UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ELAINE CRISTINA CABRAL

**Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por
Espectrometria de Massas para a Análise de
Extratos de Produtos Naturais**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
10/11/2010

ELAINE CRISTINA CABRAL

**Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por
Espectrometria de Massas para a Análise de Extratos
de Produtos Naturais**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química Orgânica.*

Orientador: Prof. Dr. Jose Manuel Riveros

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cabral, Elaine Cristina
C117u Utilização da técnica de *fingerprinting* por espectrometria
de massas para a análise de extratos de produtos naturais /
Elaine Cristina Cabral -- São Paulo, 2010.
144p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Riveros, Jose Manuel

1. Produtos naturais 2. Espectrometria de massas : Química
analítica : Orgânica I.T. II. Riveros, Jose Manuel, orientador.

547.7 CDD

Elaine Cristina Cabral

**Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por Espectrometria de Massas para a
Análise de Extratos de Produtos Naturais**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química Orgânica*

Aprovado em: 20/12/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Manuel Riveros

Instituição: Instituto de Química – USP/São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo

Instituição: Instituto de Química – UNICAMP/Campinas

Assinatura: _____

Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre

Instituição: Instituto de Biologia - UNESP/Rio Claro

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Alberto Beraldo de Moraes

Instituição: Instituto de Química – USP/Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Prof. Dr Pio Colepicolo Neto

Instituição: Instituto de Química- USP/São Paulo

Assinatura: _____

Ao meu marido, meu grande amor e companheiro.

A minha família, meu porto seguro.

E aos meus amigos, a família que eu escolhi.

Agradecimentos

Aos professores Dr. José Manuel Riveros e Dr. Marcos N. Eberlin pela orientação e paciência;

A CAPES, CNPq e Fapesp pelo financiamento;

Aos professores(as) Dra. Mary Ann Foglio, Dra. Carmen Lucia Queiroga, Dr. Ílio Montanari e ao corpo técnico do CPQBA pela colaboração e fornecimento das amostras de *A. chica*, *M. ilicifolia* e *P. pubescens*;

Ao professor Edy de Souza Brito pela amizade, colaboração e fornecimento de amostras de *A. occidentale*;

Aos amigos dos laboratórios da USP e da Unicamp, que tornaram a realização deste trabalho menos árdua e muito mais divertida;

A Deus, pela força, auxílio e consolo nas horas mais difíceis e que permitiu a finalização deste trabalho.

Resumo

Cabral, E. C. **Utilização da Técnica de *Fingerprinting* por Espectrometria de Massas para a Análise de Extratos de Produtos Naturais**. 2010. 144p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Palavras-chave: Espectrometria de Massas, *Fingerprinting*, *Maytenus ilicifolia* Mart, *Arrabidaea chica* Verlot, *Pterodon pubescens* Benth, *Anacardium occidentale* L.

Foi desenvolvida uma nova metodologia de análise de extratos e partes de plantas medicinais, via espectrometria de massas (MS) com infusão direta de amostra, técnica analítica denominada *fingerprinting* ou “impressão digital” química. Essa abordagem, que envolve mínimo preparo de amostra, foi aplicada visando detectar as condições e as épocas adequadas para cultivo e/ou coleta de produtos naturais, permitindo a obtenção de uma matéria-prima vegetal com princípios ativos e concentrações padronizadas, assim como auxiliar no reconhecimento e na compreensão das interações ecológicas do vegetal com seu ambiente. A metodologia analítica envolveu MS com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) nos modos positivo e negativo e experimentos de fragmentação de íons de interesse (MS/MS) por inserção direta do extrato diluído e frações ativas de *Maytenus ilicifolia*, de extratos de *Arrabidaea chica* de diferentes acessos (origens geográficas), assim como óleos de *Pterodon pubescens* e as amêndoas e o pedúnculo de diferentes clones de *Anacardium occidentale*. A caracterização das amêndoas e pedúnculos de *A. occidentale*, assim como de seus respectivos clones por meio do perfil de seus constituintes químicos foi realizada com sucesso. Na extração da amêndoa empregando-se éter, foi possível caracterizar o perfil de triacilgliceróis (TAG) por ESI(+) e ácidos graxos livres por ESI(-). Na extração do suco do pedúnculo empregando-se isopropanol, foram detectados íons referentes aos ácidos anacárdicos por ESI(-). Foram avaliados os principais parâmetros que possibilitam a ionização por ESI, tais como voltagens do capilar, cone e do cone extrator, e a influência de cada um destes parâmetros no perfil obtido nos espectros de ESI(-) do suco. Para *A. chica* a metodologia mostrou-se eficiente na bioprospecção de antocianidinas e dentre os nove acessos analisados, foi possível indicar aquele que

produziu maior quantidade de material corante em relação a biomassa. Também foram avaliadas metodologias de extração por tratamento enzimático, o qual ocasionou aumento da intensidade de agliconas, provavelmente devido à hidrólise das antocianinas. A ocorrência de hidrólise também foi observada na em diferentes metodologias de secagem das folhas, principalmente na secagem realizada ao sol com borrifação de água. Houve variação sazonal na produção de metabólitos secundários, como pudemos observar nos experimentos realizados com amostras coletadas de 2007 a 2009. Para *M. ilicifolia*, foi possível caracterizar uma série de compostos relacionados à atividade antiúlcera já conhecidos da literatura, como dulcitol, catequina e derivados e flavonóides glicosilados. A metodologia proposta foi aplicada ainda na avaliação do melhoramento agrícola de *M. ilicifolia* por comparação dos perfis dos compostos identificados. A metodologia desenvolvida para análise direta de *P. pubescens* mostrou-se eficiente na detecção e identificação de compostos bioativos, possibilitando a caracterização rápida e sem preparo de amostra do óleo da semente. Em conclusão, a técnica de *fingerprinting* MS permite de maneira rápida, informativa e com mínimo preparo que amostras, que produtos naturais sejam caracterizados e tenham sua qualidade monitorada.

Abstract

Cabral, E. C. **Use of Fingerprinting Technique for Mass Spectrometry for the Analysis of Extracts of Natural Products.** 2010. 144p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Keywords: Mass Spectrometry, Fingerprinting, *Maytenus ilicifolia* Mart, *Arrabidaea chica* Verlot, *Pterodon pubescens* Benth, *Anacardium occidentale* L.

A new analytical methodology for the analysis of medicinal plant parts and extracts via direct infusion mass spectrometry (MS) has been developed. This analytical approach, named chemical fingerprinting, involves minimal sample preparation and was applied in this work with the aim to detect optimal culture conditions, culture periods and harvest times for obtaining raw natural products with highest active principle and concentrations, as well as to understand and recognizing ecological interactions between plant and its surrounding environment. The analytical methodology included MS with electrospray ionization (ESI) in the positive (+) and negative (-) modes, as well as fragmentation of ions of interest (MS/MS) experiments. The diluted extract and active fractions of *Maytenus ilicifolia*, extracts of *Arrabidaea chica* from diverse geographic origins (accesses), as well as the oil from *Pterodon pubescens* and nuts of various clones of *Anacardium occidentale* were introduced by direct injection. Characterization of nuts and stems from *A. occidentale*, as well as of its respective clones by their chemical constituents has been successfully performed. After ether extraction of nuts, it was possible to characterize the triacylglycerols (TAG) by ESI(+) and free fatty acids by ESI (-). After extraction of stem juice with isopropanol, diverse ions were identified as anacardic acids by ESI(-). Also, parameters influencing to the ionization process, such as capillary voltage, cone voltage and cone extraction voltage, have been evaluated for the stem juice at ESI(-). For *A. chica*, the proposed methodology has been proven to efficiently bioprospect the anthocyanins, and among the nine accesses evaluated, it has been possible to identify the one producing higher amounts of dying material proportionally to the biomass. We also evaluated the enzymatic treatment extraction methodology, which resulted in the increase of aglycones content, probably due to anthocyanins hydrolysis. The occurrence of hydrolysis has been also observed when

leaves have been water-sprayed while drying in the sun. Seasonal influence on the production of secondary metabolite has been observed in the samples collected on the experiments performed from 2007 to 2009. For *M. ilicifolia*, it has been possible to characterize a series of compounds related to the anti ulcer activity and already reported in the literature, such as dulcitol, catechin and derivatives and flavonoid glycosides. The proposed methodology has been applied in the evaluation of genetic improvement of *M. ilicifolia* by comparing the identified compounds profiles. The developed methodology aimed at direct analyzing *P. pubescens* has successfully detected and identified bioactive compounds of the seed oil, allowing the fast characterization. In conclusion, the proposed MS fingerprinting methodology allows in an informative, straightforward and with minimal sample preparation the chemical characterization and quality control of natural products.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACN - Acetonitrila

[A – H][–] - Aglicona desprotonada

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APCI-MS - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*

APCI-MS/MS - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry*

APCI(±)-MS - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry in negative or positive-ion mode*

APCI(±)-MS/MS - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry in negative or positive-ion mode*

API - *Atmospheric Pressure Ionization*

CCD - Cromatografia em camada delgada

CID - *Collision-Induced Dissociation*

CE-MS - *Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry*

EI - *Electron Ionization*

ESI - *Electrospray Ionization*

ESI-MS - *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*

ESI-MS/MS - *Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*

eV - Elétron Volts

FAB - *Fast Atom Bombardment*

FT-IR - *Fourier Transform Infrared*

FT-MS - *Fourier Transform Mass Spectrometry*

gal – galactose

GC-MS - *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

h - hexapolo

Hex - hexose

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

hQh-Tof - hexapolo/quadrupolo/hexapolo – Time of flight analyser

HRMS - *High Resolution Mass Spectrometry*

ICR - *Ion Cyclotron Resonance*

kV - Kilo Volts

LC-MS - *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

MeOH - Metanol
M.M. - Massa molecular
[M-Cl]⁻ - Aduto de cloro
[M+H]⁺ - Molécula protonada
[M-H]⁻ - Molécula desprotonada
[M+K]⁺ - Aduto de potássio
[M+Na]⁺ - Aduto de sódio
MS - *Mass spectrometry*
MS/MS ou MSⁿ - *Tandem mass spectrometry*
m/z - Razão massa sobre carga
OH - Hidroxila
OMe - Metoxila
ppb - Parte por bilhão (μL/L)
PCA - *Principal Component Analysis*
Q - Quadrupolo
rha - raminose
RMN - Ressonância magnética nuclear
TIC - *Total Ion Current*
Tof - *Time of flight analyser*
TSP - *Thermospray*

Lista de Figuras

	Capítulo 1	Página
Figura 1.1	Representação de uma fonte de ionização por <i>Electrospray</i>	3
Figura 1.2	Mecanismos de formação de íons em ESI	4
Figura 1.3	Esquema simplificado para uma análise de <i>fingerprinting</i>	5
Figura 1.4	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo e a produção de metabólitos secundários em plantas	9
Figura 1.5	Esquema de um espectrômetro de massas Q-Tof Micromass	12
Figura 1.6	Representação do funcionamento do HCT Ultra Bruker	13
Figura 1.7	Representação do movimento ciclotrônico de íons e a obtenção do espectro de massas via transformada de Fourier	14
	Capítulo 2	
Figura 2.1	Cajueiro anão precoce	16
Figura 2.2	Frutos de diferentes clones de cajueiro anão precoce	18
Figura 2.3	ESI(+)-MS da amêndoa extraída com MeOH/H ₂ O (1:1) + 0,1 % ácido fórmico	21
Figura 2.4	ESI(+)-MS/MS dos íons de a) <i>m/z</i> 885, b) <i>m/z</i> 543, c) <i>m/z</i> 723, d) <i>m/z</i> 705, e) <i>m/z</i> 381	22
Figura 2.5	ESI(+)-MS da amêndoa extraída com éter	22
Figura 2.6	Ampliação do espectro da Figura 2.5c na região dos triglicerídeos	23
Figura 2.7	ESI(-)-MS da amêndoa extraída com éter mostrando a região do ácidos graxos livres	24
Figura 2.8	Pedúnculo coletados no campo de cultivo experimental da EMBRAPA – Pacajus/CE	25
Figura 2.9	Espectros de a) ESI(-) e b) ESI(+) obtidos da extração do suco do pedúnculo com isopropanol	26
Figura 2.10	Espectros de ESI(-) ampliado	26
Figura 2.11	Possíveis estruturas detectadas no suco de caju por ESI(-)-MS	27

Figura 2.12	ESI(-)MS/MS dos íons de a) m/z 341, b) m/z 343, c) m/z 345, d) m/z 347 e e) m/z 373	28
Figura 2.13	ESI(-)-MS da extração do pedúnculo com isopropanol ampliado na região dos ácidos anacárdicos obtido no equipamento Ion-Trap	28
Figura 2.14	a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 345 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 301	29
Figura 2.15	a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 373 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 329	30
Figura 2.16	Possíveis estruturas dos íons diagnósticos dos ácidos anacárdicos detectados	30
Figura 2.17	a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 343 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 299	31
Figura 2.18	a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 341 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 297	32
Figura 2.19	a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 347 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 303	33
Figura 2.20	<i>Score Plot</i> obtido das análises da amêndoa de acordo com o perfil de TGAs	35
Figura 2.21	<i>Score Plot</i> obtido das análises do suco do pedúnculo extraído com isopropanol de acordo com o <i>fingerprinting</i> obtido por ESI(-)-MS	36
Figura 2.22	Representação da fonte de ionização <i>Z-spray</i> do Q-Tof Micromass	37
Figura 2.23	TIC obtido pela variação da voltagem do capilar ao longo do tempo	38
Figura 2.24	ESI(-)-MS obtidos para diferentes voltagens de capilar	38
Figura 2.25	Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação da voltagem do capilar	39
Figura 2.26	TIC obtido pela variação da voltagem do cone ao longo do tempo	40
Figura 2.27	ESI(-)-MS obtidos para diferentes voltagens de cone	40
Figura 2.28	Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação da voltagem do cone	41
Figura 2.29	TIC obtido pela variação da voltagem do cone extrator ao longo do tempo	42

Figura 2.30	Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação da voltagem do cone extrator	43
Figura 2.31	TIC obtido pela variação do fluxo de infusão ao longo do tempo	44
Figura 2.32	ESI(-)-MS obtidos para diferentes fluxos de infusão	44
Figura 2.33	ESI(-)-MS obtidos para adição de diferentes aditivos auxiliares de ionização	45
Figura 2.34	Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação do aditivo auxiliar de ionização	45

Capítulo 3

Figura 3.1	<i>Arrabidaea chica</i>	47
Figura 3.2	Agliconas isoladas das folhas de <i>A. chica</i>	48
Figura 3.3	Antocianinas mais comuns encontradas na literatura	49
Figura 3.4	Plantas de acessos diferentes cultivadas no CPQBA	50
Figura 3.5	Representação da extração e obtenção de frações de <i>A. chica</i>	52
Figura 3.6	Espectros de ESI(+)-MS do extrato a) AC-1 e das frações b) AC-2, c) AC-3 e d) AC-4 avaliadas inicialmente	54
Figura 3.7	Espectros de ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 285, b) m/z 299, c) m/z 301 e d) m/z 315	55
Figura 3.8	Proposta de fragmentação dos íons de a) m/z 285, b) m/z 299, c) m/z 301 e d) m/z 315	56
Figura 3.9	Proposta de fragmentação dos íons de a) m/z 317, b) m/z 303 e c) m/z 287	57
Figura 3.10	ESI(+)-MS dos extratos obtidos a) sem tratamento enzimático e b) com tratamento enzimático	60
Figura 3.11	Intensidades relativas de antocianinas com m/z 285, 299, 301, 463 e 477 detectadas por ESI-MS para amostras sazonais extraídas a) sem tratamento prévio com xilanases e b) com tratamento prévio com xilanases, por 2 horas a 40 °C	60
Figura 3.12	Gráfico de otimização do tempo de fermentação	61
Figura 3.13	Folhas secas e moídas dos grupos a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso	62

Figura 3.14	Espectros de massas em ESI(+)-MS obtidos através da extração das folhas secas de forma diferentes: a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso	62
Figura 3.15	Heatmap gerado pelo software GenePattern 2.0 para folhas secas de forma diferentes: a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso	63
Figura 3.16	Gráficos dos 9 acessos com as intensidades relativas das antocianidinas de acordo com a forma de secagem	64
Figura 3.17	Soluções dos estratos obtidas a partir de diferentes acessos cultivados no campo experimental	65
Figura 3.18	Espectros de ESI(+)-MS dos extratos avaliados dos acessos a) 1, b) 2, c) 3, d) 4, e) 5, f) 6 e g) 7	65
Figura 3.19	Espectros de ESI(+)-MS dos extratos a) de flores e b) de folhas	66
Figura 3.20	Gráficos dos acessos 3 (a) e 5 (b) tratados com diferentes concentrações de enzima. Intensidades relativas das antocianidinas e antocianinas detectadas nas folhas diferenciando apenas as antocianidinas	67
Figura 3.21	Gráficos dos acessos 3 (a) e 5 (b) tratados com diferentes concentrações de enzima. Intensidades relativas das antocianidinas e antocianinas detectadas nas folhas diferenciando apenas as antocianinas	67
Figura 3.22	Gráficos dos acessos 3 (a) e 5 (b) obtidos da fermentação em relação a concentração enzimática	68
Figura 3.23	Gráfico das intensidades das antocianidinas e antocianinas dos acessos 3 e 5 com e sem tratamento enzimático	68
Figura 3.24	Gráficos dos acessos 1, 2 e 3 com as diferentes intensidades das antocianidinas durante os anos de a) 2007, b) 2008 e c) 2009 como também as respectivas temperaturas médias e precipitação pluviométrica	70
Figura 3.25	Gráficos dos acessos 4, 5 e 6 com as diferentes intensidades das antocianidinas durante os anos de a) 2007, b) 2008 e c) 2009, como também as temperaturas médias e precipitação pluviométrica	71
Figura 3.26	Gráficos dos acessos 7, 8 e 9 com as diferentes intensidades das antocianidinas durante os anos de a) 2007, b) 2008 e c) 2009, como também as respectivas temperaturas médias e precipitação pluviométrica	72

Capítulo 4

Figura 4.1	Diterpenos lineares característicos do gênero <i>Pterodon</i>	75
Figura 4.2	Dipterpenos cíclicos característicos do gênero <i>Pterodon</i>	76
Figura 4.3	Novo diterpeno isolado de <i>P. pubescens</i>	77
Figura 4.4	<i>Pterodon pubescens</i>	78
Figura 4.5	Metodologia de extração para as sementes de <i>P. pubescens</i>	79
Figura 4.6	Espectros de ESI(+)-MS das amostras a) PP-1, b) PP-2 e c) PP-3	80
Figura 4.7	Espectros de ESI(+)-MS ampliados das amostras a) PP-1, b) PP-2 e c) PP-3	81
Figura 4.8	Espectros de ESI(+)-MS/MS para os íons de m/z a) 271, b) 289 e c) 307	82
Figura 4.9	Proposta de fragmentação para o 14, 15-epoxi-geranilgeraniol	83
Figura 4.10	Espectros de ESI(+)-MS/MS para os íons de m/z a) 613, b) 631 e c) 649	84
Figura 4.11	Espectros de ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 403	84
Figura 4.12	Proposta de fragmentação para o diterpeno 20	85
Figura 4.13	Espectros de ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 361	86
Figura 4.14	Proposta de fragmentação para o diterpeno 33	86
Figura 4.15	Espectros de ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 405 e b) m/z 363	87

Capítulo 5

Figura 5.1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	90
Figura 5.2	Compostos isolados de <i>M. ilicifolia</i>	91
Figura 5.3	Flavonol-3-O-glicosídeo de <i>M. ilicifolia</i>	92
Figura 5.4	Catequinas e procianidinas	94
Figura 5.5	Metodologia de obtenção dos extratos de <i>M. ilicifolia</i>	96
Figura 5.6	Esquema geral da análise direta das folhas de <i>M. ilicifolia</i> por ESI(+)-MS	97

Figura 5.7	a) ESI(+)-MS e b) ESI(-)-MS obtidos para o extrato etanólico ativo	99
Figura 5.8	Ampliação (m/z de 100 a 500) do espectro de ESI(+)-MS obtido para o extrato etanólico ativo	99
Figura 5.9	ESI(+)-MS/MS do íon referente ao dulcitol protonado (m/z 183 $[M + H]^+$) a) encontrado no extrato e b) no padrão comercial	100
Figura 5.10	ESI(+)-MS/MS dos íons referentes aos dímeros a) de próton (m/z 365), com sódio (m/z 387) e com potássio (m/z 403) do dulcitol	101
Figura 5.11	ESI(+)-MS/MS do íon referente a catequina protonada (m/z 291 $[M + H]^+$)	101
Figura 5.12	Ampliação (m/z de 500 a 1000) do espectro de ESI(+)-MS obtido para o extrato etanólico ativo	102
Figura 5.13	ESI(+)-MS/MS dos íons referentes aos flavonóides glicosilados de a) m/z 741 e b) m/z 757	102
Figura 5.14	ESI(+)-MS/MS dos íons referentes aos flavonóides glicosilados de a) m/z 595 e b) m/z 611	103
Figura 5.15	ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 563 e b) m/z 579	103
Figura 5.16	Folhas das diferentes famílias de <i>M. ilicifolia</i> avaliadas	104
Figura 5.17	ESI(+)-MS obtido a partir da extração e análise das folhas de <i>M. ilicifolia</i>	105
Figura 5.18	Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 4A	105
Figura 5.19	Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 4/1	106
Figura 5.20	Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 4/3	106
Figura 5.21	Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 7/2	107
Figura 5.22	Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 8/1	107
Figura 5.23	Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 10/1	108

Lista de Tabelas

	Capítulo 1	Página
Tabela 1.1	Principais classes de compostos constituintes conhecidos das plantas medicinais estudadas neste projeto	10
	Capítulo 2	
Tabela 2.1	Amostras dos clones de <i>A. occidentale</i> analisadas	19
Tabela 2.2	Atribuição dos principais TAGs observados no espectro ESI(+)-MS para a extração com éter	24
Tabela 2.3	Atribuição dos principais ácidos graxos livres observados no espectro ESI(-)-MS para a extração com éter	25
Tabela 2.4	Dados de ESI(+/-)-MS(/MS ⁿ) e HRMS sumarizados das substâncias identificadas	34
	Capítulo 3	
Tabela 3.1	Localização dos diferentes acessos analisados	51
Tabela 3.2	Estruturas das antocianidinas	58
	Capítulo 4	
Tabela 4.1	Amostras de óleo de <i>P. pubescens</i> analisadas	80
Tabela 4.2	Possíveis diterpenos detectados nas amostras analisadas	81
Tabela 4.3	Dados de ESI(+)-HRMS sumarizados das substâncias identificadas	88
	Capítulo 5	
Tabela 5.1	Flavonóides glicosilados identificados por 2D-LC-UV-MS	93
Tabela 5.2	Intensidade relativa média do íon de <i>m/z</i> 183	108
Tabela 5.3	Anova para as famílias em relação ao dulcitol (<i>m/z</i> 183)	109
Tabela 5.4	Intensidade relativa média do íon de <i>m/z</i> 291	109
Tabela 5.5	Anova para as famílias em relação a catequina (<i>m/z</i> 291)	109
Tabela 5.6	Classificação das famílias em relação ao íon de <i>m/z</i> 291	110
Tabela 5.7	Intensidade relativa média do íon de <i>m/z</i> 579	110
Tabela 5.8	Anova para as famílias em relação o derivado de catequina (<i>m/z</i> 579)	111
Tabela 5.9	Intensidade relativa média do íon de <i>m/z</i> 741	111

Tabela 5.10	Anova para as famílias em relação o derivado ao flavonóide A (m/z 741)	111
Tabela 5.11	Intensidade relativa média do íon de m/z 757	112
Tabela 5.12	Anova para as famílias em relação o derivado ao flavonóide B (m/z 757)	112
Tabela 5.13	Intensidade relativa média do íon de m/z 595	113
Tabela 5.14	Anova para as famílias em relação o derivado ao flavonóide C (m/z 595)	113
Tabela 5.15	Classificação das famílias em relação ao íon de m/z 595	114

Sumário

Capítulo 1: Introdução	Página
1.1 Espectrometria de Massas Aplicada a Análise de Produtos Naturais	01
1.2 <i>Fingerprinting</i> e Espectrometria de Massas com Infusão Direta	04
1.3 <i>Fingerprinting</i> de Frutas Tropicais	06
1.4 <i>Fingerprinting</i> de Plantas Medicinais	07
1.5 Objetivos Gerais	10
1.6 Parte Experimental Geral	11
1.6.1 Material Vegetal	11
1.6.2 Preparo de Amostra	11
1.6.3 Equipamentos Utilizados	11
1.6.4 Tratamento de Dados	14
 Capítulo 2: <i>Anacardium Occidentale</i> L.	
2.1 Introdução	16
2.2 Objetivos Específicos	18
2.3 Parte Experimental	19
2.3.1 Material vegetal	19
2.3.2 Preparo de amostra	19
2.3.3 Obtenção dos espectros de massas	20
2.4 Resultados e Discussão	21
2.4.1 Caracterização do perfil químico da amêndoa de <i>A. occidentale</i>	21
2.4.2 Caracterização do perfil químico do pedúnculo de <i>A. occidentale</i>	25
2.4.3 Avaliação dos perfis químicos dos clones da amêndoa e do pedúnculo de <i>A. occidentale</i>	34
2.4.4 Avaliação da influência dos parâmetros de ionização nos perfis químicos de <i>A. occidentale</i> obtidos por ESI-MS <i>fingerprinting</i>	36
2.5 Conclusão	46

Capítulo 3: *Arrabidaea chica* Verlot

3.1	Introdução	47
3.2	Objetivos específicos	50
3.3	Parte Experimental	51
3.3.1	Material vegetal	51
3.3.2	Preparo de amostra	51
3.3.3	Obtenção dos espectros de Massa	53
3.4	Resultados e Discussão	53
3.4.1	Caracterização de perfil de antocianidinas em extratos de <i>A. chica</i>	53
3.4.2	Avaliação da metodologia de extração de antocianidinas das folhas de <i>A. chica</i>	59
3.4.3	Avaliação do perfil de antocianidinas dos diferentes acessos de <i>A. chica</i>	64
3.4.4	Avaliação da sazonalidade na produção de antocianidinas em <i>A. chica</i>	68
3.5	Conclusão	73

Capítulo 4: *Pterodon pubescens* Benth

4.1	Introdução	75
4.2	Objetivos específicos	78
4.3	Parte Experimental	78
4.3.1	Material vegetal	78
4.3.2	Preparo de amostra	79
4.3.3	Obtenção dos espectros de massas	79
4.4	Resultados e Discussão	80
4.4.1	Caracterização dos óleos de <i>P. pubescens</i> através do perfil de diterpenos	80
4.5	Conclusão	88

Capítulo 5: *Maytenus ilicifolia* Mart

5.1	Introdução	90
5.2	Objetivos específicos	95
5.3	Parte Experimental	95
5.3.1	Material vegetal	95
5.3.2	Preparo de amostra	96
5.3.3	Obtenção dos espectros de massas	97
5.3.4	Tratamento de Dados	97
5.4	Resultados e Discussão	98
5.4.1	Caracterização dos extratos e folhas de <i>M. ilicifolia</i>	98
5.4.2	Avaliação da padronização vegetal de <i>M. ilicifolia</i>	104
5.5	Conclusão	114
	Considerações Finais	116
	Referências Bibliográficas	117

Capítulo 1: Introdução

1.1. Espectrometria de Massas Aplicada a Análise de Extratos de Produtos Naturais

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental muito abrangente dentro da ciência moderna, com amplas aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Isto se deve a recentes avanços em instrumentação e ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização que a revitalizaram.

A espectrometria de massas é uma técnica de análise existente há quase um século, porém, inicialmente era restrita a análise de gases, substâncias volatéis e termicamente estáveis. Com a motivação comercial gerada pela utilização desta técnica na indústria do petróleo, onde é utilizada até hoje, ¹ muitas inovações além da ionização eletrônica (EI) foram realizadas, como o desenvolvimento dos analisadores quadrupolo (1953), a espectrometria de massas de alta resolução (1956) e o acoplamento com cromatografia gasosa (1957). Mesmo com estas evoluções, a espectrometria de massas ainda era limitada em relação ao tipo de substâncias analisáveis.

No início da década de 80, a análise de compostos polares foi viabilizada com o advento das técnicas de ionização FAB (*Fast Atom Bombardment*) ² e TSP (*Thermospray*), ³ porém estas técnicas apresentavam problemas: baixo limite de massa molecular detectável (~1000 Da) por TSP, presença de íons indesejáveis provenientes da matriz utilizada por FAB, e a operação bastante complexa de ambas as técnicas.

Atualmente, compostos polares e termicamente lábeis podem ser analisados por técnicas de ionização brandas, que operam em pressão atmosférica, tais como ESI (*Electrospray*) ⁴⁻⁶ e APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), ⁷ APPI (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*), ⁸ DESI (*Dessorption Electrospray Ionization*),⁹ EASI (*Easy Ambient Sonicspray Ionization*) ¹⁰, com grande rapidez, sensibilidade de picomol a fentomol, seletividade e preparo mínimo de amostra. A evolução das técnicas de ionização e dos analisadores de massas tornou possível a análise qualitativa e quantitativa de misturas orgânicas complexas de qualquer

espécie, em uma faixa de massas praticamente ilimitada, além de possibilitar o acoplamento com a cromatografia líquida, incompatível com as técnicas de ionização anteriormente citadas devido a interface entre o espectrômetro de massas, onde a fonte de ionização opera em uma região de alto vácuo, e o cromatógrafo líquido que opera em pressão atmosférica.

As técnicas de ionização brandas mais utilizadas para a análise de substâncias orgânicas de médio e baixo peso molecular são as técnicas API (*Atmospheric Pressure Ionization*), principalmente ESI, APCI e APPI, sendo a ionização por ESI a mais utilizada. No ESI, a ionização é obtida através da protonação ou desprotonação, ou ainda pela adição de outros íons, como Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Cl^- , formando adutos. As espécies observadas são chamadas protonadas $[\text{M}+\text{H}]^+$, desprotonadas $[\text{M}-1\text{H}]^-$ ou de íons adutos de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ou potássio $[\text{M}+\text{K}]^+$ por exemplo.¹¹

Diferentemente da técnica de ionização por elétrons (EI), onde ocorre a perda ou a captura de elétrons gerando íons com energia interna muito alta e conseqüentemente muita fragmentação, nas técnicas de ionização branda a informação estrutural é pouca ou inexistente, pois os íons gerados têm baixas energias internas, o que resulta em espectros de massas com sinais intensos relativos a moléculas protonadas ou desprotonadas com pouca ou nenhuma informação sobre íons relativos a fragmentos.

Esta ausência de informação estrutural impulsionou o desenvolvimento de técnicas de fragmentação induzidas, e com isso surgiu a espectrometria de massas *tandem* ou sequencial (MS/MS), onde geralmente os fragmentos são gerados por dissociação induzida por colisão (CID – *Collision-Induced Dissociation*), ou seja, pela colisão do íon gerado na fonte de ionização com uma molécula de gás (tipicamente argônio) em uma câmara de colisão.

A ionização por ESI é realizada a pressão atmosférica, produzindo íons gasosos a partir de uma solução de amostra inserida através de um capilar, ao qual uma tensão elétrica elevada é aplicada (2-4 kV). ESI é um método para produzir moléculas gasosas ionizadas por protonação ou desprotonação a partir de uma solução líquida. Este processo pode ser dividido em três etapas principais, a nebulização da solução da amostra em gotículas carregadas decorrentes da aplicação direta de voltagem no capilar; a liberação dos íons a partir das gotículas; e

o transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte para a região de alto vácuo do analisador.¹²

Figura 1.1: Representação de uma fonte de ionização por *Electrospray*

Para explicar a liberação dos íons a partir das gotículas carregadas, existem duas propostas, o Modelo de Cargas Residuais (MCR) e o Modelo da Dessorção dos Íons (MDI). O MCR propõe que as gotículas carregadas saem da ponta do capilar num spray de formato cônico (cone de Taylor) e com o auxílio de um fluxo de gás aquecido (N₂), as gotículas carregadas com várias unidades de carga sofrem a evaporação do solvente. A redução no tamanho e conseqüentemente o aumento da densidade de carga torna a repulsão entre as cargas maior que a tensão superficial. Este efeito faz com que as gotículas se desintegram em gotículas ainda menores e o mesmo processo pode ser repetido até que o solvente seja evaporado por completo, restando apenas os íons da amostra.

O MDI propõe que o aumento da densidade superficial de carga devido à evaporação do solvente cria um campo superficial que supera as forças de solvatação dos íons antes de exceder a tensão superficial do solvente, causando a ejeção do íon antes da explosão coulômbica.¹³ Estes mecanismos favorecem a formação de íons multiplamente carregados, característica que pode ser utilizada na determinação de macromoléculas.

Figura 1.2: Mecanismos de formação de íons em ESI

Um espectro de massas com ionização por ESI, de modo geral, apresenta moléculas protonadas ou desprotonadas e seus adutos iônicos como os principais picos, apresentando poucas informações estruturais devido a ausência de fragmentação. Porém, como discutido anteriormente, estas informações podem ser obtidas por espectrometria de massas tandem ou ainda, alguma fragmentação pode ser obtida na fonte de ionização, aumentando-se os potenciais aplicados no capilar e nos cones de transmissão.

1.2 *Fingerprinting* e Espectrometria de Massa com Infusão Direta

O *fingerprinting* ou “impressão digital” química é a análise de um conjunto de amostras de forma rápida onde um grande e diferente número de metabólitos é avaliado, sem a intenção de identificar cada metabólito detectado, mas sim comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que podem variar em resposta a uma doença, exposição a uma toxina, perturbações genéticas ou ambientais,¹⁴ podendo ainda identificar substâncias discriminantes ou biomarcadores. Um esquema geral de uma análise de *fingerprinting* é mostrado na Figura abaixo.

Figura 1.3: Esquema simplificado para uma análise de *fingerprinting*.

O *fingerprinting* pode ser obtido a partir de vários tipos de matrizes biológicas, seja de natureza humana, animal ou vegetal, como por exemplo, urina, plasma, saliva, tecidos, células, folhas, frutos, caule ou raiz. Esta metodologia de análise pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica, por exemplo, ¹⁴ distinguindo diferentes estados fisiológicos entre organismos submetidos à mutação e seus organismos originais. ¹⁵ Desta maneira o *fingerprinting* pode ser de grande valia comercial ou científica em estudos de caracterização de mutações genéticas, de respostas das plantas ¹⁶ ou animais ao estresse ambiental, controle de qualidade, certificação de origem e verificação de autenticidade e/ou adulteração de extratos de plantas, ¹⁷ óleo de oliva, ¹⁸ própolis, ¹⁹ uísque, ²⁰ cerveja, ²¹ vinhos, ²² perfume ²³ assim como detecção e identificação de explosivos. ²⁴

Muitas técnicas analíticas como NMR, ²⁵ FT-IR ²⁶ e espectrometria de massas acoplada a técnicas de separação (CE-MS ²⁷, GC-MS ²⁸ e LC-MS ²⁹) ou somente com infusão direta (ESI-MS, ¹⁷⁻²² EASI-MS ²³ e DESI-MS ²⁴), têm sido utilizadas para obtenção de *fingerprints*. As vantagens mais importantes da espectrometria de massas em relação às demais técnicas são a alta sensibilidade e seletividade

combinadas com a possibilidade de confirmar a identidade de componentes presentes em amostras biológicas complexas.^{14,15}

As análises por injeção ou infusão direta são perfeitamente compatíveis e eficientes para análise de grande número de metabólitos e obtenção de *fingerprintings*. Estas técnicas são geralmente utilizadas com técnicas API, predominantemente ESI, onde um espectro de massas pode ser obtido em segundos por infusão da amostras diretamente no espectrômetro de massas, sem nenhum método de separação ou em alguns casos sem preparo de amostra.¹⁵ O tempo de análise reduzido aumenta a reprodutibilidade entre amostras e melhoram a exatidão da análise multivariada subsequente.¹⁴

Apesar da alta produtividade da espectrometria de massas com infusão direta, ela apresenta algumas limitações. Os isômeros não podem ser diferenciados por esta técnica de *screening* rápido, por terem a mesma fórmula molecular, conseqüentemente possuem as mesmas massas exatas e podem apresentar o mesmo perfil de fragmentação. Deste modo, faz-se necessária a utilização de uma técnica complementar, como por exemplo, o acoplamento com a cromatografia. Outro fenômeno decorrente da ionização que deve ser considerado é a formação de íon fragmentos na fonte de ionização. A identificação de produtos de fragmentação na fonte pode aumentar a complexidade do espectro, induzindo a uma interpretação errônea. Entretanto, no caso do ESI, a maior preocupação é a supressão iônica. Uma vez que todos os componentes da amostras são introduzidos simultaneamente na fonte de ionização, a supressão ou o aumento do sinal pode ocorrer. Isto afeta expressivamente a análise de dados, especialmente se a matriz for complexa, como urina¹⁴ ou extratos vegetais, onde os analitos de interesse podem ser mascarados facilmente, devido a presença de sais, ou clorofila respectivamente.

1.3 Fingerprinting de Frutas Tropicais

O Brasil produz 32 milhões de toneladas anuais de frutas, numa área cultivada de dois milhões de hectares, sendo o terceiro produtor mundial de frutas tropicais, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO - 2006). Mesmo assim, o país possuiu um grande número de espécies frutíferas nativas pouco exploradas.

Um país que deseja entrar na modernidade e garantir seu lugar em um mercado internacional de alimentos, cada vez mais competitivo, deve ter grupos de pesquisa e desenvolvimento capazes de avaliar e desenvolver métodos analíticos adequados para as necessidades do país. Estes métodos analíticos devem garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, e gerar um banco de dados sobre as características física e químicas dos alimentos comercializados ou potencialmente comercializáveis. Esta infra-estrutura garante à população alimentos nutritivos, seguros e de alta qualidade, além de evitar a rejeição dos produtos exportados. A análise química é também o primeiro passo para utilização eficiente das riquezas naturais.

Dados sobre a composição de frutas tropicais são úteis às indústrias, instituições de ensino e pesquisa, aos hospitais e serviços de informação à comunidade, sendo necessários a atuação de profissionais de diversas áreas, envolvendo cientistas, engenheiros, tecnólogos, nutricionistas, médicos, farmacêuticos, economistas, professores e profissionais de marketing.⁴⁴

No Brasil a escassez de dados em pesquisa de alimentos expõe a população ao consumo de alimentos de qualidade não controlada, quanto ao valor nutricional e presença de contaminantes tóxicos. Portanto, a utilização da análise química de alimentos com técnicas instrumentais rápidas de alta precisão, exatidão e versatilidade tornam-se indispensáveis em ciência de alimentos. As técnicas de MS ocuparam um papel de destaque na última década, por preencherem exatamente estes requisitos. Assim aliar a técnica de MS a ciência de alimentos, torna-se uma tarefa de suma importância tecnológica e econômica para o Brasil.

Visando contribuir no desenvolvimento da fruticultura brasileira, clones de *Anacardium occidentale* (caju) produzidos pela EMBRAPA Agroindústria Tropical (Fortaleza/CE) para o melhoramento da produção de amêndoa e pedúnculo foram estudados através do *fingerprinting*, uma vez que esta cultura é de grande importância sócio econômica, nutricional e também apresenta atividades biológicas importantes.

1.4 *Fingerprinting* de plantas medicinais

A utilização de plantas como medicamentos pela humanidade é tão antiga quanto a história do homem.³⁰ O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas

de origem vegetal tem crescido significativamente nos últimos anos, o que é evidenciado pelo aumento no número de projetos de pesquisa em empresas privadas e organizações governamentais nesta área, como também pela crescente quantidade de publicações nas principais revistas científicas das áreas de farmacologia e química.³¹

Vários produtos naturais de plantas têm sido utilizados como estruturas básicas para síntese e desenvolvimento de novos medicamentos. Alguns produtos naturais que eram obtidos exclusivamente de plantas, como a cafeína ou a teofilina, agora são produzidos comercialmente por síntese química. Substâncias como a beladona, quinina, cocaína, opiáceos, papaverina e ácido salicílico têm servido de modelos de estrutura e para síntese de drogas anticolinérgicas, anticolinesterases, antimalárica, benzocaína, procaína, lidocaína, aspirina, dentre outras. Em alguns casos, os princípios ativos continuam sendo isolados das plantas, uma vez que sua síntese química é inviável técnica e economicamente, por exemplo, a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua* L. que é utilizada no tratamento da malária.³²

O valor dos produtos naturais das plantas medicinais para a sociedade e para a economia do país é incalculável. Cerca de 30% dos produtos vendidos nas farmácias é fabricado a partir de materiais extraídos de plantas ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais.³³

Porém, principalmente nos grandes centros industrializados onde há grande especulação no comércio de plantas medicinais, alguns problemas frutos da desinformação ocorrem em função da comercialização de material sem controle, tanto na qualidade como na validade. Dúvidas quanto à procedência e a legitimação da espécie vendida são constantes, ou seja, se ela é realmente a planta que o comprador procura e se procede de fontes confiáveis. Os nomes populares confundem tanto os consumidores como os vendedores, pois variam de uma região para outra mesmo se tratando de uma mesma espécie botânica. Desta forma o uso da análise química dos extratos polares de plantas medicinais com técnicas instrumentais rápidas, de alta precisão, exatidão e versatilidade torna-se indispensável à certificação de origem, ao controle de qualidade do produto e de processo, assim como na avaliação de contaminações ou degradações, tão comuns em amostras provenientes de plantas.³³

Evidentemente, além destes estudos de identificação, adulterações e contaminações existe a necessidade de uma análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico devido aos inúmeros fatores que podem levar à variações no conteúdo dos metabólitos secundários em plantas (Figura 1.4), visando detectar as condições e as épocas adequadas para cultivo e/ou coleta, conduzindo a uma matéria-prima vegetal com os princípios ativos e as concentrações padronizados.

O controle de qualidade rigoroso realizado por meio de técnicas analíticas modernas, como a espectrometria de massas, é necessário para avaliar a constância e uniformidade na composição de metabólitos secundários garantindo a padronização do material vegetal no preparado fitoterápico em escala industrial, podendo ainda auxiliar no reconhecimento e na compreensão dessas variações, ampliando os conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente.³³

Figura 1.4: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo e produção de metabólitos secundários em plantas.³³

Na Tabela 1.1 estão descritas as principais classes de compostos conhecidas das plantas estudadas neste trabalho através do desenvolvimento e da aplicação de metodologias de *fingerprinting*.

Tabela 1.1: Principais classes de compostos constituintes conhecidos das plantas medicinais estudadas neste projeto

Espécies	Classe de substâncias
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.	Maitansinóides, ³⁴ triterpenos quinona-metídios e aromáticos, ³⁵ dímeros triterpênicos, ³⁶ poliésteres oligonicotinaos esquiterpenicos, ³⁷ flavonóides ^{38,39} e taninos. ³⁸
<i>Arrabidaea chica</i> Verlot	Antocianinas, flavonóides, taninos. ⁴⁰⁻⁴⁴
<i>Pterodon pubescens</i> Benth.	Flavonóides ⁴⁵ e diterpenos vouacapânicos, vinhaticanos e furânicos. ⁴⁶

1.5 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais do presente trabalho foram, através da utilização da espectrometria de massas com infusão direta de amostra e com detecção de íons nos modos positivo e/ou negativo, demonstrar:

- A caracterização de plantas medicinais e frutas tropicais através do *fingerprinting* de seus constituintes químicos, permitindo avaliar a padronização de matéria prima vegetal, origem geográfica, sazonalidade e melhoramento genético.
- A avaliação dos parâmetros de ionização, detalhando as vantagens e limitações do uso da técnica de *fingerprinting* e suas influências na caracterização de amostras complexas com o mínimo de preparo de amostra.
- A identificação de constituintes bioativos em extratos de produtos naturais, propondo mecanismos de fragmentação, comparando com espectros de padrões comerciais disponíveis ou isolados e/ou por comparação de dados na literatura.
- O desenvolvimento de metodologias rápidas e eficientes para a análise das matérias primas de espécies vegetais e de seus produtos de interesses medicinal,

nutricional e agro econômico para o Brasil, com o mínimo de preparo de amostra e utilização de solventes.

1.6 Parte Experimental Geral

1.6.1 Material Vegetal

Todas as amostras das plantas medicinais *A. chica*, *M. ilicifolia* e *P. Pubescens* foram cedidas pelas pesquisadoras Dra. Mary Ann Foglio e Dra. Carmen Lucia Queiroga do CPQBA – Centro Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas de Paulínia/SP. As amostras de *A. occidentale* foram cedidas pelo pesquisador Dr. Edy de Souza Brito da EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Fortaleza/CE.

1.6.2 Preparo de Amostra

Todo preparo de amostra foi realizado com o mínimo de manipulação, desta forma, foram utilizados apenas procedimentos simples, de baixo custo e em quantidades mínimas de solventes e/ou aditivos, tais como: extração com solvente sob agitação em Vortex, diluição, centrifugação, filtração simples e partição líquido-líquido em escala de microlitro (μL).

1.6.3 Equipamentos utilizados

Q-ToF Micromass

O Espectrômetro de massas Q-ToF Micromass (Manchester, UK) é hoje um equipamento versátil de ampla aplicação. A combinação de ionização por ESI ou APCI com o sistema MS/MS de configuração hQh-ToF (ortogonal) confere ao Q-ToF ampla versatilidade, sensibilidade e alta resolução nas análises de massas. Em relação aos equipamentos triploquadrupolares, o Q-ToF é até 100 vezes mais sensível. Na operação no modo ESI ou APCI-MS utiliza-se os dois hexápolos e o quadrupolo (hQh) como focalizadores do feixe de íons, o que permite a análise por ToF ortogonal com resolução de 5.000 e com alta sensibilidade característica de analisadores ToF. No modo MS/MS, o quadrupolo (Q) seleciona o íon de interesse,

que é dissociado por colisão com moléculas neutras (geralmente argônio) na câmara de colisão hexapolar (h), sendo os produtos analisados pelo Tof ortogonal com alta resolução e alta sensibilidade.

Figura 1.5: Esquema de um espectrômetro de massas Q-ToF Micromass ⁴⁷

Espectros MS/MS/MS (MS^3) podem ser obtidos no Q-ToF através do aumento da voltagem no *skimmer*. Assim a dissociação ocorre antes da passagem do feixe iônico através do primeiro analisador quadrupolar (Q) e em seguida ocorrem colisões dissociativas no hexapolo e análise no Tof.

HCT Ultra Bruker

O HCTultra II System (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) é um espectrômetro de massas que combina uma fonte de ionização por ESI e um analisador de massas do tipo *ion trap* tridimensional, onde os íons podem ser analisados, isolados e fragmentados no mesmo local.

Figura 1.6: Representação do funcionamento do HCT Ultra Bruker ⁴⁸

Neste sistema, os íons gerados na fonte de ionização são acumulados, isolados de modo seletivo e excitados por CID (MS^n) no analisador e ejetados seqüencialmente para gerar um espectro de massas. Esta é uma configuração de equipamento utilizada em estudos de identificação estrutural, pois é possível gerar um grande número de informação estrutural com experimentos do tipo MS^n .

LTQ FT Ultra Thermo

O espectrômetro de massas LTQ FT Ultra (Thermo Finigann, Bremen, Germany) possui o ESI como fonte de ionização e combina dois analisadores de massas, um íon trap linear e um ICR. A utilização de analisadores de massa do tipo ICR com transformada de Fourier é conhecida como espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FTICR-MS) e é amplamente utilizada para análises que necessitam de altíssima resolução, precisão e sensibilidade, como por exemplo, em proteômica ⁴⁹ e pretroleômica. ⁵⁰

Os íons são gerados por ESI, são acumulados, isolados de modo seletivo e excitados no *ion trap* linear por CID (MS^n), ejetados seqüencialmente e posteriormente analisados na cela de ICR, que discrimina as massas baseado na frequência ciclônica dos íons em um campo magnético fixo.

O sinal resultante é extraído a partir de uma transformada de Fourier para gerar o espectro de massa. Os espectros de massas são obtidos com resolução temporal,

devido a possibilidade de armazenar íons na cela durante tempos prolongados, que podem chegar até horas no caso de baixas pressões ($\leq 1\text{e-}9$ Torr) e campos magnético elevados gerados por ímãs supercondutores.

Figura 1.7: Representação do movimento ciclôtrônico de íons e a obtenção do espectro de massas via transformada de Fourier ⁵¹

1.6.4 Tratamento de Dados

Os espectros de massas foram tratados com os softwares MassLynx 4.1 (Waters - Manchester, UK), Xcalibur 2.0 SR2 (Thermo finigann, Bremen, Germany) e Compass 1.3 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílios dos softwares Microsoft Office Excel 2007 para análise de ANOVA e o MarkerLynx XS – Waters para análise de PCA (Principal Component Analysis).

Os dados obtidos nos espectrômetros de massas Q-Tof (Micromass) e FT-MS (Thermo Scientific) são medidas de alta resolução de massa e comparadas através do erro (em ppm) calculado em relação a massa teórica calculada pela seguinte equação:

$$E_{\text{ppm}} = \frac{[\text{massa exata (calculada)} / \text{massa experimental}] \times 10^6}{\text{Massa exata (calculada)}}$$

O erro da medida de massa de alta resolução deve ter um valor máximo de 50 ppm para o Q-Tof e de 3 ppm para o FT-MS. A massa exata foi calculada através dos softwares MassLynx 4.1 e Xcalibur 2.0 SR2.

Capítulo 2: *Anacardium occidentale* L.

2.1 Introdução

Dentre as principais frutíferas cultivadas no Brasil, destaca-se o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), encontrado em grande parte do mundo ocidental. Sua área de ocorrência está compreendida entre as latitudes de 30° Norte e 31° Sul, sendo cultivado atualmente em 27 países.

Figura 2.1: Cajueiro anão precoce

Os principais produtores de castanha são Índia, Nigéria, Brasil, Tanzânia e Indonésia, com 36,60%, 14,64%, 12,81%, 8,86% e 5,74%, respectivamente, da produção mundial.⁵² A exploração do cajueiro representa uma parcela significativa para a economia do Nordeste Brasileiro, notadamente para os Estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão e Bahia onde se encontram os maiores plantios com entrada da matéria-prima nas fábricas, de 325 mil toneladas (safra 2006/2007), oriunda de 700 mil hectares de área cultivada.⁵³

No Brasil, a produção de amêndoa de castanha de caju destina-se, tradicionalmente, ao mercado externo, gerando, em média, divisas da ordem de 150 milhões de dólares anuais. Os Estados Unidos e o Canadá são os principais mercados consumidores da amêndoa brasileira, sendo responsáveis por cerca de

85% das exportações. O agronegócio do caju no mundo movimenta cerca de 2,4 bilhões de dólares por ano.⁵⁴

O cajueiro destaca-se ainda no contexto socioeconômico pelo número de empregos diretos que gera, dos quais 35 mil no campo e 15 mil na indústria, além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos. Para o Semi-Árido nordestino, a importância é ainda maior, pois os empregos do campo são gerados na entressafra das culturas tradicionais como milho, feijão e algodão, reduzindo, assim, o êxodo rural.⁵⁵

Apesar da importância socioeconômica para os Estados do Nordeste, a cajucultura tem atravessado um período crítico, com baixa produtividade, resultado principalmente da heterogeneidade dos pomares plantados por sementes.⁵⁶ A heterogeneidade dos plantios comerciais existentes e a não utilização de tecnologias agrônomicas orientadoras mínimas comprometem todo o processo de produção, com produtividade muito baixa, em torno de 220 kg/ha. Com o desenvolvimento do cajueiro anão-precoce e da irrigação localizada, observa-se que esta realidade começa a mudar.

Várias pesquisas foram desenvolvidas para a obtenção de genótipos de cajueiro que permitissem não só o aumento de produtividade, como também a melhoria da qualidade da castanha para a indústria e o aproveitamento do pedúnculo. Desse modo, a recuperação no campo vem sendo feita com o uso de clones, cultivados dentro das normas técnicas de produção.⁵⁷ Com os pomares recebendo tratamento é possível obter produtividade superior a 3.000 kg de castanha por hectare, possibilitando o aproveitamento de até 50% do caju de mesa (pedúnculo para consumo *in natura*), cujo mercado está se consolidando na Região Sudeste do país.

O pedúnculo constitui uma proveitosa fonte alimentícia no Nordeste do Brasil, na forma "*in natura*", ou processada. Essa importância nutricional é devida a sua constituição rica em sais minerais, carboidratos, ácidos orgânicos e um elevado teor de vitamina C.⁵⁸ Por apresentar excelente valor alimentar e propriedades medicinais, tais como, ação contra eczemas, reumatismo, escorbuto e gripe,⁸¹ é também recomendado na dieta humana.⁵⁵

O mercado consumidor para pedúnculo "*in natura*" é crescente e exigente em frutos que apresentem alta resistência ao manuseio, formato piriforme e frutos de

coloração laranja e vermelha.⁵⁹ No Brasil, o pedúnculo do cajueiro pode ainda ser aproveitado na forma de subprodutos variados como sucos, sorvetes, doces, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados, e aguardentes. Nos países importadores de frutas, a falta de conhecimento do valor nutritivo do pedúnculo tem sido o principal motivo para seu baixo consumo. Entretanto, embora o caju alcance preços elevados nos principais centros de consumo brasileiros, o pedúnculo ainda não oferece retorno econômico para a maioria dos produtores, estimando-se que somente 5% da produção sejam industrialmente aproveitadas.⁵²

Figura 2.2: Frutos de diferentes clones de cajueiro anão precoce

As características físicas do pedúnculo são de fundamental importância para a definição de técnicas de manuseio pós-colheita, assim como para a boa aceitação do produto pelo consumidor. Com a grande variabilidade genética existente, é necessário selecionar variedades capazes de produzir pedúnculos que atendam à estas exigências de comercialização. Além disso, o consumidor prefere pedúnculos de cor laranja a vermelha e de tamanho grande, ou seja, dos tipos 4 ou 5 (de acordo com o número de caju/bandeja) que alcançam melhores preços no mercado.⁵⁹

Diante da necessidade de estudos de caracterização química das diferentes variedades de caju, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar as características químicas de pedúnculos e castanhas de clones de cajueiro-anão precoce produzidos na EMBRAPA-CE, através do *fingerprinting* obtido por ESI-MS.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste Capítulo são:

- Caracterizar o perfil químico dos diferentes clones da amêndoa e do pedúnculo produzidos na EMBRAPA-CE e avaliar os diferentes clones da espécie em desenvolvimento.

- Verificar a influência dos parâmetros de ionização nos perfis químicos obtidos para diferentes amostras de caju e avaliar as vantagens e desvantagens da técnica de *fingerprinting*.

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Material Vegetal

As amêndoas e os pedúnculos dos clones analisados foram coletados na fazenda experimental da EMBRAPA no município de Pacajus (Fortaleza/CE) em Novembro/2007. Os clones foram previamente selecionados de acordo com os dados de produtividade (kg/hectare).

Tabela 2.1: Amostras dos clones de *A. occidentale* analisadas

Amêndoas		Pedúnculos	
Amostra	Descrição	Amostra	Descrição
AOa-1	Clone C-18	AOp-7	Clone 06
AOa-2	Clone C-21	AOp-8	Clone 09
AOa-3	Clone C-26	AOp-9	Clone 189
AOa-4	Clone C-28	AOp-10	Clone 226
AOa-5	Clone C-30	AOp-11	Clone 1001
AOa-6	Clone C-31		

2.3.2 Preparo de Amostra

A metodologia geral empregada para extração de *A. occidentale* foi desenvolvida no próprio laboratório:

- Amêndoa: as amêndoas *in natura* dos clones selecionados foram descascadas e moídas, em seguida, cerca de 10 mg de cada amostra foi colocada no ultrassom durante 1 min com solventes de diferentes

polaridades, MeOH/H₂O (1:1) + 0,1 % de ácido fórmico e éter. As amostras foram centrifugadas e 50 µL do sobrenadante foram diluídos em 450 µL de MeOH com 0,1 % de ácido fórmico para obtenção dos espectros no modo positivo, ou MeOH/H₂O (1:1) com 0,1 % de NH₄OH para obtenção dos espectros no modo negativo.

- b) Pedúnculo: os pedúnculos dos clones selecionados (70 g) foram triturados em um liquidificador comum com 100 mL de água ultra pura. As amostras resultantes foram filtradas e posteriormente extraídas no ultrassom por 1 min com solventes de diferentes polaridades (hexano, éter, acetato de etila, metanol/hexano, isopropanol e metanol). As amostras foram centrifugadas e 50 µL do sobrenadante foram diluídos em 450 µL de MeOH com 0,1 % de ácido fórmico para obtenção dos espectros no modo positivo, ou MeOH/H₂O (1:1) com 0,1 % de NH₄OH para obtenção dos espectros no modo negativo.

2.3.3 Obtenção dos espectros de massas

As soluções das amostras preparadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram extraídos no modo negativo e/ou positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester - Reino Unido) de configuração de ESI-QqToF. Os espectros de MS³ foram adquiridos no equipamento HCT Bruker (Bremen – Alemanha) com analisador de massas do tipo *Ion Trap*. As condições gerais de operação dos equipamentos durante as análises foram: voltagem do capilar: 3.0-4.0 kV; temperatura da fonte: 100 °C; temperatura de dessolvatação: 100 °C; e voltagem do cone: 20-40 V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 10 µL min⁻¹. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 a 1500. Os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de 10-30 eV a partir de *m/z* 50 até um valor pouco acima do íon em estudo.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Caracterização do perfil químico da amêndoa de *A. occidentale*

Inicialmente foram realizados a extração simplificada com MeOH/H₂O (1:1) + 0,1 % de ácido fórmico para detecção dos compostos polares da amêndoa no modo positivo de ionização. Para detecção no modo positivo e negativo dos compostos apolares constituintes da amêndoa, a extração foi realizada com éter e posteriormente diluída em metanol + 0,1 % de ácido fórmico ou hidróxido de amônio. Nas Figuras 2.3 e 2.4 são mostrados os espectros de ESI (+) obtidos das extrações da amêndoa com MeOH/H₂O (1:1) com 0,1% de ácido fórmico.

Figura 2.3: ESI(+)-MS da amêndoa extraída com MeOH/H₂O (1:1) com 0,1% de ácido fórmico

A extração com MeOH/H₂O (1:1) com 0,1% de ácido fórmico foi muito eficiente para identificação do perfil glicosídico da amêndoa. Foram realizados experimentos de ESI(+)-MS/MS, onde as fragmentações observadas são típicas de unidades de açúcar, sempre com perdas neutras características de hexoses, como mostrado nos espectros característicos dos íons de m/z 885, 543, 723, 705 e 381 na Figura 2.4:

Figura 2.4: ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 885, b) m/z 543, c) m/z 723, d) m/z 705 e) m/z 381

Nos espectros obtidos da extração da amêndoa com éter foi possível detectar o perfil de triglicerídeos característico e muito complexo, pois além das moléculas protonadas, observamos a formação de adutos de sódio e potássio (Figura 2.5b). Para simplificar a interpretação dos espectros, adicionamos solução saturada de NaCl para induzir a formação de adutos de sódio (Figura 2.5c), o qual se encontra ampliado na Figura 2.6.

Figura 2.5: ESI(+)-MS da amêndoa extraída com éter

Figura 2.6: Ampliação do espectro da Figura 2.5c na região dos triglicerídeos

De acordo com a literatura ^{52, 60} os principais ácidos graxos constituintes da amêndoa do caju são os ácidos palmítico (P) (10%), esteárico (S) (9%), oléico (O) (61%) e linoléico (L) (16%), ácidos graxos estes que são os principais constituintes dos triglicerídeos detectados e identificados por ESI-MS/MS. Na Tabela 2.2, estão descritos os íons detectados, suas intensidades relativas e sua composição (%) obtidas por GC-FID (da literatura).

Tabela 2.2: Atribuição dos principais TAGs observados nos espectros ESI(+)-MS para a extração com éter

$[M+Na]^+$ m/z	NC/LD	TAGs	Intensidade Relativa (%)	Composição (%) ^a
853	50:2	PLP	0,90	1,50 ± 0,45
855	50:1	POP	2,6	3,41 ± 0,90
877	52:4	PLL	1,87	2,23 ± 0,29
879	52:3	POL	7,08	9,18 ± 0,96
881	52:2	POO	15,75	17,0 ± 1,11
883	52:1	POS	4,64	1,51 ± 1,17
901	54:6	LLL	1,12	0,48 ± 0,04
903	54:5	OLL	4,81	4,25 ± 0,64
905	54:4	OOL	15,57	14,04 ± 1,82
907	54:3	OOO; SOL	33,94	28,19 ± 4,77
909	54:2	OOS	10,58	11,28 ± 0,53
911	54:1	SOS	1,68	2,45 ± 0,39

NC = número de carbonos; LD = número de ligações duplas das três unidades de ácido graxo. P = ácido palmítico; S = ácido esteárico; O = ácido oléico; L = ácido linoléico. ^a Calculado com base nas áreas obtidas com GC. ⁶⁰

No modo negativo, foi possível detectar os ácidos graxos livres presentes na extração na amêndoa como mostra a Figura abaixo. Na Tabela 2.3 estão a atribuição dos íons detectados, suas intensidades relativas e a composição (%) obtida por GC-FID.

Figura 2.7: ESI(-)-MS da amêndoa extraída com éter mostrando a região dos ácidos graxos livres

Tabela 2.3: Atribuição dos principais ácidos graxos livres observados no espectro ESI(-)-MS para a extração com éter

[M-H] ⁻ m/z	NC/LD	Ácido Graxo	Intensidade Relativa (%)	Composição (%) ^a
253	16:0	Palmitolênico	0,55	0,33 ± 0,05
255	16:1	Palmítico	16,64	11,59 ± 0,05
269	17:0	Margárico	0,86	0,13 ± 0,05
279	18:2	Linolênico	12,84	17,09 ± 2,09
281	18:1	Oléico	43,87	61,48 ± 3,32
283	18:0	Estearico	24,12	8,89 ± 1,97
311	20:0	Araquídico	1,12	0,51 ± 0,17

NC = número de carbonos; LD = número de ligações duplas das três unidades de ácido graxo.

^a Calculado com base nas áreas obtidas com GC. ⁶⁰

Embora o método de análise por *fingerprinting* com infusão direta não seja um método quantitativo, observamos que é possível compararmos os dados obtidos para os TAG e os ácidos graxos (as intensidades relativas dos íons normalizadas em relação a cada classe). Percebemos que estes dados podem ser corroborados diretamente com a literatura e podemos verificar os quão próximo estes perfis (*fingerprinting*) são similares a real composição das amostras estudadas.

2.4.2 Caracterização do perfil químico do pedúnculo de *A. occidentale*

Para caracterização do perfil químico dos pedúnculos, 5 clones previamente selecionados pela EMBRAPA em função da produtividade, foram analisados afim de avaliar o melhoramento genético frente aos metabolitos secundários presentes no pedúnculo.

Figura 2.8: Pedúnculos coletados no campo de cultivo experimental da EMBRAPA – Pacajus/CE

Vários testes de extração foram realizados com diferentes solventes, a extração do suco (pedúnculo batido apenas com água em liquidificador) e isopropanol mostrou-se mais eficiente. Abaixo são mostrados os espectros obtidos por ESI(+)-MS e ESI(-)-MS.

Figura 2.9: Espectros de a) ESI(-) e b) ESI(+) obtidos da extração suco do pedúnculo com isopropanol

No perfil obtido por ESI(-)-MS, detectamos uma série de ácidos graxos livres e ácidos anacádicos, como destacados na Figura abaixo.

Figura 2.10: Espectros de ESI(-) ampliado

Na Figura 2.10 é mostrada uma ampliação do espectro de ESI(-) onde podemos observar a presença de íons referentes aos ácidos anacárdicos (numerados de 1 a 5) e os íons indicados em verde são possivelmente ácidos graxos livres que podem estar presentes tanto na polpa como na casca do pedúnculo, sendo os íons de m/z 255, 269, 279, 281, 283 e 311 os ácidos palmítico (P), margárico (M), linoléico (L), oléico (O), estearíco (S) e araquídico (A) respectivamente. Na Figura 2.11 são mostradas as possíveis estruturas de ácidos anacárdicos detectados.

Figura 2.11: Possíveis estruturas detectadas no suco de caju por ESI(-)-MS

Para confirmação da identidade dos ácidos anacárdicos mostrados na Figura anterior, foram realizados experimentos ESI-MS³ realizados em um espectrômetro de massas do tipo Ion-Trap, pois os espectros de ESI(-)-MS/MS obtidos no equipamento Q-Tof mostram apenas a perda neutra de 44 Da, uma molécula de CO₂ (Figura 2.12).

Figura 2.12: ESI(-)MS/MS dos íons de a) m/z 341, b) m/z 343, c) m/z 345, d) m/z 347 e e) m/z 373

Na Figura 2.13 é mostrado o ESI(-)MS da extração do pedúnculo com isopropanol ampliado na região dos ácidos anacárdicos obtido no equipamento I-Trap, onde os íons sinalizados foram submetidos a experimentos de MS^3 .

Figura 2.13: ESI(-)MS da extração do pedúnculo com isopropanol ampliado na região dos ácidos anacárdicos obtido no equipamento Ion-Trap

Os íons de m/z 373, 347, 345, 343, 341 foram isolados no *trap* e fragmentados por CID, gerando o fragmento $[(M-H-\text{CO}_2)^-]$, então este íon fragmento foi isolado no *trap* e fragmentado novamente por CID gerando um perfil característico de estruturas que apresentam cadeias alquílicas como substituintes. Os espectros das

Figuras seguintes (2.14 – 2.19) mostram o perfil de fragmentação dos ácidos anacárdicos, uma primeira perda neutra de CO_2 (44 Da), seguida de duas séries de perdas neutras, uma iniciada por perda de CH_2CH_2 (28 Da) e a segunda iniciada pela perda radicalar de CH_3 (15 Da) e posteriormente de perdas neutras de CH_2CH_2 (28 Da).

Figura 2.14: a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 345 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 301

Figura 2.15: a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 373 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 329

Os demais íons detectados de ácidos anacárdicos apresentam um perfil similar de fragmentação, a mesma perda inicial de CO_2 (44 Da), seguido de uma menor fragmentação da cadeia alquílica, que é diretamente influenciada pelo número de ligações duplas presentes. Porém, ainda podemos observar a presença dos íons fragmentos de m/z 119, 107 e 106 (Figura 2.16) referentes aos íons formados pela fragmentação total da cadeia íons diagnósticos de classe.

Figura 2.16: Possíveis estruturas dos íons diagnósticos dos ácidos anacárdicos detectados

Figura 2.18: a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 341 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 297

Figura 2.19: a) ESI(-)-MS/MS do íon de m/z 347 e b) ESI(-)-MS/MS/MS do íon de m/z 303

Os ácidos anacárdicos e as demais substâncias detectadas também foram submetidos aos experimentos de HRMS. De modo geral, os ácidos anacárdicos apresentam uma perda de CO_2 ($[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$), seguida de uma perda de 15 Da ($-\text{CH}_3$) e posteriormente, somente de perdas sucessivas de C_2H_4 (28 Da) até a formação dos íons diagnósticos de m/z 119, 107 e 106. Não foi possível localizar as duplas ligações, pois a presença das duplas ligações parecem não influenciar o padrão de fragmentação, ou seja, observamos apenas perdas de 28 Da (C_2H_4). A fragmentação da cadeia alquílica está relacionada diretamente com a localização devido a perdas neutras de 26 Da, referentes a moléculas de C_2H_2 . Observamos apenas que aumentando a quantidade de duplas ligações presentes, ocorre uma menor fragmentação como mostrado nas Figuras de 2.17 a 2.19. A Tabela 2.4 sumariza os dados obtidos para as estruturas propostas.

Tabela 2.4: Dados de ESI(+/-)-MS(/MSⁿ) e HRMS sumarizados das substancias identificadas

Estrutura	Formula Molecular	HRMS (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	E (ppm)	MS ³ (m/z)
1	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	347,2586	347,2441	41,75	329, 301, 287, 273, 259, 245, 231, 217, 203, 189, 175, 161, 147, 133, 119, 107, 106
2	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	345,2430	345,2331	28,67	301, 287, 273, 259, 245, 231, 217, 203, 189, 175, 161, 147, 133, 119, 107, 106
3	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	343,2273	343,2280	2,04	299, 243, 217, 203, 189, 161, 119, 107, 106
4	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	341,2117	341,2070	13,77	297, 265, 119, 107, 106
5	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	373,2743	373,2603	37,50	303, 119, 107, 106

Com base no perfil de TAG e ácidos graxos livres foi possível caracterizar a amêndoa do caju, assim como através dos espectros obtidos nos modos positivos e negativos da extração do suco com isopropanol foi possível caracterizar o pedúnculo.

2.4.3 Avaliação dos perfis químicos dos clones da amêndoa e do pedúnculo de *A. occidentale*

Para classificar as diferentes amostras de clones de amêndoa e pedúnculo de acordo com o *fingerprinting* obtido por ESI(+/-)-MS utilizamos Análise de Componentes Principais através do software MarkerLynx XS (Waters). Foram adquiridos espectros em triplicata. A Figura 2.20 mostra o *Score Plot* obtido das análises da amêndoa de acordo com o perfil de TGAs.

Figura 2.20: *Score Plot* obtido das análises da amêndoa de acordo com o perfil de TGAs

De acordo com o PCA, as amostras do clone AOA-6 se apresentam agrupadas, as amostras dos clones AOA-1 e AOA-4 tendem ao agrupamento mas não se separam das amostras dos clones AOA-2 e AOA-5 mais dispersas. A dispersão dos dados pode ser explicada devido à eficiência de ionização dos íons referentes aos TAGs, que podem ser moléculas protonadas, adutos de sódio e/ou adutos de potássio.

Este tratamento compreende 95 % dos dados, sendo 30,1% dos deles explicado por PC1 e 21,0 % por PC2. A semelhança entre as amostras dos diferentes clones pode ser explicada devido o conjunto de dados utilizados terem sido o perfil de TGAs. Estas moléculas são constituintes majoritários e não devem sofrer variação significativa dentro da espécie uma vez que fazem parte do metabolismo primário das plantas.⁶¹

Na Figura 2.21 observamos o *Score Plot* obtido das análises do suco do pedúnculo extraído com isopropanol de acordo com o fingerprinting obtido por ESI (-)-MS.

Figura 2.21: *Score Plot* obtido das análises do suco do pedúnculo extraído com isopropanol de acordo com o *fingerprinting* obtido por ESI(-)-MS

De acordo com o PCA, observamos que não há dispersão dos dados. Verificamos o agrupamento das amostras dos clones AOp-7, AOp-8 e AOp-11 em três grupos distintos que se apresentam claramente separados das demais amostras dos clones AOp-9 e AOp-10 que formam um quarto grupo. Este tratamento compreende 95 % dos dados, sendo 40,6 % dos deles explicado por PC1 e 26,0 % por PC2.

A diferença entre as amostras dos diferentes clones pode ser explicada devido o conjunto de dados utilizados terem sido o perfil de ácidos anacárdicos. Estas moléculas são constituintes minoritários e devem sofrer variação significativa dentro da espécie de acordo com o metabolismo e as influências do ambiente.³³

2.4.4 Avaliação da influência dos parâmetros de ionização nos perfis químicos de *A. occidentale* obtidos por ESI-MS *fingerprinting*

O *fingerprinting* se baseia na obtenção de um perfil característico para identificação e/ou diferenciação de indivíduos ou grupos. Desta maneira, a otimização dos parâmetros de ionização em que os perfis são obtidos deve ser realizada de maneira sistemática, levando sempre em consideração o maior número de íons

detectados com a menor fragmentação na fonte possível. Outros parâmetros como concentração de amostra, extração e preparo

Para avaliar a influência dos parâmetros de ionização no perfil químico do pedúnculo obtido por fingerprinting no ESI(-), testamos os principais parâmetros utilizados, na ionização por *electrospray* de maneira sistemática e individualmente. Os parâmetros avaliados foram: voltagens do cone, do capilar e do cone extrator, o fluxo de infusão da amostra e utilização de aditivo auxiliar de ionização.

Figura 2.22: Representação da fonte de ionização *Z-spray* do Q-ToF Micromass ⁴⁷

Utilizamos as amostras do pedúnculo preparadas como descrito no item 2.3.2a, com infusão direta e fluxo contínuo (10 $\mu\text{L}/\text{min}$) alterando a cada 0,5 min apenas um parâmetro, mantendo os demais fixos nos valores otimizados anteriormente. Na Figura 2.22 é mostrado o TIC obtido para a variação da voltagem do capilar ao longo do tempo. A voltagem do capilar está ligada diretamente a ionização das espécies de interesse, uma vez que esta é a voltagem aplicada diretamente à solução que contém o analito e propiciará a formação dos íons e contra-íons e do Cone de Taylor, essencial para formação do *Electrospray*.

Figura 2.23: TIC obtido pela variação da voltagem do capilar ao longo do tempo

Como podemos observar, à medida que aumentamos a voltagem do capilar, há um aumento na intensidade do TIC, muito pronunciada a partir de 2.500 volts, tendendo a estabilizar até 4.000 volts e diminuindo bruscamente em valores acima de 4.250 volts. Quando observamos os perfis dos espectros obtidos em diferentes voltagens de capilar (Figura 2.24) é possível visualizar diferentes íons detectados e intensidades absolutas muito diferentes.

Figura 2.24: ESI(-)-MS obtidos para diferentes voltagens de capilar

Como sabemos a identidade dos principais íons detectados, assim como os íons fragmentos que podem ser produzidos por estes, podemos avaliar de forma mais direta a influência da voltagem do capilar no perfil dos espectros, como mostra a Figura a seguir:

Figura 2.25: Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação da voltagem do capilar.

Observamos que para os cinco íons identificados, como são de uma mesma classe, comportam-se da mesma maneira, apresentam o máximo de eficiência de ionização em 2.500 Volts e a partir deste valor, diminui a eficiência da ionização quase que linearmente enquanto notamos um pequeno aumento na presença dos íons fragmentos.

Na Figura 2.26 é mostrado o TIC obtido para a variação da voltagem do cone. Este é um parâmetro de fundamental importância para atrair os íons de interesse para dentro do espectrômetro de massas, de acordo com sua intensidade, mais ou menos íons são direcionados para o analisador.

Figura 2.26: TIC obtido pela variação da voltagem do cone ao longo do tempo

Outro fator que deve ser considerado, é que a energia aplicada ao cone, não só direciona os íons para dentro do espectrômetro de massas, como também pode provocar a fragmentação dos íons. Nos espectros da Figura abaixo podemos observar que quanto maior a energia aplicada ao cone, maior a intensidade dos íons fragmentos dos ácidos anacárdicos, m/z 297, 299, 301, 303 e 329 em relação aos íons precursores de m/z 341, 343, 345, 347 e 373.

Figura 2.27: ESI(-)-MS obtidos para diferentes voltagens de cone

Para simplificar a compreensão da influência direta da voltagem do cone sobre o perfil dos espectros de ESI(-) obtidos para o suco de caju, comparamos as intensidades absolutas dos íons referentes aos ácidos anacárdicos, os íons precursores e seus íons-fragmentos, na Figura 2.28.

Os íons estudados apresentam grande semelhança de comportamento, pois apresentam os mesmos grupos funcionais, com diferenças apenas pela na cadeia alquílica, em número e posição de duplas ligações. Observamos uma pequena diferença no comportamento dos íons de m/z 373, 347 e 341 (Figuras 2.28a, 2.28b e 2.28e).

Figura 2.28: Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação da voltagem do cone

O íon de m/z 373 apresenta a mesma estrutura que o íon de m/z 345, apenas uma dupla ligação na cadeia alquílica, porém dois carbonos a mais. Estes carbonos a mais devem influenciar na fragmentação, pois observamos a formação de seu íon fragmento com uma intensidade considerável já com 35 Volts, diminuindo

novamente até 50 Volts e superando a intensidade de seu íon precursor com 60 Volts.

Na Figura 2.28b, o íon de m/z 347, que não possui dupla ligação na cadeia alquílica, inicia uma pequena fragmentação com voltagem do cone de 15 Volts, mantendo-se na mesma intensidade até 30 Volts, a partir desta voltagem observamos um aumento na intensidade do íon fragmento. Em 60 Volts, o íon fragmento supera a intensidade de seu íon precursor e após 70 Volts, o íon precursor desaparece.

O gráfico da Figura 2.28e comparando a intensidade absoluta do íon de m/z 341 versus a intensidade absoluta do íon de m/z 297 mostra que o íon fragmento tem seu máximo de intensidade em 40 Volts, menor que a voltagem de fragmentação máxima para os demais íons e supera a intensidade de seu íon precursor somente com a voltagem de 70 Volts.

Assim como a voltagem do cone, a voltagem do cone extrator não só direciona os íons para dentro do espectrômetro de massas, como também pode provocar a fragmentação dos íons. Na Figura 2.29 podemos observar o TIC obtido para a variação da energia do cone extrator ao longo do tempo.

Figura 2.29: TIC obtido pela variação da voltagem do cone extrator ao longo do tempo

Na Figura 2.30 são mostrados os gráficos da variação absoluta dos íons precursores e dos íons fragmentos detectados. Notamos que quanto maior a energia

aplicada ao cone extrator, maior a intensidade dos íons fragmentos dos ácidos anacárdicos, m/z 297, 299, 301, 303 e 329 em relação aos íons precursores de m/z 341, 343, 345, 347 e 373. Todos os íons fragmentos têm seu máximo de intensidade entre 25 e 30 Volts, superando a intensidade absoluta de seus íons precursores.

Figura 2.30: Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação da voltagem do cone extrator

Além dos parâmetros ligados diretamente as voltagens de ionização, avaliamos também o fluxo de infusão da amostra e a utilização de aditivos auxiliares de ionização. Na Figura 2.31 é mostrado o TIC obtido com variação do fluxo de infusão ao longo do tempo.

Figura 2.31: TIC obtido pela variação do fluxo de infusão ao longo do tempo

Observamos que com o aumento do fluxo de infusão há um aumento gradativo da intensidade no TIC até 25 μL , de 30 a 50 μL o sinal permanece constante e diminui gradativamente a partir de 60 μL . Embora haja esta variação na intensidade do sinal, não há variação no perfil dos espectros obtidos, como mostrado na Figura 2.32.

Figura 2.32: ESI(-)-MS obtidos para diferentes fluxos de infusão

Para avaliar a influência da utilização de diferentes aditivos auxiliares de ionização, foram realizadas três infusões diretas distintas, sem aditivo, com hidróxido de amônio e acetato de amônio. Na Figura 2.33 são mostrados os perfis dos espectros obtidos.

Figura 2.33: ESI(-)-MS obtidos para diferentes aditivos auxiliares de ionização

No gráfico da Figura 2.34, podemos observar uma alteração no perfil do espectro quando adicionamos o aditivo auxiliar de ionização, seja hidróxido ou acetato de amônio, principalmente com um aumento significativo nos íons referentes aos ácidos anacárdicos: m/z 341, 343, 345, 347 e 373.

Figura 2.34: Gráficos da variação da intensidade absoluta dos íons detectados de acordo com a variação do aditivo auxiliar de ionização

2.5 Conclusão

Através da espectrometria de massas com infusão direta de amostra, foi possível desenvolver uma metodologia simples para caracterizar o perfil químico dos diferentes clones da amêndoa e do pedúnculo produzidos na EMBRAPA-CE.

Os clones de *A. occidentale* da amêndoa foram caracterizados pelo perfil de açúcares, via extração direta com solvente polar e análise por ESI(+). A extração com solvente apolar analisada por ESI(+) demonstrou o perfil de TAGs e a mesma extração analisada por ESI(-), demonstrou o perfil de ácidos graxos livres. O suco de caju (pedúnculo extraído com água) foi caracterizado por ESI(-), onde possivelmente identificamos uma série de ácidos anacárdicos por experimentos de MS³. Os perfis de TAGs da amêndoa e de ácidos anacárdicos do pedúnculo permitiram a classificação por similaridade dos clones em grupos através da Análise de Componentes Principais.

Por fim, foi testada a influência dos principais parâmetros de ionização em ESI nos perfis químicos obtidos para diferentes amostras de caju. Esta avaliação sistemática demonstrou que a técnica de *fingerprinting* é eficiente para caracterizar amostras complexas, com o mínimo de preparo de amostra, de forma simples e rápida. Porém, é necessário conhecer a natureza das amostras e de seus constituintes, uma vez que, os parâmetros de ionização podem afetar o *fingerprinting*, influenciando diretamente na sensibilidade e na fragmentação dos íons na fonte de ionização.

Capítulo 3: *Arrabidaea chica* Verlot

3.1 Introdução

A espécie *Arrabidaea chica* Verlot, conhecida popularmente como pariri (no Pará), crajiru (no Amazonas), puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz se desenvolve em quase todo o território brasileiro, sendo muito comum na Floresta Amazônica. Pertence à família Bignoniaceae, que compreende 120 gêneros com cerca de 800 espécies, distribuídas pelas regiões tropicais da América do Sul e da África.⁴¹

O gênero *Arrabidaea* ocorre na América tropical desde o sul do México até o Brasil central. Uma ampla revisão bibliográfica indicou que este gênero é fonte de antocianinas, flavonóides e taninos.⁴²⁻⁴⁴

Figura 3.1: *Arrabidaea chica*

No nordeste do Brasil, *A. chica* é usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona.⁶² As folhas submetidas à fermentação e manipuladas como as anileiras (*Indigofera* spp.) fornecem matéria corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos preparam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra ataque de insetos. São atribuídas à espécie *A. chica* propriedades terapêuticas contra enfermidades da pele (psoríase, empinagem, feridas, úlceras), cólica intestinal, diarreia com sangue, piodermite e corrimento vaginal, apresentando também propriedades adstringentes. Há ainda relatos de eficácia como antiinflamatório e contra câncer de boca, útero e leucemia.⁶³

O primeiro estudo fitoquímico das folhas de *A. chica*⁶² relata o isolamento de 3-deoxiantocianidina (carajurina) e posteriormente, foi proposto que a ocorrência deste raro pigmento em Bignoniaceae era provavelmente restrita a *A. chica*^{64, 65} Estudos posteriores resultaram no isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'- di-hidroxi-5-metaxoxiflavona e 6,3',4'- tetrahidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona).⁴⁰

Mais de 50 novas antocianinas foram isoladas a partir de plantas, não somente das pétalas das flores, mas também de frutos, folhas e sementes.⁶⁶ Dentre as novas agliconas destacam-se as 3-desoxiantocianidinas (Figura 3.2), a carajurona (**6**), 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio (carajurina) (**7**), a 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavílio (**8**) e a 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavílio (**10**) , que foram isoladas das partes aéreas da *A. chica*.

Figura 3.2: Agliconas isoladas das folhas de *A. chica*

As antocianinas são corantes naturais pertencentes à família dos compostos fenólicos da qual também fazem parte os flavonóides e fenilpropanóides. As antocianinas possuem um esqueleto básico do tipo C3C6C3 e a mesma origem biossintética, mas diferem dos demais por apresentarem coloração intensa, um maior grau de oxidação⁴⁴ e por serem glicosiladas. As antocianinas são raramente isoladas e identificadas devido à sua grande instabilidade.

A molécula de antocianina é constituída pelo íon flavílio ou 2-fenilbenzopirílio (**10**), e um açúcar, podendo conter ainda um ácido alifático ou aromático. A

antocianina, após perda de açúcar por hidrólise ácida, é chamada antocianidina ou aglicona.

Figura 3.3: Antocianinas mais comuns encontradas na literatura.

As antocianidinas mais freqüentes na natureza são perlagonidina **(11)**, cianidina **(12)**, peonidina **(13)**, petunidina **(14)** e malvidina **(15)** (Figura 3.3). Os açúcares mais encontrados nas antocianinas são glicose, ramnose, galactose e arabinose.⁶⁷ Estes açúcares ocorrem como monoglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente na glicona nas posições 3, 5 e 7.⁶⁶ As antocianinas desempenham importante papel nas interações de insetos com plantas para a polinização e dispersão de sementes. Também apresentam um papel importante nas interações alelopáticas ligadas à defesa contra insetos predadores. Esta classe de compostos demonstrou atividade antiinflamatória e atividade anticâncer.⁶⁸

Para o desenvolvimento do trabalho foram introduzidos em um mesmo campo experimental diferentes acessos da espécie (exemplares de localidades diferentes), com o objetivo de selecionar uma variedade que produza maior teor de pigmento em relação à biomassa.

Figura 3.4: Plantas de acessos diferentes cultivadas no CPQBA

Os pigmentos responsáveis pela coloração vermelha em *A. chica* são as 3-desoxiantocianidinas, porém, os testes clássicos de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizados para monitorar o processamento fitoquímico, são ineficientes para avaliar a presença ou não destes compostos. Desta maneira, o objetivo do projeto consiste no desenvolvimento de metodologia para triagem de antocianinas dos diferentes acessos, utilizando ESI-MS e ESI-MS/MS, metodologia que pode ser empregada para monitorar os processos de extração e purificação de maneira rápida e eficiente.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste Capítulo são:

- Caracterizar o perfil de antocianidinas de *A. chica* e diferenciar os acessos cultivados no CPQBA-Uncamp, quanto a produção dos pigmentos de interesse.
- Avaliar a uniformidade do material vegetal frente às metodologias de extração e a sazonalidade.

3.3 Parte Experimental

3.3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas as folhas de 9 acessos da *Arrabidaea chica* Verlot., disponível na coleção do Banco de Germoplasma do Centro de Pesquisa Químico, Biológico e Agrícola (CPQBA) da UNICAMP localizado em Paulínia (SP). As folhas foram coletadas no campo experimental do CPQBA (25 plantas por amostra), sendo que as estas foram retiradas em três alturas e entorno da planta toda.

Tabela 3.1: Localização dos diferentes acessos analisados

Amostra	Acesso
Acesso 1	CPQBA – Campinas/SP
Acesso 2	Campo Grande
Acesso 3	Tijuco do Sul
Acesso 4	Manaus/AM
Acesso 5	Curitiba/PR
Acesso 6	Paulínia/SP
Acesso 7	Campinas/SP
Acesso 8	Manaus/AM
Acesso 9	Belém/AM

3.3.2 Preparo de Amostra

As folhas frescas coletadas foram submetidas a diferentes tratamentos de secagem prévios à extração:

- a) Planta Fresca: a planta foi moída com gelo seco, em moinho tipo blender de Inox Skymssen.
- b) Planta Seca: a planta foi disposta durante 48 horas na estufa a 40 °C, com ventilação forçada, marca Fabbe, e posteriormente moída no moinho tipo martelo. Apresentando umidade de 73,3 %.

c) Planta Previamente Seca: a planta foi disposta durante 48 horas na estufa à 40 °C, e posteriormente moída no moinho martelo. Apresentando umidade de 57,2%.

Os extratos ou frações foram dissolvidos, filtrados e diluídos e inseridos diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massas. A metodologia geral empregada para extração e obtenção das frações de *A. chica* está descrita na Figura 3.5.

Figura 3.5: Representação da extração e obtenção de frações de *A. chica*

Os extratos foram obtidos com e sem tratamento prévio com xilanases comercial por 2 horas à 40 °C. Os extratos e/ou frações (cerca de 10 mg) foram dissolvidos em 1 mL de metanol e 10 µL de cada solução foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1) com 7% de ácido fórmico (99%).

Para avaliação da sazonalidade, as folhas secas (150 mg) foram extraídas em Metanol/H₂O (1:1) com 7% de ácido fórmico, sob agitação em vortex por 1 min, posterior centrifugação (1 min). 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram diluídos em 1 mL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1) com 7% ácido fórmico.

3.3.3 Obtenção dos espectros de massas

As soluções das amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram extraídos no modo negativo e/ou positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester - Reino Unido) e de um FT-ICR-MS Thermo Scientific (Bremen – Alemanha). As condições de operação dos equipamentos para as análises foram: voltagem do capilar: 3.0-4.0 kV; temperatura da fonte: 100 °C; temperatura de dessolvatação: 100 °C; voltagem do cone: 20-40 V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ ou através do Nanomate Adivion (EUA) com fluxo contínuo de 200 nL min^{-1} . Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1000. Os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de 10-45 eV a partir de m/z 50 até um valor pouco acima do íon em estudo. Os espectros foram tratados com os softwares MassLynx 4.1 e Scalibur 2.0 SR2.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Caracterização do perfil de antocianidinas em extratos de *A. chica*

Para caracterizar o perfil de antocianidinas das folhas de *A. chica* foram analisadas três amostras obtidas a partir do extrato bruto metanólico (AC-1) por soxhlet com solventes em ordem crescente de polaridade: as frações acetato de etila (AC-2), acetona (AC-3) e etanol (AC-4). As análises foram realizadas por ESI(+)-MS, uma vez que as quatro desoxiantocianidinas de interesse (Figura 3.2), encontram-se cationizadas em meio ácido.

Nos espectros obtidos do extrato AC-1 (Figura 3.6a), assim como nos espectros das frações analisadas AC-2, AC-3 e AC-4 (Figuras 3.6b-d), foram detectados os íons de m/z 285, 299, 301 e 315 referentes a carajurona (**6**), carajurina (**7**), 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium (**8**) e 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium (**9**) respectivamente, desoxiantocianidinas isoladas de *A. chica* (Figura 3.2), as quais são atribuídas a coloração vermelha dos extratos das folhas. A fração AC-4 apresentou-se mais rica em antocianidinas, pois, além de apresentar o

íon de m/z 285 como sinal mais intenso, possui a menor relação sinal/ruído entre as amostras avaliadas.

Figura 3.6: Espectros de ESI(+)-MS do extrato a) AC-1 e das frações b) AC-2, c) AC-3 e d) AC-4 avaliadas inicialmente

As antocianidinas foram identificadas por experimentos de ESI(+)-MS/MS, onde os espectros obtidos (Figura 3.7) apresentam a fragmentação característica de perda de 15 Da, já descrita na literatura⁶⁹ para esta classe de compostos.

Figura 3.7: Espectros de ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 285, b) m/z 299, c) m/z 301 e d) m/z 315

Abaixo são mostradas as propostas de fragmentação para as 3-desoxiantocinidinas de *A. chica* detectadas.

Figura 3.8: Proposta de fragmentação dos íons de a) m/z 285, b) m/z 299, c) m/z 301 e d) m/z 315

Além das 3-desoxiantocianidinas identificadas foi possível verificar a presença de outras antocianidinas. Na Figura 3.9 é mostrado o perfil de espectros característicos de antocianidinas que apresentam a fragmentação característica de perda de 15 ou 17 Da.

Figura 3.9: Proposta de fragmentação dos íons de a) m/z 317, b) m/z 303 e c) m/z 287

Embora seja possível identificar a classe das antocianidinas por experimentos de ESI(+)-MS/MS, não há como definir a identidade de cada antocianidina, pois esta classe de compostos é muito rica estruturalmente e o número de isômeros é muito grande. Nas Tabelas 3.2 são mostradas algumas as possíveis estruturas de antocianidinas por ESI(+)-MS.

Tabela 3.2: Estruturas das antocianidinas

Antocianidina	R3	R5	R6	R7	R3'	R4'	R5'	[M] ⁺
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	271
Cianidina	OH	H	H	OH	OH	OH	H	287
Delfinina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	303
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	301
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	317
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	331
5-metil-cianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	301
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	315
Pulchellidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	317
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	331
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	345
Capensidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	345
Carajurina	H	OMe	OH	OH	H	OMe	H	299
Carajurona	H	OMe	OH	OH	H	OH	H	285
6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilio	H	OMe	OH	OH	H	OH	OH	301
6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxi-flavilio	H	OMe	OH	OH	H	OH	OH	315
Apigininidina	H	OH	H	OH	H	OH	H	255
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	271
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	287
Aurantidinidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	287
6-hidroxi-cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	303
6-hidroxi-delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	319

De acordo com os espectros do extrato bruto e das demais frações analisadas foi possível caracterizar o perfil de antocianidinas de *A. chica*. Através deste perfil, foi possível selecionar um modelo para o desenvolvimento de novos métodos de

extração do material vegetal, métodos estes que visam a obtenção da maior quantidade possível de antocianidinas em relação a biomassa.

Dentre os perfis de antocianidinas obtidos por ESI(+)-MS das amostras analisadas, o perfil da amostra extraída com acetona (AC-3) mostrou maior intensidade dos íons de m/z 285, 299, 301 e 315. Porém, a extração com etanol (AC-4) foi escolhido como modelo de extração, pois também apresenta um perfil com boas intensidades dos íons de interesse e utiliza etanol na extração, solvente este que apresenta menor toxicidade em relação ao solvente utilizado na extração da amostra AC-3, a acetona.

3.4.2 Avaliação da metodologia de extração de antocianidinas das folhas de *A. chica*

Dois novos métodos de extração foram desenvolvidos produzindo dois novos extratos: um submetendo as folhas de *A. chica* à hidrólise enzimática via xilanases de *Bacillus pumilus* previamente à extração e o outro sem tratamento enzimático. Estas amostras foram avaliadas por ESI(+) quanto a presença de antocianinas e suas intensidades.

Os espectros de massas destas amostras indicaram que os extratos obtidos com a incubação de folhas de *A. chica* com xilanases previamente ao processo de extração, apresentaram maior abundância dos íons relativos às antocianidinas (agliconas) e menor intensidade dos íons relativos às antocianinas (glicosilados), provavelmente porque a fermentação promove hidrólise enzimática, liberando as agliconas no meio. Abaixo são mostrados os espectros de massas no modo positivo para os extratos com e sem tratamento enzimático.

Figura 3.10: ESI(+)-MS dos extratos obtidos a) sem tratamento enzimático e b) com tratamento enzimático.

A Figura 3.11 apresenta gráficos das intensidades relativas das antocianinas com m/z 285, 299, 301, 463 e 477 analisadas a partir do extrato de folhas de *A. chica*, sem tratamento (a) e com (b) tratamento enzimático, coletadas mensalmente de janeiro de 2007 a janeiro de 2008.

Figura 3.11: Antocianinas de m/z 285, 299, 301, 463 e 477 detectadas por ESI-MS para as amostras sazonais extraídas a) sem tratamento prévio com xilanas e b) com tratamento prévio com xilanas, por 2 horas a 40 °C.

Nos gráficos da Figura acima, foi observado que a etapa de fermentação prévia com xilanases de *B. pumilus* favoreceu a liberação das agliconas das moléculas de açúcares das antocianidinas, aumentando o rendimento final dos compostos com m/z 299. Outra observação importante é que, no extrato obtido sem tratamento enzimático (Figura 3.10a), as intensidades dos íons das agliconas e dos glicosídeos apresentam variação sazonal ao longo do período de um ano. Já no extrato obtido com tratamento enzimático, esta variação é menos pronunciada.

No gráfico abaixo (Figura 3.12) é mostrado o resultado do experimento para otimização do tempo de fermentação, onde podemos observar que o ápice da produção do íon de m/z 299 ocorre com 90 minutos, caindo um pouco e logo estabilizando. Verificou-se também que o íon de m/z 301 tem a melhor produção a partir de 120 minutos e que o tratamento enzimático afeta negativamente a produção do íon de m/z 285. Em pequenas quantidades, foi possível verificar o aumento das antocianidinas de m/z 271, 287, 303, 317 e 331 a partir de 120 minutos. O gráfico deixa claro, que como aumento da intensidade dos íons referentes às antocianidinas ocorre a diminuição da intensidade dos sinais referentes às antocianinas.

Figuras 3.12: Gráfico de otimização do tempo de fermentação.

Com base nos resultados apresentados foi selecionada uma metodologia eficiente para extração das antocianidinas de interesse, ou seja, a extração a partir das folhas em etanol/ácido cítrico 0,1 % com hidrólise enzimática. O ácido cítrico foi utilizado para garantir a estabilidade das antocianidinas, uma vez que estas podem

degradar em meio alcalino, resultando em chalconas que não tem a propriedade corante.

Durante as coletas e secagem das folhas para preparo dos extratos, verificou-se que as folhas apresentavam coloração não uniforme. Estas foram separadas em 4 grupos de acordo com a cor que as folhas apresentavam: a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso.

Figura 3.13: Folhas secas e moídas dos grupos a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso

Os espectros obtidos a partir destes quatro grupos são mostrados abaixo:

Figura 3.14: Espectros de massas em ESI(+)-MS obtidos através da extração das folhas secas de forma diferentes: a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso.

Figura 3.15: Heatmap gerado pelo software GenePattern 2.0. para folhas secas de forma diferentes: a) vermelho, b) verde + vermelho, c) verde e d) vermelho intenso.

Analisando as Figuras 3.14 e 3.15, percebemos que as amostras do grupo vermelho intenso apresentam maior intensidade do íon de m/z 299 e ausência dos íons de m/z 463 e 477. A partir destas análises foi realizado um experimento com diferentes condições de secagem com os nove acessos. As folhas foram secas ao sol, na sombra, ao sol com borrifação de água, na sombra com borrifação de água, na estufa a 30 °C e 40 °C. O gráfico da Figura 3.16 mostra as intensidades relativas dos íons de m/z 285, 299 e 301 que foram detectados nas folhas com diferentes secagens.

Figura 3.16: Gráficos dos 9 acessos com as intensidades relativas das antocianidinas de acordo com a forma de secagem realizada.

Nos gráficos da Figura 3.16 percebemos que a secagem ao sol com borrifação de água apresenta maior intensidade para todos os acessos estudados. Estes dados demonstram que a secagem realizada ao sol com borrifação de água influencia positivamente a liberação das antocianidinas, devido a hidrólise das antocianinas que ocorre na presença de água.

3.4.3 Avaliação do perfil de antocianidinas dos diferentes acessos de *A. chica*

Após selecionar o método para a extração das antocianidinas, foi necessário avaliar quais dos diferentes acessos cultivados no CPQBA produz a melhor qualidade de material corante, uma vez que os extratos das folhas destes acessos foram produzidos pela mesma metodologia, porém demonstraram coloração distinta com mostra a Figura 3.17.

Figura 3.17: Soluções dos extratos obtidas a partir de diferentes acessos cultivados no campo experimental

Na Figura 3.18 são mostrados os espectros dos sete extratos submetidos ao processo de fermentação, provenientes dos sete acessos, todos cultivados e produzidos sob as mesmas condições.

Figura 3.18: Espectros de ESI(+)-MS dos extratos avaliados dos acessos a) 1, b) 2, c) 3, d) 4, e) 5, f) 6 e g) 7

Assim como os testes de cor, os espectros obtidos indicam uma grande quantidade das antocianidinas no Acesso 6 (Paulínia), e que apresenta coloração vermelha mais satisfatória. Observamos também que a coloração esta relacionada não só com a intensidade dos íons de m/z 285, 299 e 301, mas sim com a proporção entre estes íons.

Notou-se que os Acessos 3 e 5 produziram flores, o que não foi observado nos outros acessos. As flores foram submetidas à extração, análise e posterior comparação com os extratos obtidos a partir das folhas. Na Figura 3.19 estão os espectros obtidos das flores e das folhas, mostrando que o extrato de folhas apresenta maior número de íons, e mais intensos, referentes à antocianidinas que os detectados para o extrato das flores.

Figura 3.19: Espectros de ESI(-)-MS dos extratos a) de flores e b) de folhas

Com a intenção de melhorar o rendimento das antocianidinas nos acesso 3 e 5, as folhas destes acesso foram submetidos a experimentos de extração por tratamento com diferentes concentrações de enzima. Os gráficos da Figura 3.20 mostram as intensidades relativas das antocianidinas e antocianinas, diferenciando apenas as antocianinas, já os gráficos da Figura 3.21, diferenciam os íons relativos às antocianinas.

Figura 3.20: Gráficos dos acessos 3 (a) e 5 (b) tratados com diferentes concentrações de enzima. Intensidades relativas das antocianidinas e antocianinas detectadas nas folhas diferenciando apenas as antocianidinas.

Figura 3.21: Gráficos dos acessos 3 (a) e 5 (b) tratados com diferentes concentrações de enzima. Intensidades relativas das antocianidinas e antocianinas detectadas nas folhas diferenciando apenas as antocianinas.

Com base nos gráficos mostrados acima, concluímos que há uma melhora significativa para o acesso 3 somente com a menor concentração de enzimas. O mesmo é observado para o acesso 5, porém com um aumento menos pronunciado. O gráfico da Figura 3.22 sumariza estes resultados.

Figura 3.22: Gráficos dos acesso 3 e 5 obtidos da fermentação em relação a concentração enzimática (U/mL)

As flores dos acessos 3 e 5 que floresceram em Outubro de 2008 foram submetidas ao tratamento enzimático para verificar a melhoria na extração das antocianidinas. No gráfico abaixo são mostradas as intensidades das antocianidinas e antocianinas dos acessos com e sem tratamento enzimático. Para as flores, tanto do acesso 3 como do acesso 5 houve uma diminuição na extração das antocianidinas.

Figura 3.23: Gráfico das intensidades das antocianidinas e antocianinas dos acessos 3 e 5 com e sem tratamento enzimático

3.4.4 Avaliação da sazonalidade na produção de antocianidinas em *A. chica*

Dentre os sete acessos estudados, o acesso Manaus aclimatado em Paulínia (acesso 06) coletado no início do primeiro semestre de 2007, foi o que apresentou

coloração vermelha mais intensa. Porém extratos resultantes desse mesmo acesso coletados no final deste mesmo semestre, foram incapazes de reproduzir a coloração intensa observada para as amostras coletadas e processadas primeiro. Este fato indica uma variação sazonal da produção dos metabólitos secundários produzidos pelo Acesso 6.

A partir de janeiro de 2007 iniciamos o estudo sazonal dos sete acessos estudados anteriormente, incluindo mais dois novos acessos (Acesso 8 - Belém e Acesso 9 - Manaus). Foram comparadas as variações do perfil químico de antocianinas dos acessos mês a mês e por acesso ao longo dos anos de 2007 a 2009. Durante os meses de setembro e outubro, alguns acessos não produziram folhas devido a realização de poda das plantas. Os dados foram correlacionados com as condições climáticas do período: temperaturas mínimas e máximas (média) e precipitação em mm de chuva. As medidas foram obtidas através da estação meteorológica instalada na FEAGRI/Unicamp.

Para este tratamento, os dados foram normalizados, ou seja, as intensidades absolutas dos íons referentes as antocianidinas (m/z 271, 285, 287, 299, 301, 303, 317, 319) foram somadas as intensidades absolutas dos íons identificados como possíveis antocianinas (m/z 447, 463, 503, 519, 535, 547, 549 e 593). Esta soma foi igualada a 100% para calcular a intensidade relativa de cada uma das antocianidinas e da intensidade relativa a soma das espécies glicosiladas.

Os resultados das análises ESI(+)-MS, dos nove acessos aclimatados no campo experimental do CPQBA (Paulínia), estão apresentados como gráficos nas Figuras de 3.24, 3.25 e 3.26, onde foram monitorados os íons referentes as antocianidinas e antocianinas.

Figura 3.24: Gráficos dos acessos 1, 2 e 3 com as diferentes intensidades das antocianidinas durante os anos de a) 2007 e b) 2008 c) 2009, como também as respectivas temperaturas médias e precipitação pluviométrica.

Figura 3.25: Gráficos dos acessos 4, 5 e 6 com as diferentes intensidades das antocianidinas durante os anos de a) 2007, b) 2008 e c) 2009, como também as respectivas temperaturas médias e precipitação pluviométrica.

Figura 3.26: Gráficos dos acessos 7, 8 e 9 com as diferentes intensidades das antocianidinas durante os anos de a) 2007, b) 2008 e c) 2009, como também as respectivas temperaturas médias e precipitação pluviométrica.

A temperatura máxima observada durante o ano de 2007 (30,7 °C em Janeiro) e 2008 (30,8 °C em Dezembro) foi menor que do ano de 2009 (31,4 °C em Março). A temperatura mínima observada durante o ano de 2009 (10,6 °C em Junho) foi menor que a medida para os anos anteriores (11,7 °C em Agosto/2007 e 11,3 °C em Julho/2008). Outra diferença no clima ao longo dos anos é que não houve período sem chuva em 2009, enquanto nos meses de Agosto/2007 e Julho/2008 não houve precipitação registrada. Essas diferenças observadas entre a comparação mensal dos acessos podem ter contribuído para as variações das

intensidades relativas das espécies monitoradas ao decorrer dos três anos analisados.

Os acessos 6 e 9 comparados com os demais demonstraram semelhança no perfil químico, embora as intensidades relativas das antocianidinas sejam maior no acesso 6. Talvez essa diferença esteja relacionada a maturidade da planta, pois o Acesso 6 já está adaptado a aproximadamente 20 anos, enquanto o Acesso 9 foi introduzido no campo experimental do CPQBA em 2007.

De modo geral, observamos que todos os acessos, com exceção do Acesso 6 em 2008, apresentaram uma redução significativa na intensidade dos íons referentes as antocianidinas e aumento na intensidade dos íons das espécies glicosiladas, durante o inverno.

Gobbo-Neto e Lopes (2007)³³ descreveram os principais fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. Estes são diversos e, dentre eles, está a temperatura. Dessa forma a correlação com os gráficos de temperaturas mínimas e máximas, assim como os gráficos de precipitação pluviométrica, dos meses estudados com os gráficos das intensidades dos íons referentes as antocianidinas e antocianinas indica que, nos meses de inverno, a temperatura pode ter sido um fator de influência na síntese de antocianinas, assim como a menor precipitação pluviométrica durante esta estação do ano.

3.5 Conclusão

Como conclusão deste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia de análise por ESI(+)-MS/MS com infusão direta de amostra, rápida, sensível, com o mínimo de preparo de amostra e mínimo consumo de solvente. Metodologia esta, eficiente para detectar e identificar antocianinas e antocianidinas, permitindo monitorar e escolher métodos de extração e secagem das folhas e avaliar processos de extração.

Também foi possível obter perfis químicos característicos de plantas provenientes de diferentes origens geográficas (acessos), o que permitiu a seleção de uma planta (Acesso 6) com as melhores características para produção dos compostos de interesse. Embora o volume de dados analisados no experimento de sazonalidade seja considerável, a abordagem realizada deverá ser refinada para possibilitar um real e aprofundado entendimento da interação da planta com o meio ambiente.

Uma abordagem possível é correlacionar os perfis químicos com dados de biologia molecular. Recentemente, Figueira e colaboradores,⁷⁰ através de estudos de biologia molecular, desenvolveram marcadores microsatélites para caracterização genotípica do banco de germoplasma do CPQBA, do qual os acessos de *A. chica* estudados neste trabalho fazem parte. O marcador microsatélite desenvolvido para a espécie *A. chica* neste trabalho, detectou a variabilidade e a identidade genética dos genótipos dos 9 acessos do banco de germoplasma.⁷⁰ Futuramente, através da correlação dos alelos identificados nos diferentes acesso de *A. chica*, com os dados de perfil químico ampliado, poderemos definir um perfil molecular para cada acesso, em especial do genótipo de interesse (Acesso 6), entendendo a interação do vegetal e o meio ambiente, permitindo padronização da matéria prima vegetal visando o prosseguimento com os estudos para o desenvolvimento de um produto fitoterápico.

Capítulo 4: *Pterodon pubescens* Benth.

4.1 Introdução

O gênero *Pterodon* (Leguminosae) compreende cinco espécies nativas no Brasil: *P. pubescens* Benth., *P. emarginatus* Vog., *P. polygalaeflorus* Benth., *P. apparicioi* Pedersoli e *P. abruptus* Benth.⁴³ A espécie *P. pubescens*, conhecida popularmente como sucupira branca, é uma árvore encontrada na região central do Brasil e tem suas sementes disponibilizadas comercialmente em mercados populares por suas propriedades antireumática, analgésica e antiinflamatória.⁷³ O óleo essencial das sementes de *P. pubescens* teve ação quimioprolática em xistossomos⁷⁴ devido aos efeitos tóxicos e mutagênicos.⁷⁵ Foram relatadas atividades: antiartrite,⁷⁵ antidematogênica,⁷⁶ antinocepitiva,⁷⁷ e imunomoduladora.⁷⁸ A proteção contra infecção por cercária de *Schistosoma mansoni*,⁷⁴ foi atribuída ao 14, 15-epoxigenarilgeraniol (**16**) e posteriormente outros dois diterpenos lineares, 14, 15-dihidroxi-14, 15-dihidroxigeraniolgeraniol (**17**) e o geraniolgeraniol (**18**) que ocorrem em *P. pubescens* como odor floral característico (Figura 4.1). Menna Barreto et al.⁷³ reportou também a atividade anti-*Tripanossoma cruzi* do geraniolgeraniol.

Figura 4.1: Diterpenos lineares característicos do gênero *Pterodon*

Estudos fitoquímicos de *Pterodon* demonstraram a presença de alcalóides na casca, isoflavonas e alguns triterpenos na madeira, diterpenos e isoflavonas⁴⁵ no óleo da semente, sendo que os constituintes característicos deste gênero são os

diterpenóides lineares e cíclicos com esqueletos vinhaticanos ou voucapanos ⁴⁶
(Figura 4.2).

Figura 4.2: Diterpenos cíclicos característicos do gênero *Pterodon*

Os furanos diterpenos deste gênero possuem atividades anti-edematogênica, analgésica, antiinflamatória e antiproliferativa em linhagens de câncer de células humanas. ⁴⁶

Dentre as moléculas da Figura 4.2, as estruturas **22**, **23**, **25**, **30** e **31** foram isoladas de *P. pubescens*. Recentemente as estruturas **19**, **20**, **27** e **32** relatadas apenas para o gênero, foram isoladas, assim como a estrutura **33** que ainda não havia sido relatada na espécie e no gênero:⁴⁶

(33) M.M. = 360

Figura 4.3: Novo diterpeno isolado de *P. pubescens*

Considerando as atividades biológicas da espécie, e a comercialização das sementes e extratos alcoólicos em mercados populares, há necessidade de desenvolver métodos para avaliar a qualidade dos produtos adquiridos comercialmente. Através da utilização de espectrometria de massas, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia de análise direta para o óleo da semente de *P. pubescens*, considerando principalmente os constituintes com atividades biológicas conhecidas, possibilitando o controle de qualidade e reconhecimento químico de produtos da espécie adquiridos comercialmente.

Figura 4.4: *Pterodon pubescens*

4.2 Objetivos Específicos

O objetivo específico deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia de análise direta para o óleo da semente de *P. pubescens* através da utilização de espectrometria de massas (ESI(+)-MS/MS), para avaliar o perfil químico dos diterpenos lineares e cíclicos, e para comparar os perfis dos óleos obtidos diretamente da semente, por extração com solvente e no comércio popular.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Material Vegetal

As amostras das sementes de *P. pubescens*, do óleo comercial e do óleo obtido através da extração com solvente, foram cedidas pela Prof. Dra. Mary Ann Foglioma do CPQBA-Unicamp. A metodologia empregada para extração do óleo das sementes de *P. pubescens* é descrita no esquema da Figura 4.5.

Figura 4.5: Metodologia de extração para as sementes de *P. pubescens*

4.3.2 Preparo de Amostra

As amostras foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: 10 μL de cada óleo foi diluído em 1 mL de metanol com 0,1% de ácido fórmico. A partir destas soluções foi retirada uma alíquota de 10 μL e diluída novamente em 1 mL de metanol com 0,1% de ácido fórmico.

4.3.3 Obtenção dos espectros de massas

As soluções foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram adquiridos em modo positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester - Reino Unido) de configuração de ESI-QqToF. As condições de operação do equipamento foram: voltagem do capilar: 3.0 kV; temperatura da fonte: 80 °C; temperatura de dessolvatação: 80 °C e voltagem do cone: 35 V. As amostras diluídas foram infundidas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1000 e para os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de colisão de 10-30 eV a partir de m/z 50 até valores de m/z acima do íon em estudo.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Caracterização dos óleos de *P. pubescens* através do perfil de diterpenos

Para o desenvolvimento de metodologia de análise direta do óleo dos frutos de *P. pubescens*, foram avaliados os perfis de amostras de óleo fornecidas pelo CPQBA, descritas na Tabela 4.1. As amostras foram apenas diluídas e analisadas por infusão direta com ESI(+)-MS(/MS).

Tabela 4.1: Amostras de óleo de *P. pubescens* analisadas.

Amostra	Descrição
PP-1	Óleo “in natura”
PP-2	Extrato Diclorometano
PP-3	Óleo comercial

Os espectros de ESI(+)-MS obtidos demonstram dois perfis distintos: um com grande semelhança entre as amostras PP-1 e PP-2 e outro para a amostra PP-3, como mostrado na Figura 4.6.

Figura 4.6: Espectros de ESI(+)-MS das amostras a) PP-1, b) PP-2 e c) PP-3.

Os óleos *in natura* (PP-1) e o óleo obtido por extração com solvente (PP-2) são muito similares, diferindo entre si, apenas pela diferença na intensidade do íon de m/z 361. Na Figura 4.7 são mostradas as ampliações dos espectros da Figura anterior na faixa de massas de m/z 295 a 450 que correspondentes aos diterpenos lineares e cíclicos (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3) característicos da espécie.

Figura 4.7: Espectros de ESI(+)-MS ampliados das amostras a) PP-1, b) PP-2 e c) PP-3.

Os íons assinalados possivelmente correspondem às moléculas protonadas dos diterpenos já relatados na literatura,⁴³ como também de algumas novas estruturas recentemente isoladas e identificadas (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3):

Tabela 4.2: Possíveis diterpenos detectados nas amostras analisadas

Amostra	Estrutura (m/z)											
	18 (289)	16 (307)	17 (325)	21, 32 (335)	19 (345)	28 (349)	33 (361)	27 (363)	20 (403)	29, 30 (405)	25 (417)	22, 27 (463)
PP-1	X	X	x	x	x	x	x		x	x		
PP-2	X	X	x	x	x	x	X		x	x		
PP-3	x	x			X		x	x	x	X	X	x

X = intensidade $\geq$ 35%, x = intensidade $\leq$ 35%.

Os íons de m/z 271, 289, 307, 361, 403, 613, 631 e 649 foram submetidos a experimentos de ESI(+)-MS/MS. Na Figura 4.8 são mostrados os espectros obtidos para os três primeiros íons.

Figura 4.8: Espectros de ESI(+)-MS/MS para os íons de m/z a) 271, b) 289 e c) 307

Estes espectros indicam a presença do 14,15-epoxigeranilgeraniol (**16**), uma vez que os íons fragmentos coincidem com a proposta de fragmentação mostrada na Figura 4.9. Os íons de m/z 289 e 271 são íons fragmentos do íon m/z 307.

Figura 4.9: Proposta de fragmentação para o 14,15-epoxi-geranylgeraniol

Outra evidência da presença do 14, 15-epoxi-geranilgeraniol é a presença do seu dímero simétrico protonado, m/z 613, como mostra o espectro da Figura 4.10a. Com os espectros dos íons de m/z 631 e 649 (Figuras 4.10b e 4.10c) podemos concluir que há presença do 14,15-dihidroxi-geranilgeranil (**17**), pois os íons fragmentos dos respectivos espectros são principalmente os íons de m/z 307 e 325. Desta maneira inferimos que o íon de m/z 631 é um dímero assimétrico protonado de **16** e **17**, e o íon de m/z 649 é um dímero simétrico protonado de **17**.

Figura 4.10: Espectros de ESI(+)-MS/MS dos íons de m/z a) 613, b) 631 e c) 649

Dentre os possíveis diterpenos cíclicos detectados (Tabela 4.2), os íons de m/z 403 e 361 foram submetidos a experimentos de ESI(+)-MS/MS e seus espectros, assim como suas propostas de fragmentação são mostrados nas Figuras 4.11 a 4.14:

Figura 4.11: Espectros de ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 403

De acordo com os íons fragmentos mostrados nos espectros da Figura 4.11, possivelmente o íon de m/z 403 é o diterpeno **20**, pois há perda de duas moléculas de ácido acético (60 Da) levando ao íon de m/z 343 e posteriormente ao íon de m/z 283, sendo que estes íons também podem perder uma molécula de água cada (18 Da) formando aos íons de m/z 325 e 265, ou a perda de uma molécula de gás carbônico cada (28 Da) levando aos íons fragmentos de m/z 315 e 255, ou ainda uma molécula de metanol cada (32 Da) levando aos íons de m/z 301 e 251. A Figura 4.12 mostra a proposta de fragmentação para o diterpeno **20**.

Figura 4.12: Proposta de fragmentação para o diterpeno **20**

Figura 4.13: Espectros de ESI(+)-MS/MS do íon de m/z 361

Os íons fragmentos mostrados no espectro da Figura 4.13, possivelmente são do íon de m/z 361, referente ao diterpeno **33**, pois há perda de uma molécula de ácido acético (60 Da) levando ao íon de m/z 301 e posteriormente a perda de uma molécula de água (18 Da) levando ao íon de m/z 283 de acordo com a proposta de fragmentação proposta na Figura 4.14.

Figura 4.14: Proposta de fragmentação para o diterpeno **33**

Para os íons de m/z 405 e 363, os espectros de ESI(+)-MS/MS, apresentam o mesmo perfil perdas neutras dos íons de diterpenos **20** e **33** identificados anteriormente, como mostrado na Figura a seguir:

Figura 4.15: Espectros de ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 405 e b) m/z 363

De acordo com íons fragmentos mostrados nos espectros da Figura 4.15a, possivelmente o íon de m/z 405 é o diterpeno **29** ou **30**, pois há perda de uma molécula de ácido acético (60 Da) levando ao íon de m/z 345, posteriormente ocorre a perda de uma molécula de água (18 Da) levando ao íon de m/z 327 seguida de uma perda de ácido acético (60 Da) levando ao íon de m/z 267. Pode ocorrer também a ordem inversa de perdas neutras a partir do íon de m/z 345, ou seja, a perda de uma molécula de ácido acético gerando o íon de m/z 285 e depois a perda de água gerando o íon m/z 267.

O espectro de ESI(+)-MS/MS para o íon de m/z 363 (Figura 4.15b) mostra o mesmo perfil de fragmentação, ocorrendo inicialmente a perda de uma molécula de água gerando o íon de m/z 327, depois a perda de uma molécula de ácido acético gerando o íon de m/z 285 ou uma outra perda de água gerando o íon de m/z 327. A partir do íon de m/z 285 ocorre ainda a perda de uma molécula de água gerando o íon de m/z 267.

O demais íons citados na Tabela 4.2 também foram submetidos a experimentos de ESI(+)-MS/MS, porém, estes experimentos não geraram informações conclusivas como mostrado para os íons de m/z 307 (**16**), 361 (**33**), 363 (**27**), 403 (**20**) e 405 (**29**, **30**). Porém, através dos espectros de massas de alta resolução obtidos com um analisador

de massas do tipo *Time of Flight*, foi possível confirmar a composição elementar dos íons referentes aos diterpenos de m/z 325 (**17**), 345 (**19**), 463 (**22**), 401 (**24**), 417 (**25**), 373 (**26**) e 447 (**31**). Na Tabela 4.3 estão os dados de HRMS resumidos para os íons possivelmente identificados.

Tabela 4.3: Dados de ESI(+)-HRMS sumarizados das substâncias identificadas

Estrutura	Formula Molecular	HRMS (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	E (ppm)
16	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.2637	307.2614	+7.5
17	C ₂₀ H ₃₆ O ₃	325.2743	325.2840	-29.8
19	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	345.2430	345.2357	+21.1
20	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	403.2484	403.2422	+15.4
22	C ₂₅ H ₃₄ O ₈	463.2332	463.2243	+19.2
24	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	401.2328	401.2424	-23.9
25	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.2277	417.2367	-21.6
26	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	373.2015	373.2000	+4.0
27	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	363.2172	363.2282	-30.3
29, 30	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	405.2277	405.2235	+10.4
31	C ₂₅ H ₃₄ O ₇	447.2383	447.2557	-38.9
33	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	361.2379	361.2411	-8.9

4.5 Conclusão

Como conclusão deste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia de análise direta para o óleo da semente de *P. pubescens* através da utilização de espectrometria de massas ESI(+)-MS/MS. Esta metodologia permitiu comparar os perfis dos óleos *in natura*, do obtido por extração com solvente e do adquirido no comércio popular.

Com a identificação dos compostos bioativos, observamos que os óleos *in natura* (PP-1) e obtido por extração com solvente (PP-2) apresentam um perfil químico diferenciado do óleo comercial (PP-3). Provavelmente devido a oxidação dos diterpenos contidos no óleo que ocorre naturalmente em função do tempo de estocagem, das

condições de armazenagem e ou da metodologia de extração do óleo a partir da semente.

A metodologia desenvolvida mostrou-se eficiente na caracterização das amostras de *P. pubescens* e poderá ser empregada como método rápido de controle da qualidade do óleo.

Capítulo 5: *Maytenus ilicifolia* Mart.

5.1 Introdução

Maytenus ilicifolia Mart ex Reissek é popularmente conhecida como espinheira-santa (PR, RS), cancorosa (PR), espinheira divina, erva cancorosa, erva santa, cancerosa (RS). Pertence à família Celastraceae possuindo 55 gêneros e 850 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.⁷⁹ No Brasil é encontrada predominantemente na região sul, sendo sua ocorrência nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul pouco abundante, e se desenvolve no sub-bosque das florestas de Araucária ou às margens dos rios.

Figura 5.1: *Maytenus ilicifolia*

No Brasil, as espécies *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* têm sido usadas pela medicina popular para o tratamento de úlceras gástricas, dispepsias e outros problemas gástricos, assim como, antitumoral, antireumático e antiinflamatório por algumas tribos da Bacia Amazônica.⁸⁰ Segundo Xavier e D'Angelo,⁸¹ a presença de taninos, heterosídeos e proantocianidinas, possivelmente guardam algum relacionamento com sua atividade farmacológica antiulcerogênica.

Os primeiros estudos fotoquímicos de *M. ilicifolia* mostraram a presença de terpenóides, taninos, alcalóides, macrólídeos e flavonóides.⁸² Dentre as substâncias encontradas, estão os terpenos maitenina, tringenona, isotenginona II, congorosinas A e B, ácido maitenóico; os triterpenos friedelanol e friedelina; os taninos epicatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina; os glicolipídeos

monogalactosildiacylglicerol, digalactosildiacylglicerol, trigalactosildiacylglicerol, tetragalactosildiacylglicerol e sulfoquinovosildiacylglicerol, e por fim os alcalóides maiteína, maitanprina e maitensina.⁸³⁻⁸⁵

Figura 5.2: Compostos isolados de *M. ilicifolia*.

Recentes trabalhos publicados demonstram a presença de uma série de flavonol-3-O-glicosídeos, tais como, rutina, quercetina, kampeferol mono- di- tri e tetra-glicosídeos ⁸⁶⁻⁸⁷ nas folhas, que também apresenta atividade antiúlcera gástrica, já conhecida.

Figura 5.3: Flavonol-3-O-glicosídeos de *M. ilicifolia*

Em 2009, Souza e colaboradores demonstraram o perfil de flavonóides glicosilados presentes nas folhas de *M. ilicifolia* através de experimentos 2D-LC-UV-MS, caracterizando estruturalmente os flavonóides glicosilados, isomericamente de acordo com os açúcares e posições de suas substituições,³⁸ como mostrado na Tabela 5.1

Tabela 5.1: Flavonóides glicosilados identificados por 2D-LC-UV-MS.

Flavonóide	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Rha-(1→x)-Hex-(1→x)-[Rha-(1→x)]-Gal-(1→x)-Quercetina	919	917
Rha-(1→x)-Hex-(1→x)-[Rha-(1→x)]-Gal-(1→x)-Kaempferol	903	901
Arap-(1→3)-Rhap-(1→6)-[Rhap-(1→2)]-Galp-(1→3)-Quercetina	889	887
Hex-(1→x)-Ara-(1→x)-[Rha-(1→x)]-Rha-(1→3)-Quercetina	889	887
Rhap-(1→x)-[Rhap-(1→x)]-Galp-(1→3)-Mirecetina	773	771
Arap-(1→3)-Rhap-(1→6)-[Rhap-(1→2)]-Galp-(1→3)-Kaempferol	873	871
Hex-(1→x)-Ara-(1→x)-[Rha-(1→x)]-Rha-(1→3)-Kaempferol	873	871
Rhap-(1→6)-[Rhap-(1→2)]-Galp-(1→3)-Quercetina	757	755
Rhap-(1→6)-[Rhap-(1→2)]-Galp-(1→3)-Kaempferol	741	739
Glc p-(1→2/6)-Gal/Glc-(1→3)-Quercetina	627	625
Rhap-(1→2)-Galp-(1→3)-Quercetina	611	609
Rhap-(1→6)-Galp-(1→3)-Quercetina	611	609
Rhap-(1→6)-Galp-(1→3)-Kaempferol	595	593
Rhap-(1→2)-Galp-(1→3)-Kaempferol	595	593
Rhap-(1→2)-Glc p-(1→3)-Quercetina	611	609
Rhap-(1→6)-Glc p-(1→3)-Quercetina (Rutina)	611	609
Rhap-(1→6)-Glc p-(1→3)-Kaempferol	595	593
Rhap-(1→2)-Glc p-(1→3)-Kaempferol	595	593
Rhap-(1→4/5)-Ara-(1→3)-Quercetina	581	579
Hex-(→x)-Mirecetina	481	479
Rha-(→x)-Ara-(→x)-Kaempferol	565	563
Galp-(1→3)-Quercetina (Hiperosideo)	465	463
Glc p-(1→3)-Quercetina (Isoquercetina)	465	463
Galp-(1→3)-Kaempferol	449	447
Glc p-(1→3)-Kaempferol	449	447
Araf-(1→x)-Quercetina	435	433
Arap-(1→3)-Quercetina	435	433
Ara-(1→x)-Kaempferol	419	417

Glc: glucose; Gal: galactose; Rha: raminose; Ara: arabinose (*p* e *f* para piranose e furanose respectivamente); x: ligações não identificadas.

Outros flavonóides bem conhecidos, pertencentes à classe dos flavanols, tais como, catequina (*trans*), e epicatequina (*cis*) e seus dímeros, as procianidinas, exibem forte atividade antioxidante relacionada com a eliminação de radicais livres. Estas

estruturas (Figura 5.4) também são agentes cardioprotetores, antimutagênicos e anticarcinogênicos.⁴⁰

Figura 5.4: Catequinas e procianidinas

Frente à importância e a comprovação das atividades biológicas da *M. ilicifolia* o governo brasileiro, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o uso e a comercialização de fitoterápicos de *M. ilicifolia* (Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004), o qual é padronizado pelo teor de taninos.

Embora muitos estudos sobre o potencial farmacológico de *M. ilicifolia* frente úlceras gástricas tenham sido realizados, até o presente momento, não foi possível isolar e identificar o princípio ativo responsável, na forma pura, por esta atividade. Também não se conhece se a atividade está relacionada a um sinergismo. Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia de análise direta,

rápida e sensível que possibilite avaliar a qualidade do extrato de folhas de *M. ilicifolia*, assim como monitorar o melhoramento agrícola da espécie realizado no CPQBA.

5.2 Objetivos Específicos

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia de análise por espectrometria de massas com infusão direta para avaliação do perfil químico das folhas de *M. ilicifolia* frente ao melhoramento agrícola realizado no CPQBA-UNICAMP com a finalidade de promover a padronização da espécie vegetal.

5.3 Parte Experimental

5.3.1. Material Vegetal

Foram utilizadas as folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart disponível na coleção no herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP localizado em Campinas (SP). As plantas foram coletadas através do corte a 30 cm do solo, sendo dispostas durante 48 horas na estufa (Fabbe) à 40°C, com ventilação forçada e posteriormente separadas as folhas, estas foram misturadas e moídas no moinho tipo martelo. Cada amostra provem de 5 plantas e estas apresentam umidade de aproximadamente 12 %.

As amostras de folhas avaliadas no melhoramento agrícola foram obtidas através de mudas que foram trazidas da região de Curitiba em 1988. Em 2002 as plantas foram podadas e as plantas que apresentaram melhor rebrota (6 plantas) foram clonadas. Estes clones foram plantados no campo experimental do CPQBA (Paulinia/SP) todos próximos uns aos outros de forma que se cruzassem naturalmente na época da floração. Sementes dos clones foram colhidas separadamente, formando famílias de meios irmãos. As mudas obtidas a partir destas sementes (geração F1) formaram um ensaio agrícola em blocos casualizados com 7 repetições. As folhas destes clones foram coletadas e secas com o mesmo protocolo descrito anteriormente.

5.3.2 Preparo de Amostra

Os extratos (cerca de 10 mg) foram dissolvidos em 1 mL de metanol e 10 µL de cada solução foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1) com 0,1% de aditivos auxiliares, conforme o modo de ionização. Os aditivos auxiliares de favorecimento de ionização são ácido fórmico (99%) ou hidróxido de amônio (25%) utilizados para ESI (+) ou ESI (-), respectivamente, na concentração de 0,1%.

A metodologia geral empregada para obtenção dos extratos de *M. ilicifolia* está descrita na Figura 5.5.

Figura 5.5: Metodologia de obtenção dos extratos de *M. ilicifolia*

Para avaliação do melhoramento agrícola, as folhas secas das diferentes famílias de *M. ilicifolia* (150 mg) foram extraídas em Metanol/H₂O (1:1) com 0,1% de ácido fórmico, sob agitação em vortex por 1 min, posterior centrifugação (1 min). 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram diluídos em 1 mL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1) com 0,1% ácido fórmico.

Figura 5.6: Esquema geral da análise direta das folhas de *M. ilicifolia* por ESI(+)-MS.

5.3.3 Obtenção dos espectros de massas

As soluções das amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram extraídos no modo negativo e/ou positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester - Reino Unido) e de um FT-ICR-MS Thermo Scientific (Bremen – Alemanha). As condições de operação dos equipamentos para as análises foram: voltagem do capilar: 3.0-4.0 kV; temperatura da fonte: 100 °C; temperatura de dessolvatação: 100 °C; voltagem do cone: 20-40 V. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 10 µL min⁻¹ ou através do Nanomate Adivion (EUA) com fluxo contínuo de 200 nL min⁻¹. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 a 1500. Os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos com energia de 10-30 eV a partir de *m/z* 50 até um valor pouco acima do íon em estudo. Os espectros foram tratados com os softwares MassLynx 4.1 e Scalibur 2.0 SR2.

5.3.4 Tratamento de Dados: Análise de Variância (Anova)

A Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos. Existem muitas variações da ANOVA devido aos diferentes tipos de experimentos que podem ser realizados.

No delineamento experimental utilizado neste estudo, foram comparados seis diferentes famílias de *M. ilicifolia* e avaliou-se a composição química de sete plantas de

cada família, considerando a intensidade relativa dos íons identificados por ESI-MS/MS referentes aos compostos bioativos (m/z 183; m/z 291; m/z 579, m/z 595; m/z 741 e m/z 757).

O efeito dos tratamentos (famílias) sobre as características químicas das folhas de *M. ilicifolia* foi avaliado por análise de variância e pelo teste de comparação entre médias de Tukey, ao nível de 5% de significância. Os cálculos de ANOVA foram realizados através do Microsoft Office Excel 2007.

As variâncias genotípica, fenotípica e a herdabilidade foram calculadas de acordo com Strickberger (1990).⁸⁸

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Caracterização dos extratos e folhas de *M. ilicifolia*

Com o objetivo de identificar um perfil químico, através do *fingerprinting* obtido por ESI-MS, foram avaliados inicialmente dois extratos etanólicos ativos de *M. ilicifolia*, fornecidos pelo CPQBA. Estes extratos foram obtidos em coletas diferentes de folhas (2006 e 2007) e apresentaram a mesma atividade antiulcerogênica.

Na primeira etapa do trabalho foram avaliadas as condições de análise para a obtenção dos espectros de ESI no modo positivo e negativo, avaliando a presença de compostos previamente identificados por RMN de H^1 e C^{13} anteriormente no CPQBA. Como os extratos etanólicos foram obtidos após sucessivas extrações com solventes em ordem crescente de polaridade, estes apresentam o mesmo perfil, caracterizado pela detecção de compostos com maior polaridade, como os flavonóides glicosilados de *M. ilicifolia* já descritos na literatura.

Com base nos espectros obtidos por ESI-MS no modo positivo e negativo, o modo positivo foi escolhido para o desenvolvimento do trabalho, pois um maior número de compostos conhecidos foram detectados e o no modo negativo, há favorecimento da ionização dos flavonóides glicosilados. No ESI(+) também observa-se uma relação sinal/ruído menor.

Nestes extratos foram identificados uma série de compostos conhecidos na literatura e possivelmente envolvidos com a atividade antiúlcera. Na Figura 8 é mostrado o perfil do extrato etanólico obtido por ESI(+/-)-MS.

Figura 5.7: a) ESI(+)-MS e b) ESI(-)-MS obtidos para o extrato etanólico ativo

Abaixo é mostrado uma ampliação do espectro de ESI(+)-MS da Figura 5.7a.

Figura 5.8: Ampliação (m/z de 100 a 500) do espectro de ESI(+)-MS obtido para o extrato etanólico ativo

Dentre os íons que se apresentam no perfil do espectro da Figura 5.9, os íons referentes às formas ionizadas do dulcitol, o dulcitol protonado (m/z 183 $[M + H]^+$) e seus adutos de sódio (m/z 205 $[M + Na]^+$) e potássio (m/z 221 $[M + K]^+$), assim como os dímeros com próton (m/z 365 $[2M + H]^+$), com sódio (m/z 387 $[2M + Na]^+$), com potássio

(m/z 403 $[2M + K]^+$) e a catequina protonada (m/z 291 $[M+H]^+$) foram detectados e identificados, por comparação com o dulcitol sintético e por experimentos de MS/MS, como também por comparação com os dados de literatura. Os íons que foram submetidos a experimentos de MS/MS são mostrados nas Figuras abaixo.

Figura 5.9: ESI(+)-MS/MS do íon referente ao dulcitol protonado (m/z 183 $[M + H]^+$) a) encontrado no extrato e b) no padrão comercial

No espectro de ESI(+)-MS/MS da Figura 5.9a observamos as perdas sucessivas de 4 moléculas de H_2O e a similaridade com o espectro da Figura 5.9b, obtido para o padrão comercial de Dulcitol. Além da forma protonada do Dulcitol identificada, a Figura 5.10 mostra os espectros obtidos para seus dímeros:

Figura 5.10: ESI(+)-MS/MS dos íons referentes os dímeros a) de próton (m/z 365), com sódio (m/z 387) e com potássio (m/z 403) do dulcitol

No espectro de ESI(+)-MS/MS obtido para o íon de m/z 291 (Figura 5.11), referente a catequina protonada, observa-se a presença do íons fragmentos de m/z 273 referente a perda de uma molécula de H_2O , como também do íon base de m/z 139, íon fragmento produtos da abertura de anel do tipo retro-Diels-Alder.⁸⁹

Figura 5.11: ESI(+)-MS/MS do íon referente a catequina protonada (m/z 291 $[M + H]^+$)

Para visualizar o restante do espectro de ESI(+)-MS do extrato etanólico obtido no modo positivo (Figura 5.7a), este foi ampliado na faixa de m/z de 500 a 1100, como mostrado na Figura 5.12.

Figura 5.12: Ampliação (m/z de 500 a 1100) do espectro de ESI(+)-MS obtido para o extrato etanólico ativo

Como mostrado na Figura 5.12, foram detectados uma série de flavonóides glicosilados (circulados em azul) e derivados de catequina (circulado em vermelho).

Os flavonóides foram identificados por experimentos de MS/MS (Figura 5.13). Para o íon de m/z 741 o espectro (Figura 5.13a) mostra a perda de três unidades de açúcar ($[M - 2rha - Gal/Glc + H]^+$) resultando no íon de sua aglicona de m/z 287 ($[A + H]^+$). Na Figura 5.13b, referente ao espectro do íon de m/z 757 mostra a perda de três unidades de açúcar ($[M - 2rha - Gal/Glc + H]^+$) resultando no íon de sua aglicona de m/z 303, ($[A + H]^+$). Conforme a literatura, os íons das agliconas de m/z 287 e 303 correspondem a kaempferol e quercetina, respectivamente.

Figura 5.13: ESI(+)-MS/MS dos íons referentes aos flavonóides glicosilados de a) m/z 741 e b) m/z 757

Para o íon de m/z 595 o espectro (Figura 5.14a) mostra a perda de duas unidades de açúcar ($[M - rha - Gal/Glc + H]^+$) resultando no íon de sua aglicona de m/z 287 ($[A +$

HJ⁺). Na Figura 5.14b, referente ao espectro do íon de m/z 611 mostra a perda de duas unidades de açúcar ([M – rha – Gal/Glc + H]⁺) resultando no íon de sua aglicona de m/z 303, ([A + H]⁺). Conforme a literatura, os íons das agliconas de m/z 287 e 303 correspondem a kaempferol e quercetina, respectivamente.

Figura 5.14: ESI(+)-MS/MS dos íons referentes aos flavonóides glicosilados de a) m/z 595 e b) m/z 611

Os íons de m/z 563 e 579 foram identificados como os derivados de catequina **44** e **45** através dos experimentos de ESI-MS/MS e por comparação na literatura. A presença de íons fragmentos produtos da abertura de anel do tipo retro-Diels-Alder, (M+H-152)⁺, são comuns e são indicativos da presença de catequinas em misturas complexas.⁸⁹ Alguns íons não foram correlacionados com os dados da literatura, o que pode indicar uma mistura de isômeros.

Figura 5.15: ESI(+)-MS/MS dos íons de a) m/z 563 e b) m/z 579

Os demais íons detectados também foram submetidos a experimentos de MS/MS. Em alguns casos, os espectros apresentam os íons fragmentos de m/z 303 ou 287, referente às agliconas dos flavonóides glicosilados, ou o íon de m/z 291, referente à catequina. Porém, não foi possível a elaboração de propostas de fragmentação condizentes com a literatura para estes íons que permitam a identificação.

5.4.2 Avaliação da padronização vegetal de *M. ilicifolia*

Uma vez que o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pela atividade antiúlcera não é(são) conhecido(s), o perfil químico do extrato etanólico ativo, detalhado anteriormente, foi eleito como modelo para avaliação do perfil químico das folhas de *M. ilicifolia* provenientes do melhoramento agrícola realizado pelo CPQBA.

Figura 5.16: Folhas das diferentes famílias de *M. ilicifolia* avaliadas

A partir das folhas secas das diferentes famílias de *M. ilicifolia*, foi testada uma série de metodologias de extração com diferentes solventes, até obtenção de espectros que tivessem um perfil aproximado ao espectro do extrato etanólico ativo.

Abaixo é mostrado o espectro representativo obtido com a otimização de extração e análise direta por ESI(+)-MS.

Figura 5.17: ESI(+)-MS obtido a partir da extração e análise direta das folhas de *M. ilicifolia*

Para a análise comparativa entre as seis famílias (4A, 4/1, 4/3, 7/2, 8/1 e 10/1) foram utilizados sete indivíduos (I a VII) de cada família levando em consideração a intensidade relativa dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 747 e 595. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Nas Figuras abaixo são mostrados os gráficos obtidos para cada uma das diferentes famílias e seus indivíduos em relação à intensidade relativa média dos íons acima citados.

Figura 5.18: Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 4A.

Figura 5.19: Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 4/1.

Figura 5.20: Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 4/3.

Figura 5.21: Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 7/2.

Figura 5.22: Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 8/1.

Figura 5.23: Intensidade relativa média dos íons de m/z 183, 291, 579, 741, 757 e 595 encontrados nas plantas da família 10/1.

Visualmente, como mostrado nos gráficos anteriores, as famílias parecem muito diferentes entre si, assim como os indivíduos de cada família. Foi realizada análise de variância, ANOVA, para verificar se existem variâncias significativas em relação aos íons identificados dentre as diferentes famílias. Foi calculada também a herdabilidade em relação a estes íons, para que saibamos se a seleção desta (as) características proporcionará ganhos genéticos para a população estudada.

Abaixo seguem as Tabelas com os dados utilizados na análise de variância e os resultados da Anova das famílias em relação a cada um dos íons.

Tabela 5.2: Intensidade relativa média do íon de m/z 183

Dulcitol (m/z 183)	Repetição (blocos)							
Família	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAIS
4A	5,7696	4,4961	8,3053	7,6350	5,0130	6,2147	5,1262	42,5600
4/1	8,3379	12,6495	6,1482	6,9614	7,3609	5,6604	3,0684	50,1867
4/3	7,7082	6,5332	5,6026	8,4513	6,1393	6,0918	6,2850	46,8114
8/1	5,5710	8,8497	5,3580	3,8124	3,7551	6,6894	7,1976	41,2331
7/2	6,9318	5,6639	8,4100	3,1780	7,3692	5,1326	3,8743	40,5598
TOTAIS	34.3185	38.1925	33.8240	30.0382	29.6375	29.7889	25.5515	221.3510

Os valores de intensidade relativa média do íon de m/z 183 na família 10/1 apresentaram-se nulos em cinco indivíduos e não foi possível considerá-la nesta análise.

Tabela 5.3: Anova para as famílias em relação ao dulcitol (m/z 183)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	9,625432	4	2,406358	0,645729	0,634208	2,689628
Dentro dos grupos	111,7973	30	3,726577			
Erro	91,4075	24	3,81			
Total	121,4228	34				
Coeficiente de Variação	30,85829					

De acordo com o teste F, não foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), entre as famílias em relação ao íon de m/z 183, o dulcitol. Desta forma, podemos afirmar que para esta característica, as famílias são iguais, assim a seleção desta característica será ineficaz e não poderá proporcionar ganho genético para a população.

Tabela 5.4: Intensidade relativa média do íon de m/z 291

Catequina (m/z 291)	Repetição (blocos)							
Família	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAIS
4A	20,41539	8,633558	19,51326	18,29471	9,412672	22,62823	20,92555	119,8234
4I	24,44028	15,62063	15,93848	14,56784	19,0092	24,57026	31,10812	145,2548
4/3	27,24605	25,38433	13,33405	33,07223	27,88997	30,9317	31,45928	189,3176
8/1	28,55659	24,67397	14,55413	19,74826	17,82795	20,72222	32,65925	158,7424
10/1	13,82958	20,26902	11,98616	16,09453	5,157931	12,78136	3,78453	83,9031
7/2	18,04499	18,27984	17,85362	9,604857	15,36642	18,68226	14,66505	112,497
TOTAIS	132,5329	112,8613	93,1797	111,3824	94,66415	130,316	134,6018	809,5383

Tabela 5.5: Anova para as famílias em relação a catequina (m/z 291)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	995,2622	5	199,0524	6,024758	0,000378	2,477169
Dentro dos grupos	1189,407	36	33,03908			
Erro	884,3064	30	29,48			
Total	2184,669	41				
Coeficiente de Variação	28,16778					

De acordo com o teste F, foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), entre as famílias em relação ao íon de m/z 291, a catequina. Com os dados da Tabela 5.4, foram calculadas as variâncias genotípicas ($\sigma^2_g = 24,22508$), fenotípica ($\sigma^2_f = 28,43606$) e a herdabilidade ($h^2 = 85,19\%$). Podemos afirmar que para esta característica, a presença do íon de m/z 291, as famílias são diferentes. A alta herdabilidade encontrada nos permite prever que se selecionada esta característica, obteremos ganhos de produtividade para a população.

Foi realizado o teste de Tukey para avaliar a magnitude das diferenças entre as famílias. Calculou-se a diferença mínima significativa (DMS) = 10,77336, sabendo que $q = 5,25$, obteve-se a classificação das famílias em relação a característica selecionada (íon de m/z 291), mostrada na Tabela 5.6 .

Tabela 5.6: Classificação das famílias em relação ao íon de m/z 291

Família		Classificação
4/3	189,3176	a
8/1	158,7424	b
4/1	145,2548	c
4A	119,8234	d
7/2	112,497	d
10/1	83,9031	e

De acordo com o teste de Tukey, temos que as famílias classificadas com letras iguais, diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5.7: Intensidade relativa média do íon de m/z 579

Derivado de Catequina (m/z 579)	Repetição (blocos)							TOTAIS
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
4A	9,636152	4,657643	8,503376	10,85578	5,029538	10,74398	7,492884	56,91935
4/1	7,693546	9,582482	7,320803	6,487656	8,205238	8,854839	8,855796	57,00036
8/1	11,63987	9,8773	8,629002	6,888089	7,524386	6,470827	9,316763	60,34624
7/2	9,288837	9,252224	7,548121	6,898894	9,621565	8,872454	7,242328	58,72442
TOTAIS	38,25841	33,36965	32,0013	31,13042	30,38073	34,9421	32,90777	232,9904

Os valores de intensidade relativa média do íon de m/z 579 nas famílias 4/3 e 10/1 apresentaram-se nulos em quatro e três indivíduos respectivamente, não sendo possível considerá-las nesta análise.

Tabela 5.8: Anova para as famílias em relação o derivado de catequina (m/z 579)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,135927	3	0,378642	0,124467	0,944728	3,008787
Dentro dos grupos	73,01064	24	3,04211			
Erro	62,42186	12	5,20			
Total	74,14657	27				
Coeficiente de Variação	27,40929					

De acordo com o teste F, não foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), entre as famílias em relação ao íon de m/z 579, o derivado de catequina. Desta forma, podemos afirmar que para esta característica, as famílias são iguais, assim a seleção desta característica será ineficaz e não poderá proporcionar ganho genético para a população.

Tabela 5.9: Intensidade relativa média do íon de m/z 741

Flavonóide A (m/z 741)	Repetição (blocos)							
Família	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAIS
4A	38,68971	61,74748	23,08506	31,74582	57,4624	30,57258	45,63026	288,9333
4/1	27,51662	27,63192	51,73329	56,62994	23,95262	43,30855	38,50948	269,2824
4/3	42,38756	36,31768	26,35333	38,6738	45,29396	44,92474	44,67417	278,6252
8/1	19,15446	18,12598	38,64823	46,65757	50,71516	19,69522	33,64412	226,6407
10/1	55,51223	48,78666	45,64215	43,74071	39,33216	49,07179	37,40932	319,495
7/2	35,3323	37,87019	33,43242	50,85624	25,7458	39,27663	46,35712	268,8707
TOTAIS	218,5929	230,4799	218,8945	268,3041	242,5021	226,8495	246,2245	1651,847

Tabela 5.10: Anova para as famílias em relação ao flavonóide A (m/z 741)

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	656,4849	5	131,297	1,108155	0,373263	2,477169
Dentro dos grupos	4265,371	36	118,4825			
Erro	3948,674	30	131,62			
Total	4921,855	41				
Coeficiente de Variação	29,17054					

De acordo com o teste F, não foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), entre as famílias em relação ao íon de m/z 741, o flavonóide A. Desta forma, podemos afirmar que para esta característica, as famílias são iguais, assim a seleção desta característica será ineficaz e não poderá proporcionar ganho genético para a população.

Tabela 5.11: Intensidade relativa média do íon de m/z 757

Flavonóide B (m/z 757)	Repetição (blocos)							
Família	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAIS
4A	10,35764	16,36965	2,134689	9,466978	17,3587	10,90741	10,37202	76,96709
4/1	2,922124	7,063366	12,76509	9,089555	4,279917	12,50263	11,24534	59,86802
4/3	10,43268	9,411435	5,752682	6,734741	11,86863	11,20373	9,34519	64,74909
8/1	6,097393	7,253652	13,52668	11,32257	13,30107	4,120254	5,910179	61,53179
7/2	14,62076	9,97899	6,78755	11,67788	3,295456	6,631687	13,26057	66,25289
TOTAIS	44,4306	50,07709	40,96669	48,29172	50,10377	45,36571	50,1333	329,3689

Os valores de intensidade relativa média do íon de m/z 757 na família 10/1 apresentaram-se nulos em quatro indivíduos e não foi possível considerá-la nesta análise.

Tabela 5.12: Anova para as famílias em relação ao flavonóide B (m/z 757)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	25,62746	4	6,406865	0,415066	0,796394	2,689628
Dentro dos grupos	463,0732	30	15,43577			
Erro	447,8248	24	18,66			
Total	488,7007	34				
Coeficiente de Variação	45,90225					

De acordo com o teste F, não foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), entre as famílias em relação ao íon de m/z 741, o flavonóide B. Desta forma, podemos afirmar que para esta característica, as famílias são iguais, assim a seleção desta característica será ineficaz e não poderá proporcionar ganho genético para a população.

Tabela 5.13: Intensidade relativa média do íon de *m/z* 595

Flavonoide C (<i>m/z</i> 595)	Repetição (blocos)							
Família	I	II	III	IV	V	VI	VII	TOTAIS
4A	6,490864	7,062194	5,558112	4,716847	5,723699	3,285112	5,062801	37,89963
4/1	5,528373	4,309707	6,094156	6,263579	6,366387	5,103305	7,21289	40,8784
4/3	5,192924	5,222039	3,228256	4,267882	8,325667	6,848054	8,23636	41,32118
8/1	4,860787	4,260589	4,3043	6,305148	6,876347	5,371676	5,444009	37,42286
10/1	9,326133	8,641462	28,26623	37,99809	37,18833	37,84546	38,59792	197,8636
7/2	5,321901	6,723744	4,822019	9,458576	5,955723	7,726873	8,185006	48,19384
TOTAIS	36,72098	36,21973	52,27308	69,01013	70,43616	66,18048	72,73899	403,5795

Tabela 5.14: Anova para as famílias em relação ao flavonóide C (*m/z* 595)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2934,561	5	586,9122	17,95778	6,56E-09	2,477169
Dentro dos grupos	1176,584	36	32,68288			
Erro	923,3877	30	30,78			
Total	4111,145	41				
Coeficiente de Variação	57,73665					

De acordo com o teste F, foram encontradas evidências de diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), entre as famílias em relação ao íon de *m/z* 595, o flavonóide C. Com os dados da Tabela 5.13, foram calculadas as variâncias genotípica ($\sigma^2_g = 79,44751$) e fenotípica ($\sigma^2_f = 83,84459$), assim como a herdabilidade ($h^2 = 94,75\%$). Podemos afirmar que para esta característica, a presença do íon de *m/z* 595, as famílias são diferentes. A alta herdabilidade encontrada nos permite prever que se selecionando esta característica, obteremos ganhos de produtividade para a população.

Foi realizado o teste de Tukey para avaliar a magnitude das diferenças entre as famílias. Calculou-se a diferença mínima significativa (DMS) = 11,00884, sabendo que $q = 5,25$, obteve-se a classificação das famílias em relação a característica selecionada (íon de *m/z* 595), mostrada na Tabela 5.15.

Tabela 5.15: Classificação das famílias em relação ao íon de m/z 595

Família		Classificação
10/1	197,8636	a
7/2	48,19384	b
4/3	41,32118	bc
4/1	40,8784	bc
4A	37,89963	bc
8/1	37,42286	c

De acordo com o teste de Tukey, temos que as famílias classificadas com letras iguais, diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados das análises de variância realizadas, duas características, os íon de m/z 291 e 595, a catequina e o flavonóide C respectivamente, são características diferenciadas entre as famílias, sendo o íon de m/z 291 uma característica marcante da família 4/3 e o íon de m/z 595 da família 10/1. Estas características possuem alta herdabilidade, ou seja, características que poderão proporcionar ganhos genéticos para a população estudada. Outra observação importante é que os coeficientes de variação, em todos os experimentos analisados estão próximos ao valor 30, o que configura baixa precisão do experimento. Esta baixa precisão se deve ao fato de que os indivíduos de cada família analisada ter sido gerada por sementes (F1) que possuem alta variabilidade genética. Para evitar que este problema se repita no futuro, recomenda-se utilizar um número maior de plantas por parcela, assim como um número maior de repetições.

5.5 Conclusão

Como conclusão deste trabalho, através da utilização de espectrometria de massas com infusão direta, foi possível detectar e identificar uma série de substâncias em extratos brutos de *M. ilicifolia*, de maneira muito rápida, sensível, seletiva, com o mínimo de preparo de amostra e o mínimo consumo de solvente.

Possivelmente estes compostos detectados, os flavonóides, o dulcitol e catequina e seus derivados, estão relacionados com as atividades biológicas da planta, assim, a metodologia desenvolvida mostrou-se promissora na avaliação do melhoramento

agrícola realizado, pois com apenas seis substancias monitoradas, foi possível verificar que duas delas são características que diferenciam as famílias, conferem herdabilidade a esta característica, assim como, promovem um ganho genético para a espécie.

Como perspectiva, um maior número de compostos pode ser identificado com a utilização da espectrometria de massas, inclusive os componentes responsáveis pela atividade antiúlcera, ampliando os ganhos em qualidade do material vegetal, além da possibilidade da utilização desta metodologia para controle de qualidade da matéria prima vegetal maneira simples e segura.

Considerações Finais

A análise de extratos e partes de plantas medicinais, via espectrometria de massas (MS) com infusão direta de amostra, *fingerprinting*, foi desenvolvida e aplicada em amostras de *A. Occidentale*, *A. Chica*, *P. Pubescens* e *M. Illicifolia*. As metodologias foram desenvolvidas visando obter o maior e melhor nível de informação sobre as características de cada amostra, sempre com mínimo preparo de amostra, e menores consumos de tempo e solvente. Estas metodologias permitiram-nos detectar as condições e as épocas adequadas para cultivo, coleta e/ou extração de produtos naturais, permitindo a obtenção de uma matéria-prima vegetal com princípios ativos padronizados, assim como auxiliar no reconhecimento e na compreensão das interações ecológicas do vegetal com seu ambiente.

Porém, mostramos a necessidade de utilizar a técnica de *fingerprinting* com critério, uma vez que os principais parâmetros de ionização em ESI podem alterar os perfis químicos em estudo. A avaliação sistemática dos parâmetros de ionização por ESI demonstrou que a técnica de *fingerprinting* é eficiente para caracterizar amostras complexas, sendo fundamental conhecer a natureza das amostras e de seus constituintes, uma vez que, os parâmetros de ionização podem afetar o *fingerprinting*, influenciando diretamente na sensibilidade e na fragmentação dos íons na fonte de ionização.

Referências Bibliográficas

1. Baldwin, M. A. (1995). Modern mass spectrometry in bio-organic analysis. *Nat. Prod. Rep.* 12, 33–44.
2. Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D. & Tyler, A. N. (1981). Fast atom bombardment of solids (FA.B.): a new ion source for mass spectrometry *Chem. Commun.* 7, 325–327.
3. Blakley, C. R., Vestel, M. L. (1983). Thermospray interface for liquid chromatography mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*. 55, 750-754.
4. Yamashita, M., Fenn, J. B. (1984). Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451-4459.
5. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. (1985). Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* 57, 675-679.
6. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Fu Wong, S., Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*. 246, 64-71.
7. Thomson, B. A., Davidson, W. R., Lovett, A. M. (1980). Applications of a versatile technique for trace analysis - Atmospheric Pressure Negative Chemical Ionization. *Environmental Health Perspectives*. 36, 77-84.
8. Robb, D. B., Covey, T. R., Bruins, A. P. (2000). Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 3653-3659.
9. Takáts, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., Cooks, R. G. (2004). Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science*. 306, 471-473.
10. Haddad, R., Sparrapan, R., Eberlin, M. N. (2006). Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2901-2905.
11. Murgu, M. *Saponinas e Glicosídeos de Sapindus saponaria: Metodologias de Análise por Espectrometria de Massas e Relação com Fungos Endofíticos*. 2002. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.
12. Ham, B. M. *Even Electron Mass Spectrometry with Biomolecule Applications*. New Jersey – USA. John Wiley & Sons, 2008. 421p.
13. de la Mora, J. F., Van Berkel, G. J., Enke, C. G., Cole, R. B., Martinez-Sanchez, M., Fenn, J. B. (2000). Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry – Discussion. *J. Mass Spectrom.* 35, 939-952.
14. Katja Dettmer, K., Aronov, P. A., Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based Metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51-78.
15. Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J. (2005). Mass Spectrometry in Metabolome Analysis. *Mass Spectrom. Rev.* 24, 613– 646.
16. Johnson, H. E., Broadhurst, D., Goodacre, R., Smith, A. R. (2003). Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry*. 62, 919–928.
17. Rodrigues, C. M., Rinaldo, D., dos Santos, L. C., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Hiruma-Lima, C. A., Souza Brito, A. R. M., Vilegas, W. (2007). Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hincornia speciosa*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1907-1914.
18. Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Bianchi, G., Kell, D. B. (2002). Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterization of olive oils. *Analyst*. 127, 1457-1462.

19. Sawaya, A. C. H. F., Tomazela, D. M., Cunha, I. B. S., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custodio, A. R., Eberlin, M. N. (2004). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*. 129, 739-744.
20. Moller, J. K. S., Catharino, R. R., Eberlin, M. N. (2005). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. *Analyst*. 130, 890-897.
21. Araujo, A. S., da Rocha, L. L., Tomazela, D. M., Sawaya, A. C. H. F., Almeida, R. R., Catharino, R. R., Eberlin, M. N. (2005). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. *Analyst*. 130, 884-889.
22. Biasoto, A. C. T., Catharino, R. R., Sanvido, G. B., Eberlin, M. N., da Silva, M. A. A. P. (2010). Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. *Food Quality and Preference*. 21, 755-762.
23. Marques, L. D., Catharino, R. R., Bruns, R. E., Eberlin, M. N. (2006). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3654-3658.
24. Ifa, D. R., Manicke, N. E., Dill, A. L., Cooks, R. G. (2008). Latent Fingerprint Chemical Imaging by Mass Spectrometry. *Science*. 321, 805.
25. Jung, Y., Lee, J., KWON, J., LEE, K., RYU, D. H., HWANG, G. (2010). Discrimination of the Geographical Origin of Beef by ¹H NMR-Based Metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10458-10466.
26. J. E. Szulejko and T. Solouki. (2002). Potential Analytical Applications of Interfacing a GC to an FT-ICR MS: Fingerprinting Complex Sample Matrixes. *Anal. Chem.* 2002, 74, 3434-3442
27. Williams, B. J., Cameron, C. J., Workman, R., Broeckling, C. D., Sumner, L. W., Smith, J.T. (2007). Amino acid profiling in plant cell cultures: An inter-laboratory comparison of CE-MS and GC-MS. *Electrophoresis*. 28, 1371-1379.
28. Chou, G., Xu, S., Liu, D., Koh, G. Y., Zhang, J., Liu, Z. (2009). Quantitative and Fingerprint Analyses of Chinese Sweet Tea Plant (*Rubus suavissimus* S. Lee). *J. Agric. Food Chem.* 57, 1076-1083.
29. Dworzanski, J. P., Dickinson, D. N., Deshpande, S. V., Snyder, A. P., Eckenrode, B. A. (2010). Discrimination and Phylogenomic Classification of *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* Strains Based on LC-MS/MS Analysis of Whole Cell Protein Digests. *Anal. Chem.* 82, 145-155.
30. Cragg, G. M., Grothaus, P. G., Newman, D. J. (2009) Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*. 109, 3012-3014.
31. Newman, D. J. (2008). Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *J. Med. Chem.* 51, 2589-2599.
32. Graham, I. A., Besser, K., Blumer, S., Branigan, C. A., Czechowski, T., Elias, L., Guterman, I., Harvey, D., Isaac, P. G., Khan, A.M., Larson, T. R., Li, Y., Pawson, T., Penfield, T., Rae, A. M., Rathbone, D. A., Reid, S., Ross, J., Smallwood, M. F., Segura, V., Townsend, T., Vyas, D., Winzer, T., Bowles, D. (2010). The Genetic Map of *Artemisia annua* L. Identifies Loci Affecting Yield of the Antimalarial Drug Artemisinin. *Science*. 327, 328-331.
33. Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*. 30, 374-381.
34. Reider, P. J., Roland, D. M. Maytansinoids. In: Brossi, A. *The Alkaloids*. Academic Press, 1984. Vol XXIII, p. 71-156.
35. Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H. (1994). Cytotoxic aromatic terpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *J. Nat. Prod.* 57, 1675-1681.
36. Itokawa, H., Shirota, O., Ikuta, H., Morita, H., Takeya, K., Tomioka, N., Itai, A. (1990). A new triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *Tetrahedron Lett.* 31, 6881-6882.

37. Itokawa, H., Shiota, O., Ichitsuka, K., Morita, H., Takeya, K. (1993). Oligo-nicotined sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. *J. Nat. Prod.* 56, 1479-1485.
38. De Souza, L. M., Cipriani, T. R., Sant'Ana, C. F., Iacomini, M. Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L. (2009). Heart-cutting two-dimensional (size exclusion x reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Chromatography A*. 1216, 99-105.
39. De Souza, L. M., Cipriani, T. R., Iacomini, M. Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L. (2008). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilifolia*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 59-67.
40. Pessuto, M. B., da Costa, I. C., de Souza, A. B., Nicoli, F. M., Palazzo, J. C., Petereit, F., Luftmann, H. (2009). Atividade de extratos de taninos condensados das folhas de *Mautenus ilicifolia* Mart ex Reiss. *Quim. Nova*. 32, 412-416.
41. Zorn, B., Garcia-Pineros, A. J., Castro, V., Murillo, R., Mora, G., Merfort, I. (2001). 3-Deoxyanthocyanindins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*. 56, 831-835.
42. Devia, B., Llabres, G., Wouters, J., Dupont, L., Escribano-Bailon, M. T., de Pascual-Teresa, S., Angenot, L., Tits, M. (2002) New 3-deoxyanthocyanindins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry Analysis*. 13,114-120.
43. Harborne, H. B. (1967). Comparative biochemistry of flavonoids. 6. Flavonoids patterns in Bignoniaceae and Gesneriaceae. *Phytochemistry*. 6, 1643-1651.
44. Takemura, O. S., Iinuma, M., Tosa, H., Miguel, O. G., Moreira, E. A., Nozawa, Y. (1995). A flavone from leaves of *Arrabiadaea chica cuprea*. *Phytochemistry*. 38, 1299-1300.
45. Braz Filho, R., Gottlieb, O. R., Assumpção, R. M. V. (1971). The isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry*. 10, 2835-2836.
46. Spindola, H. M., Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Rodrigues, R. a. F., Denny, C., Sousa, I. M. O., Tamshiro, J. Y., Foglio, M. A. (2009). Furanoditerpenoids from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *J. Brz. Chem Soc.* 20, 569-575.
47. QTOF User's Guide. Micromass UK Limited. 2000. 140p.
48. Hartmer, R., Kaplan, D. A., Gebhardt, C. R., Ledertheil, T., Brekenfeld, A. (2008). Multiple ion/ion reactions in the 3D ion trap: selective reagent anion production for ETD and PTR from a single compound. *Inter. J. Mass Spectrom.* 276, 82-90.
49. Marshall, A. G., Blakney, G. T., Beu, S. C. (2010). Petroleomics: a test bed for ultra-high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 16, 367-371.
50. Sutton, J., Richmond, T., Shi, X. (2008). Performance characteristics of an FT-MS-based workflow for label-free differential MS analysis of human plasma: standards, reproducibility, targeted feature investigation, and application to a model of controlled myocardial infarction. *Proteomics Clinical Applications*. 2, 862-881.
51. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/fticr-massspec.html>> Acessado em 08/08/2010.
52. Paula-Pessoa, P.E.F., Leite, L.A.A.S., Pimentel, C.R.M. *Cajucultura: Modernas técnicas de produção*. Fortaleza. EMBRAPA-CNPAT, 1995, 23. (Circular Técnica 1).
53. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola Municipal*. Disponível em: <<http://sidra.ibge.gov.br>> Acessado em 10/08/2010.
54. Lima, V.P.M.S. *A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil*. 2ed. Fortaleza: BNB-ETENE, 1998, n.3, 458p.

55. Barros, L.M., Crisostemo, J.R. Melhoramento gnético do cajueiro. In: *Cajucultura: Modernas técnicas de produção*. Fortaleza. EMBRAPA-CNPAT, 1995, 73.
56. Parente, J.I.G., Pessoa, P.F.A.P., Nemeckata, Y. *Diretrizes para a recuperação da cajucultura no Nordeste*. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1991, 51p. (Documento, 4).
57. Balbach, A., Boarim, D. *As frutas na medicina natural*. 1ed. Itaquaquecetuba, São Paulo. Editora Missionária, 1993, 436p.
58. Barreto, G. P. M., Souza, A. C. R., Azeredo, H. M. C., Mercadante, A. Z. (2007). Compostos bioativos da castanha de caju. *Alim. Nutr.* Araraquara. 8, 207-213.
59. Moura, C.F.H., Alves, R.E., Innecco, R., Filgueiras, H.A.C., Mosca, J. L., Pinto, S.A.A. (2001). Características físicas de pedúnculo de cajueiro para comercialização *in natura*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 23, 537.
60. Gallina Toschi, T.; Caboni, M. F.; Penazzi, G.; Lercker, G.; Capella, P. (1993) A study on cashew nut oil composition. *JAOCS*. 70, 1017-1020.
61. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Inglaterra, John Wiley & Sons. 507p. 2002.
62. Harborne, J.B., Williams, C.A., (1998). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* 15, 631-652
63. Oliveira, P.A. *Estudo da estabilidade e estabilização das antocianinas do bagaço de uva seibel 2*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 108p.
64. Mazza, G.; Miniati, E. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton. CRC Press, 379p., 1993.
65. Kong, J., Goh, N, Chia, L., Chiat, T. (2003). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol Sin.* 24, 7-21.
66. Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. L., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A., Galan-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113, 859–871.
67. Tian, Q., Giusti, M., Stoner, G. D., Schwartz, S. J. (2005). Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *J. Chromatogr. A*. 1091, 72-82.
68. Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46, 161–183.
69. Oliveira, M. C., Esperança, P., Ferreira, M. A. A. (2001). Characterisation of anthocyanidins by electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1525-1532.
70. Figueira, G. M., Ramelo, P. R., Ogasawara, D. C., Montanari Jr, I., Zucchi, I., Cavallari, M. M., Foglio, M. A. (2010). A set of microsatellite markers for *Arrabiadaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the neotropics. *American Journal of Botany*. e63–e64.
71. Kim, D. H., Kim, J. H., Bae, S. I., Seo, J. H., Oh, T. K., Lee, C. ,H. (2005). Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2541-2545.
72. Mors, W. B., Santos Filho, M. F., Monteiro, H. B. (1967) Chemoprophylactic agent in Schistosomiasis: 14,15-epoxygeraniol. *Science*. 157, 950-951.
73. Menna-Barreto, R. F. S., Laranja, G. A. T., Silva, M. C. C., Coelho M. G. P., Paes, M. C., Oliveira, M. M., de Castro, S. L. (2008). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil:

- geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol. Res.* 103,111–117.
74. Katz, N., dos Santos Filho, D., Sarti, S. J., Mendes, N. M., Rocha Filho, P. A., Araujo, N. (1993). Chemoprophylactic activity on *Schistosomiasis mansoni* of soaps containing essential oil from the fruits of *Pterodon pubescens*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 35, 183–191.
 75. Sabino, K. C., Gayer, C. R., Vaz, L. C., Santos, L. R., Felzenszwalb, I., Coelho, M. G. P. (1999). In vitro and in vivo toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. *Toxicol Lett.* 108, 27–35.
 76. Silva, M. C., Gayer, C. R., Lopes, C. S., Calixto, N. O., Reis, P. A., Passaes, C. P., Paes, M. C., Dalmau, S. R., Sabino, K. C., Todeschini, A. R., Coelho, M. G. P. (2004) Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J Pharm Pharmacol.* 56, 135–141.
 77. Coelho, L. P., Reis, P. A., de Castro, F. L., Gayer, C. R., Lopes, C. S., Silva, M. C., Sabino, K. C., Todeschini, A. R., Coelho, M. G. P. (2005). Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth seeds. *J. Ethnopharmacol.* 98,109–116.
 78. Coelho, M. G. P., Sabino, K. C., Dalmau, S. R. (2004). Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22, 213–218.
 79. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Conservação e Uso Sustentável de Plantas Medicinais e Aromáticas: Maytenus ssp., Espinheira Santa*. Brasília. 203p. 2004.
 80. Sannomiya, M., Vilegas, W., Rastrelli, L., Pizza, C. (1998). A Flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry.* 49, 237-239.
 81. Souza-Formigoni, M. L., Oliveira, M. G., Monteiro, M. G., da Silveira-Filho, N. G., Braz, S., Carlini, E. A. (1991). Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 34, 21-7.
 82. Santos-Oliveira, R., Coulaud-Cunha, S., Colaço, W. (2009). Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 19(2B), 650-659.
 83. Alonso JR. (1998). *Tratado de fitomedicina bases y farmacológicas*. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, p.828-834.
 84. Carlini, E. A., Frochtengarten, M. L. *Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (Maytenus ilicifolia)*. Brasília-Distrito Federal, p. 67-73. 1998.
 85. Mendes, B. G., Machado, M. J., Falkenberg, M. (2006). Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 568-575.
 86. De Souza, L. M., Cipriani, T. R., Serrato, R. V., Da Costa, C. E., Iacomini, M. Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L. (2009). Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A.* 1207, 101-109.
 87. Tiberti, L. A., Yariwake, J. H., Ndjoko, K., Hostettmann. (2007). Identification of flavonol in leaves of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *J. Chromatogr. B.* 846, 378-384.
 88. Strickberger, M. W. *Genetics*. 3th Edition. Macmillan Publishing Company. Nova Iorque. 1990.
 89. a) Shen, D., Wu, Q., Wang, M., Yang, Y., Lavoie, E. J., Simon, J. E. (2006). Determination of the predominant catechins in *Acacia catechu* by liquid/chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3219-3224. b) Wu, Q.; Wang, M.; Simon, J. E. (2003). Determination of proanthocyanidins in grape products by liquid chromatography/mass spectrometric detection under low collision energy. *Anal. Chem.* 75, 2440-2444.