

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

**“CARACTERIZAÇÃO DE QUATRO ESPÉCIES DE QUEBRA-
PEDRA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA HIFENADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA
EM MÚLTIPLOS ESTÁGIOS”**

Ricardo da Fontoura Sprenger*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S768cq

Sprenger, Ricardo da Fontoura.

Caracterização de quatro espécies de quebra-pedra utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massa em múltiplos estágios / Ricardo da Fontoura Sprenger. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
139 f.

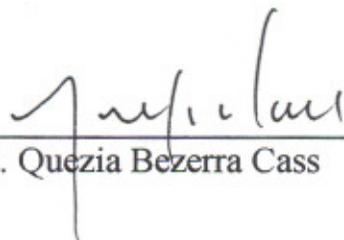
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Cromatografia líquida. 2. Produtos naturais. 3. Phyllanthus. 4. Fitoquímica. I. Título.

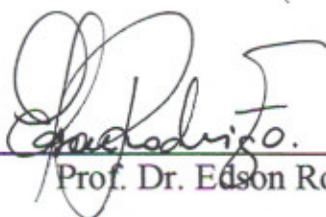
CDD: 543.0894 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

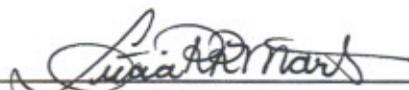
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato **Ricardo da Fontoura Sprenger**, realizada em 18 de maio de 2011:*



Prof. Dra. Quezia Bezerra Cass



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

Adquira sabedoria, adquira compreensão.

Não te esqueças e não te apartes das declarações de minha boca.

Não a abandones e ela te guardará.

Ama-a, e ela te resguardará.

Sabedoria é a coisa principal.

Adquira sabedoria; e com tudo o que adquires, adquira compreensão.

Estima-a muito, e ela te exaltará.

Ela te glorificará, porque a abraças.

Dará à tua cabeça uma grinalda de encanto;

presentear-te-á com uma coroa de beleza

(Provérbios 4:5-9)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, francamente, a oportunidade cedida pela prof^a Dr^a Quezia Bezerra Cass, orientando e auxiliando-me para que esse trabalho pudesse ser concretizado. Agradeço pelo modo paciente e consciencioso que me orientou por esses anos, tornando possível meu crescimento profissional.

Ao meu pai, Wilder Sprenger, pelo apoio incondicional e constante, como também pelo cuidado amoroso prestados por todos os anos de minha vida.

À minha mãe Kátia Dorneles da Fontoura que incutiu em mim os princípios que regem minha vida.

À minha família como um todo, mas principalmente aos meus avós Valdevino e Suzana, minha tia Delmarise e meu irmão Bruno que sempre se mostraram presentes, mesmo estando distantes.

Esses últimos dois anos foram tempos de grande aprendizado e crescimento pessoal. Tudo isso só foi possível pelo apoio, compreensão e paciência de meus amigos e colegas de trabalho. A vocês, deixo meus sinceros agradecimentos: Alexandre Cruz, Bianca Rebelo, Bruna Rubini, Fernando Almeida, Franciane Moura, Juliana Barreiro, Kenia Vanzolini, Manuela Garcia, Marcela Moraes, Marina Beghini, Marina Denadai, Neila Cassiano, Paulo Adalberto, Pedro Henrique, Regina de Oliveira, Roberta Belaz, Taciane Iceri, Tiago Lourenço, Thais Castral e Vinícius Carvalho.

Aos meus grandes amigos Flávio, Adriana, Joaquim, Amanda, João Carlos, Luciana, Terezinha, Daiane, Daniela, Edvaldo, Reneé, Andréia, Lucinéia, Bruna, Josiane, Edmundo, Tuane e Taíse. Obrigado pela amizade, apoio e compreensão em todos os momentos. Vocês constituem minha segunda família.

A técnica Luciana do Laboratório de RMN, pelo apoio e auxílio em momentos tão importantes do trabalho

Ao Dr Carlos Bloch Junior, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), por receber-me em seu laboratório e disponibilizar a utilização de equipamentos importantes para o trabalho. Agradeço também a doutoranda Mariana Quezado por auxiliar-me na realização dos experimentos.

Aos Professores exemplares, que tive o privilégio de conhecer durante o mestrado: Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Prof. Dr. João Batista Fernandes,

Profª Drª. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Prof. Dr. Timothy John Brocksom.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AlCl_3 – cloreto de alumínio

CCD – cromatografia em camada delgada

COSY – espectroscopia de correlação

DAD – detector de arranjo de diodos

ESI – ionização por electrospray

LC – cromatografia Líquida

HMBC - coerência heteronuclear de múltipla ligação

HMQC - coerência heteronuclear múltiplo-quântica

HSQC - coerência heteronuclear quântica simples

MALDI-TOF – ionização/dessorção de matriz assistida por laser combinado com analisador de massa tipo tempo de vôo

MeOH - metanol

MS – espectrometria de massa

NOESY - espectroscopia de efeito nuclear Overhauser

RMN – ressonância magnética nuclear

SPE – extração em fase sólida

UV - ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Principais características morfológicas para diferenciação das espécies oficiais de <i>Phyllanthus</i> no Brasil.....	28
TABELA 2.2 - Relação de compostos presentes em quatro espécies de Quebra-Pedra (<i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. stipulatus</i> e <i>P. tenellus</i>).....	31
TABELA 5.1 - Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato aquoso de <i>Phyllanthus</i>	44
TABELA 5.2 – Dados obtidos por LC-MS/MS no modo positivo de ionização a partir das quatro espécies de <i>Phyllanthus</i>	47
TABELA 5.3 - Dados obtidos por LC-MS/MS no modo negativo de ionização a partir das quatro espécies de <i>Phyllanthus</i>	65
TABELA 5.4 - Valores espectroscópicos de RMN da molécula de quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo.....	100
TABELA 5.5 - Lista dos compostos químicos encontrados nas espécies de quebra-pedra estudadas.....	102

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 2.1 - Quebra-pedra. Espécies <i>P. niruri</i> L. (esq.) e <i>P. tenellus</i> Roxb. (dir.).....	27
GRÁFICO 2.1 – Número de publicações contendo o descritor <i>P. niruri</i> e <i>P. tenellus</i> (área de assunto: química) indexada no banco de dados ISI Web of Knowledge.....	31
FIGURA 5.1 - Cromatograma (λ 254 e 275 nm) do extrato aquoso liofilizado de <i>P. niruri</i> conforme Método 1.....	43
FIGURA 5.2 - Cromatograma (λ 254 e 275 nm) do extrato aquoso liofilizado de <i>P. niruri</i> conforme Método 2.....	45
FIGURA 5.3 – Fragmentação da molécula de corilagina.....	48
FIGURA 5.4 - Espectro de massa da molécula de corilagina após injeção do extrato de <i>Phyllanthus amarus</i> em LC-MS/MS no modo positivo de ionização.....	49
FIGURA 5.5 – Espectro de fragmentação do íon $[(M+H)-170]^+$ de m/z 465.....	50
FIGURA 5.6 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 970g/mol já isolados de espécies de <i>Phyllanthus</i>	51
FIGURA 5.7 – Cromatogramas dos íons extraídos dos íons $[M+Na]^+$ de m/z 993 e $[(M+H)-170]^+$ de m/z 801.....	51
FIGURA 5.8 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído das bandas cromatográficas entre 29,7 a 40,1 min.....	51
FIGURA 5.9 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 952 g/mol.....	52
FIGURA 5.10 - Cromatogramas extraídos dos íons $[M+Na]^+$ de m/z 975 e $[(M+H)-170]^+$ de m/z 783.....	53
FIGURA 5.11 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica com tempo de retenção 36,4 min.....	53
FIGURA 5.12 - Espectros de fragmentação de (A) $[M+Na]^+$ de m/z 975 e (B) íon $[(M+H)-170]^+$ de m/z 783.....	53
FIGURA 5.13 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 926 g/mol.....	54
FIGURA 5.14 - Cromatogramas dos íons extraídos dos íons $[M+Na]^+$ de m/z 949 e $[(M+H)-170]^+$ de m/z 757.....	54

FIGURA 5.15 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 31,5 min.....	55
FIGURA 5.16 - Espectros de fragmentação do íon de m/z 949 [M+Na] ⁺ (A) e íon de m/z 757 [(M+H)-170] ⁺ (B).....	55
FIGURA 5.17 - Cromatogramas do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M+H] ⁺ do composto 7 de m/z 595 e do íon [M+H] ⁺ referente ao composto 8 de m/z 579.....	56
FIGURA 5.18 – Representação das fragmentações observadas em flavonas O, C-glicosiladas.....	56
FIGURA 5.19 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 34,8 min.....	57
FIGURA 5.20 – Espectro de fragmentação do íon [M+H] ⁺ m/z 595.....	57
FIGURA 5.21 - Espectro de íons totais no modo positivo de eluição extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 36,5 min.....	57
FIGURA 5.22 – Espectro de fragmentação do íon [M+H] ⁺ m/z 579.....	58
FIGURA 5.23 – Representação das fragmentações da molécula de rutina.....	58
FIGURA 5.24 - Cromatogramas do extrato de <i>P. amarus</i> extraídos dos íons [M+H] ⁺ de m/z 611 e [M+Na] ⁺ de m/z 633.....	59
FIGURA 5.25 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 39,1 min.....	59
FIGURA 5.26 - Espectro de fragmentação do íon [M+H] ⁺ m/z 611.....	59
FIGURA 5.27 - Cromatograma do extrato de <i>P. amarus</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 633.....	60
FIGURA 5.28 - Espectro de íons totais no modo negativo extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de 29,0 min.....	60
FIGURA 5.29 - Espectro de fragmentação íon [M-H] ⁻ de m/z 633.....	61
FIGURA 5.30 - Representação da fragmentação da molécula de ácido gálico.....	61
FIGURA 5.31 – Cromatograma e espectro de íons totais no modo negativo extraído do composto ácido gálico.....	62
FIGURA 5.32 – Espectro de fragmentação do íon [M-H] ⁻ m/z 169.....	62
FIGURA 5.33 – Representação da fragmentação da molécula de ácido carboxílico de brevifolina.....	63
FIGURA 5.34 – Cromatograma e espectro de íons totais no modo negativo extraído do composto ácido carboxílico de brevifolina.....	63
FIGURA 5.35 - Espectro de fragmentação do íon [M-H] ⁻ m/z 583.....	64

FIGURA 5.36 – Cromatograma e espectro de íons totais no modo negativo de ionização do composto corilagina após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS.....	67
FIGURA 5.37 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 583.....	68
FIGURA 5.38 - Espectro de massa do composto do item 3 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	68
FIGURA 5.39 - Espectro de fragmentação do íon [M-H] ⁻ de m/z 291.....	69
FIGURA 5.40 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 969.....	69
FIGURA 5.41 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 925.....	70
FIGURA 5.42 - Espectro de íons totais no modo negativo dos compostos do item 4 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS.....	70
FIGURA 5.43 - Espectro de íons totais no modo negativo dos compostos do item 5 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS.....	71
FIGURA 5.44 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 593.....	72
FIGURA 5.45 – Representação da fragmentação da molécula de orientem-2"-O-ramanosídeo.....	73
FIGURA 5.46 - Espectro de massa do composto do item 7 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	73
FIGURA 5.47 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 447.....	74
FIGURA 5.48 – Representação da fragmentação da molécula de orientina.....	75
FIGURA 5.49 - Espectro de massa do composto do item 8 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	75
FIGURA 5.50 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 577.....	76
FIGURA 5.51 – Representação da fragmentação da molécula de vitexina-2"-O-ramanosídeo.....	77
FIGURA 5.52 - Espectro de massa do composto de número 9 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	77
FIGURA 5.53 - Cromatograma do extrato de <i>P. stipulatus</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de	

m/z 953.....	78
FIGURA 5.54 - Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 954 g/mol.....	79
FIGURA 5.55 - Espectro de massa do composto do item 10 após injeção do extrato de <i>P. stipulatus</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	79
FIGURA 5.56 - Possíveis estruturas representantes dos flavonóides dos itens 11, 15 e 17.....	80
FIGURA 5.57 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 463.....	80
FIGURA 5.58 - Espectro de massa do composto do item 11 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	81
FIGURA 5.59 - Cromatograma do extrato de <i>P. stipulatus</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 463.....	81
FIGURA 5.60 - Espectro de massa do composto do item 15 após injeção do extrato de <i>P. stipulatus</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	82
FIGURA 5.61 - Cromatograma do extrato de <i>P. niruri</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 447.....	82
FIGURA 5.62 - Espectro de massa do composto do item 17 após injeção do extrato de <i>P. niruri</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	83
FIGURA 5.63 - Cromatograma do extrato de <i>P. tenellus</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 609.....	84
FIGURA 5.64 - Espectro de massa do composto do item 13 após injeção do extrato de <i>P. tenellus</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	85
FIGURA 5.65 - Cromatograma do extrato de <i>P. stipulatus</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 477.....	85
FIGURA 5.66 – Representação da fragmentação da molécula de quercetina-3-O-glucuronídeo.....	86
FIGURA 5.67 - Espectro de massa do composto do item 16 após injeção do extrato de <i>P. stipulatus</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	86
FIGURA 5.68 - Cromatograma do extrato de <i>P. tenellus</i> extraídos do íon [M-H] ⁻ de m/z 477.....	87
FIGURA 5.69 - Possíveis estruturas do flavonóide representado pelo item 18.....	87
FIGURA 5.70 - Espectro de massa do composto do item 18 após injeção do extrato de <i>P. tenellus</i> em LC-MS/MS no modo negativo de ionização.....	88

FIGURA 5.71 – Isolamento e fragmentação do íon fragmento de m/z 301 a partir do íon molecular de m/z 633 relativo à molécula de corilagina.....	89
FIGURA 5.72 – Isolamento e fragmentação do íon de m/z 301 a partir do íon molecular de m/z 609 referente à molécula de rutina.....	89
FIGURA 5.73 – Representação das principais fragmentações da quercetina no modo negativo de ionização.....	90
FIGURA 5.74 - Cromatograma da amostra do extrato aquoso de <i>P. stipulatus</i>	91
FIGURA 5.75 - Cromatograma do extrato aquoso de <i>P. stipulatus</i> para isolamento dos compostos de interesse.....	91
FIGURA 5.76 - Cromatograma de extrato aquoso de <i>P. stipulatus</i> em sistema semipreparativo.....	92
FIGURA 5.77 - Cromatograma da fração 1, purificada em sistema semipreparativo.....	93
FIGURA 5.78 - Cromatograma da fração 2, purificada em sistema semipreparativo.....	94
FIGURA 5.79 - Cromatograma da fração 2.....	94
FIGURA 5.80 - Cromatograma da fração 2, repurificada em sistema semipreparativo.....	95
FIGURA 5.81 - Estrutura química da isocorilagina (1) e corilagina (2).....	97
FIGURA 5.82 - Espectro de massa da corilagina por inserção direta de amostra em electrospray no modo negativo.....	98
FIGURA 5.83 – Representação da fragmentação da molécula de corilagina.....	98
FIGURA 5.84 – Importante acoplamento observado no experimento de HMBC.....	99
FIGURA 5.85 - Espectro de massa da molécula de quercetina-3-O-β-D-glucuropiranosídeo por inserção direta de amostra em electrospray no modo negativo.....	101

SUMÁRIO

RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 - INTRODUÇÃO.....	18
2 – JUSTIFICATIVA.....	21
2.1 - Controle de Qualidade Químico de Amostras Vegetais para fins Terapêuticos.....	21
2.1.1 - Quantificação de Marcadores Químicos por Cromatografia Líquida.....	23
2.1.2 - Perfil Cromatográfico de Extratos Vegetais e suas Aplicações em Controle de Qualidade de Fitoterápicos.....	24
2.1.3 - Técnicas Modernas de Acoplamento e suas Aplicações no Controle de Qualidade de Fitoterápicos.....	25
2.2 - Gênero <i>Phyllanthus</i> – Aspectos Botânicos, Químicos e Farmacológicos.....	26
2.2.1 - Aspectos Botânicos.....	26
2.2.2 - Aplicações terapêuticas e estudos farmacológicos.....	29
2.2.3 - Aspectos Químicos de <i>Phyllanthus</i>	30
2.2.3.1 - Controle de Qualidade Químico em Amostras de <i>Phyllanthus</i>	34
3 – OBJETIVOS.....	37
3.1 – Objetivos Gerais.....	37
3.2 – Objetivos Específicos.....	37
4 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	38
4.1 – Espectrometria de massa.....	38
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 – Obtenção das Amostras Vegetais.....	41
5.2 – Processo de Extração.....	41
5.3 - Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para Aplicação em LC-MS.....	42
5.4 - Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada a Espectrometria de Massa.....	45
5.4.1 - Resultados do Experimento 1.....	45
5.4.2 - Resultados do Experimento 2.....	64

5.4.3 – Resultados do Experimento 3.....	88
5.5 - Isolamento e caracterização de marcador químico.....	90
5.5.1 – Caracterização espectroscópica da fração 1.....	95
5.5.2 - Caracterização espectroscópica da fração 2.....	98
5.6 – Resultados dos Experimentos de Caracterização Química das Espécies de <i>Phyllanthus</i> estudadas.....	101
6 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	104
6.1 - Materiais e Equipamentos.....	104
6.2 - Preparo dos Extratos Aquosos.....	106
6.3 - Procedimentos para Análises por LC-MS.....	106
6.3.1 - Condições cromatográficas para realização de análises por LC-MS dos extratos aquosos de <i>Phyllanthus</i>	106
6.3.2 - Condições espectrométricas para realização de análises por LC-MS dos extratos aquosos de <i>Phyllanthus</i>	107
6.3.2.1 - Experimento 1.....	107
6.3.2.2 - Experimento 2.....	108
6.3.2.3 - Experimento 3.....	108
6.4 - Isolamento e Caracterização de Compostos de Interesse.....	109
6.4.1 - Preparo das Amostras para Injeção em Sistema Semipreparativo.....	109
6.4.2 - Condições Cromatográficas para Isolamento e Caracterização Química...	110
7 – CONCLUSÕES.....	112
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
APÊNDICE 1.....	128
APÊNDICE 2.....	132

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE QUATRO ESPÉCIES DE QUEBRA-PEDRA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HIFENADO A ESPECTROMETRIA DE MASSA EM MÚLTIPLOS ESTÁGIOS. O presente trabalho apresenta os resultados do uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada à espectrometria de massa na diferenciação/caracterização química de extratos aquosos de amostras vegetais popularmente conhecidas como “quebra-pedra” pertencente ao gênero *Phyllanthus*. As espécies estudadas foram *P. amarus*, *P. stipulatus*, *P. niruri* e *P. tenellus*, sendo estas duas últimas as oficiais na Farmacopeia Brasileira. As amostras vegetais utilizadas foram cultivadas e coletadas no campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O objetivo do trabalho foi comparar quimicamente as quatro espécies de *Phyllanthus* através da caracterização de seus metabólitos secundários. A caracterização estrutural dos metabólitos secundários foi alcançada por meio da interpretação dos dados de fragmentação obtidos nos experimentos on-line de MS/MS e MS³ usando espectrômetro de massa tipo *íon trap* equipado com fonte de ionização tipo *electrospray*, no modo negativo e positivo de ionização. Diversos compostos químicos foram elucidados, sendo alguns destes comuns às quatro espécies e outros exclusivos de uma única espécie, esse trabalho apresenta e discute os resultados encontrados. Separações por LC-UV semipreparativa também foram realizadas, purificando-se assim dois compostos a partir da espécie *P. stipulatus*. A elucidação estrutural foi realizada utilizando técnicas espectroscópicas como espectrometria de massa e RMN, sendo estes caracterizados como corilagina e quercetina-3-O-β-D-glucuronopiranosídeo, um flavonol pouco usual em produtos naturais.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF FOUR SPECIES OF STONE BREAKER USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY. This work presents the results of the use of High Performance Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry in the chemical differentiation/characterization of aqueous extracts of plant samples of the genus *Phyllanthus*, commonly named as "stone braker". The species studied were *P. amarus*, *P. stipulatus*, *P. niruri* and *P. tenellus*. For medical purposes, the Brazilian Pharmacopoeia recognizes only *P. niruri* and *P. tenellus*. Samples of the plants used were grown and collected on the campus of Federal University of São Carlos (UFSCar). The goal of the work here reported was to compare the four species through the characterization of secondary metabolites. Structural characterization of secondary metabolites was achieved by interpretation of fragmentation data obtained in the online experiments of MS/MS and MS³ using ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source in positive and negative mode of ionization. Several chemical compounds were elucidated; some of them presents in all four species while others were found in a single species, this work presents and discusses the results. Furthermore two compounds from the species of *P. stipulatus* were isolated by semi-preparative liquid chromatography. These two isolated compounds were fully characterized by mass spectrometry and NMR, as corilagin and quercetin-3-O- β -D-glucuronopyranoside, an unusual flavonol in natural products.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais constituiu-se, por séculos, como o principal suporte terapêutico para a humanidade. Contudo, em meados do século XX, a utilização de medicamentos de origem sintética tornou-se mais ampla que o uso de plantas medicinais, especialmente em países desenvolvidos, devido ao maior poder aquisitivo. Atualmente, em contrapartida, a cultura de valorização do uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades vem sendo resgatada em decorrência, muitas vezes, dos efeitos adversos dos fármacos sintéticos, da preferência por tratamentos de origem “natural”, da crescente validação científica das propriedades farmacológicas das espécies vegetais e/ou do relativo baixo custo dos fitoterápicos^{1,2}. Estima-se também que aproximadamente 44% do atual arsenal terapêutico tem sido desenvolvido a partir de produtos naturais, e que 25% dos medicamentos prescritos nos países desenvolvidos são oriundos de plantas superiores³.

Em muitos países em desenvolvimento, como Etiópia, Benin, Índia, Ruanda, Tanzânia e Uganda, a população utiliza majoritariamente a medicina tradicional no tratamento primário à saúde, destacando-se o uso de plantas medicinais. Por outro lado, mesmo em países desenvolvidos como Alemanha, França, Canadá, Austrália e Estados Unidos, a utilização de medicinas alternativas tem crescido significativamente. Sobressai-se nesse contexto a Alemanha, onde se estima que cerca de 80% da população utiliza alguma medicina alternativa ou complementar, dentre as quais a fitoterapia tem destaque especial⁴.

No Brasil, o acesso a medicamentos no âmbito de atenção básica a saúde compromete de maneira significativa o orçamento familiar, espoliando recursos importantes para outras necessidades básicas⁵. Contudo, existe uma carência com respeito a dados populacionais recentes quanto ao acesso a medicamentos.

Nesse contexto social, os fitoterápicos e as plantas medicinais adquirem importância ímpar na saúde pública brasileira, tanto que em 1988 foi regulamentada a implementação da fitoterapia no âmbito da saúde pública, através da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (Ciplan)⁶. Posteriormente, em 2006, foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), que ampliou as opções

terapêuticas do SUS, garantindo aos seus usuários o acesso a tratamentos de saúde por meio de plantas medicinais e fitoterápicos⁷.

Em 2006, o número de empresas produtoras de fitoterápicos alcançou 103 laboratórios, com 367 fitoterápicos comercializados, referentes a 53 classes terapêuticas. Em termos financeiros, o segmento de fitoterápicos brasileiro faturou, no período de novembro de 2003 a outubro de 2006, R\$ 1.840.228.655,00 com a venda de 122.696.549 unidades farmacêuticas, ou embalagens de medicamentos⁸.

Acompanhando o passo do crescimento industrial, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em conformidade com suas atribuições, implementou diversas resoluções com o objetivo de normatizar a comercialização e registro de fitoterápicos. As resoluções específicas são a RDC 48, complementada pelas RE 88, 89, 90 e 91 publicadas em 2004 e a RDC nº 10 de 2010⁹⁻¹⁴. Os aspectos abordados pelas legislações em vigor são: a normatização da produção e da comercialização; estudos de eficácia pré-clínica e clínica; estudos toxicológicos; normas para o controle de qualidade de drogas vegetais, seus derivados e também para o produto acabado.

Em vista da crescente expansão do mercado de fitoterápicos, bem como da inclusão dos mesmos em políticas de saúde pública, se faz urgente a análise criteriosa de aspectos relacionados à eficácia, segurança e qualidade destes¹⁵.

A eficácia está relacionada à comprovação dos efeitos biológicos, por meio de ensaios farmacológicos clínicos e pré-clínicos, enquanto a segurança relaciona-se a possíveis efeitos adversos^{16,17}.

A qualidade é um aspecto que envolve todo o processo de produção, englobando tanto o estabelecimento rigoroso de padrões de qualidade da matéria-prima até os processos de preparação de extratos vegetais, a fim de se obter produtos com uniformidade química¹⁸.

Além dos processos de fabricação uniformes, as técnicas de análise que permitem avaliar a autenticidade e a qualidade dos produtos de origem vegetal são indispensáveis diante da complexidade inerente aos fitoterápicos¹⁹.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo analisar uma das espécies medicinais mais amplamente conhecida, divulgada e utilizada na medicina popular do Brasil, o quebra-pedra. Para isso, foi desenvolvido e aplicado um método analítico por Cromatografia Líquida acoplado à espectrometria de massa

visando à caracterização química de quatro espécies de quebra-pedra.

Em abordagem inicial, o trabalho descreve as condições analíticas cromatográficas otimizadas para a análise dos extratos vegetais por técnica acoplada à espectrometria de massa em estágios múltiplos, a saber, MS/MS e MS³. A interpretação dos dados de fragmentação obtidos tem por finalidade a caracterização das espécies de quebra-pedra em estudo por meio da identificação de seus constituintes químicos.

No presente trabalho também foram realizadas separações cromatográficas em escala semipreparativa, para isolamento de marcadores químicos, os quais foram posteriormente caracterizados estruturalmente por técnicas espectroscópicas.

Deste modo, buscou-se o desenvolvimento de um método, que possibilitasse a análise da complexidade química das amostras vegetais, permitindo a identificação de marcadores químicos com substancial economia de tempo e menor consumo de solvente.

2 - JUSTIFICATIVA

2.1 - Controle de Qualidade Químico de Amostras Vegetais para fins Terapêuticos

O controle de qualidade de produtos vegetais para fins terapêuticos é realizado através de diversos procedimentos que visam assegurar a qualidade, eficácia e segurança dos mesmos. Esse controle deve seguir os parâmetros estabelecidos por órgãos oficiais, nacionais ou internacionais, os quais são publicados por meio de farmacopeias, códigos oficiais e/ou monografias. Estes, de modo geral, preconizam procedimentos de diferentes naturezas como análises químicas, físicas, físico-químicas e microbiológicas, que devem ser realizados durante todo o processo de fabricação, ou seja, desde a matéria-prima ao produto final, de modo a comprovar a autenticidade, pureza e conteúdo das amostras de plantas medicinais, bem como, assegurar níveis aceitáveis de contaminantes químicos e microbiológicos²⁰⁻²².

O controle de qualidade químico de espécies vegetais apresenta alguns desafios a serem contornados. O primeiro refere-se à estreita relação entre composição química e as condições ambientais, ou seja, fatores como sazonalidade, ciclo circadiano, etapa de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica e nutricional, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica, estímulos mecânicos e patógenos podem alterar sobremaneira a taxa de produção de alguns metabólitos secundários²³. O segundo desafio relaciona-se à grande complexidade química inerente as espécies vegetais, cuja atividade biológica pode ser, em muitos casos, atribuída ao efeito sinérgico de diversas substâncias químicas¹⁹. Além disso, os princípios ativos não são suficientemente estabelecidos³, o que torna o controle de qualidade uma atividade complexa, visto a preferência ao desenvolvimento de métodos analíticos de quantificação de compostos ativos para a padronização de fitoterápicos^{24,25}.

Geralmente, o passo inicial no controle de qualidade de fitoterápicos é a verificação da autenticidade do material vegetal, o qual pode ser realizado através da identificação botânica – método comumente laborioso e de difícil interpretação – ou por meio de métodos químicos que visam verificar a presença de compostos que

apresentem preferencialmente atividade biológica e/ou marcadores químicos²⁶.

O controle de qualidade químico de fitoterápicos engloba uma ampla diversidade de técnicas de diferentes naturezas. Dentre essas, pode-se citar as técnicas clássicas de reações de caracterização de classes de compostos químicos, bem como técnicas cromatográficas mais avançadas.

As técnicas clássicas de identificação de classes de compostos (fenóis, taninos, saponinas, alcaloides, esteroides livres e outros), apesar de seu baixo custo e rapidez de análise, apresentam o inconveniente de serem pouco sensíveis e inespecíficas, pois várias classes de metabólitos secundários são comuns a diferentes espécies vegetais. Portanto, tais técnicas mostram-se mais úteis como métodos químicos preliminares^{27,28}.

Os métodos cromatográficos são bastante amplos, envolvendo desde técnicas simples até técnicas mais avançadas de separação. Dentre essas, a cromatografia em camada delgada (CCD) geralmente representa uma técnica de análise simples, rápida e de baixo custo que aliado a reveladores globais e/ou específicos a classes químicas torna-se um procedimento útil como método químico preliminar. A CCD pode também ser acoplada a analisadores de imagem digital que permitem a quantificação de composto químicos²⁹ e até mesmo a espectrômetros de massa como MALDI-TOF propiciando análise estrutural de metabólitos secundários³⁰. Outra técnica amplamente utilizada é a Cromatografia Líquida (LC), a qual possibilita tanto quantificação de marcadores químicos³¹, estabelecimento de perfis cromatográficos²⁶ como a identificação *on-line* de compostos químicos^{32,33}.

Os métodos cromatográficos também são aplicados na fitoquímica convencional, visando o isolamento de marcadores químicos. Entre estes, a cromatografia em coluna aberta ou flash são extensamente utilizadas, contudo consomem grandes quantidades de solventes orgânicos e exigem trabalho minucioso e demorado e, não raro, apresentam baixa produtividade e pureza³⁴.

Por sua vez, o avanço das técnicas de LC em escala semipreparativa e preparativa possibilitaram o aperfeiçoamento de técnicas de isolamento em matrizes vegetais complexas, tornando essa operação mais rápida, eficaz e viável economicamente^{17,35}.

O isolamento de metabólitos secundários, seguido da elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas, possibilitam a ampliação do conhecimento quimiotaxônomico de espécies vegetais³⁴, a descoberta de novas substâncias

químicas³⁶, bem como grandes avanços em pesquisas de atividade biológica³⁷.

2.1.1 - Quantificação de Marcadores Químicos por Cromatografia Líquida

O controle de qualidade de amostras de origem vegetal geralmente é realizado a partir da quantificação de compostos químicos conhecidos de uma espécie vegetal, preferencialmente aqueles relacionados às atividades biológicas ou marcadores quimiotaxonômicos. Contudo, não raro, estes compostos não estão disponíveis comercialmente, requerendo o isolamento e caracterização²⁶.

A LC representa uma ferramenta amplamente utilizada no controle de qualidade de fitoterápicos. Sua extensa aplicabilidade deve-se grandemente à capacidade de propiciar análises rápidas com alta resolução, precisão, exatidão e robustez^{31,38}. A cromatografia líquida em geral apresenta grande versatilidade em face da possibilidade de utilização de diferentes modos de eluição aliado a grande diversidade de fases móveis disponíveis. O seu constante aperfeiçoamento também tem impulsionado sua utilização. Recentes aperfeiçoamentos incluem a utilização de equipamentos cada vez mais robustos como UHPLC (cromatografia líquida de ultra-alta pressão), os quais possibilitam o desenvolvimento de análises em curto período de tempo com alta resolução, quando utilizados com colunas cromatográficas como tamanho de partícula reduzido³⁹⁻⁴².

Os equipamentos de LC podem ser acoplados a uma grande variedade de detectores. No controle de qualidade químico de fitoterápicos os equipamentos de LC são geralmente acoplados a detectores de UV, especialmente arranjo de fotodiodos, devido à grande disponibilidade destes em laboratórios de pesquisa, como também, ao fornecimento de dados sobre algumas classes de compostos. No entanto, o uso desses detectores se restringe a compostos que apresentam grupo cromóforos. A utilização de espectrômetro de massa acoplado à cromatografia líquida, em contrapartida, apresenta as vantagens de ser um detector de alta sensibilidade e com capacidade de separação de massas³⁴.

Embora os métodos de quantificação de marcadores químicos sejam fundamentais e amplamente utilizados no controle de qualidade de fitoterápicos, existe uma grande dificuldade em estabelecer um marcador ideal que possua a

atividade terapêutica e seja exclusivo da espécie. A seleção do marcador químico normalmente é dirigida por evidências empíricas e disponibilidade comercial de padrões de referência sendo geralmente eleitos aqueles componentes de maior prevalência. Adicionalmente, em face da complexidade química de produtos de origem vegetal a quantificação de determinado marcador químico não representa um controle de qualidade seguro e específico que garanta a autenticidade de uma espécie vegetal^{43,44}.

2.1.2 - Perfil Cromatográfico de Extratos Vegetais e suas Aplicações em Controle de Qualidade de Fitoterápicos

A utilização de perfis químicos ou “*fingerprints*” vem sendo empregada por muitos pesquisadores para a análise de amostras vegetais, aplicando-se variadas técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas^{45,46}.

O perfil cromatográfico é uma ferramenta bastante útil no controle de qualidade de plantas medicinais, pois permite a análise da amostra como um todo, estabelecendo parâmetros comparativos de semelhanças e diferenças de diversos extratos submetidos ao mesmo procedimento de extração e análise⁴⁷. Dessa maneira, estabelece-se a qualidade de uma amostra por meio de uma ferramenta analítica que leva em conta a sua complexidade e não somente a presença ou ausência de determinados constituintes em detrimento a diversas outras substâncias químicas^{26,46}. Conseqüentemente a análise de perfis cromatográficos torna-se uma ferramenta de ampla aplicação, podendo ser utilizada para determinação de autenticidade e identificação de espécies, análise de estabilidade entre diferentes extratos, análise de consistência (variação lote-a-lote) de matérias-primas e de fitoterápicos, e estudos de variabilidade sazonal e acompanhamento de cultivares^{43,48,49}.

Por fim, embora o uso de perfis cromatográficos seja uma ferramenta muito útil, a mesma apresenta o inconveniente de ser muito trabalhosa, pois requer trabalho minucioso e cuidadoso no preparo amostra, no método de extração e durante a eluição cromatográfica de modo que todas as amostras sejam uniformes e o método seja reprodutivo. Adicionalmente a utilização de perfis cromatográficos para a classificação de espécies vegetais requer extenso tratamento de dados por

meio de ferramentas matemáticas de análise multivariada^{26,46,50,51}.

2.1.3 - Técnicas Modernas de Acoplamento

O acoplamento da cromatografia líquida a técnicas espectroscópicas como UV, MS e RMN tem sido utilizado por diversos pesquisadores, pelo fato de constituírem ferramentas muito úteis na caracterização de misturas complexas⁵²⁻⁵⁹.

O LC-UV, principalmente quando equipado com arranjo de fotodiodos (LC-DAD), é amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa por fornecer dados importantes sobre determinadas classes de substâncias, contudo somente os dados de absorvância são insuficientes para elucidação estrutural⁵⁴.

Por outro lado, o acoplamento a espectrometria de massa apresenta como vantagens o grande poder de separação de massas e a possibilidade de elucidação estrutural sem a necessidade de isolamento e purificação dos compostos⁵³. Apresenta também a capacidade de seleção de íons precursores, fragmentação dos mesmos e isolamento dos íons fragmentos, o que possibilita a detecção e quantificação de diversas substâncias, inclusive se as mesmas apresentarem o mesmo tempo de retenção durante a eluição cromatográfica⁵³. No entanto, os dados obtidos pela fragmentação nem sempre são suficientes para uma análise estrutural conclusiva, especialmente no que concerne a estereoisômeros^{34,54}.

A espectroscopia de RMN representa uma das principais ferramentas para elucidação estrutural. Consequentemente, o acoplamento do LC ao RMN pode prover a completa elucidação estrutural, sem a necessidade de isolamento e purificação. Entretanto, o LC-RMN apresenta como desvantagem a pequena sensibilidade, especialmente em experimentos mais sofisticados como COSY, NOESY, HMQC. Com a finalidade de contornar essa limitação, uma alternativa é a utilização da técnica hifenada LC-SPE-RMN. Nessa configuração os cartuchos de SPE são inseridos entre o LC e o espectrômetro de RMN, de modo que os compostos eluídos sejam retidos e concentrados no cartucho de SPE. Posteriormente cada composto é eluído para dentro da sonda de RMN com solvente deuterado⁵⁴. A utilização dessa técnica é bastante recente, existindo um número limitado de publicações em produtos naturais^{54,56,57,60-66}.

2.2 - Gênero *Phyllanthus* – Aspectos Botânicos, Químicos e Farmacológicos

2.2.1 - Aspectos Botânicos

O gênero *Phyllanthus* pertence à família Phyllanthaceae, táxon recentemente desmembrado da família Euphorbiaceae, apresentando cerca de 2000 espécies distribuídas em 59 gêneros⁶⁷.

Esse gênero possui ampla distribuição, tendo, porém, predominância tropical, especialmente a região tropical da Ásia. O gênero destaca-se também por ser um dos principais da família, possuindo aproximadamente 750 espécies, sendo que cerca de 107 destas ocorrem no Brasil^{26,68,69}.

As espécies pertencentes a esse gênero apresentam hábito variado, sendo principalmente herbáceo, havendo, contudo espécies arbóreas de pequeno porte e arbustos. No Brasil essas espécies são popularmente conhecidas como quebra-pedra, sendo classificadas como espécies semiperenes, pois vegetam por um período de 3 a 4 anos. Crescem especialmente nos períodos chuvosos em todo o tipo de solo, sendo comum a sua ocorrência em fendas de calçadas, terrenos baldios, quintais e jardins^{26,68-70}.

As espécies denominadas quebra-pedra geralmente possuem porte herbáceo, ramificação filantoide, glabra, medindo cerca de 40 a 80 cm. Possuem folhas simples, membranáceas, medindo até 1 cm de comprimento e dispostas em ramos em semelhança a folhas compostas. Apresentam inflorescências cimosas, axilares, paucifloras, às vezes reduzidas a uma única flor e viradas para baixo. As flores são gamossépalas, com discos nectaríferos usualmente segmentados. Os frutos são cápsulas tricoca com aproximadamente 1 mm de diâmetro com sementes geralmente trígonas e ornamentadas^{26,68-70}.

Devido à grande complexidade do gênero, a classificação taxonômica torna-se laboriosa e sujeita a interpretações errôneas. As características das flores apresentam utilização limitada devido ao tamanho reduzido e pouca variação morfológica de suas partes. Assim, o principal aspecto de classificação é a distribuição espacial dos ramos e das flores masculinas e femininas, aliado a morfologia das sementes, uma vez que não existem espécies com a mesma combinação de tamanho e padrão de ornamentação⁷¹.

Conforme a 4ª edição da Farmacopeia Brasileira a droga vegetal popularmente conhecida como erva-pombinha, quebra-pedra e falso-quebra-pedra é constituída por folhas e ramos secos de *Phyllanthus niruri* e suas subespécies, *Phyllanthus niruri* ssp. *niruri* L. e *Phyllanthus niruri* ssp. *lathyroides* (Kunth) G.L. Webster, e *Phyllanthus tenellus* Roxb⁷².

As duas espécies apresentam características semelhantes quanto aos caracteres organolépticos, possuindo sabor amargo no início da mastigação, tornando-se suave posteriormente, e também descrição anatômica muito semelhante. As características morfológicas são os principais determinantes na distinção das duas espécies, destacando-se a forma e tamanho das folhas, características das flores e frutos além da coloração do caule⁷². A FIGURA 2.1 ilustra as características morfológicas que diferenciam as espécies.



FIGURA 2.1 - Quebra-pedra. Espécies *P. niruri* L. (esq.) e *P. tenellus* Roxb. (dir.)⁷⁰

As principais características morfológicas para diferenciação das espécies de *Phyllanthus* encontram-se na TABELA 2.1.

TABELA 2.1 - Principais características morfológicas para diferenciação das espécies oficiais de *Phyllanthus* no Brasil⁷³

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

2.2.2 - Aplicações terapêuticas e estudos farmacológicos

O gênero *Phyllanthus* é amplamente utilizado na medicina popular sendo reconhecido desde longa data como eficiente remédio na eliminação de cálculos renais e como diurético^{70,74-80}. As espécies de quebra-pedra também são utilizadas como analgésico, antiespasmódico, relaxante muscular e antisséptico das vias urinárias, colagogo, galactagogo, hipoglicemiante, eupépticos, antimenorrágico, antitussígeno e no tratamento de icterícia, hipertensão, cistite, hepatite B, afecções da pele, resfriados, gota, gonorreia, constipação, dispepsia e disenteria^{70,74-80}.

Diversos estudos farmacológicos com espécies de *Phyllanthus* têm sido recentemente publicados, destacando-se as pesquisas com *P. niruri* especialmente em urolitíase. Murugaiyah e Chan⁸¹ avaliaram o efeito do extrato metanólico de *P. niruri* sobre a excreção de ácido úrico em ratos com hiperuricemia. O trabalho demonstrou que o extrato de *P. niruri* aumentou a excreção de ácido úrico, juntamente com outros compostos dele já extraído, hipofilantina e filtetralina.

Nishiura *et al.*⁸² realizaram estudos clínicos em pacientes com cálculos renais. Esses foram tratados com cápsulas de extrato aquosos liofilizados (cápsulas de 450 mg contendo 2% do extrato, três vezes ao dia) durante 3 meses. Os resultados demonstraram significativa redução nos níveis de cálcio urinário.

Barros *et al.*⁸³ analisaram o efeito do extrato aquoso de *P. niruri* sobre a cristalização *in vitro* de oxalato de cálcio em urina de ratos e humanos. Embora o extrato de *P. niruri* não tenha inibido a precipitação e formado ainda mais cristais, os mesmos foram significativamente menores. A agregação e o crescimento de cristais após 24 horas de cristalização foram inibidos demonstrando que o extrato de *Phyllanthus* provavelmente interfere nos estágios iniciais da formação dos cálculos podendo assim representar uma alternativa no tratamento e/ou prevenção de urolitíase.

Em outro estudo Barros *et al.*⁸⁴ avaliaram o efeito do extrato aquoso de *P. niruri* em cálculos pré-formados induzidos pela introdução de oxalato de cálcio na bexiga de ratos. O tratamento com extrato de *Phyllanthus* (5 mg/rato/dia) foi iniciado imediatamente ou depois de 30 dias. Os animais foram sacrificados 50 ou 70 dias depois da cirurgia inicial, e a análise dos cálculos nos animais tratados precocemente demonstrou redução significativa no número (75%, $p < 0,05$) e na massa (65%, $p < 0,05$) dos mesmos. O tratamento iniciado após 30 dias, embora

não tenha evitado o crescimento dos cálculos, causou uma modificação na aparência dos mesmos, os quais se apresentaram mais suaves e homogêneos em comparação com os cálculos espinhosos presentes nos animais não tratados. Análises por difração de raio-X demonstraram que não houveram alterações na composição da estrutura cristalina dos cálculos, sugerindo que o extrato interfere no arranjo cristalino, modificando as interações cristal matriz. Os resultados obtidos sugerem um grande potencial terapêutico da espécie *P. niruri* no tratamento de casos de urolitíase por deposição de oxalato de cálcio

Os trabalhos acima demonstram que a espécie de *P. niruri* constitui-se uma fonte promissora para o desenvolvimento de um novo fitoterápico para tratamento ou prevenção de reincidência de litíase renal, contudo ainda são necessários outros estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos a fim de consolidar sua aplicação terapêutica.

2.2.3 - Aspectos Químicos de *Phyllanthus*

Devido à grande variedade de aplicações terapêuticas das espécies de quebra-pedra, estas têm sido alvo de diversos estudos fitoquímicos com o objetivo de isolamento e identificação de constituintes químicos. A literatura fitoquímica do gênero *Phyllanthus* é exuberante, destacando-se a espécie *P. niruri*, a qual apresenta literatura fitoquímica mais extensa. Por outro lado, curiosamente a espécie *P. tenellus*, incluída na Farmacopeia Brasileira⁶³, carece de número considerável de publicações (GRÁFICO 2.1). Dentre as classes de compostos mais isolados do gênero destacam-se os alcaloides, flavonoides, taninos e lignanas. Na TABELA 2.2 estão alistados os constituintes químicos das espécies *P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*, selecionadas para o trabalho aqui descrito.

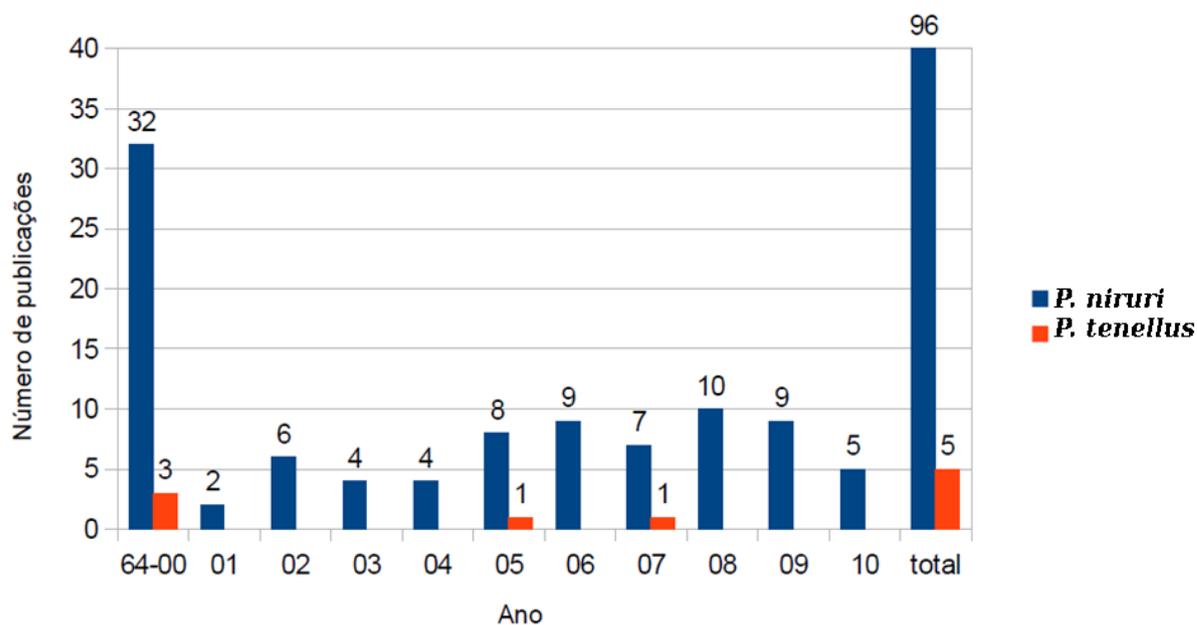


GRÁFICO 2.1 – Número de publicações contendo descritor *P. niruri* e *P. tenellus* (área de assunto: química) indexada no banco de dados ISI Web of Knowledge⁸⁵

TABELA 2.2 - Relação de compostos presentes em quatro espécies de Quebra-Pedra (*P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*)

Espécie	Classe	Compostos
<i>P. amarus</i>	alcaloides	isobubialina, epibubialina, filantina, securinina e norsecurinina ⁸⁶
	benzenoides	ácido gálico e ácido elágico ⁸⁷
	esteroides	amarosterol A e amarosterol B ⁸⁸
	flavonoides	rutina e quercetrina ^{89,90} ; galocatequina ⁹⁰
	hidrocarbonetos	pentacosano e naftaleno ⁹¹
	lignanas	filantina e hipofilantina ^{31,87,93} ; 3-(3,4-dimetoxi-benzil)-4-(7-metoxi-benzo[1,3]dioxol-5-il-metil)-dihidrofuran-2-onae 4-(3,4-dimetoxi-fenil)-1-(7-metoxi-benzo[1,3]dioxol-5-il)-2,3-bis-metoximetil-butan-1-ol ⁹²

TABELA 2.2 - Relação de compostos presentes em quatro espécies de Quebra-Pedra (*P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*) (continuação)

Espécie	Classe	Compostos
<i>P. amarus</i>	taninos	corilagina ^{26,89} ; 1-galoil-2,3-dehidrohexahidroxidifenil-glucose ⁸⁹ ; amarina e geranina ^{89,90} ; ácido repandusínico, ácido amarínico, elaeocarpusina e ácido geranínico ^{89,94} ; filantusina D ^{89,95} ; 1,6-digaloilglucopiranosídeo e furosina ⁹⁰
	terpenos	linalol e fitol ⁹¹
	outros	hexahidrofarnesil acetona ⁹¹
<i>P. niruri</i>	alcaloides	nirurina ⁹⁰ ; 4-metoxinorsecurinina ^{90,96} ; ent-norsecurinina ^{90,97} ; 4-metoxisecurinina ⁹⁶ ; 4-metoxidihidronorsecurinina, 4-metoxitetrahidrosecurinina, 4-hidroxisecurinina, securinina, dihidrosecurinina, tetrahidrosecurinina, securinol A, securinol B, alosecurinina e norsecurinina ⁹⁸
	benzenoides	ácidogálico ^{90, 99-101} ; ácido elágico ¹⁰¹
	esteroides	estradiol ⁹⁰ ; β -sitosterol ^{90,99} ; isopropil-24-colesterol ^{90, 102}
	flavonoides	quercitrina, isoquercitrina e nirurina ⁹⁰ ; quercetina, astragalina e fisetina-4-O-glucosídeo ^{90,103} ; rutina ^{90,103,104} ; quercetin-3-O- β -D-glucopiranosil-(2 \rightarrow 1)-O- β -D-xilopiranosídeo, camferol-4'-ramanopiranosídeo e eridictiol-7-ramanopiranosídeo ⁹⁹ ; isoquercetina ¹⁰⁰ ; 8-(3-metil-but-2-enil)-2-fenil-croman-4-ona e 2-(4-hidroxifenil)-8-(3-metil-but-2-enil)-croman-4-ona ¹⁰⁵

TABELA 2.2 - Relação de compostos presentes em quatro espécies de Quebra-Pedra (*P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*) (continuação)

Espécie	Classe	Compostos
<i>P. niruri</i>	flavonas	niruriflavona ¹⁰⁰ ; 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona ¹⁰⁶
	ftalatos	filester ^{90, 102}
	lignanas	filtetralinaenirantina ^{31,90} ; hipofilantina ^{31,90,100,107} ; filantina ^{31,90,107} ; nirtetralina ^{90,107} ; isolintetralina ^{90,108} ; hinoquina ^{90,109} ; hidroxinirantina, lintetralina, seco-4-hidroxilintetralina, seco-isolariciresinol-trimetil-éter, hidroxinirantina e dibenzilbutirolactona ¹⁰⁸ ; cubebin-dimetil-éter e urinatetralina ¹¹⁰ ; neonirtetralina ¹¹¹ ; nirfilina e filnirurina ¹¹² ; 4-hidroxisesamina ¹¹³
	lipídeos	ácidoricinoleico ^{90,114} ; ácido linoleico e ácido linolênico ¹¹⁴
	polifenóis	(-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequina-3-O-galato e (-)-epigalocatequina 3-O-galato ¹¹⁵
	polissacarídeos	arabinogalactana ¹¹⁶ ; xilanos ¹¹⁷
	taninos	corilagina ^{26,100,101,104} ; 1-O-galoil-6-O-luteoil- α -D-glucose e β -glucogalina ⁹⁹ ; isocorilagina ¹⁰⁰ ; amarulona ¹¹⁸ ; geranina ¹¹⁹
	terpenos	lupeol acetato ⁹⁰ ; lupeol ^{90,106} ; 3,7,11,15,19,23-hexametil-2Z,6Z,10Z,14E,18E,22E-tetracosenen-1-ol ^{90,120} ; filantenol, filantenona e filanteol ^{90,121} , α -amirina ¹⁰⁶ , transfitol ¹²² , friedelina ¹²³

TABELA 2.2 - Relação de compostos presentes em quatro espécies de Quebra-Pedra (*P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*) (continuação)

Espécie	Classe	Compostos
<i>P. niruri</i>	outros	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, ácido carboxílico de brevifolina e metil carboxilato de brevifolina ¹⁰⁰ ; ácido dotriacontanóico ¹⁰² ; etil 3,4,5-trihidroxibenzoato ¹⁰⁴ ; 32-metil-1-tritriacontanol ¹⁰⁶ ; 2-Metilhexadec-2-eno ¹²⁴ ; nirurisida ^{125,126} ; 2,3,5,6-tetrahidroxibenzil acetato e filangina ¹²⁷ ; triacontanal ¹²⁸
<i>P. stipulatus</i>	esteroides	β -sitosterol ¹²⁹
	terpenos	gloquidonolegloquidona ¹²⁹
	Taninos	corilagina ²⁶
<i>P. tenellus</i>	benzenoides	ácido gálico ¹³⁰
	Taninos	corilagina ²⁶ , pinocembrina ¹³¹

2.2.3.1 - Controle de Qualidade Químico em Amostras de *Phyllanthus*

Segundo a Farmacopeia Brasileira, a diferenciação das duas espécies “oficiais” de quebra-pedra (*P. niruri* e *P. tenellus*) se faz por meio da determinação colorimétrica do teor de taninos totais (mínimo de 6,5% para *P. niruri* e mínimo de 9,0% para *P. tenellus*) e por quantificação de ácido gálico por LC-UV após hidrólise dos taninos presentes no extrato (0,15% para *P. niruri* e 0,12% para *P. tenellus*)⁷².

Além dos métodos descritos na Farmacopeia Brasileira, diversos outros trabalhos foram publicados, os quais discutem métodos de caracterização química e quantificação de marcadores químicos a partir de extratos de quebra-pedra.

Bachi e Oliveira, em 1983¹³⁰, realizaram ensaios de prospecção fitoquímica a partir da droga vegetal e do extrato fluído de *P. tenellus* utilizando técnicas clássicas de reações de caracterização de metabólitos secundários. Os ensaios deram resultados positivos para flavonoides, taninos, alcaloides e baixo teor de óleos essenciais. Por meio de cromatografia em camada delgada preparativa os

autores obtiveram também quantidades relevantes de ácido gálico a partir do extrato hidroalcoólico concentrado.

Em 2003 Mouco e colaboradores²⁷ realizaram ensaios químicos de identificação de classes químicas a partir de uma amostra comercial de quebra-pedra. Foram realizados processos químicos de identificação para taninos, heterosídeos flavonoídicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos antraquinônicos, alcaloides e óleos voláteis. Os resultados demonstram a presença de flavonoides, glicosídeo antraquinônico e alcaloides. No mesmo ano Soares *et al.*¹³² desenvolveram um método espectrométrico para quantificação flavonoides em amostra vegetal e extratos aquosos, a partir da complexação do grupo químico com $AlCl_3$. Análises estatísticas demonstraram que o método era adequado para quantificação em material vegetal, contudo apresentava limitações quando aplicados em extratos aquosos, devido a desvios na linearidade.

Murugaiyah e Chan³¹ desenvolveram um método quantitativo por LC utilizando detecção por fluorescência para a determinação de quatro lignanas em extratos metanólicos de *P. niruri*. O método foi aplicado para análise de amostras coletadas em diferentes localidades geográficas da Malásia e de extratos de diferentes partes do vegetal. A lignana filantina foi a mais abundante nas amostras analisadas e as concentrações de lignanas foram maiores nas folhas do que nas outras partes da planta.

Em 2008 Martins²⁶ desenvolveu e validou um método analítico de perfil químico por LC acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) para controle de qualidade de amostras vegetais de quebra-pedra. A partir de amostras autênticas (cultivadas e taxonomicamente identificadas) de seis espécies de *Phyllanthus* foram analisadas amostras não cultivadas coletadas em 27 municípios do estado de São Paulo e 25 amostras comerciais. Para interpretação das informações cromatográficas foram utilizados modelos quimiométricos devidamente elaborados e validados. A partir dos dados obtidos foi possível a classificação das amostras comerciais, sendo a maioria das amostras comerciais produzidas a partir de *P. tenellus*, embora fossem comercializadas como *P. niruri*. Em outras duas amostras foram detectadas adulteração, pois as amostras não puderam ser classificadas como nenhuma amostra de *Phyllanthus*. Martins²⁶ também desenvolveu um método quantitativo para corilagina, observando uma grande variação na concentração de corilagina em decorrência das diferenças geográficas e sazonais. Esse resultado demonstrou que

a quantificação de corilagina, apesar de não ser um método eficaz para padronização de espécies de *Phyllanthus*, pode ser futuramente explorada em estudos de monitoramento de compostos fenólicos em cultivares de *Phyllanthus*, como forma de acompanhamento do manejo agrônômico, ou para a obtenção desse marcador químico com fins medicinais.

Como abordado acima, há diferentes métodos para controle de qualidade de amostras vegetais e produtos elaborados a partir de *Phyllanthus*. Estes englobam desde métodos de identificação de classes químicas, quantificação de marcadores até modelos quimiométricos completos para comprovação de autenticidade de amostras. Contudo, ainda existe certo hiato no desenvolvimento de métodos utilizando ferramentas analíticas mais complexas como LC acoplado à espectrometria de massa. Este último permite a quantificação com alto nível de sensibilidade, como também a caracterização química *online* de marcadores químicos com menor consumo de solvente e rapidez.

O crescimento significativo do setor de fitoterápicos em âmbito nacional aliado a ampla utilização das espécies de quebra-pedra ampliam a possibilidade de desenvolvimento de novas formulações fitoterápicas. No entanto, tal desenvolvimento requer completa caracterização química das diferentes espécies de *Phyllanthus*, de modo a se estabelecer padrões de qualidade que assegurem produtos fitoterápicos de qualidade superior.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivos Gerais

1. Caracterização química dos extratos aquosos das espécies *P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus* através de análises por cromatografia líquida hifenada a espectrometria de massa;

3.2 - Objetivos Específicos

1. Desenvolvimento de método de análise química qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa, utilizando espectrometria de múltiplos estágios com a finalidade de caracterizar os marcadores químicos que diferenciem quimicamente os extratos aquosos das espécies de *Phyllanthus* estudadas;
2. Elucidação estrutural dos marcadores químicos através da interpretação dos espectros de fragmentação de MS² e MS³;
3. Purificação e isolamento de alguns marcadores químicos por LC-UV semipreparativa seguido de elucidação estrutural por métodos espectroscópicos.

4 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 - Espectrometria de Massa

Os espectrômetros de massa apresentam 3 componentes básicos, ou seja, fonte de ionização, analisador de massa e detector¹³³.

A fonte de ionização constitui-se um importante componente, pois íons são mais facilmente analisados que moléculas neutras. A ionização pode ser obtida por diferentes fontes como ionização por electrospray (ESI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI)¹³⁴. ESI constitui-se uma técnica de ionização de alta aplicabilidade para uma grande diversidade de compostos, além de propiciar pequena fragmentação na fonte, muito embora adutos sejam geralmente observados¹³³. A interface de electrospray na verdade proporciona a transferência de íons pré-formados em solução para fase gasosa, sendo a efetiva ionização um efeito secundário¹³⁵. A ionização na interface de ESI envolve a formação de um *spray* eletrostático, a partir do qual são formadas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. Ao ser aplicado um campo elétrico sobre o capilar os íons em solução de carga oposta ao campo aplicado se deslocam em direção ao contra-eletrodo, formando assim uma gota na ponta do capilar altamente carregada. À medida que a densidade elétrica aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eletrodo aumenta causando deformação na gota. Essa gota deformada em forma de cone permanece junto à extremidade do capilar até quando a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial do líquido, causando a liberação das pequenas gotas altamente carregadas (explosão Coulombica). Conjuntamente ao potencial aplicado utiliza-se um gás de nebulização, geralmente nitrogênio, para facilitar a evaporação da fase móvel^{133,135}. A fonte APCI apresenta uma configuração semelhante à ESI, contudo o campo é aplicado através de uma corona localizado a extremidade do capilar. As interfaces APCI são especialmente úteis para compostos não polares¹³⁶. Outra interface mais recentemente utilizada é a APPI, a qual constitui uma importante alternativa aos compostos pouco ionizados por ESI e APCI. A ionização na interface APCI ocorre pela interação do feixe de fótons de uma lâmpada de criptônio ou xenônio com os

vapores formados pela nebulização do líquido em solução¹³⁷. Nessa técnica geralmente é necessário a utilização de solventes dopantes como acetona, tolueno ou anisol, os quais agem como intermediários entre os fótons e os analitos¹³⁸.

Outro importante componente é o analisador de massa. Dentre os diferentes detectores o mais simples utilizado atualmente é o analisador de quadrupolo simples. Nesse analisador as hastes opostas estão conectadas uma a outra, nas quais é aplicada uma corrente de rádio-frequência. Posteriormente é sobreposta uma corrente direta (DC), produzindo um campo elétrico, onde somente alguns íons de certa massa podem passar¹³⁹. O arranjo de três quadrupolos em sequência (triplo quadrupolo) possibilita a fragmentação dos íons fornecendo importantes informações estruturais. Nesse arranjo o primeiro quadrupolo funciona como filtro de massa, o segundo como célula de colisão e o terceiro novamente como filtro de massa. Na célula de colisão ocorre a fragmentação auxiliada por um gás de colisão (nitrogênio ou argônio) e uma energia aplicada para fragmentação¹³³. Outros analisadores muito utilizados são os analisadores do tipo *ion trap*, os quais são especialmente úteis para estudos de múltipla fragmentação. Nos *ions traps* lineares os ions são isolados e acumulados por um arranjo de eletrodos de forma anelar e de hipérbole os quais formam um campo elétrico oscilante. Os ions isolados e acumulados são fragmentados de maneira similar ao que ocorre na célula de colisão do analisador tipo triplo-quadrupolo, contudo permite fragmentações sequenciais que fornecem importantes informações estruturais^{140,141}. Mais recentemente, foram desenvolvidos os analisadores tipo *ion trap* 3D, como o analisador de ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier e o Orbitrap, os quais fornecem resultados como alta resolução (usualmente entre 100.000 e 1.000.000) e precisão de massa (1 a 2 ppm)¹⁴². Outro analisador de massa amplamente utilizado é o analisador de tempo de voo (TOF). O princípio de seu funcionamento é que a massa molecular está relacionada com a velocidade, e conseqüentemente os compostos encontram o detector em diferentes momentos. Esses detectores apresentam alta resolução e precisão de massa (5ppm), o que permite a verificação da composição elementar e diferenciação de compostos com a mesma massa nominal, mas diferentes composições elementares e massas exatas. Esses analisadores também possibilitam *scans* em alta velocidade e podem ser acoplados a um quadrupolo (QTOF-MS) ou *ion trap* (IT-TOF-MS) propiciando altas resoluções em experimentos de MS/MS ou MSⁿ^{143,144}.

Por fim, os detectores nos equipamentos mais modernos geralmente utilizam a tecnologia de placa de múltiplos canais (MCP), a qual consiste em uma fina placa perfurada por tubos finos de aproximadamente 6 a 10 μm de diâmetro. Na presença de um campo elétrico cada canal age como um multiplicador de elétrons e sempre que atingido por um íon ou fóton uma cascata de elétrons se inicia¹³³. Os elétrons então saem pela extremidade oposta, o que resulta numa corrente que é mensurada em um ânodo¹⁴⁵.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Obtenção das Amostras Vegetais

As amostras vegetais de quatro espécies de quebra-pedra (*Phyllanthus amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*) foram cultivadas, coletadas e processadas previamente a esse trabalho pela pesquisadora Dra. Lúcia Regina Rocha Martins²⁶.

As amostras vegetais foram cultivadas no Campus da UFSCar, a partir de sementes obtidas de exemplares fornecidos pelo CQBPA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da UNICAMP. Todo o processo, desde o cultivo até a coleta, seguiu de perto orientações agrônômicas propiciando o melhor desenvolvimento vegetal²⁶.

O material vegetal utilizado para análise foi semeado em tubetes na data de 31 de agosto de 2006. Após germinação de 40 dias as mudas foram transferidas para os canteiros no Campus da UFSCar, na área da CEMA (Coordenadoria Especial do Meio Ambiente). Martins²⁶ realizou coletas nas datas de 20 de janeiro, 30 de abril e 30 de outubro de 2007, contudo somente as amostras coletadas em 30 de abril foram utilizadas nos experimentos realizados nesse trabalho.

5.2 – Processo de Extração

O método de extração empregado nesse estudo foi a extração em meio aquoso. A escolha levou em consideração os seguintes pontos: as espécies de *Phyllanthus* são popularmente utilizadas na forma de chá⁷⁰, os estudos farmacológicos que pesquisam os efeitos de *Phyllanthus* sobre cálculos renais utilizam principalmente extratos aquosos⁸²⁻⁸⁴ e a Farmacopeia Brasileira preconiza a extração aquosa para a identificação química das espécies *P. niruri* e *P. tenellus*⁷².

O método de extração utilizado no presente trabalho foi desenvolvido pela Dr^a Lúcia Regina Rocha Martins²⁶. O procedimento foi adaptado a partir da Farmacopeia Brasileira⁷², de modo a padronizar o procedimento de extração, alterando a proporção entre material vegetal e água, monitorando a temperatura e

estabelecendo o tempo de extração. O protocolo de extração encontra-se no item 6.3 do Procedimento Experimental.

Os extratos aquosos obtidos foram liofilizados e mantidos sob temperatura de -20°C, a fim de evitar possíveis processos de degradação.

5.3 - Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para Aplicação em LC-MS

Os métodos cromatográficos foram desenvolvidos no modo reverso de eluição e encontram-se descritos no item 6.3.1 do procedimento experimental. A fase estacionária escolhida foi sílica Luna[®] ligada quimicamente a grupos fenil-hexila com tamanho de partícula de 10 µm. Essa decisão ocorre, principalmente, devido à comum presença de compostos como taninos, flavonoides glicosilados e outros compostos fenólicos em extratos aquosos. Nesses casos as interações do tipo π-π e interações hidrofóbicas presentes nesse tipo de fase estacionária, otimizam a seletividade na análise de compostos aromáticos e/ou que apresentam sistemas de duplas ligações conjugadas¹⁴⁶.

As condições cromatográficas utilizadas nas análises por LC-MS/MS foram desenvolvidas a partir do método descrito por Martins²⁶, que utilizou coluna analítica de fase estacionária fenil-hexil Luna[®] 10 µm, vazão de 0,5 mL/min, eluição gradiente linear no modo reverso, com fase móvel constituída por MeOH e solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v): 5-100% de MeOH em 50 min ($\Delta\%/min = 1,90$), permanecendo isocrático em 100% de MeOH por 10 minutos.

O uso de ácidos fracos na fase móvel, como o ácido fosfórico, constitui-se uma importante opção para otimização de separações cromatográficas. Os extratos vegetais obtidos com solventes polares, como no caso de extratos aquosos utilizados no atual trabalho, apresentam uma grande quantidade de compostos ionizáveis de caráter ácido, tais como compostos fenólicos e ácidos carboxílicos diversos. Essas substâncias em solução aquosa podem estar parcial ou totalmente ionizadas. Nesses casos, a redução do pH propicia a supressão da ionização tornando os compostos mais hidrofóbicos, aumentando sua retenção¹⁴⁷. No entanto, análises por LC-MS apresentam limitação quanto à utilização de tampões ou aditivos não voláteis, como o ácido fosfórico, fato este decorrente da deposição de cristais de

tampão na interface ou fonte do espectrômetro de massa, com conseqüente redução no desempenho do detector¹⁴⁸. Dessa forma, o ácido fosfórico foi trocado por ácido fórmico a 0,1% (v/v), mantendo-se assim o pH da fase móvel, bem como, auxiliando a protonação dos compostos químicos, tornando-os conseqüentemente visíveis ao analisador de massa sem alterar o funcionamento do espectrômetro de massa.

Outras modificações foram realizadas no método descrito por Martins, apresentando as seguintes condições: vazão de 0,5 mL/min, eluição isocrática nos 5 minutos iniciais (5% de MeOH / 95% de solução de ácido fórmico 0,1% v/v), eluição gradiente 5-70% de MeOH até 45 minutos ($\Delta\%/min=1,63$), permanecendo isocrático em 70% de MeOH por 5 minutos. Após eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100% de metanol por 10 minutos acompanhado por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de modificador orgânico). A coluna foi condicionada em 5% de MeOH por 20 minutos entre cada análise, totalizando assim 90 minutos por análise (Método 1) (FIGURA 5.1).

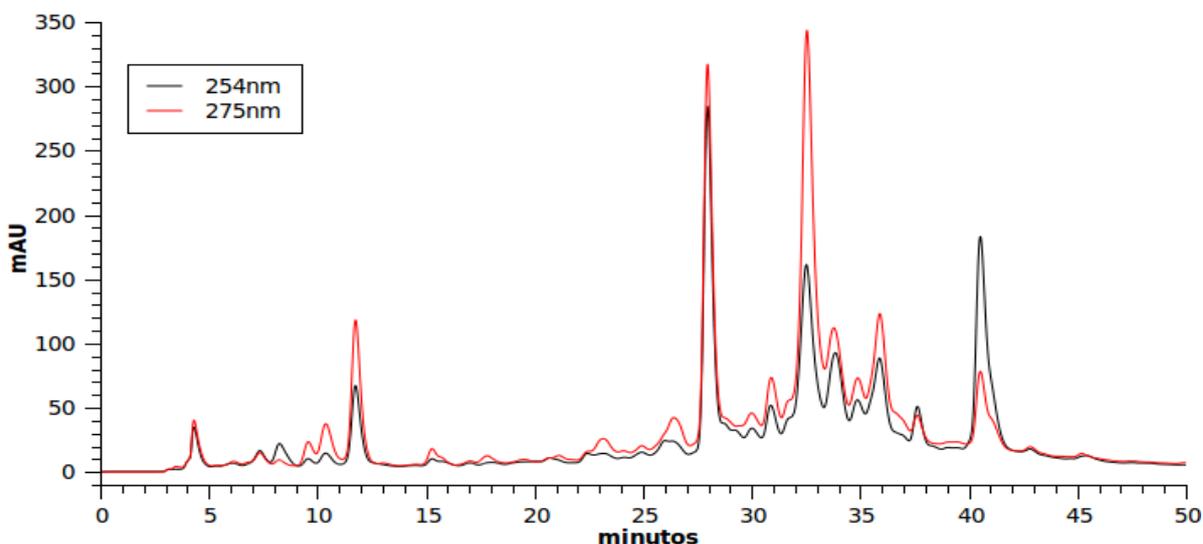


FIGURA 5.1 - Cromatograma (λ 254 e 275 nm) do extrato aquoso liofilizado de *P. niruri* conforme Método 1. Concentração do extrato de 1,5 mg/mL e volume de injeção de 50 μ L.

Visto a maioria dos metabólitos secundários apresentarem tempo de retenção entre 25 até aproximadamente 45 minutos (FIGURA 5.1), foi desenvolvido um segundo método mais seletivo para os compostos de polaridade intermediária.

Para tal foram realizados duas eluições gradientes de ampla faixa, ou seja, variando de 5-100% de modificador orgânico em 60 minutos. Ambos

apresentavam fase móvel constituída de solução de ácido fórmico 0,1% (v/v), diferenciando-se entre si pelo tipo de modificador orgânico, a saber, metanol no primeiro e acetonitrila no segundo. A eluição gradiente com metanol apresentou maior seletividade na separação dos compostos. A partir dessa eluição gradiente foram desenvolvidos diversos métodos de modo a obter maior seletividade na separação dos compostos de polaridade intermediária (TABELA 5.1).

TABELA 5.1 - Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato aquoso de *Phyllanthus*

Análise	Condição Cromatográfica*
1	19-60% MeOH por 60 min ($\Delta\%B = 0,68$); vazão de 1,0mL/min; vol. inj. 50 μ L.
2	25-70% MeOH por 60 min ($\Delta\%B = 0,75$); vazão de 1,0mL/min; vol. inj. 50 μ L.
3	25-60% MeOH por 60 min ($\Delta\%B = 0,58$); vazão de 1,0 mL/min; vol. inj. 50 μ L.
4	25-50% MeOH por 60 min ($\Delta\%B = 0,42$); vazão de 1,0 mL/min; vol. inj. 50 μ L.
5	25-40% MeOH por 60 min ($\Delta\%B = 0,25$); vazão de 1,0 mL/min; vol. inj. 50 μ L.
6	Isocrático em 20% de MeOH por 20 minutos; 20-60% MeOH até 60 min ($\Delta\%B = 1,0$); vazão de 1,0 mL/min; vol. inj. 50 μ L.
7	Isocrático em 25% de MeOH por 20 minutos; 25-60% MeOH até 60 min ($\Delta\%B = 0,875$); vazão de 1,0 mL/min; vol. inj. 50 μ L.
8	Isocrático em 24% de MeOH por 20 minutos; 24-50% MeOH até 60 min ($\Delta\%B = 0,65$); vazão de 1,0 mL/min; vol. inj. 50 μ L.

(*) Todas as análises foram realizadas em uma coluna fenil-hexil Luna[®] de 15 x 0,46 cm d.i com tamanho de partícula de 10 μ m e com fase móvel constituída por metanol e solução de ácido fórmico 0,1%.

Dentre as condições analíticas avaliadas, o cromatograma que mostrou

melhor faixa de retenção e melhor separação foi obtido com a condição cromatográfica 8 da TABELA 5.1: coluna analítica Fenil-hexil Luna[®] 10 µm; vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 50 µL; eluição isocrática em 24% nos 20 minutos iniciais, seguido de eluição gradiente: 24-50% de MeOH por mais 40 minutos ($\Delta\%B/min = 0,65$). Após eluição cromatográfica foi realizada a limpeza da coluna com 100% de metanol por 5 minutos acompanhado por retorno do gradiente em 3 minutos (100-24% de modificador orgânico). A coluna foi condicionada em 24% de MeOH por 20 minutos entre cada análise, totalizando assim 88 minutos por análise (Método 2) (FIGURA 5.2).

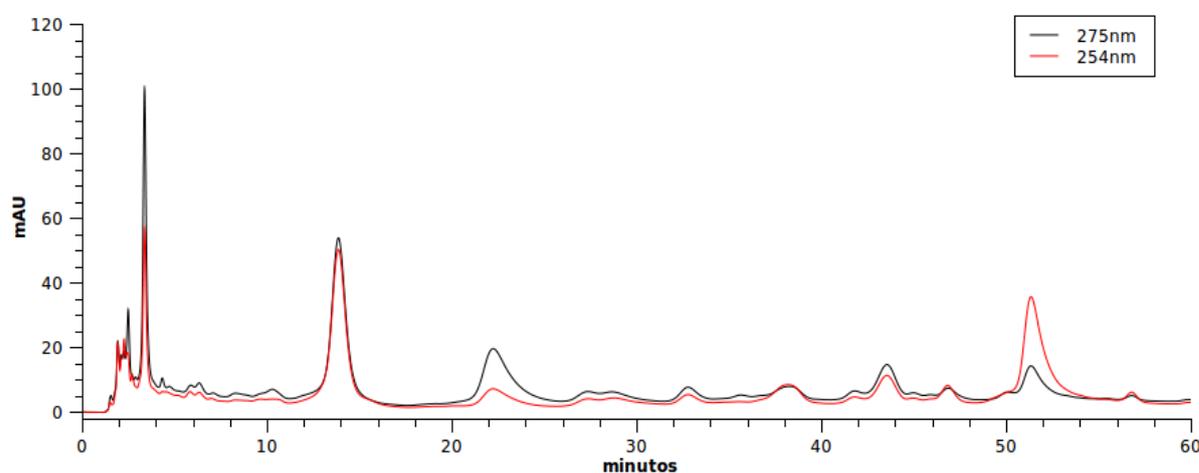


FIGURA 5.2 - Cromatograma ($\lambda 254$ e 275 nm) do extrato aquoso liofilizado de *P. niruri* conforme Método 2. Concentração do extrato 1 mg/mL e volume de injeção de 50 µL.

5.4 - Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada a Espectrometria de Massa

5.4.1 - Resultados do Experimento 1

As condições cromatográficas utilizadas nesse experimento corresponde às descritas no Método 1. Foram realizadas análises em *full scan* nos modos positivo e negativo de ionização, de maneira a verificar as principais relações massa/carga (m/z) presentes nas quatro espécies de *Phyllanthus*. Em seguida, realizaram-se novas análises utilizando a ferramenta MRM (*Multiple Reaction*

Monitoring) nos dois modos de ionização. No modo MRM os íons fragmentados foram escolhidos manualmente após criteriosa avaliação das análises no modo *full scan*.

Os resultados desse experimento estão dispostos na TABELA 5.2, seguido de subsequente discussão.

TABELA 5.2 – Dados obtidos por LC-MS/MS no modo positivo de ionização a partir das quatro espécies de *Phyllanthus*.

N°	Composto Proposto	tr (min)	[M+Na] ⁺	[M+H] ⁺	MS ² íons	Observações
1	Corilagina	29,0	657		487, 403, 361, 343, 299	Presente nas quatro espécies
				635* (465)	429, 411, 385, 363, 321, 303, 277	
2	Composto não caracterizado	29,8		795	409	Presente nas quatro espécies
3	Isômeros de Elagitaninos de massa molar 970 g/mol	29,7-40,1	993		971* (801)	Presente nas quatro espécies
4	Isômeros de Elagitaninos de massa molar 952 g/mol	30,9 33,1 36,4	975		805, 761, 503, 469	Presente nas quatro espécies
				953* (783)	765, 481, 463, 429, 393, 337, 303, 277, 247	
5	Isômeros de Elagitaninos de massa molar 926 g/mol	31,5 32,5	949		779, 477	Presente nas quatro espécies
				927* (757)	757, 739, 455, 437, 419, 401, 373, 303, 277	
6	Composto não caracterizado	33,3		609	333, 315	Presente nas quatro espécies
7	Flavona O,C glicosilada	34,8		595	449, 431, 413, 383, 353, 329, 287	Presente em <i>P. niruri</i>
8	Vitexina-2"-O-ramanosídeo	36,6		579	433, 415, 397, 367, 313, 271	Presentes em <i>P. niruri</i>
9	Rutina	39,2	633		605, 487, 331, 325	Ausente em <i>P. niruri</i>
				611	465, 303	
10	Composto não caracterizado	40,5		767	395	Ausente em <i>P. amarus</i>

(*) indica que o íon molecular [M+H]⁺ não está presente no espectro, aparecendo somente o íon referente à perda de grupo galoil, o qual foi selecionado para fragmentação. Tempo de retenção determinado no máximo da banda cromatográfica.

Os compostos representados pelos números 1, 3, 4 e 5 foram caracterizados como taninos hidrolisáveis devido ao padrão de fragmentação comum a elagitaninos.

O composto do item 1 (tr = 29,0) presente em todos os extratos aquosos foi identificado como corilagina (FIGURA 5.3). A fragmentação do íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z de 657 (Figura 5.4A) originou o íon 487 resultante da perda de 170 unidades de massa correspondente ao grupo galoil após quebra da ligação C-O entre o carbono anomérico da glucose e o oxigênio do éster. O íon de m/z 299 refere-se à fragmentação de uma das ligações C-O das carbonilas dos ésteres ligados ao açúcar e de uma das ligações C-C entre uma carbonila e um dos anéis aromáticos¹⁴⁹ (FIGURA 5.3 e 5.4B).

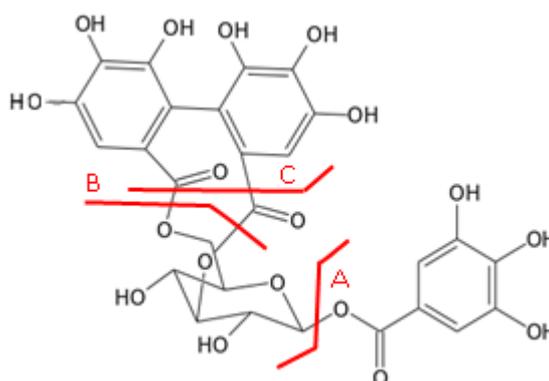


FIGURA 5.3 – Fragmentação da molécula de corilagina. A) perda de grupo galoil formando íon $[(M+Na)-170]^+$ de m/z 487 e íon $[(M+H)-170]^+$ de m/z = 465; B) quebra seguida do rearranjo do grupo hexahidroxidifenol formando íon $[(M+H)-332]$ de m/z 303; C) quebra formando íon $[(M+Na)-358]^+$ de m/z = 299 e íon $[(M+H)-358]^+$ de m/z 277.

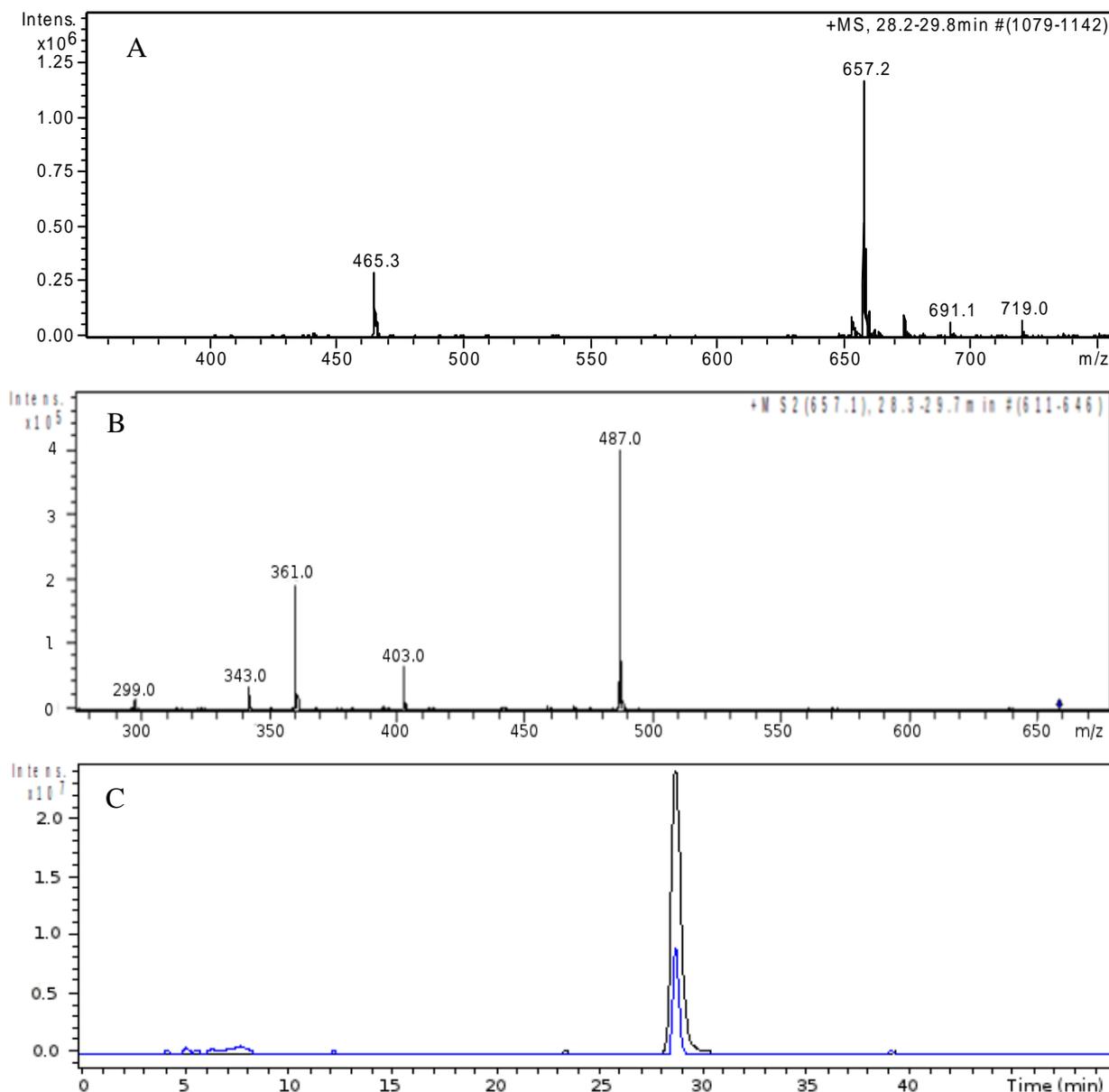


FIGURA 5.4 - Espectro de massa e cromatograma da molécula de corilagina após injeção do extrato de *Phyllanthus amarus* em LC-MS/MS no modo positivo de ionização. A) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica com tempo de retenção 29,0 min; B) fragmentação do íon $[M+Na]^+$ 657 m/z; C) cromatogramas extraídos do íon $[M+Na]^+$ de m/z 657 (preto) e do íon $[(M+H)-170]^+$ de m/z 465.

No espectro de íons totais apresentado na FIGURA 5.4A, a presença de íon com m/z de 465 representa a perda do grupo galoiil ainda na fonte de ionização do espectrômetro. No experimento de MS² a fragmentação do íon de m/z 465 apresentou as seguintes perdas: 162 e 188 referentes, respectivamente, a quebra das ligações C-O de ambas as carbonilas dos ésteres ligados aos carbonos

3 e 6 do açúcar, formando o fragmento m/z 303 e a fragmentação de uma das ligações C-C entre um dos anéis aromáticos e uma das carbonilas dos ésteres, formando o fragmento de m/z 277 (FIGURA 5.3 e 5.5).

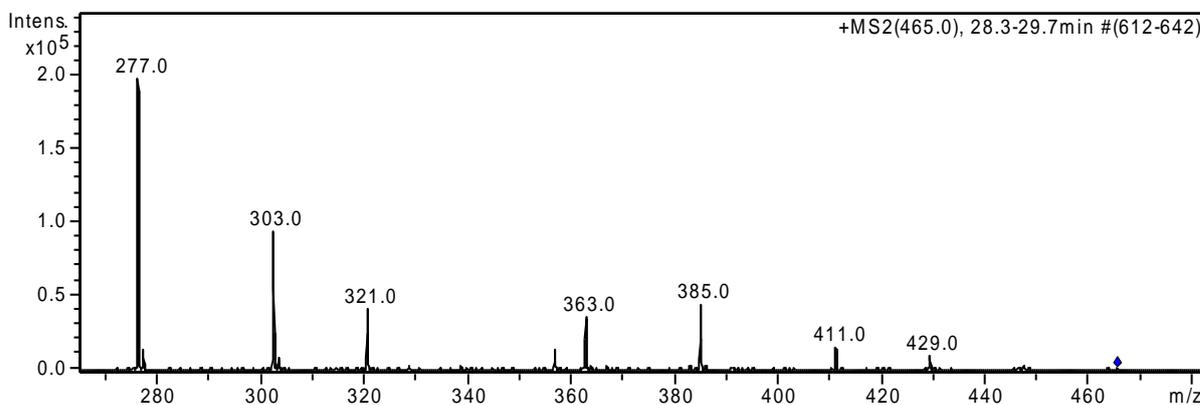


FIGURA 5.5 – Espectro de fragmentação do íon $[(M+H)-170]^+$ de m/z 465.

Diversos pesquisadores relataram a presença de corilagina em espécies de *Phyllanthus* o que reforça a proposta de identificação do composto1 como corilagina^{26,89,100,101,104}.

Os compostos do item 3 (tr = 29,7-40,1) foram caracterizados como vários isômeros de taninos hidrolisáveis com massa molar de 970 g/mol presentes em todos os extratos analisados. As estruturas químicas desses taninos correspondem, possivelmente, aos compostos ácido amarínico^{90,94} filantusina B¹⁵⁰ e/ou G¹⁵¹, anteriormente relatados em trabalhos realizados com espécies do gênero *Phyllanthus*. (FIGURA 5.6). Mesmo não sendo possível identificar o íon de m/z 971 $[M+H]^+$, observou-se o íon aduto de sódio de m/z 993 e o íon de m/z 801 corresponde à perda do grupo galoil ainda na fonte de ionização (FIGURA 5.7 e 5.8).

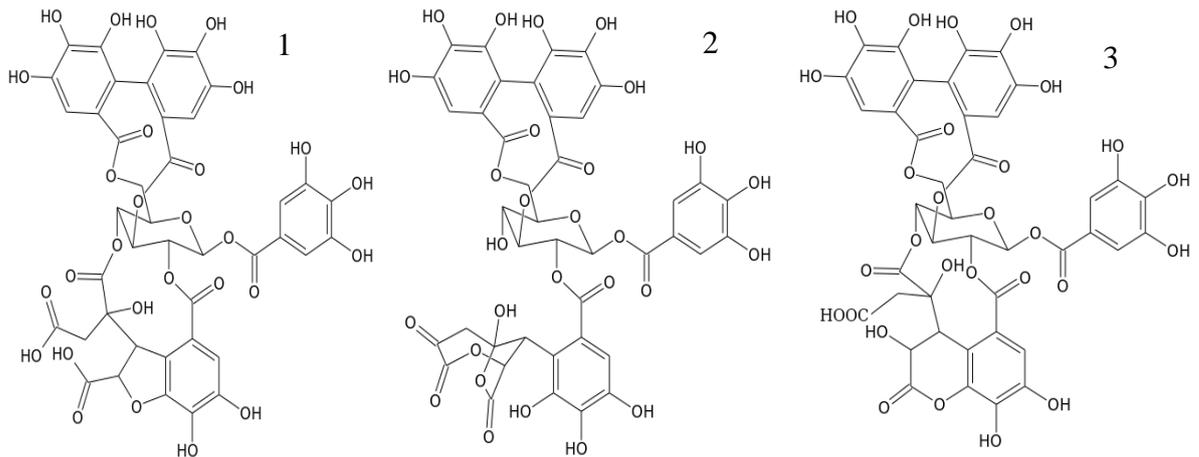


FIGURA 5.6 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 970g/mol já isolados de espécies de *Phyllanthus*. 1) filantusina B; 2) filantusina G; 3) ácido amarínico.

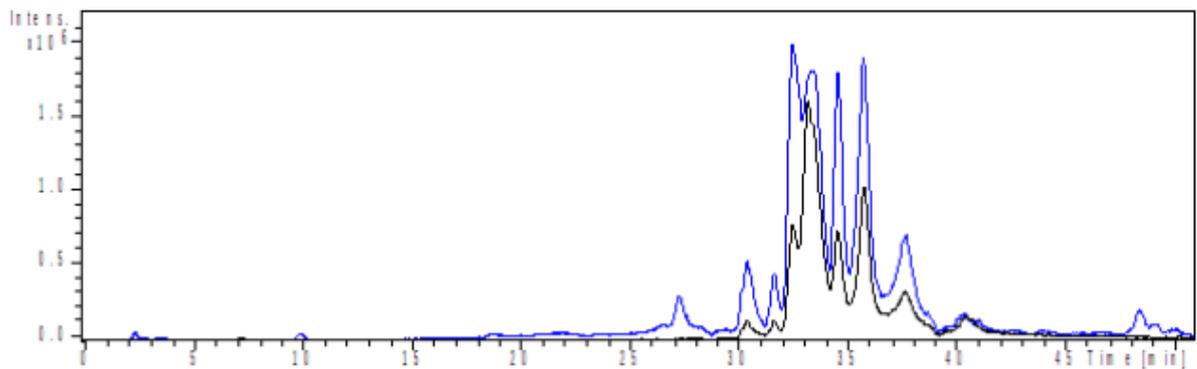


FIGURA 5.7 – Cromatogramas dos extratos de *P. amarus* extraído dos íons $[M+Na]^+$ de m/z 993 (preto) e $[(M+H)-170]^+$ de m/z 801 (azul).

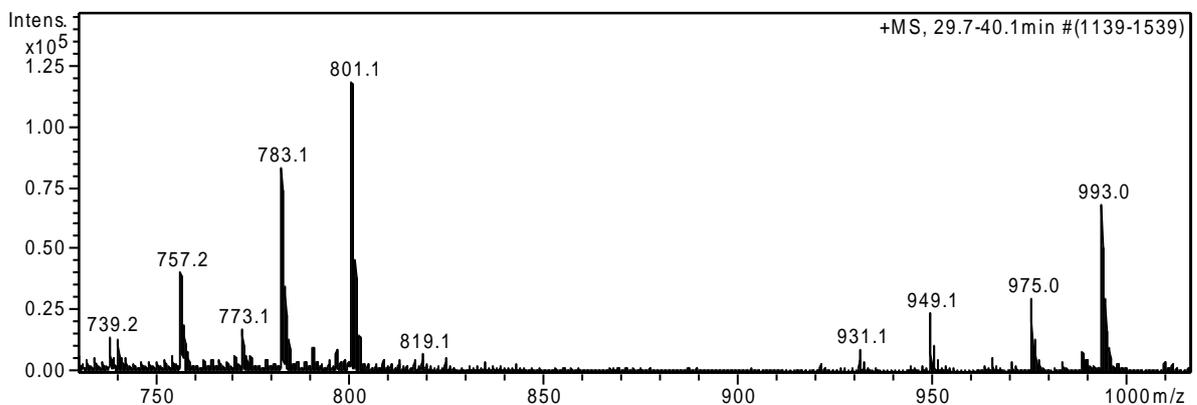


FIGURA 5.8 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído das bandas cromatográficas entre 29,7 a 40,1 min.

Os compostos do item 4 (tr = 30,9; 33,1; 36,4), presentes nos extratos das quatro espécies, foram caracterizados como isômeros de taninos com massa molar de 952 g/mol (FIGURA 5.9 e 5.10). No espectro de íons totais ilustrado na FIGURA 5.11 não foi identificado o íon molecular $[M+H]^+$, contudo foram observados o íon de m/z 975 $[M+Na]^+$ e o íon de m/z 783 referente à perda na fonte de ionização do grupo galoil. A fragmentação do íon de m/z 975 produziu o íon m/z 805 (FIGURA 5.12A) concernente à perda de grupo galoil. Por sua vez, a fragmentação do íon de m/z 783 originou os íons m/z 303 e 277 (FIGURA 5.12B), anteriormente explicado para a corilagina. Devido à grande semelhança estrutural dos elagitaninos não é possível, apenas com esse padrão de fragmentação, identificar quais isômeros de massa molar 952 g/mol estão presentes nos cromatogramas apresentados na FIGURA 5.10. Contudo, dentre os prováveis elagitaninos com massa molar de 952 g/mol destacam-se aqueles mencionados em trabalhos como filantusina A¹⁵⁰, geranina^{89,90} e ácido geranínico B ou C^{90,94} (FIGURA 5.9).

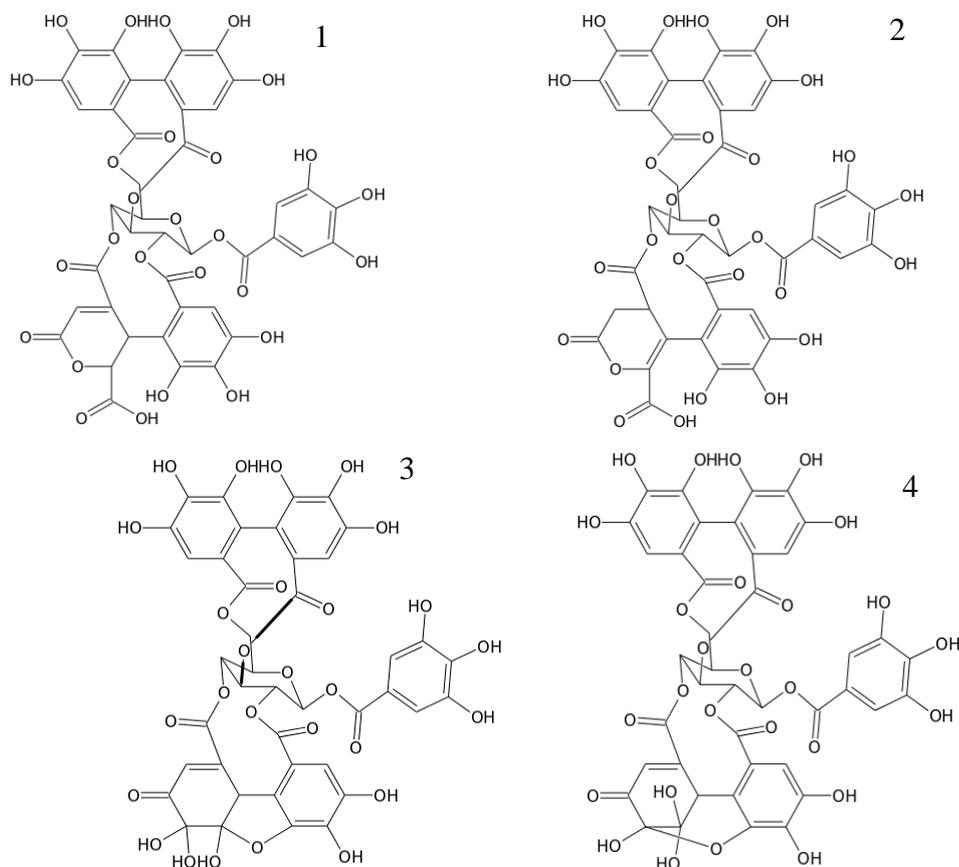


FIGURA 5.9 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 952 g/mol. 1) ácido geranínico B ou C; 2) filantusina A; 3) geranina A; 4) geranina B.

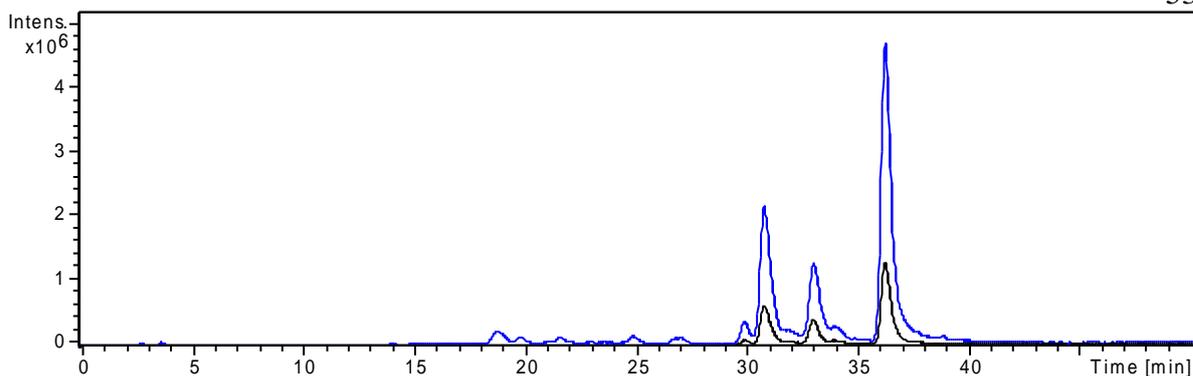


FIGURA 5.10 – Cromatogramas do extrato de *P. amarus* extraídos dos íons $[M+Na]^+$ de m/z 975 (preto) e $[(M+H)-170]^+$ de m/z 783 (azul).

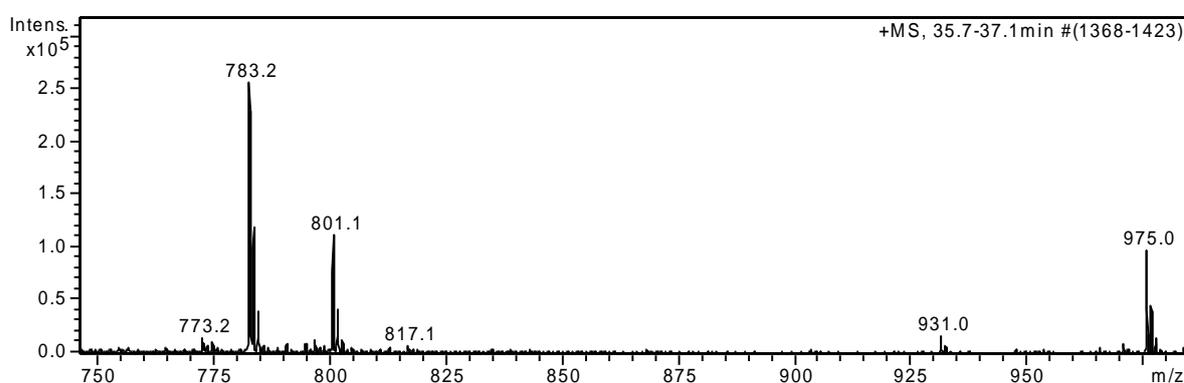


FIGURA 5.11 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica com tempo de retenção 36,4 min.

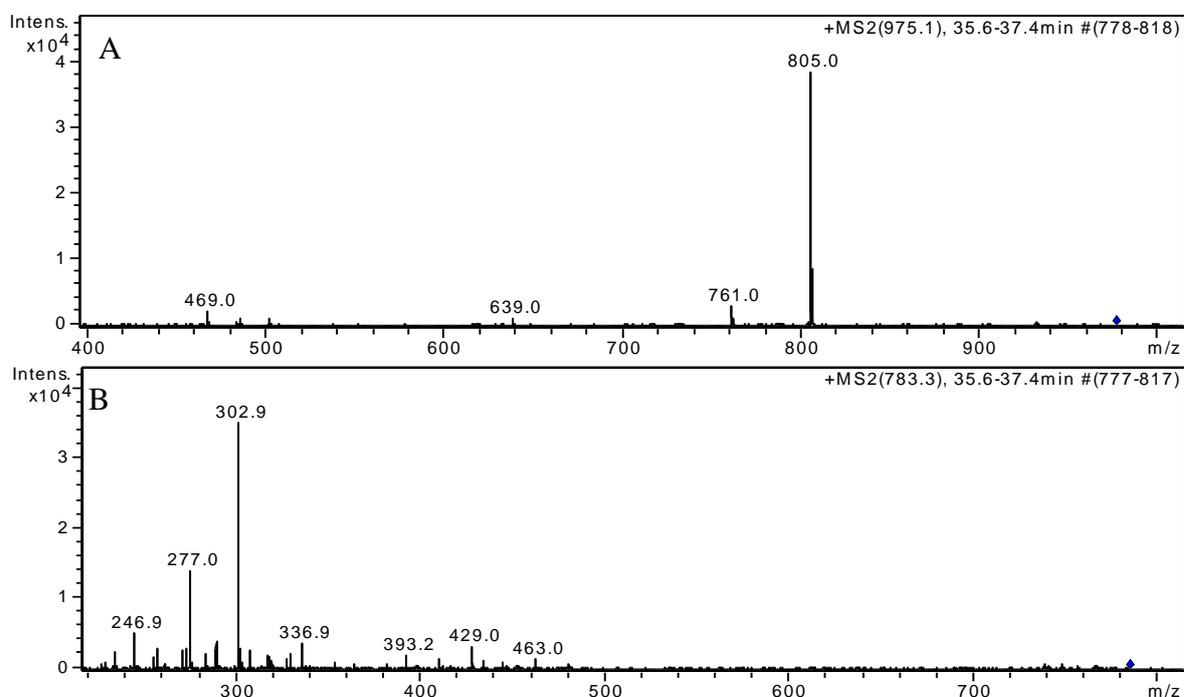


FIGURA 5.12 - Espectros de fragmentação de (A) $[M+Na]^+$ de m/z 975 e (B) íon $[(M+H)-170]^+$ de m/z 783 no tempo de retenção de 36,4 minutos.

Os compostos representados pelo número 5 (tr = 31,5 e 32,5), presentes nos quatro extratos aquosos, foram caracterizados como 2 isômeros de taninos hidrolisáveis de massa molar 926 g/mol (FIGURA 5.13 e 5.14). O espectro de íon totais (FIGURA 5.15) não apresentou o íon molecular $[M+H]^+$, no entanto, o padrão de fragmentação foi característico de elagitaninos. A fragmentação do íon de m/z 949 $[M+Na]^+$ resultou na formação do íon fragmento de m/z 779 decorrente da perda dos grupos galoil e hexahidroxidifenoil (FIGURA 5.16A). O íon de m/z 757 $[(M+H)-170]^+$ ao ser fragmentado apresentou os mesmos íons fragmentos característicos de elagitaninos já explicados, a saber, m/z 303 e 277 (FIGURA 5.16B). O padrão de fragmentação não permite a completa elucidação estrutural, contudo, é possível presumir suas estruturas químicas como filantusina C¹⁵⁰ e pelargonina A¹⁵² (FIGURA 5.13).

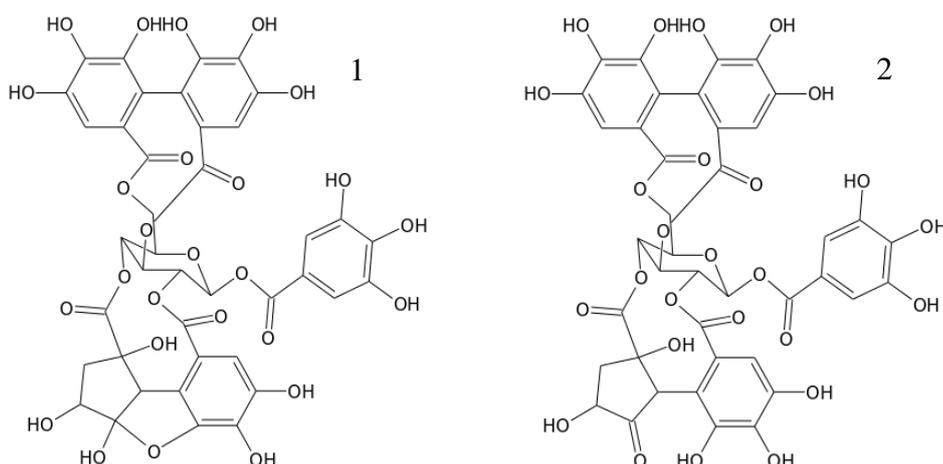


FIGURA 5.13 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 926 g/mol. 1) filantusina C; 2) pelargonina A.

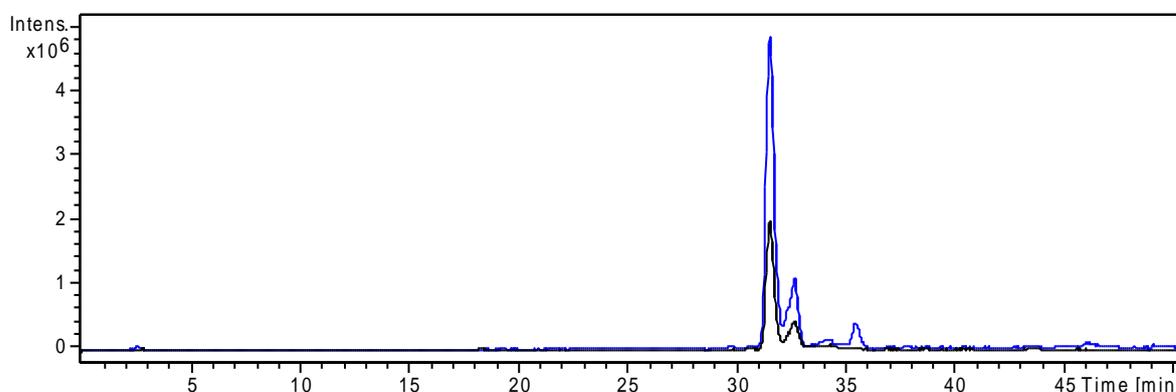


FIGURA 5.14 - Cromatogramas do extrato de *P. amarus* extraídos dos íons $[M+Na]^+$ de m/z 949 (preto) e $[(M+H)-170]^+$ de m/z 757 (azul).

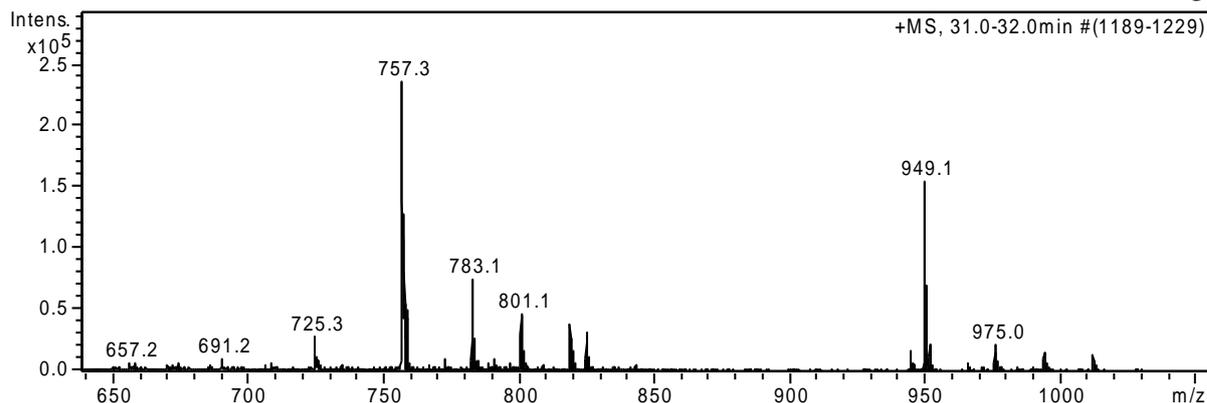


FIGURA 5.15 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 31,5 min.

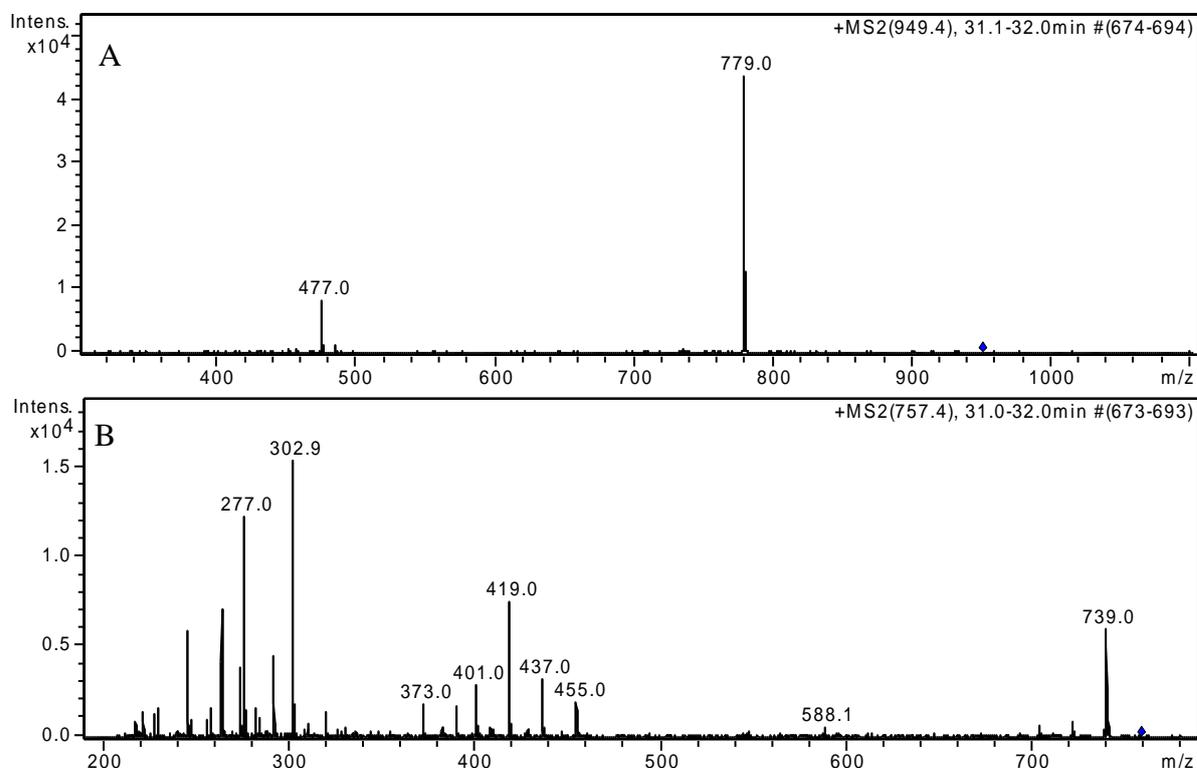


FIGURA 5.16 - Espectros de fragmentação do (A) íon de m/z 949 $[M+Na]^+$ e (B) íon de m/z 757 $[(M+H)-170]^+$.

Os compostos representados pelos itens 7 (tr = 34,8) e 8 (tr = 36,6) (FIGURA 5.17) presentes exclusivamente no extrato de *P. niruri* apresentaram fragmentações típicas de flavonas O,C glicosiladas (FIGURA 5.18). Ambos os compostos de m/z 595 e 579 (FIGURA 5.19 e 5.21) demonstraram perdas de 146 unidades de massa relativo à unidade de oxihexose (Y^+) e 164 referente à perda adicional de água (Y^+-H_2O). Os íons de m/z 329 e 313 são resultantes da quebra

cruzada do anel de hexose entre as ligações 0,2, indicando ligação entre a hexose e deoxihexose entre as posições 1-2 ($^{0,2}X_0Y_1^+$) ou ligação da unidade O-glicosídica em outro grupo hidroxil do núcleo flavônico ($^{0,2}X_0Y_4^+$)^{153,154}. As agliconas livres das duas flavonas são observadas pelos íons de m/z 287 e 271 concernente a luteolina e apigenina, respectivamente (FIGURA 5.20 e 5.22). Portanto, pode-se assegurar que os compostos correspondem a flavonas O,C-glicosiladas, no entanto a discriminação dos sítios de ligação dos açúcares e se esses estão interligados ou não, não podem ser inferidas.

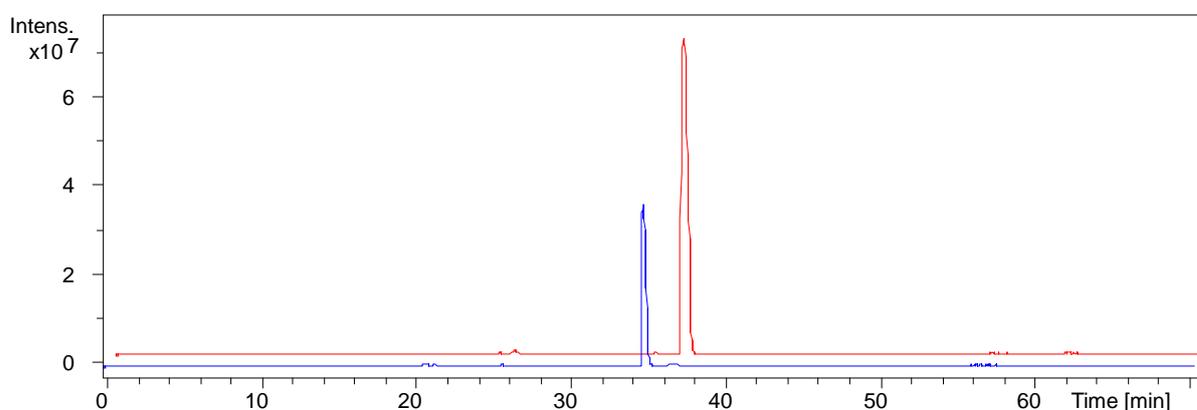


FIGURA 5.17 – Cromatogramas do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M+H]^+$ do composto 7 de m/z 595 (azul) e do íon $[M+H]^+$ referente ao composto 8 de m/z 579 (vermelho).

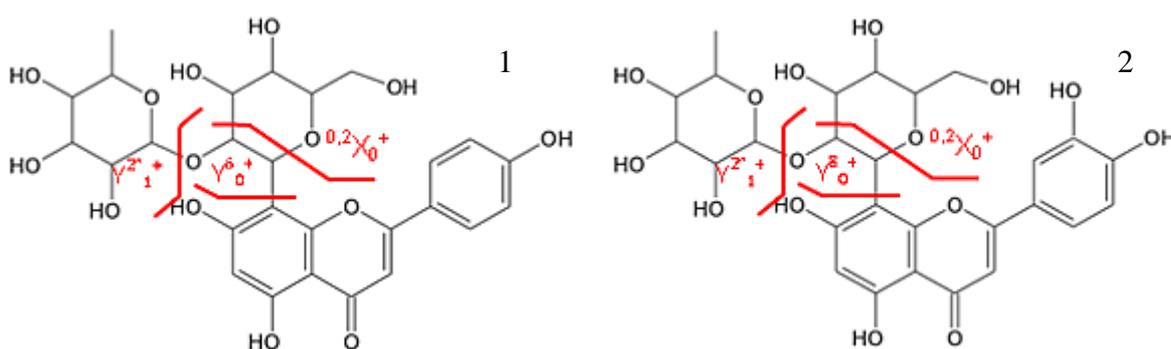


FIGURA 5.18 – Representação das fragmentações observadas em flavonas O,C-glicosiladas. 1) vitexina-2''-O-ramanoze e 2) orientina-2''-O-ramanoze.

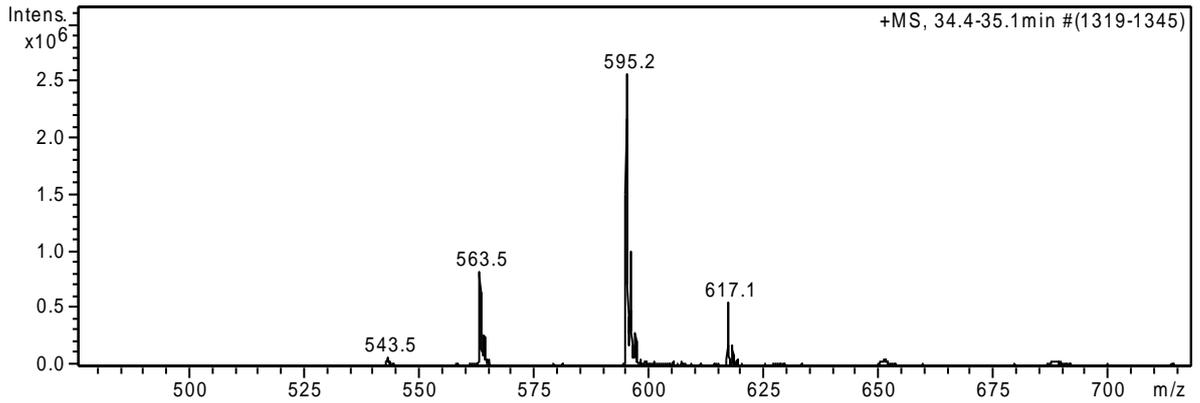


FIGURA 5.19 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 34,8 min

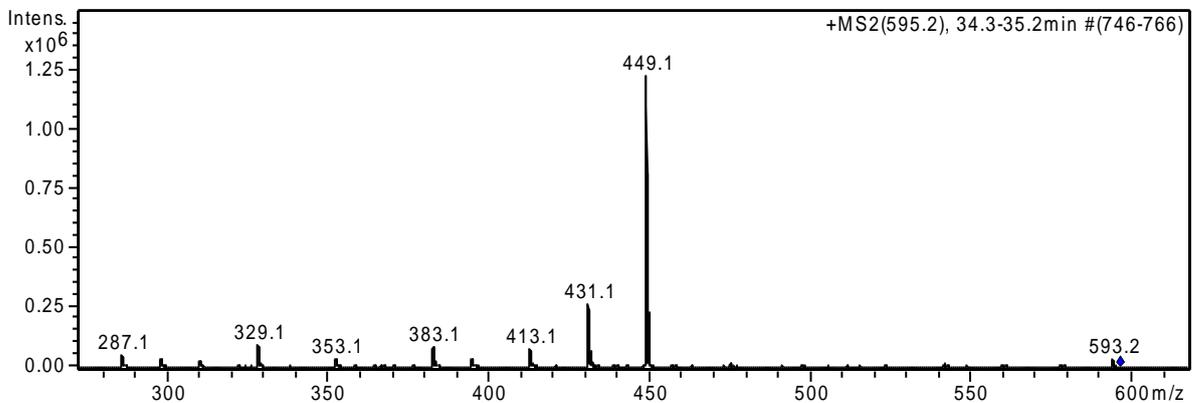


FIGURA 5.20 – Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 595.

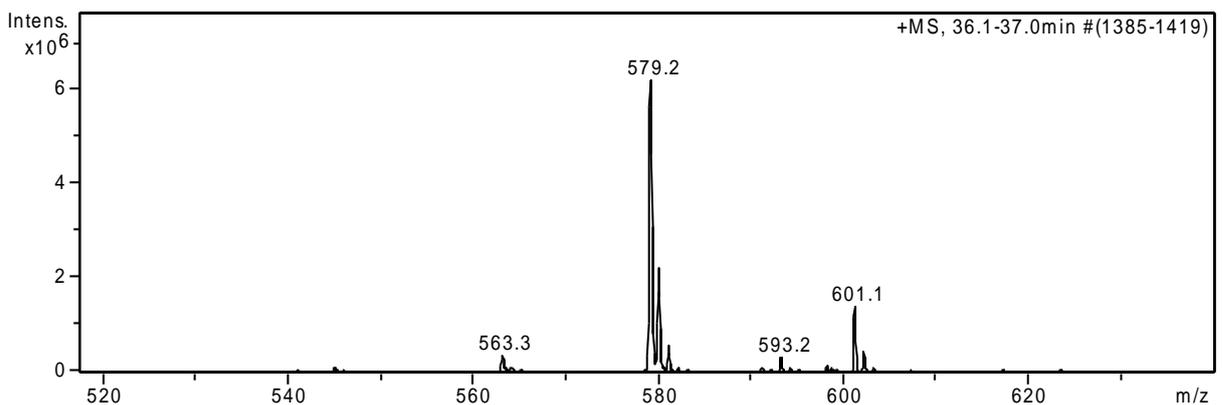


FIGURA 5.21 - Espectro de íons totais no modo positivo de eluição extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 36,5 min.

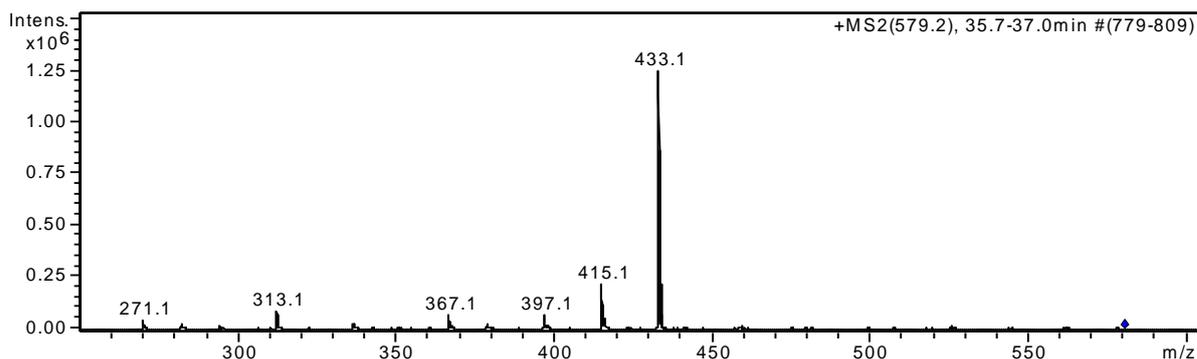


FIGURA 5.22 – Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 579.

O composto do item 9 ($t_r = 39,2$) foi caracterizado como rutina (FIGURA 5.23 e 5.24). No espectro de íons totais foram observados o íon molecular $[M+H]^+$ m/z 611 e seu aduto de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633 (FIGURA 5.25). A fragmentação do íon de m/z 611 originou o íon de m/z 465 após perda de 146 unidades de massa referente à deoxihexose (Y_1^+) e também o íon de m/z 303 referente à aglicona quercetina (Y_0^+) (FIGURA 5.26). O aduto de sódio apresentou as mesmas fragmentações, a saber, perda de 146 unidades de massa formando o íon m/z 487 e perda de 308 unidades de massa referente à saída do rutinosídeo originando o aglicona quercetina mais aduto de sódio com m/z de 325. Todavia, o modo positivo de ionização provê poucas informações sobre a disposição dos açúcares, sendo o modo negativo mais útil para determinar diferenças entre rutinosídeo e neohesperosídeos, como também flavonoides com açúcares ligados em diferentes posições da aglicona livre¹⁵⁵.

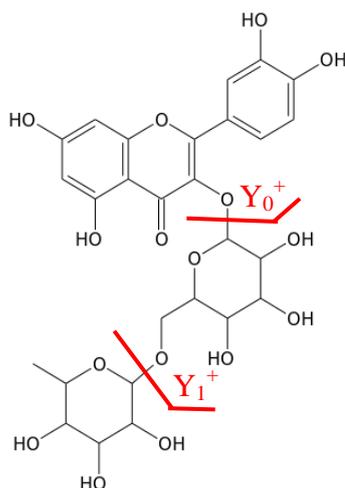


FIGURA 5.23 - Representação das fragmentações da molécula de rutina: (Y_1^+) perda de 146 unidades de massa formando o íon de m/z 465; (Y_0^+) perda de 308 unidades de massa relativo à rutinosídeo deixando a aglicona quercetina livre (m/z 303).

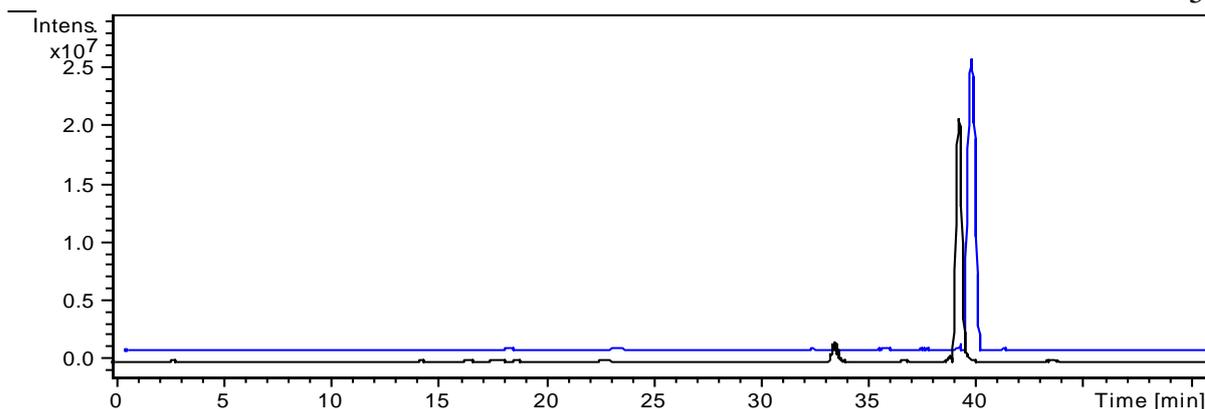


FIGURA 5.24 – Cromatogramas do extrato de *P. amarus* extraídos dos íons $[M+H]^+$ de m/z 611 (preto) e $[M+Na]^+$ de m/z 633 (azul).

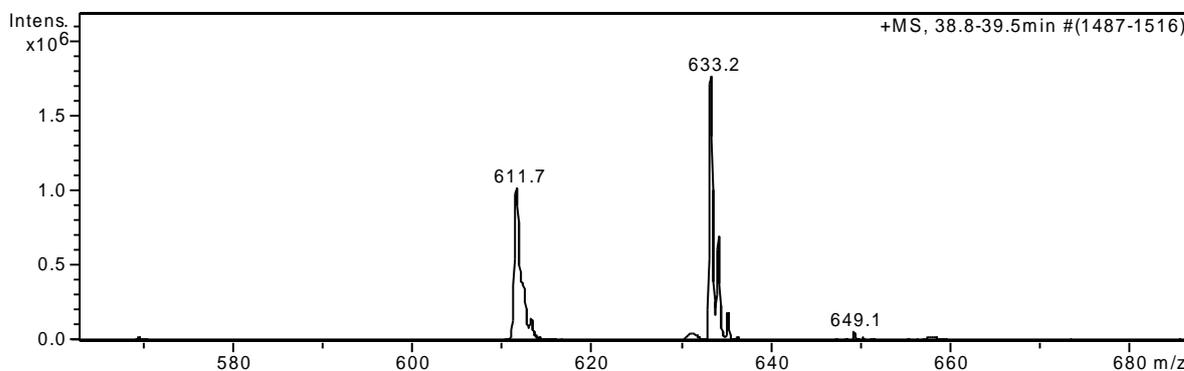


FIGURA 5.25 - Espectro de íons totais no modo positivo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 39,1 min.

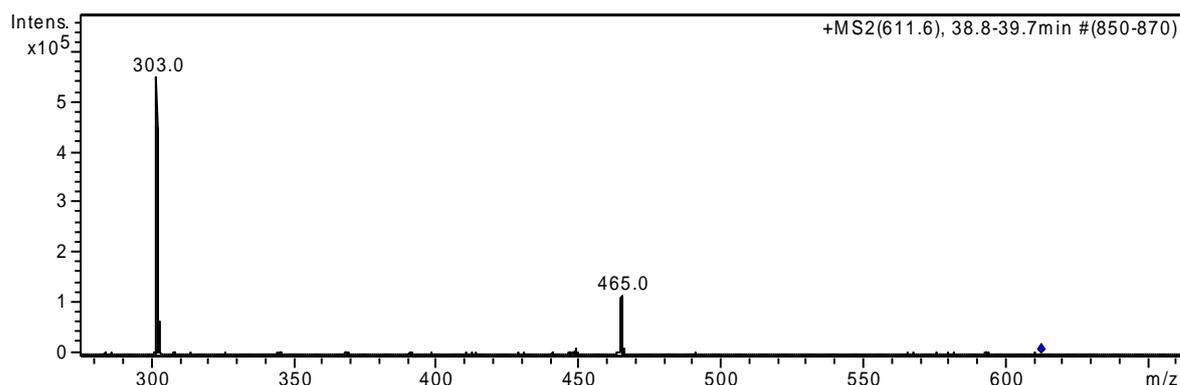


FIGURA 5.26 - Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 611.

Para os compostos dos itens 2,6 e 10 não foi possível propor estruturas baseando-se somente nos dados de fragmentação obtidos.

No modo negativo de ionização também foi observado nos extratos das quatro espécies de *Phyllanthus* ($tr = 29,0$) o íon molecular $[M-H]^-$ de m/z 633 relativo à corilagina (FIGURA 5.27 e 5.28). A fragmentação do íon molecular forneceu as

mesmas perdas do modo positivo, ou seja, o íon de m/z 463 resultante da perda do grupo galoil, além dos íons 301 e 275 referentes, respectivamente, a quebra das ligações C-O de ambas carbonilas dos ésteres ligados ao açúcar e a quebra de uma das ligações C-O das carbonilas dos ésteres ligados ao açúcar e de uma das ligações C-C entre uma carbonila e um dos anéis aromáticos²⁶(FIGURA 5.29).

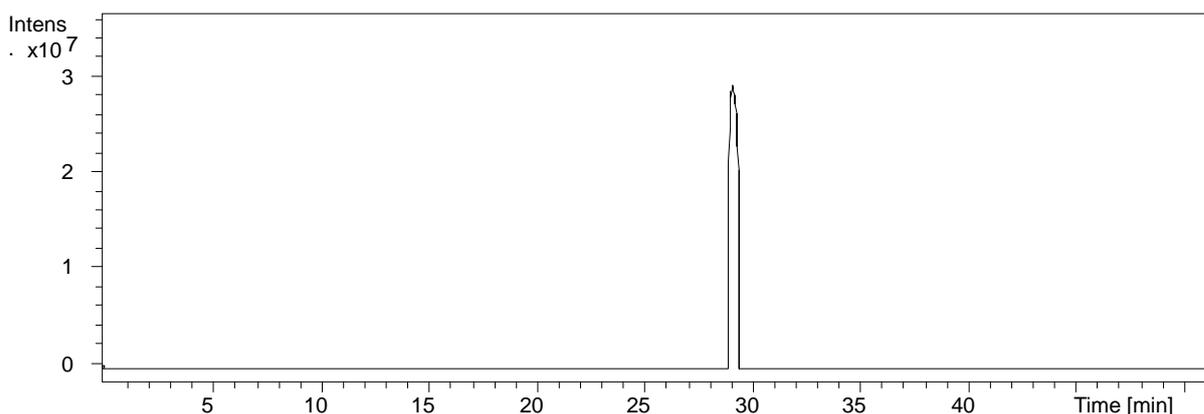


FIGURA 5.27 – Cromatograma do extrato de *P. amarus* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 633.

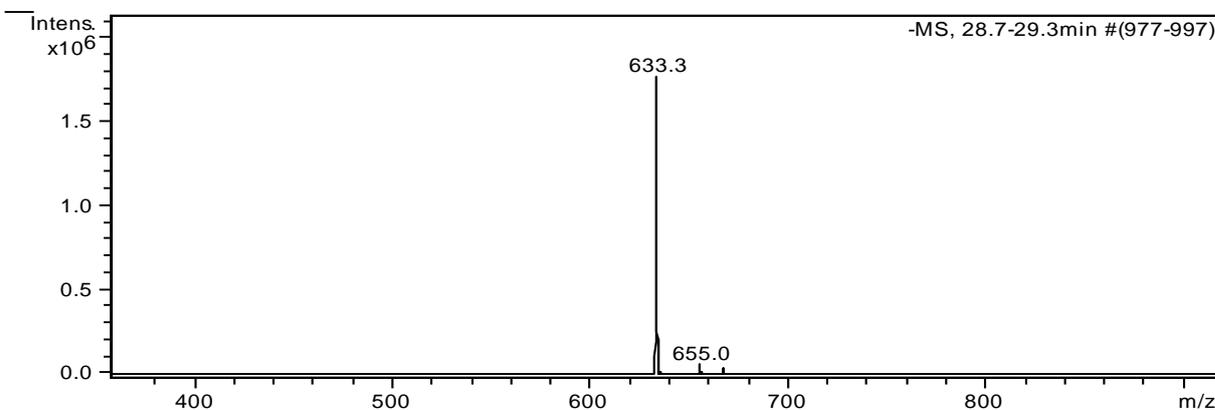


FIGURA 5.28 - Espectro de íons totais no modo negativo extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de 29,0 min.

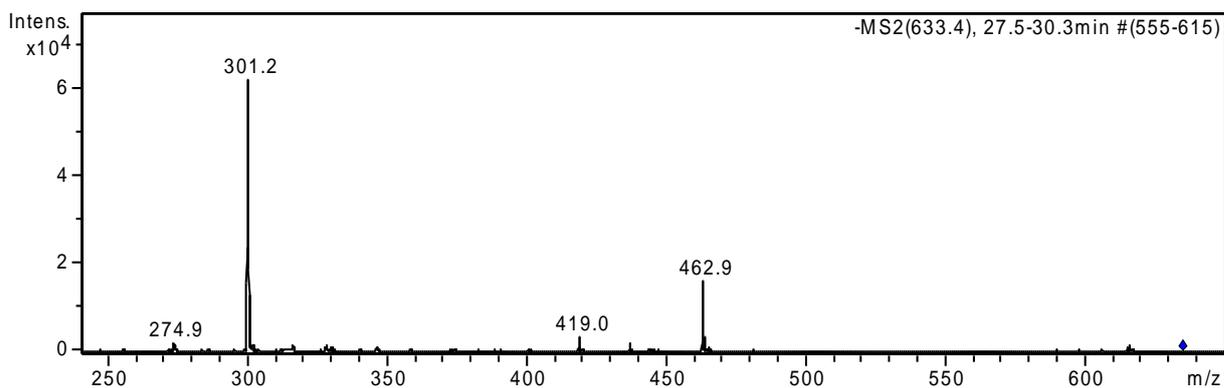


FIGURA 5.29 - Espectro de fragmentação íon $[M-H]^-$ de m/z 633.

No modo negativo foi possível observar nas quatro espécies de *Phyllanthus* o composto de m/z 169 caracterizado como ácido gálico (tr = 11,8) (FIGURA 5.30e 5.31). A fragmentação desse íon produziu o íon de m/z 125 consequente à perda de CO_2 com permanência da carga negativa no grupo trihidroxifenila remanescente¹⁵⁶ (FIGURA 5.32).

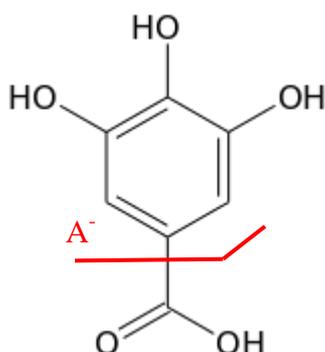


FIGURA 5.30 – Representação da fragmentação da molécula de ácido gálico. (A⁻) perda de 44 unidades de massa devido à saída de CO_2 .

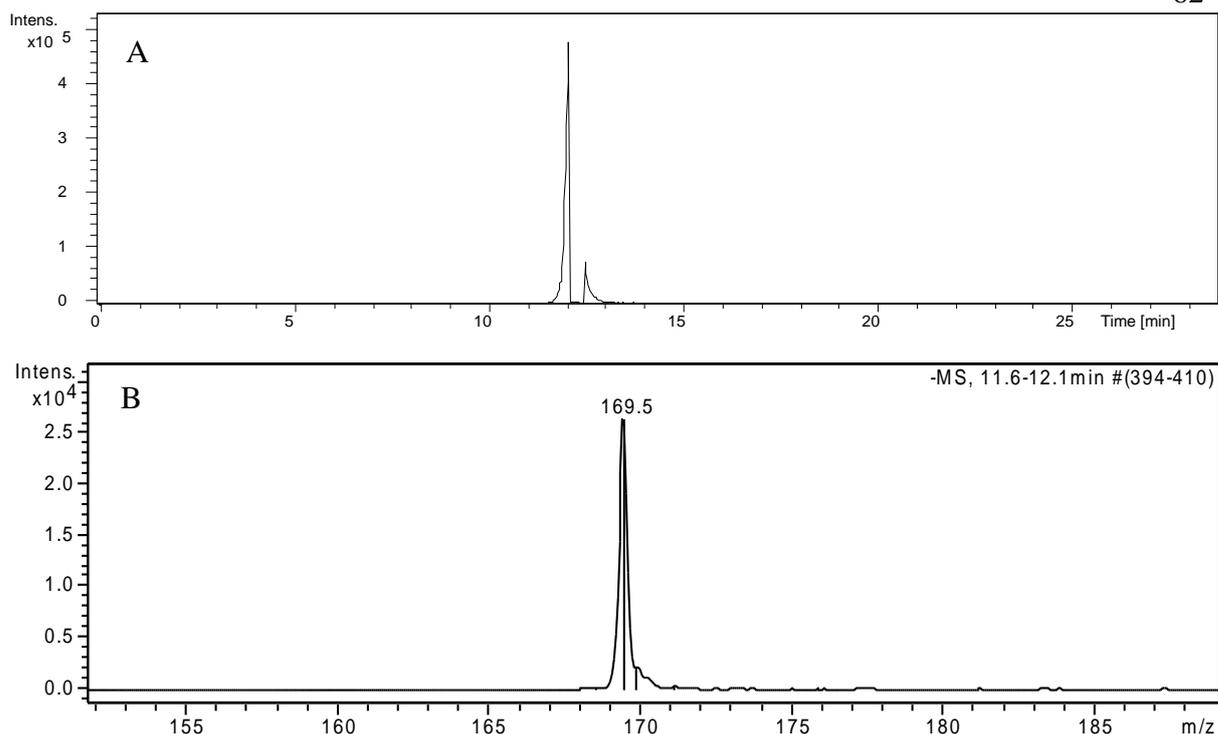


FIGURA 5.31 – Cromatograma e espectro de íons totais no modo negativo do composto ácido gálico. A) Cromatograma do extrato de *P. amarus* extraído do íon $[M-H]^-$ de m/z 169; B) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de 11,8 min.

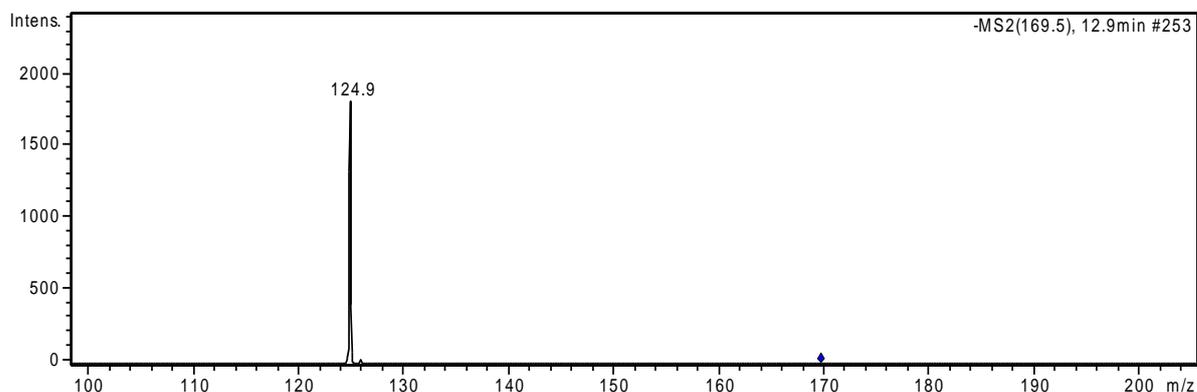


FIGURA 5.32 – Espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 169.

O íon de m/z de 583, presente nas quatro espécies, foi observado no modo negativo de ionização ($tr = 33,1$) e caracterizado como ácido carboxílico de brevifolina (FIGURA 5.33 e 5.34). O íon de m/z 583 ao ser fragmentado forneceu o íon fragmento correspondendo à metade de sua massa, ou seja, m/z de 291, o que indica a existência de um dímero, bem como, o íon fragmento de m/z 247 decorrente da perda de CO_2 proveniente de ácido carboxílico (FIGURA 5.35). Os dados de

fragmentação aliado a outros trabalhos publicados^{100,157} apontam para o composto ácido carboxílico de brevifolina.

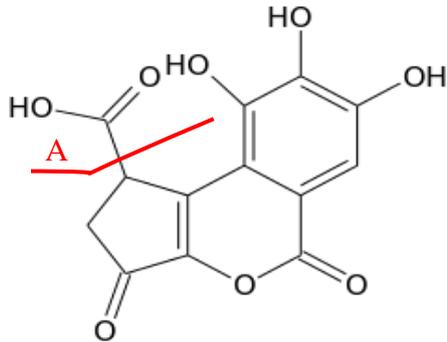


FIGURA 5.33 – Representação da fragmentação da molécula de ácido carboxílico de brevifolina. A) perda de 44 unidades de massa devido à saída de CO_2

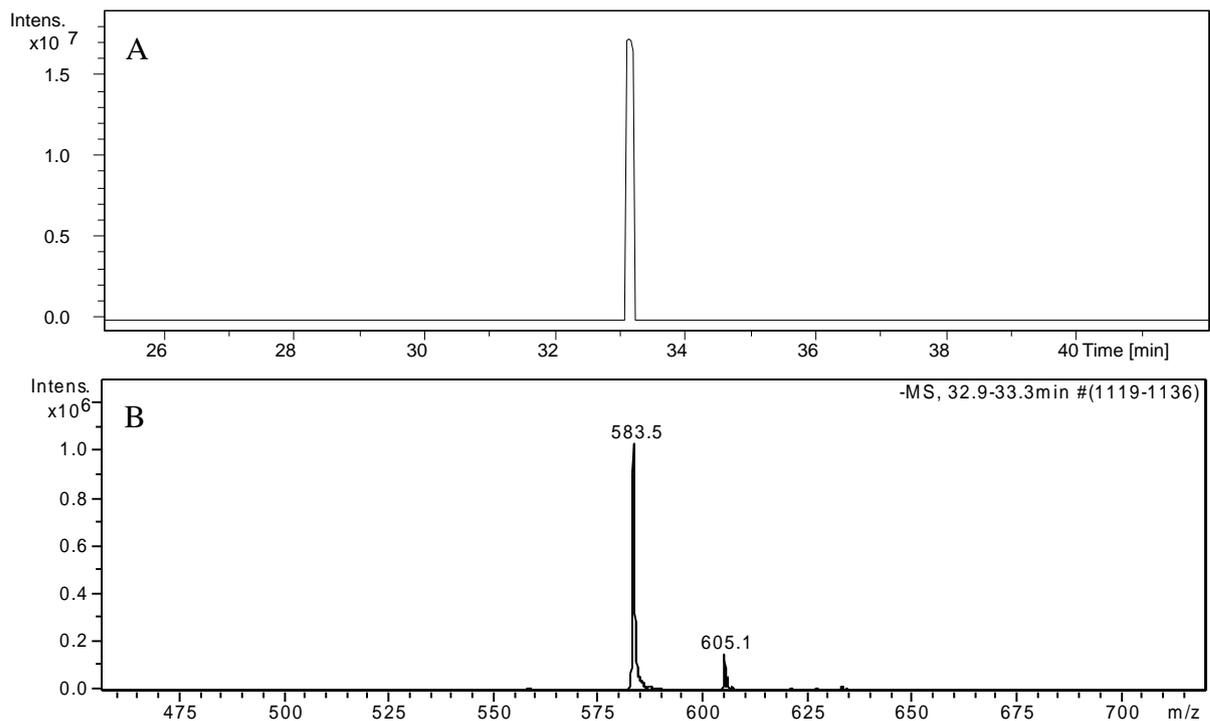


FIGURA 5.34 - Cromatograma e espectro de íons totais no modo negativo do composto ácido carboxílico de brevifolina. A) Cromatograma do extrato de *P. amarus* extraído do íon $[2\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 583; B) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de 33,1 min.

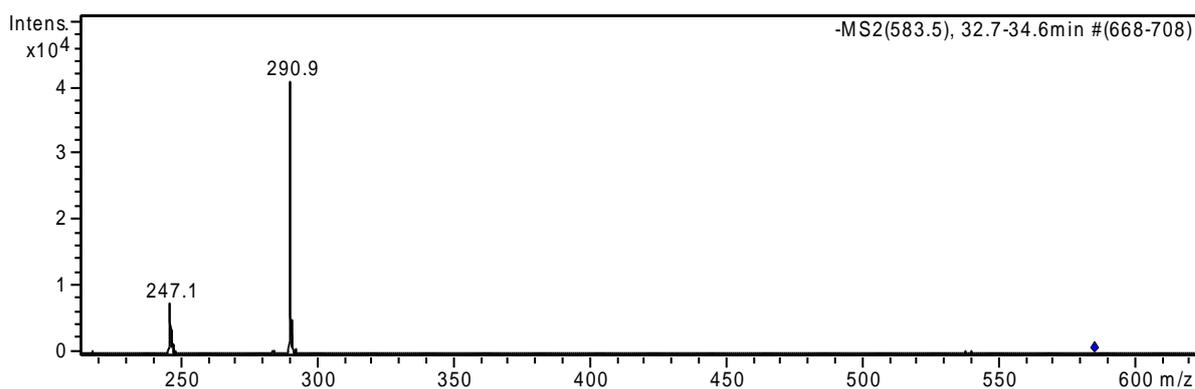


FIGURA 5.35 - Espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 583.

5.4.2 - Resultados do Experimento 2

Nesse experimento, foram realizadas análises em *full scan* no modo positivo e negativo de ionização. Todavia o modo de ionização positivo apresentou algumas desvantagens relacionadas à fragmentação ainda na fonte de ionização, observado no experimento 1, e também não foi possível observar o íon molecular $[M+H]^+$ em alguns íons e sim um aduto mais 18 unidades de massa. Em face disso, as análises por auto MS² foram realizadas apenas no modo negativo de ionização. Nesse experimento, distintamente ao primeiro (seção 5.4.1) os íons fragmentados foram escolhidos automaticamente pelos parâmetros selecionados no equipamento. Desta forma, foram analisados prioritariamente os íons mais intensos. As condições de eluição cromatográfica utilizada nesse experimento corresponde ao segundo método cromatográfico desenvolvido descrito no item 6.3.1 do procedimento experimental.

Na TABELA 5.3 encontram-se dispostos os resultados obtidos no experimento2.

TABELA 5.3 - Dados obtidos por LC-MS/MS no modo negativo de ionização a partir das quatro espécies de *Phyllanthus*.

N°	Composto Proposto	tr (min)	[M-H] ⁻	Ms ²	Observações
1	Corilagina	12,4	633	613; 463; 329; 301(100); 275	Presente nas quatro espécies
2	Composto não caracterizado	19,8	387	369; 343; 207(100); 191; 163; 113	Presente nas quatro espécies
3	Ácido carboxílico de brevifolina	22,1	583 [2M-H] ⁻ 291 [M-H] ⁻	291(100); 247 247	Presente nas quatro espécies
4	Isômeros de elagitaninos de massa molar de 970 g/mol	27,1 40,5	969		Presente nas quatro espécies
5	Isômeros elagitaninos de massa molar de 926 g/mol	31,0 35,5	925		Presente nas quatro espécies
6	Composto não caracterizado	33,2	605	537; 453; 435; 393; 363; 291(100); 273; 247	Presente nas quatro espécies
7	Orientina-2"-O-ramanosídeo	36,0	593	473; 429; 393; 357; 327(100); 309	Presente em <i>P. niruri</i>
8	Orientina	36,2	447	381; 357; 327 (100); 285	Presente em <i>P. niruri</i>
9	Vitexina-2-O"-ramanosídeo	42,0	577	457; 413(100); 311; 293	Presente em <i>P. niruri</i>

TABELA 5.3 - Dados obtidos por LC-MS/MS no modo negativo de ionização a partir das quatro espécies de *Phyllanthus*(continuação)

N°	Composto Proposto	tr (min)	[M-H] ⁻ m/z	Ms ² m/z	Observações
10	Elagitanino de massa molar de 954 g/mol	44,0	953	935; 907; 633; 463; 445; 301(100); 275	Presente em <i>P. stipulatus</i> e <i>P. niruri</i>
11	Miricetrina	45,0	463	395; 317 (100); 179; 151	Ausente <i>P. stipulatus</i>
12	Composto não caracterizado	46,4	549	531, 519, 503 (100), 457, 371	Presente em <i>P. niruri</i>
13	Rutina	49,7	609	463; 343, 301(100); 271;179	Ausente em <i>P. niruri</i>
14	Composto não caracterizado	48,4	417	371(100), 209	Presente em <i>P. stipulatus</i> e <i>P. niruri</i>
15	Quercetina-3-O-glucosídeo	50,2	463	301(100); 265; 179, 151	Presente nas quatro espécies
16	Quercetina-3-O-glucuronídeo	52,7	477	301(100)	Presente em <i>P. amarus</i> e <i>P. stipulatus</i>
17	Quercetrina	55,3	447	301(100)	Presente nas quatro espécies
18	Camferol-3-O-rutinosídeo	57,5	593	475; 359; 327; 285(100); 255; 209	Ausente em <i>P. niruri</i>
19	Composto não caracterizado	58,8	583	502; 437; 431; 413(100); 357; 327; 285; 257; 191	Presente em <i>P. niruri</i>
20	Composto não caracterizado	59,5	475	453; 397; 343; 325; 313(100); 193	Presente em <i>P. stipulatus</i>

O composto representado pelo item 1 ($t_r = 12,4$) apresentou as mesmas fragmentações da corilagina que as obtidas no experimento anterior referentes às perdas do grupo galoil e rearranjo do grupo hexahidroxidifenoila, sendo assim identificado como tal (FIGURA 5.36).

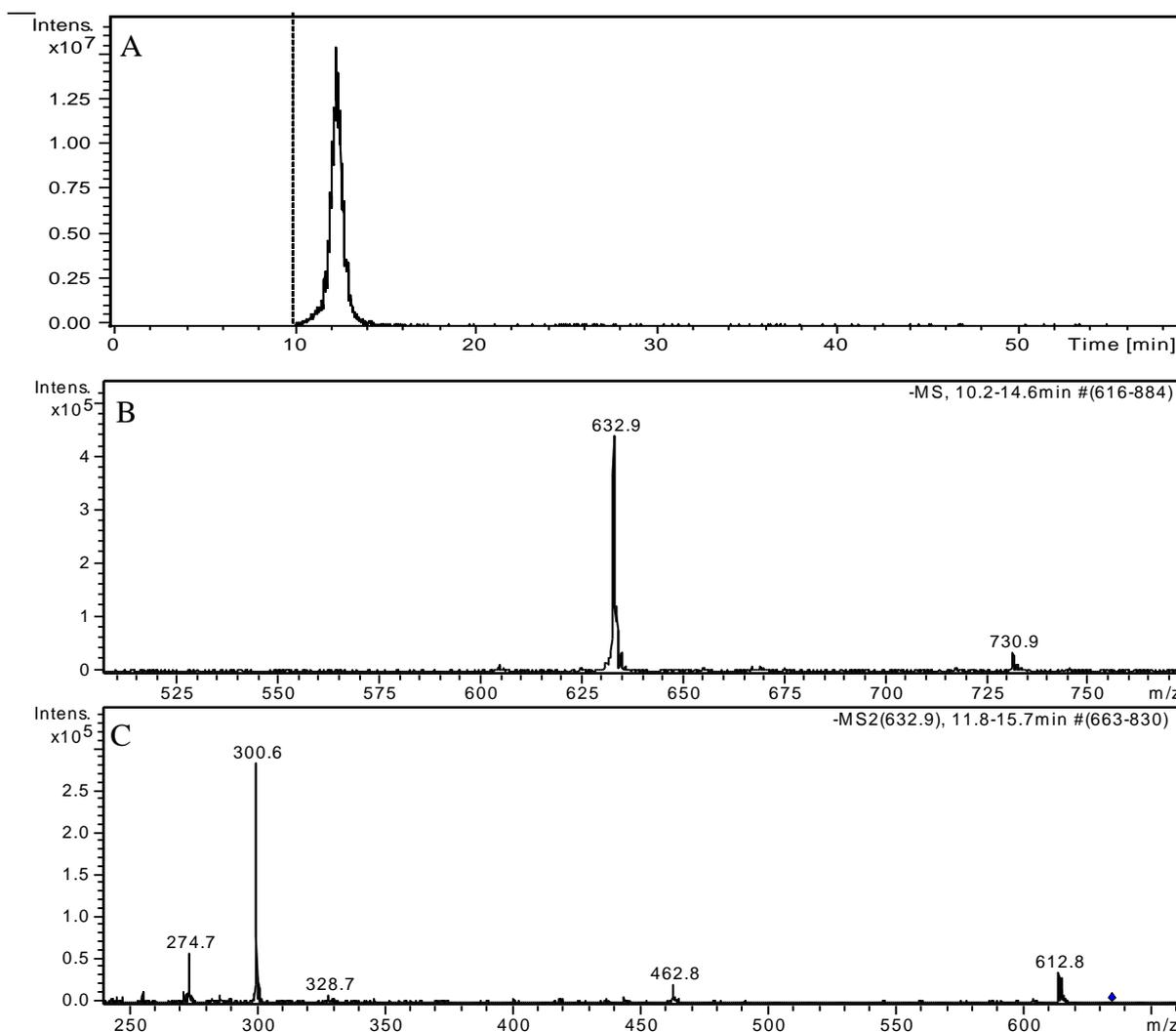


FIGURA 5.36 - Cromatograma e espectro de íons totais no modo negativo do composto corilagina após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS. A) Cromatograma extraído do íon $[M-H]^-$ de m/z 633; B) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de 12,4 min; C) fragmentação do íon $[M-H]^-$ 633 m/z.

O composto do item 3 ($t_r = 22,1$) (FIGURA 5.37) já identificado no experimento anterior como ácido carboxílico de brevifolina, apresentou o mesmo íon referente a dímero de ácido carboxílico $[2M-H]^-$ de m/z 583, bem como a mesma fragmentação, a saber, quebra do dímero formando íon m/z 291 e perda de CO_2

originando o íon de m/z 247 (FIGURA 5.38). Neste experimento também foi possível identificar o monômero do ácido carboxílico de brevifolina apresentando íon molecular $[M-H]^-$ de m/z 291 e fragmentação originando o íon de m/z 247 (FIGURA 5.39).

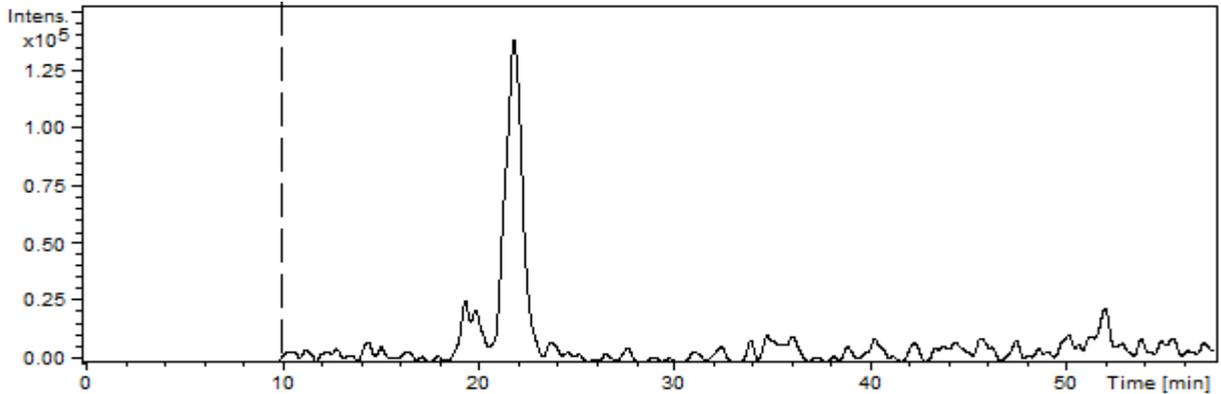


FIGURA 5.37 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 583.

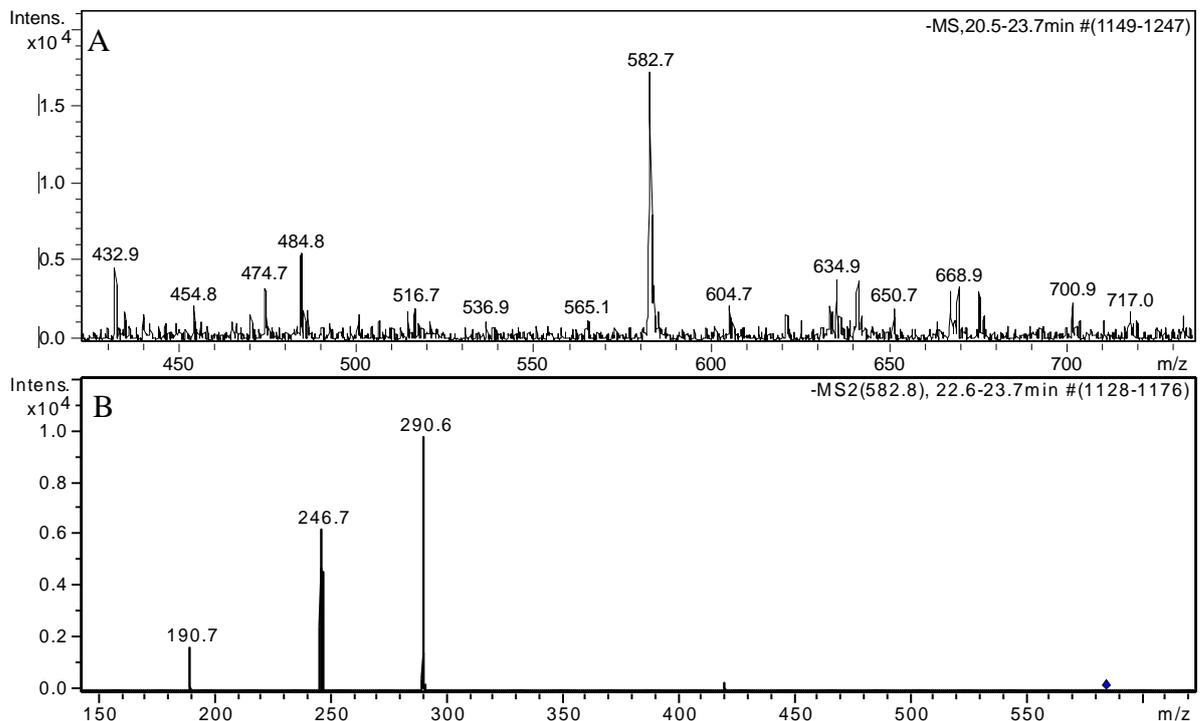


FIGURA 5.38 - Espectro de massa do composto do item 3 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 22,1 min; B) fragmentação do íon $[2M-H]^-$ m/z 583.

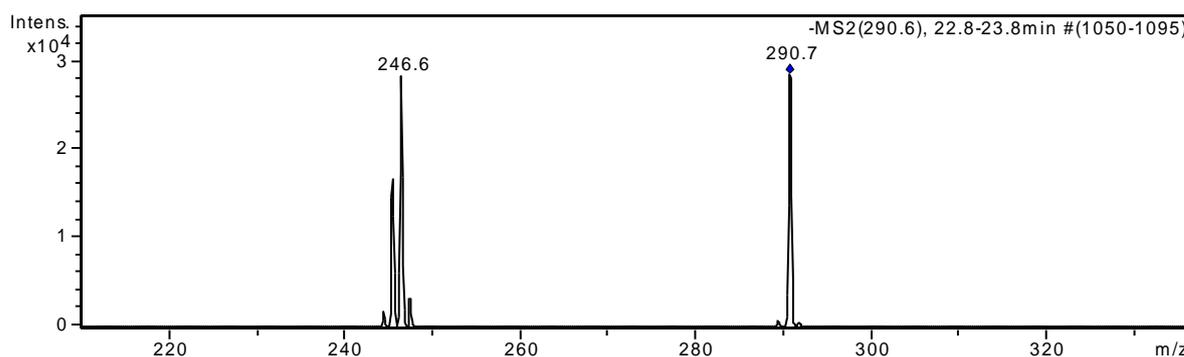


FIGURA 5.39 - Espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ de m/z 291.

Os compostos representados pelos números 4 ($tr = 27,1$ e $40,5$) (FIGURA 5.40) e 5 ($tr = 31,0$ e $35,5$) (FIGURA 5.41) com os íons moleculares $[M-H]^-$ 969 (FIGURA 5.42) e 925 (FIGURA 5.43) não apresentaram perfis fragmentação interpretáveis, contudo provavelmente representam os taninos hidrolisáveis de mesma massa molar discutidos anteriormente no experimento 1. Os compostos com m/z de 969 correspondem aos elagitaninos filantusina B, filantusina G e/ou ácido amarínico, enquanto que os compostos de m/z 925 aos taninos filantusina C e/ou pelargonina.

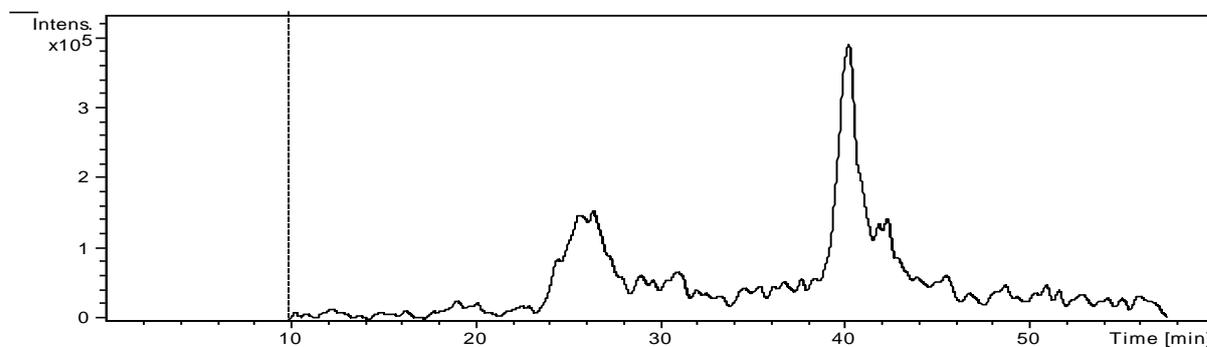


FIGURA 5.40 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 969.

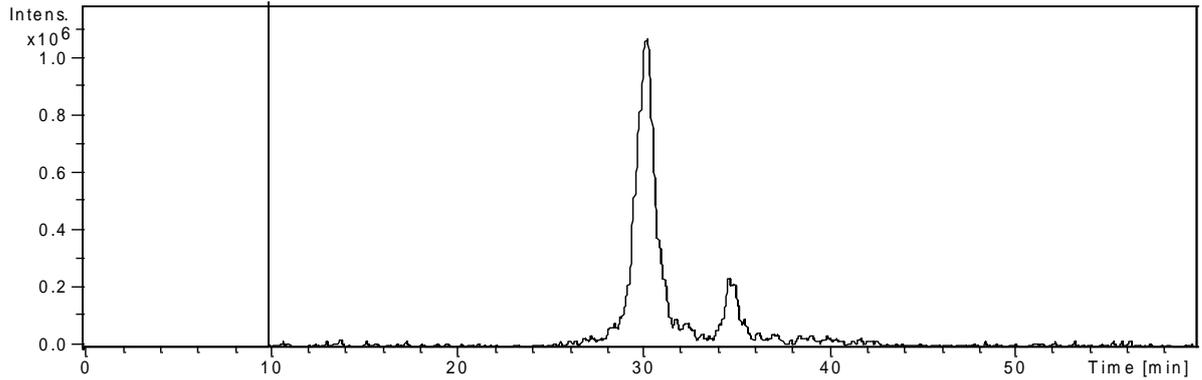


FIGURA 5.41 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 925.

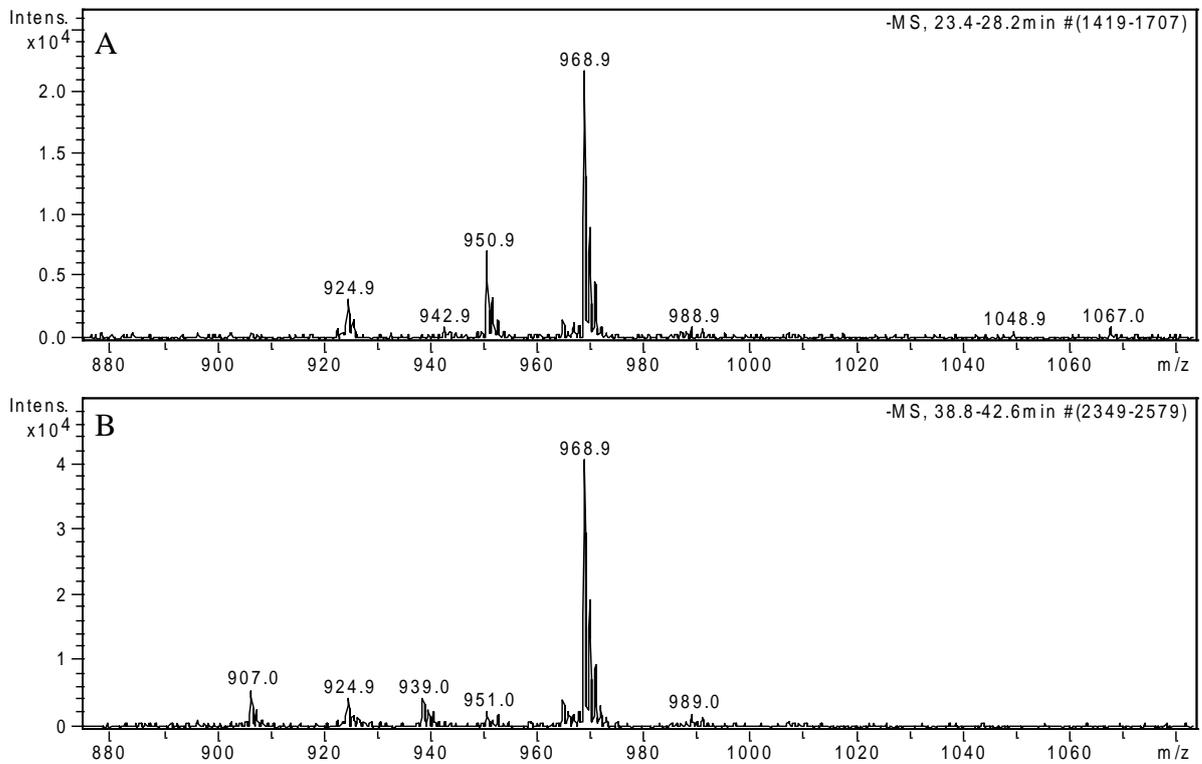


FIGURA 5.42 - Espectro de íons totais no modo negativo dos compostos do item 4 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS. Espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de (A) 27,1 min e (B) 40,5 min.

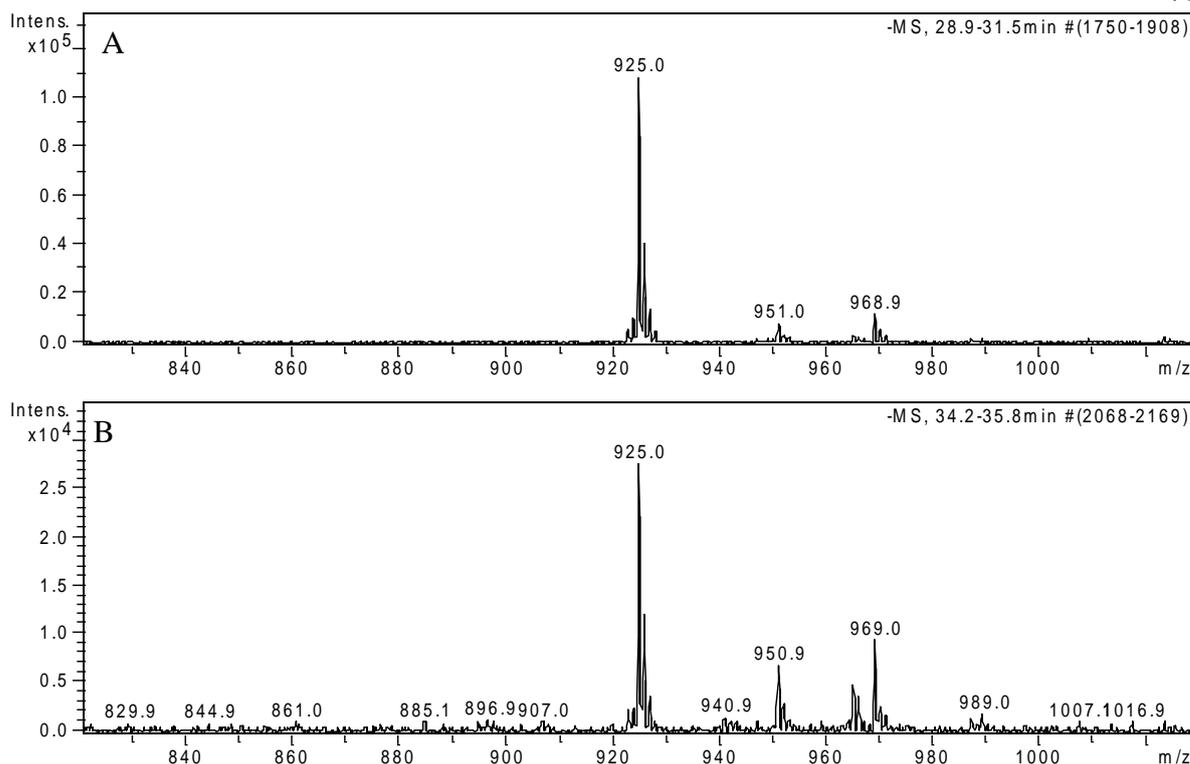


FIGURA 5.43 - Espectro de íons totais no modo negativo dos compostos do item 5 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS. Espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção de (A) 31,0 min e (B) 35,5 min.

O composto do item 7 ($tr = 36,0$) (FIGURA 5.44), presente exclusivamente no extrato de *P. niruri* e observado no experimento anterior sob o número 7 (TABELA 5.2), foi caracterizado como orientina-2"-O-ranósídeo (FIGURA 5.45). A fragmentação do íon molecular $[M-H]^-$ de m/z 593 apresentou padrão de fragmentação característico de flavonas C-glicosiladas. O íon fragmento de m/z 473 refere-se à quebra cruzada do anel hexose nas ligações 0,2 ($^{0,2}X_0^-$). O íon fragmento de m/z 429 referente à perda 164 unidades foi atribuída à perda de ranose com subsequente perda de molécula água em decorrência da fragmentação intramolecular do açúcar C-glicosídico ($Y^{2''}_1-H_2O^-$). A presença do íon de m/z 327 refere-se à perda de 120 unidades de massa concernente à quebra cruzada do anel de hexose, explicada acima, somada à perda de ranose ($Y^{2''}_1^{0,2}X_0^-$), enquanto o íon de m/z 309 relaciona-se à mesma quebra acrescida da saída de ranose e molécula de água ($Y^{2''}_1^{0,2}X_0-H_2O^-$). O íon fragmento de m/z 357 origina-se da quebra cruzada do anel nas ligações 0,3 ($^{0,3}X_0$) (FIGURA 5.46). As intensidades relativas dos íons no modo negativo fornecem muitas informações sobre a disposição dos açúcares em flavonoides glicosilados. Ferreres e

colaboradores¹⁵⁸ realizaram um estudo com flavonas C-glicosiladas nas posições 8 e 6 por LC-DAD-ESI/MS/MS, que tornou possível a diferenciação desses, baseando-se no padrão de fragmentação. Segundo os autores a principal diferença entre ambas as flavonas é a razão entre as perdas de 90 e 120 unidades de massa, sendo que em flavonas 8C glicosiladas a perda de 120 unidades de massa prevalece. Analisando o espectro ilustrado na FIGURA 5.45B observa-se que o íon fragmento de m/z de 327, referente à perda de 120 unidades massa após a saída de ramanose ($Y^{2''}_{1^{0,2}}X_0^-$), constitui-se o pico base, enquanto o íon fragmento 357 originário da perda 90 unidades de massa apresenta intensidade de 40%. Esses fatores indicam que o composto em questão é uma flavona 8C glicosilada. Por outro lado, como se trata de uma flavona com duas unidades de açúcar, sendo uma C-glicosídica e a outra O-ramanosídica, torna-se necessário diferenciar se o composto se trata de flavona diglicosilada em diferentes posições da aglicona ou duas unidades de açúcares interligadas. Conforme trabalho realizado por Ferreres¹⁵⁹, flavonas O-glicosiladas na posição 2'' do açúcar C-glicosilado apresentam o íon referente à saída do açúcar mais 18 unidades de massa ($Y^{2''}_{1-H_2O}$) como íon abundante sendo, muitas vezes, o pico base. No espectro o íon m/z 429 ($Y^{2''}_{1-H_2O}$) (FIGURA 5.45), apresenta intensidade significativa de 36,8%, o que sugere a presença de unidades hexose interligadas na posição 2''. Os dados obtidos sugerem que o composto consiste na flavona orientina-2''-O-ramanosídeo.

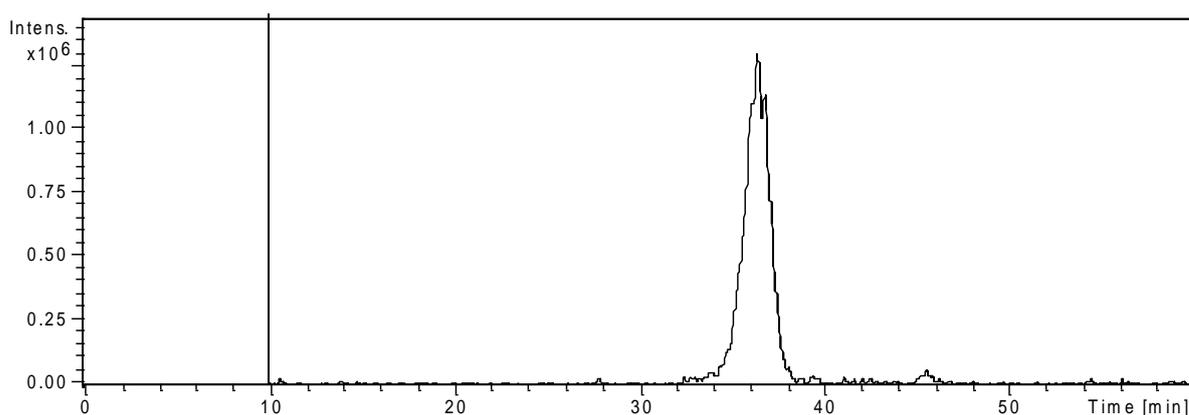


FIGURA 5.44 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 593.

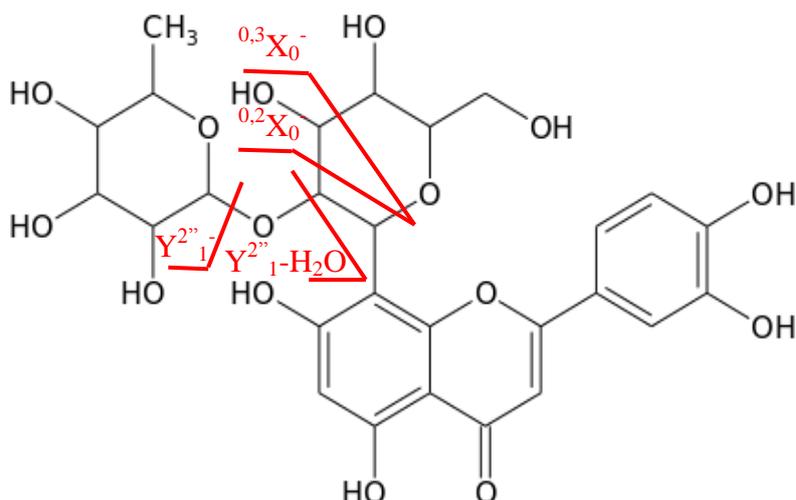


FIGURA 5.45 – Representação da fragmentação da molécula de orientina-2''-O-ranósídeo: ($^{0,2}X_0^-$) perda de 120 unidades de massa concernente a quebra cruzada do anel hexose nas ligações 0,2; ($^{0,3}X_0^-$) perda de 90 unidades de massa relativo à quebra cruzada do anel nas ligações 0,3; ($Y^{2''}_1^-$) perda de 146 unidades de massa referente à ramosídeo; ($Y^{2''}_1-H_2O$) perda de ramosídeo mais molécula de água.

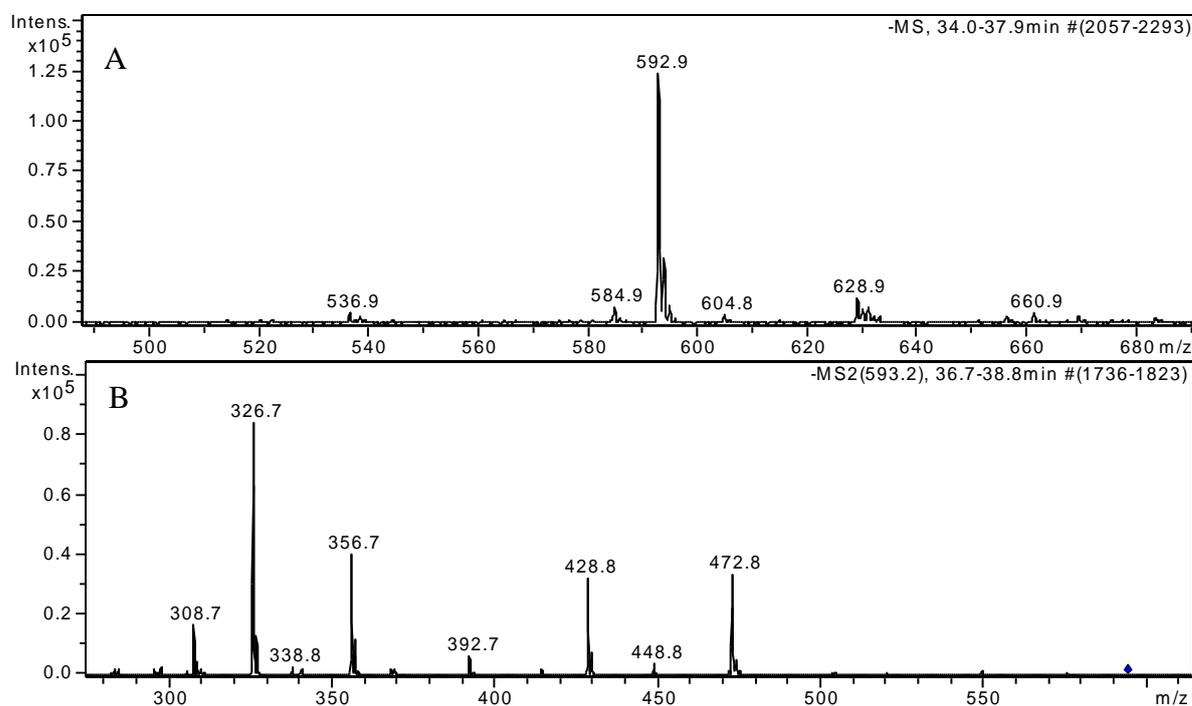


FIGURA 5.46 - Espectro de massa do composto do item 8 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 36,0 min; B) fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 593.

O composto do item 8 (tr = 36,2) (FIGURA 5.47) presente somente na espécie *P. niruri* foi identificado como sendo uma flavona C-glicosilada denominada orientina (FIGURA 5.48). O íon molecular $[M-H]^-$ de m/z 447 (FIGURA 5.49A) ao ser fragmentado apresentou perdas características de flavonas C-glicosiladas, entre as quais se destacam a perda de 120 unidades de massa referente à quebra cruzada do anel da glucose nas ligações 0,2 ($^{0,2}X_0^-$) e à perda de 90 unidades de massa relativo à quebra cruzada nas ligações 0,3 ($^{0,3}X_0^-$). O íon de m/z 285 é representativo da quebra da ligação C-glicosídica com permanência da carga sobre a aglicona livre (FIGURA 5.49B). Em flavonas C-glicosiladas a unidade de açúcar comumente está ligadas as posições 6 ou 8, sendo possível, conforme Ferreres¹⁵⁸, determinar qual a posição baseando-se na intensidade do íons $[(M-H)-90]^-$ e $[(M-H)-120]^-$, sendo o primeiro mais intenso em flavonas 6C do que em 8C-glicosilados. Os respectivos íons apresentaram (FIGURA 5.49B) intensidades de 57 e 100%, sugerindo a presença de flavona 8C glicosilada, ou seja, luteolina-8-C-glucosídeo (orientina).

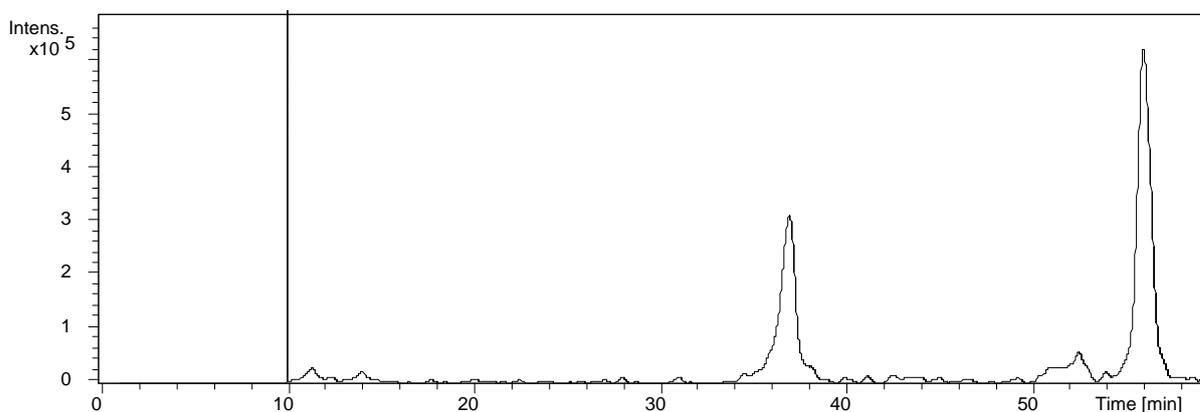


FIGURA 5.47 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 447.

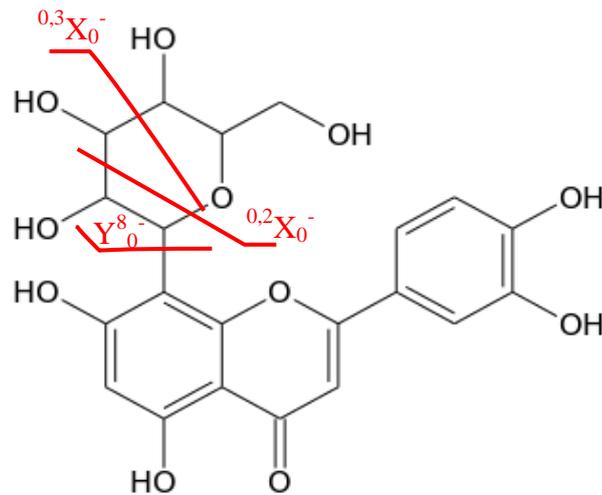


FIGURA 5.48 – Representação da fragmentação da molécula de orientina: ($^{0,2}X_0^-$) perda de 120 unidades de massa concernente a quebra cruzada do anel hexose nas ligações 0,2; ($^{0,3}X_0^-$) perda de 90 unidades de massa relativo à quebra cruzada do anel nas ligações 0,3; e Y_0^8 referente a quebra da ligação C-glicosídica.

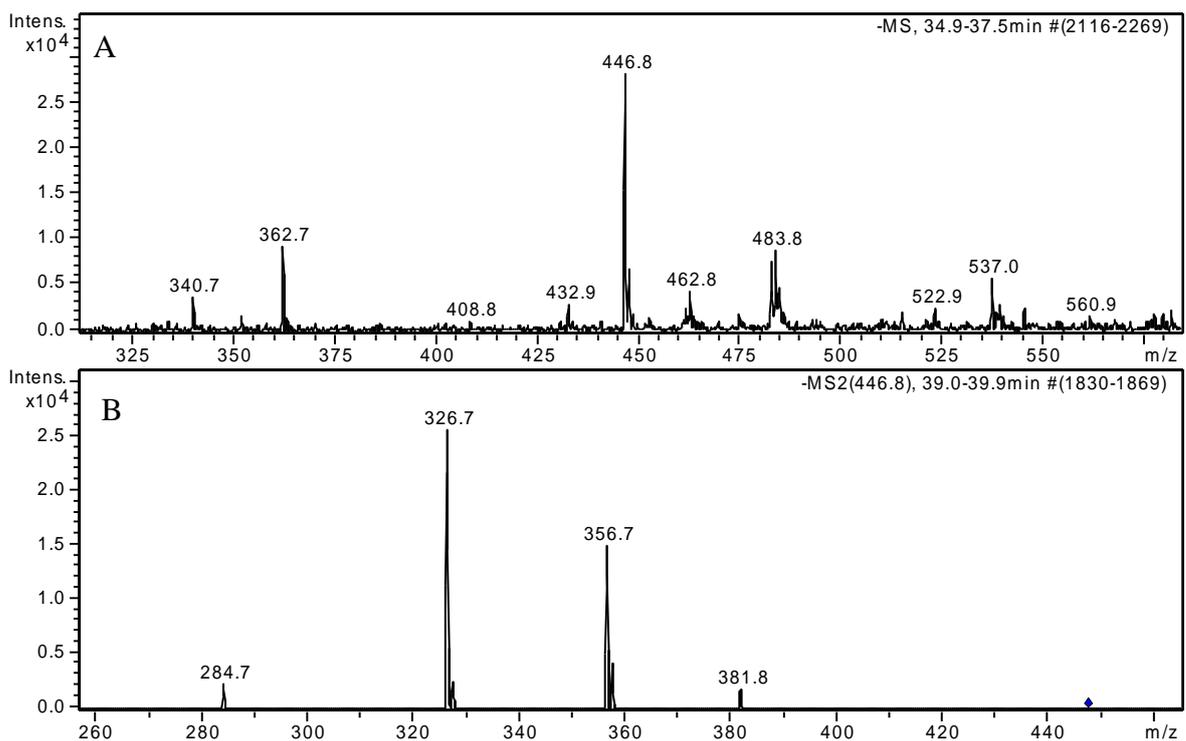


FIGURA 5.49 - Espectro de massa do composto do item 8 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 36,2 min; B) fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 447.

O composto representado pelo número 9 (tr = 42,0) (FIGURA 5.50)

destaca-se por estar exclusivamente presente no extrato de *P. niruri*. O mesmo foi caracterizado como vitexina-2''-O-ranansideo devido ao padrão de fragmentação característico de flavonas C-glicosiladas (FIGURA 5.51). A fragmentação do íon $[M-H]^-$ de m/z 577 (FIGURA 5.52A) apresentou as seguintes perdas: 120 relativo a quebra do anel de hexose nas ligações 0,2 ($^{0,2}X_0^-$); 164 concernente a saída da ramanose e molécula de água ($Y^{2''}_1-H_2O^-$); 266 referente a quebra cruzada da hexose acrescido a perda da ramanose ($Y^{2''}_1^{0,2}X_0^-$), 284 pertinente a fragmentação cruzada da hexose e perda de ramanose aditado a molécula de água ($Y^{2''}_1^{0,2}X_0^-H_2O$) (FIGURA 5.52B). A discriminação em relação ao posicionamento dos açucares é possível por meio da análise da intensidade de alguns íons no espectro. No espectro de fragmentação ilustrado na FIGURA 5.51B o pico base de m/z 413 atinente a perda da deoxihexose mais molécula de água ($Y^{2''}_1-H_2O^-$) reforça a proposição da presença de unidades de hexose interligadas pela posição 2'' glicosídica¹⁵⁹. Por outro lado, a presença de quebras cruzadas do anel de hexose entre as ligações 0,2, aliado a ausência de quebras cruzadas nas ligações 0,3, indicam que a ponto de inserção da C-glicosídica ocorre na posição 8 do núcleo flavônico¹⁵⁸.

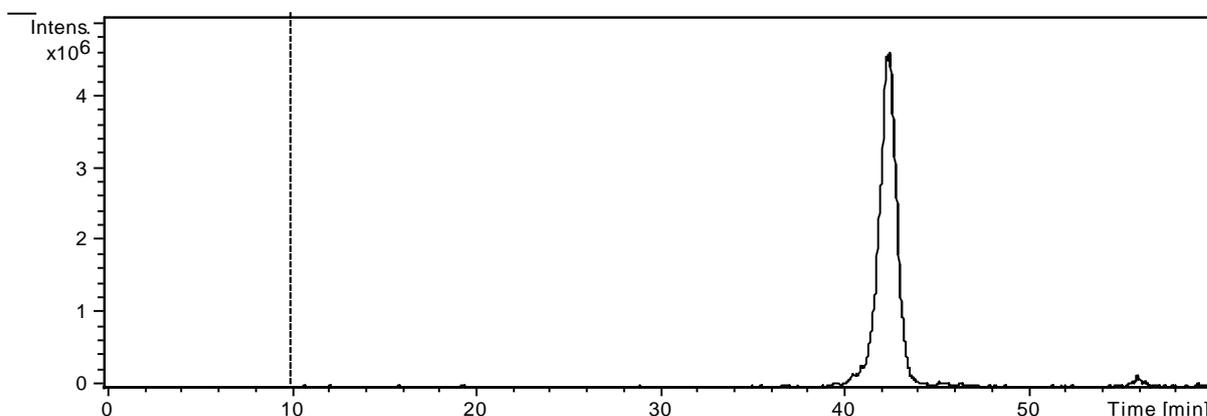


FIGURA 5.50 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 577.

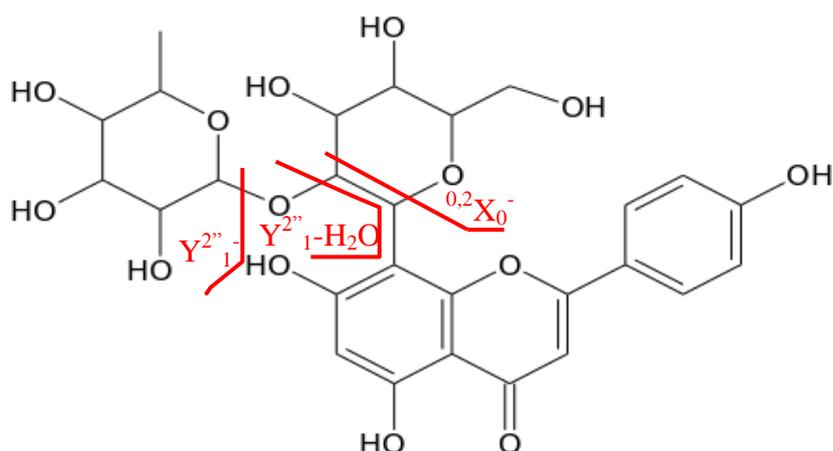


FIGURA 5.51 – Representação da fragmentação da molécula de vitexina-2''-O-ramanosídeo: ($^{0,2}X_0^-$) perda de 120 unidades de massa concernente a quebra cruzada do anel hexose entre as posições 0,2; ($Y^{2''}_1$) perda de 146 unidades de massa referente saída de ramanosídeo e ($Y^{2''}_1-H_2O$) saída de ramanosídeo mais água.

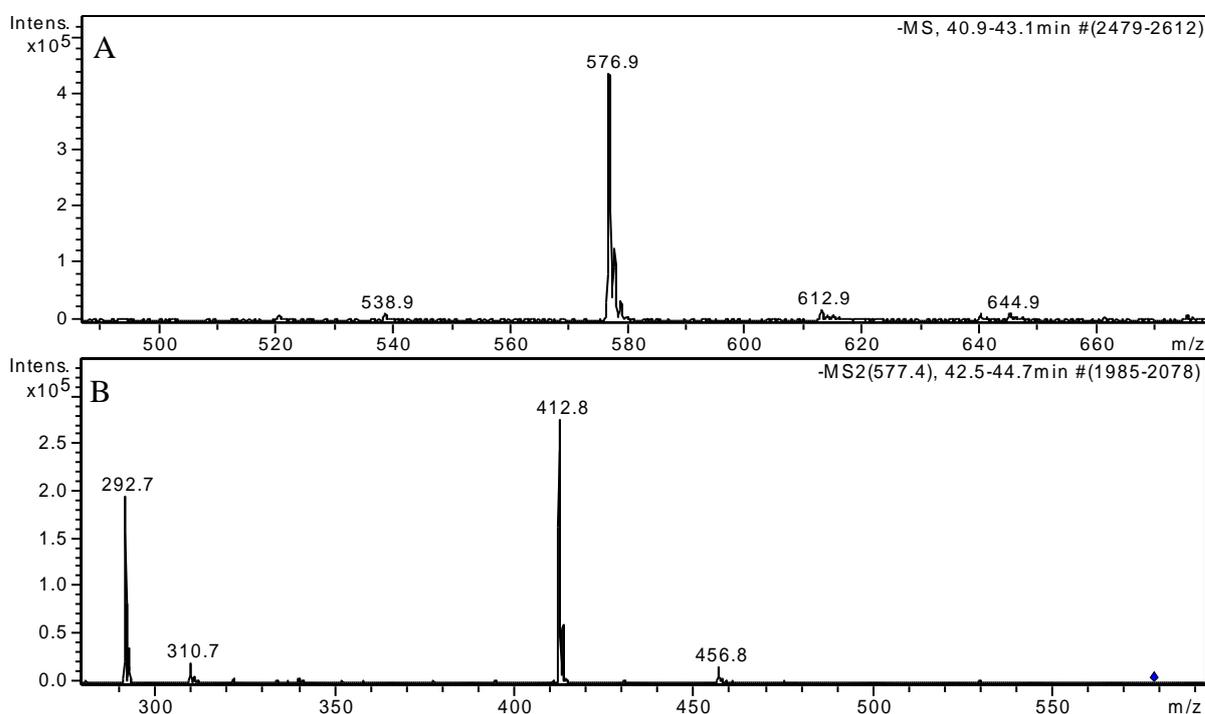


FIGURA 5.52 - Espectro de massa do composto de número 9 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 42,0 min; B) fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 577.

O composto do item 10 ($t_r = 44,0$) (FIGURA 5.53) foi observado nas espécies *P. niruri* e *P. stipulatus*. No experimento de MS^2 apresentou fragmentação característica de elagitaninos, sendo sua possível estrutura caracterizada como ácido quebulágico¹⁶⁰ ou ácido geranínico A (FIGURA 5.54). A fragmentação do $[M-H]^-$ de m/z 953 (FIGURA 5.55A) formou os íons de m/z 301 e 275 concernente à quebra de ambas as ligações C-O dos ésteres ligados ao açúcar seguidos de rearranjo formando ácido elágico e quebra de uma das ligações C-C entre um dos anéis aromáticos e uma das carbonilas dos ésteres, respectivamente. A perda de 332 unidades de massa formando o íon de m/z 633 refere-se à quebra das ligações de éster com subsequente saída de grupo hexahidroxi-difenol. O íon fragmento de m/z 463 diz respeito a perda de ácido gálico após perda do grupo hexahidroxi-difenol (FIGURA 5.55B).

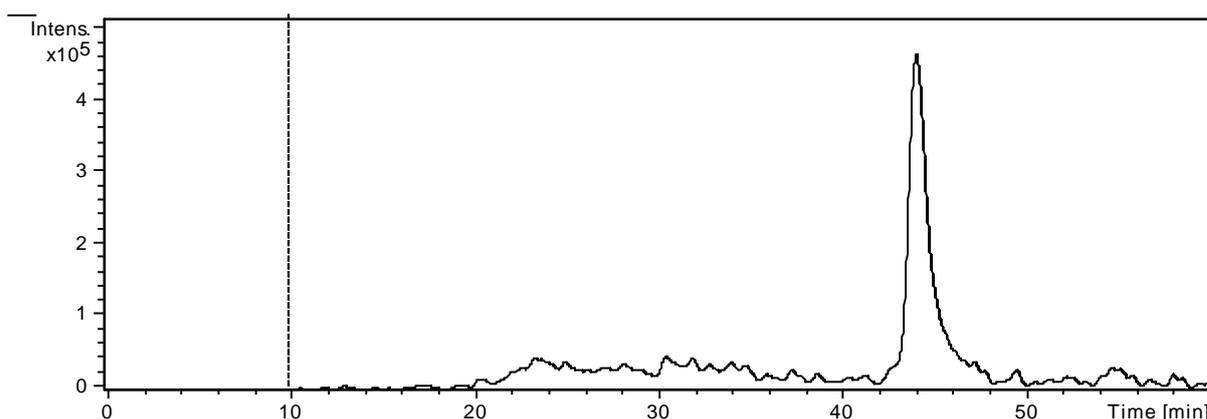


FIGURA 5.53 – Cromatograma do extrato de *P. stipulatus* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 953.

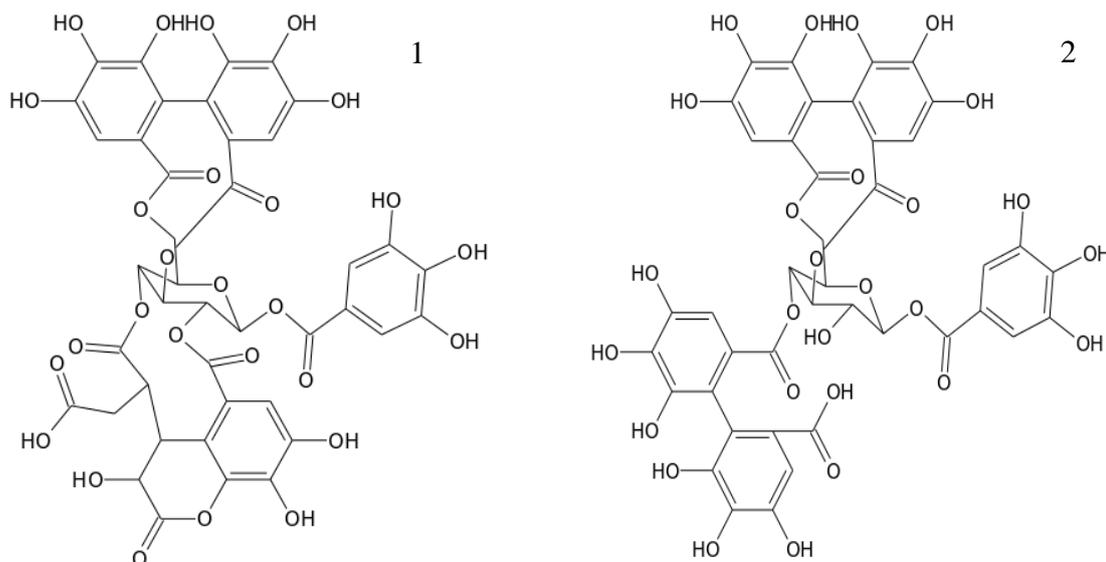


FIGURA 5.54 – Possíveis estruturas de taninos hidrolisáveis com massa molar de 954 g/mol. 1) ácido quebulágico; 2) ácido geranínico A.

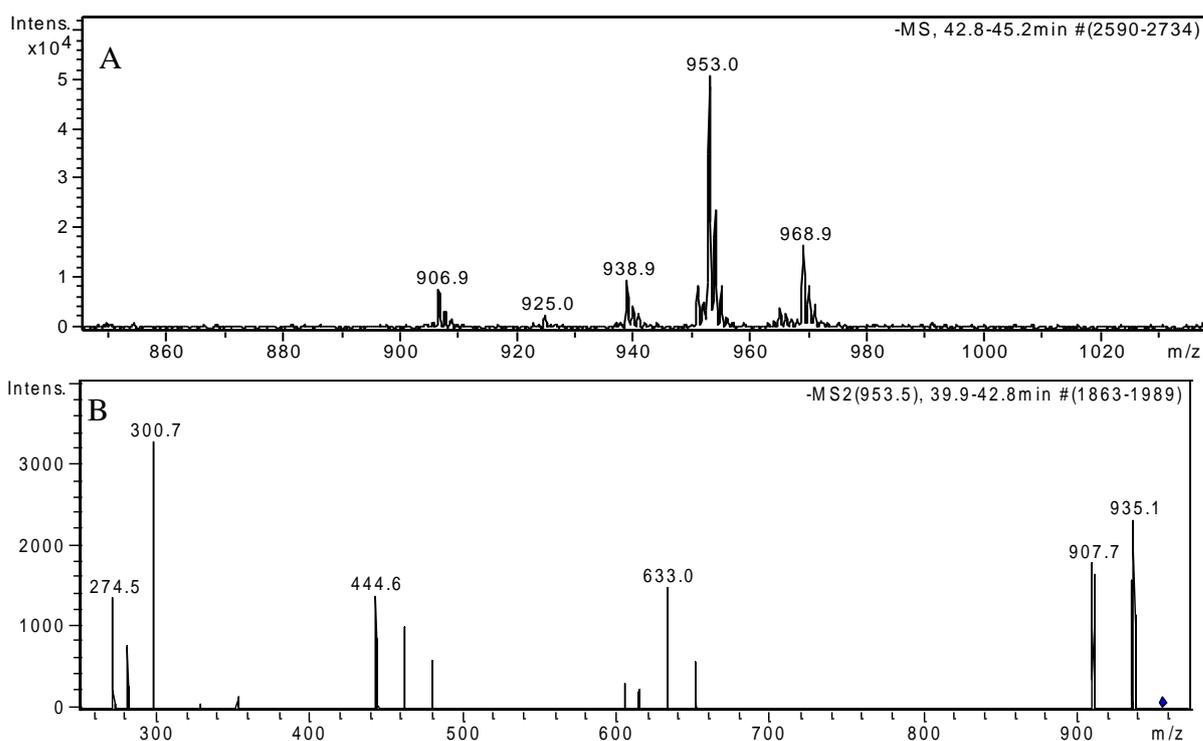


FIGURA 5.55 - Espectro de massa do composto do item 10 após injeção do extrato de *P. stipulatus* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 44,0; B) espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 953.

Os compostos representados pelos itens 11, 15 e 17 representam flavonoides O-heterosídicos (FIGURA 5.56). O composto do item 11 (tr = 45,0) (FIGURA 5.57) mostrou-se presente em todas as espécies exceto em *P. stipulatus*. A

fragmentação do íon molecular 463 originou o íon de m/z 317 característico da aglicona miricetina (Y_0^-) após a perda do açúcar ramosa (FIGURA 5.58). O composto de número 15 ($tr = 50,2$) (FIGURA 5.59), presente nas quatro espécies de *Phyllanthus*, ao ser fragmentado apresentou a perda de 162 unidades de massa referente à glucose (Y_0^-), dando origem ao fragmento de m/z 301 concernente à quercetina (FIGURA 5.60). O composto do item 17 ($tr = 55,3$) (FIGURA 5.61), presente nas quatro espécies, possui o íon molecular de m/z 447 que ao ser fragmentado apresentou a aglicona livre de m/z 301 relativo à quercetina, entretanto demonstrou perda de 146 unidades de massa característico de ramosa (Y_0^-) (FIGURA 5.62). Os flavonoides O-heterosídicos geralmente apresentam glicosilação na posição 3 ou 7, podendo eventualmente estar ligado ao anel B e raramente na posição 5. A discriminação dessas diferenças não é possível exclusivamente pela interpretação dos dados de fragmentação por espectrometria de massa.

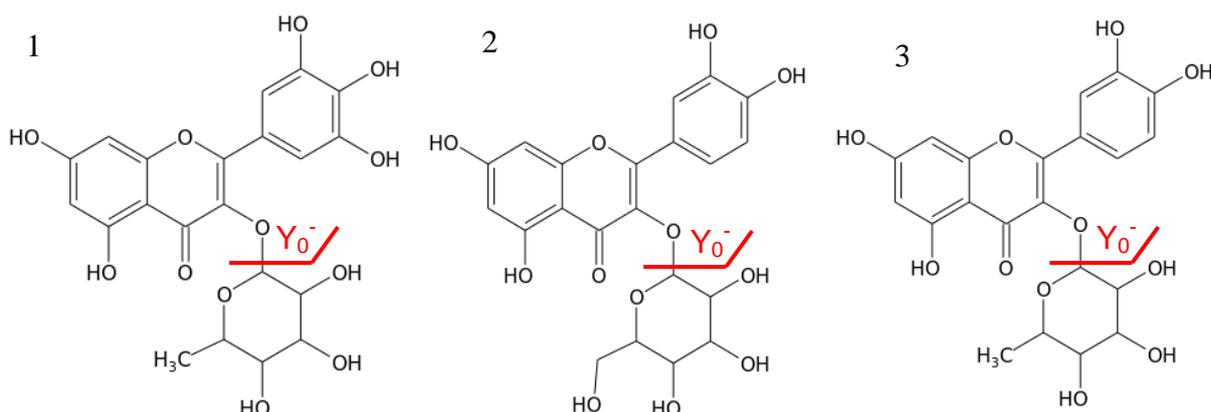


FIGURA 5.56 - Possíveis estruturas representantes dos flavonoides dos itens 11, 15 e 17. 1) miricetina-3-O-ramanosídeo; 2) quercetina-3-O-glucosídeo; 3) quercetina-3-O-glucosídeo.

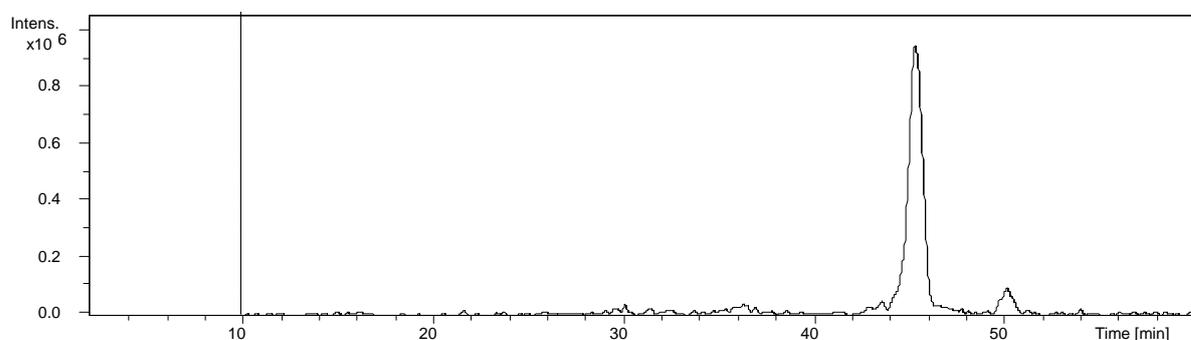


FIGURA 5.57 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 463.

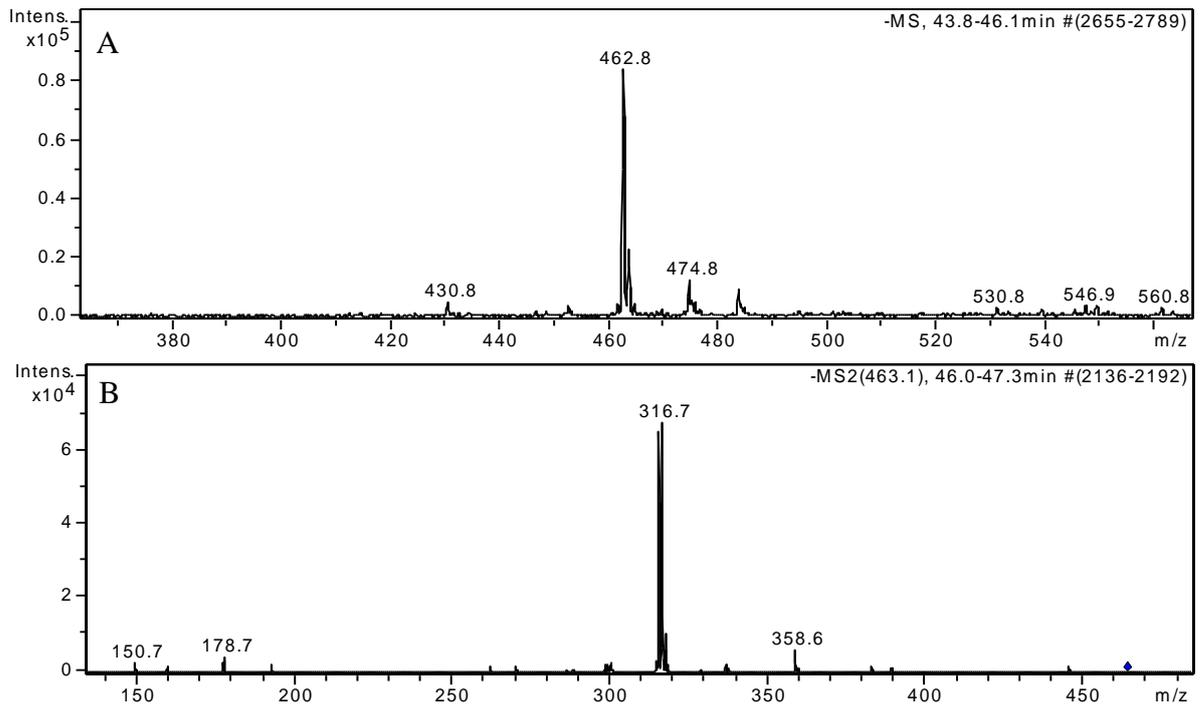


FIGURA 5.58 - Espectro de massa do composto do item 11 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 45,0; B) espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ de m/z 463.

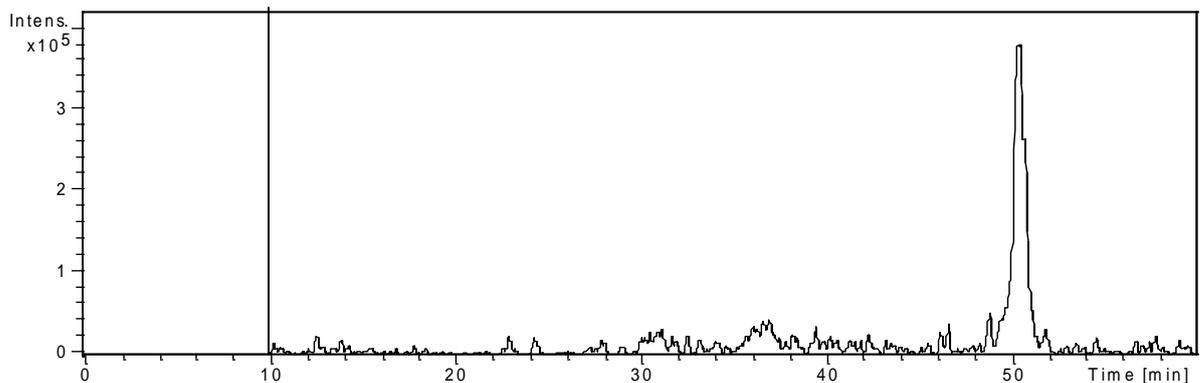


FIGURA 5.59 – Cromatograma do extrato de *P. stipulatus* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 463.

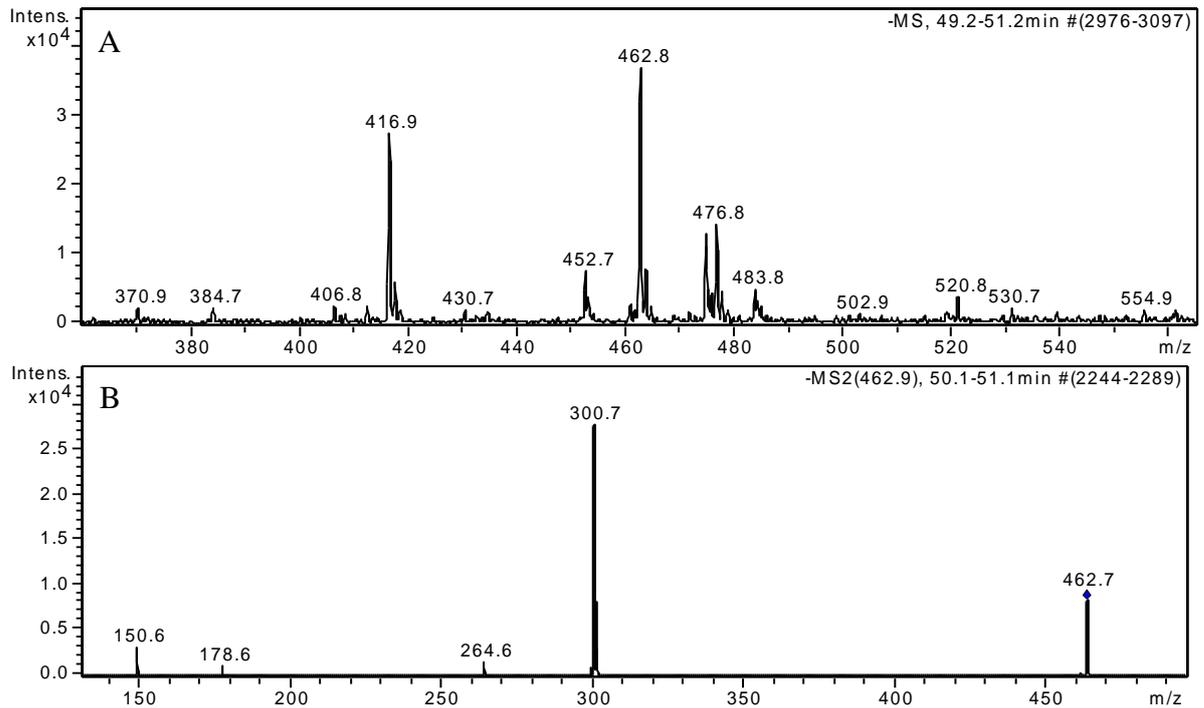


FIGURA 5.60 - Espectro de massa do composto do item 15 após injeção do extrato de *P. stipulatus* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 50,2; B) espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ de m/z 463.

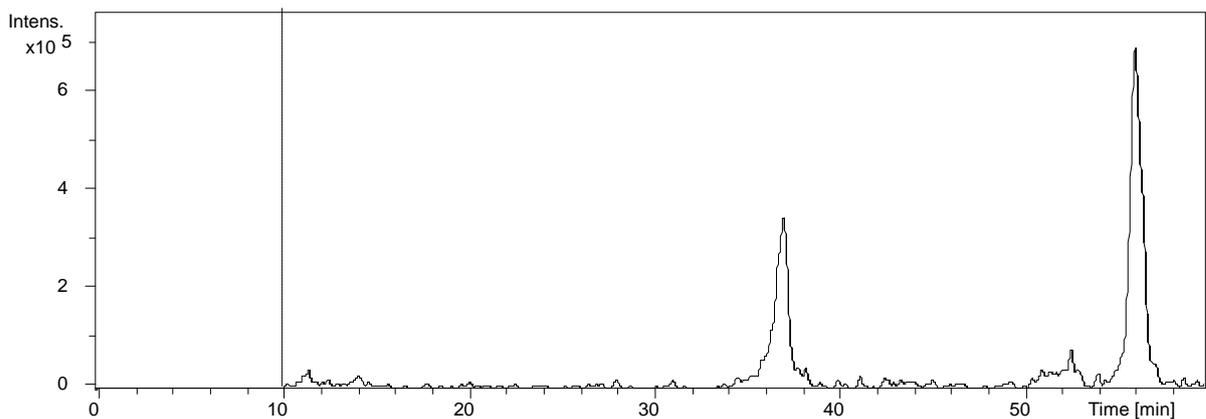


FIGURA 5.61 – Cromatograma do extrato de *P. niruri* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 447.

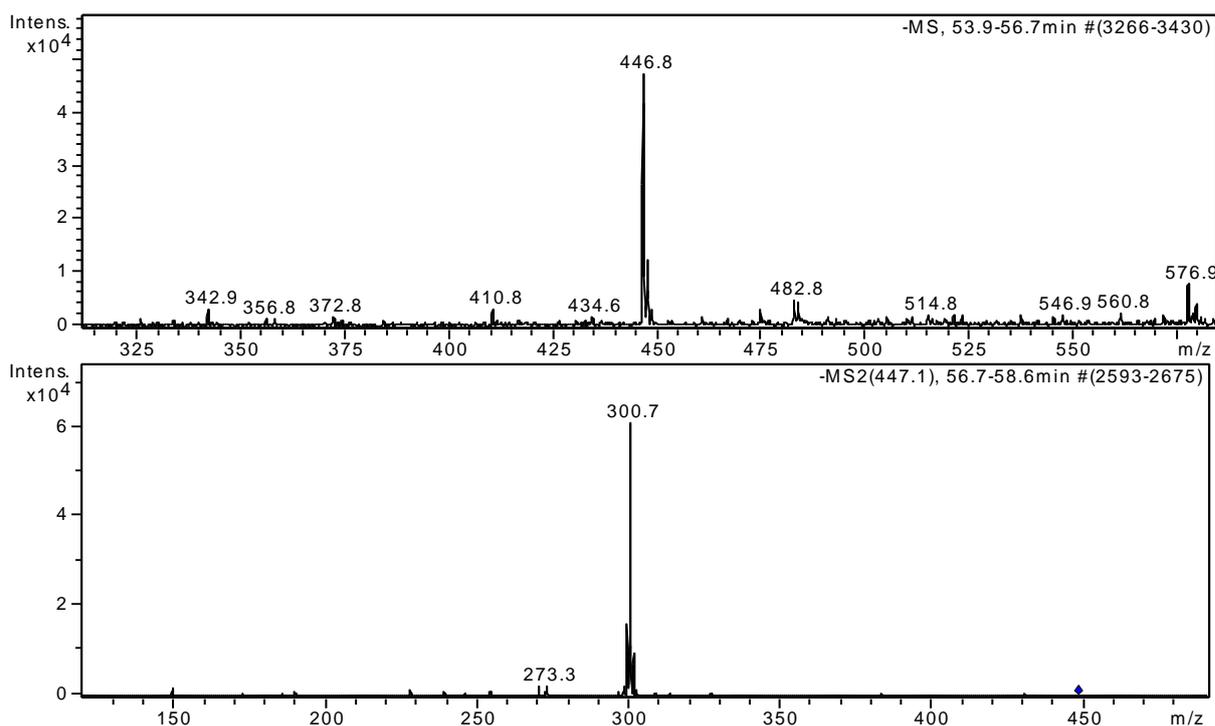


FIGURA 5.62 - Espectro de massa do composto do item 17 após injeção do extrato de *P. niruri* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 55,3; B) espectro de fragmentação do íon [M-H]⁻ de m/z 447

O composto do item 13 (tr = 49,7) (FIGURA 5.63), ausente somente na espécie *P. niruri*, foi caracterizado no experimento 1 no modo positivo de ionização como sendo provavelmente rutina. No modo negativo de ionização o íon molecular [M-H]⁻ de m/z 609 (Figura 5.64A) ao ser fragmentado apresentou o íon de m/z 301 como pico base pertinente a aglicona livre (Y₀⁻). A perda de 146 unidades de massa relativa a perda ramanose formando o íon 463 está presente no espectro embora em baixa intensidade (Y₆¹⁻) (Figura 5.64B). Conforme Ferreres¹⁵⁵, o qual caracterizou e diferenciou flavonoides poliglicosilados interligados por LC-ESI-MS/MS, os flavonoides O-diglicosilados interligados através de ligação 1,6 (Glc(1 → 6)Glc) apresentam como pico base a aglicona livre (Y₀⁻), por outro lado, o pico referente a perda da primeira unidade de açúcar é pouco intenso (Y₆¹⁻). Em contrapartida, flavonoides O-diglicosilados interligados através de ligação 1,2 (Glc(1 → 2)Glc) embora também apresentem as mesmas quebras citadas acima, é possível observar o pico relativo a perda da primeira unidade de açúcar mais 18 unidades de massa com abundância significativa (Y₂¹⁻-H₂O⁻). Já flavonoides di-O-glicosilados

apresentam pico base referente a quebra da primeira unidade de açúcar. Em face disso e também devido ao fato de dissacarídeos em flavonoides geralmente estarem dispostos em (1→6) ou (1→2)¹⁵⁴ pode-se inferir que o dado composto retrata uma molécula de quercetina ligada por ligação O-heterosídica ao dissacarídeo rutinosídeo. Em flavonóis, embora seja possível a unidade O-glicosídica estar ligada a qualquer grupo hidroxil presente na aglicona, comumente o sítio de ligação de heterosídeos ocorre na posição 3 ou 7¹⁵⁴. Dessa forma, não é possível propor com certeza a estrutura exata do composto, todavia o mesmo aparenta ser quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina) ou quercetina-7-O-rutinosídeo.

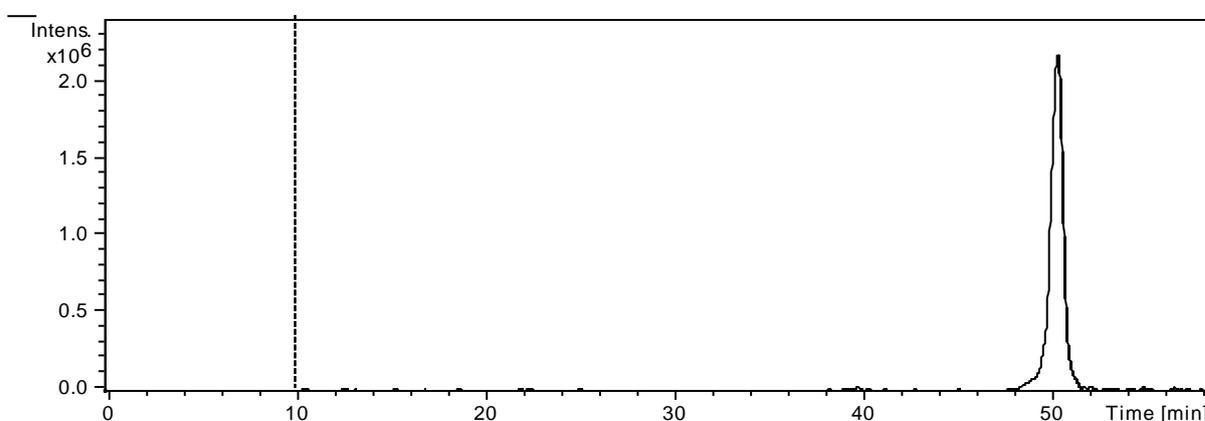


FIGURA 5.63 – Cromatograma do extrato de *P. tenellus* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 609.

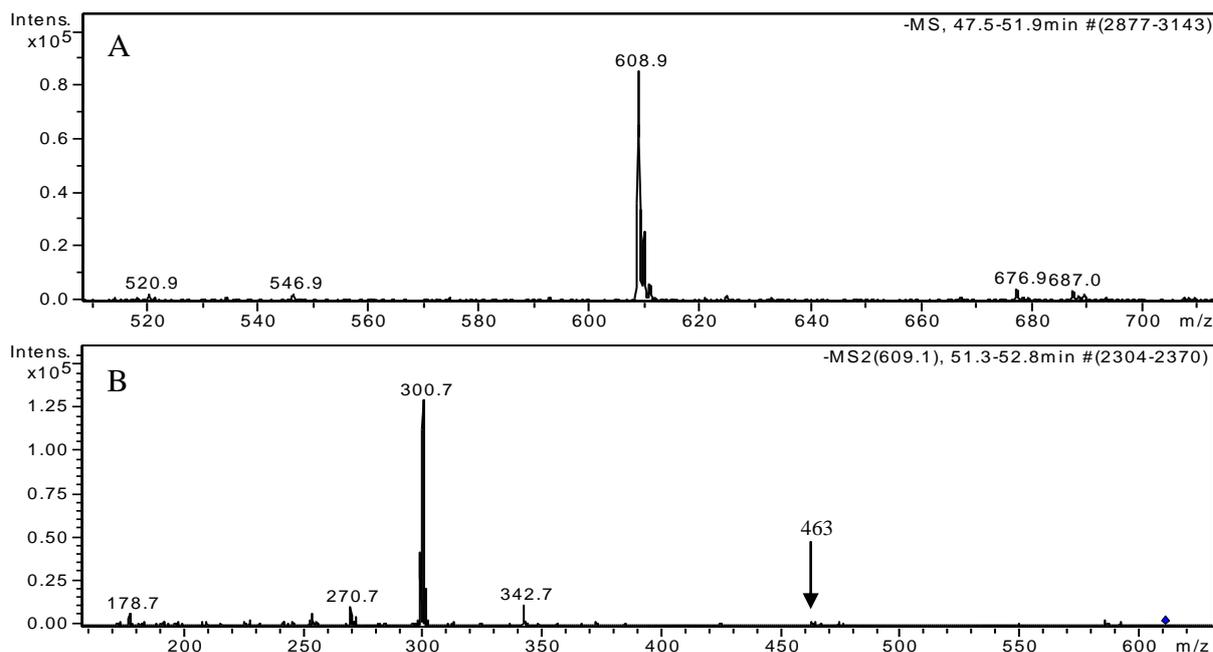


FIGURA 5.64 - Espectro de massa do composto do item 13 após injeção do extrato de *P. tenellus* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído da banda cromatográfica no tempo de retenção 49,7 min; B) espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 609.

O composto do item 16 (tr = 52,7) (FIGURA 5.65), presente somente em *P. amarus* e *P. stipulatus* foi inferido como quercetina-3-O-glucuronídeo (FIGURA 5.66). A presença de ácido glucurônico ligado a aglicona quercetina, apesar de rara¹⁵⁴, pode ser observada pela fragmentação do íon $[M-H]^-$ de m/z 477 (FIGURA 5.67A) formando o íon de m/z 301 após perda de 176 unidades de massa (Y_0) (FIGURA 5.67B). Este composto foi posteriormente isolado e identificado por ressonância magnética nuclear.

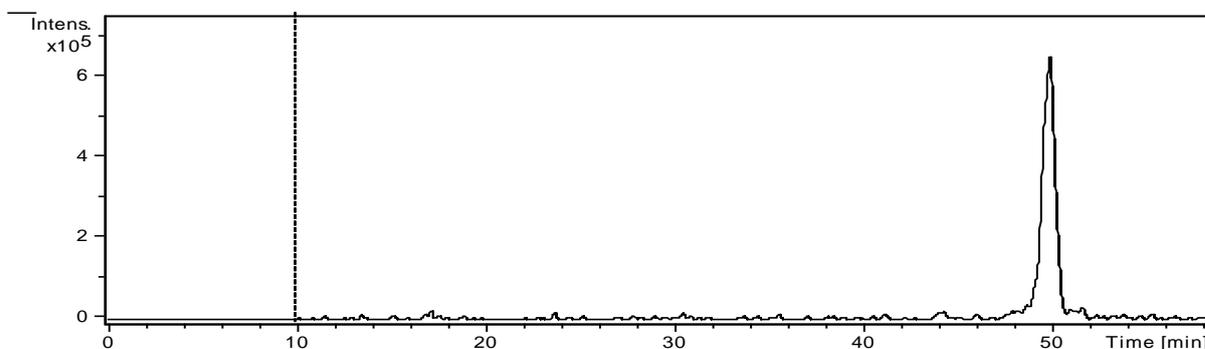


FIGURA 5.65 – Cromatograma do extrato de *P. stipulatus* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 477.

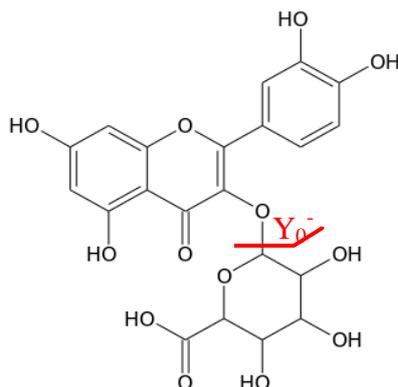


FIGURA 5.66 – Representação da fragmentação da molécula de quercetina-3-O-glucuronídeo; A) perda de 176 unidades de massa referente a ácido glucurônico.

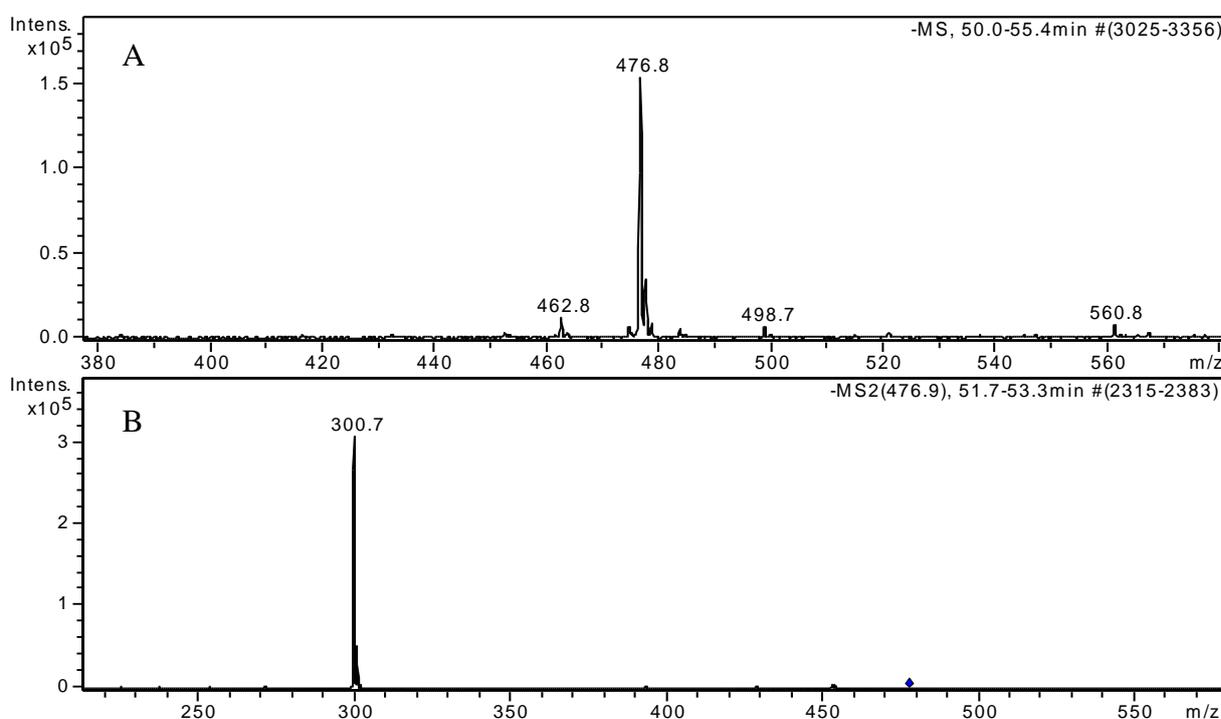


FIGURA 5.67 - Espectro de massa do composto do item 16 após injeção do extrato de *P. stipulatus* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído do tempo de retenção 52,7 min; B) espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 477.

O composto do item 18 (tr = 57,5) (FIGURA 5.68), ausente somente em *P. niruri*, foi caracterizado como flavonoide O-diglicosilado (FIGURA 5.69). A fragmentação do íon de m/z 593 resultou na perda de 308 unidades de massa que produziu o íon de m/z 285 referente a aglicona livre camferol (Y_0^-) (FIGURA 5.70). Essa quebra resulta da perda de duas unidades de açúcar (glucose e ramanose). A

ausência do íon relativo à perda de somente uma unidade de açúcar reforça a ideia que os açúcares estão interligados entre estes através de ligações 1-6, ou seja, formando um rutinosídeo¹⁵⁵(FIGURA 5.70). Por outro lado, não é possível discriminar em qual grupo hidroxil estão ligados os açúcares, embora normalmente estes estejam ligados aos grupos presentes nas posições 3 ou 7. O composto do item 18 foi caracterizado, possivelmente, como sendo camferol-7-O-rutinosídeo ou camferol-3-O-rutinosídeo (FIGURA 5.69).

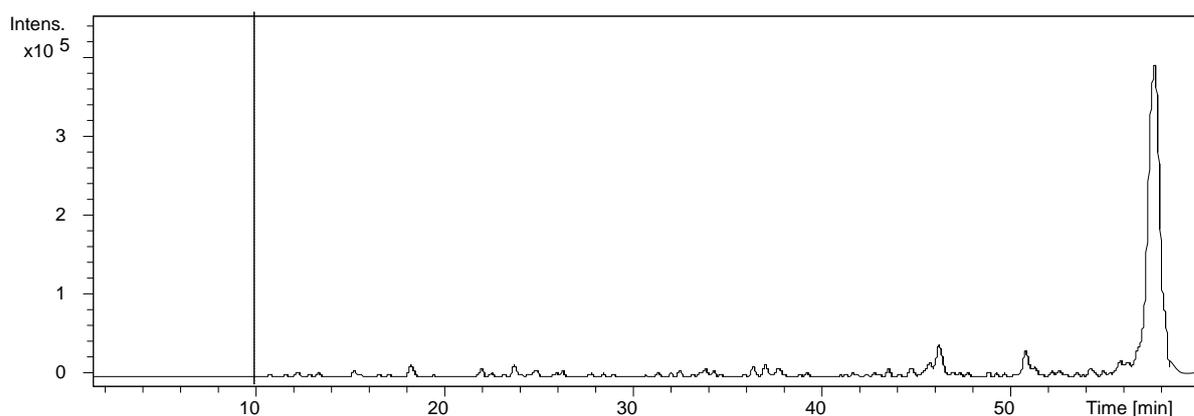


FIGURA 5.68 – Cromatograma do extrato de *P. tenellus* extraídos do íon $[M-H]^-$ de m/z 477.

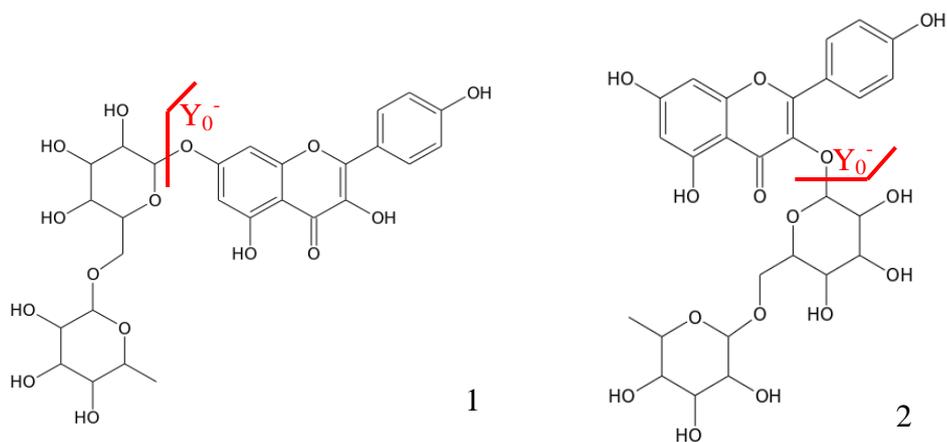


FIGURA 5.69 - Possíveis estruturas do flavonoide representado pelo item 18. 1) camferol-7-O-rutinosídeo; 2) camferol-3-O-rutinosídeo

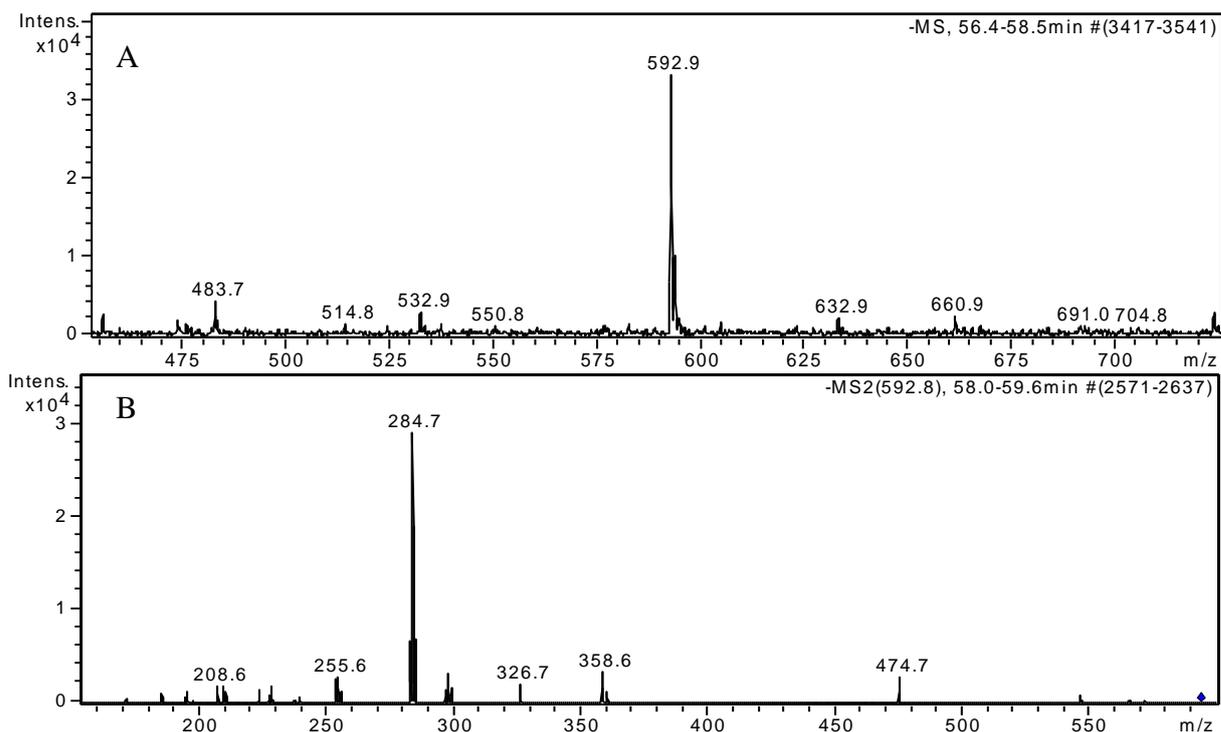


FIGURA 5.70 - Espectro de massa do composto do item 18 após injeção do extrato de *P. tenellus* em LC-MS/MS no modo negativo de ionização. A) espectro de íons totais no modo negativo de ionização extraído do tempo de retenção 57,2 min; B) espectro de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 593.

Os compostos dos itens 2, 6, 12, 14, 19 e 20 não puderam ter suas estruturas caracterizadas baseando-se somente nos padrões de fragmentação obtidos no modo negativo de ionização.

5.4.3 – Resultados do Experimento 3

Esse experimento teve como objetivo a realização de experimentos por MS³ de modo obter dados de fragmentação adicionais ao experimento 2. O experimento foi desenvolvido utilizando a ferramenta MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) no modo negativo de ionização.

O composto identificado no experimento 2 como corilagina foi selecionado e a fragmentação em MS³ do íon fragmento de m/z 301 forneceu quebras típicas de ácido elágico, a saber, perda de 44 unidades de massa referente à perda de CO₂ e também a perda de 72 unidades de massa relativo à perda de CO₂ e CO¹⁵⁷ (FIGURA 5.71), corroborando a estrutura anteriormente proposta.

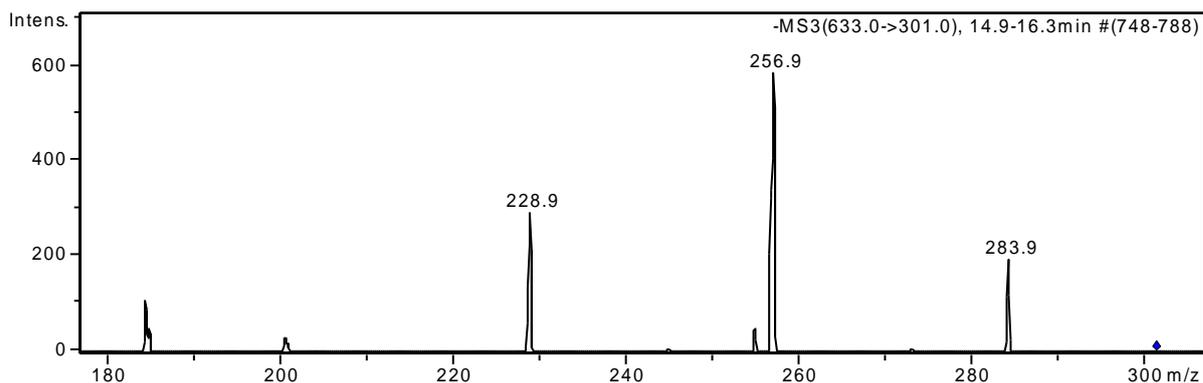


FIGURA 5.71 – Isolamento e fragmentação do íon fragmento de m/z 301 a partir do íon molecular de m/z 633 relativo a molécula de corilagina.

No experimento 2 todos os compostos caracterizados como flavonóis ligados a quercetina, isto é, os compostos dos itens 13, 15, 16 e 17, apresentaram pico base de m/z 301. Em todos os flavonóis descritos fragmentação do íon de m/z 301 produziu os íons m/z 179 e 151 (FIGURA 5.72), os quais representam respectivamente a quebra do anel C da quercetina entre as ligações 1,2 ($^{1,2}A^-$) e 1,3 ($^{1,2}A^-$) (FIGURA 5.73). Ao fragmentar o íon 301, proveniente do íon molecular $[M-H]^-$ de m/z 609, os fragmentos 273, 257, 229 e 125 foram observados (FIGURA 5.72 e 5.73)¹⁶¹. O padrão de fragmentação obtido infere a presença de quercetina, diferenciando estes daqueles compostos ligados a ácido elágico¹⁶².

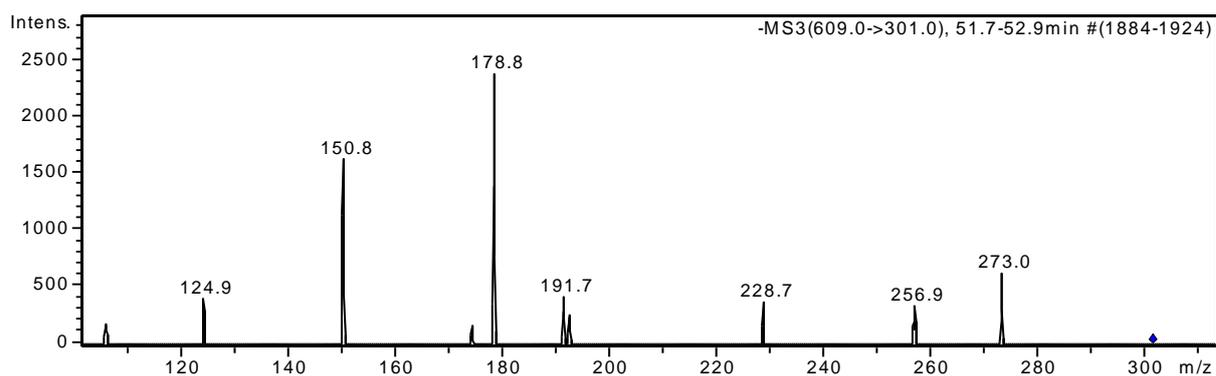


FIGURA 5.72 – Isolamento e fragmentação do íon de m/z 301 a partir do íon molecular de m/z 609 referente a molécula de rutina.

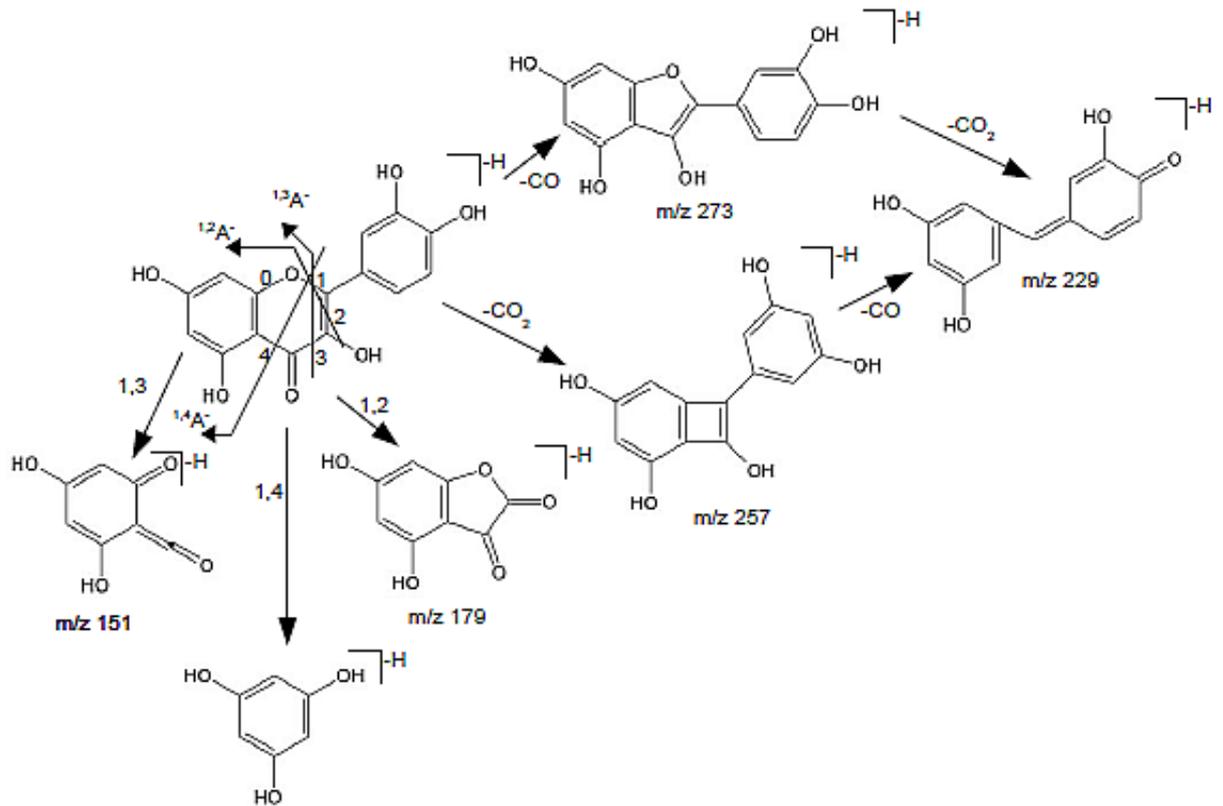


FIGURA 5.73 – Representação das principais fragmentações da quercetina no modo negativo de ionização¹⁶¹.

5.5 - Isolamento e caracterização de marcador químico

A partir do cromatograma obtido no modo reverso de eluição utilizando gradiente exploratório (FIGURA 5.74), foram avaliadas condições isocráticas de modo a possibilitar o isolamento e purificação de marcadores químicos presentes nas amostras.

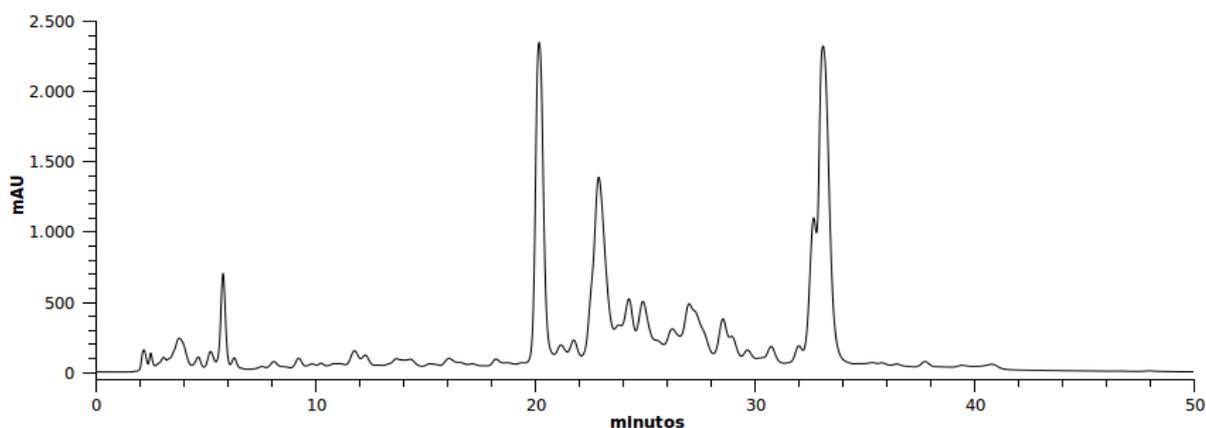


FIGURA 5.74 - Cromatograma da amostra do extrato aquoso de *P. stipulatus*. Condições cromatográficas: coluna analítica Luna[®] fenil-hexil 10 μ m, vazão 1 mL/min; λ 254nm; volume de injeção 30 μ L; eluição gradiente linear no modo reverso (MeOH:ácido fórmico 0,5%v/v): 5-70% MeOH em 50 min (Δ %B = 1,3)

Com o objetivo de isolar e caracterizar os compostos de polaridade intermediária do cromatograma foi desenvolvido o seguinte método cromatográfico: eluição isocrática com vazão de 1,5 mL/min e fase móvel constituída por solução de 75% ácido fórmico 0,5%(v/v) e 25% de metanol como modificador orgânico (B) por 30 minutos seguido de degrau de 100% de B até 40 minutos (FIGURA 5.75).

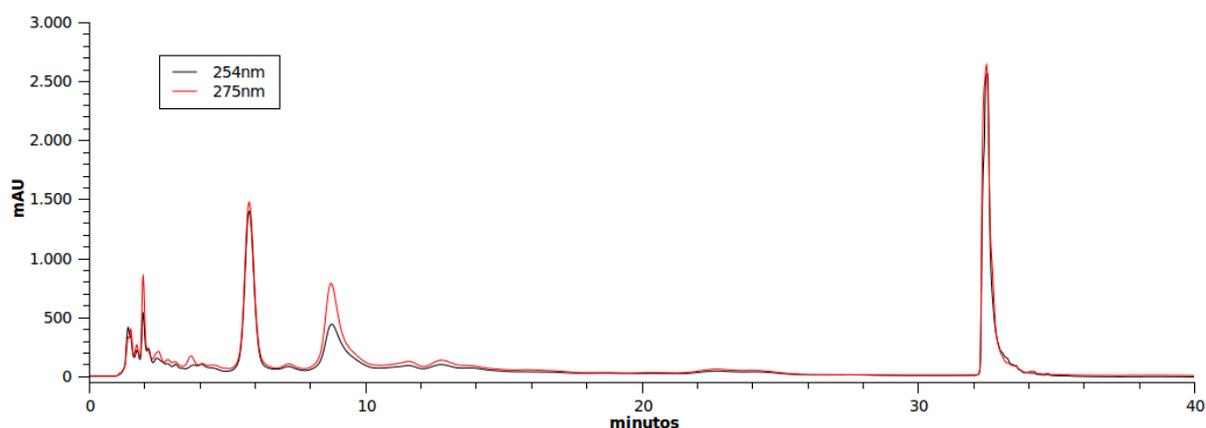


FIGURA 5.75 – Cromatograma do extrato aquoso de *P. stipulatus* para isolamento dos compostos de interesse. Condições cromatográficas: λ = 254 e 275nm; coluna fenil-hexil Luna[®] 10 μ m (15 x 0,46 cm d.i.); vazão 1,5 mL/min; volume de injeção 30 μ L; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v (25:75 v/v) por 30 min seguido de degrau de 100% de MEOH até 40 minutos.

A transferência de escala foi realizada utilizando coluna cromatográfica com dimensões características de sistema semipreparativo, ou seja, 20 x 0,7 cm d.i. O ajuste da condição cromatográfica foi realizado por meio da equação de escalonamento abaixo¹⁴⁷:

$$S = \frac{Rp^2Lp}{Ra^2La}$$

onde S é o fator de escalonamento, Rp e Ra são os diâmetros e Lp e La são os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

O fator de escalonamento (3,09) foi multiplicado pela vazão utilizada no sistema analítico (1,5 mL/min). Desta forma, a vazão no sistema semipreparativo foi ajustada em 4,65mL/min.

Para a purificação das bandas cromatográficas, a solução aquosa do extrato de *P. stipulatus* foi preparada conforme descrito no item 6.4.1; o volume de injeção utilizado foi de 200 µL (FIGURA 5.76).

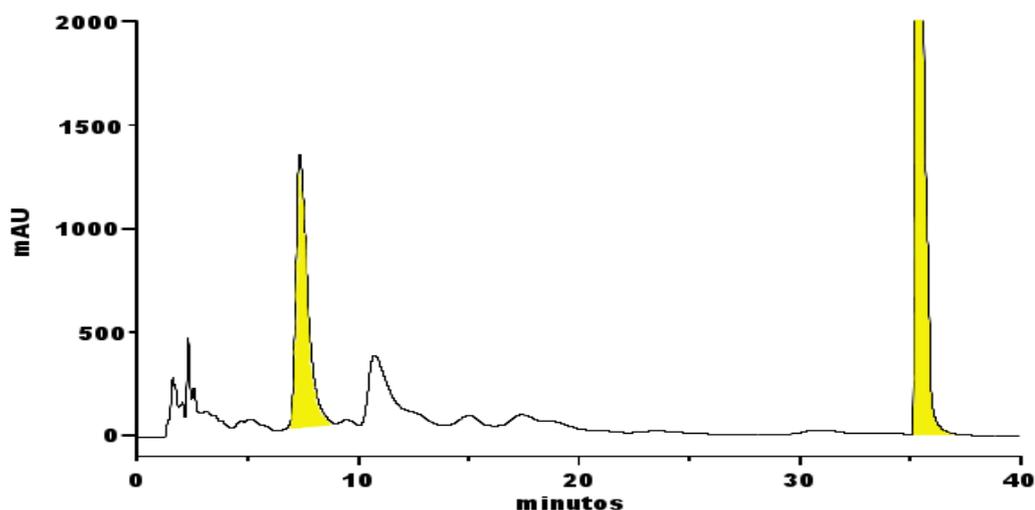


FIGURA 5.76 - Cromatograma do extrato aquoso de *P. stipulatus* em sistema semipreparativo. As regiões destacadas indicam a coleta das frações 1 e 2. Condições cromatográficas: coluna Luna[®] fenil-hexil 10 µm (20 x 0,7 cm d.i.), vazão 4,65 mL/min; λ 254nm, volume de injeção 200 µL; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v (25:75 v/v) por 30 min seguido de degrau (100% MeOH) até 40 min.

As bandas cromatográficas (tr_1 entre 6,5-8,5 min e tr_2 entre 34,4-36,4

min), denominadas fração 1 e 2, foram coletadas em balões de fundo redondo, concentradas em rotaevaporador, congeladas e liofilizadas. Após 13 injeções, as frações liofilizadas foram pesadas, obtendo-se 21,3 mg para a fração 1 e 58,4 mg para a fração 2.

A fração 1 (0,5 mg/mL) foi reanalisada em condições analíticas com o objetivos de verificar sua pureza (FIGURA 5.77). Como não foram observadas impurezas nas condições de análise cromatográfica, a amostra foi submetida à caracterização de sua estrutura química.

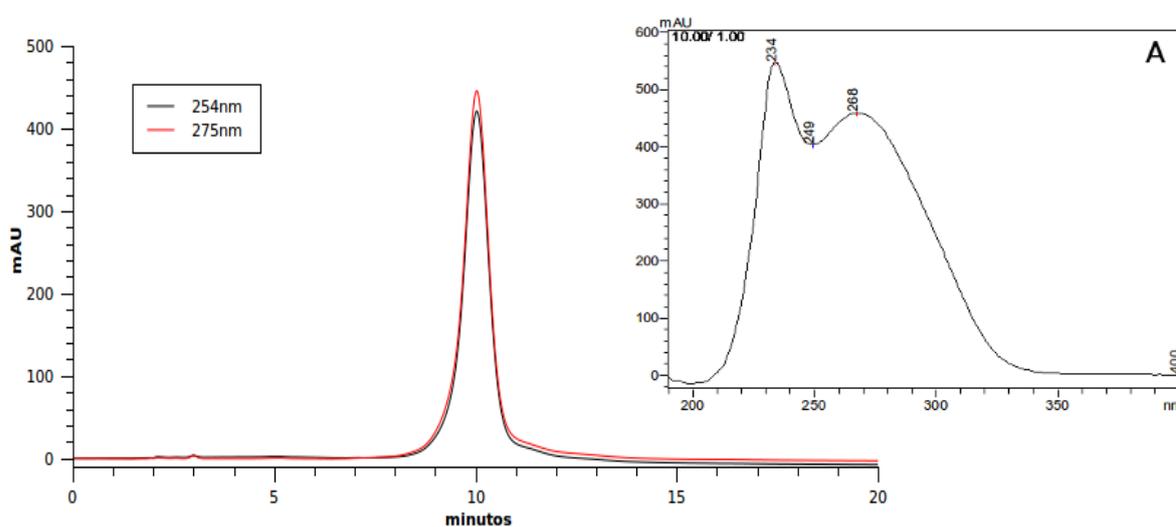


FIGURA 5.77 - Cromatograma da fração 1, purificada em sistema semipreparativo. Condições analíticas: coluna Luna[®] fenil-hexil 10 μ m, vazão 1 mL/min; λ 254nm; volume de injeção 30 μ L; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% (v/v) (20:80 v/v); detecção por DAD (190-600 nm). A) espectro de UV no tempo de retenção da banda cromatográfica.

A fração 2 foi analisada em condições analíticas (5,0mg/mL), com o intuito de avaliar a pureza do mesmo (FIGURA 5.78). Como a fração não demonstrou pureza foi desenvolvido um novo método para isolamento deste composto.

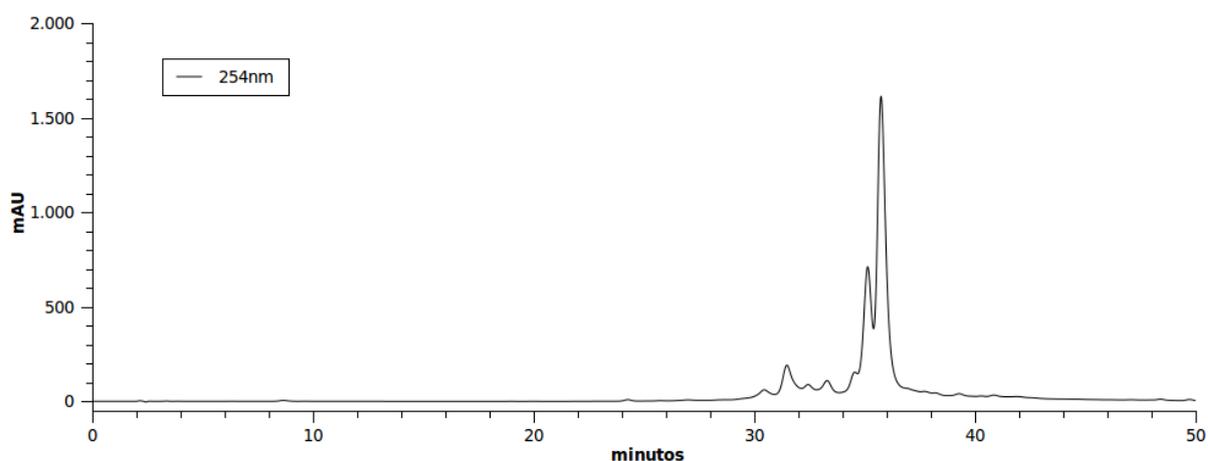


FIGURA 5.78 - Cromatograma da fração 2 purificada em sistema semipreparativo. Condições analíticas: coluna Luna[®] fenil-hexil 10 μm , vazão 1 mL/min; $\lambda = 254 \text{ nm}$; volume de injeção 30 μL ; eluição gradiente linear (MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v): 5-70% MeOH em 50 min ($\Delta\%B = 1,3$).

O novo método cromatográfico desenvolvido foi: eluição isocrática com vazão de 1 mL/min e fase móvel constituída por solução de 50% ácido fórmico 0,5%(v/v) e 50% de metanol como modificador orgânico (B) por 15 minutos (FIGURA 5.79).

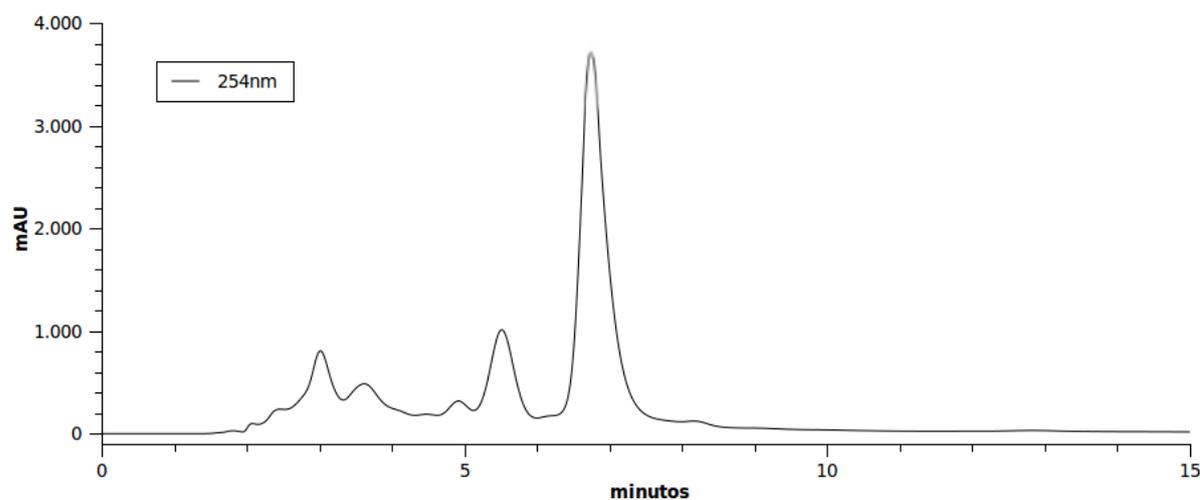


FIGURA 5.79 - Cromatograma da fração 2. Condições cromatográficas: coluna fenil-hexil Luna[®] 10 μm (15 x 0,46 cm d.i.), vazão 1,0 mL/min, λ 254 nm, volume de injeção 30 μL , concentração 5mg/mL, eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v (50:50 v/v).

Para a cromatografia em escala semipreparativa, foi utilizada coluna semipreparativa (25 x 0,7 cm d.i.) de sílica derivada Fenil-hexil (Luna[®]) de 10 µm de tamanho de partícula. A purificação da fração 2 foi realizada solubilizando 50 mg da mesma em 2,5 mL de água deionizada e injetando-se 200µL a cada corrida cromatográfica (FIGURA 5.80).

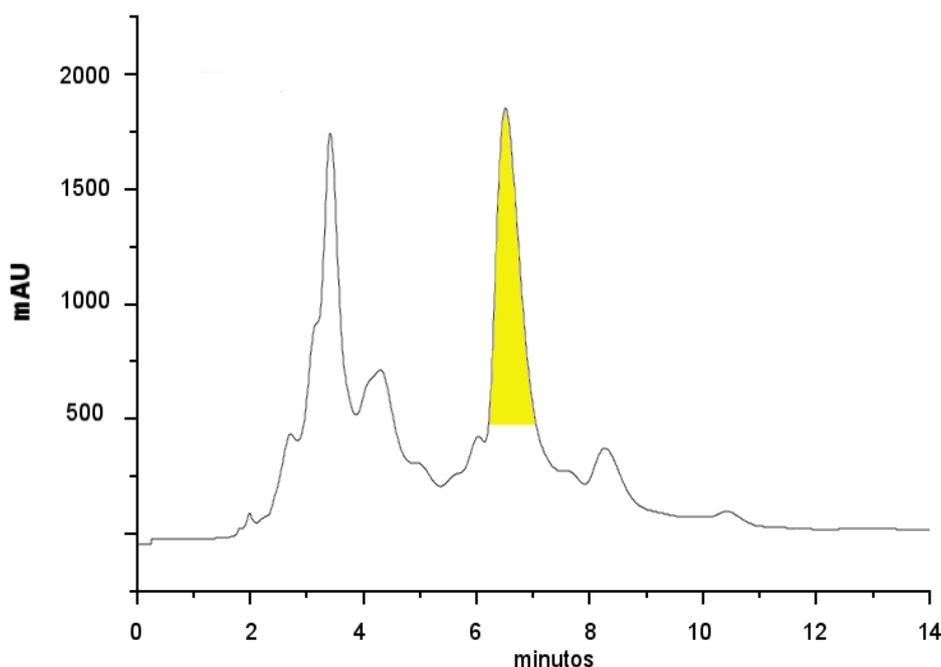


FIGURA 5.80 - Cromatograma da fração 2, repurificada em sistema semipreparativo. Condições cromatográficas: coluna Luna[®] fenil-hexil 10 µm (20 x 0,7 cm d.i.), vazão 3,1 mL/min; $\lambda = 254$ nm; volume de injeção 200µL; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v (50:50 v/v) por 15 min.

A banda cromatográfica (tr entre 6,15-7,07 min) foi coletada, concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada. Após 12 injeções, a fração liofilizada foi pesada, obtendo 4,7mg. A fração 2 foi posteriormente submetida à caracterização estrutural.

5.5.1 – Caracterização espectroscópica da fração 1

A amostra purificada (fração 1; 4 mg) foi dissolvida em solvente deuterado (CD_3OD) e posteriormente em dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$) e caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear de 1H . A análise do espectro, juntamente com a comparação dos valores relatados na

literatura^{26,163,164}, demonstrou que a amostra refere-se à substância 1-O-galoil-3,6-hexadihidroxidifenoil- α -D-glucopiranoose, um tanino hidrolisável isolado de espécies de *Phyllanthus*^{26,89,100,101,104}.

A fração apresentou os seguintes deslocamentos químicos em experimento de RMN ¹H (CD₃OD): δ 7,0 (2H; s; próton galoil (Gal) H-2''; 6''), 6,64 (1H; s; 1H do grupo hexahidroxidifenoil H-2'), 6,61 (1H; s; hexahidroxidifenoil H-2), 6,32 (1H; d; $J = 2,2$; glucose Glc H-1'''), 4,90 (1H; t; $J = 11,0$; Glc H_a-6'''), 4,75 (1H; sl; Glc H-3'''); 4,47 (1H; t; $J = 9,5$; Glc H-5'''), 4,41 (1H; d; $J = 3,2$; Glc H-4'''); 4,11 (1H; dd; $J = 11,0$ e $8,0$; Glc H_b-6'''), 3,93 (1H; sl; Glc H-2'''). O espectro ¹H RMN encontra-se no APÊNDICE 1.

O experimento realizado em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) apresentou os seguintes deslocamentos químicos: δ 7,01 (2H; s; próton galoil (Gal) H-2''; 6''), 6,55 (1H; s; 1H do grupo hexahidroxidifenoil H-2'), 6,49 (1H; s; hexahidroxidifenoil H-2), 6,20 (1H; d; $J = 7,3$; glucose Glc H-1'''), 4,59 (1H; m; Glc H-3'''), 4,35 (1H; t; $J = 8,3$; Glc H-5'''); 4,25 (1H; d; $J = 7,8$; Glc H-4'''), 4,21 (1H; sl; Glc H_a-6'''); 3,93 (1H; dd; $J = 11,0$ e $8,8$; Glc H_b-6'''), 3,87 (1H; d; $J = 6,5$; Glc H-2'''). O espectro ¹H RMN encontra-se no APÊNDICE 1.

O experimento de RMN ¹H realizado em DMSO-d₆ demonstrou sinal correspondente ao próton do carbono anomérico como dubleto em 6,20 ppm com constante de acoplamento de 7,3 Hz, característico de configuração β no carbono anomérico, podendo ser consequentemente caracterizado como corilagina¹⁶⁵ (FIGURA 5.81). Em contrapartida, o espectro de RMN ¹H em CD₃OD apresentou sinal correspondente ao próton do carbono anomérico (H-1''') como dubleto a 6,32 ppm com constante de acoplamento de 2,2 Hz, típico de arranjo equatorial-axial caracterizando configuração alfa para o carbono anomérico. Segundo Liu *et. al.*¹⁶⁴, essa constante de acoplamento representa o diastereoisômero da corilagina, denominada isocorilagina (FIGURA 5.81).

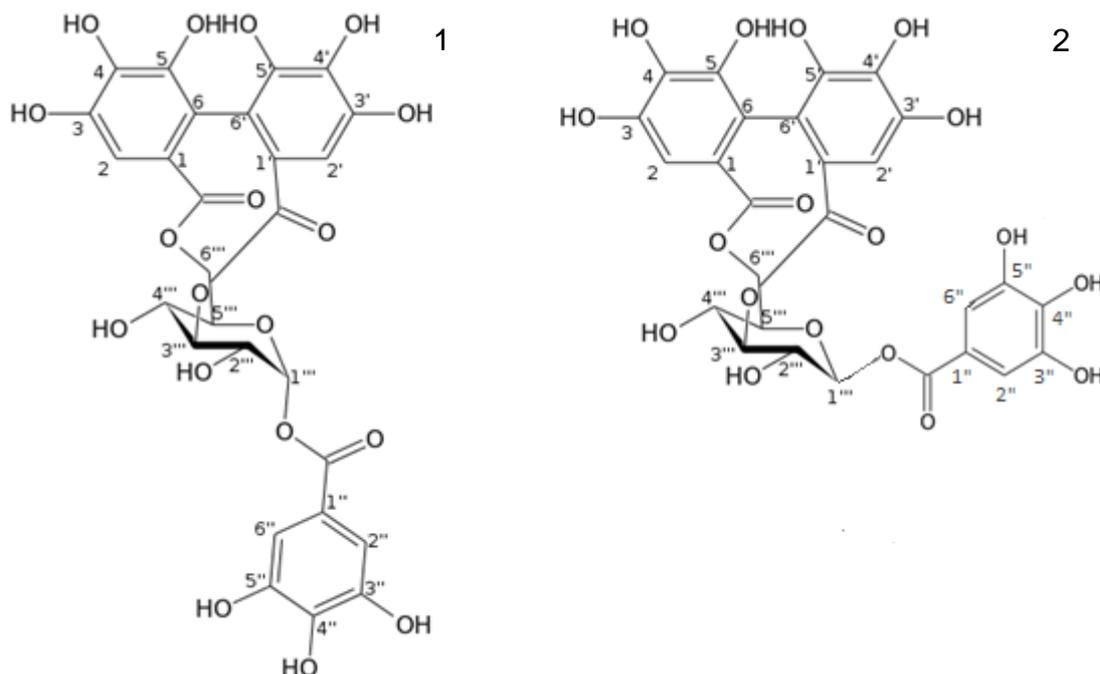


FIGURA 5.81 -Estrutura química da corilagina (1) e isocorilagina (2).

A fração 1 também foi analisada por espectrometria de massa utilizando experimento de infusão direta de amostra com fonte de ionização electrospray no modo negativo e analisador do tipo *íon trap* (item 6.4.2).

De maneira semelhante aos resultados encontrados nos experimentos por LC-MS², a fragmentação do íon $[M-H]^-$ de m/z 633, amplitude de fragmentação de 0,3 V, apresentou os seguintes íons fragmentos: m/z 463 referente a perda do grupo galoil; m/z 301 e 275 relativos à fragmentação do íon de m/z 463 com duas possibilidades; quebra das ligações C-O de ambas carbonilas dos ésteres ligados ao açúcar e quebra de uma das ligações C-C entre um dos anéis aromáticos e uma das carbonilas dos ésteres (FIGURA 5.82 e 5.83).

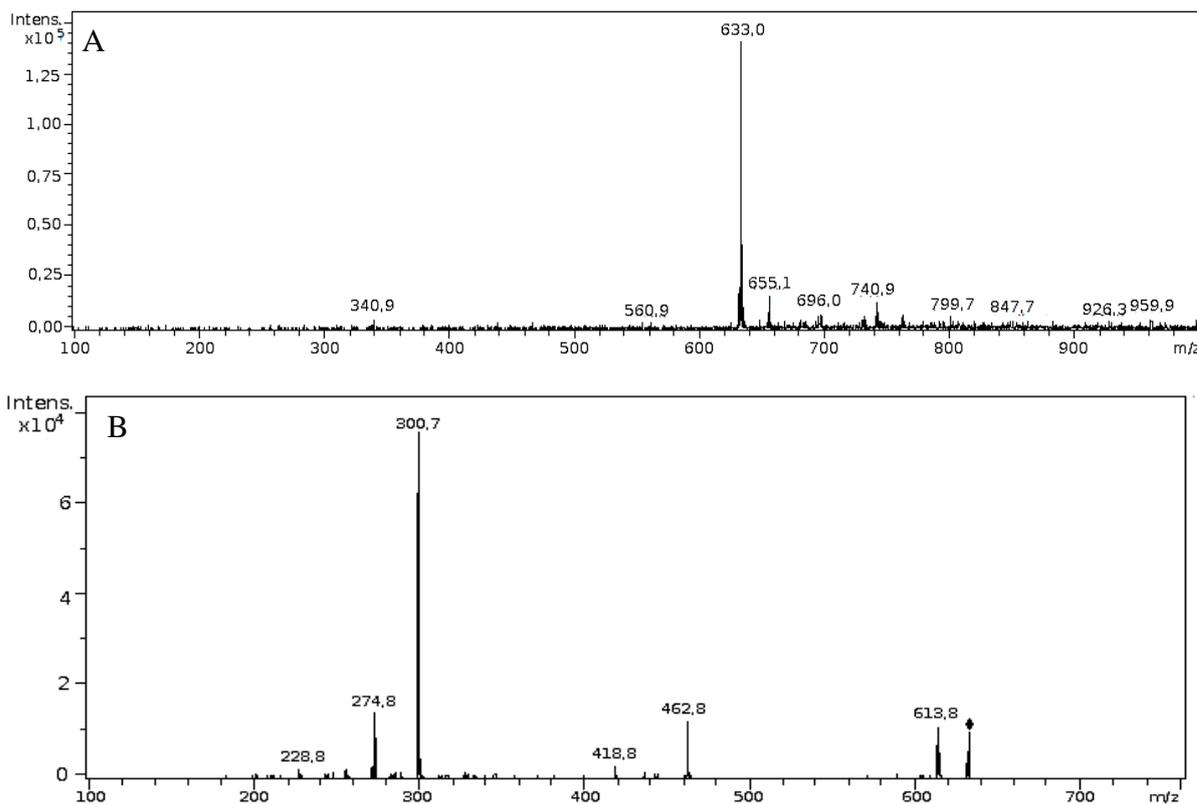


FIGURA 5.82 -Espectro de massa da corilagina por inserção direta de amostra em electrospray no modo negativo. A) espectro de íons totais e B) fragmentação do íon molecular $[M-H]^-$ 633 m/z.

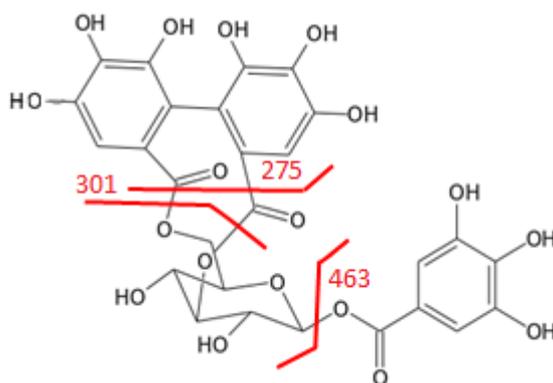


FIGURA 5.83 – Representação da fragmentação da molécula de corilagina.

5.5.2 - Caracterização espectroscópica da fração 2

A amostra purificada (fração 2; 1 mg) foi solubilizada em solvente deuterado (CD_3OD) e caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear de 1H , COSY, HSQC e HMBC. A análise dos espectros adicionalmente aos dados de

ressonância encontrados na literatura^{166,167}, evidenciou que a amostra refere-se à substância quercetina-3-O-β-D-glucopiranosídeo.

O espectro de ¹H RMN (TABELA 5.4) demonstrou uma relação axial-axial entre H-1'' e H-2'' (δ 5,35-5,33; *J* = 7,5Hz) indicando a presença de β-D-glucopiranosil. O espectro também mostrou sinais correspondendo a 5 prótons carbonos sp² (δ 7,67–6,21). Dois prótons com deslocamento de δ 6,40 e 6,21 com a mesma constante de acoplamento (*J* = 1,4Hz) estão relacionados ao anel A da quercetina. Por outro lado, os prótons com deslocamento de δ 7,67 (1H, sl), 7,62 (1H, dd, *J* = 8,0 e 2,0 Hz), e 6.85 (1H, d, *J* = 8,0 Hz) são relativos ao anel B. Esses dados confirmam a presença de quercetina como aglicona. Adicionalmente, o acoplamento entre o pico H-1'' (δ 5,34) com o C-3 (δ 135,47) nos experimentos de HMBC indicam que o ácido glucurônico está ligado a hidroxila C-3 da quercetina (FIGURA 5.84). Os espectros uni e bidimensionais encontram-se no APÊNDICE 2.

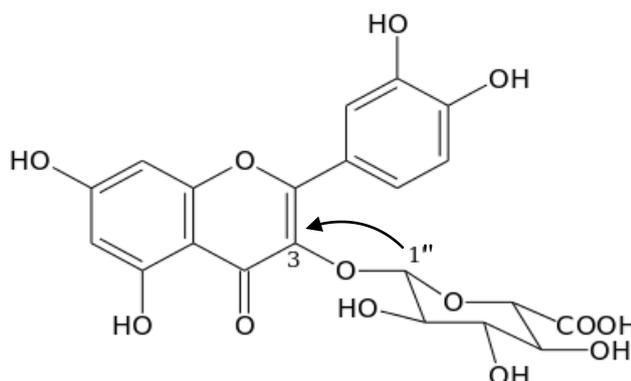


FIGURA 5.84 – Importante acoplamento observado no experimento de HMBC.

TABELA 5.4 – Valores espectroscópicos de RMN da molécula de quercetina-3-O-β-D-glucuronopiranosídeo.

¹ H (δ)	COSY	¹³ C (δ)	HMBC
2		159,67	7,67 / 7,62
3		135,47	5,34
4		*	
5		163,04	6,21
6 6,21 (1H; d; J=2Hz)	6,40	100,36	6,40
7		166,21	6,40 / 6,21
8 6,40 (1H; d; J=2Hz)	6,21	94,61	6,21
9		158,28	6,40
10		105,72	6,40 / 6,21
1'		123,17	7,67
2' 7,67 (1H; sl)	7,62	117,31	
3'		146,68	7,67 / 6,84
4'		150,15	7,67 / 7,62 / 6,84
5' 6,85 (1H; d; J=8Hz)	7,62	115,74	7,62
6' 7,62 (1H, dd, J=8,0 e 2,0Hz)	6,84/7,67	123,06	6,84
1'' 5,34 (1H, d, J=7,8Hz)	3,53	104,23	3,54
2'' 3,53 (1H, t, J=7,8Hz)	5,34/3,48	75,47	3,48
3'' 3,48 (1H, t, J=7,8Hz)	3,53/3,59	77,56	3,54
4'' 3,59 (1H, t, J=7,8Hz)	3,48/3,73	72,68	3,48
5'' 3,73 (1H, d, J=7,8Hz)	3,59	77,56	
6''		*	

(*) valores de deslocamentos de ¹³C não observados nos experimentos de HSQC e HMBC.

O composto quercetina-3-O-α-D-glucuronopiranosídeo também foi analisada por espectrometria de massa por meio de experimento de injeção direta da amostra, com fonte de ionização electrospray no modo negativo e analisador do tipo íon trap (item 6.4.2).

A FIGURA 5.85A apresenta o espectro de massa do íon molecular de m/z 477 (0,6V de amplitude de fragmentação), o qual confirma a massa molar de 478 g/mol. A fragmentação do íon 477 originou o íon 301 referente à perda de ácido glucurônico e permanência da carga na aglicona quercetina (FIGURA 5.66 e 5.85B). Fragmentações em MS³ do íon de m/z 301 (2V de amplitude de fragmentação)

apresentou padrão de fragmentação característico da quercetina (FIGURA 5.73 e 5.85C).

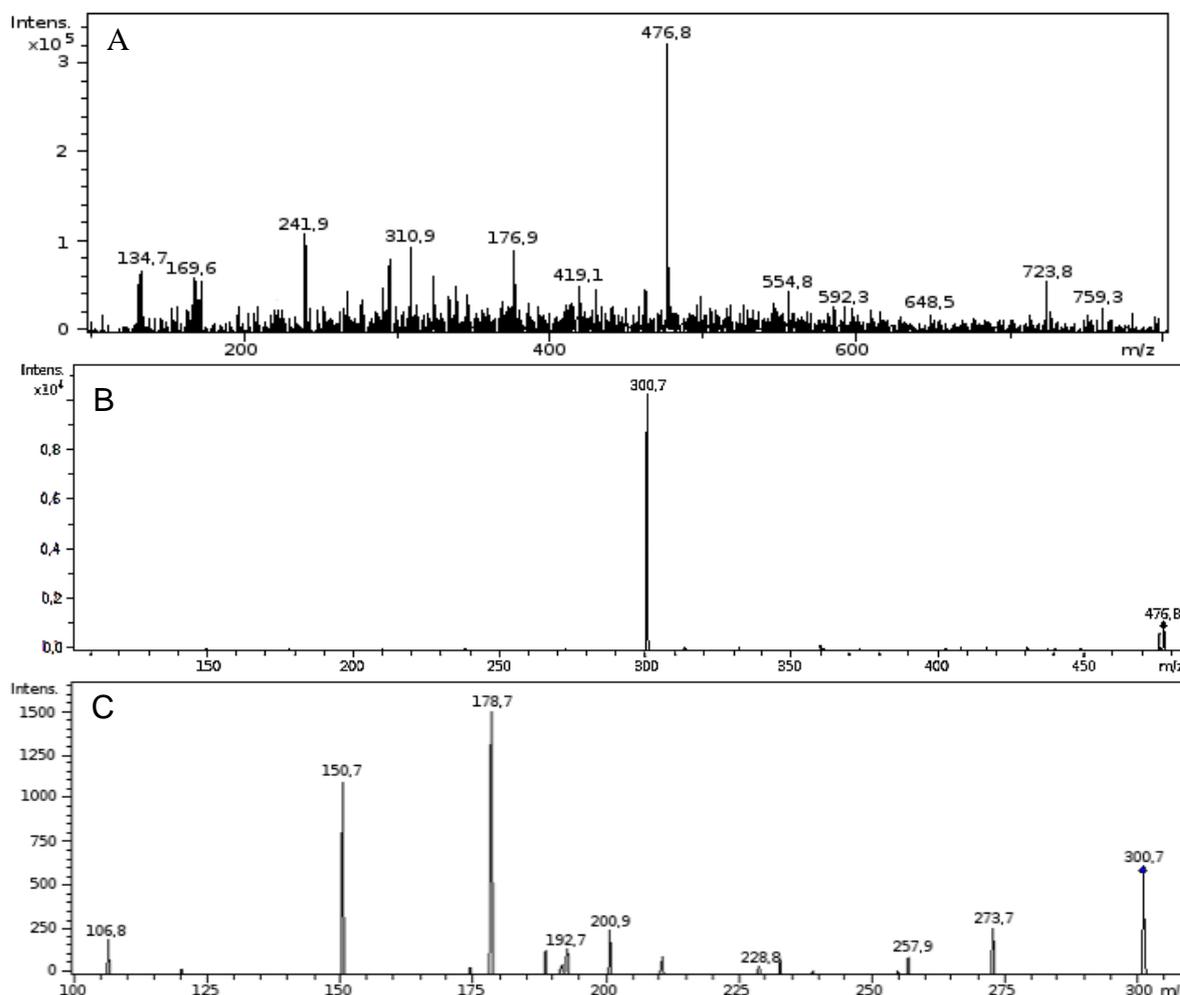


FIGURA 5.85 -Espectro de massa da molécula de quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo obtido por inserção direta de amostra em electrospray no modo negativo. A) espectro de íons totais, B) fragmentação do íon molecular $[M-H]^-$ de m/z 477 e C) fragmentação em MS³ do íon de m/z 301.

5.6 – Resultados dos Experimentos de Caracterização Química das Espécies de *Phyllanthus* estudadas

Os resultados encontrados nos experimentos descritos e discutidos acima com respeito aos marcadores químicos presentes nos extratos aquosos de *Phyllanthus amarus*, *P. niruri*, *P. amarus* e *P. tenellus*, encontram-se detalhados na TABELA 5.5.

TABELA 5.5 - Lista dos compostos químicos encontrados nas espécies de quebra-pedra estudadas.

Compostos	Espécies			
	<i>P. amarus</i>	<i>P. niruri</i>	<i>P. stipulatus</i>	<i>P. tenellus</i>
Ácido gálico	X	X	X	X
Ácido carboxílico de brevifolina	X	X	X	X
Corilagina	X	X	X	X
Isômeros de elagitaninos com massa molar de 970 g/mol	X	X	X	X
Isômeros de elagitaninos com massa molar de 954 g/mol		X	X	
Isômeros de elagitaninos com massa molar de 952 g/mol	X	X	X	X
Isômeros de elagitaninos com massa molar de 926 g/mol	X	X	X	X
Orientina-2"-O-ramanosídeo		X		
Orientina		X		
Vitexina-2"-O-ramanosídeo		X		
Miricetrina	X	X		X
Rutina	X		X	X
Quercetina-3-O-glucosídeo	X	X	X	X
Quercetina-3-O-glucuronídeo	X		X	
Quercetrina	X	X	X	X
Camferol-3-O-rutinosídeo	X		X	X

Baseado nos resultados sumarizados na TABELA 5.5 é possível observar diferenças nas composições químicas dos extratos aquosos. A espécie *P. niruri* apresentou exclusivamente em sua composição as flavonas C-glicosiladas, vitexina-2-O"-ramanosídeo, orientina e orientina-2-O"-ramanosídeo, as quais podem ser utilizadas como marcadores químicos do extrato aquoso dessa espécie. Nos extratos aquosos de *P. amarus* e *P. stipulatus* foi identificado o flavonol quercetina-3"-O-glucuronídeo, composto comumente não encontrado em amostras vegetais. As espécies *P. amarus* e *P. stipulatus* apresentam grande semelhança qualitativa na sua

composição química, diferenciando-se somente quanto a presença de um tanino hidrolisável com massa molar 954 g/mol e do flavonol miricetrina, contudo não foi possível a sua elucidação estrutural completa desse tanino e também taninos hidrolisáveis apresentam pequena capacidade de diferenciação vegetal, visto serem muito comuns em espécies vegetais. O extrato de *P. tenellus* não apresentou nenhum metabólito secundário exclusivo, no entanto a ausência dos compostos mencionados acima caracterizam a espécie. Outros metabólitos importantes inferidos foram a corilagina, composto presente nas quatro espécies com grande intensidade e rutina, metabólito também bastante intenso, entretanto ausente no extrato de *P. niruri*.

6 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.1 - Materiais e Equipamentos

Os solventes grau LC (J.T. Baker, Philipsburg, EUA) utilizados nas análises cromatográficas foram filtrados à vácuo em membrana de nylon de 0,45 µm (Millipore, São Paulo, Brasil). Os solventes não foram filtrados nas análises por LC-MS. A água usada no preparo dos extratos aquosos e na composição das fases móveis foi obtida no sistema MILLI-Q ((Millipore, São Paulo, Brasil).

As amostras vegetais foram pulverizadas por Martins²⁶ utilizando moinho de facas (Marconi[®], modelo MA340) e liquidificador industrial (Skymesen[®], modelo TA-02) e em seguida foram padronizados com peneira de 60 mesh (Bertel[®]). A extração das amostras foi realizada sob aquecimento em manta de aquecimento (Quimis[®]). Os extratos foram liofilizados em liofilizador (Labconco[®], modelo E-C Modulyo) acoplado à bomba de vácuo (Emerson[®], modelo DV-200N-250). A homogeneização das amostras foi feita em agitador de tubos (Phoenix[®], modelo AP 56). As pesagens foram realizadas em balança analítica (AND[®], modelo HR 200), com precisão de 0,1 mg. Para o preparo de soluções, os volumes de diluentes e reagentes foram pipetados com micropipetas Gilson[®].

Sistemas cromatográficos:

Sistema 1 (analítico): 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; todas essas unidades são interligadas, através de uma interface CBM 20A e operados por computador, através do qual os cromatogramas foram registrados pelo software LC SOLUTION.

Sistema 2 (preparativo): cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-6AD, injeter manual Rheodyne com válvula de reciclo e alça de amostragem de 200µL, acoplado a um detector de ultravioleta modelo SPD 10AVvp e interligados por uma unidade de interface SCL-10Avp. Os cromatogramas foram registrados pelo software Class VP.

Sistema 3 (UFLC-MS): cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão) composto por duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A₂, autoinjeter

SIL-20AC HT, detector de ultravioleta SPD 20A; todas as unidades interligadas através de uma interface CBM 20A e operados por computador, sendo os cromatogramas registrados pelo software Class VP. O sistema cromatográfico foi acoplado por meio de um divisor de vazão (“splitter”) ao espectrômetro de massa com fonte de electrospray e analisador tipo íon trap modelo Bruker HCT Ultra PTM Discovery EDT II[®] (Brucker Daltonics, Alemanha); os espectros de massas foram registrados pelo software DataAnalysis.

Sistema 4 (LC-MS): cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de duas bombas LC-20AD, uma delas equipada com válvula solenoide de quatro linhas, degaseificador DGU-20A₅, autoinjeter SIL-20A, detector de ultravioleta SPD 20A; todas as unidades interligadas através de uma interface CBM 20A e operados por computador, sendo os cromatogramas registrados pelo software Class VP. O sistema cromatográfico foi acoplado por meio de um divisor de vazão (“splitter”) ao espectrômetro de massa com fonte de electrospray e analisador tipo íon trap modelo Esquire 6000[®] (Brucker Daltonics, Alemanha); os espectros de massas foram registrados pelo software DataAnalysis.

As colunas cromatográficas foram preparadas com sílica Luna[®] fenil-hexil (10 µm de tamanho de partícula, 120Å de poro), produzidas pela Phenomenex[®]. Foi utilizada uma empacotadora Shandon, utilizando tubos de aço inox de 15,0 x 0,46 cm d.i. para coluna analítica e 25,0 x 0,7 cm para coluna semipreparativa. As sílicas foram suspensas em metanol e homogeneizadas em ultrassom (Cole-Palmer[®]8852) por três minutos antes de serem empacotadas. As colunas foram empacotadas sob uma pressão de 7000 psi. Após o empacotamento, as colunas foram condicionadas em MeOH por 24 horas, utilizando vazão de 1,0 mL/min, e posteriormente foram guardadas em temperatura ambiente, em local apropriado.

Os espectros de RMN ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) foram registrados em equipamento Avance[®] (BRUKER), utilizando sinal de TMS como referência interna.

6.2 - Preparo dos Extratos Aquosos

A extração aquosa foi desenvolvida pesando-se exatamente 3g de amostra vegetal em pó (60 mesh) em balão de fundo redondo de duas ou três bocas, com capacidade para 50 mL. Adicionou-se então 20 mL de água deionizada. Na boca central do balão adaptou-se uma coluna do tipo “*vigreux*” e em uma das bocas laterais adaptou-se um termômetro e vedou-se o sistema com septos. O sistema foi aquecido em manta de aquecimento até a temperatura interna de 98°C e mantida essa condição por mais 15 minutos. O sistema foi resfriado em temperatura ambiente, sendo o conteúdo do balão transferido para tubo de Falcon utilizando 30 mL de água para a completa transferência e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. O extrato liofilizado foi transferido para frasco de vidro tampado, identificado, pesado e mantido em freezer a -20°C.

Para análise, a amostra foi descongelada em temperatura ambiente e pesada (1,5 mg) em tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de água deionizada, homogeneizou-se em agitador de tubos por 1 minuto. A amostra líquida obtida foi centrifugada em tubo eppendorff® a 10.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente separado e transferido para frasco de amostragem (*vials*) e disposto na bandeja do autoinjeter; 50 µL da amostra foram injetados no sistema cromatográfico. Para injeção no sistema cromatográfico hifenado a espectrômetro de massa foi pesado 1 mg o qual foi solubilizado em 1 mL de água deionizada. O volume de injeção foi de 50 µL.

6.3 - Procedimentos para Análises por LC-MS

6.3.1 - Condições cromatográficas para realização de análises por LC-MS dos extratos aquosos de *Phyllanthus*

As amostras das 4 espécies de *Phyllanthus* foram preparadas conforme os procedimentos descritos no item 5.2 e analisadas empregando-se uma coluna analítica Luna® Fenil-hexil (15 x 0,46 cm d.i., 120 Å de diâmetro poro, 10 µm de diâmetro de partícula), adaptada a uma pré-coluna C18 (4 x 3 mm,

Phenomenex).

As análises foram realizadas por dois métodos de eluição cromatográficos, sendo o primeiro realizado no sistema cromatográfico 3 (UFLC SHIMADZU® e espectrômetro BRUKER® HCT Ultra PTM Discovery EDT 2) e o segundo no sistema cromatográfico 4 (LC SHIMADZU® e espectrômetro BRUKER® Esquire 6000)

O primeiro método (Método 1) consistiu em uma eluição gradiente no modo reverso, sendo a fase móvel constituída por solução de ácido fórmico 0,1%(v/v) e metanol como modificador orgânico (B). A vazão foi de 0,5 mL/min apresentando o seguinte gradiente: condição inicial de 5% de B, mantendo-se isocrático até 5 minutos, seguido de inclinação de 5% a 70% de B até 45 minutos ($\Delta\%B=1,625$), mantendo-se depois isocrático por 5 minutos. Após eluição cromatográfica foi realizada uma limpeza da coluna com 100% de metanol por 10 minutos acompanhado por retorno do gradiente em 5 minutos (100-5% de B). A coluna foi condicionada em 5% de B por 20 minutos entre cada análise, totalizando 90 minutos de análise.

O segundo método (Método 2) empregou o mesmo modo de eluição, mesma fase móvel e vazão de 1 mL/min. A eluição cromatográfica iniciou com 24% de B mantendo-se isocrático por 20 minutos seguido de inclinação 24 a 50% de B até 60 minutos ($\Delta\%B=0,65$). Após eluição cromatográfica foi realizada uma limpeza da coluna com 100% de metanol por 5 minutos acompanhado por retorno do gradiente em 3 minutos (100-24% de B). A coluna foi condicionada em 24% de B por 20 minutos entre cada análise, totalizando 88 minutos de análise.

6.3.2 - Condições espectrométricas para realização de análises por LC-MS dos extratos aquosos de *Phyllanthus*

6.3.2.1 - Experimento 1

As condições cromatográficas utilizadas nesse experimento estão arroladas no item 5.3.1 do procedimento experimental conforme Método 1, utilizando o sistema cromatográfico 3.

As condições do espectrômetro de massa para análise foram: pressão

do nebulizador (*nebulizer*) 40,0 psi, vazão do gás de secagem (*dry gas*) 10 L/min, temperatura de secagem (*dry temp.*) de 350°C, condições aperfeiçoadas para uma relação massa/carga de 550 m/z (*smart parameter settings* ligado).

Inicialmente foi realizado um *full scan* das amostras nos modos positivos e negativos em uma faixa de relação massa carga de 50 a 1100 m/z. A vazão que chegava até o espectrômetro era de 0,1mL/min, a qual era determinada por meio de um divisor de vazão (*splitter*).

Em seguida foram realizadas análises por MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), selecionando aquelas razões massa/carga de interesse para cada espécie, as quais foram determinadas pelas análises em *full scan*.

6.3.2.2 - Experimento 2

As condições cromatográficas nesse experimento estão dispostas no item 5.3.1 do procedimento experimental conforme Método 2 utilizando o sistema cromatográfico 4.

Os parâmetros do espectrômetro de massa para análise foram: pressão do nebulizador (*nebulizer*) 30,0 psi, vazão do gás de secagem (*dry gas*) 8 L/min, temperatura de secagem (*dry temp.*) de 325°C, condições aperfeiçoadas para uma relação massa carga de 600 m/z (*smart parameter settings* ligado).

Inicialmente foi realizado um *full scan* das amostras nos modos positivos e negativos em uma faixa de relação massa/carga de 300 a 1100 m/z. A vazão que chegava até o espectrômetro era de 0,1mL/min, a qual era determinada por meio de um divisor de vazão (*splitter*).

Posteriormente, realizou-se análises de fragmentação utilizando auto-MS² somente no modo negativo de ionização, no qual o instrumento analisa o espectro e determina os picos que serão fragmentados, a partir da intensidade (*threshold*) de 4000.

6.3.2.3 - Experimento 3

As condições cromatográficas e os parâmetros do espectrômetro de massa nesse experimento são as mesmas do experimento 2.

O *full scan* das amostras foi realizado no modo negativo com uma faixa de relação massa carga de 50-2500 m/z. A vazão que chegava a fonte do espectrômetro era mesma do experimento 2.

Em seguida realizou-se análises selecionando a ferramenta MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) com a finalidade de se obter os espectros de massa dos íons fragmentos (MS^3) de alguns compostos descritos no experimento 2.

6.4 - Isolamento e Caracterização de Compostos de Interesse

6.4.1 - Preparo das Amostras para Injeção em Sistema Semipreparativo

Antes da injeção das amostras vegetais no sistema semipreparativo as mesmas foram submetidas a um processo de preparo de amostra por extração em fase sólida (SPE).

Inicialmente 750 mg de extrato vegetal devidamente pesados em tubo Falcon de 50 mL foram solubilizados em 25 mL de água deionizada, os quais foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, recolhendo-se depois o sobrenadante. Nesse processo foram utilizados 5 cartuchos de SPE empacotados com sílica derivada com C18 (Supelco[®]), os quais foram previamente condicionados com 2 mL de metanol e com 2 mL de água. Em seguida passou-se pelos cartuchos 1 mL do extrato vegetal solubilizado a uma vazão de aproximadamente 1 mL por minuto, sendo descartada a alíquota recolhida. Posteriormente 2 mL de metanol foram eluídos através dos cartuchos, recolhendo-se as alíquotas. Cada cartucho foi posteriormente limpo com 2 mL de metanol e equilibrado com 2 mL de água, sendo o mesmo utilizado em 5 extrações.

Todas as alíquotas foram recolhidas em dois tubos Falcons e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante separado teve então o solvente evaporado em evaporador rotatório a temperatura ambiente, e ressolubilizado em 5 mL de água deionizada.

6.4.2 - Condições Cromatográficas para Isolamento e Caracterização Química

O isolamento e purificação dos compostos de interesse foram realizados a partir da espécie vegetal *Phyllanthus stipulatus*. O preparo da amostra vegetal foi feito conforme item 6.4.1 e analisadas em uma coluna analítica Luna® fenil-hexil (20 x 0,7 cm d.i., 120 Å de diâmetro poro, 10 µm de diâmetro de partícula).

As análises foram realizadas no sistema cromatográfico 2 (semipreparativo), cuja configuração está descrita no item 6.1. O volume de injeção foi de 200 µL.

O método para isolamento consistiu em uma eluição isocrática no modo reverso, sendo a fase móvel constituída por solução de ácido fórmico 0,5%(v/v) e metanol como modificador orgânico (B). A vazão foi de 4,65mL/min e a eluição apresentou a seguinte configuração: condição inicial de 25% de B, mantendo-se isocrático até 30 minutos, seguido de degrau de 100% de B até 40 minutos. Após eluição cromatográfica foi realizado o acondicionamento da coluna por 20 minutos (25% de B).

As frações foram coletadas nos seguintes tempos de eluição: 6,5 a 8,5 minutos (fração 1) e 34,4 a 36,4 minutos (fração 2).

A fração 2 (concentração de 20mg/mL e volume de injeção de 200µL) foi recromatografada empregando-se eluição isocrática sendo a fase móvel constituída por solução de ácido fórmico 0,5%(v/v) e metanol como modificador orgânico (B), vazão de 3,1 mL/min e eluição isocrática com 50% de B. Durante as eluições foi coletada a fração com tempo de retenção de 6 a 7 minutos (fração 2).

As frações correspondentes às bandas cromatográficas de interesse foram coletadas em balões, concentradas em rotaevaporador, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas. Posteriormente, as amostras purificadas foram transferidas para frascos tipo eppendorff, tampados, identificados e pesados.

Para a caracterização da amostra purificada (fração 1) por RMN, diluiu-se 4 mg em 600µL de metanol deuterado em tubo apropriado. O experimento de RMN foi repetido utilizando como solvente DMSO deuterado. Para a análise por espectrometria de massa, preparou-se uma solução aquosa de concentração 5µg/mL, que foi inserida diretamente na fonte de ionização electrospray, por infusão

direta (vazão de 800 μ L/h). As condições de ionização foram: polaridade negativa; pressão de nebulização de 30 psi com vazão de 9,0 L/min(nitrogênio), temperatura do capilar 325°C, voltagem do capilar +3KV, voltagem do cone (skimmer) -34,5V, saída do capilar -197,5V.

A fração 2 também foi caracterizada por RMN, diluindo-se 1 mg em 60 μ L de metanol deuterado em tubo apropriado. Foram realizadas análises de RMN 2D, a saber COSY, HSQC e HMBC. Realizou-se análises por espectrometria de massa nas mesmas condições da fração 1.

7 – CONCLUSÕES

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência constitui-se uma das mais importantes ferramentas no âmbito de controle de qualidade de plantas medicinais tanto na esfera de pesquisa científica como na rotina laboratorial. A utilização dessa poderosa ferramenta analítica aliada a detectores mais sensíveis e específicos como espectrômetros de massa amplia seu potencial e aplicabilidade em pesquisas científicas visando o estabelecimento de padrões de qualidades mais seguros para fitoterápicos. Nesse contexto, o atual trabalho apresentou sua contribuição para aplicação de LC acoplada a espectrometria de massa na caracterização química de espécies vegetais.

Os resultados encontrados nesse trabalho foram bastante úteis no enriquecimento de dados fitoquímicos do gênero *Phyllanthus*, especialmente em relação a espécies com poucas informações fitoquímicas como *P. stipulatus* e *P. tenellus*.

As análises por LC-MSⁿ utilizando fragmentações em MS² e MS³ forneceram ricas informações estruturais a respeito de metabólitos secundários, sendo possível inferir diversas estruturas químicas, algumas presentes em todas as espécies de *Phyllanthus* e outros exclusivos de algumas espécies. A utilização de técnicas acopladas de LC-MSⁿ propiciou análises rápidas e sem grandes gastos de solventes, além de permitir a caracterização de compostos químicos que apresentavam pequena intensidade nos cromatogramas devido a sua alta sensibilidade. Contudo, muitos compostos apresentaram dados de fragmentação insuficientes para a caracterização estrutural completa, havendo assim a necessidade de investigação estrutural utilizando outras técnicas espectroscópicas como ressonância magnética nuclear.

No entanto, foi possível inferir algumas estruturas químicas não caracterizadas anteriormente no gênero *Phyllanthus* como algumas flavonas C-glicosiladas, a saber, vitexina-2"-O-ramanosídeo e orientina-2"-O-ramanosídeo. Esses últimos presentes somente no extrato aquoso de *P. niruri*, os quais juntamente com 1-O-galoil-3,6-hexadihidroxidifenoil-glucopiranosose, podem servir como padrões para o extrato aquoso dessa espécie.

Adicionalmente, foi possível caracterizar o composto, raramente

encontrado em espécies vegetais, quercetina-3-O-glucuronídeo, o qual foi caracterizado nos experimentos por LC-MSⁿ e também isolado e identificado por espectroscopia de RMN uni e bidimensional. Destaca-se o fato deste estar presente somente nos extratos aquosos de *P. amarus* e *P. stipulatus*, podendo conseqüentemente servir de marcador químico dos extratos aquosos dessas espécies.

Dessa forma, a utilização da técnica acoplada de LC-MSⁿ demonstrou grande aplicabilidade na diferenciação das espécies vegetais por meio da caracterização dos metabólitos secundários presentes em cada espécie, podendo conseqüentemente ser aplicado como método que assegure a autenticidade e padrões de qualidade superiores de materiais vegetais e fitoterápicos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N. & PIETRO, R. C. L. R. "O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais." *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**: 435-440, 2010.
2. BORGES, A.; CEOLIN, T.; BARBIERI, R. & HECK, R. "La inserción de las plantas medicinales en la práctica de enfermería: un creciente desafío." *Enfermería Global*, (18), 2010.
3. CALIXTO, J. "Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**: 179-189, 2000.
4. ZHANG, X. International Regulatory Cooperation on Proper Use of Traditional Medicine. Apresentação Oral em International Regulatory Cooperation on regulation of Herbal medicines (IRCH). 29 de Março de 2006, Brasil.
5. Ministério da Saúde/Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Avaliação da assistência farmacêutica no Brasil: estrutura, processo e resultados. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
6. BRASIL. Resolução CIPLAN Nº 8/88, de 8 março de 1988. Diário Oficial da União, Brasília, v. 126, n. 48, p. 3999-4000. 11 de março 1988. Seção I.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União; 04 de maio de 2006
8. FREITAS, A. "Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira", Brasília, DF: Ministério da Saúde, Brasil; 2007. p 28.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº48. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº88. Lista de Referências Bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº89. Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.; 16 de março de 2004.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 90. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº91. Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004

14. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº10. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 09 de março de 2010.
15. ALVES, F. N. R. “Desafio para a Inovação em Fitomedicamentos no contexto da indústria farmacêutica nacional.” *Revista Fitos*, 1 (1): 18-29, 2005.
16. WHO. World Health Organization. *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva, 2000. p. 1-80.
17. FARIAS, M. R. “Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais.” . IN: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC, Editora da UFSC, Editora da UFRGS, 2004. p. 263-268.
18. CALIXTO, J. B. *Medicamentos Fitoterápicos. Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó, SC, Editora Argos, 2001. p. 500.
19. LIANG, Y.; XIE, P. & CHAN, K. “Quality control of herbal medicines.” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812 (1-2): 53-70, 2004.
20. WHO. World Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials*. 1998. p. 122.
21. WHO. World Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials - Revised Draft Update*. 2005. p. 62.
22. European Medicines Agency. *Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) and Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP)*. London,UK, 2006. p. 11.
23. GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. “Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.” *Química Nova*, 30 (2), 2007.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº899. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 29 de maio de 2003
25. NETO, E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E. & CARVALHO, A. C. B. “Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos.” *Revista Fitos*, 1 (3), 2006.
26. MARTINS, L. R. R. *Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o Controle de Qualidade de Amostras Comerciais do gênero Phyllanthus (quebra-pedra)*. São Carlos, UFSCar, 2003. Tese de Doutorado, 154 p.

27. MOUCO, G.; BERNADINO, M. J. & CORNÉLIO, M. L. "Controle de qualidade de ervas medicinais." *Controle de qualidade de ervas medicinais*, **31**: 68-73, 2003.
28. ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R. & VENEZIANI, R. C. S. "Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae)." *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **31** (2): 205-209, 2010.
29. CIMPOIU, C.; HOSU, A.; SESERMAN, L.; SANDRU, M. & MICLAUS, V. "Simultaneous determination of methylxanthines in different types of tea by a newly developed and validated TLC method." *Journal of Separation Science*, **33** (23-24): 3794-3799, 2010.
30. FUCHS, B.; SÜß, R.; NIMPTSCH, A. & SCHILLER, J. "MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State." *Chromatographia*, **69** (S1): 95-105, 2008.
31. MURUGAIYAH, V. & CHAN, K. "Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection." *Journal Of Chromatography A*, **1154** (1-2): 198-204, 2007.
32. WOLFENDER, J. L.; MARTI, G. & QUEIROZ, E. F. "Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics." *Current Organic Chemistry*, **14** (16): 1808-1832, 2010.
33. ZHENG, Z.; WANG, R.; CHENG, H.; DUAN, T.; HE, B.; TANG, D.; GU, F. & ZHU, Q. "Isolated perfused lung extraction and HPLC-ESI- analysis for predicting bioactive components of *Saposhnikovia Radix*." *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, **54** (3): 614-618, 2011.
34. HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F. & VIEIRA, P. C. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos, SP, edUFSCar, 2003. p. 152.
35. SILVA, V. C. D.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. D. S. & LOPES, M. N. "Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high performance liquid chromatography." *Eclética Química*, **31**: 55-58, 2006.
36. VON POSER, G. L. & MENTZ, L. A. "Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação." . IN: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC, Editora da UFSC, Editora da UFRGS, 2004. p. 75-89.
37. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. & ARAÚJO JÚNIOR, J. X. "O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. Farmacognosia: da planta ao medicamento". IN: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). Porto

Alegre, RS; Florianópolis, SC, Editora da UFSC, Editora da UFRGS, 2004. p. 147-210.

38. QIU, H.; LIANG, X.; SUN, M. & JIANG, S. "Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (10): 3307-3322, 2011.

39. HAN, Z.; ZHENG, Y.; LUAN, L.; CAI, Z.; REN, Y. & WU, Y. "An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines." *Analytica Chimica Acta*, 664 (2): 165-171, 2010.

40. KUO, C.; LEE, C.; LIN, S.; TSAI, I.; LEE, S.; TSENG, Y. J.; KANG, J.; PENG, F. & WEI-CHU, L. "Rapid determination of aristolochic acids I and II in herbal products and biological samples by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Talanta*, 80 (5): 1672-1680, 2010.

41. PETERS, R. J. B.; RIJK, J. C. W.; BOVEE, T. F. H.; NIJROLDER, A. W. J. M.; LOMMEN, A. & NIELEN, M. W. F. "Identification of anabolic steroids and derivatives using bioassay-guided fractionation, UHPLC/TOFMS analysis and accurate mass database searching." *Analytica Chimica Acta*, 664 (1): 77-88, 2010.

42. SONG, J.; LI, S.; ZHOU, Y.; QIAO, C.; CHEN, S. & XU, H. "A novel approach to rapidly explore analytical markers for quality control of *Radix Salvia Miltiorrhizae* extract granules by robust principal component analysis with ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet-quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (3): 279-286, 2010.

43. XIE, P.; CHEN, S.; LIANG, Y.; WANG, X.; TIAN, R. & UPTON, R. "Chromatographic fingerprint analysis--a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine." *Journal of Chromatography. A*, 1112 (1-2): 171-180, 2006.

44. SONG, J.; LI, S.; ZHOU, Y.; QIAO, C.; CHEN, S. & XU, H. "A novel approach to rapidly explore analytical markers for quality control of *Radix Salvia Miltiorrhizae* extract granules by robust principal component analysis with ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet-quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53 (3): 279-286, 2010.

45. GILARD, V.; BALAYSSAC, S.; MALET-MARTINO, M. & MARTINO, R. "Quality Control of Herbal Medicines Assessed by NMR." *Current Pharmaceutical Analysis*, 6 (4): 234-245, 2010.

46. MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. "Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models." *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400 (2): 469-481, 2011.

47. HENDRICKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; DE BONTE, D. & HALL, R. D. "Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts." *Analytica Chimica Acta*, 545 (1): 53-64, 2005.

48. FAN, X.; CHENG, Y.; YE, Z.; LIN, R. & QIAN, Z. "Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines." *Analytica Chimica Acta*, 555 (2): 217-224, 2006.
49. GOMES, S. V. F.; SANTOS, A. D. C.; MORAES, V. R. S.; MARTINS, L. R. R.; VIANA, M. D.; BLANK, A. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B.; NOGUEIRA, P. C. L. & ALVES, P. B. "Differentiation of *Lippia gracilis* Schauer Genotypes by LC Fingerprint and Chemometrics Analyses." *Chromatographia*, 72 (3-4): 275-280, 2010.
50. RUIZ-SAMBLÁS, C.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; PAULA RODRÍGUEZ GARCÍA, F.; MATA-ESPINOSA, P. & BOSQUE-SENDRA, J. M. "Multivariate analysis of HT/GC-(IT)MS chromatographic profiles of triacylglycerol for classification of olive oil varieties." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (6): 2093-2103, 2010.
51. PENG, L.; WANG, Y. Z.; ZHU, H. B. & CHEN, Q. M. "Fingerprint profile of active components for *Artemisia selengensis* Turks by HPLC-PAD combined with chemometrics." *Food Chemistry*, 125 (3): 1064-1071, 2011.
52. WANG, M.; PARK, C.; WU, Q. & SIMON, J. E. "Analysis of Artemisinin in *Artemisia annua* L. by LC-MS with Selected Ion Monitoring." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (18): 7010-7013, 2005.
53. KALLENBACH, M.; BALDWIN, I. T. & BONAVENTURE, G. "A rapid and sensitive method for the simultaneous analysis of aliphatic and polar molecules containing free carboxyl groups in plant extracts by LC-MS/MS." *Plant Methods*, 5: 17, 2009.
54. TATSIS, E. C.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT, J. & GEROTHANASSIS, I. P. "Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS." *Phytochemistry*, 68 (3): 383-393, 2007.
55. LIGOR, T.; LUDWICZUK, A.; WOLSKI, T. & BUSZEWSKI, B. "Isolation and determination of ginsenosides in American ginseng leaves and root extracts by LC-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (7-8): 1098-1105, 2005.
56. CASTRO, A.; MOCO, S.; COLL, J. & VERVOORT, J. "LC-MS-SPE-NMR for the Isolation and Characterization of neo-Clerodane Diterpenoids from *Teucrium luteum* subsp. *flavovirens*." *Journal of Natural Products*, 73 (5): 962-965, 2010.
57. IWASA, K.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; SUGIURA, M.; TAKEUCHI, A.; TODE, C.; TOKUDA, H. & TAKEDA, K. "Online Structural Elucidation of Alkaloids and Other Constituents in Crude Extracts and Cultured Cells of *Nandina domestica* by Combination of LC-MS/MS, LC-NMR, and LC-CD Analyses." *Journal of Natural Products*, 71 (8): 1376-1385, 2008.
58. AVULA, B.; WANG, Y.; SMILLIE, T. J.; FU, X.; LI, X. C.; MABUSELA, W.; SYCE, J.; JOHNSON, Q.; FOLK, W. & KHAN, I. A. "Quantitative determination of flavonoids and cycloartanol glycosides from aerial parts of *Sutherlandia frutescens* (L.) R. BR. by using LC-UV/ELSD methods and confirmation by using LC-MS method." *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 52 (2): 173-180, 2010.

59. RAUH, M. "Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121 (3-5): 520-527, 2010.

60. MMATLI, E. E.; MALERØD, H.; WILSON, S. R.; ABEGAZ, B.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E.; MALTERUD, K. E.; PETERSEN, D. & RISE, F. "Identification of major metal complexing compounds in *Blepharis aspera*." *Analytica Chimica Acta*, 597 (1): 24-31, 2007.

61. BIERI, S.; VEUTHEY, J. L.; MUNOZ, O.; TSENG, L. H.; BRAUMANN, U.; SPRAUL, M. & CHRISTEN, P. "Identification of isomeric tropane alkaloids from *Schizanthus grahamii* by HPLC-NMR with loop storage and HPLC-UV-MS/SPE-NIVIR using a cryogenic flow probe." *Phytochemical Analysis*, 17 (2): 78-86, 2006.

62. SCHWAIGER, S.; SEGER, C.; GODEJOHANN, M.; HUMPFER, E.; HEHENBERGER, S.; TSENG, L. H.; ELLMERER, E. P.; SPRAUL, M. & STUPPNER, H. "Different strategies for discriminator identification in a NMR based metabonomics matrix of the genus *Leontopodium* using LC-SPE-NMR, H-1-NMR-guided isolation and classical phytochemistry." *Planta Medica*, 72 (11): S036, 2006.

63. CAO, M.; TITS, M.; MUGANGA, R.; ANGENOT, L. & FREDERICH, M. "LC-SPE-NMR-MS analysis of *Strychnos usambarensis* fruits from Rwanda." *PLANTA MEDICA*, 76 (12): 1241-1242, 2010.

64. GOULAS, V.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; PSOMIADOU, E.; FOTSIS, T.; BRIASOULIS, E. & GEROTHANASSIS, I. P. "Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells." *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 (5): 600-608, 2009.

65. PIERI, V.; STURM, S.; SEGER, C.; SCHNEIDER, P. & STUPPNER, H. "Rapid dereplication of secondary metabolites from *Thymus vulgaris* L. using LC-SPE-NMR as discriminators identification tool in NMR based metabolic profiling." *Planta Medica*, 75 (9): 996, 2009.

66. ABERHAM, A.; CICEK, S. S.; SCHNEIDER, P. & STUPPNER, H. "Study of decomposition behaviour of absinthin from *Artemisia absinthium* using LC/MS and LC-SPE-NMR." *Planta Medica*, 75 (9): 999, 2009.

67. THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (2003), "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II". *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**: 399–436, 2003.

68. SILVA, M. J. A. D. & SALES, M. F. D. "*Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil." *Acta Botanica Brasilica*, **21**: 79 - 98, 2007.

69. TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I. A. & GIULIETTI, A. M. "O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil." *Acta Botanica Brasilica*, **17**: 265 - 278, 2003.

70. LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais do Brasil: nativa e exóticas*. 7 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. p. 215-216.
71. WEBSTER, G. L. "A Revision of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in the Continental United States." *Brittonia*, **22**: 44-76, 1970.
72. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 73. Fascículo 5 da Parte II da 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira. Monografias 246 e 247. 13 de abril de 2004.
73. GARCIA, C. M.; ZANETTI, G. D.; ZAGO, A. M.; BITTENCOURT, C. F. & HEINZMANN, B. M. "Estudo Morfo-Anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb.." *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23 (1): 67-70, 2004.
74. FARNSWORTH, N. R. "Ethnopharmacology and drug development." *Book of Symposium on Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Fortaleza-CE, 1996. p. 42-59.
75. MATOS, F. J. A. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 2 ed. Fortaleza, EUFC, 1994. p. 140-142.
76. IWU, M. M. *Handbook of African Medicinal Plants*. Boca Raton, CRC Press, 1993. p. 34.
77. KAPOOR, L. D. *Handbook of ayurvedic medicinal plants*. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 261-262.
78. RIBEIRO, P. G. F. & DINIZ, R. C. *Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização*. Londrina, IAPAR, 2008. p. 171.
79. SIMÕES, C. M. O. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. 3 ed. Porto Alegre, UFRGS, 1989. p. 72-73.
80. HUANG, K. C. *The pharmacology of chinese herbs*. 2 ed. Boca Raton, CRC Press, 1999.p. 279.
81. MURUGAIYAH, V. & CHAN, K. "Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents." *Journal of Ethnopharmacology*, 124 (2): 233-239, 2009.
82. NISHIURA, J. L.; CAMPOS, A. H.; BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P. & SCHOR, N. "*Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients." *Urological Research*, 32 (5): 362-366, 2004.
83. BARROS, M. E.; SCHOR, N. & BOIM, M. A. "Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro." *Urological Research*, 30 (6): 374-379, 2003.
84. BARROS, M. E.; LIMA, R.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; SCHOR, N. & BOIM, M. A. "Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental

urolithiasis." *Urological Research*, 34 (6): 351-357, 2006.

85. ISI Web of Knowledge.

http://apps.isiknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=2D7iMaDbFM22AmNAd4j&preferencesSaved=. Acesso em: Março de 2011

86. HOUGHTON, P. J.; WOLDEMARIAM, T. Z.; O'SHEA, S. & THYAGARAJAN, S. P. "Two Securinega-Type Alkaloids from *Phyllanthus amarus*." *ChemInform*, 28 (2): 715-717, 2010.

87. DHALWAL, K.; BIRADAR, Y. S. & RAJANI, M. "High-performance thin-layer chromatography densitometric method for simultaneous quantitation of phyllanthin, hypophyllanthin, gallic acid, and ellagic acid in *Phyllanthus amarus*." *Journal of AOAC International*, 89 (3): 619-623, 2006.

88. AHMAD, B. & ALAM, T. "Components from Whole Plant of *Phyllanthus amarus* Linn.." *ChemInform*, 34 (44), 2003.

89. LONDHE, J. S.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; FOO, L. Y. & GHASKADBI, S. S. "Radioprotective properties of polyphenols from *Phyllanthus amarus* Linn." *Journal of Radiation Research*, 50 (4): 303-309, 2009.

90. CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. "A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential." *Medicinal Research Reviews*, 18 (4): 225-258, 1998.

91. MORONKOLA, D. O.; OGUNWANDE, I. A.; OYEWOLE, I. O.; BASER, K. H. C.; OZEK, T. & OZEK, G. "Studies on the Volatile Oils of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) and *Phyllanthus amarus* Sch et Thonn (Euphorbiaceae)." *Journal of Essential Oil Research*, 21 (5): 393-399, 2009.

92. SINGH, M.; TIWARI, N.; SHANKER, K.; VERMA, R. K.; GUPTA, A. K. & GUPTA, M. M. "Two new lignans from *Phyllanthus amarus*." *Journal of Asian Natural Products Research*, 11 (6): 562-568, 2009.

93. TRIPATHI, A. K.; VERMA, R. K.; GUPTA, A. K.; GUPTA, M. M. & KHANUJA, S. P. S. "Quantitative determination of phyllanthin and hypophyllanthin in *Phyllanthus* species by high-performance thin layer chromatography." *Phytochemical Analysis*, 17 (6): 394-397, 2006.

94. FOO, P. J. "Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*." *Phytochemistry*, 39 (1): 217-224, 1995.

95. FOO, L. Y. & WONG. "*Phyllanthusiin* D, an unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*." *Phytochemistry*, 31 (2): 711-713, 1992.

96. MULCHANDANI, N. B. & HASSARAJANI, S. A. "4-Methoxynorsecurinine, a new alkaloid from *Phyllanthus niruri*." *Planta Medica*, 50 (1): 104-105, 1984.

97. JOSHI, B. S.; GAWAD, D. H.; PELLETIER, S. W.; KARTHA, G. & BHANDARY, K. "Isolation and Structure (X-Ray Analysis) of Ent-Norsecurinine, an Alkaloid from *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 49 (4): 614-620, 1986.
98. HASSARAJANI, S. A. & MULCHANDANI, N. B. "Securinine type of alkaloids from *Phyllanthus niruri*." *Indian Journal of Chemistry*, 29B (9): 801-803, 1990.
99. SUBEKI; MATSUURA, H.; TAKAHASHI, K.; YAMASAKI, M.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; KATAKURA, K.; KOBAYASHI, S.; TRIMURNINGSIH; CHAIRUL & YOSHIHARA, T. "Anti-babesial and Anti-plasmodial Compounds from *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 68 (4): 537-539, 2005.
100. THAN, N. N.; FOTSO, S.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. & LAATSCH, H. "Niruriflavone, a New Antioxidant Flavone Sulfonic Acid from *Phyllanthus niruri*." *ChemInform*, 37 (25), 2006.
101. MARKOM, M.; HASAN, M. & DAUD, W. R. W. "Pressurized Water Extraction of Hydrolysable Tannins from *Phyllanthus niruri* Linn." *Separation Science and Technology*, 45 (4): 548, 2010.
102. SINGH, B.; AGRAWAL, P. K. & THAKUR, R. S. "Chemical constituents of *Phyllanthus niruri* Linn." *Indian Journal of Chemistry*, 25B (6): 600-602, 1986.
103. GUPTA, D. R. & AHMED, B. "A new flavone glycoside from *Phyllanthus niruri* Linn." *Shoyakugaku Zasshi*, 38 (3): 213-215, 1984.
104. COLOMBO, R.; DE L BATISTA, A. N.; TELES, H. L.; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; DA SILVA BOLZANI, V.; SILVA, D. H. S.; PELÍCIA, C. R.; GUIMARÃES, F. M. & HEIMBERG, M. C. H. "Validated HPLC method for the standardization of *Phyllanthus niruri* (herb and commercial extracts) using corilagin as a phytochemical marker." *Biomedical Chromatography: BMC*, 23 (6): 573-580, 2009.
105. SHAKIL, N. A.; PANKAJ; KUMAR, J.; PANDEY, R. K. & SAXENA, D. B. "Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*." *Phytochemistry*, 69 (3): 759-764, 2008.
106. AGARWAL, T. & TIWARI, J. S. "A note on the flavanoid and other constituents of *Phyllanthus* genus." *Journal of the Indian Chemical Society*, 68 (8): 479-480, 1991.
107. HUSSAIN, R. A.; DICKEY, J. K.; ROSSER, M. P.; MATSON, J. A.; KOZLOWSKI, M. R.; BRITTAIN, R. J.; WEBB, M. L.; ROSE, P. M. & FERNANDES, P. "A Novel Class of Non-Peptidic Endothelin Antagonists Isolated from the Medicinal Herb *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 58 (10): 1515-1520, 1995.
108. SATYANARAYANA, P.; SUBRAHMANYAM, P.; VISWANATHAM, K. N. & WARD, R. S. "New seco- and hydroxy-lignans from *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 51 (1): 44-49, 1988.
109. HUANG, R.; HUANG, Y.; OU, J.; CHEN, C.; HSU, F. & CHANG, C. "Screening

of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human Hepatitis B virus in vitro." *Phytotherapy Research*, 17 (5): 449-453, 2003.

110. ELFAHMI; BATTERMAN, S.; KOULMAN, A.; HACKL, T.; BOS, R.; KAYSER, O.; WOERDENBAG, H. J. & QUAX, W. J. "Lignans from Cell Suspension Cultures of *Phyllanthus niruri*, an Indonesian Medicinal Plant." *Journal of Natural Products*, 69 (1): 55-58, 2006.

111. WEI, W.; GONG, X.; ISHRUD, O. & PAN, Y. "New Lignan Isolated from *Phyllanthus niruri* Linn. Structure Elucidation by NMR Spectroscopy." *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23 (6): 896-899, 2002.

112. SINGH, B.; AGRAWAL, P. K. & THAKUR, R. S. "A New Lignan and a New Neolignan from *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 52 (1): 48-51, 1989.

113. QUADER, M. A.; KHATUN, M. & MOSIHUZZAMAN, M. "Isolation of 4-hydroxysesamin and ent-norsecurinine from *Phyllanthus niruri* and their chemotaxonomic significance." *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 18 (2): 229-34, 1994.

114. AHMAD, M. U.; HUSAIN, S. K. & OSMAN, S. M. "Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil." *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58 (6): 673-674, 1981.

115. ISHIMARU, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA, H. & SHIMOMURA, K. "Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*." *Phytochemistry*, 31 (6): 2015-2018, 1992.

116. MELLINGER, C. G.; CIPRIANI, T. R.; NOLETO, G. R.; CARBONERO, E. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M. "Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid." *International Journal of Biological Macromolecules*, 43 (2): 115-120, 2008.

117. MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J. & IACOMINI, M. "Xylans from the Medicinal Herb *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 68 (1): 129-132, 2005.

118. FOO, L. Y. "Amarulone, a novel cyclic hydrolyzable tannin from *Phyllanthus amarus*." *Natural Product Letters*, 3 (1): 45-52, 1993.

119. UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHOGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUKI, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N.; BERGANZA, L. H.; FERRO, E. & BASUALDO, I. "Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay, Geraniin, an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from "Paraparai Mi," *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 51 (2): 357-359, 1988.

120. SINGH, B.; AGRAWAL, P. K. & THAKUR, R. S. "An acyclic triterpene from *Phyllanthus niruri*." *Phytochemistry*, 28 (7): 1980-1981, 1989.

121. SINGH, B.; AGRAWAL, P. K. & THAKUR, R. S. "Euphane triterpenoids from *Phyllanthus niruri*." *Indian Journal of Chemistry*, 28B (4): 319-321, 1989.
122. SINGH, B.; AGRAWAL, P. K. & THAKUR, R. S. "Isolation of trans-phytol from *Phyllanthus niruri*." *Planta Medica*, 57 (1): 98, 1991.
123. WEI, W.; PAN, Y.; ZHANG, H. & CHEN, P. A. J. "Structures in crystal and in solution of friedelin isolated from *Phyllanthus niruri* linn." *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 16 (3): 201-203, 2004.
124. KOTOKY, R.; KAJILAL, P. B. & BORDOLOI, M. "2-Methylhexadec-2-ene from *Phyllanthus niruri* Linn." *ChemInform*, 36 (20), 2005.
125. QIAN-CUTRONE, J.; HUANG, S.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P.; ALAM, M.; KLOHR, S. E. & KADOW, K. F. "Niruriside, a New HIV REV/RRE Binding Inhibitor from *Phyllanthus niruri*." *Journal of Natural Products*, 59 (2): 196-199, 1996.
126. CAFFARENA, E. R. & LORENZO, A. N. "Conformational and dynamical properties of the niruriside in aqueous solution: a molecular dynamics approach." *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 714 (2-3): 189-197, 2005.
127. WEI, W.; PAN, Y.; ZHANG, H.; LIN, C. & WEI, T. "Two new compounds from *Phyllanthus niruri*." *Chemistry of Natural Compounds*, 40 (5): 460-464, 2004.
128. SYAMASUNDAR, K. V.; SINGH, B.; THAKUR, R. S.; HUSAIN, A.; KISO, Y. & HIKINO, H. "Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs." *Journal of Ethnopharmacology*, 14 (1): 41-44, 1985.
129. CATACAN, E.; VIANA, A. M.; YUNES, R. A.; BRESCIANI, L. F. V.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. & CECHINEL-FILHO, V. "Pharmacological activity and chemical composition of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus*." *Pharmazie*, 55 (12): 945-946, 2000.
130. BACHI, E. M. & OLIVEIRA, F. "Caracterização química da droga e do extrato fluido de *Phyllanthus tenellus* Roxb. - quebra-pedra." *Anais de Farmácia e Química*, 23: 19-27, 1983.
131. HUANG, Y. L.; CHEN, C. C.; HSU, F. L. & CHEN, C. F. "Two Tannins from *Phyllanthus tenellus*." *Journal of Natural Products*, 61 (4): 523-524, 1998.
132. SOARES, L. A. L.; BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G. & PETROVICK, P. R. "Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L." *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22 (3): 203-207, 2003.
133. STEINMANN, D. & GANZERA, M. "Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (4): 744-757, 2011.
134. HOLČAPEK, M.; KOLÁŘOVÁ, L. & NOBILIS, M. "High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination

- of phase I and phase II drug metabolites”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (1): 59-78, 2008
135. MORAES, M. C. B. & LAGO, C. L. “Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas.” *Química Nova*, 26 (4): 556-563, 2003
136. SOLER, C.; MAÑES, J & PICÓ, Y. “The Role of the Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Pesticide Residue Determination in Food” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 38 (2): 93, 2008.
137. HANOLD, K. A.; FISHER, S. M.; CORMIA, P. H.; MILLER, C. E. & SYAGE, J. A. “Atmospheric Pressure Photoionization. 1. General Properties for LC/MS” *Analytical Chemistry*, 76 (10): 2842-2851, 2004.
138. MARCHI, I.; RUDAZ, S. & Veuthey, J. L. “Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review.” *Talanta*, 78 (1): 1-18, 2009.
139. ALWOOD, J. W. & GOODACRE R. “An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses.” *Phytochemical Analysis*, 21 (1): 33-47, 2010.
140. HOGEBOM, A. C.; VAN LEERDAM, J. A. & DE VOOGT, P. “Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry.” *Journal of Chromatography A*, 1216 (3): 510-519, 2009.
141. MATAMOROS FERNÁNDEZ, L.E. “Introduction to ion trap mass spectrometry: Application to the structural characterization of plant oligosaccharides”, *Carbohydrate Polymers*, 68 (4), 797-807, 2007.
142. MAKAROV, A.; DENISOV, E.; KHOLOMEEV, A.; BALSCHUN, W.; LANGE, O.; STRUPAT, K. & HORNING, S. “Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer.” *Analytical Chemistry*, 78 (7): 2113-2120, 2006.
143. GUILHAUS, M.; MLYNSKI, V. & SELBY, D. Perfect timing: “Time-of-flight mass spectrometry?” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (9): 951-962, 1997.
144. ZHOU, J. L.; QI, L. W. & LI, P. “Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry.” *Journal of Chromatography A*, 1216 (44): 7582-7594, 2009.
145. RICHARDS, P. & LEES, J. “Functional proteomics using microchannel plate detectors.” *Proteomics*, 2 (3): 256-261, 2002.
146. NEUE, U. D. & MÉNDEZ, A. “Selectivity in reversed-phase separations: general influence of solvent type and mobile phase pH.” *Journal of Separation Science*, 30 (7): 949-963, 2007.

147. CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: fundamentos, estratégia e validação*. São Carlos, edUFSCar, 2001.p. 77.
148. ARDREY, R. E. *Liquid chromatography–mass spectrometry: an introduction*. Hoboken, John Wiley & Sons, 2003.p. 276.
149. ZHIYONG, H.; WENSHUI, X.; JIE, C. “Isolation and structure elucidation of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit.” *European Food Research and Technology*, 226 (5): 1191-1196, 2008.
150. YOSHIDA, T.; ITOH, H.; TANAKA, R. & OKUDA, T. “Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants. 9 hydrolyzable tannins with 1C4 glucose core from *Phyllanthus flexuosus* muell-arg.” *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40 (1): 53-60, 1992.
151. ZHANG, L.; GUO, Y.; TU, G.; GUO, W. & MIAO, F. “Isolation and identification of a novel ellagitannin from *Phyllanthus urinaria* L.” *Acta Pharmaceutica Sinica*, 39 (2): 119-122, 2004.
152. LATTÉ, K. P. & KOLODZIEJ, H. “Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*.” *Phytochemistry*, 54 (7): 701-708, 2000.
153. LI, H.; SONG, F.; XING, J.; TSAO, R.; LIU, Z. & LIU, S. “Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS n and SORI-CID FTICR MS.” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20 (8): 1496-1503, 2009.
154. ABAD-GARCIA, B.; BERRUETA, L. A.; GÁRMON-LOBATO, S. & VICENTE, F. “A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry.” *Journal Of Chromatography A*, 1216 (28): 5398-5415, 2009.
155. FERRERES, F.; LLORACH, R. & GIL-IZQUIERDO, A. “Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry.” *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 39 (3): 312-321, 2004.
156. FERNANDES, A.; SOUSA, A.; MATEUS, N.; CABRAL, M. & FREITAS, V. “Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS.” *Food Chemistry*, 125 (4): 1398-1405, 2011.
157. ZHIYONG, H. & XIA, W. “Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS.” *Food Chemistry*, 105 (3): 1307-1311, 2007.
158. FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M. & FERREIRA, M. A. “Approach to the study of C-glycosyl flavones by íon trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*.)” *Phytochemical*

Analysis: PCA, 14 (6): 352-359, 2003.

159. FERRERES, F.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P. & GIL-IZQUIERDO, A. "Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionization mass spectrometry." *Journal of Chromatography. A*, 1182 (1): 56-64, 2008.

160. ZHANG, Y.; ABE, T.; TANAKA, T.; YANG, C. & KOUNO, I. "Phyllanemblinins A-F, New Ellagitannins from *Phyllanthus emblica*." *Journal of Natural Products*, 64 (12): 1527-1532, 2001.

161. DUEÑAS, M.; MINGO-CHORNET, H.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; PAOLA-NARANJO, R.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. & SANTOS-BUELGA, C. "Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC-DAD-ESI/MS." *European Food Research and Technology*, 227 (4): 1069-1076, 2008.

162. MULLEN, W.; YOKOTA, T.; LEAN, M. E. J. & CROZIER, A. "Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-." *Phytochemistry*, 64 (2): 617-624, 2003.

163. CONEGERO, L. D. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E. D. & FOGGIO, M. A. "Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae)." *Química Nova*, **26**: 825-827, 2003.

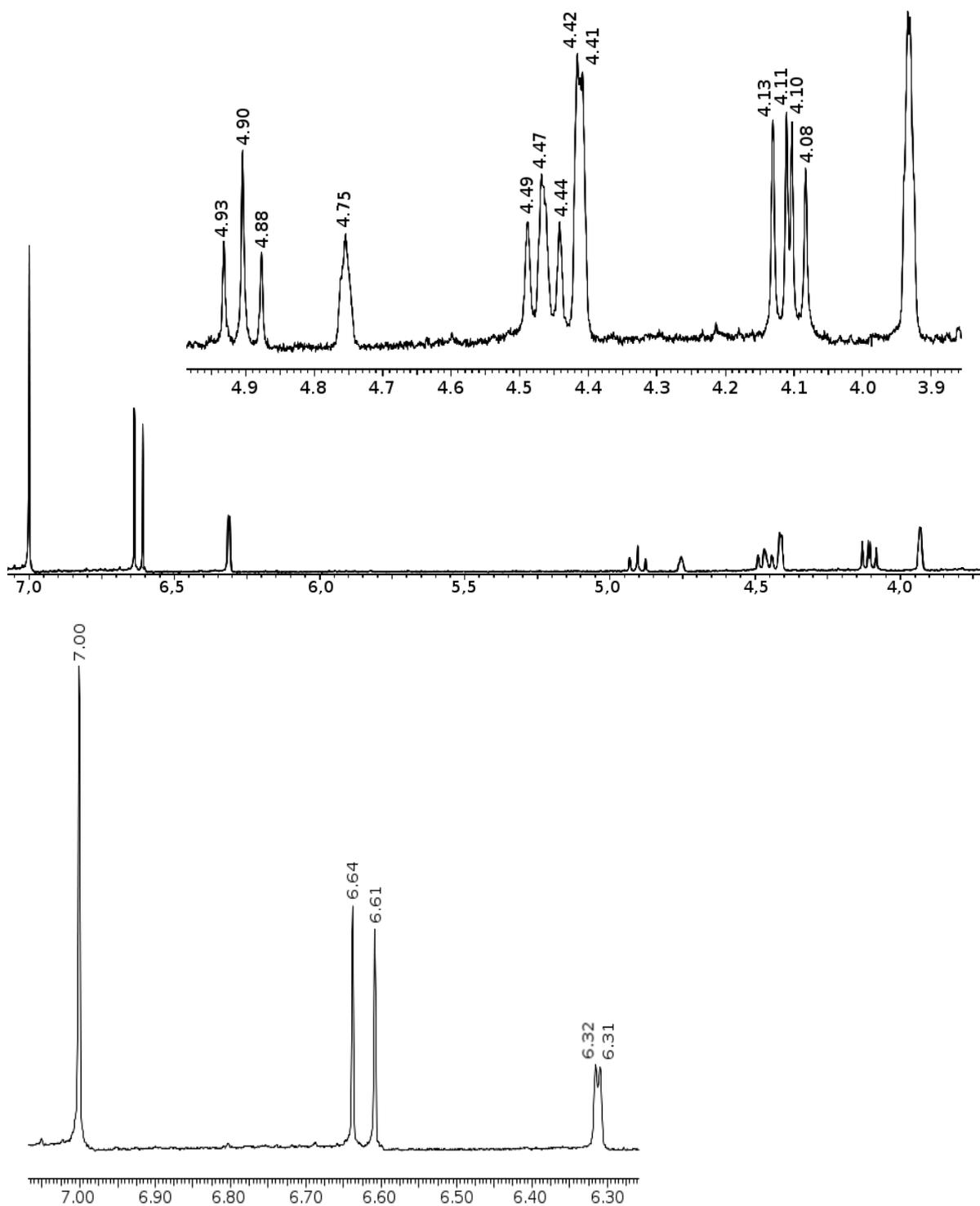
164. LIU, X.; ZHAO, M.; WANG, J.; LUO, W.; YANG, B. & JIANG, Y. "Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities." *Food Chemistry*, 109 (4): 909-915, 2008.

165. NAWWAR, M. A.M.; HUSSEIN, S. A. M & Merfort, I. "NMR Spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*". *Phytochemistry*, 36(3): 793-798, 1994

166. MOON, J.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K. & TERAOKA, J. "Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin." *Free Radical Biology and Medicine*, 30 (11): 1274-1285, 2001.

167. NHIEM, N. X.; KIEM, P.; MINH, C.; BAN, N. K.; CUONG, N. X.; TAI, B. H. & KIM, Y. H. "Phenylpropanoid glycosides from *Heterosmilax erythrantha* and their antioxidant activity." *Archives of Pharmacol Research*, 32 (10): 1373-1377, 2009.

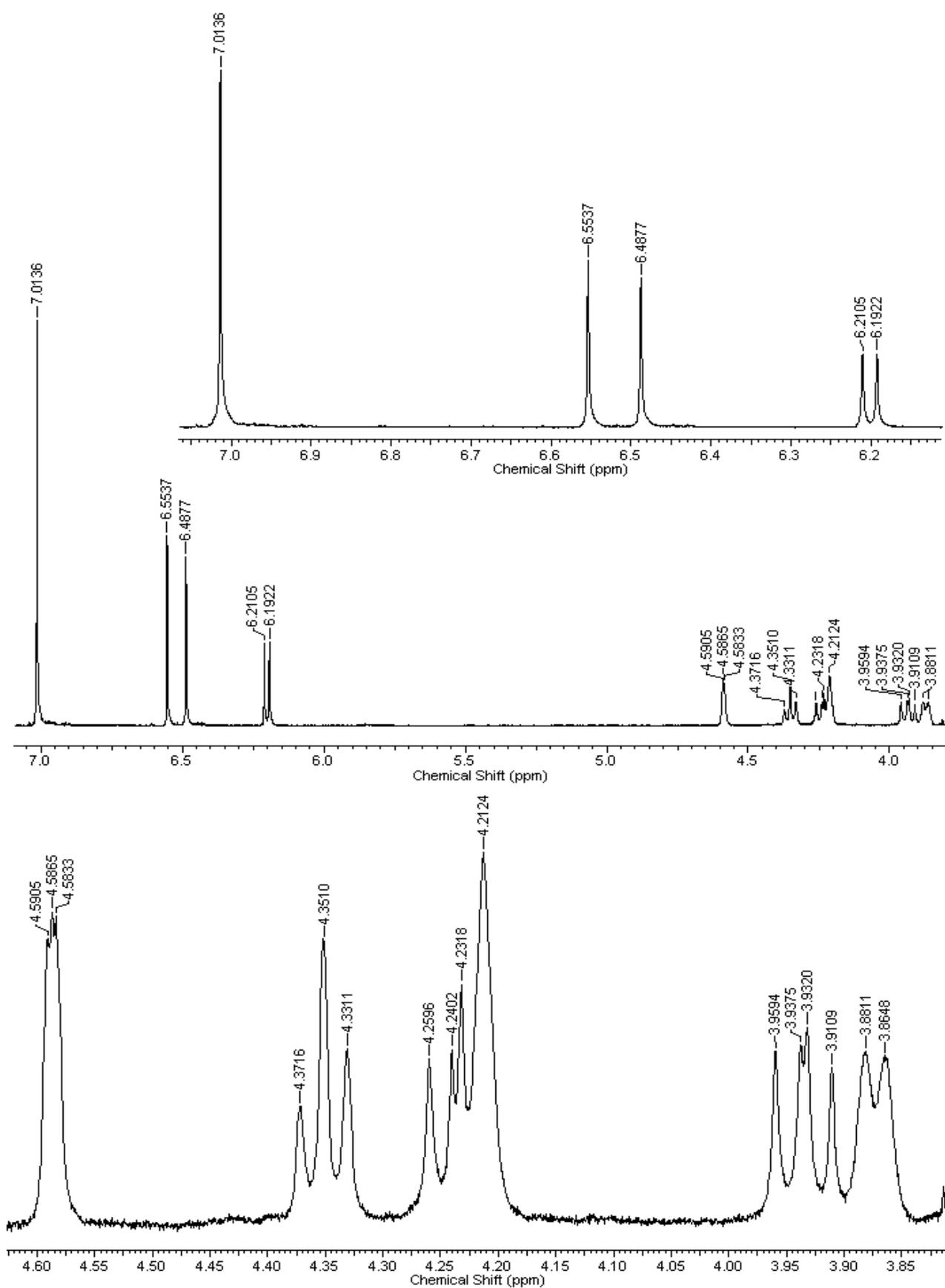
APÊNDICE 1: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear 1D da Substância Isocorilagina



Espectro de RMN ^1H (400 MHz CD_3OD) da substância corilagina.

Tabela dos picos do RMN ^1H do composto corilagina (400 MHz CD_3OD)

Nº	(ppm)	(Hz)	Altura
1	3.93	1574.5	0.0192
2	4.08	1634.2	0.0104
3	4.10	1642.0	0.0130
4	4.11	1645.2	0.0135
5	4.13	1653.3	0.0131
6	4.41	1764.3	0.0158
7	4.42	1767.5	0.0168
8	4.44	1777.7	0.0074
9	4.47	1788.5	0.0101
10	4.49	1796.6	0.0073
11	4.75	1902.7	0.0067
12	4.88	1951.9	0.0056
13	4.90	1962.9	0.0114
14	4.93	1973.9	0.0063
15	6.31	2525.3	0.0239
16	6.32	2527.5	0.0245
17	6.61	2644.9	0.0636
18	6.64	2656.6	0.0704
19	7.00	2801.9	0.1401

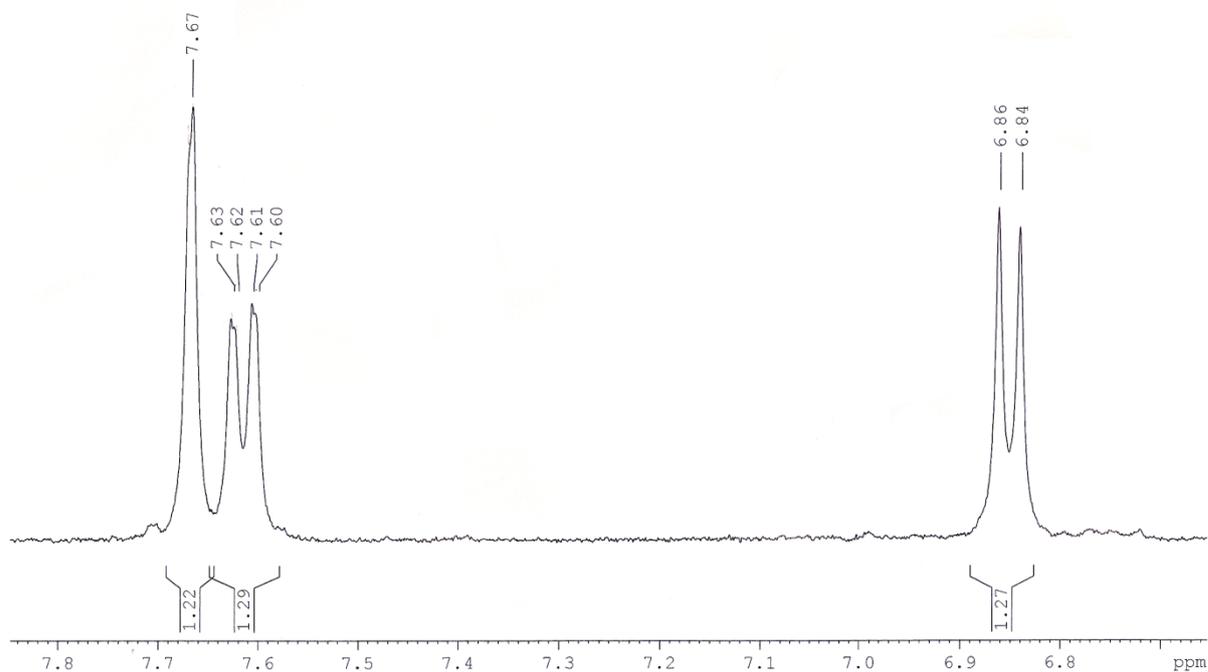
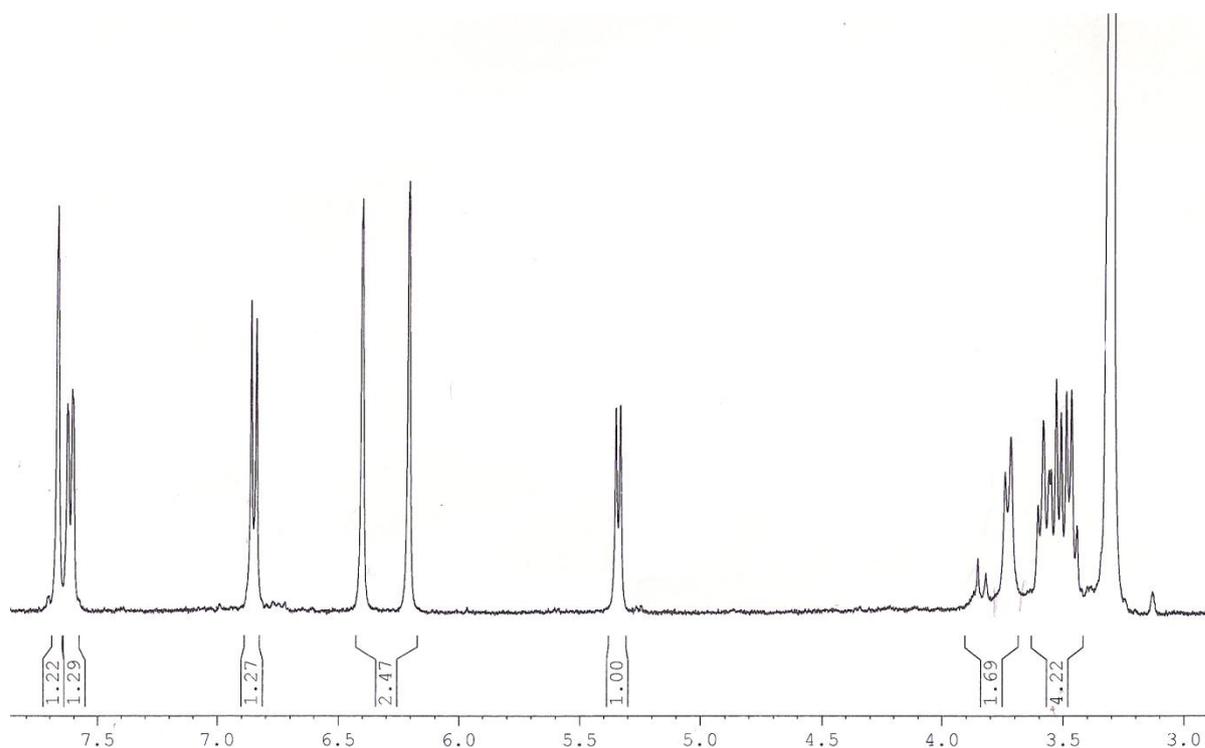


Espectro de RMN ^1H (400 MHz DMSO- d_6) da substância corilagina.

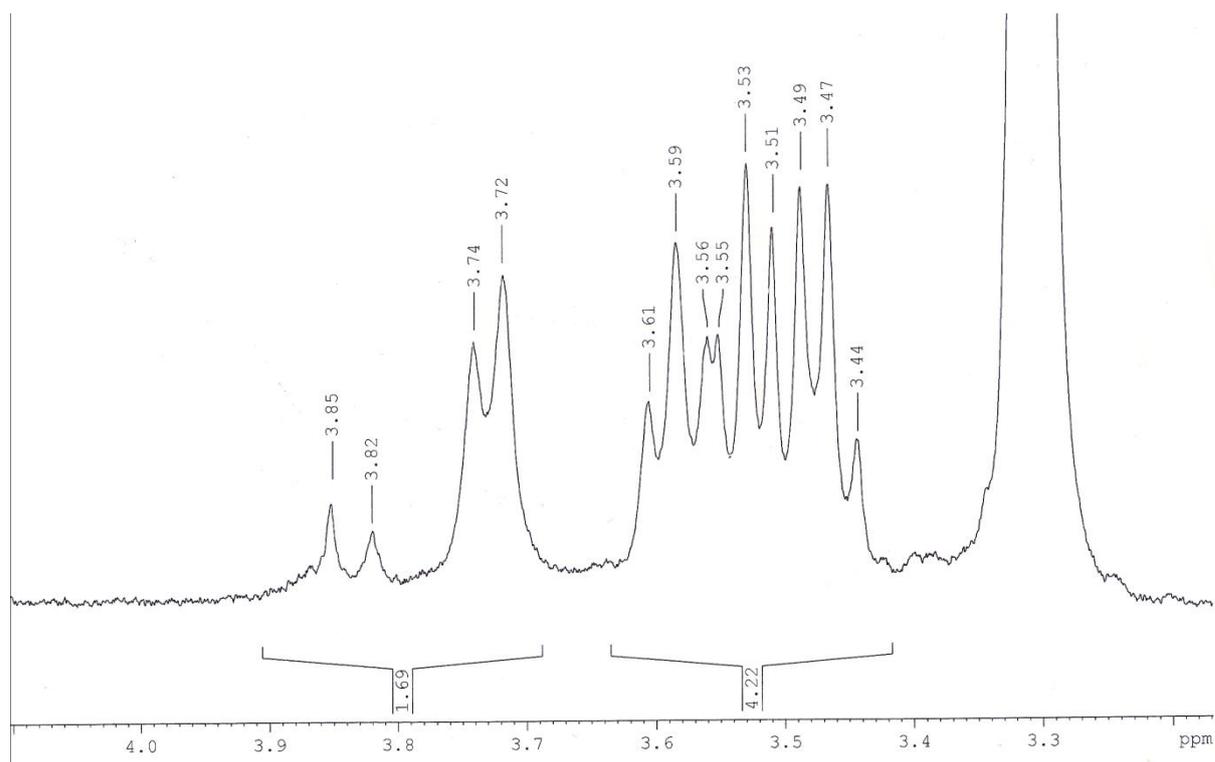
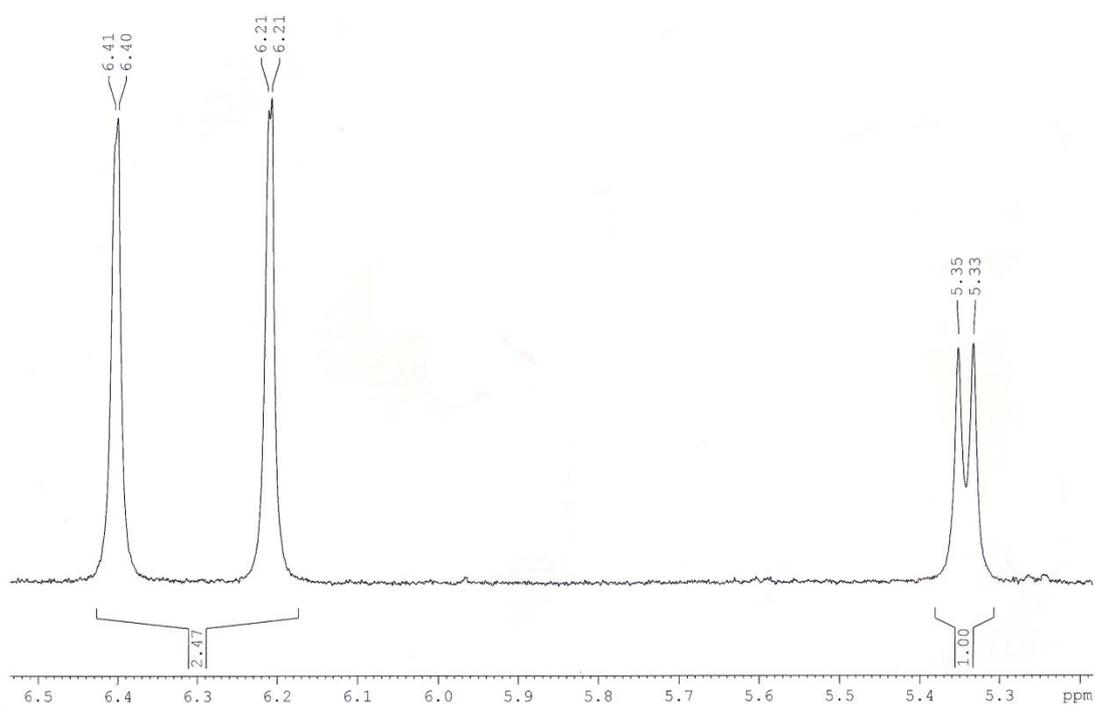
Tabela dos picos do RMN ^1H do composto corilagina (400 MHz DMSO-d6)

Nº	(ppm)	(Hz)	Altura
1	3.86	1546.8	0.0216
2	3.88	1553.3	0.0224
3	3.91	1565.2	0.0203
4	3.93	1573.6	0.0254
5	3.94	1575.8	0.0232
6	3.96	1584.6	0.0224
7	4.21	1685.8	0.0475
8	4.23	1693.6	0.0308
9	4.24	1697.0	0.0226
10	4.26	1704.8	0.0214
11	4.33	1733.4	0.0228
12	4.35	1741.3	0.0363
13	4.37	1749.6	0.0155
14	4.58	1834.3	0.0394
15	4.59	1835.6	0.0399
16	4.59	1837.2	0.0365
17	6.19	2478.2	0.0785
18	6.21	2485.5	0.0780
19	6.49	2596.5	0.1595
20	6.55	2622.9	0.1790
21	7.01	2806.9	0.3824

APÊNDICE 2: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear 1D da Substância Quercetina-3-O- β -D-Glucuropiranosídeo.



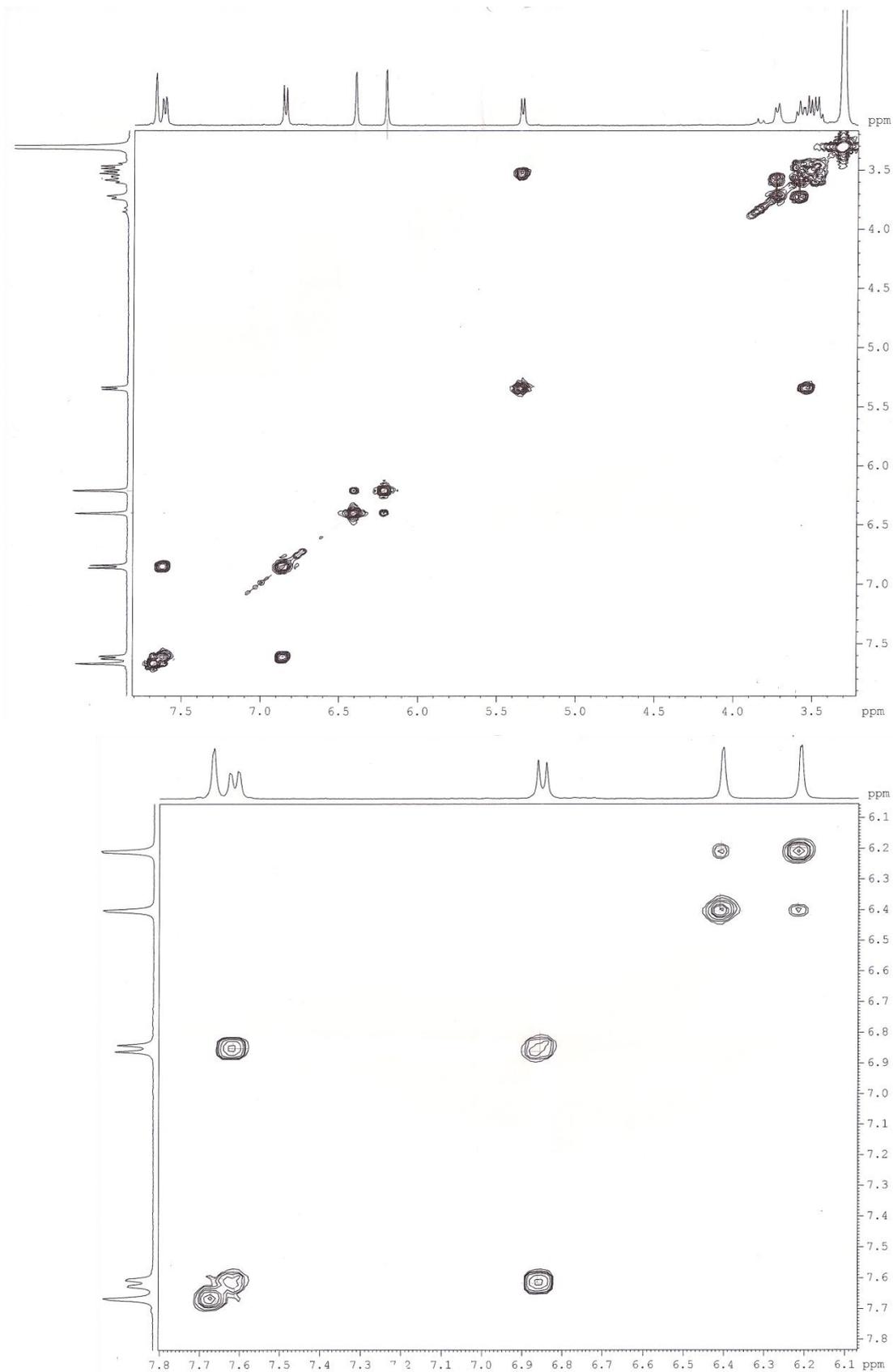
Espectro de RMN ¹H (400 MHz CD₃OD) da substância Quercetina-3-O- β -D-Glucuropiranosídeo.



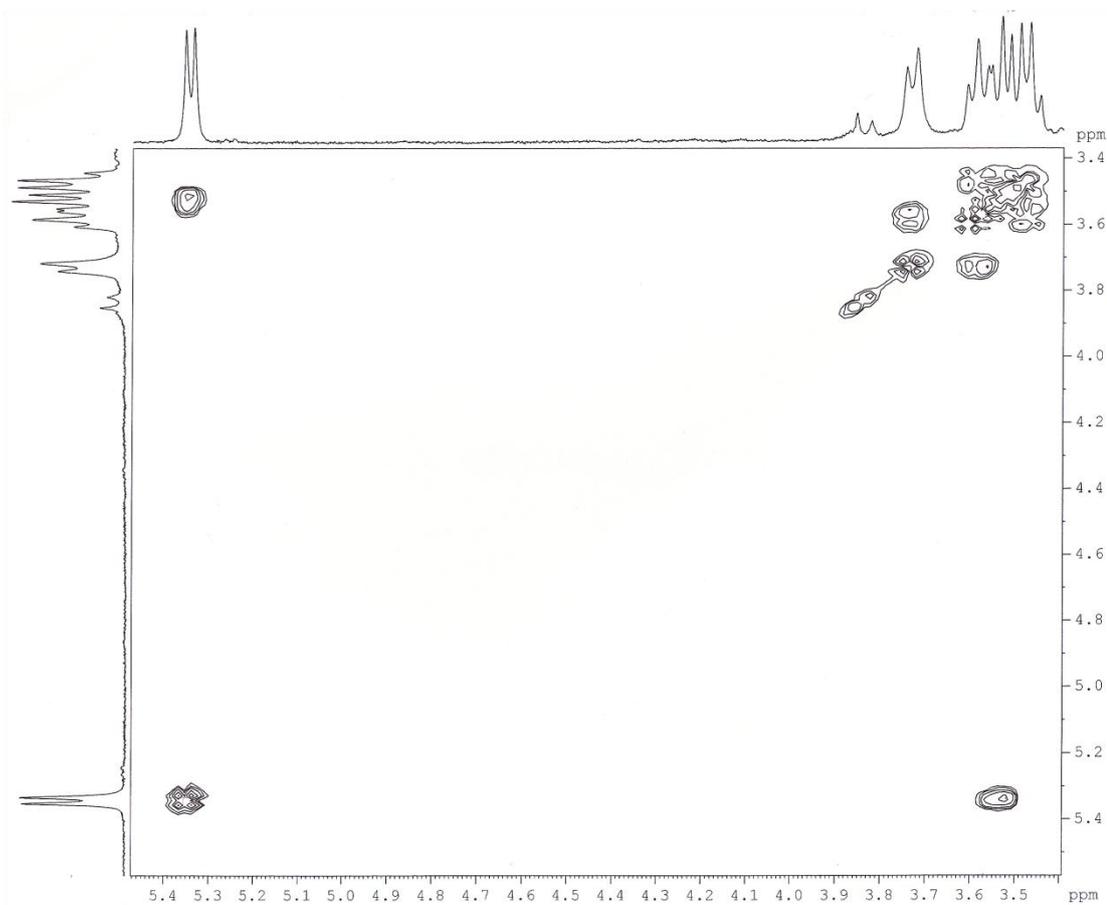
Espectro de RMN ¹H (400 MHz CD₃OD) da substância Quercetina-3-O-β-D-Glucuronopiranosideo

Tabela dos picos do RMN ^1H do composto quercetina-3-O- β -glucuronopiranosídeo

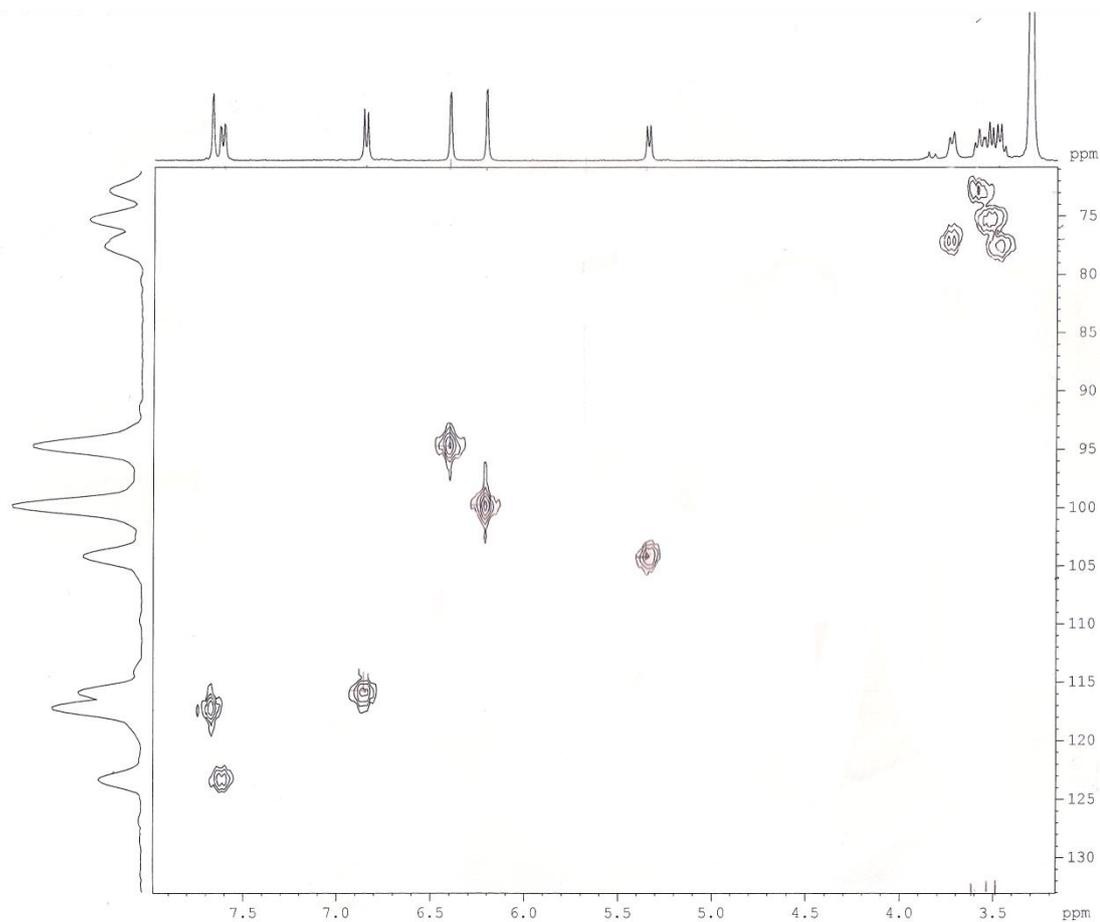
Nº	(ppm)	(Hz)	Altura
1	3.44	1378.2	0.0119
2	3.47	1387.4	0.0309
3	3.49	1395.9	0.0305
4	3.51	1404.9	0.0277
5	3.53	1412.7	0.0331
6	3.55	1421.7	0.0189
7	3.56	1424.9	0.0191
8	3.58	1434.7	0.0259
9	3.61	1443.1	0.0147
10	3.72	1488.0	0.0247
11	3.74	1497.1	0.0186
12	3.82	1528.5	0.0050
13	3.85	1541.6	0.0073
14	5.33	2134.9	0.0309
15	5.35	2142.4	0.0289
16	6.21	2484.8	0.0630
17	6.21	2486.2	0.0581
18	6.40	2562.0	0.0599
19	6.41	2563.4	0.0523
20	6.84	2737.8	0.0437
21	6.86	2746.3	0.0452
22	7.60	3043.0	0.0319
23	7.61	3044.6	0.0316
24	7.62	3050.9	0.0284
25	7.63	3052.8	0.0281
26	7.67	3068.1	0.0578



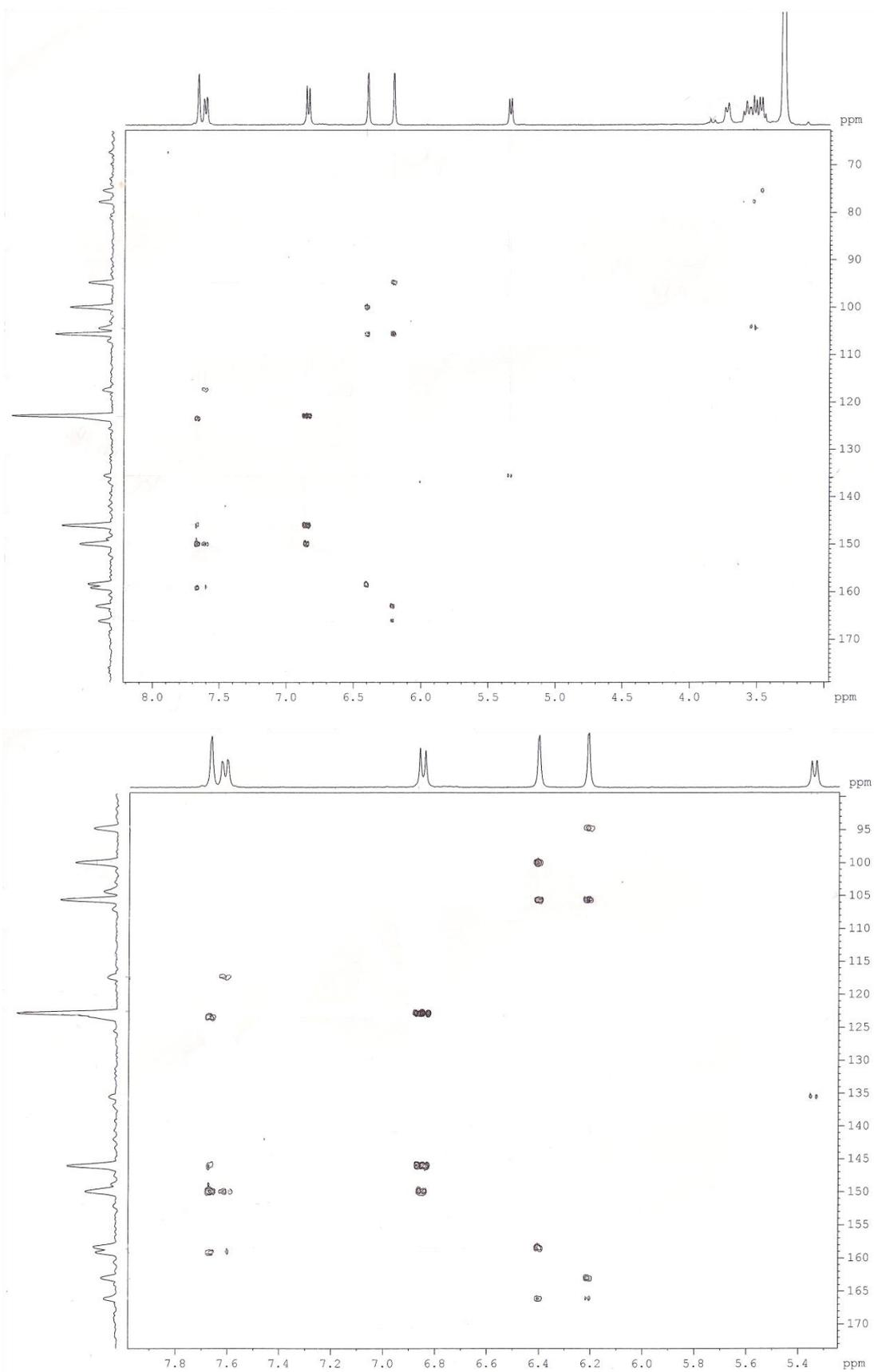
Espectro bidimensional RMN ¹H-¹H COSY (400 MHz CD₃OD) da substância Quercetina-3-O-β-D-Glucuropiranosideo



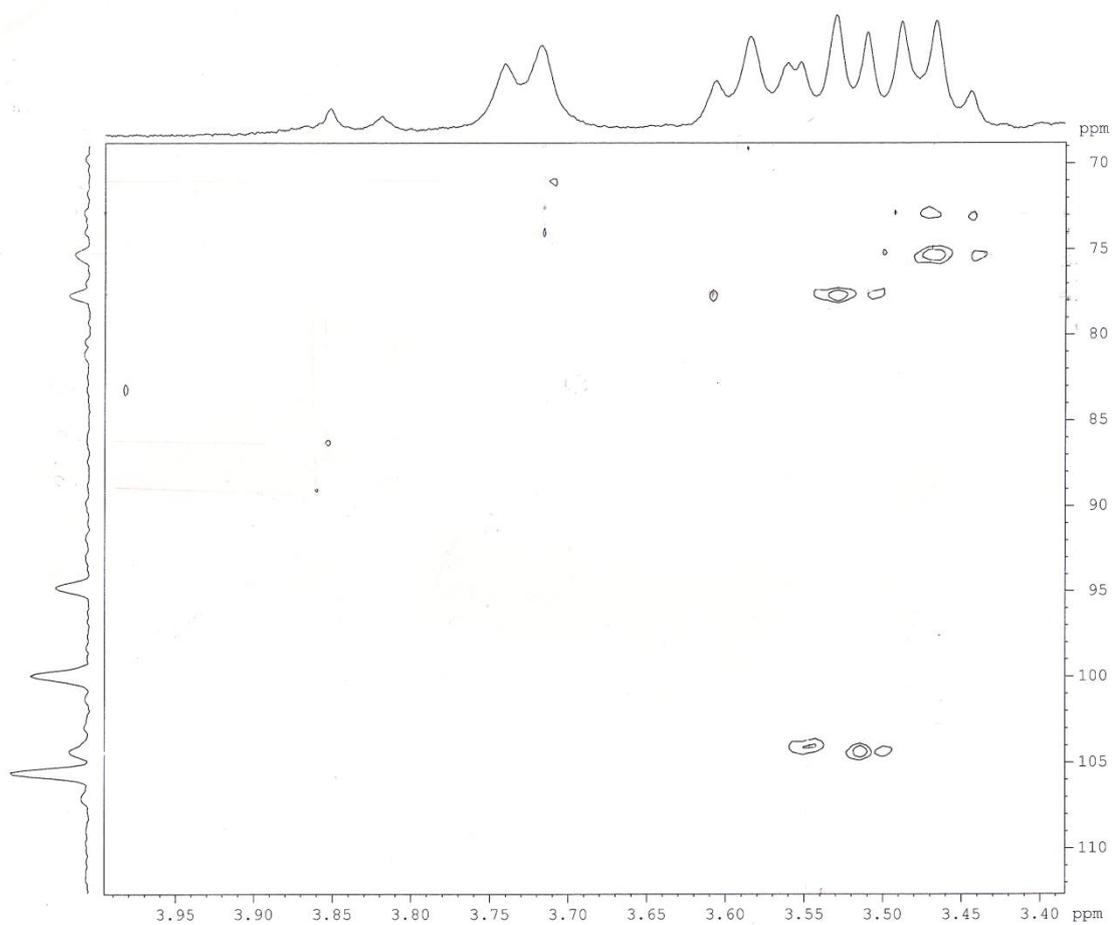
Espectro bidimensional RMN ^1H - ^1H COSY (400 MHz CD_3OD) da substância Quercetina-3-O- β -D-Glucuropiranosideo



Espectro bidimensional RMN HSQC da substância Quercetina-3-O-β-D-Glucuropiranosídeo



Espectro bidimensional RMN HMBC da substância Quercetina-3-O-β-D-Glucopiranosideo



Espectro bidimensional RMN HMBC da substância Quercetina-3-O- β -D-Glucuropiranosideo