

Jacqueline Pereira Vistuba

**Desenvolvimento de métodos analíticos em GC-FID, CE-UV e LC-MS/MS no estudo fitoquímico de triterpenos, flavonóis e taninos voltado para a obtenção de uma nova cultivar de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Química na Área de concentração de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Ana Carolina de Oliveira Costa

Florianópolis, SC  
2014

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vistuba, Jacqueline Pereira  
Desenvolvimento de métodos analíticos em GC-PID, CE-UV e  
LC-MS/MS no estudo fitoquímico de triterpenos, flavonóis e  
taninos voltado para a obtenção de uma nova cultivar de  
Maytenus ilicifolia (Espinheira-Santa) / Jacqueline  
Pereira Vistuba ; orientador, Gustavo Amadeu Micke ;  
coorientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
170 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. métodos de separação. 3. metabólitos  
secundários. 4. acúleos. 5. Maytenus ilicifolia. I. Micke,  
Gustavo Amadeu. II. Oliveira Costa, Ana Carolina de. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Química. IV. Título.

Jacqueline Pereira Vistuba

**Desenvolvimento de métodos analíticos em GC-FID, CE-UV e LC-MS/MS no estudo fitoquímico de triterpenos, flavonóis e taninos voltado para a obtenção de uma nova cultivar de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-Santa)**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química, com ênfase em Química Analítica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 24 de outubro de 2014.

---

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.  
Coordenador do Programa

**Banca examinadora:**

---

Prof. Gustavo A. Micke, Dr.  
Orientador  
(DQ-UFSC)

---

Profa. Ana Carolina O. Costa, Dra.  
Co-orientadora  
(CAL-UFSC)

---

Prof. Marcone A. L. de Oliveira, Dr.  
(DQ – UFJF)



---

Prof. Fernando G. Tonin, Dr.  
(FZEA – USP)

---

Profa. Cristiane L. Jost, Dra.  
(DQ – UFSC)

---

Profa. Tatiane de A. Maranhão, Dra.  
(DQ – UFSC)

---

Prof. Eduardo C. da Rocha, Dr.  
(DQ – UFSC)



**“O êxito da vida não se mede por aquilo conquistado,  
mas pelas dificuldades superadas no caminho.”**  
**Abraham Lincoln**





## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportuniades que Ele me deu e por estar sempre mostrando o melhor caminho a seguir.

Aos meus avós Leordette Pereira, José Pereira (*in memoriam*) e Sibilla Vistuba (*in memoriam*) por serem exemplo e os melhores avós do mundo.

Aos meus familiares, principalmente, a minha mãe, Josimari, ao meu pai, Alcino e a meu irmão José Antônio, por todo o amor e incentivo.

Ao meu namorado, Luciano Vitali, pelo companheirismo, amizade, amor, compreensão e por toda alegria que sinto quando estou com você.

Aos professores, Dr. Gustavo A. Micke e Dra. Ana Carolina O. Costa, por toda amizade, orientação e contribuições.

Aos professores Dr. Marcone A. L. de Oliveira, Dr. Fernando G. Tonin, Dra. Cristiane L. Jost, Dra. Tatiane de A. Maranhão e Dr. Eduardo C. da Rocha, por terem aceitado fazer parte da banca examinadora e por todas as sugestões.

Ao professor Dr. Ervim Lenzi, que abriu as portas do seu laboratório e me deu a oportunidade de realizar a minha iniciação científica.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-graduação em Química, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela oportunidade e apoio financeiro.

Agradeço ao Jadir Carminatti e a Graça Höeller pelos auxílios prestados.

Agradeço a minhas queridas amigas de longa data, Larissa V. Bruno, Danielli Alves, Lídia B. S. Soares, Fabiana Cavalcante, Maiana Muricy que mostram que apesar da distância, existem amizades verdadeiras e para sempre!

Agradeço aos amigos que fiz nestes últimos quatro anos, Mônia Azevedo, Maressa Dolzan, Michelle Barcellos, Daniel Spudeit, Andressa Vales e Melina Heller, que ajudaram de forma direta e indireta para a realização deste sonho.



## RESUMO

Esta tese tem como proposta principal o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de três subclasses de metabólitos secundários (triterpenos, flavonóis e taninos), presentes em 111 indivíduos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) contidos em um Banco Ativo de Germoplasma (BAG). A determinação dos triterpenos, friedelan-3-ol e friedelin, em extratos de *M. ilicifolia*, foi realizada em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*) e teve como principal objetivo, aumentar a frequência instrumental empregando, pela primeira vez, injeções múltiplas em uma única corrida (MISER, do inglês *multiple injections in a single experimental run*). Foi possível realizar três injeções de indivíduos diferentes dos extratos de *M. ilicifolia* em uma mesma corrida, utilizando o método com MISER, cujo tempo de análise foi inferior a dez minutos. Observou-se um aumento na frequência instrumental com um fator de 2,5 vezes quando comparado com o método de injeção simples. Este método empregando MISER apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros de validação e a concentração de friedelan-3-ol variou entre 2,8-3,7 mg g<sup>-1</sup> e para friedelin entre 2,3-2,5 mg g<sup>-1</sup>. A determinação de flavonóis com o auxílio do planejamento de experimentos (DOE, do inglês *design of experiment*) foi realizada em um eletroforese capilar de zona com detector de ultravioleta-visível (CZE-UV/Vis, do inglês *capillary zone electrophoresis with ultraviolet-visible detector*). O método mostrou-se eficiente para a separação dos analitos com um tempo de análise inferior a três minutos. O emprego do DOE permitiu otimizar os procedimentos de preparo de amostra e de separação eletroforética. Os parâmetros de validação do método demonstraram bons resultados, e pela primeira vez, a determinação dos flavonóis glicosilados a partir das agliconas, quercetina e canferol, permitiu avaliar as diferentes concentrações dos flavonóis em distintos indivíduos de *M. ilicifolia*, cujas concentrações variaram entre 0,29-0,33 mg g<sup>-1</sup> para o canferol e 0,25 – 0,32 mg g<sup>-1</sup> para a quercetina. A avaliação qualitativa dos taninos presentes em diferentes indivíduos de *M. ilicifolia* foi realizada utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em “tandem” (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry detector*), a qual permitiu identificar 13 analitos quando comparados com dados apresentados na literatura. A fim de quantificar

estes compostos, utilizou-se o método espectrofotométrico da vanilina e a concentração dos taninos nos diferentes indivíduos analisados variou entre 7,7 a 11,6 mg g<sup>-1</sup>. Os métodos desenvolvidos permitiram avaliar uma grande quantidade de amostras de *M. ilicifolia*, as quais foram submetidas às mesmas condições ambientais (climáticas e geográficas). Este trabalho permitiu ainda avaliar que os diferentes metabólitos secundários presentes em extratos de folhas de *M. ilicifolia* não apresentavam correlação com a morfologia foliar quanto à presença de acúleos (espinhos), facilitando a escolha de espécies para o desenvolvimento de uma nova cultivar.

**Palavras-chave:** friedelan-3-ol, friedelin, MISER, GC-FID, canferol, quercetina, DOE, CZE-UV, taninos, LC-MS/MS, acúleos

## ABSTRACT

This thesis is mainly aimed at the development of new analytical methods for the determination of three subclasses of secondary metabolites (triterpenes, flavonols, and tannins) present in 111 different individuals from *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) contained in an active germplasm bank (BAG). The determination of triterpenes, friedelan-3-ol and friedelin, in extracts of *M. ilicifolia* were performed on a gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID) and aimed to increase the frequency employing instrumental, for the first time, multiple injections in a single run (MISER). It was possible to perform three different injections of extracts of *M. ilicifolia* in the same run, using the method with MISER, whose analysis time was less than ten minutes. There was an increase in instrumental frequency by a factor of 2.5 times when compared to the single injection method. MISER employing this method has produced satisfactory results for the validation parameters and the concentration of friedelan-3-ol ranged from 2.8 to 3.7 mg g<sup>-1</sup> and friedelin between 2.3-2.5 mg g<sup>-1</sup>. The determination of flavonols with assistance from design of experiments (DOE) was performed on a capillary zone electrophoresis with UV-Visible detector (CZE-UV/VIS). The method proved to be efficient for the separation of analytes with a analysis time of less than three minutes. The uses of DOE allowed optimize procedures for sample preparation and electrophoretic separation. The validation parameters of the method showed good results and the determination of flavonol glycosides from the aglycones, quercetin and kaempferol, allowed to study different concentrations of flavonols in different individuals of *M. ilicifolia*, whose concentrations ranged from 0.29 to 0.33 mg g<sup>-1</sup> for kaempferol and 0.25 to 0.32 mg g<sup>-1</sup> for quercetin. Qualitative evaluation of tannins present in different individuals from *M. ilicifolia* was performed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in "tandem" (LC-MS/MS), which allowed the identification of 13 analytes as compared to data shown in literature. In order to quantify these compounds, it was used the spectrophotometric method vanillin and tannin concentration subjects ranged from 7.7 to 11.6 mg g<sup>-1</sup>. The developed methods allowed evaluating a large number of samples of *M. ilicifolia*, which were subjected to the same environmental conditions (climate and geography). This study allowed evaluating the secondary metabolites present in extracts of leaves of *M. ilicifolia*

showed no correlation with the leaf morphology and the presence of thorns, facilitating the choice of the species for the development of a new cultivar.

**Key-words:** friedelan-3-ol, friedelin, MISER, GC-FID, kaempferol, quercetin, DOE, CZE-UV, tannin, LC-MS/MS, thorns

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	29
Figura 1.2. Biossíntese dos compostos terpênicos a partir do ácido mevalênico. Os números 1X, 2X e 3X indicam as unidades de IPP. ....	32
Figura 1.3. Triterpenos encontrados na planta <i>M. ilicifolia</i> (a) friedelin e (b) friedelan-3-ol. ....	34
Figura 1.4. Rota biossintética para a origem de diferentes classes de compostos fenólicos. ....	35
Figura 1.5. Estrutura base dos flavonoides e sua numeração.....	37
Figura 1.6. Estrutura dos flavonóis majoritários na <i>M. ilicifolia</i> . (a) canferol e (b) quercetina.....	38
Figura 1.7. Taninos condensados encontrados na <i>M. ilicifolia</i> . (a) epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (procianidina B <sub>1</sub> ); (b) epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina B <sub>2</sub> ).....	39
Figura 2. 1 (a) Cromatograma de uma solução padrão (50 mg L <sup>-1</sup> ) de friedelan-3-ol e friedelin, e (b) cromatograma de um extrato das folhas de <i>M. ilicifolia</i> . Condições experimentais: modo de injeção simples, temperatura do injetor 280°C, modo split (1:90), fluxo de 1,5 mL min <sup>-1</sup> , temperatura do forno 300°C (isoterma), FID: 320°C. Legenda: 1 - friedelan-3-ol (t <sub>1</sub> = 8,76 min), 2 - friedelin (t <sub>2</sub> = 9,19 min); D* - Desconhecido (t <sub>D</sub> = 8,47 min); tr <sub>A1</sub> - tempo de retenção do primeiro analito; tr <sub>An</sub> – tempo de retenção do último analito; tr <sub>interf 1</sub> - o tempo de retenção do primeiro pico de interferência.....	62
Figura 2. 2 Etapas que envolvem o processo de injeção múltipla no GC-FID. Círculo branco interno indica o número de métodos programados no software do equipamento para o desenvolvimento do modo MISER. Círculo externo indica as etapas de cada método sequencial desenvolvido.....	67
Figura 2. 3 Cromatograma do método analítico empregando o modo MISER para a separação dos triterpenos friedelan-3-ol e friedelin no extrato das folhas de <i>M. ilicifolia</i> . Condições experimentais: injeções múltiplas com um tempo de	

espera de 0,6 min entre injeções; temperatura do injector 280°C, modo *split* (1:90), taxa de fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno 300°C (isoterma), FID: 320°C. Legenda: 1 - friedelan-3-ol; 2 - friedelin; D\* - Desconhecido. ....68

Figura 2. 4 Avaliação do procedimento de extração dos triterpenos da *M. ilicifolia*. Variação de tempo de extração dos compostos friedelan-3-ol e friedelin (concentração total, mg g<sup>-1</sup>) com o auxílio de ultrassom a temperatura 25 °C e a 60 °C.....70

Figura 2. 5 Cromatograma com a injeção de três segmentos de amostra, representando três indivíduos diferentes de *M. ilicifolia*. ....76

Figura 2. 6 Concentração dos triterpenos friedelan-3-ol (a) e friedelin (b) em relação aos grupos de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*.....77

Figura 3. 1 Resposta do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central, para escolha do eletrólito de corrida, variando as concentrações de TBS e MeOH. Outras condições de separação: injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 s; tensão, 30 kV, polaridade positiva; capilar, 48,5 cm (L<sub>tot</sub>), 40 cm (L<sub>det</sub>); temperatura, 25°C.....101

Figura 3. 2 Eletroferograma de um extrato da planta *M. ilicifolia*. Condições de separação: injeção hidrodinâmica, 50 mbar, 3 s; tensão, 30 kV, polaridade positiva; eletrólito de corrida, TBS 20 mmol L<sup>-1</sup>, MeOH 20%; capilar, 48,5 cm (L<sub>tot</sub>) 40 cm (L<sub>det</sub>); pH 9,5; temperatura, 25°C; λ, 390 nm.....102

Figura 3. 3 Eletroferograma de um extrato da planta *M. ilicifolia*. Condições de separação: injeção hidrodinâmica, 50 mbar, 3 s (amostra) + 50 mbar, 5 s (água desionizada); tensão, 30 kV, polaridade positiva; eletrólito de corrida, TBS 20 mmol L<sup>-1</sup>, MeOH 20 %; capilar, 32 cm (L<sub>tot</sub>) 23,5 cm (L<sub>det</sub>); pH 9,5; Temperatura, 25 °C; λ, 390 nm. (a) extrato hidroalcoólico hidrolisado; (b) mistura dos padrões canferol e quercetina (50 mg L<sup>-1</sup>); (c) adição de padrões de canferol e quercetina no extrato hidroalcoólico hidrolisado. ....105

Figura 3. 4 Gráfico de cubo relacionando a resposta da análise do planejamento fatorial para a hidrólise ácida, cujo produto final é concentração total de agliconas (canferol e quercetina) em mg g<sup>-1</sup>. Parâmetros avaliados: T = 80 a 110 °C; [HCl] = 0,4 a 1,2 mol L<sup>-1</sup> e tempo = 20 a 80 minutos.....107



- Figura 3. 5 Avaliação univariada para hidrólise ácida, mantendo-se temperatura (110 °C) e concentração de ácido (HCl=1,2 mol L<sup>-1</sup>) constantes e variando o tempo de aquecimento de 5 a 30 minutos. .... 108
- Figura 3. 6 Estudo do efeito do pH na concentração dos flavonóis (a) canferol e (b) quercetina em função do tempo. .... 110
- Figura 3. 7 Estudo da extração dos flavonóis mantendo-se a temperatura a 25°C e variando MeOH (20 - 100 %, v/v) e o tempo de sonicação de 2 a 30 minutos. .... 111
- Figura 3. 8 Concentração de Canferol (a) e Quercetina (b) em relação aos grupos de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*..... 118
- Figura 4. 1 Cromatograma do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. ilicifolia*. Condições cromatográficas: coluna Gemini NX C-18 (250 mm x d.i. 4.6 mm x 5 µm); Fase móvel: (A) água desionizada em ácido fórmico pH 3,6 e (B) ACN:H<sub>2</sub>O (95:5). (A) 85% e 15% (B) por 10 min; 45% (A) e 55% (B) por 15 min; em 1 min, variou-se o gradiente para 5% (A) e 95% (B) e manteve-se por 4 min. O fluxo da fase móvel foi de 500 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 30°C..... 138
- Figura 4. 2 Área relativa dos taninos em relação aos grupos de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*..... 141
- Figura 4. 3 Variação das concentrações de taninos nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. ilicifolia* em função dos diferentes grupos..... 145



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1 Alguns métodos analíticos de separação para a determinação de metabólitos secundários em <i>Maytenus spp.</i> .....	41
Tabela 2. 1 Parâmetros das curvas de calibração externa das soluções padrão de friedelan-3-ol e friedelin utilizando modo MISER. ....	72
Tabela 2. 2 Resultados dos ensaios de recuperação dos analitos friedelan-3-ol e friedelin do extrato de <i>M. ilicifolia</i> usando o modo MISER. ....	73
Tabela 2. 3 Avaliação da adequabilidade do sistema para a determinação de friedelan-3-ol e friedelin utilizando o modo MISER. ....	75
Tabela 2. 4 Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de <i>M. ilicifolia</i> em função da concentração de friedelan-3-ol e friedelin.....	79
Tabela 2. 5 Comparação entre o método proposto com outros métodos da literatura na determinação de friedelan-3-ol e friedelin. ....	81
Tabela 3. 1 Planejamento fatorial $2^2$ como ponto central para o eletrólito de corrida.....	96
Tabela 3. 2 Fatorial $2^3$ com ponto central para hidrólise ácida. ....	97
Tabela 3. 3 Dados do planejamento fatorial $2^2$ com ponto central para a escolha da composição do BGE em função do número de picos.....	100
Tabela 3. 4 Concentração total de agliconas a partir do planejamento fatorial $2^3$ com ponto central para o procedimento de hidrólise. ....	106
Tabela 3. 5 Valores obtidos para os coeficientes, erro padrão, teste-t e p-valores a partir do planejamento fatorial $2^3$ .....	107
Tabela 3. 6 Parâmetros das curvas de calibração externa das soluções padrão de canferol e quercetina.....	113
Tabela 3. 7 Resultados dos ensaios de recuperação dos analitos canferol e quercetina do extrato de <i>M. ilicifolia</i> usando o método proposto. ....	114

Tabela 3. 8 Avaliação de parâmetros do método proposto para a determinação de canferol e quercetina..... 116

Tabela 3. 9 Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da concentração de canferol e quercetina. .... 120

Tabela 4. 1 Compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. ilicifolia* determinados a partir das análises em LC-MS/MS utilizando o modo negativo de ionização. .... 140

Tabela 4. 2 Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da área dos taninos..... 143

Tabela 4. 3 Parâmetros da curva de calibração externa da solução padrão de catequina..... 144

Tabela 4. 4 Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da área dos taninos..... 146

## LISTA DE ABREVIATURAS E SILGAS

- ANOVA - análise de variância  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BAG – Banco Ativo de Germoplasma  
BGE - eletrólito de corrida (do inglês, “*background eletrolyte*”)  
CV – coeficiente de variação  
CZE-UV/Vis – eletroforese capilar de zona com detector de ultravioleta-visível  
(do inglês *capillary electrophoresis with ultraviolet-visible detector*)  
DOE - planejamento de experimentos (do inglês, *design of experiment*)  
EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
GC – cromatografia gasosa (do inglês, *gas chromatography*)  
GC-FID - cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (do inglês, *gas chromatography with flame ionization detector*)  
GC-MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês, *gas chromatography with mass spectrometry detector*)  
HPLC-MS - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa (do inglês, *high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry*)  
HPLC-UV/Vis - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível (do inglês, *high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector*)  
HTGC-FID – cromatografia gasosa capilar de alta temperatura com detector de ionização em chama (do inglês, *high temperature capillary gas chromatography*)  
ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use  
LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetria de massas em “tandem” (do inglês, *liquid chromatography – tandem mass spectrometry*)  
LD – Limite de detecção  
LQ – Limite de quantificação  
MISER - injeção múltipla em uma única corrida (do inglês, *multiple injection in a single experimental run*)  
MRM - monitoramento de reações múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring*)  
PI – padrão interno  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RMN <sup>13</sup>C – ressonância magnética nuclear de carbono  
RMN <sup>1</sup>H – ressonância magnética de hidrogênio  
rpm – rotações por minuto

SPE - extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*)

TBS - tetraborato de sódio

TRIS - tris(hidroximetil)aminometano

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>29</b>
2.1 MAYTENUS ILICIFOLIA .....	29
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	30
2.2.1 Terpenos.....	31
2.2.1.1 Triterpenos.....	32
2.2.2 Compostos Fenólicos.....	34
2.2.2.1 Flavonóis.....	36
2.2.2.2 Taninos.....	38
2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	40
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DOS TRITERPENOS FRIEDELIN E FRIEDELAN-3- OL EM FOLHAS DE M. ILICIFOLIA POR CROMATOGRAFIA GASOSA USANDO INJEÇÕES MÚLTIPLAS.....</b>	<b>51</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	55
<b>3 EXPERIMENTAL.....</b>	<b>57</b>
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES .....	57
3.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	57
3.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS TRITERPENOS NAS AMOSTRAS DE M. ILICIFOLIA .....	57
3.3.1 Preparação do extrato hexânico.....	58
3.3.2 Avaliação dos volumes de extrato hexânico e clorofórmio para o procedimento de clean up utilizando cartucho de SPE Florisil® .....	58
3.3.3 Isolamento e caracterização do pico desconhecido.....	59

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>61</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO.....	61
4.1.1 <i>Modo MISER</i> .....	64
4.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS TRITERPENOS NAS AMOSTRAS DE <i>M. ILICIFOLIA</i> .....	69
4.2.1 <i>Preparação do extrato hexânico</i> .....	69
4.2.2 <i>Avaliação dos volumes de extrato hexânico e clorofórmio para o         procedimento de clean up utilizando extração em fase sólida</i> .....	70
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO MISER.....	71
4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	76
4.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM ALGUNS MÉTODOS DA LITERATURA.....	80
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIS EM <i>M. ILICIFOLIA</i> POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA UTILIZANDO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....</b>	<b>89</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>93</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	93
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	93
<b>3 EXPERIMENTAL.....</b>	<b>95</b>
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	95
3.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	95
3.3 PREPARO DE AMOSTRA.....	96
3.3.1 <i>Planejamento de experimentos</i> .....	96
3.3.1.1 <i>Composição do BGE para a separação dos flavonóis             glicosilados</i> .....	96
3.3.1.2 <i>Hidrólise ácida dos flavonóis glicosilados</i> .....	97
3.3.2 <i>Procedimento de extração</i> .....	98
3.3.3 <i>Estudo de estabilidade das agliconas</i> .....	98



<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>99</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO.....	99
4.1.1 <i>Composição do BGE para a separação dos flavonóis glicosilados utilizando planejamento de experimentos.....</i>	<i>99</i>
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	103
4.2.1 <i>Otimização do procedimento de hidrólise ácida dos flavonóis utilizando planejamento de experimentos.....</i>	<i>103</i>
4.2.2 <i>Estudo da estabilidade do pH nos flavonóis após a hidrólise ácida.....</i>	<i>109</i>
4.2.3 <i>Extração dos flavonóis.....</i>	<i>110</i>
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	112
4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	117
4.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM ALGUNS MÉTODOS DA LITERATURA.....	121
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>124</b>
<b>CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE TANINOS EM FOLHAS DE <i>M. ILICIFOLIA</i> POR LC-MS/MS E QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....</b>	<b>131</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>133</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	133
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	133
<b>3 EXPERIMENTAL.....</b>	<b>135</b>
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	135
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO LC-MS/MS.....	135
3.3 INSTRUMENTAÇÃO.....	135
3.4 MÉTODO DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS.....	136
3.5 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA VANILINA.....	136
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>137</b>

4.1 MÉTODO DE SEPARAÇÃO POR LC-MS/MS PARA ANÁLISE DE TANINOS .....	137
4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	141
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>149</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>150</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERPECTIVAS .....</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO E.....</b>	<b>169</b>

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma grande diversidade de plantas medicinais em sua flora, sendo uma das fontes mais ricas de material com atividade farmacológica comprovada, a qual é muito utilizada na medicina popular. Além disso, é uma excelente matéria-prima para o mercado farmacêutico.

Conforme o artigo 2, inciso XVI, da Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define-se “planta medicinal” como sendo uma “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos” (BRASIL, 2010).

O desenvolvimento de pesquisas na área de plantas medicinais tem aumentado nos últimos anos, pois, além de apresentar menor custo de obtenção, são menos severos quando comparados aos medicamentos sintéticos (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005). O potencial terapêutico das plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e cumarinas já foram comprovados em diversos ensaios pré-clínicos com animais (MAIORANO et al., 2005; RUDNICKI et al., 2007; CRESTANI et al., 2009). Nesse contexto, a Presidência da República assinou o Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, referente à “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, que visa o incentivo à pesquisa e desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, valorizando a biodiversidade do país (BRASIL, 2006).

Um exemplo de planta medicinal que vem sendo estudada é a *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como espinheira-santa devido à presença de acúleos foliares (espinhos) e sua propriedade medicinal gastroprotetora. Esta planta é nativa da região sul do Brasil e atualmente foi eleita pelo Governo do Estado de Santa Catarina mediante a Lei nº 15.674, de 15 de dezembro de 2011, como planta medicinal símbolo do Estado (SANTA CATARINA, 2011).

A crescente exploração de plantas em populações nativas desta espécie, sem critérios de manejo adequados, pode acabar promovendo a perda na variabilidade genética. Desse modo, faz-se necessário a geração de critérios técnico-científicos para o manejo sustentável dessas populações, uma vez que seu cultivo visaria o aproveitamento econômi-

co, inclusive como matéria-prima para a indústria de medicamentos fitoterápicos (YARIWAKE et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010).

A presença de diversos acúleos nas folhas da *M. ilicifolia* dificulta a colheita e o seu manuseio, o que também promove o extrativismo de forma errônea e destrutiva. Isso não está apenas ameaçando a extinção da espécie, como oportuniza a colheita de espécies inócuas ou tóxicas, tais como, *Maytenus aquifolium*, *Maytenus obtusifolia*, *Maytenus robusta*, *Maytenus imbricata*, *Zollernia ilicifolia*, entre outras muito semelhantes à *M. ilicifolia* (GONZALEZ et al., 2001; DE ANDRADE et al., 2007; DE SOUZA e SILVA et al., 2007). Desta forma, estudos estão sendo realizados a fim de se produzir uma nova cultivar de *M. ilicifolia* desprovida ou com menor quantidade de acúleos, para que seja de fácil manuseio, estimulando o cultivo como importante fonte de renda e consequentemente redução do extrativismo atual.

O projeto de pesquisa intitulado “Seleção de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) rica em princípios bioativos e atenuada de acúleos foliares para viabilizar o cultivo de variedades de fácil colheita” coordenado pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) – Estação Experimental de Itajaí, SC, em parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, tem como principal objetivo caracterizar cada indivíduo de *M. ilicifolia* desprovida dos acúleos foliares, mas plena dos princípios bioativos requeridos da espécie, para lançamento de uma nova cultivar. A EPAGRI apresenta um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *M. ilicifolia* e este projeto vigente ampliará o campo para estudos de melhoramento genético da espécie. Tal obtenção permitirá a expansão do cultivo de espinheira-santa, substituindo a prática do extrativismo; garantia de renda à propriedade rural; salvamento da espécie botânica e padronização da matéria-prima utilizada na indústria farmacêutica com consequente valorização do produto. Contudo, é necessário o monitoramento de compostos marcadores desta nova cultivar a fim de verificar se as propriedades da mesma correspondem a planta nativa.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Maytenus ilicifolia*

A diversidade de plantas presentes no Brasil, em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas, permite o estudo de seus princípios ativos no tratamento de algumas doenças bem como o desenvolvimento de novos fármacos. Um caso representativo são as plantas da família Celastraceae, que apresenta uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como, antirreumática, antitumoral, anti-ulcerogênica e anti-inflamatória (PESSUTO et al., 2009; MOSSI et al., 2010).

Segundo Carvalho-Okano (1992), o gênero *Maytenus* (representante da família Celastraceae) é constituído por 225 espécies e está representado, no Brasil, por 77 espécies e 14 variedades, incluindo representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos. A *M. ilicifolia* está enquadrada na seção *Oxyphylla*, cuja característica é a presença de acúleos no bordo foliar e muitas vezes pode ser confundida com *M. aquifolium*, cujo nome comum também é espinheira-santa, a diferença da primeira espécie em relação a segunda ocorre pela presença de estrias longitudinais em seus ramos (DE MAGALHÃES, 2002; MARIOT; BARBIERI, 2007). A Figura 1.1 ilustra os ramos da *M. ilicifolia*, bem como os detalhes do bordo foliar contendo os acúleos.

**Figura 1.1** *Maytenus ilicifolia*



Fonte: Banco Ativo de Germoplasma (EPAGRI, Itajaí-SC).

O valor terapêutico da *M. ilicifolia* é atribuído aos metabólitos secundários, especificamente os triterpenos (friedelin e friedelan-3-ol), os quais são considerados marcadores químicos (VILEGAS; LANÇAS; CERVI, 1994), bem como aos polifenóis (flavonóis e taninos), compostos muito estudados e relacionados à atividade antioxidante da planta (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009; NEGRI; POSSAMAI; NAKASHIMA, 2009). Um estudo realizado por Cipriani et al. (2009) concluiu que o ácido poligalacturônico presente na *M. ilicifolia* também apresentou ação antiulcerogênica. Jorge et al. (2004) também avaliaram a atividade antiulcerogênica e anti-inflamatória a partir dos extratos hexânico e de acetato de etila de *M. ilicifolia* e obtiveram os triterpenos friedelan-3-ona e friedelan-3 $\beta$ -ol e ainda alguns taninos condensados e flavonóides como princípios ativos, respectivamente. Já Baggio et al. (2007) observaram que as frações etanólicas ricas em flavonóides (catequina e epicatequina) de espinheira-santa proporcionaram bons resultados na redução de úlcera gástrica.

## 2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo de uma planta compreende um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células, podendo ser classificado como primário, o qual ocorre em todas as plantas, cujas reações envolvem aminoácidos, lipídeos e carboidratos; e o metabolismo secundário, com reações químicas diferenciadas, características e intrínsecas de acordo com a espécie (DOS SANTOS, 2010).

Os metabólitos secundários tem uma importante função biológica, atuam no mecanismo de polinização e defesa contra predadores e doenças agindo como antibióticos, antifúngicos e antivirais, a fim de proteger as plantas de agentes patogênicos e na defesa contra o estresse abiótico, isto é, à exposição a radiação ultravioleta. Além de defesa química e física, algumas plantas usam as características mecânicas e morfológicas para a proteção, tais como os acúleos e pêlos urticantes (CUNICO et al., 2002; WINK, 2006; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). Muitos desses compostos podem apresentar propriedades terapêuticas sendo denominados de princípios ativos, os quais são empregados em produtos farmacológicos. Além disso, vários metabólitos secundários, tais como, alcalóides, antocianinas, flavonoides, quinonas, lignanas, esteróides e terpenóides têm sido

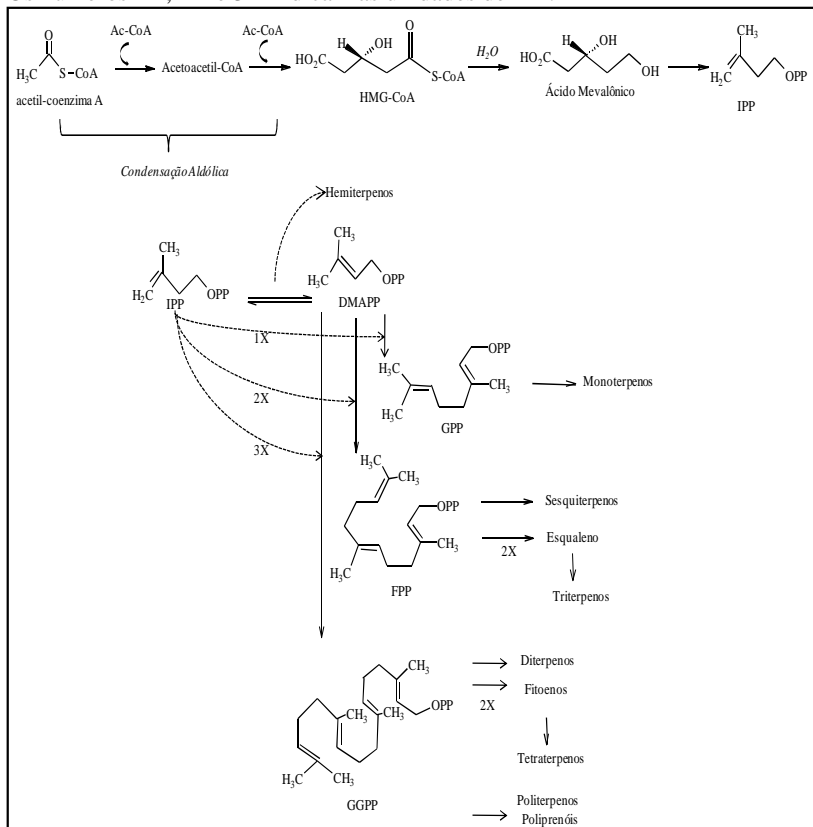
empregado na indústria de corantes, aromas e fragâncias. (VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002; FUMAGALI et al., 2008).

### 2.2.1 Terpenos

Os principais grupos de metabólitos secundários, das plantas em geral, são os compostos terpênicos, fenólicos e os compostos contendo enxofre e nitrogênio, sendo que o primeiro compõe a maior classe dos metabólitos secundários.

Os compostos terpênicos comumente se encontram na forma de hidrocarbonetos cíclicos, podendo possuir ou não insaturações. A nomenclatura dos terpenos depende do número de carbonos presentes em sua estrutura, os quais podem ser divididos nas seguintes subclasses: monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e politerpenos ( $(C_5)_n$ ). A biossíntese dos compostos terpênicos pode ser observada na Figura 1.2, onde a partir da condensação aldólica de acetil-coenzima A com acetoacetil-CoA obtém-se o intermediário 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que sofre uma hidrólise formando o ácido mevalônico. Este último é convertido em isopentenil pirofosfato (IPP), que é a base da cadeia carbônica dos terpenos e esteróides. Esta molécula de IPP e seu isômero, o dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) formam o composto *trans* geranyl-pirofosfato (GPP), o qual origina os monoterpenos. Deste modo, é possível observar que a partir de duas unidades de IPP se obtém o composto farnesil-pirofosfato (FPP), intermediário dos sesquiterpenos, esqualenos e triterpenos. E ainda, com três unidades de IPP é possível obter o intermediário geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) precursor dos di, tetra e politerpenos (MC-GARVEY e CROTEAU, 1995; DE AGUIAR, 2003).

**Figura 1.2.** Biossíntese dos compostos terpênicos a partir do ácido mevalênico. Os números 1X, 2X e 3X indicam as unidades de IPP.



Fonte: adaptado de MCGARVEY; CROTEAU, 1995.

### 2.2.1.1 Triterpenos

Os triterpenos têm despertado um grande interesse em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, tais como: anticâncer, anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antioxidante e antiulcerogênico (JORGE et al., 2004; VELLOSA et al., 2006).

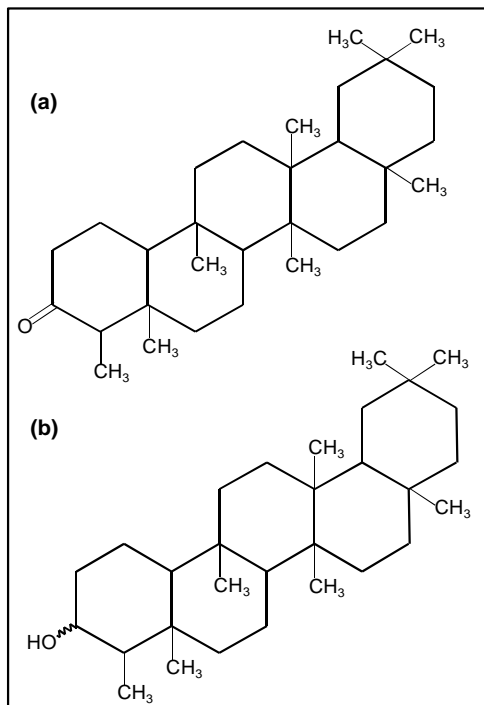
Estes compostos são sintetizados pelas plantas por meio dos precursores acíclicos de C<sub>30</sub> ou do esqualeno e são formados por enzi-



mas denominadas de terpenos sintases. Estes compostos são abundantes no reino vegetal e podem ser aplicados comercialmente em polímeros, fibras, colas e ceras (YIN, 2012).

Muitos triterpenos são tetracíclicos ou pentacíclicos, porém compostos acíclicos, mono, bi, tri e hexacíclicos já foram isolados. As características estruturais dos triterpenos estão relacionadas aos grupos os quais os triterpenos pertencem. Nas diferentes espécies de *Maytenus spp.*, encontram-se os friedelanos, oleananos, lupanos, taraxeranos e ursanos, muitos apresentam atividades farmacológicas, como antitumoral, antioxidante, espermicida e antiulcerogênica (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004; NUÑES et al., 2005). Destaque para a espécie *M. ilicifolia*, que segundo Vilegas, Lanças e Cervi (1994), os compostos friedelin e friedelan-3-ol, além de apresentarem atividade antiulcerogênica, são denominados os marcadores quimiotaxonômicos desta planta. Além destes triterpenos, Dos Santos et al. (2010) também encontraram os triterpenos quinonemetídeos maytenina e pristimerina. A Figura 1.3 apresenta a estrutura química dos principais triterpenos encontrados na *M. ilicifolia*.

**Figura 1.3.** Triterpenos encontrados na planta *M. ilicifolia* (a) friedelin e (b) friedelan-3-ol.



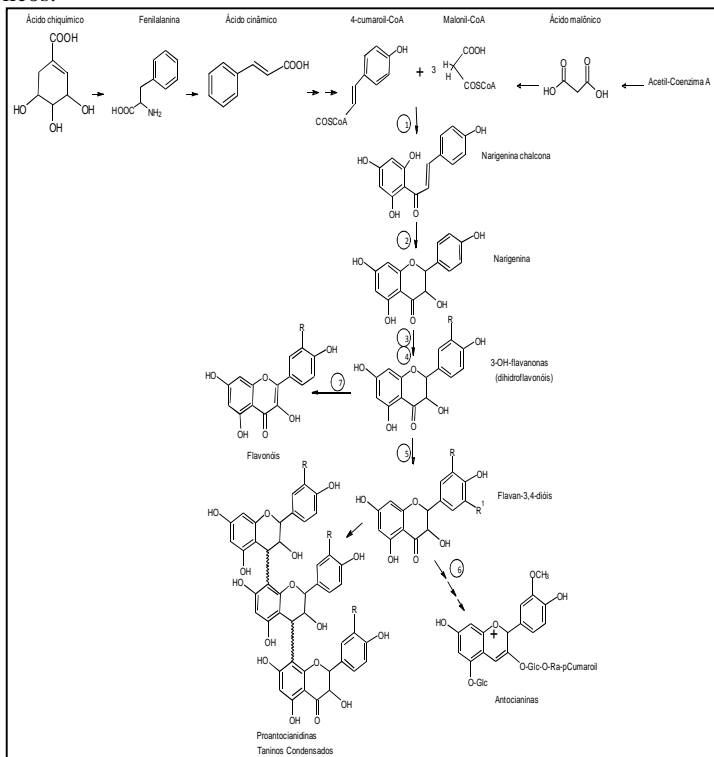
Fonte: Nossack et al., 2000.

### 2.2.2 Compostos Fenólicos

Outros compostos presentes em grande quantidade nas plantas medicinais são os polifenóis, que agem como antioxidantes atuando na defesa contra os radicais livres em doenças como as cardiovasculares, o câncer e outras doenças degenerativas. Do ponto de vista fisiológico para a planta, os compostos fenólicos atuam no crescimento, reprodução das plantas e, além disso, contribuem para as características sensoriais e coloração de frutas e vegetais. Os compostos fenólicos podem ser classificados como ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e flavonoides (BEHLING et al, 2004; BIESAGA, 2011).

A Figura 1.4 ilustra a rota biossintética para a obtenção de algumas classes de compostos fenólicos, os quais são formados por algumas reações enzimáticas.

**Figura 1.4.** Rota biossintética para a origem de diferentes classes de compostos fenólicos.



\* Os números sob as setas representam reações enzimáticas: 1-CHS (chalcona sintase); 2 – CHI (chalcona isomerase); 3 – F3H (flavonona-3-hidroxilase); 4 – F3'H (flavonoide-3-hidroxilase); 5 – FLS (flavonol sintase); 6 – DFR (dihidroflavonol redutase) e 7 – LDOX – leucoantocianidina dioxigense).

Fonte: adaptado de BURBULIS; WINKEL-SHIRLEY, 1999.

De maneira geral, a biossíntese de compostos fenólicos, tais como os flavonóis, flavanonas, taninos e antocianinas envolve a condensação de uma unidade de 4-cumaril-CoA e de três unidades de malonil-CoA. O produto desta reação é a naringenina chalcona, que sofre uma

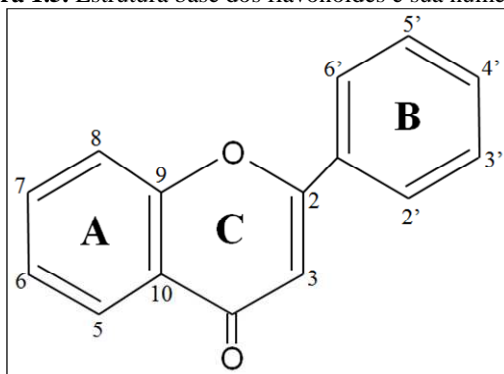
ciclização originando a narigenina. Com isso, a partir de reações de hidroxilação ou de seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos, entre outros) é possível obter diferentes classes de compostos fenólicos (JOHANN, 2003; ZUANAZZI e MONTANHA, 2010).

Uma importante classe dos compostos fenólicos é a classe dos flavonoides, os quais podem ser utilizados como marcadores quimiota-xonômicos, isto é, estão relacionados à especificidade em algumas espécies; e ainda, podem ser utilizados na determinação do parentesco de híbridos e em determinação de novas cultivares (MARKHAM, 1989). Dentro desta classe destacam-se duas subclasses: a dos flavonóis e taninos.

#### 2.2.2.1 *Flavonóis*

Os flavonóis são uma subclasse dos flavonoides, cuja estrutura molecular é derivada dos anéis benzo- $\gamma$ -pirona, na qual consiste na ligação entre os anéis fenólicos e pirona, conforme ilustra a Figura 1.5. Os flavonóis apresentam grupos hidroxila nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Dentre as substituições dos grupos hidroxilas podemos encontrar grupos metila, acetila, sulfatos ou grupos glicosídios, os quais são ligados por meio de uma ligação hemiacetal originada através da ligação *O*-glicosídeo (C-3), facilmente quebrada por uma hidrólise ácida ou *C*-glicosídeo (C-7). Várias são as moléculas de açúcar ligadas aos flavonóis, por exemplo, L-ramnose, D-glicose, glucoramnose, galactose, ou arabinose. Os flavonóis são denominados de flavonóis glicosilados quando esses contêm uma ou mais moléculas de açúcar (ou glicósidos, em caso de uma porção de glicose), ou ainda podem ser denominados de agliconas quando nenhum grupo açúcar está presente (HAVSTEEN, 2002; DANTULURI et al., 2005; RIJKE et al., 2006).

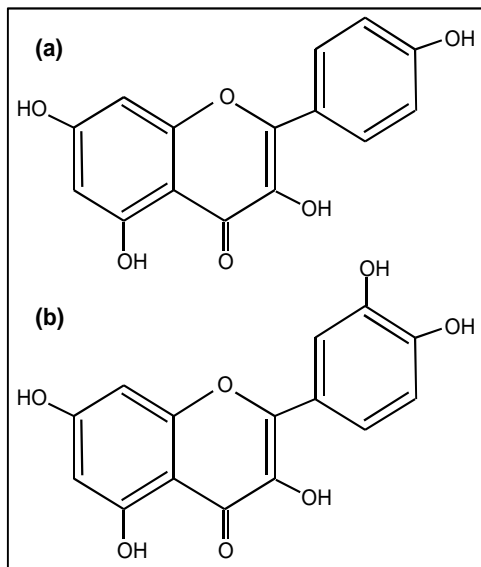
**Figura 1.5.** Estrutura base dos flavonoides e sua numeração.



Fonte: adaptado de ZUANAZZI; MONTANHA, 2010.

Os flavonóis majoritários encontrados na espécie de *M. ilicifolia* são os derivados mono-, di-, tri- e tetraglicosilados de quercetina, canferol e miricetina (TIBERTI et al, 2007; DE SOUZA et al. 2008a). Estudos mostram uma correlação entre as atividades anti-inflamatória e antiulcerogênica com a presença de flavonoides nos extratos das folhas de *M. ilicifolia* (JORGE et al., 2004). Assim como no estudo realizado por Leite et al (2010), que observaram a ação gastroprotetora do triglicósido flavonólico mauritanina e de um derivado tetraglicosilado de canferol. A Figura 1.6 ilustra a estrutura de dois flavonóis majoritários presentes na *M. ilicifolia*.

**Figura 1.6.** Estrutura dos flavonóis majoritários na *M. ilicifolia*. (a) canferol e (b) quercetina.



Fonte: DE SOUZA et al., 2008b.

### 2.2.2.2 Taninos

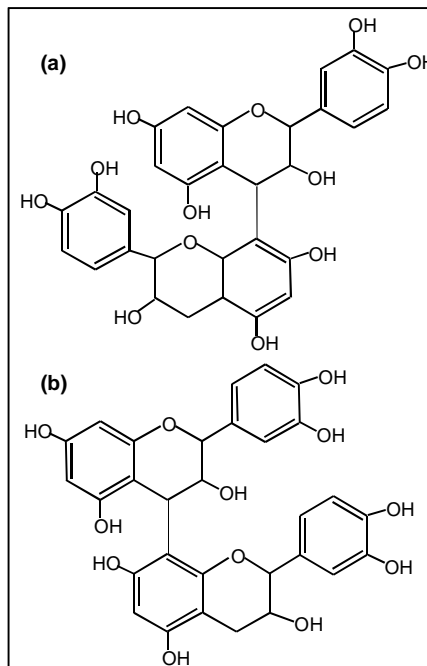
Os taninos são moléculas de elevada massa molar e também pertencem ao grupo dos flavonoides, e, assim como os flavonóis, estes possuem propriedades antioxidantes. Além disso, os taninos têm propriedades cicatrizantes, devido à sua capacidade para promover a precipitação de proteínas, o que dá origem a uma camada protetora que pode melhorar o processo regenerativo (DE SOUZA et al., 2008b).

Os taninos podem ser classificados como taninos condensados, os quais podem ser formados por cadeias oligoméricas ou poliméricas de unidades de flavan-3-ol, os quais são ligados entre os carbonos C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> (proantocianidinas). Estes taninos são mais encontrados nas plantas na forma de procianidinas, que são derivados da catequina e epicatequina e pode conter ligações de ésteres de ácido gálico. Estes compostos apresentam atividade antimicrobiana, antialérgica e antioxidante. Além disso, devido à presença de inúmeros grupos hidroxila, esses compostos têm a capacidade de formarem complexos com íons

metálicos, proteínas e polissacarídeos (ROMANI et al., 2006; AL-JABER; AWAAD; MOSES, 2011). Ou ainda, podem ser classificados como taninos hidrolisáveis, que são formados por carboidratos, geralmente D-glicose, cuja hidroxila pode estar esterificada com os grupos fenólicos do ácido elágico (elagitaninos) ou ácido gálico (galotaninos) (BOSSU et al., 2006).

O trabalho realizado por Pessuto et al (2009) apresentou um estudo sobre o potencial antioxidante da *M. ilicifolia* avaliando sua fração de acetato de etila e os resultados demonstraram que a sua capacidade antioxidante se deve também a presença dos taninos condensados epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (procianidina B<sub>1</sub>) e epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina B<sub>2</sub>). A estrutura destes taninos condensados pode ser observada na Figura 1.7.

**Figura 1.7.** Taninos condensados encontrados na *M. ilicifolia*. (a) epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (procianidina B<sub>1</sub>); (b) epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina B<sub>2</sub>).



Fonte: Pessuto et al., (2009).

### 2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A disponibilidade de métodos analíticos validados é de grande importância para a garantia e o controle da qualidade de fitoterápicos, e é exigido pelas autoridades sanitárias brasileiras para fins de registro. (BRASIL, 2004; NETTO et al., 2006).

Diversos métodos são descritos na literatura para análise de metabólitos secundários em diferentes plantas. Muitos dos métodos são complexos, laboriosos, e exigem uma demanda de recursos elevada. Mesmo assim, estes métodos já estabelecidos devem ser tomados como ponto de partida para a análise dos marcadores numa determinada planta. Contudo, ainda existe a necessidade de desenvolvimento de novos métodos para fins de monitoramento desses marcadores e avaliação da qualidade de plantas, que combinem a obtenção de resultados satisfatórios com procedimentos simplificados e de custo operacional reduzido. Dentre os métodos analíticos encontrados na literatura para a determinação destes marcadores, podemos citar alguns cromatográficos, eletroforéticos e espectrofotométricos, listados na Tabela 1. É importante ressaltar que todos serão abordados separadamente nos capítulos posteriores.



**Tabela 1. 1** Alguns métodos analíticos de separação para a determinação de metabóliso secundários em *Maytenus spp.*

PLANTA	ANALITOS	PREPARO DE AMOSTRA	TÉCNICA ANALÍTICA (tempo de análise)	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIA
<i>M. aquifolium</i>	Friedelin e Friedelan-3-ol	Extrato hexânico no ultrassom por 1 min); SPE (MgO-SiOH); Eluição com CHCl <sub>3</sub> .	HTGC-FID* (t=5 min)	Preparo de amostra simples; consumo excessivo de reagentes; análise instrumental rápida.	NOSSACK et al., 2000.
<i>M. ilicifolia</i>	Friedelin e Friedelan-3-ol	Extração por fluido supercrítico com CO <sub>2</sub> (t = 90 min).	GC-MS (t= 90 min)	Preparo de amostra sem degradação evidente, não tóxico; tempo de preparo e análise instrumental longos.	MOSSI et al., 2010
<i>M. ilicifolia</i>	Derivados de canferol e quercetina	Extrato hidrometanólico; maceração por 30 min a 50°C; extrato filtrado.	CE-UV/Vis* (t = 30 min)	Tempos de preparo de amostra e análise instrumental longos.	DIAGONE et al., 2012.
<i>M. ilicifolia</i>	Catequina e epicatequina	Extrato aquoso 10% (m/v); (t=15 min infusão).	HPLC-UV/Vis* (t=30 min)	Preparo de amostra simples; detectabilidade satisfatória; tempo de análise instrumental longo; baixa resolução.	SOARES et al., 2004.

\*HTGC-FID (do inglês, *high temperature capillary gas chromatography*); CE-UV/Vis (do inglês, *capillary electrophoresis with ultraviolet-visible detector*); HPLC-UV/Vis (do inglês, *high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector*);

Com isso, esta tese tem como proposta principal o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de três subclasses de metabólitos secundários (triterpenos, flavonóis e taninos), presentes em 111 indivíduos diferentes de *M. ilicifolia* contidos no BAG da EPAGRI de Iatajaí, SC. Estes metabólitos são considerados marcadores químicos importantes para o desenvolvimento de uma nova cultivar. Estas três subclasses são relevantes para a própria espécie, *M. ilicifolia*, uma vez que estão relacionados à sua autenticidade química, proteção contra a radiação ultravioleta e resistência a patógenos, além de apresentarem benefícios à saúde. Ainda, verificar se há correlação destes metabólitos com a presença de acúleos foliares.

## REFERÊNCIAS

- AL-JABER, N.A.; AWAAD, A. S.; MOSES, J. E. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 15, p. 293–307, 2011.
- BAGGIO, C. H. et al. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. **J. Ethnopharm.**, v. 123, p. 385–391, 2009.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **J. Chromatog. A**, v. 1218, p. 2505–2512, 2011.
- BOSSU, C. M.; et al. Flow injection system for hydrolysable tannin determination. **Microchem. J.**, v. 84, p. 88–92, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 48, Distrito Federal, 2004.
- BRASIL. Presidência da República. Decreto nº. 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
- BURBULIS, I. E.; WINKEL-SHIRLEY, B. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, n. 22, p. 12929–12934, 1999.

CARVALHO-OKANO, R. M. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico. 1992. 253p. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal), Universidade de Campinas, Campinas, 1992.

CIPRIANI, T. R. et al. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Carboh. Polym.**, v. 78, p. 361–363, 2009.

CRESTANI, S. et al. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. **Vasc. Pharm.**, v. 51, p. 57–63, 2009.

CUNICO, M. M. et al. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., Celastraceae. **R. Bras. Farmacog.**, v. 12, n. 2, p. 69-73, jul-dez 2002.

DANTULURI, M. et al. Capillary electrophoresis of highly sulfated flavanoids and flavonoids. **Analyt. Biochem.**, v. 336, p. 316–322, 2005.

DE AGUIAR, E. M. Isolamento e caracterização de óleos essenciais de piperáceas no vale do itajaí, santa catarina. 2003. 106 p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

DE ANDRADE, S. F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **J. Ethnopharm.**, v. 113, p. 252–257, 2007.

DE MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para o cultivo da Espinheira Santa, 2002. Disponível em:

<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm>

Acessado em: 17 de março de 2014.

DE SOUZA E SILVA, S. R. et al. Uncoupling and inhibition properties of 3,4-seco-friedelan-3-oic acid isolated from *Maytenus imbricata*. **Pestic. Biochem. Physiology**, v. 87, p. 109–114, 2007.

DE SOUZA, L. M.; et al. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **J. Chromatog. A**, v. 1207, p. 101–109, 2008a.

DE SOUZA, L. M.; et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 47 p. 59–67, 2008b.

DIAGONE, C. A.; et al. CZE/PAD and HPLC-UV/PAD Profile of Flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” Leaves Extracts. **Chromatog. Res. Internat.**, v. 2012, (2012) Article ID 691509,7 pages.

DOS SANTOS, V. A. F. F. M. et al. Evaluation of Antioxidant Capacity and Synergistic Associations of Quinonemethide Triterpenes and Phenolic Substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 15, p. 6956 – 6973, 2010.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **R. Bras. Farmacog.**, v. 18, n. 4, p.627-641, Out.-Dez. 2008.

GONZALEZ, F. G. et al. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J. Ethnopharm.**, v. 77, p. 41–47, 2001.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmac. & Therap.**, v. 96, p. 67– 202, 2002.

JOHANN, S. Atividade antimicrobiana de flavonóides polimetoxilados isolados de frutos cítricos. 83 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

JORGE, R. M. et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharm.**, v.94, p. 93-100, 2004.

LEITE, J. P. V. et al. Constituents from *Maytenus ilicifolia* Leaves and Bioguided Fractionation for Gastroprotective Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 2, p. 248-254, 2010.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharm.**, v. 102, p. 364–370, 2005.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.3, p.89-99, 2007.

MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. Capítulo 6. p. 197-235. In: Methods in Plant biochemistry. Vol 1. ISBN 0-12-461011-0. 1989.

MAZID, M.; KHAN T.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, Special Issue, p. 232-249, 2011.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1015-1026, 1995.

MOSSI, A. J.; et al. Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. **Quim. Nova**, v. 33, n. 5, p. 1067-1070, 2010.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **R. Bras. Farmacog.**, v. 19, n. 2B, p. 553-556, Abr./Jun. 2009.

NETTO, E. M. et al. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. **R. Fitos**, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.

NOSSACK, A. C. et al. Quantitative Analysis of Triterpenes Friedelan-3- $\beta$ -ol and Friedelin in *Maytenus aquifolium* by High-Resolution Gas Chromatography and High-Temperature Capillary Gas Chromatography. **Phytochem. Anal.**, v 11, p. 243–246, 2000.

NUÑEZ, M. J. et al. Lupane Triterpenoids from *Maytenus* Species. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 1018-1021, 2005.

PESSUTO, M. B. et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **R. Bras. Farmacog.**, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

RIBEIRO, M.V. et al. Diversidade genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis.) coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.4, p.443-451, 2010.

RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **J. Chromatog. A**, v. 1112, p. 31–63, 2006.

ROMANI, A. et al. Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 41, p. 415–420, 2006.

RUDNICKI, M. et al. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 656–661, 2007.

SANTA CATARINA (Estado). Lei nº 15.674, de 15 de dezembro de 2011. Florianópolis, SC 2011.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **R. Bras. Farmacog.**, v. 19, n. 2B, p 650-659, Abr./Jun. 2009.

SOARES, L. A. L. et al. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.

TIBERTI, L. A.; et al. Identification of flavonols in leaves of *M. ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J. Chromatog. B**, v. 846, p. 378–384, 2007.

VELLOSA, J. C. R.; et al. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitot.**, v. 77, p. 243-244, 2006.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochem. R.**, v. 1, p. 13–25, 2002;

VILEGAS, J. H. Y; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C. High resolution gas chromatography analysis of ‘espinheira santa’ (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): Analysis of crude drug adulterations. **Phytot. Res.**, v. 8, n. 4, p. 241-244, 1994.

WINK, M. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. CHAPTER 11, p. 251- 268. In: Mahendra Rai e Maria Cecilia Carpinella. **Advances in Phytomedicine: Naturally occurring bioactive compounds**. Volume 3. ISSN: 1572-557X. 1<sup>st</sup> edition. 2006.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochem.**, v. 65, p. 261–291, 2004.



YARIWAKE, J. H. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **R. Bras. Farmacog.**, v.15, n. 2, p. 162-168, Abr./Jun. 2005.

YIN, M. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review. **BioMedicine**, v. 2, p. 2-9, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. *In*: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O. et al. 6ª. Edição. Editora UFRGS e UFSC. 2010.



## **CAPÍTULO 2. Desenvolvimento de método para determinação dos triterpenos friedelin e friedelan-3-ol em folhas de *M. ilicifolia* por cromatografia gasosa usando injeções múltiplas**

### **1 INTRODUÇÃO**

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) tem sido utilizada para a análise qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis e tem demonstrado vantagens em termos de sensibilidade e resolução em análise de misturas complexas, o que demonstra a seletividade da técnica (SANTOS; GALCERAN, 2001; LEHOTAY; HAJŠLOVÁ, 2002; BANICERU; MANDA; POPESCU, 2011). Algumas características notáveis desta técnica são uma boa separação dos analitos em misturas complexas, alta precisão, simplicidade instrumental e disponibilidade de vários sistemas de detecção, seja universal ou específico, contribuindo para o uso generalizado da técnica nas áreas acadêmica e industrial (LEHOTAY; HAJŠLOVÁ, 2002).

A procura por métodos que proporcionam um elevado rendimento instrumental, isto é, que aumentem a taxa de geração de dados em um curto período de tempo, é uma força motriz importante no desenvolvimento de métodos analíticos. Isto resulta em menores custos por análise, redução do tempo gasto pelo analista, além de operação mínima do equipamento (BEREZKIN; LAPIN; MALYUKOVA, 2001; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; DONATO et al., 2007). Para laboratórios com um elevado número de análises diárias, a seleção dos métodos de análise deve levar em conta dois fatores essenciais: o método de separação e o preparo das amostras, com o objetivo de separar os componentes mais críticos e aplicar procedimentos eficientes para o preparo da amostra a ser analisada (MATISOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ, 2003; TRANCHIDA et al., 2007).

Nos últimos anos, tem sido observado um avanço na instrumentação de cromatógrafos gasosos comerciais, com injetores automáticos de alta velocidade, controladores eletrônicos de pressão de gás, sistemas rápidos para aquecimento e arrefecimento do forno, sistemas de detecção mais rápidos e reprodutíveis e *softwares* dedicados para controlar estes dispositivos (BICCHI et al., 2005). Diante destes melhoramentos instrumentais, numerosos trabalhos foram publicados

mostrando diferentes estratégias para reduzir o tempo das análises. Estes incluem o uso de rápidos programas de temperatura em colunas especiais (XU et al., 2008), os sistemas de injeção com válvulas especiais de injeção combinadas com um programa de temperatura rápido (REID; MCBRADY; SYNOVEC, 2007), injetor de canais de fluxo contínuo de multiplexação, no qual as amostras são injetadas continuamente de acordo com uma pseudo-sequência binária aleatória controlada por um computador (TRAPP, 2007), colunas cromatográficas com comprimento reduzido (KORYTÁR et al., 2002; MONDELLO et al., 2004) e dispositivos para o uso de várias colunas (HINZ, 2006; SASAMOTO; OCHIAI; KANDA, 2007).

As estratégias para aumentar o rendimento instrumental também foram estudadas em relação a outras técnicas de separação, tais como electroforese capilar, em que métodos utilizando múltiplas injeções foram explorados (LODÉNA et al., 2008; VITALI et al., 2011). Neste modo de injeção é possível analisar duas ou mais amostras em uma mesma corrida, causando uma redução significativa no tempo de análise, quando comparado com os métodos convencionais, sem necessidade de qualquer modificação do instrumento. Recentemente, um estudo foi relatado por Welch et al., (2010) empregando a injeção múltipla em uma única corrida (MISER, do inglês *multiple injection in a single experimental run*) para o aumento da frequência analítica, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS, do inglês *high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry*). Contudo, em estudos que utilizam este tipo de injeção, geralmente as amostras analisadas não são complexas, uma vez que esta estratégia é geralmente aplicada para a análise de fármacos, os quais envolve, teoricamente, um menor número de analitos, o que facilita a aplicação deste modo de injeção (LODÉNA et al., 2008; VITALI et al., 2011). O modo de injeção múltipla também pode ser utilizado como uma estratégia para aumentar o rendimento instrumental nas análises por GC. Recentemente, Cho (2012) usou o modo de injeção múltipla com *stacking* em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *gas chromatography with mass spectrometry detector*). Este método consistia na injeção da amostra ( $n$  vezes) entre as injeções do reagente de derivatização de forma a melhorar a detecção de compostos polares com baixa volatilidade.

Em muitas metodologias analíticas publicadas na literatura, poucos picos de analitos são observados e em algumas regiões do cromatograma não apresentam eluição de picos, oferecendo uma maior oportunidade de aplicação para o uso do modo MISER. No entanto, numa matriz complexa o preparo da amostra é uma etapa determinante, limitando o número de compostos que possam ser introduzidos no cromatograma em uma única análise. Diante disso, um processo de pré-tratamento de amostras complexas, empregando a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), poderia atuar como um filtro para a retenção, principalmente, dos analitos, gerando um cromatograma com menor número de picos. Portanto, o procedimento de preparo de amostra pode também contribuir para o aumento da capacidade de injeção utilizando o modo MISER.

Contudo, até o presente momento nenhum trabalho foi encontrado utilizando o modo MISER em cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*). Diante disso, têm-se os objetivos do presente estudo.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método de separação usando, pela primeira vez, o modo MISER em um GC-FID, sem qualquer modificação instrumental, visando a análise dos triterpenos friedelan-3-ol e friedelin no extrato hexânico de folhas de *M. ilicifolia*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método analítico para a determinação de triterpenos (friedelan-3-ol e friedelin) por GC-FID em *M. ilicifolia* selecionando condições de separação, a saber: fluxo gás de arraste; temperatura do injetor e volume de injeção; tipo de coluna e temperatura do forno; temperatura do FID; entre outras;
- Desenvolver procedimento de extração assistida por ultrassom avaliando diferentes temperaturas (25 °C e 60 °C) para a extração dos triterpenos a partir das folhas de *M. ilicifolia*, utilizando SPE;
- Avaliar qual o melhor volume de extrato de planta e eluente para realizar o *clean up* no cartucho de SPE das amostras;
- Avaliar os parâmetros de validação do método: linearidade; limites de detecção e quantificação; precisão intra-ensaio e intermediária e recuperação para o método de injeções múltiplas;
- Avaliar o perfil dos 111 indivíduos de *M. ilicifolia* em relação à presença dos triterpenos e correlacionar com o número de acúleos presentes contidos em cada planta;





### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões analíticos de friedelan-3-ol e friedelin foram obtidos da Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St. Louis, MO, E.U.A.). As soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em clorofórmio grau HPLC (Carlo Erba Reagents, Itália).

Para a preparação da curva de calibração externa utilizou-se a faixa de calibração de 5 - 70 mg L<sup>-1</sup> para ambos os analitos, com seis níveis de concentração, empregando o modo MISER.

Para a preparação dos extratos de *M. ilicifolia* utilizou-se o solvente hexano P.A. (Synth, São Paulo). Para a extração em fase sólida dos triterpenos das amostras utilizou-se o cartucho de extração Florisil<sup>®</sup> contendo silicato de magnésio ativado (Applied Separations, E.U.A., FLO/Florisil, 500 mg/3 mL).

#### 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (Agilent GC System 7890 A) com detecção por ionização em chama. As condições cromatográficas desenvolvidas para a separação dos triterpenos friedelin e friedelan-3-ol foram realizadas em uma coluna ZB-50 (30 m x 0,25 mm x 0,15 μm) com 50% fenil-50% metilpolisiloxano. O volume de injeção foi de 1,0 μL empregando o modo split (1:90) cuja temperatura de injetor e detector foi de 280 °C e 320 °C, respectivamente. Como programação de temperatura utilizou-se o modo isotérmico a 300 °C com um fluxo constante de gás de arraste, hélio, de 1,5 mL min<sup>-1</sup>.

#### 3.3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS TRITERPENOS NAS AMOSTRAS DE *M. ilicifolia*

Para a extração dos triterpenos foi necessário realizar a avaliação da relação solvente/planta (seca e moída) para o extrato hexânico, e em seguida, a avaliação do procedimento de *clean up* do extrato hexânico resultante com cartucho de SPE contendo Florisil<sup>®</sup> como fase extra-

tora. Nestas duas etapas de desenvolvimento do método utilizou-se como referência o trabalho descrito por Nossack et al., (2000) com algumas adaptações.

### 3.3.1 Preparação do extrato hexânico

No procedimento de extração dos triterpenos, em 100 mg de planta seca e moída foram adicionados 5 mL de hexano e este foi submetido ao ultrassom (Cristofoli Ultrasonic Cleaner, 42 kHz). Para a otimização da extração se avaliou a influência do tempo de ultrassom empregado ( $t=1,5$  a 9 minutos, com incrementos de 1,5 minutos), e ainda, avaliou-se o efeito da temperatura no processo de extração ( $T=25$  °C e 60 °C). Posteriormente, o extrato hexânico foi centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm. Em seguida, utilizou-se o cartucho Florisil<sup>®</sup>, o qual foi pré-condicionado com 1 mL de hexano, posteriormente, uma alíquota de 4 mL do extrato hexânico foi percolada pelo cartucho e em seguida, eluiu-se os analitos adsorvidos com 4 mL de clorofórmio. Uma alíquota do eluato foi diluída com clorofórmio (1:1, v/v) para a injeção direta no equipamento de GC.

### 3.3.2 Avaliação dos volumes de extrato hexânico e clorofórmio para o procedimento de *clean up* utilizando cartucho de SPE Florisil<sup>®</sup>

A partir de um extrato hexânico resultante do estudo realizado na etapa anterior, avaliou-se o procedimento de *clean up* em Florisil<sup>®</sup>. Inicialmente, verificou-se o volume de extrato hexânico a ser percolado no cartucho. O volume de extrato percolado variou entre 1 a 4 mL. Uma alíquota de cada volume percolado foi diluído com hexano (1:1 v/v) e analisado no GC-FID a fim de verificar a possível presença dos analitos em estudo.

Em seguida, partiu-se para o estudo do volume de clorofórmio empregado para a eluição dos triterpenos adsorvidos no cartucho de Florisil<sup>®</sup>. Esta etapa procedeu-se com a aplicação inicial de 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  e sucessivas adições de 1 mL a fim de verificar o volume ideal para a eluição total dos analitos. Uma alíquota de todas as eluições foi retirada e diluída com  $\text{CHCl}_3$  (1:1) para posterior injeção no GC-FID.

### 3.3.3 Isolamento e caracterização do pico desconhecido

Em 100 gramas de planta seca e moída adicionou-se 20 mL de hexano (P.A.) sendo submetida à maceração por um mês. A cada semana, o extrato hexânico foi rotaevaporado e o precipitado branco foi acondicionado de maneira adequada em um frasco de vidro para posterior análise cromatográfica. O volume de hexano rotaevaporado era novamente colocado em contato com o resíduo sólido da planta para uma extração mais efetiva

Uma alíquota do precipitado branco foi retirada para análise por cromatografia em coluna flash para o isolamento do pico desconhecido. Cada fração isolada da coluna flash era submetida à análise por cromatografia em camada delgada sendo comparada com os padrões analíticos dos triterpenos. Após o isolamento da fração contendo o pico desconhecido, esta fração foi submetida às análises de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , cujos resultados se encontram no Anexo A.

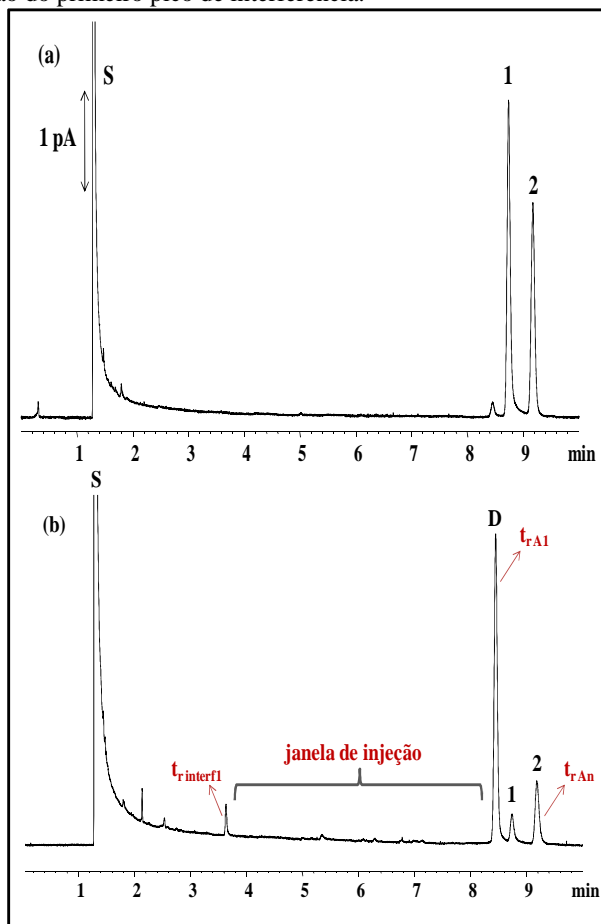


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO

Inicialmente, as condições para a separação dos marcadores químicos friedelan-3-ol e friedelin por GC-FID foram utilizadas de acordo com Nossack et al., (2000). Este método foi reotimizado para o presente estudo e empregado na separação dos triterpenos de interesse a partir de uma mistura de padrões e de um extrato hexânico com posterior *clean up* utilizando SPE da planta de *M. ilicifolia* aplicando o modo de injeção simples, conforme ilustrado na Figura 2.1. O tempo necessário para a separação dos triterpenos foi inferior a dez minutos. Uma boa similaridade entre os cromatogramas dos padrões e das amostras foi observada. Além disso, o método mostrou uma boa resolução ( $R_s = 1,78$ ) entre os diferentes analitos.

**Figura 2. 1** (a) Cromatograma de uma solução padrão (50 mg L<sup>-1</sup>) de friedelan-3-ol e friedelin, e (b) cromatograma de um extrato das folhas de *M. ilicifolia*. Condições experimentais: modo de injeção simples, temperatura do injetor 280°C, modo split (1:90), fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno 300°C (isoterma), FID: 320°C. Legenda: 1 - friedelan-3-ol ( $t_1 = 8,76$  min), 2 - friedelin ( $t_2 = 9,19$  min); D\* - Desconhecido ( $t_D = 8,47$  min);  $t_{r\text{AI}}$  - tempo de retenção do primeiro analito;  $t_{r\text{An}}$  - tempo de retenção do último analito;  $t_{r\text{interf}1}$  - o tempo de retenção do primeiro pico de interferência.



\*D - Pico desconhecido (Friedelan-3 $\beta$ -ol, ver Anexo A)

A separação dos analitos foi realizada empregando o modo isotérmico, a fim de utilizar as mesmas condições de separação do modo de injeção simples para o desenvolvimento de um novo método empregando o modo MISER. O modo isotérmico permite a separação dos analitos de diferentes segmentos de amostras na mesma corrida utilizando o método MISER sob as mesmas condições de temperatura, evitando que haja interações diferentes do mesmo analito entre segmentos de amostras diferentes com a fase estacionária, possibilitando condições reprodutíveis em termos de resolução e tempos de retenção. Além disso, o uso do método MISER empregando o modo isotérmico em GC-FID permite que o sistema cromatográfico possa ser considerado como um sistema de injeção em fluxo. E ainda, o modo isotérmico evita a etapa de arrefecimento do forno entre as análises, que também contribui para uma melhoria no rendimento instrumental.

Outro fator que influencia o emprego do método MISER é a complexidade da amostra a ser analisada. Neste caso particular, uma amostra do extrato das folhas de *M. ilicifolia* foi inicialmente injetada no equipamento para verificar os picos dos analitos e a presença de possíveis “interferentes”. No cromatograma da amostra (Figura 2.1b) a presença dos analitos foi observada juntamente com um pico desconhecido, porém, todos apresentaram boa resolução. Além disso, verificou-se que, entre o sinal do solvente e dos analitos existiam poucos picos que poderiam interferir na determinação dos analitos em estudo, definindo-se assim uma “janela de injeção” (Figura 2.1b) no cromatograma, indicando a possibilidade de se utilizar o modo de múltiplas injeções. Neste contexto, o procedimento de preparação da amostra demonstrou ser uma etapa crítica. Para isso, um processo de *clean up* da amostra foi necessário, não só com o objetivo de proteger a coluna de possíveis contaminantes advindos da amostra, mas também para gerar um cromatograma com menor número de picos. Assim, este conjunto de observações sugerem a possibilidade de introduzir o sinal dos analitos de outras amostras em uma mesma corrida utilizando o modo MISER. Deste modo, utilizou-se o procedimento de SPE com uma fase extratora denominada de Florisil<sup>®</sup>, o qual é composta por silicato de magnésio ativado.

### 4.1.1 Modo MISER

O método MISER consiste em injetar vários segmentos de uma determinada amostra ou mistura de padrões em uma mesma corrida, obtendo-se um cromatograma único com maior quantidade de informações sobre os analitos, quando comparado com o modo de injeção simples. Assim, o método MISER pode proporcionar uma melhoria no rendimento instrumental.

Para empregar o método MISER, a "janela de injeção" num cromatograma deve ser determinada a partir do método de uma única injeção (Figura 2.1b). Esta "janela" permite a inclusão de mais picos no cromatograma por meio de múltiplas injeções e do número de injeções ( $n_{inj}$ ), o qual pode ser estimado usando as seguintes Equações (VISTUBA et al.; 2013):

$$n_{inj} = \frac{(t_{r_{A1}} - t_{r_{interf1}})}{(t_{r_{An}} - t_{r_{A1}}) + \left( \frac{w_{A1} + w_{An} + w_{interf1}}{3} \right)} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$n_{inj} = \frac{(t_{r_{interf2}} - t_{r_{An}})}{(t_{r_{An}} - t_{r_{A1}}) + \left( \frac{w_{A1} + w_{An} + w_{interf2}}{3} \right)} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde  $t_{r_{A1}}$ ,  $t_{r_{An}}$ , são os tempos de retenção do primeiro analito e do último analito e  $t_{r_{interf1}}$  e  $t_{r_{interf2}}$  são tempos de retenção dos picos "interferentes" antes do sinal do primeiro analito e depois do sinal do último analito, respectivamente;  $w_{A1}$ ,  $w_{An}$ ,  $w_{interf1}$  e  $w_{interf2}$ , são as larguras de base dos respectivos picos mencionados anteriormente. Todos estes tempos de retenção e as larguras dos picos foram obtidos a partir de um cromatograma de uma amostra analisada pelo método de uma única injeção da amostra (Figura 2.1b).

A Equação para calcular  $n_{inj}$  selecionada depende do tempo da "janela de injeção", localizada entre o grupo de picos dos analitos e os picos vizinhos interferentes. Uma "janela" pequena irá limitar o número de injeções. Se a janela correspondente a  $t_{r_{A1}} - t_{r_{interf1}}$  for menor do que



a janela relacionada ao  $tr_{interf\ 2} - tr_{An}$ , então o  $n_{inj}$  deve ser calculado usando a Equação 1, e se  $tr_{AI} - tr_{interf\ 1}$  for maior que  $tr_{interf\ 2} - tr_{An}$  a Equação 2 deve ser utilizada. Para calcular  $n_{inj}$ , o pico desconhecido que aparece próximo dos picos dos triterpenos avaliados foi considerado como "primeiro analito" (A1), devido à proximidade dos picos dos analitos, formando um bloco de picos no cromatograma no intervalo de tempo. Neste estudo, existe apenas o pico  $tr_{interf\ 1}$  (tempo de corrida de 30 minutos,  $tr_{interf\ 2}$  não detectado - dados não mostrados), e, por conseguinte,  $n_{inj}$  foi obtido a partir da Equação 1. Os valores médios para os tempos de retenção utilizados nos cálculos foram  $tr_{AI} = 8,473$  min,  $tr_{interf\ 1} = 3,638$  min e  $tr_{An} = 9,190$  min e os valores médios para a largura de base dos picos foram  $w_{AI} = 0,326$ ,  $w_{An} = 0,364$  e  $w_{interf\ 1} = 0,147$ . Assim, o número calculado de injeções possíveis foi de 4,85. No entanto, neste estudo, apenas foram realizadas 3 injeções, uma vez que a linha de base demonstrou um elevado ruído nos cromatogramas para os tempos de análise inferiores a seis minutos, e isso poderia comprometer a integração automática dos picos.

Para empregar o modo MISER em GC-FID seria necessária uma modificação no *software* que controla o equipamento. O *software* do equipamento utilizado não apresenta a opção de injeção múltipla em uma mesma corrida e, portanto, foi necessário criar uma sequência de métodos, em que cada método corresponde a uma injeção. Para a aquisição dos dados e suas análises, o último método da sequência foi usado. Para isso, foi necessário estimar o tempo de espera ( $t_{espera}$ ) entre os métodos da sequência aplicados no modo MISER, a fim de promover a separação com resoluções satisfatórias para todos os picos originados a partir das diferentes injeções em uma mesma corrida. Este tempo de espera foi relacionado com o tempo de execução do primeiro método ( $t_{1^a\ corrida}$ ) e o tempo de pré-injeção do segundo método ( $t_{pré-injeção}$ ). A Equação seguinte permite que o tempo de espera ( $t_{espera}$ ) entre as injeções dos métodos 1 e 2 seja estimado (VISTUBA et al.; 2013):

$$t_{espera} = t_{1^a\ corrida} + t_{pré-injeção*} \quad (\text{Equação 3})$$

onde  $t_{1^a\ corrida}$  é o tempo de corrida do primeiro método e  $t_{pré-injeção}$  é o tempo associado com as etapas aplicadas antes da segunda injeção (permutação, lavagem da agulha c/ amostra e remoção de bolhas). No primeiro método, a pré-injeção no método 1 é diferente do método 2,

porque duas lavagens da agulha foram realizadas com o solvente antes da lavagem com a amostra. Assim, o tempo gasto nesta etapa adicional no método 1 (0,3 min) não deve ser considerado nas etapas de pré-injeção para os métodos 2 e 3.

O  $t_{1^a\text{ corrida}}$  foi calculado de acordo com a seguinte Equação (VISTUBA et al.; 2013):

$$t_{1^a\text{ corrida}} = t_{rAn} - t_{rAl} + \left( \frac{W_{An} + W_{Al}}{2} \right) - t_{\text{pré-injeção}} - t_{\text{delay}} \quad (\text{Equação 4})$$

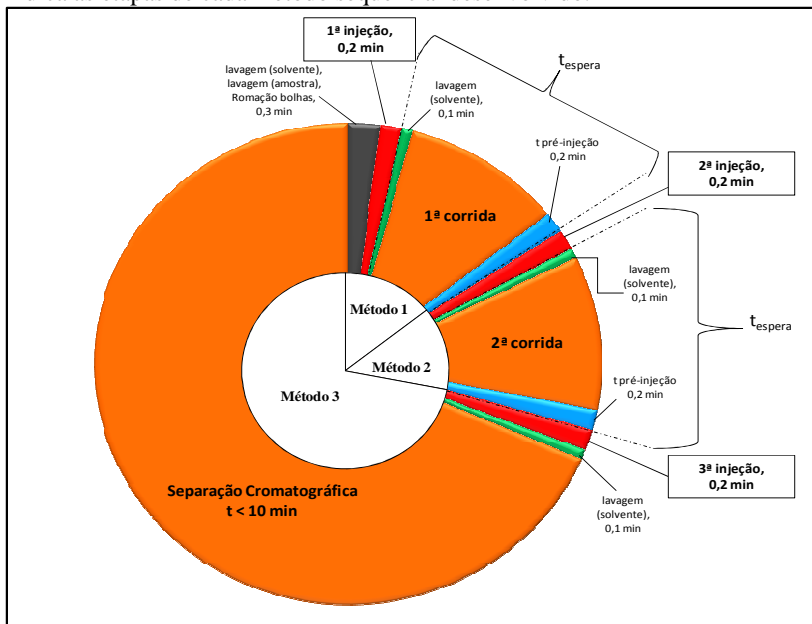
onde  $t_{\text{delay}}$  é o tempo de intervalo do equipamento antes de começar o próximo método. O termo  $t_{rAn} - t_{rAl}$  representa o intervalo de tempo no qual o grupo de picos dos analitos aparece no cromatograma, ao passo que o termo entre parênteses representa o intervalo de tempo entre a separação do primeiro grupo de picos relacionados com a primeira injeção e o segundo grupo de picos está relacionado com a segunda injeção. Para calcular  $t_{1^a\text{ corrida}}$ , o pico desconhecido próximo ao pico dos analitos de interesse foi considerado como o "primeiro analito (A1)", como no cálculo do  $n_{inj}$ . Assim, os valores médios para os tempos de retenção foram  $t_{rAn} = 9,190$  min,  $t_{rAl} = 8,473$  min e  $t_{\text{pré-injeção}} = 0,317$  min, com  $t_{\text{delay}} = 0,07$  min, e os valores médios para a largura de base dos picos foram  $w_{An} = 0,364$  e  $w_{Al} = 0,326$ . Os valores calculados para  $t_{1^a\text{ corrida}}$  para os métodos ficaram em torno de 0,675 min, enquanto que o valor experimental para o  $t_{1^a\text{ corrida}}$  usado foi de 0,6 minutos.

Na Figura 2.2, um diagrama esquemático do modo MISER mostra cada passo dos procedimentos. O primeiro e o segundo métodos da sequência apenas apresentam um tempo de corrida de 0,6 min cada. Desta forma, os dados destas corridas não são utilizados para a aquisição dos dados para gerar um cromatograma. Apenas a partir do terceiro método da sequência que os dados são adquiridos, gerando o cromatograma final com as injeções dos diferentes segmentos dos analitos.

O método foi aplicado com sucesso na separação de friedelan-3-ol e friedelin a partir de extratos de amostras de folhas de *M. ilicifolia* submetidas a extração em fase sólida. Apesar da complexidade da matriz da amostra, foi possível a realização de três injeções na mesma corrida com boa resolução entre os picos, conforme ilustra a Figura 2.3.

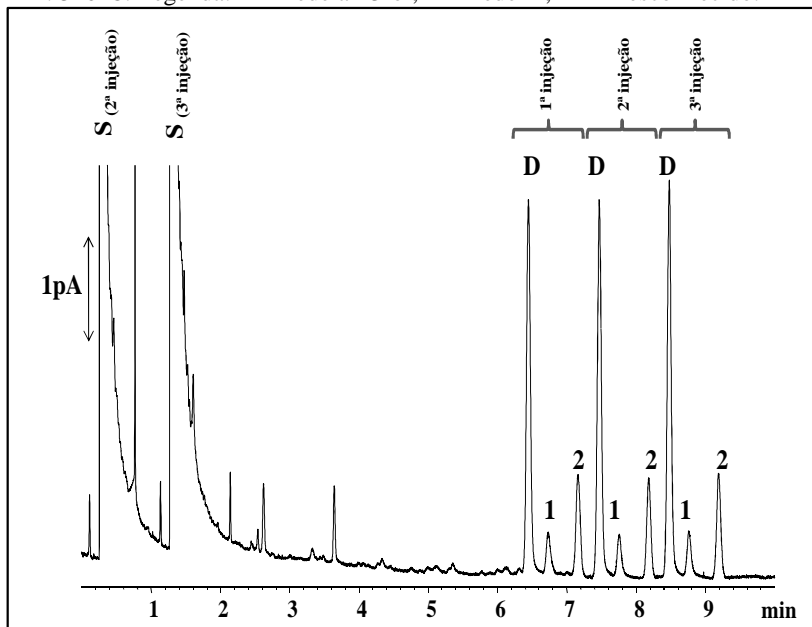
Os analitos podem ser verificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos dos analitos detectados nas amostras, bem como pela adição de padrão nas amostras.

**Figura 2. 2** Etapas que envolvem o processo de injeção múltipla no GC-FID. Círculo branco indica o número de métodos programados no software do equipamento para o desenvolvimento do modo MISER. Círculo externo indica as etapas de cada método sequencial desenvolvido.



Fonte: VISTUBA et al., (2013).

**Figura 2. 3** Cromatograma do método analítico empregando o modo MISER para a separação dos triterpenos friedelan-3-ol e friedelin no extrato das folhas de *M. ilicifolia*. Condições experimentais: injeções múltiplas com um tempo de espera de 0,6 min entre injeções; temperatura do injector 280°C, modo *split* (1:90), taxa de fluxo de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno 300°C (isoterma), FID: 320°C. Legenda: 1 - friedelan-3-ol; 2 - friedelin; D\* - Desconhecido.



\*D – Pico desconhecido (Friedelan-3 $\beta$ -ol).

Uma comparação entre os modos de injeção simples e múltipla permitiu um aumento no rendimento instrumental pelo procedimento proposto. No modo de injeção simples, o tempo de análise instrumental foi de 10,6 min permitindo que 5 amostras fossem analisadas por hora. Por outro lado, no modo de injeção múltipla o tempo de análise instrumental foi 13 minutos permitindo que 13 amostras fossem analisadas por hora. Assim, o rendimento instrumental aumentou 2,6 vezes empregando o modo MISER. No que diz respeito ao tempo de análise total, que inclui o tempo instrumental e o tempo de preparação das amostras, os modos de injeção simples e múltipla permitiram que 4 e 10 amostras fossem analisadas por hora, respectivamente. O tempo

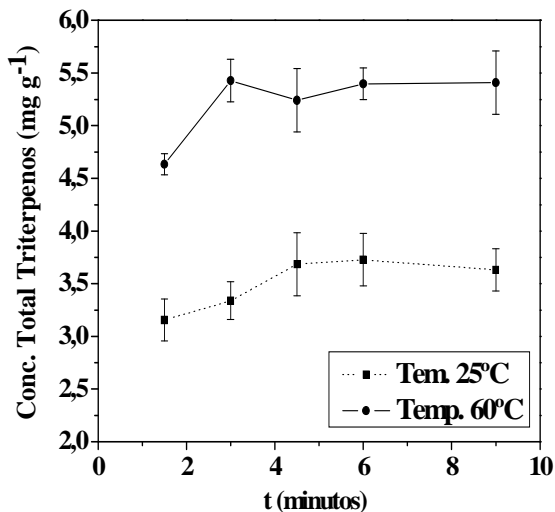
médio de preparação de 18 amostras foi cerca de 30 minutos. Diante disso, foi possível observar que o aumento da frequência analítica foi mantido em um fator de 2,5 demonstrando que a utilização do modo MISER conduziu a uma melhoria do rendimento das análises.

## 4.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS TRITERPENOS NAS AMOSTRAS DE *M. ilicifolia*

### 4.2.1 Preparação do extrato hexânico

O resultado do estudo para o procedimento de extração, o qual se avaliou a influência da temperatura e do tempo na extração por ultrassom, pode ser observado na Figura 2.4. Os dados mostram que houve influência da temperatura no procedimento de extração dos analitos, isto é, quando o extrato hexânico foi submetido a aquecimento a 60 °C, a concentração de friedelin e friedelan-3-ol aumentou significativamente em relação à extração em temperatura ambiente. Outro fator importante foi o tempo de extração no ultrassom, o qual mostrou maior influência no procedimento de extração com aquecimento, cujo tempo adequado para extração foi de 3 minutos, atingindo a estabilidade em torno de 6 minutos.

**Figura 2. 4** Avaliação do procedimento de extração dos triterpenos da *M. ilicifolia*. Variação de tempo de extração dos compostos friedelan-3-ol e friedelin (concentração total,  $\text{mg g}^{-1}$ ) com o auxílio de ultrassom a temperatura 25 °C e a 60 °C.



#### 4.2.2 Avaliação dos volumes de extrato hexânico e clorofórmio para o procedimento de *clean up* utilizando extração em fase sólida

Posteriormente, foi necessário realizar um estudo relacionado ao volume do extrato hexânico a ser percolado pelo cartucho de SPE, bem como o volume necessário de clorofórmio para dessorver os analitos do adsorvente Florisil®. O volume de extrato hexânico avaliado para a percolação no cartucho de SPE variou de 1 e 4 mL, sendo que uma alíquota do volume percolado foi injetada no GC, afim de verificar a presença dos triterpenos. Inicialmente, um volume de 1 mL foi percolado pelo cartucho de SPE e analisado no GC e posteriormente, sucessivas adições de 1 mL sobre o mesmo cartucho foram realizadas a fim de atingir a saturação do mesmo. Observou-se que, após a percolação de 4 mL do extrato hexânico no cartucho, os analitos não ficaram totalmente retidos no adsorvente. Com isso, um volume adequado do extrato hexânico a ser percolado no cartucho foi de 3 mL, uma vez que os analitos

ficaram totalmente retidos, sem apresentar nenhum sinal cromatográfico. Logo, o cartucho de SPE atingiu sua capacidade de adsorção máxima dos analitos friedelan-3-ol e friedelin.

Em seguida, para a dessorção total dos analitos, variou-se o volume de clorofórmio de 1 a 4 mL, no qual sucessivas adições de 1 mL do eluente foram percoladas pelo cartucho de SPE. Uma alíquota do eluato foi posteriormente analisada no GC para verificar a presença dos analitos. O volume necessário para a dessorção total dos triterpenos foi de 3 mL, uma vez que volumes acima deste não apresentaram sinal cromatográfico.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO MISER

Após a otimização do procedimento de extração, bem como a otimização do método, foi necessário realizar a avaliação de alguns parâmetros de validação do método MISER antes da quantificação das amostras de *M. ilicifolia*.

A avaliação dos parâmetros do método proposto para a determinação de friedelan-3-ol e friedelin em amostras de folha de *M. ilicifolia* foi realizada de acordo com as recomendações do ICH (2005). Os parâmetros analisados foram: linearidade da curva de calibração externa, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), repetibilidade (instrumental e intra-ensaio), precisão intermediária e seletividade.

A Tabela 2.1 mostra os valores obtidos para os parâmetros analíticos com base nas curvas de calibração externa para os analitos friedelan-3-ol e friedelin utilizando injeção múltipla, com um intervalo linear de 5-70 mg L<sup>-1</sup> (com seis níveis de concentração) com um coeficiente de determinação,  $R^2 > 0,99$ . Uma outra maneira de verificar o ajuste do modelo linear foi a partir da análise de variância (ANOVA) pelo teste F, o qual indicou um valor maior para o  $F_{\text{calculado}}$  que o  $F_{\text{crítico}}$ , para os dois analitos, e isto indica que o modelo linear tem significância estatística.

Os valores de LD e LQ para friedelan-3-ol foram 0,25 mg L<sup>-1</sup> e 0,78 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, e para o friedelin os respectivos valores foram 0,38 mg L<sup>-1</sup> e 1,15 mg L<sup>-1</sup>. O método proposto apresentou melhores valores para LD, quando comparado ao trabalho desenvolvido para Nossack et al., (2000).

**Tabela 2. 1** Parâmetros das curvas de calibração externa das soluções padrão de friedelan-3-ol e friedelin utilizando modo MISER.

Parâmetros	Friedelan-3-ol	Friedelin
Linearidade – faixa de calibração (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>	5 – 70	5 – 70
Linearidade – inclinação (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>	0,320	0,163
Desvio padrão – inclinação	0,009	0,008
Linearidade-intercepto <sup>(a)</sup>	0,102	0,205
Desvio padrão – intercepto	0,004	0,062
R <sup>2</sup>	0,996	0,993
LD (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>	0,3	0,4
LQ (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>	0,8	1,2
F <sub>calculado</sub> <sup>(c)</sup>	2.122	1.289
t <sub>calculado</sub> <sup>(d)</sup>	3,9	1,3

<sup>(a)</sup> Curva de calibração com seis níveis de concentração, cada ponto da curva preparado foi injetado em duplicata.

<sup>(b)</sup> Limites de detecção e quantificação calculados a partir das equações:

$LD = (3,3 \times s)/S$ ;  $LQ = (10 \times s)/S$ , onde  $s$  é o desvio padrão do intercepto e  $S$  é a inclinação da curva analítica.

<sup>(c)</sup> Teste F:  $F_{crítico} = 7,71$ ; sendo  $\alpha = 0,05$ .

<sup>(d)</sup> Teste t;  $t_{crítico} = 4,3$ ; sendo  $\alpha = 0,05$ .

Para avaliar o efeito de matriz, a curva de calibração externa foi comparada com a curva de adição de padrão. No caso do friedelan-3-ol o valor da inclinação da curva de calibração externa utilizando injeções múltiplas foi  $0,320 \pm 0,009$ , enquanto o valor correspondente para a curva de adição de padrão foi de  $0,290 \pm 0,006$ . Já os valores de inclinação das curvas para friedelin foram  $0,163 \pm 0,008$  e  $0,153 \pm 0,005$ , respectivamente. A partir do teste t, observou-se que não houve diferença significativa entre as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão, pois os valores de  $t_{calculado}$  foram inferiores ao  $t_{crítico}$ , para um intervalo de 95% de confiança, para ambos os analitos. Isto sugere que não houve efeito de matriz da amostra, indicando que o método apresenta seletividade.

Os ensaios de recuperação empregando o modo MISER foram realizados em cinco níveis de concentração, apresentando bons resultados com relação as concentrações adicionadas. A Tabela 2.2 mostra os resultados da recuperação para os dois analitos, os quais



variaram entre 91-101% para o friedelan-3-ol e 82-103% para o friedelin, indicando que o método proposto apresenta boa exatidão.

**Tabela 2. 2** Resultados dos ensaios de recuperação dos analitos friedelan-3-ol e friedelin do extrato de *M. ilicifolia* usando o modo MISER.

Analitos	Concentração (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>		Recuperado (%) <sup>(b)</sup>
	Adicionado	Encontrado	
<b>Friedelan-3-ol</b>	5,0	5,0	100
	10,0	9,1	91
	15,0	15,1	101
	25,0	24,8	99
	35,0	35,5	101
<b>Friedelin</b>	5,0	5,0	100
	10,0	8,2	82
	15,0	15,5	103
	25,0	23,9	96
	35,0	36,1	103

<sup>(a)</sup> Valores de recuperação dos padrões adicionados ao extrato de *M. ilicifolia*.

Inclinação da curva de adição de padrão: friedelan-3-ol 0,290±0,004 e friedelin 0,153±0,005. Concentração de friedelan-3-ol e friedelin na amostra foi de 3,5 mg L<sup>-1</sup> e 20,04 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

<sup>(b)</sup> Média dos resultados de três medidas de uma replicata (n=3).

A Tabela 2.3 apresenta os valores dos parâmetros de avaliação do método proposto e estão representados pelo coeficiente de variação (CV). A precisão instrumental foi determinada com uma solução dos padrões de friedelan-3-ol e friedelin (50 mg L<sup>-1</sup>), e também em uma amostra de extrato das folhas de *M. ilicifolia* (valores entre parênteses). Os valores de CV para a variação da área do pico dos padrões nos diferentes segmentos dos analitos foram inferiores a 5%. Quando se avaliou a amostra de *M. ilicifolia* os valores de CV para os segmentos variou entre 2,27 e 4,16% para friedelan-3-ol e 2,39 a 2,81% de friedelin. O valor de CV para o tempo de retenção tanto dos padrões quanto para as amostras foi inferior a 0,5%. Apesar da complexidade da matriz, estes valores foram satisfatórios.

Para a precisão intra-ensaio de uma solução padrão dos analitos de 50 mg L<sup>-1</sup>, os valores de CV variaram entre 4,21 e 6,37% para

friedelan-3-ol e 3,92 até 7,10% para friedelin. O valor de CV para a amostra de *M. ilicifolia* foi inferior a 15% e, nestes ensaios, o valor de CV para o tempo de retenção foi menor que 0,5%.

No caso da precisão intermediária, os valores de CV para os padrões variou entre 7,31-10,25% para friedelan-3-ol e 5,07-6,15% para friedelin. Para as amostras de *M. ilicifolia*, os valores de CV variaram de 15,31-20,59% para friedelan-3-ol e 8,59-12,07% para friedelin. Ao avaliar o tempo de retenção para a solução padrão e para os analitos na amostra os valores de CV foram inferiores a 0,5%.

De acordo com Huber (2007), a precisão é um fator de que depende da complexidade da matriz, no caso de amostras alimentícias os valores de CV podem variar entre 2 – 20%. Deste modo, o emprego do modo MISER apresentou valores consideráveis para os parâmetros de validação de um método, indicando que este é um método preciso e pode ser aplicado em matrizes complexas, como é o caso de plantas. E ainda, o método proposto apresentou uma boa eficiência de separação entre os analitos, com valores elevados para o número de pratos.

**Tabela 2. 3** Avaliação da adequabilidade do sistema para a determinação de friedelan-3-ol e friedelin utilizando o modo MISER.

Parâmetros	Friedelan-3-ol	Friedelin
Precisão Instrumental, CV (%) – área do pico <sup>(a)</sup>	2,7 – 3,8 (2,3 – 4,2)	2,6 – 4,6 (2,4 – 2,8)
Precisão Instrumental, CV (%) – tempo de retenção <sup>(a)</sup>	0,1 – 0,2 (0,1 – 0,5)	0,1 – 0,2 (0,1 – 0,4)
Precisão Intra-ensaio, CV (%) – área do pico <sup>(a)</sup>	4,2 – 6,4 (10,2 – 14,5)	3,9 – 7,1 (7,7 – 13,4)
Precisão Intra-ensaio, CV (%) – tempo de retenção <sup>(a)</sup>	0,1 – 0,5 (0,1 – 0,4)	0,1 – 0,4 (0,1 – 0,4)
Precisão Intermediária, CV (%) - área do pico <sup>(a)</sup>	7,3 – 10,2 (15,3 – 20,5)	5,1 – 6,1 (8,6 – 12,1)
Precisão Intermediária, CV (%) - tempo de retenção <sup>(a)</sup>	0,1 – 0,5 (0,1 – 0,3)	0,1 – 0,4 (0,1 – 0,3)
Número de pratos <sup>(b)</sup>	15.206	23.582
Resolução	1,8-1,9	
Simetria de pico <sup>(b)</sup>	0,86-0,88	0,94-0,98

Resolução calculada (n=10) conforme a equação:  $R_s = 2(t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$ , onde  $t$  é o tempo de retenção do pico e  $w$  é a largura de base do pico. Concentração de friedelan-3-ol e friedelin em torno de 50 mg L<sup>-1</sup>. Valor médio de simetria de pico para n=10.

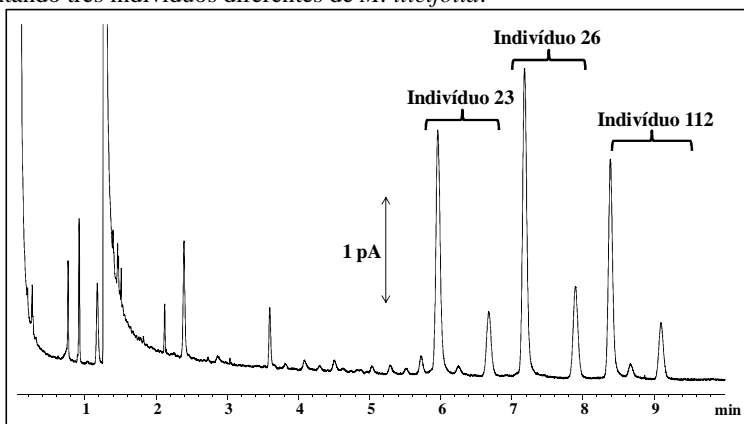
<sup>a</sup>Coefficiente de variação calculado através da equação:  $CV = (P/\bar{u}) \times 100$ , onde  $P$  é o desvio padrão absoluto e  $\bar{u}$  é a média aritmética da área do pico do analito ou média aritmética do tempo de retenção. Valor de CV para precisão instrumental (n=10) analisado na mesma solução; precisão intra-ensaio (n=6) e precisão intermediária (n=9). Valores entre parênteses representam as amostras dos extratos das folhas de *M. ilicifolia*.

<sup>b</sup>Número de pratos calculados para n = 10 de acordo com a equação:  $N = 16(t_i/w_i)^2$ , onde  $t_i$  é o tempo de migração (minutos) do analito e  $w_i$  é a largura de base deste analito.

#### 4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A fim de se avaliar a influência dos acúleos foliares presentes nas espécies de *Maytenus ilicifolia*, em relação à concentração dos triterpenos friedelan-3-ol e friedelin, foram analisados 111 indivíduos desta planta, as quais estão sob as mesmas condições de clima e solo. Apesar da complexidade da matriz de amostras, foi possível injetar três segmentos de diferentes amostras empregando o método MISER após *clean up* com SPE. Ao utilizar o modo MISER foi possível também notar a diferença entre os diferentes indivíduos em um mesmo cromatograma com relação à presença dos triterpenos, como se pode observar na Figura 2.5.

**Figura 2. 5** Cromatograma com a injeção de três segmentos de amostra, representando três indivíduos diferentes de *M. ilicifolia*.

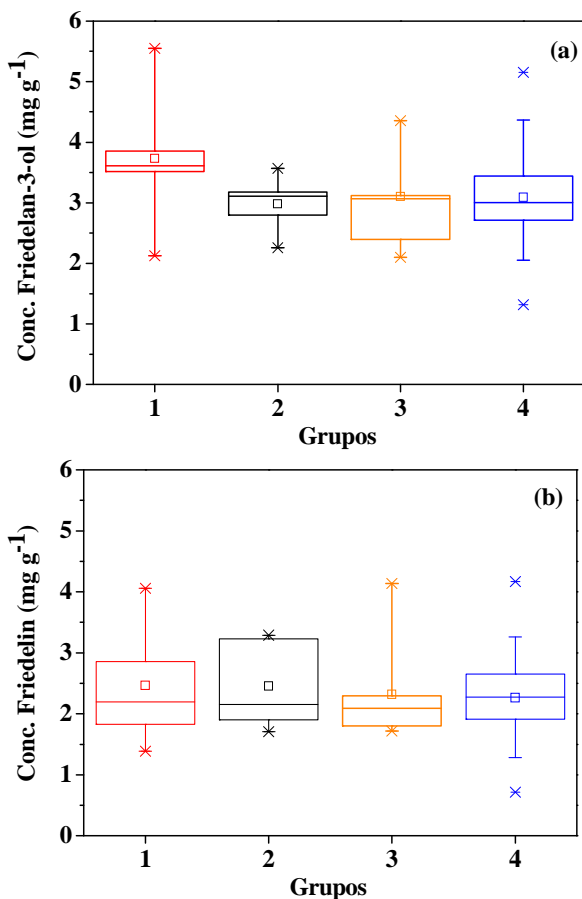


A variação das concentrações dos triterpenos friedelan-3-ol e friedelin em relação aos diferentes indivíduos de *M. ilicifolia* pode ser analisada na Figura 2.6. Esses diferentes indivíduos foram separados em quatro grupos, os quais estão relacionados à quantidade de acúleos foliares presentes.

Como o triterpeno friedelan-3ol é um isômero de posição (alfa e beta), a quantificação desses isômeros foi realizada por meio de uma única curva de calibração externa utilizando o padrão comercial. Sendo assim, a Figura 2.6(a), representa a soma das concentrações dos triterpe-

nos friedelan-3 $\alpha$ -ol e friedelan-3 $\beta$ -ol, cuja média variou entre 2,86 – 3,73 ( $\pm$  0,62) mg g<sup>-1</sup>. Já a concentração média de friedelin variou entre 2,26 – 2,47 ( $\pm$  0,15) mg g<sup>-1</sup> e esta variação pode ser observada na Figura 2.6(b).

**Figura 2. 6** Concentração dos triterpenos friedelan-3-ol (a) e friedelin (b) em relação aos grupos de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*.



**Grupo 1** - n<sup>o</sup> acúleos: 0 a 1; **Grupo 2** - n<sup>o</sup> acúleos: 0 a 4;  
**Grupo 3** - n<sup>o</sup> acúleos: 2 a 4 e **Grupo 4** - n<sup>o</sup> acúleos: 4 ou mais.

A fim de verificar se há diferença estatística entre os diferentes grupos de acúleos, uma vez que os indivíduos estão sob as mesmas condições de clima e de solo, inicialmente, avaliaram-se os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência de resíduos, porém, um desses pressupostos foi violado.

Diante disto, foi necessário utilizar o método não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as diferentes populações, o qual está descrito na Tabela 2.4. Com valores de p-valor  $> 0,05$ , com 95% de intervalo de confiança, isto indica que as concentrações de friedelan-3-ol e friedelin em todos os grupos são estatisticamente iguais. Apesar de alguns indivíduos apresentarem valores atípicos de concentração dos triterpenos dentro de um mesmo grupo (*outliers*: indivíduos 76 e 91 (friedelan-3-ol); indivíduos 69 e 118 (friedelin)), observou-se que não houve correlação entre a presença de acúleos e a concentração dos analitos estudados, isto é, os acúleos não influenciam no aumento da concentração dos triterpenos. Isto favorece a escolha de plantas com menor número de acúleos para o desenvolvimento de uma nova cultivar, uma vez que apresentam concentração adequada dos marcadores quimiota-xonômicos. A concentração individual de cada analito para cada indivíduo se encontra descrito no Anexo B.

**Tabela 2. 4** Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da concentração de friedelan-3-ol e friedelin.

	<b>Fatores Comparados (Grupos)</b>	<b>Diferença Observada</b>	<b>Diferença Crítica</b>	<b>Diferença</b>	<b>Kruskal-Wallis (Qui-quadrado)</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>p-valor</b>
<b>Friedelan-3-ol</b>	1 - 2	26,20	53,71		2,67	3	0,45
	1 - 3	22,55	48,41				
	1 - 4	23,86	38,98	Não			
	2 - 3	3,65	48,41				
	2 - 4	2,34	38,98				
	3 - 4	1,31	31,29				
<b>Friedelin</b>	1 - 2	2,40	53,71		0,26	3	0,97
	1 - 3	6,29	48,41				
	1 - 4	2,69	38,98	Não			
	2 - 3	8,69	48,41				
	2 - 4	5,09	38,98				
	3 - 4	3,59	31,29				

Até o momento, nenhum outro estudo foi realizado relacionando a concentração destes analitos com a presença de acúleos em *M. ilicifolia*, apenas a variação da concentração destes analitos em populações de diferentes localidades, conforme descrito por Mossi et al. (2010). Os autores avaliaram a distribuição química de friedelan-3-ol e friedelin em dezoito populações nativas de *M. ilicifolia* localizadas em diferentes cidades do Brasil. A concentração de friedelan-3-ol variou entre 3,52 – 16,41 mg g<sup>-1</sup> e de friedelin em torno de 2,61 – 10,50 mg g<sup>-1</sup>.

Apesar dos valores terem sido superiores aos encontrados no presente trabalho, alguns aspectos devem ser levados em consideração para a avaliação do perfil químico dos extratos obtidos de plantas medicinais, como por exemplo, a localização geográfica, época da colheita, condições climáticas, manejo de cultivo, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento.

#### 4.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM ALGUNS MÉTODOS DA LITERATURA

Algumas características do método MISER foram comparadas com outros métodos da literatura utilizados na determinação dos triterpenos friedelan-3-ol e friedelin e foram resumidas na Tabela 2.5.

Ao compararmos a frequência instrumental do método empregando MISER, apenas avaliando o tempo de análise instrumental, observou-se que o método proposto tem a vantagem de analisar mais amostras do que os outros métodos em um mesmo intervalo de tempo.

Embora o método analítico desenvolvido por Nossack et al., (2000) seja mais rápido quando comparado ao método que utiliza MISER, não foi possível verificar o tempo de preparo de amostra, que deve ser contabilizado para comparar a frequência analítica entre ambos os métodos.

Dentre os outros métodos descritos (YARIWAKE et al., 2005; TIAN et al., 2009; MOSSI et al., 2010), o método MISER foi superior, tanto em preparo de amostra quanto em tempo de análise instrumental.

Uma alternativa para um preparo de amostra mais rápido e aumentar ainda mais a frequência analítica do método seria a avaliação dos triterpenos na cera superficial da folha da *M. ilicifolia*, conforme estudo realizado por Maarseveen; Han e Jetter (2009). Contudo, um estudo aprofundado da representatividade das amostras e da planta como um todo deve ser realizado previamente, uma vez que as amostras não apresentaram uniformidade de tamanhos.



**Tabela 2. 5** Comparação entre o método proposto com outros métodos da literatura na determinação de friedelan-3-ol e friedelin.

PLANTA	PREPARO DE AMOSTRA	TÉCNICA	FREQ. INSTRUM.*	REFERÊNCIAS
<i>M. ilicifolia</i>	Extração+SPE (t=1,5 min por amostra)	GC-FID (t = 10 min)	13	VISTUBA et al., 2013
<i>M. aquifolium</i>	Extração com solvente orgânico (t=1 min) + SPE (não informado)	HTGC-FID (t = 5 min)	12	NOSSACK et al., 2000
<i>M. aquifolium</i>	Extração com solvente orgânico (t=1 min) + SPE (não informado)	GC-FID (t ~ 30 min)	3	YARIWAKE et al., 2005
<i>M. ilicifolia</i>	Extração por fluido supercrítico com CO <sub>2</sub> (t=90 min)	GC-MS (t = 90 min)	1	MOSSI et al., 2010
<i>Radix asteris</i>	Extração com solvente orgânico (t=60 min)	HPLC-ELSD (t=25 min)	2,4	TIAN et al., 2009
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Extração superficial da cera; (t=90 seg)	GC-MS (t = não informado)	-	MAARSEVEEN; HAN; JETTER, 2009

\*Frequência instrumental - Número de amostras por hora (considerando apenas o tempo de análise instrumental).



## 5 CONCLUSÕES

Neste capítulo foi apresentado um método que utiliza injeções múltiplas em uma mesma corrida com a técnica de GC- FID para análise dos triterpenos friedelin e friedelan-3-ol em extratos hexânicos de *M. ilicifolia*. Uma série de equações foi proposta para estimar o número de injeções possíveis em uma única corrida, incluindo o tempo de espera entre os métodos utilizados para este modo de injeção.

O método utilizado proporcionou um aumento na frequência instrumental por um fator de cerca de 2,5 quando se aplica o método MISER, em comparação com o método de injeção simples. Além disso, o método proposto apresentou bom desempenho analítico para os parâmetros de validação.

O detector FID utilizado contribuiu para limitar o número de injeções múltiplas no método devido à detecção não seletiva. O método MISER tem potencial para ser aplicado em outras colunas cromatográficas com diferentes fases estacionárias, bem como outros tipos de detecção mais seletivos, tais como espectrometria de massa. Assim, seria possível monitorar cada analito na sua razão massa/carga específica e aumentar o número de injeções na mesma corrida, contribuindo para melhor rendimento instrumental.

O método que utiliza múltiplas injeções poderia ser adaptado para uso em qualquer equipamento de GC convencional, ao contrário de outros métodos encontrados na literatura, que para aumentar a frequência instrumental utilizaram algum tipo de modificação instrumental. Uma sugestão, seria que o *software* do equipamento pudesse ser modificado de modo a permitir múltiplas injeções, sem a necessidade de criar métodos em sequência.

A etapa do preparo da amostra foi fundamental para o desenvolvimento do método MISER. O procedimento de *clean up* utilizando SPE permitiu a obtenção de um cromatograma com número reduzido de picos - favorecendo a injeção múltipla.

O método de injeção múltipla permitiu a quantificação dos triterpenos, friedelan-3-ol e friedelin em extratos de folhas de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*, cuja concentração média variou entre 2,86 – 3,73 ( $\pm 0,62$ ) mg g<sup>-1</sup> e 2,26 – 2,47 ( $\pm 0,15$ ) mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, permitiu comparar diferentes indivíduos em um mesmo cromatograma.

A partir do método não paramétrico de Kruskal-Wallis observou-se que não houve correlação entre os diferentes grupos de acúleos e os triterpenos para os diferentes grupos de *M. ilicifolia*. Este resultado auxilia na seleção das plantas para uma nova cultivar com menor número de acúleos.

## REFERÊNCIAS

BANICERU, M.; MANDA, C. V.; POPESCU S. M. Chromatographic analysis of local anesthetics in biological samples. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 54, p. 1-12, 2011.

BEREZKIN, V. G.; LAPIN, A. B.; MALYUKOVA, I. V.. Effect of efficiency improvement by injecting a sample at a lower carrier gas velocity in isothermal gas-liquid chromatography. **J. Chromatog. A**, v. 919, p. 357-361, 2001.

BICCHI, C. et al. High-speed gas chromatography with direct resistively-heated column (ultra fast module-GC)-separation measure (S) and other chromatographic parameters under different analysis conditions for samples of different complexities and volatilities. **J. Chromatog. A**, v. 1071, p. 3-12, 2005.

CHO, S. Sample stacking with in-column silylation for less volatile polar compounds using GC-MS. **J. Sep. Sci.**, v. 35, , p. 661-665, 2012.

DONATO, P. et al. Rapid analysis of food products by means of high speed gas chromatography. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 508-526, 2007.

HINZ, D. C. Development of a removable multi-column-switching system for gas chromatography. **J. Chromatog. A**, v. 1105, p. 87-94, 2006.

HUBER, L. Tutorial. Validation of Analytical Methods and Procedures. (2007). Disponível em:

[www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08\\_paramters](http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08_paramters)

Acessado em: 04 de fevereiro de 2014.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005).

KORYTÁR, P. et al. Practical fast gas chromatography: methods, instrumentation and applications. **T. Anal. Chem.**, v. 21, p. 558-572, 2002.

LEHOTAY, S. J.; HAJŠLOVÁ, J. Application of gas chromatography in food Analysis. **T. Analyt. Chem.**, v. 21, p. 686-697, 2002.

LODÉNA, H. et al. Quantitative determination of salbutamol in tablets by multiple-injection capillary zone electrophoresis. **J. Chromatog A**, v. 1207, p. 181-185, 2008.

MAARSEVEEN, C. V.; HAN, H.; JETTER, R. Development of the cuticular wax during growth of *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 73–81, 2009.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J.. Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatog. A**, v. 1000, p. 153-180, 2003.

MATISOVÁ, E.; DÖMÖTÖROVÁ, M.. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. **J. Chromatog. A**, v. 1000, p. 199-221, 2003.

MONDELLO, L. et al. Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry in the analysis of lipids. **J. Chromatog. A**, v. 1035, p. 237-247, 2004.

MOSSI, A. J.; et al. Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. **Quim. Nova**, v. 33, n. 5, p. 1067-1070, 2010

NOSSACK, A. C. et al. Quantitative Analysis of Triterpenes Friedelan-3- $\beta$ -ol and Friedelin in *Maytenus aquifolium* by High-Resolution Gas Chromatography and High-Temperature Capillary Gas Chromatography. **Phytochem. Anal.**, v 11, p. 243–246, 2000.

REID, V. R.; MCBRADY, A. D.; SYNOVEC, R. E.. Investigation of high-speed gas chromatography using synchronized dual-valve injection and resistively heated temperature programming. **J. Chromatog. A**, v. 1148, p. 236-243, 2007.

SANTOS, F.J.; GALCERAN, M.T. The application of gas chromatography to environmental analysis. **Trends Analyt. Chem.**, v. 21, p. 672-685, 2001.

SASAMOTO, K.; OCHIAI, N.; KANDA, H.. Dual low thermal mass gas chromatography–mass spectrometry for fast dual-column separation of pesticides in complex sample. **Talanta**, v. 72, p. 1637-1643, 2007.

TIAN, Y.; et al. Simultaneous Quantification of Three Major Triterpenoids in *Radix asteris* by Highperformance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. *Phytochem. Anal.* v. 20, p. 191–196, 2009.

TRANCHIDA, P. Q. et al. High-throughput analysis of bergamot essential oil by fast solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–flame ionization detection. **J. Chromatog. A**, v. 1103 p. 162-165.

TRAPP, O. Boosting the Throughput of Separation Techniques by “Multiplexing”. **Angewandte Chemie Int. Ed.**, v. 46 p. 5609-5613, 2007.

VITALI, L. et al. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations—Applications in iodide analysis. **J. Chromatog. A**, v. 1218 p. 4586-4591, 2011.

VISTUBA, J. P.; et al. Increasing the instrumental throughput of gas chromatography method using multiple injections in a single experimental run: Application in determination of friedelan-3-ol and friedelin in *Maytenus ilicifolia*. **J. Chromatog. A**, v.1274, p. 159–164, 2013.

WELCH, C. J. et al. MISER chromatography (multiple injections in a single experimental run): the chromatogram is the graph. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 1674-1681, 2010.

XU, F. et al. Fast temperature programming on a stainless-steel narrow-bore capillary column by direct resistive heating for fast gas chromatography. **J. Chromatog. A**, v. 1186, p. 183-188, 2008.

YARIWAKE, J. H. et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **R. Bras. Farmacog.**, v.15, n. 2, p. 162-168, Abr./Jun. 2005.



### **CAPÍTULO 3. Determinação de flavonóis em *M. ilicifolia* por eletroforese capilar de zona utilizando planejamento de experimentos**

#### **1 INTRODUÇÃO**

O emprego de plantas popularmente conhecidas por medicinais, como a *M. ilicifolia* no tratamento de algumas doenças é uma prática muito difundida no Brasil. O amplo interesse nesta espécie, juntamente com o aumento de sua utilização pela indústria farmacêutica, acentuou a importância do desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e controle de qualidade de seus princípios ativos, como forma de padronização de fitoterápicos, permitindo uma estimativa de possíveis marcadores quimiotaxonômicos (LEITE et al., 2001).

Dentre os princípios ativos encontrados na *M. ilicifolia* encontram-se os flavonóis, subgrupo da classe dos flavonoides. Estudos relatam diversas atividades farmacológicas para alguns flavonóis presentes nesta espécie, tais como, anti-inflamatória, antiulcerogênica e de redução da motilidade gastrointestinal (JORGE et al., 2004; BAGGIO et al., 2009; LEITE et al., 2010).

A determinação de compostos flavônicos e dos compostos fenólicos, em geral, pode ser realizada por meio de complexação com cloreto de alumínio, sendo analisada por espectrofotometria, cuja medida indica o teor de flavonoides totais, sem a possibilidade de identificar quais são os tipos presentes (HUANG et al., 2009; FERNANDES et al., 2012). Outra técnica empregada para a determinação destes compostos é a GC-MS, que, de acordo com estudo realizado por PROESTOS et al., (2006) e KUSKOSKI et al., (2012) apesar de apresentar seletividade superior quando comparado ao uso de outras técnicas, devido a especificidade do detector, o qual informa a massa molar dos analitos, ainda assim existe a necessidade de procedimentos de derivatização para a conversão dos analitos em compostos mais voláteis e estáveis, tornando o método laborioso.

A técnica mais empregada para a separação e quantificação dos compostos fenólicos é a HPLC-UV (LEITE et al., 2001; CHEN; ZUO; DENG, 2001; YARIWAKE et al., 2005) ou HPLC-MS/MS (TSIMOGIANNIS et al., 2007; DE SOUZA et al, 2008a; CUOCO; MATHE; VIEILLESCHAZES, 2014) ou a combinação dos mesmos (TIBERTI et al., 2007). Alguns

fatores são importantes para a análise destes compostos, tais como, a escolha da fase móvel e do tipo de coluna adequados, e ainda, a purificação das amostras complexas e/ou pré-concentração dos analitos com o emprego de cartuchos de SPE, a fim de melhorar a separação dos analitos se faz necessária (CHEN; ZUO; DENG, 2001; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

A eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) vem se mostrando uma técnica versátil para análises de compostos orgânicos e inorgânicos, uma vez que apresenta um custo operacional inferior quando comparada com as técnicas cromatográficas (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997). Além disso, apresenta vantagens como pequeno volume de injeção de amostra, alta eficiência de separação e tempos de análise apreciavelmente curtos. Essas características demonstram sua utilidade na determinação rápida e eficiente de compostos fenólicos em extratos vegetais (LUO et al., 2007). Dentre as modalidades da CE, a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*) e a cromatografia eletrocínética micelar vêm sendo empregadas para a determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes (TONIN et al., 2005; PERES et al., 2009; DIAGONE et al., 2012).

Devido à estrutura dos flavonoides apresentar grupos hidroxila, conforme elucidado no Capítulo 2 (*item 2.2.2*), o método por CZE mais encontrado na literatura para sua determinação é a partir da complexação com íons borato, o qual permite melhor eficiência na separação mesmo que os analitos não estejam completamente ionizados (MORIN; VILLARD; DREUX, 1993a; MORIN; VILLARD; DREUX, 1993b; WANG; HUANG, 2004; TONIN et al., 2005; PERES et al., 2009; DIAGONE et al., 2012).

Para o desenvolvimento de um método por CZE, é necessário avaliar alguns parâmetros, tais como: composição, força iônica e pH do eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*); tensão aplicada; temperatura de separação; tamanho do capilar; entre outros. Uma ferramenta que pode auxiliar na escolha dos parâmetros ideais de um método é o *software* Peakmaster, que permite uma simulação prévia de analitos cuja mobilidade seja conhecida, sem a necessidade de realizar procedimentos experimentais. Entretanto, a simulação para alguns compostos não é possível, como é o caso dos compostos fenólicos, uma vez que as mobilidades dos mesmos não são conhecidas. Diante disso, é possível utilizar o planejamento de experimentos (DOE, do inglês *de-*

*sign of experiment*) para o desenvolvimento de métodos analíticos para separação desses compostos. Esta ferramenta tem sido muito utilizada e mostra-se vantajosa e eficiente para o desenvolvimento e otimização de métodos de separação, uma vez que permitem a avaliação dos efeitos de interação entre as variáveis com um número reduzido de ensaios e torna possível a construção de modelos empíricos para a previsão de condições experimentais adequadas, tais como na escolha da composição do BGE, tempo de preparo de amostra, entre outros. Diversos são os trabalhos encontrados na literatura que vem empregando o DOE no desenvolvimento de métodos de separação por CE (ANURUKVORAKUN; SUNTORNSUK; SUNTORNSUK, 2006; PERES et al., 2009; MEINHART et al., 2011; BALLUS et al., 2011).

Dentre os trabalhos encontrados na literatura para a avaliação de flavonóis presentes em *M. ilicifolia* (TIBERTI et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008a; DIAGONE et al., 2012), até o presente momento, nenhum destes quantificou os flavonóis, apenas identificaram alguns flavonóis-3-O-glicosilados, derivados de quercetina e canferol.

Nesse contexto, o estudo apresentado neste capítulo propõe o emprego de DOE no desenvolvimento de um método para a separação e quantificação de flavonóis em extratos de *M. ilicifolia*. Diante disso, têm-se os objetivos do presente capítulo.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinação de flavonóis em *M. ilicifolia* por eletroforese capilar de zona com o auxílio do planejamento de experimentos na escolha dos parâmetros inerentes ao método, tais como composição do BGE e condições de hidrólise ácida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as concentrações adequadas de TBS e metanol para a composição do BGE empregando o DOE para a separação dos flavonóis presentes no extrato hidroalcoólico das folhas secas e moídas da *M. ilicifolia*;
- Propor um método rápido e eficiente de hidrólise ácida dos flavonóis presentes na amostra, selecionando a concentração de ácido clorídrico, temperatura e tempo de hidrólise utilizando DOE;
- Avaliar as agliconas presentes nos extratos hidroalcoólicos após o procedimento de hidrólise ácida, bem como a estabilidade das mesmas conforme a alteração do pH (2-8);
- Sugerir um método eficiente para a extração dos flavonóis da *M. ilicifolia*, avaliando a influência do tempo de sonicação e concentração adequada de metanol:água;
- Avaliar os parâmetros de validação do método: linearidade; limites de detecção e quantificação; precisão intra-ensaio e intermediária; e recuperação;
- Determinar o perfil dos 111 indivíduos de *M. ilicifolia* com relação à presença dos flavonóis e correlacionar com o número de acúleos;



### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

O solvente utilizado no procedimento de extração dos flavonóis foi metanol P.A. (MeOH) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro). Uma solução estoque de HCl  $8 \text{ mol L}^{-1}$  (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro) foi utilizada para o procedimento de hidrólise ácida. Para o procedimento de correção do pH, após a hidrólise ácida, utilizou-se uma solução estoque de Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) com concentração de  $1,23 \text{ mol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, São Paulo).

Para a composição do BGE, utilizou-se uma solução estoque de tetraborato de sódio (TBS)  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, São Paulo, ) e MeOH.

A solução estoque contendo o padrão interno (PI) metilparabeno foi de  $90 \text{ mg L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, São Paulo).

A curva de calibração externa foi preparada com soluções estoque dos padrões de canferol ( $1050 \text{ mg L}^{-1}$ ) e quercetina ( $1080 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, São Paulo) preparados em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) com diluições apropriadas contendo a concentração final de TRIS ( $0,41 \text{ mol L}^{-1}$ ), HCl ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) e PI ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

As análises dos flavonóis foram efetuadas em um equipamento de CE-UV-Vis (Agilent Technologies modelo 7100 CE). As determinações foram realizadas em  $390 \text{ nm}$ , com temperatura de  $25^\circ\text{C}$  em um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poli-imida (Polymicro Technologies, E.U.A.). Utilizou-se um capilar cujo comprimento total,  $L_{\text{tot}}$ , era de  $32 \text{ cm}$  ( $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno e  $375 \mu\text{m}$  de diâmetro externo) e comprimento até o detector,  $L_{\text{det}}$  de  $23,5 \text{ cm}$ . O condicionamento inicial do capilar foi realizado utilizando uma pressão de  $940 \text{ mbar}$  com trinta minutos com NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e em seguida, por mais trinta minutos com água desionizada (Milli-Q, Millipore, E.U.A.).

Para a determinação dos analitos ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ), utilizou-se como composição do BGE ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS e 20% MeOH). Inicialmente, o capilar foi condicionado com o BGE durante 10 minutos, em seguida,

empregou-se o modo de injeção hidrodinâmica 50 mbar (3 segundos, amostra) e um plug de água após a amostra (50 mbar, 5 s) e para separação dos analitos aplicou-se um tensão de 30kV (polaridade positiva na injeção). A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados utilizando o *software Chemstation*<sup>®</sup>, ver. A.06.01.

### 3.3 PREPARO DE AMOSTRA

#### 3.3.1 Planejamento de experimentos

As seguintes condições foram avaliadas utilizando planejamento de experimentos: concentração adequada de TBS e MeOH para a composição do BGE e concentração de HCl, temperatura e tempo de hidrólise dos flavonóis glicosilados.

##### 3.3.1.1 Composição do BGE para a separação dos flavonóis glicosilados

Para a separação dos analitos, a composição do BGE foi otimizada mediante um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com ponto central (três replicatas), variando as concentrações de TBS (10 – 30 mmol L<sup>-1</sup>) com MeOH (10 – 30%), conforme descrito na Tabela 3.1. A resposta para este planejamento fatorial foi correlacionada com o maior número de picos presentes. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o *software Action 2.6 (ESTATCAMP)*<sup>®</sup>.

**Tabela 3. 1** Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> como ponto central para o eletrólito de corrida.

Variáveis Independentes	Níveis		
	+1	0	-1
TBS (mmol L <sup>-1</sup> )	30	20	10
MeOH (%)	30	20	10

+ 1 - nível superior; 0 – ponto central; -1 – nível inferior;

Fonte: o próprio autor.

Deste modo, numa primeira etapa foi realizada a extração a partir das folhas de *M. ilicifolia*, segundo estudo de COLOMBO; LANÇAS e YARIWAKE, (2006), com algumas adaptações. Em um frasco de polipropileno fechado, um volume de 2 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v)



foram adicionados em 100 mg de planta seca e moída. Este extrato foi homogeneizado e submetido a extração por ultrassom (Cristofoli Ultrasonic Cleaner, 42 kHz) durante 90 segundos. Em seguida, o extrato foi centrifugado durante 2 min a 3000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante foi injetada no equipamento de CE para determinar de uma forma preliminar quantos flavonóis poderiam ser encontrados no extrato da folha de *M. ilicifolia*.

### 3.3.1.2 Hidrólise ácida dos flavonóis glicosilados

Para o procedimento de hidrólise ácida, foi realizado um planejamento fatorial,  $2^3$  com ponto central (com cinco replicatas), em que foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração de HCl (0,4 – 1,2 mol L<sup>-1</sup>); temperatura (70 – 110 °C); tempo de hidrólise (20 – 80 minutos) (Tabela 3.2). A resposta para este planejamento fatorial foi correlacionada com a concentração total das agliconas presentes. O tratamento dos resultados foi realizado utilizando o *software* Action 2.6 (ESTATCAMP<sup>®</sup>).

**Tabela 3. 2** Fatorial  $2^3$  com ponto central para hidrólise ácida.

Variáveis Independentes	Níveis		
	+1	0	-1
Temperatura (°C)	110	90	70
tempo (minutos)	80	50	20
HCl (mol L <sup>-1</sup> )	1,2	0,8	0,4

+ 1 - nível superior; 0 – ponto central; -1 – nível inferior;

Fonte: o próprio autor.

Em tubos de ensaio de vidro com tampa foram adicionados uma alíquota de 500 µL do extrato preparado como descrito na *Seção 3.3.1.1* com HCl (nas diferentes concentrações descritas na Tabela 3.2) e água desionizada, cuja diluição final manteve a proporção de 1:1 (v/v). Posteriormente, o tubo foi colocado na estufa sob diferentes temperaturas, e tempos, previstos no planejamento fatorial. Após a hidrólise, esperou-se o arrefecimento do tubo para então posterior correção do pH com uma solução de TRIS (2,4 mol L<sup>-1</sup>), juntamente com o P.I. A correção inicial do pH para 8,0 das amostras hidrolisadas foi realizada na proporção Amostra:TRIS:P.I. (1:1:1, v/v/v) e injetadas imediatamente no equipamento de CE.

Como procedimento final para a hidrólise ácida, em tubos de ensaios de vidro com tampa, em 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante dos extratos preparados de acordo com a *Seção 3.3.2.1* foram adicionadas alíquotas de HCl ( $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e água desionizada, mantendo a proporção final de diluição 1:1 (v/v). Os tubos de ensaio foram colocados em estufa a 110 °C por 15 minutos, e, após o arrefecimento da solução, uma alíquota do extrato hidrolisado foi diluída com TRIS ( $1,23 \text{ mol L}^{-1}$ ) e P.I. ( $90 \text{ mg L}^{-1}$ ) nas seguintes proporções 1:1:1 (Amostra:TRIS:P.I.) com pH final igual a 3,6, para posterior análise no CE.

### **3.3.2 Procedimento de extração**

Para o procedimento de extração foram avaliados os efeitos do MeOH (20-100%) e o tempo de sonicação (2-30 min). Como procedimento final, em tubos de ensaio com tampa, 2 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60 v/v) foram adicionados em 100 mg de planta previamente seca e moída. O extrato foi homogeneizado e submetido a extração por ultrassom (Cristofoli Ultrasonic Cleaner, 42 kHz) durante 20 minutos a 25 °C. Após, centrifugado a 3000 rpm por 2 minutos. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi submetida à hidrólise ácida.

### **3.3.3 Estudo de estabilidade das agliconas**

O procedimento para a avaliação da estabilidade das agliconas dos flavonóis após a hidrólise ácida foi desenvolvido em diferentes valores de pH (2, 4, 6 e 8), utilizando o TRIS para o ajuste. A amostra hidrolisada foi diluída com TRIS e PI nas proporções 1:1:1 (v/v/v), e, posteriormente injetadas no CE. O estudo da estabilidade foi avaliado por um período de 8 horas nos diferentes pHs.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO

#### 4.1.1 Composição do BGE para a separação dos flavonóis glicosilados utilizando planejamento de experimentos

Inicialmente, para o desenvolvimento do método proposto, foi necessário verificar quais eram os flavonóis presentes no extrato das folhas de *M. ilicifolia*, utilizando procedimento de extração segundo estudo de COLOMBO; LANÇAS e YARIWAKE, (2006), com algumas adaptações.

Sabe-se que, para que ocorra uma separação eletroforética em solução livre, é necessário que os analitos apresentem carga, seja positiva ou negativa, a qual depende do pKa e do pH da solução eletrolítica. Neste caso, para os compostos fenólicos o valor de pKa se encontra na faixa de 7 a 12 (WANG; HUANG, 2004; HYÖTYLÄINEN; KIVILOMPOLO, 2011), portanto, a composição do BGE deve apresentar um pH nesta faixa. Deste modo, um dos componentes do BGE escolhido foi o TBS ( $pK_a = 9,3$ ). Além de apresentar uma boa capacidade tamponante na faixa de pH de trabalho, o TBS é amplamente utilizado na separação de flavonoides por CE, pois o ânion borato forma complexos com os grupos hidroxila das agliconas e/ou falvonoides glicosilados, aumentando a seletividade da separação, sem a necessidade dos analitos estarem totalmente ionizados (MORIN; VILLARD; DREUX, 1993a; MORIN; VILLARD; DREUX, 1993b; LUO et al., 2007). A faixa de concentração de TBS avaliada no presente estudo foi de 10 - 30 mmol L<sup>-1</sup>, conforme descrito no planejamento de experimentos.

Para melhorar a solubilidade dos analitos foi necessário a adição de um modificador orgânico na composição do BGE, neste caso, escolheu-se o MeOH (10-30%). De acordo com PERES et al., (2009), apesar do emprego de modificadores orgânicos aumentar o tempo de análise, uma vez que ocorre uma diminuição na velocidade do fluxo eletrosmótico, contudo, pode reduzir a corrente elétrica, evitando um aquecimento no interior do capilar pelo efeito Joule.

Para a escolha da concentração eletrólito de corrida buscou-se como resposta o maior número de picos eletroforéticos em um menor tempo de análise, sem o comprometimento da resolução entre os anali-

tos (Tabela 3.3). Outro fator determinante para a escolha do eletrólito de corrida foi a corrente elétrica registrada, suficiente para não causar quedas ou eletrólise provocadas pelo efeito Joule.

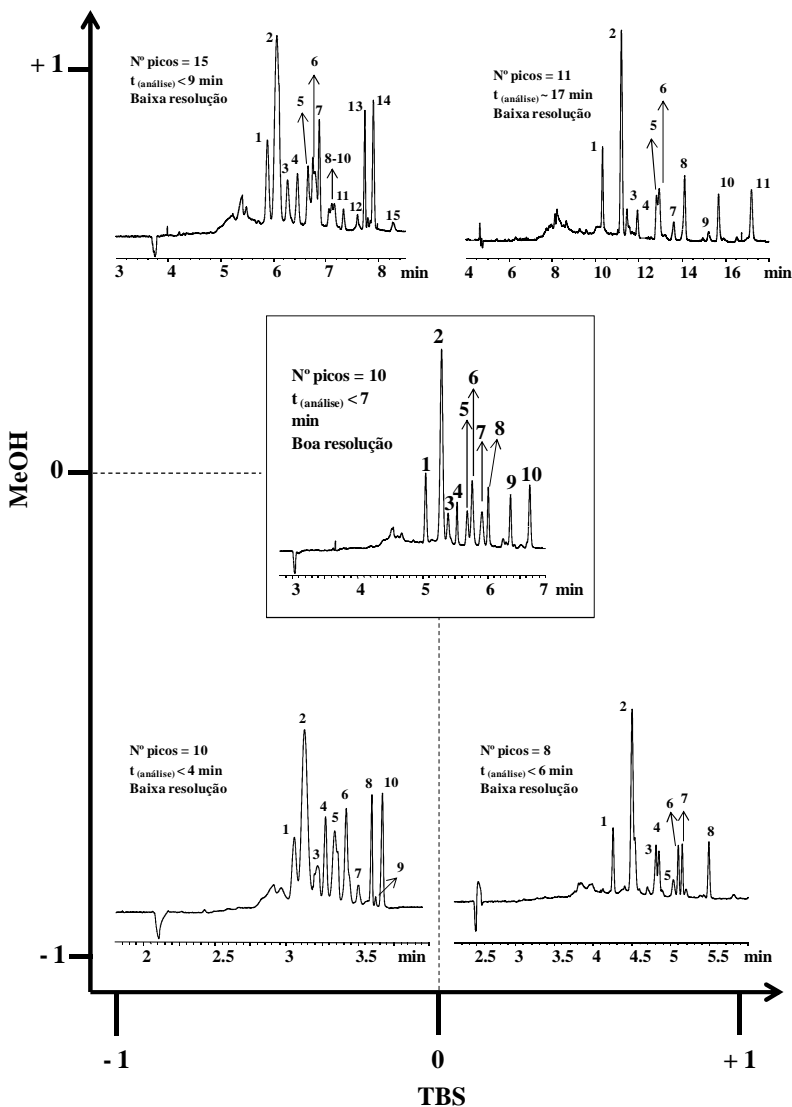
**Tabela 3. 3** Dados do planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central para a escolha da composição do BGE em função do número de picos.

Experimentos	TBS (mmol L <sup>-1</sup> )	MeOH (%)	Número Picos	t <sub>análise</sub> (min)
<b>1</b>	-1	-1	10	4
<b>2</b>	-1	+1	15	9
<b>3</b>	+1	-1	8	6
<b>4</b>	+1	+1	11	17
<b>5</b>	0	0	10	7
<b>6</b>	0	0	10	7
<b>7</b>	0	0	10	7

Em uma avaliação preliminar foi empregado um método para separação dos flavonóis utilizando um capilar cujo comprimento total foi de 48,5 cm (50  $\mu\text{m}$  diâmetro interno x 375  $\mu\text{m}$  diâmetro externo) e comprimento efetivo de 40 cm, com injeção hidrodinâmica (50 mbar, 3 s), tensão de 30 kV (polaridade positiva).

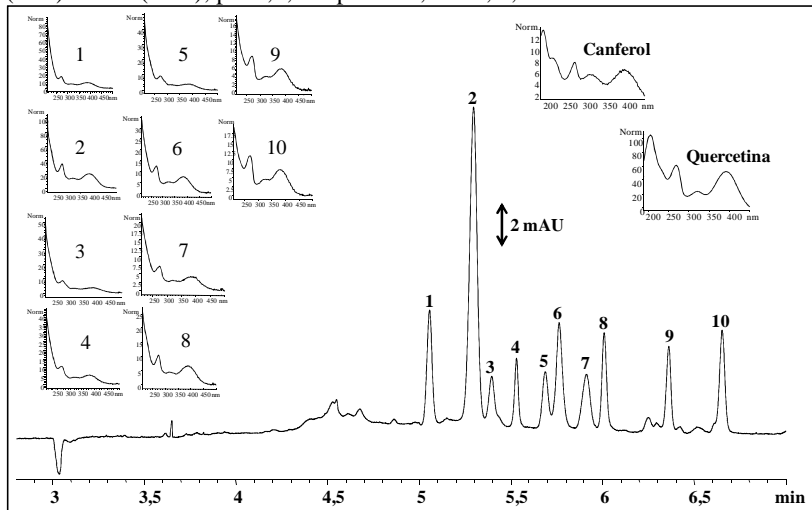
Ao analisar os resultados do planejamento fatorial, observou-se que a melhor condição para a separação de analitos (picos,  $n = 10$ ) e que mostrou melhor resolução foi empregando uma concentração de TBS de 20 mmol L<sup>-1</sup> com 20% de MeOH (v/v) cujo pH aparente é 9,5, conforme mostrado na Figura 3.1. Além disso, nessa condição obteve-se um tempo de análise inferior a 7 min, e ainda, obteve-se um valor de corrente elétrica próximo a 50  $\mu\text{A}$ , considerado um valor adequado, evitando o aquecimento do sistema por efeito Joule.

**Figura 3. 1** Resposta do planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, para escolha do eletrólito de corrida, variando as concentrações de TBS e MeOH. Outras condições de separação: injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 s; tensão, 30 kV, polaridade positiva; capilar, 48,5 cm ( $L_{tot}$ ), 40 cm ( $L_{det}$ ); temperatura, 25°C.



A Figura 3.2 apresenta o eletroferograma ampliado utilizando as condições escolhidas para a composição do BGE, no qual apresentou dez picos. Alguns estudos publicados na literatura mostram que os flavonóis glicosilados encontrados em plantas do gênero *Maytenus spp.* são derivados de quercetina e canferol (LEITE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008b; BAGGIO et al., 2009). Diante disso, fez-se a adição de padrões de alguns flavonóis glicosilados e agliconas, porém não foi possível a identificação de nenhum dos picos presentes. Contudo, por meio de comparação dos espectros de UV-Vis, notou-se uma similaridade com os espectros dos padrões de canferol e quercetina. Todavia, para investigar esta informação, foi necessário realizar um procedimento de hidrólise ácida e verificar as possíveis agliconas que compõem os flavonóis glicosilados.

**Figura 3. 2** Eletroferograma de um extrato da planta *M. ilicifolia*. Condições de separação: injeção hidrodinâmica, 50 mbar, 3 s; tensão, 30 kV, polaridade positiva; eletrólito de corrida, TBS 20 mmol L<sup>-1</sup>, MeOH 20%; capilar, 48,5 cm (Ltot) 40 cm (Ldet); pH 9,5; temperatura, 25°C;  $\lambda$ , 390 nm.



## 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

### 4.2.1 Otimização do procedimento de hidrólise ácida dos flavonóis utilizando planejamento de experimentos

Para a determinação das agliconas dos flavonóis foi necessário realizar um procedimento de hidrólise ácida, na qual se quebra a ligação glicosídica entre a aglicona e as moléculas de açúcar. O resultado da hidrólise depende diretamente da molaridade do ácido utilizado, do tempo empregado, da temperatura e da composição do solvente extrator utilizado na etapa que antecede esse procedimento (WACH; P-YRZYN´SKA; BIESAGA, 2007).

A hidrólise ácida comumente utilizada para flavonóides glicosilados requer a adição de ácido clorídrico concentrado (1:1) mantendo o sistema fechado sob aquecimento a uma temperatura de 100 °C durante uma hora (ONISZCZUK; HAWRYT, 2011). No entanto, existem relatos que descrevem outras condições para o procedimento de hidrólise ácida de flavonóides glicosilados, seja alterando a temperatura, concentração de ácido ou tempo da hidrólise (WANG; HELLIWELL, 2001; NUUTILA; KAMMIOVIRTA, OKSMAN-CALDENTY, 2002; MOLN´AR-PERL; FÜZ-FAI, 2005; BAE et al., 2012; BIZZOTTO et al., 2012).

Contudo, a fim se obter um procedimento mais rápido, fez-se uso de um planejamento fatorial com a avaliação da concentração de HCl; tempo e temperatura da hidrólise, conforme descrito no procedimento experimental (*Seção 3.3.1.2*). Os níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial foram baseados nos trabalhos descritos por Molnár-Perl e Füzfai (2005), e a resposta avaliada foi a concentração dos analitos após cada experimento do planejamento fatorial. Antes das amostras hidrolisadas serem injetadas no equipamento de CE, ajustou-se o pH próximo de 8 com a adição de TRIS (2,4 mol L<sup>-1</sup>).

A Figura 3.3 ilustra os eletroferogramas referentes à separação dos analitos na amostra hidrolisada (a), mistura de padrões de canferol e quercetina (b) e amostra hidrolisa com adição de padrão de canferol e quercetina. A Figura 3.3 (a) indica que após o procedimento de hidrólise, apenas duas agliconas foram determinadas, o canferol e a quercetina. A presença majoritária destas agliconas foi também confirmada por Diagone et al., (2012). A Figura 3.3 (b) apresenta a separação dos padrões dos analitos, com um tempo de migração semelhante àquele evidenciado

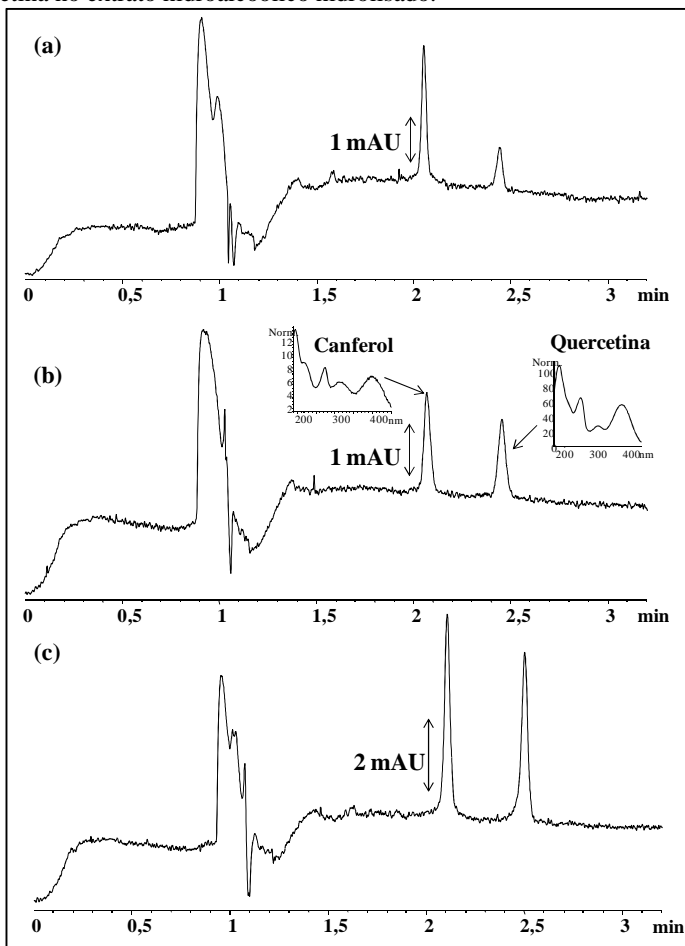
na amostra. Após o procedimento de adição de padrão na amostra, Figura 3.3 (c), e ainda, por meio da similaridade dos espectros de UV, confirmou-se a presença das agliconas majoritárias após a hidrólise do extrato da planta.

Sendo assim, o método desenvolvido inicialmente para a determinação dos flavonóis glicosilados foi modificado a fim de reduzir o tempo de análise, uma vez que apenas as duas agliconas foram identificadas. Para isso foi utilizado um capilar de 32 cm ( $L_{total}$ ) 23,5 cm ( $L_{det}$ ) (50  $\mu$ m d.i. x 375  $\mu$ m d.e.). As amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente (50 mbar, 3s) seguido de um *plug* de água desionizada (50 mbar, 5 s). A injeção de um volume de água após a injeção da amostra teve como objetivo diminuir os efeitos advindos da elevada força iônica da amostra, cuja concentração de ácido era elevada.

Para corrigir possíveis erros na injeção o metilparabeno foi escolhido como padrão interno, devido a suas propriedades semelhantes as dos analitos, uma vez que este tem um pKa próximo a dos analitos (pKa ~8,4), e ainda, tem capacidade de absorver radiação na região do UV ( $\lambda$  305 nm) sem interferir na separação dos mesmos.



**Figura 3. 3** Eletroferograma de um extrato da planta *M. ilicifolia*. Condições de separação: injeção hidrodinâmica, 50 mbar, 3 s (amostra) + 50 mbar, 5 s (água desionizada); tensão, 30 kV, polaridade positiva; eletrólito de corrida, TBS 20 mmol L<sup>-1</sup>, MeOH 20 %; capilar, 32 cm (L<sub>tot</sub>) 23,5 cm (L<sub>det</sub>); pH 9,5; Temperatura, 25 °C; λ, 390 nm. (a) extrato hidroalcoólico hidrolisado; (b) mistura dos padrões canferol e quercetina (50 mg L<sup>-1</sup>); (c) adição de padrões de canferol e quercetina no extrato hidroalcoólico hidrolisado.



Sendo assim, as respostas avaliadas para cada experimento do planejamento fatorial estão representadas pela concentração total das agliconas canferol e quercetina (Tabela 3.4). É possível observar que o experimento 4 (+1 +1 -1) apresentou maior rendimento na hidrólise e o experimento 1 (-1 -1 -1) teve um rendimento inferior a todos os outros. Isto quer dizer que a modificação das variáveis temperatura e concentração de HCl do menor nível para o maior nível afetaram positivamente o rendimento da reação de hidrólise. Contudo, a variável tempo não apresentou efeito significativo, nestes dois experimentos.

**Tabela 3. 4** Concentração total de agliconas a partir do planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central para o procedimento de hidrólise.

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Agliconas* (mg g <sup>-1</sup> )	Canferol	Quercetina
	T (°C)	HCl (mol L <sup>-1</sup> )	tempo (min)		(mg g <sup>-1</sup> )	(mg g <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	-1	-1	-1	<b>0,11</b>	0,06	0,05
<b>2</b>	1	-1	-1	0,30	0,18	0,12
<b>3</b>	-1	1	-1	0,14	0,08	0,06
<b>4</b>	1	1	-1	<b>0,49</b>	0,26	0,23
<b>5</b>	-1	-1	1	0,17	0,07	0,10
<b>6</b>	1	-1	1	0,19	0,09	0,10
<b>7</b>	-1	1	1	0,23	0,15	0,08
<b>8</b>	1	1	1	0,23	0,12	0,11
<b>9</b>	0	0	0	0,36	0,26	0,10
<b>10</b>	0	0	0	0,27	0,18,	0,09
<b>11</b>	0	0	0	0,34	0,16	0,18
<b>12</b>	0	0	0	0,30	0,10	0,20
<b>13</b>	0	0	0	0,32	0,19	0,,13

\*Agliconas – soma das concentrações de quercetina e canferol (mg g<sup>-1</sup>);

Fonte: o próprio autor.

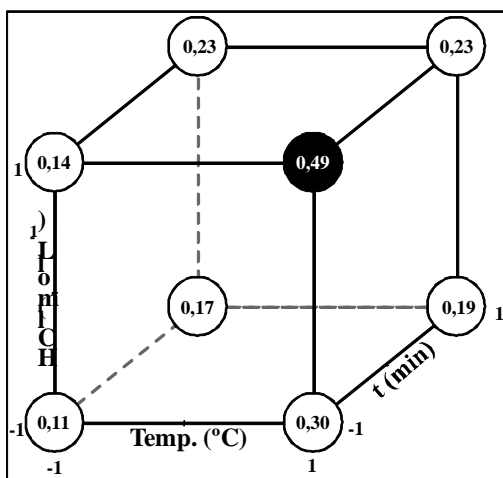
A Tabela 3.5 apresenta os valores obtidos dos coeficientes dos fatores (concentração de HCl, temperatura e tempo) e seus efeitos individuais, bem como sua possíveis interações. É possível observar que o fafor temperatura apresenta um coeficiente positivo e  $p < 0,05$ , assim como, o fator concentração de HCl. Isto confirma o efeito positivo no rendimento da reação conforme descrito anteriormente. Já o fator tempo não apresenta efeito significativo na resposta do experimento. Contudo, a interação entre os fatores temperatura e tempo indica um efeito negativo (coeficiente negativo e  $p < 0,05$ ), isto é, a quanto maior a temperatura, menor é o tempo necessário para a reação de hidrólise ocorrer. Uma

maneira de representar os resultados deste planejamento fatorial foi por meio do gráfico de cubos (Figura 3.4.). Desta forma, o experimento que apresentou maior concentração para canferol e quercetina foi para o experimento 4 quando o extrato de *M. ilcifolia* foi submetido à hidrólise com HCl 1,2 mol L<sup>-1</sup>, temperatura de 110 °C por 20 minutos.

**Tabela 3. 5** Valores obtidos para os coeficientes, erro padrão, teste-t e p-valores a partir do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

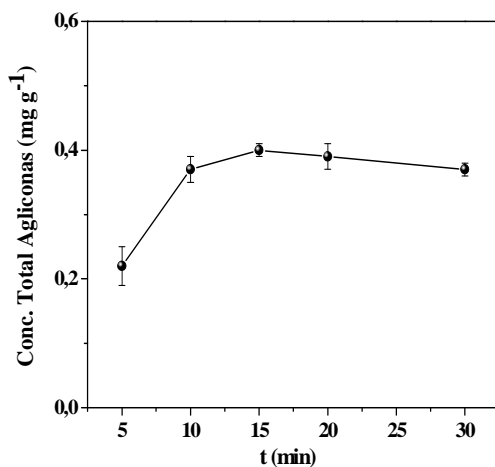
Fatores	Coefficiente	erro	Teste t	p-valor
<b>b0</b>	0,265	0,009	27,395	1,1x10 <sup>-5</sup>
<b>X<sub>1</sub> b1</b>	<b>0,070</b>	<b>0,012</b>	<b>5,668</b>	<b>0,005</b>
<b>X<sub>2</sub> b2</b>	<b>0,040</b>	<b>0,012</b>	<b>3,239</b>	<b>0,032</b>
<b>X<sub>3</sub> b3</b>	-0,028	0,012	-2,227	0,089
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> b12</b>	0,018	0,012	1,417	0,229
<b>X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> b13</b>	<b>-0,065</b>	<b>0,012</b>	<b>-5,264</b>	<b>0,006</b>
<b>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> b23</b>	-0,015	0,012	-1,214	0,291
<b>X<sub>123</sub> b123</b>	-0,023	0,012	-1,822	0,142

**Figura 3. 4** Gráfico de cubo relacionando a resposta da análise do planejamento fatorial para a hidrólise ácida, cujo produto final é concentração total de agliconas (canferol e quercetina) em mg g<sup>-1</sup>. Parâmetros avaliados: T = 80 a 110 °C; [HCl] = 0,4 a 1,2 mol L<sup>-1</sup> e tempo = 20 a 80 minutos.



Uma vez que a variável tempo não apresentou efeito positivo ou negativo nos valores de rendimento da hidrólise ácida, foi realizado então um estudo univariado com variação apenas do tempo ( $t = 5$  a 30 minutos) e fixando-se os parâmetros de concentração de HCl ( $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e temperatura ( $T = 110 \text{ }^\circ\text{C}$ ), buscando com isso uma diminuição do tempo de hidrólise. A Figura 3.5 ilustra o resultado deste ensaio, em que foi possível observar uma correlação positiva entre o tempo e o rendimento da hidrólise. Desta forma, a reação de hidrólise atingiu sua estabilidade em torno de quinze minutos. Com isso, concluiu-se que as condições adequadas de hidrólise foram HCl ( $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

**Figura 3. 5** Avaliação univariada para hidrólise ácida, mantendo-se temperatura ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e concentração de ácido ( $\text{HCl}=1,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) constantes e variando o tempo de aquecimento de 5 a 30 minutos.



Em um trabalho realizado por WACH, PYRZYŃSKA e BIESAGA (2007) em que foi avaliado o procedimento de hidrólise ácida a fim de obter a aglicona quercetina em diferentes matrizes, tais como vegetais, frutas e ervas. Os autores verificaram que, ao realizarem o procedimento de hidrólise empregando HCl  $2,8 \text{ mol L}^{-1}$  com refluxo a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por cinco minutos, um melhor rendimento foi obtido. Porém, no presente estudo, para concentrações maiores que  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido, os analitos sofre-

ram degradação e não foram detectados no CE (dados não apresentados). Diante disso, houve a necessidade de se estudar a estabilidade dos flavonóis frente ao procedimento de preparo de amostra.

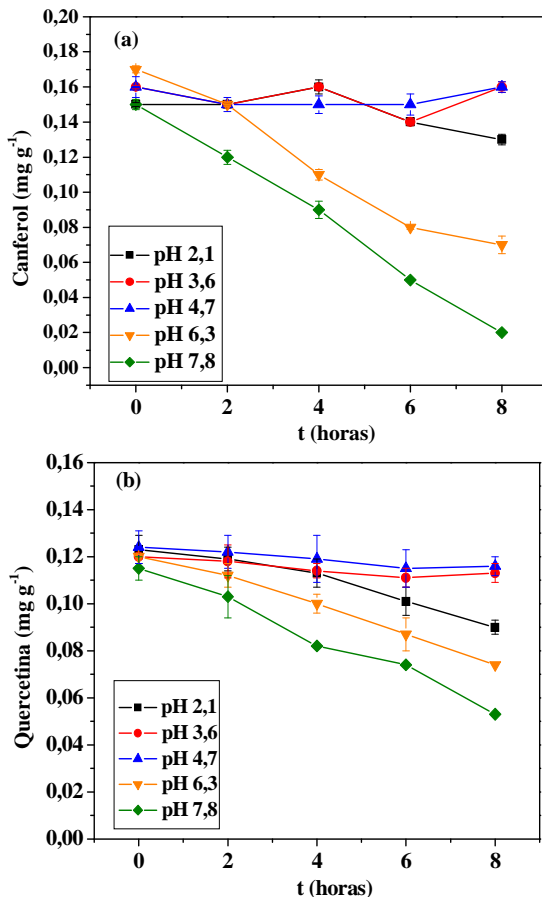
#### **4.2.2 Estudo da estabilidade do pH nos flavonóis após a hidrólise ácida**

Devido ao caráter antioxidante dos flavonóis, estes devem ser estabilizados. Por isso, foi realizado um estudo do efeito do pH após a hidrólise a fim de verificar a estabilidade da quercetina e canferol.

Nos ensaios o agente utilizado para a correção do pH foi o TRIS, uma base fraca e que tem a vantagem de captar prótons da solução, aumentando o pH da mesma, sem aumentar a força iônica do meio, sendo isto uma vantagem em análises por CE. Esse procedimento aliado a adição de um *plug* de água após o da amostra, favoreceu a diluição da amostra, bem como a diminuição da força iônica e promoveu uma separação adequada dos analitos. Um estudo realizado por Bizzotto et al., (2012) utilizou o hidróxido de sódio para alterar o pH do meio, porém, para este estudo, isto não seria vantajoso, uma vez que acarretaria em um aumento da força iônica, devido a presença de íons hidróxido e sódio, dificultando a separação dos analitos.

A Figura 3.6 esboça o efeito do pH (2, 4, 6 e 8) na concentração dos analitos ao longo de um estudo de oito horas. Durante este estudo, observou-se que as amostras submetidas a um valor de  $\text{pH} > 6$  depois de algum tempo foi observada uma diminuição na concentração de canferol e quercetina, até não ser mais detectada pelo método. Uma possível explicação seria que o pH mais elevado pode comprometer a estrutura das agliconas, conforme estudo de HU et al., (2010). Além disso, observou-se que para pH próximo a 2, ocorreu uma redução na concentração da quercetina. Diante disso, o valor mais adequado de pH para realizar as análises das amostras após o procedimento de hidrólise se encontra na faixa de  $\text{pH} = 3,6$ .

**Figura 3. 6** Estudo do efeito do pH na concentração dos flavonóis (a) canferol e (b) quercetina em função do tempo.



#### 4.2.3 Extração dos flavonóis

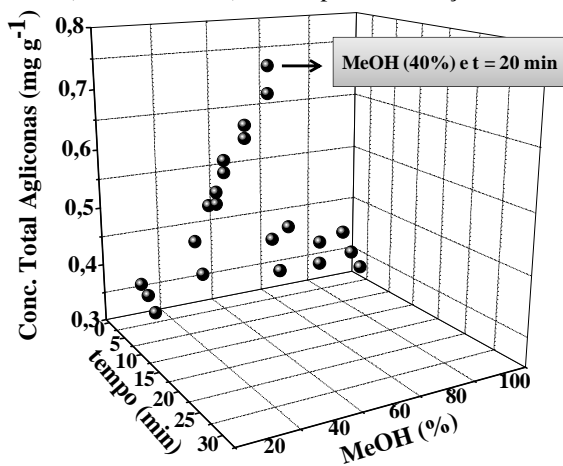
A fim de encontrar uma condição adequada para o procedimento de extração, avaliou-se os efeitos do MeOH (20-100%) e do tempo de sonicação (2-30 min) a temperatura ambiente (25°C). Este procedimento teve como melhor resposta o rendimento em função da concentração

total de canferol e quercetina (após hidrólise). Os valores previstos foram baseados em trabalhos anteriores (COLOMBO; LANÇAS; YARIWAKE, 2006; YANG; ZHANG, 2008).

A Figura 3.7 mostra a extração das agliconas em função do tempo de sonicação e porcentagem de MeOH. À medida que o tempo de sonicação aumentava, o rendimento da extração era mais efetivo, porém com uma porcentagem menor de MeOH (40%). Barboza e Serra (1992) concluíram que devido ao efeito de cavitação provocado pelo emprego do ultrassom em reações químicas, este tipo de preparo de amostra apresenta vantagens como a redução do tempo de reação; redução da quantidade de reagentes/solventes; aumento de rendimento; favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais.

Portanto, como procedimento final para a extração dos analitos empregou-se 40% de MeOH (v/v) a 25 °C por 20 minutos em ultrassom. Outros estudos da literatura comprovam que a extração hidroalcoólica, seja com metanol ou etanol, de agliconas e flavonoides glicosilados são mais efetivas, pois esta mistura de solventes causa a ruptura das membranas celulares e aumenta o potencial extrator do interior das células (ROBARDS, 2003; MOLNÁR-PERL; FÜZFAI, 2005; WACH; P-YRZYN´SKA; BIESAGA, 2007; BAE et al., 2012).

**Figura 3. 7** Estudo da extração dos flavonóis mantendo-se a temperatura a 25°C e variando MeOH (20 - 100 %, v/v) e o tempo de sonicação de 2 a 30 minutos.



### 4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A avaliação dos parâmetros do método proposto para a determinação de canferol e quercetina nos extratos das amostras de folha de *M. ilicifolia* foi realizada de acordo com as diretrizes do ICH (2005). Os parâmetros analisados foram: linearidade da curva de calibração externa; limites de detecção e quantificação; precisão intra-ensaio e intermediária; e recuperação.

A Tabela 3.6 apresenta os valores obtidos para as curvas de calibração externa referente aos analitos canferol e quercetina, com um intervalo linear de 10,5-73,5 e 10,8-75,6 mg L<sup>-1</sup> (com sete níveis de concentração), respectivamente, com um coeficiente de determinação,  $R^2 > 0,99$ . Todas as duas curvas foram preparadas em duplicata e injetadas duas vezes para se ter uma média dos valores. Uma outra maneira de verificar o ajuste do modelo linear foi realizada a partir do teste F, o qual indicou um valor maior para o  $F_{\text{calculado}}$  do que o  $F_{\text{crítico}}$  (95% de confiança) para os dois analitos, e isto indica que o modelo linear tem significância estatística.

Os valores de LD e LQ para canferol foram 2,1 ( $\pm 0,2$ ) mg L<sup>-1</sup> e 6,2 ( $\pm 0,5$ ) mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, e para a quercetina os respectivos valores foram 3,0 ( $\pm 0,1$ ) mg L<sup>-1</sup> e 8,4 ( $\pm 0,3$ ) mg L<sup>-1</sup>.



**Tabela 3. 6** Parâmetros das curvas de calibração externa das soluções padrão de canferol e quercetina.

Parâmetros	Canferol	Quercetina
Linearidade – faixa de calibração (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>	10,5 – 73,5	10,8 – 75,6
Linearidade – inclinação (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>	0,014	0,013
Desvio padrão – inclinação	0,001	0,001
Linearidade-intercepto <sup>(a)</sup>	-0,020	-0,052
Desvio padrão – intercepto	0,002	0,002
R <sup>2</sup>	0,999	0,997
LD (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>	2,1	3,0
LQ (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>	6,2	8,4
F <sub>calculado</sub> <sup>(c)</sup>	782,90	396,09
t <sub>calculado</sub> <sup>(d)</sup>	-0,37	0,64

<sup>(a)</sup> Curva de calibração com sete níveis de concentração, cada ponto da curva preparado em duplicata e foi injetado em duplicata.

<sup>(b)</sup> Limites de detecção e quantificação calculados a partir das equações:  $LD = (3.3 \times s)/S$ ;  $LQ = (10 \times s)/S$ , onde  $s$  é o desvio padrão do intercepto e  $S$  é a inclinação da curva analítica.

<sup>(c)</sup> Teste F: F<sub>crítico</sub> = 6,61; sendo  $\alpha = 0,05$ .

<sup>(d)</sup> Teste t; t<sub>crítico</sub> = 4,3; sendo  $\alpha = 0,05$ .

Para avaliar o efeito da matriz, foi realizado um estudo de comparação entre a curva de calibração externa e a curva com adição de padrão. O valor da inclinação da curva de calibração externa para o canferol foi de 0,014 ( $\pm 0,001$ ), enquanto o valor correspondente para a curva de adição de padrão foi de 0,014  $\pm$  (0,002). Já os valores de inclinação das curvas para quercetina foram 0,013 ( $\pm 0,001$ ) e 0,014 ( $\pm 0,001$ ), respectivamente. A partir do teste t, observou-se que não houve diferença significativa entre as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão, pois os valores de t<sub>calculado</sub> foram inferiores ao t<sub>crítico</sub>, para 95% de confiança, para ambos os analitos. Isto sugere que não houve efeito de matriz, indicando que o método apresenta seletividade.

Os ensaios de recuperação empregando o método desenvolvido foram realizados em cinco níveis de concentração, apresentando bons valores com relação as concentrações adicionadas. A Tabela 3.7 mostra

os resultados da recuperação para os dois analitos, os quais variaram entre 99-103% para o canferol e 96-100% para a quercetina, indicando que o método proposto apresentou boa exatidão.

**Tabela 3. 7** Resultados dos ensaios de recuperação dos analitos canferol e quercetina do extrato de *M. ilicifolia* usando o método proposto.

Analitos	Concentração (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>(a)</sup>		Recuperado (%) <sup>(b)</sup>
	Adicionado	Encontrado	
Canferol	10,5	10,7 (± 0,3)	101,7 (± 2,5)
	15,8	15,8 (± 0,3)	100,4 (± 1,9)
	21,0	21,7 (± 0,5)	103,1 (± 2,2)
	31,5	31,5 (± 0,1)	99,9 (± 0,3)
	42,0	41,9 (± 1,1)	99,7 (± 2,6)
Quercetina	10,8	10,7 (± 0,4)	98,8 (± 3,6)
	16,2	15,6 (± 0,4)	96,3 (± 2,3)
	21,6	21,6 (± 0,3)	100,2 (± 1,5)
	32,4	32,5 (± 1,2)	100,2 (± 3,7)
	43,2	42,7 (± 0,7)	99,0 (± 1,6)

<sup>(a)</sup> Valores de recuperação dos padrões adicionados ao extrato de *M. ilicifolia*.

Inclinação: canferol 0,014 (± 0,002) e quercetina 0,014 (± 0,001) Concentração de canferol e quercetina na amostra foi de 19,27 mg L<sup>-1</sup> and 18,67 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

<sup>(b)</sup> Média dos resultados de duas medidas de uma replicata (n=2).

A Tabela 3.8 apresenta outros parâmetros de avaliação do método proposto e estão representados pelo CV. A precisão instrumental foi determinada com uma solução dos padrões de canferol e quercetina (aproximadamente 30 mg L<sup>-1</sup>), e também em uma amostra de extrato das folhas de *M. ilicifolia* (valores entre parênteses). Os valores de CV para a variação da área do pico dos padrões dos analitos foram inferiores a 3%. Quando se avaliou a amostra de *M. ilicifolia* os valores de CV foram inferiores a 5% para ambos os analitos. Já o valor de CV para o tempo de migração tanto dos picos dos padrões quanto na amostra foi inferior a 1%.

Para a precisão intra-ensaio de uma solução padrão dos analitos de aproximadamente 30 mg L<sup>-1</sup>, os valores de CV para área foram

inferiores a 5%, no entanto, para a amostra variou entre 6 – 8% para os dois analitos. Neste ensaio, o valor de CV para o tempo de migração foi próximo a 1%, tanto para os padrões quanto para a amostra.

No caso da precisão intermediária, os valores de CV para os padrões e amostra variaram entre 6 - 7%. Já para o tempo de migração, o valor de CV foi inferior a 5%, tanto para padrões quanto para amostra.

O método proposto apresentou valores satisfatórios de CV, sendo que o valor esperado para matrizes complexas se encontra entre 2 e 20% (HUBER, 2007), indicando que o método tem boa precisão e pode ser aplicado para amostras complexas, como por exemplo, matrizes de plantas. Além disso, o método apresentou uma boa eficiência para a separação dos analitos com uma resolução de 7,2 e o número de pratos elevados 81.622 e 101.697, para canferol e quercetina, respectivamente.

**Tabela 3. 8** Avaliação de parâmetros do método proposto para a determinação de canferol e quercetina.

Parâmetros	Canferol	Quercetina
Precisão Instrumental, CV (%) – área do pico <sup>(a)</sup>	2,86 (3,57)	2,57 (4,29)
Precisão Instrumental, CV (%) – tempo de migração <sup>(a)</sup>	0,66 (0,42)	0,37 (0,49)
Precisão Intra-ensaio, CV (%) – área do pico <sup>(a)</sup>	3,33 (7,76)	4,84 (5,86)
Precisão Intra-ensaio, CV (%) – tempo de migração <sup>(a)</sup>	0,82 (1,05)	0,44 (0,74)
Precisão Intermediária, CV (%) – área do pico <sup>(a)</sup>	4,55 (6,32)	5,22 (6,79)
Precisão Intermediária, CV (%) - tempo de migração <sup>(a)</sup>	4,58 (2,31)	4,79 (1,77)
Número de pratos <sup>(b)</sup>	81.622	101.697
Resolução <sup>(c)</sup>		7,24
Simetria de pico <sup>(c)</sup>	0,77	0,82

<sup>(a)</sup> Coeficiente de variação calculado através da equação:  $CV = (P/\bar{u}) \times 100$ , onde P é o desvio padrão absoluto e  $\bar{u}$  é a média aritmética da área do pico do analito ou média aritmética do tempo de migração. Valor de CV para precisão instrumental (n=10) analisado na mesma solução; precisão intra-ensaio (n=6) e precisão intermediária (n=9). Valores dentro dos parênteses representam as amostras dos extratos das folhas de *M. ilicifolia*.

<sup>(b)</sup> Número de pratos calculados para n = 10 de acordo com a equação:  $N=16(t_i/w_i)^2/L_{det}$ , onde  $t_i$  é o tempo de migração (minutos) do analito;  $w_i$  é a largura de base deste analito e  $L_{det}$  é o tamanho do capilar até o detector em metros.

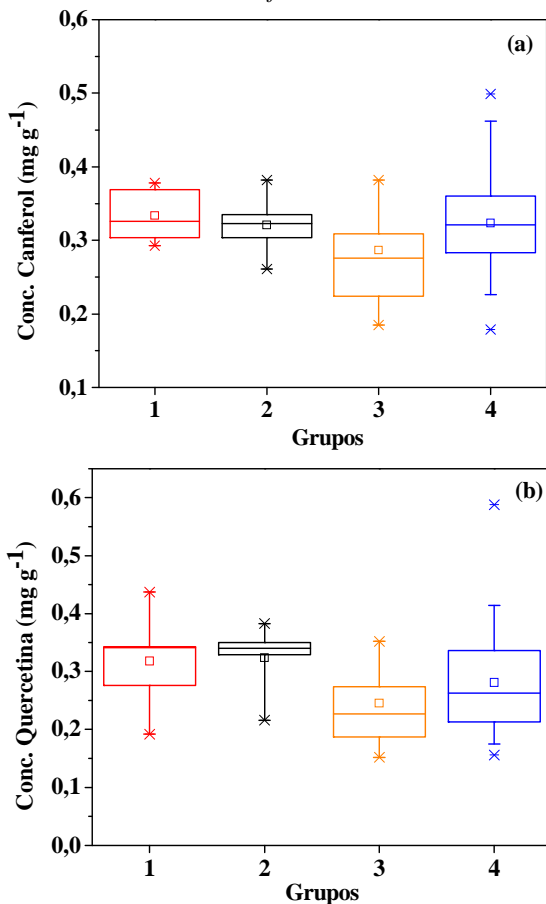
<sup>(c)</sup> Resolução calculada (n=10) conforme a equação:  $R_s=2(t_n-t_{n-1})/(w_n+w_{n-1})$ , onde  $t$  é o tempo de migração do pico e  $w$  é a largura de base do pico. Concentração de canferol e quercetina (30 mg L<sup>-1</sup>). Valor médio de simetria de pico para n=10.

#### 4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Assim como no capítulo anterior, avaliou-se a influência dos acúleos foliares presentes nas espécies de *M. ilicifolia*, em relação à concentração dos flavonóis canferol e quercetina. Um total de 111 indivíduos foi analisado, os quais foram preparados duas replicatas e injetados duas vezes.

A variação das concentrações dos flavonóis em relação aos diferentes indivíduos de *M. ilicifolia* pode ser observada na Figura 3.8. Os diferentes indivíduos foram separados em quatro grupos, os quais estão relacionados à quantidade de acúleos foliares presentes. A concentração média de canferol variou entre 0,29 - 0,33 ( $\pm 0,02$ ) mg g<sup>-1</sup>, como pode ser observado na Figura 3.8 (a) e a concentração média de quercetina variou entre 0,25 - 0,32 ( $\pm 0,04$ ) mg g<sup>-1</sup>, que esta representada na Figura 3.8 (b).

**Figura 3. 8** Concentração de Canferol (a) e Quercetina (b) em relação aos grupos de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*.



**Grupo 1** - n° acúleos: 0 a 1; **Grupo 2** - n° acúleos: 0 a 4;  
**Grupo 3** - n° acúleos: 2 a 4 e **Grupo 4** - n° acúleos: 4 ou mais.

Assim como no capítulo anterior, verificou-se se havia diferença estatística entre os diferentes grupos de acúleos, avaliaram-se os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência de resíduos, no entanto, um desses pressupostos também foi violado.

A Tabela 3.9 esboça os dados utilizando o método não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual compara as diferentes populações. Com

valores de p-valor  $> 0,05$ , com 95% de intervalo de confiança, isto indica que as concentrações de canferol e quercetina em todos os grupos são estatisticamente iguais. Deste modo, apesar de alguns indivíduos apresentarem valores atípicos de concentração dos flavonóis dentro de um mesmo grupo (*outliers*: indivíduos 41 e 83 (canferol); indivíduos 42 e 118 (quercetina)), observou-se também que não houve correlação entre a presença de acúleos e a concentração dos analitos, assim como na avaliação dos triterpenos.

Sabendo da importância da presença dos flavonóis na planta, a escolha de plantas com menor número de acúleos para o desenvolvimento de uma nova cultivar é favorável, uma vez que apresentam boa concentração destes analitos. A concentração individual de cada analito para cada espécie de *M. ilicifolia* se encontra descrito no Anexo C.

**Tabela 3. 9** Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da concentração de canferol e quercetina.

	<b>Fatores Comparados (Grupos)</b>	<b>Diferença Observada</b>	<b>Diferença Crítica</b>	<b>Diferença</b>	<b>Kruskal-Wallis (Qui-quadrado)</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>p-valor</b>
<b>Canferol</b>	1 - 2	9,00	53,71	Não	2,47	3	0,48
	1 - 3	25,85	48,41				
	1 - 4	9,35	38,98				
	2 - 3	16,85	48,41				
	2 - 4	0,35	38,98				
	3 - 4	16,50	31,29				
<b>Quercetina</b>	1 - 2	6,00	53,71	Não	4,52	3	0,21
	1 - 3	28,21	48,41				
	1 - 4	15,08	38,98				
	2 - 3	34,21	48,41				
	2 - 4	21,08	38,98				
	3 - 4	13,13	31,29				



#### 4.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM ALGUNS MÉTODOS DA LITERATURA

A partir de uma pesquisa na literatura, observou-se que não existem muitos relatos sobre a quantificação de flavonóis glicosilados ou agliconas em extratos de *M. ilicifolia*, apenas a identificação por meio das técnicas de LC-UV-MS e CE-UV/Vis (TIBERTI et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008a; DE SOUZA et al., 2009; DIAGONE et al., 2012) ou quantificação de flavonoides totais por meio de espectrofotometria (CHABARIBERI et al., 2009). Dentre os trabalhos citados, observou-se a necessidade de procedimentos de preparo de amostra mais elaborados, como fracionamento dos extratos em colunas de sílica e até a derivatização dos flavonoides, além de tempos de análise longos, sendo inviáveis para a avaliação de uma grande quantidade de amostras (111 indivíduos) de *M. ilicifolia*.

O método proposto no presente trabalho mostrou-se vantajoso com um simples preparo de amostra e posterior quantificação dos flavonóis totais a partir das agliconas utilizando uma técnica simples (CZE-UV-Vis), com uma análise rápida e com baixo consumo de reagente e custo operacional reduzido, permitindo analisar um grande número de amostras em um curto espaço de tempo. Além disso, este método pode ser uma ferramenta para auxiliar nas informações complementares de espécies de *M. ilicifolia*, uma vez que a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) apenas solicita ensaios para a determinação de taninos totais para a sua identificação.



## 5 CONCLUSÕES

Neste capítulo foi desenvolvido um método para a determinação de flavonóis glicosilados a partir de suas agliconas, quercetina e canferol, nos extratos de *M. ilicifolia* utilizando CZE-UV-Vis, com auxílio do planejamento de experimentos. O método mostrou-se eficiente para a separação das agliconas com um tempo de análise inferior a 3 minutos. Além disso, o DOE possibilitou verificar as concentrações adequadas de TBS e MeOH para a composição do BGE, obtendo uma boa separação entre os analitos.

O emprego do planejamento de experimentos permitiu avaliar o procedimento de hidrólise ácida dos flavonóis glicosilados gerando bons rendimentos dos analitos.

Apesar dos procedimentos de preparo de amostra apresentar um tempo elevado de preparo de amostra ( $t_{\text{extração}} = 20$  minutos e  $t_{\text{hidrólise ácida}} = 15$  minutos), isto não foi desfavorável, pois durante estes procedimentos foram preparadas vinte amostras diferentes de *M. ilicifolia* por vez.

O método proposto apresentou um desempenho analítico adequado, com boa linearidade ( $R^2 > 0,99$ ) para a curva de calibração externa de ambos os analitos, assim como bons valores para LD 2,1 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> para canferol e quercetina, respectivamente. De maneira geral, os valores para a recuperação variaram entre 96-103% e os valores de precisão intermediária fora inferiores a 7%.

Para a quantificação de um grande número de amostras (111 indivíduos), o desenvolvimento de um método rápido foi fundamental para o alcance de uma elevada frequência analítica, bem como menor consumo de reagentes, e baixo custo operacional.

A determinação dos flavonóis glicosilados a partir das agliconas quercetina e canferol permitiu avaliar as diferentes concentrações dos flavonóis em distintos indivíduos de *M. ilicifolia* e verificar que a presença de acúleos foliares não influenciou na concentração dos analitos.

O presente método tem potencial para ser aplicado em outras espécies de plantas para a quantificação de flavonóis, sem ter a necessidade de se utilizar padrões analíticos para todos os analitos, uma vez que foi possível a quantificação a partir da conversão dos flavonóis glicosilados em agliconas.

**REFERÊNCIAS**

ANURUKVORAKUN, O.; SUNTORNSUK, W.; SUNTORNSUK, L. Factorial design applied to a non-aqueous capillary electrophoresis method for the separation of  $\beta$ -agonists. **J. Chromatog. A**, v. 1134, p. 326–332, 2006.

BAE, H.; et al. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v. 130, p. 751–758, 2012.

BAGGIO, C. H.; et al. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. **J. Ethnopharm.**, v. 123, p. 385–391 2009.

BALLUS, C. A.; et al. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 83, p. 1181–1187 2011.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-som(I): Influência do ultra-som na química. **Quim. Nova**, v. 15, n. 4, p. 302-316, 1992.

BIZZOTTO, C. S.; et al. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Res. Internat.**, v. 48, p. 763–768, 2012.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p., 2v/il.

CHABARIBERI, R. A. O.; et al. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian J. Pharmacog.**, v.19, n. 4 p. 860-864, Out./Dez. 2009.

CHEN, H.; ZUO, Y.; DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatog. A**, v. 913, p. 387–395, 2001.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Quím. Nova**, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.

COLOMBO, R.; LANÇAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **J. Chromatog. A**, v. 1103, p. 118–124, 2006.

CUOCO, G.; MATHE, C.; VIEILLESCHAZES, C. Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. **Microchem. J.**, v. 115, p. 130–137, 2014.

DE SOUZA, L. M.; et al. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **J. Chromatog.**, v. 1207, p. 101–109, 2008a.

DE SOUZA, L. M.; et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 47, p. 59–67, 2008b.

DE SOUZA, L. M.; et al. Heart-cutting two-dimensional (size exclusion×reversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Chromatog. A**, v. 1216, p. 99–105, 2009.

DIAGONE, C. A.; et al. CZE/PAD and HPLC-UV/PAD Profile of Flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” Leaves Extracts. **Chromatog. Res. Internat.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

ESTATCAMP<sup>®</sup>. Consultoria em Estatística e Qualidade. Software Action 2.6. Portal Action: <http://www.portalaction.com.br/>. Acessado em: 18 de fevereiro de 2014.

FERNANDES, A. J. D.; et al. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **T. Scient. World J.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

HU, J.; et al. Acid Hydrolytic Method for Determination of *Ginkgo biloba* Total Flavonoids in Rat Plasma by HPLC for Pharmacokinetic Studies. **Tsing. Science Tech.**, v. 15, n. 4, p. 452-459, 2010.

HUANG, W.; et al. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. **Food Chem.**, v. 114, p. 1147–1154, 2009.

HUBER, L. Tutorial. Validation of Analytical Methods and Procedures. (2007). Disponível em: [www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08\\_paramaters](http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/#08_paramaters). Acessado em: 04 de fevereiro de 2014.

HYÖTYLÄINEN, T.; KIVILOMPOLO, M. Application of HPLC in the Analysis of Phenols, Phenolic Acids, and Tannins. *In*: Waks-mundzka-Hajnos, M.; Sherma, J. (Eds.) High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Florida: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2011. p. 477.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005).

JORGE, R. M.; et al. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharm.**, v. 94, p. 93–100, 2004.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KUSKOSKI, E. M.; et al. Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry (CGC-MS) Analysis and Antioxidant Activities of Phenolic and Components of Guarana and Derivatives. **The Open Analyt. Chem. J.**, v. 6, p. 1-8, 2012.

LEITE, J. P. V.; et al. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3796–3801, 2001.

LUO, M.; et al. Separation and determination of flavonoids in *Lamiophlomis rotata* by capillary electrophoresis using borate as electrolyte. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 44, p. 881–886, 2007.

MEINHART, A. D.; et al. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85 p. 237–244, 2011.

MOLNÁAR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **J. Chromatog. A**, v. 1073, p. 201–227, 2005.

MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. I. Separation of flavonoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone. **J. Chromatog.**, v. 628, p. 153-160, 1993a.

MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. II. Separation of flavonoid-3-O-glycosides differing in their sugar moiety. **J. Chromatog.**, v. 628, p. 153-160, 1993b.

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chem.**, v. 76, p. 519–525, 2002.

ONISZCZUK, A.; HAWRYT, A. Preparation of Plant Material. Waks-mundzka-Hajnos, M.; Sherma, J. (Eds.) High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Florida: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2011. p.139.

PERES, R. G.; et al. Multivariant optimization, validation, and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 3822–3828, 2009.

PROESTOS, C.; et al. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chem.**, v. 95, p. 664–671, 2006.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **J. Chromatog. A**, v. 1000, p. 657–691, 2003;

TIBERTI, L. A.; et al. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J. Chromatog. B**, v. 846, p. 378–384, 2007.

TONIN, F. G.; et al. Optimization of the separation of flavonoids using solvent-modified micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, p. 3387–3396, 2005.

TSIMOGIANNIS, D.; et al. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593–606, 2007.

WACH, A.; PYRZYN´SKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chem.**, v. 100 p. 699–704, 2007.



WANG, H.; HELLIWELL, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. **Food Res. Internat.**, v. 34, p. 223-227, 2001.

WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatog. A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.

YANG, Y.; ZHANG, F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. **Ultras. Sonochem.**, v. 15, p. 308-313, 2008.

YARIWAKE, J. H.; et al. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Rev.. Bras. Farmacog.**, v. 15, n. 2, p. 162-168, Abr./Jun. 2005.



## **CAPÍTULO 4 – Desenvolvimento de método para avaliação qualitativa de taninos em folhas de *M. ilicifolia* por LC-MS/MS e quantificação de taninos totais por espectrofotometria**

### **1 INTRODUÇÃO**

Os taninos são compostos fenólicos presentes em plantas, alimentos e bebidas, e são de grande interesse farmacológico, uma vez que estes compostos têm a capacidade de sequestrar radicais livres e complexar-se com macromoléculas. A exemplificar, estes compostos auxiliam no processo de cura de feridas, formando uma camada protetora (tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, permitindo a reestruturação do epitélio, um mecanismo que pode explicar o tratamento de úlcera gástrica (SANTOS; DE MELLO, 2010; DE JESUS et al., 2012). Estudos realizados pelos grupos de pesquisa de Jorge et al. (2004) e Baggio et al. (2007) indicaram que a fração rica em taninos preparados a partir das folhas de *M. ilicifolia* mostraram ação eficaz contra lesões gástricas agudas e crônicas induzidas experimentalmente.

Dentre os diferentes tipos de taninos encontrados em plantas medicinais, conforme descrito anteriormente, os taninos condensados são apontados como constituintes químicos majoritários em extratos aquosos de *M. ilicifolia*, sendo utilizados como marcadores no controle de qualidade de extratos e medicamentos fitoterápicos (Pessuto et al., 2009). Os trabalhos realizados por Soares et al. (2004) e Baggio et al. (2007) confirmaram a presença dos taninos condensados (catequina e (epicatequina).

Diversos são os métodos para a determinação dos taninos em plantas medicinais, porém devido à estrutura complexa dos mesmos, os métodos não são específicos. Dentre os métodos encontrados na literatura compreendem-se as reações de oxi-redução, despolimerização oxidativa das proantocianidinas, reações de precipitação e procedimentos gravimétricos (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001). Além destes, existem os métodos espectrofotométricos, tais como o método de Folin-Denis (1912), o qual envolve a formação do complexo azul fosfotungstíco-fosfomolibídico. Mossi et al. (2009) avaliaram a composição de taninos no extrato aquoso da *M. ilicifolia* em diferentes populações por meio desta técnica. Porém, o inconveniente encontra-se na formação de preci-

pitados e reações com compostos nitrogenados, que interferem na medida espectrofotométrica (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; IKAWA et al., 2003; MONTEIRO et al., 2005). Outro método colorimétrico empregado é o de Folin-Ciocalteu (1927), versão aprimorada do método Folin-Denis. Neste método, inicialmente, determina-se o teor de fenóis totais em uma alíquota do extrato metanólico da planta com o reagente de Folin Ciocalteu, em seguida, em outra alíquota deste extrato é adicionada a caseína para a formação do precipitado dos taninos. O sobrenadante é submetido a reação de Folin-Ciocalteu para a determinação de fenóis residuais. A partir da diferença entre fenóis totais e fenóis residuais determina-se a concentração de taninos totais. Além de ser um método laborioso, também tem a desvantagem de não ser um método específico para a determinação de taninos condensados (ARAÚJO et al., 2008). Um método espectrofotométrico que é específico para a determinação de taninos condensados é o método descrito por Price; Scoyoc; e Butter, (1978), o qual compreende a reação de complexação com a vanilina. Este método pode fornecer informação sobre o grau de polimerização e o padrão de hidroxilação e estereoquímica das subunidades de flavan-3-ol. O padrão de catequina é normalmente usado no método de vanilina para a quantificação dos taninos, permitindo estimar as proantocianidinas (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Uma técnica bem elucidativa para a determinação de taninos é a HPLC. Soares et al. (2004) e Lopes et al. (2010) desenvolveram métodos por HPLC-UV-Vis para a determinação de catequina e epicatequina em extratos de *M. ilicifolia*. Apesar da complexidade da matriz, os métodos se mostraram reprodutíveis e precisos. Uma alternativa para se avaliar o perfil qualitativo de compostos tânicos presentes em uma planta seria a partir do emprego de detectores mais seletivos, por exemplo, um espectrômetro de massas. De Souza et al. (2008) avaliaram o perfil qualitativo de diferentes flavonoides em um extrato de *M. ilicifolia* utilizando a técnica de HPLC-MS/MS e observaram que a maioria dos taninos presentes eram derivados de catequinas e epicatequinas. Diante do que foi abordado, têm-se os seguintes objetivos do presente estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para avaliar de forma qualitativa a presença de taninos em extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. ilicifolia* utilizando a técnica de LC-MS/MS e sua quantificação a partir do método espectrofotométrico da vanilina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para a determinação de taninos por LC-MS/MS em extrato hidroalcoólico de *M. ilicifolia* selecionando condições de separação, tais como fluxo e tipo de fase móvel, coluna cromatográfica, temperatura, bem como condições do detector;
- Identificar os taninos por meio de comparação com os espectros de massas obtidos a partir de outros trabalhos encontrados na literatura;
- Determinar a porcentagem relativa dos taninos presentes em 111 indivíduos de *M. ilicifolia* a partir dos valores de área dos analitos identificados pelo método desenvolvido e correlacionar com o número de acúleos;
- Avaliar a concentração dos taninos totais em 16 amostras por meio de método espectrofotométrico da vanilina e correlacionar com o número de acúleos;



### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o desenvolvimento do método por LC-MS/MS utilizou-se para a fase móvel água desionizada obtida com sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.), com resistividade  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , ácido fórmico (HCOOH), e acetonitrila (ACN), todos grau HPLC fornecidos pela J. T. Baker (México).

Para o preparo dos extratos hidroalcoólicos utilizou-se MeOH P.A. e HCl 1% (v/v) ambos da marca Vetec (Química Fina, Rio de Janeiro).

Para a determinação de taninos por espectrofotometria utilizou-se uma solução 0,5 g de vanilina (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO – E.U.A.) em 200 mL de HCl (4%, v/v) em MeOH.

#### 3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO LC-MS/MS

As amostras foram preparadas conforme o procedimento descrito Capítulo 3 (*Seção 3.3.2*) para extração dos flavonóis. Em um frasco pesou-se 100 mg de amostra de planta seca e moída de *M. ilicifolia* e adicionou-se 2 mL de MeOH:água (40:60, v/v). A solução foi homogeneizada e submetida à extração por ultrassom em tubo de ensaio de vidro fechado, durante 20 minutos à 25 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi diretamente injetada no LC-MS/MS.

#### 3.3 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram conduzidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (1200 Agilent Technologies, Germany) acoplado a um espectrômetro de massas Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada).

A separação foi realizada utilizando uma coluna Gemini NX C-18 (250 mm x d.i. 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$  tamanho de partícula) fornecida pela Phenomenex (Torrance, CA, E.U.A.). Os experimentos foram realizados utilizando a fonte de ionização por *eletrospray*, Turbo Ion Spray™ (Electrospray-ESI, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Ontario,

Canada) no modo negativo. Os parâmetros de energia de ionização dos analitos estão discriminados no Anexo D.

### 3.4 MÉTODO DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS

As análises foram realizadas utilizando o modo gradiente cuja fase móvel era composta por (A) água desionizada com pH = 3,6 ajustado com ácido fórmico e (B) acetonitríliia:água (95:5, v/v). Inicialmente, realizou-se um pré-condicionamento por 10 minutos com 85% (A) e 15% (B). Em seguida, o método procedeu da seguinte maneira: (A) 85% e 15% (B) por 10 min; 45% (A) e 55% (B) por 15 min; em 1 min, variou-se o gradiente para 5% (A) e 95% (B) e manteve-se por 4 min. O fluxo da fase móvel foi de  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  e o volume injetado de amostra foi de  $10 \mu\text{L}$ . A temperatura da coluna foi mantida a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . O *software* Analyst versão 1.5.1 foi usado para operação do sistema e análises de dados.

### 3.5 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA VANILINA

Inicialmente preparou-se o extrato hidroalcoólico em meio ácido das folhas secas e moídas de *M. ilicifolia*, sendo que em um tubo de polipropileno (tipo falcon) pesou-se 0,5 g de planta e foram adicionados 15 mL de solução HCl em MeOH (1%, v/v). A amostra foi submetida à extração em ultrassom a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período de 20 minutos, sendo que a cada 10 minutos o tubo era agitado manualmente. Após o arrefecimento do extrato, o tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 2 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi retirada para adição de 5 mL de vanilina. Após um período de 20 minutos fez-se as medidas em cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm em comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro (Spectrophotometer FEMTO 482). Todas as amostras foram preparadas em duplicata.



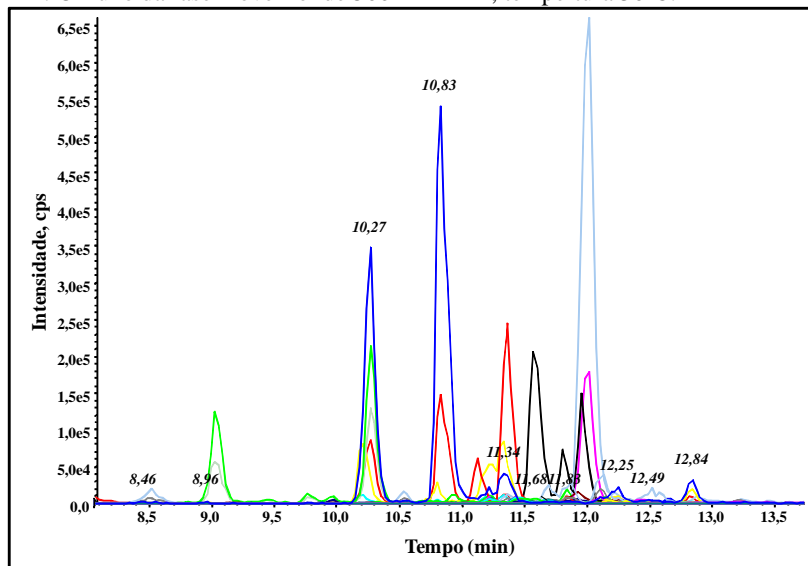
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 MÉTODO DE SEPARAÇÃO POR LC-MS/MS PARA ANÁLISE DE TANINOS

Os extratos hidroalcoólicos de *M. ilicifolia* foram preparados de acordo com método de extração para flavonóis obtido a partir de planejamento fatorial (Capítulo 3). Uma vez que os taninos pertencem à classe dos flavonoides e apresentam solubilidade similar aos flavonóis, acredita-se que o procedimento seja eficiente para a extração dos taninos. Porém, como estes compostos apresentam uma estrutura complexa e não há padrões analíticos comerciais para todos os analitos, apenas foi realizada uma avaliação qualitativa dos taninos presentes nas diferentes amostras de *M. ilicifolia*.

O desenvolvimento do presente método foi baseado nos trabalhos desenvolvidos por De Souza et al. (2008) e Romani, Campo e Pinelli (2012) readequando as proporções dos solventes da fase móvel. Uma alíquota do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. ilicifolia* foi injetada diretamente no LC-MS/MS utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e o cromatograma pode ser observado na Figura 4.1.

**Figura 4. 1** Cromatograma do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. ilicifolia*. Condições cromatográficas: coluna Gemini NX C-18 (250 mm x d.i. 4.6 mm x 5  $\mu$ m); Fase móvel: (A) água desionizada em ácido fórmico pH 3,6 e (B) ACN:H<sub>2</sub>O (95:5). (A) 85% e 15% (B) por 10 min; 45% (A) e 55% (B) por 15 min; em 1 min, variou-se o gradiente para 5% (A) e 95% (B) e manteve-se por 4 min. O fluxo da fase móvel foi de 500 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 30°C.



Fonte: o próprio autor.

O método proposto mostrou a presença de 17 analitos com um tempo de análise de 20 minutos. No entanto, somente foi possível a identificação de 13 analitos, quando comparados os espectros obtidos com os disponíveis na literatura. Muitos dos taninos contidos na *M. ilicifolia* apresentam estrutura molecular muito similar entre si e isto dificulta sua identificação. Desta forma, a fim de confirmar os espectros de massas dos taninos presentes nas amostras, foi desenvolvido um segundo método utilizando MS<sup>2</sup>, isto é, um método para se obter os espectros de massas a partir do íon molecular de cada composto. A escolha do íon precursor para o monitoramento e comparação dos fragmentos foi realizada a partir dos trabalhos encontrados na literatura (DE SOUZA et al., 2008; BAGGIO et al., 2009; PESSUTO et al., 2009; ROMANI; CAMPO; PINELLI, 2012; OJWANG et al., 2013; SIMIRGIO-

TIS; BÓRQUEZ; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2013). Com isso foi possível verificar que os taninos encontrados nos extratos foram identificados como derivados de catequinas, (epi)catequinas, afzelequina e (epi)afzelequina, conforme descrito na Tabela 4.1, corroborando com os trabalhos encontrados na literatura.

Na Tabela 4.1 observa-se a presença dos isômeros catequina e (e-pi)catequina ( $m/z = 289$ ), bem como, taninos com diferentes unidades de polimerização. Apesar dos tempos de retenção diferentes para alguns compostos, o espectro de massa apresentou os mesmos fragmentos para um mesmo íon precursor, dificultando a identificação de alguns taninos. Um exemplo disto foi o íon precursor com  $m/z$  561, o qual apresentou quatro compostos com tempos de retenção diferentes, constituindo em dímeros que são representadas por unidades de (epi)afzelequina-(epi)catequina.

Já para o íon precursor de  $m/z = 577$  observou-se três picos intensos e estes pertencem a dímeros de procianidina (tipo B), cujo tempo de retenção foi de 9,06 e 10,32 min. Já o analito com tempo de retenção de 11,87 min pode corresponder a duas unidades de (epi)catequinas ligadas entre si.

O trabalho realizado por Friedrich; Eberhardt; Galensa (2000) sugerem que o íon precursor de  $m/z = 593$  corresponda a dímeros com unidades de galocatequina e catequinas. Em contraste com o íon precursor de  $m/z = 609$  contendo duas unidades de galocatequinas.

Os taninos com maior grau de polimerização foram observados em diferentes tempos de retenção a partir do íon precursor de  $m/z = 833$ , todos com o mesmo perfil de fragmentação, possivelmente correspondendo a duas unidades de (epi)afzelequina e uma de (epi)catequina.

No Anexo E se encontra uma Tabela referente à área relativa de cada pico dos analitos identificados nos extratos dos 111 indivíduos de *M. ilcifolia*.

**Tabela 4. 1** Compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. ilicifolia* determinados a partir das análises em LC-MS/MS utilizando o modo negativo de ionização.

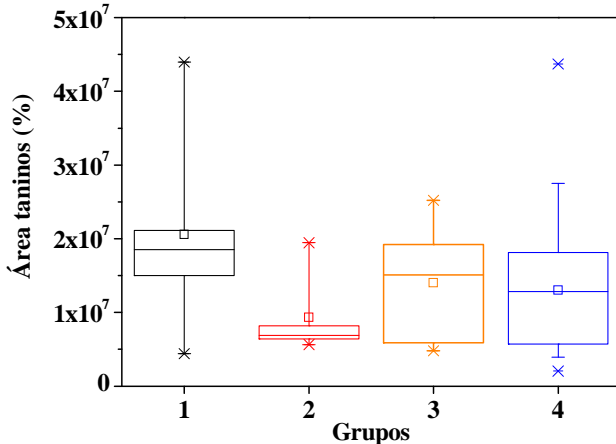
(M-1) <sup>-</sup>	Fragmentos	t(min)	Composto
289	245,203,187,151,137,125,109	10,32	Catequina
289	245,203,187,151,137,125,109	10,87	(Epi)catequina
463	301,271,255,179,151	12,00	Quercetina-hexosídio
561	543,435,407,289,271,245,125,97	10,26	(epi)afzelequina-(epi)catequina
561	543,435,407,289,271,245,125,97	11,38	(epi)afzelequina-(epi)catequina
561	543,435,407,289,271,245,125,97	12,12	(epi)afzelequina-(epi)catequina
561	543,435,407,289,271,245,125,97	12,85	(epi)afzelequina-(epi)catequina
577	451,425,407,289,245,161,125	9,06	Procianidina B (dímero)
577	559,451,425,407,289,245,161,125	10,32	Procianidina B (dímero)
577	407,289,245,161,125	11,87	(epi)catequina-(epi)catequina
593		11,56	Não identificado
593		11,97	Não identificado
609		11,15	Não identificado
609		11,38	Não identificado
833	561,543,289,271	11,39	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)catequina
833	561,543,289,271	12,13	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)catequina
833	561,543,289,271	13,23	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)catequina

## 4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

a) **Correlação entre taninos e grupos de acúleos em função da área relativa pelo método LC-MS/MS**

A variação das áreas relativas dos taninos em relação aos 111 diferentes indivíduos de *M. ilicifolia* pode ser observada na Figura 4.2. Os diferentes indivíduos foram separados em quatro grupos, os quais estão relacionados à quantidade de acúleos foliares presentes. As médias das áreas, as quais representam a concentração dos taninos, foram  $2,06 \times 10^7$  ( $\pm 1,45 \times 10^7$ ),  $9,32 \times 10^6$  ( $\pm 5,74 \times 10^6$ ),  $1,40 \times 10^7$  ( $\pm 7,61 \times 10^6$ ) e  $1,30 \times 10^7$  ( $\pm 7,98 \times 10^6$ ), para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

**Figura 4. 2** Área relativa dos taninos em relação aos grupos de diferentes indivíduos de *M. ilicifolia*



A fim de verificar se há diferença estatística entre os diferentes grupos de acúleos em função da área relativa dos taninos, os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência de resíduos foram avaliados, porém, um desses pressupostos foi violado.

Perante isto, foi necessário utilizar o método não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as diferentes populações, o qual está descrito na Tabela 4.2. Com valores de p-valor > 0,05, com 95% de

intervalo de confiança, isto indica que as áreas dos taninos em todos os grupos são estatisticamente iguais. Apesar de alguns indivíduos apresentarem valores atípicos de área dos taninos dentro de um mesmo grupo (*outliers*: indivíduos 74 e 101), observou-se que não houve correlação entre a presença de acúleos e a área dos analitos, isto é, os acúleos não influenciam no aumento da concentração dos taninos. Isto favorece a escolha de plantas com menor número de acúleos para o desenvolvimento de uma nova cultivar.

**Tabela 4. 2** Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da área dos taninos.

	<b>Fatores Comparados (Grupos)</b>	<b>Diferença Observada</b>	<b>Diferença Crítica</b>	<b>Diferença</b>	<b>Kruskal-Wallis (Qui-quadrado)</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>p-valor</b>
<b>Taninos</b>	<b>1 - 2</b>	25,60	53,71		2,06	3	0,55
	<b>1 - 3</b>	10,73	48,41				
	<b>1 - 4</b>	17,51	38,98	Não			
	<b>2 - 3</b>	14,88	48,41				
	<b>2 - 4</b>	8,09	38,98				
	<b>3 - 4</b>	6,79	31,29				

### b) Correlação entre taninos e grupos de acúleos pelo método espectrofotométrico da vanilina

Uma alternativa para a determinação dos taninos presentes nos extratos das folhas de *M. ilicifolia* seria pelo método espectrofotométrico da vanilina cuja leitura foi realizada em 500 nm, conforme descrito por Villarreal-Lozoya; Lombardini; Cisneros-Zevallos (2007). A reação de complexação da vanilina com compostos fenólicos, neste caso com os taninos envolve a reação do aldeído aromático da vanilina com o anel dos flavonóides metasubstituídos para formar um complexo de coloração vermelha.

Esta análise foi realizada a fim de verificar a concentração de taninos e se haveria correlação entre os diferentes grupos de acúleos presentes nas folhas de *M. ilicifolia*, assim como nos estudos realizados nos capítulos anteriores. Para isso, apenas 16 amostras desta planta foram avaliadas quanto à presença de taninos, sendo 4 amostras por grupo. A escolha das amostras foi realizada considerando a maior concentração de flavonóis e triterpenos entre os grupos, uma vez que estes compostos também são importantes na planta.

As amostras foram diluídas 33X e a quantificação foi realizada a partir da curva de calibração externa referente à catequina, cujos parâmetros se encontram na Tabela 4.3.

**Tabela 4. 3** Parâmetros da curva de calibração externa da solução padrão de catequina.

Parâmetros	Catequina
Linearidade – faixa de calibração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>(a)</sup>	17,5 – 140
Linearidade – inclinação ( $\text{L mg}^{-1}$ ) <sup>(a)</sup>	0,002
Desvio padrão – inclinação	0,001
Linearidade-intercepto <sup>(a)</sup>	0,014
Desvio padrão – intercepto	0,003
R <sup>2</sup>	0,996
LD ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>(b)</sup>	0,24
LQ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) <sup>(b)</sup>	0,74

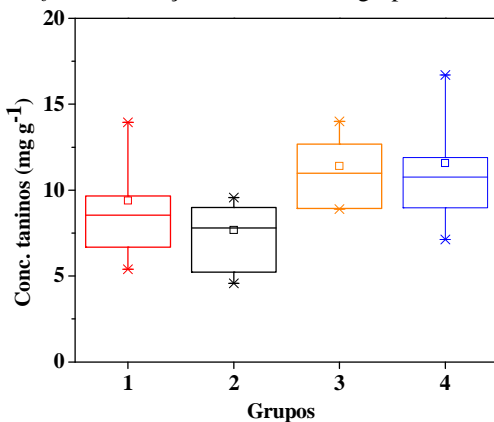
<sup>(a)</sup> Curva de calibração com oito níveis de concentração, cada ponto da curva preparado e analisado em duplicata.

<sup>(b)</sup> Limites de detecção e quantificação calculados a partir das equações:  $LD = (3,3 \times s)/S$ ;  $LQ = (10 \times s)/S$ , onde  $s$  é o desvio padrão do intercepto e  $S$  é a inclinação da curva analítica.



A variação das concentrações dos taninos em relação aos diferentes grupos pode ser observada na Figura 4.3. A concentração média entre os grupos de acúleos 1, 2, 3 e 4 variou entre  $9,39 (\pm 3,07)$ ,  $7,68 (\pm 1,93)$ ,  $11,40 (\pm 1,87)$  e  $11,56 (\pm 3,16)$   $\text{mg g}^{-1}$ , respectivamente.

**Figura 4. 3** Variação das concentrações de taninos nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. ilicifolia* em função dos diferentes grupos.



**Grupo 1** - n° acúleos: 0 a 1; **Grupo 2** - n° acúleos: 0 a 4;

**Grupo 3** - n° acúleos: 2 a 4 e **Grupo 4** - n° acúleos: 4 ou mais.

Com a finalidade de comparar os diferentes grupos, os pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência de resíduos foram avaliados, porém, um desses pressupostos foi violado. Diante disto, foi necessário utilizar o método não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as diferentes populações, o qual está descrito na Tabela 4.4. Com valores de p-valor  $> 0,05$ , com 95% de intervalo de confiança, isto indica que as concentrações dos taninos em todos os grupos são estatisticamente iguais.

Deste modo, observou-se também que não houve correlação entre a presença de acúleos e a concentração dos taninos, assim como na avaliação dos triterpenos e dos flavonóis.

**Tabela 4. 4** Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia* em função da área dos taninos.

	Fatores Comparados (Grupos)	Diferença Observada	Diferença Crítica	Diferença	Kruskal-Wallis (Qui-quadrado)	Graus de Liberdade	p-valor
<b>Taninos</b>	1 - 2	2,75	8,88		5,54	3	0,14
	1 - 3	3,75	8,88				
	1 - 4	4,00	8,88	Não			
	2 - 3	6,50	8,88				
	2 - 4	6,75	8,88				
	3 - 4	0,25	8,88				

Assim como para os estudos realizados para os triterpenos e flavonóis, não há estudos correlacionando a concentração de taninos e a presença de acúleos em diferentes populações de *M. ilicifolia*, quando estas plantas estão submetidas às mesmas condições climáticas e geográficas.

Contudo, um estudo realizado por Mossi et al. (2009) avaliou o teor de taninos em 15 populações nativas de *M. ilicifolia*, distribuídas nas regiões sul e centro-Oeste do Brasil, correlacionando fatores climáticos, bem como geográficos. Os resultados mostraram que apenas o fator temperatura apresentou uma correlação positiva com o teor de taninos, isto é, em locais que apresentaram maior média anual da temperatura, os valores de taninos foram superiores.

Radomski (1998), também observou que a intensidade de luminosidade foi o fator que mais contribuiu no teor de compostos fenólicos, inclusive de taninos, em diferentes populações de *M. ilicifolia*. Além disso, nos ambientes com maior luminosidade, a autora observou diferenças anatômicas nas plantas, as quais se apresentaram amareladas, mais espessas e com acúleos mais pronunciados, caracterizando formas típicas de adaptação de plantas de sombra expostas à luz solar. A autora ainda recomenda estudos mais amplos sobre a influência de diferentes condições ambientais nas populações homogêneas de *M. ilicifolia*, abordando tanto aspectos fitoquímicos quanto farmacológicos. Estes estudos certamente poderiam resultar em recomendações de cultivo e manejo ambientalmente sustentáveis aliadas à produção de fitoterápicos de alta qualidade e comprovada ação terapêutica.

No presente estudo observou-se que a intensidade de luminosidade não foi um fator dominante quanto ao teor de taninos e a presença de acúleos foliares, uma vez que os diferentes acessos de *M. ilicifolia* se encontram sob as mesmas condições climáticas. A diferença na morfologia foliar pode estar relacionada a aspectos genéticos, os quais devem ser estudados posteriormente.



## 5 CONCLUSÕES

Neste capítulo foi abordado o desenvolvimento de um método por LC-MS/MS para a avaliação qualitativa dos taninos presentes nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *M. ilicifolia*. O método permitiu a identificação dos taninos majoritários catequina, (epi)catequina, afzelequina e (epi)afzelequina, bem como derivado destes, corroborando com outros estudos da literatura.

Além disso, observaram-se diversos compostos com elevados graus de polimerização e mesmo íon precursor ( $m/z$ ), porém com diferentes tempos de retenção, dificultando a identificação exata, sem o auxílio de padrões analíticos.

O detector de espectrometria de massas foi fundamental para a avaliação qualitativa dos principais taninos presentes nas diferentes amostras de *M. ilicifolia*, pois permitiu avaliar de forma individual cada um dos analitos em relação à área relativa.

A quantificação dos taninos pelo método espectrofotométrico da vanilina mostrou-se um método simples e uma alternativa viável quando não se tem padrões analíticos para todos os analitos.

A partir do método não paramétrico de Kruskal-Wallis observou-se que não houve diferença estatística entre os diferentes grupos de *M. ilicifolia*, e ainda, mostrou que não houve correlação entre o número de acúleos e os taninos. Este resultado auxilia na seleção das plantas para uma nova cultivar com menor número de acúleos.

**REFERÊNCIAS**

ARAÚJO, T. A. S.; et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **J. Ethnopharm.**, v. 120, p. 72–80, 2008.

BAGGIO, C. H.; et al. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. **J. Ethnopharm.**, v. 123, p. 385–391, 2009.

DE JESUS, N. Z. T.; et al. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.

DE SOUZA, L. M.; et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 47, p. 59–67, 2008.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 211, p. 56-64, 2000.

IKAWA, M.; et al. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p.1811–1815, 2003.

JORGE, R. M.; et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharm.**, v. 94, p. 93-100, 2004.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

LOPES, G. C.; et al. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 20, p. 5, p. 789-795, Out./Nov. 2010.

MONTEIRO, J. M.; et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOSSI, A. J. et al. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009.

OJWANG, L. O.; Yang, L.; Dykes, L.; Awika, J. Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. **Food Chem.**, v. 139, p. 35-43, 2013.

PESSUTO, M. B.; et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex reiss. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A. Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in *Sorghum* Grain. **J. Agric. Food Chem.**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.

RADOMSKI, M.I. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart. em populações nativas no município da Lapa - Paraná. 1988. 97p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P.. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chem.**, v. 130, p. 214-221, 2012.

SANTOS, S. C.; DE MELLO, J. C. P. Taninos. *In: Farmacognosia: da planta ao medicamento*. SIMÕES, C. M. O. et al. 6ª. Edição. Editora UFRGS e UFSC. 2010. p. 615.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **An. Feed Sci. Technol.**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SIMIRGIOTIS, M. J.; BÓRQUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. **Food Chem.**, v. 139, p. 289–299, 2013.

SOARES, L. A. L.; et al. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 36, p. 787–790, 2004.

VILLARREAL-LOZOYA, J. E.; LOMBARDINI, L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch cultivars. **Food Chem.**, v. 102, p. 1241–1249, 2007.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os métodos desenvolvidos neste trabalho permitiram avaliar uma grande quantidade de amostras da planta *M. ilicifolia*, as quais foram submetidas às mesmas condições ambientais (climáticas e geográficas). Além disso, os métodos se mostraram promissores para a aplicação em outras matrizes complexas.

Este trabalho permitiu, ainda, avaliar diferentes metabólitos secundários (triterpenos, flavonóis e taninos) presentes em extratos de folhas de *M. ilicifolia* e verificar que estes não apresentam correlação com a morfologia foliar quanto à presença de acúleos.

A escolha de uma planta dentro os diferentes acessos de *M. ilicifolia* presentes no BAG da EPAGRI-Itajaí deve levar em consideração não apenas o menor número de acúleos no bordo foliar, mas também, o teor dos compostos aqui estudados uma vez que estes apresentam funções biológicas e químicas tanto para o desenvolvimento de uma nova cultivar, quanto como atividade farmacológica.

Outros estudos devem ser realizados a fim de dar continuidade nos trabalhos relacionados à *M. ilicifolia*, tais como, avaliar as “filhas” provenientes desse BAG, estudar outros metabólitos secundários que possam atuar como marcadores quimiotaxonômicos da espécie, bem como avaliar a atividade farmacológica dos compostos estudados no presente trabalho, pois há algumas divergências na literatura quanto ao principal princípio ativo responsável pela atividade antiulcerogênica.



**ANEXO A**

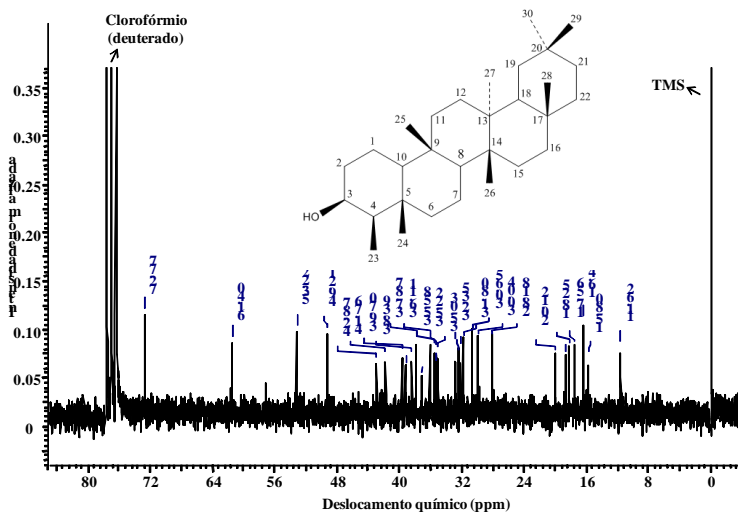
Tabela das constantes de acoplamento do RMN C<sup>13</sup> do pico desconhecido comparando com dados da literatura.

<b>Carbono</b>	<b>Pico Desconhecido</b>	<b>SALAZAR et al, 2000*</b>
<b>1</b>	15,80	16,16
<b>2</b>	36,11	36,14
<b>3</b>	72,77	71,59
<b>4</b>	49,21	49,62
<b>5</b>	37,87	38,09
<b>6</b>	41,76	41,99
<b>7</b>	17,56	17,69
<b>8</b>	53,22	53,27
<b>9</b>	37,12	37,18
<b>10</b>	61,40	61,50
<b>11</b>	35,36	35,66
<b>12</b>	30,65	30,69
<b>13</b>	38,39	38,38
<b>14</b>	39,70	39,69
<b>15</b>	32,35	32,34
<b>16</b>	35,58	35,90
<b>17</b>	30,04	30,02
<b>18</b>	42,87	42,88
<b>19</b>	35,22	35,36
<b>20</b>	28,18	28,16
<b>21</b>	32,85	32,88
<b>22</b>	39,29	39,28
<b>23</b>	11,62	12,09
<b>24</b>	16,40	16,58
<b>25</b>	18,25	18,35
<b>26</b>	20,12	20,13
<b>27</b>	18,64	18,69
<b>28</b>	32,11	32,12
<b>29</b>	35,03	35,02
<b>30</b>	31,80	31,85

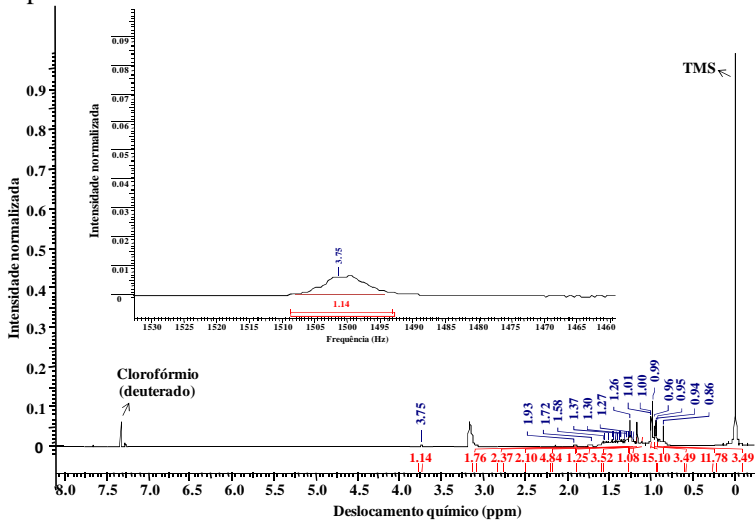
\*SALAZAR, G. C. M. et al. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift assignments. **Magn. Reson. Chem.** 2000; 38: 977–980.

continuação Anexo A

Espectro de RMN <sup>13</sup>C do Pico Desconhecido



Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Pico Desconhecido



**Observações:**

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foram identificados trinta sinais de carbono, sendo um sinal referente ao carbono carbonílico ( $\text{C}_3$ ), sinais de oito carbonos metílicos, 11 carbonos metilênicos na região de  $\delta_{\text{C}}$  15,80-41,76 e 6 sinais de carbonos na região de  $\delta_{\text{C}}$  28,80-39,70 não ligados a hidrogênios.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , o sinal  $\delta_{\text{H}}$  3,75 (d,  $J=2,46$  Hz), referente ao hidrogênio do  $\text{C}_3$  apresenta uma constante de acoplamento de 2,46, a qual indica um hidrogênio na posição “beta” e sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,86-1,93 referente a hidrogênios metílicos e metilênicos. Para ser o H na posição “alfa”, a constante de acoplamento teria um valor maior ( $J=10$  Hz).



## ANEXO B

Concentração individual dos triterpenos presentes em cada indivíduo de *M. ilicifolia* pertencetes ao BAG da EPAGRI-Itajaí, SC.

Indivíduos	Grupos	Friedelan-3 $\beta$ -ol (mg g <sup>-1</sup> )	Friedelan-3 $\alpha$ -ol (mg g <sup>-1</sup> )	Friedelin (mg g <sup>-1</sup> )
1	2	3,125	0,443	3,230
2	4	2,191	0,449	4,090
3	4	2,670	0,581	2,243
4	4	2,763	0,485	2,195
5	3	2,471	0,495	2,295
6	4	3,415	0,647	3,542
7	3	2,579	0,489	1,718
8	4	2,309	0,422	2,033
10	4	2,177	0,494	1,594
12	4	2,568	0,642	3,186
13	4	2,202	0,575	2,798
14	4	3,027	0,628	2,080
15	4	2,435	<LOD*	1,169
16	4	2,003	0,537	2,471
17	2	2,494	0,613	2,152
18	2	2,257	<LOD*	3,288
19	3	1,898	0,498	1,801
20	4	2,866	0,457	2,074
22	4	3,732	0,667	3,231
23	4	3,278	0,513	1,388
24	1	1,606	0,517	1,388
25	2	2,636	0,541	1,899
26	4	3,900	<LOD*	3,210
27	4	3,072	0,635	2,520
28	4	4,098	0,700	2,896
29	3	2,101	<LOD*	1,979
30	3	3,118	<LOD*	2,386
31	3	2,953	0,772	2,163
32	3	2,527	0,576	2,091
33	2	2,363	0,432	1,705
34	4	3,092	0,722	1,999
35	4	2,743	0,697	2,917

## continuação Anexo B

Indivíduos	Grupos	Friedelan-3 $\beta$ -ol (mg g <sup>-1</sup> )	Friedelan-3 $\alpha$ -ol (mg g <sup>-1</sup> )	Friedelin (mg g <sup>-1</sup> )
36	4	2,338	0,428	2,334
37	1	3,041	0,571	2,196
38	4	2,253	0,593	2,765
39	4	2,558	0,445	2,501
40	4	2,872	0,696	2,478
41	4	2,795	0,603	2,017
42	4	2,954	0,429	3,165
43	4	2,505	0,565	2,085
44	4	2,709	<LOD*	2,655
45	4	2,678	<LOD*	2,540
46	4	2,682	0,620	2,668
47	4	2,188	0,626	2,364
48	4	2,640	<LOD*	2,173
49	4	2,769	0,583	2,473
50	4	2,485	0,723	2,643
51	4	2,489	0,529	2,135
52	4	2,998	0,546	2,078
53	4	2,334	0,465	1,740
54	4	2,274	0,562	2,790
55	4	3,710	0,657	2,528
56	4	2,856	0,602	2,273
57	4	2,386	0,467	1,729
58	4	2,699	0,765	1,801
59	4	2,423	0,518	1,960
60	4	2,911	0,610	2,307
61	4	2,854	<LOD*	2,631
62	4	2,901	0,565	2,764
63	3	3,877	0,481	4,140
64	4	2,355	0,584	2,938
65	4	2,779	0,587	2,676
67	4	2,031	0,589	2,669
68	4	2,192	0,524	1,906
69	4	3,850	0,796	4,169
70	1	2,941	0,575	1,829
71	4	2,649	<LOD*	2,333
72	4	2,472	0,482	1,951
73	4	3,248	0,790	2,477



## continuação Anexo B

Indivíduos	Grupos	Friedelan-3 $\beta$ -ol (mg g <sup>-1</sup> )	Friedelan-3 $\alpha$ -ol (mg g <sup>-1</sup> )	Friedelin (mg g <sup>-1</sup> )
74	4	2,723	0,485	1,911
75	4	2,040	0,445	1,515
76	4	1,317	<LOD*	1,190
77	4	2,734	0,421	2,650
78	4	2,727	<LOD*	1,534
79	4	1,810	<LOD*	1,293
80	4	2,363	0,562	1,954
81	4	1,737	0,547	1,712
82	4	1,951	0,503	1,219
83	4	2,348	0,477	1,509
85	4	2,767	0,577	2,004
87	4	2,241	0,77	1,656
88	1	4,849	0,702	4,057
89	4	2,054	<LOD*	1,447
90	4	2,136	0,605	1,542
91	4	4,539	0,613	3,261
92	4	2,125	0,550	1,341
93	4	3,155	0,683	2,626
94	4	3,379	0,618	2,703
95	4	2,599	0,502	2,484
96	4	2,285	0,520	2,074
97	4	2,664	0,586	2,338
98	4	2,408	0,606	1,919
99	4	2,528	0,573	2,048
100	4	2,308	<LOD*	1,806
101	4	1,542	0,441	1,560
102	4	1,660	0,469	1,281
103	4	2,190	0,446	1,442
104	4	1,934	0,647	1,999
105	4	2,559	<LOD*	2,238
106	4	2,216	0,552	1,340
108	1	3,110	0,744	2,856
109	4	2,465	0,476	2,278
110	4	3,505	0,857	2,886
112	4	2,966	0,539	2,276
113	4	2,357	0,650	2,420
114	4	2,275	0,617	2,571

## continuação Anexo B

<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Friedelan-3<math>\beta</math>-ol (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Friedelan-3<math>\alpha</math>-ol (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Friedelin (mg g<sup>-1</sup>)</b>
<b>115</b>	4	3,206	0,569	2,784
<b>116</b>	4	1,875	0,522	2,149
<b>117</b>	4	2,871	0,561	2,094
<b>118</b>	4	1,063	0,477	0,716
<b>119</b>	4	3,069	<LOD*	3,369

**ANEXO C**

Concentração individual dos flavonóis presentes em cada indivíduo de *M. ilicifolia* pertencetes ao BAG da EPAGRI-Itajaí, SC.

<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Canferol (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quercetina (mg g<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	2	0,335	0,350
<b>2</b>	4	0,493	0,516
<b>3</b>	4	0,374	0,357
<b>4</b>	4	0,340	0,268
<b>5</b>	3	0,382	0,312
<b>6</b>	4	0,306	0,242
<b>7</b>	3	0,309	0,227
<b>8</b>	4	0,370	0,333
<b>10</b>	4	0,371	0,246
<b>12</b>	4	0,250	0,322
<b>13</b>	4	0,227	0,279
<b>14</b>	4	0,328	0,312
<b>15</b>	4	0,361	0,348
<b>16</b>	4	0,296	0,346
<b>17</b>	2	0,304	0,329
<b>18</b>	2	0,323	0,340
<b>19</b>	3	0,287	0,200
<b>20</b>	4	0,289	0,227
<b>22</b>	4	0,462	0,352
<b>23</b>	4	0,386	0,336
<b>24</b>	1	0,369	0,341
<b>25</b>	2	0,261	0,383
<b>26</b>	4	0,336	0,370
<b>27</b>	4	0,304	0,342
<b>28</b>	4	0,433	0,365
<b>29</b>	3	0,361	0,352
<b>30</b>	3	0,224	0,256
<b>31</b>	3	0,276	0,274
<b>32</b>	3	0,185	0,152
<b>33</b>	2	0,382	0,216
<b>34</b>	4	0,265	0,250
<b>35</b>	4	0,262	0,492

## continuação Anexo C

<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Canferol (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quercetina (mg g<sup>-1</sup>)</b>
36	4	0,327	0,235
37	1	0,326	0,276
38	4	0,283	0,344
39	4	0,214	0,183
40	4	0,293	0,193
41	4	0,179	0,172
42	4	0,226	0,156
43	4	0,272	0,195
44	4	0,303	0,188
45	4	0,276	0,194
46	4	0,286	0,182
47	4	0,287	0,288
48	4	0,351	0,296
49	4	0,338	0,219
50	4	0,240	0,213
51	4	0,211	0,175
52	4	0,257	0,181
53	4	0,358	0,293
54	4	0,321	0,386
55	4	0,279	0,406
56	4	0,388	0,342
57	4	0,291	0,253
58	4	0,372	0,237
59	4	0,357	0,328
60	4	0,321	0,261
61	4	0,339	0,254
62	4	0,257	0,212
63	3	0,272	0,187
64	4	0,298	0,326
65	4	0,307	0,284
67	4	0,349	0,247
68	4	0,361	0,304
69	4	0,347	0,248
70	1	0,304	0,437
71	4	0,287	0,333
72	4	0,324	0,274

## continuação Anexo C

Indivíduos	Grupos	Canferol (mg g <sup>-1</sup> )	Quercetina (mg g <sup>-1</sup> )
73	4	0,466	0,206
74	4	0,283	0,201
75	4	0,298	0,193
76	4	0,308	0,414
77	4	0,320	0,227
78	4	0,360	0,266
79	4	0,295	0,263
80	4	0,333	0,310
81	4	0,243	0,161
82	4	0,374	0,380
83	4	0,499	0,401
85	4	0,320	0,387
87	4	0,280	0,258
88	1	0,293	0,192
89	4	0,343	0,382
90	4	0,307	0,262
91	4	0,272	0,239
92	4	0,345	0,280
93	4	0,372	0,205
94	4	0,297	0,198
95	4	0,306	0,174
96	4	0,324	0,241
97	4	0,490	0,238
98	4	0,335	0,260
99	4	0,396	0,255
100	4	0,365	0,249
101	4	0,265	0,213
102	4	0,278	0,195
103	4	0,447	0,376
104	4	0,327	0,207
105	4	0,381	0,358
106	4	0,289	0,336
108	1	0,378	0,343
109	4	0,343	0,307
110	4	0,338	0,304
112	4	0,390	0,414
113	4	0,339	0,210

## continuação Anexo C

<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Canferol (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quercetina (mg g<sup>-1</sup>)</b>
<b>114</b>	4	0,324	0,179
<b>115</b>	4	0,250	0,190
<b>116</b>	4	0,261	0,331
<b>117</b>	4	0,337	0,298
<b>118</b>	4	0,187	0,588
<b>119</b>	4	0,412	0,278

**ANEXO D**

Parâmetros de ionização do espectrômetro de massas

<b>Íon precursor (m/z)<sup>-</sup></b>	<b>Q3</b>	<b>DP*</b>	<b>EP*</b>	<b>CEP*</b>	<b>CE*</b>	<b>CXP*</b>
289	203	-31	-3,50	-22,35	-19,00	-4,00
289	187	-31	-3,50	-22,35	-17,00	-4,00
463	301	-31	-3,50	-28,79	-40,00	-4,00
561	543	-31	-3,50	-32,41	-40,00	-4,00
561	435	-31	-3,50	-32,41	-30,00	-4,00
577	407	-31	-3,50	-33,01	-40,00	-4,00
577	289	-31	-3,50	-33,01	-30,00	-4,00
577	305	-31	-3,50	-33,01	-40,00	-4,00
593	289	-31	-3,50	-33,60	-40,00	-4,00
593	285	-31	-3,50	-33,60	-40,00	-4,00
609	301	-31	-3,50	-34,19	-40,00	-4,00
609	289	-31	-3,50	-34,19	-30,00	-4,00
833	561	-31	-3,50	-42,48	-40,00	-4,00
833	543	-31	-3,50	-42,48	-30,00	-4,00

\* DP- Declustering Potential; EP- Entrance Potential; CEP- Collision Cell Entrance Potential; CE- Collision Energy; CXP- Collision Cell Exit Potential.





**ANEXO E**

Somatório da área dos taninos presentes em cada indivíduo de *M. ilicifolia* pertencetes ao BAG da EPAGRI-Itajaí, SC.

<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Σ área taninos</b>	<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b>Σ área taninos</b>
<b>1</b>	2	5,64x10 <sup>6</sup>	<b>36</b>	4	2,62 x10 <sup>7</sup>
<b>2</b>	4	6,41 x10 <sup>6</sup>	<b>37</b>	1	2,11 x10 <sup>7</sup>
<b>3</b>	4	5,52 x10 <sup>6</sup>	<b>38</b>	4	3,00 x10 <sup>7</sup>
<b>4</b>	4	6,65 x10 <sup>6</sup>	<b>39</b>	4	2,07 x10 <sup>7</sup>
<b>5</b>	3	5,87 x10 <sup>6</sup>	<b>40</b>	4	1,81 x10 <sup>7</sup>
<b>6</b>	4	5,76 x10 <sup>6</sup>	<b>41</b>	4	1,60 x10 <sup>7</sup>
<b>7</b>	3	4,79 x10 <sup>6</sup>	<b>42</b>	4	1,77 x10 <sup>7</sup>
<b>8</b>	4	9,01 x10 <sup>6</sup>	<b>43</b>	4	1,84 x10 <sup>7</sup>
<b>10</b>	4	2,58 x10 <sup>7</sup>	<b>44</b>	4	2,01 x10 <sup>7</sup>
<b>12</b>	4	2,75 x10 <sup>7</sup>	<b>45</b>	4	1,91 x10 <sup>7</sup>
<b>13</b>	4	2,76 x10 <sup>7</sup>	<b>46</b>	4	1,62 x10 <sup>7</sup>
<b>14</b>	4	3,06 x10 <sup>7</sup>	<b>47</b>	4	1,20 x10 <sup>7</sup>
<b>15</b>	4	6,67 x10 <sup>6</sup>	<b>48</b>	4	2,37 x10 <sup>7</sup>
<b>16</b>	4	8,03 x10 <sup>6</sup>	<b>49</b>	4	2,13 x10 <sup>7</sup>
<b>17</b>	2	8,18 x10 <sup>6</sup>	<b>50</b>	4	1,79 x10 <sup>7</sup>
<b>18</b>	2	6,41 x10 <sup>6</sup>	<b>51</b>	4	1,28 x10 <sup>7</sup>
<b>19</b>	3	6,06 x10 <sup>6</sup>	<b>52</b>	4	2,01 x10 <sup>7</sup>
<b>20</b>	4	7,09 x10 <sup>6</sup>	<b>53</b>	4	6,15 x10 <sup>6</sup>
<b>22</b>	4	7,10 x10 <sup>6</sup>	<b>54</b>	4	6,08 x10 <sup>6</sup>
<b>23</b>	4	8,30 x10 <sup>6</sup>	<b>55</b>	4	4,65 x10 <sup>6</sup>
<b>24</b>	1	4,42 x10 <sup>6</sup>	<b>56</b>	4	5,31 x10 <sup>6</sup>
<b>25</b>	2	6,91 x10 <sup>6</sup>	<b>57</b>	4	4,57 x10 <sup>6</sup>
<b>26</b>	4	5,72 x10 <sup>6</sup>	<b>58</b>	4	4,29 x10 <sup>6</sup>
<b>27</b>	4	5,81 x10 <sup>6</sup>	<b>59</b>	4	4,66 x10 <sup>6</sup>
<b>28</b>	4	5,42 x10 <sup>6</sup>	<b>60</b>	4	2,14 x10 <sup>7</sup>
<b>29</b>	3	2,52 x10 <sup>7</sup>	<b>61</b>	4	1,58 x10 <sup>7</sup>
<b>30</b>	3	1,92 x10 <sup>7</sup>	<b>62</b>	4	1,50 x10 <sup>7</sup>
<b>31</b>	3	1,96 x10 <sup>7</sup>	<b>63</b>	3	1,51 x10 <sup>7</sup>
<b>32</b>	3	1,64 x10 <sup>7</sup>	<b>64</b>	4	1,49 x10 <sup>7</sup>
<b>33</b>	2	1,95 x10 <sup>7</sup>	<b>65</b>	4	2,07 x10 <sup>7</sup>
<b>34</b>	4	2,67 x10 <sup>7</sup>	<b>67</b>	4	1,41 x10 <sup>7</sup>
<b>35</b>	4	2,34 x10 <sup>7</sup>	<b>68</b>	4	1,90 x10 <sup>7</sup>

## continuação Anexo E

<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b><math>\Sigma</math> área Taninos</b>	<b>Indivíduos</b>	<b>Grupos</b>	<b><math>\Sigma</math> área taninos</b>
<b>69</b>	4	1,92 x10 <sup>7</sup>	<b>103</b>	4	5,54 x10 <sup>6</sup>
<b>70</b>	1	1,85 x10 <sup>7</sup>	<b>104</b>	4	4,38 x10 <sup>6</sup>
<b>71</b>	4	1,38 x10 <sup>7</sup>	<b>105</b>	4	8,27 x10 <sup>6</sup>
<b>72</b>	4	1,67 x10 <sup>7</sup>	<b>106</b>	4	1,46 x10 <sup>7</sup>
<b>73</b>	4	1,25 x10 <sup>7</sup>	<b>108</b>	1	1,50 x10 <sup>7</sup>
<b>74</b>	4	1,07 x10 <sup>7</sup>	<b>110</b>	4	4,22 x10 <sup>6</sup>
<b>75</b>	4	1,52 x10 <sup>7</sup>	<b>112</b>	4	2,04 x10 <sup>6</sup>
<b>76</b>	4	2,12 x10 <sup>7</sup>	<b>113</b>	4	6,49 x10 <sup>6</sup>
<b>77</b>	4	1,58 x10 <sup>7</sup>	<b>114</b>	4	1,24 x10 <sup>7</sup>
<b>78</b>	4	6,68 x10 <sup>6</sup>	<b>115</b>	4	6,34 x10 <sup>6</sup>
<b>79</b>	4	5,45 x10 <sup>6</sup>	<b>116</b>	4	4,53 x10 <sup>6</sup>
<b>80</b>	4	5,27 x10 <sup>6</sup>	<b>117</b>	4	3,24 x10 <sup>6</sup>
<b>81</b>	4	3,60 x10 <sup>6</sup>	<b>118</b>	4	1,53 x10 <sup>7</sup>
<b>82</b>	4	5,70 x10 <sup>6</sup>	<b>119</b>	4	1,77 x10 <sup>7</sup>
<b>83</b>	4	5,05 x10 <sup>6</sup>			
<b>85</b>	4	5,69 x10 <sup>6</sup>			
<b>87</b>	4	3,20 x10 <sup>6</sup>			
<b>88</b>	1	4,40 x10 <sup>7</sup>			
<b>89</b>	4	1,07 x10 <sup>7</sup>			
<b>90</b>	4	3,94 x10 <sup>6</sup>			
<b>91</b>	4	1,54 x10 <sup>7</sup>			
<b>92</b>	4	1,54 x10 <sup>7</sup>			
<b>93</b>	4	1,47 x10 <sup>7</sup>			
<b>94</b>	4	1,21 x10 <sup>7</sup>			
<b>95</b>	4	1,37 x10 <sup>7</sup>			
<b>96</b>	4	1,73 x10 <sup>7</sup>			
<b>97</b>	4	1,89 x10 <sup>7</sup>			
<b>98</b>	4	1,92 x10 <sup>7</sup>			
<b>99</b>	4	1,69 x10 <sup>7</sup>			
<b>100</b>	4	1,46 x10 <sup>7</sup>			
<b>101</b>	4	4,37 x10 <sup>7</sup>			
<b>102</b>	4	5,30 x10 <sup>6</sup>			