

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Campus Araraquara

Clenilson Martins Rodrigues

**Caracterização quali e quantitativa de metabólitos
secundários em extratos vegetais**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

R696c Rodrigues , Clenilson Martins
Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos
vegetais / Clenilson Martins Rodrigues. – Araraquara : [s.n], 2007
197 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Wagner Vilegas
Co-orientador: Lourdes Campaner dos Santos

1. Produtos naturais. 2. Plantas medicinais – Estudo químico.
3. Técnicas hifenadas. . I. Título.

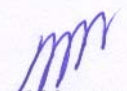
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

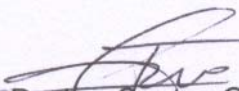
CLENILSON MARTINS RODRIGUES

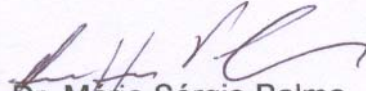
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.


Araraquara, 13 de abril de 2007.

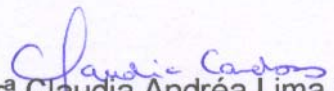
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.


Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.


Prof. Dr. Mário Sérgio Palma
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro.


Profª Drª Adriana Zerlotti Mercadante
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas.


Profª Drª Claudia Andréa Lima Cardoso
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, Dourados.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Clenilson Martins Rodrigues

Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Laboratório de Fitoquímica
Rua Prof. Francisco Degni s/n. Jd. Quitandinha, CEP: 14800-900.

Telefone: 3301-6600, Ramal: 6792

E-mail: clenilsonmr@gmail.com

Formação Acadêmica:

Graduação

Bacharelado

Instituição: Universidade Federal de Goiás, UFG, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Campus Samambaia

Local: Goiânia - GO

Curso: Química

Período: 1996-2000

Trabalho Orientado em Química: Determinação espectrofotométrica do teor de Cr₂O₃ em couros *wet blue* e especiação de cromo em efluentes de curtumes empregando a reação de formação do íon complexo Cr(III)-EDTA ativada por microondas.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Gama

Pós Graduação

Mestrado

Instituição: Universidade Federal de Goiás, UFG, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Campus Samambaia

Local: Goiânia - GO

Período: 2001-2003

Bolsista: CAPES

Título da Dissertação: Quantificação do feromônio sexual presente em *Anocentor nitens* (Neumann) (Acari: Ixodidae) por GC-MS-SIM.

Orientador: Prof. Dr. Lourival Cardoso de Faria

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri

Doutorado

Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara

Local: Araraquara - SP

Período: 2003-2007

Bolsista: CAPES

Título da Tese: Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Publicações

1. **Rodrigues, C.M.**; Rinaldo, D.; Santos, L.C.; Montoro, P. Piacente, S.; Pizza, C. Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, no prelo.
2. **Rodrigues, C.M.**; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Vilegas, W. High-Performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. *Phytochemical Analysis*, 2007, no prelo.
3. Sannomiya, M.; Cardoso, C.R.P.; Figueiredo, M.E.; **Rodrigues, C.M.**; Santos, L.C.; Santos, F.V. dos; Serpeloni, J.M.; Colus, I.M.S.; Vilegas, W.; Varanda, E.A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, submetido.
4. Rinaldo, D.; **Rodrigues, C. M.**; Rodrigues, J.; Sannomiya, M., Santos, L. C. dos; Vilegas, W. New flavone from the *Neea theifera* (Nyctaginaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2007, no prelo.
5. Hiruma-Lima, C.A.; Calvo, T.R.; **Rodrigues, C.M.**; Andrade, F.D.P.; Vilegas, W.; Brito, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.104, n.1-2, p.215-224, 2006.
6. Rinaldo, D.; da Silva, M.A.; **Rodrigues, C.M.**; Calvo, T.R.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Kushima, H.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. *Química Nova*, v.29, n.5, p.947-949, 2006.
7. Santos, L.C.; **Rodrigues, C.M.**; da Silva, M.A.; Coelho, R.G.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Chemical profile of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) LB Smith (Eriocaulaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.33, n.11, p.1159-1166, 2005.
8. Sannomiya, M.; Michelin, D.C.; **Rodrigues, C.M.**; Santos, L.C.; Salgado, H.R.N.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.26, n.1, p.71-75, 2005.
9. Santos, L.C.; da Silva, M.A.; **Rodrigues, C.M.**; Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Fast preparative separation of flavones from capitula of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith (Eriocaulaceae) by High-speed countercurrent chromatography (HSCCC). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.26, n.2, p.101-103, 2005.
10. **Rodrigues, C.M.**; Borges, L.M.F.; Ferri, P.H.; Faria, L.C. Quantification of sex pheromone from *Anocentor nitens* by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. *Talanta*, v.62, n.3, p.637-641, 2004.
11. Sannomiya, M.; **Rodrigues, C.M.**; Coelho, R.G.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *Journal of Chromatography A*, v.1035, n.1, p.47-51, 2004.

Formação complementar:

1. **Química Forense**. Ministrado pelo Prof. Valter Stefani. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. (2006). Carga horária: 6 h.
2. **Global Positioning System (GPS)**. Ministrado pelo Prof. Marcos Nalon. In: V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biot/Fapesp (2005). Carga horária: 5 h.
3. **Interação química entre plantas**. Ministrado por Adriana Pacheco Barreiro e Tainara Bortolucci Ferrari. In: IV Workshop de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (2004). Carga horária: 6 h.
4. **Inovações em Instrumentação Analítica para o Seguimento Farmacêutico**. Ministrado por Perkin Elmer do Brasil. In: Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, UFG (2002). Carga horária: 16 h.

5. **Controle da Qualidade das Águas.** Ministrado pelo Prof. Roque Passos Pivelli. In: 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. (2000). Carga horária: 6 h.
6. **Tratamento de Rejeitos Laboratoriais.** Ministrado pelo Prof. Wilson de Figueiredo Jardim. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Química (1999). Carga horária: 6 h.
7. **Introdução à espectrometria de absorção atômica e emissão em plasma: Impacto analítico na determinação de traços de metais.** Ministrado pelo Prof. Francisco José Krug. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Química (1999). Carga horária: 6 h.
8. **Espectrometria de emissão atômica com plasma (ICP - AES).** Ministrado pelo Prof. Nivaldo Baccan. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Química (1999). Carga horária: 6 h.
9. **Processos avançados de oxidação no tratamento de efluentes industriais.** Ministrado pelo Prof. Enio Leandro Machado. In: 10º Encontro Nacional de Química Analítica (1999). Carga horária: 6 h.
10. **Eletroquímica e Meio Ambiente.** Ministrado pelos Prof. Romeu C. Rocha, Edério D. Bidóia, Rodney Bertazzoli e Luiz A. Avaca. In: 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. (1998). Carga horária: 6 h.
11. **Automação em Química Analítica.** Ministrado pelo Prof. Dr. Célio Pasquini. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Química (1998). Carga horária: 6 h.
12. **Biossegurança em Laboratórios de Química.** Ministrado pelas Profª. Maria Gizelda de Oliveira Tavares e Profª. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol (1997). In: Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, UFG. Carga horária: 20 h.

Trabalhos apresentados em congressos:

1. **Rodrigues, C.M.;** Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Vilegas, W. Isolamento por HPLC de compostos polifenólicos presentes nas folhas de *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). In: II Simpósio de Cromatografia e Técnicas Afins. 2006. São Pedro - SP.
2. **Rodrigues, C.M.;** Rinaldo, D.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Caracterização por ESI-IT-MSⁿ dos metabólitos secundários presentes na infusão de *Davilla nitida* Vahl (Dilleniaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. Águas de Lindóia - SP.
3. **Rodrigues, C.M.;** Brito, A.R.M.S.; Hiruma-Lima, C.A.; Vilegas, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. Águas de Lindóia - SP.
4. Lorenzi, K.C.; **Rodrigues, C.M.;** Sannomiya, M.; Almeida, L.F.R.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Estudo químico das folhas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (Malpighiaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. Águas de Lindóia - SP.
5. Sannomiya, M.; **Rodrigues, C.M.;** Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Derivados do ácido galoil quínico isolados do chá das folhas de *Byrsonima fagifolia*. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. Águas de Lindóia - SP.
6. Rinaldo, D.; **Rodrigues, C.M.;** Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Tamashiro, J.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Estudo químico do extrato metanólico das folhas de *Neea theifera* Oerst (Nyctaginaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. Águas de Lindóia - SP.
7. Almeida, L.F.R.; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; **Rodrigues, C.M.;** Santos, L.C.; Vilegas, W. Constituintes presentes nas folhas de *Leonurus sibiricus*. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006. Águas de Lindóia - SP.
8. Olea, R.S.G.; Vilegas, W.; **Rodrigues, C.M.** Flavonóides em *Calotropis procera* R. BR. (Asclepiadaceae). In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador - BA.
9. **Rodrigues, C.M.;** Rinaldo, D.; Olea, R.S.G.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A. ; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Constituintes das folhas de *Davilla nitida* Vahl (Dilleniaceae). In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas.

10. **Rodrigues, C.M.**; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A. ; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Determinação por HPLC dos constituintes químicos da infusão das folhas de *Davilla nitida* Vahl (Dilleniaceae). In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas.
11. **Rodrigues, C.M.**; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; de Almeida, L.F.R.; Vilegas, W. Avaliação química do extrato polar de espécies do gênero *Byrsonima*. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas.
12. da Silva, M.A.; **Rodrigues, C.M.**; Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Santos, L.C. Separação de flavonas de *Eriocaulon ligulatum* (Eriocaulaceae) por HSCCC (high speed counter-current chromatography). In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas.
13. da Silva, M.A.; **Rodrigues, C.M.**; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Vilegas, W. Obtenção de fração de alcalóides e flavonóides de *Strychnos pseudoquina* (Loganiaceae) por HSCCC (high speed counter-current chromatography). In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas.
14. Sannomiya, M.; Michelin, D.C.; **Rodrigues, C.M.**; Santos, L.C.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Compostos fenólicos das folhas de *Byrsonima fagifolia*. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas.
15. **Rodrigues, C.M.**; Rinaldo, D.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Avaliação da composição química do extrato polar de *Anacardium humile* por HPLC-UV-PAD. In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005, Recife - PE, 2005.
16. Rinaldo, D.; **Rodrigues, C.M.**; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Olea, R.S.G.; Tamashiro, J.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas, W. Flavonas isoladas das folhas de *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae). In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005, Recife - PE.
17. Calvo, T.R.; **Rodrigues, C.M.**; Severi, J.; Tamashiro, J.; Brito, A.R.M.S.; Hiruma-Lima, C.A. . Perfil químico do extrato metanólico das folhas de *Alchornea gladiosa* (Euphorbiaceae). In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005, Recife - PE.
18. **Rodrigues, C.M.**; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Tamashiro, J.; Vilegas, W. SPE e avaliação do perfil cromatográfico dos principais constituintes presentes nas folhas de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae). In: XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2004. Salvador-BA.
19. **Rodrigues, C.M.**; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Tamashiro, J.; Vilegas, W. Extração por fase sólida e identificação por HPLC de catequinas presentes nas cascas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In: XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2004. Salvador-BA.
20. Rinaldo, D.; **Rodrigues, C.M.**; Calvo, T.R.; Sannomiya, M.; Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Tamashiro, J.; Vilegas, W. Avaliação do perfil cromatográfico de espécies do gênero *Davilla* por HPLC. In: XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo. 2004. Ubatuba-SP.
21. **Rodrigues, C.M.**; Santos, L.C.; Vilegas, W. Perfil cromatográfico por CLAE/UV dos extratos polares de *Eriocaulon ligulatum* (Eriocaulaceae). In: XXV Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. 2003. Campos do Jordão - SP.
22. **Rodrigues, C.M.**; Borges, L.M.F.; Lôbo, A.C.C.; de Paula, J.R.; Ferri, P. H.; Faria, L.C. Quantificação por SIM-GCMS do feromônio de atração sexual de *Anocentor nitens* (Neumann) (Acari: Ixodidae). In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2002. Poços de Caldas - MG.
23. **Rodrigues, C.M.**; Lôbo, A.C.C.; Borges, L.M.F.; Ferri, P.H.; Faria, L.C. Identificação e quantificação do feromônio sexual de *Anocentor nitens* (Neumann), Acari: Ixodidae. In: III Encontro Brasileiro de Ecologia Química. 2002. Campinas - SP.
24. **Rodrigues, C.M.**; Tavares, M.G.O.; Miyashiro, G. Quantificação de zinco em soro de crianças subnutridas por absorção atômica em chama com solubilização por irradiação

- de microondas. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2002. Poços de Caldas - MG.
25. **Rodrigues, C.M.**; Faria, L.C. Determinação espectrofotométrica de hipoclorito em alvejantes por injeção em fluxo. In: XL Congresso Brasileiro de Química. 2000. Recife - PE.
26. **Rodrigues, C.M.**; Gama, R.; Faria, L.C. Determinação do teor de cromo total em efluentes de curtumes empregando a reação de formação do íon-complexo Cr(III)-EDTA. In: X Encontro Nacional de Química Analítica. 1999. Santa Maria - RS.
27. **Rodrigues, C.M.**; Gama, R.; Faria, L.C.; Capelato, M.D. Determinação espectrofotométrica do teor de Cr₂O₃ em couros *Wet Blue* com a reação de formação do íon complexo Cr(III)-EDTA ativada por microondas. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Química. 1998. São Luís - MA.

Aos meus pais José Martins e Maria Dalva Rodrigues, aos meus irmãos Cleilton e Cleomar e a minha esposa Viviane Cândida da Silva, por terem sempre me apoiado ao longo de toda essa jornada e por muito mais...

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Wagner Vilegas, que mesmo sabendo da minha formação anterior, fora da área de química de produtos naturais, confiou em abrir as portas do seu laboratório e me aceitar como seu aluno de Doutorado, mesmo estando, naquela época, com sua cota de orientados extrapolada. Agradeço por ter disponibilizado os equipamentos de HPLC, bem como dado a liberdade para que eu aprendesse todos os demais métodos/processos disponíveis em seu laboratório e empregados no estudo de espécies vegetais. Agradeço pelo grandioso empenho prestado para o aprendizado das metodologias aqui aplicadas, bem como no ensinamento das técnicas de caracterização, principalmente a espectrometria de massas, a qual rendeu longas horas de discussão.

À Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos por sua co-orientação, por sempre estar disposta a transmitir seus valiosos ensinamentos, tanto no aspecto acadêmico quanto fora dos muros da academia, principalmente nos ensinamentos relacionados ao valor da vida e de como transpor as dificuldades que em muitos casos não fazem parte dos nossos planos.

Aos professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito.

Aos professores Dr. Ian Castro-Gamboa e Dr^a. Lúcia Xavier pela convivência e pelo aprendizado durante meu Estágio Docência.

Aos demais professores do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara, por todo o conhecimento transmitido durante suas aulas.

Aos professores Dr^a. Sonia Piacente e Dr. Cosimo Pizza do Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, Salerno, pela realização dos experimentos de MS.

À Dra. Virginia Carbone do Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, Istituto di Scienze dell' Alimentazione, Avellino, pela realização dos espectros de massas em *tandem* e por suas valiosas informações sobre a técnica de MS.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pela realização dos espectros de NMR, por seus valiosos conhecimentos e ensinamentos e pelos bons momentos de descontração.

À Dr^a. Miriam Sannomiya pelo incentivo, companheirismo, pelas longas discussões sobre assuntos pertinentes ao ambiente de trabalho, bem como os aspectos vividos no cotidiano e principalmente por nossa amizade.

Ao Prof. Dr. Roberto Gallegos Olea pelo excelente convívio durante o seu estágio de pós-doutoramento e por nossa amizade.

Ao Doutorando Daniel Rinaldo, por toda ajuda prestada desde a época de sua iniciação científica, pelas boas lembranças dos vários congressos que participamos, pelas longas discussões sobre os aspectos de nossos trabalhos e por nossa amizade.

Ao Dr. Luiz Fernando Rolim pelo excelente convívio durante a época do seu doutoramento, pelo seu carisma e por nossa amizade.

À química Kamilla Lorenzi, ex-aluna de iniciação científica, pela valiosa ajuda prestada para o desenvolvimento de parte deste trabalho e por seu interesse e dedicação.

À Prof^a. Dr^a. Claudia J. Nehme pelas sugestões e por toda ajuda prestada.

Aos colegas do Departamento de Química Orgânica: Márcio Andreo, Roberta Coelho, Marcelo A. da Silva, Tamara Regina, Ana Lúcia Nasser, Juliana Rodrigues, Juliana Severi, Adriana Cândido, Carolina, Flávia, Hélio Kushima, Luciana de Ávila, Marcelo Telascrea, Vânia A. F. Formenton, Jonas M. da Silva, Geraldo Humberto Silva, Alberto C. Alécio, agradeço pela convivência no laboratório e nos corredores do Departamento.

Às funcionárias da Seção de pós-graduação, Vilma A. Pestana, Patrícia F. Ribeiro, Célia Maria C. V. Coelho e Sandra R. Pavanelli, pela dedicação aos assuntos relacionados à coordenação do curso de pós-graduação.

À FAPESP pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa concedida.

À todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo o meu sincero reconhecimento.

*“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina”.*
(Cora Coralina)

RESUMO

Este trabalho trata da caracterização química de espécies de plantas brasileiras usadas no tratamento de disfunções gástricas. Nossa proposta envolve a investigação de extratos orgânicos polares e infusões por técnicas analíticas. Extração em fase sólida (SPE) e/ou extração líquido-líquido (LLE) foram utilizadas na etapa de *clean-up* para que açúcares livres e oligômeros de proantocianidinas fossem separados da matriz vegetal bruta. As amostras pré-tratadas foram então analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com detector de arranjo de fotodiodos (PAD) ou por espectrometria de massas em *tandem* acoplado a um *ion trap* com interface de ionização por *electrospray*, usando o modo de inserção direta da amostra (FIA-ESI-IT-MS). Esta estratégia permitiu conhecer os metabólitos secundários de plantas pertencentes às famílias Dilleniaceae (*Davilla elliptica* e *D. nitida*: flavonóides, catequinas, isoprenóides e ácidos fenólicos), Apocynaceae (*Hancornia speciosa*: catequinas, ácidos fenólicos, procianidinas e oligômeros de procianidinas C-glucosiladas) e Malpighiaceae (*Byrsonima basiloba*, *B. coccolobifolia*, *B. crassa*, *B. fagifolia* e *B. intermedia*: flavonóides, biflavonóides, ácidos fenólicos, oligômeros de proantocianidinas e ácidos galoilquínicos). A determinação quantitativa dos principais metabólitos secundários também foi realizada, permitindo então a completa caracterização da composição química dos extratos de plantas. Assim, nossa proposta levou a uma caracterização química rápida e eficiente de espécies de plantas brasileiras usadas na medicina popular como antiúlcera. Estes resultados são úteis para um melhor entendimento das atividades farmacológicas das espécies de plantas acima mencionadas.

ABSTRACT

This work deals with the chemical characterization of Brazilian plant species used to treat gastric disfunctions. Our approach involved the investigation of organic polar extracts and infusions by using analytical techniques. Solid-phase extraction (SPE) and/or liquid-liquid extraction (LLE) were used in the clean-up step, so that free sugars and proanthocyanidin oligomers were separated from the bulk of the vegetable matrix. The pre-treated samples were then analyzed by using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to photodiode array (PAD) detector or by direct flow analysis - electrospray ionization - ion trap - tandem mass spectrometry (FIA-ESI-IT-MS). This strategy allowed to recognize the secondary metabolites from plants belonging to the families Dilleniaceae (*Davilla elliptica* and *D. nitida*: flavonoids, catechins, isoprenoids and phenolic acids), Apocynaceae (*Hancornia speciosa*: catechins, phenolic acids, procyanidins and C-glycosilated procyanidins oligomers) and Malpighiaceae (*Byrsonima basiloba*, *B. coccolobifolia*, *B. crassa*, *B. fagifolia* and *B. intermedia*: flavonoids, biflavonoids, phenolics acids, proanthocyanidins oligomers and galloylquinic acids). Quantitative determination of the main secondary metabolites was also performed, thus allowing to fully characterization of the chemical composition of plant extracts. Thus, our approach led to a fast and efficient chemical characterization of Brazilian plant species used in folk medicine as antiulcer. These results are useful to the better understanding of the pharmacological activities of the above mentioned plant species.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
Ara	Arabinose
i.d.	internal diameter (diâmetro Interno)
DCCC	Droplet Countercurrent Chromatography (Cromatografia Gotejante em Contra Corrente)
ESI	Electrospray ionization (Ionização por <i>electrospray</i>)
EtOH	Etanol
FIA	Flow Injection Analysis (Análise por injeção em fluxo ou análise por inserção direta da amostra)
FIA-ESI-IT-MS	Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas acoplada a um <i>ion-trap</i> com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
Gal	Galactose
Gall	Galoil
GC	Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)
GC-FID	Gas Chromatography - Flame Ionization Detector (Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama)
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry (Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas)
Gli	Glicose
GPC	Gel Permeation Chromatography (Cromatografia de Permeação em Gel)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-NMR	High Performance Liquid Chromatography - Nuclear Magnetic Resonance (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Ressonância Magnética Nuclear)
HPLC-PAD	High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
HRF	Heterocyclic Ring Fission (Clivagem Heterocíclica)
HSCCC	High Speed Counter Current Chromatography (Cromatografia de Contra Corrente de Alta Velocidade)
IR	Infrared (Infravermelho)
IT	<i>Ion Trap</i>
k'	Fator de retenção ou fator de capacidade
LLE	Liquid-Liquid Extraction (extração líquido-líquido)

LOD	Limit of detection (Limite de Detecção)
LOQ	Limit of quantification (Limite de Quantificação)
[M – H] [–]	Molécula desprotonada
M3OGal	miricetina-3- O-β-galactopiranosídeo
M3OGli	miricetina-3- O-β-glicopiranosídeo
M3O(2"Gall)Rha	miricetina-3- O-(2"- O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo
M3O(3"Gall)Rha	miricetina-3- O-(3"- O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo
M3ORha	miricetina-3- O-α-rhamnopiranosídeo
M3O(2"Gall)Gal	Miricetina-3- O-(2"-Galoil)-β-galactopiranosídeo
<i>m/z</i>	Relação Massa/Carga
MeOH	Metanol
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Média Pressão)
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
NP/PEG	Natural Products/Polyethylene glycol reagent
PAD	Photodiode Array Detector (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
PTFE	Politetrafluoroetileno (<i>Teflon</i>)
Q3OAra	quercetina-3- O-α-arabinopiranosídeo
Q3OGal	quercetina-3- O-β-galactopiranosídeo
Q3ORha	quercetina-3- O-α-rhamnopiranosídeo
Q3O(2"Gall)Gal	quercetina-3- O-(2"-Galoil)-α-arabinopiranosídeo
Q3O(2"Gall)Gal	quercetina-3- O-(2"-Galoil)-β-galactopiranosídeo
Q3ORha(1-6)Gal	quercetina-3- O-α-rhamnopiranosil-(1→6)- O-β-galactopiranosídeo
Q3ORha(1-3)ORha(1-6)OAla	quercetina-3- O-α-rhamnopiranosil-(1→3)- O-[α-rhamnopiranosil-(1→6)]- O-β-alopiranosídeo
QM	quinone methide (quinona metídeo)
<i>Rs</i>	Resolução
RDA	retro-Diels-Alder
<i>R_f</i>	Fator de Retenção
Rha	Rhamnose
RP18	Reversed Fase octadecylsilan (Fase reversa octadecilsilano)
SPE	Solid Fase Extraction (Extração em fase sólida)
TFA	Ácido Trifluoracético
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia de Camada Delgada)
<i>t_r</i>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Hábito, folhas e inflorescências de <i>Hancornia speciosa</i> . Fonte: (LORENZI, 1998)	40
Figura 1.2.	Frutos e sementes de <i>H. speciosa</i> . Fonte: (LORENZI, 1998).	41
Figura 1.3.	Perfis cromatográficos do extrato EtOH (A) e do extrato MeOH (B) das cascas de <i>H. speciosa</i> obtidos por HPLC-PAD. Sistema de eluição gradiente: 5-100% ACN em 60 min, coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm.	43
Figura 1.4.	Perfil cromatográfico da fração MeOH/H ₂ O 2:8 v/v proveniente do infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> , submetida ao <i>clean-up</i> em LLE e SPE em <i>Sep Pak</i> RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).	48
Figura 1.5.	A) cromatograma do primeiro eluato da SPE (MeOH/H ₂ O 2:8 v/v). B) cromatograma do segundo eluato da SPE (MeOH/H ₂ O 1:1 v/v). C) cromatograma do terceiro eluato da SPE (MeOH 100%). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1 e para processo de SPE em RP18 veja Esquema 1.2A).	49
Figura 1.6.	Perfil cromatográfico do eluato MeOH/H ₂ O 2:8 v/v do infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> submetido ao processo de SPE. A) Cromatograma processado em 210 nm e B) cromatograma processado em 325 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ . (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).	50
Figura 1.7.	Espectros na região do UV para os principais picos eluídos no cromatograma da Figura 1.6. Espectros 2, 3 e 5 foram atribuídos à catequina, ácido clorogênico e à <i>epicatequina</i> , respectivamente.	51
Figura 1.8.	Avaliação da degradação do conteúdo de catequinas a partir de análises cromatográficas de uma amostra (eluato MeOH/H ₂ O 2:8 v/v após <i>clean-up</i> em <i>Sep Pak</i> RP18) submetida à ação de luz e calor. Intervalos: A) 1 dia; B) 15 dias; C) 30 dias e D) 90 dias. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).	53
Figura 1.9.	A) Separação cromatográfica por HPLC-PAD da infusão submetida aos processos de LLE e SPE em cartucho <i>Sep Pak</i> de RP18, eluato MeOH/H ₂ O 2:8 v/v, λ = 210 nm. B) Análise cromatográfica de uma alíquota das frações 39-45 provenientes da separação do infuso de <i>H. speciosa</i> com o sistema MPLC, λ = 210 nm. C) Processamento da corrida cromatográfica da alíquota das frações 39-45 em 325 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ . (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).	55
Figura 1.10.	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , da infusão de <i>H. speciosa</i> avaliado em modo negativo. A) Faixa de íons com <i>m/z</i> de 210-1600 Da. B) Faixa de íons com <i>m/z</i> de 1200-2000 Da. (●) Íons precursores separados por 288 Da, referentes à primeira série homóloga de procianidinas. (♦) Segunda série homóloga de procianidinas C-glucosiladas. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	57
Figura 1.11.	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 289, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	58

Figura 1.12.	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 273, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	59
Figura 1.13.	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 425, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	59
Figura 1.14.	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 341, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	60
Figura 1.15.	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 353, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	60
Figura 1.16.	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 865, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.	63
Figura 1.17.	Espectro de massas de segunda-ordem obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% para o íon precursor de m/z 1027. Para condições experimentais veja: Parte Experimental.	65
Figura 1.18.	Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: 1 ácido gálico, 2 (-)-galocatequina, 3 (-)-epigalocatequina, 4 galato de metila, 5 (+)-catequina, 6 4'-O-metil-galocatequina, 7 (-)-epicatequina, 8 galato de (-)-galocatequina, 9 galato de etila, 10 galato de (-)-epicatequina.	70
Figura 1.18.	Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: 1 ácido gálico, 2 (-)-galocatequina, 3 (-)-epigalocatequina, 4 galato de metila, 5 (+)-catequina, 6 4'-O-metil-galocatequina, 7 (-)-epicatequina, 8 galato de (-)-galocatequina, 9 galato de etila, 10 galato de (-)-epicatequina.	71
Figura 1.19.	Separação cromatográfica de uma mistura de padrões contendo catequinas e derivados de ácidos fenólicos. Identificação dos picos eluídos: 1 ácido gálico (AG), 2 (-)-galocatequina (GC), 3 (-)-epigalocatequina (EGC), 4 galato de metila (GM), 5 (+)-catequina (C), 6 4'-O-metil-galocatequina (GC4'OMe), 7 (-)-epicatequina (EC), 8 galato de (-)-galocatequina (GCG), 9 galato de etila (GE), 10 galato de (-)-epicatequina (ECG). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.2).	72
Figura 1.20.	Separação cromatográfica dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> . Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.2).	73
Figura 1.21.	Separação cromatográfica dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> . Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.3).	74
Figura 1.22.	Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> . Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.3).	75

- Figura 2.1.** Esquerda, folhas frutos e inflorescência de *D. nitida*. Disponível em: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?imagx=10900112 acesso em: 26/03/2007. Direita, folhas e frutos de *D. elliptica*. Disponível em: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?name=Davilla+elliptica acesso em: 26/03/2007. 79
- Figura 2.2.** Perfis cromatográficos dos extratos MeOH de *D. nitida* (A) e *D. elliptica* (B). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.2). 82
- Figura 2.3.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD do primeiro eluato (MeOH/H₂O 14:86, v/v) do extrato MeOH de *D. nitida* submetido ao processo de SPE em cartucho Sep Pak de RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.3, Sistema 1). 85
- Figura 2.4.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD do segundo eluato (MeOH/H₂O 1:1, v/v) (A) e do terceiro eluato (MeOH 100%) (B) do extrato MeOH de *D. nitida* submetido ao processo de SPE em cartucho Sep Pak de RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.3, Sistema 2). 86
- Figura 2.5.** Efeito da presença do ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 0,05 % v/v durante a separação dos constituintes químicos presentes nos três eluatos da SPE de *D. nitida*. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4). 88
- Figura 2.6.** Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para flavonóides (A) e taninos condensados (B). 89
- Figura 2.7.** Identificação dos constituintes químicos de *D. elliptica* eluídos durante as análises cromatográficas do primeiro eluato da SPE (A) monitorado em 210 nm e do segundo eluato da SPE (B) monitorado em 360 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4). 90
- Figura 2.8.** Identificação dos constituintes químicos de *D. nitida* eluídos durante as análises cromatográficas do primeiro eluato da SPE (A) monitorado em 210 nm e do segundo eluato da SPE (B) monitorado em 360 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4). 91
- Figura 2.9.** Cromatogramas de separação por HPLC monitorados em 210 nm. Análise do primeiro eluato obtido após *clean-up* de 10 mg dos extratos MeOH das folhas de *D. nitida* (A) e *D. elliptica* (B). Padrão AG = padrão de ácido gálico (a), substâncias identificadas (b). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4). 92
- Figura 2.10.** Cromatogramas de separação por HPLC monitorados em 254 nm. Análise do segundo eluato obtido após *clean-up* de 10 mg dos extratos MeOH das folhas de *D. nitida* (A) e *D. elliptica* (B). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4). 93

- Figura 2.11.** Cromatogramas de separação por HPLC monitorados em 254 nm. Análise do terceiro eluato obtido após *clean-up* de 10 mg dos extratos MeOH das folhas de *D. elliptica* (A) e *D. nitida* (B). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4). 93
- Figura 2.12.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD da porção acetato de etila obtida a partir da LLE do infuso das folhas de *D. elliptica* e posterior *clean-up* em Sep Pak RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5). 97
- Figura 2.13.** Cromatograma de separação por HPLC-PAD (modo preparativo) da amostra obtida após etapas de *clean-up* e enriquecimento empregando os processos de LLE e SPE no infuso das folhas de *D. elliptica*. Coluna Varian® Dynamax RP18 (250 x 41,4 mm i.d.; 8 µm), HPLC (Varian®), fluxo 15,0 mL min⁻¹, monitorado em 254 nm, Volume injetado: 1 mL. 99
- Figura 2.14.** Cromatograma de separação por HPLC-PAD dos constituintes químicos encontrados no infuso das folhas de *D. elliptica* após os procedimentos de LLE e SPE. Identificação: **1** ácido gálico; **2** (-)-epicatequina; **3** miricetina-3-O-β-galactopiranosídeo; **4** miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo; **5** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-β-galactopiranosídeo; **6** (6S,7E)-6,9-diidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona; **7** rutina; **8** miricetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo, **9** quercetina-3-O-β-galactopiranosídeo; **10** quercetina-3-O-α-arabinopiranosídeo; **11** quercetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo; **12** miricetina, **13** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo; **14** miricetina-3-O-(3"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo; **15** quercetina. Em destaque, separação da mistura dos flavonóis **3** e **4** empregando o sistema isocrático com a mistura de 40% de MeOH + TFA 0,05% (B) em 60% de H₂O + TFA 0,05% (A). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 254 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5). 100
- Figura 2.15.** Constituintes químicos isolados a partir da porção acetato de etila proveniente das etapas de LLE e SPE da infusão feita com as folhas de *D. elliptica*. 100
- Figura 2.16.** Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, da infusão de *D. nitida* (A) e da infusão de *D. elliptica* (B), avaliados em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: parte Experimental. 102
- Figura 2.17.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD de uma mistura de flavonóides injetados na concentração de 50,0 µg mL⁻¹. **1** miricetina-3-O-β-galactopiranosídeo; **2** rutina; **3** miricetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo; **4** quercetina-3-O-β-galactopiranosídeo; **5** quercetina-3-O-α-arabinopiranosídeo; **6** quercetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo; **7** miricetina; **8** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo; **9** miricetina-3-O-(3"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo; **10** quercetina e **11** amentoflavona. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5). 103
- Figura 2.18.** Espectros na região do UV para os flavonóides destacados no cromatograma da Figura 2.18. Identificação: A rutina; B miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo; C quercetina e D amentoflavona. 104
- Figura 2.19.** Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** miricetina-3-O-β-galactopiranosídeo, **2** rutina, **3** (miricetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo, **4** quercetina-3-O-β-galactopiranosídeo, **5** quercetina-3-O-α-arabinopiranosídeo, **6** quercetina-3-O-α-rhamnopiranosídeo, **7** miricetina, **8** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo, **9** miricetina-3-O-(3"-O-galoil)-α-rhamnopiranosídeo, **10** quercetina. 105

- Figura 2.19.** Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo, **2** rutina, **3** (miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, **4** quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo, **5** quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, **6** quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, **7** miricetina, **8** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo, **9** miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo, **10** quercetina. 106
- Figura 2.20.** Efeito da eficiência de extração do solvente em função do tempo ($n = 3$). O eixo y representa a área do pico cromatográfico para o flavonol miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo presente no infuso das folhas de *D. elliptica*. 109
- Figura 2.21.** Representação das massas obtidas por meio dos processos de extração em MeOH ($n = 3$). **1)** *D. nitida* primeira coleta, **2)** *D. nitida* segunda coleta e **3)** *D. elliptica*. 111
- Figura 2.22.** Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos flavonóides presentes no infuso das folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*. Identificação dos picos cromatográficos é a mesma dada na Tabela 2.8. **A)** *D. elliptica*, **B)** *D. nitida* coleta: agosto de 2002 e **C)** *D. nitida* coleta: março de 2002. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 360$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5). 114
- Figura 2.23.** Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos flavonóides presentes no extrato MeOH das folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*. Identificação dos picos cromatográficos é a mesma dada na Tabela 2.8. **A)** *D. elliptica*, **B)** *D. nitida* coleta: agosto de 2002 e **C)** *D. nitida* coleta: março de 2002. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 360$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5). 115
- Figura 3.1.** Distribuição geográfica das espécies pertencentes à família Malpighiaceae (Heywood, 1993). 116
- Figura 3.2.** Fotos das espécies do gênero *Byrsonima* estudadas. 118
- Figura 3.3.** Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH/H₂O 2:8 v/v obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Identificação: **1** ácido gálico; **2** galato de metila; **3** catequina; **4** epicatequina; **5** galato de epigallocatequina. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 210$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 1). 120
- Figura 3.4.** Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH/H₂O 1:1 v/v obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Identificação: **6** quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; **7** quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- β -galactopiranosídeo; **8** quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo; **9** quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -arabinopiranosídeo; **10** quercetina. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 360$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 2). 121
- Figura 3.5.** Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH 100% obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Identificação: **11** amentoflavona. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 360$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 2). 121

- Figura 3.6.** Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH 100% obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Avaliação do flavonóide **11** amentoflavona com comprimento de onda processado em: **A)** 254 nm; **B)** 270 nm; **C)** 330 nm; **D)** 210 nm e **E)** 360 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 2). 122
- Figura 3.7.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD do infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 1). 124
- Figura 3.7.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD do infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 1). 125
- Figura 3.8.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD de flavonóides presentes no infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 2). 126
- Figura 3.8.** Separação cromatográfica por HPLC-PAD de flavonóides presentes no infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 2). 127
- Figura 3.9.** Espectros na região do UV para algumas das classes de substâncias encontradas em *B. fagifolia*. 129
- Figura 3.10.** Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do: **A)** infuso de *B. coccolobifolia*; **B)** infuso de *B. crassa*; **C)** infuso de *B. basiloba*; **D)** infuso de *B. intermedia* e **E)** infuso de *B. fagifolia*. Para condições espectrométricas veja: parte Experimental. 133
- Figura 3.11.** **A)** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de *m/z* 729, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. **B)** Espectro de massas de terceira-ordem (MS³) do íon produto de *m/z* 577, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 135
- Figura 3.12.** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de *m/z* 1017, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 135
- Figura 3.13.** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de *m/z* 609, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 137
- Figura 3.14.** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de *m/z* 343, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 138

- Figura 3.15.** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 495, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 138
- Figura 3.16.** **A)** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 647, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. **B)** Espectro de massas de terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 495, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 139
- Figura 3.17.** **A)** Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 799, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. **B)** Espectro de massas de terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 601, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental. 140
- Figura 3.18.** Espectro de massas de segunda-ordem obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% para o íon precursor de m/z 951. Para condições experimentais veja: Parte Experimental. 141

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1.	Etapas envolvidas na obtenção da infusão das cascas de <i>H. speciosa</i> .	45
Esquema 1.2.	Etapas de extração em fase sólida com cartuchos <i>Sep Pak</i> de fase normal e fase reversa.	46
Esquema 1.3.	Rotas de fragmentação de uma possível proantocianidina trimérica encontrada no infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> . Os principais mecanismos de fragmentação envolvidos são: RDA (retro-Diels-Alder), HRF (clivagem heterocíclica), e QM (quinona metídeo).	62
Esquema 1.4.	Íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma O-hexose (B). O sinal \pm indica os modos de ionização, positivo ou negativo.	65
Esquema 1.5.	Rotas de fragmentação de uma possível procianidina trimérica C-glucosilada encontrada no infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> . Os principais mecanismos de fragmentação envolvidos são: RDA (retro-Diels-Alder), HRF (clivagem heterocíclica), QM (quinona metídeo), $^{0,2}X^-$ e $^{0,3}X^-$ (clivagem interna da unidade sacarídica).	66
Esquema 2.1.	Etapas de extração dos constituintes químicos presentes nas folhas de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i> .	81
Esquema 2.2.	Etapas de <i>clean-up</i> empregadas nos procedimentos de SPE dos extratos MeOH de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i> em cartuchos de <i>Sep Pak</i> RP18.	84
Esquema 2.3.	Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.	86
Esquema 2.4.	Procedimento de produção dos extratos MeOH empregados nas análises de rotina.	87
Esquema 2.5.	Etapas realizadas para a obtenção da porção acetato de etila proveniente da infusão feita com as folhas de <i>D. elliptica</i> .	95
Esquema 3.1.	Etapas de <i>clean-up</i> empregadas nos procedimentos de SPE do extrato MeOH de <i>B. crassa</i> em cartuchos de <i>Sep Pak</i> RP18.	119
Esquema 3.2.	Clivagem homolítica entre unidade de galactose e a aglicona quercetina com formação do íon produto do ânion radicalar ($[Y_0 - H]^{\bullet}$).	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Gradiente de eluição cromatográfica empregado na eluição dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de <i>H. speciosa</i> após procedimentos de <i>clean-up</i>	48
Tabela 1.2.	Gradiente de eluição cromatográfica usado na separação de catequinas e derivados de ácidos fenólicos	72
Tabela 1.3.	Gradiente de eluição usado na separação dos metabólitos encontrados na infusão das cascas de <i>H. speciosa</i>	73
Tabela 1.4.	Dados de regressão linear para os padrões empregados na elaboração das curvas analíticas	74
Tabela 1.5.	Concentrações dos derivados de catequinas encontrados nas cascas de <i>H. speciosa</i>	77
Tabela 2.1.	Distribuição de flavonóides em 11 espécies de <i>Davilla</i>	80
Tabela 2.2.	Gradiente de eluição exploratório empregado na separação dos constituintes químicos presentes nos extratos MeOH de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i>	82
Tabela 2.3.	Gradientes de eluição usados na separação dos metabólitos de <i>D. nitida</i>	84
Tabela 2.4.	Gradiente de eluição usado na separação dos constituintes químicos presentes nas folhas de <i>D. nitida</i>	88
Tabela 2.5.	Gradiente de eluição empregado na separação dos constituintes químicos presentes na fração flavonoídica obtida após os procedimentos de LLE e SPE do infuso das folhas de <i>D. elliptica</i>	96
Tabela 2.6.	Condições típicas de operação para colunas de diversas dimensões	98
Tabela 2.7.	Dados de regressão linear para os flavonóides empregados como padrões na elaboração das curvas analíticas	107
Tabela 2.8.	Dados quantitativos referentes à concentração individual dos flavonóides encontrados em fitopreparações (infuso e extrato metanólico) feitas com as folhas de <i>D. nitida</i> e <i>D. elliptica</i> . Avaliação da eficiência dos modelos de extração e comparação da variação no teor de flavonóides em períodos sazonais distintos	113
Tabela 3.1.	Gradientes de eluição empregados na separação por HPLC-PAD dos metabólitos secundários de <i>Byrsonima crassa</i>	119
Tabela 3.2.	Gradientes de eluição empregados na separação por HPLC-PAD dos metabólitos secundários presentes em espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	123
Tabela 3.3.	Bandas de absorção na região do UV para os metabólitos secundários identificados nas espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	128
Tabela 3.4.	Dados espectrométricos das substâncias identificadas durante os experimentos de FIA-ESI-IT-MS/MS	131

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	26
Extração em fase sólida e extração líquido-líquido	30
Padronização de extratos vegetais	32
OBJETIVOS	33
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	34
EXPERIMENTAL	35
Instrumentos	35
Materiais, Reagentes e Soluções	36
Material Vegetal	38
Extrações	38
Procedimentos Cromatográficos Gerais	39
Capítulo 1: <i>Hancornia speciosa</i> Gomez (Apocynaceae)	40
Parte experimental / Resultados e discussões	42
Investigação dos extratos de <i>H. speciosa</i>	42
Preparação dos extratos utilizados na avaliação do perfil cromatográfico	44
Identificação dos metabólitos secundários	49
Estabilidade da fração MeOH/H ₂ O 2:8 v/v	52
Fracionamento da porção acetato de etila da infusão de <i>Hancornia speciosa</i>	54
Análises por FIA-ESI-IT-MS	55
Avaliação quantitativa da infusão das cascas de <i>H. speciosa</i>	69
Construção das curvas analíticas	69
Aplicação do método quantitativo	75
Capítulo 2: Gênero <i>Davilla</i> (Dilleniaceae)	78
Parte experimental / Resultados e discussões	81
Avaliação do perfil cromatográfico de espécies do gênero <i>Davilla</i>	81
Clean-up em SPE	83
Identificação dos metabólitos secundários	89
Comparação dos perfis cromatográficos <i>Davilla nitida</i> e <i>Davilla elliptica</i>	91
Fracionamento da porção acetato de etila da infusão das folhas de <i>Davilla elliptica</i>	94
Preparo da amostra	95
Isolamento por HPLC preparativo	97
Análises por FIA-ESI-IT-MS	101
Análise quantitativa dos infusos e dos extratos MeOH de <i>Davilla nitida</i> e <i>Davilla elliptica</i>	102
Construção das curvas analíticas	104
Procedimento de otimização da extração dos metabólitos secundários	107
Infusão:	107
Extrato MeOH:	109
Preparo das amostras	110

Aplicação dos métodos de quantificação	111
Capítulo 3: Gênero <i>Byrsonima</i> (Malpighiaceae)	116
Parte experimental / Resultados e discussões	119
Identificação das classes de substâncias presentes em <i>B. crassa</i>	119
Triagem cromatográfica das espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	122
Análises por FIA-ESI-IT-MS	130
Preparo das amostras	130
CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
REFERÊNCIAS	146
ANEXOS	158
Anexo 1	159
Anexo 2	179

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas tidas como “medicinais” é uma prática comum na medicina popular brasileira e está fundamentada no acúmulo de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993).

Este potencial das plantas como fonte de novas drogas é ainda pouco explorado. Estima-se existir entre 250.000-500.000 espécies de plantas em todo o mundo, das quais uma porcentagem ínfima foi submetida a estudo fitoquímico (HAMBURGER & HOSTETTMAN, 1991). Diante deste contexto, a elaboração de métodos de análises que sejam rápidos, precisos e confiáveis torna-se uma necessidade constante dentro de um laboratório de fitoquímica, ainda mais quando o objetivo é investigar um conjunto de plantas que apresentem características morfológicas e etnofarmacológicas semelhantes. Esse tipo de aplicação quando bem executado pode agilizar os processos de caracterização e minimizar as extenuantes etapas de fracionamento, isolamento, e elucidação de metabólitos secundários presentes nos indivíduos que aparentemente possuem a mesma composição química.

Tradicionalmente, o estudo de produtos naturais de origem vegetal é feito com a utilização de métodos de isolamento e purificação de substâncias orgânicas, associado com as principais técnicas espectrométricas e espectroscópicas de identificação, tais como a espectrometria de massas (MS), a ressonância magnética nuclear (NMR), Ultravioleta (UV) e o infravermelho (IR) (ROBARDS, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003). No entanto, todas as etapas envolvidas nos processos de obtenção das substâncias isoladas são muito demoradas e a associação de técnicas empregadas na fase de caracterização torna a identificação dessas substâncias uma etapa bastante dispendiosa e na maioria das vezes não permite predizer concomitantemente a identidade da substância analisada e sua concentração.

Uma das situações com o qual nosso grupo tem se deparado é o estudo de extratos vegetais polares contendo grandes quantidades de taninos, catequinas, derivados de ácidos fenólicos, flavonóides e seus respectivos glucosídeos (ANDRADE, 2002; DOYAMA *et al.*, 2005; ANDREO *et al.*, 2006). Em muitos casos, a presença de significativas quantidades de compostos poliméricos, como por exemplo, taninos condensados com alto grau de polimerização, inviabiliza a separação preparativa dos componentes do extrato, seja por meio de cromatografia de

adsorção (sílica gel, alumina, celulose, poliamida, etc.), seja por cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20 e similares), ou ainda por cromatografia em contracorrente (DCCC, HSCCC) (OKUDA *et al.*, 1989; MUELLER-HARVEY, 2001).

Atualmente em nosso grupo, tem-se verificado que, após extenuantes tentativas de obter os metabólitos secundários, os resultados têm se traduzido no isolamento de substâncias bastante conhecidas, como alguns flavonóides glucosilados simples contendo uma ou duas unidades de açúcares, alguns terpenos, ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (cafeico, ferúlico, etc.) e principalmente catequinas (SANNOMIYA *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2005; SANNOMIYA; FONSECA *et al.*, 2005; SANNOMIYA; MICHELIN *et al.*, 2005; SANNOMIYA; MONTORO *et al.*, 2005; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2006; RINALDO *et al.*, 2006).

Embora nosso objetivo não seja apenas o de obter substâncias novas, mas sim o de investigar a composição química de extratos, reconhecidamente ativos (conforme exposto no projeto Biota), o consumo de tempo e os custos têm sido consideravelmente altos quando se deseja conhecer a constituição química de forma mais rápida e eficiente. Ainda como desvantagens, após o fracionamento dos extratos por cromatografia de permeação em gel (que até o momento tem se mostrado a metodologia mais viável), é necessário realizar o tratamento do material adsorvente a fim de poder reutilizá-lo; além disso, as quantidades de material puro obtidas nestes casos têm sido muito pouco recompensadoras uma vez que, quando são estudadas várias espécies pertencentes a um mesmo gênero, ocorre na maioria das vezes, o isolamento de substâncias conhecidas.

Exemplos deste tipo de situação são os estudos das espécies do gênero *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). Embora os ensaios biológicos de atividade antiulcerogênica tenham sido extremamente promissores, o reconhecimento da composição química dessas espécies apenas pôde ser realizado parcialmente (ANDRADE, 2002).

Outro problema que tem sido recorrente é a necessidade da quantificação dos metabólitos secundários detectados/isolados. Para que se possa estabelecer uma possível relação entre a composição química e a atividade biológica observada, apenas o conhecimento qualitativo do perfil químico não é suficiente. Nem sempre o metabólito secundário isolado é aquele responsável pela atividade biológica ou nem sempre é isolado o metabólito secundário presente em maior quantidade, mas sim aquele cuja técnica aplicada permitiu seu isolamento e ainda, nem sempre a

substância majoritária é a responsável pela atividade biológica observada. Note-se que neste momento não estamos correlacionando quantidades de metabólitos com atividade biológica, mas sim discutindo possibilidades reais no estudo de espécies vegetais.

Adicionalmente, revistas conceituadas têm exigido não apenas o estabelecimento de um perfil qualitativo, mas também a relação quantitativa dos metabólitos secundários encontrados em extratos ativos. De forma similar, a atual legislação brasileira exige que, para o registro de um fitoterápico se faça a padronização dos extratos, procedendo simultaneamente com as análises quali e quantitativa do material vegetal e que seja especificado o teor de uma substância ou de um grupo de substâncias denominadas de marcadores (Anvisa, RDC nº48, 2004).

Recentemente, critérios ainda mais rígidos foram estabelecidos pela Anvisa, e estes preconizam a adequação de testes referentes ao controle de qualidade, estando todo o processo de acordo com as normas de Boas Práticas de Laboratório e Boas Práticas de Fabricação e Controle, as quais são muito próximas à NBR 17025 do Inmetro, que recomenda a harmonização de normas e procedimentos. Essa uniformidade surge como um critério importantíssimo, uma vez que ela reforça a necessidade de verificar a autenticidade da amostra, evitando colocar em risco a saúde da população brasileira com medicamentos fitoterápicos de origem duvidosa e cuja dose pode estar longe de ser a terapêutica, mas próxima à dose tóxica!

Dessa forma, fica evidente que a investigação química de uma espécie vegetal baseada apenas no isolamento e caracterização estrutural de seus componentes não é mais suficiente e adequada às atuais condições exigidas pela Ciência e que resultem em produtos manufaturados viáveis.

Uma forma de tentar solucionar e/ou minimizar os problemas anteriormente mencionados é empregar o uso de técnicas cromatográficas hifenadas tais como, HPLC-PAD e a espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Estas por sua vez, permitem uma rápida tipificação da composição da matriz vegetal estudada através dos tempos de retenção e/ou propriedades espectroscópicas/espectrométricas, todas associados às características intrínsecas de cada substância, como polaridade, massa molecular, entre outros (SNYDER *et al.*, 1997, ARDREY, 2003).

Na maioria das vezes, a resposta obtida pelo detector permite a identificação inequívoca dos metabólitos secundários presentes na matriz (ARDREY, 2003), e posteriormente pode ser realizada a quantificação com o uso de técnicas de

calibração variadas, como por exemplo, adição de padrão, padrão externo e/ou padrão interno (ROBARDS, 2003).

Uma forma de minimizar os custos relacionados aos processos de investigação clássicos e maximizar os resultados da análise compreende a utilização, em uma etapa prévia, da extração em fase sólida (SPE), seguida de análise cromatográfica. Isso permite a caracterização química de uma matriz complexa com a eliminação de possíveis interferentes durante o processo de avaliação cromatográfica (CANNELL, 1998; LANÇAS, 2004). Nesse caso, ocorre a retenção seletiva dos componentes de interesse presentes numa matriz complexa pelo suporte usado, ou o contrário. Os interferentes menos retidos são eluídos com um solvente de baixa força de eluição e os analitos removidos com um solvente forte ($k' \sim 0$), isso possibilita o uso de pequenos volumes do solvente extrator, resultando no aumento da sensibilidade do método empregado, pois o nível de diluição passa a ser muito pequeno (CASS & DEGANI, 2001).

A literatura demonstra que este tipo de abordagem muitas vezes é rápido e vantajoso sobre os processos da fitoquímica tradicional. KATALINIĆ (1997), por exemplo, promoveu a identificação por SPE-HPLC do perfil cromatográfico dos principais flavonóides presentes nos extratos das sementes, talo e do caule de *Vitis vinifera* L (Ampelidaceae), onde a (+)-catequina e a (-)-epicatequina foram empregadas na etapa de quantificação. HUHMAN & SUMNER (2002) desenvolveram um método de caracterização química de saponinas encontradas em *Medicago sativa* e *Medicago truncatula* (Fabaceae) usando HPLC/UV/PAD e HPLC/ESI/MS/MS. REZNICEK e colaboradores (1996) reportaram um método baseado em HPLC, que permitiu a quantificação das principais saponinas presentes em *Solidago gigantea* AIT (Asteraceae). CROZIER e colaboradores (1997) investigaram as espécies *Allium cepa* L. e *Apium graveolens* L. (Apiaceae), identificando e quantificando uma série de flavonóides livres e conjugados. HUCK e colaboradores (2002) propuseram a avaliação de uma nova fase-reversa hidrofílica em análises rápidas para a determinação de inúmeros flavonóides encontrados nos mais diversos extratos de plantas, usando as técnicas de HPLC/UV/PAD e HPLC/ESI/MS/MS.

Nosso grupo possui alguma experiência nesse tipo de abordagem. CARDOSO e colaboradores (1997) identificaram os constituintes alifáticos e uma série de alcalóides indólicos de estruturas complexas de *Tabernaemontana hilariana*

(Apocynaceae). Posteriormente, extrapolaram esta aplicação para a determinação de triterpenóides e esteróides usando extração em fase sólida seguida por análises por GC-FID e GC-MS (CARDOSO *et al.*, 1998). A mesma autora identificou uma série de cumarinas de diversas espécies de *Dorstenia* (Moraceae) usando GC-FID, GC-MS (CARDOSO *et al.*, 1999) e HPLC (CARDOSO *et al.*, 2002). Este tipo de abordagem permitiu também avaliar quantitativamente diversos fitoterápicos encontrados no comércio local, tanto na forma de cápsulas quanto na forma de cremes e pomadas (CARDOSO *et al.*, 2000). Outro exemplo é a identificação de flavonóides glucosilados de *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) (VILEGAS *et al.*, 1999; VILEGAS *et al.*, 2000) e de *Sorocea bomplandii* (Moraceae) usando HPLC-NMR e HPLC-MS-MS (ANDRADE *et al.*, 2002). Ainda, o uso de HPLC-NMR como ferramenta para identificação rápida de flavonóides glucosilados permitiu formular considerações sobre a taxonomia de plantas da família Eriocaulaceae (SANTOS, 2001).

Extração em fase sólida e extração líquido-líquido

A maioria das análises que envolvem amostras complexas requer várias etapas de manipulação antes de se chegar à identificação e/ou a medida da concentração de um ou mais analitos de interesse (SKOOG *et al.*, 1996). Dentre as várias etapas envolvidas na análise de amostras complexas, principalmente aquelas de fontes vegetais, as que mais se destacam são: extração (TREUTTER, 1988; CHEN *et al.*, 2001), *clean-up* (SUÁREZ *et al.*, 1996; SCHÜTZ *et al.*, 2004), pré-concentração, ajuste de concentração/volume entre outras (SUN *et al.*, 1998; ROBARDS, 2003).

As etapas de *clean-up* e ajustes de concentração geralmente são as que mais consomem tempo e são as que mais podem causar erros críticos quando não bem elaboradas e executadas.

Uma etapa de *clean-up* é fundamental para eliminar compostos indesejáveis e que fazem parte da constituição da matriz, principalmente aqueles presentes em extratos vegetais e matrizes biológicas, como por exemplo clorofila e proteínas, as quais podem interferir drasticamente no método analítico a ser executado. Além do mais, a etapa de *clean-up* pode estar intimamente ligada à longevidade de parte da instrumentação usada, principalmente quando o objetivo é trabalhar em HPLC

usando fase reversa (RP) na avaliação de matrizes que apresentam grande quantidade de material lipofílico (WELLUM & KIRBY, 1981).

Até bem pouco tempo atrás, a técnica analítica mais empregada no preparo e eliminação de interferentes da amostra era a extração líquido-líquido (LLE), a qual se baseia em solubilidade seletiva por parte dos analitos encontrados numa determinada matriz. No entanto, este procedimento é lento, dispendioso, exige grandes volumes de solventes orgânicos e praticamente inviabiliza um possível processo de automação (LANÇAS, 2004).

A técnica denominada extração em fase sólida (SPE) tem se consolidado nessas últimas décadas e vem sendo introduzida com a finalidade de eliminar grande parte dos problemas encontrados na LLE (LANÇAS, 2004).

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. A SPE, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (fase estacionária) (CASS & DEGANI, 2001).

Atualmente, a SPE utiliza como fase estacionária todos os suportes que tradicionalmente são usados em cromatografia líquida de coluna, como: sílica gel, alumina, Florisil, carvão ativo, XAD e fases baseadas em sílica quimicamente modificada (RP2, RP8, RP18, etc.). Consequentemente, os mecanismos de separação em SPE são os mesmos da cromatografia líquida (adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho) (SNYDER *et al.*, 1997; LANÇAS, 2004).

No entanto, apesar deste grande número de materiais que podem ser usados como fase estacionária em SPE, os mais utilizados são as fases baseadas em sílica quimicamente ligada, principalmente RP18, muito provavelmente devido à versatilidade que a sílica oferece, seja pela regularidade e tamanho de suas partículas (NEUE *et al.*, 1999) ou pela gama de reações de funcionalização que ela permite (SILVA *et al.*, 2003). Estas vantagens se refletem nas inúmeras aplicações e desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas na utilização da SPE RP18 como uma etapa preliminar para o tratamento de amostras (KATALINIĆ, 1997; POZZEBON *et al.*, 2003). Por esses motivos ela foi efetivamente utilizada no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que reduz o número de etapas de manipulação da amostra facilitando a análise dos compostos orgânicos presentes em vegetais (NAMIESNIK & GÓRECKI, 2000).

Padronização de extratos vegetais

A padronização dos extratos obtidos tem sido outro ponto importante, sendo observada a relação entre material vegetal e o extrato obtido, ou seja, quanto em peso foi inicialmente utilizado da planta seca para fornecer uma determinada massa de extrato seco. Normalmente, uma planta seca após extração e filtração fornece um extrato líquido que, se levado a resíduo por evaporação, fornece uma quantidade de material sólido (sem adição de excipientes) na proporção de cerca de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5-50% segundo a solubilidade dos seus metabólitos (GREGÓRIO *et al.*, 2006).

No caso dos 30%, a relação material vegetal-extrato é de 3:1, representando que foram necessários 3 quilos da planta seca para fornecer 1 quilo de extrato seco; para a planta que fornece 50% de resíduo, a proporção é de 2:1 e no caso da planta com 5% a proporção é dez vezes maior, portanto de 20:1 (GREGÓRIO *et al.*, 2006).

Outra forma de padronização envolve o doseamento das substâncias químicas relacionadas aos efeitos terapêuticos. Na maioria das vezes, este doseamento é feito para uma ou mais substâncias que ocorrem na espécie vegetal de maneira mais expressiva em quantidade ou em potência farmacológica. Nos casos em que é exigida a determinação dos teores dessas substâncias, a cromatografia líquida de alta eficiência mostra-se como uma das principais técnicas de análise química, a qual é amplamente empregada em laboratórios de controle de qualidade da indústria farmacêutica ou em laboratórios de fiscalização sanitária (GREGÓRIO *et al.*, 2006).

Desta forma, neste trabalho a técnica de HPLC-PAD foi efetivamente utilizada na tentativa de se estabelecer os teores dos principais metabólitos secundários em fitopreparações a base de infusos e em outras espécies de extratos vegetais.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a composição química de espécies vegetais pertencentes ao bioma Cerrado;
- ✓ Desenvolver metodologias que permitam reconhecer, de forma rápida e eficiente, a composição química de extratos vegetais;
- ✓ Traçar o perfil cromatográfico das espécies estudadas com a utilização de técnicas hifenadas (HPLC-PAD e FIA-ESI-IT-MS/MS);
- ✓ Efetuar a quantificação dos principais metabólitos secundários presentes em fitopreparações (infuso e/ou extratos).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho foi baseado na investigação de uma série de plantas de várias famílias e gêneros, todas incluídas no projeto temático: “USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS SUPERIORES”, incluído no Programa - BIOTA/FAPESP. Desta forma, o trabalho foi organizado em capítulos, os quais correspondem aos estudos das espécies vegetais investigadas, incluindo em cada capítulo introdução, desenvolvimento e discussão.

Espécies dos gêneros *Davilla* (Dilleniaceae), *Byrsonima* (Malpighiaceae) e *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) foram selecionadas com base: 1) na dificuldade em se realizar o estudo fitoquímico da forma tradicional, 2) pelos resultados positivos frente às atividades biológicas ensaiadas e 3) para comparar diferentes espécies de um mesmo gênero.

EXPERIMENTAL

Instrumentos

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco®), bem como em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico/preparativo, gradiente binário) acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 190-800 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo *ProStar* 210/330 (Varian®).

Os softwares *Star Chromatography Workstation* versão 5.31 (Varian®) e *EZChrom Elite Client/Server* versão 3.1.7 (Chromatec®) foram utilizados durante a aquisição e processamentos dos dados cromatográficos.

No modo analítico foram usadas colunas de fase reversa RP18 imobilizadas com octadecilsilano, modelos Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm i.d., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm; Synergi Hydro (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm i.d.; 4 µm, ambas com coluna de guarda (Phenomenex®) de 4 x 3 mm i.d. No modo preparativo foi usada uma coluna de fase reversa RP18, modelo Dynamax (Varian®) de 250 x 41,4 mm i.d.; 8 µm. No modo semi-preparativo foi usada uma coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 10 mm i.d.; 10 µm. Amostras e padrões foram injetados através de um injetor Rheodyne® 7125 com um *loop* de 20 µL (modo analítico), 100 µL (modo semi-preparativo) e 1 mL (modo preparativo).

Os espectros de massas das infusões foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ Deca (ESI-IT-MSⁿ, Thermo Finnigan®), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³, MSⁿ) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). As análises por FIA-ESI-IT-MSⁿ foram realizadas junto aos grupos do Prof. Cosimo Pizza/Sonia Piacente da Università degli Studi di Salerno e da Prof^a Virginia Carbone do Istituto di Scienze dell Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare - Itália.

O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V,

voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N_2) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50 - 2000 , com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS^n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento.

O software *Xcalibur* versão 1.3 (Thermo Finigan®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

O sistema MPLC BÄECKSTROM Separo AB, equipado com uma bomba peristáltica FMI-50 modelo QSY e com uma coluna de vidro BÄECKSTROM de $1,0$ cm i.d. e com comprimento regulável, foi usado em experimentos de separação cromatográfica.

As balanças analíticas Bioprecisa® FA2104N (capacidade 200 g e precisão de $0,1$ mg) e Libror AEG-45SM (capacidade para 45 g e precisão de $0,01$ mg, Shimadzu®) foram usadas na pesagem dos extratos, substâncias de referência e dos padrões comerciais utilizados para preparação das soluções estoque.

As soluções padrão de calibração foram preparadas a partir de alíquotas retiradas das soluções estoque por meio de micropipetas de alta precisão (Gilson Pipette®), modelos P20, P200 e P1000. A faixa de transferência de volumes estava contida no intervalo de amostragem de $2,0$ a $1000,0$ μ L.

Materiais, Reagentes e Soluções

Balões volumétricos, micropipetas, *vials* com tampa de *teflon*® e demais vidrarias usadas no preparo dos extratos e padrões foram imersos por 24 h em solução de Extran (Merck®) 3% v/v, para remoção de contaminantes. O material foi enxaguado em água Milli-Q (Millipore®) e seco a temperatura ambiente.

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase normal (SiO_2) 360 mg (55 μ m, Classic, Waters®) e fase reversa a base de octadecilsilano (RP18) com 500 mg 6 mL⁻¹ (33 μ m, Supelco®), 500 mg 6 mL⁻¹ (55 μ m, Strata-X, Phenomenex®) e 10 g 60 mL⁻¹ (55 μ m, Strata-E, Phenomenex®) foram usados nas etapas de *clean-up* dos extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*®, Millipore®) com poro de $0,45$ ou $0,20$ μ m.

Miricetina (96%), apigenina (95%), luteolina (98%), kaempferol (96%), quercetina (95%), rutina (95%), quercetina-3-O- β -glicopiranosídeo (90%), quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (97%), (+)-catequina (98%), (-)-*epicatequina* (98%), (-)-*epigallocatequina* (98%), galato de (-)-*epicatequina* (98%), galato de (-)-*epigallocatequina* (98%), galato de (-)-galocatequina (98%), ácido clorogênico (95%), ácido trifluoracético (99,5%) (Sigma Aldrich[®]), ácido gálico (98%) (Merck[®]), quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (95%), miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (97%) (Extrasynthese[®]) foram usados como padrões de identificação e nas subseqüentes etapas de quantificação. Demais metabólitos não disponíveis comercialmente foram isolados, purificados, caracterizados por ¹H-NMR, ¹³C-NMR e fazem parte de um banco de padrões pertencente ao Laboratório de Fitoquímica do Prof. Wagner Vilegas, o qual é composto por: miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (98%), quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo (98%), miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (95%), miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- β -galactopiranosídeo, (97%), (6*S*,7*E*)-6,9-diidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona, (98%), miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (97%), miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (90%), amentoflavona (98%), quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -arabinopiranosídeo (95%), quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- β -galactopiranosídeo (90%), quercetina-3-O- α -rhamnopiranosil-(1→6)-O- β -galactopiranosídeo, quercetina-3-O- α -rhamnopiranosil-(1→3)-O-[α -rhamnopiranosil-(1→6)]-O- β -alopiranosídeo, rhamnetina (98%), quercetagina-7-O- β -glicopiranosídeo (95%). Todos os padrões e amostras foram armazenados em *via*/s de 2 mL e mantidos em freezer a -18°C.

Os experimentos de ¹H-NMR e ¹³C-NMR, obtidos em metanol tretradeuterado (CD₃OD, Sigma Aldrich[®]) ou em dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆, Sigma Aldrich[®]), foram realizados em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 11,7 T (Varian[®] Inova), operando em 500 MHz para ¹H-NMR e 125 MHz para ¹³C-NMR. Os deslocamentos químicos são dados em δ (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Clorofórmio e diclorometano (Burdick & Jackson[®]), acetonitrila e metanol (Baker[®]), todos de grau HPLC, foram usados na preparação das amostras, padrões, nas eluições em SPE e como fase móvel em HPLC. Os demais solventes citados no trabalho são de grau analítico (PA).

Nas triagens das frações foram usadas colunas de camada delgada de silicagel em suporte de alumínio ou vidro (Merck®, Aldrich®), sendo usados como reveladores: Anisaldeído/H₂SO₄, NP/PEG, I₂.

Material Vegetal

Davilla nitida Vahl, *D. elliptica* A. St. -Hill e *Hancornia speciosa* Gomez foram coletadas pela prof^a. Clélia A. Hiruma-Lima em Palmas-TO. A identificação foi realizada pela prof^a. Solange de Fátima Lólis. Exsicatas foram depositadas no Herbário da Fundação Universidade do Tocantins com os seguintes números de voucher: *D. elliptica* St. Hill (Dilleniaceae) TO4593, *D. nitida* Vahl. (Dilleniaceae) TO3849, *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae) - TO4064.

Folhas de *Byrsonima crassa* Niedenzu e *B. fagifolia* Niedenzu (Malpighiaceae), foram coletadas na estrada do Brejinho de Nazaré, município de Porto Nacional-TO pela prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma-Lima (IBB-UNESP-Botucatu). A identificação foi feita pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos e catalogadas com o número de exsicata 6398 e 3377, respectivamente, sendo que os exemplares se encontram depositados no herbário da Universidade do Tocantins.

As folhas de *B. intermedia* A. Juss. e *B. basiloba* DC. foram coletadas por Luís Fernando R. de Almeida (IBB-UNESP-Botucatu) no município de Pratânia-SP e identificadas por José Clemente Campos (IBB-UNESP-Botucatu). As exsicatas de número 24164 e 24163 encontram-se depositadas no herbário da UNESP-Botucatu. As folhas de *B. coccolobifolia* Kunth foram coletadas no município de Itirapina-SP, na localidade de Cerrado de Graúna. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro (IB-UNICAMP). Uma exsicata com frutos imaturos foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob número 1397.

Depois de coletadas, as plantas foram secadas em estufa a 50°C, moídas em moinhos de facas, sendo posteriormente pesadas, embaladas, etiquetadas e armazenadas em local seco.

Extrações

Infusões foram utilizadas na preparação de extratos aquosos de folhas e cascas das espécies vegetais. Os infusos foram preparados na proporção de 10% (m/v), sendo adicionado ao material vegetal moído água a 80°C (DALLUGE *et al.*, 1998). O recipiente foi mantido fechado e deixado em repouso por 10 min.

Posteriormente, a solução do infuso foi filtrada em filtro de papel. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de PTFE (Millex[®]) de 0,45 µm e analisado por HPLC ou ainda concentrado em liofilizador ou em fluxo de nitrogênio para posterior armazenamento na forma sólida.

Extratos obtidos a partir de solventes orgânicos. Estes foram preparados por maceração, sendo o processo acelerado por meio de ultra-som. Quantidades conhecidas das folhas secas e pulverizadas das espécies vegetais foram primeiramente extraídas com 25 mL CHCl₃ em quatro etapas, a cada extração o extrato líquido foi separado e acondicionado em um frasco, ao final da quarta extração o material vegetal foi seco e submetido às mesmas etapas de extração em MeOH.

Procedimentos Cromatográficos Gerais

Na etapa de *clean-up* dos extratos ou infusões, uma pequena massa (1 mg da amostra para cada 10 mg da fase de RP18 ou SiO₂) foi aplicada nos cartuchos SPE. Em RP18, o cartucho foi previamente ativado com MeOH (4 mL) e depois ambientado com H₂O (5 mL). O material a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em aproximadamente 0,5 mL de MeOH com auxílio de ultra-som, sendo posteriormente adicionados 2 mL de H₂O ou da própria solução usada na dessorção dos analitos. A eluição nos suportes de RP18 obedeceu à seguinte ordem geral (MeOH/H₂O 2:8 v/v, MeOH/H₂O 1:1 v/v e MeOH), porém, ajustes foram realizados durante as otimizações. Em SiO₂, o cartucho foi ambientado com CHCl₃ (4 mL). A amostra foi dissolvida em 0,5 mL de MeOH com auxílio de ultra-som e adição de 1 mL de CHCl₃. A eluição foi realizada na ordem (CHCl₃:MeOH 2:1 v/v, MeOH e MeOH/H₂O 1:1 v/v). Em ambas as extrações, alíquotas de 5 mL foram coletadas para cada composição do eluente empregado na dessorção dos analitos (LANÇAS, 2004).

Capítulo 1:

***Hancornia speciosa* Gomez (Apocynaceae)**

Popularmente conhecida como mangabeira, mangaba e mangava, *H. speciosa* é uma planta originária do Brasil. Apresenta ampla dispersão geográfica, ocorrendo em diversos ecossistemas do país como Amazônico, Mata Atlântica e Cerrado. Ela se adapta às mais diferentes altitudes, com ocorrências desde o litoral Nordeste até áreas de Cerrado do Brasil Central com 1.500 m de altitude. Em especial, são nas áreas dos Tabuleiros Costeiros, Baixadas Litorâneas e áreas de Cerrado onde as populações locais fazem seu maior aproveitamento alimentar. Sua exploração é exclusivamente extrativista, não havendo registro da existência de áreas sob cultivo homogêneo.

A mangabeira é uma árvore de grande porte, podendo atingir até 15 m de altura. Possui um tronco tortuoso com ramos lisos e avermelhados. A casca apresenta um látex branco. As folhas são opostas, simples, pecioladas; limbo com cerca de 5-6 x 2 cm, elíptico ou oblongo; ápice abruptamente acuminado ou obtuso; base obtusa ou arredondada; nervura mediana impressa na face ventral e elevada na face dorsal e as flores são brancas e perfumadas (Figura 1.1, LORENZI, 1998).



Figura 1.1. Hábito, folhas e inflorescências de *Hancornia speciosa*. Fonte: (LORENZI, 1998).

O fruto apresenta casca amarelada com manchas ou estrias avermelhadas (Figura 1.2). Possui grande valor nutritivo, a polpa é macia e doce e apresenta mais vitamina C do que o limão. É geralmente consumida como fruta, ou em forma de

sorvetes, doces e geléias, mas o fruto verde é indigesto e purgativo, podendo ser tóxico (POTT & POTT, 1994). Da casca extraí-se um látex que é matéria-prima para produção de uma borracha de qualidade inferior ao da seringueira (LORENZI, 1998). No entanto, existem estudos que empregaram o uso da reação de copolimerização entre o estireno-butadieno com o látex de *H. speciosa* para a produção industrial de uma borracha sintética (FIRESTONE, 1948).

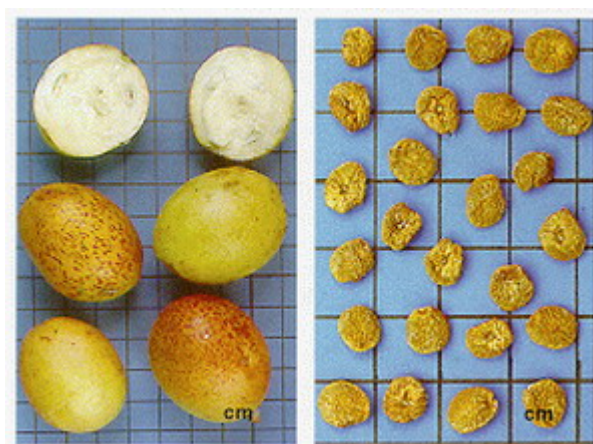


Figura 1.2. Frutos e sementes de *H. speciosa*. Fonte: (LORENZI, 1998).

Na medicina popular, *H. speciosa* é usada de várias formas: como decocto da raiz, junto com o “quiabinho” (*Manihot tripartita*), para tratar a hipertensão (ALMEIDA *et al.* 1998); como infusão das folhas para cólica menstrual e contra gripe; a casca é indicada para doenças internas (por exemplo, tuberculose, úlceras, doenças do fígado e baço) e o látex para abscessos internos. Outros usos medicinais são descritos contra câimbras, doenças do fígado, diabetes e como agente emagrecedor (POTT & POTT, 1994) e em um estudo preliminar, ANDRADE (2002) verificou a atividade gastroprotetora do extrato etanólico das cascas de *H. speciosa*.

Quanto à avaliação da composição química de *H. speciosa*, SAMPAIO *et al.*, (2006) evidenciaram a presença de inúmeros compostos voláteis nos frutos desta espécie, os quais foram identificados com a utilização da técnica de GC-FID e GC-MS. O estudo químico realizado com o extrato etanólico das folhas resultou no isolamento do inositol L-(+)-bornesitol (ENDRINGER *et al.*, 2007) e na identificação do flavonol rutina realizada por HPLC (FERREIRA *et al.*, 2007). No entanto, até o presente momento, nenhum outro trabalho encontrado na literatura reporta um estudo aprofundado sobre a composição química das cascas de *H. speciosa*.

Parte experimental / Resultados e discussões

Investigação dos extratos de *H. speciosa*

Estudos anteriores realizados por nosso grupo demonstraram promissora atividade antiulcerogênica de *H. speciosa*. Na análise inicial realizada por ANDRADE (2002), apenas o extrato etanólico das cascas foi investigado e devido ao elevado teor de substâncias polares, aquele autor empregou a técnica de cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) ao estudo, resultando na obtenção de frações impuras, onde foram identificados nas misturas o ácido clorogênico, catequinas e taninos condensados. A complexidade do extrato inviabilizou o estudo fitoquímico mais aprofundado deste material com a utilização das técnicas tradicionais de isolamento. Novas tentativas utilizando a cromatografia de permeação em gel (GPC) usando Sephadex LH-20 não se mostraram eficientes na separação dos metabólitos secundários de *H. speciosa*. Fatores como a forte adsorção dos taninos condensados, a possibilidade de degradação da fase estacionária ocasionada por esta classe de metabólitos (MUELLER-HARVEY, 2001) e a necessidade do uso de grandes quantidades de solventes para a eluição dos metabólitos com subseqüentes etapas para a regeneração do suporte foram motivos que nos direcionaram para o estabelecimento de uma nova estratégia de investigação.

Desta maneira, optou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia baseada em análises por HPLC-PAD na tentativa de realizar a identificação direta dos metabólitos secundários presentes nas matrizes estudadas empregando experimentos de co-injeção de padrões autênticos e/ou substâncias previamente isoladas e caracterizadas.

Inicialmente foi realizada a investigação dos extratos EtOH e MeOH das cascas de *H. speciosa*, em que 5 mg de cada extrato foi dissolvido em uma mistura de MeOH/H₂O (3:7, v/v), seguido da filtração em membrana de PTFE com poro de 0,45 µm, diluição para 2 mL e injeção de 20 µL em HPLC analítico. As análises cromatográficas foram feitas com a utilização de uma coluna de RP18 e a fase móvel utilizada era composta de uma mistura de ACN/H₂O. Durante a eluição dos componentes químicos presentes em cada extrato, o gradiente exploratório de 5-100% de ACN em 60 minutos com manutenção de 100% de ACN por mais 5 minutos foi empregado na obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos.

Avaliação dos perfis cromatográficos obtidos (Fig. 1.3A e 1.3B) mostrou claramente a complexidade desta matriz, a baixa resolução cromatográfica e a eluição característica de um pico bastante alargado em cada cromatograma foram outros indicativos da presença de taninos condensados em *H. speciosa* e tentativas de otimização cromatográfica não se mostraram promissoras.

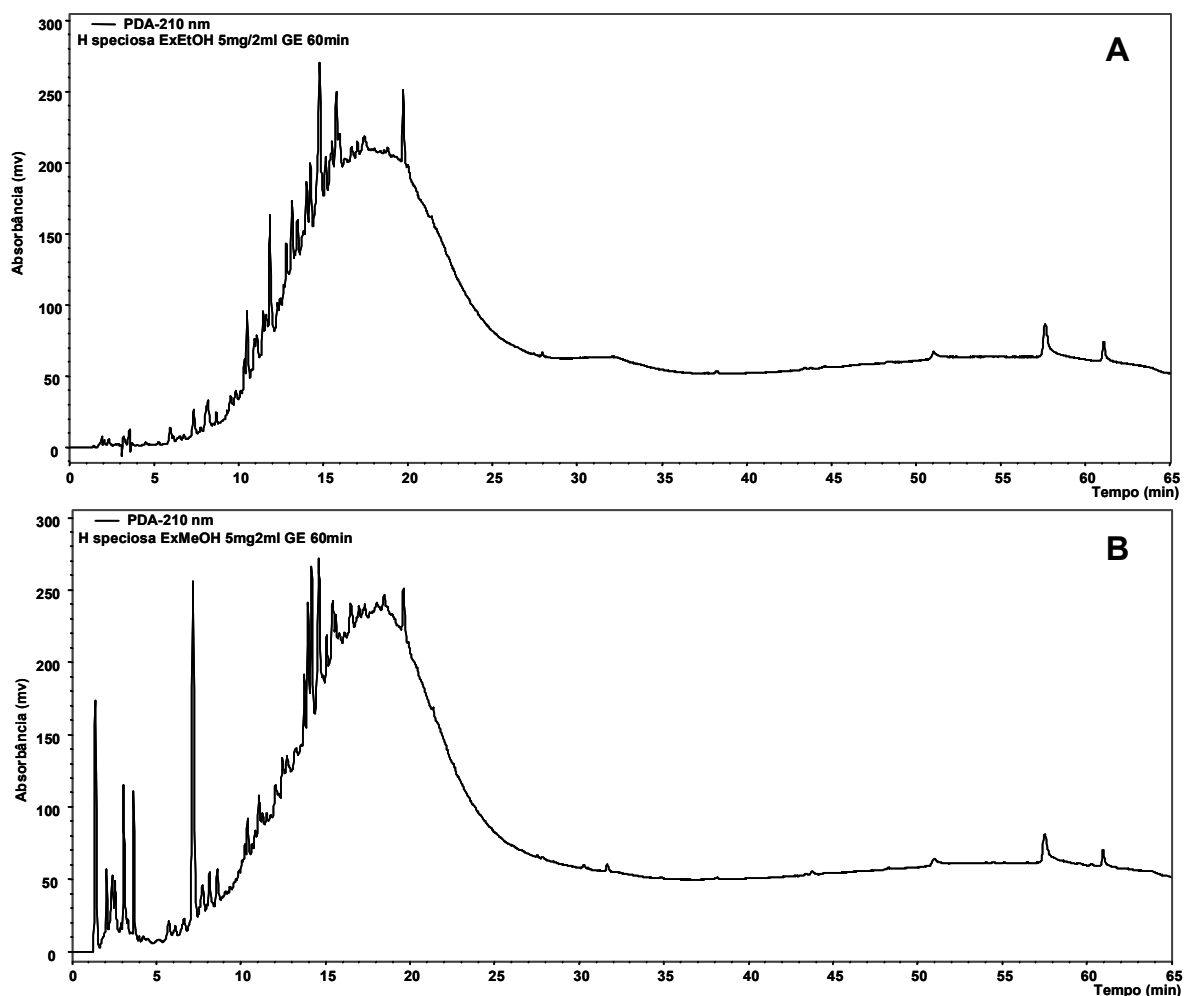


Figura 1.3. Perfis cromatográficos do extrato EtOH (A) e do extrato MeOH (B) das cascas de *H. speciosa* obtidos por HPLC-PAD. Sistema de eluição gradiente: 5-100% ACN em 60 min, coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm.

Uma vez constatada a presença de taninos condensados em *H. speciosa* (ANDRADE, 2002) e o conhecimento de que esta classe de metabólitos secundários apresenta labilidade frente à ação de luz e calor (SIMÕES *et al.*, 2003), outras metodologias de extração usando acetona/água 7:3 v/v (SANTOS *et al.*, 2002) e acetona/água 1:1 v/v (SIMÕES *et al.*, 2003) seguida da liofilização do material

extraído foram testadas na tentativa de se trabalhar com um extrato mais íntegro, mas os resultados continuaram não sendo promissores.

A falta de resolução e seletividade observadas foi ocasionada provavelmente não apenas ao elevado número de substâncias ou pela presença de taninos condensados, mas também pela presença de outros componentes poliméricos, uma vez que a planta é uma fonte natural de látex (LORENZI, 1998).

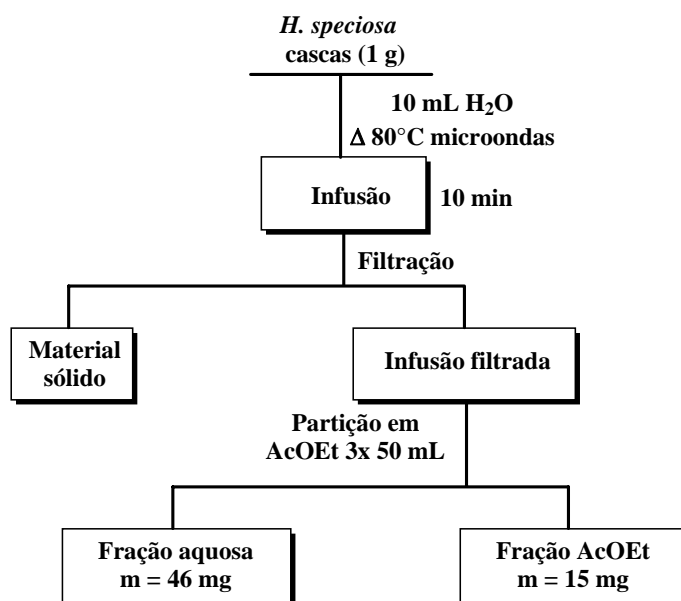
Nenhum dos estudos reportados na literatura descreve a natureza química do látex encontrado nesta espécie. Desta forma, uma etapa de caracterização da parte apolar de *H. speciosa* foi realizada com o extrato CHCl_3 .

O extrato originado por etapas de maceração foi obtido em uma quantidade razoável de rendimento ($\sim 3,4\%$) e apresentando um aspecto de “goma” com cor amarelada. Análises do extrato CHCl_3 por TLC usando vários sistemas eluentes evidenciaram apenas uma mancha, sugerindo assim a possível presença de uma única substância.

Realização de experimentos de ^1H -NMR e ^{13}C -NMR juntamente com comparação de dados da literatura (BRANDOLINI & HILLS, 2000) permitiram a identificação do polímero *cis*-poliisopreno e a triagem cromatográfica usando TLC evidenciou a presença deste nos extratos MeOH e EtOH.

Preparação dos extratos utilizados na avaliação do perfil cromatográfico

Confirmada a presença de material polimérico em *H. speciosa*, foi necessário minimizar sua extração e ao mesmo tempo possibilitar a identificação dos componentes polares. Assim, uma alternativa encontrada foi a utilização de infusões (DALLUGE *et al.*, 1998) feitas a partir das cascas de *H. speciosa* com remoção de taninos com elevado grau de polimerização empregando o procedimento adaptado de HAGERMAN & BUTLER (1980). Esta metodologia consistiu em proceder com uma extração líquido-líquido (LLE) entre a infusão e acetato de etila, seguida de extração em fase sólida (SPE) (ROBARDS, 2003) da porção acetato de etila previamente seca para a remoção dos interferentes poliméricos remanescentes. O Esquema 1.1 apresenta as etapas seguidas para a obtenção da fração de interesse da infusão analisada por HPLC.

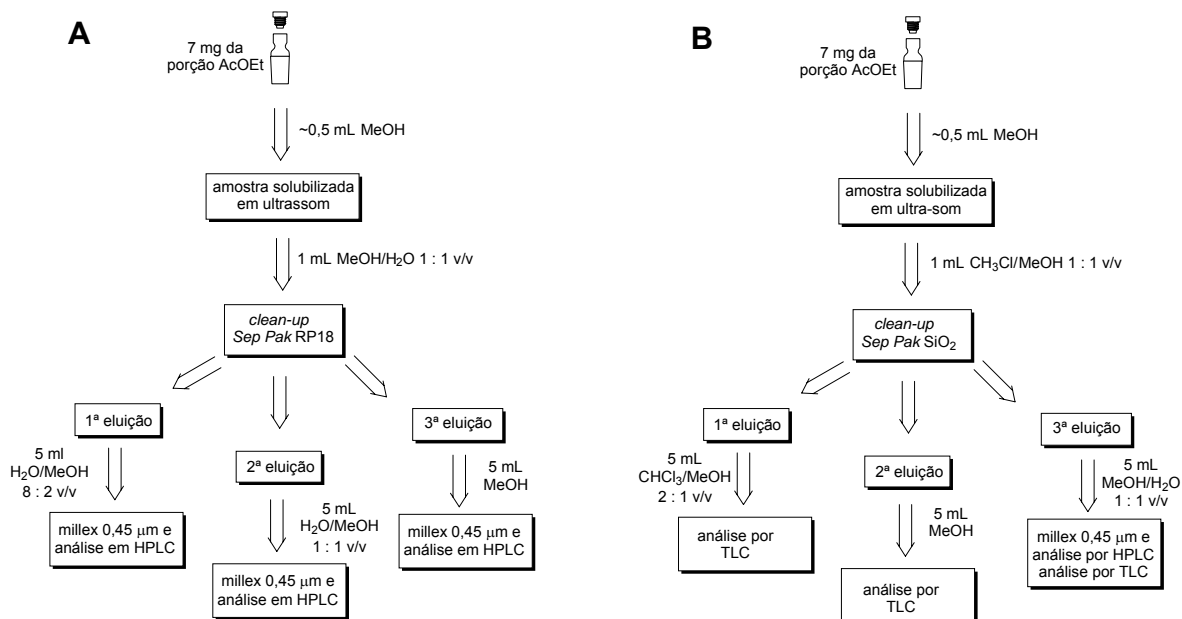


Esquema 1.1. Etapas envolvidas na obtenção da infusão das cascas de *H. speciosa*.

Análises por TLC em vários sistemas de solventes evidenciaram uma melhora substancial na resolução cromatográfica com a ocorrência de diversas substâncias na fração acetato de etila. A fração aquosa apresentou-se como um sólido vermelho e quebradiço, cuja análise por TLC indicou rastros e grande quantidade de material retido no ponto de aplicação. Uma vez que a fase acetato de etila mostrou-se mais promissora, maior ênfase foi dada ao seu estudo.

Na etapa envolvendo a SPE da porção acetato de etila da infusão de *H. speciosa*, inicialmente foram avaliados cartuchos SPE de dois suportes: *Sep pak* de fase reversa (RP18) e *Sep pak* de fase normal (SiO₂).

Nos procedimentos que envolveram a otimização das condições analíticas da SPE, uma série de eluentes foi investigada e misturas em proporções variadas de ACN/H₂O; MeOH/H₂O; CHCl₃/MeOH e CHCl₃/ACN foram usadas na eluição dos metabólitos adsorvidos nos suportes e os melhores resultados foram obtidos com a utilização dos eluentes representados no Esquema 1.2.



Esquema 1.2. Etapas de extração em fase sólida com cartuchos *Sep Pak* de fase normal e fase reversa.

Cartuchos de fase reversa ($500 \text{ mg } 6 \text{ mL}^{-1}$, Supelco[®]) foram pré-condicionados passando sequencialmente 15 mL de MeOH e 10 mL de H_2O e os cartuchos de fase normal (SiO_2 , 500 mg, *Sep Pak Classic*, Waters[®]) foram pré-condicionados passando 15 mL de CHCl_3 . Em seguida, a amostra (obedecendo o limite de carga estabelecido pelo fabricante do suporte ou 1 mg para cada 10 mg de fase estacionária) previamente solubilizada em um pequeno volume de solução ($\sim 1 \text{ mL MeOH/H}_2\text{O } 1:1 \text{ v/v}$ para RP18 e $\sim 1 \text{ mL CHCl}_3/\text{MeOH } 1:1 \text{ v/v}$ para SiO_2) foi aplicada nos cartuchos.

Cada eluato representado no Esquema 1.2 foi coletado como uma fração separada e monitorado por TLC em vários sistemas eluentes, sendo empregando nesta análise comparativa, catequinas e ácidos fenólicos como substâncias de referência.

Na eluição em fase normal, ao fim do *clean-up* o cartucho de SiO_2 permaneceu impregnado com grande quantidade do material aplicado. A fração aparentemente mais rica em *spots* foi a eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 2:1 \text{ v/v}$, mas que por sua vez evidenciou a presença de componentes apolares. Este eluato foi preterido para as análises por RP18-HPLC, uma vez que sua composição poderia comprometer a vida útil da coluna de fase reversa. Análise dos demais eluatos por TLC também mostrou a presença de rastros ao longo de toda a placa cromatográfica

e os resultados obtidos com os cartuchos *Sep Pak* de SiO₂ demonstraram baixa especificidade para os metabólitos de interesse.

No caso do *clean-up* usando cartuchos de RP18, a análise por TLC mostrou melhor resolução ao longo das eluições com a presença de manchas de R_fs semelhantes aos das substâncias de referência, sugerindo maior concentração na fração eluída com MeOH/H₂O 2:8 v/v. Outro fator importante foi a eliminação do material apolar, o qual permaneceu retido no cartucho e foi evidenciado por TLC após completa dessorção do mesmo com CHCl₃.

Assim, as três frações resultantes do *clean-up* com cartuchos de *Sep Pak* RP18 representadas no Esquema 1.2 foram posteriormente analisadas por HPLC.

Inicialmente houve tentativas de realizar a separação cromatográfica dos constituintes químicos encontrados nas cascas de *H. speciosa* com alguns dos sistemas de eluição para HPLC descritos na literatura, os quais envolvem a separação de catequinas presentes principalmente em folhas de chás verdes, como no trabalho de *Camellia sinensis*, em que GOTO e colaboradores (1996) empregaram um sistema gradiente de eluição com a fase móvel contendo a seguinte composição: (A) H₂O/ACN-85%/H₃PO₄ (95,45 : 4,5 : 0,05, v/v/v); (B) H₂O/ACN-85%/H₃PO₄ (49,95 : 50,0 : 0,05, v/v). Ou ainda misturas ternárias, como a sugerida no trabalho de PELILLO e co-autores (2001), em que a fase móvel era composta por: (A) H₂O/MeOH/ácido fórmico (74,7 : 25 : 0,3; v/v/v); (B) ACN/ácido fórmico (99,7/0,3; v/v).

No entanto, não houve êxito nas separações cromatográficas, mesmo tentando utilizar e reproduzir algumas fases móveis descritas na literatura. Essa dificuldade foi atribuída ao fato de que a composição química encontrada nas cascas de *H. speciosa* apresentava uma composição química muito distinta àquelas reportadas na literatura, em que na maioria dos trabalhos se observa a avaliação cromatográfica de catequinas monoméricas encontradas nas folhas de chás verdes ou chás pretos.

Desta maneira, o uso de sistemas eluentes mais simples baseados em misturas de MeOH/H₂O ou ACN/H₂O foram avaliados. Sistemas compostos de MeOH/H₂O além de serem mais viscosos, especialmente na região da proporção de MeOH/H₂O 1:1 v/v (SNYDER *et al.*, 1997), apresentaram menor seletividade e foram preteridos em etapas posteriores. Assim, o sistema eluente composto de ACN/H₂O foi otimizado (Tabela 1.1). Em todas as análises o fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹,

o volume injetado foi de 20 μL e a detecção monitorada na região do UV, principalmente em 210 e 280 nm.

Tabela 1.1. Gradiente de eluição cromatográfica empregado na eluição dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de *H. speciosa* após procedimentos de *clean-up*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H_2O	ACN	0	5
		50	20
		60	100
		70	100

O cromatograma da Figura 1.4 mostra o perfil de *H. speciosa* após o tratamento da amostra por LLE seguida da SPE em *Sep pak* RP18. Foi possível notar que houve a remoção de vários interferentes, uma vez que resolução de linha de base foi alcançada em toda a corrida cromatográfica e conseqüentemente a obtenção de picos bem resolvidos pelo sistema proposto.

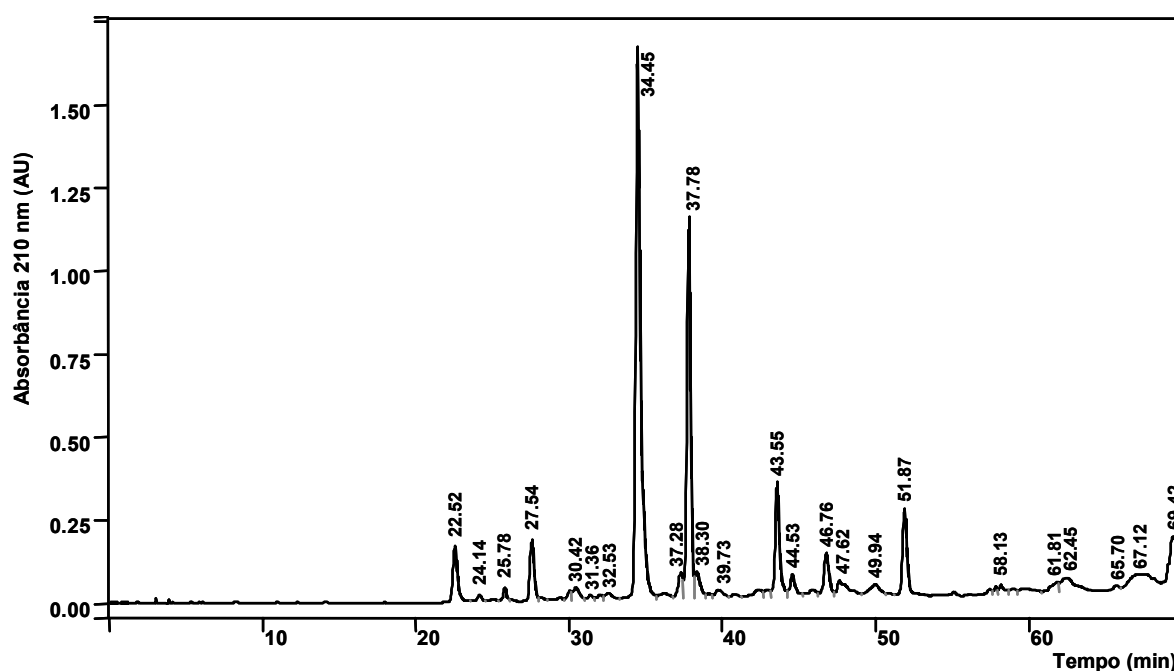


Figura 1.4. Perfil cromatográfico da fração MeOH/ H_2O 2:8 v/v proveniente do infuso das cascas de *H. speciosa*, submetida ao *clean-up* em LLE e SPE em *Sep Pak* RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).

Embora a análise por TLC tenha indicado a presença de substâncias nos três efluentes do *clean-up* em *Sep Pak* RP18, avaliação dos cromatogramas da Figura 1.5 para os três eluatos permitiu verificar que os constituintes químicos das cascas

de *H. speciosa* se encontravam quase que totalmente no eluato **A** (MeOH/H₂O 2:8 v/v). Processamento em diversos comprimentos de onda, usando o detector PAD, evidenciou um pico alargado de intensidade relevante com ápice em $t_r = 61,35$ min no eluato **B** (MeOH/H₂O 1:1 v/v), enquanto que no eluato **C** (MeOH) foram registrados apenas ruídos.

Desta forma, os resultados obtidos mostraram que a etapa de *clean-up* viabilizou a pré-concentração de alguns dos metabólitos secundários no primeiro eluato e eliminação do material polimérico presente no infuso de *H. speciosa*.

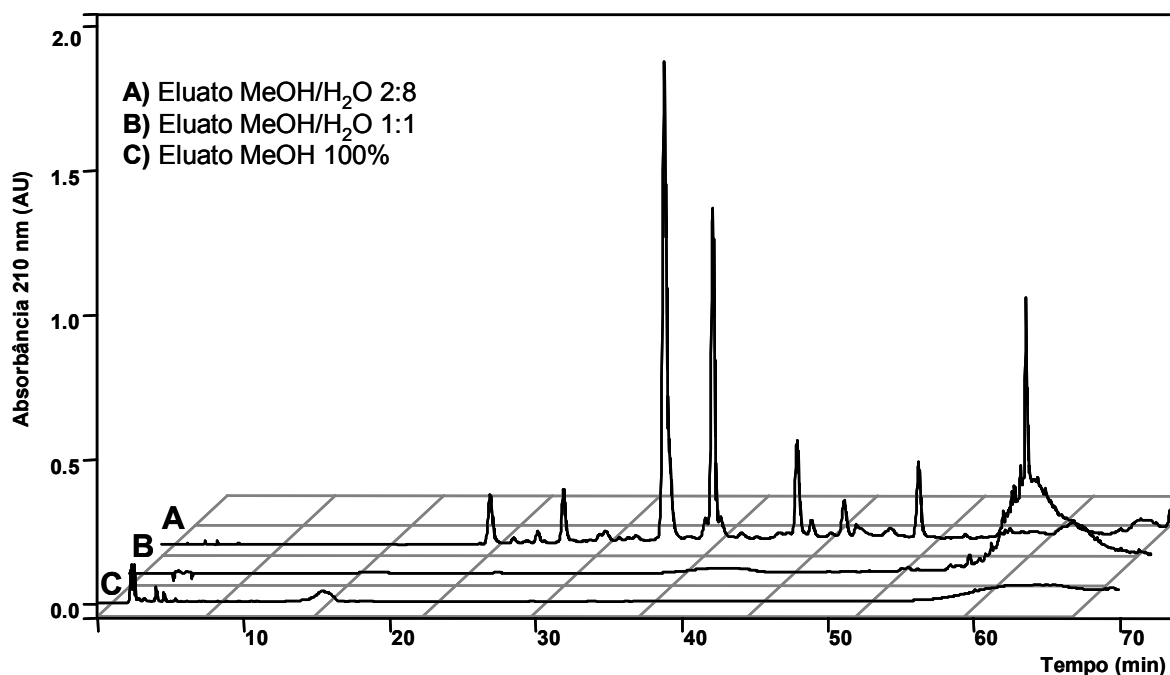


Figura 1.5. **A)** cromatograma do primeiro eluato da SPE (MeOH/H₂O 2:8 v/v). **B)** cromatograma do segundo eluato da SPE (MeOH/H₂O 1:1 v/v). **C)** cromatograma do terceiro eluato da SPE (MeOH 100%). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 210$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1 e para processo de SPE em RP18 veja Esquema 1.2A).

Uma vez realizada a otimização do sistema de eluição cromatográfico, a etapa seguinte consistiu na identificação dos constituintes presentes no eluato MeOH/H₂O 2:8 v/v do infuso das cascas de *H. speciosa*.

Identificação dos metabólitos secundários

Sob a condição de eluição descrita na Tabela 1.1, os principais picos eluídos nos cromatogramas da Figura 1.6 foram identificados pela comparação dos seus espectros de UV ou pela comparação dos seus tempos de retenção com o de padrões comerciais e/ou substâncias isoladas de outras espécies vegetais.

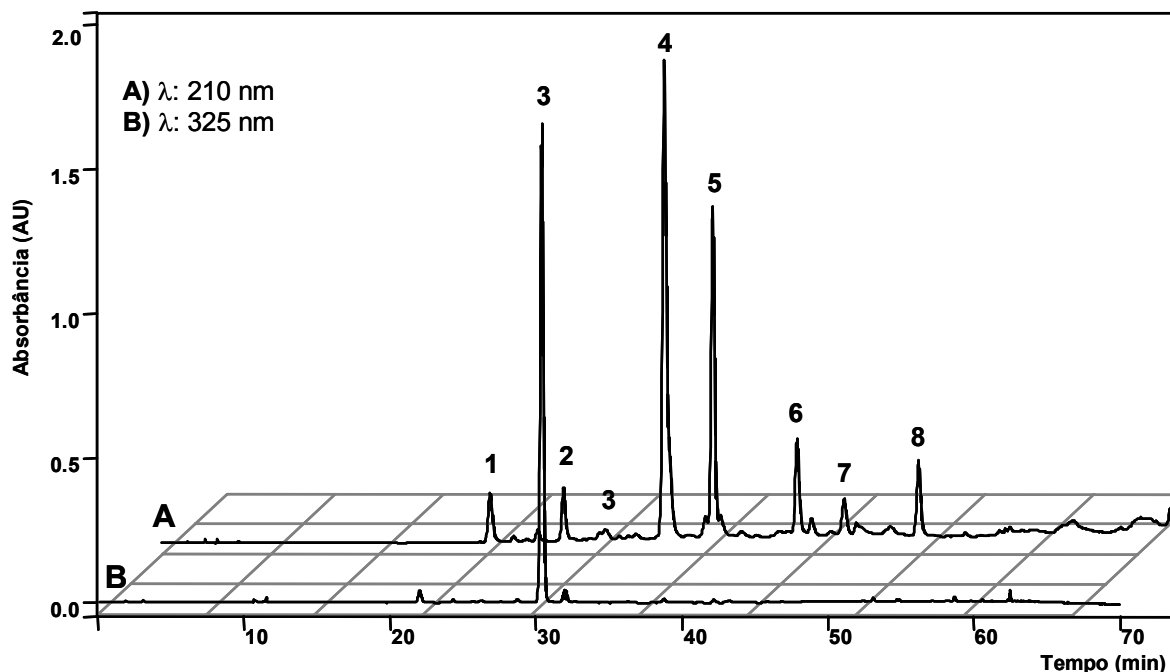


Figura 1.6. Perfil cromatográfico do eluato MeOH/H₂O 2:8 v/v do infuso das cascas de *H. speciosa* submetido ao processo de SPE. **A)** Cromatograma processado em 210 nm e **B)** cromatograma processado em 325 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).

Com o auxílio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm, duas classes de substâncias foram identificadas no infuso das cascas de *H. speciosa*. Catequinas monoméricas e oligoméricas (taninos condensados ou proantocianidinas) foram facilmente identificadas com base nos seus espectros de absorção na região do UV. Esses metabólitos secundários exibiram uma banda fraca em torno de 280 nm, um ombro próximo de 220 nm e máximo entre 205-210 nm (ROHR *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000). Os derivados do ácido cafeoilquínico apresentaram duas bandas de máximo de absorção intensas nas regiões de 217 e 325 nm e dois ombros nas regiões de 245 e 295 nm (ROHR *et al.*, 2000) (Fig. 1.7).

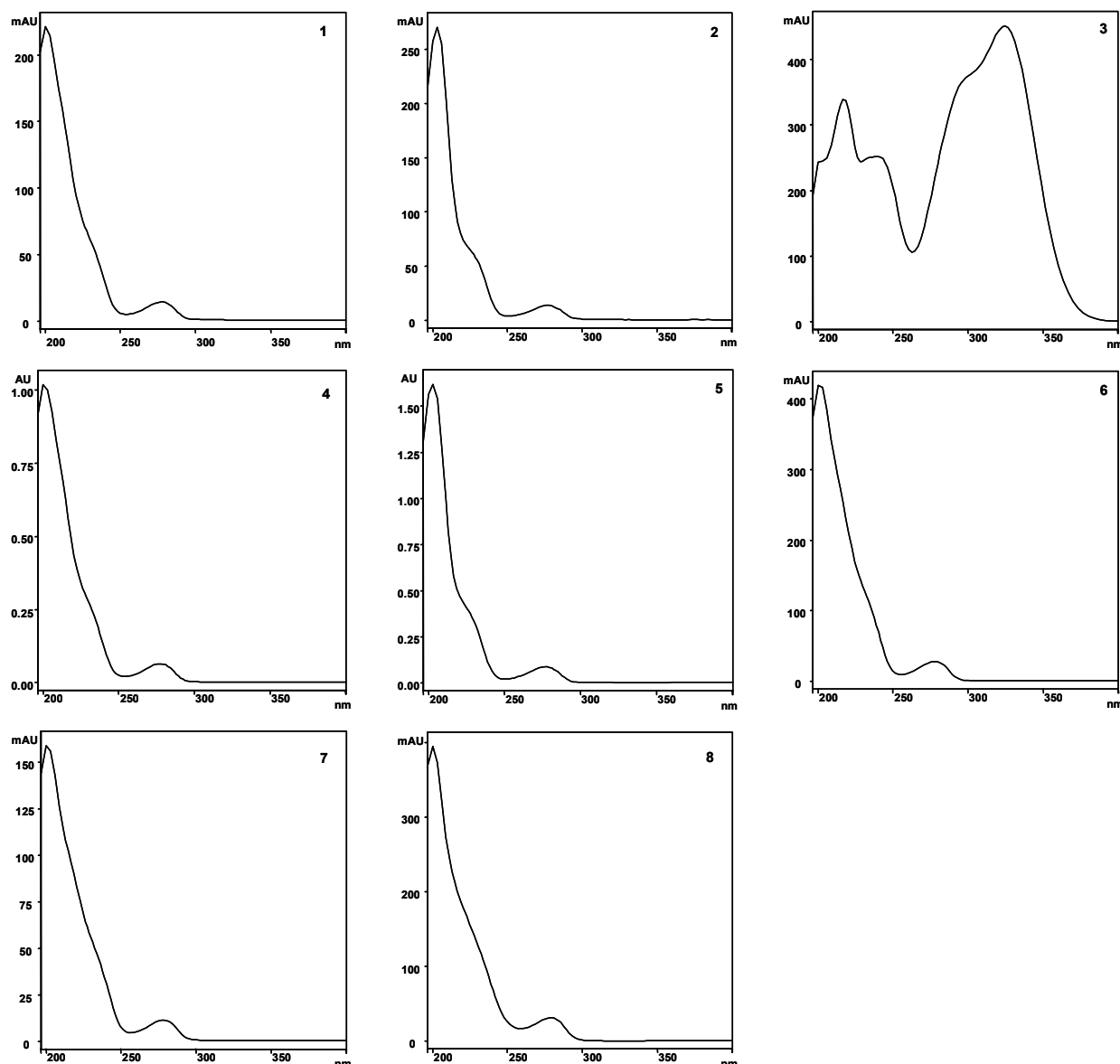


Figura 1.7. Espectros na região do UV para os principais picos eluídos no cromatograma da Figura 1.6. Espectros 2, 3 e 5 foram atribuídos à catequina, ácido clorogênico e à *epicatequina*, respectivamente.

A identificação de alguns dos metabólitos secundários encontrados na infusão das cascas de *H. speciosa* pôde ser feita de forma inequívoca pela realização de experimentos de co-injeção, em que alíquotas da matriz e padrão foram misturas e diluídas para um volume conhecido, sendo posteriormente analisadas por HPLC em mais de um método de eluição (gradiente e/ou isocrático). Assim, os picos 2 ($t_r = 27,5$ min), 3 ($t_r = 30,4$ min), 5 ($t_r = 37,8$ min) e 7 ($t_r = 46,7$ min) dos cromatogramas da Figura 1.6 foram identificados como sendo catequina, ácido clorogênico, *epicatequina* e galato de *epigallocatequina*, respectivamente.

Estabilidade da fração MeOH/H₂O 2:8 v/v

Catequinas e taninos são substâncias que apresentam instabilidade química quando submetidas à ação do calor e da luz (SIMÕES *et al.*, 2003). A concentração desta classe de metabólitos secundários diminui com tempo, devido ao fato destas substâncias serem instáveis também em condições de pH neutro ou básico (STACH & SCHMITZ 2001). Podem sofrer transformações químicas tais como oxidação e principalmente epimerização pela ação de íons metálicos presentes na água ou pela alteração dos valores de pH (WANG & HELLIWELL, 2000). Tendo em vista que modificações na composição química são fatores importantes quando se pensa em atividade biológica, como uma etapa adicional, foi avaliada a degradação da fração MeOH/H₂O 2:8 v/v.

Uma amostra resultante da primeira eluição da SPE em *Sep Pak* RP18 com aproximadamente 2 mL foi dividida e acondicionada em dois *vials*: o primeiro, âmbar, foi fechado e mantido em freezer a -18°C. O segundo, transparente, foi mantido fechado em temperatura ambiente e sem proteção contra a luz. Monitoramento das duas amostras foi realizado nos intervalos de 1, 15, 30 e 90 dias.

Visualmente foi verificado um aumento na tonalidade da cor da solução mantida sob os efeitos de luz e calor. A solução, inicialmente possuía uma cor pálido-alaranjada, passando gradativamente para uma tonalidade avermelhada até chegar à cor marrom ao final dos 90 dias. Essa mudança de coloração pode estar associada aos mecanismos de oxidação que ocorrem frequentemente em compostos fenólicos (SCHIEBER *et al.*, 2001).

A resolução cromatográfica e a intensidade dos picos da amostra mantida sob refrigeração e protegida da luz permaneceram inalteradas por pelo menos 30 dias. No entanto, o cromatograma da amostra que permaneceu sob os efeitos externos apresentou um expressivo decréscimo na resolução cromatográfica e na intensidade dos picos nos primeiros 15 dias e o desaparecimento de todos os picos cromatográficos ao final dos 90 dias (Figura 1.8). Estudo semelhante foi realizado por STACH & SCHMITZ (2001), em que os autores observaram decréscimo de até 21% na concentração de catequinas de chás verdes preparados em meio neutro ou básico com monitoramento em um intervalo máximo de 60 min.

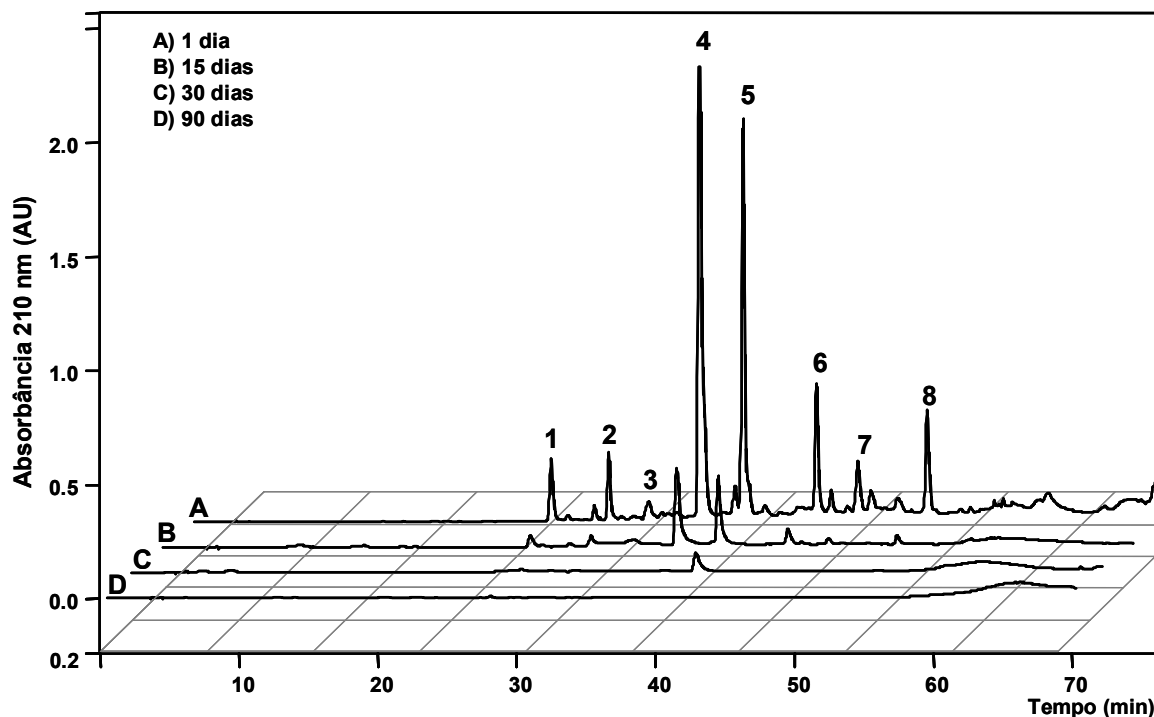


Figura 1.8. Avaliação da degradação do conteúdo de catequinas a partir de análises cromatográficas de uma amostra (eluato MeOH/H₂O 2:8 v/v após *clean-up* em *Sep Pak RP18*) submetida à ação de luz e calor. Intervalos: **A)** 1 dia; **B)** 15 dias; **C)** 30 dias e **D)** 90 dias. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).

Os resultados obtidos nesta investigação são bastante significativos, tanto do ponto de vista analítico quanto do ponto de vista químico-farmacológico. No aspecto analítico, cuidados devem ser tomados em etapas quantitativas: tanto amostras quanto os padrões devem ser protegidos destes efeitos, visto que o desenvolvimento de uma metodologia e a resposta de um sinal analítico depende da estabilidade dos analitos empregados nos processos de calibração. No aspecto químico-farmacológico, estes resultados servem para alertar sobre a integridade dos produtos e as formulações fitoterápicas que são comercializados. Ou seja, a ausência de mecanismos que permitam proteger ou estabilizar as matrizes que contenham esses metabólitos secundários pode alterar as atividades relacionadas a eles por causa desses efeitos.

Outro aspecto pertinente a este resultado diz respeito à integridade de extratos vegetais no geral. Em alguns casos, o intervalo de obtenção entre extrato seco e a realização dos ensaios químico-farmacológicos pode levar algumas dezenas de dias. Sendo assim, pode ser questionado até que ponto este intervalo de tempo pode comprometer a atividade de um determinado metabólito secundário? Ou ainda, até que ponto uma planta (ou extrato) considerada “inativa” teve a sua

atividade comprometida devido a um longo intervalo de tempo até ocorrer a sua avaliação ou a um processo de extração e armazenamento incorretos?

Fracionamento da porção acetato de etila da infusão de *Hancornia speciosa*

Tendo em vista que as demais substâncias, incluindo aquela aparentemente majoritária (Fig. 1.6, pico 4), não foram identificadas, uma nova estratégia usada na tentativa de isolar algumas das substâncias não caracterizadas em *H. speciosa* foi realizada empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC). Como foram obtidos resultados promissores com as etapas de *clean-up*, um *scale-up* do procedimento da SPE em *Sep Pak* RP18 foi elaborado e a separação de 300 mg de infusão liofilizada foi efetuada em uma coluna empacotada com sílica de fase reversa RP18.

A infusão liofilizada foi solubilizada em MeOH/H₂O 5:95 v/v, centrifugada e a solução aplicada na coluna de RP18 (Strata-X 55 µm, Phenomenex) de 1,0 cm i.d. x 10 cm. As eluições foram realizadas em modo gradiente (1,0 mL min⁻¹) com o sistema MPLC BÄECKSTROM separo AB, iniciando-se com 5% de MeOH e aumentando a força de eluição em 5% a cada 50 mL. As frações eluídas do sistema MPLC foram coletadas em um coletor automático programado para 6 min/coleta. Um total de 161 frações foram obtidas e posteriormente reagrupadas após verificação por TLC empregando catequinas como substâncias de referência.

Análises preliminares por TLC evidenciaram grande quantidade de material fortemente retido no ponto de aplicação, sendo este material distribuído ao longo de todas as frações coletadas. Estas observações mostraram que houve dificuldade na separação dos metabólitos secundários, mesmo usando uma coluna empacotada com RP18.

As frações 39-45 (16 mg) que apresentaram R_fs semelhantes, próximos aos das substâncias empregadas como referência, foram reagrupadas. Uma alíquota foi filtrada em membrana de PTFE (0,45 µm) e injetada em HPLC (modo analítico) no sistema descrito na Tabela 1.1. Análise da corrida cromatográfica em vários comprimentos de onda revelou inúmeras substâncias na fração investigada (Fig. 1.9), incluindo o ácido clorogênico (**3**) em $t_r = 30,4$ min (Figura 1.9B) que foi melhor visualizado em 325 nm (Figura 1.9C) e uma das catequinas não identificadas (**4**) em $t_r = 34,5$ min. Etapas de purificação posteriores resultaram na obtenção da

substância (4), mas em quantidade insuficiente para a execução de experimentos de NMR e por esta razão não foi possível chegar a uma proposta estrutural.

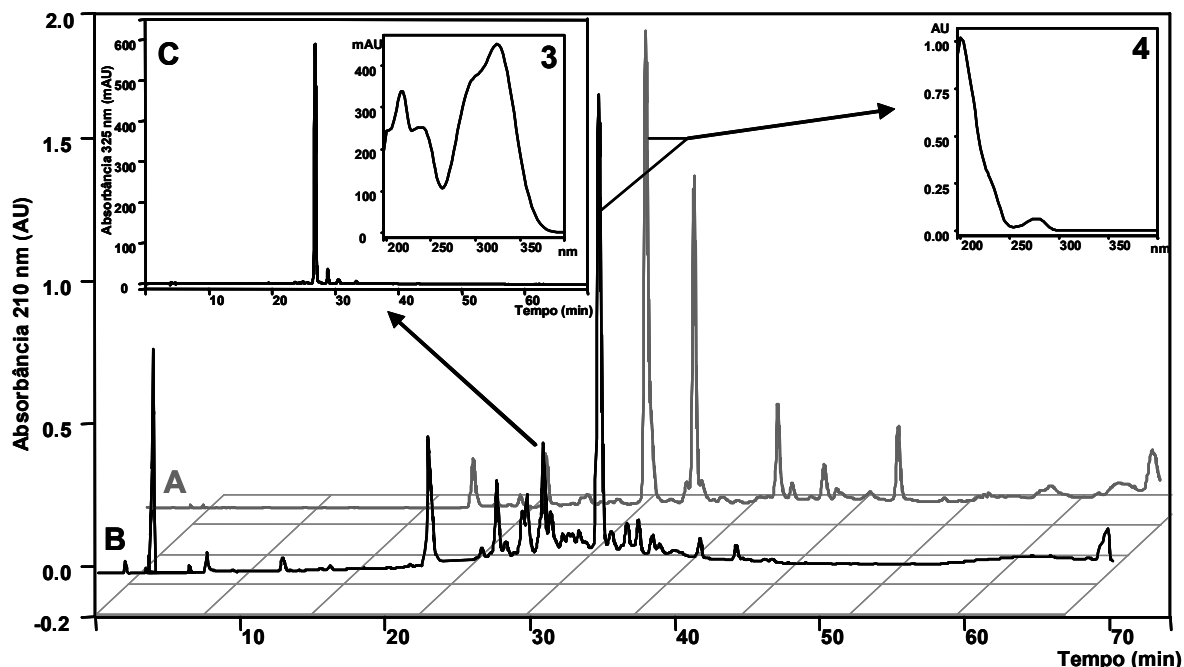


Figura 1.9. A) Separação cromatográfica por HPLC-PAD da infusão submetida aos processos de LLE e SPE em cartucho *Sep Pak* de RP18, eluato MeOH/H₂O 2:8 v/v, λ = 210 nm. B) Análise cromatográfica de uma alíquota das frações 39-45 provenientes da separação do infuso de *H. speciosa* com o sistema MPLC, λ = 210 nm. C) Processamento da corrida cromatográfica da alíquota das frações 39-45 em 325 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC-PAD (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 1.1).

Tendo em vista a dificuldade de isolamento dos metabólitos secundários de *H. speciosa* seja por cromatografia de adsorção, seja por cromatografia de partição ou por métodos de cromatografia em contracorrente, a etapa seguinte consistiu em fazer uso da espectrometria de massas em tandem para investigar a constituição química da infusão desta espécie.

Análises por FIA-ESI-IT-MS

Inúmeros trabalhos descritos na literatura mostram que a espectrometria de massas (MS), na maioria das vezes acoplada a um sistema HPLC, tem se destacado como uma poderosa ferramenta em estudos de biodiversidade (ZEEB *et al.*, 2000). Ela é empregada em aplicações de ordem qualitativa e quantitativa para analitos de baixo e/ou alto peso molecular, encontrados em matrizes complexas em que o HPLC é o sistema de separação de escolha e o espectrômetro de massas fornece a seletividade e sensibilidade para gerar a informação quantitativa e/ou a

informação estrutural que não pode ser obtida com outros tipos de detectores (ARDREY, 2003).

Catequinas e taninos condensados são frequentemente analisados nos modos positivo (WU *et al.*, 2005) e negativo (GU *et al.*, 2003) e várias são as interfaces empregadas para a geração desses íons, sendo a ionização por *electrospray* (ESI) a interface mais utilizada. Ela é reconhecida como uma técnica de ionização branda e possibilita a investigação dos mais diversos tipos de matrizes em fase gasosa, incluindo analitos que exibem alta polaridade, viabilizando assim a caracterização estrutural com quantidades mínimas de uma determinada amostra (ARDREY, 2003).

No entanto, taninos condensados com alto grau de polimerização não são completamente resolvidos durante as separações cromatográficas por HPLC. Geralmente há necessidade de análises cromatográficas mais longas, principalmente para garantir que os analitos sejam eluídos do sistema cromatográfico. Neste caso, o acoplamento de um sistema HPLC com MS configura uma das desvantagens na utilização desta aplicação (WU *et al.*, 2005; KARONEN *et al.*, 2006), principalmente quando se busca a obtenção de um real perfil químico da matriz investigada em um tempo de análise relativamente curto.

Por outro lado, vários trabalhos vêm demonstrando que análises por MS usando o modo de inserção direta da amostra (FIA), sem a necessidade de complexas etapas de preparação e *clean-up* (resguardando apenas as etapas mais simples que envolvem: filtração, diluição e/ou adição de um modificador para auxiliar a ionização), tem se destacado como a forma mais representativa e rápida de estabelecer a composição química de uma determinada matriz e essa abordagem tem sido empregada no controle de qualidade e na verificação da autenticidade de diversos tipos de amostras, incluindo bebidas, alimentos e até mesmo extratos de plantas (MAURI & PIETTA, 2000; GOODACRE *et al.*, 2002; CATHARINO *et al.*, 2006).

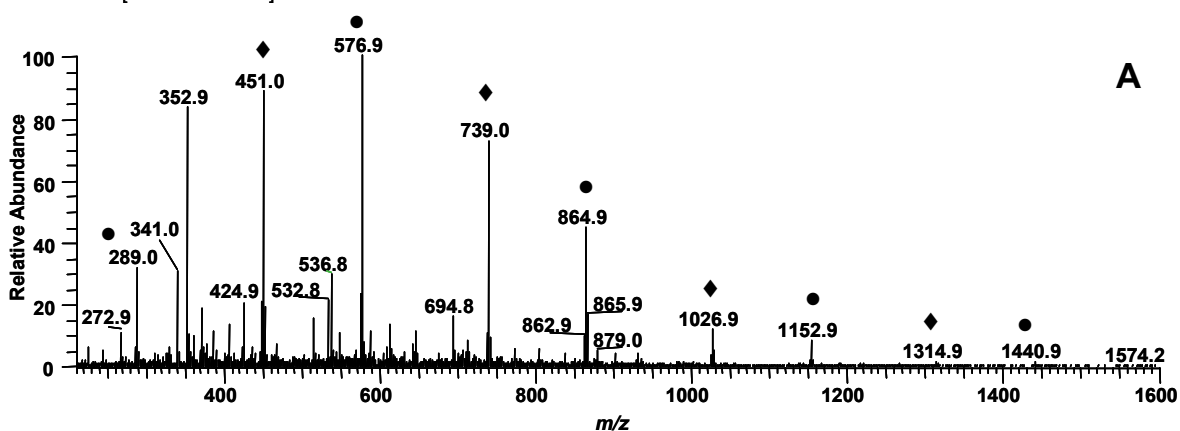
Diante destas observações e conhecendo, em parte, a composição química da planta, nesta etapa do estudo foi realizada a caracterização dos metabólitos secundários presentes na infusão das cascas de *H. speciosa* com a técnica ESI-IT-MS/MS empregando o modo de inserção direta.

A infusão de *H. speciosa* foi obtida com 1 g de cascas. O material triturado foi mantido em contato com 10 mL de água aquecida (80°C) por 10 min. A mistura

contendo a solução e o material particulado foi filtrado em papel de filtro e resfriado a temperatura ambiente, em seguida uma alíquota da solução foi novamente filtrada, agora em membrana de PTFE com poro de 0,45 μm . A infusão filtrada (500 μL) foi diluída com MeOH para o volume final de 1 mL e a solução introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsiona por um sistema de bombeamento em fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$.

A Figura 1.10 mostra o espectro de massas em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ($[M - H]^-$) da infusão de *H. speciosa*.

HSfia #403-416 RT: 6.65-6.94 AV: 14 NL: 9.82E5
T: - c Full ms [210.00-1600.00]



HSfia #2450-2570 RT: 46.94-48.85 AV: 121 NL: 5.14E4
T: - c Full ms [1200.00-2000.00]

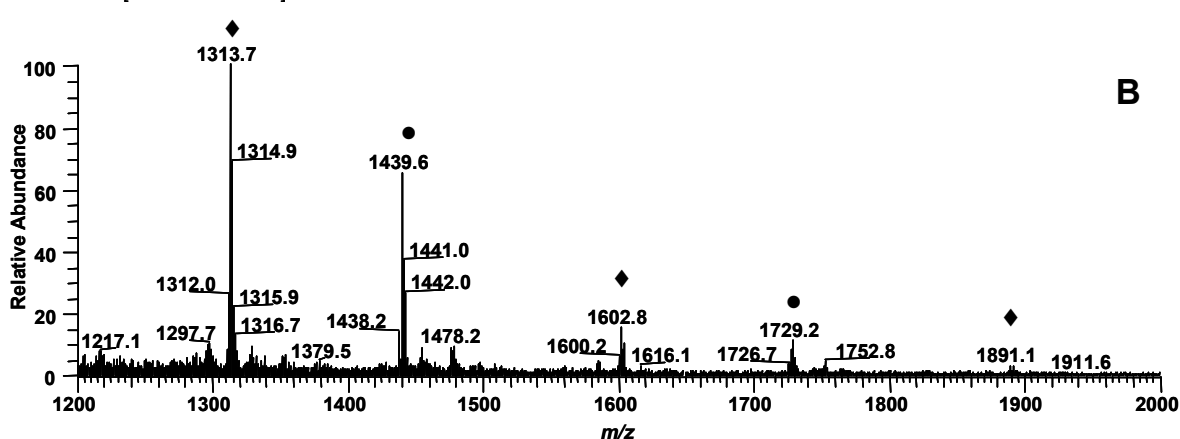


Figura 1.10. Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, da infusão de *H. speciosa* avaliado em modo negativo. **A)** Faixa de íons com m/z de 210-1600 Da. **B)** Faixa de íons com m/z de 1200-2000 Da. (●) Íons precursores separados por 288 Da, referentes à primeira série homóloga de procianidinas. (◆) Segunda série homóloga de procianidinas C-glucosiladas. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Fragmentação de segunda-ordem (MS/MS) para cada um desses íons levou à identificação de diversos metabólitos, conforme discutido a seguir e a nomenclatura utilizada seguiu as recomendações sugeridas por MURRAY e co-autores (2006).

A estereoquímica dos carbonos C2 e C3 de catequinas monoméricas e oligoméricas não é diferenciada em experimentos de MS (ZEEB *et al.*, 2000). Para efeitos de simplicidade, passaremos a denominar fragmentos de m/z 289 como sendo referente à [epi]catequina.

O íon precursor de m/z 289 corresponde molécula desprotonada da [epi]catequina. MS/MS deste íon levou ao íon produto de m/z 271 (Fig. 1.11), referente à perda de uma molécula de água $[M - 18 - H]^-$ e ao pico base de m/z 137 $[M - 152 - H]^-$, formado pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) (GU *et al.*, 2003). O conjunto de dados fornecido pelo espectro de massas da Figura 1.11 e a presença do íon precursor de m/z 289 (Fig. 1.10) corroboram com a presença da catequina e/ou da epicatequina, caracterizadas anteriormente nos experimentos de co-injeção (Fig. 1.6).

HSfia #25-28 RT: 0,53-0,57 AV:4 NL: 7,54E4
T: - c Full ms2 289,00@30,00 [120,00-300,00]

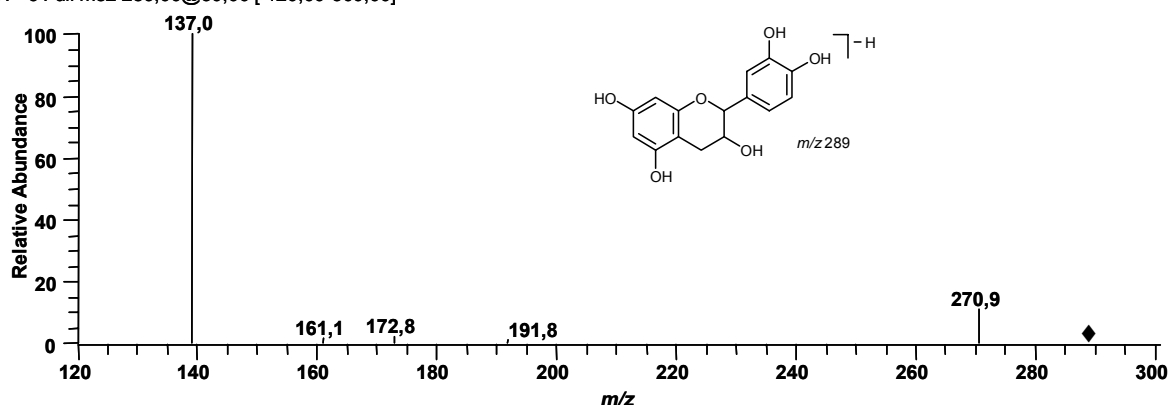


Figura 1.11. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 289, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 273 sugeriu a presença de outro monômero, a eliminação de um fragmento neutro de 136 Da e formação do íon produto de m/z 137 $[M - 136 - H]^-$ é compatível ao da [epi]afzelequina (Fig. 1.12). De forma similar, o íon precursor de m/z 425, sugeriu a presença do galato de [epi]afzelequina. A atribuição para essa catequina (Fig. 1.13) foi sugerida pela formação do pico base de m/z 255, referente à eliminação seqüencial do grupo galoíla e água $[M - 152 - 18 - H]^-$, conforme sugerido por ZEEB e co-autores (2000). O íon produto de m/z 137 foi formado a partir da clivagem do anel C e eliminação do anel B via mecanismo de RDA.

HS2 #536 RT: 1,03-1,25 AV: 5 NL: 1,21E4
T: - c d Full ms2 272,90@35,00 [65,00-300,00]

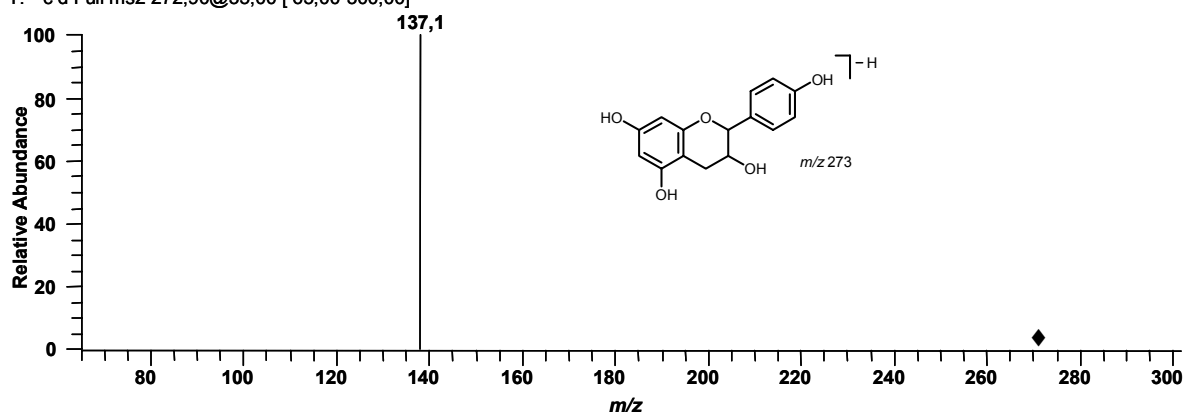


Figura 1.12. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 273, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

HS2 #208 RT: 2,95-3,07 AV: 3 NL: 4,11E2
T: - c d Full ms2 424,92@35,00 [120,00-500,00]

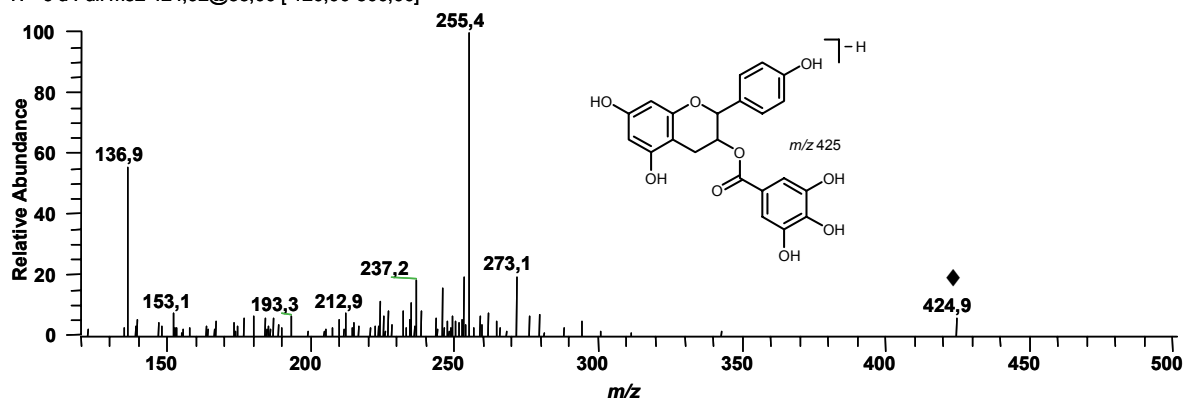


Figura 1.13. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 425, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

MS/MS do íon precursor de m/z 341 resultou no espectro de segunda-ordem mostrado na Figura 1.14. Os íons produtos de m/z 323 (perda de água), m/z 297 (perda de CO_2) e m/z 179 (perda de uma unidade de hexose) foram atribuídos à fragmentação observada para o ácido cafeoil-O-glucosídeo (SÁNCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2005). Porém, apenas com os experimentos de MS não foi possível determinar se a unidade de hexose estava ligada na posição 3-O ou 4-O do ácido cafeico. A possibilidade de um dímero do ácido cafeico foi descartada devido à presença de fragmentações correspondentes a perdas de moléculas de água, como por exemplo os fragmentos em m/z 323 e m/z 161.

HSfia #71-226 RT: 1,12-3,43 AV: 156 NL: 3,69E4
T: - c Full ms2 341,00@30,00 [120,00-400,00]

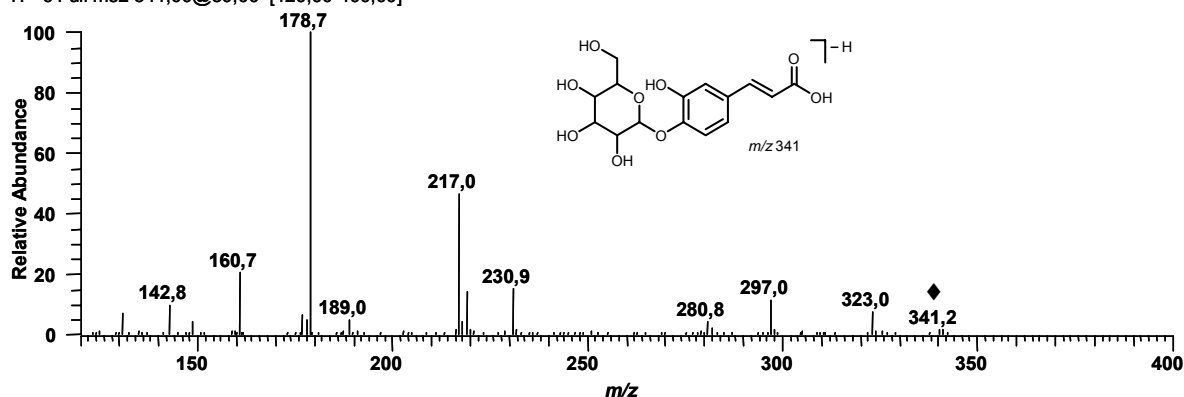


Figura 1.14. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 341, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 353 levou à formação íon produto de m/z 191 $[M - 162 - H]^-$. Esse resultado sugere a presença de uma estrutura que teve uma unidade de ácido cafeico (162 Da) esterificada por uma unidade de ácido quínico (191 Da) (Fig. 1.15), o que é compatível com a estrutura do ácido clorogênico, identificado durante os experimentos que envolveram co-injeção com padrão autêntico (Fig. 1.6).

HSfia #307-355 RT: 5,19-5,95 AV: 49 NL: 2,51E5
T: - c Full ms2 352,90@30,00 [120,00-400,00]

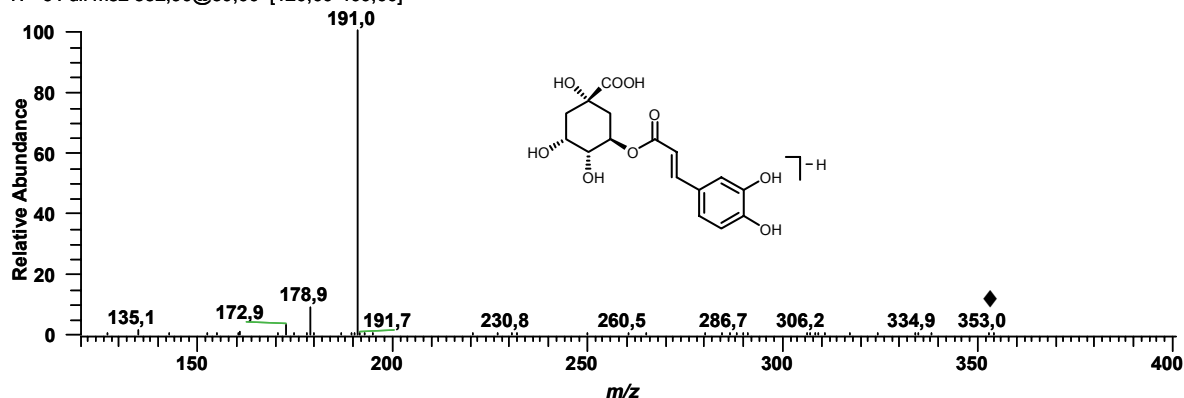


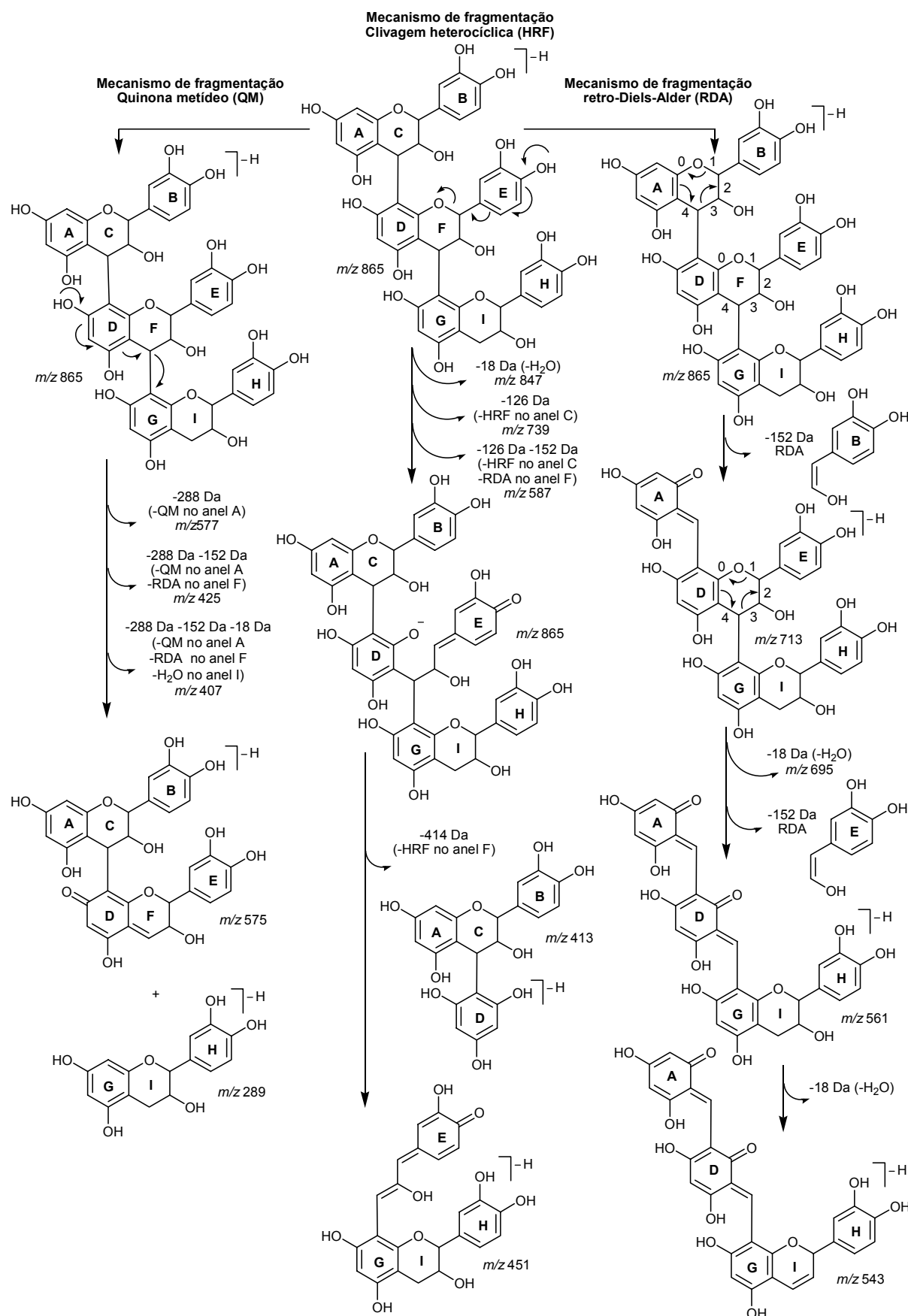
Figura 1.15. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 353, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

A partir de uma inspeção mais minuciosa do espectro de massas da Figura 1.10, os sinais dos íons precursores observados evidenciaram a presença de uma série homóloga consistente à proantocianidinas oligoméricas intercaladas por 288 Da. As moléculas desprotonadas representadas por (•) correspondem a proantocianidinas com grau de polimerização variando de 1-6. Desta forma, esses sinais foram interpretados como os íons precursores de um monômero (m/z 289),

dímero (m/z 577), trímero (m/z 865), tetrâmero (m/z 1153), pentâmero (m/z 1441) e hexâmero (m/z 1729) da [epi]catequina, respectivamente.

Uma segunda série homóloga, representada por (♦), foi evidenciada pelos sinais das moléculas desprotonadas de m/z 451, m/z 739, m/z 1027, m/z 1315, m/z 1603 e m/z 1891, as quais são 162 unidades superiores aquelas observadas da primeira série homóloga, sugerindo assim a presença de um grupo de proantocianidinas monoglucosiladas.

A verificação dessas evidências foi realizada com base na interpretação dos espectros de massas dos principais íons precursores observados. Espectros de segunda-ordem de proantocianidinas podem ser racionalizados em três principais mecanismos de fragmentação: retro-Diels-Alder (RDA), quinona metídeo (QM) e clivagem heterocíclica (HRF) (GU *et al.*, 2003). O Esquema 1.3 mostra as principais rotas de fragmentação ilustradas de um possível trímero encontrado em *H. speciosa*.



Esquema 1.3. Rotas de fragmentação de uma possível proantocianidina trimérica encontrada no infuso das cascas de *H. speciosa*. Os principais mecanismos de fragmentação envolvidos são: RDA (retro-Diels-Alder), HRF (clivagem heterocíclica), e QM (quinona metídeo).

Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 865 (Fig. 1.16) produziu o pico base de m/z 577, esse íon foi gerado após a formação do QM (m/z 287) no anel A da unidade superior do trímero, com conseqüente eliminação da unidade dimérica contendo os anéis D-F e G-I [$M - 288 - H$]⁻. Posteriormente, a unidade dimérica formada (m/z 577) sofreu uma clivagem do tipo RDA no anel F, gerando o íon produto m/z 425 [$M - 288 - 152 - H$]⁻, que por sua vez forneceu o íon produto de m/z 407 [$M - 288 - 152 - 18 - H$]⁻, interpretado como a eliminação seqüencial de água no anel I. Os íons produtos de m/z 847 e m/z 289 foram atribuídos à perda de água ([$M - 18 - H$]⁻) e à eliminação da molécula da [epi]catequina desprotonada através da formação do QM no anel D da unidade central do trímero ([$M - 576 - H$]⁻) (Esquema 1.3).

HSfia #1413-1520 RT: 25,64-28,01 AV: 108 NL: 1,92E3
T: - c Full ms2 865,30@30,00 [235,00-900,00]

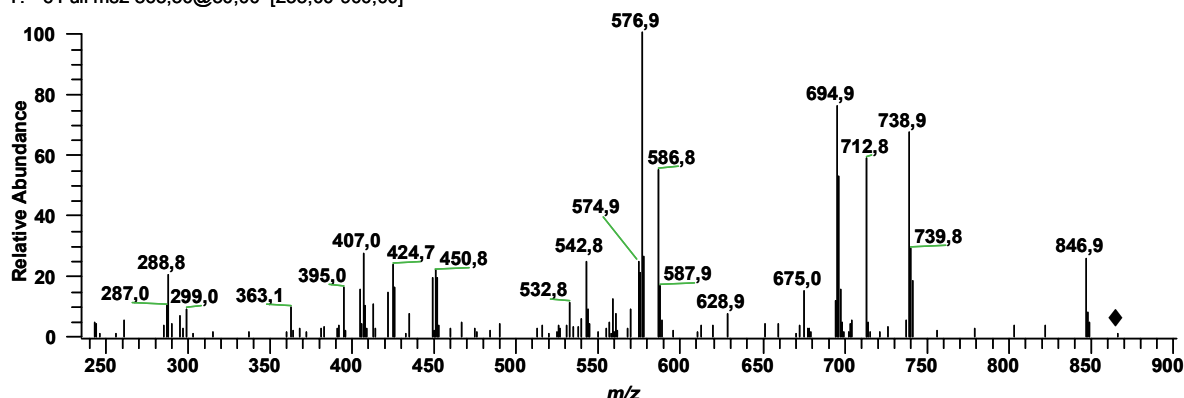


Figura 1.16. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 865, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

O íon produto de m/z 713 [$M - 152 - H$]⁻ pode ser formado pelo mecanismo RDA no anel C da unidade superior ou no anel F da unidade central com eliminação do fragmento $^{1,3}B_0$ ou $^{1,3}E_0$. Nesse caso a fragmentação RDA poderia ocorrer também na unidade inferior do trímero ($^{1,3}H_0$). No entanto, as eliminações dos fragmentos $^{1,3}B_0$ e $^{1,3}E_0$ são mais favoráveis por gerar íons produtos com sistema de conjugação $\pi - \pi$ maior que o esperado para a RDA no anel I da unidade inferior do trímero.

Logo após a RDA ocorre a formação do íon produto de m/z 695 [$M - 152 - 18 - H$]⁻, esse íon foi gerado pela perda de uma molécula de água, mais precisamente devido à eliminação de um grupo 3-OH dos anéis C, F ou I que tenham se mantido intactos após a RDA para fornecer um íon mais estável com formação de uma

ligação dupla $^{2,3}\Delta$ ou $^{3,4}\Delta$. Por sua vez, um íon com uma ligação dupla $^{3,4}\Delta$ é preferencialmente formado por apresentar um sistema de conjugação mais extenso que um íon com uma ligação dupla $^{2,3}\Delta$, (Esquema 1.3). O íon produto de m/z 543 foi interpretado como as eliminações seqüenciais dos fragmentos $^{1,3}B_0$, $^{1,3}E_0$ e perda de água do anel I $[M - 2 \times 152 - 18 - H]^-$.

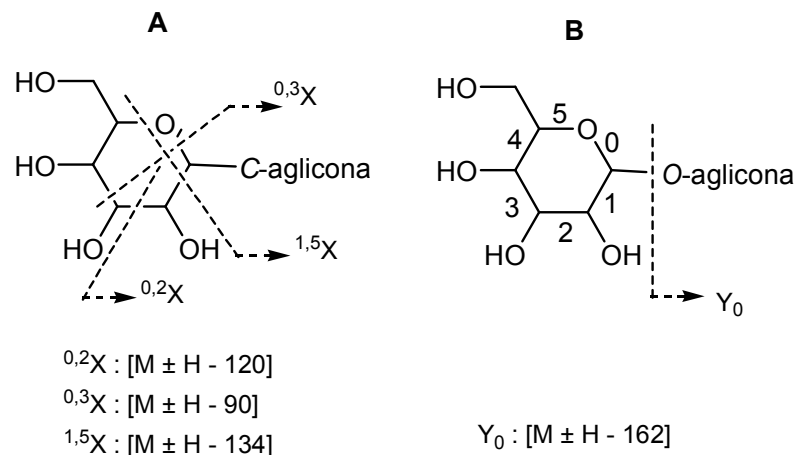
O íon produto de m/z 739 foi gerado após a eliminação do anel A como 1,3,5-triidroxibenzeno $([M - 126 - H]^-)$ pela clivagem do anel C da unidade superior do trímero através do mecanismo de fragmentação HRF. De forma similar, o íon produto de m/z 451 foi gerado após a eliminação HRF resultante da clivagem do anel F da unidade central do trímero com a eliminação de um resíduo de 414 Da. O íon produto de m/z 587 foi gerado pela fragmentação HRF ocorrida no anel C da unidade superior e na seqüência a eliminação do fragmento $^{1,3}E_0$ resultante da RDA no anel F da unidade central do trímero $([M - 126 - 152 - H]^-)$. Esse íon produto (m/z 587) foi considerado um íon diagnóstico para o trímero encontrado em *H. speciosa*, uma vez que somente podem ocorrer mecanismos RDA e HRF simultâneos com a eliminação de 126 Da na unidade superior do mesmo.

As proantocianidinas que são constituídas exclusivamente de unidades equivalentes de [epi]catequinas e que apresentam uma ligação interflavonoídica são denominadas de procianidinas do tipo-B. Assim, os íons precursores de m/z 577, m/z 865, m/z 1153, m/z 1441 e m/z 1729 são indicativos de procianidinas do tipo-B. Porém, como ocorre em todas as técnicas de MS, nenhuma diferenciação entre estereoisômeros foi realizada, bem como nenhuma informação sobre a posição e estereoquímica da ligação interflavonoídica.

As procianidinas glucosiladas também foram investigadas quanto aos seus espectros de massas de segunda-ordem e a natureza glucosídica desses derivados foi evidenciada devido às características da clivagem da unidade do açúcar.

Em flavonóides C-glucosilados, o açúcar é ligado diretamente ao núcleo do flavonóide por uma ligação C-C, dificilmente clivada; em flavonóides O-glucosilados a ligação O-C é mais susceptível a clivagem. Análises por ESI-MS/MS fornecem subsídios que permitem a caracterização de O- e C-glucosídeos em ambos os modos de ionização (negativo ou positivo). Para flavonóides C-glucosilados, sendo que a via de fragmentação preferencial é aquela que se baseia na clivagem interna da unidade sacarídica, enquanto que nos flavonóides O-glucosilados a eliminação

intacta do açúcar é favorecida (Esquema 1.4), (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; ESSAFI *et al.*, 2005).



Esquema 1.4. Íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma O-hexose (B). O sinal \pm indica os modos de ionização, positivo ou negativo.

Fragmentação MS/MS da molécula desprotonada de m/z 1027 resultou no espectro de íons produtos mostrado na Figura 1.17, que resume inúmeras informações estruturais. Um mecanismo baseado na análise de um possível trímero monoglucosilado encontrado em *H. speciosa* foi proposto para a formação dos principais íons produtos verificados (Esquema 1.5).

HSfia #1748-1841 RT: 32,55-34,47 AV: 94 NL: 1,80E2
T: - c Full ms2 1027,00@30,00 [280,00-1100,00]

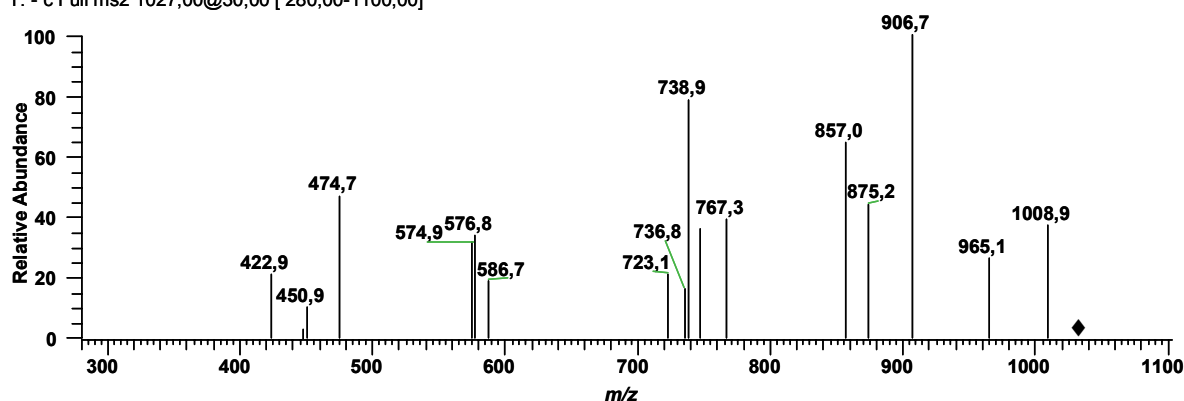
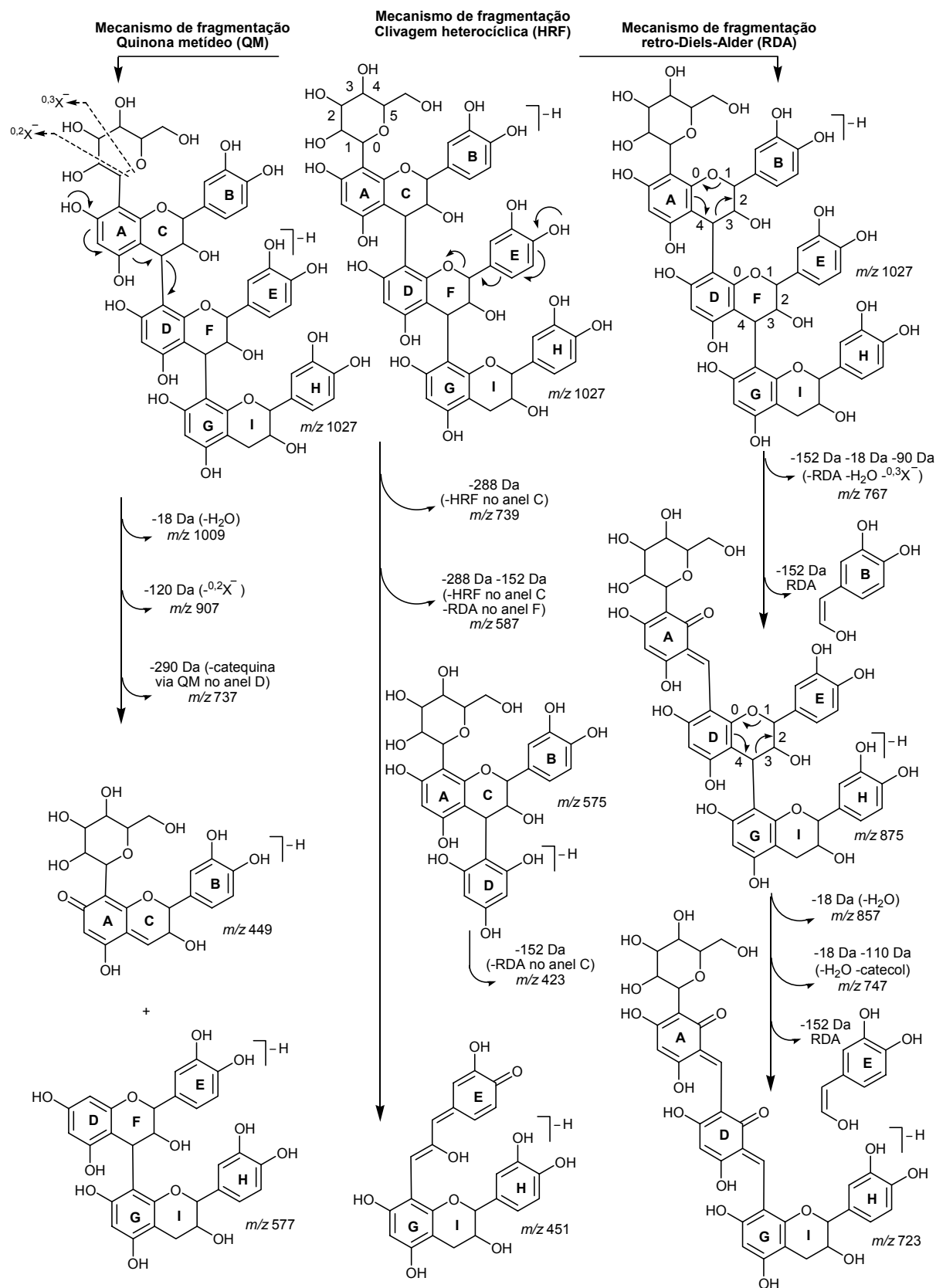


Figura 1.17. Espectro de massas de segunda-ordem obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% para o íon precursor de m/z 1027. Para condições experimentais veja: Parte Experimental.



Esquema 1.5. Rotas de fragmentação de uma possível procianidina trimérica C-glucosilada encontrada no infuso das cascas de *H. speciosa*. Os principais mecanismos de fragmentação envolvidos são: RDA (retro-Diels-Alder), HRF (clivagem heterocíclica), QM (quinona metídeo), $^{0,2}X^-$ e $^{0,3}X^-$ (clivagem interna da unidade sacarídica).

Foram postuladas três rotas principais de fragmentação do trímero glucosilado (Fig. 1.17). Em todas elas, o íon produto de m/z 1009 ($[M - 18 - H]^-$) foi formado pela eliminação de água a partir da molécula desprotonada ($[M - H]^-$). Além disso, observa-se a formação do pico base de m/z 907, que foi atribuída à clivagem $^{0,2}X^-$ com eliminação de 120 Da. Esse tipo de fragmentação é bastante comum em flavonóides C-glucosilados (CUYCKENS & CLAEYS, 2004). A ausência do íon produto de m/z 865 $[M - 162 - H]^-$ foi um dos primeiros indícios que permitiram descartar a possibilidade de proposta para uma procianidina O-glucosilada.

No mecanismo de fragmentação envolvendo a clivagem QM, a localização do açúcar na unidade superior da molécula desprotonada foi postulada com base na clivagem da ligação interflavonoídica entre o anel C da unidade superior e o anel D da unidade central (Esquema 1.5). Essa fragmentação gera simultaneamente uma unidade QM glucosilada (m/z 449) no anel A da unidade superior e o íon produto de m/z 577 $[M - 450 - H]^-$, referente ao dímero contendo os anéis D-I.

Outra evidência de que o açúcar se encontra na unidade superior do trímero é fornecida pelo íon de m/z 737. Esse íon é o resultado da eliminação da unidade inferior de catequina (anéis G-I), com a conseqüente formação de um fragmento cuja unidade superior é uma catequina glucosilada (anéis A,B,C) e a unidade inferior contém um sistema QM (anéis D,E,F). Tal fragmento não é possível de ser formado se o açúcar estiver na unidade inferior do trímero.

Numa segunda rota, o íon produto de m/z 739 pode ser justificado pelo mecanismo de fragmentação HRF com clivagem do anel C da unidade superior e eliminação do resíduo 1,3,5-tridroxibenzeno glucosilado ($[M - 288 - H]^-$). De forma semelhante, o íon produto de m/z 451 foi atribuído à clivagem do anel F da unidade central via mecanismo de fragmentação HRF com eliminação de um resíduo (R) de 576 Da. Este resíduo quando fragmentado, fornece o íon produto de m/z 423, o qual foi formado pela eliminação do fragmento $^{1,3}B_0$ via RDA no anel C do resíduo $[R - 152 - H]^-$ (Esquema 1.4).

Outra proposta consistente foi usada para explicar a presença do íon produto de m/z 587, gerado pela fragmentação HRF ocorrida no anel C da unidade superior com perda do resíduo 1,3,5-tridroxibenzeno glucosilado e na seqüência a eliminação do fragmento $^{1,3}E_0$ resultante da RDA no anel F da unidade central $[M - 288 - 152 - H]^-$.

Numa terceira rota, o íon produto de m/z 875 $[M - 152 - H]^-$ pode ser explicado pelo mecanismo de RDA com eliminação do fragmento $^{1,3}B_0$ ou $^{1,3}E_0$. A eliminação do fragmento $^{1,3}H_0$ não é favorecida pelas mesmas razões justificadas anteriormente para o trímero (Esquema 1.3). Na sequência, após a RDA ocorre a formação do íon produto de m/z 857 $[M - 152 - 18 - H]^-$. Este íon foi gerado após a perda de uma molécula de água do anel C, F ou I, que tenha se mantido intacto após a RDA, com formação da ligação dupla $^{2,3}\Delta$ e pode ainda ocorrer pela desidratação do açúcar (WARIDEL *et al.*, 2001). O íon produto de m/z 723 foi gerado após eliminação RDA simultânea dos fragmentos $^{1,3}B_0$ e $^{1,3}E_0$ $[M - 2 \times 152 - H]^-$.

O íon produto de m/z 767 foi caracterizado como um íon diagnóstico da clivagem interna do açúcar. Ele pode ser explicado a partir de uma fragmentação sequencial do trímero monoglucosilado, com eliminação de 152 Da via RDA, seguida da perda de água (18 Da) e posterior clivagem do tipo $^{0,3}X^-$ levando à eliminação de 90 Da.

Alguns autores sugerem que é possível diferenciar as posições C6 e C8 do núcleo de um flavonóide em experimentos MS/MS usando baixas energias de colisão. Nesse caso, a eliminação de água a partir da desidratação da unidade sacarídica seria uma fragmentação específica de C6-glucosídeos (WARIDEL *et al.*, 2001; CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Em nosso caso, a atribuição do ponto de ligação do açúcar (C6 ou C8) na unidade superior da aglicona não foi possível, uma vez que em proantocianidinas (flavan-3-óis) pode ocorrer a eliminação de água também a partir da eliminação do grupo 3-OH. Desta forma, a perda de água não pode ser usada para uma atribuição inequívoca do ponto de ligação do açúcar.

Os experimentos realizados com a técnica FIA-ESI-IT-MS corroboraram com a proposta inicial da presença de taninos condensados provenientes da polimerização de catequinas. As fragmentações sugeridas para os íons das duas séries encontradas revelam a presença de procianidinas oligoméricas do tipo-B e seus respectivos derivados C-glucosilados, além de outros derivados fenólicos.

Uma discussão mais detalhada para outros íons precursores foi reportada recentemente por nosso grupo (RODRIGUES; RINALDO; SANTOS *et al.*, 2007 (anexo), em que a análise por FIA-ESI-IT-MS auxiliou a esclarecer a composição química de uma fitopreparação bastante complexa.

Avaliação quantitativa da infusão das cascas de *H. speciosa*

A grande diversidade de substâncias presentes nas matrizes vegetais em muitos casos inviabiliza uma quantificação específica para cada um dos componentes encontrados em uma determinada amostra, pois muitas substâncias não estão disponíveis comercialmente, outras ainda sequer foram descobertas e consequentemente não possuem suas estruturas estabelecidas (ROBARDS, 2003). Vários trabalhos reportam que a quantificação destas substâncias pode ser feita com base na comparação de um padrão pertencente à classe do analito determinado (ROBARDS, 2003), e desta forma, os resultados são dados em termos da substância usada na calibração (SCHÜTZ *et al.*, 2004).

Sendo assim, nesta etapa do trabalho foi usada a metodologia de preparo de amostra e gradiente de separação cromatográfica similar ao descrito por DALLUGE e colaboradores (1998). A eluição de um conjunto de catequinas foi otimizada, concomitantemente com outros derivados de ácidos fenólicos comumente encontrados em infusões. Curvas analíticas foram construídas a partir de uma solução estoque e a quantificação dos picos eluídos da amostra realizada de acordo com a identificação e/ou a similaridade espectral de seus metabólitos secundários com aqueles dos padrões utilizados na calibração.

Construção das curvas analíticas

Solução estoque contendo a mistura de ácido gálico, (-)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, galato de metila, (+)-catequina, 4'-O-metil-galocatequina, (-)-epicatequina, galato de (-)-galocatequina, galato de etila e galato de (-)-epicatequina, cada padrão na concentração de 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi preparada e solubilizada em MeOH/H₂O 7:3 v/v. A solução estoque foi armazenada em *vial* âmbar e mantida refrigerada em *freezer* a -18°C .

As soluções padrão cobrindo intervalos lineares com dez níveis de concentração (0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram feitas a partir de diluições das soluções estoque e o volume final das soluções ajustados para 2 mL, sendo mantidas em *freezer* até o momento das análises.

Durante a quantificação foi empregado o método de calibração externa. Os padrões foram analisados por HPLC-PAD. Cada padrão foi injetado em triplicata e a resposta de absorção obtida em 210 e/ou 280 nm. Ao final, a área sob os picos cromatográficos dos padrões foi calculada e os valores obtidos interpolados em

função da concentração usando regressão linear. Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio das injeções (Fig. 1.18).

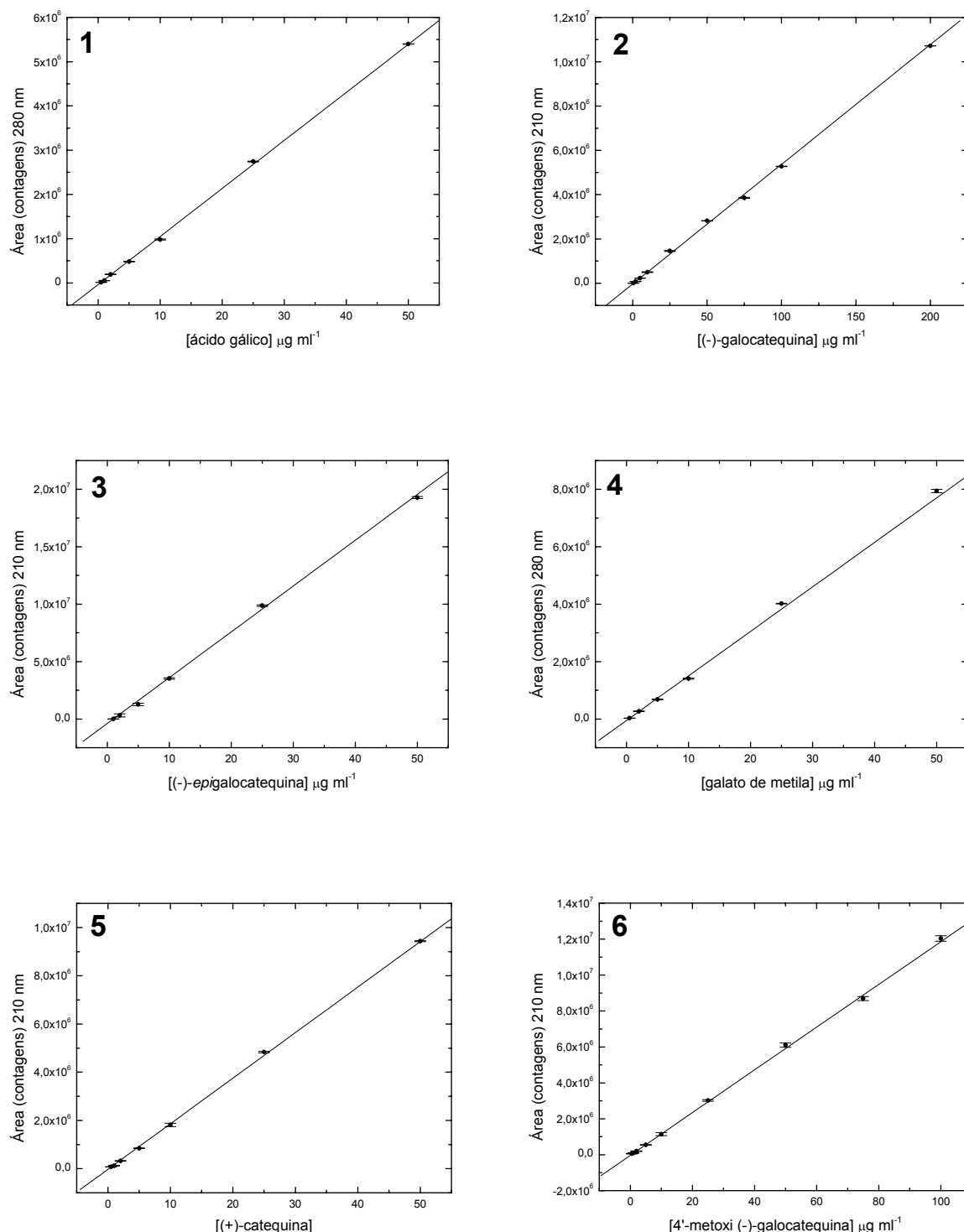


Figura 1.18. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** ácido gálico, **2** $(-)\text{-galocatequina}$, **3** $(-)\text{-epigalocatequina}$, **4** galato de metila, **5** $(+)\text{-catequina}$, **6** $4'\text{-O-metil-galocatequina}$, **7** $(-)\text{-epicatequina}$, **8** galato de $(-)\text{-galocatequina}$, **9** galato de etila, **10** galato de $(-)\text{-epicatequina}$.

Continuação da Figura 1.18

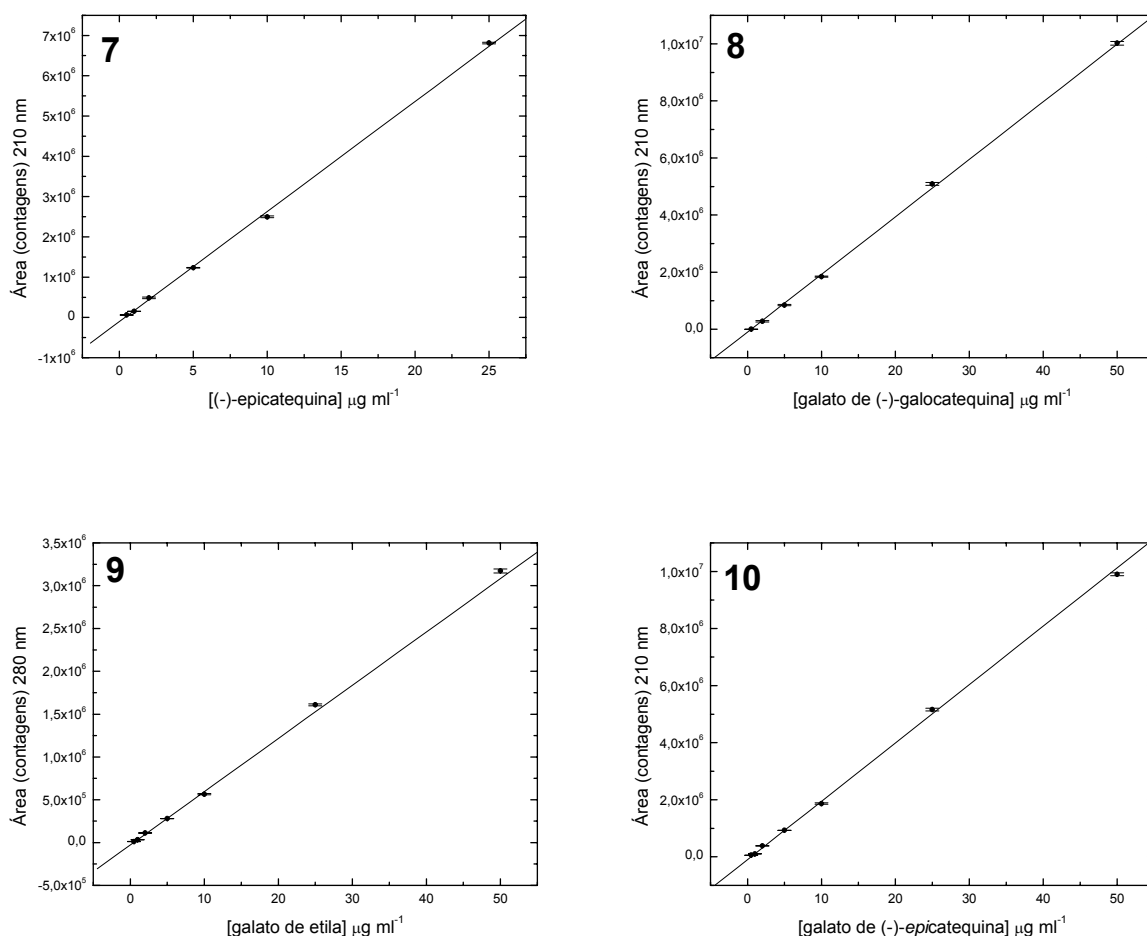


Figura 1.18. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** ácido gálico, **2** (-)-galocatequina, **3** (-)-epigalocatequina, **4** galato de metila, **5** (+)-catequina, **6** 4'-O-metil-galocatequina, **7** (-)-epicatequina, **8** galato de (-)-galocatequina, **9** galato de etila, **10** galato de (-)-epicatequina.

A Figura 1.19 ilustra a separação de 7 catequinas e 3 derivados de ácidos fenólicos. A separação usando o gradiente de eluição da Tabela 1.2 resultou em picos com resolução cromatográfica significativa ($R_s = 1,28$ entre os picos 8 e 9), embora os picos 5 e 6 tenham apresentado um valor menor ($R_s = 0,62$), mas que não influenciou em análises posteriores pelo fato de não ter sido observado a presença de catequinas metoxiladas nos experimentos de caracterização do infuso de *H. speciosa* por FIA-ESI-IT-MS/MS. Além do mais uma curva analítica individual usando (+)-catequina foi construída e usada para a avaliação deste metabólito na matriz estudada.

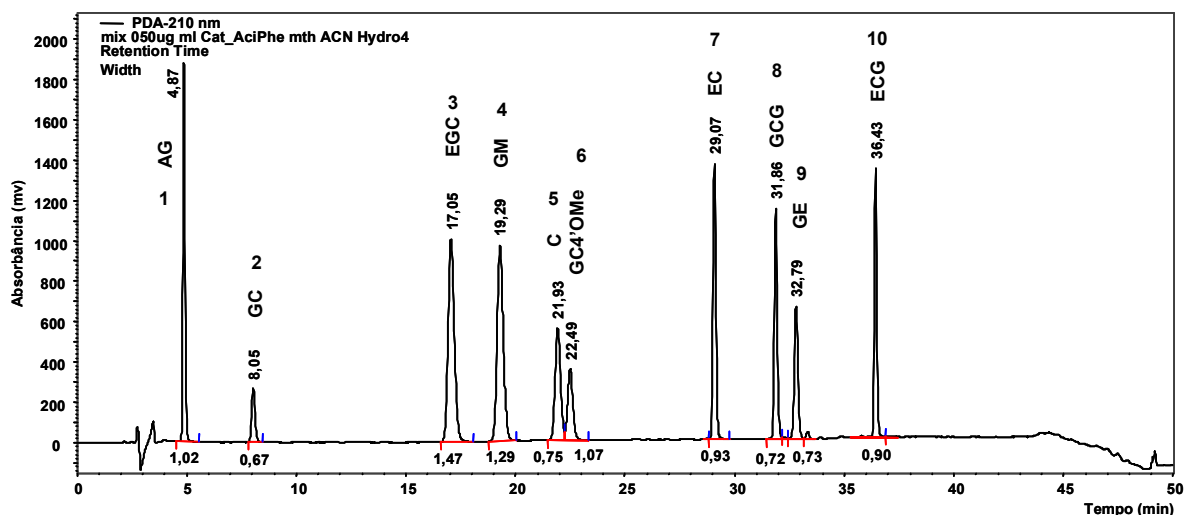


Figura 1.19. Separação cromatográfica de uma mistura de padrões contendo catequinas e derivados de ácidos fenólicos. Identificação dos picos eluídos: **1** ácido gálico (AG), **2** (-)-galocatequina (GC), **3** (-)-epigalocatequina (EGC), **4** galato de metila (GM), **5** (+)-catequina (C), **6** 4'-O-metil-galocatequina (GC4'OMe), **7** (-)-epicatequina (EC), **8** galato de (-)-galocatequina (GCG), **9** galato de etila (GE), **10** galato de (-)-epicatequina (ECG). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Gradiente de eluição cromatográfica usado na separação de catequinas e derivados de ácidos fenólicos

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + TFA 0,05%	ACN + TFA 0,05%	0	8
		15	8
		30	20
		40	40
		45	100
		50	100

No entanto, apesar de ter ocorrido a separação completa dos padrões empregados no desenvolvimento da rampa de eluição cromatográfica (Tabela 1.2), foi verificado que durante a eluição da amostra (infuso das cascas de *H. speciosa*) as proantocianidinas com alto grau de polimerização eluíram como uma extensa banda cromatográfica a partir de $t_r = 25$ min (Fig. 1.20). Esse comportamento cromatográfico resultou em baixa resolução de linha de base para os picos eluídos neste intervalo.

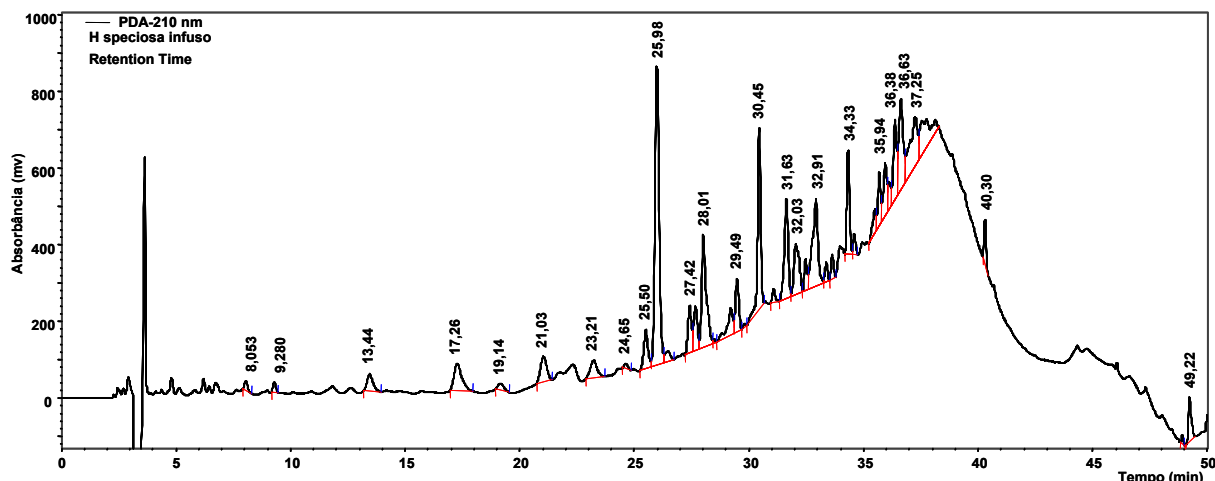


Figura 1.20. Separação cromatográfica dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de *H. speciosa*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.2).

Uma nova modificação na rampa de eluição cromatográfica foi implementada com a finalidade de minimizar esse efeito e facilitar a integração da área dos picos de interesse. Neste caso, a alternativa encontrada foi aumentar a velocidade de modificação da concentração do solvente B, reduzindo o tempo de corrida cromatográfica, adiantando a eluição dos componentes monoméricos e retardando ao máximo a eluição das proantocianidinas poliméricas. Este resultado foi alcançado usando a configuração do gradiente ilustrado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Gradiente de eluição usado na separação dos metabólitos encontrados na infusão das cascas de *H. speciosa*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + TFA 0,05%	ACN + TFA 0,05%	0	5
		25	27
		30	100
		35	100

A partir da avaliação do cromatograma da Figura 1.21, nota-se que ocorreu uma melhora na resolução cromatográfica para a eluição do infuso das cascas de *H. speciosa*. Além de ter ocorrido uma separação mais rápida (35 min) houve ainda uma maior seletividade na eluição dos taninos condensados que foram eluídos como um pico simples em $t_r = 29,93$ min.

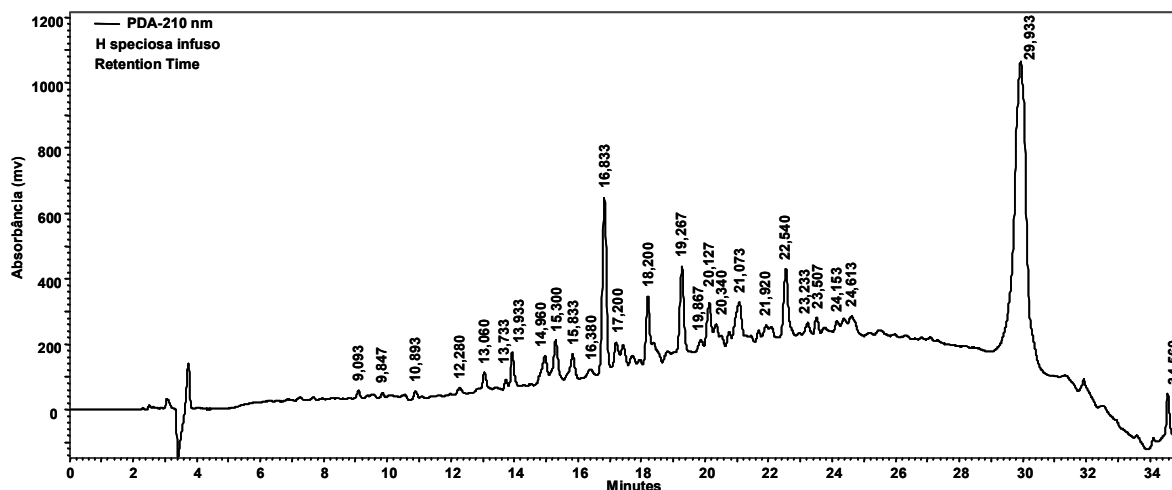


Figura 1.21. Separação cromatográfica dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de *H. speciosa*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.3).

Desta maneira, as curvas analíticas usando os padrões de catequinas e derivados de ácidos fenólicos foram construídas empregando o gradiente de eluição da Tabela 1.3.

Os parâmetros estatísticos que definiram as funções lineares para cada uma das curvas analíticas são mostrados na Tabela 1.4, sendo que todas as curvas apresentaram coeficientes de correlação (*r*) superiores a 0,99.

Tabela 1.4. Dados de regressão linear para os padrões empregados na elaboração das curvas analíticas

Padrões*	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)**	Faixa linear (µg mL ⁻¹)	LOD (µg mL ⁻¹)	LOQ (µg mL ⁻¹)
AG	4173	108548	0,9998	0,5-50	0,13	0,38
GC	10416	540628	0,9998	0,5-200	0,06	0,19
EGC	2619	35911	0,9997	1-50	0,12	0,35
GM	6887	154989	0,9984	0,5-50	0,14	0,44
C	8628	188710	0,9997	0,5-50	0,15	0,46
GC4'OMe	5619	118836	0,9995	0,5-100	0,16	0,47
EC	10168	273259	0,9995	0,5-25	0,12	0,37
GCG	2920	201663	0,9997	0,5-50	0,05	0,14
GE	3046	62183	0,9992	0,5-50	0,16	0,49
ECG	9889	204399	0,9991	0,5-50	0,16	0,48

* ácido gálico (AG), (-)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina (EGC), galato de metila (GM), (+)-catequina (C), 4'-O-metil-galocatequina (GC4'OMe), (-)-epicatequina (EC), galato de (-)-galocatequina (GCG), galato de etila (GE) e galato de (-)-epicatequina (ECG).

** Todas as curvas analíticas apresentaram significância *P* > 0,0001.

O limite de detecção (LOD) foi determinado como o sinal equivalente a 3,3 vezes o valor entre a razão do coeficiente linear (a) pelo coeficiente angular (b)

$(3,3 \times \frac{a}{b})$ obtidos pela equação da reta da curva analítica de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta razão ($10 \times \frac{a}{b}$) (RIBANI *et al.*, 2004).

Aplicação do método quantitativo

A determinação da concentração das catequinas presentes nas cascas de *H. speciosa* foi realizada diretamente no infuso recém preparado. Desta maneira, tentou-se chegar a resultados mais representativos com relação a real composição dos metabólitos secundários e assim, evitar possíveis erros sistemáticos referentes ao número de etapas e manipulações envolvidas nos procedimentos de LLE e SPE.

Na avaliação da amostra, foi considerada apenas a quantidade de cascas usada no preparo da infusão e a diluição necessária para garantir que os principais picos identificados e/ou caracterizados como derivados de catequinas estivessem contidos no intervalo linear proposto pelas curvas analíticas. Os valores ótimos encontrados foram 500 mg de cascas para 50 mL de diluição.

O cromatograma da Figura 1.22 ilustra a separação das catequinas e proantocianidinas poliméricas nas condições ótimas obtidas para a investigação quantitativa do infuso das cascas de *H. speciosa*.

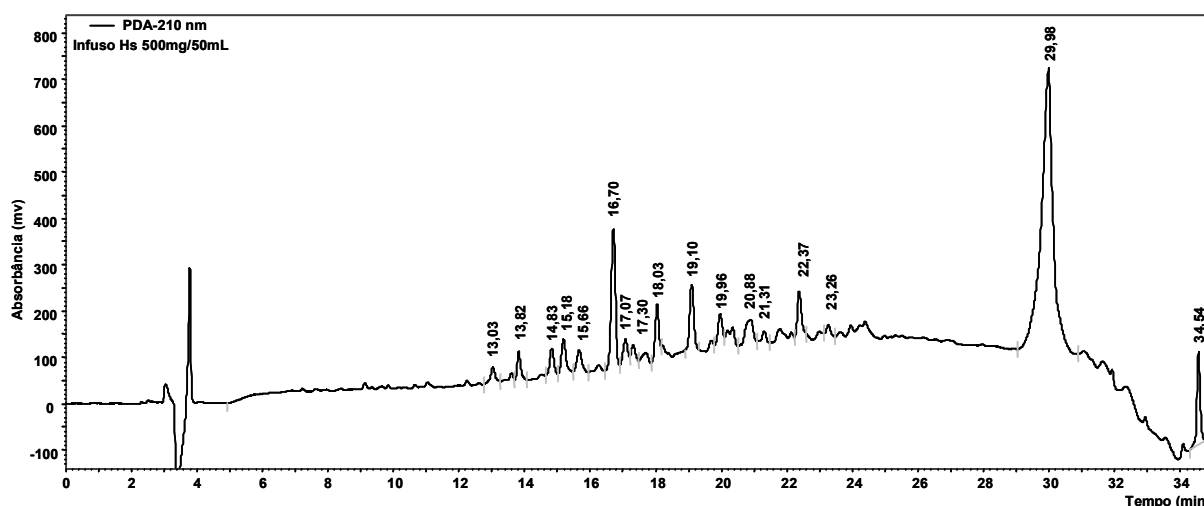


Figura 1.22. Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos metabólitos secundários encontrados no infuso das cascas de *H. speciosa*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 1.3).

Os infusos foram preparados em duplicata de extração a partir de amostragens realizadas no mesmo lote contendo o material vegetal previamente triturado e homogeneizado. As injeções foram feitas em triplicata e as áreas dos picos que exibiram espectros de UV típicos de catequinas, banda fraca em torno de 280 nm e máximo entre 205-210 nm (ROHR *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000), foram calculadas com auxílio do software *EZChrom Elite*.

A concentração individual dos picos cromatográficos indicados na Tabela 1.5 foi estabelecida a partir das curvas analíticas obtidas com os padrões de catequinas. Com o auxílio do detector PDA, cada pico cromatográfico encontrado no infuso das cascas de *H. speciosa* teve seu espectro de UV comparado com o dos padrões e a escolha da curva empregada na quantificação foi estabelecida de acordo com o máximo de similaridade entre o padrão e o analito quantificado.

Os picos cromatográficos que exibiram baixa reprodutibilidade durante a etapa de integração de suas áreas foram preteridos e nesta avaliação quantitativa foi considerada apenas a integração dos picos que apresentaram coeficiente de variação menor que 10%. O teor das catequinas na matriz foi determinado com base na seguinte equação:

$$(teor) \% = [\mu g / mL] \times \frac{\text{volume diluição (mL)}}{\text{massa amostra (g)} \times 10^6} \times 100$$

Estudos realizados com chás mostram diferenças significativas nos valores de catequinas totais (PELILLO *et al.*, 2002), principalmente quando vários métodos de extração são comparados (YAO *et al.*, 2004). Em suma, nos chás verdes são encontrados altos teores de catequinas, os quais podem chegar até a 70% de sua composição. Nos chás pretos essa quantidade é bem inferior e supõe-se que a baixa concentração é ocasionada por processos de oxidação e/ou polimerização, os quais são promovidos nesse tipo de matriz (PELILLO *et al.*, 2002). Levando em conta este fator, podemos também sugerir que o baixo valor de 16,26 mg g⁻¹ encontrado para *H. speciosa* pode estar associado a esses processos.

Uma aproximação referente à integração da área do pico de $t_r = 29,98$ min (Fig. 1.22) indicou uma estimativa de concentração superior a 13 mg g⁻¹ para os taninos com alto grau de polimerização presentes nas cascas de *H. speciosa*,

indicando que grande parte da composição desta planta é devido à presença desses polímeros.

Tabela 1.5. Concentrações dos derivados de catequinas encontrados nas cascas de *H. speciosa*

catequinas Picos t_r (min)	[catequinas] \pm DP ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[catequinas] \pm DP (mg g^{-1})	CV ^b	Teor (%)	Curva ^c
13,03	3,07 \pm 0,06	0,31 \pm 0,01	2,00	0,03	(-)-GC
13,82	7,82 \pm 0,36	0,78 \pm 0,02	4,55	0,08	(+)-C
14,83	8,96 \pm 0,10	0,90 \pm 0,01	1,16	0,09	(-)-ECG
15,18 (C)	11,30 \pm 1,09	1,13 \pm 0,05	9,62	0,11	(+)-C
15,66	nq ^d	nq ^d	nq ^d	nq ^d	nq ^d
16,70	24,54 \pm 0,47	2,45 \pm 0,03	1,93	0,25	(+)-C
17,07	6,36 \pm 0,58	0,64 \pm 0,03	9,12	0,06	(-)-EC
17,30	10,07 \pm 0,04	1,01 \pm 0,01	0,44	0,10	(+)-C
18,03 (EC)	9,74 \pm 0,12	0,97 \pm 0,01	1,21	0,10	(-)-EC
19,10	15,24 \pm 0,07	1,52 \pm 0,01	0,48	0,15	(-)-EC
19,96 (EGCG)	14,51 \pm 0,07	1,45 \pm 0,01	0,48	0,15	(-)-GCG
20,88	8,88 \pm 0,47	0,89 \pm 0,03	5,33	0,09	(-)-GC
21,31	6,55 \pm 0,27	0,66 \pm 0,03	4,12	0,07	(-)-GC
22,37	26,52 \pm 0,77	2,65 \pm 0,04	2,89	0,27	(-)-GCG
23,26	6,72 \pm 0,20	0,67 \pm 0,01	2,95	0,07	(-)-EGC
34,54	2,33 \pm 0,13	0,23 \pm 0,01	5,66	0,02	(-)-GC
Total de catequinas	162,61 \pm 1,69	16,26 \pm 0,08	-	1,64	-
Estimativa de taninos poliméricos	131,64 \pm 6,51	13,16 \pm 0,33	-	1,32	(-)-GCG

^a DP: desvio padrão para $n = 6$.

^b CV: coeficiente de variação.

^c Curva analítica empregada na quantificação com base na similaridade espectral.

^d nq: não quantificado (ácido clorogênico).

Quando comparamos o resultado encontrado para *H. speciosa* com aqueles publicados na literatura para catequinas presentes em chás, constatamos que *H. speciosa* é mais pobre do que, por exemplo, o chá verde das folhas de *Camellia sinensis* (45,23 mg g^{-1} de folhas) (DALLUGE *et al.*, 1998). No entanto, *H. speciosa* apresenta um teor de catequinas totais não poliméricas bem superior àquele descrito por PELLILLO *et al.* (2002) em chás pretos (3,4 mg g^{-1}).

Em resumo, vários estudos que relacionam o consumo de chás indicam que catequinas e taninos possuem propriedades medicinais, tais como antiviral, antibacteriana, antiinflamatória, antiséptica, antitumoral, diurética, contra diarreia e inibição seletiva da replicação do HIV (NAKASHIMA *et al.*, 1992; KHANBABAEE & VAN REE, 2001). Sendo assim, acreditamos que a quantidade desses metabólitos em *H. speciosa*, principalmente dos taninos condensados, possa resultar em um efeito similar aquele de plantas reconhecidamente ativas.

Capítulo 2:

Gênero *Davilla* (Dilleniaceae)

A família Dilleniaceae é composta por 11 gêneros (*Acrotrema*, *Curatella*, *Davilla*, *Didesmandra*, *Dillenia*, *Doliocarpus*, *Hibbertia*, *Pachynema*, *Pinzona*, *Schumacheria* e *Tetracera*) e existem aproximadamente 400 espécies catalogadas (GURNI & KUBITZKI, 1981). Os indivíduos pertencentes a essas gêneros são classificados como árvores, arbustos ou lianas. Apresentam folhas alternas inteiras, penínervias, sem estípulas e geralmente com células epidérmicas impregnadas de sílica o que lhes conferem certa aspereza ao tato (BARROSO *et al.*, 1978, SOARES, *et al.*, 2005). A ocorrência é predominante nas regiões de Cerrado de todo o mundo.

Dados etnobotânicos revelam que determinadas espécies da família Dilleniaceae são empregadas na medicina tradicional com diferentes indicações. *Curatella americana* L. é empregada como antiinflamatório e antiúlcera (CORRÊA, 1984). *D. rugosa* Poir. é utilizada como antiinflamatório, antiúlcera, purgativo, estimulante, afrodisíaco e tônico (CORRÊA, 1984). *D. elliptica* é empregada como adstringente, tônico, laxativo, sedativo, diurético (RODRIGUES & CARVALHO, 2001), no tratamento de hemorróidas, hérnia e diarreia, e em aplicações tópicas como antisséptico na limpeza de ferimentos (SILVA *et al.*, 2001).

Davilla é um gênero neotropical que consiste de 20 espécies, 11 das quais foram investigadas por GURNI & KUBITZKI (1981) em um estudo de sistemática sobre a composição química de flavonóides (Tabela 2.1). Os autores mostraram que os flavonóides miricetina-3-O-rhamnosídeo e quercetina-3-O-rhamnosídeo possuem ocorrência predominante em todas as espécies pesquisadas.

Na literatura recente existem poucos relatos sobre o gênero *Davilla*, principalmente do ponto de vista químico. DAVID e colaboradores (1996) realizaram o estudo fitoquímico das folhas de *D. flexuosa* e isolaram o α -tocoferol do extrato hexânico. Da porção acetato de etila estes autores obtiveram os flavonóis miricetina, quercetina, miricetina-3-O-rhamnosídeo e miricetina-3'-O-rhamnosídeo.

Com relação às atividades observadas, GUARALDO e colaboradores (2001) detectaram efeito antiulcerogênico para o extrato hidroalcoólico e em frações enriquecidas de *D. rugosa*. Nesta espécie os autores identificaram a presença de flavonóides e saponinas através de triagem fitoquímica do extrato e frações.

Levantamento etnofarmacológico indicou o uso popular de *D. nitida* e *D. elliptica* (Fig. 2.1) para o tratamento de úlceras gástricas. Desta forma, foi iniciada uma investigação sobre a composição química destas duas espécies.

Davilla nitida é um arbusto trepador, sendo popularmente conhecida como sambaibinha ou lixeirinha de rama e ocorre principalmente na borda de mata ciliar. *Davilla elliptica* é conhecida como “lixinha”, devido à aspereza de suas folhas. Floresce de abril a junho e sua época de frutificação é de julho a setembro. Apresenta porte médio de 1,50 m caracterizando-se como subarbustos. Os tricomas são unisseriados, as folhas são hipoestomáticas e o mesofilo é isolateral. Depois de submetida à carbonização, várias células epidérmicas são preservadas, o que indica uma grande quantidade de sílica em suas paredes (OLIVEIRA & CASTRO, 2003). Na medicina popular, o infuso das raízes é utilizado como adstringente tônico e laxativo, possuindo forte efeito purgativo. O banho com folhas frescas é indicado em caso de linfatismo, inchações e orquites (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).



Figura 2.1. Esquerda, folhas frutos e inflorescência de *D. nitida*. Disponível em: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?imagx=10900112 acesso em: 26/03/2007. Direita, folhas e frutos de *D. elliptica*. Disponível em: http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?name=Davilla+elliptica acesso em: 26/03/2007.

Tabela 2.1. Distribuição de flavonóides em 11 espécies de *Davilla*

Davillae	M	Q	K	M3OAra	M3OGal	M3ORha	Q3OGal	Q3OGlc	Q3ORha	K3ORha	M3ORhaSul	PD	PC	PP
<i>D. alata</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>D. macrocarpa</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>D. cearensis</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>D. flexuosa</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>D. angustifolia</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>D. grandiflora</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>D. elliptica</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>D. lacunosa</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>D. kunthii</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>D. nitida</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>D. rugosa</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-

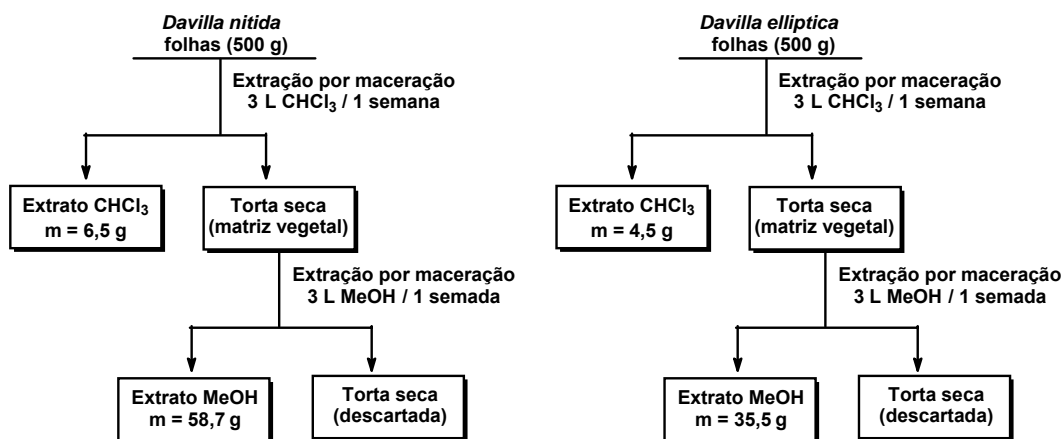
(+) presente, (-) ausente. M = miricetina, Q = quercetina, M3OAra = miricetina-3-O-arabinosídeo, M3OGal = miricetina-3-O-galactosídeo, M3ORha = miricetina-3-O-rhamnosídeo, Q3OGal = quercetina-3-O-galactosídeo, Q3OGlc = quercetina-3-O-glicosídeo, Q3ORha = quercetina-3-O-rhamnosídeo, K3ORha = kaempferol-3-O-rhamnosídeo, M3ORhaSul = miricetina-3-O-rhamnosídeosulfato, PP = prodelfinidina, PC = procianidina, PP = propelargonidina.

Parte experimental / Resultados e discussões

Avaliação do perfil cromatográfico de espécies do gênero *Davilla*

O estudo cromatográfico das espécies do gênero *Davilla* foi iniciado levando em consideração a ocorrência de proantocianidinas e dos flavonóides citados no trabalho de GURNI & KUBITZKI (1981).

As matrizes inicialmente investigadas foram os extratos brutos obtidos nos processos de maceração, os quais são produzidos pelo contato do material vegetal triturado com os solventes atualmente empregados no protocolo de obtenção de extratos vegetais adotado por nosso grupo. O Esquema 2.1 ilustra essas etapas.



Esquema 2.1. Etapas de extração dos constituintes químicos presentes nas folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*.

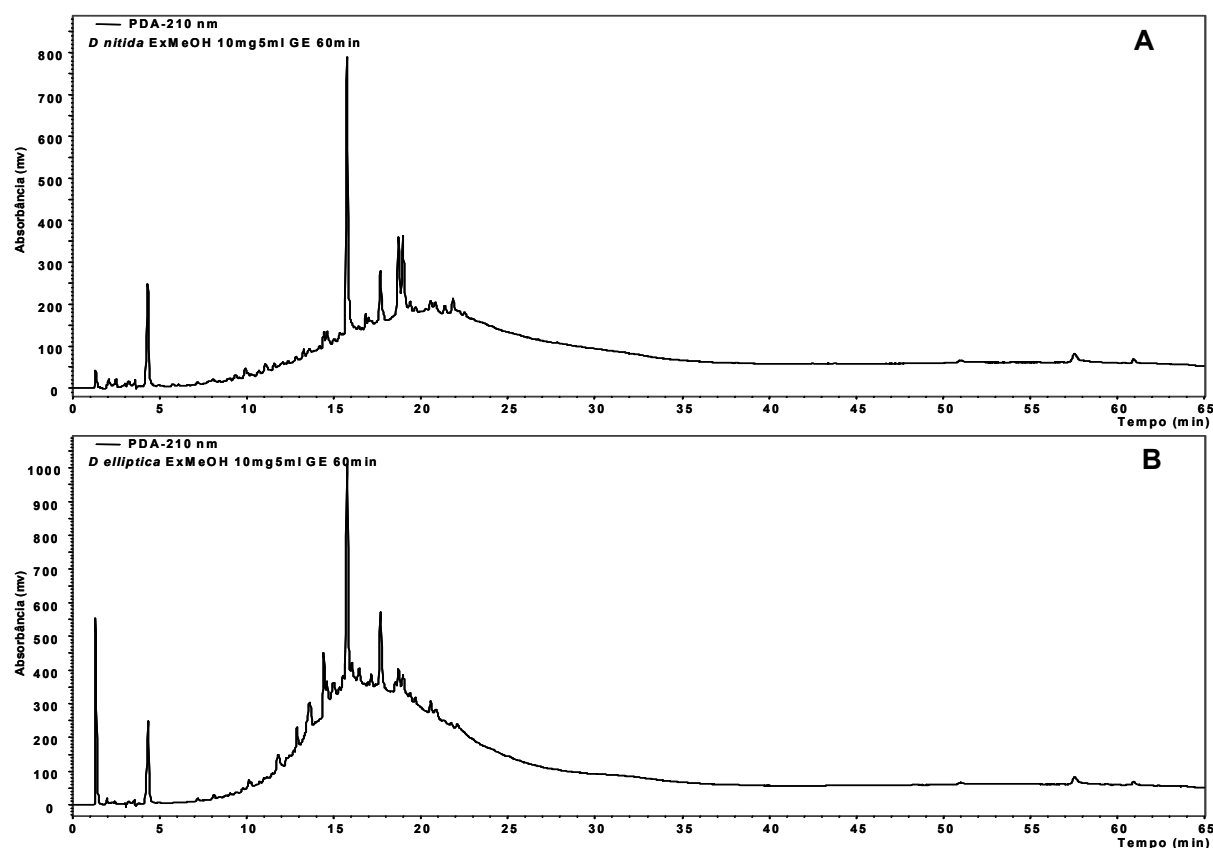
Pequenas quantidades dos extratos MeOH (~10 mg) foram pesadas e transferidas para balões volumétricos de 5 mL. Cada extrato foi dissolvido em uma quantidade mínima de MeOH (~0,5 mL) e o material solubilizado ajustado para o volume final de 5 mL com a mistura MeOH/ H_2O 3:7 v/v. Alíquotas das soluções dos extratos MeOH foram filtradas em membranas de PTFE (0,45 μm), o efluente filtrado foi coletado *in vacuo* e mantido refrigerado até o momento das análises.

A primeira avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos MeOH das espécies de *Davilla* foi feita empregando o gradiente exploratório linear com variação do solvente orgânico (B) na faixa de composição de 5-100% em 60 min (Tabela 2.2). A partir das análises observou-se que o comportamento cromatográfico obtido foi similar ao encontrado para *H. speciosa* (Capítulo 1), em que a presença de taninos condensados conduziu à instabilidade da corrida cromatográfica com a formação de uma banda cromatográfica bastante alargada na região entre t_r = 10-35 min.

Tabela 2.2. Gradiente de eluição exploratório empregado na separação dos constituintes químicos presentes nos extratos MeOH de *D. nitida* e *D. elliptica*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O	ACN	0	5
		60	100
		65	100

Comparação das duas análises também mostrou que *D. nitida* (Fig. 2.2 A) exibiu um comportamento cromatográfico menos afetado, quando comparado ao aspecto cromatográfico de *D. elliptica* (Fig. 2.2 B), indicando que a concentração de taninos condensados deve ser menor nesta espécie do que em *D. elliptica*.

**Figura 2.2.** Perfis cromatográficos dos extratos MeOH de *D. nitida* (A) e *D. elliptica* (B). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC-PAD (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.2).

Acreditamos ainda que o fato do longo tempo entre a produção, armazenamento e secagem dos extratos contribuiu para a polimerização dos taninos condensados, conforme discutido no Capítulo 1, e consequentemente na dificuldade de obtenção de uma análise cromatográfica uniforme. Portanto, para chegar a

resultados mais informativos com relação à composição química dos extratos, iniciou-se as etapas de SPE para os extratos MeOH das duas espécies estudadas.

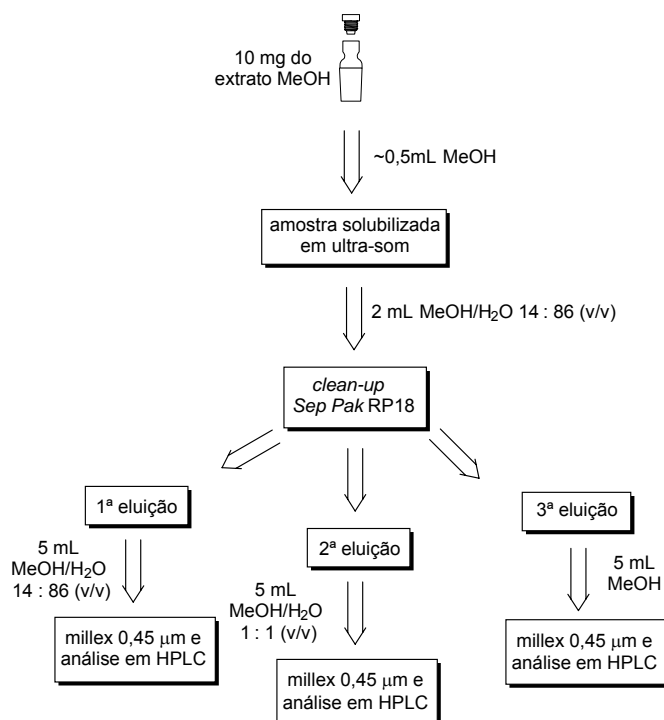
Clean-up em SPE

Clean-up em cartuchos *Sep Pak* RP18 foram realizados empregando 10 mg do extrato MeOH das folhas de *D. nitida* e/ou *D. elliptica*, esse procedimento seguiu as mesmas etapas descritas anteriormente para o estudo de *H. speciosa* (Esquema 1.2 A). Durante o processo de SPE, cartuchos de 500 mg 6 mL⁻¹ (Supelco®) foram pré-condicionados passando sequencialmente 15 mL de MeOH e 10 mL de H₂O.

Amostras previamente solubilizadas em um pequeno volume de solução (~0,5 mL MeOH) foram aplicadas nos cartuchos. Cada eluato foi coletado como uma fração separada e monitorado por TLC em vários sistemas eluentes. As revelações foram feitas com solução metanólica de anisaldeído : ácido sulfúrico : ácido acético seguido de aquecimento em estufa (WAGNER *et al.*, 2003), sendo empregando nesta análise comparativa, catequinas, ácidos fenólicos e flavonóides como substâncias de referência.

A partir das análises por TLC ficou evidenciado que os derivados de ácidos fenólicos, *spots* de cor cinza, além de açúcares livres, haviam sido eluídos preferencialmente no primeiro eluato. Taninos condensados, *spots* de cor marrom escuro, e flavonóides, *spots* de cor amarelo/alaranjado, foram concentrados principalmente no segundo eluato, porém havendo constatação da presença de flavonóides mais polares no primeiro eluato da SPE. No terceiro eluato não foram observados *spots* que caracterizassem a presença das substâncias investigadas. Clorofila, *spot* de cor verde, foi evidenciada no efluente referente à lavagem dos cartuchos com CHCl₃.

Para garantir que houvesse uma dessorção seletiva e conseqüentemente, a separação completa dos flavonóides em uma única fração durante a SPE, misturas em diferentes proporções com diminuição da força de eluição para a obtenção do primeiro eluato foram avaliadas e as condições ótimas encontradas estão representadas no Esquema 2.2.



Esquema 2.2. Etapas de *clean-up* empregadas nos procedimentos de SPE dos extratos MeOH de *D. nitida* e *D. elliptica* em cartuchos de *Sep Pak RP18*.

Testes preliminares usando o gradiente empregado para a separação das catequinas discutido no Capítulo 1 (Sistema 1, Tabela 2.3) mostraram parcial sobreposição entre os flavonóides presentes no segundo eluato da SPE. Esse comportamento foi atribuído ao fato de que as substâncias eluídas com MeOH/H₂O 14:86 v/v possuíam polaridade bem distintas daquelas eluídas com MeOH/H₂O 1:1 v/v. Portanto, para avaliar a composição química do segundo e terceiro eluatos da SPE houve a necessidade de aplicar um segundo sistema gradiente de eluição (Sistema 2, Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Gradientes de eluição usados na separação dos metabólitos de *D. nitida*

Sistema 1			
Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O	ACN	0	5
		50	20
		60	100
Sistema 2			
H ₂ O	ACN	0	20
		20	40
		55	100
		60	100

A partir das análises cromatográficas foi possível comprovar as observações evidenciadas com as triagens realizadas por TLC. Com auxílio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm, obteve-se os espectros na região do UV para os picos eluídos. O cromatograma da Figura 2.3 representa a análise por HPLC-PAD do primeiro eluato da SPE e um único pico em $t_r = 13,20$ min, com intensidade significativa, apresentou espectro na região do UV equivalente ao de um derivado do ácido gálico, com bandas de máximos de absorção intensas em 215 e 271 nm (ROHR *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000).

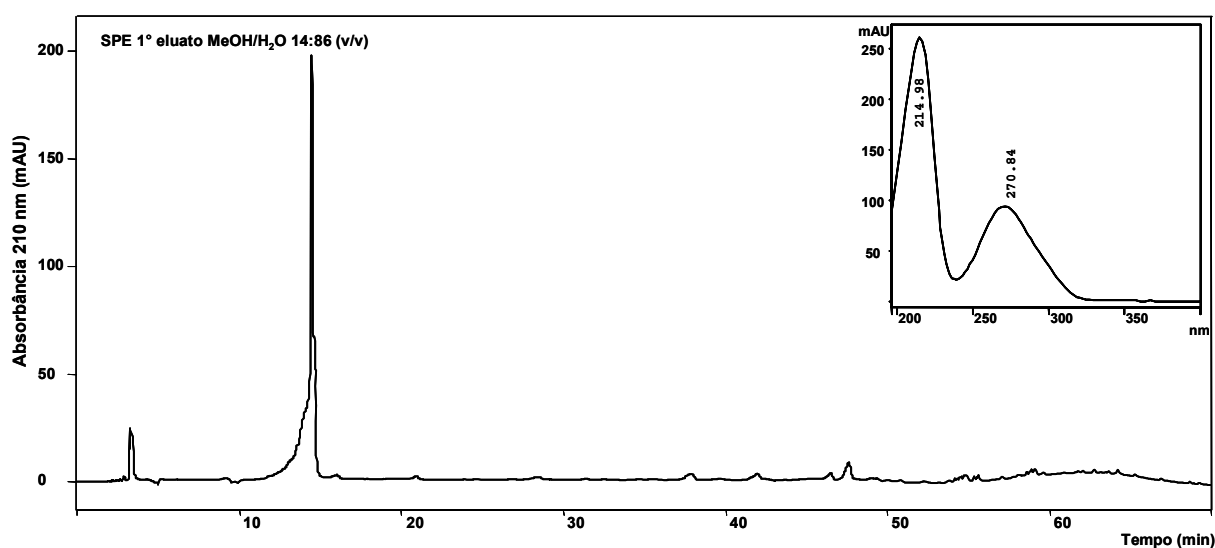
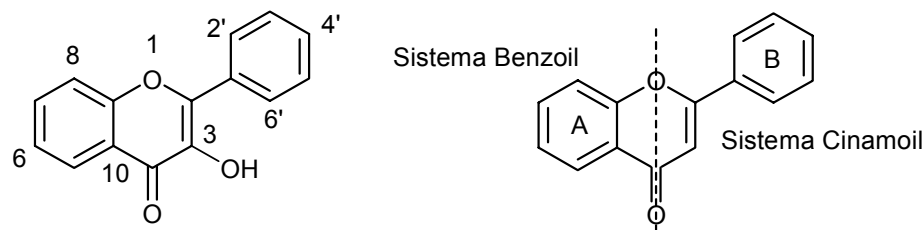


Figura 2.3. Separação cromatográfica por HPLC-PAD do primeiro eluato (MeOH/H₂O 14:86, v/v) do extrato MeOH de *D. nitida* submetido ao processo de SPE em cartucho Sep Pak de RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 210$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.3, Sistema 1).

Outros picos com intensidades relevantes foram obtidos por HPLC após a análise do segundo eluato da SPE (Fig. 2.4A). Com auxílio do detector PAD foi verificado que os espectros na região do UV para os picos eluídos em $t_r = 5,70$; 8,34; 14,39; 21,67; 23,53; 35,71 e 47,47 min eram compatíveis com os de flavonóides, os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (MERKEN & BEECHER, 2000).

A Banda I é associada a absorção do Anel B (sistema cinamoil) e a Banda II é atribuída ao Anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil (Esquema. 2.3).



Esquema 2.3. Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.

O pico bastante alargado ao final da análise, com ápice em $t_r = 51,91$ min (Fig. 2.5A), exibiu espectros na região do UV característicos ao logo da sua eluição, com máximos de absorção intensos em torno de 206 nm e bandas de máximo de absorção menos intensas próximas de 276 nm, sendo este pico atribuído a presença dos taninos condensados (DE PASCUAL-TERESA *et al.*, 2000; ROHR *et al.*, 2000).

No cromatograma do terceiro eluato da SPE (Fig. 2.4B) não foram observados picos com informações espectrais relevantes que resultassem na indicação de uma classe de metabólito secundário.

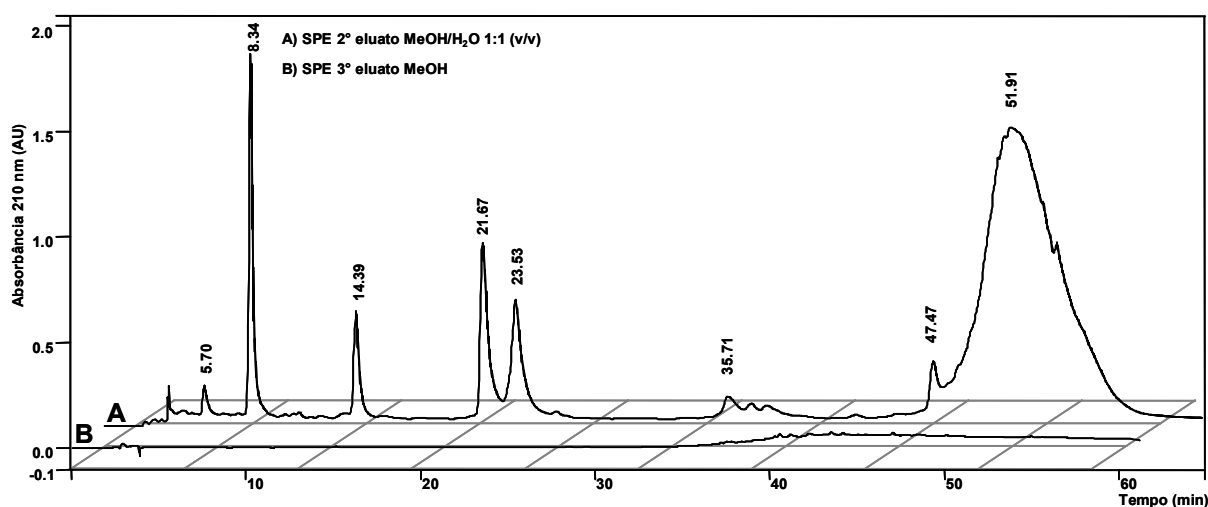
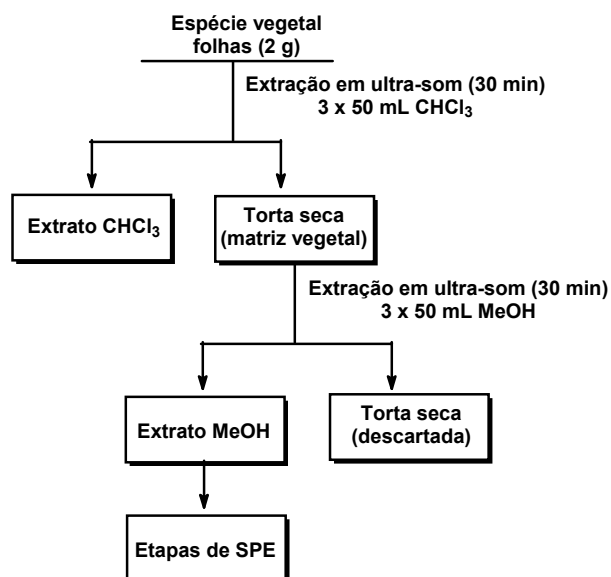


Figura 2.4. Separação cromatográfica por HPLC-PAD do segundo eluato (MeOH/H₂O 1:1, v/v) (A) e do terceiro eluato (MeOH 100%) (B) do extrato MeOH de *D. nitida* submetido ao processo de SPE em cartucho *Sep Pak* de RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 210$ nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.3, Sistema 2).

Para eliminar parte da interferência causada pela grande quantidade dos taninos encontrados nos extratos MeOH, foi realizada uma etapa de obtenção dos extratos em um espaço de tempo menor. Esta estratégia consistiu em realizar a transposição do protocolo original descrito no Esquema 2.1 para um procedimento de pequena escala que possibilitasse gerar os extratos diariamente para análises de rotina, conforme ilustrado no Esquema 2.4.

Ao mesmo tempo, inspeção do cromatograma do segundo eluato (MeOH/H₂O 1:1 v/v) havia ainda revelado que os picos eluídos acima de 18 minutos (Fig. 2.4A) apresentaram baixa resolução cromatográfica com notável encaudamento e alargamento dos picos, provavelmente ocasionada pela interação dos compostos fenólicos com silanóis livres da coluna de fase reversa (KIRKLAND *et al.*, 1997). Ou ainda, pelo fato dessas substâncias apresentarem um equilíbrio ácido-base em meio neutro e assim contribuir para o surgimento de efeitos indesejados, como variações no tempo de retenção, falta de reprodutibilidade entre as análises e baixa eficiência cromatográfica (SNYDER *et al.*, 1997). Alguns autores reportam que a variação do pH com o uso de diferentes modificadores ácidos pode minimizar esses problemas (DALLUGE *et al.*, 1998; SCHIEBER *et al.*, 2001).



Esquema 2.4. Procedimento de produção dos extratos MeOH empregados nas análises de rotina.

Desta forma, optou-se por avaliar o uso de dois modificadores, o ácido trifluoracético (TFA, $pK_a = 2$) e o ácido fórmico ($pK_a = 3,8$) em conjunto com a fase móvel empregada na eluição dos metabólitos secundários encontrados nas espécies investigadas.

A presença de TFA 0,05% v/v ou ácido fórmico 0,2% v/v na fase móvel promoveu uma melhora na resolução cromatográfica dos metabólitos secundários eluídos durante as análises cromatográficas, principalmente com redução do alargamento dos picos. No entanto, optou-se em empregar apenas TFA 0,05% v/v como modificador ácido para as demais análises realizadas durante o

desenvolvimento do trabalho. Esta escolha foi feita levando em consideração que a concentração mais elevada de ácido fórmico poderia gerar um desgaste mais efetivo no equipamento de HPLC.

Assim, a adição de TFA na fase móvel, bem como a elaboração de uma nova rampa de eluição possibilitou analisar os três eluatos da SPE nas mesmas condições (Tabela 2.4). Adicionalmente, a obtenção recente dos extratos contribuiu para a minimização dos efeitos causados pela presença taninos condensados. Essas estratégias levaram à obtenção de picos bem resolvidos com separação de linha de base e conduziram à visualização de picos que antes estavam co-eluinto (Figura 2.5).

Tabela 2.4. Gradiente de eluição usado na separação dos constituintes químicos presentes nas folhas de *D. nitida*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + 0,05% TFA	ACN + 0,05% TFA	0	32
		20	35
		60	75
		61	100
		65	100

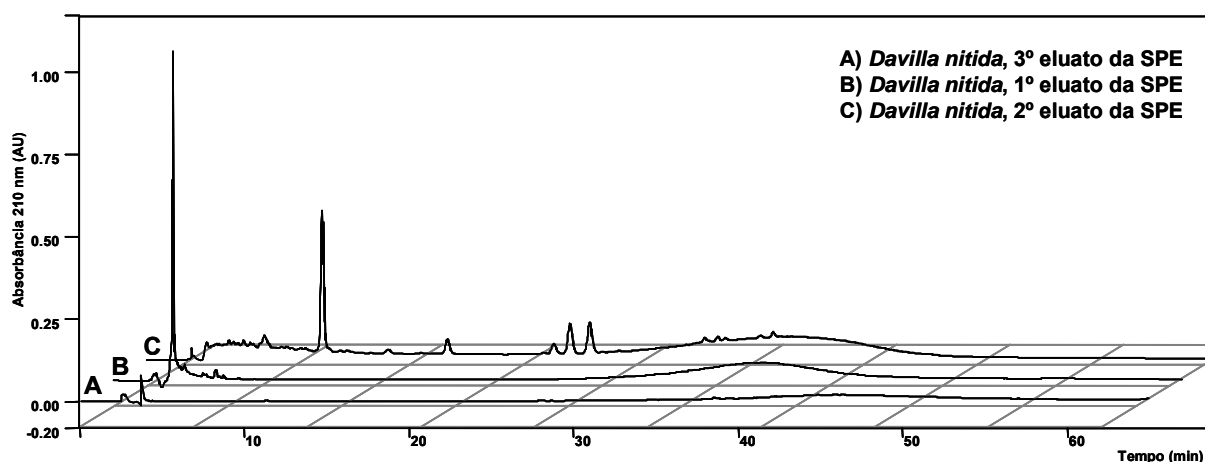


Figura 2.5. Efeito da presença do ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 0,05 % v/v durante a separação dos constituintes químicos presentes nos três eluatos da SPE de *D. nitida*. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4).

Embora taninos e flavonóides tenham sido dessorvidos em uma mesma fração, é importante ressaltar que os flavonóides podem ser monitorados sem que os taninos remanescentes aos processos de preparação das amostras promovam algum tipo de interferência efetiva, isto é possível devido fato dos flavonóides

possuírem uma banda de máximo de absorção que lhes é característica (Fig. 2.6). Portanto, a escolha de um comprimento de onda que esteja acima da faixa de absorção dos taninos confere seletividade na avaliação de flavonóides em mistura com taninos condensados.

Desta forma, os cromatogramas referentes ao primeiro eluato da SPE (MeOH/H₂O 2:8 v/v) foram processados no comprimento de onda de 210 nm, evidenciando que o procedimento de extração foi seletivo e que todos os flavonóides permaneceram retidos no suporte empregado na SPE. Por sua vez, os cromatogramas do segundo eluato da SPE (MeOH/H₂O 1:1 v/v) foram processados em 360 nm, garantido maior especificidade na detecção dos analitos investigados, fator que conduziu a obtenção de análises cromatográficas com resolução de linha de base, favorecendo assim a identificação dos picos cromatográficos de menor intensidade e consequentemente na integração de suas áreas durante as avaliações quantitativa desta matriz.

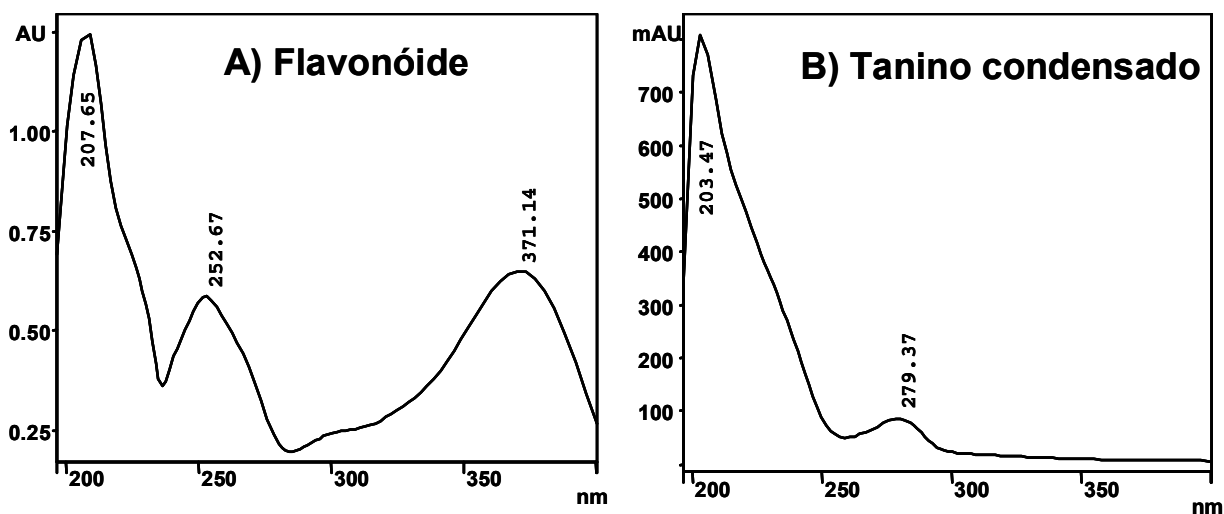


Figura 2.6. Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para flavonóides (A) e taninos condensados (B).

Identificação dos metabólitos secundários

Sob a condição de eluição descrita na Tabela 2.4, os principais picos eluídos durante as análises por HPLC-PAD dos extratos MeOH das duas espécies foram identificados pela comparação dos seus espectros na região do UV, pela comparação dos seus tempos de retenção com o de padrões comerciais e/ou substâncias isoladas de outras espécies vegetais, ou ainda por experimentos de co-injeção.

Em *D. elliptica*, os picos: 1 (t_r = 3,61 min), 3 (t_r = 9,98 min), 4 (t_r = 11,00 min), 5 (t_r = 11,52 min), 6 (t_r = 15,64 min), 8 (t_r = 18,43 min), 9 (t_r = 24,56 min) e 12 (t_r = 37,30 min) dos cromatogramas das Figuras 2.7A e 2.7B foram identificados como: ácido gálico, rutina, miricetina-3-O- α -rhamnosídeo, quercetina-3-O- β -galactosídeo, quercetina-3-O- α -arabinosídeo, quercetina-3-O- α -rhamnosídeo, miricetina e quercetina, respectivamente.

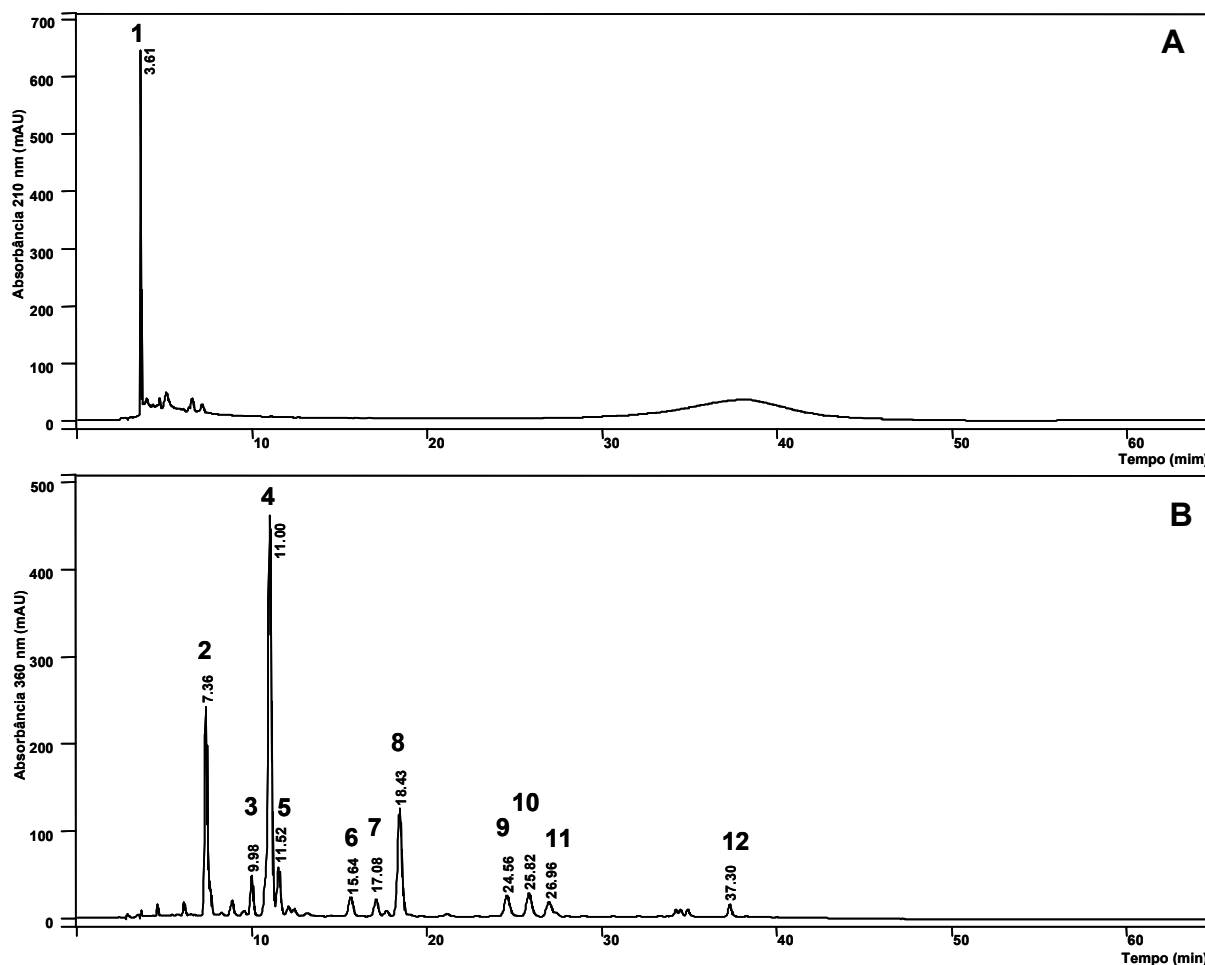


Figura 2.7. Identificação dos constituintes químicos de *D. elliptica* eluídos durante as análises cromatográficas do primeiro eluato da SPE (A) monitorado em 210 nm e do segundo eluato da SPE (B) monitorado em 360 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4).

Em *D. nitida*, os picos: 1 (t_r = 3,60 min), 3 (t_r = 9,76 min), 4 (t_r = 10,67 min), 6 (t_r = 18,28 min), 7 (t_r = 24,73 min), e 12 (t_r = 37,30 min) dos cromatogramas das Figura 2.8A e 2.8B foram identificados como: ácido gálico, rutina, miricetina-3-O- α -rhamnosídeo, quercetina-3-O- α -rhamnosídeo, miricetina e quercetina, respectivamente.

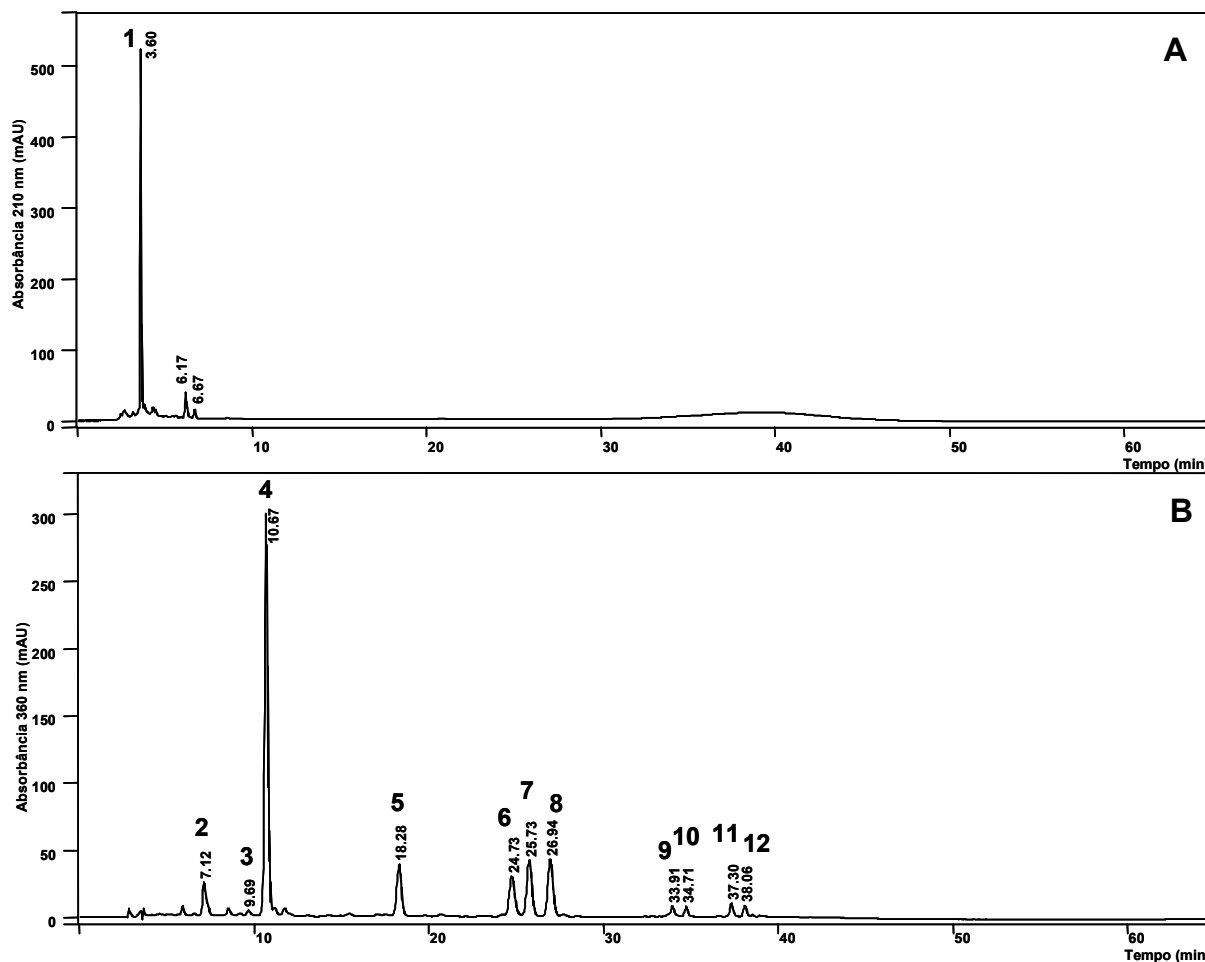


Figura 2.8. Identificação dos constituintes químicos de *D. nitida* eluídos durante as análises cromatográficas do primeiro eluato da SPE (A) monitorado em 210 nm e do segundo eluato da SPE (B) monitorado em 360 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4).

Comparação dos perfis cromatográficos *Davilla nitida* e *Davilla elliptica*

Na sequência, foi realizada a comparação dos perfis cromatográficos das duas espécies de *Davilla*, tendo em vista que foram estabelecidas as condições ótimas empregadas durante a SPE (Esquema 2.2), bem com a elaboração de um sistema de eluição cromatográfico (Tabela 2.4) que possibilitou a avaliação dos três eluatos em condições equivalentes.

Os cromatogramas para o primeiro eluato (MeOH/H₂O 14:86 v/v) da SPE de *D. nitida* (Fig. 2.9A) e *D. elliptica* (Fig. 2.9B) revelaram que a composição destas espécies é relativamente pobre, no que diz respeito a presença de derivados de ácidos fenólicos e catequinas, destacando apenas a ocorrência predominante do ácido gálico (t_r = 3,6 min).

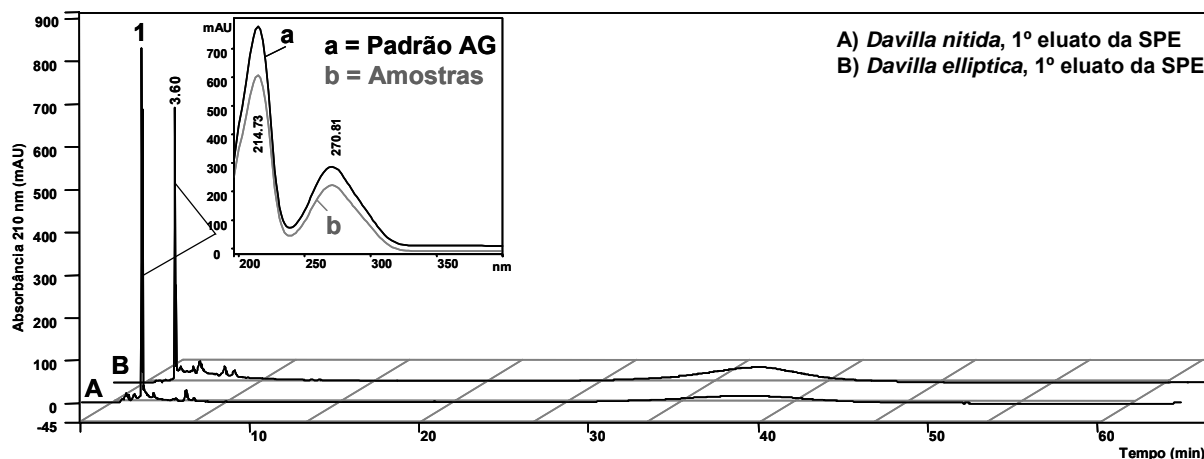


Figura 2.9. Cromatogramas de separação por HPLC monitorados em 210 nm. Análise do primeiro eluato obtido após *clean-up* de 10 mg dos extratos MeOH das folhas de *D. nitida* (A) e *D. elliptica* (B). Padrão AG = padrão de ácido gálico (a), substâncias identificadas (b). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4).

Averiguação, com auxílio do detector PAD em outros comprimentos de onda, revelou que não houve a eluição em quantidades significativas dos flavonóides, comprovando que ocorreu seletividade durante o processo de SPE com retenção desta classe de substância no suporte utilizado e para a mistura de solventes empregada na primeira dessorção.

Análise dos cromatogramas referentes ao segundo eluato (MeOH/H₂O 1:1 v/v) da SPE (Fig. 2.10) para as duas espécies investigadas mostrou evidências de que os flavonóides são os metabólitos secundários predominantes e que há grande similaridade quanto ao conteúdo flavonoídico das espécies.

Aparentemente a diferença entre os flavonóides de *D. nitida* (Fig. 2.10A) e *D. elliptica* (Fig. 2.10B) é de ordem quantitativa, uma vez que visualmente podem ser notadas disparidades entre as intensidades de absorção dos picos cromatográficos eluídos. Porém, essa observação será confirmada e discutida mais adiante na etapa que envolveu as análises quantitativas.

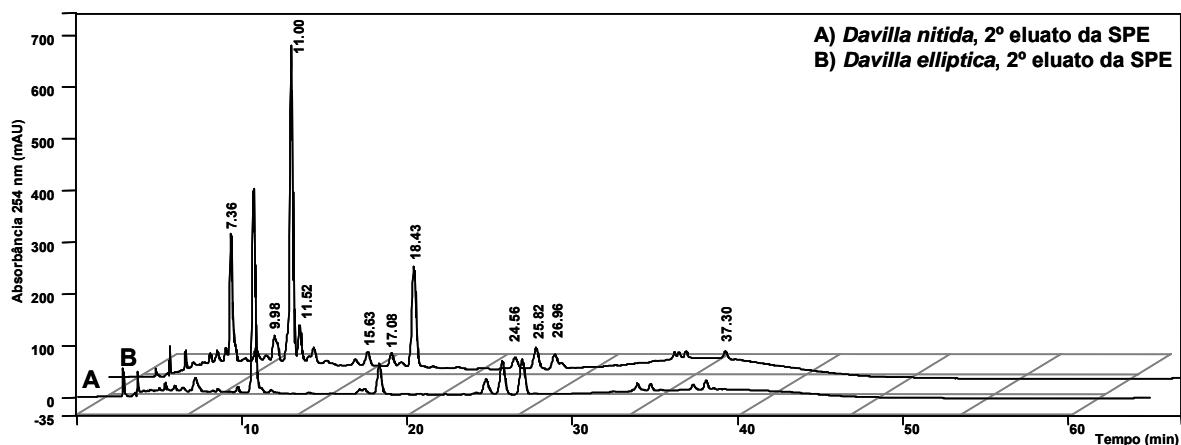


Figura 2.10. Cromatogramas de separação por HPLC monitorados em 254 nm. Análise do segundo eluato obtido após *clean-up* de 10 mg dos extratos MeOH das folhas de *D. nitida* (A) e *D. elliptica* (B). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4).

Comparação dos cromatogramas do terceiro eluato (MeOH 100%) da SPE indicou que não houve perdas significativas por parte dos flavonóides anteriormente eluídos e, em ambos efluentes (Fig. 2.11A e 2.11B), não foram caracterizados picos com intensidades significativas que resultassem na aquisição de espectros na região do UV interpretáveis. Os cromatogramas mostraram a predominância de picos alargados entre na faixa de t_r = 30-45 min, provavelmente referente aos oligômeros que tenham ficado fortemente retidos e que não foram eluídos durante as dessorções iniciais.

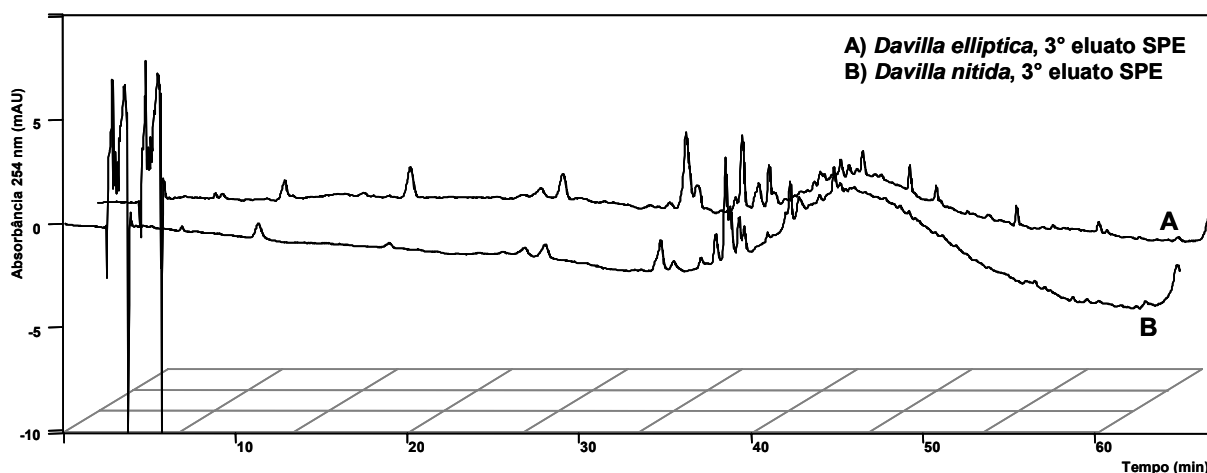


Figura 2.11. Cromatogramas de separação por HPLC monitorados em 254 nm. Análise do terceiro eluato obtido após *clean-up* de 10 mg dos extratos MeOH das folhas de *D. elliptica* (A) e *D. nitida* (B). Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.4).

Desta forma, os resultados alcançados com as etapas de SPE foram bem sucedidos, destacando que a mistura dos solventes empregados nas eluições dos metabólitos secundários presentes nas espécies de *Davilla* proporcionou uma separação seletiva entre ácidos fenólicos de taninos/flavonóides mono- e diglucosilados. No entanto, experimentos realizados com alguns padrões de biflavonóides e derivados metoxilados da quercetina mostraram que esse tipo de substância estava sendo eluída entre as frações MeOH/H₂O 1:1 v/v e MeOH 100%. Portanto, para evitar problemas na ordem de recuperação e/ou etapas de quantificação, optamos em unificar estas duas eluições usando apenas MeOH 100% como eluente para segunda coleta do efluente da SPE.

Fracionamento da porção acetato de etila da infusão das folhas de *Davilla elliptica*

A comparação da triagem cromatográfica entre as espécies de *Davilla* evidenciou a ocorrência de flavonóides que não puderam ser identificados pelos métodos diretos. Com o objetivo de se chegar à caracterização destas substâncias, uma estratégia foi organizada visando o isolamento por HPLC-PAD preparativo.

Nesta aplicação, *D. elliptica* foi escolhida pelo fato de ter apresentado uma composição aparentemente mais concentrada no conteúdo dos seus metabólitos secundários, principalmente nos flavonóides não identificados (Fig. 2.7). No entanto, os experimentos anteriores indicaram que os extratos MeOH obtidos de forma convencional apresentaram grande quantidade de taninos condensados e que esse tipo de substância poderia interferir na etapa de isolamento.

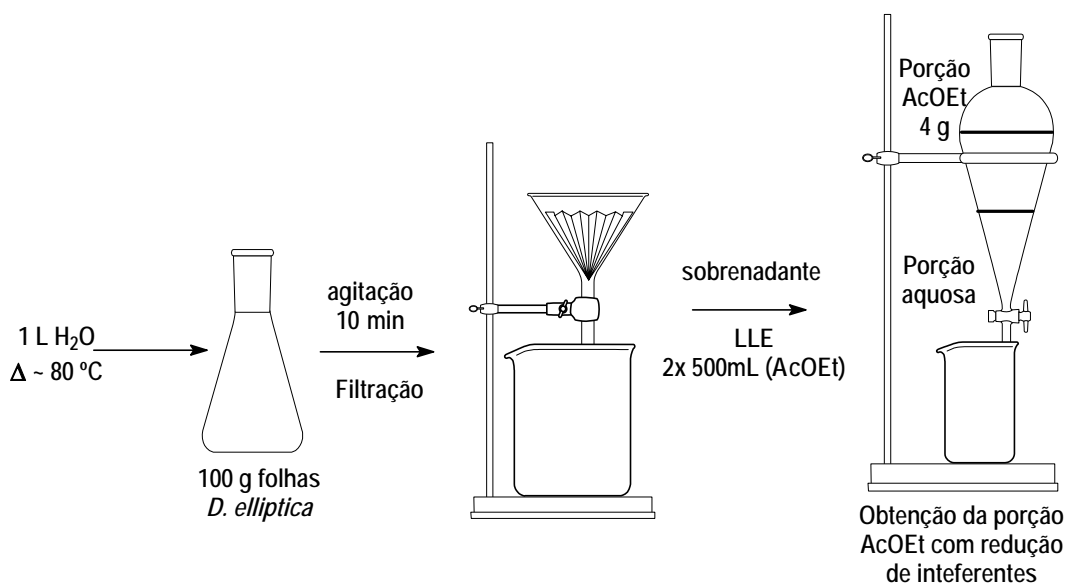
Tendo em vista que os extratos MeOH provenientes do protocolo do Esquema 2.1 não seriam adequados para uso em uma separação por HPLC preparativo, uma alternativa encontrada foi empregar a produção e a utilização de infusos.

Esta nova abordagem foi fundamentada no fato de que a amostra vegetal poderia ser manipulada e preparada em um intervalo de tempo muito inferior ao utilizado no protocolo do Esquema 2.1. Outra vantagem consistiu na possibilidade de empregar concomitantemente as técnicas de LLE e SPE, garantindo assim uma maior integridade da matriz com pré-concentração dos analitos de interesse, antes dela ser submetida às separações por HPLC.

Preparo da amostra

O infuso de *D. elliptica* foi feito com 100 g das folhas secas e trituradas. O material vegetal foi colocado em um erlenmeyer de 2 L e em seguida adicionado 1 L de água aquecida a 80°C. O solvente foi mantido em contato com o material vegetal por 10 min sob agitação manual. O material foi posteriormente filtrado em filtro de papel para remoção de macro partículas e a solução filtrada adicionada em um funil de separação de 2 L.

Na seqüência, o infuso filtrado foi submetido a uma LLE com acetato de etila. As fases formadas foram coletadas e avaliadas por TLC. Flavonóides foram concentrados na porção acetato de etila enquanto que, taninos e açúcares permaneceram na porção aquosa. A porção acetato de etila foi concentrada utilizando evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecendo 4 g de um sólido de coloração marrom, Esquema 2.5.



Esquema 2.5. Etapas realizadas para a obtenção da porção acetato de etila proveniente da infusão feita com as folhas de *D. elliptica*.

Posteriormente o sólido obtido pelo processo de LLE foi dissolvido em 50 mL de MeOH/H₂O 7:3 v/v, centrifugado e alíquotas de 10 mL foram submetidas ao processo de *clean-up* por SPE em cartucho *Sep Pak* de RP18 (10 g 60 mL⁻¹, 55 µm, Strata-E, Phenomenex®) previamente condicionado pela passagem seqüencial de 200 mL de MeOH e 100 mL de água. Os analitos de interesse foram dessorvidos passando 50 mL de MeOH. Ao final da coleta do efluente, o cartucho foi lavado com 100 mL de CHCl₃ e recondicionado para novas extrações, este processo foi repetido até completar o *clean-up* da porção acetato de etila. Os eluatos contendo os analitos

de interesse foram agrupados em uma única solução após controle por TLC, sendo a solução posteriormente concentrada por evaporação a pressão reduzida ou sob fluxo de nitrogênio, fornecendo assim, 3,5 g de uma fração contendo majoritariamente flavonóides.

Para confirmar a composição da fração flavonoídica, uma pequena quantidade (0,5 mg) foi solubilizada em 5 mL da mistura entre MeOH/H₂O 3:7 v/v, filtrada em membrana de PTFE (0,45 µm) e analisada por HPLC nas condições indicadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Gradiente de eluição empregado na separação dos constituintes químicos presentes na fração flavonoídica obtida após os procedimentos de LLE e SPE do infuso das folhas de *D. elliptica*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + 0,05% TFA	ACN + 0,05% TFA	0	15
		25	22
		40	40
		45	78
		50	78
		51	100
		55	100

O cromatograma da Figura 2.12 mostra que o processo empregado viabilizou a remoção dos taninos e permitiu o enriquecimento de uma fração composta majoritariamente pelos flavonóides presentes em *D. elliptica*. Nas separações em escala preparativa, a fração flavonoídica foi resolubilizada em 10 mL de MeOH/H₂O 3:7 v/v, centrifugada, filtrada em membrana de PTFE (0,45 µm) e alíquotas de 1 mL injetadas no sistema HPLC.

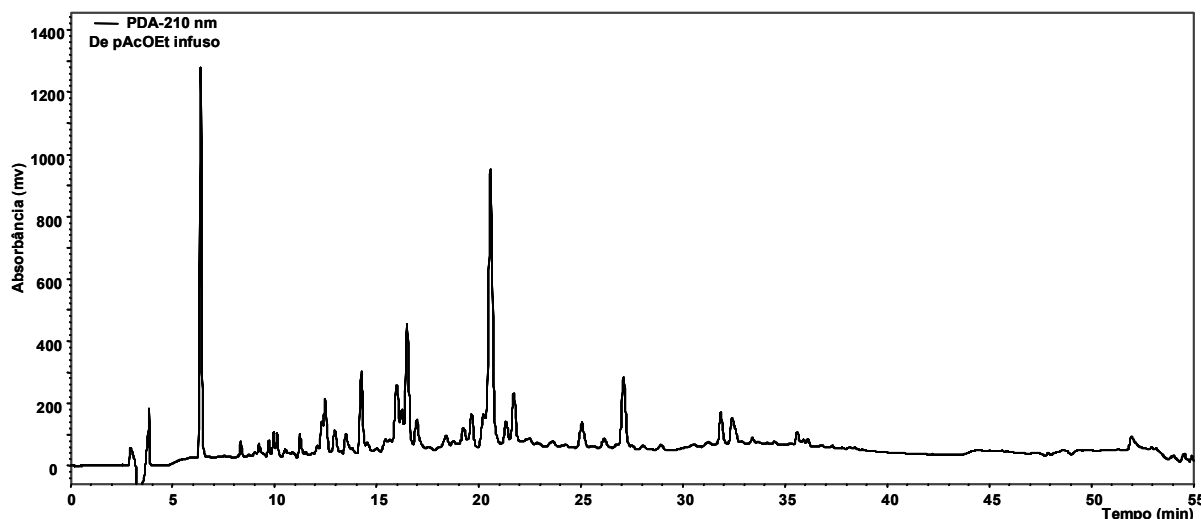


Figura 2.12. Separação cromatográfica por HPLC-PAD da porção acetato de etila obtida a partir da LLE do infuso das folhas de *D. elliptica* e posterior *clean-up* em *Sep Pak* RP18. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5).

Isolamento por HPLC preparativo

A limitada solubilidade da fração flavonoídica em ACN e a grande quantidade de água usada inicialmente no gradiente analítico representado na Tabela 2.5 não possibilitou transpor a mesma fase móvel utilizada nesta separação para a escala preparativa. Desta forma, com o objetivo de efetuar injeções com grandes volumes de amostra sem que houvesse a possibilidade de ocorrer precipitação da fração flavonoídica durante as injeções, optou-se em usar uma fase móvel baseada na mistura entre H₂O (A) e MeOH (B), ambas acidificadas com TFA (0,05%), uma vez que a fração flavonoídica mostrou ser mais solúvel em MeOH.

O fluxo da fase móvel foi estabelecido com base nas características da coluna preparativa usada. De acordo com MAJORS (2004), o fator de transposição linear (*scale-up*) pode ser obtido pela razão entre as áreas seccionais da coluna preparativa a ser usada e a coluna analítica, conforme a seguinte equação.

$$\text{Fator de transposição} = \frac{\pi r_{\text{coluna preparativa}}^2}{\pi r_{\text{coluna analítica}}^2} = \frac{r_{\text{coluna preparativa}}^2}{r_{\text{coluna analítica}}^2}$$

Devido à mudança do solvente orgânico, os valores encontrados nas análises, usando ACN e a coluna analítica de 250 x 4.6 mm i.d., foram incluídos no cálculo para a separação preparativa usando metanol e uma coluna preparativa de 250 x 41.4 mm i.d. Dessa forma, o fator estimativo de transposição encontrado foi de 81. Na separação em escala analítica (Figura 2.12) o fluxo foi de 1 mL min⁻¹, com o

último pico sendo eluído em torno de $t_r = 40$ min. Uma separação em escala preparativa mantendo a mesma velocidade linear e para manter os mesmos tempos de retenção dos picos eluídos necessitaria de fluxo de 81 mL min^{-1} . Contudo, essa velocidade encontrava-se acima das limitações instrumentais. Devido à alta pressão sobre a coluna, avaliada experimentalmente com fluxos de até 30 mL min^{-1} , assim optou-se por usar fluxo cerca de 5 vezes menor do que o calculado, com o conseqüente aumento do tempo de análise.

A quantidade (massa) de amostra que pode ser injetada em uma coluna preparativa pode variar amplamente, devido à sua solubilidade no solvente inicialmente empregado para esta finalidade. Cuidados devem ser tomados para que a força de eluição do solvente empregado na solubilização seja compatível com a força de eluição da fase móvel. Se o solvente de injeção é relativamente mais forte que a fase móvel a amostra tenderá a se espalhar longitudinalmente ao longo da coluna e a separação ficará prejudicada. A melhor situação é quando o solvente de injeção é mais fraco que a força de eluição da fase móvel, pois os analitos tendem a permanecer no topo da coluna, sendo seletivamente eluídos de acordo com a variação da força de eluição da fase móvel pelo gradiente utilizado (MAJORS, 2004).

A Tabela 2.6 representa uma estimativa de massas e volumes que podem ser injetados em colunas de fase reversa de várias dimensões.

Tabela 2.6. Condições típicas de operação para colunas de diversas dimensões

Parâmetro	Diâmetro interno da coluna*				
Comprimento (mm)	4,6	9,4	21,2	30,0	50,0
-	Massa (mg)				
50	1	3-5	30-50	80-100	250-300
100	4-6	15-20	80-90	200-500	500-700
150	8-10	30-40	140-160	300-350	800-900
250	12-15	50-60	200-250	475-525	1200-1400
Volume de injeção (μL)	10-20	50-75	350-400	700-800	1500-2500
Fluxo (mL min^{-1})**	1,0	4,2	21,2	42,5	118

* Os valores destacados representam valores aproximados em quantidade de amostra que pode ser injetada em colunas com as dimensões sugeridas.

** Fluxo necessário para manter a velocidade linear e tempo de separação.

Assim, após a otimização de todos os parâmetros, a separação dos constituintes químicos da fração flavonoídica foi realizada com o sistema HPLC preparativo descrito na parte Experimental. A fase móvel empregada foi: A = H_2O + TFA 0,05% e B = MeOH + TFA 0,05%, em fluxo de 15 mL min^{-1} . A rampa de eluição usada foi: 0-150 min, 33-47% B (gradiente linear); 150-175 min, 47-100% B

(gradiente linear); 175-200 min, 100% B (isocrático), retorno para 33% B em 5 min e recondicionamento da coluna em 55 min. Em cada corrida cromatográfica foram aplicados aproximadamente 350 mg da fração flavonoídica por injeção. Picos individuais eluídos da coluna foram coletados por múltiplas injeções da amostra e concentrados por evaporação a pressão reduzida ou liofilizados. O cromatograma da Figura 2.13 ilustra a separação em escala preparativa dos constituintes químicos encontrados na fração flavonoídica proveniente da infusão das folhas de *D. elliptica*.

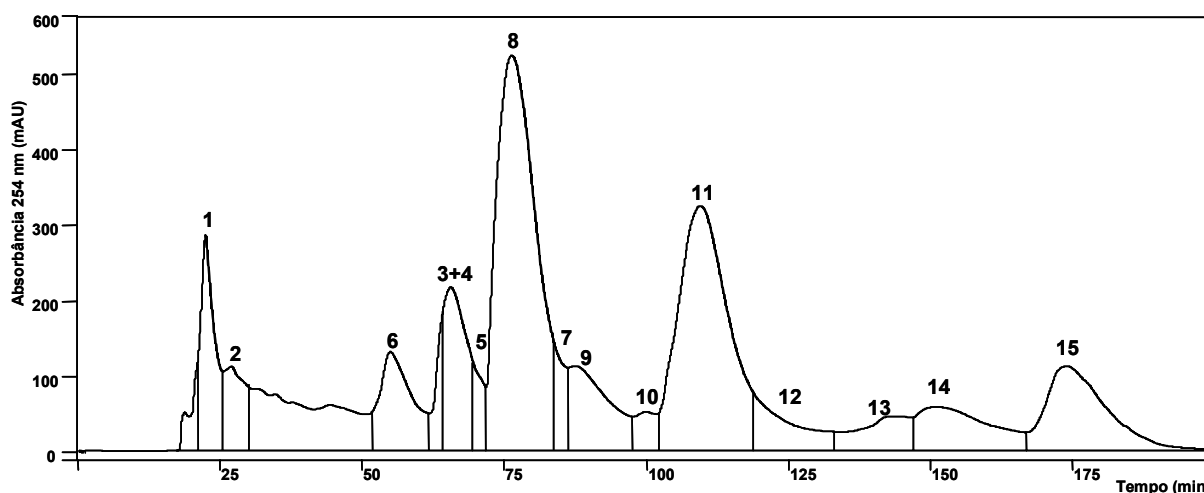


Figura 2.13. Cromatograma de separação por HPLC-PAD (modo preparativo) da amostra obtida após etapas de *clean-up* e enriquecimento empregando os processos de LLE e SPE no infuso das folhas de *D. elliptica*. Coluna Varian® Dynamax RP18 (250 x 41,4 mm i.d.; 8 µm), HPLC (Varian®), fluxo 15,0 mL min⁻¹, monitorado em 254 nm, Volume injetado: 1 mL.

Para garantir a pureza dos metabólitos secundários isolados no processo, cada substância passou por uma etapa adicional de purificação, com a finalidade de serem utilizadas na etapa de quantificação dos flavonóides presentes nas duas espécies de *Davilla*. Desta maneira, as substâncias foram reinjetadas, utilizando uma coluna semipreparativa de 250 x 10 mm i.d., empacotada com o mesmo material presente na coluna analítica, e nestas condições foi possível estabelecer e utilizar o fator de transposição igual a 4,7.

Ao final das etapas de isolamento e purificação, as substâncias desconhecidas foram caracterizadas usando as técnicas de elucidação estrutural comumente empregadas, tais como UV, NMR e MS. Uma discussão mais detalhada sobre esta aplicação foi recentemente descrita por nosso grupo (RODRIGUES; RINALDO; SANNOMIYA *et al.*, 2007 (anexo).

O cromatograma da Figura 2.14 mostra a identificação das substâncias da fração flavonoídica eluídas durante a separação cromatográfica e a Figura 2.15 representa as estruturas dos metabólitos secundários isolados e/ou identificados a partir da infusão das folhas de *D. elliptica*.

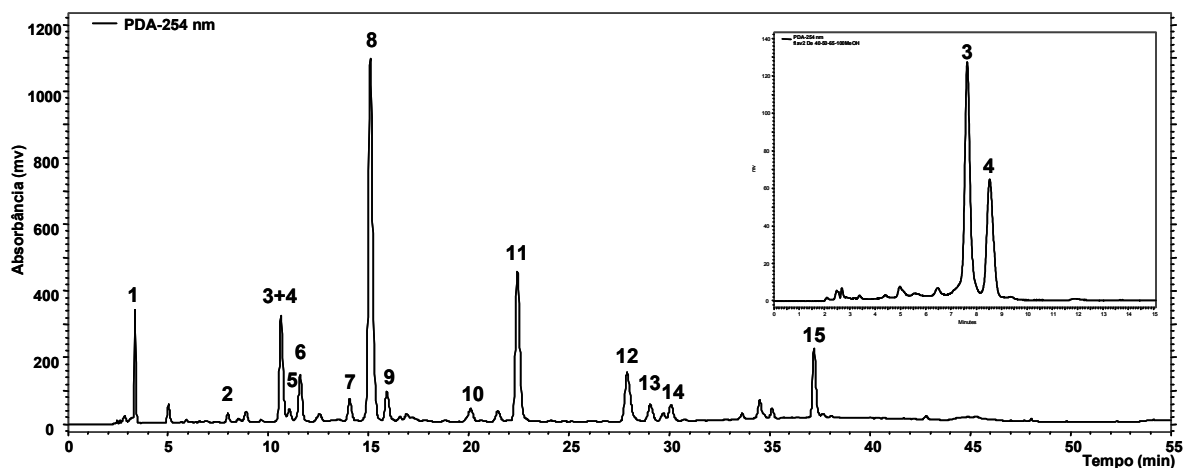


Figura 2.14. Cromatograma de separação por HPLC-PAD dos constituintes químicos encontrados no infuso das folhas de *D. elliptica* após os procedimentos de LLE e SPE. Identificação: **1** ácido gálico; **2** (-)-epicatequina; **3** miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo; **4** miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo; **5** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- β -galactopiranosídeo; **6** (6S,7E)-6,9-diidroxi-4,7-megastigmadien-3-ona; **7** rutina; **8** miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo; **9** quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; **10** quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo; **11** quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo; **12** miricetina, **13** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo; **14** miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo; **15** quercetina. Em destaque, separação da mistura dos flavonóis **3** e **4** empregando o sistema isocrático com a mistura de 40% de MeOH + TFA 0,05% (**B**) em 60% de H₂O + TFA 0,05% (**A**). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 μ m), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 254 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5).

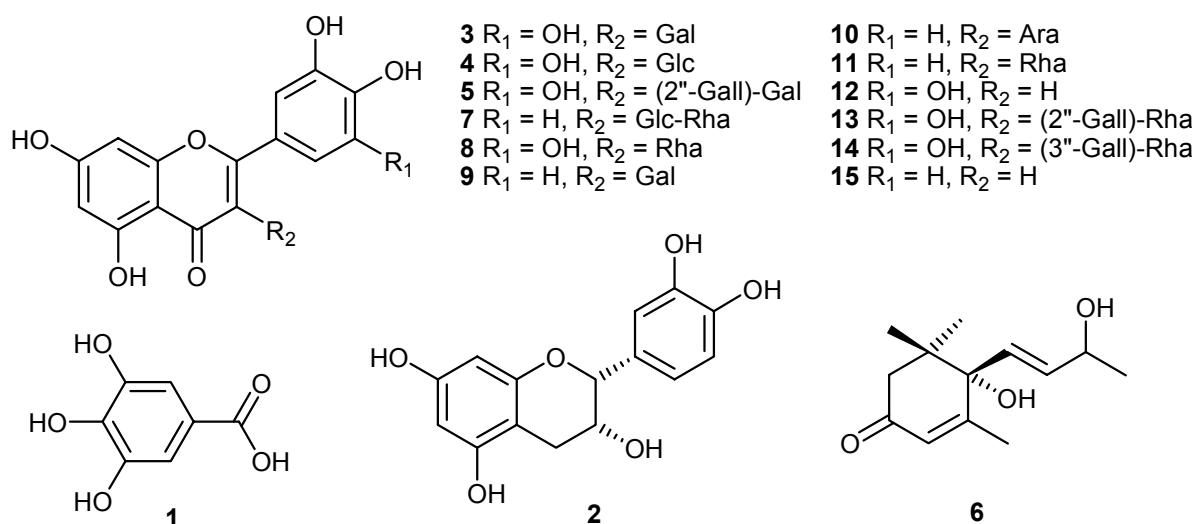


Figura 2.15. Constituintes químicos isolados a partir da porção acetato de etila proveniente das etapas de LLE e SPE da infusão feita com as folhas de *D. elliptica*.

Análises por FIA-ESI-IT-MS

Além dos experimentos envolvendo as análises por HPLC-PAD, também foi realizada a investigação da composição química das espécies vegetais empregando a técnica de ESI-IT-MS com inserção direta (FIA) das amostras provenientes de infusões feitas com as folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*.

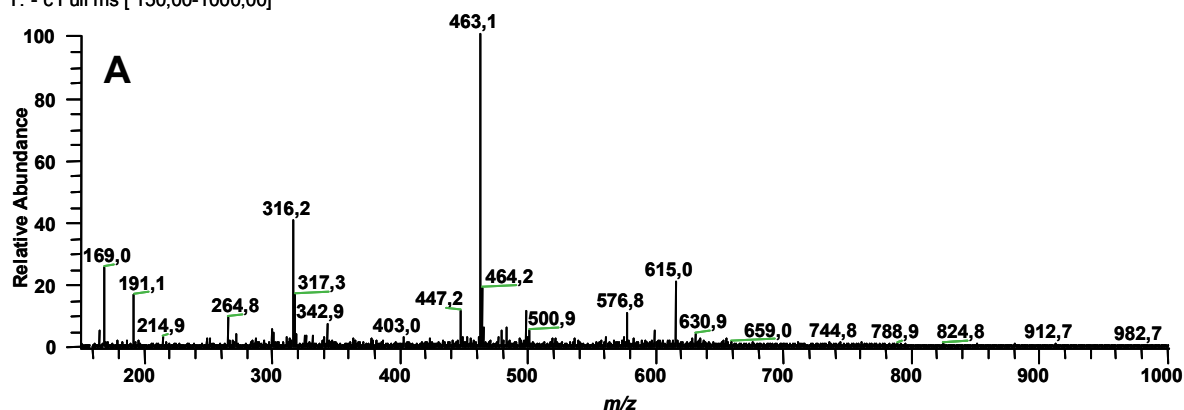
O principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da técnica FIA em conjunto com a ESI-IT-MS para produzir informações espectrais sobre a constituição das matrizes avaliadas de forma rápida e direta, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento e/ou de separações cromatográficas.

As infusões de *D. nitida* e *D. elliptica* foram obtidas a partir de 1 g das folhas trituradas. O material vegetal foi mantido em contato com 10 mL de água aquecida (80°C) por 10 min. A mistura contendo a solução e o material particulado foi filtrado em filtro de papel e resfriado a temperatura ambiente, em seguida uma alíquota da solução foi novamente filtrada, agora em membrana de PTFE com poro de 0,45 µm. A infusão filtrada (500 µL) foi diluída com MeOH para o volume final de 1 mL e a solução introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsionada por um sistema de bombeamento em fluxo de 3 µL min⁻¹.

Quando comparado ao modo positivo, o modo negativo conduziu a resultados mais informativos para a obtenção da composição química das infusões de *D. nitida* e *D. elliptica*. Desta forma, embora o modo positivo tenha sido testado, somente os resultados em modo negativo serão apresentados e discutidos. Assim, o modo negativo foi escolhido tendo em vista o conhecimento prévio da composição flavonoídica destas espécies e que esta classe de metabólitos secundários ionizam facilmente pela desprotonação das hidroxilas fenólicas, sendo as moléculas desprotonadas dos flavonóides transferidas eficientemente para a fase gasosa como íons negativos.

Como mostrado nos espectros de massas da Figura 2.16, uma simples inspeção visual revelou grande similaridade entre os principais íons precursores ($[M - H]^-$) obtidos para as duas espécies em questão. Confirmando desta forma a equivalência entre a composição química das espécies e o íon produto de m/z 463, de alta abundância relativa, parece ser o principal íon diagnóstico encontrado neste gênero.

DN #1-24 RT: 0,00-0,57 AV: 24 NL: 1,15E6
T: - c Full ms [150,00-1000,00]



DE #124-142 RT: 2,37-2,56 AV: 11 NL: 7,07E5
T: - c Full ms [150,00-1000,00]

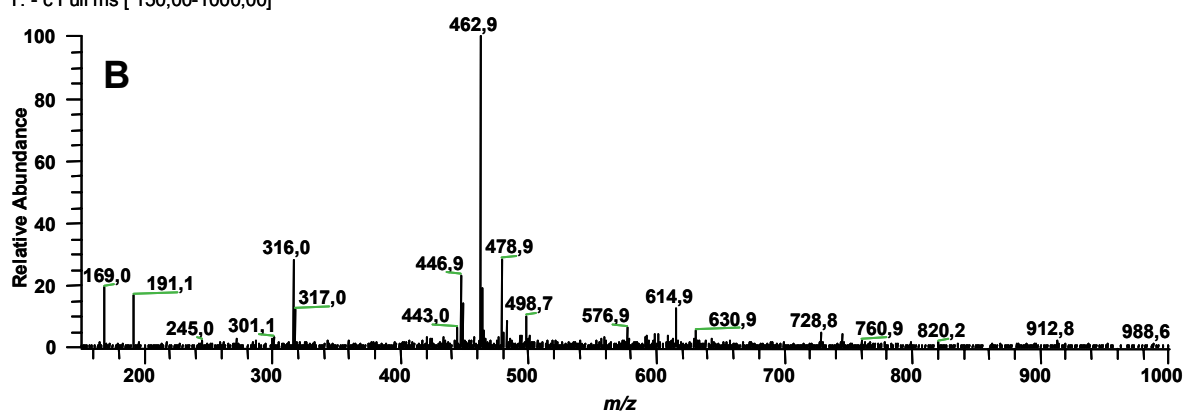


Figura 2.16. Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, da infusão de *D. nitida* (A) e da infusão de *D. elliptica* (B), avaliados em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: parte Experimental.

Com a finalidade de garantir maior seletividade e especificidade dos íons precursores observados e ao mesmo tempo dar uma indicação da natureza química desta matriz, foram adquiridos espectros de segunda-ordem (MS/MS) dos principais íons diagnósticos, e uma discussão detalhada sobre a interpretação destes íons foi reportada recentemente por nosso grupo (RODRIGUES; RINALDO; SANNOMIYA *et al.*, 2007 (anexo), de modo que os experimentos usando FIA-ESI-IT-MS permitiram confirmar a presença dos metabólitos secundários anteriormente isolados e/ou identificados.

Análise quantitativa dos infusos e dos extratos MeOH de *Davilla nitida* e *Davilla elliptica*

Apesar de alguns autores citarem que quantificações de metabólitos secundários de espécies vegetais por HPLC-PAD possam ser realizadas tendo como referência de calibração um composto que represente as classes das

substâncias analisadas (MERKEN & BEECHER, 2000; ROBARDS, 2003), ou mais especificamente que flavonóides glucosilados possam ser quantificados em termos de uma calibração feita apenas com suas correspondentes agliconas (CONDE *et al.*, 1997), durante nossos experimentos foi constatada que a resposta analítica observada para uma aglicona difere daquela gerada por um mono ou dissacarídeo, ou ainda por um flavonol acetilado.

Esta verificação foi evidenciada durante a comparação das respostas obtidas com um padrão contendo uma mistura de 11 diferentes flavonóides na concentração de $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir da Figura 2.17 foi possível visualizar as diferenças nas intensidades de absorção entre todos os padrões resolvidos no cromatograma. Além das variações nas intensidades, foram observadas diferenças significativas nas áreas de integração. Desta forma, uma quantificação relativa, conforme sugerido por alguns autores pode resultar na atribuição de valores com erros superiores a 70%.

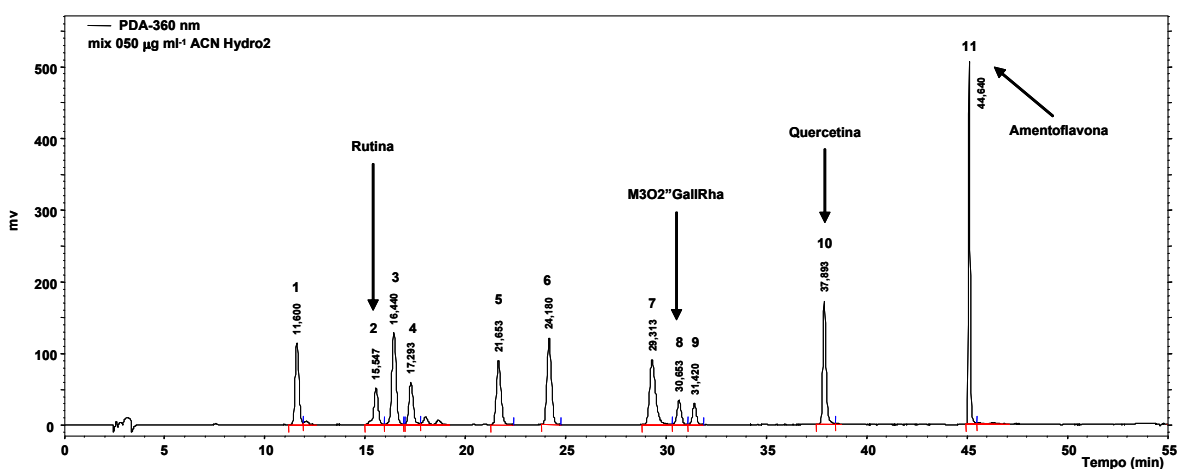


Figura 2.17. Separação cromatográfica por HPLC-PAD de uma mistura de flavonóides injetados na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. 1 miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo; 2 rutina; 3 miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo; 4 quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; 5 quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo; 6 quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo; 7 miricetina; 8 miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo; 9 miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo; 10 quercetina e 11 amentoflavona. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 μm), HPLC (Jasco®), fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 360 \text{ nm}$. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5).

Analisando os espectros na região do UV dos flavonóides destacados no cromatograma anterior (Fig. 2.18), nota-se que a intensidades de absorção da quercetina e amentoflavona são bem superiores ao dos demais flavonóides, indicando que a presença de uma ou mais unidades de açúcares promovem os

efeitos hipsocrômico e hipocrômico (PAVIA *et al.*, 1996) e que esses efeitos conduzem a diferentes níveis de sensibilidade.

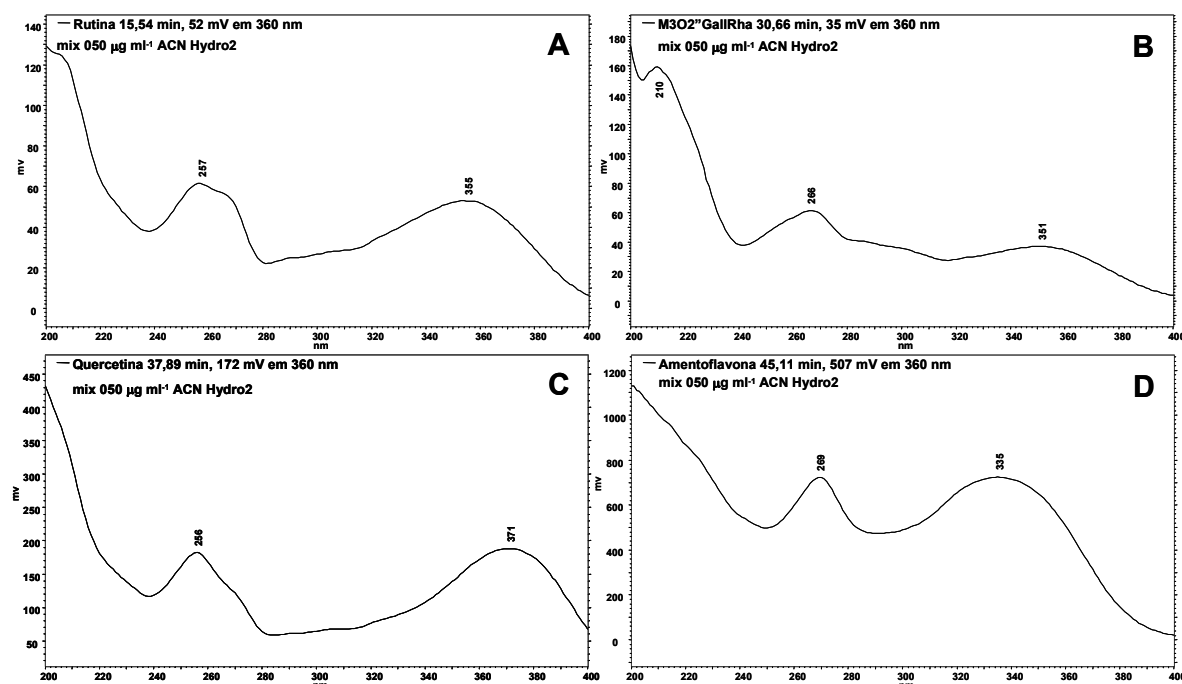


Figura 2.18. Espectros na região do UV para os flavonóides destacados no cromatograma da Figura 2.18. Identificação: **A** rutina; **B** miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo; **C** quercetina e **D** amentoflavona.

Diante dessas observações optou-se em realizar a quantificação individual dos principais flavonóides encontrados nas duas espécies a partir da construção de curvas analíticas de calibração com as substâncias isoladas de *D. elliptica* e com padrões comerciais.

Construção das curvas analíticas

Uma solução estoque de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (M3OGal), miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (M3O(2''Gall)Rha), miricetina-3-O-(3''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (M3O(3''Gall)Rha), quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (Q3OGal), miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (M3ORha), quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo (Q3OAra), quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (Q3ORha), miricetina, quercetina, rutina e amentoflavona ($1,0 \text{ mg}/10 \text{ mL}$) foi preparada e solubilizada em MeOH/H₂O 7:3 v/v. A solução estoque foi armazenada em *vial* âmbar e mantida em *freezer* a -18°C .

Soluções padrão cobrindo o intervalo linear em oito níveis de concentração ($0,4$; 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 75 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram feitas a partir de diluições da solução

estoque e o volume final das soluções ajustados para 1 mL. As soluções padrão foram preparadas no momento das análises e conservadas em *freezer* até o momento das injeções.

Na etapa de quantificação foi empregado o método de calibração externa. Os padrões foram analisados por HPLC-PAD e as áreas dos picos obtidos correlacionados com as concentrações das curvas analíticas (Fig. 2.19). A mistura entre miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo + miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo foi avaliada em termos de miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo e a miricetina-3-O-(2"-Galoil)- β -galactopiranosídeo (M3O(2"Gall)Gal) foi determinada em termos de (M3O(2"Gall)Rha). Os flavonóides minoritários não identificados foram determinados de acordo a similaridade dos seus espectros na região do UV com aqueles dos flavonóis utilizados na calibração.

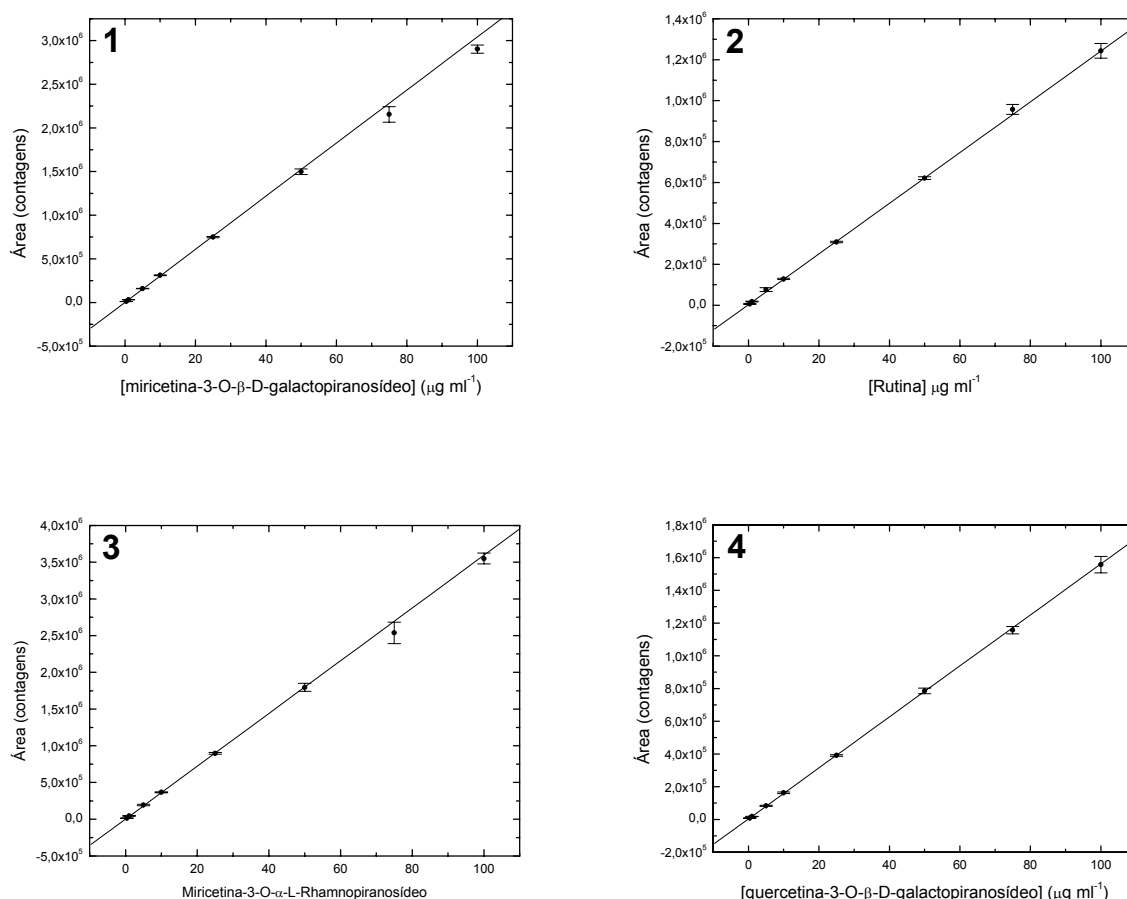


Figura 2.19. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo, **2** rutina, **3** (miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, **4** quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo, **5** quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, **6** quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, **7** miricetina, **8** miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo, **9** miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo, **10** quercetina.

Continuação da Figura 2.19

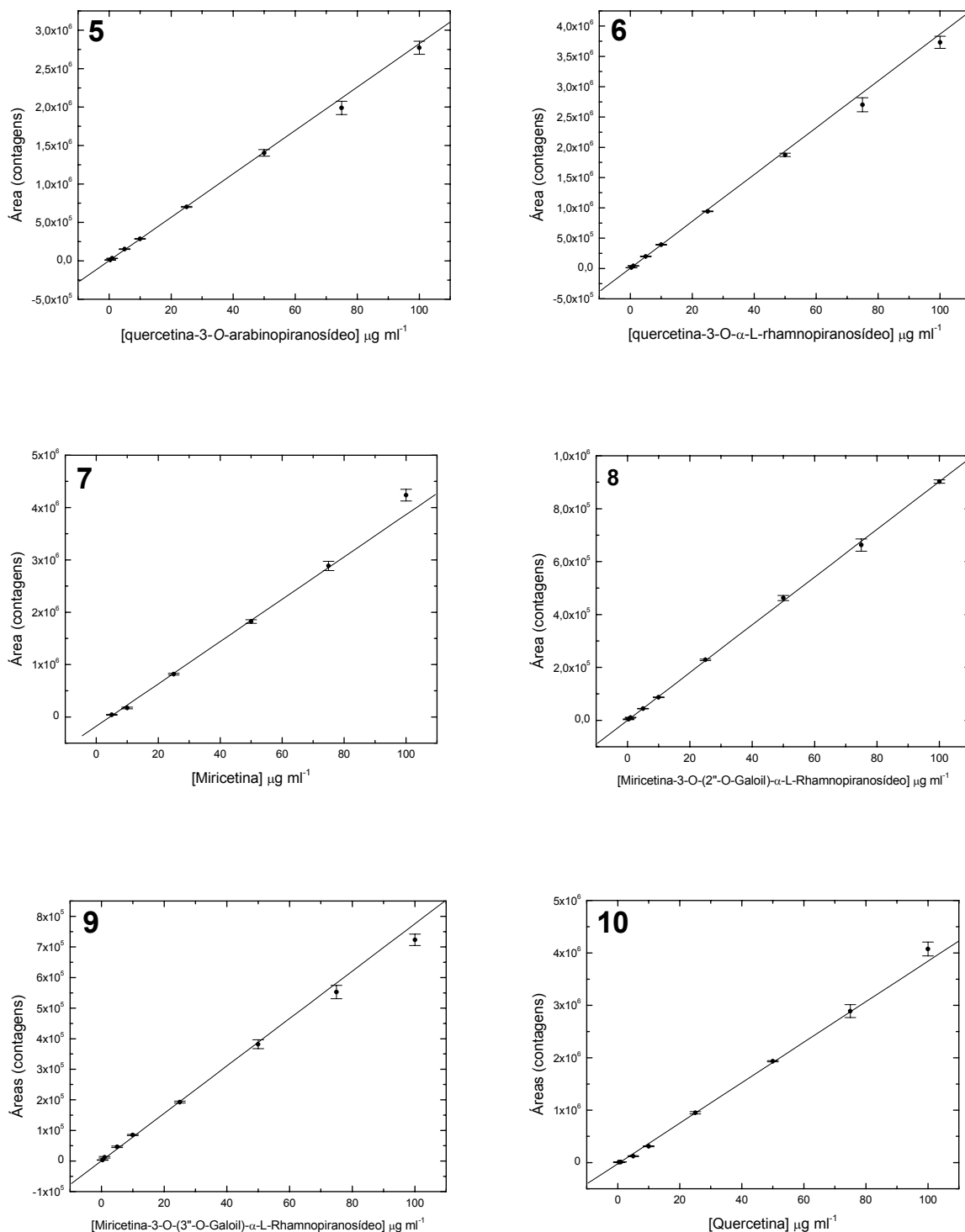


Figura 2.19. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo, **2** rutina, **3** (miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, **4** quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo, **5** quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, **6** quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, **7** miricetina, **8** miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo, **9** miricetina-3-O-(3''-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo, **10** quercetina.

Os parâmetros estatísticos que definiram a função linear para cada uma das curvas analíticas são mostrados na Tabela 2.7, sendo que todas as curvas apresentaram um coeficiente de correlação (r) superior a 0,99.

Tabela 2.7. Dados de regressão linear para os flavonóides empregados como padrões na elaboração das curvas analíticas

Flavonóide	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Coeficiente de correlação (r)*	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
M3OGal	758	30417	0,9992	0,4-100	0,08	0,25
Rutina	627	12392	0,9998	0,4-100	0,17	0,51
M3ORha	1619	35911	0,9995	0,4-100	0,15	0,45
Q3OGal	305	15581	0,9990	0,4-100	0,06	0,20
Q3OAra	1325	28215	0,9994	0,4-100	0,15	0,47
Q3ORha	1354	38614	0,9995	0,4-100	0,12	0,35
Miricetina	-2775	40416	0,9975	5-100	0,23	0,68
M3O(2"OGal)Rha	-245	9026	0,9998	0,4-100	0,09	0,27
M3O(3"OGal)Rha	387	7749	0,9976	0,4-100	0,16	0,49
Quercetina	-2165	38636	0,9980	0,4-100	0,18	0,56

** Todas as curvas analíticas apresentaram significância $P > 0,0001$.

Procedimento de otimização da extração dos metabólitos secundários

O estudo consistiu na determinação dos metabólitos extraíveis em dois tipos de preparação: O primeiro na forma de infuso, tradicional modo de administração empregado pela população no consumo de espécies vegetais consideradas “plantas medicinais”. A segunda, na forma de extrato orgânico polar, mimetizando as preparações de extratos comumente obtidos nos laboratórios de fitoquímica e ao nosso protocolo para de obtenção de extratos (Esquema 2.1).

Infusão: Dois experimentos para a obtenção dos infusos das espécies estudadas foram avaliados. No primeiro foi considerada a quantidade de amostra usada no preparo da infusão e a diluição necessária para garantir que os analitos estivessem contidos na faixa linear de cada curva analítica. No segundo experimento foi considerado o tempo de contato do material vegetal com o solvente extrator.

Primeiro experimento: Quantidades precisas de 500, 1000 e 2000 mg de *D. elliptica* foram colocadas separadamente em erlenmeyers de 125 mL, em seguida foram adicionados 20 mL de água aquecida a 80°C. A solução de extração foi mantida em contato com o material vegetal por 10 min, conforme sugerido pelo trabalho de DALLUGE e colaboradores (1998). Em seguida a solução foi filtrada em filtro de papel para remoção de macro partículas, sendo o efluente coletado diretamente em um balão volumétrico. Uma vez alcançada a temperatura ambiente

da solução, esta teve o volume final ajustado para 25 mL, sendo que alíquotas foram filtradas em membranas de PTFE de 0,45 μm e analisadas por HPLC.

Nesse experimento foi verificado que o sinal analítico da solução de 500 mg 25 mL⁻¹ foi significativo apenas para os picos cromatográficos dos flavonóis de maior intensidade. Por sua vez, a solução de 2000 mg 25 mL⁻¹ não apresentou estabilidade em resolução de linha de base durante a corrida cromatográfica. O melhor resultado foi obtido com a solução de 1000 mg 25 mL⁻¹, em que todos os picos cromatográficos para os flavonóis identificados na espécie permaneceram dentro da faixa de calibração das curvas analíticas. Além do mais, não foi observado o efeito de saturação na coluna cromatográfica (*carry-over*) em injeções sequenciais feitas em branco.

Segundo experimento: Nesse ponto foi avaliada a eficiência de extração do solvente em função do tempo de contato com a amostra vegetal. Os metabólitos foram extraídos em quatro tempos diferentes, 0, 5, 10 e 15 min e a área do flavonol miricetina-3-O- α -rhamnonopiranosídeo (M3ORha) extraído no processo foi usada como o parâmetro de referência. Todas as análises foram realizadas em triplicata de extração.

O tempo de 0 min consistiu em apenas passar 20 mL de água aquecida através de um filtro de papel contendo 1000 mg do material vegetal. Os demais foram os tempos em que o solvente extrator permaneceu em contato com o material vegetal no erlenmeyer.

A Figura 2.20 ilustra uma curva que representa o sinal analítico obtido em 360 nm para a integração da área do flavonol M3ORha em função do tempo. A partir da análise do gráfico, verifica-se que a área de integração permaneceu inalterada após 10 min entre o solvente extrator e o material vegetal, indicando que a extração havia alcançado o máximo de eficiência após esse tempo de exposição. Desta forma, mantivemos para todos os experimentos com infusos o tempo de 10 min de contato entre o solvente extrator e o material vegetal.

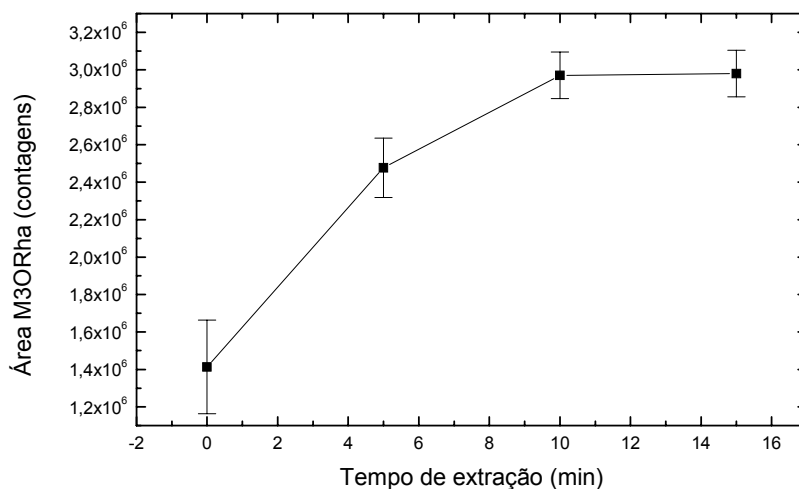


Figura 2.20. Efeito da eficiência de extração do solvente em função do tempo ($n = 3$). O eixo y representa a área do pico cromatográfico para o flavonol miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo presente no infuso das folhas de *D. elliptica*.

Extrato MeOH: O procedimento de obtenção do extrato MeOH seguiu o protocolo utilizado para obtenção de extratos em nosso laboratório e neste estudo foi levado em conta a aplicação dos critérios de obtenção discutidos anteriormente.

Uma quantidade conhecida do material vegetal (2,0 g) foi colocado em erlenmeyer de 125 mL, em seguida foram adicionados 25 mL de CHCl_3 e a amostra submetida a ultra-som por 30 min. Esse procedimento foi repetido quatro vezes e teve a finalidade de remover material lipofílico, além de outros constituintes químicos de natureza apolar. A cada extração o sobrenadante foi submetido a análises por TLC para verificar possíveis perdas dos analitos de interesse, não sendo observadas perdas significativas.

Ao final da quarta extração com CHCl_3 o material sólido (torta) foi seco e uma quantidade precisa de 1000 mg foi separada e submetida ao mesmo procedimento de extração, empregando nesta etapa MeOH como solvente extrator.

A cada extração com MeOH, os sobrenadantes foram analisados por TLC, filtrados em filtro de papel e reagrupados.

As análises por TLC indicaram que a remoção completa dos flavonóis ocorreu entre segunda e a terceira extração com MeOH, desta forma optou-se em manter as quatro extrações de modo a garantir que não houvesse perdas durante esse processo.

Para remover a clorofila remanescente, o extrato MeOH foi seco sob fluxo de N_2 fornecendo um resíduo, este por sua vez foi redissolvido em um pequeno volume (3-5 mL) de MeOH/ H_2O 7:3 v/v e submetido a uma etapa de SPE em cartucho *Sep Pak* RP18 (500 mg 6 mL^{-1}). Os flavonóis foram eluídos do cartucho com 15 mL de MeOH, o eluato foi coletado diretamente em um balão volumétrico e o volume final da solução ajustado com H_2O para 25 mL. Alíquotas foram filtradas em membranas de PTFE de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e analisadas por HPLC.

O material retido no cartucho de SPE foi eluído posteriormente com $CHCl_3$ e o eluato avaliado por TLC, não sendo constatada a presença de flavonóides nessa fração.

Uma vez estabelecida as condições otimizadas de extração, a próxima etapa consistiu em realizar a quantificação dos metabólitos secundários nas duas espécies de *Davilla* e em ambas as preparações, infuso e extrato MeOH.

Preparo das amostras

Nessa etapa foram avaliadas três amostras: as folhas de *D. elliptica* coletadas em março de 2004 e as folhas de *D. nitida* coletadas nas épocas de agosto de 2002 (primeira coleta) e março de 2004 (segunda coleta). O preparo das amostras, infusão e extrato MeOH, foi feito em triplicata de extração.

Tento em vista que o processo de padronização de extratos vegetais também é um critério fundamental para se estabelecer correlações entre a quantidade das substâncias encontradas e o seu possível efeito terapêutico (GREGÓRIO, 2006), além da quantificação específica dos flavonóis, foi realizado um balanço de massa entre os extratos MeOH das espécies investigadas (Fig. 2.21).

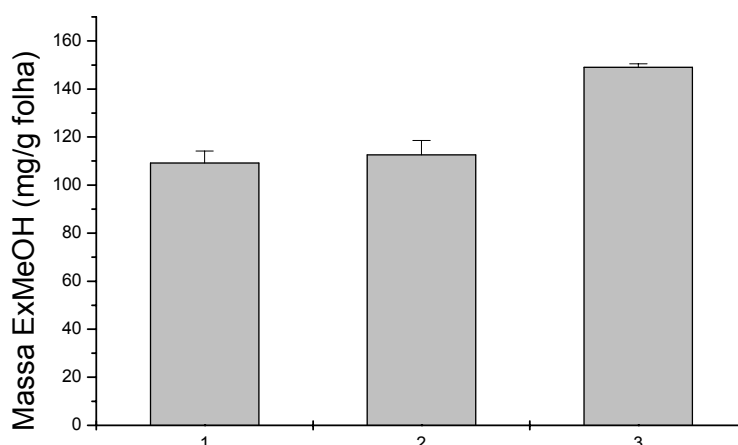


Figura 2.21. Representação das massas obtidas por meio dos processos de extração em MeOH ($n = 3$). 1) *D. nitida* primeira coleta, 2) *D. nitida* segunda coleta e 3) *D. elliptica*.

Análise da Figura 2.21 mostra que a relação planta-extrato obtido foi de 10,9% e 11,3% para a primeira (1) e segunda coleta de *D. nitida* (2), respectivamente e que para *D. elliptica* (3) esse valor foi de 14,9%. Ou seja, no caso dos 14,9%, a relação planta-extrato foi de 7:1 representando que são necessários 7 g da planta seca para fornecer 1 g de resíduo do extrato MeOH de *D. elliptica*. Como não houve diferença significativa para os valores encontrados entre as duas coletadas de *D. nitida*, foi estabelecido o valor médio de 11% no rendimento para o extrato MeOH obtido, e este valor representa então uma proporção planta-extrato de 9:1.

Aplicação dos métodos de quantificação

Como pode ser visto na Tabela 2.8, miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, pico 5 dos cromatogramas da Figuras 2.22 e 2.23, caracterizou-se como o flavonol majoritário em ambas as espécies. Comparação entre os dois períodos de coleta realizados para *D. nitida* mostrou um aumento na produção dos flavonóis mais polares durante o segundo período de coleta, sendo que essas concentrações são mais expressivas para os flavonóis miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (1), miricetina-3-O-(2"-O-Galoil)- β -galactopiranosídeo (2), rutina (4), miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (5) e quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (6) em ambas as preparações.

Comparando ainda as duas metodologias de obtenção dos metabólitos secundários para as espécies estudadas, notamos, através do conteúdo total de

flavonóides, que ocorreu uma maior eficiência no modelo de extração que emprega o uso de solvente orgânico. Para as três amostras analisadas foi possível constatar um rendimento superior a 50% quando comparamos o conteúdo total de flavonóides obtidos por infusos com aqueles obtidos por extração em MeOH, e esse fato pode ser atribuído à baixa solubilidade desses metabólitos em água. Esta característica pode ser facilmente ressaltada se compararmos, por exemplo, os valores de concentração obtidos das duas preparações para os flavonóis acetilados miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (13) e miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (14) em *D. nitida* primeira coleta. Nota-se que para o extrato MeOH as concentrações encontradas foram duas vezes superiores aquelas obtidas para o infuso.

Tabela 2.8. Dados quantitativos referentes à concentração individual dos flavonóides encontrados em fitopreparações (infuso e extrato metanólico) feitas com as folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*. Avaliação da eficiência dos modelos de extração e comparação da variação no teor de flavonóides em períodos sazonais distintos

<i>D. nitida</i> Infusão 1ª coleta		<i>D. nitida</i> ExMeOH 1ª coleta	
Concentração ± DP *	Concentração ± DP	Concentração ± DP	Concentração ± DP
($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(mg kg^{-1}) folhas	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(mg kg^{-1}) folhas
1) M3OGal + M3Ogli	5,04 ± 0,05	126,12 ± 0,68	183,30 ± 0,32
2) M3O(2°OGal)Gal	4,22 ± 0,01	105,54 ± 0,06	142,09 ± 0,13
3) NI**	0,97 ± 0,02	24,35 ± 0,24	26,77 ± 0,17
4) Rutina	2,35 ± 0,12	55,81 ± 1,55	97,59 ± 0,44
5) M3ORha	99,35 ± 0,51	2483,8 ± 6,4	2558,2 ± 3,8
6) Q3OGal	2,72 ± 0,48	67,91 ± 5,97	119,17 ± 0,80
7) NI	1,18 ± 0,24	29,50 ± 3,05	51,70 ± 1,85
8) NI	0,56 ± 0,01	14,05 ± 0,09	22,75 ± 1,68
9) Q3OAra	0,83 ± 0,03	20,64 ± 0,33	25,36 ± 0,30
10) NI	0,52 ± 0,01	12,95 ± 0,02	20,58 ± 0,38
11) Q3ORha	12,78 ± 0,15	319,57 ± 1,86	405,45 ± 5,57
12) Miricetina	0,56 ± 0,03	14,05 ± 0,42	40,36 ± 3,87
13) M3O(2°OGal)Rha	47,16 ± 0,19	1179,1 ± 2,2	2371,1 ± 5,2
14) M3O(3°OGal)Rha	54,41 ± 0,28	1360,1 ± 3,6	2547,1 ± 11,0
15) NI	1,61 ± 0,04	40,24 ± 0,56	96,12 ± 0,66
16) NI	1,14 ± 0,01	28,51 ± 0,09	62,69 ± 0,62
17) quercetina	1,25 ± 0,01	31,28 ± 0,10	94,34 ± 0,94
Flavonóides totais	236,66 ± 0,84	5916,5 ± 10,5	8864,7 ± 14,8

<i>D. nitida</i> Infusão 2ª coleta		<i>D. nitida</i> ExMeOH 2ª coleta	
[] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] (mg kg^{-1}) folhas	[] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] (mg kg^{-1}) folhas
1) M3OGal + M3Ogli	20,41 ± 0,04	510,37 ± 0,51	710,18 ± 0,16
2) M3O(2°OGal)Gal	7,10 ± 0,03	177,38 ± 0,36	230,23 ± 1,21
3) NI	1,16 ± 0,01	29,10 ± 0,10	38,71 ± 1,19
4) Rutina	11,57 ± 0,13	289,20 ± 1,64	590,76 ± 7,47
5) M3ORha	158,14 ± 0,20	3953,44 ± 2,51	4784,76 ± 2,6
6) Q3OGal	9,33 ± 0,17	233,13 ± 2,18	399,95 ± 1,01
7) NI	1,87 ± 0,16	46,78 ± 1,95	99,90 ± 0,45
8) NI	0,78 ± 0,01	19,53 ± 0,04	31,51 ± 1,34
9) Q3OAra	1,52 ± 0,08	38,01 ± 1,00	90,87 ± 0,90
10) NI	1,23 ± 0,01	30,79 ± 0,18	53,39 ± 0,56
11) Q3ORha	18,54 ± 0,16	463,61 ± 2,03	665,52 ± 0,36
12) Miricetina	nd***	nd	82,61 ± 0,21
13) M3O(2°OGal)Rha	33,00 ± 0,10	825,04 ± 1,23	2363,07 ± 6,5
14) M3O(3°OGal)Rha	40,05 ± 0,22	1001,3 ± 2,75	2445,32 ± 55,9
15) NI	1,41 ± 0,06	35,15 ± 0,80	108,40 ± 2,49
16) NI	0,87 ± 0,03	21,76 ± 0,33	59,30 ± 0,87
17) quercetina	1,32 ± 0,10	32,89 ± 1,24	134,70 ± 4,38
Flavonóides totais	308,30 ± 0,46	7707,4 ± 5,9	12895,2 ± 57,1

<i>D. elliptica</i> Infusão		<i>D. elliptica</i> ExMeOH	
[] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] (mg kg^{-1}) folhas	[] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] (mg kg^{-1}) folhas
1) M3OGal + M3Ogli	38,28 ± 0,45	956,90 ± 5,6	1294,89 ± 1,2
2) M3O(2°OGal)Gal	8,21 ± 0,11	205,37 ± 1,34	246,43 ± 0,95
3) NI	4,16 ± 0,02	104,04 ± 0,23	106,05 ± 0,32
4) Rutina	23,26 ± 0,46	581,41 ± 5,80	801,80 ± 1,78
5) M3ORha	100,34 ± 0,01	2508,5 ± 0,1	3040,11 ± 8,8
6) Q3OGal	22,59 ± 1,70	564,76 ± 21,25	766,33 ± 1,19
7) NI	1,90 ± 0,42	47,41 ± 5,25	71,56 ± 0,56
8) NI	2,14 ± 0,03	53,59 ± 0,37	56,35 ± 0,01
9) Q3OAra	5,97 ± 0,05	149,31 ± 0,59	234,98 ± 0,06
10) NI	4,17 ± 0,02	104,35 ± 0,31	144,10 ± 0,41
11) Q3ORha	28,27 ± 0,29	706,81 ± 3,65	943,31 ± 12,70
12) Miricetina	0,98 ± 0,08	24,49 ± 0,98	170,26 ± 1,30
13) M3O(2°OGal)Rha	19,76 ± 0,39	494,07 ± 4,87	1068,60 ± 3,1
14) M3O(3°OGal)Rha	23,43 ± 1,38	585,79 ± 17,22	815,95 ± 1,64
15) NI	2,25 ± 0,05	56,24 ± 0,57	138,37 ± 0,04
16) NI	1,07 ± 0,06	26,65 ± 0,74	74,92 ± 2,60
17) quercetina	0,72 ± 0,01	18,06 ± 0,14	107,27 ± 0,83
Flavonóides totais	287,51 ± 2,38	7187,7 ± 29,7	10081,3 ± 16,4

* DP = desvio padrão para $n = 6$;

** NI = não identificado;

*** nd = não detectado.

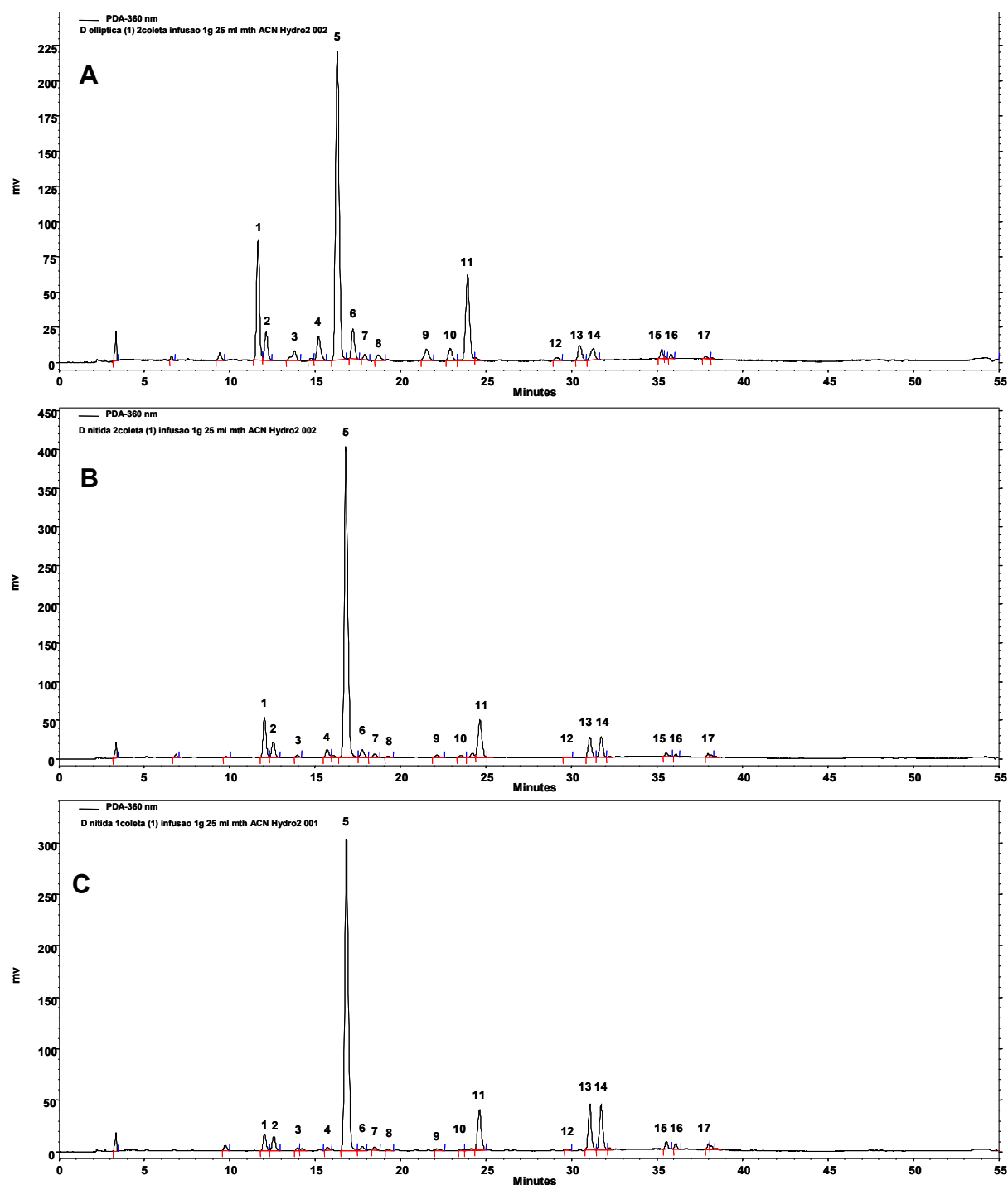


Figura 2.22. Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos flavonóides presentes no infuso das folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*. Identificação dos picos cromatográficos é a mesma dada na Tabela 2.8. **A)** *D. elliptica*, **B)** *D. nitida* coleta: agosto de 2002 e **C)** *D. nitida* coleta: março de 2002. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5).

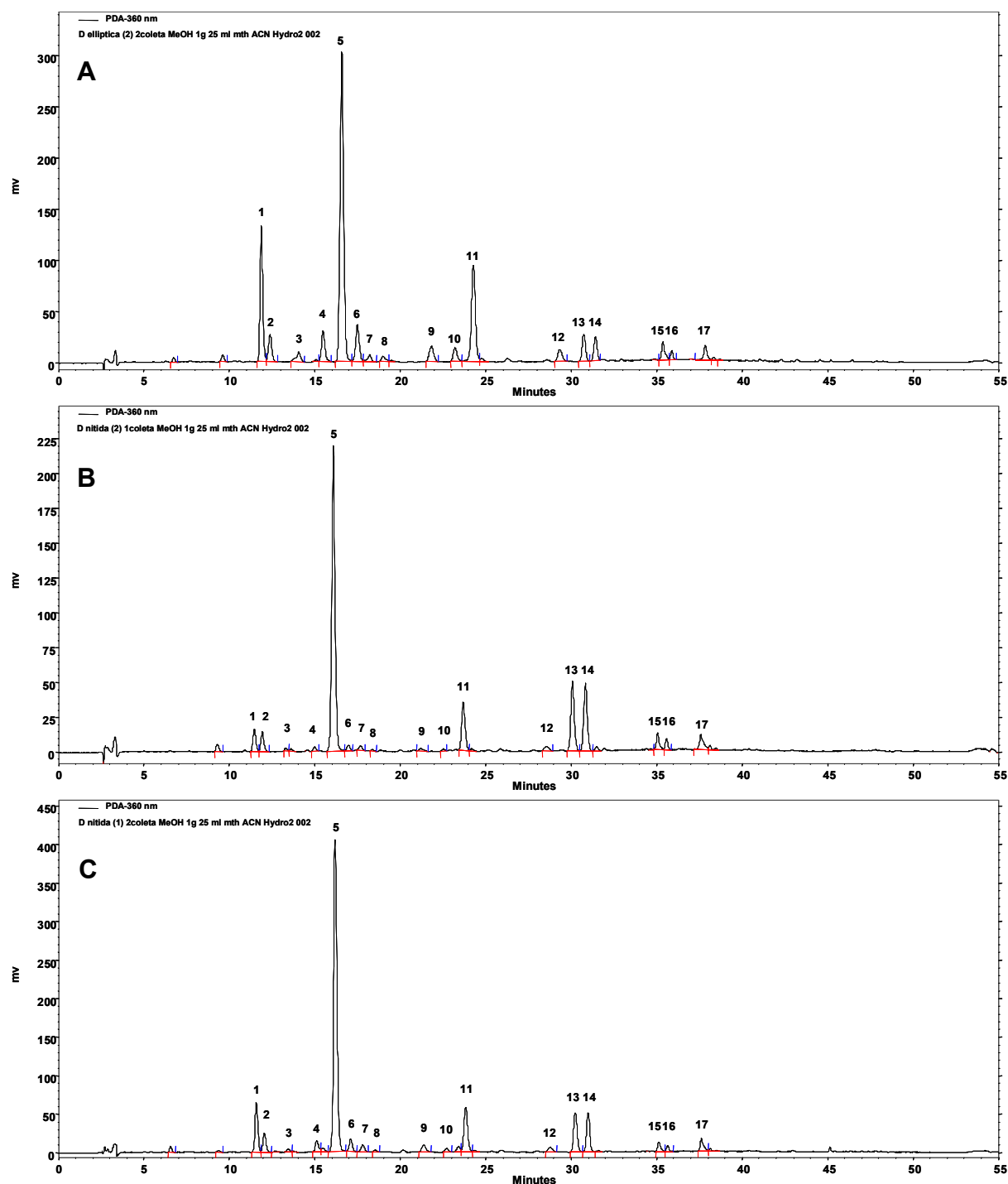


Figura 2.23. Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos flavonóides presentes no extrato MeOH das folhas de *D. nitida* e *D. elliptica*. Identificação dos picos cromatográficos é a mesma dada na Tabela 2.8. **A)** *D. elliptica*, **B)** *D. nitida* coleta: agosto de 2002 e **C)** *D. nitida* coleta: março de 2002. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC-PAD (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 2.5).

Capítulo 3:

Gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae)

A família Malpighiaceae compreende aproximadamente 60 gêneros e 1200 espécies, sendo que 50% encontram-se no Brasil. Sua distribuição geográfica é pantropical com concentração na América do Sul (Fig. 3.1). São árvores, arbustos ou trepadeiras simples. Seu uso econômico se dá como frutos comestíveis, ornamental ou como ingrediente chave em misturas alucinógenas desenvolvidas por tribos indígenas na Amazônia (HEYWOOD, 1993). É o caso do gênero *Banisteriopsis*, cujas espécies são empregadas em rituais indígenas e seu efeito alucinógeno está relacionado com a presença de alcalóides carbolínicos (GHOSAL, 1972). Os gêneros mais importantes da América meridional são *Malpighia* e *Byrsonima* (JOLY, 1977).

No Brasil, membros do gênero *Byrsonima* são empregados não apenas na medicina popular, como antiasmáticas, antifebris e no tratamento de infecções cutâneas (CÁCERES *et al.*, 1993), mas também como fonte alimentícia no preparo de sucos, geléias e licores, principalmente na região Norte e Nordeste do Brasil (SANNOMIYA *et al.*, 2004).

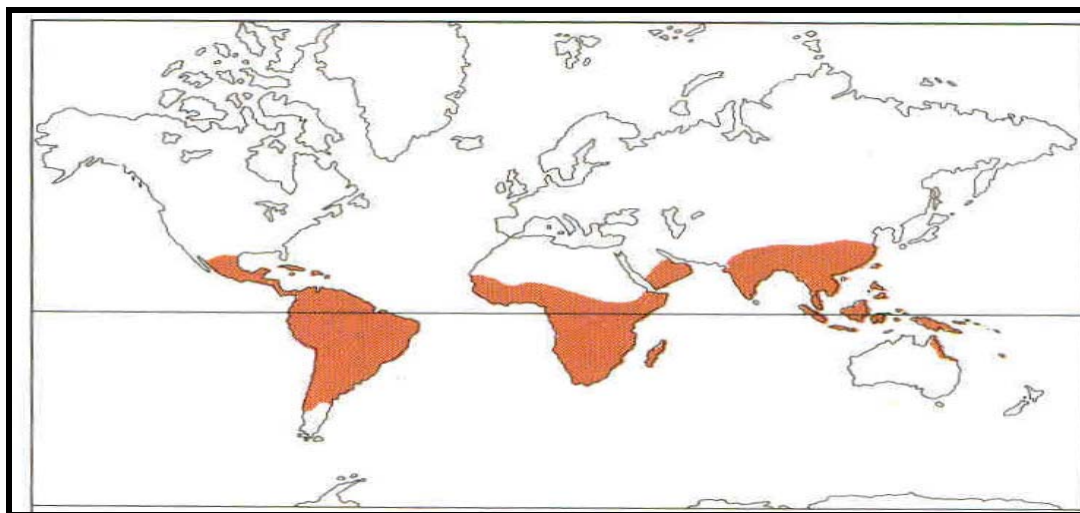


Figura 3.1. Distribuição geográfica das espécies pertencentes à família Malpighiaceae (Heywood, 1993).

Até o momento, poucas espécies foram estudadas quimicamente. GOTTlieb e colaboradores (1975) isolaram triterpenos do tronco de *B. verbascifolia*. As folhas de *B. microphylla* forneceram triterpenos esterificados com ácidos graxos, quercetina e galato de metila (MENDES *et al.*, 1999). Vários grupos de pesquisas estudaram

quimicamente *B. crassifolia*, da qual foram isolados compostos voláteis dos frutos, glicolípídeos, triterpenos, catequinas, e flavonóides das folhas (AMARQUAYE *et al.*, 1994; RASTRELLI *et al.*, 1997) e, do tronco proantocianidinas (GEISS *et al.*, 1995). No Norte e Nordeste do Brasil, as folhas e troncos de algumas espécies de *Byrsonima* são usados popularmente em disfunções gástricas, infecções cutâneas, contra picadas de cobra e ainda como antidiarréicos (AMARQUAYE *et al.*, 1994). A literatura relata os efeitos espasmogênicos em ratos (BEJAR *et al.*, 1995), atividade antifúngica (CÁCERES *et al.*, 1993), bactericida (MARTÍNEZ-VÁSQUEZ *et al.*, 1999) e antidermatófito de *B. crassifolia* (CÁCERES *et al.*, 1991).

Apesar do vasto uso popular de espécies deste gênero como medicamento, na terapêutica contra asma, contra a febre e no tratamento de infecções cutâneas (CÁCERES *et al.*, 1991), encontram-se poucos estudos sobre a química e apenas para algumas das espécies pertencentes a este gênero. Essa incipiência de dados justificou o trabalho de realizar o estudo de extratos das folhas de *B. basiloba*, *B. coccolobifolia*, *B. crassa*, *B. fagifolia* e *B. intermedia*. (Fig. 3.2).

Dentro deste contexto, cinco espécies do gênero *Byrsonima*, as quais possuem indicações etnofarmacológicas como antiúlceras, foram investigadas quanto à similaridade entre as suas composições químicas através do uso das técnicas de HPLC-PAD e FIA-ESI-IT-MS.



Byrsonima basiloba A.Juss.



Byrsonima intermedia A. Juss.



Byrsonima crassa Nied.



Byrsonima fagifolia Nied.



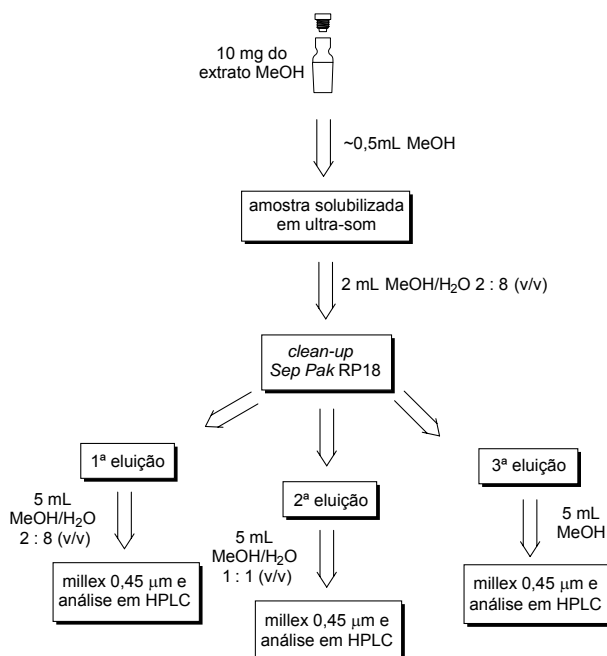
Byrsonima coccolobifolia Kunth

Figura 3.2. Fotos das espécies do gênero *Byrsonima* estudadas.

Parte experimental / Resultados e discussões

Identificação das classes de substâncias presentes em *B. crassa*

A avaliação das espécies do gênero *Byrsonima* iniciou com a investigação por HPLC-PAD dos metabólitos secundários encontrados nos eluatos provenientes do *clean-up* de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa* em SPE (Esquema 3.1). Após as análises cromatográficas, usando os gradientes de eluição descritos na Tabela 3.1, foi possível identificar algumas das substâncias eluídas. As identificações foram baseadas na aquisição de dados espectroscópicos na região do UV, por comparação do tempo de retenção e principalmente por co-injeção com padrões comerciais ou por aqueles isolados de fontes vegetais.



Esquema 3.1. Etapas de *clean-up* empregadas nos procedimentos de SPE do extrato MeOH de *B. crassa* em cartuchos de Sep Pak RP18.

Tabela 3.1. Gradientes de eluição empregados na separação por HPLC-PAD dos metabólitos secundários de *Byrsonima crassa*

Sistema 1			
Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + TFA 0,05%	ACN + TFA 0,05%	0	23
		50	36
		60	100
		70	100
Sistema 2			
H ₂ O + TFA 0,05%	ACN + TFA 0,05%	0	32
		20	38
		60	80
		61	100
		65	100

No primeiro eluato da SPE foram caracterizadas substâncias pertencentes à classe de ácidos fenólicos (bandas intensas nas faixas espectrais de 190-220 e 260-280 nm) e de catequinas (bandas intensas na faixa espectral de 190-220 e bandas fracas de 270-280 nm) (ROHR *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000). A partir do cromatograma da Figura 3.3 foi possível identificar os seguintes metabólitos secundários: **1** ácido gálico; **2** galato de metila; **3** catequina; **4** *epicatequina* e **5** *epigallocatequina* galato.

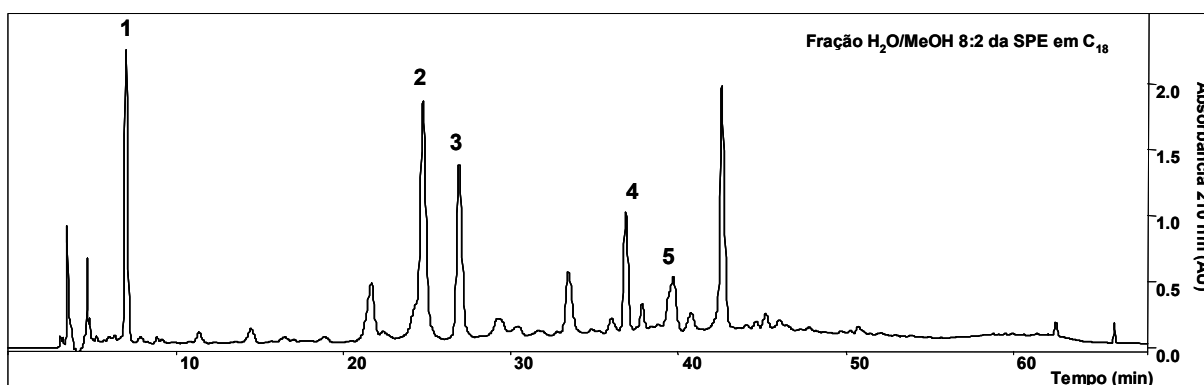


Figura 3.3. Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH/H₂O 2:8 v/v obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Identificação: **1** ácido gálico; **2** galato de metila; **3** catequina; **4** *epicatequina*; **5** galato de *epigallocatequina*. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 1).

No segundo eluato da SPE foi verificada a presença de flavonóides e taninos condensados. Para evitar a interferência espectral dos taninos condensados, os flavonóides foram monitorados em 360 nm e deste eluato foi possível identificar diretamente mais cinco substâncias: **6** quercetina-3-O-β-galactopiranosídeo; **7** quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-β-galactopiranosídeo; **8** quercetina-3-O-α-arabinopiranosídeo; **9** quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-arabinopiranosídeo e **10** quercetina, dos quais três haviam sido descritas por SANNOMIYA e colaboradores (2004) (Fig. 3.4).

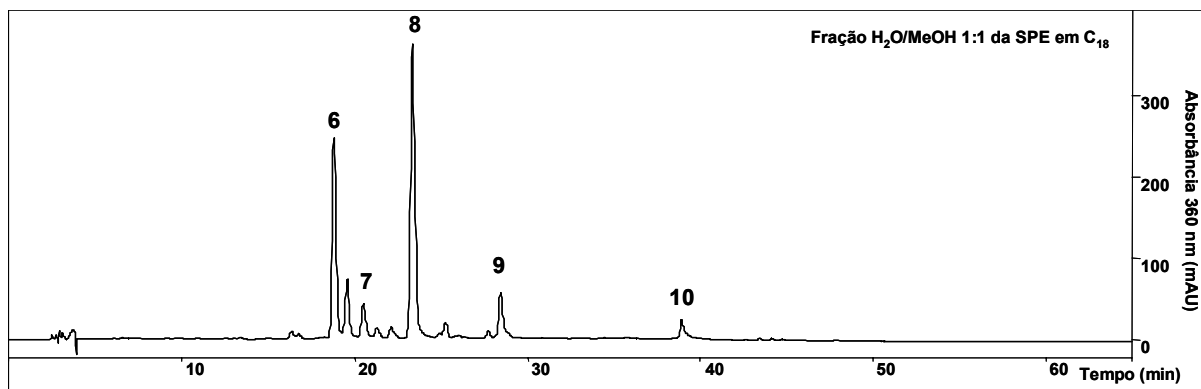


Figura 3.4. Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH/H₂O 1:1 v/v obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Identificação: **6** quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; **7** quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- β -galactopiranosídeo; **8** quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo; **9** quercetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -arabinopiranosídeo; **10** quercetina. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 2).

No terceiro eluato da SPE foi observada a presença de um único pico cromatográfico. A substância eluída foi também caracterizada como um flavonóide por apresentar espectro na região do UV com dois máximos de absorção em 268 e 335 nm, máximos que por sua vez são compatíveis com as bandas I e II, referentes aos anéis B e A de um núcleo flavonoídico (MERKEN & BEECHER, 2000). Após os experimentos de co-injeção, verificou-se tratar de um biflavonóide: **11** amentoflavona (Fig. 3.5).

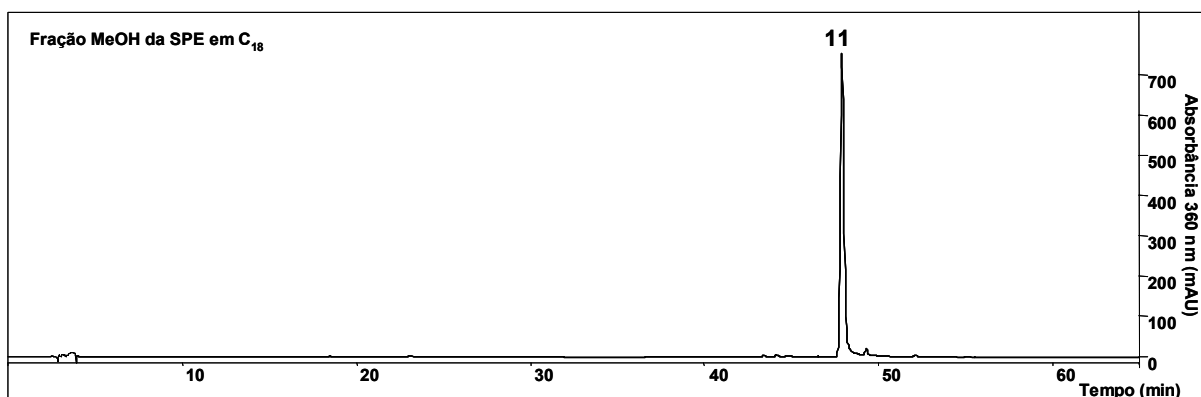


Figura 3.5. Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH 100% obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Identificação: **11** amentoflavona. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 2).

Averiguação em vários comprimentos de onda, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 3.6, mostrou a ausência de outras substâncias que apresentassem grupos cromóforos, indicando assim que houve seletividade na eluição deste flavonóide nas condições empregadas. Portanto, a partir dos

experimentos que envolveram as etapas de SPE do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*, nota-se que o procedimento pode ser uma estratégia bastante interessante se um dos objetivos for o de isolar o biflavonóide **11** em quantidades apreciáveis e com relativo grau de pureza. Esses fatores são imprescindíveis para a realização de ensaios químico-farmacológicos, principalmente *in vivo*. Por outro lado, este aspecto pode apresentar um fator complicador, visto que a eluição de metabólitos secundários em todos os efluentes da SPE fragmenta o número de amostras com conseqüente aumento do número de análises, fator que não é desejável, principalmente em avaliações de ordem quantitativa. Desta maneira, as etapas de eluição com MeOH/H₂O 1:1 v/v e MeOH durante o procedimento de SPE foram unificados para que todos os flavonóides fossem coletados em um único eluato.

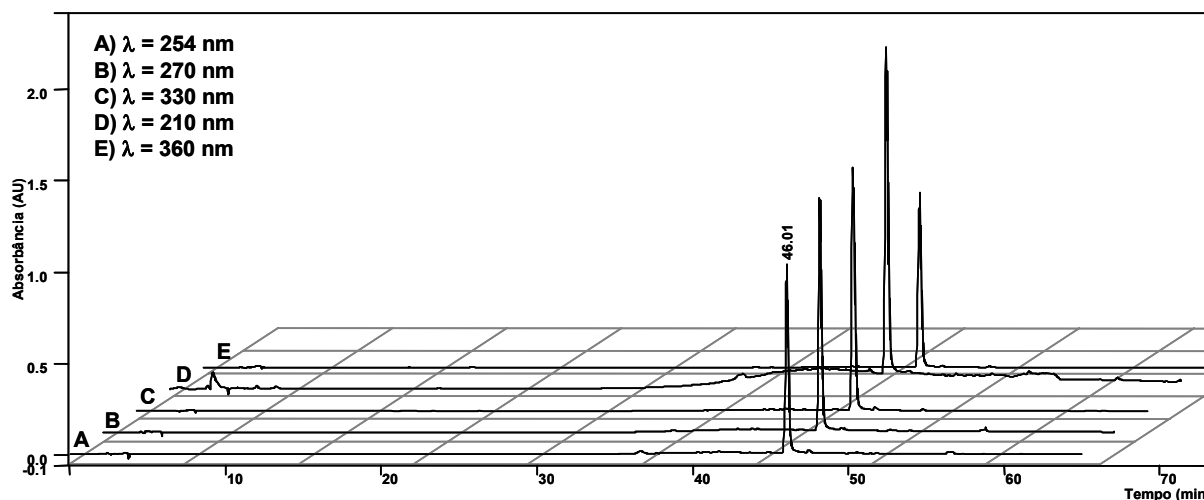


Figura 3.6. Cromatograma de separação por HPLC-PAD do eluato MeOH 100% obtido após *clean-up* em SPE de 10 mg do extrato MeOH das folhas de *B. crassa*. Avaliação do flavonóide **11** amentoflavona com comprimento de onda processado em: **A)** 254 nm; **B)** 270 nm; **C)** 330 nm; **D)** 210 nm e **E)** 360 nm. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Varian®), fluxo 1,0 mL min⁻¹. (Para condições de eluição veja Tabela 3.1, Sistema 2).

Triagem cromatográfica das espécies do gênero *Byrsonima*

Devido ao longo tempo entre a produção dos extratos MeOH das demais espécies e sua avaliação cromatográfica, foi verificado que a composição referente à catequinas havia sido comprometida por conta dos efeitos de estabilidade, discutidos previamente no Capítulo 1. Desta forma, as análises foram inviabilizadas pela grande quantidade de taninos condensados. Para contornar este problema optou-se em avaliar a composição química das espécies investigadas a partir de infusos recém preparados.

O infuso de cada espécie foi feito com 1 g das folhas secas e trituradas. O material vegetal foi colocado em um erlenmeyer de 125 mL e em seguida adicionado 10 mL de água aquecida a 80°C. O solvente foi mantido em contato com o material vegetal por 10 min sob agitação manual. O infuso foi posteriormente filtrado em filtro de papel para remoção de macro partículas e a solução filtrada ajustada em um balão volumétrico para o volume final de 10 mL. Alíquotas dos infusos foram filtradas em membranas de PTFE (0,45 µm) e analisadas por HPLC-PAD.

A identificação das substâncias presentes nos infusos nas espécies de *Byrsonima* foi efetuada após as análises cromatográficas. Condições otimizadas foram empregadas na eluição cromatográfica para a avaliação dos derivados de ácidos fenólicos e catequinas (Sistema 1, Tabela 3.2) e dos flavonóides (sistema 2, Tabela 3.2). As substâncias encontradas foram comparadas com aquelas presentes em um banco de padrões e a identificação realizada conforme discutido nos capítulos anteriores.

Tabela 3.2. Gradientes de eluição empregados na separação por HPLC-PAD dos metabólitos secundários presentes em espécies do gênero *Byrsonima*

Sistema 1			
Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + TFA 0,05%	ACN + TFA 0,05%	0	23
		50	36
		60	100
		70	100
Sistema 2			
H ₂ O + TFA 0,05%	ACN + TFA 0,05%	0	32
		20	38
		60	80
		61	100
		65	100

Após a avaliação dos espectros na região do UV para as espécies de *Byrsonima* foi verificada grande similaridade quanto à composição de derivados de ácidos fenólicos, catequinas e mesmo trabalhando com infusos houve significativa presença de taninos condensados em *B. crassa*, *B. coccolobifolia*, *B. intermedia* e em *B. basiloba* (Fig. 3.7A-D). Por outro lado, *B. fagifolia* não apresentou em sua composição a presença dos flavan-3-óis monoméricos e poliméricos (Fig. 3.7E), característicos nas outras quatro espécies.

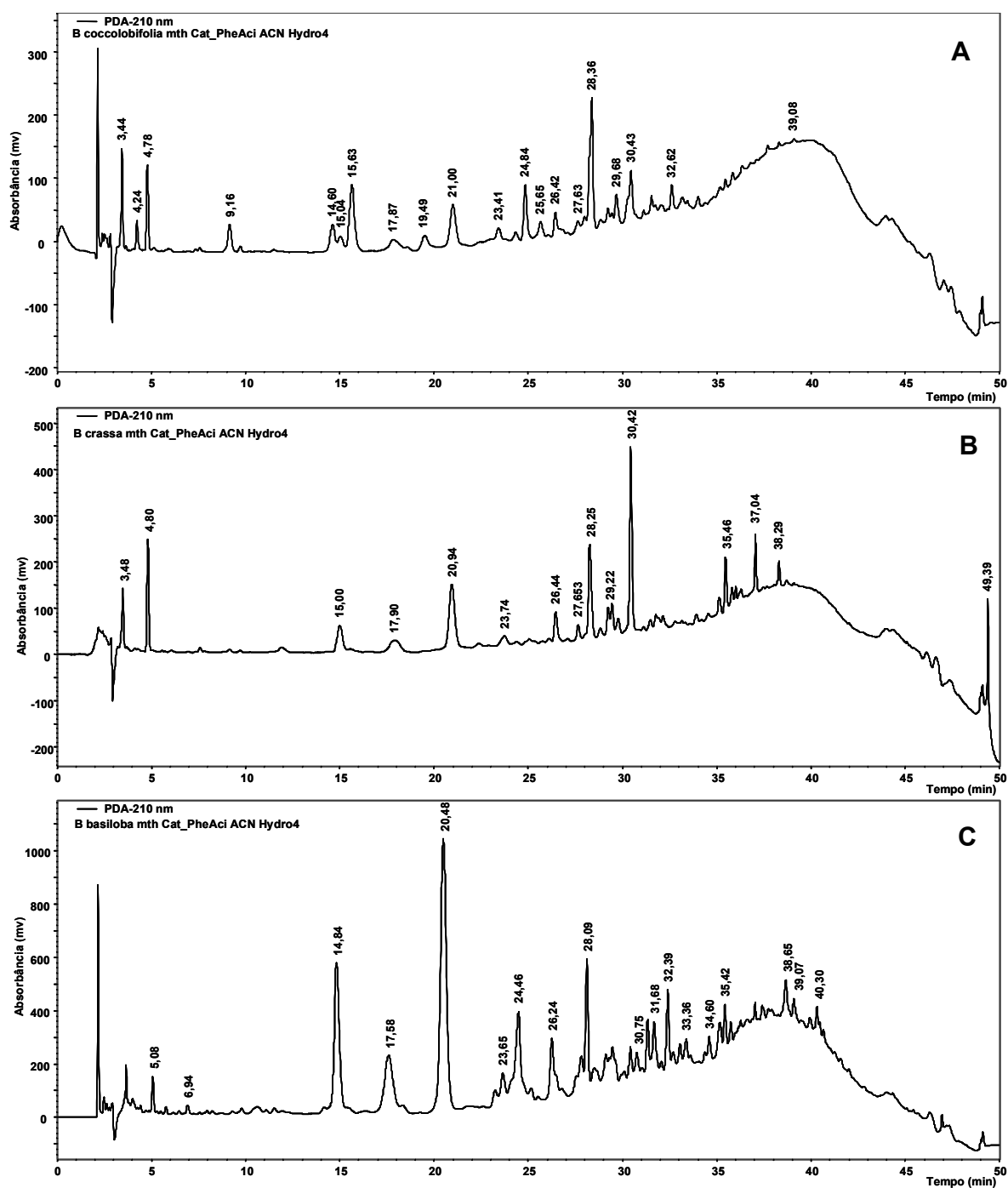


Figura 3.7. Separação cromatográfica por HPLC-PAD do infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 1).

Continuação da Figura 3.7

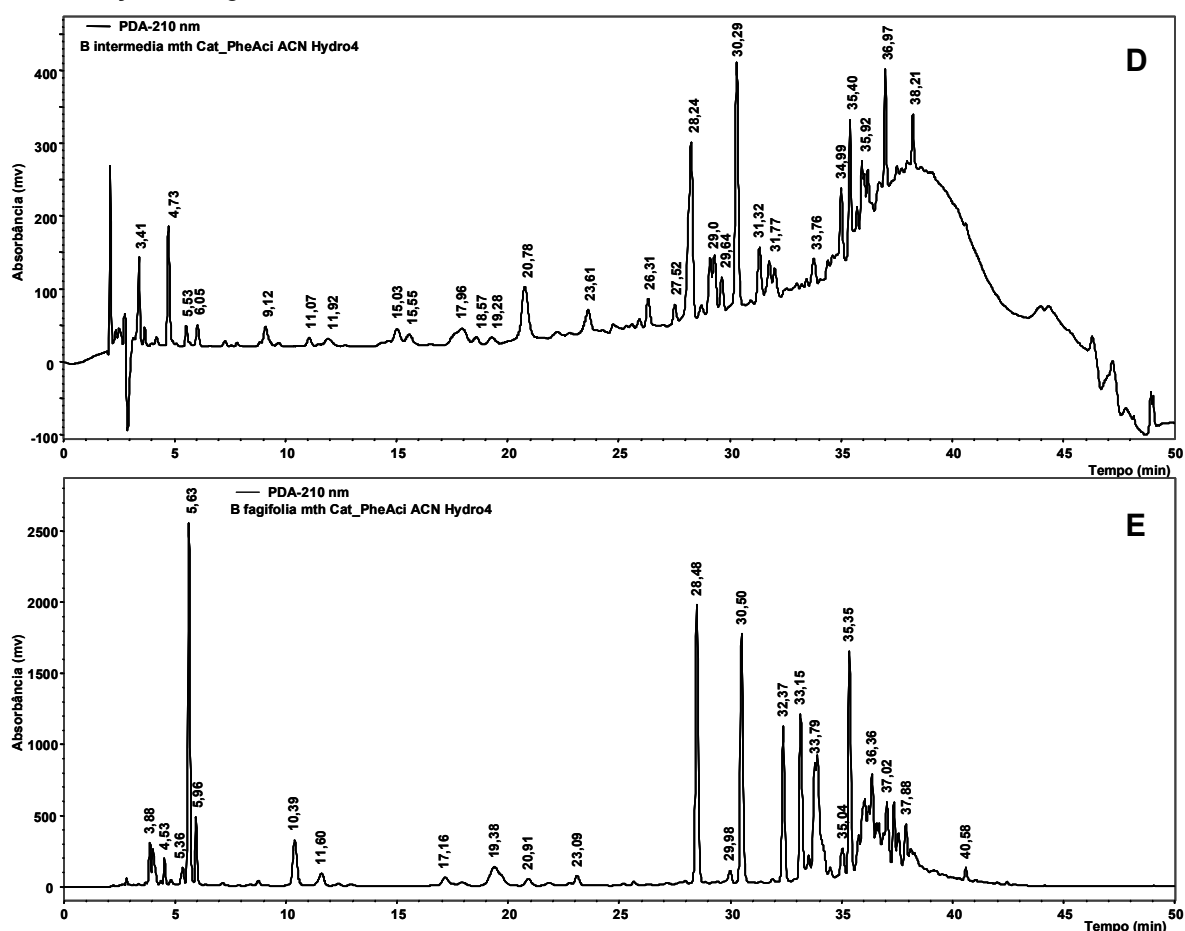


Figura 3.7. Separação cromatográfica por HPLC-PAD do infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 210 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 1).

Comparação entre a composição dos flavonóides evidenciou certo padrão de ocorrência para alguns desses metabólitos secundários, principalmente para os flavonóides monoglucosilados (Fig. 3.8). A Tabela 3.3 lista as principais substâncias encontradas nas espécies de *Byrsonima*.

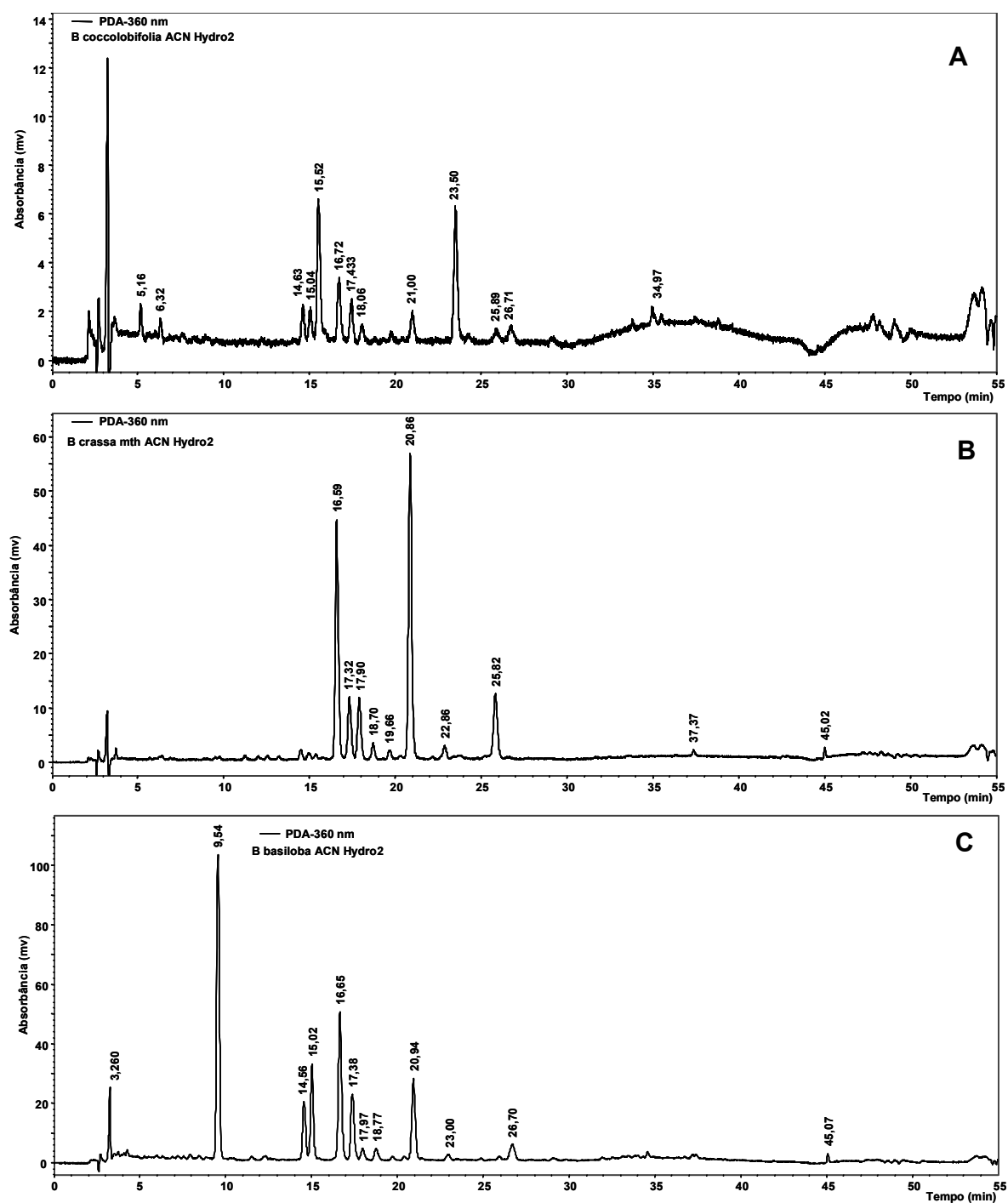


Figura 3.8. Separação cromatográfica por HPLC-PAD de flavonóides presentes no infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 μ m), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 μ L, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 2).

Continuação da Figura 3.8

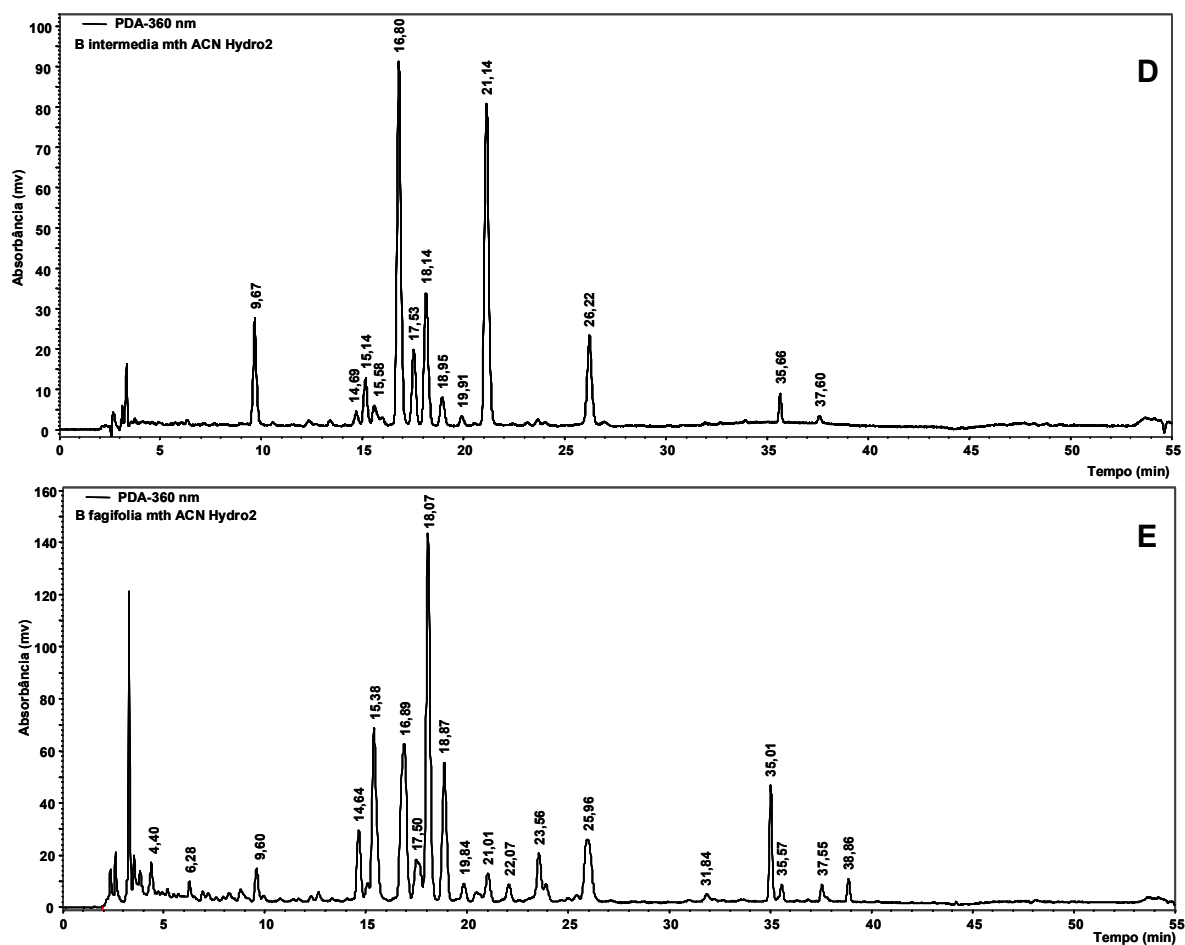


Figura 3.8. Separação cromatográfica por HPLC-PAD de flavonóides presentes no infuso das folhas de: **A)** *B. coccolobifolia*; **B)** *B. crassa*; **C)** *B. basiloba*; **D)** *B. intermedia*; **E)** *B. fagifolia*. Coluna Phenomenex® Synergi Hydro (250 x 4.0 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®). Volume injetado: 20,0 µL, fluxo: 1,0 mL min⁻¹, λ = 360 nm. (Para condições de eluição veja Tabela 3.2, sistema 2).

Tabela 3.3. Bandas de absorção na região do UV para os metabólitos secundários identificados nas espécies do gênero *Byrsonima*

Atribuição	Bandas de máximo de absorção (nm)	Presente em (*)	Confirmação com padrão (**)
Ácidos fenólicos		-	-
Ácido gálico	215; 271	Bcr, Bba, Bco, Bin, Bfa	Sim
Galato de metila	216; 272	Bcr, Bba, Bco, Bin, Bfa	Sim
Ácido elágico	253; 366	Bfa	Sim
Catequinas		-	-
catequina	203; 230(sh); 278	Bcr, Bba, Bin	Sim
epicatequina	203; 229(sh); 278	Bcr, Bba, Bco, Bin	Sim
galato de epigalocatequina	208; 233(sh); 271	Bcr, Bba, Bco, Bin	Sim
Flavonóides		-	-
Q3ORha(1-3)ORha(1-6)OAla	256; 354	Bba, Bin, Bfa	Sim
Q3ORha(1-6)Gal	255; 353	Bco, Bin, Bfa	Sim
Q3OGal	255; 355	Bco, Bcr, Bba, Bin, Bfa	Sim
Q3O(2"Gall)Gal	265; 297(sh); 358	Bco, Bcr, Bba, Bin, Bfa	Sim
Q3OAra	256; 355	Bco, Bcr, Bba, Bin, Bfa	Sim
Q3ORha	255; 347	Bco	Sim
Q3O(2"Gall)Ara	266; 296(sh); 356	Bco, Bcr, Bba, Bin, Bfa	Sim
Quercetina	254; 370	Bco(**), Bcr, Bba(**), Bin, Bfa	Sim
Amentoflavona	268; 334	Bcr, Bba, Bin(**)	Sim

(*) Bcr (*B. crassa*); Bba (*B. basiloba*); Bco (*B. coccolobifolia*); Bin (*B. intermedia*) e Bfa (*B. fagifolia*).

(**) análise de co-injeção por HPLC-PAD;

(***) ausente no infuso, presente no extrato MeOH.

Tendo em vista que os infusos foram produzidos nas mesmas condições, pode-se inferir que *B. coccolobifolia* é a espécie que apresentou menor concentração no conteúdo de flavonóides (Fig. 3.8A). Por sua vez, foi verificado que apenas nesta espécie há ocorrência do flavonol quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, pico de t_r = 25,00 min.

B. basiloba e *B. intermedia* apresentaram um flavonóide cuja polaridade era superior ao da rutina, indicando que este metabólito secundário deveria possuir um padrão de oxidação superior ou ainda ser um triglucosídeo. Etapas de purificação a partir do infuso das folhas de *B. basiloba* possibilitaram o isolamento deste flavonóide, o qual foi caracterizado como quercetina-3-O- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-[α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -alopiranosídeo, (trabalho não publicado).

B. crassa, *B. intermedia* e *B. basiloba* exibiram um perfil flavonoídico bastante similar. Nelas foram identificados, em comum, os flavonóides: quercetina-3-O-galactopiranosídeo; quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-galactopiranosídeo; quercetina-3-O-arabinopiranosídeo; quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-arabinopiranosídeo; quercetina e amentoflavona.

B. fagifolia foi a espécie que mais se distinguiu com relação a presença de flavonóides, a partir da investigação dos espectros na região do UV para os picos eluídos no cromatograma da Figura 3.8E, foi observado que os flavonóides exibiam um ombro na região de 299 nm, além das duas bandas referentes aos anéis A e B do núcleo flavonoídico. Esse perfil espectral é compatível com o de flavonóides esterificados. Em *B. fagifolia*, foram identificados os flavonóides quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-galactopiranosídeo (t_r = 18,07 min); quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-arabinopiranosídeo (t_r = 25,96 min) e quercetina (t_r = 37,55 min). Além desses, foi confirmado ainda a presença do ácido elágico (t_r = 15,38 min). A Figura 3.9 ilustra os espectros na região do UV dos principais picos monitorados em 360 nm.

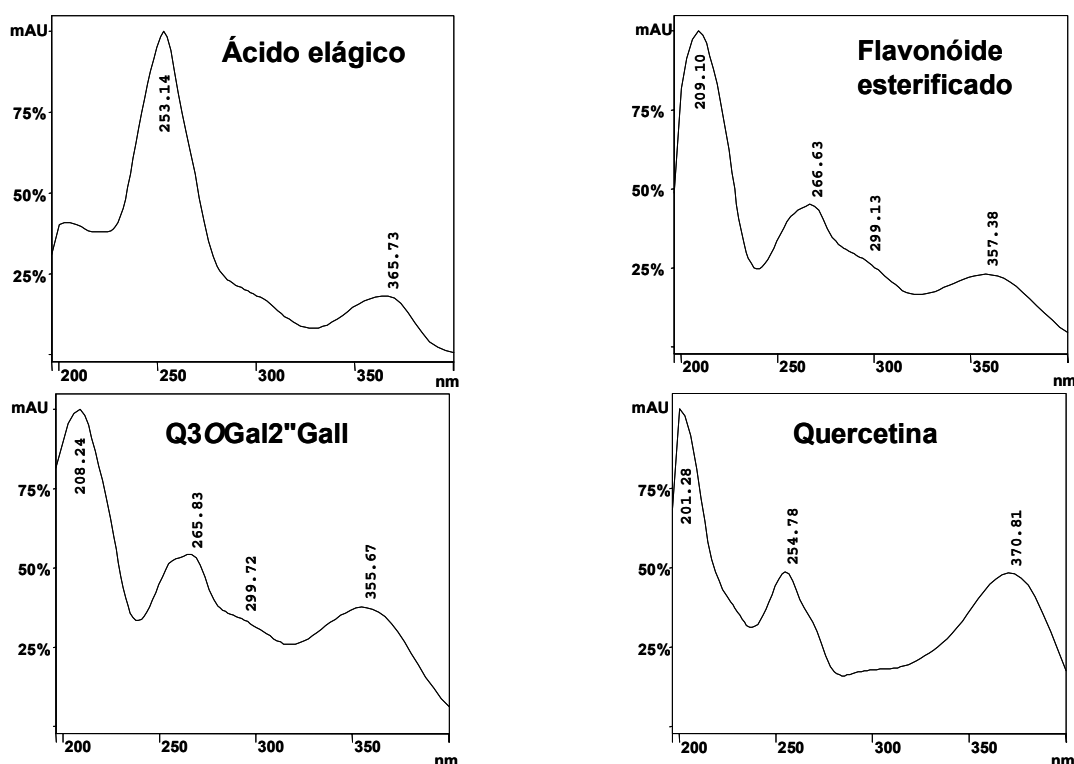


Figura 3.9. Espectros na região do UV para algumas das classes de substâncias encontradas em *B. fagifolia*.

Análises por FIA-ESI-IT-MS

Recentemente a técnica de ESI-MS com inserção direta de amostra tem mostrado ser uma ferramenta rápida, eficiente e de grande sensibilidade. Ela é capaz de gerar informações específicas sobre a composição química de matrizes bastante complexas, as quais apresentam substâncias de ampla faixa de peso molecular, bem como substâncias de média e alta polaridade, tais como ácidos fenólicos, proantocianidinas, catequinas e flavonóides, comumente encontrados em extratos polares de espécies vegetais (SAWAYA *et al.*, 2004). Tendo em vista estas características, nesta etapa foram realizados experimentos de FIA-ESI-IT-MS para a obtenção e comparação dos perfis dos infusos de cinco espécies do gênero *Byrsonima* em modo negativo, o que permitiu estabelecer e confirmar a similaridade [ou não] da composição química das espécies investigadas.

Preparo das amostras

As infusões foram produzidas na proporção de 10% (m/v), conforme citado anteriormente. Para cada infusão filtrada, 500 μL foram diluídos com MeOH para o volume final de 1 mL e a solução introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsional por um sistema de bombeamento em fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Averiguação dos espectros de massas em *full-scan* (Fig. 3.10) revelou a presença de várias substâncias, as quais são representadas pelos íons precursores das moléculas desprotonadas ($[M - H]^-$) para as infusões das folhas de cinco espécies de *Byrsonima*. Com base nas substâncias previamente isoladas de *B. crassa* (SANNOMIYA *et al.*, 2004), bem como pela avaliação da composição química desta espécie, feita pela mesma autora por HPLC-MS (SANNOMIYA; MONTORO *et al.*, 2005), foi possível estabelecer correlação com a composição química das demais. A Tabela 3.4 sumariza as principais características sobre os íons produtos observados durante as análises por FIA-ESI-IT-MS/MS.

Tabela 3.4. Dados espectrométricos das substâncias identificadas durante os experimentos de FIA-ESI-IT-MS/MS

Atribuição	Ion precursor (m/z)	Ions produtos (MS ²) (m/z)	Presente em (*)	Confirmação com padrão (**)
Ácidos fenólicos	-	-	-	-
Ácido gálico	169	125	Bcr, Bba, Bco, Bin, Bfa	Sim
Galato de metila	183	-	Bcr, Bba, Bco, Bin, Bfa	Sim
Ácido quínico	191	-	Bcr, Bba, Bin, Bco	Não
Ácido monogaloilquínico	343	325; 191; 169	Bco, Bin, Bfa	Não
Ácido digaloilquínico	495	477; 343; 325; 169	Bba, Bco, Bin, Bfa	Não
Ácido trigaloilquínico	647	495; 477; 343; 325	Bcr, Bba, Bco, Bin, Bfa	Não
Ácido tetragaloilquínico	799	647; 629; 601; 449; 431	Bcr, Bba, Bin, Bfa	Não
Ácido pentagaloilquínico	951	799; 647; 629; 601	Bfa	Não
Proantocianidinas	-	-	-	-
Dímero [epi]catequina + [epi]afzelequina	561	-	Bcr, Bba, Bin	Não
Dímero [epi]catequina	577	559; 451; 425; 407; 289	Bcr, Bba, Bco, Bin	Não
Galato do dímero [epi]catequina	729	711; 577; 559; 451; 425; 407	Bcr, Bba, Bco, Bin	Não
Digalato do dímero [epi]catequina	881	755; 729; 577	Bin	Não
Trímero [epi]catequina	865	847; 739; 713; 695; 587; 577; 575	Bcr, Bba, Bco, Bin	Não
Galato do trímero [epi]catequina	1017	999; 891; 865; 847; 739; 729; 727; 713; 577	Bcr, Bco, Bin	Não
Tetrâmero	1153	-	Bcr, Bba, Bco	Não
Digalato do trímero [epi]catequina	1169	-	Bin	Não
Flavonóides	-	-	-	-
[epi]catequina	289	137	Bcr, Bba, Bco, Bin	Sim
Quercetina	301	-	Bcr, Bba, Bco, Bin, Bfa	Sim
Galato de [epi]afzelequina	425	-	Bcr, Bba	Não
Q3OAra	433	301	Bcr, Bba, Bco, Bin	Sim
Q3ORha	447	301	Bco	Sim
Q3OGal	463	301	Bcr, Bba, Bco, Bin	Sim
Amentoflavona	537	375	Bcr, Bba	Sim
Q3ORha(1-6)Gal	609	463; 301	Bba, Bco	Sim
Q3O(2"Gall)Ara	585	433; 301	Bcr, Bci, Bco, Bin	Sim
Q3O(2"Gall)Gal	615	463; 301	Bcr, Bin, Bfa	Sim
Q3ORha(1-3)ORha(1-6)OAla	755	609; 301	Bba	Sim

(*) Bcr (*B. crassa*); Bba (*B. basiloba*); Bco (*B. coccolobifolia*); Bin (*B. intermedia*) e Bfa (*B. fagifolia*);

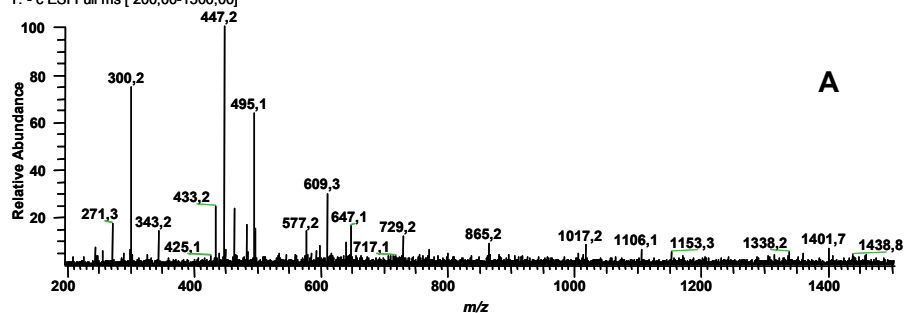
(**) Confirmação em experimentos de co-injeção por HPLC-PAD.

Os espectros de massas indicaram que há grande similaridade entre os metabólitos secundários de todas as espécies, com exceção de *B. fagifolia* (Fig. 3.10E).

Fragmentação dos principais íons precursores em múltiplos estágios evidenciou que flavonóides, proantocianidinas e derivados de ácidos fenólicos foram as principais classes de metabólitos encontrados em *B. coccolobofolia* (Fig. 3.10A), *B. crassa* (Fig. 3.10B), *B. basiloba* (Fig. 3.10C) e em *B. intermedia* (Fig. 3.10D). Por sua vez, em *B. fagifolia* (Fig. 3.10E) não foi observada a presença de íons precursores característicos de proantocianidinas, indicando que esta espécie não apresenta taninos condensados em sua composição química, o que de fato foi observado durante os experimentos de triagem cromatográfica por HPLC-PAD.

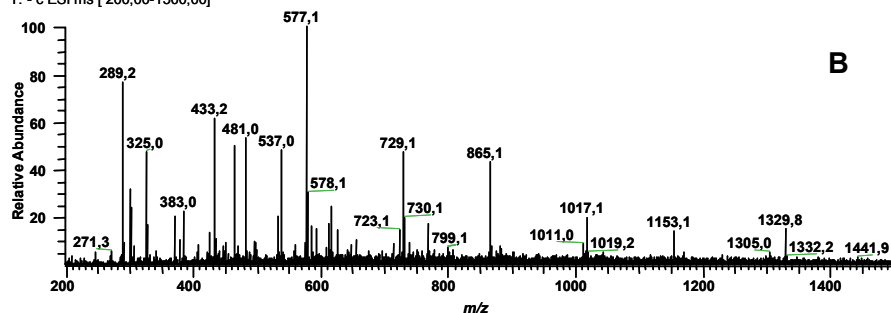
Bco cha' neg msms #75-85 RT: 1,59-1,86 AV: 11 NL: 8,70E5

T: - c ESI Full ms [200,00-1500,00]



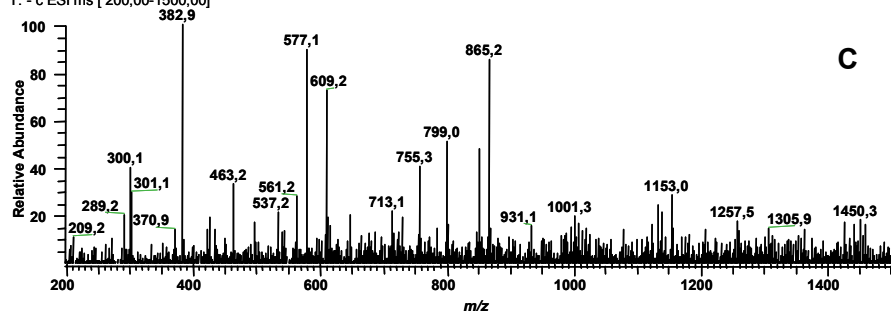
Bcr cha' neg msms #10-65 RT: 0,21-1,35 AV: 55 NL: 2,11E6

T: - c ESI ms [200,00-1500,00]



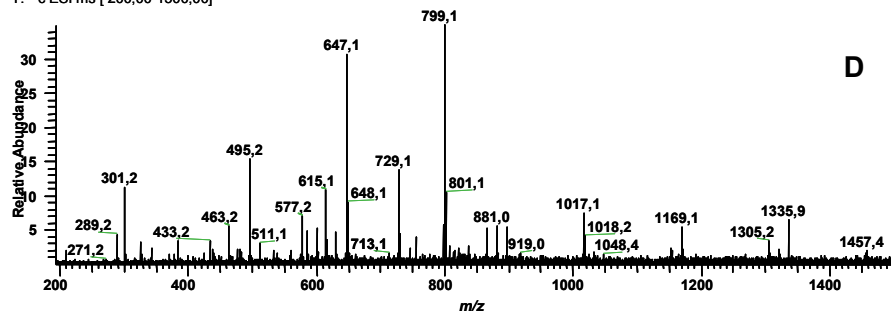
Bba cha' neg msms #25-30 RT: 0,64-0,77 AV: 6 NL: 2,49E5

T: - c ESI ms [200,00-1500,00]



Bb cha' neg msms #57-91 RT: 1,48-2,35 AV: 34 NL: 4,47E6

T: - c ESI ms [200,00-1500,00]



BFFia #396-402 RT: 6,63-6,76 AV: 7 NL: 5,21E5

T: - c Full ms [135,00-1500,00]

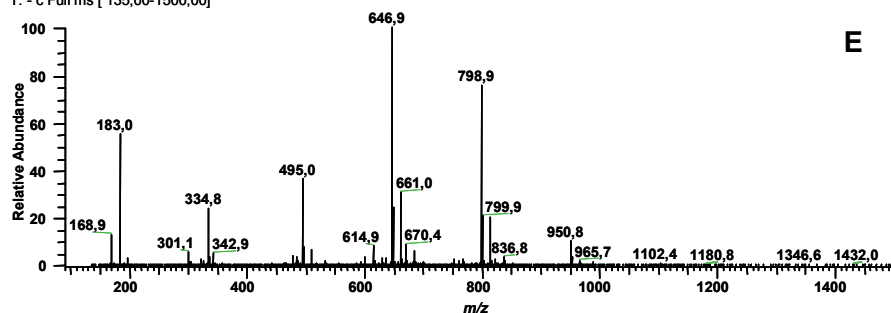
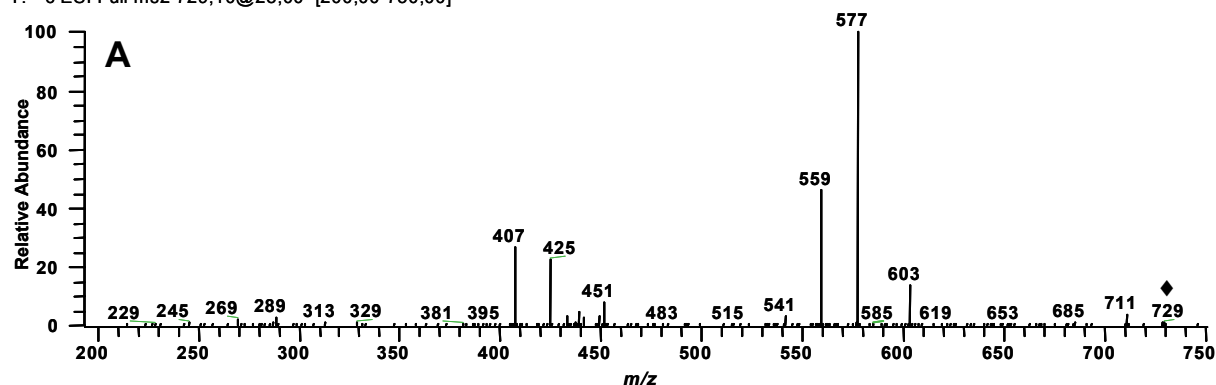


Figura 3.10. Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do: **A)** infuso de *B. coccolobifolia*; **B)** infuso de *B. crassa*; **C)** infuso de *B. basiloba*; **D)** infuso de *B. intermedia* e **E)** infuso de *B. fagifolia*. Para condições espectrométricas veja: parte Experimental.

Numa primeira classe de metabólitos secundários, os íons precursores de procianidinas formadas pela ligação interflavonoídica entre unidades da [epi]catequina de m/z 577 (dímero), m/z 865 (trímero) e m/z 1153 (tetrâmero) foram facilmente encontrados nos espectros de massas em *full-scan* das Figuras 3.10A-3.10D. Outras proantocianidinas mais complexas, formadas pela ligação interflavonoídica de unidades de catequinas distintas também foram sugeridas pela presença de íons característicos visualizados no modo *full-scan*, como por exemplo, os íons precursores de m/z 729 (dímero entre [epi]catequina e galato de [epi]catequina), m/z 1017 (trímero entre duas unidades de [epi]catequina e uma unidade do galato de [epi]catequina), além de outros íons precursores de menor intensidade, como os íons de m/z 561, 881, 1169 e 1305.

Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 729 (Fig. 3.10B) produziu o pico base de m/z 577, esse íon foi gerado pela eliminação do grupo galóila $[M - 152 - H]^-$ da unidade do galato de [epi]catequina deste dímero (Fig. 3.11A). Essa fragmentação pode ser sustentada pela avaliação do espectro de terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 577 (Fig. 3.11B). A formação do pico base em m/z 451 ocorre apenas pela fragmentação do tipo HRF com eliminação do grupo 1,2,3-triidroxibenzeno, conforme mencionado no Capítulo 1, que necessariamente ocorre na unidade superior a partir do dímero formado no experimento MS^2 . A presença dos íons produtos minoritários de m/z 439 e m/z 441 (Fig. 3.11A) sugere que ocorre os dois tipos de dímeros, com a unidade do galato de [epi]catequina estando na base e no topo de cada uma das proantocianidinas possíveis.

Bcr cha' neg msms #168-180 RT: 6,29-6,53 AV: 13 NL: 4,47E5
T: - c ESI Full ms2 729,10@28,00 [200,00-750,00]



Bcr cha' neg msms #181-192 RT: 6,69-6,92 AV: 12 NL: 8,50E4
T: - c ESI Full ms3 729,10@28,00 577,00@28,00 [200,00-750,00]

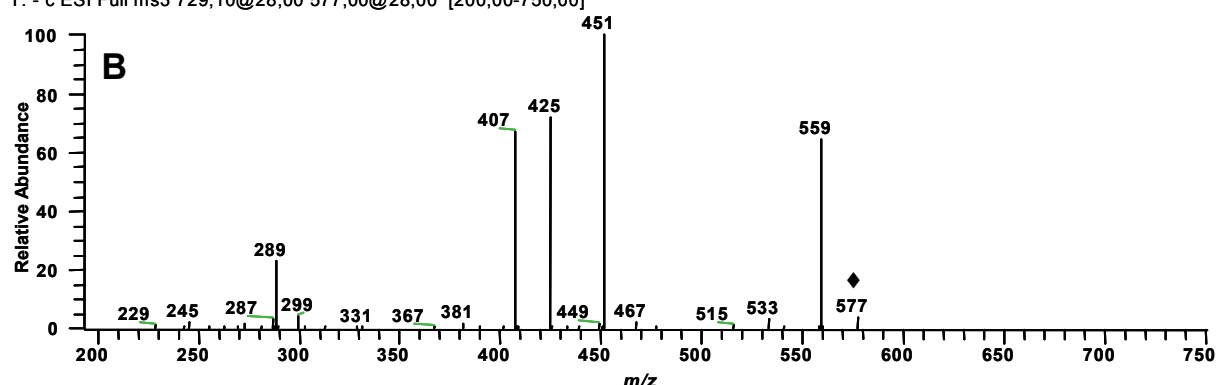


Figura 3.11. A) Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 729, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. B) Espectro de massas de terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 577, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Fragmentação de segunda-ordem da molécula desprotonada de m/z 1017 resultou no espectro de íons produtos mostrado na Figura 3.12 que ilustra inúmeras informações estruturais, compatíveis com uma proantocianidina trimérica.

Bi cha' neg msms #195-203 RT: 8,25-8,48 AV: 9 NL: 6,22E3
T: - c ESI Full ms2 1017,10@25,00 [280,00-2000,00]

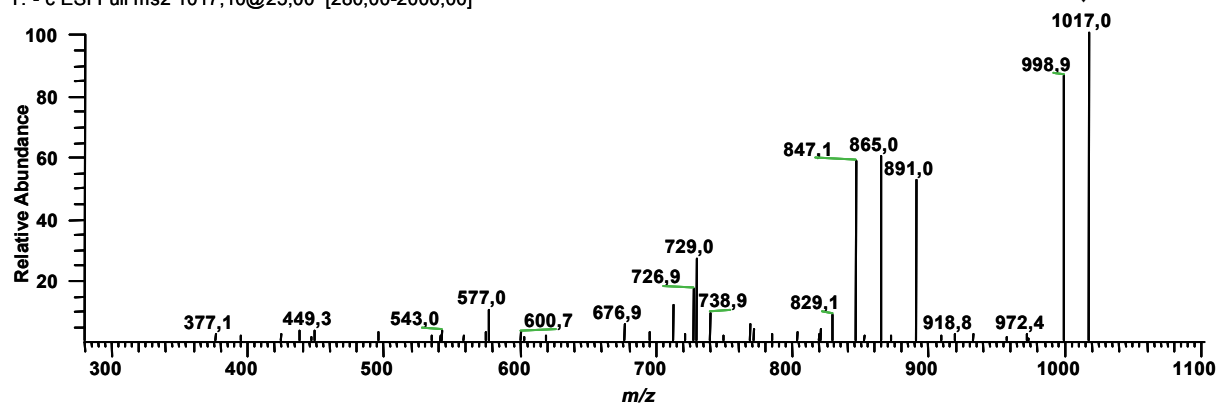


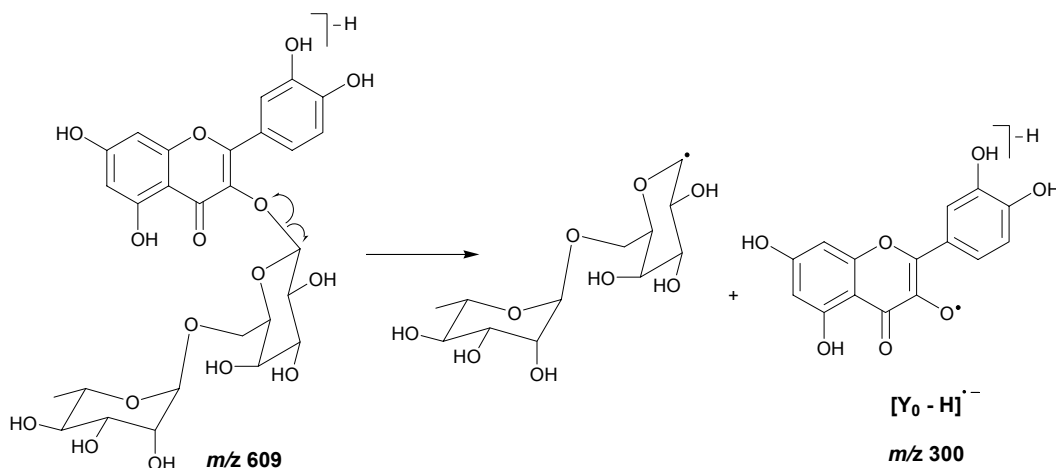
Figura 3.12. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 1017, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

O íon produto de m/z 999 $[M - 18 - H]^-$ é referente à perda de uma molécula de água do trímero pela eliminação do grupo 3-OH livre de uma das unidades monoméricas. O íon produto de m/z 891 foi gerado após a eliminação do anel A como 1,3,5-triidroxibenzeno ($[M - 126 - H]^-$) pela clivagem do anel C da unidade superior do trímero através do mecanismo de fragmentação HRF. O íon produto de m/z 865 é gerado preferencialmente pela eliminação do grupo galoíla $[M - 152 - H]^-$, seguido da eliminação de uma molécula de água para formar o íon de m/z 847 $[M - 152 - 18 - H]^-$ (ZEEB *et al.*, 2000). Esse mesmo íon produto poderia também ser o resultado da clivagem RDA da molécula desprotonada. No entanto, a energia para romper uma ligação C-C é superior à energia necessária para quebrar uma ligação do tipo C-O, e desta forma, a eliminação do grupo galoíla é favorecida.

Os demais íons produtos formados após o fragmento de m/z 865 são referentes às rotas de fragmentação do trímero ilustrado no Esquema 1.3 do Capítulo 1. Neste caso, não houve a formação de um íon diagnóstico que permitisse sugerir a localização do grupo galoíla em uma das três unidades de [epi]catequinas.

Uma segunda classe de metabólitos secundários, comuns a todas as espécies investigadas foi atribuída à presença de flavonóides. Fragmentação MS/MS dos seus íons precursores (Tabela 3.4) permitiu sugerir que estes eram derivados da quercetina. Esta observação foi fundamentada pela formação do íon diagnóstico de m/z 301 e ao ânion-radical de m/z 300, formado por uma clivagem homolítica em derivados O-glucosilados da quercetina (Esquema 3.2) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004, ES-SAFI *et al.*, 2005). O espectro de segunda-ordem para o íon precursor do flavonol quercetina-3-O- α -rhamnosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -galactopiranosídeo de m/z 609 exemplifica a formação do ânion-radical $[Y_0 - H]^\bullet$ (Fig. 3.13).

Em *B. crassa* e em *B. basiloba*, além dos derivados da quercetina foi também observado a presença da biflavona (amentoflavona) de m/z 537 (Fig. 3.10B e 3.10C).



Esquema 3.2. Clivagem homolítica entre unidade de galactose e a aglicona quercetina com formação do íon produto do ânion radicalar ($[Y_0 - H]^{•-}$).

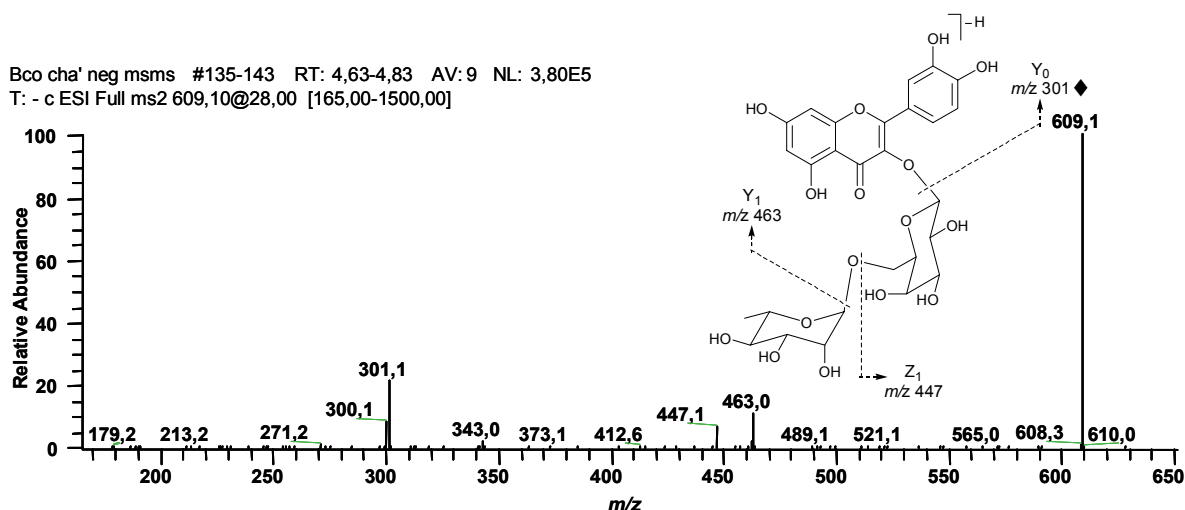


Figura 3.13. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de $m/z\ 609$, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Uma terceira classe de metabólitos secundários foi atribuída à presença de derivados do ácido galoilquínico. Eles são formados pela esterificação das hidroxilas livres do ácido quínico por uma ou mais unidades do ácido gálico. Desta forma, os íons precursores de $m/z\ 343$; $m/z\ 495$; $m/z\ 647$; $m/z\ 799$ e $m/z\ 951$ correspondem a uma série composta de monômeros a pentâmeros. Porém, apenas com os experimentos de MS não foi possível estabelecer a caracterização completa para essas substâncias, visto que existem inúmeras possibilidades de isômeros posicionais e as estruturas mostradas juntamente com os espectros de massas constituem exemplos para ajudar a entender as possíveis rotas de fragmentação.

Os ácidos monogaloilquínicos foram observados pelas seguintes fragmentações. MS/MS do íon precursor de $m/z\ 343$ (Fig. 3.14) gerou o íon produto

$[M - 152 - H]^-$ de m/z 191, este íon é formado pela eliminação do grupo galoil. O íon $[M - 174 - H]^-$ é referente à eliminação do ácido quínico com formação da molécula desprotonada do ácido gálico de m/z 169, que por sua vez gera o íon produto de m/z 125 $[M - 174 - 44 - H]^-$ com eliminação sequencial de CO_2 .

Bco cha' neg msms #127-134 RT: 4,21-4,40 AV: 8 NL: 1,27E5
T: - c ESI Full ms2 343,10@28,00 [90,00-400,00]

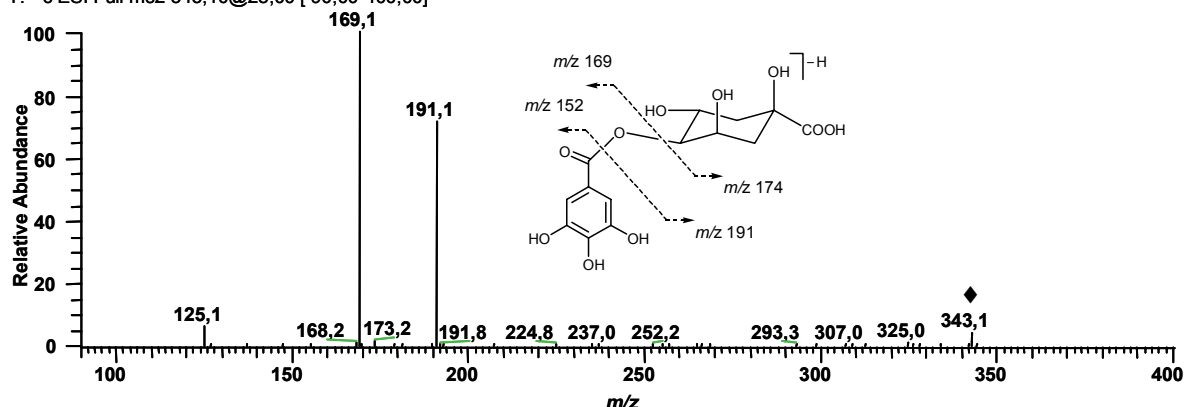


Figura 3.14. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 343, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Os derivados do ácido digaloilquínico exibiram padrão de fragmentação similar. Espectro de segunda-ordem para o íon precursor de m/z 495 (Fig. 3.15) mostrou eliminação de água a partir de desidratação do núcleo do ácido quínico com formação do íon produto de m/z 477; formação do pico base de m/z 343 pela perda de uma unidade galoila com subsequente eliminação de água para formar o íon de m/z 325 e o íon de m/z 169 foi interpretado como a uma molécula desprotonada do ácido gálico.

BFFia #288-352 RT: 4,75-5,88 AV: 65 NL: 4,00E3
T: - c Full ms2 495,00@40,00 [135,00-500,00]

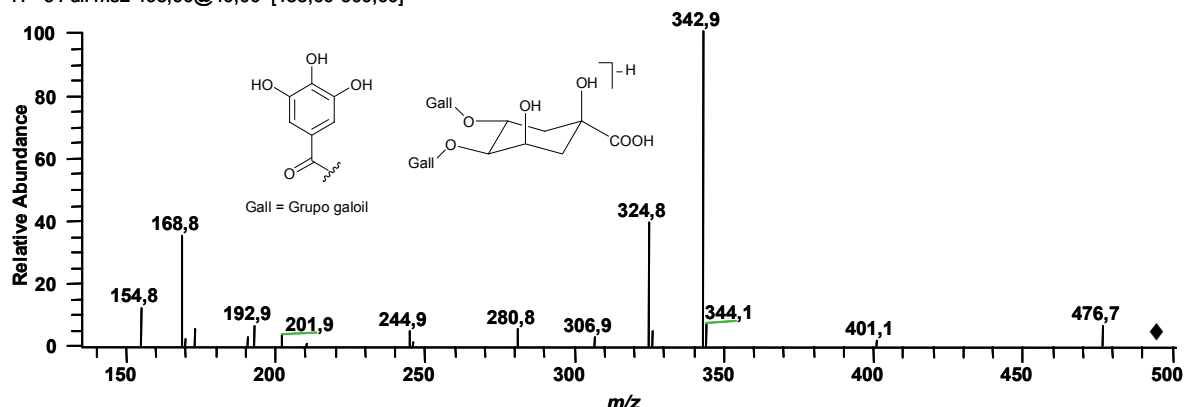
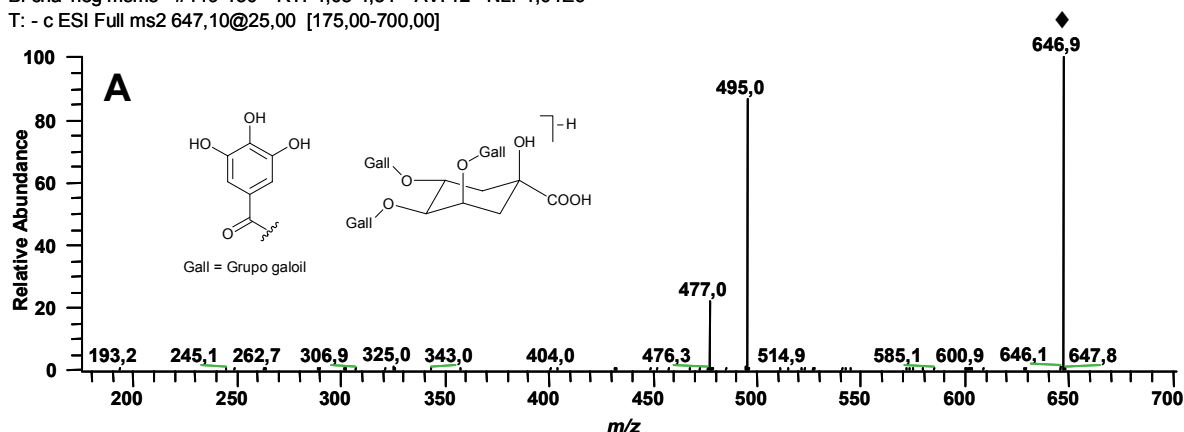


Figura 3.15. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 495, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Os derivados do ácido trigaloilquínico apresentaram a seguinte fragmentação, MS/MS do íon precursor de m/z 647 (Fig. 3.16A) produziu os íons produtos de m/z 495 $[M - 152 - H]^-$ e m/z 477 $[M - 152 - 18 - H]^-$. Fragmentação de terceira-ordem para o íon de m/z 495 (Fig. 3.16B) comprovou as eliminações sequenciais de duas unidades galoílicas $[M - 2 \times 152 - H]^-$ e desidratação do núcleo do ácido quínico $[M - 2 \times 152 - 18 - H]^-$.

Bi cha' neg msms #119-130 RT: 4,08-4,34 AV: 12 NL: 1,04E6
T: - c ESI Full ms2 647,10@25,00 [175,00-700,00]



Bi cha' neg msms #131-139 RT: 4,56-4,75 AV: 9 NL: 5,54E5
T: - c ESI Full ms3 647,10@25,00 495,00@25,00 [135,00-700,00]

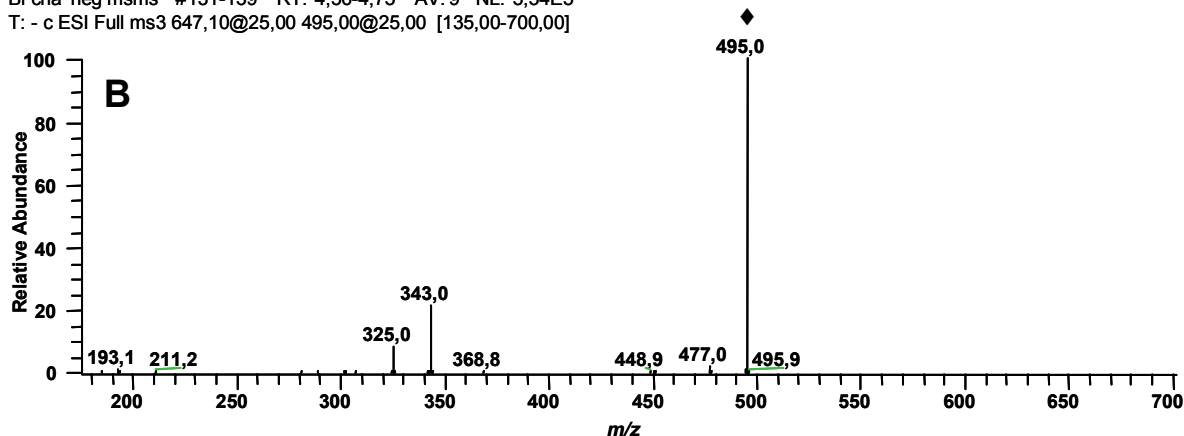
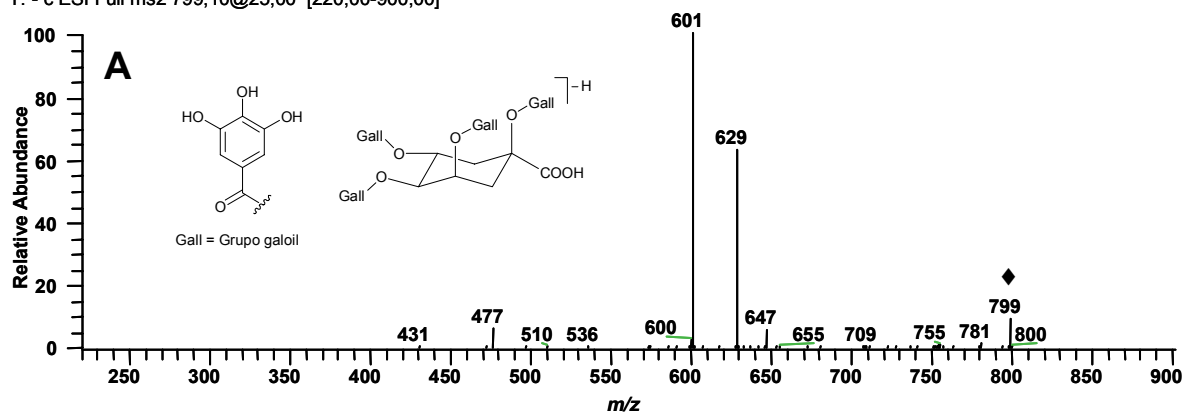


Figura 3.16. A) Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 647, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. B) Espectro de massas de terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 495, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Os derivados do ácido tetragaloilquínico apresentaram o padrão de fragmentação esperado, com eliminações sequenciais de grupos galoílicos e moléculas de água. A principal diferença nesta série foi a presença do pico base de m/z 601, o qual foi interpretado como a eliminação de ácido gálico seguida da perda de CO $[M - 152 - 18 - 28 - H]^-$ (Fig. 3.17A). Fragmentação de terceira-ordem do pico base de m/z 601, observado no experimento MS^2 , mostrou que este íon sofre nova fragmentação com eliminação de outra molécula de ácido gálico, interpretada

como as perdas seguidas do grupo galoil (152 Da) de m/z 449 e água (18 Da) de m/z 431 (Fig. 3.17B).

Bci cha' neg msms #117-124 RT: 6,40-6,61 AV: 8 NL: 6,75E4
T: - c ESI Full ms2 799,10@25,00 [220,00-900,00]



Bci cha' neg msms #125-132 RT: 7,00-7,21 AV: 8 NL: 2,10E4
T: - c ESI Full ms3 799,10@25,00 601,00@27,00 [165,00-900,00]

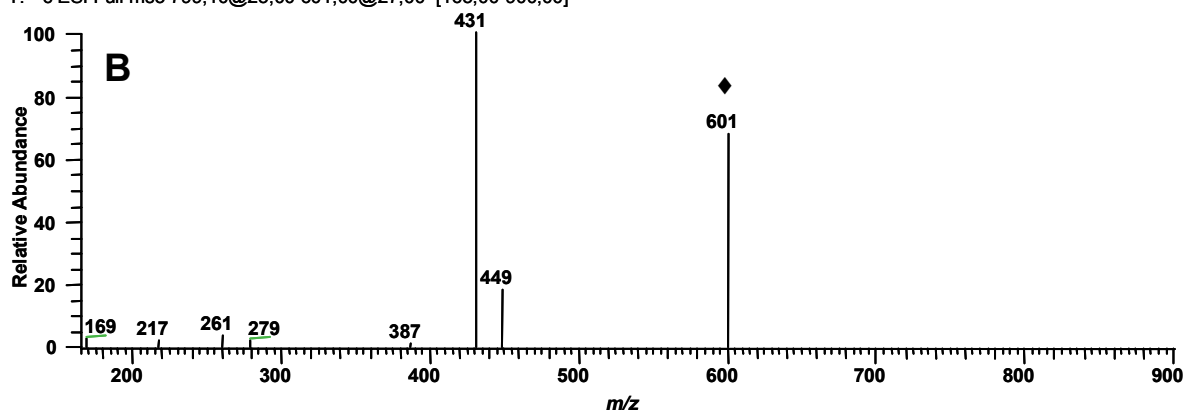


Figura 3.17. A) Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 799, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. **B)** Espectro de massas de terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 601, obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%. Para condições espectrométricas veja: Parte Experimental.

Analogamente, os derivados do ácido pentagaloilquínico mostraram eliminações características, MS/MS do íon precursor de m/z 951 produziu o pico base de m/z 799 $[M - 152 - H]^-$, este íon exibiu nova eliminação de um grupo galoíla $[M - 2 \times 152 - H]^-$ com formação do íon produto de m/z 647. A ausência dos fragmentos de m/z 933 $[M - 18 - H]^-$ e m/z 907 $[M - 44 - H]^-$ indicam que todas as hidroxilas presentes no ácido quínico foram esterificadas por unidades de ácido gálico (Fig. 3.18).

BFFia #1967-2030 RT: 36,65-37,87 AV: 64 NL: 1,31E4
T: - c Full ms2 950,80@30,00 [260,00-1000,00]

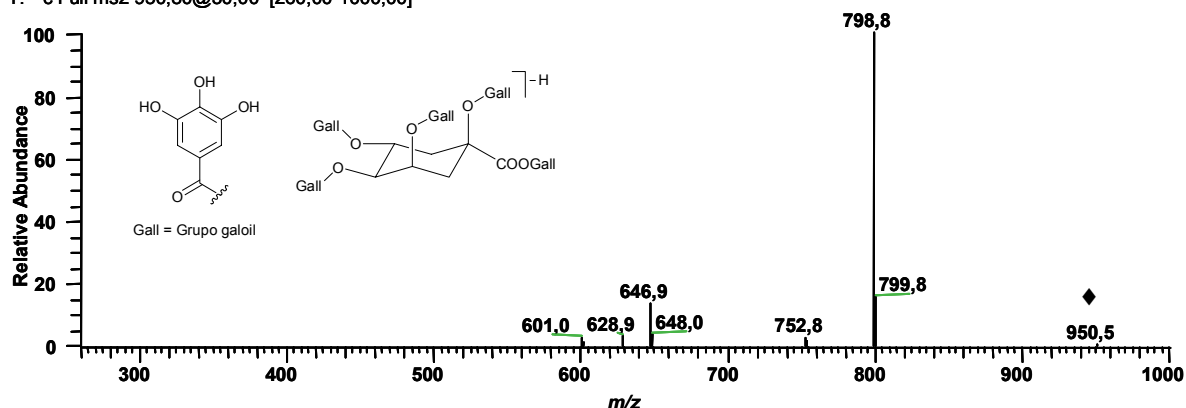


Figura 3.18. Espectro de massas de segunda-ordem obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% para o íon precursor de m/z 951. Para condições experimentais veja: Parte Experimental.

Assim, os experimentos empregando a técnica de FIA-ESI-IT-MS/MS forneceram informações importantes sobre a caracterização das classes de substâncias presentes nas cinco espécies estudadas. Os experimentos mostraram que *B. crassa*, *B. coccolobifolia*, *B. intermedia* e *B. basiloba* são constituídas por três classes principais de metabólitos secundários: flavonóides, proantocianidinas e derivados do ácido galoilquínico. *B. fagifolia* não apresentou a ocorrência de proantocianidinas em sua composição. Os resultados obtidos foram complementares aos alcançados com a técnica de HPLC-PAD, confirmando a presença de alguns dos metabólitos secundários identificados nos experimentos de co-injeção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação do trabalho proposto demonstrou ganho de tempo por parte do fitoquímico que venha realizar as etapas de purificação de compostos preestabelecidos após a triagem cromatográfica. Esse fator pode impedir a realização de tarefas extenuantes que resultem no isolamento de substâncias repetidas.

O trabalho contribuiu ainda para a diminuição da carga de resíduos gerados pela utilização de solventes orgânicos empregados nas etapas de preparo de extratos e fracionamento cromatográfico. Apresentou benefícios econômicos, uma vez que experimentos que possuem alto custo, como NMR 1D e principalmente 2D, podem ser realizados apenas para as substâncias não identificadas pelos métodos propostos.

Tendo em vista que em nosso trabalho o estudo fitoquímico de uma determinada espécie parte das informações etnofarmacológicas, maior ênfase foi dada ao estudo de infusões, pois este tipo de amostra é o que mais se assemelha com as fitopreparações empregadas pela população. Assim, uma abordagem que por muito tempo tem sido evitada pelos fitoquímicos mostrou-se muito promissora, uma vez que a preparação desse tipo de amostra é bastante simples, possui um custo extremamente baixo e o número de etapas de manipulação da amostra é menor (parâmetro imprescindível para se obter dados exatos e precisos, principalmente em etapas de avaliações quantitativas).

A utilização de infusos propiciou significativa redução no tempo de obtenção dos extratos, além de apresentar características de cunho ambiental e sustentável. Essa abordagem requer apenas a utilização de água como solvente extrator, que é facilmente descartada após as etapas de preparação. Como vantagem adicional, necessita de pequenas quantidades do material vegetal.

Embora possa se considerar que nesse tipo de preparação ocorra uma maior incidência de interferentes, etapas envolvendo a LLE e a SPE mostraram-se estratégias importantes para a eliminação de substâncias indesejáveis e, conseqüentemente, a obtenção de frações quase que totalmente livres de interferentes, como açúcares e principalmente taninos condensados.

Nas espécies de *Davilla*, as análises cromatográficas por HPLC-PAD forneceram informações valiosas quanto à obtenção de seus perfis. Essa aplicação

contribuiu para uma avaliação rápida sobre a composição química dessas espécies, possibilitando identificar substâncias conhecidas e presentes em um banco de padrões. Além da presença do ácido gálico, foram encontrados flavonóis monoglucosilados derivados na miricetina e quercetina. A literatura recente não reporta a presença dos flavonóis miricetina-3-O-(2"-O-Galoil)- β -galactopiranosídeo, miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo e miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo (DAVID *et al.*, 1996; GUARALDO *et al.*, 2001) encontrados em ambas espécies. Nem mesmo o estudo de variabilidade química dos flavonóides encontrados na família Dilleniaceae realizado por GURNI & KUBTZKI (1981) indicou a presença desses metabólitos secundários, sendo desta forma o primeiro relato desses flavonóis, tanto na família quanto no gênero.

Por outro lado, esses flavonóis são conhecidos. O flavonol miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -rhamnopiranosídeo foi isolado pela primeira vez por NICOLLIER & THOMPSON (1983) em *Desmanthus illionensis* (Leguminosae). Nesse mesmo trabalho os autores descreveram que esse flavonol exibiu atividades alelopática e antibacteriana significativas, sugerindo ainda que essas atividades estavam relacionadas à importância da ligação do grupo galoíla na posição 2" da rhamnose. Posteriormente, LEE e colaboradores (2000) descreveram em *Acacia confusa* (Leguminosae) a presença desses monogaloilrhamnosídeos, bem como a presença de um digaloilrhamnosídeo esterificado nas posições 2" e 3" da rhamnose.

Avaliação quantitativa indicou ainda que *D. nitida* e *D. elliptica* possuem um teor significativo de flavonóides totais e, que desta forma, essas espécies representam promissoras fontes de constituintes polifenólicos, as quais podem ser usadas como antioxidantes naturais.

As duas espécies, quando avaliadas por HPLC-PAD, exibiram o mesmo perfil flavonoídico, porém apresentaram diferenças significativas na concentração de alguns flavonóis, como por exemplo, miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo + miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo; quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo e quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo. Da mesma forma, o perfil químico obtido por FIA-ESI-IT-MS comprovou não só a semelhança entre a composição flavonoídica, mas a de outros constituintes. Conforme sugerido por GURNI & KUBTZKI (1981), as duas espécies de *Davilla* podem ser caracterizadas pela presença predominante da miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo.

Em *H. speciosa*, o emprego dos procedimentos de LLE e SPE seguido da avaliação cromatográfica por HPLC-PAD resultou na visualização de catequinas monoméricas e do ácido clorogênico em uma espécie extremamente complexa. A partir dos experimentos de comparação cromatográfica realizados chegou-se na identificação do ácido clorogênico, catequina, epicatequina e do galato de epigallocatequina.

A utilização da técnica FIA-ESI-IT-MS/MS possibilitou formular considerações importantes sobre a real composição química desta espécie. Foram observadas duas séries homólogas de proantocianidinas com grau de polimerização variando de 1 a 6. Na primeira série foram observadas diferenças de 288 Da entre os íons precursores obtidos nos experimentos. Essa característica indicou que as substâncias eram formadas por uma ligação entre unidades monoméricas de [epi]catequinas, constituindo desta forma procianidinas do tipo-B. O aspecto mais significativo da utilização desta técnica ocorreu com a visualização da segunda série de proantocianidinas, que apresentaram íons precursores 162 Da superiores àqueles da primeira série. Avaliação desses íons em múltiplos estágios gerou subsídios que sustentaram propostas para a existência de procianidinas do tipo-B C-glucosiladas.

O estudo comparativo entre as espécies do gênero *Byrsonima* evidenciou que flavonóides derivados da quercetina, derivados do ácido galoilquínico e proantocianidinas do tipo-B são os metabólitos secundários de comum ocorrência entre as espécies de *B. crassa*, *B. coccolobifolia*, *B. basiloba* e *B. intermedia*. Em *B. fagifolia* não foi constatada a presença de proantocianidinas. Nessa espécie, os derivados do ácido galoilquínico são as substâncias predominantes. A partir das análises de FIA-ESI-IT-MS/MS foi constatada a presença de uma série constituída com derivados do ácido mono-, di-, tri-, tetra- e pentagaloilquínico. Essas evidências foram observadas a partir da investigação do perfil espectral e confirmadas através de experimentos MS em múltiplos estágios.

Em suma, os procedimentos de preparação de amostras vegetais envolvendo etapas de LLE e SPE demonstraram inúmeras vantagens, conforme indicado a seguir:

- ❖ O *clean-up* em cartuchos *Sep Pak* de RP18 viabilizou eluição seletiva dos componentes presentes nas plantas estudadas. Foi possível trabalhar tanto

com substâncias de maior polaridade - principalmente catequinas e derivados de ácidos fenólicos provenientes do eluato MeOH/H₂O 14:86 v/v, quanto com substâncias de média polaridade - flavonóides, encontrados nos eluatos seguintes;

- ❖ Taninos condensados foram eliminados quase que em sua totalidade após LLE entre água e acetato de etila, como consequência, durante as análises por HPLC-PAD, foram obtidas separações com linha de base estável para os sistemas de eluição empregados nas eluições cromatográficas;
- ❖ A presença de TFA na fase móvel contribuiu para a obtenção de picos bem resolvidos, eliminando interações indesejáveis;
- ❖ O processo de SPE permitiu a concentração dos analitos e desta forma, pequenas quantidades do material vegetal foram usadas nas avaliações da composição química das matrizes estudadas. Adicionalmente, a retenção de material lipofílico, principalmente clorofila, nos cartuchos de SPE configurou-se como uma medida de preventiva, evitando a necessidade de extensos gradientes que resultassem na dessorção desse tipo de substância e consequentemente reduzindo o tempo de condicionamento da coluna para injeções subseqüentes.

Finalmente, esperamos que a abordagem proposta neste trabalho possa contribuir para o estudo de outras famílias de espécies vegetais, propiciando uma estratégia rápida e importante para o reconhecimento da composição química de plantas comumente empregadas na medicina tradicional. Adicionalmente, novos parâmetros podem ser avaliados, principalmente quando se pensa na ocorrência das outras classes de substâncias encontradas em matrizes vegetais, desta forma, abrem-se aqui perspectivas para futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.
Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1998, v. 1, 464 p.
- AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S.
A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Medica**, v. 60, n. 6, p. 85-86, 1994.
- ANDRADE, F. D. P. **Investigação química de chás brasileiros.** 2002. 178 f.
Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- ANDRADE, F. D. P.; SANTOS, L. C.; DATCHLER, M.; ALBERT, K.; VILEGAS, W.
Use of on-line liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*. **Journal of Chromatography A**, v. 953, n. 1/2, p. 287-291, 2002.
- ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 431-441, 2006.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction.** San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.
- BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHEC, C-T.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S.
Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 33, n. 1, p. 25-32, 1995.
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das angiospermas.** Rio de Janeiro: Editora da Universidade de São Paulo, 1978. v. 1, 255 p.
- BRANDOLINI, A. J.; HILLS, D. D. **NMR spectra of polymers and polymer additives.** New York: Marcel Dekker, 2000. p. 304-307.
- CÁCERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders.1. Screening of 84 plants against enterobactéria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 55-73, 1991.

CÁCERES, A.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases.2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive Bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 77-82, 1993.

CANNELL, R. J. P. **Natural products isolation**. New Jersey: Humana Press, 1998. p. 282-295.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; BARISON, A.; HONDA, N. K. Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoctions from “carapiá” (*Dorstenia* species) by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1465-1469, 2002.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Quantitative determination of indole alkaloids, triterpenoids and steroids of *Tabernaemontana hilariana*. **Journal of Chromatography A**, v. 808, n. 1/2, p. 264-268, 1998.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Quantitative determination of furocoumarins in simples of “carapiá” by capillary gas chromatography. **Chromatographia**, v. 50, n. 1/2, p. 11-14, 1999.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Rapid determination of furanocoumarins in creams and pomades using SPE and GC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 2, p. 203-214, 2000.

CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; POZETTI, G. L. Gas chromatographic analysis of indole alkaloids from *Tabernaemontana hilariana*. **Journal of Chromatography A**, v. 788, n. 1/2, p. 204-206, 1997.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: UFSCar, 2001. p. 5-77.

CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; FOGAÇA, A. O.; FACCO, E. M. P.; GODOY, H. T.; DAUDT, C. E.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 2, p. 185-190, 2006.

CHEN, H.; ZUO, Y.; DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1/2, p. 387-395, 2001.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCÍA-VALLEJO, M. C. Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 186-193, 1997.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v. 6.

CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1/2, p. 315-321, 1997.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

DALLUGE, J. J.; NELSON, B. C.; THOMAS, J. B.; SANDER, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 793, n. 1, p. 265-274, 1998.

DAVID, J. M.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S.; CHAVEZ, J. P. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, n. 2, p. 115-118, 1996.

DE PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Prodelphinidins and related flavanols in wine. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p.33-40, 2000.

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L. B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; SOARES, C. M.; BRAGA, F. C. L-(+)-bornesitol. **Acta Crystallographica Section E**, v. E63, n. 2, p. o1067–o1068, 2007.

ES-SAFI, N-E.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; DUCROT, P-H. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 247, n. 1/3, p. 93-100, 2005.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, 2007. In press.

FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L. F. R.; BRITO, A. R. M. S.; SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e anti-diarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 79-83, 2005.

FIRESTONE TIRE & RUBBER CO (United States). **Improvements in or relating to synthetic rubber compositions and methods of making same**. GB613121, 23 nov. 1948. Disponível em: <<http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=GB613121&F=0>>. Acesso em: 22 mar. 2007.

GHOSAL, S. Occurrence of psychedelic substances in some indian medicinal-plants. **Planta Medica**, v. 21, n. 2, p. 200-209, 1972.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 635-643, 1995.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; BIANCHI, G.; KELL, D. B. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. **The Analyst**, v. 127, n. 11, p. 1457-1462, 2002.

GOTO, T.; YOSHIDA, Y.; KISO, M.; NAGASHIMA, H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. **Journal of Chromatography A**, v. 749, n. 1/2, p. 295-299, 1996.

GOTTLIEB, O. R.; MENDES, P. H.; MAGALHÃES, M. T. Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 5/6, p. 1456-1456, 1975.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, v. 89, n. 15, p. 51-54, 1993.

GREGÓRIO, G.; ALBANO, O.; MARQUES, L. C.; AYALA, S.; CARVALHO, J. E.; COZZOLINO, S.; YARIWAKE, J. H. Soyfemme a isoflavona contra o climatério. **Phytociência**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2006.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003.

GUARALDO, L.; SERTIÈ, J. A. A.; BACCHI, E. M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiré in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 191-195, 2001.

GURNI, A. A.; KUBTZKI, K. Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 9, n. 2/3, p. 109-114, 1981.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 947-952, 1980.

HAMBURGER, M.; HOSTETMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. 335 p.

HIRUMA-LIMA, C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1/2, p. 215-224, 2006.

HUCK, C. W.; BUCHMEISER, M. R.; BONN, G. K. Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 943, v. 1, p. 33-38, 2002.

HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. **Phytochemistry**, v. 59, n. 3, p. 347-360, 2002.

KARONEN, M.; OSSIPOV, V.; SINKKONEN, J.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in birch leaves with normal-phase HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 3, p. 149-156, 2006.

KATALINIĆ, V. High-performance liquid chromatographic determination of flavan fingerprints in plant extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 775, n. 1/2, p. 359-367, 1997.

KIRKLAND, J. J.; HENDERSON, J. W.; DESTEFANO, J. J.; VAN STRATEN, M. A.; CLAESSENS, H. A. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 762, n. 1/2, p. 97-112, 1997.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 4. ed. São Paulo: Nacional, 1977. 778 p.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 93 p.

LEE, T-H.; QIU, F.; WALLER, G. R.; CHOU, C-H. Three new flavonol galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 710-712, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 1, p. 28.

MAJORS, R. E. The role of the column in preparative HPLC. **The Magazine of Separation Science-LC*GC**, v. 7, n. 3, p. 8-16, 2004.

MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNA, L. C.; GUTIÉRREZ, M. N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 79-82, 1999.

MAURI, P.; PIETTA, P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 61-68, 2000.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-188, 1999.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1/2, p. 3-20, 2001.

MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L.; NAITO, Y.; TABET, J. C. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. **Pure and Applied Chemistry**, 2006. Disponível em: <http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract06/murray_310107.html> Acesso em: 20 dez. 2006.

NAKASHIMA, H.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, N.; SAKAGAMI, H.; TANUMA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. **Antiviral Research**, v. 18, n. 1, p. 91-103, 1992.

NAMIESNIK, J.; GÓRECKI, T. Sample preparation for chromatographic analysis of plant material. **JPC Journal of Planar Chromatography Modern TLC**, v. 13, n. 6, p. 404-413, 2000.

NEUE, U. D.; SEROWIK, E.; IRANETA, P.; ALDEN, B. A.; WALTER, T. H. Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 1, p. 87-100, 1999.

NICOLLIER, G.; THOMPSON, A. C. Flavonoids of *Desmanthus illinoensis*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 1, p. 112-117, 1983.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 1, p. 1-31, 1989.

OLIVEIRA, L. A.; CASTRO, N. M. Ocorrência de sílica nas folhas de *Curatella americana* L. e *Davilla elliptica* St. Hill. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Ultraviolet spectroscopy. In: _____. **Introduction to spectroscopy**. 2. ed. New York, Saunders College Publishing, 1996. cap. 6, p. 267-302.

PELILLO, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, T. G.; VANZINI, M.; LERCKER, G. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. **Food Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 369-374, 2002.

PELILLO, M.; BONOLI, M.; BIGUZZI, B.; BENDINI, A.; TOSCHI, T. G.; LERCKER, G. An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 465-470, 2004.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Planaltina: EMBRAPA, 1994. 320 p.

POZZEBON, J. M.; VILEGAS, W.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of herbicides and a metabolite in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1/2, p. 375-380, 2003.

RASTRELLI, L.; DE TOMMASI, N.; BERGER, I.; CÁCERES, A.; SARAVIA, A.; DE SIMONE, F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 647-650, 1997.

REZNICEK, G.; FREILER, M.; SCHADER, M.; SCHMIDT, U. Determination of the content and the composition of the main saponins from *Solidago gigantea* AIT. using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 1, p. 133-137, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RINALDO, D.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 947-949, 2006.

ROBARDS, K. Strategies for the determinations of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1/2, p. 657-691, 2003.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, 2007. In press.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2007. In press.

ROHR, G. E.; MEIER, B.; STICHER, O. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode array and electrochemical detection. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 106-112, 2000.

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA, C. Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 5, p. 553-563, 2005.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005.

SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 26, n. 1, p. 71-75, 2005.

SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from the infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 16, p. 2244-2250, 2005.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 47-51, 2004.

SANTOS, L. C. **Estudo químico de plantas de Eriocaulaceae**. 2001. 187 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 292-299, 2002.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 24, p. 615-656.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, v. 129, n. 8, 739-744, 2004.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 2, p. 265-273, 2001.

SCHÜTZ, K.; KAMMERER, D.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4090-4096, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. The analysis of real samples. In: _____. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996. cap. 31, p. 725-735.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Elimination of interferences. In: _____. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996. cap. 34, p. 760-775.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Preparing samples for analysis. In: _____. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996. cap. 32, p. 736-748.

SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA, M. C. Jr.; MEDEIROS, M. B. **Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília: WWF-Brasil, 2001. v. 1, 132 p.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; AIROLDI, C. New generation of sterically protected C₁₈ stationary phases containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1/2, p. 127-138, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 352-360, 2005.

STACH, D.; SCHMITZ, O. J. Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 924, n. 1/2, p. 519-522, 2001.

SUÁREZ, B.; PICINELLI, A.; MANGAS, J. J. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders. **Journal of Chromatography A**, v. 727, n. 2, p. 203-209, 1996.

SUN, B.; LEANDRO, C.; SILVA, J. M. R.; SPRANGER, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1390-1396, 1998.

TREUTTER, D. Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various *Prunus* tissues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 436, n. 1, p. 490-496, 1988.

VILEGAS, W.; SANNOMYIA, M.; RASTRELLI, L.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluating of the anti-ulceractivity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 403-406, 1999.

VILEGAS, W.; VILEGAS, J. H. Y.; DACHTLER, M.; GLASER, T.; ALBERT, K. Application of on-line C30 RP-HPLC-NMR for the analysis of flavonoids from leaf extract of *Maytenus aquifolium*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 317-321, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer, 2003. 384 p.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. **Food Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 337-344, 2000.

WANG, H.; HELLIWEL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 115-121, 2000.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, n. 1, p. 29-41, 2001.

WELLUM, D. A.; KIRBY, W. High-performance liquid chromatographic assay for teaflavins. **Journal of Chromatography A**, v. 206, n. 2, p. 400-406, 1981.

WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of proanthocyanidins in fresh grapes and grape products using liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 14, p. 2062-2068, 2005.

YAO, L.; JIANG, Y.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DUAN, J.; RAYMONT, K.; LISLE, R.; XU, Y. HPLC analyses of flavonols and phenolics acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 253-263, 2004.

ZEEB, D. J.; NELSON, B. C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

ANEXOS

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007 (no prelo).

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-Performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. *Phytochemical Analysis*, 2007 (no prelo).

Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*

Short Title: Proanthocyanidins from *Hancornia speciosa*

Clenilson M. Rodrigues,¹ Daniel Rinaldo,¹ Lourdes C. dos Santos,¹ Paola Montoro,² Sonia Piacente,² Cosimo Pizza,² Clélia A. Hiruma-Lima,³ Alba R. M. Souza Brito⁴ and Wagner Vilegas^{1*}

¹UNESP, São Paulo State University, Institute of Chemistry, Organic Chemistry Department, CP 355, CEP 14800-900, Araraquara, SP - Brazil.

²Università degli Studi di Salerno, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, via Ponte Don Melillo, 84084 Fisciano (SA) - Italy.

³UNESP, São Paulo State University, Institute of Bioscience, Physiology Department, CP 355, CEP 18618-000, Botucatu, SP - Brazil.

⁴UNICAMP, State University of Campinas, Institute of Biology, Physiology and Biophysics Department, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP - Brazil.

ABSTRACT

Direct flow injection/electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry techniques were used to investigate the polyphenolic compounds present in the infusion from the barks of *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae), a native Brazilian plant popularly known as “mangabeira”, used as nutritious source and against gastric disorders. After an easy sample pretreatment based on filtration procedures the characteristic fingerprint of the infusion was performed in negative ion mode in few minutes. At low capillary-voltage activation, the deprotonated molecules ($[M - H]^-$) were observed and using collision-induced dissociation MS/MS product ion, the fragmentation pattern obtained evidenced the presence of a homologous series of B-type proanthocyanidins, as well as another series containing their respective C-glycosylated derivatives, with degree of polymerization from 1 up to 6 units of interlinked catechins. Therefore, direct flow injection allowed identifying the key-compounds without preparative isolation of the components.

Keywords: infusion analysis; fast typification; Apocynaceae; *Hancornia speciosa*; natural products; C-glycosylated procyanidins.

*Address correspondence to W. Vilegas, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual Paulista. Tel.: +55-16-3301-6668, fax: +55-16-3301-6692. E-mail: vilegasw@gmail.com

INTRODUCTION

Hancornia speciosa known as “mangaba”, “mangabeira” and “mangava” is a Brazilian tropical fruit tree common in the Cerrado region with an exotic flavor and aroma. The fruit is an important and rich source of vitamin C. The pulp is eaten fresh or used to make juices. It is also consumed as ice cream, jellies, confectionery and liquor, and it is greatly appreciated by the local population.¹ In folk medicine the infusion from the barks is used to protect against gastric disorders and the latex is used to treat tuberculosis.¹ Many investigations have shown that secondary metabolites are key-molecules that may be correlated to the pharmacological activities observed.² Therefore, research on the constitution of medicinal plants is essential, in order to determine the health benefits or risks. However, despite the popular use of *Hancornia speciosa* as a medicinal plant, there are no data about the chemical composition of this species or about its phytopreparations used by the population.

Infusions prepared from barks usually have a high amount of proanthocyanidins, also known as condensed tannins, the second most abundant class of natural phenolic compounds after lignin.³ Proanthocyanidins existing in many foods possess potential healthpromoting effects, such as antioxidant, anticarcinogenic and antiinflammatory effects.^{2,3} They are oligomeric and polymeric proanthocyanidins formed from at least two flavan-3-ol (catechin) units, proanthocyanidins containing the single interflavan linkages are B-type and they are linked mainly through C4—C8 or C4—C6 bonds. Alternatively, they can also be esterified by groups linked to the hydroxyl group at C3. Those containing two interflavan linkages with additional ether bond between C2—O7 are assigned to the A-type proanthocyanidins (Fig.1).³

The molecular weight of proanthocyanidins expressed as degree of polymerization (DP) is one of the most important properties of this class of compounds, since the increase of the DP is directly related to the increase of the observed biological activities.² It has also been reported that proanthocyanidins with low DP are usually present in plant tissues in relatively lower concentrations compared to oligomers or polymers with high DP.^{4,5}

Due to its characteristics, high performance liquid chromatography (HPLC) is the technique of choice used to investigate secondary metabolites founded in infusions, as these compounds are frequently highly polar molecules. Coupled to photodiode array

detector (PAD), HPLC-PAD allows the separation and recognition of a large number of compounds from plant origin.⁶ Many studies showed that HPLC coupled to tandem mass spectrometry is a powerful tool to analyze proanthocyanidins present in complex natural samples, since they can give more information about the structure of the analyzed compounds. Techniques as matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) and atmospheric-pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS) are frequently employed.⁷⁻⁹ However, in some cases this approach fails in establishing the total chemical profile. As an example, the proanthocyanidin homologues are hardly separated and gave unresolved peaks at the HPLC chromatograms, due to the similarity in their structures and also due to the large number of phenolic groups.^{10,11} This can be a problem mainly when the technique is intended to be used in routine analyses. Moreover, standard compounds are not commercially available as references for this class of secondary metabolites.

On the other hand, direct flow injection ESI-MS can overcome such limitations when the main objective is a fast typification of complex mixtures. This approach has been used in the quality control and in the verification of the authenticity and/or adulteration of plant extracts,¹² olive oils,¹³ propolis,¹⁴ whisky,¹⁵ beers¹⁶ and wines.¹⁷

The present study investigates the ability of ESI-IT-MS/MS, without prior chromatography separation, as an analytical tool to determine proanthocyanidins present in the infusion from the barks of *H. speciosa* by direct injection analysis mode.

EXPERIMENTAL

Chemicals

HPLC-grade methanol was purchased from JT Baker (Baker Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA). (+)-catechin and chlorogenic acid were purchased from Sigma Co. (Saint Louis, MO, USA). HPLC-grade water was prepared using a Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q purification system.

Sample preparation

Barks of *H. speciosa* Gomez were collected in August 2002 at Palmas city, Tocantins State, Brazil and authenticated by Solange de Fátima Lólis, from the Institute of Biosciences of the Tocantins University. A *voucher* specimen (Nr. 4064) was deposited at the Herbarium of the Tocantins University.

The dried powdered barks of *H. speciosa* (1 g) were infused with boiling water (10 mL) for 10 min. The mixture was further filtered on filter paper to remove macro particles, cooled to room temperature and filtered through a 0.45 μm membrane of nylon filter. The infusion (500 μL) was diluted with methanol up to final volume of 1 mL and the solution introduced by flow injection at 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ directly in the ESI source by using a syringe pump.

Mass spectrometric analysis

Analyses were performed using a Thermo Finnigan LCQ Deca ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray interface. To tune the LCQ, the voltages on the lenses were optimized in the TunePlus function of the software provided by the manufacturer. The MS and MS/MS analyses in negative ion mode were selected after calibration infusing a standard solution of (+)-catechin (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol) at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ and working under the following conditions: capillary voltage -5 V , capillary temperature 220°C . Nitrogen was used both as drying gas at a flow rate 60 (arbitrary units) and as nebulizing gas. Ion spray voltage 5 kV and the tube lens offset was -55 V . The nebulizer temperature was set at 280°C , and a potential of -4 V was used on the capillary. Negative ion mass spectra were recorded in the range m/z 50-2000. The first event was a full-scan mass spectrum to acquire data on ions in the m/z range. The second scan event was an MS/MS experiment performed by using data-dependent scan that was carried out on deprotonated molecules from the compounds at collision energy of 30% and activation time of 30 ms. Polyphenols and proanthocyanidins were analyzed under the same conditions and with the same optimized parameters. Data acquisition and processing were performed using the Xcalibur software.

RESULTS AND DISCUSSION

The isolation of the compounds originating from polar plant extracts are traditionally performed by chromatography gel permeation. However, using Sephadex LH20, some labile oligomeric tannins can be degraded during separation and purification. It is well known, although seldom mentioned, that Sephadex LH20 tends to strongly absorb large molecular weight condensed tannins, so that they cannot be eluted during the purification process.¹⁸

Moreover, matrices containing mixtures of proanthocyanidins with high DP are hardly fractionated even using partition chromatographic techniques, as high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). In this case, literature often reports only the isolation of low molecular weight dimers or trimers.¹⁹⁻²¹

Therefore, the identification and characterization of the chemical composition of extracts containing proanthocyanidins with DP higher than 3 is still underexplored.

The HPLC-PAD chromatographic profile (not shown) of the infusion from *H. speciosa* barks showed that, even using an acidified gradient elution system, the secondary metabolites were not appropriately separated, with peak tailing, no baseline separation and an unresolved peak at the end of the chromatogram. The features of the UV spectra with bands of maximum of absorption at 205-215 nm and 270-285 nm suggested the presence of polymeric proanthocyanidins.^{8,22}

In order to get qualitative information about the chemical composition, the infusion from the barks of *H. speciosa* was directly injected into the ESI-IT-MS source. Both positive and negative ionization were tested. For the analyses of the proanthocyanidins present in the infusion negative ionization was used, since it has been demonstrated to be more sensitive and selective than the positive mode. This fact is explained due to the acidity of the phenolic hydrogens, a fact that was also reported by other researchers.^{23,24} Figure 2 shows the ESI-IT-MS spectra of the precursor ions in full scan mode for the secondary metabolites present in the infusion.

Peak at m/z 289 was assigned to the deprotonated molecule of [epi]catechin. Second order fragmentation led to the base peak at m/z 137 $[M - 152 - H]^-$ which represents the C-ring cleavage through a retro-Diels-Alder mechanism (RDA).^{10,25} A minor product ion at m/z 271 $[M - 18 - H]^-$ was due to the loss a water molecule with double bond formation. The chirality of the C3 on the flavan-3-ols cannot be differentiated by MS experiments. Designations of the epimer configuration are generally based on the relative abundance of the “epi” configuration as polyphenolic components of tea infusions and extracts.^{26,27} In our case, we designated the compounds as [epi]catechins.

Close inspection of the deprotonated molecule at m/z 273 suggested the presence of another monomer, corresponding to one unit of [epi]afzelechin.²⁸ Similarly, the deprotonated molecule at m/z 425 suggested the presence of [epi]afzelechin gallate. The

second-generation product ion spectrum of the precursor ion at m/z 425 produced the catechin-specific RDA ion product at m/z 137 and the ion product $[M - 152 - 18 - H]^-$ at m/z 255, due to the sequential elimination of the galloyl moiety and water.

The second order fragmentation of the deprotonated molecule at m/z 341 produced the product ions at m/z 323 $[M - 18 - H]^-$ (loss of water), at m/z 297 $[M - 44 - H]^-$ (loss of CO_2) and at m/z 179 $[M - 162 - H]^-$ (loss of an hexose moiety), which were tentatively assigned to the fragmentation of the caffeic acid-*O*-glycoside.²⁹ It is not possible, however, to determine if the hexose moiety is bounded to position C3 or C4 of the caffeic acid core.

The second-generation product ion spectrum of the deprotonated molecule at m/z 353 produced the product ion at m/z 191 (quinic acid) due to the elimination of the caffeoyl moiety $[M - 162 - H]^-$ from the chlorogenic acid, which presence was confirmed through HPLC analysis with the commercially available standard compound (data not shown).

Further examination of the ions in Figure 2 evidenced the presence of an homologous series of proanthocyanidins intercalated by 288 Da. Major peaks at m/z 289, 577, 865, 1153, 1441 and 1729 correspond to the deprotonated molecules of the monomer, dimer, trimer, tetramer, pentamer and hexamer of the [epi]catechin, respectively.

A second series of homologous compounds was evidenced by the peak signals at m/z 451, 739, 1027, 1315, 1603 and 1891, which are 162 mass units higher than those described before, thus suggesting the presence of a group of monoglycosylated proanthocyanidins.

In order to verify the results described above, second order ESI-IT-MS/MS experiments for the main observed peaks were performed. The tandem mass spectra in second order for the homologous series of proanthocyanidins can be rationalized by three main fragmentation mechanisms: the retro-Diels-Alder (RDA), quinone methide (QM) and the heterocyclic ring fission (HFR) mechanisms.^{10,25,30} Figure 3 shows the fragmentation pathway of the dimer found in *H. speciosa*, similar to that reported by Gu *et al.*¹⁰ Aglycone fragments were denoted in a similar way to the nomenclature proposed for flavonoids by Ma *et al.*³¹ Shortly, the $^{ij}A^-$ and $^{ij}B^-$ labels are used to designate ions containing intact A and B rings, respectively, in which the superscripts *i* and *j* indicate

the bonds in the heterocyclic ring that have been broken. An additional subscript 0 to the right of the letter is used to designate product ions originated from precursor ions containing a sugar unit.³¹ The product ions from glycoconjugates were designated according to the nomenclature previously introduced by Domon and Costello.³² Ions containing the aglycone are labeled $^{k,l}X^-$, where the superscripts k and l indicate the internal cleavages in the carbohydrate ring.³³

The second-generation product ion spectrum of the deprotonated molecule at m/z 577 (Fig. 4) produced the base peak at m/z 425 $[M - 152 - H]^-$, which is formed due to the RDA fragmentation and loss of the $^{1,3}B$ fragment (Fig. 3).²⁴ The RDA reaction could take place on the upper unit or on the base unit of the dimer. However, elimination of ring B on the upper unit gives rise to a product ion with a larger $\pi - \pi$ conjugated system than RDA on the base unit.^{10,23} In the sequence, the RDA originates the product ion at m/z 407 $[M - 152 - 18 - H]^-$ due to the loss a water molecule, most likely due to the elimination of the 3OH to form a conjugated ion with a $^{2,3}\Delta$ or $^{3,4}\Delta$ double bond. A ion with a $^{3,4}\Delta$ double bond is preferred, since it has a more extended conjugation than the ion with a $^{2,3}\Delta$ double bond. The product ion at m/z 451 is formed due to the elimination of the upper unit of the dimer by HRF fragmentation pathway¹⁰ (Fig. 3). HRF on the base unit of the dimer is not favored for the same reason as RDA. Loss of the $^{1,4}A$ fragment of 126 Da indicates that the A-ring of the upper unit has a 1,3,5-trihydroxybenzene structure (Fig. 3). Formation of the product ion at m/z 451 also indicates that there are two hydroxyl group located at the C3' and C4' position of the B-ring. Hence, the upper and base units of this dimer were identified as [epi]catechin. Other minor product ions were observed at m/z 559 $[M - 18 - H]^-$ due to the loss a water molecule from the dimer, and the product ions at m/z 289 $[M - 288 - H]^-$ and at m/z 287 $[M - 290 - H]^-$ are resulting from the cleavage of the interflavan linkage through the QM mechanism (Fig. 3). The proanthocyanidins that consist exclusively of [epi]catechin are called procyanidins and the peak ion at m/z 577 is indicative of the B-type procyanidin dimer, that is, a procyanidin containing singly linked units. However, as with other mass spectrometric techniques no differentiation between stereoisomers is possible and no information about the position and stereochemistry of the interflavanoid linkage (4 \rightarrow 6 or 4 \rightarrow 8) is available.²⁵ Since literature reports that procyanidins with

4→8 linkages are stereochemically favored² we designated the compounds present in the infusion of *H. speciosa* as represented in Fig. 3.

The higher homologous compounds presented deprotonated molecules at m/z 865, 1153, 1441 and 1729, with diagnostic product ions (not shown) nearly identical to those displayed in Figure 4.

The second-generation product ion spectra of the monoglycosylated procyanidins were also investigated. The glycosidic nature of these derivatives was indicated due to characteristic cross-ring cleavages. Second order fragmentation of the deprotonated molecule at m/z 739 (Fig. 5) illustrate the product ion spectrum containing specific structural information on various portions of this structure. A mechanism based on the analysis of the monoglycosylated dimer in *H. speciosa* (Fig. 6) is proposed for the formation of the main product ions observed.

The second-generation product ion spectrum of the deprotonated molecule at m/z 739 (Fig. 5) produced the base peak at m/z 587 $[M - 152 - H]^-$, which is formed due to the RDA fragmentation and loss of the $^{1,3}B_0$ fragment, and the diagnostic ions $^{0,3}X^-$ $[M - 90 - H]^-$ at m/z 649 and $^{0,2}X^-$ $[M - 120 - H]^-$ at m/z 619 in the product ion spectrum, which are characteristic of the cross-ring cleavages of a C-glycoside residue.³³ Besides, the low intensity of the peak corresponding to the product ion at m/z 577 is not compatible with an O-glycoside residue.^{33,34} The location of the sugar moiety in the upper-unit of the dimer was proposed based on the cleavage of the interflavan bond, which gives rise to the formation of the glycosylated quinone methide at m/z 449 $[M - 290 - H]^-$, and subsequent cleavages of the hexose unit yielded the product ions $^{0,2}X^-$ at m/z 329 $[M - 290 - 120 - H]^-$ and $^{0,3}X^-$ at m/z 359 $[M - 290 - 90 - H]^-$ (Fig. 6). The fragmentation pattern of an isomeric compound with the sugar unit in the base-unit would produce the ions $^{1,5}X^-$ at m/z 317 $[M - 288 - 134 - H]^-$, $^{0,2}X^-$ at m/z 331 $[M - 288 - 120 - H]^-$ and $^{0,3}X^-$ at m/z 361 $[M - 288 - 90 - H]^-$. Hence the base unit was identified as an intact unit of [epi]catechin, which forms the product ion at m/z 289. Other signals also support the C-glycosidic nature of the compounds included in this series. The presence of the ions at m/z 449 and at m/z 435 were interpreted as the fragments $^{0,2}X^-$ $[M - 152 - 18 - 120]^-$ and $^{1,5}X^-$ $[M - 152 - 18 - 134]^-$, respectively, probably originated from the peak at m/z 569 $[M - 152 - 18 - H]^-$, formed due to the elimination of a water molecule from the base peak at m/z 587. Formation of the

product ion at m/z 451 $[M - 288 - H]^-$ through the HRF mechanism with neutral loss of the $^{1,4}A_0$ fragment from the glycosylated A-ring corroborates with the suggested structure of a B-type C-glycosylated procyanidin (Fig. 6).

Waridel *et al.*³⁵ described that the differentiation between C6 and C8 flavonoid C-glycosides can be based on low-energy negative ion mode CID-IT-MS/MS spectra, in which loss of water (E_1^-) is specific to C6 C-glycosides. However, to the best of our knowledge, discrimination between C6 and C8 C-glycosides proanthocyanidins is not described in the literature. In this class of secondary metabolites loss of water is also possible through elimination of the 3OH, and therefore the fragment E_1^- can not be used for an unambiguous identification.

The higher monoglycosylated homologous, from trimer to hexamer, presented deprotonated molecular peaks at m/z 1027, 1315, 1603 and 1891, and led to fragmentation patterns analogous to those described above. To the best of our knowledge, only a dimeric glycosylated procyanidin was described in the literature.³⁶ Therefore, the monoglycosylated proanthocyanidins here described might be new compounds.

It is well known that polymeric procyanidins can form multiply charged ions, leading to additional signals in the MS spectrum.^{10,25} However, procyanidins with high DP may originate ions with close mass-to-charge ratios, which cannot be solved by a medium resolution mass spectrometer. Therefore, the identification of these polymers usually is only speculative.¹⁰

Our results demonstrate that noteworthy characteristics of the infusion from the barks of *H. speciosa* were the presence of proanthocyanidin oligomers, including compounds containing [epi]catechin sub-units (i.e. procyanidins) with B-type linkages, as well as their respective C-glycosylated derivatives.

The presence of proanthocyanidins in this phytopreparation is particularly significant. In fact, Iwasaki *et al.*³⁷ recently reported that proanthocyanidins inhibited gastric mucosal injury by strengthening mucosal protection. Besides, the recognized antioxidant activity of these compounds may also contribute to its antiulcer activity.² Therefore, it is possible that the traditional antiulcer use of *H. speciosa* is due, at least in part, to the high content of proanthocyanidins.

CONCLUSIONS

ESI-IT-MS using direct flow injection of the infusion from *Hancornia speciosa* led to the detection of phenolic compounds and two series of oligomeric proanthocyanidins. ESI-IT-MS/MS experiments allowed structural recognition of B-type proanthocyanidins as well as their respective C-glycosylated derivatives. The technique also allowed to overcome the problem associated to the occurrence of polymers and showed to be very simple, rapid, efficient, and provided a unique fingerprint of the secondary metabolites content in the infusion, since it is not necessary a previous chromatographic separation. As result, no extensive and time-consuming sample pretreatment was necessary.

Therefore, direct flow injection ESI-IT-MS showed its potential as a standard analytical tool for the determination of polyphenols in complex mixtures like infusions, which may have a profound impact on the study of biodiversity, including the fast obtaining of metabolomic profiling and dereplication of vegetable species. The analytical procedure demonstrated in this work proved to be a very efficient and simple screening method that is able to provide information on different components. As a routine application, the procedure could potentially be of great value in the investigation of black or green tea samples, wines or other matrices based on the proanthocyanidin core.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the BIOTA/FAPESP Program (Proc. Nº. 02/05503-6). To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants to W.V. and A.R.M.S.B. and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to a fellowship to C.M.R.

REFERENCES

1. Sampaio TS, Nogueira PCL. *Food Chem.* 2006; **95**: 606. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.038.
2. De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. *Biochem. Syst. Ecol.* 1999; **27**: 445. DOI: 10.1016/S0305-1978(98)00101-X.
3. Khanbabaee K, van Ree T. *Nat. Prod. Rep.* 2001; **18**: 641. DOI: 10.1039/b101061l.
4. Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1980; **1**: 2278. DOI: 10.1039/P19800002278.
5. Foo LY, Porter LJ. *Phytochemistry* 1980; **19**: 1747. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)83807-8.

6. Robards K. J. *Chromatogr. A* 2003; **1000**: 657. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00058-X.
7. Le Roux E, Doco T, Sarni-Manchado P, Lozano Y, Cheynier V. *Phytochemistry* 1998; **48**: 1251. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)01070-4.
8. de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2000; **35**: 33. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2000.00338.x.
9. Vivas N, Nonier MF, de Gaulejac NV, Absalon C, Bertrand A, Mirabel M. *Anal. Chim. Acta* 2004; **513**: 247. DOI: 10.1016/j.aca.2003.11.085.
10. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Zhang Z, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. *J. Mass Spectrom.* 2003; **38**: 1272. DOI: 10.1002/jms.541.
11. Karonen M, Ossipov V, Sinkkonen J, Loponen J, Haukioja E, Pihlaja K. *Phytochem. Anal.* 2006; **17**: 149. DOI: 10.1002/pca.898.
12. Mauri P, Pietta P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000; **23**: 61. DOI: 10.1016/S0731-7085(00)00264-8.
13. Goodacre R, Vaidyanathan S, Bianchi G, Kell DB. *Analyst* 2002; **127**: 1457. DOI: 10.1039/b206037j.
14. Sawaya ACHF, Tomazela DM, Cunha IBS, Bankova VS, Marcucci MC, Custodio AR, Eberlin MN. *Analyst* 2004; **129**: 739. DOI: 10.1039/b403873h.
15. Møller JKS, Catharino RR, Eberlin MN. *Analyst* 2005; **130**: 890. DOI: 10.1039/b415422c.
16. Araújo AS, da Rocha LL, Tomazela DM, Sawaya ACHF, Almeida RR, Catharino RR, Eberlin MN. *Analyst* 2005; **130**: 884. DOI: 10.1039/b415252b.
17. Catharino RR, Cunha IBS, Fogaça AO, Facco EMP, Godoy HT, Daudt CE, Eberlin MN, Sawaya ACHF. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**, 185. DOI: 10.1002/jms.976.
18. Mueller-Harvey I. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001; **91**: 3. DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00227-9.
19. Degenhardt A, Engelhardt UH, Lakenbrink C, Winterhalter P. *J. Agric. Food Chem.* 2000; **48**: 3425. DOI: 10.1021/jf0000833.
20. Degenhardt A, Hofmann S, Knapp H, Winterhalter P. *J. Agric. Food Chem.* 2000; **48**: 5812. DOI: 10.1021/jf0007481.
21. Shibusawa Y, Yanagida A, Ito A, Ichihashi K, Shindo H, Ito Y. *J. Chromatogr. A* 2000; **886**: 65. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00448-9.

22. Rohr GE, Meier B, Sticher O. *Phytochem. Anal.* 2000; **11**: 106. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(200003/04)11:2<106::AID-PCA496>3.0.CO;2-O.
23. Sun W, Miller JM. *J. Mass Spectrom.* 2003; **38**: 438. DOI: 10.1002/jms.456.
24. Sannomiya M, Montoro P, Piacente S, Pizza C, Brito ARMS, Vilegas W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; **19**: 2244. DOI: 10.1002/rcm.2053.
25. Friedrich W, Eberhardt A, Galensa R. *Eur. Food Res. Technol.* 2000; **211**: 56. DOI: 10.1007/s002170050589.
26. Goto T, Yoshida Y, Kiso M, Nagashima H. *J. Chromatogr. A* 1996; **749**: 295. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00456-6.
27. Dalluge JJ, Nelson BC, Thomas JB, Sander LC. *J. Chromatogr. A* 1998; **793**: 265. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00906-0.
28. Davis AL, Cai Y, Davies AP, Lewis JR. *Magn. Reson. Chem.* 1996; **34**: 887. DOI: 10.1002/(SICI)1097-458X(199611)34:11<887::AID-OMR995>3.0.CO;2-U.
29. Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM, Viladomat F, Bastida J, Codina C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; **18**: 553. DOI: 10.1002/rcm.1370.
30. Miketova P, Schram KH, Whitney J, Li M, Huang R, Kerns E, Valcic S, Timmermann BN, Rourick R, Klohr S. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 860. DOI: 10.1002/1096-9888(200007)35:7<860::AID-JMS10>3.0.CO;2-J.
31. Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997; **11**: 1357. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(199708)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9.
32. Domon B, Costello CE. *Glycoconj. J.* 1988; **5**: 397. DOI: 10.1007/BF01049915.
33. Cuyckens F, Claeys M. *J. Mass Spectrom.* 2004; **39**: 1. DOI: 10.1002/jms.585.
34. Es-Safi N-E, Kerhoas L, Einhorn J, Ducrot P-H. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **247**: 93. DOI: 10.1016/j.ijms.2005.10.002.
35. Waridel P, Wolfender J-L, Ndjoko K, Hobby KR, Major HJ, Hostettmann K. *J. Chromatogr. A* 2001; **926**: 29. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00806-8.
36. Morimoto S, Nonaka G, Nishioka I. *Chem. Pharm. Bull.* 1986; **34**: 643.
37. Iwasaki Y, Matsui T, Arakawa Y. *J. Gastroenterol.* 2004; **39**: 831. DOI: 10.1007/s00535-004-1399-5.

Figure 1. Chemical structures of dimeric B-type proanthocyanidins: **1** epicatechin-(4 β →8)-catechin, **2** epicatechin-(4 β →6)-catechin and dimeric A-type proanthocyanidin: **3** epicatechin-(2 β →7;4 β →8)-epicatechin.

Figure 2. Typical direct flow injection ESI-IT-MS fingerprint spectra obtained in negative ion mode of the infusion from the barks of *H. speciosa*. **A)** Normal mass scan in the range of m/z 210 to 1600 and **B)** high mass scan in the range of m/z 1200 to 2000. ▼) Ions signals separated by 288 Da and corresponding to the first procyanidins homologous series. ♦) Second monoglycosylated procyanidins homologous series.

Figure 3. Main fragmentation pathways of B-type proanthocyanidins illustrated for the dimer identified in the infusion from the barks of *H. speciosa*.

Figure 4. Product ion spectrum of the precursor ion $[M - H]^-$ at m/z 577 of a dimeric B-type procyanidin identified in the infusion from the barks of *H. speciosa* in collision energy of 30%.

Figure 5. Product ion spectrum of the precursor ion $[M - H]^-$ at m/z 739 of a dimeric B-type C-glycosylated procyanidin identified in the infusion from the barks of *H. speciosa* in collision energy of 30%.

Figure 6. Main fragmentation pathways of B-type proanthocyanidins proposed for the monoglycosylated dimer identified in the infusion from the barks of *H. speciosa*.

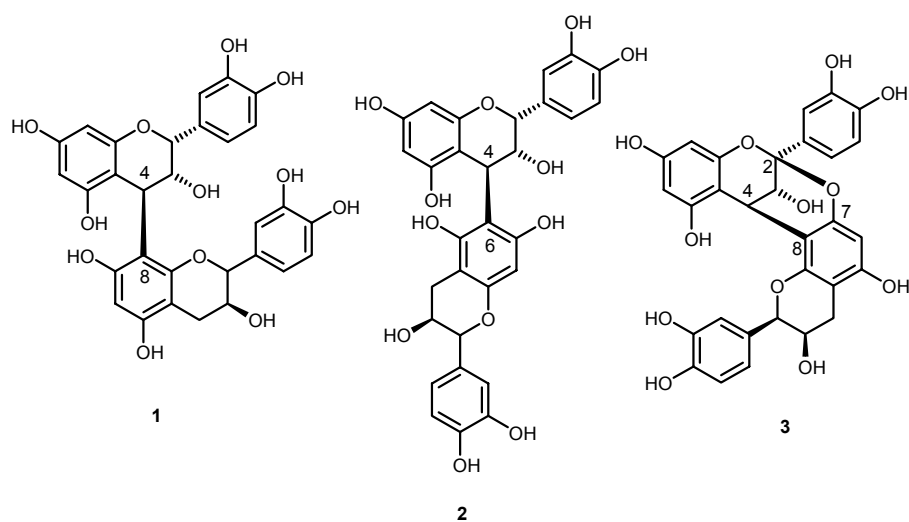
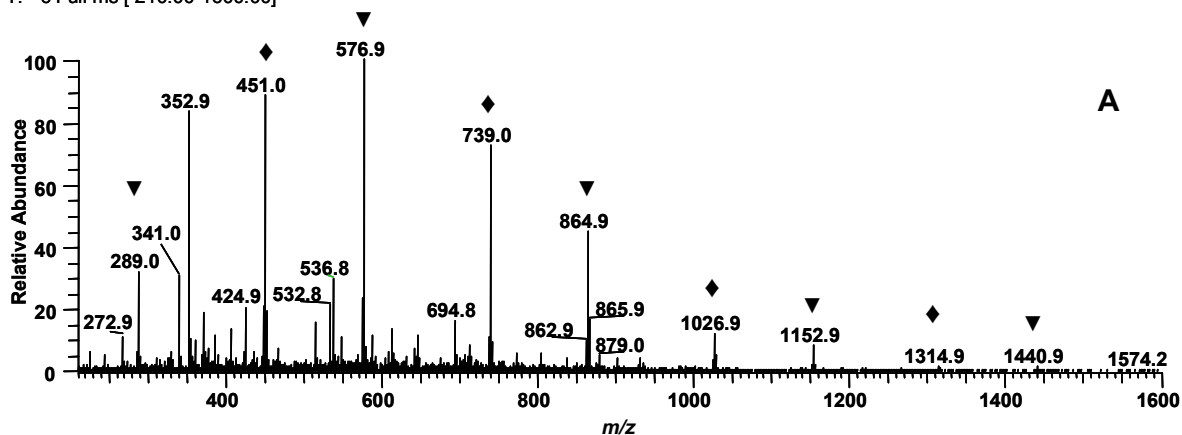


Figure 1. Chemical structures of dimeric B-type proanthocyanidins: **1** epicatechin-(4β→8)-catechin, **2** epicatechin-(4β→6)-catechin and dimeric A-type proanthocyanidin: **3** epicatechin-(2β→7;4β→8)-epicatechin.

HSfia #403-416 RT: 6.65-6.94 AV: 14 NL: 9.82E5
T: - c Full ms [210.00-1600.00]



HSfia #2450-2570 RT: 46.94-48.85 AV: 121 NL: 5.14E4
T: - c Full ms [1200.00-2000.00]

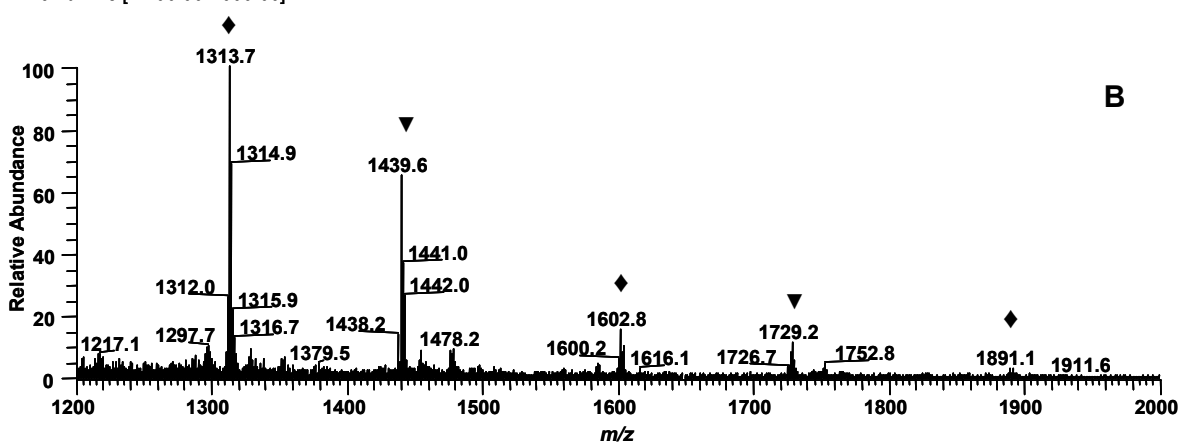


Figure 2. Typical direct flow injection ESI-IT-MS fingerprint spectra obtained in negative ion mode of the infusion from the barks of *H. speciosa*. **A)** Normal mass scan in the range of m/z 210 to 1600 and **B)** high mass scan in the range of m/z 1200 to 2000. ▼) Ions signals separated by 288 Da and corresponding to the first procyanidins homologous series. ◆) Second monoglycosylated procyanidins homologous series.

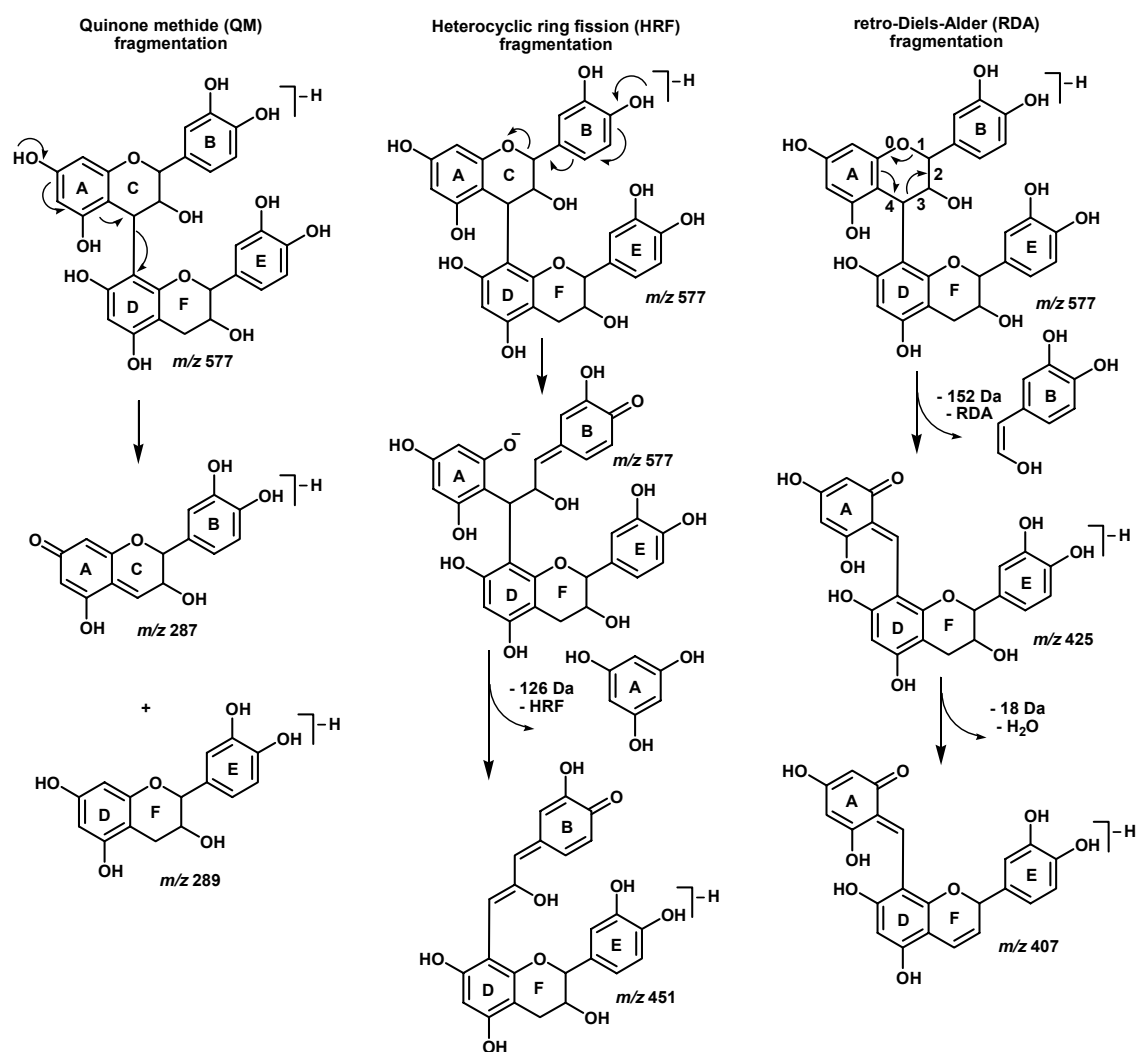


Figure 3. Main fragmentation pathways of B-type proanthocyanidins illustrated for the dimer identified in the infusion from the barks of *H. speciosa*.

HSfia #1047-1082 RT: 19.00-19.38 AV: 24 NL: 2.62E4
T: - c Full ms2 577.00@30.00 [155.00-600.00]

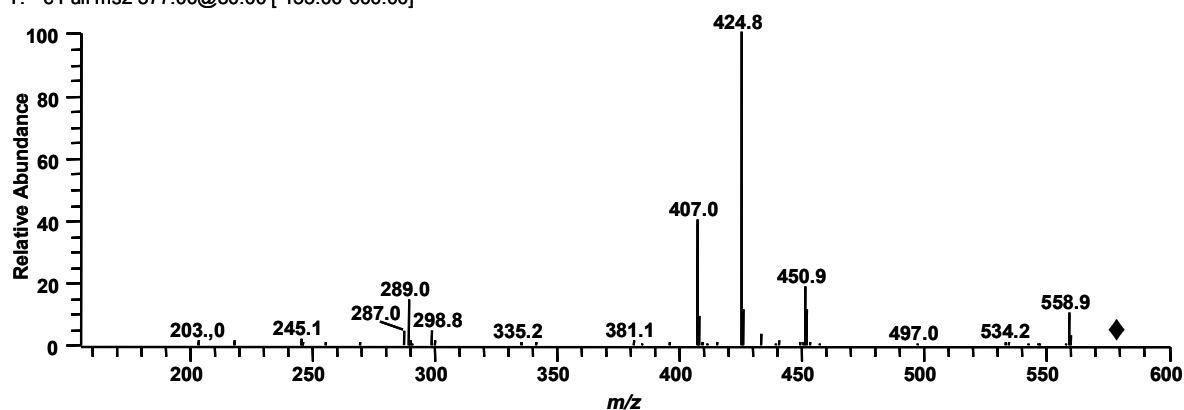


Figure 4. Product ion spectrum of the precursor ion $[M - H]^-$ at m/z 577 of a dimeric B-type procyanidin identified in the infusion from the barks of *H. speciosa* in collision energy of 30%.

HSfia #1244-1362 RT: 22.44-24.55 AV: 119 NL: 8.19E3
T: - c Full ms2 739.00@30.00 [200.00-800.00]

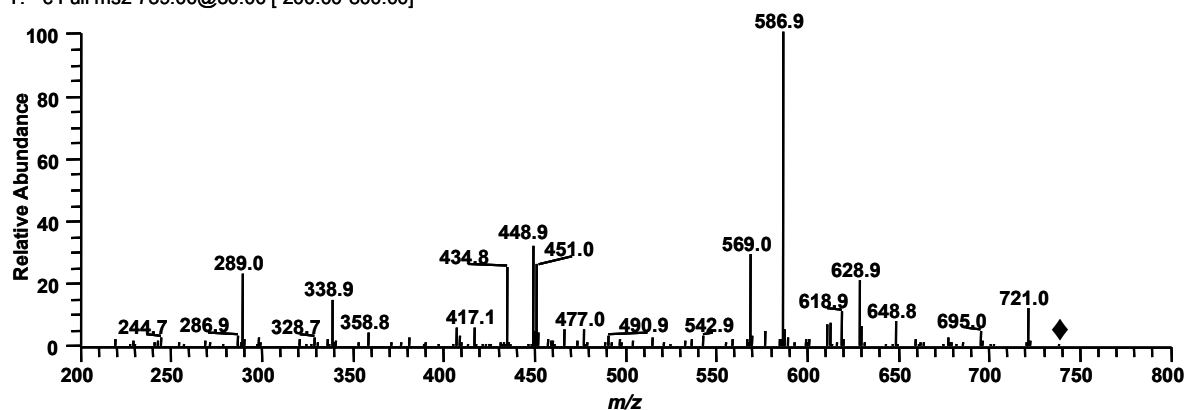


Figure 5. Product ion spectrum of the precursor ion $[M - H]^-$ at m/z 739 of a dimeric B-type C-glycosylated procyanidin identified in the infusion from the barks of *H. speciosa* in collision energy of 30%.

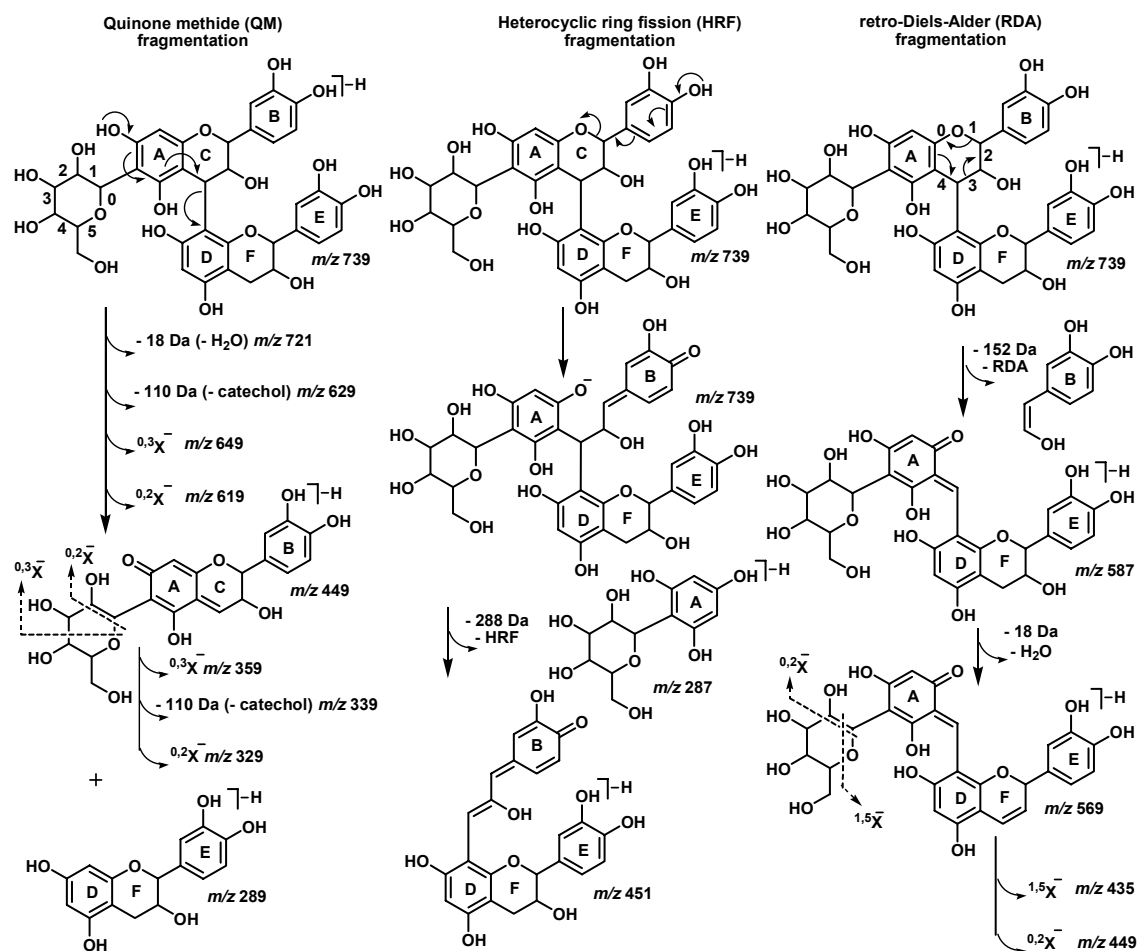


Figure 6. Main fragmentation pathways of B-type proanthocyanidins proposed for the monoglycosylated dimer identified in the infusion from the barks of *H. speciosa*.

High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill**Short Title:** Polyphenolic compounds from *Davilla elliptica**Clenilson M. Rodrigues¹, Daniel Rinaldo¹, Miriam Sannomiya¹, Lourdes C. dos Santos¹, Paola Montoro², Sonia Piacente², Cosimo Pizza² and Wagner Vilegas^{1*}*¹UNESP, São Paulo State University, Organic Chemistry Department, CP 355, CEP 14800-900, Araraquara, São Paulo - Brazil.²Università degli Studi di Salerno, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, via Ponte Don Melillo, 84084 Fisciano (SA) - Italy.

Abstract: The isolation of polyphenolic compounds from an infusion of the Brazilian plant *Davilla elliptica* (Dilleniaceae), used as tea by virtue of its digestive properties, is described. An improved preparative HPLC method was used in order to isolate pure polyphenols from the complex mixture. Liquid-liquid extraction and solid-phase extraction were employed to minimize the interference of polymeric compounds and to provide an enriched fraction of the compounds of interest. The identification of the isolated compounds was performed using analytical HPLC as well as direct injection electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry (ESI-IT-MS/MS). The high flavonoid content suggests that *D. elliptica* may be a promising source of compounds to produce natural phytomedicines.

Keywords: Preparative HPLC; solid-phase extraction; infusion analysis; flavonoids; *Davilla elliptica*; Dilleniaceae

*Address correspondence to W. Vilegas, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual Paulista. Tel.: +55-16-3301-6668, fax: +55-16-3301-6692. E-mail: vilegasw@gmail.com

INTRODUCTION

Dilleniaceae is a plant family found in tropical and subtropical regions of the world. The native Brazilian representatives are predominantly species of the genera *Davilla*, *Tetracera*, *Curatella* and *Dolicarpus* (David *et al.*, 1996).

Davilla is a Neotropical genus consisting of twenty species, eleven of which have been botanically studied (Gurni and Kubitzki, 1981). Some species of this genus are used by local populations as medicinal plants (data not published). Despite the popular use of these species in folk medicine, there are only a few reports about their pharmacological activities on the gastric intestinal system or their possible toxic effects. *D. rugosa* was investigated owing to its anti-ulcerogenic activity (Guaraldo *et al.*, 2001). Moreover, the chemical composition of this and of other species it is still under explored. There are, however, literature reports of the presence of kaempferol, myricetin and quercetin as well as their rhamnoside derivatives in the leaves of *D. flexuosa* and *D. rugosa* (David *et al.*, 1996; Guaraldo *et al.*, 2001). Previous pharmacological evaluation of the methanol extracts from the leaves of *D. elliptica* indicated that they did not present acute toxicity and promoted gastric protection in *in vivo* assays in mice (unpublished data), thus representing a promising source of new phytomedicines. In addition, Michelin *et al.* (2005) described the antimicrobial activity of the crude methanol extract of the aerial parts of *D. elliptica*.

Flavonoids are widespread compounds commonly found in the daily diet; they are resistant to boiling and fermentation and display a broad range of biological and pharmacological properties (Hollman and Katan, 1998). It has been reported that flavonoids and phenolic compounds display hydrogen-donating and radical scavenger capacities, especially those with an *ortho*-dihydroxy group such as quercetin, and gallic acid derivatives, which can be related to some anti-ulcer mechanisms (Havsteen, 2002). This represents, therefore, an important reason to study the chemical composition of medicinal plants with traditional use in gastric diseases.

During the investigation of complex matrices, efficient separation and fast identification methods are required to assess the chemical composition of medicinal plants. Although there are different approaches to the separation and analysis of secondary metabolites from herbal extracts, HPLC is by far the most widely used technique for the separation of complex mixtures of polyphenolic compounds in plant

extracts (Merken and Beecher, 2000; Robards, 2003; Rayyan *et al.*, 2005). However, when the concentration of tannins is high, it usually leads to a significant decrease in chromatographic resolution, which makes unfeasible the separation of the compounds by HPLC. The literature also reports that the separation of mixtures containing tannins and flavonoids using gel permeation chromatography (GPC) over Sephadex LH-20 produces poor results (Mueller-Harvey, 2001). In our studies, the use of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) to fractionate the ethanol extract of *D. elliptica* led only to the isolation of myricetin-3-*O*-rhamnoside and quercetin-3-*O*-rhamnoside (Rinaldo *et al.*, 2006). Thus, in order to achieve good separations, it is often necessary to perform a clean-up of the sample.

The present work deals with the isolation and identification of secondary metabolites present in the infusion from the leaves of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). Since most of the compounds present in infusions are known to be polar compounds, methods were developed based on reversed-phase (RP) HPLC. Gradient preparative and analytical HPLC methods coupled with photodiode array detection (PAD) were applied simultaneously to separate flavonoids, both glycosides and aglycones, and phenolic compounds. Negative mode ESI-IT-MS/MS analyses were used to characterize the structure of these compounds.

EXPERIMENTAL

Plant Material. Aerial parts of *D. elliptica* were collected in March 2004 at Palmas, Tocantins State, Brazil and authenticated by Solange de Fátima Lólis. A voucher specimen N° 4593 was deposited at the Herbarium of the Tocantins University.

Reagents and Standard Solutions. HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from J.T. Baker (Baker-Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA). Standards of quercetin, myricetin, quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, rutin, (-)-epicatechin and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside and myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside were from Extrasynthese (Genay, France). HPLC-grade water (18 M Ω .cm) was obtained using a Direct Q5 Milli-Q purification system (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Sep-Pak RP18 cartridges (20 g/60 mL) for solid-phase extraction (SPE) were purchased from Phenomenex Co. (Torrance, CA, USA).

Extraction. The dried powdered leaves of *D. elliptica* (100 g) were infused with boiling water (1 L) for 10 min. The mixture was filtered through filter paper to remove macro particles, cooled to room temperature and submitted to liquid-liquid extraction (LLE) between ethyl acetate and water (1:1, v:v). Both layers were checked by TLC (Si gel plates, chloroform : methanol : *n*-propanol : water (5:6:1:4, v:v), organic phase) and visualized with anisaldehyde sulphuric acid reagent (Wagner *et al.*, 2003). Flavonoids (yellow spots) and gallic acid derivatives (grey spots) were concentrated in the ethyl acetate fraction, whereas tannins and free sugars remained in the aqueous layer. The ethyl acetate layer was vacuum-evaporated to dryness to give a brown solid (4.0 g).

The brown residue obtained from LLE was dissolved in 50 mL methanol : water (7:3, v:v) and aliquots (10 mL) were applied to a Sep-Pak RP18 cartridge, preconditioned with methanol (2 x 100 mL) and water (100 mL), to remove lipid material. The cartridge was eluted with 100% methanol (50 mL) affording a fraction containing mainly flavonoids. In order to remove adsorbed lipids, carotenoids and chlorophyll, the cartridge was further washed with chloroform (100 mL). This process was repeated and the methanol fractions were combined. The solvent was evaporated under a stream of nitrogen to give a flavonoid rich fraction (FRF, 3.5 g). The solid was redissolved in 10 mL methanol : water (7:3, v:v), filtered through a 0.45 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filter and aliquots submitted to preparative HPLC.

Isolation of the components. The FRF was separated using a Varian (Walnut Creek, CA, USA) ProStar 210/330 HPLC system equipped with a Dynamax RP18 preparative column (250 x 41.4 mm i.d.; 8 µm) and a Rheodyne (Cotati, CA, USA) 7125 sample injector with a 1 mL sample loop. The mobile phase consisted of water (eluent A) and methanol (eluent B), both containing 0.05% of TFA. Elution was: 33-47% B, linear gradient (150 min); 47-100% B, linear gradient (25 min); 100% B isocratic (25 min). The flow rate was 15 mL/min and the total run time was 200 min. Data were monitored at 270 nm for general aromatics, 330 nm for myricetin and quercetin monoglycosides, and 360 nm for flavonoid aglycones (Merken and Beecher, 2000). Individual peaks from multiple injections were collected as they eluted from the column and concentrated by evaporation. When necessary, the fractions obtained were purified by multiple HPLC separation on a Phenomenex Luna C18 semi-preparative column (250 x 10 mm i.d.; 10

µm) using a Rheodyne 7125 sample injector with a 100 µL sample loop. The gradient elution was 36 to 42% of eluent B in 15 min, with a linear increase to 100% in 30 min, followed by 5 min isocratic elution and a return to 36% at 40 min: the flow rate was 4.7 mL/min.

Infusion Analyses by HPLC-PAD. The chromatographic profile of the sample obtained from SPE was established using a Jasco (Tokyo, Japan) liquid chromatograph equipped with a PU-2089 quaternary solvent pump, a MD-2010 PAD and a Rheodyne 7725 sample injector with a 20 µL sample loop. The analytical column was a Phenomenex Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm) equipped with a Phenomenex security guard column (4.0 x 2.0 mm i.d.). The mobile phase composition was: water (eluent A) and acetonitrile (eluent B) both containing 0.05% of TFA. The gradient program was as follows: 15-22% B (25 min), 22-40% B (15 min), 40-78% B (5 min), 78-100% B (5 min) and 100% B isocratic (5 min). The flow rate was 1.0 mL/min and the total run time was 55 min. EZChrom Elite Data System software (Chromatec, Idstein, Germany) was used for both the operation of detector and for data processing. Identification of compounds was performed by retention time and by spiking with standards and isolated compounds under the same conditions.

Analyses by ESI-IT-MS and ESI-IT-MS/MS. ESI-MS in the negative ion mode was performed using a Finnigan (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) LCQ Deca ion trap instrument equipped with Xcalibur software. Samples were dissolved in methanol and infused in the ESI source using a syringe pump; the flow rate was 3 µL/min. The capillary voltage was -5 V, the spray voltage was 5 kV, and the tube lens offset was -55 V. The capillary temperature was 220°C. Nitrogen was used both as drying gas at a flow rate of 350 L/min and as nebulizing gas. The nebulizer temperature was set at 280°C, and a potential of -4 V was used on the capillary. Negative ion mass spectra were recorded in the range m/z 50-1500. Two scan events were prescribed to run in the LCQ mass spectrometry. The first event was a full-scan spectrum to acquire data on the deprotonated compounds within the scan range. The second scan event was a MS/MS experiment performed using a data-dependent scan on deprotonated molecule $[M - H]^-$ at a collision energy of 25% of the instrument maximum.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to assess the chromatographic profile, the infusion was investigated by analytical HPLC-PAD. The preparation of the sample prior to HPLC analysis was performed using LLE partitioning of the infusion between ethyl acetate and water.

Mixtures of methanol : water and acetonitrile : water in different proportions were tested as mobile phase for HPLC analyses, as were the effects of adding formic and trifluoroacetic acids to adjust the pH value and solvent strength over the separation. The best results were obtained using gradient elution with acetonitrile : water. A significant improvement in the separation of the peaks was also observed after adding trifluoroacetic acid. As a result, under the optimized conditions a baseline separation was achieved within 40 min, with symmetrical, sharp and well-resolved peaks for almost all analytes including the minor components (Fig. 1). The identification of analytes was based on the comparison of the retention time and UV spectra of the peaks with those of the available reference standards and confirmed by spiking FRF with standards or isolated compounds. With PAD scanning from 200-600 nm it was possible to obtain the UV spectra of each peak, which permitted the selection of a suitable wavelength at which to maximize the detection of the constituents of FRF thus minimizing any interference. According to their corresponding UV absorbance, a wavelength of 254 nm was determined to be the most appropriate to ensure maximum detection for the simultaneous analyses of all compounds present in FRF. The UV spectra of the peaks corroborated the presence of flavonoids (peaks **3** to **5** and **7** to **15** with bands at 240-285 nm and 300-380 nm) and gallic acid derivatives or catechins (peaks **1** and **2** with bands at 210-278 nm) (Merken and Beecher, 2000).

Unfortunately, owing to the large amount of water (85%) present at the start of the gradient, the optimized conditions for analytical separation could not be directly transported to the preparative scale for separation of the FRF in order to isolate analytes in amounts sufficient for spectral characterization. Hence, in view of the greater solubility of the FRF in methanol, several solvent systems were evaluated as mobile phase in order to separate the maximum number of compounds. The flow rate and the FRF loading onto the column were also optimized to obtain the largest number of the minor compounds with the highest purity in a single chromatographic run. The best result was achieved using gradient mixtures of methanol : water, starting with 67% water, at a flow rate of 15 mL/min and detection at 254 nm (Fig. 2). This system led to

the separation of fifteen compounds (Fig. 3) in amounts sufficient to perform spectral characterization (Table 1). The isolated compounds were identified by their NMR spectral data and compared to those reported in the literature (Agrawal, 1989; Harborne, 1994). The purity of compounds was determined by NMR and by HPLC under different experimental conditions and was found to be higher than 90%.

In order to confirm these results, direct injection ion trap electrospray tandem mass spectrometry analyses of the infusion was also performed. Figure 4 shows the negative spectral profile of the infusion of *D. elliptica* submitted to direct injection into the ESI-IT-MS source. The signal at m/z 169 corresponds to gallic acid whilst that at m/z 191 suggests the presence of quinic acid; these compounds are widely distributed in plants. The identification of the other compounds was mainly performed on the basis of their fragmentation patterns in the MS/MS experiments. Figure 5 presents the MS/MS fragmentation of representative compounds from *D. elliptica* and Figure 6 displays the most common aglycone fragmentation of flavonoids designated according to the nomenclature previously proposed by Ma *et al.*, (1997). The product ions from the glycoconjugates were denoted according to the nomenclature introduced by Domon and Costello (1998). The second-generation ion product spectrum of the precursor ion at m/z 447 (Fig. 5a) produced the base peak Y_0^- at m/z 301 $[M - 146 - H]^-$, due to the loss of a deoxyhexose, and the minor product ion $^{0,2}X^-$ at m/z 343 $[M - 104 - H]^-$, thus corroborating the presence of quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside (**11**). The second-generation ion product spectrum of the precursor ion at m/z 463 $[M - H]^-$ (Fig. 5b) produced the product ion Y_0^- at m/z 317 $[M - 146 - H]^-$, due to the loss of a deoxyhexose unit, and the minor product ions $^{0,2}X^-$ at m/z 359 $[M - 104 - H]^-$, Z_0^- at m/z 301 $[M - 162 - H]^-$, as well as the product ion $^{1,3}A_0^-$ resulting from the retro-Diels-Alder (RDA) elimination of ring B at m/z 151, which confirms the presence of myricetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside (**8**). The second-order fragmentation of the precursor ion $[M - H]^-$ at m/z 479 (Fig. 5c) produced the product ion Y_0^- at m/z 317 $[M - 162 - H]^-$, and also the product ion $^{0,2}X^-$ at m/z 359 $[M - 120 - H]^-$, supporting the presence of the myricetin hexoside (**3** or **4**). The second-generation ion product spectrum of the precursor ion at m/z 615 (Fig. 5d) produced product ion Y_1^- at m/z 463

$[M - 152 - H]^-$ (due to the loss of a galloyl moiety), the product ion Y_0^- at m/z 317 $[M - 152 - 146 - H]^-$ (corresponding to the loss of the galloyl and a deoxyhexose moiety), together with the minor product ion B_2^- at m/z 299 and Z_0^- at m/z 301, thus confirming the presence in *D. elliptica* of the two acylated flavonol glycosides myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- α -rhamnopyranoside (**13**) and myricetin-3-*O*-(3"-*O*-galloyl)- α -rhamnopyranoside (**14**). The aglycones quercetin (**15**) and myricetin (**12**) gave low intensity peaks at m/z 301 $[M - H]^-$ and at m/z 317 $[M - H]^-$, respectively. The presence of the acylated flavonol glycoside myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- β -galactopyranoside (**5**) at m/z 631 $[M - H]^-$ could also be observed. The second-generation ion product spectrum of the odd-electron ion (radical anion) at m/z 316 $[M]^\bullet$ (Fig 5e) produced the radical anion at m/z 271 $[M - 45]^\bullet$, due to the loss of a COOH unit, while the radical anions at m/z 203 $[M - 113]^\bullet$ and at m/z 222 $[M - 94]^\bullet$ could be ascribed to the loss of the terminal C_5H_7COOH (3-methyl-2,4-pentadienoic acid) and C_4H_5COOH (3-methyl-2-butenic acid) units and further recombination with hydrogen atoms. This kind of fragmentation matches with those of oxoretinoic acids (Wingerath *et al.*, 1999). However, the occurrence of rearrangements, *cis/trans* isomers and positional isomers prevented the unequivocal identification of this compound.

Our results reveal that the approach used in this work permits a fast and efficient analysis and preparative separation of the phenolic compounds present in a highly complex matrix such as an infusion from the leaves of *D. elliptica*.

The clean-up steps were simple and efficient. The combination of LLE followed by SPE using Sep-Pak RP18 cartridge was able to separate the analytes from co-extractives, such as tannins, free sugars and lipid material. The clean-up led to a considerable minimization of the interferences and allowed the preconcentration of the main metabolites found in this infusion, with advantages in terms of sample preparation and selective separation of the secondary metabolites.

The optimized analytical HPLC method has shown to be useful for the reliable identification of 15 compounds present in the infusion of *D. elliptica*, including gallic acid, one catechin and flavonoid glycosides, and established the chemical profile of this plant species. Following the general procedure here described, it could also be used for quantitative determination and quality control of this plant species.

Concerning the HPLC separation of the compounds on a preparative scale, under the conditions used the method allowed the isolation and the detailed identification of several compounds, including minor flavonoid glycosides, which allowed the full characterization of the chemical composition of the infusion.

Direct flow injection ESI-IT-MS of the infusion of the aerial parts of *D. elliptica* led to the detection of phenolic acids, one oxoretinoic acid as well as a series of flavonoid *O*-glycosides and their acyl derivatives. The technique has shown to be very simple, rapid, efficient, and provided a qualitative fingerprint of the secondary metabolites content in the infusion. The uses of ESI-IT-MS point toward the possibility of identifying key-compounds directly from crude infusion, without the need of extensive clean-up. Moreover, by performing a limited number of experiments, a significant gain in terms of time and reliability was achieved.

Flavonoids and their glycosides are responsible for a large number of pharmacological properties. They are also known for their radical scavenging and antioxidant capabilities (Aaby *et al.*, 2004) and these properties are closely related to the anti-ulcer activity due to protective effect, including gastric and esophageal injuries or liver protection (Oh *et al.*, 2001; Galati *et al.*, 2003; Speroni *et al.*, 2003).

Therefore, the detailed description of the chemical composition of the infusion of *D. elliptica* showed the presence of groups of secondary metabolites that may be involved in the pharmacological activities observed. Due to the scarce literature data on the secondary metabolites of plants present in Dilleniaceae, our results may also contribute to the taxonomy of the family.

Further studies are now in process in order to clarify the biological activities of these compounds in the infusion, which may evidence [or not] the folk utilization of *D. elliptica* as a medicinal plant to treat gastric diseases.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Biota FAPESP Program of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial aid and for fellowships to D.R. and M.S. We also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants to W.V. and CAPES for a fellowship to C.M.R.

REFERENCES

- Aaby K, Hvattum E, Skrede G. 2004. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **52**: 4595-4603.
- Agrawal PK. 1989. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Elsevier, Amsterdam.
- David JM, Cruz FG, Guedes MLS, Chávez JP. 1996. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. *J Braz Chem Soc* **7**: 115-118.
- Domon B, Costello CE. 1998. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj J* **5**: 397-409.
- Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, Dugo G, Miceli N, Pergolizzi S, Taviano MF. 2003. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J Agric Food Chem* **51**: 4903-4908.
- Guaraldo L, Sertiè JAA, Bacchi EM. 2001. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in rat. *J Ethnopharmacol* **76**: 191-195.
- Gurni AA, Kubitzki K. 1981. Flavonoid chemistry and systematics of the Dilleniaceae. *Biochem Syst Ecol* **9**: 109-114.
- Harborne JB. 1994. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, New York.
- Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* **96**: 67-202.
- Hollman PC, Katan MB. 1998. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl* **20**: 237-248.
- Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. 1997. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**: 1357-1364.
- Merken HM, Beecher GR. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J Agric Food Chem* **48**: 577-599.

- Michelin DC, Rinaldo D, Iha SM, Sannomiya M, dos Santos LC, Vilegas W, Salgado HRN. 2005. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). *Rev Bras Farmacogn* **15**: 209-211.
- Mueller-Harvey, I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim Feed Sci Technol* **91**: 3-20.
- Oh T, Lee J, Ahn B, Cho H, Kim W, Kim Y, Surh Y, Cho S, Hahm K. 2001. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of anti-oxidants in its treatment. *Free Radic Biol Med* **30**: 905-915.
- Rayyan S, Fossen T, Nateland HS, Andersen ØM. 2005. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'crataegi folium cum flore' (hawthorn). *Phytochem Anal* **16**: 334-341.
- Rinaldo D, Silva MA, Rodrigues CM, Calvo TR, Sannomiya M, dos Santos LC, Kushima H, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS, Vilegas W. 2006. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. *Quim Nova* **29**: 947-949.
- Robards K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A* **1000**: 657-691.
- Speroni E, Cervellati R, Govoni P, Guizzardi S, Renzulli C, Guerra M. 2003. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *J Ethnopharmacol* **86**: 203-211.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 2003. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, Berlin.
- Wingerath T, Kirsch D, Spengler B, Stahl W. 1999. Analysis of cyclic and acyclic analogs of retinol, retinoic acid, and retinal by laser desorption ionization-, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, and UV/Vis spectroscopy. *Anal Biochem* **272**: 232-242.

Figure 1. Analytical HPLC-PAD chromatogram recorded at 254 nm of the compounds isolated from leaves of *D. elliptica*. Peak identification: **1** gallic acid, **2** (–)-epicatechin, **3** myricetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside, **4** myricetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, **5** myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- β -D-galactopyranoside, **6** (6*S*,7*E*)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one, **7** rutin, **8** myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, **9** quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside, **10** quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside, **11** quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, **12** myricetin, **13** myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside, **14** myricetin-3-*O*-(3"-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside, **15** quercetin. For chromatographic conditions see Experimental section.

Figure 2. Preparative HPLC-PAD chromatogram of the compounds isolated from leaves of *D. elliptica*. For peak identification see Fig. 1 and for chromatographic conditions see conditions see Experimental section.

Figure 3. Compounds found in the leaves of the *D. elliptica*. Gal: galactoside; Glc: glucoside; Gall: galloyl; Rha: rhamnoside; Ara: arabinoside.

Figure 4. Typical direct flow injection ESI-MS spectrum, in full scan mode, of the infusion from the leaves of *D. elliptica*. For spectrometric conditions see Experimental section.

Figure 5. Second-generation product ion spectra obtained for the main precursor ions produced in the ESI-MS experiment and the proposed corresponding fragmentations. For peak assignments see Fig. 6.

Figure 6. Ion nomenclature adopted for flavonoid glycoside fragmentation (illustrated on myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside).

Table 1. Spectral (UV and electrospray ionization MS) and chromatographic (HPLC) data of the compounds **1-15** isolated from the flavonoid rich fraction (FRF) obtained after clean-up procedures on the infusion of *D. elliptica*.

Compound ^a (isolated amount, mg)	ESI-MS [M – H] [–] (<i>m/z</i>)	On line HPLC-PAD	
		λ_{max} (nm)	Retention time (min)
1 (210)	169	272; 216	3.34
2 (5)	289	279; 231(sh); 204	7.89
3 (73)	479	358; 258	10.64
4 (25)	479	358; 258	10.64
5 (53)	631	363; 300(sh); 266	11.05
6 (60)	223	241	11.60
7 (6)	625	354; 257	14.05
8 (350)	463	350; 260	15.08
9 (22)	463	353; 255	15.92
10 (5)	443	355; 257	20.10
11 (140)	447	348; 257	22.43
12 (6)	317	372; 254	27.90
13 (6)	615	350; 299(sh); 266	29.04
14 (5)	615	351; 300(sh); 266	30.08
15 (16)	301	371; 256	37.22

^aPeak numbering as in Fig. 1: for the proposed structures and nomenclature of compounds see Fig. 3.

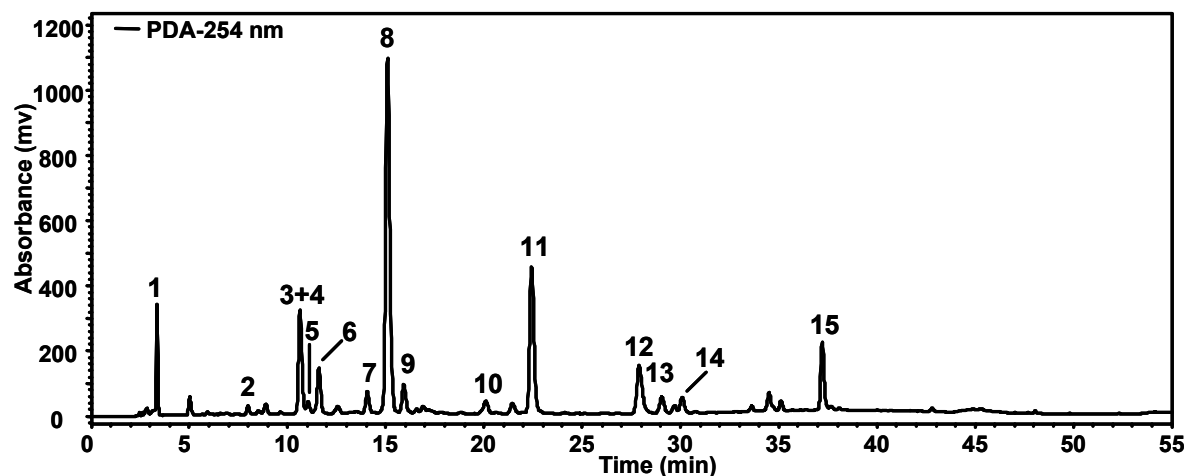


Figure 1. Analytical HPLC-PAD chromatogram recorded at 254 nm of the compounds isolated from leaves of *D. elliptica*. Peak identification: **1** gallic acid, **2** (–)-epicatechin, **3** myricetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside, **4** myricetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, **5** myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- β -D-galactopyranoside, **6** (6*S*,7*E*)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one, **7** rutin, **8** myricetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, **9** quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside, **10** quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside, **11** quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, **12** myricetin, **13** myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside, **14** myricetin-3-*O*-(3"-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside, **15** quercetin. For chromatographic conditions see Experimental section.

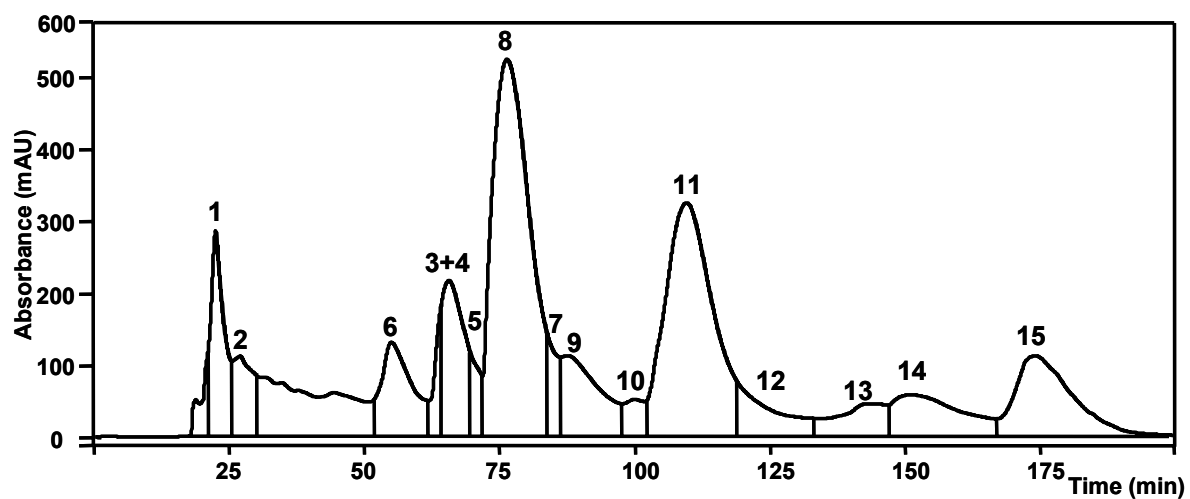


Figure 2. Preparative HPLC-PAD chromatogram of the compounds isolated from leaves of *D. elliptica*. For peak identification see Fig. 1 and for chromatographic conditions see conditions see Experimental section.

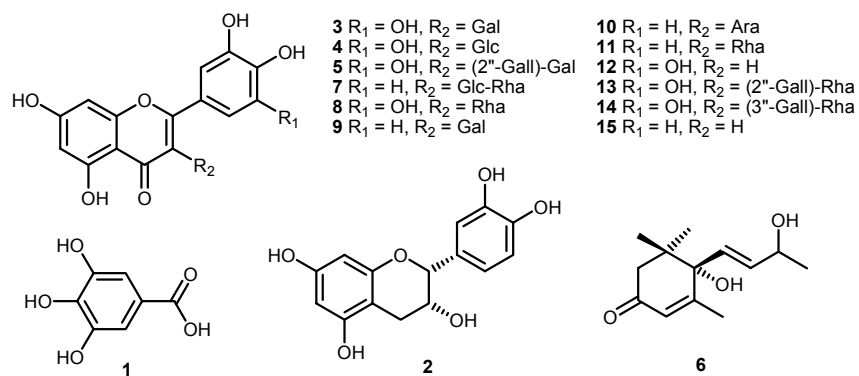


Figure 3. Compounds found in the leaves of the *D. elliptica*. Gal: galactoside; Glc: glucoside; Gall: galloyl; Rha: rhamnoside; Ara: arabinoside.

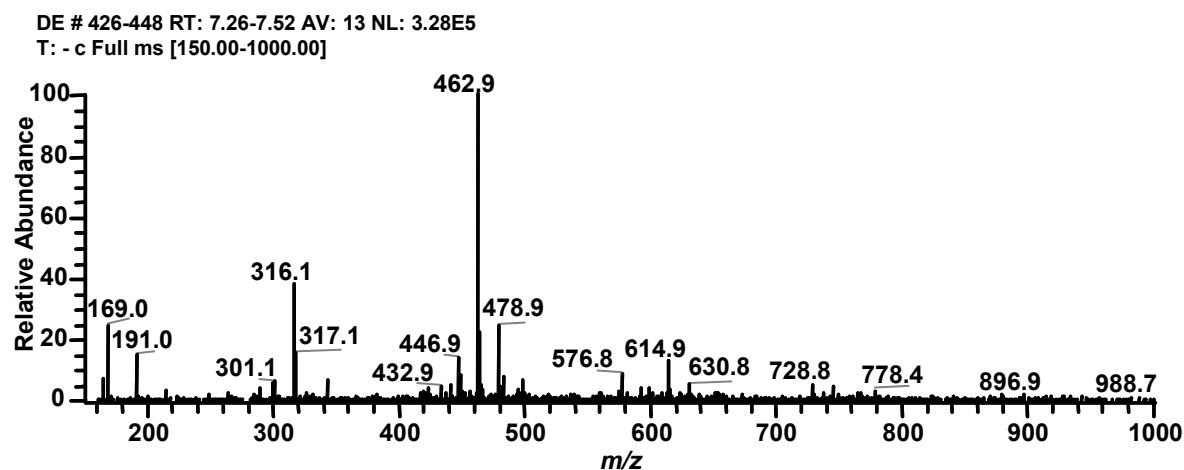


Figure 4. Typical direct flow injection ESI-MS spectrum, in full scan mode, of the infusion from the leaves of *D. elliptica*. For spectrometric conditions see Experimental section.

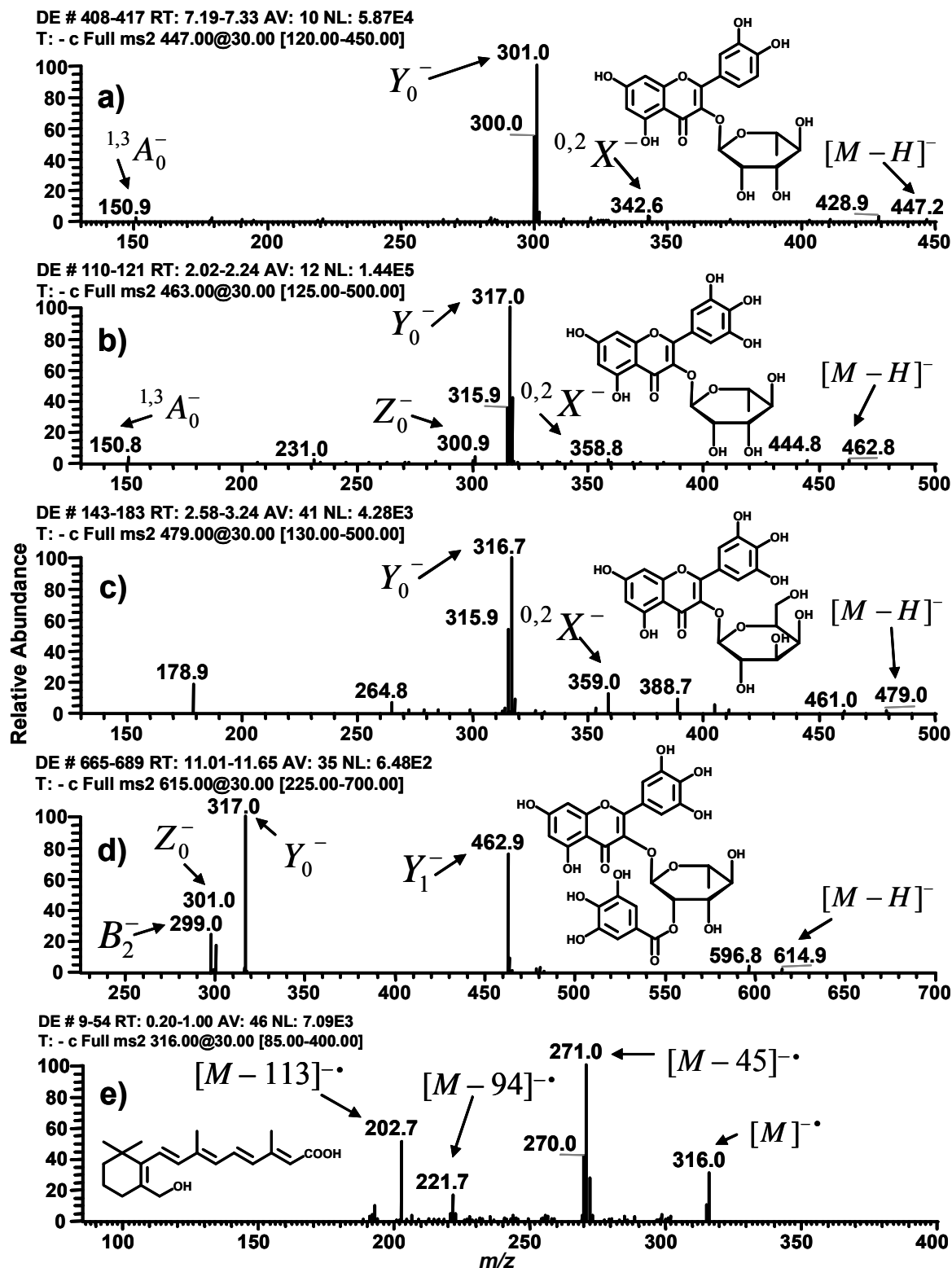


Figure 5. Second-generation product ion spectra obtained for the main precursor ions produced in the ESI-MS experiment and the proposed corresponding fragmentations. For peak assignments see Fig. 6.

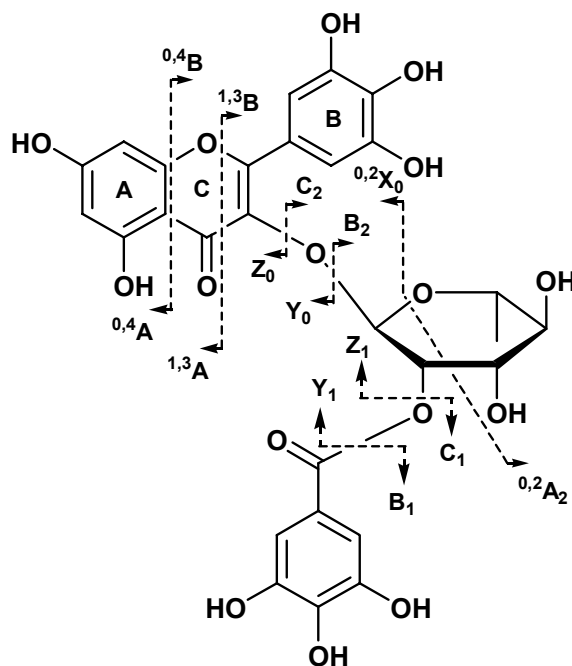


Figure 6. Ion nomenclature adopted for flavonoid glycoside fragmentation (illustrated on myricetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside).