UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para
quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de
*Copaifera langsdorffii***

Erick Vicente da Silva Motta

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para
quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de
*Copaifera langsdorffii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Erick Vicente da Silva Motta

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Motta, Erick Vicente da Silva

Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii*. Ribeirão Preto, 2014.

212 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Copaifera langsdorffii*. 2. Galoílquínico. 3. CLAE-UV-DAD.
4. Sazonalidade

Foto da capa: João Paulo Barreto de Sousa (2011)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Erick Vicente da Silva Motta

Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Eli e Maria Eugênia, por todo amor e dedicação depositados em mim e,
sobretudo, pelos valores transmitidos ao longo da minha vida,*

Aos meus irmãos, Elizângela e Edson, pelos cuidados fraternos e pela sincera amizade,

*Aos meus sobrinhos, Douglas, Aneliza e Camille, e à minha afilhada, Ana Laura, por todos
os momentos divertidos e sérios que nos tornaram tão próximos,*

*Aos meus familiares que acompanharam minha trajetória e compreenderam da melhor
maneira possível os momentos de ausência,*

Dedico a vocês essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a dádiva da vida e saúde para vivê-la e lutar pelos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela oportunidade única e todo conhecimento transmitido ao longo dessa trajetória.

Aos professores do Laboratório de Farmacognosia, pelos conselhos e ensinamentos transmitidos enquanto estagiário PAE, bem como pela disponibilidade de uso de seus equipamentos para realização de parte desse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia, Angélica, Mário e Walter, pela amizade e suporte proporcionado ao longo desses dois anos.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, e à Prof. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, pelos conselhos transmitidos durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, por realizar as análises de massas.

Ao técnico Vinicius, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, por realizar as análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, pela identificação botânica da espécie em estudo.

À amiga Juliana de Carvalho da Costa, pela estadia nos primeiros dias em Ribeirão Preto, pelas incansáveis horas de experimentos compartilhadas e pela parceria desenvolvida durante a realização do projeto de pesquisa.

Ao amigo Bruno Leite Sampaio, pela troca de conhecimentos durante os estudos fitoquímicos e pela ajuda na realização da análise estatística multivariada dos estudos sazonais.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia, Anny, Cristiane, Daniela, Danniel, Federico, Felipe, Ingrid, João Luiz, Letícia, Marcela, Marivane, Mariza, Rejane, Ricardo, Rosana, Tatiana, Tiago e Túlio, pelo convívio e troca de experiências.

À empresa Apis Flora, por proporcionar meios para realização das coletas no Sítio Beija-Flor, assim como à Juliana Canela e ao Daniel Carrão, pelo auxílio prestado nessas ocasiões.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial ao Laboratório de Farmacognosia, pela infraestrutura necessária para desenvolvimento desse trabalho e pelo acolhimento proporcionado.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial à Eleni e ao Rafael, pela ajuda durante as tramitações necessárias para realização do mestrado.

À CAPES pelos primeiros quatro meses de bolsa e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos demais meses de bolsa. Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.

“Um aspecto essencial da criatividade é não ter medo de fracassar”

Dr. Edwin Land

RESUMO

MOTTA, E V. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii*.** 2014. 212f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Copaifera langsdorffii (Fabaceae, Caesalpinioideae), conhecida popularmente como “copaíba”, “copaibeira” ou “pau d’óleo”, é uma árvore de grande porte que se encontra amplamente distribuída pelo Brasil, desde a floresta amazônica até a vegetação do cerrado. A oleorresina, constituída principalmente por sesquiterpenos e diterpenos, é utilizada na medicina popular no tratamento de desordens infecciosas e inflamatórias. Por outro lado, estudos sobre suas folhas, as quais são constituídas majoritariamente por flavonoides e derivados galoilquínicos, são escassos. Assim, foi proposto o isolamento de marcadores químicos, desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD, bem como o estudo sazonal. O extrato bruto obtido das folhas foi particionado com solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. As frações em *n*-butanol e aquosa apresentaram, majoritariamente, compostos polares, dentre os quais se destacaram os derivados galoilquínicos. Para isolamento desses compostos utilizaram-se a cromatografia de permeação em gel de *Sephadex* LH-20 e a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa. Nas análises por CLAE-UV-DAD empregou-se coluna analítica Synergi Polar-RP (100 mm x 3,0 mm, 2,5 µm) e fase móvel composta por ácido fórmico-água (0,1:99,9, solvente A) e *iso*-propanol-metanol-acetonitrila (0,5:4:6, solvente B). O gradiente de eluição foi A:B (90:10 para 85:15) em 8,33 minutos, seguido por A:B (85:15 para 64:36) até 29,17 minutos, utilizando vazão de 0,68 mL/min. Os estudos de sazonalidade foram realizados com 10 acessos de *C. langsdorffii* cultivados no Sítio Beija-Flor (Cajuru/SP). A partir da fração aquosa foram isolados e identificados 16 derivados galoilquínicos: ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico (AGQ-1), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-2), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-3), ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-4), ácido 5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-5), ácido 5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-6), ácido 5'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (AGQ-7), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-8), ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-9), ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-10), ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-11), ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-12), ácido 5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico (AGQ-13), ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-14), ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-15), ácido 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-16). Além disso, por meio das análises realizadas por CLAE-EM foi possível constatar a presença de outros 10 derivados galoilquínicos: ácido 3-*O*-galoilquínico, ácido 4-*O*-galoilquínico, ácido 5-*O*-galoilquínico, ácido 5'-*O*-metil-4-*O*-galoilquínico, ácido 5'-*O*-metil-5-*O*-galoilquínico, ácido 5'-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5'''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5',5'''-di-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5'',5'''-di-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico. O método analítico mostrou-se adequado para quantificação de nove derivados galoilquínicos (AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16) e dois flavonoides, quercitrina e afzelina, frente aos parâmetros seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão. Por meio de análise estatística multivariada dos estudos sazonais concluiu-se que os acessos apresentaram perfis químicos qualitativos e quantitativos semelhantes nas coletas isoladas e perfis quantitativos diferentes ao longo dos meses.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, galoilquínico, CLAE-UV-DAD, sazonalidade.

ABSTRACT

MOTTA, E. V. S. **Development and validation of analytical method by HPLC-UV-DAD for quantification and seasonal studies of galloylquinic compounds from *Copaifera langsdorffii* leaves.** 2014. 212p. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2014.

Copaifera langsdorffii (Fabaceae, Caesalpinioideae), popularly known as “copaíba”, “copaibeira” or “pau d’oleo”, is a large tree widely distributed in Brazil, from Amazon rainforest to savannah vegetation. Its oleoresin, composed mainly of sesquiterpenes and diterpenes, is widely used in folk medicine to treat inflammatory and infectious disorders. On the other hand, studies about its leaves, composed mainly of flavonoids and galloylquinic acid derivatives, are scarce. Therefore, it was proposed to isolate leaves major compounds, to develop and validate an analytical method by HPLC-UV-DAD, as well as to undertake seasonal studies. The crude extract of the leaves was partitioned with solvents of increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol, in sequence. Chemical profiles of *n*-butanol and aqueous fractions showed to be composed of polar compounds, especially galloylquinic acid derivatives. These compounds were isolated by gel permeation chromatography using *Sephadex* LH-20 and preparative high-performance liquid chromatography. The HPLC-UV-DAD analyses were carried out on a Synergi Polar-RP (100 x 3.0 mm, 2.5 µm) column. The mobile phase was made up of formic acid-water (0.1:99.9, solvent A), and isopropanol-methanol-acetonitrile (0.5:4:6, solvent B). The elution gradient was A:B (90:10 to 85:15) in 8.33 minutes, followed by A:B (85:15 to 64:36) up to 29.17 minutes using a flow rate of 0.68 mL/ min. The seasonal studies were performed from 10 *C. langsdorffii* accesses grown on Beija-Flor farm (Cajuru/SP). From the aqueous fraction it was isolated and identified 16 galloylquinic acid derivatives: 5'-*O*-methyl-3-*O*-galloylquinic acid (GQA-1), 5''-*O*-methyl-3,4-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-2), 5',5''-di-*O*-methyl-3,4-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-3), 3,4-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-4), 5''-*O*-methyl-3,5-di-*O*-galloylquinic acid (AGQ-5), 5'-*O*-methyl-3,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-6), 5'-*O*-methyl-3,4-di-*O*-galloylquinic acid (AGQ-7), 5',5''-di-*O*-methyl-3,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-8), 5',5''-di-*O*-methyl-4,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-9), 3,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-10), 4,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-11), 5'-*O*-methyl-4,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-12), 5''-*O*-methyl-4,5-di-*O*-galloylquinic acid (GQA-13), 3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid (GQA-14), 5''-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid (GQA-15), 5',5'',5'''-tri-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid (GQA-16). Furthermore, through HPLC-MS analysis it was identified additional 10 galloylquinic acid derivatives: 3-*O*-galloylquinic acid, 4-*O*-galloylquinic acid, 5-*O*-galloylquinic acid, 5'-*O*-methyl-4-*O*-galloylquinic acid, 5'-*O*-methyl-5-*O*-galloylquinic acid, 5'-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid, 5'''-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid, 5',5''-di-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid, 5',5'''-di-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid, 5'',5'''-di-*O*-methyl-3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid. The HPLC developed method was suitable to quantify nine galloylquinic derivatives (GQA-1, GQA-5, GQA-6, GQA-7, GQA-8, GQA-9, GQA-10, GQA-15, GQA-16) and two flavonoids, quercitrin and afzelin, related to the selectivity, linearity, sensitivity, precision and accuracy parameters. Through multivariate statistical analysis, it was possible to conclude that all ten different populations of *C. langsdorffii* cultivated displayed similar qualitative and quantitative chemical profiles among isolated months and different quantitative profiles among different months.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*, galloylquinic, HPLC-UV-DAD, seasonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Indivíduo de <i>Copaifera langsdorffii</i> localizado em frente ao Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP.	6
Figura 2.	Metabólitos secundários obtidos a partir das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	8
Figura 3.	Derivados galoilquínicos obtidos a partir das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	9
Figura 4.	Partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	15
Figura 5.	Fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente.	17
Figura 6.	Fracionamento da fração em <i>n</i> -butanol por cromatografia de filtração em gel. .	18
Figura 7.	Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.	20
Figura 8.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD do extrato bruto das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	33
Figura 9.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD da fração em <i>n</i> -butanol. ...	34
Figura 10.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD da fração aquosa.	35
Figura 11.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das fases superior/orgânica e inferior/aquosa dos sistemas de solventes (1) acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água 9:1:10 e (2) acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água 8:2:10.	39
Figura 12.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das fases superior/orgânica e inferior/aquosa dos sistemas de solventes (3) acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água 7:3:10 e (4) acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água 5:1,8:6.	40
Figura 13.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das subfrações 1, 2, 3 e 4 provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente.	43
Figura 14.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das subfrações 5, 6, 7 e 8 provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente.	44
Figura 15.	Estrutura parcial da resina <i>Sephadex</i> LH-20.	45
Figura 16.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para FB3, FB4 e FB5 provenientes do fracionamento da fração em <i>n</i> -butanol por cromatografia de filtração em gel.	46
Figura 17.	Cromatografia em camada delgada (5 x 5 cm) realizada no decorrer do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.	47
Figura 18.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para FA2, FA3, FA4, FA5, FA6 e FA7 provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração e gel.	48
Figura 19.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para as seis primeiras subfrações provenientes do sexto fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.	51
Figura 20.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para as seis últimas subfrações provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.	52

Figura 21.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-1 e AGQ-2. ...	56
Figura 22.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-3 e AGQ-4. ...	57
Figura 23.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-5 e AGQ-6. ...	58
Figura 24.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-7 e AGQ-8. ...	59
Figura 25.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-9 e AGQ-10. .	60
Figura 26.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-11 e AGQ-12.	61
Figura 27.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-13 e AGQ-14.	62
Figura 28.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-15 e AGQ-16.	63
Figura 29.	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV-DAD para AGQ-16 proveniente de FB4.	64
Figura 30.	Estrutura química de AGQ-1.	66
Figura 31.	Estrutura química de AGQ-2.	67
Figura 32.	Estrutura química de AGQ-3.	68
Figura 33.	Estrutura química de AGQ-4.	69
Figura 34.	Estrutura química de AGQ-5.	70
Figura 35.	Estrutura química de AGQ-6.	71
Figura 36.	Estrutura química de AGQ-7.	72
Figura 37.	Estrutura química de AGQ-8.	73
Figura 38.	Estrutura química de AGQ-9.	74
Figura 39.	Estrutura química de AGQ-10.	75
Figura 40.	Estrutura química de AGQ-11.	76
Figura 41.	Estrutura química de AGQ-12.	77
Figura 42.	Estrutura química de AGQ-13.	78
Figura 43.	Estrutura química de AGQ-14.	79
Figura 44.	Estrutura química de AGQ-15.	80
Figura 45.	Estrutura química de AGQ-16.	81
Figura 46.	Via do ácido chiquímico.	82
Figura 47.	Reação de esterificação para formação do ácido 3- <i>O</i> -galoilquínico.	83
Figura 48.	Conformação planar (A) e em cadeira (B) do ácido quínico.	84
Figura 49.	Mecanismo de metilação da <i>S</i> -adenosilmetionina (SAM). ..	85
Figura 50.	Constituição química da coluna Synergi Polar-RP.	87
Figura 51.	Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> utilizando acetonitrila como fase orgânica.	88

Figura 52.	Perfis cromatográficos do extrato bruto das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> utilizando misturas de solventes.....	89
Figura 53.	Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> utilizando metanol-acetonitrila 4:6 como fase orgânica.....	90
Figura 54.	Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> utilizando <i>iso</i> -propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6 como fase orgânica.....	90
Figura 55.	Cromatogramas obtidos com os métodos 1 e 2 para o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> . 1-16, derivados galoilquínicos isolados; Q, quercitrina; A, afzelina.....	95
Figura 56.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD da quercitrina e da afzelina..	99
Figura 57.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD do ácido ferúlico e da quercetina.	100
Figura 58.	Perfis cromatográficos dos padrões analíticos e do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	101
Figura 59.	Curvas analíticas para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10 e AGQ-15.	110
Figura 60.	Curvas analíticas para AGQ-16, ácido ferúlico, quercitrina, afzelina e quercetina.....	111
Figura 61.	Curvas analíticas em triplicata para estimativa dos limites de detecção e quantificação de AGQ-1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15.....	113
Figura 62.	Curvas analíticas em triplicata para estimativa dos limites de detecção e quantificação de AGQ-16, do ácido ferúlico e dos flavonoides afzelina e quercitrina.....	114
Figura 63.	Matriz das folhas <i>Copaifera langsdorffii</i> após extração em aparelho de Soxhlet.....	120
Figura 64.	Estudos de recuperação realizados com AGQ-10, AGQ-5, padrão interno ácido ferúlico, AGQ-15, AGQ-16 e padrão secundário quercetina, da esquerda para a direita.....	120
Figura 65.	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM para a mistura dos padrões.....	125
Figura 66.	Espectros de massas obtidos para AGQ-1, AGQ-2, AGQ-3, AGQ-4, AGQ-5 e AGQ-6.....	126
Figura 67.	Espectros de massas obtidos para AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-11 e AGQ-12.....	127
Figura 68.	Espectros de massas obtidos para AGQ-13, AGQ-14, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina e afzelina.	128
Figura 69.	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM para o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i>	129
Figura 70.	Espectro de massas obtido em 3,57 minutos.....	129
Figura 71.	Derivados galoilquínicos monossubstituídos metilados.	130
Figura 72.	Espectros de massas obtidos em 1,54, 2,02 e 3,57 minutos.....	130

Figura 73.	Derivados galoilquínicos monossubstituídos não metilados.....	131
Figura 74.	Espectro de massas obtido em 16,15 minutos.....	131
Figura 75.	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV-DAD para a mistura de AGQ-17 e AGQ-18.....	132
Figura 76.	Estrutura química de dois derivados galoilquínicos trissubstituídos com uma metila.....	132
Figura 77.	Espectros de massas obtidos em 18,99 e 19,75 minutos.....	133
Figura 78.	Derivados galoilquínicos trissubstituídos com duas metilas.....	133
Figura 79.	Espectros de massas obtidos em 21,45 min e 19,75 min.....	134
Figura 80.	(A) Vista superior e (B) lateral da região onde se encontram os indivíduos de <i>Copaifera langsdorffii</i> cultivados. Latitude: -21° 15' 19'', Longitude: -47° 16' 14''. (C) Exemplos dos acessos de <i>Copaifera langsdorffii</i>	135
Figura 81.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das coletas referentes ao mês de Maio/2012 para os acessos 1 a 5 de <i>Copaifera langsdorffii</i>	136
Figura 82.	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das coletas referentes ao mês de Maio/2012 para os acessos 6 a 10 de <i>Copaifera langsdorffii</i>	137
Figura 83.	Dispersão das variáveis químicas (A) e ambientais (B) dentro do ambiente em que estão inseridas. Dados obtidos através da Análise de Correspondência Destendenciada (DCA).....	142
Figura 84.	Tendência de distribuição dos dados climáticos e dos teores dos metabólitos secundários quantificados, em relação aos dois primeiros eixos da RDA..	145
Figura 85.	Tendência de distribuição dos dados climáticos, dos teores dos metabólitos secundários quantificados e dos acessos de <i>Copaifera langsdorffii</i> , em relação aos dois primeiros eixos da RDA.....	146
Figura 86.	Dados obtidos na Análise de Discriminante Canônico.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gradiente de polaridade empregado no fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel de <i>Sephadex</i> LH-20.	19
Tabela 2.	Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido.	22
Tabela 3.	Concentrações das diluições obtidas a partir da solução estoque.	24
Tabela 4.	Relação das quantidades adicionadas à matriz e concentração resultante nos diferentes grupos.	25
Tabela 5.	Parâmetros de variabilidade avaliados no ensaio de robustez.	27
Tabela 6.	Matriz dos fatores para determinação da robustez.	27
Tabela 7.	Sistemas de solventes analisados para fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente de alta velocidade.	38
Tabela 8.	Determinação do coeficiente de partição (<i>K</i>) para os compostos de interesse presentes tanto na fase superior quanto na fase inferior dos sistemas de solventes analisados.	41
Tabela 9.	Fracionamento da fração aquosa (2,0 g) por cromatografia contracorrente.	42
Tabela 10.	Fracionamento da fração em <i>n</i> -butanol (1,0 g) por cromatografia de filtração em gel.	46
Tabela 11.	Primeiro fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.	49
Tabela 12.	Demais fracionamentos da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.	50
Tabela 13.	Sexto fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel. ..	50
Tabela 14.	Gradiente de polaridade da fase móvel empregada no processo de separação dos constituintes das subfrações FA2, FA4, FA5, FA6 e FA7.	54
Tabela 15.	Procedência e quantidade obtida dos derivados galoilquínicos.	55
Tabela 16.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-1 em CD_3OD	66
Tabela 17.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-2 em CD_3OD	67
Tabela 18.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-3 em CD_3OD	68
Tabela 19.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-4 em CD_3OD	69
Tabela 20.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-5 em CD_3OD	70
Tabela 21.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-6 em CD_3OD	71
Tabela 22.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-7 em CD_3OD	72

Tabela 23.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-8 em CD_3OD	73
Tabela 24.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-9 em CD_3OD	74
Tabela 25.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-10 em CD_3OD	75
Tabela 26.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-11 em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	76
Tabela 27.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-12 em CD_3OD	77
Tabela 28.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-13 em CD_3OD	78
Tabela 29.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-14 em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	79
Tabela 30.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-15 em CD_3OD	80
Tabela 31.	Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz), ^1H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-16 em CD_3OD	81
Tabela 32.	Características esperadas para os hidrogênios do ácido quínico.....	85
Tabela 33.	Condições cromatográficas empregadas para transferência do método analítico 1 para o 2.....	95
Tabela 34.	Economia de tempo e de solvente com a transferência do método.....	96
Tabela 35.	Avaliação da seletividade do método analítico para os padrões por meio da análise do tempo de retenção (T_r), largura da base do pico (W_b), número de pratos teóricos (N), resolução (R_s) e seus respectivos coeficientes de variação CV(%).	102
Tabela 36.	Avaliação da seletividade do método analítico para o extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Copaifera langsdorffii</i> através da análise do tempo de retenção (T_r), largura da base do pico (W_b), número de pratos teóricos (N), resolução (R_s) e seus respectivos coeficientes de variação CV(%).	103
Tabela 37.	Dados obtidos para construção da curva analítica de AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8 e AGQ-9.	106
Tabela 38.	Dados obtidos para construção da curva analítica de AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina, afzelina, ácido ferúlico e quercetina.	107
Tabela 39.	Resultados da linearidade para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9 e AGQ-10.	108
Tabela 40.	Resultados da linearidade para AGQ-15, AGQ-16, quercitrina, afzelina, ácido ferúlico e quercetina.	109
Tabela 41.	Equações para quantificação dos derivados galoilquínicos e dos flavonoides.	112
Tabela 42.	Coeficientes angular (a) e linear (b) obtidos a partir das equações da reta e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os derivados galoilquínicos, ácido ferúlico e flavonoides afzelina e quercitrina.....	114

Tabela 43.	Resultados da repetibilidade para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7 e AGQ-8.....	115
Tabela 44.	Resultados da repetibilidade para AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina e afzelina.	116
Tabela 45.	Resultados da precisão intermediária para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6 e AGQ-7.	117
Tabela 46.	Resultados da precisão intermediária para AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15 e AGQ-16.....	118
Tabela 47.	Resultados da precisão intermediária para afzelina e quercitrina.	119
Tabela 48.	Resultados obtidos nos estudos de recuperação para AGQ-5, AGQ-10 e AGQ-15.....	121
Tabela 49.	Resultados obtidos nos estudos de recuperação para AGQ-16 e ácido ferúlico.	122
Tabela 50.	Dados obtidos para o padrão secundário (quercetina).....	122
Tabela 51.	Valores obtidos para robustez dos derivados galoilquínicos.....	124
Tabela 52.	Valores obtidos para robustez dos flavonoides afzelina e quercitrina.	124
Tabela 53.	Valores numéricos obtidos em função dos parâmetros de variabilidade.	125
Tabela 54.	Teores obtidos para os derivados galoilquínicos e os flavonoides no estudo de sazonalidade no período de Janeiro a Abril de 2012.....	138
Tabela 55.	Teores obtidos para os derivados galoilquínicos e os flavonoides no estudo de sazonalidade no período de Maio a Agosto de 2012.....	139
Tabela 56.	Teores obtidos para os derivados galoilquínicos e os flavonoides no estudo de sazonalidade no período de Setembro a Dezembro de 2012.....	140
Tabela 57.	Dados climáticos mensais durante o ano de 2012.....	141
Tabela 58.	Análise de Correspondência Destendenciada para medida do gradiente ambiental.....	142
Tabela 59.	Análise de Redundância Canônica para avaliação da inflação das variáveis ambientais.....	143
Tabela 60.	Análise de Redundância Canônica para avaliação da correlação químico-ambiental.....	143
Tabela 61.	Sumário do teste de Monte Carlo (999 permutações em modelo reduzido) para a Análise de Redundância Canônica.....	143
Tabela 62.	Sumário da Análise de Discriminante Canônico para as amostras analisadas..	148

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGQ	Ácido galoilquínico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ax	Axial
CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
(CD ₃) ₂ SO	Dimetilsulfóxido deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>d</i>	Duplete
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de Arranjo de Diodos / <i>Diodo Array Detector</i>
<i>dd</i>	Duplo duplete
<i>ddd</i>	Duplo duplo duplete
EM	Espectrometria de Massas
eq	Equatorial
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
GQA	<i>Galloylquinic acid</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSCCC	<i>High-Speed Counter-Current Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Razão massa carga
OMS	Organização Mundial da Saúde
®	Marca registrada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
™	<i>Trademark</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
α	Alfa
β	Beta
δ	Gama / Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 <i>Copaifera langsdorffii</i> – contexto e perspectivas	6
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Preparo do material vegetal	14
3.2 Obtenção do extrato bruto	14
3.3 Partição líquido-líquido do extrato bruto	14
3.4 Análise cromatográfica	15
3.4.1 Cromatografia em camada delgada	15
3.4.2 Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD	15
3.5 Fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente	16
3.5.1 Teste de partição líquido-líquido em proveta graduada	16
3.5.2 Cálculo do coeficiente de partição por CLAE-UV-DAD	16
3.5.3 Preparo do sistema de solventes e amostra	17
3.5.4 Separação dos constituintes por cromatografia contracorrente	17
3.6 Fracionamento da fração em <i>n</i> -butanol por cromatografia de filtração em gel	18
3.7 Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel	19
3.8 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa	20
3.9 Determinação das estruturas químicas dos compostos isolados	21
3.10 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-UV-DAD	21
3.10.1 Condições cromatográficas	21
3.10.2 Preparo da amostra	22
3.11 Validação do método analítico para quantificação dos derivados galoilquínicos	22
3.11.1 Seletividade	22
3.11.2 Linearidade	23
3.11.3 Limite de detecção e quantificação	24
3.11.4 Recuperação e Exatidão	25
3.11.5 Precisão	26
3.11.6 Robustez	26
3.12 Análises realizadas por CLAE-EM	28
3.13 Estudo sazonal dos derivados galoilquínicos	29

3.13.1 Coleta dos dados meteorológicos	30
3.13.2 Tratamento dos resultados e análise estatística.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Perfis cromatográficos do extrato bruto e frações de <i>Copaifera langsdorffii</i>	32
4.2 Fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente	36
4.3 Fracionamento por cromatografia de filtração em gel	44
4.3.1 Fração em <i>n</i> -butanol	46
4.3.2 Fração aquosa	47
4.4 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa	53
4.4.1 Fração aquosa	54
4.4.2 Fração em <i>n</i> -butanol	64
4.5 Determinação das estruturas químicas dos derivados galoilquínicos isolados	64
4.5.1 Composto proveniente de FA2	66
4.5.2 Compostos provenientes de FA4	67
4.5.3 Compostos provenientes de FA5	69
4.5.4 Compostos provenientes de FA6	75
4.5.5 Compostos provenientes de FA7	79
4.6 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-UV-DAD	86
4.6.1 Parâmetros cromatográficos	86
4.6.2 Otimização do método analítico desenvolvido	91
4.6.3 Preparo da amostra.....	96
4.7 Estimativa da pureza dos padrões analíticos	97
4.8 Validação de método analítico por CLAE-UV-DAD	101
4.8.1 Seletividade.....	101
4.8.2 Linearidade	105
4.8.3 Limite de detecção e quantificação.....	112
4.8.4 Precisão	115
4.8.4.1 Repetibilidade	115
4.8.4.2 Precisão intermediária.....	117
4.8.5 Recuperação e Exatidão.....	119
4.8.6 Robustez.....	123
4.9 Análises realizadas por CLAE-EM	125
4.10 Estudo sazonal dos derivados galoilquínicos	134
5 CONCLUSÕES	151
6 REFERÊNCIAS	154
APÊNDICES	162

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades, sendo que a utilização das mesmas para prevenção e tratamento de doenças é uma prática milenar que vem crescendo cada vez mais no mundo inteiro (YAN et al., 2013). Apesar dos grandes avanços tecnológicos obtidos nas últimas décadas, as plantas medicinais continuam sendo utilizadas e estima-se que 25-30% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são derivados de produtos obtidos a partir delas (NEWMAN e CRAGG, 2012). Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia dessas plantas contribuem de forma relevante para a divulgação de suas virtudes terapêuticas, prescritas com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo passadas de geração em geração durante os séculos. Esse tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como, por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (LOPEZ, 2006).

Nesse contexto, o Brasil é um dos países que abriga uma das maiores biodiversidades do mundo com importante fonte de recursos naturais derivados de animais, plantas e micro-organismos (OLIVEIRA et al., 2012), contando com mais de 20% do número total de espécies do planeta e com um número de espécies vegetais superior a 55 mil descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRANDÃO et al., 2006; FERRO et al., 2006). Essa rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (VEIGA JUNIOR et al., 2008), o que demonstra a importância de se conhecer cada vez mais a flora brasileira, em especial para fins terapêuticos. Dentre as diversas aplicabilidades que a biodiversidade pode proporcionar, destaca-se aqui a produção e padronização de fitoterápicos.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004, define fitoterápicos como medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes das mesmas (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes), que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas

em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase 3 (BRASIL, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 65-80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais como primeira forma de tratamento de saúde (YAN et al., 2013) ou utiliza, em alguma instância, medicamentos fitoterápicos para o tratamento ou prevenção de doenças (DAOLIO, 2006), e isso se deve ao aumento no interesse global pela medicina alternativa e pelo tratamento por plantas medicinais. Porém, muitas espécies vegetais são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, ainda existe uma grande lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas (FOGLIO et al., 2006). Além disso, um dos grandes problemas relacionados à administração de medicamentos fitoterápicos é que a maioria da população acredita que sua utilização não confere riscos à saúde por se tratar de uma terapia natural. Por essa razão sua utilização ocorre de forma indiscriminada e gera muitas vezes efeitos adversos indesejáveis (MARTINS-RAMOS et al., 2010). Sendo assim, esses fatores servem como incentivo ao estudo das plantas medicinais, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de substâncias bioativas a serem descobertas. Portanto, o contínuo estudo da composição química de matérias-primas naturais visando à proposição de novos princípios ativos é condição essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (FOGLIO et al., 2006).

A administração segura dos fitoterápicos também esbarra, assim como todo medicamento, no fator confiança. Os produtos de origem vegetal utilizados necessitam de um controle da qualidade adequado, tanto para suas matérias-primas (plantas), quanto para o produto tecnologicamente acabado (fármaco ou fitoterápico) (ONG, 2004). Este controle contribui, sem dúvida, para a garantia do tripé eficácia, segurança e qualidade, refletindo como principal resultado no binômio custo-benefício. Estes princípios são necessários ao desenvolvimento científico e tecnológico dos medicamentos fitoterápicos, pois asseguram confiabilidade para os consumidores.

A qualidade é um parâmetro muito complexo quando se trabalha com espécies vegetais. Esse é um dos maiores desafios para qualquer indústria que queira produzir um produto confiável e garantir os efeitos farmacológicos prometidos. Devido à complexidade de extratos vegetais e à sua enorme variação regional em termos de constituintes químicos, existe a necessidade de padronização de matérias-primas vegetais, através do desenvolvimento e validação de métodos analíticos específicos que quantifiquem os seus marcadores nos extratos

preparados e em outras formulações, para garantir uma melhor qualidade de um possível fitoterápico que venha a surgir (CARDELLINA, 2002; DAOLIO, 2006). Alguns desafios para o desenvolvimento de um método analítico a ser utilizado no estudo de materiais vegetais envolvem a extração dos constituintes, principalmente compostos ativos, a partir de uma matriz complexa; a falta de substâncias de referência; a variação da composição química entre lote coletado, localidade e época do ano, bem como vários outros aspectos (BLANK et al., 2007; SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

A qualidade dos medicamentos fitoterápicos pode ser alcançada através de técnicas cromatográficas que avaliam as características qualitativas e quantitativas da droga vegetal. Por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta de arranjo de diodos (CLAE-UV-DAD) demonstra com precisão e sensibilidade adequadas informações a respeito de possíveis marcadores presentes nas plantas. Outras técnicas mais sensíveis e seletivas também podem ser utilizadas, como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM) ou a espectrômetro de ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN-¹H), respectivamente. Todas essas técnicas oferecem uma caracterização da espécie vegetal do produto analisado, além de permitirem a distinção entre espécies com características morfológicas semelhantes (DRASARA e MORAVCOVA, 2004; LIU et al., 2007).

Assim, o controle da qualidade ou pesquisa de um produto envolve a avaliação e a otimização de vários parâmetros analíticos, desde o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação, sendo que estes devem ser intensivamente estudados e intrinsecamente relacionados com os metabólitos de interesse. Neste contexto, tanto a validação de um método analítico como os estudos rigorosos da segurança e qualidade são imprescindíveis para o registro de novos produtos (SHABIR, 2003).

A validação de um método desenvolvido, normalmente requerido pelas agências nacionais e internacionais, é realizada pela avaliação do desempenho analítico, o qual pode ser determinado pelos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite operacional de detecção, limite operacional de quantificação, precisão, exatidão, e robustez (RIBANI et al., 2004). Estes parâmetros de validação têm sido definidos por diferentes grupos de pesquisas (THOMPSON et al., 2002; RIBANI et al., 2007; ROZET et al., 2007), comitês e/ou agências nacionais e internacionais como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e *International Conference on Harmonization* (ICH). Cada uma dessas agências descreve de forma peculiar a aplicação de cada conceito e método experimental e, por isso, a proposição

do planejamento para a validação de método talvez seja alternativa para atingir o sucesso no desenvolvimento e validação de novos produtos. Esta proposição deve seguir algumas etapas, tais como definição do preparo analítico da amostra, escolha da melhor técnica de análise, obtenção dos padrões cromatográficos da espécie vegetal em estudo e, por fim, avaliação dos parâmetros de desempenho analítico.

A RDC nº 899, de 29 de maio de 2003, estabelece o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Segundo essa resolução, o método desenvolvido deve passar por um processo de validação por meio de estudos experimentais, para assegurar a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Para tanto, o método desenvolvido deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados às análises, para que, a partir dos resultados obtidos, seja possível verificar os teores dos princípios ativos ou dos marcadores da espécie vegetal a partir da qual é feita o fitoterápico e, dessa maneira, garantir sua qualidade mediante constância química. Outras normas também regulam a área de medicamentos fitoterápicos, como a RDC nº 48, de 16 de março de 2004, que foi revogada pela RDC nº 14, de 31 de março de 2010, com o objetivo de atualizar os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004, BRASIL, 2010a).

Outro ponto crucial nesse cenário é o Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006, o qual dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e proporciona à população brasileira o acesso seguro, bem como o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, ampliando as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais (BRASIL, 2006). Para estimular o desenvolvimento e consumo dos fitoterápicos, esse decreto ainda incentiva o cultivo, a formação técnico-científica, a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos e estabelece estratégias de comunicação para a divulgação do setor de plantas medicinais e fitoterápicos.

Sendo assim, a produção de medicamentos fitoterápicos requer o desenvolvimento e validação de métodos analíticos que ostentem o tripé segurança, eficácia e qualidade. Neste sentido, o controle da qualidade e a padronização de produtos naturais, especialmente plantas, são importantes para estudar a influência da sazonalidade, selecionar a melhor população para o cultivo, determinar a melhor época de colheita, desenvolver processos de extração e

formulação, analisar o produto final, bem como monitorar a qualidade destes produtos durante os ensaios pré-clínico e clínico (FEINBERG, 2007).

1.1 *Copaifera langsdorffii* – contexto e perspectivas

O gênero *Copaifera* (Fabaceae, Caesalpinioideae) é composto por 43 espécies, as quais estão distribuídas pela América do Sul (37 espécies, 28 espécies no Brasil), América Central (4 espécies) e África (4 espécies) (NASCIMENTO et al., 2012). No território brasileiro, as espécies mais abundantes são *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart. and *C. cearensis* Huber ex Ducke (LEANDRO et al., 2012).

Em especial, *C. langsdorffii* (Figura 1) é uma árvore de grande porte que se encontra amplamente distribuída pelo Brasil, desde a floresta amazônica até a vegetação do cerrado (SALOMÃO, 2013).

Figura 1. Indivíduo de *Copaifera langsdorffii* localizado em frente ao Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP.

Assim como outras espécies do gênero, *C. langsdorffii* é conhecida popularmente como “copaíba”, “copaibeira” ou “pau d’óleo” em alusão à oleorresina que pode ser extraída de forma sustentável do seu tronco. Tal oleorresina é um exsudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis, considerado um valioso remédio na medicina popular, pois apresenta ações anti-inflamatória e anti-infecciosa no tratamento de várias condições, tais como dores de garganta, infecções urinária e pulmonar (MARTINS-DA-SILVA et al., 2008; LEANDRO et al., 2012).

A oleorresina produzida por diferentes espécies de *Copaifera* tem sido caracterizada principalmente pela presença de sesquiterpenos, tais como α -copaeno, δ -cadineno, β -selineno, β -cariofileno e β -bisaboleno (CASCON e GILBERT, 2000; LAMEIRA et al., 2009; ZOGHBI et al., 2009a; ZOGHBI et al., 2009b), e diterpenos das classes caurano, clerodano e labdano (PINTO et al., 2000; VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002), sendo que a partir da oleorresina de *C. langsdorffii* já foram isolados e identificados, por exemplo, óxido de cariofileno, ácido caurenico, ácido copálico, ácido 3-acetoxi-copálico, ácido agático, ácido 3-hidroxicopálico (SOUSA, 2011). Estudos sobre as atividades biológicas em animais com o óleo dessa espécie apresentaram atividades protetoras de colite aguda e de danos do intestino (PAIVA et al., 2004a e 2004b). Além disso, o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para a oleoresina têm sido descritos na literatura, visando garantir a autenticidade das amostras comercializadas e diminuir os casos de adulteração (VEIGA JUNIOR et al. 1997, VASCONCELOS e GODINHO, 2002; TAPPIN et al., 2004; BIAVATTI et al., 2006; SOUSA et al., 2011).

Os principais trabalhos realizados e publicados na literatura envolvendo o estudo não só da espécie *C. langsdorffii*, assim como das demais espécies do gênero, estão relacionados à oleorresina ou à fração volátil obtida da mesma. Por outro lado, há pouquíssimos estudos relatando a composição química e atividades biológicas das folhas de *C. langsdorffii*. O conhecimento do uso do chá das folhas de *C. langsdorffii* para tratamento de cálculo renal serviu como base de estudo etnofarmacológico para nosso grupo de pesquisa, o qual vem direcionando esforços na tentativa de descobrir os princípios ativos responsáveis por tal efeito, bem como comprová-lo.

Sendo assim, estudos prévios constataram que a constituição química do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* diferia significativamente daquela observada para a oleorresina, sendo o extrato constituído principalmente por compostos polares derivados da via do ácido chiquímico, incluindo flavonoides e derivados galoilquínicos. Sousa e colaboradores (2012a) isolaram dois flavonoides majoritários, canferol-3-*O*- α -L-

raminopiranosídeo (afzelina) e quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo (quercitrina) (Figura 2), os quais foram utilizados como padrões cromatográficos no desenvolvimento e validação de método analítico para a espécie em questão. Além destes, outros compostos foram obtidos a partir do extrato (SOUSA et al., 2012b): ácido caurenoico, caurenol, ácido 2-hidroxi-*ent*-labda-7,13-dien-15-oico, ácido 2-*ent*-labda-7,13-dien-15-oico e óxido de cariofileno (Figura 2).

Figura 2. Metabólitos secundários obtidos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

Dando continuidade aos estudos fitoquímicos, Nogueira (2011) otimizou o isolamento dos flavonoides quercitrina e afzelina a partir do extrato bruto das folhas de *C. langsdorffii* por cromatografia contracorrente e também constatou a presença de derivados galoilquínicos no mesmo extrato (Figura 3).

Figura 3. Derivados galoilquínicos obtidos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

A partir dos estudos realizados por Brancalion et al. (2012) foi possível constatar que animais com urolitíase induzida tratados com extrato bruto das folhas de *C. langsdorffii* apresentavam média da massa total dos cálculos discretamente menor em comparação ao grupo controle após o período de tratamento. Além disso, a média do número e a dureza dos cálculos formados foi significativamente menor nos animais tratados.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2013) demonstraram que o extrato das folhas de *C. langsdorffii* apresenta potencial profilático na prevenção da recorrência de cálculo renal. Tais informações viabilizaram a obtenção de novos marcadores químicos para a espécie *C. langsdorffii* e geraram novas perspectivas sobre o potencial químico e biológico da espécie em questão.

Devido aos resultados obtidos, foi solicitado o registro de depósito de patente junto ao INPI: PI 04088br, “Processo de obtenção e utilização de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de copaífera no tratamento da litíase urinária em seres humanos e em animais”. Esta patente ainda precisa ser fortalecida com novas informações imprescindíveis tais como: constituintes químicos presentes no extrato ativo, métodos analíticos validados, tecnologia de obtenção da forma farmacêutica, resultados de eficácia pré-clínica para o extrato bruto, frações e substâncias isoladas, bem como os resultados dos ensaios clínicos.

Desse modo, o presente estudo objetivou contribuir para o desenvolvimento de novo fitoterápico a partir de espécie vegetal brasileira, por meio do desenvolvimento e validação de método analítico e estudos sazonais para as folhas da espécie *C. langsdorffii*, pontos mandatórios para o desenvolvimento de medicamentos, em especial, os fitoterápicos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Considerando a carência de estudos fitoquímicos e de métodos analíticos validados para as folhas de *Copaifera langsdorffii*, a qual vem sendo alvo de muitas pesquisas, os objetivos do presente trabalho foram:

2.1 Objetivo geral

- Investigar a composição química das folhas de *C. langsdorffii*, visando enriquecer e contribuir para o conhecimento da química desse gênero, por meio do fracionamento de seus extratos, isolamento e determinação estrutural de seus metabólitos secundários majoritários, especialmente os derivados galoilquínicos.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o perfil químico do extrato hidroalcoólico e das frações de *C. langsdorffii* por CLAE-UV-DAD;
- Submeter o extrato a diferentes técnicas cromatográficas, visando o isolamento dos derivados galoilquínicos para utilização como padrões analíticos;
- Desenvolver e validar método analítico por CLAE-UV-DAD para determinação dos derivados galoilquínicos presentes no extrato das folhas de *C. langsdorffii*;
- Estudar a influência da sazonalidade por meio de análises qualitativas e quantitativas do extrato hidroalcoólico das folhas coletadas mensalmente de 10 acessos de *C. langsdorffii* cultivados.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do material vegetal

Folhas e ramos de *Copaifera langsdorffii* foram coletados próximo ao Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP. A autorização de coleta junto ao SISBIO-ICMBio foi obtida em 2012, enquanto que a autorização de acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica foi solicitada ao CNPQ e teve o aval da Pró-Reitoria de pesquisa da USP em janeiro de 2014 (processo nº 010783/2013-0). As exsiccatas da espécie foram devidamente identificadas pelo Prof. Dr. Milton Groppo Junior do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP e depositadas no herbário da mesma instituição sob o número SPFR 10120. Após a coleta do material vegetal, este foi seco e estabilizado em estufa de ar quente e circulante a 40°C. Em seguida, foram retiradas as folhas dos galhos, as quais foram submetidas à moagem em moinho de facas previamente sanitizado.

3.2 Obtenção do extrato bruto

O material vegetal pulverizado (2,0 kg) foi submetido à maceração com etanol-água 7:3 (15 L). O solvente foi percolado e renovado após 48 horas e o material vegetal submetido a mais duas macerações a cada 48 horas, também intermediadas com percolação e renovação do solvente. As soluções hidroalcoólicas obtidas foram concentradas em rotaevaporador e o material resultante foi liofilizado com a finalidade de se obter o extrato bruto (754,99 g).

3.3 Partição líquido-líquido do extrato bruto

Parte do extrato bruto (100,01 g) foi ressuspensa em 1000 mL de metanol-água 6:4 e, em seguida, particionada com solventes de polaridades crescentes: diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol (4 x 500 mL), obtendo-se as respectivas frações e a fração aquosa (Figura 4). Cada fração foi concentrada em rotaevaporador, transferida para um frasco de armazenamento adequado, pesada e armazenada sob refrigeração. Além disso, a fração aquosa foi liofilizada para completa concentração.

Figura 4. Partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

3.4 Análise cromatográfica

3.4.1 Cromatografia em camada delgada

Extrato e frações de *C. langsdorffii* foram avaliados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo aplicadas alíquotas de 5 µL com auxílio de capilares de vidro em cromatoplas de sílica gel 60 F 254 (Merck) (5 cm). Estas foram eluídas com a fase móvel acetato de etila-ácido acético-ácido fórmico-água na proporção 100:11:11:27 (v:v:v:v) (WAGNER e BLADT, 1996). As cromatoplas foram reveladas em luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e, posteriormente, com solução de anisaldeído e aquecimento.

3.4.2 Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD

Os perfis cromatográficos do extrato, das frações e das subfrações foram obtidos por meio de CLAE analítica de fase reversa realizadas em cromatógrafo analítico da marca Shimadzu, com controlador do modelo SLC-10 Avp, detector de arranjo de diodos (DAD) do

modelo SPD-M10 *Avp*, duas bombas do modelo LC-10 *Avp*, injetor automático do modelo SIL-10 *Avp* e degaseificador do modelo DGU-14 A. O cromatógrafo é acoplado a um computador contendo o software *ClassVP* versão 5.02 instalado.

As análises foram realizadas em coluna analítica Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m) e pré-coluna analítica Synergi Polar-RP (4,0 x 3,0 mm, 4 μ m), ambas da marca Phenomenex[®]. O seguinte sistema de solventes foi escolhido para compor a fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. O gradiente de polaridade da fase móvel utilizada foi 15-50% de B em 45 minutos, 50-100% de B até 48 minutos, 100% de B até 52 minutos, 100-15% de B até 55 minutos e 15% de B até 60 minutos.

As amostras foram solubilizadas na fase móvel inicial da análise cromatográfica na concentração de 1 mg/mL, seguidas de filtração em membranas com poros de 0,45 μ m, sendo que 20 μ L de cada solução foram injetados no cromatógrafo. A detecção ocorreu na faixa de 210 a 400 nm e os cromatogramas foram registrados no comprimento de onda de 280 nm. Vazão de 1 mL/min.

3.5 Fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente

3.5.1 Teste de partição líquido-líquido em proveta graduada

Em proveta graduada de 10 mL, foram adicionados cerca de 1 mg da fração aquosa mais 4 mL do sistema de solventes em equilíbrio. Em seguida, foi realizada agitação manual e os sistemas que apresentaram tempo de separação de fases inferior a 30 segundos foram analisados por CCD. Volumes iguais (5 μ L) de ambas as fases foram aplicados em placa de CCD. As placas foram eluídas e após revelação com solução de anisaldeído e aquecimento, as bandas cromatográficas presentes nas fases superior/orgânica e inferior/aquosa foram observadas. Os sistemas de solventes promissores foram selecionados para análise por CLAE-UV-DAD.

3.5.2 Cálculo do coeficiente de partição por CLAE-UV-DAD

Em proveta graduada de 10 mL foram adicionados 10 mg da fração aquosa mais 10 mL do sistema de solventes selecionado, seguido de agitação manual. Após decantação das fases, estas foram separadas em funil de separação e os solventes foram evaporados com auxílio do concentrador a vácuo *Speed Vac* (Thermo Savant[®]). 1 mg de cada fase foi ressuspensionado em 1 mL da fase móvel inicial do método analítico. O coeficiente de partição (*K*) foi calculado pela razão entre a área do pico da substância na fase superior e inferior.

3.5.3 Preparo do sistema de solventes e amostra

O sistema de solventes selecionado para a separação da fração aquosa por cromatografia contracorrente de alta velocidade foi preparado nas proporções definidas, transferido para funil de separação e deixado em repouso de um dia para o outro para atingir o equilíbrio. As fases, superior e inferior, foram separadas e degaseificadas em aparelho de ultrassom por 10 minutos. A amostra (2,0 g) foi solubilizada em 8 mL da mistura 1:1 das fases superior e inferior do sistema de solventes.

3.5.4 Separação dos constituintes por cromatografia contracorrente

A cromatografia contracorrente de alta velocidade foi realizada em equipamento com duas bobinas, cada uma contendo duas colunas em politetrafluoretileno – PTFE (Bobina 1: coluna A: 208 mL, d.i. 3,2 mm e coluna B: 29 mL, d.i. 1,0 mm; Bobina 2: coluna C: 102 mL, d.i. 2,0 mm e coluna D: 105 mL, d.i. 2,0 mm), modelo Quatro CCCTM MK 5 & MK 6 (AECS-QuikPrepTM Ltd., Reino Unido) (Figura 5). As separações foram realizadas utilizando as colunas C e D, conectadas entre si no sentido cauda-cabeça (modo de eluição normal). Desse modo, a fase inferior/aquosa foi considerada como fase estacionária e a fase superior/orgânica, como fase móvel. Os sistemas de solventes utilizados foram bombeados por bomba de fluxo contínuo (*SSI Series II HPLC Pump*). A alça do injetor de 10 mL foi utilizada para introdução da amostra no sistema cromatográfico. A velocidade de rotação foi de 850 rpm e temperatura ajustada em 35°C (com variação máxima até 40°C).

Figura 5. Fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente. **A.** Bomba de fluxo contínuo; **B.** Capela de exaustão contendo suporte para injeção da amostra, frascos com fases móvel e estacionária e tubos de ensaio para coleta; **C.** Cromatógrafo contracorrente de alta velocidade; **D.** Interior do cromatógrafo onde se encontram as colunas.

O sistema de solventes utilizado foi acetato de etila-*iso*-butanol-água na proporção 5:1,8:6, eluição em modo normal, vazão de 2 mL/min, rotação em 850 rpm e coleta de

volumes de 10 mL em tubos de ensaio. A fase móvel foi bombeada até não haver mais saída de fase estacionária das colunas. A retenção da fase estacionária foi calculada e, em seguida, a amostra foi injetada. A vazão de 2 mL/min foi utilizada até o tubo de ensaio 50 e a partir do tubo de ensaio 51 foi alterada para 3 mL/min. Foram coletados 50 volumes com o aparelho em rotação e 20 volumes com a rotação desligada (*wash off*). Os volumes coletados foram reunidos de acordo com semelhança cromatográfica por CCD. As subfrações foram concentradas, pesadas e os respectivos rendimentos foram calculados. Por fim, foram analisadas por CLAE-UV-DAD.

3.6 Fracionamento da fração em *n*-butanol por cromatografia de filtração em gel

A cromatografia de filtração em gel foi efetuada em coluna de vidro de 4 cm d.i. x 35 cm, utilizando gel de *Sephadex* LH-20 (25-100 μ m Sigma-Aldrich[®]) (25,0 g) como fase estacionária e metanol como fase móvel. A fração em *n*-butanol (1,0 g) foi ressuspensa em 5 mL de metanol e, em seguida, centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. A amostra foi então aplicada no topo da coluna para iniciar o processo cromatográfico (Figura 6).

Figura 6. Fracionamento da fração em *n*-butanol por cromatografia de filtração em gel. **A.** Coluna cromatográfica estabilizada com metanol; **B.** Adição da amostra; **C-G.** Momentos distintos do processo de separação da amostra enquanto passa pela coluna cromatográfica.

3.7 Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel

A cromatografia de filtração em gel para a fração aquosa foi efetuada na mesma coluna descrita no item 3.6. Entretanto, foi utilizado como fase móvel metanol-água em gradiente (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente de polaridade empregado no fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel de *Sephadex* LH-20.

Fase móvel	Volume (mL)
Metanol-água 1:9	300
Metanol-água 2:8	100
Metanol-água 3:7	100
Metanol-água 4:6	300
Metanol-água 5:5	300
Metanol-água 6:4	200
Metanol-água 7:3	200
Metanol-água 8:2	100
Metanol	300

A fração aquosa (1,5 g) foi ressuspensa em 10 mL da fase móvel inicial e, em seguida, centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O precipitado (0,277 g) foi guardado e o sobrenadante (1,223 g) foi filtrado em algodão e aplicado no topo da coluna cromatográfica, previamente estabilizada com a fase móvel inicial (Figura 7). Os cálculos de rendimento foram realizados com base na massa de amostra presente no sobrenadante.

As amostras foram coletadas em tubos de ensaio de 20 mL, sendo necessários 100 tubos. Cada tubo de ensaio teve seu conteúdo analisado por CCD para reunir aqueles com perfil químico semelhante. Foram obtidas oito subfrações, as quais foram concentradas e pesadas para o cálculo do rendimento. Em seguida, as subfrações de interesse tiveram seus perfis químicos analisados por CLAE-UV-DAD.

O procedimento cromatográfico descrito anteriormente foi realizado mais cinco vezes, no intuito de se obterem maiores quantidades das frações de interesse. De forma semelhante, cada processo levou à obtenção de oito subfrações, as quais foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD, concentradas e pesadas para o cálculo do rendimento.

Figura 7. Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel. **A.** Coluna cromatográfica estabilizada com fase móvel inicial; **B.** Adição da amostra; **C-I.** Momentos distintos do processo de separação da amostra no decorrer da mudança de gradiente da fase móvel.

3.8 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa

Análises cromatográficas por CLAE-UV-DAD possibilitaram a seleção das frações que continham os derivados galoilquínicos. Logo, estas frações foram submetidas à CLAE semipreparativa para isolamento.

Foi utilizado cromatógrafo preparativo Shimadzu, modelo Proeminence, com controlador do modelo CBM-20A, detector UV/Visível do modelo SPD-20A, duas bombas do modelo LC-6AD, coletor automático do modelo FCR-10A e degaseificador do modelo DGU-20A5. O cromatógrafo é acoplado a um computador contendo o software *LC-Solution Single* instalado.

A CLAE semipreparativa foi realizada em coluna semipreparativa Synergi Polar-RP (250 x 10 mm, 4 μ m) e pré-coluna semipreparativa Polar-RP (10 x 10 mm, 4 μ m), ambas da marca Phenomenex[®]. Quantidades de 5 a 10 mg das amostras foram solubilizadas em 300 μ L de metanol-água 0,15:0,85, filtradas em membranas com poros de 0,45 μ m e, em seguida, injetadas no cromatógrafo. Os cromatogramas foram registrados em 280 nm. Para compor a fase móvel, foram utilizados (A) ácido-fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. O gradiente de polaridade da fase móvel variou conforme a fração purificada. Vazão de 4,7 mL/min.

O solvente das amostras contendo as substâncias isoladas foi evaporado com auxílio do aparelho *Speed Vac*. As substâncias isoladas por CLAE semipreparativa foram analisadas por CLAE-UV-DAD em coluna analítica Polar-RP, como descrito no item 3.4.2. A estimativa da pureza dos picos foi avaliada através dos espectros no UV e dos espectros obtidos por RMN.

3.9 Determinação das estruturas químicas dos compostos isolados

As estruturas químicas dos derivados galoilquínicos isolados foram determinadas por meio das análises de RMN Unidimensional de ^1H e de ^{13}C e Bidimensional (HSQC e HMBC) realizadas no Departamento de Química da FFCLRP-USP. Os espectros obtidos foram registrados em espectrômetro Brucker–Avance DRX₅₀₀, operando em 500 MHz (RMN de ^1H e HMBC), 400 MHz (HSQC) e 125 MHz (RMN de ^{13}C e DEPT-135). As amostras foram preparadas em CD_3OD ou $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

3.10 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-UV-DAD

3.10.1 Condições cromatográficas

Para o desenvolvimento do método analítico foi utilizado cromatógrafo da marca Waters, com sistema de bombas binário do modelo 1525, injetor automático do modelo 2707, detector de arranjo de diodos do modelo 2998 e controlador de temperatura. O sistema é acoplado a um computador contendo o software *Empower 3*.

O método 1 foi desenvolvido em coluna analítica Synergi Polar-RP com 150 mm de altura por 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho das partículas de 4 μm . O sistema de solventes escolhido para compor a fase móvel foi (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6 no modo de eluição em gradiente (Tabela 2) e vazão de 1 mL/min.

Visando reduzir o tempo das análises cromatográficas desenvolveu-se o método 2, o qual corresponde à transferência do método 1 para coluna analítica Synergi Polar-RP com 100 mm de altura por 3,0 mm de diâmetro interno e tamanho das partículas de 2,5 μm . O gradiente de eluição utilizado foi o mesmo do método 1, alterando-se o tempo de cada segmento do gradiente (Tabela 2). A vazão foi reduzida para 0,68 mL/min e a temperatura foi mantida a 25°C.

Tabela 2. Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido.

Tempo (minutos)			
Método analítico 1 Coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm)	Método analítico 2 Coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm)	A (%)	B (%)
0	0	90	10
20	08,33	85	15
70	29,17	64	36
75	31,25	0	100
80	33,33	0	100
85	35,42	90	10
90	37,50	90	10

(A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) iso-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6

3.10.2 Preparo da amostra

Foram pesados 100 mg do pó das folhas de *Copaifera langsdorffii*, com o tamanho das partículas previamente uniformizado em Tamis com malha de 45 mesh, os quais foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 125 mL com tampa. Em seguida, foram adicionados 20 mL do solvente de extração, composto de solução do padrão interno, ácido ferúlico, a 40 µg/mL em etanol 70%. A extração foi realizada em agitador mecânico do tipo Shaker durante 1 hora, na temperatura de 30°C e sob agitação a 120 rpm.

Após a extração, o extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e alíquota de 1 mL foi transferida para microtubo, a qual foi particionada com 500 µL de hexano (*clean-up*). A fase inferior/aquosa foi filtrada em membrana com poros de 0,45 µm e analisada por CLAE-UV-DAD.

3.11 Validação do método analítico para quantificação dos derivados galoilquínicos

3.11.1 Seletividade

A seletividade do método analítico desenvolvido foi determinada por meio da comparação do perfil cromatográfico dos padrões analíticos e do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*. Desse modo, foram preparadas duas amostras distintas no solvente de extração, uma contendo os padrões dos derivados galoilquínicos e de dois flavonoides (quercitrina e afzelina) e outra contendo o pó das folhas de *C. langsdorffii*, sendo que essa última foi extraída conforme item 3.10.2.

Para a verificação do desempenho analítico avaliaram-se a separação dos derivados galoilquínicos através do tempo de retenção, largura da base do pico, número de pratos teóricos (Equação 1) e resolução (Equação 2) (COLLINS et al., 2005).

$$N = 16 \times (T_r / W_b)^2 \quad (\text{Equação 1})$$

$$R_s = 2 \times (T_{r2} - T_{r1}) / (W_{b1} + W_{b2}) \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

N = número de pratos teóricos;

T_r = tempo de retenção;

W_b = largura da base;

R_s = resolução;

3.11.2 Linearidade

Para determinação da linearidade foram elaboradas curvas analíticas a partir de uma solução estoque contendo os padrões dos derivados galoilquínicos, dos flavonoides quercitrina e afzelina e o padrão interno ácido ferúlico.

Para o preparo da solução estoque, foram pesados:

- 1,6 mg de AGQ-1;
- 2,0 mg de AGQ-3, AGQ-6, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-13 e afzelina;
- 2,1 mg de AGQ-2, AGQ-4, AGQ-7, AGQ-12, AGQ-14 e AGQ-15;
- 2,2 mg de AGQ-5, AGQ-8, AGQ-11, AGQ-16, ácido ferúlico e quercitrina.

As amostras foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e solubilizadas em metanol. Após completar o volume do balão volumétrico, obteve-se a solução estoque, a partir da qual foram obtidas as demais soluções de referência. O mesmo procedimento foi realizado para construção da curva analítica do padrão secundário quercetina. As concentrações obtidas para cada padrão encontram-se na Tabela 3.

As soluções padrão preparadas foram analisadas em triplicata por CLAE-UV-DAD segundo o método descrito no item 3.10.1. A partir das áreas correspondentes a cada ponto, foram construídas as respectivas curvas analíticas.

A linearidade para cada composto foi determinada através de seu coeficiente de determinação (R^2). Além disso, com auxílio do *software* MINITAB 14, foram obtidos os valores de F calculado para a regressão e o parâmetro *Lack of fit* (falta de ajuste), os quais foram comparados com seus respectivos F tabelado e avaliados quanto à sua significância.

Tabela 3. Concentrações das diluições obtidas a partir da solução estoque.

Concentração (µg/mL)			
Derivado galoilquínico 1	Derivados galoilquínicos 3, 6, 9, 10 e 13 e afzelina	Derivados galoilquínicos 2, 4, 7, 12, 14 e 15 e quercetina	Derivados galoilquínicos 5, 8, 11 e 16, ácido ferúlico e quercitrina
80,00	100,00	105,00	110,00
60,00	75,00	78,75	82,50
40,00	50,00	52,50	55,00
30,00	37,50	39,38	41,25
20,00	25,00	26,25	27,50
15,00	18,75	19,69	20,63
10,00	12,50	13,13	13,75
7,50	9,38	9,84	10,31
5,00	6,25	6,56	6,88
3,75	4,69	4,92	5,16
2,50	3,13	3,28	3,44
1,88	2,34	2,46	2,58

A regressão linear obtida foi utilizada para dedução das fórmulas de quantificação dos padrões analíticos, relacionando as áreas do analito, do padrão interno e suas regressões lineares (Equações 3 e 4).

$$A_{pa} / A_{pi} = E_{pa} / E_{pi} \quad (\text{Equação 3})$$

$$A_{pi} / A_{ps} = E_{pi} / E_{ps} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

A = área sob a curva;

E = equação da reta;

pa = padrão analítico;

pi = padrão interno;

ps = padrão secundário.

3.11.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados baseando-se em parâmetros das curvas analíticas, as quais foram elaboradas em concentrações próximas ao limite de detecção. Assim, foram utilizados os seis últimos pontos de cada curva analítica (Tabela 3). As equações das curvas analíticas para cada replicata foram elaboradas a partir dos dados obtidos em triplicata desses pontos. Os valores de LD e LQ foram calculados segundo as Equações 5 e 6 (RIBANI et al., 2004).

$$LD = 3,3 \times s / S \quad (\text{Equação 5})$$

$$LQ = 10 \times s / S \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

s = desvio padrão do coeficiente linear;

S = coeficiente angular da curva analítica.

3.11.4 Recuperação e Exatidão

A exatidão do método analítico foi determinada por meio da recuperação dos derivados galoilquínicos em matriz exaurida. Desse modo, a droga vegetal exaurida foi fortificada com quatro derivados galoilquínicos (AGQ-5, AGQ-10, AGQ-15 e AGQ-16) em três níveis de concentrações diferentes (baixa, média e alta) e em quadruplicata. A matriz fortificada foi submetida às mesmas condições de extração e análise relatadas no item 3.10.

Para exaustão da matriz, 10 g das folhas de *Copaifera langsdorffii* foram trituradas e o tamanho das partículas foi uniformizado em Tamis com malha de 45 *mesh*. Em seguida, o pó vegetal foi submetido à extração em aparelho de Soxhlet por aproximadamente 30 horas, empregando-se etanol como solvente extrator. A exaustão da matriz foi confirmada pela extração e análise segundo item 3.10.

Uma solução estoque contendo 0,988 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,106 mg/mL de AGQ-5, AGQ-10, AGQ-15 e AGQ-16, respectivamente, foi preparada e reservada. Alíquotas de 100 mg do pó vegetal exaurido foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL. A cada grupo foram adicionados os respectivos volumes de solução estoque conforme Tabela 4.

Tabela 4. Relação das quantidades adicionadas à matriz e concentração resultante nos diferentes grupos.

Nível	Volume da solução estoque (mL)	Concentração final dos derivados galoilquínicos (µg/mL)			
		5	10	15	16
Baixo	0,3	14,82	15,0	15,0	16,59
Médio	0,6	29,64	30,0	30,0	33,18
Alto	1,2	59,28	60,0	60,0	66,36

Após adição das soluções padrão, as amostras foram secas ao ar livre. Em seguida, os materiais enriquecidos foram submetidos à extração, conforme item 3.10.2. O material

resultante foi filtrado. Para corrigir a variação do padrão interno, a quercetina foi utilizada como padrão secundário. Para tanto, foram transferidos 5 mL de cada replicata para tubos com tampa contendo 1 mL de solução de quercetina a 368 µg/mL. Após homogeneização das amostras, estas foram submetidas à análise segundo item 3.10.1.

A porcentagem de recuperação e a exatidão do método analítico foram calculadas segundo as Equação 7 e 8, respectivamente (RIBANI, et al., 2004).

$$\text{Recuperação} = (\text{valor teórico} - \text{valor obtido}) / \text{valor teórico} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{Exatidão} = 100 - \text{Recuperação} \quad (\text{Equação 8})$$

3.11.5 Precisão

A precisão foi determinada por meio do preparo do extrato vegetal conforme condições definidas no item 3.10. Para avaliar a repetibilidade do método foram preparados seis extratos. As amostras foram submetidas à análise em CLAE-UV-DAD em triplicata.

Para a precisão intermediária, optou-se por duas variáveis: tempo em dias e analistas diferentes. Dessa forma, no primeiro dia, foram produzidos quatro extratos e estes foram analisados em triplicata. No segundo dia, mais quatro extratos foram preparados e analisados, porém, por outro analista, a doutoranda Juliana de Carvalho da Costa.

Os dados obtidos para os dois níveis de precisão foram expressos em função do coeficiente de variação CV(%), segundo a Equação 9 (RIBANI et al., 2004).

$$CV (\%) = s / X_m \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Em que:

s = desvio padrão;

X_m = média dos valores obtidos.

3.11.6 Robustez

A robustez do método analítico foi determinada por meio do planejamento de *Youden* conforme descrito pelo INMETRO (BRASIL, 2007), utilizando-se a droga vegetal seca e tamisada. Para o delineamento do experimento foram selecionados os parâmetros de variabilidade conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de variabilidade avaliados no ensaio de robustez.

Código	Fator	Nominal	Variação
A ou a	Tempo de extração	1 hora	45 min
B ou b	Tamanho da amostra	100 mg	90 mg
C ou c	Tamanho da partícula	42 <i>mesh</i>	32 <i>mesh</i>
D ou d	Temperatura de extração	30°C	40°C
E ou e	Agitação de extração	120 rpm	150 rpm
F ou f	Volume de extração	20 mL	20,5 mL

Aplicando-se as combinações conforme a matriz têm-se os experimentos descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Matriz dos fatores para determinação da robustez.

Código	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Desse modo, os experimentos realizados apresentaram as seguintes combinações:

s: nenhuma variação;

t: tamanho da partícula, agitação e volume do solvente de extração;

u: tamanho da amostra, temperatura de extração e volume de extração;

v: tamanho da amostra, tamanho da partícula, temperatura de extração e agitação;

w: tempo de extração, temperatura de extração e agitação;

x: tempo de extração, tamanho da partícula, temperatura de extração e volume de extração;

y: tempo de extração, tamanho da amostra, agitação e volume de extração;

z: tempo de extração, tamanho da amostra e tamanho da partícula.

Para determinação da influência de um fator foram encontrados os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e às minúsculas e compararam-se as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de C, referente a variações no tamanho da partícula, o cálculo do fator de C/c foi feito conforme a Equação 10 (BRASIL, 2007).

$$\text{Efeito C/c} = [(s + u + w + y) / 4] - [(t + v + x + z)/4] \quad (\text{Equação 10})$$

Após o desenvolvimento do protocolo elaborado e análise crítica e ordenada dos resultados obtidos, puderam-se avaliar quais foram os parâmetros críticos do método, ou seja, aqueles que deveriam ser adequadamente controlados para melhor desempenho do método analítico. A interpretação do teste foi realizada através da comparação do valor obtido a partir da Equação 10 com o valor resultante da Equação 11 (BEDREGAL et al., 2008).

$$\text{Valor de referência} = s\sqrt{2} \quad (\text{Equação 11})$$

Em que:

s = desvio padrão dos resultados obtidos a partir do teste de Youden.

O valor encontrado na Equação 10 deve ser menor que o valor determinado na Equação 11 para que o efeito seja interpretado como não significativo (BEDREGAL et al., 2008).

3.12 Análises realizadas por CLAE-EM

Foram realizadas análises por CLAE-EM do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii* e da mistura dos derivados galoilquínicos isolados para confirmação da massa molecular dos mesmos e identificação dos demais derivados galoilquínicos presentes nas folhas da espécie em questão.

As análises foram realizadas no sistema H-Class UPLC ACQUITY Waters acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo[®] TQ-S com uma fonte Z-spray operando no modo negativo, empregando-se os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, -3.2 kV; voltagem do cone, -40 V; temperatura da fonte Z-spray, 150°C; temperatura de dessolvatação (N₂), 350°C; vazão do gás de dessolvatação (N₂), 500 L/h; vazão do gás de colisão (Ar), 0.15 mL/min.

Utilizou-se como fase estacionária a coluna analítica Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm) da marca Phenomenex[®], e como fase móvel (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6 no modo de eluição em gradiente, com duração das análises de 37,5 minutos, volume de injeção de 5 µL e vazão de 0,5 mL/min.

3.13 Estudo sazonal dos derivados galoilquínicos

Em parceria com a empresa Apis Flora[®], sementes de *C. langsdorffii* foram coletadas manualmente entre julho e agosto de 2008 nas seguintes regiões: Fazenda João Alvino, São Roque de Minas, MG – *Acesso 1*; Sementes Lorenzo, Sacramento, MG – *Acesso 2*; Parque Estadual do Morro do Diabo, Teodoro Sampaio, SP – *Acesso 3*; Rodovia Candido Portinari, Rifaina, SP – *Acesso 4*; Região de Sobradinho, MG – *Acessos 5 e 6*; Área urbana de São Roque de Minas, MG – *Acesso 7*; Fazenda Campo Formoso distante 19 km de São Roque de Minas, MG – *Acesso 8*; Sítio Plantas Medicinais, Franca, SP – *Acesso 9*; Sítio Arnaldo, Sacramento, MG – *Acesso 10*.

Entre outubro e dezembro de 2008, as sementes foram germinadas e, em 2009, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos quando estavam com cerca de 3 a 11 cm de altura com uma mistura de adubo orgânico e terra, evitando que as raízes fossem danificadas. As mesmas foram levadas para o viveiro onde foram regadas diariamente. Ao atingirem aproximadamente 12 a 20 cm de altura, foram conduzidas para uma área destinada a reflorestamento no Sítio Beija-Flor, situado na cidade de Cajuru/SP. Foram produzidas 500 mudas para o plantio definitivo, sendo 50 para cada acesso. As mudas de *C. langsdorffii* foram plantadas no campo com espaçamento de 4,0 m × 4,0 m (*Embrapa Florestas*), obedecendo a distribuição de acordo com a origem de cada muda.

Para o estudo em questão foram selecionados e identificados 20 indivíduos de cada acesso, dos quais, mensalmente, foram coletados quatro folíolos, aleatoriamente. A coleta foi feita durante 12 meses (01/2012 a 12/2012). As amostras coletadas foram secas em estufa de ar circulante a 40°C e armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

Após o desenvolvimento e a validação do método analítico, as amostras coletadas foram retiradas do refrigerador, trituradas e o tamanho das partículas foi uniformizado em Tamis com malha de 45 *mesh*. Em seguida, 100 mg de cada amostra foram pesados e submetidos às mesmas condições de extração e análise relatadas no item 3.10. As análises qualitativas dos extratos hidroalcoólicos obtidos foram realizadas com base nos perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD. Para tanto, os perfis cromatográficos das amostras foram comparados com os perfis dos padrões. A quantificação dos principais compostos foi realizada por meio de curvas analíticas, as quais foram elaboradas com os devidos padrões. Além disso, para minimizar eventuais erros de quantificação foi utilizada padronização interna.

3.13.1 Coleta dos dados meteorológicos

Os dados referentes a índice de radiação, temperatura e umidade médios, bem como precipitação acumulada das estações automáticas de coleta de dados climáticos de Casa Branca/SP e Pradópolis/SP, referentes ao período de Janeiro a Dezembro de 2012, foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia, INMET (<http://www.inmet.gov.br>) através do seu Sistema de Informações Hidro-Meteorológicas.

3.13.2 Tratamento dos resultados e análise estatística

Os dados obtidos experimentalmente passaram por pré-tratamento antes da análise estatística multivariada. As variáveis químico-orgânicas (metabólitos secundários) e uma variável ambiental (umidade relativa), por terem seus valores expressos em porcentagem, foram transformadas pelo $\arcseno(x/100)^{1/2}$, enquanto que as demais variáveis ambientais (temperatura, índice de radiação e precipitação) foram transformadas pelo $\log_{10}(x+1)$.

Os programas estatísticos utilizados foram o Canoco for Windows Version 4.5 em associação com o CanoDraw for Windows 4.1 e o SYSTAT 12.

A Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) foi utilizada para estabelecer a medida do gradiente ambiental. A Análise de Redundância Canônica (RDA) foi utilizada para avaliação da inflação da variável e da correlação metabólitos *versus* ambiente, e posteriormente utilizada para selecionar as variáveis ambientais relevantes.

A Análise de Discriminante Canônico (CDA) foi utilizada para propor a classificação de grupos, e o percentual de classificação correto foi determinado pelo teste de Jackknifed.

A significância para a Análise de Redundância Canônica foi determinada pelo teste de Monte Carlo (com 999 permutações sob modelo reduzido). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfis cromatográficos do extrato bruto e frações de *Copaifera langsdorffii*

O processo de extração empregado para a obtenção do extrato hidroacoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* resultou em 754,99 g do mesmo, o que representa 37,75% de rendimento. De acordo com estudos prévios realizados no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, o extrato obtido é constituído majoritariamente por substâncias de média a alta polaridade, dentre as quais se encontram os compostos de interesse do presente trabalho, os derivados galoilquínicos, além de flavonoides como quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina). Sabendo-se dessa característica, o extrato bruto foi submetido ao processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, o que possibilitou a obtenção de frações mais polares e, conseqüentemente, mais ricas nos derivados galoilquínicos. A partir de 100,01 g do extrato bruto foram obtidos 16,11% da fração em *n*-butanol e 44,84% da fração aquosa, as quais foram submetidas aos processos cromatográficos de isolamento.

Através dos cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD para o extrato e as frações de interesse (Figuras 8-10) foi possível visualizar a complexidade do perfil metabólico das folhas da espécie *C. langsdorffii* e sugerir a presença dos derivados galoilquínicos nas frações em *n*-butanol e aquosa, baseando-se nos espectros de absorção no ultravioleta obtidos. Tian et al. (2000) e Yang et al. (2008) demonstraram em seus trabalhos que o ácido gálico apresenta absorção significativa no ultravioleta em 254 nm e 280 nm. Uma vez que os derivados galoilquínicos apresentam pelo menos uma unidade galoil em sua estrutura química, tal característica foi levada em consideração na determinação das frações e subfrações que continham os compostos de interesse.

Figura 8. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii*. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. Espectro de varredura (200 a 400 nm). Vazão: 1 mL/min.

Figura 9. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD da fração em *n*-butanol. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. Espectro de varredura (200 a 400 nm). Vazão: 1 mL/min.

Figura 10. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD da fração aquosa. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimentos de onda: 254, 280 e 360 nm. Espectro de varredura (200 a 400 nm). Vazão: 1 mL/min.

4.2 Fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente

A cromatografia contracorrente é um processo de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida é retida no aparelho sem a utilização de suporte sólido. O princípio da separação da amostra envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo que a proporção relativa de soluto que passa para cada fase é determinada pelo seu respectivo coeficiente de partição (MARSTON e HOSTETTMANN, 2006). Esta técnica é amplamente utilizada na separação de produtos naturais de média a alta polaridade, pois, devido à ausência de suporte sólido, evita problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes, assim como permite a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificações, a recuperação total da mesma e, também, um baixo consumo de solventes (LEITE et al., 2005).

A escolha do sistema de solventes para compor as fases móvel e estacionária da cromatografia contracorrente é um fator determinante para o sucesso da separação. Esta etapa pode representar até 90% do tempo gasto em um experimento realizado em cromatografia contracorrente (PAULI et al., 2008). Dados da literatura sugerem algumas alternativas para se iniciar a escolha do sistema de solventes apropriado à amostra a ser utilizada, tais como artigos que relatem o isolamento de substâncias similares (ITO, 2005; SEGER et al., 2006). Alternativa pouco descrita se fundamenta na solubilidade da amostra e na imiscibilidade dos solventes. Os solventes em que a amostra seja mais solúvel devem estar preferencialmente em cada fase do sistema bifásico e os solventes que não solubilizam a amostra geralmente são adicionados ou como agentes de seletividade das fases do sistema ou como agentes que proporcionarão imiscibilidade ao sistema, caso os solventes que melhor solubilizem a amostra sejam miscíveis. Os agentes de seletividade têm suas proporções modificadas para “empurrar” ou “puxar” a amostra ou compostos de interesse de uma fase para outra dependendo do modo (normal ou reverso) de separação desejado (BROWN, 2010). Na separação de extratos de produtos naturais, esta concepção pode ser uma excelente alternativa, pois o sistema de solventes será obtido levando em conta as particularidades da amostra (solubilidade, presença de compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, presença de agentes emulsificantes, dentre outras) e objetivando a separação dos compostos de interesse.

Desse modo, os primeiros critérios utilizados para a seleção do sistema de solventes desse trabalho foram obtidos na literatura. Segundo Nogueira (2011), 1 mg da fração aquosa é solúvel em 1 mL de água, pouco solúvel em 5 mL de metanol e insolúvel em hexano, diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e *n*-butanol. Também foi analisada a solubilidade

da mesma em misturas 1:1 de água com solventes orgânicos. As misturas diclorometano-água, acetato de etila-água, *iso*-butanol-água e *n*-butanol-água solubilizaram completamente a amostra (1 mg/mL), com formação de emulsão na última mistura mencionada. Diante dessa realidade, alguns sistemas de solventes foram propostos para trabalhar com a fração aquosa no teste de partição líquido-líquido em proveta graduada, em proporções variadas (Tabela 7):

- acetato de etila-*n*-butanol-água
- acetato de etila-*iso*-butanol-água
- acetato de etila-diclorometano-*n*-butanol-água
- *n*-butanol-metanol-água
- *iso*-butanol-metanol-água

Por meio da análise dos dados presentes na Tabela 7, foram selecionados quatro sistemas de solventes para cálculo do coeficiente de partição por CLAE-UV-DAD, os quais apresentaram mínima formação de emulsão, tempo de separação das fases inferior a 30 segundos e boa distribuição das substâncias nas fases superior/orgânica e inferior/aquosa nas análises por CCD. Foram eles:

- acetato de etila-*iso*-butanol-água 9:1:10
- acetato de etila-*iso*-butanol-água 8:2:10
- acetato de etila-*iso*-butanol-água 7:3:10
- acetato de etila-*iso*-butanol-água 5:1,8:6

Os cromatogramas obtidos por CLAE-UV-DAD das fases superior/orgânica e inferior/aquosa contendo a fração aquosa encontram-se nas Figuras 11 e 12, enquanto que os valores da área sob a curva e do coeficiente de partição (*K*) dos compostos selecionados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 7. Sistemas de solventes analisados para fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente de alta velocidade.

Testes	Sistema de Solventes	Proporção dos solventes	Tempo de separação de fases (s)
1	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	9:1:10	15
2	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	8:2:10	>30
3	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	7:3:10	>30
4	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	6:4:10	>30
5	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	5:5:10	>30
6	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	2:8:10	>30
7	acetato de etila- <i>n</i> -butanol-água	5:1,8:6	>30
8	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	9:1:10	16
9	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	8:2:10	15
10	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	7:3:10	17
11	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	6:4:10	28
12	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	5:5:10	>30
13	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	5:1,8:6	25
14	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	5:2,2:6	30
15	acetato de etila- <i>iso</i> -butanol-água	5:2,4:6	>30
16	acetato de etila-diclorometano- <i>n</i> -butanol-água	3:0,1:2:3	>30
17	acetato de etila-diclorometano- <i>n</i> -butanol-água	3:0,2:2:3	>30
18	acetato de etila-diclorometano- <i>n</i> -butanol-água	3:0,5:2:3	>30
19	<i>n</i> -butanol-metanol-água	1:0,01:1	>30
20	<i>n</i> -butanol-metanol-água	1:0,05:1	>30
21	<i>n</i> -butanol-metanol-água	1:0,1:1	>30
22	<i>n</i> -butanol-metanol-água	1:0,2:1	>30
23	<i>n</i> -butanol-metanol-água	1:0,4:1	não separa fase
24	<i>iso</i> -butanol-metanol-água	1:0,01:1	>30
25	<i>iso</i> -butanol-metanol-água	1:0,05:1	>30
26	<i>iso</i> -butanol-metanol-água	1:0,1:1	>30
27	<i>iso</i> -butanol-metanol-água	1:0,2:1	>30
28	<i>iso</i> -butanol-metanol-água	1:0,4:1	>30

Figura 11. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das fases superior/orgânica e inferior/aquosa dos sistemas de solventes (1) acetato de etila-*iso*-butanol-água 9:1:10 e (2) acetato de etila-*iso*-butanol-água 8:2:10. As bandas cromatográficas em destaque tiveram o coeficiente de partição (K) calculado. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 12. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das fases superior/orgânica e inferior/aquosa dos sistemas de solventes (3) acetato de etila-*iso*-butanol-água 7:3:10 e (4) acetato de etila-*iso*-butanol-água 5:1,8:6. As bandas cromatográficas em destaque tiveram o coeficiente de partição (K) calculado. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Tabela 8. Determinação do coeficiente de partição (K) para os compostos de interesse presentes tanto na fase superior quanto na fase inferior dos sistemas de solventes analisados.

Sistema de solventes: acetato de etila-<i>iso</i>-butanol-água 8:2:10					
Sinal	Fase superior		Fase inferior		K
	T_r (min)	Área	T_r (min)	Área	
1	18,19	46497	17,99	284472	0,16
2	19,27	45998	19,07	281853	0,16
3	28,66	153907	28,48	444558	0,35
4	30,03	94624	29,81	585050	0,16
5	34,05	128600	33,89	282400	0,46
Sistema de solventes: acetato de etila-<i>iso</i>-butanol-água 7:3:10					
Sinal	Fase superior		Fase inferior		K
	T_r (min)	Área	T_r (min)	Área	
1	19,04	126276	19,52	371164	0,34
2	20,15	136404	20,67	374753	0,36
3	27,85	483773	28,38	1124967	0,43
4	29,73	334929	30,28	617449	0,54
5	31,09	195051	31,60	617732	0,32
Sistema de solventes: acetato de etila-<i>iso</i>-butanol-água 5:1,8:6					
Sinal	Fase superior		Fase inferior		K
	T_r (min)	Área	T_r (min)	Área	
1	19,45	83452	19,49	151407	0,55
2	20,57	88285	20,60	164336	0,54
3	28,25	368784	28,29	488096	0,76
4	30,13	237265	30,18	239326	0,99
5	31,47	135130	31,50	264564	0,51

Para escolher o melhor sistema de solventes dentre os quatro analisados foi levado em consideração a distribuição dos compostos de interesse nas duas fases, designados pelos números 1 a 5, os quais deveriam estar distribuídos em proporções semelhantes nas mesmas. Esse fato é observado quando $0,5 < K < 2$. Desse modo, o sistema de solventes acetato de etila-*iso*-butanol-água na proporção 5:1,8:6 foi selecionado para uso no cromatógrafo contracorrente.

O equipamento de cromatografia contracorrente utilizado nesse trabalho é constituído por um sistema hidrodinâmico com dois eixos de rotação, sendo a coluna um longo tubo enovelado que gira em dois eixos, mimetizando o movimento planetário e, consequentemente, promovendo campo de força centrífuga variável ao longo da coluna (Figura 5). Esse sistema permite a obtenção de zonas de mistura e de separação das fases ao longo de toda coluna, gerando um número superior de partições em pequeno intervalo de tempo (ITO, 1991; PAULI et al., 2008).

A fase móvel foi eluída no sentido cauda-cabeça com a rotação da bobina no sentido normal (horário). Utilizou-se fase estacionária aquosa e a fase móvel orgânica, o que garantiu facilidade e rapidez para secagem das frações coletadas. A proporção dos volumes das fases móvel e estacionária para o sistema de solventes desenvolvido foi de aproximadamente 1:1. A retenção da fase estacionária no interior da coluna foi de 84%, valor de retenção obtido previamente à injeção da amostra. No entanto, por fatores possivelmente dependentes das características da amostra, houve extrusão de fase estacionária da coluna ao longo do processo de separação, sendo que ao final do processo a retenção da fase estacionária correspondeu a 40%.

O fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente resultou em oito subfrações (Tabela 9), as quais foram agrupadas de acordo com o perfil químico apresentado em CCD.

Tabela 9. Fracionamento da fração aquosa (2,0 g) por cromatografia contracorrente.

Subfrações	Tubos	Peso (mg)	Rendimento (%)
F1	01-07	40,2	2,01
F2	08	29,4	1,47
F3	09-10	55,5	2,78
F4	11-14	53,9	2,70
F5	15-25	62,8	3,14
F6	26-33	28,9	1,44
F7	34-43	34,6	1,73
F8	44-70	432,9	21,64
Total	01-70	738,2	36,91

Os perfis cromatográficos das subfrações foram analisados por CLAE-UV-DAD (Figuras 13 e 14) e demonstraram grande complexidade das mesmas. Observou-se que a cromatografia contracorrente separou os compostos de interesse por grupos de polaridade, diminuindo a complexidade da amostra, mas não a ponto de proporcionar o isolamento cromatográfico por CLAE semipreparativa, devido à sobreposição de bandas cromatográficas de interesse.

Segundo Ito (2005), o coeficiente de partição (K) é a relação de soluto distribuído entre as duas fases do sistema de solventes em equilíbrio e é determinado pela quantidade de soluto na fase estacionária dividida pela quantidade de soluto na fase móvel. Para garantir a separação dos compostos presentes em uma mistura, a razão entre o K de um composto e o K do outro composto que se deseja separar, para o sistema de solventes utilizado, deve ser $\geq 1,5$. Esta razão raramente é alcançada quando se busca a separação de vários compostos em uma

mistura complexa utilizando um mesmo sistema de solventes, o que foi o caso do presente estudo (método isocrático). Utilizar um método em gradiente poderia ser uma alternativa adequada para o isolamento desses compostos por cromatografia contracorrente (LEITÃO et al., 2005).

Figura 13. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das subfrações 1, 2, 3 e 4 provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 14. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das subfrações 5, 6, 7 e 8 provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia contracorrente. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

4.3 Fracionamento por cromatografia de filtração em gel

A cromatografia de filtração em gel utilizando a resina *Sephadex* LH-20 como fase estacionária também foi empregada na tentativa de se obterem subfrações menos complexas. A escolha dessa modalidade cromatográfica se deve ao fato de que os compostos de interesse são mais polares e o emprego de técnicas cromatográficas convencionais utilizando sílica como fase estacionária poderia acarretar em adsorção irreversível dos derivados galoilquínicos. Outro fator motivante é que esta resina possui uma característica dual. Na sua

estrutura química existem grupos polares e apolares que, dependendo da polaridade do solvente de eluição, se conformam de tal maneira que provocam uma expansão ou contração tridimensional da esfera polimérica, alterando o tamanho dos poros. Em solventes polares os canais expandirão de modo a se estreitarem. Em solventes apolares ocorre contração tridimensional e, assim, o alargamento dos canais. Pela variação da polaridade da fase móvel pode-se “ajustar” o tamanho dos poros para se obter melhor seletividade na separação dos compostos desejados, visto que esses possuem massas moleculares bastante próximas (GUTERRES, 2005). Na Figura 15 é possível observar a estrutura química da resina *Sephadex* LH-20, a qual é formada por unidades entrecruzadas de dextran hidroxipropilado. A hidroxipropilação confere ao gel a característica apolar enquanto que as unidades sacarídicas conferem característica polar. Já as ligações entrecruzadas promovem uma maior resistência ao gel e possibilitam o uso de solventes com polaridades diversas.

Figura 15. Estrutura parcial da resina *Sephadex* LH-20.

Levando-se tais características em consideração, foram realizados dois testes com a resina *Sephadex* LH-20, o primeiro no modo de eluição isocrático com metanol e o segundo no modo de eluição em gradiente com metanol-água. No modo de eluição isocrático, optou-se por trabalhar com a fração em *n*-butanol, visto que a fração aquosa não é totalmente solúvel em metanol. Já no modo de eluição em gradiente empregando-se a mistura metanol-água, optou-se por trabalhar com a fração aquosa, já que esta é solúvel na mistura de solventes empregada.

4.3.1 Fração em *n*-butanol

As subfrações obtidas a partir da fração em *n*-butanol tiveram seu rendimento calculado (Tabela 10). Posteriormente, os perfis químicos das mesmas foram analisados por CCD e por CLAE-UV-DAD (Figura 16). As subfrações FB1, FB2, FB6 e FB7 não apresentaram absorção no comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 10. Fracionamento da fração em *n*-butanol (1,0 g) por cromatografia de filtração em gel.

Subfrações	Tubos	Peso (mg)	Rendimento (%)
FB1	01-04	16,9	1,69
FB2	05-06	176,6	17,66
FB3	07-09	195,8	19,58
FB4	10-11	133,9	13,39
FB5	12-21	375,3	37,53
FB6	22-30	17,1	1,71
FB7	30-35	22,5	2,25
Total	01-35	938,1	93,81

Figura 16. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para FB3, FB4 e FB5 provenientes do fracionamento da fração em *n*-butanol por cromatografia de filtração em gel. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Por meio da análise dos perfis cromatográficos, verificou-se que o sistema de eluição no modo isocrático com metanol foi pouco satisfatório, uma vez que praticamente todos os derivados galoilquínicos presentes na fração em *n*-butanol eluíram nas subfrações FB4 e FB5, além do fato de que algumas bandas cromatográficas acabaram se sobrepondo, o que dificultaria o isolamento desses compostos. Apenas a subfração FB3 apresentou perfil químico pouco complexo. Além disso, nota-se a presença de um constituinte majoritário no cromatograma de FB4, com tempo de retenção próximo a 45 minutos.

4.3.2 Fração aquosa

Na tentativa de melhorar o sistema de separação, optou-se por utilizar a cromatografia de filtração em gel com o sistema de eluição em gradiente, utilizando como solventes metanol e água. Levando-se em consideração a proporção de água utilizada no decorrer do fracionamento, o teste foi realizado com a fração aquosa, em vez da fração em *n*-butanol. Embora a fração em *n*-butanol seja mais concentrada em alguns derivados galoilquínicos, especialmente os de média polaridade, a fração aquosa abrange uma gama maior desses compostos, desde os mais polares até os de média polaridade. É importante destacar que a cromatografia de filtração em gel com eluição em gradiente já foi utilizada por outros pesquisadores com êxito no isolamento de compostos semelhantes aos derivados galoilquínicos (BOUCHET et al., 1998; BOUCHET et al., 2000).

Portanto, foi realizado o fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel de *Sephadex* LH-20. As subfrações resultantes foram analisadas por CCD (Figura 17) e CLAE-UV-DAD (Figura 18) e tiveram seu rendimento calculado (Tabela 11). As subfrações FA1 e FA8 não apresentaram absorção no comprimento de onda de 280 nm.

Figura 17. Cromatografia em camada delgada (5 x 5 cm) realizada no decorrer do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel. Fase estacionária: Sílica gel. Fase móvel: acetato de etila-ácido acético-ácido fórmico-água (100:11:11:27). Revelador: luz UV (254 nm).

Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para FA2, FA3, FA4, FA5, FA6 e FA7 provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração e gel. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Tabela 11. Primeiro fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.

Subfrações	Tubos	Peso (mg)	Rendimento (%)*
FA1	01-07	56,4	4,6
FA2	08-10	496,8	40,6
FA3	11-15	139,3	11,4
FA4	16-20	54,3	4,4
FA5	21-26	78,6	6,4
FA6	27-31	92,7	7,6
FA7	32-48	111,4	9,1
FA8	49-100	55,2	4,6
Total	01-100	1084,7	88,7

* Rendimento calculado com base na quantidade de amostra injetada = 1223,0 mg.

Por meio desse fracionamento foi possível obter subfrações menos complexas. Compostos com tempos de retenção próximos foram eluídos em subfrações diferentes. Podem-se citar como exemplos os compostos que eluem entre 10 e 15 minutos nas subfrações FA4 e FA6, os que eluem entre 20 e 25 minutos nas subfrações FA4, FA6 e FA7, bem como aqueles que eluem entre 30 e 35 minutos nas subfrações FA5 e FA7. Tal fato foi de grande relevância tendo em vista que o próximo passo seria o isolamento desses compostos por CLAE no modo preparativo.

Portanto, o êxito na obtenção de subfrações mais simplificadas por meio da técnica de cromatografia de filtração em gel no modo de eluição em gradiente fez com que a mesma fosse escolhida para utilização no isolamento dos derivados galoilquínicos. Em seguida, repetiu-se o procedimento mais cinco vezes, no intuito de se obterem maiores quantidades das frações de interesse e dar sequência ao isolamento dos compostos. A repetitividade da técnica foi satisfatória e os resultados do segundo ao quinto fracionamentos encontram-se na Tabela 12.

O sexto fracionamento foi realizado numa coluna de vidro de 5 cm de diâmetro interno por 70 cm de altura contendo 300 g do gel de *Sephadex* LH-20. Essa mudança proporcionou maior agilidade ao processo, uma vez que foi possível utilizar 6,0 g de fração aquosa num único fracionamento. As subfrações resultantes desse fracionamento apresentaram perfil químico bastante semelhante aos anteriores, porém um pouco menos complexos. Tal fato pode ser confirmado através da visualização dos cromatogramas presentes nas Figuras 19 e 20. O rendimento do processo se encontra na Tabela 13. As subfrações FA1 e FA14 não apresentaram absorção no comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 12. Demais fracionamentos da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.

Subfrações	2º Fracionamento			3º Fracionamento		
	Tubos	Peso (mg)	R (%)*	Tubos	Peso (mg)	R (%)*
FA1	01-07	95,5	7,9	01-07	101,4	8,6
FA2	08-10	503,3	41,8	08-10	462,2	39,1
FA3	11-15	136,7	11,4	11-13	113	9,6
FA4	16-20	53,6	4,5	14-17	49,8	4,2
FA5	21-26	62,3	5,2	18-24	120	10,2
FA6	27-32	87,5	7,3	25-28	64,4	5,5
FA7	33-48	102,1	8,5	29-44	128,1	10,8
FA8	49-100	84,2	7,0	45-100	53,8	4,6
Total	01-100	1125,2	93,6	01-100	1182,3	92,6

Subfrações	4º Fracionamento			5º Fracionamento		
	Tubos	Peso (mg)	R (%)*	Tubos	Peso (mg)	R (%)*
FA1	01-07	56,9	4,6	01-09	206,4	14,7
FA2	08-10	504,2	41,1			
FA3	11-14	167,3	13,7	10-14	635,5	45,2
FA4	15-19	75,2	6,1	15-20	78,8	5,6
FA5	20-24	100,5	8,2	21-25	76,3	5,4
FA6	25-32	79	6,5	26-30	83,3	5,9
FA7	33-47	125,5	10,2	31-50	139	9,9
FA8	48-100	50,8	4,2	51-100	127,8	9,1
Total	01-100	1159,4	94,6	01-100	1347,1	95,8

* R = Rendimento calculado com base na quantidade de amostra injetada: 2º fracionamento = 1202,4 mg; 3º fracionamento = 1182,3 mg; 4º fracionamento = 1225,5 mg; 5º fracionamento = 1406,0 mg.

Tabela 13. Sexto fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel.

Tubos de ensaio	Peso (mg)	Rendimento (%)*
01-34	1221,3	20,1
35-41	1571,2	25,9
42-55	620,8	10,2
56-76	214,9	3,5
77-88	160,8	2,7
89-98	206,3	3,4
99-107	210,1	3,5
108-116	217,7	3,6
117-137	99,0	1,6
138-150	63,2	1,0
151-162	115,8	1,9
163-181	121,6	2,0
182-200	237,0	3,9
200-250	344,3	5,7
01-250	5404,7	89,2

* Rendimento calculado com base na quantidade de amostra injetada = 6,0614 mg.

Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para as seis primeiras subfrações provenientes do sexto fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para as seis últimas subfrações provenientes do fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

4.4 Isolamento dos compostos por CLAE semipreparativa

As subfrações provenientes da cromatografia de filtração em gel com perfis químicos semelhantes foram reunidas para isolamento por CLAE semipreparativa. As primeiras tentativas de isolamento dos derivados galoilquínicos foram realizadas sem adição de ácido orgânico na fase móvel devido a dois motivos. O primeiro estava relacionado com a estabilidade dos compostos. Por possuírem ligações ésteres esperava-se que em meio ácido e interação com adsorventes, os derivados galoilquínicos poderiam começar a se degradar dependendo do tempo em que ficassem em solução. O segundo motivo estava relacionado à temperatura do processo de secagem. O método mais rápido encontrado para secagem dos solventes nos quais os compostos seriam isolados por CLAE semipreparativa (metanol e água) envolvia o uso do equipamento *Speed Vac*, o qual funciona sob temperatura controlada a 45°C e pressão reduzida, o que proporciona a evaporação de solventes com ponto de ebulição mais elevado. O grande inconveniente do aparelho é sua temperatura de operação, que é um pouco elevada e associada ao meio ácido poderia iniciar o processo de degradação dos derivados galoilquínicos.

Levando-se esses motivos em consideração, parte das amostras foi submetida ao processo de isolamento sem ácido orgânico na fase móvel. Entretanto, a resolução das bandas cromatográficas visualizadas por CLAE analítica não se manteve, sendo que aquelas com tempos de retenção próximos acabaram se sobrepondo parcialmente, o que impediu o isolamento adequado. Como alternativa, outra parte das amostras foi submetida ao processo de isolamento com ácido fórmico na fase móvel para verificar a estabilidade dos compostos isolados após secagem. Após o processo de isolamento, os derivados galoilquínicos obtidos foram secos e logo em seguida analisados por CLAE analítica. Não foram constatados produtos de degradação. Após uma e duas semanas, os mesmos compostos foram analisados por CLAE analítica e também não foram constatados produtos de degradação. Desse modo, foi possível concluir que a presença do ácido orgânico na fase móvel e a temperatura de 45°C do processo de secagem não influenciaram na estabilidade dos derivados galoilquínicos isolados no curto prazo, sendo o uso de ácido fórmico necessário para a boa resolução e simetria dos picos cromatográficos. Mesmo assim, após o isolamento, os compostos foram secos imediatamente e armazenados sob refrigeração a fim de evitar eventuais perdas. Sendo assim, optou-se por trabalhar com ácido fórmico na fase móvel para otimização do processo de isolamento e obtenção dos derivados galoilquínicos com grau de pureza aceitável para

serem utilizados como padrões cromatográficos na validação do método analítico para quantificação dos mesmos no extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

Parte das subfrações reunidas foi submetida ao processo de isolamento sem adição de ácido orgânico na fase móvel, sendo necessário submetê-las ao processo de isolamento por uma segunda vez, o que gerou perda significativa de massa e impossibilitou o cálculo de rendimento.

4.4.1 Fração aquosa

As subfrações FA2, FA4, FA5, FA6 e FA7 provenientes dos cinco primeiros fracionamentos foram purificadas conforme especificações presentes no item 3.8. O gradiente de polaridade da fase móvel variou conforme a fração estudada e encontra-se na Tabela 14.

Tabela 14. Gradiente de polaridade da fase móvel empregada no processo de separação dos constituintes das subfrações FA2, FA4, FA5, FA6 e FA7.

Subfração	Tempo (min)	A (%)	B(%)
FA2	0-10	85-77	15-23
FA4 e FA6	0-25	85-66	15-34
FA5	0-35	85-58	15-42
FA7	0-45	70-50	30-50

(A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol.

De modo similar, as subfrações provenientes do sexto fracionamento também foram purificadas e os compostos obtidos foram reunidos com aqueles obtidos nos fracionamentos iniciais após comparação dos perfis cromatográficos. A quantidade total obtida de cada composto e as subfrações a partir das quais os mesmos foram isolados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Procedência e quantidade obtida dos derivados galoilquínicos.

Compostos	Procedência	Massa (mg)
AGQ-1	FA2 e Fr 35-41	33,6
AGQ-2	FA4, Fr 77-88 e Fr 89-98	84,2
AGQ-3	FA4 e Fr 56-76	95,7
AGQ-4	FA5 e Fr 99-107	44,1
AGQ-5	FA5 e Fr 89-98	40,0
AGQ-6	FA5 e Fr 89-98	33,6
AGQ-7	FA5 e Fr 99-107	38,1
AGQ-8	FA5, Fr 77-88 e Fr 89-98	27,9
AGQ-9	FA5, Fr 89-98 e 99-107	63,2
AGQ-10	FA6 e Fr 99-107	51,2
AGQ-11	FA6 e Fr 108-116	60,9
AGQ-12	FA6, Fr 99-107 e Fr 108-116	48,6
AGQ-13	FA6, Fr 99-107 e Fr 108-116	55,4
AGQ-14	FA7, Fr 163-181 e Fr 182-200	58,9
AGQ-15	FA7, Fr 163-181 e Fr 182-200	73,6
AGQ-16	FA7, Fr 117-137 e Fr 138-150	21,8

Os perfis cromatográficos, os espectros de absorção no UV e os tempos de retenção dos derivados galoilquínicos isolados encontram-se nas Figuras 21-28. Eles foram identificados pela sigla AGQ seguida pelo número correspondente à ordem do isolamento e identificação. A porcentagem da área sob a curva referente às bandas cromatográficas dos compostos isolados, bem como seus espectros de varredura no ultravioleta (210 a 400 nm) foram utilizados como estimativa de pureza. Como nem todos os compostos presentes na natureza são passíveis de detecção por espectroscopia no ultravioleta, devido à ausência de grupos cromóforos na sua estrutura química, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C também serviram de parâmetros para estimar a pureza dos derivados galoilquínicos.

Figura 21. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-1 e AGQ-2. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-3 e AGQ-4. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-5 e AGQ-6. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-7 e AGQ-8. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 25. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-9 e AGQ-10. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móve (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 26. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-11 e AGQ-12. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 27. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-13 e AGQ-14. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 28. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD para AGQ-15 e AGQ-16. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

4.4.2 Fração em *n*-butanol

Dentre as subfrações provenientes da fração em *n*-butanol, apenas FB4 foi submetida ao isolamento por CLAE semipreparativa. Sua purificação foi realizada conforme especificações presentes no item 4.4.1 para a subfração FA7. A partir de FB4 foi possível isolar maior quantidade do composto AGQ-16 (28,7 mg). Como pode ser observada no cromatograma da Figura 29, a polaridade desse composto é intermediária quando comparada com os demais compostos isolados, o que justifica sua maior concentração na fração em *n*-butanol, menos polar que a fração aquosa.

Figura 29. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV-DAD para AGQ-16 proveniente de FB4. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 8,35 min, 50-100% de B até 29,23 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 37,5 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 0,68 mL/min.

4.5 Determinação das estruturas químicas dos derivados galoilquínicos isolados

Os compostos isolados pertencem à classe dos derivados galoilquínicos. O núcleo principal dessa classe é o ácido quínico, que apresenta grupamentos hidroxílicos nas posições C-1, C-3, C-4 e C-5, que podem ser esterificados por uma ou mais unidades galoil, as quais,

por sua vez, podem estar esterificadas com uma ou mais unidades galoil. Como diversas estruturas podem ser formadas, encontra-se uma grande similaridade estrutural e, portanto, pequenas variações nos deslocamentos químicos e nas constantes de acoplamento são os principais pontos de diferenciação desses constituintes para identificação e determinação estrutural por espectroscopia de RMN (CORSE et al., 1966; ISHIMARU et al., 1987; PARKER et al., 1989). Absorções máximas no espectro de UV em torno de 230 nm e 276 nm podem sugerir a presença dos derivados galoilquínicos. No entanto, as análises espectroscópicas de RMN (PARKER et al., 1989; HOU et al., 2000) e espectrométricas (PAWLOWSKA et al., 2006; CLIFFORD et al., 2007; MALDINI et al., 2011) têm sido utilizadas na identificação e determinação estrutural dos mesmos.

A presença de dois carbonos metilênicos similares (C-2 e C-6), três carbonos oximetínicos (C-3, C-4 e C-5) e um carbono quaternário (C-1), observados nos espectros de RMN de ^{13}C , juntamente com a presença do carbono carboxílico desblindado (C-7) sugeriram a estrutura do ácido quínico em todos os compostos isolados. Esta foi confirmada a partir das correlações obtidas nos mapas de contornos de HSQC e HMBC. A configuração relativa dos carbonos ostentando hidrogênios metilênicos e metínicos foi determinada de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H , quando possível. A presença dos resíduos de ácido gálico foi determinada pelos sinais dos carbonos com deslocamentos químicos entre 100 e 170 ppm, bem como pelos sinais de hidrogênios meta correlacionados. Correlações observadas no mapa de contornos de HMBC entre os hidrogênios metínicos do ácido quínico e o(s) carbono(s) carbonílico(s) do(s) resíduo(s) de ácido gálico permitiram determinar a posição e o grau da substituição. Os grupos metílicos nas unidades galoil, quando presentes, foram visualizados por meio da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e das correlações no mapa de contornos de HMBC entre os hidrogênios do grupo metílico e o carbono da unidade galoil ao qual o mesmo estivesse diretamente ligado.

As estruturas químicas propostas para os compostos isolados são apresentadas a seguir (Figuras 30-45). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram atribuídos e, posteriormente, comparados com dados da literatura, em especial para os derivados galoilquínicos não metilados (NISHIMURA et al., 1984; PAULI et al., 1998; ROMANI et al., 2002). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos estão descritos nas Tabelas 16-31 e as principais correlações observadas nos mapas de contornos de HSQC e HMBC podem ser verificadas nas mesmas tabelas. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135,

bem como os mapas de contorno de HSQC e HMBC dos derivados galoilquínicos isolados encontram-se nos Apêndices 1-48.

4.5.1 Composto proveniente de FA2

AGQ-1: ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico; C₁₅H₁₈O₁₀; 358 g/mol

Figura 30. Estrutura química de AGQ-1.

Tabela 16. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-1 em CD₃OD.

Posição	δ_C	δ_H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,48	-	-
2	36,82	2,18 (<i>m</i> ; 1H) ^a 2,22 (<i>m</i> ; 1H) ^a	C-1; C-3
3	73,28	5,47 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	75,18	3,67 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,0; 8,8Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5
5	68,25	4,24 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,6; 8,8; 9,4 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6
6	41,81	1,96 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =9,4; 12,4 Hz; 1H _{ax}) 2,16 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,6; 12,4 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5
-COOH (7)	178,52	-	-
Ácido gálico			
1'	122,15	-	-
2'	112,22	7,26 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,7 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,09	-	-
4'	140,38	-	-
5'	148,94	-	-
6'	106,53	7,29 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,7 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	168,10	-	-
-CH ₃ (8')	56,62	3,88 (<i>s</i> ; 3H)	C-5'

^a Intercambiáveis.

4.5.2 Compostos provenientes de FA4

AGQ-2: ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510 g/mol

Figura 31. Estrutura química de AGQ-2.

Tabela 17. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-2 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,29	-	-
2	37,09	2,20 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 6,8; 15,0 Hz; 1H _{ax}) 2,42 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,1; 15,0 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3
3	70,43	5,73 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,1; 3,3; 6,8 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	76,97	5,15 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,3; 9,3 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7''
5	65,90	4,52 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =4,2; 9,3; 9,7; 1H _{ax})	C-4; C-6
6	42,19	2,12 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =9,7; 11,1 Hz; 1H _{ax}) 2,29 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =4,2; 11,1 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5
-COOH (7)	178,14	-	-
Ácido gálico			
1'	121,63	-	-
2'	110,44	7,14 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	146,02	-	-
4'	139,83	-	-
-COO- (7')	167,72	-	-
1''	121,31	-	-
2''	112,01	7,15 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,5 Hz; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,45	-	-
4''	140,45	-	-
5''	148,77	-	-
6''	106,05	6,97 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,5 Hz; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,61	-	-
-CH ₃ (8'')	56,13	3,52 (<i>s</i> ; 3H)	C-5''

AGQ-3: ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico; C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol

Figura 32. Estrutura química de AGQ-3.

Tabela 18. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-3 em CD₃OD.

Posição	δ_C	δ_H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,27	-	-
2	37,16	2,18 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,4; 14,8 Hz; 1H _{ax}) 2,43 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,7; 14,8 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-4; C-7
3	70,41	5,77 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,0; 3,7; 7,4 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	76,74	5,16 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,0; 8,9 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-6; C-7''
5	66,08	4,48 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =4,2; 8,9; 9,5 Hz; 1H _{ax})	C-1; C-3; C-4; C-6
6	42,01	2,14 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =9,5; 12,3 Hz; 1H _{ax}) 2,28 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =4,2; 12,3 Hz; 1 H _{eq})	C-1; C-5; C-4; C-7
-COOH (7)	178,24	-	-
Ácido gálico			
1'	121,62	-	-
2'	112,17	7,24 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,27	-	-
4'	140,61	-	-
5'	149,08	-	-
6'	106,42	7,22 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,47	-	-
-CH ₃ (8')	56,56	3,83 (<i>s</i> ; 3H)	C-5'
1''	121,38	-	-
2''	112,09	6,99 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,9 Hz; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,15	-	-
4''	140,55	-	-
5''	148,85	-	-
6''	106,14	6,83 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,9 Hz; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,59	-	-
-CH ₃ (8'')	56,22	3,56 (<i>s</i> ; 3H)	C-5''

4.5.3 Compostos provenientes de FA5

AGQ-4: ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico; C₂₁H₂₀O₁₄; 496 g/mol

Figura 33. Estrutura química de AGQ-4.

Tabela 19. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-4 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,12	-	-
2	36,98	2,18 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,0; 14,6 Hz; 1H _{ax}) 2,44 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,3; 14,6 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	70,28	5,72 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =2,8; 3,3; 7,0 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	76,45	5,12 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =2,8; 8,6; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7''
5	66,07	4,44 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =4,1; 8,6; 8,6 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6
6	41,97	2,16 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =8,6; 11,7 Hz; 1H _{ax}) 2,24 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =4,1; 11,7 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	178,06	-	-
Ácido gálico			
1'	121,67	-	-
2'	110,45	7,08 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	146,36	-	-
4'	139,80	-	-
-COO- (7')	167,69	-	-
1''	121,35	-	-
2''	110,31	7,02 (<i>s</i> ; 2H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	146,31	-	-
4''	139,85	-	-
-COO- (7'')	167,86	-	-

AGQ-5: ácido 5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510 g/mol

Figura 34. Estrutura química de AGQ-5.

Tabela 20. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-5 em CD₃OD.

Posição	δ_C	δ_H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	74,84	-	-
2	37,87	2,32 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,4; 14,2 Hz; 1H _{ax}) 2,24 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,2; 14,2 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	72,35	5,52 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,1; 3,2; 7,4; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	70,71	4,06 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,1; 7,4 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5
5	73,01	5,55 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,7; 7,1; 7,4 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	36,07	2,20 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,1; 14,0 Hz; 1H _{ax}) 2,39 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,7; 14,0 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	177,81	-	-
Ácido gálico			
1'	121,51	-	-
2'	110,26	7,08 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	146,43	-	-
4'	139,98	-	-
-COO- (7')	167,64	-	-
1''	121,87	-	-
2''	112,22	7,29 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,15	-	-
4''	140,55	-	-
5''	149,03	-	-
6''	106,54	7,33 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,95	-	-
-CH ₃ (8'')	56,68	3,91 (<i>s</i> ; 3H)	C-5''

AGQ-6: ácido 5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510 g/mol **Figura 35.** Estrutura química de AGQ-6.**Tabela 21.** Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-6 em CD₃OD.

Posição	δ_C	δ_H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	74,64	-	-
2	37,28	2,35 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,2; 13,4 Hz; 1H _{ax}) 2,25 (<i>m</i> ; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	72,67	5,48 (<i>m</i> ; 1 H _{eq})	C-2; C-4
4	70,20	4,08 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,1; 7,2 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5
5	72,55	5,55 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,7; 7,2; 7,8 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	35,83	2,20 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,8; 13,2 Hz; 1H _{ax}) 2,38 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,7; 13,2 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	177,38	-	-
Ácido gálico			
1'	121,95	-	-
2'	112,02	7,20 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,9 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,18	-	-
4'	140,68	-	-
5'	149,11	-	-
6'	106,34	7,22 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,9 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,37	-	-
-CH ₃ (8')	56,77	3,92 (<i>s</i> ; 3 H)	C-5'
1''	121,39	-	-
2''	110,39	7,16 (<i>s</i> ; 1H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	146,38	-	-
4''	139,75	-	-
-COO- (7'')	168,04	-	-

AGQ-7: ácido 5'-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510 g/mol **Figura 36.** Estrutura química de AGQ-7.**Tabela 22.** Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-7 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,03	-	-
2	36,97	2,19 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,3; 14,4 Hz; 1H _{ax}) 2,44 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,5; 14,4 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	70,24	5,75 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,2; 3,5; 5,3 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	76,01	5,15 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,2; 8,2; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7''
5	66,29	4,41 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =5,3; 7,5; 8,2 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6
6	41,65	2,18-2,24 (<i>m</i> ; 2H)	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	178,03	-	-
Ácido gálico			
1'	121,62	-	-
2'	112,12	7,19 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,16	-	-
4'	140,52	-	-
5'	148,99	-	-
6'	106,36	7,16 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,44	-	-
-CH ₃ (8')	56,48	3,77 (<i>s</i> ; 3H)	C-5'
1''	121,37	-	-
2''	110,31	7,03 (<i>s</i> ; 2H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	146,39	-	-
4''	139,87	-	-
-COO- (7'')	167,81	-	-

AGQ-8: ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol

Figura 37. Estrutura química de AGQ-8.

Tabela 23. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-8 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	74,65	-	-
2	37,34	2,35 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =6,8; 13,8 Hz; 1H _{ax}) 2,28 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,0; 13,8 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	72,51	5,50 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =2,9; 3,0; 6,8 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	70,36	4,08 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,0; 7,0 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5
5	72,67	5,59 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,2; 7,0; 7,8 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	35,84	2,23 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,8; 13,6 Hz; 1H _{ax}) 2,40 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,2; 13,6 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	177,26	-	-
Ácido gálico			
1'	121,39	-	-
2'	112,02	7,20 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,5 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,18	-	-
4'	140,67	-	-
5'	149,11	-	-
6'	106,33	7,21 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,5 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,38	-	-
-CH ₃ (8')	56,72	3,91 (<i>s</i> ; 3 H)	C-5'
1''	121,83	7,28 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,6 Hz; 1H)	-
2''	112,20	-	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,15	-	-
4''	140,55	-	-
5''	149,03	7,31 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,6 Hz; 1H)	-
6''	106,49	-	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,87	3,90 (<i>s</i> ; 3H)	-
-CH ₃ (8'')	56,68	7,28 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,6 Hz; 1H)	C-5''

AGQ-9: ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₃H₂₄O₁₄; 524 g/mol

Figura 38. Estrutura química de AGQ-9.

Tabela 24. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-9 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	76,20	-	-
2	38,54	2,15 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,4; 14,0 Hz; 1H _{ax}) 2,36 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =2,7; 14,0 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	69,32	4,47 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =2,7; 3,1; 5,4 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	76,06	5,24 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,1; 8,6 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7'
5	69,49	5,75 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =6,1; 8,2; 8,6 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	39,32	2,30-2,40 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =8,2; 14,5 Hz; 1H _{ax}) 2,30-2,40 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =6,1; 14,5 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	176,86	-	-
Ácido gálico			
1'	121,16	-	-
2'	112,11	7,20 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,9 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,21	-	-
4'	140,75	-	-
5'	149,01	-	-
6'	106,37	7,17 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,9 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,73	-	-
1''	121,11	-	-
2''	119,93	7,11 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,21	-	-
4''	140,71	-	-
5''	149,01	-	-
6''	106,17	7,08 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,39	-	-
-CH ₃ (8' e 8'')	56,59	3,81 (<i>s</i> ; 6 H)	C-5' e C-5''

4.5.4 Compostos provenientes de FA6

AGQ-10: ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₁H₂₀O₁₄; 496 g/mol

Figura 39. Estrutura química de AGQ-10.

Tabela 25. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-10 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	74,62	-	-
2	37,41	2,33 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,1; 14,4 Hz; 1H _{ax}) 2,25 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,3; 14,4 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	70,45	5,47 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,1; 3,3; 7,1 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	70,43	4,06 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,1; 7,2 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5
5	72,66	5,54 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,6; 7,2; 7,6 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	35,84	2,20 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =7,6; 13,6 Hz; 1H _{ax}) 2,38 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,6; 13,6 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	177,41	-	-
Ácido gálico			
1'	121,45	-	-
2'	110,25	7,08 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	146,42	-	-
4'	139,98	-	-
-COO- (7')	167,54	-	-
1''	121,83	-	-
2''	110,39	7,17 (<i>s</i> ; 2H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	146,39	-	-
4''	139,75	-	-
-COO- (7'')	168,09	-	-

AGQ-11: ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₁H₂₀O₁₄; 496 g/mol **Figura 40.** Estrutura química de AGQ-11.**Tabela 26.** Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-11 em (CD₃)₂SO.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,02	-	-
2	36,38	1,71 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,5; 13,5 Hz; 1H _{ax}) 2,13 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,0; 13,5 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	68,88	4,15 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =2,8; 3,0; 5,5 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	75,91	5,03 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =2,8; 10,1 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7'
5	68,42	5,61 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =5,2; 10,1; 10,4 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	38,04	2,03 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =10,4; 12,8 Hz; 1H _{ax}) 1,91 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,2; 12,8 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	176,21	-	-
Ácido gálico			
1'	119,36	-	-
2'	108,65	6,87 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	145,59	-	-
4'	138,72	-	-
-COO- (7')	165,49	-	-
1''	119,30	-	-
2''	108,79	6,91 (<i>s</i> ; 2H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	145,64	-	-
4''	138,72	-	-
-COO- (7'')	165,34	-	-

AGQ-12: ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510 g/mol

Figura 41. Estrutura química de AGQ-12.

Tabela 27. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-12 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	76,04	-	-
2	38,44	2,14 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,5; 14,2 Hz; 1H _{ax}) 2,36 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,1; 14,2 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	69,17	4,49 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =2,9; 3,1; 5,3 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	76,42	5,18 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =2,9; 8,9 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7'
5	69,02	5,78 (<i>m</i> ; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	39,32	2,29-2,33 (<i>m</i> ; 2H)	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	176,91	-	-
Ácido gálico			
1'	121,17	-	-
2'	112,05	7,18 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,6 Hz; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,15	-	-
4'	140,70	-	-
5'	148,98	-	-
6'	106,36	7,16 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,6 Hz; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,78	-	-
-CH ₃ (8')	56,58	3,80 (<i>s</i> ; 3H)	C-5'
1''	121,13	-	-
2''	110,17	6,99 (<i>s</i> ; 2H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	146,42	-	-
4''	139,34	-	-
-COO- (7'')	167,43	-	-

AGQ-13: ácido 5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico; C₂₂H₂₂O₁₄; 510 g/mol

Figura 42. Estrutura química de AGQ-13.

Tabela 28. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-13 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	75,82	-	-
2	38,53	2,13 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,7; 14,0 Hz; 1H _{ax}) 2,30-2,40 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =2,8; 14,0 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	69,05	4,44 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =2,8; 3,0; 5,7 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4
4	75,28	5,27 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,0; 7,8 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7'
5	69,75	5,66 (<i>m</i> ; 1 H _{ax})	C-4; C-6; C-7''
6	38,91	2,30-2,40 (<i>m</i> ; 2H)	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	176,84	-	-
Ácido gálico			
1'	121,05	-	-
2'	110,33	7,09 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-7'
3'	146,41	-	-
4'	139,99	-	-
-COO- (7')	167,76	-	-
1''	121,12	-	-
2''	111,88	7,10 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,14	-	-
4''	140,69	-	-
5''	149,01	-	-
6''	106,07	7,07 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,8 Hz; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,38	-	-
-CH ₃ (8'')	56,59	3,81 (<i>s</i> ; 3H)	C-5''

4.5.5 Compostos provenientes de FA7

AGQ-14: ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico; C₂₈H₂₄O₁₈; 648 g/mol

Figura 43. Estrutura química de AGQ-14.

Tabela 29. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-14 em (CD₃)₂SO.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	73,30	-	-
2	36,47	1,81 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =1,1; 13,3 Hz; 1H _{ax}) 2,34 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =0,9; 13,3 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	69,91	5,53 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =0,9; 1,1; 1,7 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4, C-7'
4	72,95	5,27 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =1,7; 9,5 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5, C-7''
5	68,43	5,74 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =9,5; 9,7; 12,8 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7'''
6	39,69	2,14 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =11,2; 12,8 Hz; 1H) 1,97 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =9,7; 11,2 Hz; 1H)	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	176,84	-	-
Ácido gálico			
1'	118,95	-	-
2'	108,64	6,88 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	145,44	-	-
4'	138,53	-	-
-COO- (7')	165,17	-	-
1''	118,77	-	-
2''	108,69	6,80 (<i>s</i> ; 2H)	C-1''; C-3''; C-7''
3''	145,47	-	-
4''	138,65	-	-
-COO- (7'')	165,26	-	-
1'''	119,99	-	-
2'''	109,17	7,04 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'''; C-3'''; C-7'''
3'''	145,57	-	-
4'''	138,77	-	-
-COO- (7''')	165,59	-	-

AGQ-15: ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico; C₂₉H₂₆O₁₈; 662 g/mol **Figura 44.** Estrutura química de AGQ-15.**Tabela 30.** Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-15 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	74,89	-	-
2	36,84	2,28 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =4,7; 14,7 Hz; 1H _{ax}) 2,53 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,7; 14,7 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	70,20	5,81 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,4; 3,7; 4,7 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	73,56	5,48 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,4; 8,6 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7''
5	69,41	5,89 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =6,4; 8,6; 14,0 Hz; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7'''
6	38,93	2,40 (<i>m</i> ; 2H)	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	177,43	-	-
Ácido gálico			
1'	121,47	-	-
2'	110,44	7,16 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'; C-3'; C-7'
3'	146,46	-	-
4'	139,93	-	-
-COO- (7')	167,70	-	-
1''	120,79	-	-
2''	111,92	7,09 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,7 Hz; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,08	-	-
4''	140,67	-	-
5''	148,87	-	-
6''	106,10	6,95 (<i>d</i> ; <i>J</i> =1,7 Hz; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,13	-	-
-CH ₃ (8'')	56,24	3,57 (<i>s</i> ; 3H)	C-5''
1'''	120,99	-	-
2'''	110,19	7,01 (<i>s</i> ; 2H)	C-1'''; C-7'''
3'''	146,39	-	-
4'''	139,98	-	-
-COO- (7''')	167,43	-	-

AGQ-16: ácido 5',5'',5'''-tri-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico; C₃₁H₃₀O₁₈; 690 g/mol

Figura 45. Estrutura química de AGQ-16.

Tabela 31. Dados dos espectros de RMN de ¹³C (125 MHz), ¹H (500 MHz) e HMBC obtidos para AGQ-16 em CD₃OD.

Posição	δ _C	δ _H	HMBC (H→C)
Ácido quínico			
1	74,91	-	-
2	36,89	2,28 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =5,0; 14,5 Hz; 1H _{ax}) 2,56 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,4; 14,5 Hz; 1H _{eq})	C-1; C-3; C-7
3	70,48	5,85 (<i>ddd</i> ; <i>J</i> =3,2; 3,4; 5,0 Hz; 1H _{eq})	C-2; C-4; C-7'
4	73,35	5,52 (<i>dd</i> ; <i>J</i> =3,2; 8,4 Hz; 1H _{ax})	C-3; C-5; C-7''
5	69,72	5,88 (<i>m</i> ; 1H _{ax})	C-4; C-6; C-7'''
6	38,83	2,42 (<i>m</i> ; 2H)	C-1; C-5; C-7
-COOH (7)	177,33	-	-
Ácido gálico			
1'	121,47	-	-
2'	112,15	7,27 (<i>sl</i> ; 1H)	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'; C-7'
3'	146,30	-	-
4'	140,70	-	-
5'	149,09	-	-
6'	106,47	7,26 (<i>sl</i> ; 1H)	C-1'; C-2'; C-4'; C-5'; C-7'
-COO- (7')	167,46	-	-
-CH ₃ (8')	56,56	3,83 (<i>s</i> ; 3H)	C-5'
1''	120,79	-	-
2''	112,00	7,10 (<i>sl</i> ; 1H)	C-1''; C-3''; C-4''; C-6''; C-7''
3''	146,20	-	-
4''	140,77	-	-
5''	148,94	-	-
6''	106,24	6,95 (<i>sl</i> ; 1H)	C-1''; C-2''; C-4''; C-5''; C-7''
-COO- (7'')	167,06	-	-
-CH ₃ (8'')	56,27	3,58 (<i>s</i> ; 3H)	C-5''
1'''	121,01	-	-
2'''	111,94	7,12 (<i>sl</i> ; 1H)	C-1'''; C-3'''; C-4'''; C-6'''; C-7'''
3'''	146,20	-	-
4'''	140,77	-	-

5'''	149,04	-	-
6'''	106,13	7,10 (sl; 1H)	C-1'''; C-2'''; C-4'''; C-5'''; C-7'''
-COO- (7''')	167,28	-	-
-CH ₃ (8''')	56,62	3,84 (s; 3H)	C-5'''

A biossíntese dos derivados galoilquínicos isolados também foi um fator crucial na determinação da estrutura química dos mesmos, especialmente na atribuição dos deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios oximetínicos. Os derivados galoilquínicos são oriundos da via do chiquimato e por meio da visualização de parte dessa via (Figura 46) é possível verificar a origem dos dois principais metabólitos que fazem parte da estrutura química desses derivados, o ácido quínico e o ácido gálico.

Figura 46. Via do ácido chiquímico. Fonte: Modificado de Dewick (2009).

Mais especificamente, a via do chiquimato se inicia por meio da ligação entre fosfoenolpiruvato, proveniente da via glicolítica, e D-eritrose-4-fosfato, proveniente da via das pentoses-fosfato, formando ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato (DAHF). Essa reação é demonstrada na Figura 46 como uma condensação do tipo aldólica. Porém, nos tecidos vegetais ocorre de maneira mais complexa, sendo catalisada pela enzima estereoseletiva DAHF sintetase. A eliminação do fosfato da estrutura do DAHF seguida pela

reação aldólica intramolecular leva à formação do primeiro intermediário carbocíclico, o ácido 3-desidroquínico, as quais ocorrem por meio da ação de uma única enzima, a 3-desidroquinato sintetase. A redução do ácido 3-desidroquínico leva à formação do ácido quínico, comumente encontrado nas plantas na forma livre ou esterificado. Já o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) é formado a partir do ácido 3-desidroquínico. Primeiro ocorre uma desidratação (3-desidroquinase), formando o ácido 3-desidrochiquímico, o qual sofre uma reação de oxidação seguida por enolização. De maneira análoga, porém mais elaborada, enzimas desidroquinase distintas são responsáveis por catalisar essas reações na planta. O ácido gálico é amplamente distribuído no reino vegetal, podendo estar ligado a unidades de açúcar como a glicose, formando os galotaninos, ou a unidades de ácido quínico, formando os galoilquínicos (DEWICK, 2009).

Uma vez biossintetizados pela planta, ácido quínico e ácido gálico podem se combinar por meio de reações de esterificação, provavelmente assistidas por coenzima A (HSCoA) e ATP, e formar os derivados galoilquínicos. Como exemplo, encontra-se na Figura 47 o possível mecanismo para a formação do ácido 3-*O*-galoilquínico.

Figura 47. Reação de esterificação para formação do ácido 3-*O*-galoilquínico. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se à sequência dos acontecimentos. Nu: nucleófilo.

Como pode ser observado, os derivados galoilquínicos, assim como a maioria dos produtos naturais, são biossintetizados por meio de uma sequência de reações químicas catalisadas na maioria das vezes por enzimas, as quais facilitam a modificação dos substratos devido à sua estereoseletividade. Desse modo, espera-se que os produtos naturais apresentem estereoquímica definida a partir de sua rota biossintética, o que pode ser observado para o ácido quínico (Figuras 46 e 48).

Levando-se em consideração a estereoquímica pré-estabelecida para o ácido quínico durante sua biossíntese, várias considerações podem ser feitas quanto aos derivados galoilquínicos isolados. Avaliou-se a estrutura do ácido quínico na conformação em cadeia

(Figura 48) para prever possíveis multiplicidades e constantes de acoplamento para os hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4 e 5 em especial.

Figura 48. Conformação planar (A) e em cadeira (B) do ácido quínico.

Segundo Pavia e colaboradores (2010), em derivados do cicloexano com conformação preferencial, tal como é o ácido quínico, a constante de acoplamento entre dois hidrogênios axiais é, em geral, de 10 a 14 Hz ($\alpha = 180^\circ$), enquanto a magnitude de interação entre um hidrogênio axial e um equatorial é, normalmente, de 2 a 6 Hz ($\alpha = 60^\circ$). Já entre dois hidrogênios equatoriais fica na faixa entre 2 e 5 Hz, sendo normalmente por volta de 1 Hz menor que a constante de acoplamento axial-equatorial no mesmo sistema de anel. Esses valores das constantes de acoplamento vicinais ($^3J_{HH}$) podem ser explicados através do ângulo diedro α formado entre os hidrogênios. Quando duas ligações C–H adjacentes são ortogonais ($\alpha = 90^\circ$, perpendiculares) ocorre sobreposição mínima dos orbitais. Com isso, a informação de spin nuclear não é transmitida e a constante de acoplamento tende a zero. Do modo inverso, quando essas duas ligações são paralelas ($\alpha = 0^\circ$) ou antiparalelas ($\alpha = 180^\circ$), a constante de acoplamento tem sua maior magnitude devido à sobreposição máxima dos orbitais.

Sendo assim, através das multiplicidades e constantes de acoplamento obtidas para os sinais nos espectros de RMN de ^1H referentes aos hidrogênios oximetínicos, foi possível atribuir sua posição na estrutura do ácido quínico. Além disso, na Tabela 32 encontram-se os dados esperados para multiplicidade e constantes de acoplamento para os hidrogênios ligados diretamente aos carbonos da estrutura do ácido quínico nos derivados galoilquínicos isolados. Mesmo sabendo desses dados, quando não possível visualizar ou calcular, as multiplicidades e constantes de acoplamento não foram propostas.

Tabela 32. Características esperadas para os hidrogênios do ácido quínico.

Ácido quínico	Multiplicidade	Constantes de acoplamento
C-1	-	-
C-2	Hax	$^3J_{2ax-2eq}$; $^3J_{2ax-3eq}$
	Heq	$^3J_{2ax-2eq}$; $^3J_{2eq-3eq}$
C-3	Heq	$^3J_{2ax-3eq}$; $^3J_{2eq-3eq}$; $^3J_{3eq-4ax}$
C-4	Hax	$^3J_{3eq-4ax}$; $^3J_{4ax-5ax}$
C-5	Hax	$^3J_{4ax-5ax}$; $^3J_{5ax-6ax}$; $^3J_{5ax-6eq}$
C-6	Hax	$^3J_{5ax-6ax}$; $^3J_{6ax-6eq}$
	Heq	$^3J_{5ax-6eq}$; $^3J_{6ax-6eq}$

Outra característica peculiar de alguns dos derivados galoilquínicos isolados é a presença de grupamentos metílicos na unidade galoil. Embora derivados galoilquínicos metilados não tenham sido descritos na literatura, tal fato pode ser facilmente explicado. Grupamentos metila podem ser adicionados em produtos naturais a partir do aminoácido L-metionina por meio de reação de substituição nucleofílica. Nas plantas, o grupo abandonador é favorecido através da conversão da L-metionina em S-adenosilmetionina (SAM), um cofator para a enzima metiltransferase. A presença do enxofre carregado positivamente na SAM facilita o mecanismo de substituição nucleofílica do tipo S_N2 . Assim, ligações O-metil podem ser obtidas utilizando a função hidroxila como nucleófilo (Figura 49) (DEWICK, 2009).

Figura 49. Mecanismo de metilação da S-adenosilmetionina (SAM). E1, enzima metiltransferase; SAH, S-adenosil-homocisteína.

Os derivados galoilquínicos não metilados já foram detectados nas folhas de outras espécies vegetais, tais como *Guiera senegalensis* (Combretaceae) (BOUCHET et al., 1996), *Quercus mongolica* e *Q. myrsinaefolia* (Fagaceae) (ISHIMARU et al., 1987) e *Pistacia weinmannifolia* (Anacardiaceae) (HOU et al., 2000).

Nishimura et al. (1984) isolaram e identificaram sete derivados galoilquínicos a partir das cascas da espécie *Q. stenophylla* (Fagaceae). Bouchet et al. (1996) conseguiram isolar pela primeira vez o ácido 1,3-di-O-galoilquínico a partir das folhas de *G. senegalensis*, juntamente com outros oito derivados: 3-O-, 4-O-, 5-O-, 3,4-di-O-, 4,5-di-O-, 3,5-di-O-,

3,4,5-tri-*O*- e 1,3,4,5-tetra-*O*-galoilquínico. Posteriormente, ainda foram feitos estudos de quantificação dos mesmos (BOUCHET et al., 2000). Outros estudos de quantificação de derivados galoilquínicos em espécies vegetais distintas também foram relatados na literatura. Por exemplo, Romani et al. (2002) isolaram e quantificaram os ácidos 3,5-di-*O*- e 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico a partir das folhas de *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae), enquanto Maldini et al. (2011) isolaram e quantificaram pela primeira vez cinco derivados (3-*O*-, 5-*O*-, 3,4-di-*O*-, 3,5-di-*O*- e 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) a partir das cascas da espécie vegetal *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae).

Segundo Clifford et al. (2007), as principais fontes de derivados galoilquínicos são as espécies vegetais *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae, Caesalpinioideae), pertencente à mesma família e subfamília da *Copaifera langsdorffii*, e *Camellia sinensis* (Theaceae), sendo as folhas dessa última utilizadas na produção do chá verde e chá preto.

Além do isolamento e identificação estrutural, atividades biológicas já foram relatadas na literatura para os derivados galoilquínicos. Importantes resultados foram obtidos em estudos de Parker et al. (1989), os quais mostraram que esses compostos são capazes de atuar como inibidores seletivos da enzima transcriptase reversa de HIV e DNA polimerases humanas, bem como atividade anti-HIV. Além disso, como polifenóis em geral, apresentam potencial antioxidante (BOUCHET et al, 1998; BARATTO et al. 2003).

É importante destacar que os derivados galoilquínicos foram isolados pela primeira vez a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, sendo que os derivados galoilquínicos metilados são compostos inéditos na literatura.

4.6 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-UV-DAD

4.6.1 Parâmetros cromatográficos

No intuito de identificar e quantificar os derivados galoilquínicos no extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*, procedeu-se ao desenvolvimento do método analítico por CLAE-UV-DAD. Os testes iniciais foram realizados com o extrato bruto na concentração de 1 mg/mL. A princípio, empregou-se como fase estacionária a coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 µm), a qual é constituída por éter ligado a grupamento fenílico com recobrimento polar [Si-(CH₂)₃-O-C₆H₅] (Figura 50). Sua aplicação está direcionada para retenção de compostos polares e aromáticos, tais como os derivados galoilquínicos. Além disso, apresenta maior eficiência quando comparada às colunas de

octadecilsilano, pois melhora o formato das bandas cromatográficas para analitos ácidos, básicos e aromáticos com fases móveis contendo metanol.

Figura 50. Constituição química da coluna Synergi Polar-RP.

Fonte: <<http://www.allcrom.com.br/produtos/produtos-hplc/colunas-phenomenex/synergi.html>>.

A escolha do sistema de solventes para compor a fase móvel iniciou-se com os dados obtidos a partir do cromatograma na Figura 8, Página 33. A busca por um sistema de solventes ideal, capaz de proporcionar a melhor resolução possível para as bandas cromatográficas, foi um dos fatores cruciais no desenvolvimento do método. De acordo com Jardim e colaboradores (2006), se após o ajuste da força cromatográfica ainda existirem picos superpostos no cromatograma, a solução é modificar a seletividade da fase móvel até alcançar um fator de separação ideal. Para tanto, deve-se trocar um dos solventes da fase móvel, porém mantendo-se a polaridade da fase móvel constante, o que gera misturas de mesma polaridade, porém com diferentes seletividades.

Desse modo, a seletividade em CLAE de fase reversa foi alcançada variando-se solventes de seletividades diferentes, tais como acetonitrila e metanol, e utilizando-se água acidificada para ajustar a força cromatográfica da mistura. Para manter a polaridade da mistura praticamente constante, na troca dos solventes de diferentes seletividades, utilizou-se a Equação 10 (JARDIM et al., 2006).

$$\phi_C = \phi_B \times S_B / S_C \quad (\text{Equação 10})$$

Em que:

ϕ_B = fração em volume do solvente inicial;

ϕ_C = fração em volume do novo solvente;

S_B = fator força peso do solvente da mistura inicial;

S_C = fator força peso do novo solvente.

Os fatores força peso (S) em CLAE de fase reversa para acetonitrila e metanol são 3,2 e 2,6, respectivamente. Desse modo, substituindo metanol por acetonitrila obteve-se o perfil cromatográfico descrito na Figura 51. Nesse caso, a força cromatográfica do sistema foi mantida, alterando-se apenas a seletividade da fase móvel, o que não foi satisfatório, pois a acetonitrila eluiu todos os compostos em até 30 minutos, fazendo com que muitas bandas cromatográficas ficassem superpostas, fator não desejável.

Figura 51. Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii* utilizando acetonitrila como fase orgânica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) acetonitrila. Eluição em gradiente: 12-40% de B em 45 min, 40-90% de B até 48 min, 90-12% de B até 52 min, 12% de B até 60 min. Vazão: 1 mL/min.

Segundo Outinen e colaboradores (1998), a utilização de misturas de solventes orgânicos também é capaz de alterar a interação dos compostos presentes em uma mistura com a fase móvel e a fase estacionária do sistema cromatográfico, muitas vezes proporcionando melhor resolução para o cromatograma do que quando os mesmos solventes orgânicos são utilizados separadamente. Uma vez que a utilização de apenas metanol ou acetonitrila não foi suficiente para garantir a resolução das bandas cromatográficas, partiu-se para a pesquisa de fases móveis contendo misturas de ambos os solventes. O primeiro passo, foi analisar misturas metanol-acetonitrila 9:1, 1:9 e 1:1 (Figura 52).

Analisando a Figura 52-A, observou-se que a adição de 10% de acetonitrila na fase móvel foi capaz de iniciar a separação de algumas bandas cromatográficas que apenas o metanol não foi capaz de realizar (Figura 8, Página 33). De maneira análoga, a Figura 52-B mostrou que a adição de 10% de metanol na fase móvel também foi capaz de melhorar a resolução de algumas bandas cromatográficas que apenas com acetonitrila não foi possível (Figura 51). Esses dados sugeriram que misturas contendo metanol-acetonitrila seriam capazes de melhorar a resolução do sistema cromatográfico na região em que os derivados galoilquínicos aparecem. A análise cromatográfica, representada pela Figura 52-C, contendo como fase orgânica a mistura metanol-acetonitrila 1:1, apresentou resolução significativa

quando comparada com as demais. Nessas condições, poucas bandas cromatográficas ficaram superpostas, cabendo então apenas um ajuste final da fase móvel.

Figura 52. Perfis cromatográficos do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii* utilizando misturas de solventes. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol-acetonitrila 9:1, 1:9 ou 1:1. Eluição em gradiente: 10-15% de B em 5 min, 15% de B até 10 min, 15-50% de B até 60 min, 50-100% de B até 70 min, 100% de B até 75 min, 100-10% de B até 80 min, 10% de B até 85 min. Vazão: 1 mL/min.

Testou-se uma fase móvel contendo metanol-acetonitrila 4:6 como fase orgânica (Figura 53). Comparando com a Figura 52-C, houve significativa melhora na resolução das primeiras bandas, entretanto, algumas coeluíram.

Figura 53. Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii* utilizando metanol-acetonitrila 4:6 como fase orgânica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol-acetonitrila 4:6. Eluição em gradiente: 10-15% de B em 5 min, 15% de B até 10 min, 15-36% de B até 50 min, 36-100% de B até 60 min, 100% de B até 65 min, 100-10% de B até 70 min, 10% de B até 75 min. Vazão: 1 mL/min.

Na Figura 53 pode-se observar que a resolução das bandas no início do cromatograma melhorou significativamente. Entretanto algumas bandas cromatográficas coeluíram. Tendo em vista a dificuldade para encontrar um sistema de fases móveis ideal para a separação de compostos altamente polares, como aqueles observados no início do cromatograma, optou-se por manter a proporção metanol-acetonitrila 4:6 e utilizar outro modificador de fase móvel para tentar separar as bandas superpostas. Dentre os solvente orgânicos testados, o *iso*-propanol mostrou-se capaz de promover a separação das bandas cromatográficas que coeluíram (Figura 53) e ao mesmo tempo manter a resolução das demais bandas cromatográficas (Figura 54).

Figura 54. Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii* utilizando *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6 como fase orgânica. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6. Eluição em gradiente: 10-15% de B em 20 min, 15-36% de B até 70 min, 36-100% de B até 75 min, 100% de B até 80 min, 100-10% de B até 85 min, 10% de B até 90 min. Vazão: 1 mL/min.

Desse modo, a melhor fase móvel encontrada para o desenvolvimento do método analítico foi composta por ácido fórmico-água na proporção 0,1:99,9 (bomba A) e *iso*-propanol-metanol-acetonitrila na proporção 0,5:4:6 (bomba B) em gradiente (Figura 54).

Após a determinação do sistema de fases móveis e dos parâmetros cromatográficos, verificou-se que o tempo de análise utilizando a coluna analítica Synergi Polar-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m) atingiu 70 minutos, além do tempo necessário para limpeza e estabilização da coluna cromatográfica entre as análises, que foi de 20 minutos. Esse fator seria um grande inconveniente, visto o tempo e a quantidade de solvente orgânico que seriam gastos durante a validação do método e nos estudos de sazonalidade. Desse modo, optou-se por otimizar o método desenvolvido.

4.6.2 Otimização do método analítico desenvolvido

Os tempos das análises de matrizes complexas por CLAE convencional normalmente são elevados, às vezes maiores que uma hora. Tal fato foi observado durante o desenvolvimento do método analítico para o extrato das folhas de *Copaifera langsdorffii*, que chegou a atingir 90 minutos. Conforme demonstrado por Nguyen et al. (2006), separações eficientes podem ser alcançadas em menores tempos de análise, quando são empregadas colunas com partículas menores. Essas partículas podem ser empregadas com duas finalidades: realizar análises rápidas, uma vez que uma boa eficiência pode ser mantida, mesmo com colunas curtas e alta velocidade linear da fase móvel, e resoluções mais altas podem ser alcançadas com colunas mais longas e velocidade da fase móvel próxima aos valores ótimos.

A transferência de um método com coluna convencional para coluna com partículas de diâmetro próximos a 2 μ m pode levar em conta as diferentes necessidades analíticas. Se as dimensões da coluna são mantidas e somente o tamanho da partícula é reduzido, melhorias na eficiência, na resolução e na capacidade de picos são obtidas. Se além da redução no tamanho da partícula, as dimensões da coluna também forem reduzidas, o tempo de análise também será menor. Em ambos os casos, a vazão, o perfil do gradiente e o volume de amostra injetado devem ser ajustados adequadamente.

Visando reduzir o tempo do método desenvolvido por CLAE-UV-DAD para análise do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*, optou-se por alterar o tamanho da partícula da fase estacionária e as dimensões da coluna cromatográfica. Desse modo, o método analítico 1, desenvolvido com a coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m), teve alguns de seus parâmetros cromatográficos alterados para gerar o método analítico 2, desenvolvido com a coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 μ m).

Para transferir o método analítico para a coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 μ m) e garantir sua equivalência cromatográfica foi necessário diminuir proporcionalmente

a vazão, o volume injetado e o gradiente da fase móvel conforme as etapas 1, 2 e 3 detalhadas a seguir e baseadas nos trabalhos de Pereira (2008).

Etapla 1. Ajuste da vazão para que a velocidade linear fosse mantida nos métodos 1 e 2:

$$F_2 = F_1 \times (d_{c2}^2 / d_{c1}^2) \times (d_{p1} / d_{p2}) \quad (\text{Equação 12})$$

Em que:

F_1 = vazão original (mL/min);

F_2 = nova vazão (mL/min);

d_{c1} = diâmetro interno da coluna original (mm);

d_{c2} = novo diâmetro interno da coluna (mm);

d_{p1} = tamanho da partícula (μm);

d_{p2} = novo tamanho da partícula (μm);

Sendo assim,

$$F_2 = 1,0 \times (3,0^2 / 4,6^2) \times (4,0 / 2,5)$$

$$F_2 = 0,68 \text{ mL/min}$$

Etapla 2. Ajuste do volume de injeção:

$$V_{i2} = V_{i1} \times (d_{c2}^2 \times L_2 / d_{c1}^2 \times L_1) \quad (\text{Equação 13})$$

Em que:

V_{i1} = volume original de injeção (μL);

V_{i2} = novo volume de injeção (μL);

d_{c1} = diâmetro interno da coluna original (mm);

d_{c2} = novo diâmetro interno da coluna (mm);

L_1 = comprimento original da coluna (mm);

L_2 = novo comprimento da coluna (mm).

Sendo assim,

$$V_{i2} = 20 \times (3,0^2 \times 100 / 4,6^2 \times 150)$$

$$V_{i2} = 5,67 \text{ μL}$$

Etapas 3. Ajuste do perfil do gradiente da fase móvel:

O método 1 apresenta dois segmentos principais, um gradiente linear de 10 a 15% de B até 20 minutos, seguido por outro gradiente linear de 15 a 36% de B até 70 minutos. Para transferir essas condições para a coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 μm), foi necessário calcular a razão entre o volume de fase móvel e o volume da coluna em cada segmento do método 1.

Primeiramente, foi calculado o volume de fase móvel (V_{FM}) gasto em cada segmento:

Para o segmento 1:

$$V_{FM} = \text{vazão} \times \text{duração do segmento}$$

$$V_{FM} = 1 \text{ mL/min} \times 20 \text{ min}$$

$$V_{FM} = \mathbf{20 \text{ mL}}$$

Para o segmento 2:

$$V_{FM} = \text{vazão} \times \text{duração do segmento}$$

$$V_{FM} = 1 \text{ mL/min} \times 50 \text{ min}$$

$$V_{FM} = \mathbf{50 \text{ mL}}$$

Em seguida, foi determinado o volume da coluna (V_C) utilizada no método 1, através da Equação 14.

$$V_C = 0,68 \times \pi \times r^2 \times L \quad (\text{Equação 14})$$

Em que:

V_C = volume da coluna em mL;

r = raio da coluna (cm);

L = comprimento da coluna (cm);

0,68 = fator que corrige o volume da coluna, levando em consideração seu volume morto.

Sendo assim,

$$V_{CI} = 0,68 \times 3,14 \times 0,23^2 \times 15$$

$$V_{CI} = \mathbf{1,69 \text{ mL}}$$

Com os dados de V_M e V_C em mãos, foi possível calcular a razão (R) entre os volumes de fase móvel e da coluna em cada segmento:

Para o segmento 1:

$$R = 20 \text{ mL} / 1,69 \text{ mL}$$

$$R = 11,83$$

Para o segmento 2:

$$R = 50 \text{ mL} / 1,69 \text{ mL}$$

$$R = 29,59$$

No método 2, os segmentos precisam ter a mesma razão R para manter a integridade cromatográfica. Sendo assim, a partir da razão R (calculada acima) e do volume da coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 μm), o volume de fase móvel em cada segmento do novo método foi calculado:

Cálculo do volume da coluna do método 2:

$$V_{C2} = 0,68 \times 3,14 \times 0,15^2 \times 10$$

$$V_{C2} = 0,48 \text{ mL}$$

Cálculo do volume de fase móvel para o método 2:

Para o segmento 1:

$$V_{FM} = R \times \text{volume da coluna}$$

$$V_{FM} = 11,83 \times 0,48 \text{ mL}$$

$$V_{FM} = 5,68 \text{ mL}$$

Para o segmento 2:

$$V_{FM} = R \times \text{volume da coluna}$$

$$V_{FM} = 29,59 \times 0,48 \text{ mL}$$

$$V_{FM} = 14,20 \text{ mL}$$

A partir do volume de fase móvel em cada segmento e da vazão (calculado na etapa 1), a duração de cada segmento do método 2 foi determinada em unidade de tempo:

Para o segmento 1:

Duração do segmento = Volume de fase móvel / Vazão

Duração do segmento = 5,68 mL / 0,68 mL/min = 8,33 min

Para o segmento 2:

Duração do segmento = Volume de fase móvel / Vazão

Duração do segmento = 14,20 mL / 0,68 mL/min = 20,84 min

Na Tabela 33 apresentam-se os cálculos de transferência do método 1 (coluna Synergi Polar-RP, 150 x 4,6 mm, 4 µm) para o método 2 (coluna Synergi Polar-RP, 100 x 3,0 mm, 2,5 µm). Os perfis cromatográficos dos métodos 1 e 2 estão apresentados na Figura 55.

Tabela 33. Condições cromatográficas empregadas para transferência do método analítico 1 para o 2.

Método 1					Método 2				
Coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm)					Coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm)				
Volume da coluna: 1,69 mL					Volume da coluna: 0,48 mL				
Volume injetado: 20 µL					Volume injetado: 5,67 µL				
Vazão: 1,0 mL/min					Vazão: 0,68 mL/min				
V _{FM} /V _{FE}	A (%)	B (%)	V _{FM} (mL)	T (min)	V _{FM} /V _{FE}	A (%)	B (%)	V _{FM} (mL)	T (min)
0	90	10	0	0	0	90	10	0	0
11,83	85	15	20	20	11,83	85	15	5,68	8,33
29,59	64	36	50	70	29,59	64	36	14,20	29,17

A (%) = ácido fórmico-água 0,1:99,9; B (%) = *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6; V_{FM}/V_{FE} = Razão entre o volume da fase móvel e o volume da fase estacionária.

Figura 55. Cromatogramas obtidos com os métodos 1 e 2 para o extrato bruto das folhas de *Copaifera langsdorffii*. 1-16, derivados galoilquínicos; Q, quercitrina; A, afzelina.

A economia de tempo e de solvente alcançada pela transferência do método está ilustrada na Tabela 34. Reduções de aproximadamente duas vezes no tempo de análise e de três vezes no consumo de solvente foram observadas nas análises realizadas.

Tabela 34. Economia de tempo e de solvente com a transferência do método.

Parâmetros	Método 1	Método 2
	Coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,6 mm, 4 µm)	Coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm)
Duração da análise (min)	70	29,23
Duração da análise + limpeza (min)	90	37,5
Economia de tempo	-	2,4 vezes
Solvente gasto por análise (mL)	90	25,5
Economia de solvente	-	3,5 vezes

Por meio da análise dos cromatogramas apresentados na Figura 55, foi possível constatar que a transferência do método foi qualitativamente satisfatória, visto que todas as bandas cromatográficas observadas pelo método 1 também foram observadas no método 2. Além disso, analisando-se o cromatograma obtido a partir do método 2, observa-se que algumas bandas cromatográficas começaram a se desdobrar, indicando a presença de dois ou mais compostos superpostos. Isso foi verificado para a banda cromatográfica outrora designada apenas para AGQ-4, assim como para as duas bandas cromatográficas visualizadas logo após AGQ-9.

O método 2 promoveu pequena superposição das bandas cromatográficas referentes aos derivados galoilquínicos AGQ-12 e AGQ-13, AGQ-3 e AGQ-14, bem como AGQ-9 e AGQ-15. Foi observado que tal superposição aumentava na medida em que a coluna cromatográfica se saturava. Alguns testes foram realizados na tentativa de melhorar a resolução dessas bandas cromatográficas, porém nenhum êxito foi alcançado com relação à AGQ-12 e AGQ-13. Já a resolução de AGQ-3 e AGQ-14 melhoraram ao se adicionar tetraidrofurano na fase orgânica no lugar do *iso*-propanol na mesma proporção. Porém, AGQ-9 e AGQ-15 coeluíram. Misturas desses dois solventes orgânicos também foram testadas, embora nenhum êxito tenha sido alcançado. Portanto, foi determinado que o sistema de solventes da fase móvel seria mantido e que para evitar ainda mais superposições de bandas cromatográficas, a coluna seria limpa e estabilizada a cada cinco análises.

4.6.3 Preparo da amostra

Após a escolha das condições cromatográficas, procedeu-se à determinação do preparo da amostra. O estudo comparativo envolvendo a proporção do solvente extrator e o tempo de

extração para as folhas de *Copaifera langsdorffii* foi realizado previamente por Sousa (2011), o qual determinou que a condição de extração ideal para quantificar os principais compostos fenólicos presentes nas folhas dessa espécie envolvia o uso de solução hidroalcoólica 70% por um período de extração de 60 minutos. Tais condições foram empregadas para o preparo das amostras no presente trabalho. Visando facilitar o processo e diminuir eventuais erros de pesagem, bem como definir uma alíquota representativa do material vegetal, a quantidade da amostra foi estabelecida em 100 mg. A extração do material vegetal foi realizada em agitador mecânico do tipo Shaker a 30°C e 120 rpm. Além disso, determinou-se que a extração seria realizada com 20 mL de solvente, volume suficiente para esgotar o material vegetal nas condições estipuladas.

O extrato hidroalcoólico obtido no final do processo de extração foi filtrado e particionado com solvente orgânico, hexano, como técnica de preparo da amostra. Esse procedimento se fez necessário para minimizar a retenção de compostos apolares na coluna cromatográfica e aumentar seu tempo de vida útil. Análises prévias realizadas por CLAE-UV-DAD com o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii*, sem e com partição com hexano, não demonstraram diferenças qualitativas e quantitativas significativas, permitindo o uso dessa técnica.

4.7 Estimativa da pureza dos padrões analíticos

Tendo em vista a carência de padrões de referência disponíveis comercialmente, os derivados galoilquínicos isolados foram utilizados como padrões analíticos. Embora a Resolução RE 899/2003 estabeleça que só devem ser utilizados padrões de referência oficializados pela Farmacopeia Brasileira para validação de métodos analíticos, ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente, a mesma resolução diz que no caso da inexistência desses padrões, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor dos mesmos sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2003). Esse é também o entendimento da RDC 17/2010 que declara no Artigo 187 que devem ser utilizados padrões de referência oficiais, sempre que existirem e, na ausência desses, devem ser utilizados padrões de referência devidamente caracterizados. No Artigo 188 da RDC 17/2010 afirma-se que um padrão de referência não adquirido de uma farmacopeia reconhecida deve ser do mais elevado grau de pureza possível de ser obtido e cuidadosamente caracterizado a fim de garantir sua identidade, teor, qualidade, pureza e potência (BRASIL, 2010b).

Sendo assim, a estimativa da pureza dos derivados galoilquínicos isolados foi estimada por meio das técnicas cromatográficas de CLAE-UV-DAD e espectroscópicas RMN de ^1H e ^{13}C . Tais dados podem ser verificados nas Figuras 21-28 (Páginas 56-63) e nos Apêndices 1 a 48, respectivamente.

Dois flavonoides majoritários presentes nas folhas de *Copaifera langsdorffii*, quercetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo (afzelina), também foram utilizados como padrões analíticos. Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 2. As alunas de doutorado Juliana de Carvalho da Costa e Mariza Abreu Miranda isolaram e forneceram a quercitrina e a afzelina, respectivamente, para elaboração da curva analítica. A pureza desses compostos foi verificada através das análises realizadas por CLAE-UV-DAD (Figura 56).

O ácido ferúlico e a quercetina foram escolhidos como padrões interno e secundário, respectivamente, para validação do método. A pureza desses padrões foi avaliada por CLAE-UV-DAD (Figura 57).

Figura 56. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD da quercitrina e da afzelina. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6. Eluição em gradiente: 10-15% de B em 8,33 min, 15-36% de B até 29,17 min, 36-100% de B até 31,25 min; 100% de B até 33,33 min, 100-10% de B até 35,42 min, 10% de B até 37,5 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 0,68 mL/min.

Figura 57. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD do ácido ferúlico e da quercetina. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6. Eluição em gradiente: 10-15% de B em 8,33 min, 15-36% de B até 29,17 min, 36-100% de B até 31,25 min; 100% de B até 33,33 min, 100-10% de B até 35,42 min, 10% de B até 37,5 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 0,68 mL/min.

4.8 Validação de método analítico por CLAE-UV-DAD

4.8.1 Seletividade

Para determinar a seletividade do método analítico, os perfis cromatográficos dos padrões e do extrato foram analisados separadamente e em triplicata através do método analítico 2. Além disso, foi realizada uma análise cromatográfica com os padrões utilizando o método analítico 1, apenas para fins de comparação (Figura 58). Parâmetros como tempo de retenção (T_r), largura da base do pico (W_b), número de pratos teóricos (N) e resolução (R_s) foram calculados e avaliados. Seus valores, bem como seus respectivos CV(%), encontram-se nas Tabelas 35 e 36.

Figura 58. Perfis cromatográficos dos padrões analíticos e do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*. 1-16, derivados galoilquínicos; pi, padrão interno; Q, quercitrina; A, afzelina.

Tabela 35. Avaliação da seletividade do método analítico para os padrões por meio da análise do tempo de retenção (T_r), largura da base do pico (W_b), número de pratos teóricos (N), resolução (R_s) e seus respectivos coeficientes de variação CV(%).

Análise dos padrões	$T_r \pm DP$ (min)	CV(%)	$W_b \pm DP$ (min)	CV(%)
AGQ-1	$1,89 \pm 0,02$	1,05	$0,20 \pm 0,01$	3,03
AGQ-4	$4,16 \pm 0,03$	0,83	$0,38 \pm 0,01$	2,98
AGQ-10	$6,41 \pm 0,06$	0,92	$0,52 \pm 0,01$	1,78
AGQ-11	$7,31 \pm 0,06$	0,85	$0,36 \pm 0,01$	2,55
AGQ-2	$7,64 \pm 0,06$	0,75	$0,48 \pm 0,01$	3,01
AGQ-7	$8,34 \pm 0,08$	0,93	$0,53 \pm 0,02$	4,47
AGQ-5	$10,89 \pm 0,08$	0,72	$0,53 \pm 0,02$	4,17
AGQ-6	$11,57 \pm 0,06$	0,52	$0,53 \pm 0,02$	2,94
AGQ-12	$12,23 \pm 0,02$	0,13	$0,36 \pm 0,01$	4,07
AGQ-13	$12,51 \pm 0,02$	0,16	$0,44 \pm 0,01$	2,29
AGQ-3	$13,18 \pm 0,03$	0,25	$0,35 \pm 0,01$	3,75
AGQ-14	$13,43 \pm 0,03$	0,25	$0,54 \pm 0,01$	2,10
Ácido ferúlico	$15,10 \pm 0,02$	0,13	$0,56 \pm 0,01$	1,25
AGQ-8	$16,18 \pm 0,05$	0,33	$0,42 \pm 0,02$	3,76
AGQ-15	$16,69 \pm 0,08$	0,50	$0,36 \pm 0,01$	1,94
AGQ-9	$17,07 \pm 0,08$	0,47	$0,36 \pm 0,01$	4,15
Quercitrina	$22,57 \pm 0,09$	0,41	$0,44 \pm 0,02$	3,89
AGQ-16	$23,73 \pm 0,10$	0,41	$0,55 \pm 0,01$	2,12
Afzelina	$25,62 \pm 0,04$	0,16	$0,52 \pm 0,02$	3,84
Análise dos padrões	$N \pm DP$	CV(%)	$R_s \pm DP$	CV(%)
AGQ-1	$1451,35 \pm 110,54$	7,62	$19,04 \pm 0,72$	3,77
AGQ-4	$1906,20 \pm 85,08$	4,46	$7,84 \pm 0,04$	0,54
AGQ-10	$2429,77 \pm 69,61$	2,86	$4,99 \pm 0,05$	0,94
AGQ-11	$6483,55 \pm 328,97$	5,07	$2,05 \pm 0,11$	5,25
AGQ-2	$3994,70 \pm 294,87$	7,38	$0,77 \pm 0,05$	6,67
AGQ-7	$3999,05 \pm 298,27$	7,46	$1,39 \pm 0,08$	5,67
AGQ-5	$6712,94 \pm 590,78$	8,80	$4,81 \pm 0,12$	2,57
AGQ-6	$7756,58 \pm 496,29$	6,40	$1,28 \pm 0,01$	1,03
AGQ-12	$18861,60 \pm 1587,51$	8,42	$1,48 \pm 0,09$	6,24
AGQ-13	$13151,78 \pm 565,97$	4,30	$0,73 \pm 0,01$	1,06
AGQ-3	$23343,06 \pm 1664,71$	7,13	$1,71 \pm 0,01$	0,73
AGQ-14	$9930,49 \pm 376,64$	3,79	$0,57 \pm 0,03$	6,07
Ácido ferúlico	$11825,73 \pm 319,90$	2,71	$3,04 \pm 0,04$	1,24
AGQ-8	$23672,40 \pm 1665,97$	7,04	$2,20 \pm 0,05$	2,45
AGQ-15	$34865,62 \pm 1727,24$	4,95	$1,32 \pm 0,08$	5,86
AGQ-9	$36754,50 \pm 2635,04$	7,17	$1,06 \pm 0,02$	2,09
Quercitrina	$42754,26 \pm 2900,59$	6,78	$13,87 \pm 0,50$	3,60
AGQ-16	$29811,04 \pm 1510,55$	5,07	$2,34 \pm 0,10$	4,24
Afzelina	$39349,18 \pm 2811,46$	7,14	$3,54 \pm 0,13$	3,68

Tabela 36. Avaliação da seletividade do método analítico para o extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* através da análise do tempo de retenção (T_r), largura da base do pico (W_b), número de pratos teóricos (N), resolução (R_s) e seus respectivos coeficientes de variação CV(%).

Análise das amostras	$T_r \pm DP$ (min)	CV(%)	$W_b \pm DP$ (min)	CV(%)
AGQ-1	2,17 $\pm$ 0,05	2,21	0,16 $\pm$ 0,01	2,18
AGQ-10	6,49 $\pm$ 0,04	0,57	0,45 $\pm$ 0,01	3,17
AGQ-11	7,40 $\pm$ 0,06	0,82	0,31 $\pm$ 0,01	3,25
AGQ-2	7,72 $\pm$ 0,07	0,95	0,39 $\pm$ 0,01	2,03
AGQ-7	8,40 $\pm$ 0,04	0,48	0,35 $\pm$ 0,01	2,94
AGQ-5	11,09 $\pm$ 0,10	0,89	0,44 $\pm$ 0,01	2,96
AGQ-6	11,79 $\pm$ 0,13	1,07	0,56 $\pm$ 0,02	4,44
AGQ-12	12,40 $\pm$ 0,10	0,79	0,40 $\pm$ 0,01	3,53
AGQ-13	12,70 $\pm$ 0,10	0,78	0,37 $\pm$ 0,01	0,93
AGQ-3	13,39 $\pm$ 0,12	0,86	0,30 $\pm$ 0,01	2,55
AGQ-14	13,65 $\pm$ 0,12	0,89	0,45 $\pm$ 0,02	3,75
Ácido ferúlico	15,33 $\pm$ 0,09	0,56	0,51 $\pm$ 0,02	4,04
AGQ-8	16,39 $\pm$ 0,10	0,62	0,41 $\pm$ 0,01	1,16
AGQ-15	16,89 $\pm$ 0,09	0,53	0,37 $\pm$ 0,01	2,46
AGQ-9	17,28 $\pm$ 0,08	0,48	0,37 $\pm$ 0,01	1,79
Quercitrina	22,76 $\pm$ 0,03	0,15	0,43 $\pm$ 0,01	2,54
AGQ-16	23,81 $\pm$ 0,01	0,06	0,32 $\pm$ 0,01	2,44
Afzelina	25,76 $\pm$ 0,02	0,08	0,33 $\pm$ 0,01	4,43
Análise das amostras	$N \pm DP$	CV(%)	$R_s \pm DP$	CV(%)
AGQ-1	2976,47 $\pm$ 35,37	1,19	1,50 $\pm$ 0,08	5,10
AGQ-10	3377,74 $\pm$ 245,78	7,28	5,72 $\pm$ 0,24	4,21
AGQ-11	9036,93 $\pm$ 588,06	6,51	2,40 $\pm$ 0,13	5,30
AGQ-2	6342,12 $\pm$ 299,63	4,72	0,91 $\pm$ 0,04	4,58
AGQ-7	9515,85 $\pm$ 658,86	6,92	1,88 $\pm$ 0,07	3,95
AGQ-5	10178,53 $\pm$ 481,59	4,73	6,84 $\pm$ 0,15	2,16
AGQ-6	7067,60 $\pm$ 700,93	9,92	1,39 $\pm$ 0,07	5,34
AGQ-12	15735,87 $\pm$ 1376,03	8,74	1,28 $\pm$ 0,04	3,04
AGQ-13	18728,12 $\pm$ 392,97	2,10	0,77 $\pm$ 0,02	2,81
AGQ-3	31415,74 $\pm$ 1263,63	4,02	2,05 $\pm$ 0,10	4,64
AGQ-14	15063,68 $\pm$ 1434,71	9,52	0,69 $\pm$ 0,03	4,32
Ácido ferúlico	14547,36 $\pm$ 1348,16	9,27	3,53 $\pm$ 0,07	1,93
AGQ-8	25095,37 $\pm$ 404,02	1,61	2,29 $\pm$ 0,08	3,38
AGQ-15	32879,07 $\pm$ 1875,51	5,70	1,26 $\pm$ 0,03	2,08
AGQ-9	35540,47 $\pm$ 344,31	0,97	1,07 $\pm$ 0,03	2,92
Quercitrina	45453,98 $\pm$ 2172,60	4,78	3,39 $\pm$ 0,06	1,82
AGQ-16	87154,27 $\pm$ 4084,02	4,69	2,81 $\pm$ 0,13	4,46
Afzelina	98891,46 $\pm$ 8922,99	9,02	2,64 $\pm$ 0,17	6,29

Por meio dos resultados obtidos foi possível determinar a seletividade da fase móvel com relação aos compostos de interesse, bem como determinar a eficiência da coluna cromatográfica. De modo geral, valores de N maiores que 2000 para cromatografia de fase líquida indicam excelente eficiência da coluna (RIBANI et al., 2004). Tal fato foi observado para a maior parte dos padrões analisados, sendo que apenas AGQ-1 e AGQ-4 não se enquadraram nesse quesito.

Quanto ao CV(%), considerando determinações na escala macro, com amostras de baixa para média complexidade, valores até 5% são aceitáveis. Já para amostras de alta complexidade, determinadas na escala micro ou traços, estes valores podem atingir até 20%. Além disso, em amostras que envolvam a quantificação de componentes em fluidos biológicos, valores de coeficientes de variação podem ser adequados até próximos de 50% (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Uma vez que os compostos de interesse são encontrados na escala micro na amostra, constatou-se que os valores de CV(%) não ultrapassaram 10%, atendendo aos requisitos das referências e agências regulamentadoras consultadas.

Quanto à resolução, segundo Collins e colaboradores (2005), valores de R_s iguais a 1,0 indicam que os dois picos adjacentes estão razoavelmente separados, com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Valores maiores de resolução indicam melhor separação: R_s igual a 1,25 é suficiente para fins quantitativos e R_s superior a 1,5 indica separação completa. Levando-se em consideração a complexidade da amostra em estudo, tais critérios foram adotados na seleção dos compostos a serem quantificados.

Os compostos AGQ-2, AGQ-13 e AGQ-14 apresentaram valores de R_s inferiores a 1,0. Tais valores foram calculados levando-se em consideração o tempo de retenção e a largura da base desses compostos, bem como de seus picos adjacentes à esquerda, que são os compostos AGQ-11, AGQ-12 e AGQ-3, respectivamente. Sendo assim, embora esses três últimos compostos apresentem valores de R_s superiores a 1,5, seus cálculos não levaram em consideração a superposição de suas bandas cromatográficas com àquelas referentes aos seus picos adjacente à direita. Portanto, esses seis compostos não foram selecionados para os estudos de quantificação por CLAE-UV-DAD. Além disso, através da comparação dos perfis cromatográficos obtidos para os padrões e para a amostra, constatou-se que a banda cromatográfica referente ao composto AGQ-4 estava superposta com pelo menos mais um composto, o que também impediu sua quantificação por CLAE-UV-DAD.

Já os valores de R_s para os compostos AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina e afzelina foram superiores a 1,25 e, desse modo, foram passíveis de quantificação. O padrão interno (ácido ferúlico) apresentou valores de R_s iguais a 3,04 e 3,53 para as análises dos padrões e da amostra, respectivamente, o que determina sua boa separação com relação aos demais compostos presentes nas amostras. Além disso, o composto AGQ-9, mesmo apresentando R_s entre 1,0 e 1,25 tanto nas análises dos padrões quanto nas análises da amostra, foi selecionado para quantificação, deixando-se

claro que uma pequena margem de erro ficou inerente à sua quantificação. Portanto, foram selecionados nove derivados galoilquínicos para serem utilizados como padrões durante a validação do método, bem como os flavonoides quercitrina e afzelina, devido aos resultados obtidos para o parâmetro resolução.

Observando os dados obtidos, pode-se dizer que o método analítico desenvolvido foi seletivo para os derivados galoilquínicos selecionados e para os flavonoides afzelina e quercitrina, uma vez que a resolução foi satisfatória para suas bandas cromatográficas tanto na análise dos padrões quanto na do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*.

4.8.2 Linearidade

Os dados obtidos para a elaboração das curvas analíticas para os compostos AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina, afzelina, quercetina e ácido ferúlico, bem como os resultados dos parâmetros estatísticos obtidos a partir das mesmas estão presentes nas Tabelas 37-40. Já nas Figuras 59 e 60 encontram-se as curvas analíticas e seus respectivos coeficientes de determinação.

No intervalo de linearidade avaliado para cada composto, as regressões lineares apresentaram coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99, atendendo às exigências da ANVISA (BRASIL, 2003), bem como razões entre os valores de F calculado e F tabelado para a regressão superiores a 1. Ainda, os modelos de regressão linear propostos se mostraram bem ajustados considerando que não houve significância do parâmetro de falta de ajuste ou *Lack of fit* ($p \geq 0,05$) e que as razões entre os valores de F calculado e F tabelado da falta de ajuste foram inferiores a 1. Estes resultados confirmam a linearidade do método no intervalo de concentração de cada composto analisado, estando os parâmetros estimados em conformidade com os preconizados pela literatura (PIMENTEL e BARROS, 1996; ICH, 2006; RIBEIRO et al., 2008).

Tabela 37. Dados obtidos para construção da curva analítica de AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8 e AGQ-9.

AGQ-1			AGQ-7		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
40,00	313079 ± 1566,86	0,50	39,38	420283 ± 10081,29	2,40
30,00	232820 ± 5166,94	2,22	26,25	276904 ± 5117,64	1,85
20,00	157568 ± 3471,60	2,20	19,69	206194 ± 3654,93	1,77
15,00	116024 ± 3274,98	2,82	13,13	139033 ± 3404,19	2,45
10,00	78563 ± 3070,08	3,91	9,84	101211 ± 1459,00	1,44
7,50	58790 ± 1884,49	3,21	6,56	68325 ± 1055,30	1,54
5,00	39605 ± 254,01	0,64	4,92	49110 ± 2247,05	4,58
3,75	29202 ± 946,79	3,24	3,28	33885 ± 295,60	0,87
2,50	20199 ± 143,39	0,71	2,46	25336 ± 535,81	2,11
AGQ-5			AGQ-6		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
110,00	1313212 ± 37381,83	2,85	100,00	1165016 ± 28143,54	2,42
82,50	956631 ± 15797,77	1,65	75,00	853217 ± 22248,74	2,61
55,00	640869 ± 25541,46	3,99	50,00	568942 ± 22791,27	4,01
41,25	474159 ± 10584,86	2,23	37,50	421256 ± 6364,56	1,51
27,50	315414 ± 6344,14	2,01	25,00	282615 ± 9772,99	3,46
20,63	233788 ± 7414,26	3,17	18,75	207004 ± 5867,83	2,83
13,75	158886 ± 3758,37	2,37	12,50	140712 ± 2363,58	1,68
10,31	115282 ± 2220,34	1,93	9,38	103130 ± 3769,68	3,66
6,88	78813 ± 1750,24	2,22	6,25	69077 ± 738,00	1,07
5,16	57553 ± 2213,98	3,85	4,69	53481 ± 2169,74	4,06
3,44	38491 ± 646,27	1,68	3,13	34976 ± 1301,93	3,72
2,58	29205 ± 344,90	1,18	2,34	27503 ± 1300,85	4,73
AGQ-8			AGQ-9		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
110,00	1266915 ± 27911,91	2,20	100,00	1272931 ± 32678,73	2,57
82,50	933858 ± 12295,17	1,32	75,00	937792 ± 8711,38	0,93
55,00	624611 ± 15789,59	2,53	50,00	626310 ± 18733,16	2,99
41,25	466143 ± 7574,87	1,63	37,50	467587 ± 8334,09	1,78
27,50	310915 ± 5697,49	1,83	25,00	310203 ± 4233,16	1,36
20,63	230631 ± 4030,72	1,75	18,75	231661 ± 7600,12	3,28
13,75	157824 ± 2060,97	1,31	12,50	155424 ± 3317,56	2,13
10,31	114237 ± 2858,61	2,50	9,38	113186 ± 728,51	0,64
6,88	76669 ± 415,53	0,54	6,25	77431 ± 2884,83	3,73
5,16	56589 ± 2704,53	4,78	4,69	55243 ± 2104,09	3,81
3,44	37857 ± 330,50	0,87	3,13	38402 ± 1736,56	4,52
2,58	28984 ± 1124,08	3,88	2,34	27507 ± 692,21	2,52

Tabela 38. Dados obtidos para construção da curva analítica de AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina, afzelina, ácido ferúlico e quercetina.

AGQ-10			AGQ-15		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
110,00	1114239 ± 11958,43	1,07	110,00	1306239 ± 34886,98	2,67
82,50	829860 ± 10757,86	1,30	82,50	965638 ± 9405,10	0,97
55,00	538065 ± 15052,05	2,80	55,00	644898 ± 18154,95	2,82
41,25	398209 ± 5908,96	1,48	41,25	481829 ± 10836,24	2,25
27,50	263312 ± 3411,09	1,30	27,50	318807 ± 2584,90	0,81
20,63	194711 ± 4663,74	2,40	20,63	236040 ± 5744,12	2,43
13,75	131542 ± 2046,54	1,56	13,75	146826 ± 3538,52	2,41
10,31	97188 ± 552,58	0,57	10,31	106369 ± 2090,18	1,97
6,88	66380 ± 1710,33	2,58	6,88	71124 ± 2230,43	3,14
5,16	46847 ± 2259,52	4,82	5,16	52202 ± 2439,36	4,67
3,44	32133 ± 964,63	3,00	3,44	33281 ± 666,68	2,00
2,58	23168 ± 337,97	1,46	2,58	24705 ± 338,52	1,37
AGQ-16			Quercitrina		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
110,00	1094742 ± 14356,59	1,31	110,00	619593 ± 6645,82	1,07
82,50	813799 ± 5945,77	0,73	82,50	462865 ± 6161,82	1,33
55,00	547260 ± 8785,84	1,61	55,00	313534 ± 5112,07	1,63
41,25	414510 ± 4412,63	1,06	41,25	229619 ± 1862,31	0,81
27,50	269742 ± 3728,95	1,38	27,50	150963 ± 1541,13	1,02
20,63	196826 ± 5174,16	2,63	20,63	112248 ± 1217,82	1,08
13,75	126244 ± 1248,51	0,99	13,75	76965 ± 109,29	0,14
10,31	92668 ± 1255,03	1,35	10,31	54956 ± 2141,64	3,90
6,88	62833 ± 2059,32	3,28	6,88	35261 ± 202,75	0,57
5,16	44239 ± 2059,53	4,66	5,16	25325 ± 1216,97	4,81
3,44	30507 ± 1151,52	3,77	3,44	16585 ± 206,00	1,24
2,58	23726 ± 547,50	2,31	2,58	12320 ± 43,82	0,36
Afzelina			Ácido ferúlico		
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)	C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)
105,00	593856 ± 7660,60	1,29	110,00	1573954 ± 31999,39	2,03
78,75	444354 ± 5085,70	1,14	82,50	1168684 ± 1928,35	0,17
52,50	298328 ± 9812,05	3,29	55,00	778845 ± 16058,93	2,06
39,38	222447 ± 4167,99	1,87	41,25	587355 ± 11457,30	1,95
26,25	146724 ± 2130,86	1,45	27,50	385639 ± 786,17	0,20
19,69	108312 ± 2625,18	2,42	20,63	289378 ± 5768,11	1,99
13,13	72667 ± 1555,24	2,14	13,75	192849 ± 3597,36	1,87
9,84	52572 ± 56,40	0,11	10,31	140217 ± 2060,17	1,47
6,56	34896 ± 343,66	0,98	6,88	94849 ± 1571,82	1,66
4,92	25136 ± 1068,69	4,25	5,16	69962 ± 3258,09	4,66
3,28	16345 ± 566,61	3,47	3,44	46668 ± 705,57	1,51
2,46	11990 ± 384,01	3,20	2,58	35142 ± 794,93	2,26
Quercetina					
C (µg/mL)	Área ± DP	CV (%)			
210,00	1479610 ± 14983,51	1,01			
157,50	1093822 ± 7376,79	0,67			
105,00	741664 ± 4872,02	0,66			
78,75	537050 ± 13822,22	2,57			
52,50	363935 ± 2479,11	0,68			
39,38	270219 ± 2897,51	1,07			
26,25	175983 ± 2300,97	1,31			
19,69	130727 ± 438,79	0,34			

Tabela 39. Resultados da linearidade para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9 e AGQ-10.

AGQ-1	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	1,875 – 40,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 7805x + 133,1$ (0,9994)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 28 g.l.) (P)	35240,93 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 28 g.l.)	8398,75
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 8, 20 g.l.) (P)	0,37 (0,923)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 8, 20 g.l.)	0,151
AGQ-5	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,58 – 110,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 11845x - 6428$ (0,9987)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	12692,85 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	3073,32
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,68 (0,732)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,302
AGQ-6	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,34 – 100,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 11573x - 5212$ (0,9988)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	14308,06 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	3464,41
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,49 (0,878)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,217
AGQ-7	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,46 – 39,38
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 10688x - 2357$ (0,9991)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 25 g.l.) (P)	15369,35 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 25 g.l.)	3623,39
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 7, 18 g.l.) (P)	0,18 (0,986)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 7, 18 g.l.)	0,070
AGQ-8	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,58 – 110,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 11466x - 3491$ (0,9994)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	24162,36 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	5850,43
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,44 (0,913)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,195
AGQ-9	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,34 – 100,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 12680x - 4605$ (0,9992)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	19614,79 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	4749,32
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,36 (0,954)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,160
AGQ-10	
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	2,58 – 110,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 10127x - 8535$ (0,9994)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	44887,88 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	10868,69
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 11, 23 g.l.) (P)	0,91 (0,547)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 11, 23 g.l.)	0,407

$y = ax + b$, em que y = área do pico do analito, a = coeficiente angular, b = coeficiente linear; Fc, valor de F calculado; Ft, valor de F tabelado; Fc/Ft, razão entre valores de F calculado e tabelado; R^2 , coeficiente de determinação; g.l., grau de liberdade.

Tabela 40. Resultados da linearidade para AGQ-15, AGQ-16, quercitrina, afzelina, ácido ferúlico e quercetina.

AGQ-15	
Intervalo de linearidade (µg/mL)	2,46 – 105,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 12945x - 11093$ (0,9992)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	19364,63 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	4688,75
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,18 (0,996)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,080
AGQ-16	
Intervalo de linearidade (µg/mL)	2,58 -110,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 10004x - 6298$ (0,9997)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	58599,79 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	14188,75
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 11, 23 g.l.) (P)	0,73 (0,694)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 11, 23 g.l.)	0,324
Quercitrina	
Intervalo de linearidade (µg/mL)	2,58 -110,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 5666x - 3121$ (0,9997)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	62341,68 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	15094,77
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,68 (0,736)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,302
Afzelina	
Intervalo de linearidade (µg/mL)	2,46 -105,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 5685x - 2479$ (0,9996)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	45743,35 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	11075,82
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,11 (0,999)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,049
Ácido ferúlico	
Intervalo de linearidade (µg/mL)	2,58 -110,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 14295x - 4565$ (0,9996)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.) (P)	58599,79 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 34 g.l.)	14188,75
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.) (P)	0,73 (0,694)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 10, 24 g.l.)	0,324
Quercetina	
Intervalo de linearidade (µg/mL)	19,69 – 210,0
Equação do modelo de regressão linear (R^2)	$y = 7066x - 9468$ (0,9996)
Fc, regressão ($p = 0,05$; 1, 22 g.l.) (P)	36981,87 (0,000)
Fc/Ft, regressão ($p = 0,05$; 1, 22 g.l.)	8598,54
Fc, falta de ajuste ($p = 0,05$; 6, 16 g.l.) (P)	1,97 (0,130)
Fc/Ft, falta de ajuste ($p = 0,05$; 6, 16 g.l.)	0,719

$y = ax + b$, em que y = área do pico do analito, a = coeficiente angular, b = coeficiente linear; Fc, valor de F calculado; Ft, valor de F tabelado; Fc/Ft, razão entre valores de F calculado e tabelado; R^2 , coeficiente de determinação; g.l., grau de liberdade.

Figura 59. Curvas analíticas para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10 e AGQ-15.

Figura 60. Curvas analíticas para AGQ-16, ácido ferúlico, quercitrina, afzelina e quercetina.

A partir das equações obtidas foram deduzidas as equações para quantificação (Tabela 41). As equações fornecem a concentração dos compostos em µg/mL, sendo $X_{\text{número}}$ a concentração dos respectivos derivados galoilquínicos, X_A a concentração de afzelina, X_Q a concentração de quercitrina, X_{PI} a concentração do ácido ferúlico (padrão interno) e X_{PS} a concentração de quercetina (padrão secundário).

Tabela 41. Equações para quantificação dos derivados galoilquínicos e dos flavonoides.

Compostos	Equações para quantificação
AGQ-1	$X_1 = [Y_1 / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) - 133,1] / 7805$
AGQ-5	$X_5 = [Y_5 / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 6428] / 11845$
AGQ-6	$X_6 = [Y_6 / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 5212] / 11573$
AGQ-7	$X_7 = [Y_7 / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 2357] / 10688$
AGQ-8	$X_8 = [Y_8 / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 3491] / 11466$
AGQ-9	$X_9 = [Y_9 / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 4605] / 12680$
AGQ-10	$X_{10} = [Y_{10} / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 8535] / 10127$
AGQ-15	$X_{15} = [Y_{15} / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 11093] / 12945$
AGQ-16	$X_{16} = [Y_{16} / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 6298] / 10004$
Afzelina	$X_A = [Y_A / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 2479] / 5685$
Quercitrina	$X_Q = [Y_Q / Y_{PI} (14295 X_{PI} - 4565) + 3121] / 5666$
Ácido ferúlico	$X_{PI} = [Y_{PI} / Y_{PS} (7066 X_{PS} - 9468) + 4565] / 14295$

4.8.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e/ou método baseado em parâmetros da curva analítica. Dos métodos para determinação do limite de detecção o mais aceitável é o método baseado em parâmetros da curva analítica, pois os valores são estatisticamente determinados (RIBANI et al., 2004).

Desse modo, para a determinação do limite de detecção dos derivados galoilquínicos, do ácido ferúlico e dos flavonoides afzelina e quercitrina, foram elaboradas curvas analíticas utilizando-se pontos próximos ao limite de detecção (Figuras 61 e 62). Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação estão presentes na Tabela 42. Nota-se que os valores de detecção (0,055–0,752 µg/mL) e quantificação (0,167–2,278 µg/mL) foram baixos, os coeficientes de determinação R^2 variaram entre 0,9935 a 0,9999 e os coeficientes de variação, calculados a partir dos limites de quantificação, oscilaram entre 0,74 a 4,18%.

Figura 61. Curvas analíticas em triplicata para estimativa dos limites de detecção e quantificação de AGQ-1, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15.

Figura 62. Curvas analíticas em triplicata para estimativa dos limites de detecção e quantificação de AGQ-16, do ácido ferúlico e dos flavonoides afzelina e quercitrina.

Tabela 42. Coeficientes angular (a) e linear (b) obtidos a partir das equações da reta e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os derivados galoilquínicos, ácido ferúlico e flavonoides afzelina e quercitrina.

Compostos	Parâmetros								
	a	DP	b	DP	LD ($\mu\text{g/mL}$)	DP	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	DP	CV (%)
AGQ-1	7847,7	320,3	284,2	165,3	0,070	0,003	0,211	0,009	4,18
AGQ-5	11545,3	311,5	1400,0	888,4	0,254	0,007	0,770	0,021	2,70
AGQ-6	11151,3	187,2	548,0	359,2	0,106	0,002	0,322	0,005	1,68
AGQ-7	10614,7	257,2	1636,0	528,2	0,164	0,004	0,498	0,012	2,44
AGQ-8	11428,3	111,5	2387,0	1746,8	0,504	0,005	1,529	0,015	0,97
AGQ-9	12487,7	148,5	1881,5	1112,8	0,294	0,004	0,891	0,011	1,19
AGQ-10	9668,0	96,3	1661,0	618,9	0,211	0,002	0,640	0,006	1,00
AGQ-15	11409,7	231,9	4172,7	797,1	0,231	0,005	0,699	0,014	2,05
AGQ-16	9234,0	129,3	1621,7	2103,1	0,752	0,011	2,278	0,032	1,40
Ácido ferúlico	14038,7	180,9	1990,0	738,7	0,174	0,002	0,526	0,007	1,30
Afzelina	5680,0	57,3	2556,7	437,0	0,254	0,003	0,769	0,008	1,01
Quercitrina	5788,7	42,8	3790,0	473,6	0,270	0,002	0,818	0,006	0,74

DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

4.8.4 Precisão

4.8.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi determinada através da análise de seis amostras em triplicata preparadas no mesmo dia e pelo mesmo analista. O tempo de retenção e a concentração dos compostos nos extratos preparados foi a resposta avaliada. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 43 e 44.

Tabela 43. Resultados da repetibilidade para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7 e AGQ-8.

Compostos	T _r (min)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
AGQ-1	1,90	0,02	1,10	11,05	0,44	3,96
	1,87	0,04	2,35	11,98	0,17	1,44
	1,93	0,02	0,94	12,04	0,43	3,61
	1,86	0,07	4,02	12,30	0,28	2,30
	1,90	0,03	1,73	12,47	0,20	1,63
	1,89	0,05	2,51	12,05	0,07	0,55
Média	1,89	0,02	1,30	11,98	0,49	4,10
AGQ-5	10,69	0,24	2,22	20,09	0,44	2,17
	10,89	0,06	0,58	21,52	0,72	3,33
	10,99	0,06	0,55	21,97	0,31	1,42
	10,77	0,12	1,09	22,60	0,06	0,29
	10,88	0,04	0,38	22,59	0,68	3,02
	10,86	0,05	0,44	22,03	0,81	3,66
Média	10,85	0,10	0,95	21,80	0,93	4,28
AGQ-6	11,40	0,16	1,39	22,61	0,26	1,16
	11,59	0,07	0,57	23,98	0,29	1,19
	11,66	0,05	0,42	24,61	0,29	1,16
	11,46	0,13	1,13	24,95	0,16	0,64
	11,55	0,04	0,36	25,41	0,23	0,90
	11,58	0,01	0,11	24,31	0,43	1,79
Média	11,54	0,09	0,79	24,31	0,97	3,64
AGQ-7	8,05	0,30	3,70	6,13	0,16	2,63
	8,30	0,06	0,69	6,30	0,12	1,92
	8,37	0,10	1,23	6,66	0,29	4,32
	8,21	0,07	0,87	6,53	0,09	1,45
	8,25	0,05	0,59	6,56	0,08	1,23
	8,32	0,01	0,17	6,34	0,09	1,39
Média	8,25	0,11	1,36	6,42	0,20	3,04
AGQ-8	16,15	0,03	0,16	27,22	0,28	1,03
	16,20	0,07	0,44	29,50	0,30	1,03
	16,24	0,02	0,15	29,66	0,22	0,73
	16,17	0,04	0,26	29,17	0,49	1,68
	16,19	0,04	0,27	30,29	0,28	0,93
	16,21	0,02	0,10	29,52	0,03	0,11
Média	15,13	0,05	0,35	29,23	1,05	3,59

T_r = média dos tempos de retenção; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

Tabela 44. Resultados da repetibilidade para AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina e afzelina.

Compostos	T _r (min)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
AGQ-9	17,01	0,03	0,19	21,38	0,59	2,75
	17,04	0,07	0,43	23,37	0,39	1,66
	17,09	0,04	0,23	23,29	0,24	1,01
	17,05	0,03	0,16	22,96	0,62	2,69
	17,05	0,04	0,24	23,55	0,37	1,58
	17,07	0,02	0,10	23,17	0,08	0,35
Média	16,69	0,03	0,17	22,96	0,80	3,47
AGQ-10	6,13	0,21	3,44	30,00	0,44	1,46
	6,31	0,04	0,60	32,50	0,62	1,92
	6,35	0,09	1,39	33,11	0,52	1,58
	6,26	0,04	0,63	33,85	0,63	1,85
	6,24	0,06	0,97	33,64	0,37	1,11
	6,36	0,03	0,40	33,08	0,38	1,14
Média	6,28	0,09	1,38	32,70	1,40	4,30
AGQ-15	16,65	0,04	0,21	46,44	0,70	1,52
	16,70	0,07	0,41	49,83	0,64	1,28
	16,72	0,03	0,19	50,75	0,34	0,67
	16,70	0,03	0,18	51,09	0,10	0,19
	16,67	0,04	0,26	51,59	0,19	0,36
	16,71	0,01	0,09	50,16	0,05	0,11
Média	16,19	0,03	0,20	49,98	1,84	3,69
AGQ-16	23,69	0,08	0,34	66,81	0,60	0,90
	23,73	0,04	0,18	71,35	0,94	1,32
	23,71	0,06	0,26	72,22	1,10	1,52
	23,69	0,03	0,12	72,79	0,61	0,84
	23,73	0,02	0,10	73,42	0,48	0,65
	23,68	0,06	0,26	72,02	0,17	0,23
Média	22,61	0,03	0,12	71,43	2,37	3,32
Quercitrina	22,58	0,07	0,32	55,60	0,93	1,67
	22,63	0,06	0,26	60,02	0,31	0,51
	22,62	0,06	0,26	60,12	0,85	1,42
	22,59	0,04	0,20	60,89	0,46	0,75
	22,63	0,01	0,06	61,19	0,39	0,63
	22,57	0,04	0,20	60,13	0,62	1,03
Média	17,05	0,03	0,15	59,66	2,05	3,43
Afzelina	25,64	0,07	0,27	33,16	0,64	1,92
	25,66	0,03	0,12	35,84	0,36	1,00
	25,65	0,03	0,13	35,82	1,08	3,00
	25,63	0,03	0,11	36,66	0,29	0,78
	25,66	0,05	0,18	36,75	0,26	0,70
	25,63	0,05	0,21	36,09	0,06	0,18
Média	23,70	0,02	0,10	33,16	0,64	1,92

T_r = média dos tempos de retenção; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

4.8.4.2 Precisão intermediária

Os resultados obtidos no primeiro e no segundo dias para a precisão intermediária estão apresentados nas Tabelas 45-47. O tempo de retenção e a concentração dos compostos nos extratos preparados foram as respostas avaliadas.

Tabela 45. Resultados da precisão intermediária para AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6 e AGQ-7.

Experimentos	T _r (μg/mL)	DP	CV (%)	C (μg/mL)	DP	CV (%)
AGQ-1	1º dia	1,89	0,05	2,51	12,05	0,07
		1,90	0,03	1,73	12,47	0,20
		1,87	0,04	2,35	11,98	0,17
		1,90	0,02	1,10	11,05	0,44
	2º dia	1,86	0,03	1,49	11,61	0,17
		1,80	0,26	14,20	12,09	1,05
		1,88	0,04	2,19	11,98	0,15
		1,92	0,04	2,20	11,58	0,35
	Média	1,88	0,04	1,97	11,85	0,43
	1º dia	10,86	0,05	0,44	22,03	0,81
		10,88	0,04	0,38	22,59	0,68
		10,89	0,06	0,58	21,52	0,72
		10,69	0,24	2,22	20,09	0,44
AGQ-5	2º dia	10,76	0,30	2,78	21,21	0,08
		10,65	0,53	4,98	21,56	1,26
		11,05	0,17	1,49	21,52	0,84
		11,16	0,45	3,99	21,63	0,08
	Média	10,87	0,17	1,59	21,52	0,71
AGQ-6	1º dia	11,58	0,01	0,11	24,31	0,43
		11,55	0,04	0,36	25,41	0,23
		11,59	0,07	0,57	23,98	0,29
		11,40	0,16	1,39	22,61	0,26
	2º dia	11,48	0,27	2,36	23,44	0,70
		11,38	0,51	4,46	24,29	1,23
		11,74	0,19	1,64	23,98	0,72
		11,85	0,40	3,34	23,70	0,38
	Média	11,57	0,16	1,37	23,97	0,80
AGQ-7	1º dia	8,32	0,01	0,17	6,34	0,09
		8,25	0,05	0,59	6,56	0,08
		8,30	0,06	0,69	6,30	0,12
		8,05	0,30	3,70	6,13	0,16
	2º dia	8,14	0,31	3,80	6,31	0,21
		7,93	0,67	8,51	6,77	1,15
		8,33	0,20	2,38	6,30	0,08
		8,49	0,25	2,95	6,20	0,09
	Média	8,23	0,18	2,15	6,37	0,21

T_r = média dos tempos de retenção; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

Tabela 46. Resultados da precisão intermediária para AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15 e AGQ-16.

Experimentos	T _r (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
AGQ-8	1º dia	16,21	0,02	29,52	0,03	0,11
		16,19	0,04	30,29	0,28	0,93
		16,20	0,07	29,50	0,30	1,03
		16,15	0,03	27,22	0,28	1,03
	2º dia	16,18	0,10	28,22	0,36	1,27
		16,15	0,26	28,63	0,72	0,93
		16,27	0,14	29,50	0,13	0,46
		16,41	0,29	28,73	0,35	1,23
	Média	16,22	0,09	28,95	0,96	3,30
AGQ-9	1º dia	17,07	0,02	23,17	0,08	0,35
		17,05	0,04	23,55	0,37	1,58
		17,04	0,07	23,37	0,39	1,66
		17,01	0,03	21,38	0,59	2,75
	2º dia	17,05	0,08	22,29	0,33	1,48
		17,00	0,21	22,27	0,74	1,58
		17,10	0,14	23,37	0,77	3,48
		17,24	0,27	22,31	0,13	0,57
	Média	17,07	0,08	22,71	0,77	3,37
AGQ-10	1º dia	6,36	0,03	33,08	0,38	1,14
		6,24	0,06	33,64	0,37	1,11
		6,31	0,04	32,50	0,62	1,92
		6,13	0,21	30,00	0,44	1,46
	2º dia	6,21	0,24	31,88	0,69	2,16
		5,98	0,66	32,87	0,42	1,11
		6,30	0,20	32,50	1,12	3,51
		6,52	0,26	33,32	0,91	2,74
	Média	6,26	0,16	32,47	1,14	3,51
AGQ-15	1º dia	16,71	0,01	50,16	0,05	0,11
		16,67	0,04	51,59	0,19	0,36
		16,70	0,07	49,83	0,64	1,28
		16,65	0,04	46,44	0,70	1,52
	2º dia	16,69	0,10	48,43	0,41	0,85
		16,65	0,21	49,21	1,21	0,36
		16,76	0,14	49,83	0,79	1,59
		16,89	0,29	48,85	0,37	0,77
	Média	16,72	0,08	49,29	1,50	3,04
AGQ-16	1º dia	23,68	0,06	72,02	0,17	0,23
		23,73	0,02	73,42	0,48	0,65
		23,73	0,04	71,35	0,94	1,32
		23,69	0,08	66,81	0,60	0,90
	2º dia	23,69	0,07	68,58	1,02	1,49
		23,74	0,02	69,10	1,03	0,65
		23,76	0,06	71,35	1,79	2,55
		23,86	0,25	71,47	3,14	4,40
	Média	23,73	0,06	70,51	2,15	3,05

T_r = média dos tempos de retenção; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

Tabela 47. Resultados da precisão intermediária para afzelina e quercitrina.

Experimentos	T _r (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)	
Afzelina	1º dia	25,63	0,05	0,21	36,09	0,06	0,18
		25,66	0,05	0,18	36,75	0,26	0,70
		25,66	0,03	0,12	35,84	0,36	1,00
		25,64	0,07	0,27	33,16	0,64	1,92
	2º dia	25,64	0,07	0,26	34,68	0,24	0,68
		25,68	0,04	0,15	33,96	0,69	0,70
		25,72	0,13	0,50	35,84	0,18	0,51
		25,78	0,28	1,08	35,45	1,68	4,74
	Média	25,68	0,05	0,20	35,22	1,20	3,40
	Quercitrina	1º dia	22,57	0,04	0,20	60,13	0,62
22,63			0,01	0,06	61,19	0,39	0,63
22,63			0,06	0,26	60,02	0,31	0,51
22,58			0,07	0,32	55,60	0,93	1,67
2º dia		22,60	0,03	0,13	58,29	0,69	1,18
		22,63	0,06	0,24	56,86	0,78	0,63
		22,66	0,05	0,21	60,02	0,59	1,00
		22,77	0,27	1,20	58,86	1,36	2,32
Média		22,63	0,06	0,27	58,87	1,88	3,19

T_r = média dos tempos de retenção; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

Analisando-se os resultados obtidos, tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária, nota-se que os valores de coeficiente de variação estão abaixo de 5%, atendendo às normas descritas pela ANVISA (BRASIL, 2003) e pelo INMETRO (BRASIL, 2007). Portanto, pode-se dizer que o método em estudo apresenta boa precisão.

4.8.5 Recuperação e Exatidão

A recuperação do método foi realizada com a fortificação da matriz de *C. langsdorffii* previamente esgotada com auxílio de aparelho Soxhlet. Na Figura 63 encontra-se o perfil cromatográfico da matriz após ser totalmente esgotada. O procedimento de recuperação permite avaliar o quanto do composto é possível recuperar durante o processo analítico, possibilitando os cálculos para a determinação da exatidão do método. Esses cálculos são dados pelo percentual do erro relativo entre os valores reais e teóricos das concentrações de cada composto em questão.

Figura 63. Matriz das folhas *Copaifera langsdorffii* após extração em aparelho de Soxhlet.

Para o delineamento dos experimentos de recuperação e exatidão foram selecionados quatro derivados galoilquínicos, 5, 10, 15 e 16, com tempos de retenção em regiões distintas do cromatograma. A média dos teores esperados para esses derivados galoilquínicos na matriz vegetal foi considerada como o nível de concentração médio, enquanto que os níveis alto e baixo foram considerados como o nível médio mais ou menos 50%, respectivamente. A Figura 64 ilustra os estudos de recuperação realizados. Os valores de recuperação e exatidão obtidos em porcentagem encontram-se descritos nas Tabelas 48 e 49, respectivamente. Além disso, os valores de área obtidos para o padrão secundário (quercetina) encontram-se na Tabela 50.

Figura 64. Estudos de recuperação realizados com AGQ-10, AGQ-5, padrão interno ácido ferúlico, AGQ-15, AGQ-16 e padrão secundário quercetina, da esquerda para a direita.

Tabela 48. Resultados obtidos nos estudos de recuperação para AGQ-5, AGQ-10 e AGQ-15.

AGQ-5							
Nível	M (µg)	T _E (µg/mL)	A	T _O (µg/mL)	R ± DP (%)	CV (%)	E (%)
Baixo	296,4	12,35	140281	11,03	90,25 ± 1,37	1,52	9,75
			140997	11,38			
			138426	11,01			
			139593	11,17			
Médio	592,8	24,7	288471	24,70	89,07 ± 0,77	0,86	10,93
			282752	24,70			
			287603	24,70			
			290317	24,70			
Alto	1185,6	49,4	580301	45,78	90,18 ± 1,77	1,97	9,82
			592871	43,75			
			570916	44,18			
			510230	44,48			
AGQ-10							
Nível	M (µg)	T _E (µg/mL)	A	T _O (µg/mL)	R ± DP (%)	CV (%)	E (%)
Baixo	300,0	12,5	132849	12,46	103,70 ± 2,79	2,69	-3,70
			137860	13,23			
			137676	13,01			
			138297	13,15			
Médio	600,0	25,0	279502	25,01	100,33 ± 1,30	1,29	-0,33
			272950	25,28			
			275412	24,66			
			282124	25,39			
Alto	1200,0	50,0	562184	52,10	101,75 ± 2,49	2,45	-1,75
			572275	49,62			
			549913	50,01			
			505597	51,77			
AGQ-15							
Nível	M (µg)	T _E (µg/mL)	A	T _O (µg/mL)	R ± DP (%)	CV (%)	E (%)
Baixo	300,0	12,5	153142	11,62	95,38 ± 3,03	3,18	4,62
			158571	12,30			
			150897	11,58			
			158670	12,20			
Médio	600,0	25,0	308136	22,17	90,44 ± 1,28	1,42	9,56
			306094	22,78			
			314191	22,59			
			316826	22,90			
Alto	1200,0	50,0	633907	46,99	90,92 ± 2,13	2,34	9,08
			643925	44,67			
			615852	44,81			
			553836	45,39			

M = massa; T_E = teor esperado; A = área; T_O = teor obtido; R = recuperação; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = exatidão.

Tabela 49. Resultados obtidos nos estudos de recuperação para AGQ-16 e ácido ferúlico.

AGQ-16							
Nível	M (µg)	T _E (µg/mL)	A	T _O (µg/mL)	R ± DP (%)	CV (%)	E (%)
Baixo	331,8	13,825	161805	14,95	108,84 ± 1,78	1,64	-8,84
			162380	15,40			
			158681	14,83			
			159605	15,01			
Médio	663,6	27,65	318042	28,46	104,21 ± 1,19	1,14	-4,21
			313492	29,04			
			319625	28,61			
			323810	29,15			
Alto	1327,2	55,3	639226	59,63	104,35 ± 2,43	2,32	-4,35
			650940	56,79			
			620490	56,78			
			558872	57,62			
Ácido Ferúlico (Padrão Interno)							
Nível	M (µg)	T _E (µg/mL)	A	T _O (µg/mL)	R ± DP (%)	CV (%)	E (%)
Baixo	675,0	33,75	536699	33,56	100,99 ± 1,50	1,49	-0,99
			539566	34,67			
			534056	33,77			
			539505	34,33			
Médio	675,0	33,75	535482	33,12	99,04 ± 0,65	0,65	0,96
			523612	33,53			
			543589	33,62			
			537511	33,45			
Alto	675,0	33,75	528668	34,47	101,11 ± 5,14	5,09	-1,11
			542118	33,05			
			508890	32,55			
			505967	36,42			

M = massa; T_E = teor esperado; A = área; T_O = teor obtido; R = recuperação; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = exatidão.

Tabela 50. Dados obtidos para o padrão secundário (quercetina).

Nível	Teor (µg/mL)	Área
Baixo	61,33	388912
		378407
		384576
		382093
Médio	61,33	393303
		379848
		393251
		390879
Alto	61,33	372944
		398972
		380372
		337589

Por meio da análise dos resultados obtidos, nota-se que os percentuais de recuperação variaram entre 89 e 109%, enquanto que os percentuais de exatidão ficaram entre -8,84 e 10,93. Segundo Ribani et al., (2004), valores de recuperação aceitáveis estão na faixa de 70%

a 120%, com exatidão (erro) de até $\pm 20\%$. Portanto, o método desenvolvido permite uma recuperação adequada tanto para os derivados galoilquínicos quanto para o padrão interno.

4.8.6 Robustez

O teste de robustez visa examinar fontes potencialmente passíveis de variações por meio da avaliação de um conjunto de respostas inerentes ao método. Para examinar estas fontes, um número de fatores, os quais estão inseridos ao procedimento de validação, são selecionados e variações relativamente leves são deliberadas. De forma geral, determinar estas variações significa definir a perspectiva de uma dada oscilação quando o método é executado em instrumentos de outras marcas ou transferido para outro laboratório. Tanto parâmetros cromatográficos como parâmetros inerentes ao preparo das amostras podem ser avaliados no teste de robustez. Levando-se em consideração que os parâmetros inerentes ao preparo das amostras são mais susceptíveis a erros devido à grande manipulação pelo analista, optou-se por avaliar a robustez durante o preparo da amostra. Para tanto, foram definidos os respectivos limites de variação para cada fator analisado e, seguindo o planejamento descrito na Tabela 6, Página 27, foram realizados oito experimentos. Por meio desses experimentos, as concentrações dos componentes foram obtidas, bem como seus respectivos coeficientes de variação (Tabelas 51 e 52). Em seguida, foi determinada a influência de cada fator analisado e os resultados obtidos foram comparados com os respectivos valores de referência (Tabela 53). Por meio da análise desses resultados foi possível inferir que pequenas variações no tempo de extração, no tamanho das partículas, na temperatura, agitação e volume de extração não são capazes de interferir significativamente na precisão do método, visto que os valores numéricos obtidos em função dos parâmetros de variabilidade para os derivados galoilquínicos e os flavonoides em estudo foram menores que os respectivos valores de referência estipulados. Por outro lado, os valores obtidos para o parâmetro tamanho da amostra foram maiores que os respectivos valores de referência para os componentes AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-10, AGQ-15 e quercitrina, e muito próximos aos valores de referência para os compostos AGQ-1, AGQ-9, AGQ-16 e afzelina. Desse modo, é possível inferir que pequenas variações no tamanho das amostras são capazes de modificar significativamente as análises quantitativas das mesmas e, por isso, o procedimento de pesagem da amostra deve ser rigorosamente seguido para evitar variações significativas na precisão do método.

Tabela 51. Valores obtidos para robustez dos derivados galoilquínicos.

Exp	AGQ-1			AGQ-10			AGQ-7		
	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
1	10,68	0,09	0,82	31,64	0,40	1,25	7,04	0,57	8,08
2	11,51	1,20	10,43	34,13	0,70	2,05	7,19	0,25	3,45
3	10,46	0,44	4,22	31,63	0,45	1,42	6,87	0,09	1,29
4	9,97	0,69	6,94	30,29	2,00	6,60	6,91	0,44	6,31
5	12,51	1,79	14,29	32,58	2,39	7,34	7,69	0,28	3,61
6	10,24	0,30	2,94	32,49	0,91	2,79	7,31	0,19	2,60
7	10,05	0,03	0,29	28,36	0,93	3,28	6,27	0,42	6,76
8	10,37	1,02	9,79	28,70	1,12	3,89	6,40	0,21	3,26
Média	10,72	0,87	8,10	31,23	1,99	6,37	6,96	0,47	6,70

Exp	AGQ-5			AGQ-6			AGQ-8		
	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
1	21,11	0,52	2,45	23,11	0,66	2,85	28,53	0,08	0,30
2	21,39	0,17	0,77	23,59	0,38	1,61	27,85	1,08	3,89
3	19,30	0,12	0,61	21,83	0,19	0,88	26,16	0,26	1,01
4	20,01	0,92	4,59	21,92	1,19	5,44	25,99	0,57	2,21
5	22,00	1,11	5,05	24,59	0,63	2,57	29,92	1,32	4,43
6	19,61	0,17	0,88	22,19	0,20	0,90	26,70	0,86	3,21
7	19,21	0,44	2,29	20,61	0,25	1,20	25,26	0,06	0,23
8	18,32	0,21	1,13	19,91	0,09	0,46	24,34	0,15	0,62
Média	20,12	1,26	6,27	22,22	1,54	6,91	26,84	1,82	6,79

Exp	AGQ-15			AGQ-9			AGQ-16		
	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
1	48,49	0,58	1,19	21,62	0,05	0,24	69,75	3,63	5,21
2	48,00	0,27	0,56	21,24	0,59	2,80	69,53	0,54	0,77
3	44,21	0,34	0,76	19,64	0,16	0,79	65,19	0,21	0,32
4	44,99	2,30	5,12	20,05	0,69	3,42	66,44	3,56	5,36
5	51,02	2,94	5,76	22,45	0,62	2,78	74,08	3,26	4,40
6	46,18	0,55	1,18	19,22	0,25	1,30	65,58	1,10	1,68
7	43,86	0,05	0,12	18,38	0,09	0,47	62,01	1,04	1,67
8	42,07	0,21	0,49	17,74	0,14	0,77	58,52	1,28	2,18
Média	46,10	2,92	6,33	20,04	1,63	8,14	66,39	4,83	7,28

Exp = experimento; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

Tabela 52. Valores obtidos para robustez dos flavonoides afzelina e quercitrina.

Exp	Afzelina			Quercitrina		
	C (µg/mL)	DP	CV (%)	C (µg/mL)	DP	CV (%)
1	34,66	0,28	0,82	58,01	0,59	1,02
2	33,75	0,31	0,91	57,25	0,44	0,77
3	31,80	0,30	0,94	53,24	0,11	0,21
4	32,38	1,67	5,16	54,15	2,97	5,49
5	36,40	2,14	5,87	59,94	3,72	6,21
6	32,20	1,03	3,21	53,73	2,19	4,08
7	30,54	1,46	4,79	50,48	2,08	4,11
8	28,18	1,24	4,41	46,58	2,19	4,71
Média	32,49	2,52	7,77	54,17	4,31	7,95

Exp = experimento; C = média das concentrações; DP = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação.

Tabela 53. Valores numéricos obtidos em função dos parâmetros de variabilidade.

Compostos	Referência	Efeitos					
	$S\sqrt{2}$	A/a	B/b	C/c	D/d	E/e	F/f
AGQ-1	1,23	-0,14	1,04	0,41	-0,15	-0,59	0,32
AGQ-10	2,81	1,39	2,97	-0,35	-1,04	-0,23	-0,85
AGQ-7	0,66	0,09	0,69	0,01	-0,47	-0,11	0,10
AGQ-5	1,79	0,67	1,82	0,57	-0,23	-1,07	0,48
AGQ-6	2,17	0,79	2,31	0,63	-0,83	-0,92	0,33
AGQ-8	2,58	0,58	2,81	1,25	-0,70	-0,82	0,70
AGQ-15	4,13	0,65	4,72	1,61	-1,01	-1,76	1,10
AGQ-9	2,31	1,19	2,18	0,96	-0,60	-0,98	0,84
AGQ-16	6,84	2,68	6,70	2,74	-2,87	-3,25	1,62
Afzelina	3,57	1,32	3,53	1,72	-1,41	-1,56	0,83
Quercitrina	6,09	2,98	6,12	2,49	-2,18	-2,56	1,00

S = desvio padrão; A/a = Tempo de extração; B/b = Tamanho da amostra; C/c = Tamanho da partícula; D/d = Temperatura de extração; E/e = Agitação de extração; F/f = Volume de extração.

4.9 Análises realizadas por CLAE-EM

Visando complementar os estudos realizados por CLAE-UV-DAD, foram realizadas análises por CLAE-EM para a mistura dos padrões de derivados galoilquínicos e para o extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* (Figuras 65 e 69). Os cromatogramas obtidos por CLAE-EM foram muito semelhantes àqueles obtidos por CLAE-UV-DAD, demonstrando a reprodutibilidade do método analítico desenvolvido e validado. Por meio dos espectros de massas obtidos para os padrões de derivados galoilquínicos foi possível confirmar a massa molecular dos mesmos a partir da visualização dos sinais m/z referentes aos íons moleculares $[M - H]^-$ (Figuras 66-68).

Figura 65. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM para a mistura dos padrões. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 μ m). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 8,35 min, 50-100% de B até 29,23 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 37,5 min. Vazão: 0,5 mL/min. 1-16, derivados galoilquínicos; Q, quercitrina; A, afzelina.

Figura 66. Espectros de massas obtidos para AGQ-1, AGQ-2, AGQ-3, AGQ-4, AGQ-5 e AGQ-6. O tempo de retenção encontra-se entre parênteses.

Figura 67. Espectros de massas obtidos para AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-11 e AGQ-12. O tempo de retenção encontra-se entre parênteses.

Figura 68. Espectros de massas obtidos para AGQ-13, AGQ-14, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina e afzelina. O tempo de retenção encontra-se entre parênteses.

A análise realizada por CLAE-EM para o extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* (Figura 69) permitiu determinar a presença dos derivados galoilquínicos isolados e identificados nesse trabalho, bem como sugerir a presença de outros derivados galoilquínicos não isolados.

Figura 69. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM para o extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* (inferior). Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (100 x 3,0 mm, 2,5 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) *iso*-propanol-metanol-acetonitrila 0,5:4:6. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 8,35 min, 50-100% de B até 29,23 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 37,5 min. Vazão: 0,5 mL/min. 1-16, derivados galoilquínicos; Q, quercitrina; A, afzelina.

Além disso, os espectros de massas obtidos permitiram confirmar a ausência de outros metabólitos coeluinto com os derivados galoilquínicos isolados e identificados, com exceção do espectro de massas de AGQ-4 (496 g/mol), que detectou a presença de dois íons com m/z diferentes, um referente à AGQ-4 ($m/z = 495$) e outro com $m/z = 357$ (Figura 70).

Figura 70. Espectro de massas obtido em 3,57 minutos.

Levando-se em consideração a constituição química das folhas de *Copaifera langsdorffii*, sugeriu-se que o íon de $m/z = 357$ fosse referente a dois derivados galoilquínicos monossubstituídos metilados, o ácido 5'-*O*-metil-4-*O*-galoilquínico e o ácido 5'-*O*-metil-5-*O*-galoilquínico (Figura 71), tendo em vista que o outro possível metabólito com a mesma massa molecular desses dois foi isolado e identificado nesse trabalho (ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico, AGQ-1) (Figura 30, Página 66). A visualização de apenas um sinal $m/z = 357$

não excluiu a possibilidade da presença dos dois metabólitos sugeridos, pois nas Figuras 18 (subfração FA3), 19 (subfração Fr 42-55), 55 e 58 foi possível detectar a presença de 3 bandas cromatográficas superpostas referentes ao tempo de retenção em que se encontra AGQ-4.

Figura 71. Derivados galoilquínicos monossustituídos metilados.

Também foram constatados três íons com $m/z = 343$, nos tempos de retenção 1,54, 2,02 e 3,57 minutos (Figura 72), provavelmente referentes aos metabólitos ácido 3-O-galoilquínico, ácido 4-O-galoilquínico e ácido 5-O-galoilquínico (Figura 73), uma vez que esses três compostos apresentam massa molecular igual a 344 g/mol. Porém não foram realizadas atribuições no cromatograma, devido à falta de informações.

Figura 72. Espectros de massas obtidos em 1,54, 2,02 e 3,57 minutos.

Figura 73. Derivados galoilquínicos monossustituídos não metilados.

Também foi constatado que o íon com $m/z = 661$ no tempo de retenção de 16,15 minutos refere-se à mistura de dois derivados galoilquínicos com massa molecular igual a 662 g/mol (Figura 74). Por meio de CLAE no modo preparativo foi possível obter a mistura desses dois metabólitos, a qual foi analisada por CLAE-UV-DAD (Figura 75) e RMN de ^1H e ^{13}C (Apêndices 49-51). Após avaliação dos resultados obtidos, foi possível determinar que esses dois metabólitos são o ácido 5'-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-17) e o ácido 5'''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (AGQ-18) (Figura 76), já que o outro metabólito com a mesma massa molecular desses dois foi isolado e identificado (ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, AGQ-15). O metabólito AGQ-18 foi previamente isolado por Nogueira (2011).

Figura 74. Espectro de massas obtido em 16,15 minutos.

Figura 75. Perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV-DAD para a mistura de AGQ-17e AGQ-18. Fase estacionária: coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 µm). Fase móvel: (A) ácido fórmico-água 0,1:99,9 e (B) metanol. Eluição em gradiente: 15-50% de B em 45 min, 50-100% de B até 48 min, 100% de B até 52 min, 100-15% de B até 55 min, 15% de B até 60 min. Comprimento de onda: 280 nm. Vazão: 1 mL/min.

Figura 76. Estrutura química de dois derivados galoilquínicos trissubstituídos com uma metila.

Por fim, também foram constatados dois íons com $m/z = 675$ para os picos com tempos de retenção iguais a 18,99 e 19,75 minutos (Figura 77), sugerindo a presença de derivados galoilquínicos trissubstituídos, nos quais duas unidades de ácido gálico estão metiladas e, portanto, com massa molecular igual a 676 g/mol.

Figura 77. Espectros de massas obtidos em 18,99 e 19,75 minutos.

Constatou-se que o pico com tempo de retenção igual a 18,99 minutos referia-se a pelo menos dois metabólitos, devido ao seu desdobramento observado nos cromatogramas presentes nas Figuras 55 e 58. Desse modo, foi possível inferir a presença de três metabólitos: ácido 5',5''-*O*-dimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico, ácido 5',5'''-*O*-dimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico e ácido 5'',5'''-*O*-dimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico (Figura 78). Nogueira (2011) isolou o ácido 5',5'''-*O*-dimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico.

Figura 78. Derivados galoilquínicos trissubstituídos com duas metilas.

Além dos derivados galoilquínicos, também foi possível constatar a presença dos flavonoides quercitrina (21,45 minutos; $m/z = 447$; 448 g/mol) e afzelina (24,66 minutos; $m/z = 431$; 432 g/mol) (Figura 79).

Figura 79. Espectros de massas obtidos em 21,45 min e 19,75 min.

Desse modo, foi possível visualizar a grande variedade de derivados galoilquínicos presentes nas folhas de *Copaifera langsdorffii* e a identificação dos mesmos contribui dos mesmos para o conhecimento da química dessa espécie.

4.10 Estudo sazonal dos derivados galoilquínicos

Para propor critérios de padronização de medicamentos fitoterápicos é imprescindível conhecer a variabilidade química da espécie vegetal utilizada como matéria-prima. Visto essa característica, foi realizado o estudo sazonal para 10 acessos de *Copaifera langsdorffii* de origens distintas, porém cultivados sob as mesmas condições. O objetivo do estudo sazonal foi verificar as possíveis variações qualitativas e/ou quantitativas dos constituintes químicos de interesse dentro dos acessos cultivados, bem como entre os mesmos, além da influência dos fatores climáticos, durante o ano de 2012. Os acessos de *C. langsdorffii* encontram-se no Sítio Beija-Flor, situado na cidade de Cajuru/SP. Na Figura 80 apresenta-se a região onde estão sendo cultivados os 500 indivíduos de *C. langsdorffii*, sendo 50 indivíduos para cada acesso, assim como imagens de exemplares dos acessos.

Os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das amostras coletadas para cada acesso foram preparados e analisados por CLAE-UV-DAD, conforme especificações descritas no item 3.10. As análises qualitativas dos perfis cromatográficos obtidos permitiram constatar a

presença de todos os derivados galoilquínicos identificados nas folhas de *C. langsdorffii*, bem como dos flavonoides quercitrina e afzelina, o que pode ser observado nas Figuras 81 e 82 para as análises referentes ao mês de Maio.

Figura 80. (A) Vista superior e (B) lateral da região onde se encontram os indivíduos de *Copaifera langsdorffii* cultivados. Latitude: $-21^{\circ} 15' 19''$, Longitude: $-47^{\circ} 16' 14''$. (C) Exemplos dos acessos de *Copaifera langsdorffii*.

Figura 81. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das coletas referentes ao mês de Maio/2012 para os acessos 1 a 5 de *Copaifera langsdorffii*.

Figura 82. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-DAD das coletas referentes ao mês de Maio/2012 para os acessos 6 a 10 de *Copaifera langsdorffii*.

Quanto às análises quantitativas, estas foram realizadas por meio das curvas analíticas dos padrões, utilizando ácido ferúlico como padrão interno. Nas Tabelas 54-56 encontram-se os teores, expressos em %, obtidos para os compostos quantificados durante o período de avaliação sazonal, com destaque para AGQ-16, quercitrina e afzelina, cujos teores foram os mais elevados dentre os metabólitos quantificados durante o período das coletas.

Tabela 54. Teores obtidos para os derivados galoilquínicos e os flavonoides no estudo de sazonalidade no período de Janeiro a Abril de 2012.

Mês	Acesso	Teor (%)										
		Derivados galoilquínicos									Flavonoides	
		1	10	7	5	6	8	15	9	16	A	Q
Janeiro	1	0,15	0,24	0,08	0,21	0,23	0,45	0,39	0,41	1,43	1,75	1,85
	2	0,13	0,22	0,07	0,26	0,25	0,57	0,63	0,50	2,32	1,56	1,34
	3	0,15	0,27	0,13	0,35	0,36	0,91	0,51	0,75	3,36	1,69	1,57
	4	0,16	0,56	0,16	0,53	0,58	0,86	1,19	0,60	2,54	1,90	2,07
	5	0,15	0,19	0,06	0,26	0,31	0,71	0,44	0,44	2,13	1,11	1,30
	6	0,13	0,18	0,07	0,20	0,19	0,48	0,33	0,42	1,42	1,83	1,72
	7	0,15	0,19	0,08	0,25	0,28	0,60	0,45	0,42	1,91	1,86	1,39
	8	0,18	0,14	0,07	0,26	0,24	0,71	0,29	0,57	2,51	1,85	1,55
	9	0,16	0,38	0,09	0,37	0,38	0,71	0,63	0,47	1,88	1,67	2,04
	10	0,20	0,45	0,15	0,40	0,43	0,68	0,77	0,50	1,80	1,95	1,57
Fevereiro	1	0,21	0,18	0,09	0,20	0,24	0,55	0,31	0,50	1,62	1,42	1,49
	2	0,15	0,28	0,11	0,29	0,28	0,51	0,75	0,50	1,72	1,83	1,69
	3	0,25	0,42	0,14	0,41	0,44	0,74	0,63	0,57	2,27	1,55	1,89
	4	0,19	0,89	0,17	0,55	0,59	0,65	1,74	0,44	2,03	2,28	2,02
	5	0,13	0,07	0,05	0,22	0,30	0,73	0,30	0,40	2,48	1,36	1,24
	6	0,17	0,12	0,04	0,11	0,14	0,37	0,15	0,36	1,17	1,51	1,34
	7	0,14	0,17	0,07	0,24	0,28	0,62	0,42	0,51	2,12	1,95	1,20
	8	0,23	0,10	0,08	0,21	0,23	0,73	0,24	0,59	2,08	1,50	1,87
	9	0,11	0,28	0,12	0,30	0,34	0,61	0,58	0,46	1,76	1,98	1,59
	10	0,13	0,30	0,14	0,33	0,40	0,80	0,63	0,60	2,52	1,55	1,65
Março	1	0,17	0,17	0,06	0,22	0,26	0,67	0,40	0,53	1,82	1,30	1,69
	2	0,11	0,25	0,11	0,27	0,28	0,55	0,71	0,47	1,68	1,54	1,82
	3	0,10	0,16	0,11	0,27	0,28	0,80	0,37	0,68	3,36	1,47	1,40
	4	0,17	0,40	0,02	0,48	0,45	0,98	0,84	0,87	2,78	1,75	1,65
	5	0,15	0,17	0,05	0,26	0,31	0,83	0,38	0,51	2,23	1,16	1,31
	6	0,14	0,23	0,09	0,28	0,30	0,71	0,55	0,58	2,42	1,69	1,73
	7	0,21	0,22	0,09	0,28	0,30	0,87	0,36	0,66	2,47	1,67	2,03
	8	0,13	0,16	0,09	0,30	0,29	0,79	0,40	0,76	2,58	1,48	1,48
	9	0,15	0,32	0,12	0,33	0,33	0,73	0,61	0,61	2,19	1,80	1,74
	10	0,18	0,24	0,10	0,31	0,33	0,73	0,54	0,64	2,65	1,80	1,60
Abril	1	0,07	0,14	0,05	0,18	0,17	0,45	0,34	0,36	1,42	1,29	1,31
	2	0,07	0,16	0,08	0,28	0,26	0,68	0,57	0,65	2,70	1,69	1,44
	3	0,06	0,08	0,06	0,18	0,23	0,63	0,37	0,49	3,41	1,37	1,30
	4	0,18	0,55	0,16	0,52	0,56	0,96	0,99	0,70	2,59	1,50	1,89
	5	0,07	0,14	0,05	0,24	0,29	0,71	0,47	0,46	2,39	1,26	1,15
	6	0,07	0,09	0,05	0,18	0,18	0,60	0,28	0,53	2,02	1,32	1,26
	7	0,13	0,18	0,06	0,26	0,29	0,82	0,47	0,57	2,80	1,91	1,58
	8	0,10	0,17	0,08	0,26	0,23	0,67	0,43	0,66	2,55	1,56	1,30
	9	0,09	0,33	0,08	0,30	0,29	0,58	0,60	0,49	1,67	1,66	1,55
	10	0,15	0,19	0,08	0,31	0,32	0,78	0,48	0,70	2,90	1,59	1,62

1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 e 16, derivados galoilquínicos; A, afzelina; Q, quercitrina.

Tabela 55. Teores obtidos para os derivados galoilquínicos e os flavonoides no estudo de sazonalidade no período de Maio a Agosto de 2012.

Mês	Acesso	Teor (%)										
		Derivados galoilquínicos									Flavonoides	
		1	10	7	5	6	8	15	9	16	A	Q
Maio	1	0,10	0,07	0,04	0,09	0,10	0,35	0,15	0,29	1,20	1,21	1,15
	2	0,08	0,07	0,05	0,11	0,11	0,38	0,24	0,39	1,32	1,26	1,08
	3	0,07	0,09	0,05	0,14	0,15	0,49	0,34	0,44	2,52	1,33	1,31
	4	0,17	0,21	0,10	0,24	0,24	0,59	0,50	0,49	1,80	1,53	1,62
	5	0,12	0,06	0,04	0,11	0,11	0,47	0,21	0,40	1,97	1,25	1,10
	6	0,07	0,08	0,03	0,10	0,10	0,32	0,23	0,30	1,31	1,32	1,05
	7	0,11	0,07	0,03	0,10	0,11	0,52	0,18	0,37	1,67	1,31	0,98
	8	0,14	0,06	0,05	0,10	0,10	0,52	0,16	0,45	1,81	1,25	1,33
	9	0,11	0,08	0,04	0,11	0,11	0,39	0,21	0,34	1,30	1,34	1,08
	10	0,11	0,12	0,06	0,13	0,14	0,40	0,28	0,36	1,53	1,21	1,04
Junho	1	0,09	0,13	0,05	0,15	0,16	0,39	0,30	0,34	1,36	1,32	1,36
	2	0,10	0,20	0,11	0,26	0,26	0,54	0,58	0,48	2,12	1,72	1,80
	3	0,10	0,22	0,13	0,29	0,31	0,71	0,55	0,59	2,94	1,56	1,50
	4	0,10	0,39	0,12	0,36	0,42	0,67	0,90	0,46	2,07	1,58	1,57
	5	0,13	0,19	0,06	0,26	0,31	0,71	0,46	0,48	2,12	1,36	1,39
	6	0,08	0,12	0,06	0,17	0,19	0,50	0,30	0,40	1,60	1,49	1,36
	7	0,14	0,14	0,06	0,21	0,27	0,73	0,35	0,50	2,27	1,51	1,25
	8	0,12	0,09	0,06	0,17	0,20	0,57	0,27	0,47	1,91	1,25	1,33
	9	0,15	0,32	0,12	0,28	0,30	0,57	0,50	0,45	1,80	1,39	1,53
	10	0,15	0,25	0,12	0,28	0,29	0,59	0,54	0,54	2,20	1,72	1,44
Julho	1	0,10	0,15	0,07	0,20	0,23	0,40	0,34	0,36	1,25	1,52	1,61
	2	0,11	0,21	0,11	0,23	0,26	0,48	0,54	0,42	1,96	1,31	1,13
	3	0,09	0,14	0,11	0,24	0,28	0,82	0,46	0,68	3,02	1,52	1,41
	4	0,21	0,53	0,15	0,44	0,50	0,81	1,13	0,57	2,40	1,80	1,96
	5	0,13	0,14	0,07	0,25	0,29	0,68	0,42	0,41	2,01	1,05	1,23
	6	0,13	0,10	0,06	0,14	0,16	0,44	0,30	0,39	1,30	1,67	1,57
	7	0,15	0,08	0,05	0,14	0,17	0,56	0,43	0,40	1,80	1,76	1,31
	8	0,14	0,12	0,07	0,23	0,22	0,65	0,27	0,52	2,29	1,68	1,41
	9	0,12	0,31	0,11	0,25	0,29	0,68	0,60	0,44	1,78	1,58	1,93
	10	0,13	0,19	0,12	0,25	0,28	0,64	0,72	0,47	1,69	1,84	1,48
Agosto	1	0,13	0,17	0,08	0,22	0,23	0,54	0,35	0,41	1,80	1,50	1,13
	2	0,12	0,21	0,08	0,24	0,26	0,52	0,55	0,42	1,74	1,41	1,51
	3	0,14	0,14	0,10	0,26	0,26	0,68	0,40	0,60	3,12	1,28	1,30
	4	0,19	0,62	0,14	0,46	0,49	0,66	1,15	0,45	2,03	1,89	1,57
	5	0,13	0,17	0,07	0,25	0,28	0,61	0,46	0,45	2,10	1,37	1,31
	6	0,12	0,16	0,09	0,23	0,23	0,60	0,31	0,51	1,81	1,55	1,50
	7	0,14	0,16	0,06	0,23	0,27	0,61	0,39	0,45	2,03	1,76	1,45
	8	0,13	0,11	0,06	0,17	0,18	0,52	0,25	0,44	1,94	1,41	1,55
	9	0,14	0,24	0,10	0,24	0,27	0,47	0,53	0,39	1,54	1,54	1,65
	10	0,11	0,24	0,10	0,27	0,29	0,56	0,53	0,50	2,07	1,67	1,42

1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 e 16, derivados galoilquínicos; A, afzelina; Q, quercitrina.

Tabela 56. Teores obtidos para os derivados galoilquínicos e os flavonoides no estudo de sazonalidade no período de Setembro a Dezembro de 2012.

Mês	Acesso	Teor (%)										
		Derivados galoilquínicos									Flavonoides	
		1	10	7	5	6	8	15	9	16	A	Q
Setembro	1	0,09	0,08	0,04	0,13	0,14	0,46	0,21	0,41	1,46	1,15	1,33
	2	0,13	0,19	0,09	0,20	0,22	0,48	0,55	0,41	1,53	1,58	1,74
	3	0,13	0,13	0,07	0,21	0,19	0,65	0,42	0,66	2,63	1,39	1,55
	4	0,18	0,49	0,10	0,40	0,41	0,71	1,00	0,52	1,98	1,57	1,61
	5	0,15	0,09	0,05	0,16	0,17	0,60	0,24	0,42	1,59	1,15	1,28
	6	0,10	0,11	0,06	0,14	0,16	0,40	0,22	0,34	1,28	1,36	1,41
	7	0,16	0,18	0,06	0,21	0,24	0,61	0,40	0,45	1,87	1,75	1,47
	8	0,14	0,09	0,06	0,16	0,17	0,56	0,25	0,55	2,20	1,40	1,60
	9	0,17	0,28	0,08	0,20	0,22	0,43	0,43	0,38	1,31	1,43	1,35
	10	0,14	0,13	0,07	0,20	0,22	0,56	0,37	0,52	2,03	1,50	1,36
Outubro	1	0,18	0,21	0,10	0,25	0,27	0,65	0,45	0,53	2,10	1,52	1,58
	2	0,15	0,26	0,10	0,28	0,29	0,58	0,78	0,49	2,14	1,58	1,83
	3	0,12	0,29	0,14	0,36	0,33	0,74	0,92	0,75	3,75	1,61	1,61
	4	0,13	0,65	0,17	0,50	0,55	0,77	1,35	0,57	2,24	1,83	1,96
	5	0,19	0,19	0,08	0,30	0,32	0,79	0,46	0,67	2,53	1,32	1,54
	6	0,15	0,21	0,09	0,21	0,21	0,45	0,33	0,41	1,49	1,39	1,50
	7	0,21	0,16	0,07	0,22	0,24	0,74	0,34	0,49	1,96	1,30	1,28
	8	0,21	0,18	0,10	0,32	0,29	0,75	0,43	0,70	2,78	1,60	1,59
	9	0,19	0,34	0,13	0,31	0,31	0,60	0,60	0,51	1,74	1,75	1,73
	10	0,19	0,24	0,14	0,30	0,31	0,67	0,55	0,60	2,58	1,72	1,64
Novembro	1	0,21	0,12	0,06	0,16	0,17	0,49	0,28	0,42	1,62	1,34	1,30
	2	0,16	0,18	0,12	0,25	0,26	0,57	0,68	0,54	2,26	1,67	1,71
	3	0,19	0,19	0,11	0,26	0,25	0,69	0,63	0,65	3,21	1,73	1,57
	4	0,18	0,57	0,15	0,41	0,46	0,68	1,22	0,52	2,09	1,72	2,04
	5	0,26	0,14	0,08	0,23	0,25	0,69	0,36	0,52	2,19	1,36	1,46
	6	0,18	0,08	0,05	0,12	0,11	0,38	0,19	0,39	1,30	1,45	1,55
	7	0,21	0,13	0,08	0,22	0,25	0,66	0,45	0,50	2,23	1,56	1,29
	8	0,24	0,14	0,08	0,22	0,24	0,68	0,30	0,55	2,38	1,35	1,51
	9	0,21	0,25	0,10	0,22	0,23	0,49	0,56	0,43	1,57	1,35	1,71
	10	0,20	0,20	0,11	0,25	0,24	0,54	0,56	0,53	2,06	1,78	1,53
Dezembro	1	0,16	0,11	0,06	0,17	0,16	0,51	0,27	0,42	1,66	1,69	1,44
	2	0,17	0,16	0,10	0,23	0,23	0,51	0,61	0,47	2,41	1,45	1,35
	3	0,18	0,14	0,08	0,19	0,19	0,55	0,49	0,51	2,84	1,35	1,16
	4	0,21	0,46	0,14	0,36	0,38	0,68	0,96	0,52	1,89	1,72	1,83
	5	0,17	0,10	0,07	0,19	0,21	0,62	0,33	0,49	2,01	1,30	1,40
	6	0,14	0,06	0,03	0,07	0,09	0,37	0,16	0,31	1,28	1,40	1,20
	7	0,16	0,09	0,06	0,16	0,16	0,64	0,24	0,51	2,29	1,27	1,32
	8	0,22	0,08	0,08	0,19	0,17	0,62	0,24	0,54	2,33	1,42	1,52
	9	0,15	0,18	0,08	0,19	0,19	0,44	0,41	0,38	1,41	1,50	1,52
	10	0,15	0,18	0,11	0,22	0,21	0,50	0,54	0,55	1,92	1,68	1,55

1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 e 16, derivados galoilquínicos; A, afzelina; Q, quercitrina.

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Portanto, sua síntese é frequentemente afetada por variações climáticas e fatores ambientais. A época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarina, saponinas, alcaloides, taninos, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Desse modo, o conhecimento das variações químicas é de grande importância para a qualidade e o preparo das espécies medicinais de interesse terapêutico e/ou industrial, sendo útil para a extração e isolamento de princípios ativos desejados ou para a determinação da interrupção da colheita em épocas de produção de metabólitos tóxicos (BAUER e TITTEL, 1996).

Visando complementar os estudos de sazonalidade, dados climáticos referentes ao período do estudo foram coletados para verificar a influência dos mesmos na produção dos metabólitos secundários quantificados. Os dados de precipitação, temperatura, umidade relativa e índice de radiação para regiões próximas ao local de coleta foram fornecidos pelo INMET (Tabela 57).

Tabela 57. Dados climáticos mensais durante o ano de 2012.

Mês	Pradópolis/SP			Casa Branca/SP
	Precipitação acumulada (mm)	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Índice de Radiação (kJ/m ²)
Janeiro	239,40	22,77	82,00	1981,15
Fevereiro	69,20	24,93	72,78	1559,51
Março	65,60	24,15	73,43	1137,87
Abril	94,40	23,00	75,67	1104,60
Maio	73,60	18,86	75,56	970,87
Junho	140,00	18,87	80,15	779,45
Julho	23,40	17,84	68,30	1079,70
Agosto	0,00	20,18	55,21	1222,85
Setembro	68,00	22,27	56,44	1239,38
Outubro	69,80	25,35	57,54	1227,56
Novembro	181,40	24,45	66,52	1150,70
Dezembro	133,60	25,69	71,75	1134,37

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia – INMET.

As variáveis químicas (metabólitos secundários quantificados) e ambientais obtidas passaram por pré-tratamento para posterior análise estatística multivariada. Através da realização das análises estatísticas dos dados químicos e ambientais foi possível observar que

a variação dos fatores ambientais conseguiu explicar o comportamento dos metabólitos quantificados nas folhas de *Copaifera langsdorffii* durante o ano de 2012.

A princípio, foi realizada Análise de Correspondência Destendenciada (DCA), no intuito de observar o comprimento dos gradientes para suas variáveis. Valores pequenos foram obtidos para os gradientes em todos os eixos, o que indica pequena dispersão dos dados químicos e ambientais (Tabela 58). Além disso, pode-se observar na Figura 83 que as variáveis químicas e ambientais estão dispersas aleatoriamente no gradiente, ou seja, não seguem tendência.

Tabela 58. Análise de Correspondência Destendenciada para medida do gradiente ambiental.

Eixos	1	2	3	4	Inércia total
Autovalores	0,007	0,002	0,001	0,000	0,012
Comprimentos de gradiente	0,392	0,239	0,135	0,135

Figura 83. Dispersão das variáveis químicas (A) e ambientais (B) dentro do ambiente em que estão inseridas. Dados obtidos através da Análise de Correspondência Destendenciada.

Em seguida, foi realizada Análise de Redundância Canônica (RDA) para verificar a influência das variáveis ambientais sobre os metabólitos secundários quantificados. Essa análise assume uma associação linear entre as variáveis dependentes (dados químicos) e independentes (dados ambientais) e é aplicável quando os gradientes obtidos através da DCA são curtos, ou seja, menores que 0,5 (o que foi observado para as análises realizadas).

Na Tabela 59 encontram-se os resultados da RDA para avaliação da inflação das variáveis ambientais, cujos valores foram adequados, situando-se abaixo de 20, demonstrando contribuição significativa de tais variáveis para a compreensão das possíveis correlações químico-ambientais do sistema.

Tabela 59. Análise de Redundância Canônica para avaliação da inflação das variáveis ambientais.

Variáveis	Média (ponderada)	Desvio padrão	Fator de inflação
Temperatura	1.3657	0.0510	2.0033
Umidade relativa	0.9907	0.0943	2.0731
Precipitação acumulada	1.7932	0.5940	2.3953
Índice de radiação	3.0743	0.0951	1.3788

Já na Tabela 60 é possível verificar que os dois primeiros eixos da RDA explicam juntos 93,4% da variância total do sistema através da correlação químico-ambiental, sendo que com apenas quatro é possível explicar 100% a variância total do sistema.

Tabela 60. Análise de Redundância Canônica para avaliação da correlação químico-ambiental.

Eixos	1	2	3	4	Variância total
Autovalores:	0,068	0,012	0,005	0,001	1,000
Correlações químico-ambientais:	0,343	0,237	0,414	0,101	
Porcentagem cumulativa da variância					
dos dados químicos:	6,8	8,0	8,5	8,6	
da relação químico-ambiental:	79,7	93,4	99,3	100,0	
Soma de todos os autovalores					1,000
Soma de todos os autovalores canônicos					0,898

O teste de Monte Carlo apresentou valor de p menor que 0,05, tanto para o primeiro eixo canônico quanto para todos os eixos avaliados juntos, o que demonstra a significância estatística da análise (Tabela 61).

Tabela 61. Sumário do teste de Monte Carlo (999 permutações em modelo reduzido) para a Análise de Redundância Canônica.

Teste de significância do primeiro eixo canônico	Autovalor	0,068
	F-valor	8,429
	P-valor	0,0120
Teste de significância de todos os eixos canônicos	Traço	0,086
	F-valor	2,693
	P-valor	0,0070

Na Figura 84 apresenta-se um diagrama do tipo *Biplot* para os dois primeiros eixos canônicos da RDA (primeiro eixo - RDA-1 e segundo eixo - RDA-2), no qual se encontram dispostas as variáveis químicas (vetores azuis) e ambientais (vetores vermelhos). O tamanho dos vetores indica a respectiva variação dos dados obtidos no período analisado. Quanto maior o vetor, maior a variação observada. A temperatura e o índice de radiação apresentaram maiores variações quando comparados com a precipitação e a umidade relativa, bem como quando comparados com os metabólitos analisados.

Conforme o ângulo entre os vetores, algumas inferências podem ser realizadas. Vetores com ângulos próximos a 90° não estão correlacionados, enquanto que vetores com ângulos próximos a 0° estão correlacionados positivamente e vetores com ângulos próximos a 180° estão correlacionados negativamente. Sendo assim, é possível constatar na Figura 84 uma correlação positiva da temperatura com os derivados galoilquínicos AGQ-8, AGQ-9 e AGQ-16, indicando que nos meses mais quentes a biossíntese desses metabólitos é favorecida. Já para os demais derivados galoilquínicos, bem como os flavonoides quercitrina e afzelina, a temperatura exerce menor influência, estando os vetores destes mais próximos ao vetor da radiação. Dentre esses compostos, a afzelina apresenta correlação positiva mais marcante com a radiação, enquanto que a precipitação e a umidade parecem não afetar a sua biossíntese.

Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, tais como flavonoides (TATTINI et al., 2004), taninos (DUDT e SHURE, 1994) e antocianinas (JEONG et al., 2004). Isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonoides e fenilpropanoides correlatos, pela proteção contra fotodestruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, o que dificulta a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GRACE e LOGAN, 2000). No caso específico dos flavonoides, estes são acumulados principalmente em tecidos superficiais e utilizados pela planta como filtros UV, pois absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (BIEZA e LOIS, 2001). Além disso, também podem atuar como sequestradores de radicais livres e antioxidantes (GRACE e LOGAN, 2000). O aumento na produção desses metabólitos é controlado por enzimas da rota biossintética dos fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase, entre outras), as quais podem ter sua expressão gênica induzida pela luz (LOGEMANN et al., 2000). No entanto, isto não se aplica a taninos e compostos fenólicos simples, os quais têm absorção máxima em comprimentos de onda consideravelmente mais curtos que os da UV-B. (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Figura 84. Tendência de distribuição dos dados climáticos e dos teores dos metabólitos secundários quantificados, em relação aos dois primeiros eixos da RDA.

Além disso, foi construído um gráfico do tipo *Triplot* para os dois primeiros eixos canônicos da RDA (primeiro eixo - RDA-1 e segundo eixo - RDA-2) a fim de verificar a tendência de distribuição dos dados climáticos, dos teores dos derivados galoilquínicos e dos flavonoides e desses compostos dentro e entre os acessos analisados mensalmente durante o ano de 2012 (Figura 85).

A informação mais marcante obtida a partir do *Triplot* foi que os acessos de *C. langsdorffii* se agruparam por mês e não por origem, o que significa que, embora tenham origens distintas, apresentam constituição química qualitativa e quantitativa semelhantes dentro de cada mês analisado. Entretanto, variações sazonais foram constatadas.

Figura 85. Tendência de distribuição dos dados climáticos, dos teores dos metabólitos secundários quantificados e dos acessos de *Copaifera langsdorffii*, em relação aos dois primeiros eixos da RDA.

Os meses de Maio, Junho e Julho apresentaram correlação negativa com todas as variáveis ambientais estudadas, o que de certa forma é condizente com o esperado, visto que esse é um período mais frio e com menor índice de radiação (final do outono e início do inverno no hemisfério sul). Além disso, esses meses também apresentaram correlação negativa com todas as variáveis químicas, indicando que foi o período com menor produção dos metabólitos quantificados. O mês de Janeiro demonstrou-se atípico quando comparado com os demais meses, apresentando forte correlação positiva com o índice de radiação tanto no primeiro quanto no segundo eixo canônico, e com a temperatura apenas no primeiro eixo. Já os meses de Agosto e Setembro apresentaram correlação negativa com a precipitação e a umidade, o que se justifica por ser um período de seca no interior de São Paulo. Os vetores referentes aos derivados galoilquínicos e aos flavonoides afzelina e quercitrina apresentaram correlação positiva em especial com o mês de fevereiro, indicando que nesse mês foi possível

obter teores mais elevados desses compostos, o que é comprovado por meio dos dados apresentados nas Tabelas 54-56.

Desse modo, foi feita uma proposta de agrupamento para as amostras analisadas e as variáveis discriminantes foram determinadas por meio da Análise de Discriminante Canônico (CDA), levando-se em consideração a época de coleta das amostras: Grupo I, Maio-Julho/2012; Grupo II, Agosto-Setembro/2012; Grupo III, Janeiro/2012; e Grupo IV, Fevereiro-Abril/2012 e Outubro-Dezembro/2012.

Para testar o nível de acerto dos grupos propostos, foram utilizadas quatro variáveis como discriminantes (um ácido galoilquínico, AGQ-9, e os fatores ambientais temperatura, umidade relativa e índice de radiação). A escolha de AGQ-9 se deve à sua maior variação, indicada pelo tamanho do seu vetor, quando comparada aos demais metabólitos quantificados. Desse modo, foi possível observar os agrupamentos em três eixos canônicos e ver o quanto a classificação estava correta baseando-se no teste de Jackknifed, buscando-se o nível de 100% de acerto para cada um dos grupos propostos, o que foi alcançado (Figura 86).

Figura 86. Dados obtidos na Análise de Discriminante Canônico.

Na Tabela 62 encontra-se o sumário da Análise de Discriminante Canônico (CDA) para as amostras em estudo.

Tabela 62. Sumário da Análise de Discriminante Canônico para as amostras analisadas.

A. Função canônica discriminante						
	Autovalor	Correlação canônica	Lambda de Wilks	F	gl	P
F1	14,392	0,967	0,007	141,986	12; 299	0,000
F2	3,518	0,882				
F3	1,199	0,738				
B. Coeficientes padronizados						
	AGQ-9	Temperatura	Umidade relativa	Índice de Radiação		
F1	0,343	0,941	0,290	0,447		
F2	0,024	-0,309	0,835	0,761		
F3	0,051	0,220	0,607	-0,611		
C. Jackknifed – percentual de classificação correta						
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Total		
100	100	100	100	100		
D. Variáveis canônicas das médias de grupos						
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV		
F1	-5,668	-1,960	3,541	2,897		
F2	0,739	-1,587	5,535	-0,763		
F3	0,784	-2,149	-0,763	0,511		

Portanto, a análise dos dados obtidos para os constituintes químicos quantificados nas folhas dos 10 acessos de *Copaifera langsdorffii* possibilitou correlacionar os dados químicos (derivados galoilquímicos e flavonoides) com os dados ambientais (temperatura, umidade, índice de radiação e precipitação) por meio da Análise de Redundância Canônica (RDA). Chegou-se na formação de quatro grupos distintos, adotando-se como critério para a formação destes grupos, os diferentes meses de coleta, demonstrando que não há variação entre os acessos, mas uma resposta aos fatores ambientais que variam conforme as épocas do ano.

É importante destacar, que além da sazonalidade, outros fatores também são capazes de alterar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, tais como condições de coleta, estabilização e estocagem, constituintes químicos presentes no solo e fatores bióticos, os quais podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente, no valor terapêutico de preparados fitoterápicos. O controle da qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas. Porém, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reproduzíveis. O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramentos genéticos de plantas medicinais, ao invés do uso de

plantas selvagens coletadas diretamente no campo, deve levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade (CALIXTO, 2000).

Desse modo, fica nítida a necessidade de análises químicas detalhadas de plantas destinadas ao uso terapêutico. Tendo em vista os inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, é cada vez mais necessária a realização de estudos visando detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos. Também se faz necessário um rigoroso controle da qualidade realizado por meio de técnicas analíticas modernas, para garantir constância na composição de metabólitos secundários no preparado fitoterápico em escala industrial (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Os estudos sazonais realizados para as folhas de *Copaifera langsdorffii*, bem como os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste trabalho serviram para determinar e garantir a qualidade da matéria-prima vegetal a ser utilizada na produção de eventual fitoterápico. Além disso, os resultados obtidos contribuirão fortemente para a realização de estudos de desreplicação na análise dos compostos fenólicos presentes nas partes aéreas de espécies de todo o gênero *Copaifera*.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Dentre as técnicas cromatográficas empregadas para o isolamento dos derivados galoilquínicos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii*, a cromatografia de filtração em gel de *Sephadex* LH-20 e a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa, quando associadas, demonstraram-se satisfatórias para o isolamento de 16 derivados galoilquínicos. Além disso, foi possível identificar outros 10 derivados por meio de espectrometria de massas, totalizando 26 metabólitos dessa classe. São eles:

Resíduo de ácido quínico	Resíduo de ácido gálico	
	G-1 (não metilado)	G-2 (metilado)

<p>$R_3 = G-1; R_4 = H; R_5 = H$ $R_3 = H; R_4 = G-1; R_5 = H$ $R_3 = H; R_4 = H; R_5 = G-1$ $R_3 = G-2; R_4 = H; R_5 = H$ $R_3 = H; R_4 = G-2; R_5 = H$ $R_3 = H; R_4 = H; R_5 = AG-2$ $R_3 = G-1; R_4 = G-1; R_5 = H$ $R_3 = G-2; R_4 = G-1; R_5 = H$ $R_3 = G-1; R_4 = G-2; R_5 = H$ $R_3 = G-2; R_4 = G-2; R_5 = H$ $R_3 = G-1; R_4 = H; R_5 = G-1$ $R_3 = G-2; R_4 = H; R_5 = G-1$ $R_3 = G-1; R_4 = H; R_5 = G-2$ $R_3 = G-2; R_4 = H; R_5 = G-2$ $R_3 = H; R_4 = G-1; R_5 = G-1$ $R_3 = H; R_4 = G-2; R_5 = G-1$ $R_3 = H; R_4 = G-1; R_5 = G-2$ $R_3 = H; R_4 = G-2; R_5 = G-2$ $R_3 = G-1; R_4 = G-1; R_5 = G-1$ $R_3 = G-2; R_4 = G-1; R_5 = G-1$ $R_3 = G-1; R_4 = G-2; R_5 = G-1$ $R_3 = G-1; R_4 = G-1; R_5 = G-2$ $R_3 = G-2; R_4 = G-2; R_5 = G-1$ $R_3 = G-2; R_4 = G-1; R_5 = G-2$ $R_3 = G-1; R_4 = G-2; R_5 = G-2$ $R_3 = G-2; R_4 = G-2; R_5 = G-2$</p>	<p>Ácido 3-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 4-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 5-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 5'-<i>O</i>-metil-3-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-1) Ácido 5'-<i>O</i>-metil-4-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 5'-<i>O</i>-metil-5-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 3,4-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-4) Ácido 5'-<i>O</i>-metil-3,4-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-7) Ácido 5''-<i>O</i>-metil-3,4-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-2) Ácido 5',5''-di-<i>O</i>-metil-3,4-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-3) Ácido 3,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-10) Ácido 5'-<i>O</i>-metil-3,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-6) Ácido 5''-<i>O</i>-metil-3,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-5) Ácido 5',5''-di-<i>O</i>-metil-3,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-8) Ácido 4,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-11) Ácido 5'-<i>O</i>-metil-4,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-12) Ácido 5''-<i>O</i>-metil-4,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-13) Ácido 5',5''-di-<i>O</i>-metil-4,5-di-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-9) Ácido 3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-14) Ácido 5'-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-17) Ácido 5''-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-15) Ácido 5'''-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-18) Ácido 5',5''-di-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 5',5'''-di-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 5'',5'''-di-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico Ácido 5',5'',5'''-tri-<i>O</i>-metil-3,4,5-tri-<i>O</i>-galoilquínico (AGQ-16)</p>	

Esses derivados galoilquínicos foram identificados e/ou isolados pela primeira vez a partir das folhas de *C. langsdorffii* pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP, sendo que os derivados galoilquínicos metilados são compostos inéditos na literatura.

Além de serem isolados, 16 derivados galoilquínicos foram obtidos com grau de pureza satisfatório para serem utilizados como padrões no desenvolvimento do método analítico. O método analítico desenvolvido e validado foi capaz de identificar todos os derivados galoilquínicos isolados e quantificar satisfatoriamente AGQ-1, AGQ-5, AGQ-6, AGQ-7, AGQ-8, AGQ-9, AGQ-10, AGQ-15, AGQ-16, quercitrina e afzelina, seguindo recomendações da ANVISA e do INMETRO.

O método analítico validado foi utilizado nos estudos de sazonalidade dos 10 acessos de *C. langsdorffii* cultivados no Sítio Beija-Flor (Cajuru/SP). Através de análise estatística multivariada, concluiu-se que não há variação química qualitativa e quantitativa entre as coletas individuais, existindo apenas variação sazonal. Desse modo, a produção de fitoterápico a base das folhas de *C. langsdorffii* é favorecido, tendo em vista a homogeneidade da matéria-prima a ser utilizada. Os derivados galoilquínicos isolados podem ser, a partir desse estudo, considerados marcadores químicos para as folhas de *C. langsdorffii*, assim como já são os flavonoides quercitrina e afzelina.

Portanto, o isolamento e a identificação dos derivados galoilquínicos a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* abrem novas perspectivas sobre o potencial químico e biológico da espécie em questão e viabilizaram a obtenção de novos marcadores químicos. Os marcadores químicos foram utilizados especialmente no desenvolvimento e validação de método analítico capaz de identificar e quantificar esses compostos na droga vegetal, em extratos e em todas as etapas de produção de eventuais fitoterápicos, bem como nos estudos de sazonalidade. Além disso, as ferramentas desenvolvidas nesse trabalho poderão ser utilizadas para os estudos de desreplicação na análise dos compostos fenólicos presentes nas partes aéreas de espécies de todo o gênero *Copaifera*.

Referências

6 REFERÊNCIAS

- BARATTO, M. C.; TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; ROMANI, A.; VISIOLI, F.; BASOSI, R.; POGNI, R. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. **Free Radical Research**, v. 37, n. 4, p. 405-412, 2003.
- BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 193-198, 1996.
- BEDREGAL, P.; TORRES, B.; UBILLÚS, M.; MENDONZA, P.; MONTOYA, E. Robustness in NAA evaluated by the Youden and Steiner test. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 801-806, 2008.
- BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 230-235, 2006.
- BIEZA, K.; LOIS, R. An arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1105-1115, 2001.
- BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECCO R.; EHLERT, P. A. D.; SOUSA, I. F. Influence of season, harvest time and drying on *Java citronella* (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.
- BOUCHET, N.; BARRIER, L.; FAUCONNEAU, B. Radical Scavenging Activity and Antioxidant Properties of Tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 159-162, 1998.
- BOUCHET, N.; LEVESQUE, J.; BLOND, A.; BODO, B.; POUSSET, J.-L. 1,3-di-O-galloylquinic acid from *Guiera senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 189-190, 1996.
- BOUCHET, N.; LÉVESQUE, J.; BODO, B.; POUSSET, J.-L. 3,4,5-tri-O-galloylquinic acid ethyl ester from *Guiera senegalensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 1, p. 63-65, 1998.
- BOUCHET, N.; LÉVESQUE, J.; POUSSET, J.-L. HPLC Isolation, identification and quantification of tannins from *Guiera senegalensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 1, p. 52-56, 2000.
- BRANCALION, A. P. S.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P. B.; GROPPA JÚNIOR, M.; BERRETTA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research**, v. 40, n. 5, p. 475-481, 2012.
- BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.; MONTE-MOR, R. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.
- BRASIL. **Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, 2006.
- _____. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade industrial (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008 Revisão 03**. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2007.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2010a.

- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada nº 17, de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, 2010b.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília, 2003.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada nº 48, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2004.
- BROWN, L. **Procedures to operate the AECS-QuikPrep™ CCC Method Development Strategies for Polar & Mid Polar Compounds of interest, by an Quattro CCC™ Mk 5 & Mk 6**. UK, 12 p., 2010.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CARDELLINA, J. H. Challenges and opportunities confronting the botanical dietary supplement industry. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 7, p. 1073-1084, 2002.
- CASCON, V.; GILBERT, R. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.
- CLIFFORD, M. N.; STOUPI, S.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the galloylquinic acids of green tea, tara tannin, and tannic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2797-2807, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2005.
- CORSE, J.; LUNDIN, R. E.; SONDHEIMER, E.; WAJSS JR., A. C. Conformation analyses of D-(-)-quinic acid and some of its derivatives by nuclear magnetic resonance. **Phytochemistry**, v. 5, n. 4, p. 767-776, 1966.
- DAOLIO, C. **Aplicação de técnicas espectrométricas, cromatográficas e quimiométricas na avaliação da autenticidade de plantas utilizadas como fitoterápicos**. 2006. 146 f. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. London: John Wiley and Sons, 2009.
- DRASARA, P.; MORAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 3-21, 2004.
- DUDT, J. F.; SHURE, D. J. The Influence of Light and Nutrients on Foliar Phenolics and Insect Herbivory. **Ecology**, v. 75, n. 1, p. 86-98, 1994.
- FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 174-183, 2007.
- FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégicas concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão e Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, 2006.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, n. 7, 2006.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical transactions of the Royal Society**, v. 355, n. 1402, p. 1499-1510, 2000.
- GUTERRES, S. B. **Estudo dos extratos dos frutos de *Sapindus saponária* enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- HOU, A. J.; PENG, L. Y.; LIU, Y. Z.; LIN, Z. W.; SUN, H. D. Gallotannins and related polyphenols from *Pistacia weinmannifolia*. **Planta Medica**, v. 66, n. 7, p. 624-626, 2000.
- International Conference on Harmonization (ICH). **Validation of analytical procedures: definitions and methodology Q2(R1)**. Committee for Medicinal Products for Human Use - European Medicines Agency, p. 1-15, 2006.
- ISHIMARU, K.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Gallic acid esters of proto-quercitol, quinic acid and (-)-shikimic acid from *Quercus mongolica* and *Q. myrsinaefolia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1501-1504, 1987.
- ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for highspeed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n.2, p. 145-168, 2005.
- ITO, Y. Recent advances in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 538, n. 1, p. 3-25, 1991.
- JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Orgs.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. p. 273-398.
- JEONG, S. T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skin. **Plant Science**, v. 167, p. 247-252, 2004.
- LAMEIRA, O. A.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 2, p. 105-107, 2009.
- LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.
- LEITÃO, G. G.; EL-ADJI, S. S.; MELO, W. A. L.; LEITÃO, S. G.; BROWN, L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianenses* by gradient and isocratic CCC. **Journal of Chromatography and Related Technologies**, v. 28, p. 12-13, 2005.
- LEITE, A. C.; CABRAL, E. C.; SANTOS, D. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (euphorbiaceae) através de cromatografias em contracorrente. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.
- LIU, M.; LI, Y.; CHOU, G.; CHENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix Salviae Miltiorrhizae. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1-2, p. 51-55, 2007.
- LOGEMANN, E.; TAVERNARA, A.; SCHULZ, W.; SOMSSICH, I. E.; HAHNBROCK, K. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid

- secondary product formation in parsley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1903-1907, 2000.
- LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.
- MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2011.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 181-194, 2006.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. L. O gênero *Copaifera* (Leguminosae, Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008.
- MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.
- NASCIMENTO, M. E.; ZOGHBI, M. G. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 1-6, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NGUYEN, D. T.-T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μ m stationary phases in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1128, n. 1-2, p. 105-113, 2006.
- NISHIMURA, H.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Seven quinic acid gallates from *Quercus stenophylla*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2621-2623, 1984.
- NOGUEIRA, M. S. **Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii***. 2011. 166 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- OLIVEIRA, R. B.; COELHO, E. B.; RODRIGUES, M. R.; COSTA-MACHADO, A. R. M.; SOUSA, J. P. B.; BERRETTA, A. A.; BASTOS, J. K. Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaf Extract on the Ethylene Glycol-Induced Nephrolithiasis in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n.1, p. 170-179, 2012.
- ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 821, n. 1-2, p. 23-33, 2004.
- OUTINEN, K.; HAARIO, H.; VUORELA, P.; NYMAN, M.; UKKONEN, E.; VUORELA, H. Optimization of selectivity in high-performance liquid chromatography using desirability functions and mixture designs according to PRISMA. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 197-205, 1998.
- PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Science**, v. 75, n. 16, p. 1979-1987, 2004a.

- PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin against acetic acid induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 51-56, 2004b.
- PARKER, W. B.; NISHIZAWA, M.; FISHER, M. H.; YE, N.; LEE, K.-H.; CHENG, Y.-C. Characterization of a novel inhibitor of human DNA polymerases: 3,4,5-tri-*O*-galloylquinic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 21, p. 3759-3765, 1989.
- PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 4, p. 177-185, 1998.
- PAULI, G. F.; PRO, M. S.; FRIESEN, J. B. Countercurrent separation of natural products (review). **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1489-1508, 2008.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PAWLOWSKA, A. M.; DE LEO, M.; BRACA, A. Phenolics of *Arbutus unedo* (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 10234-10238, 2006.
- PIMENTEL, M.; BARROS, N. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.
- PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 355-360, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, n. 1-2, p. 201-205, 2007.
- RIBEIRO, F.L.; FERREIRA, M.; MORANO, S.; SILVA, L.; SCHINEIDER, R. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- ROMANI, A.; PINELLI, P.; GALARDI, C.; MULINACCI, N.; TATTINI, M. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. **Phytochemical Analyses**, v. 13, n. 2, p. 79-86, 2002.
- ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analyses of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.
- SALOMÃO, V. P. **Efeitos antrópicos do represamento de um riacho do cerrado na decomposição foliar**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- SEGER, C.; EBERHART, K.; STURM, S.; STRASSER, H.; STUPPNER, H. Apolar chromatography on *Sephadex* LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography, high yield strategy for structurally closely related analytes – destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case of study. **Journal of Chromatography A**, v. 1117, n. 1, p. 67-73, 2006.

- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analyses. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.
- SOUSA, J. P. B. *Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. 2011. 179 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- SOUSA, J. P. B.; BRANCALION, A. P. S.; GROppo JÚNIOR, M.; BASTOS, J. K. A validated chromatographic method for the determination of flavonoids in *Copaifera langsdorffii* by HPLC. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 1, p. 25-28, 2012a.
- SOUSA, J. P. B.; BRANCALION, A. P. S.; SOUZA, A. B.; TURATTI, I. C. C.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; LOPES, N. P.; BASTOS, J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 653-659, 2011.
- SOUSA, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; BERRETA, A. A.; BASTOS, J. K. Leishmanicidal and antimalarial activities of crude extracts from aerial parts of *Copaifera langsdorffii* and isolation of secondary metabolites. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 8, p. 4103-4107, 2012b.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.
- TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.
- TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 547-561, 2004.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analyses (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TIAN, G.; ZHANG, T.; YANG, F.; ITO, Y. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* sieb. et zucc by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 886, n. 1-2, p. 309-312, 2000.
- VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionais no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 273-286, 2002.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1996.
- YAN, Z.; LI, T.; LV, P.; LI, X.; ZHOU, C.; YANG, X. Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 22-31, 2013.

- YANG, C.; TANG, Q.; LIU, J.; ZUNJIAN ZHANG, Z.; LIU, W. Preparative isolation and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 61, n. 3, p. 474-478, 2008.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MARTINS-DA-SILVA, R. C.; TRIGO, J. R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the States of Pará and Amapá, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 6, p. 501-503, 2009a
- ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; TRIGO, J. R. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 5, p. 403-404, 2009b.

Appendices

APÊNDICES

Apêndice 1. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-1 (ácido 5'-O-metil-3-O-galoilquínico em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 2. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-1 (ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 3. Mapas de contorno de HSQC e HMBC de AGQ-1 (ácido 5'-*O*-metil-3-*O*-galoilquínico) em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 4. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-2 (ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 5. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-2 (ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 6. Mapas de contorno de HSQC e HMBC de AGQ-2 (ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 7. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-3 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 8. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-3 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 9. Mapas de contorno de HSQC e HMBC de AGQ-3 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 10. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-4 (ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 11. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-4 (ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 12. Mapas de contorno de HSQC e HMBC de AGQ-4 (ácido 3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD (400 MHz).

Apêndice 13. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-5 (5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 14. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-5 (5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquinico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 15. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-5 (5''-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 16. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-6 (5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (400 MHz).

Apêndice 17. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-6 (5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 18. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-6 (5'-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 19. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-7 (ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 20. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-7 (ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 21. Mapas de contorno de HSQC e HMBC de AGQ-7 (ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 22. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-8 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 23. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-8 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 24. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-8 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 25. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-9 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 26. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-9 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 27. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-9 (ácido 5',5''-di-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 28. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-10 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 29. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-10 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 30. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-10 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 31. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-11 (ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (500 MHz).

Apêndice 32. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-11 (ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (125 MHz).

Apêndice 33. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500MHz) de AGQ-11 (ácido 4,5-di-*O*-galoilquínico) em (CD₃)₂SO.

Apêndice 34. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-12 (ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 35. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-12 (ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 36. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-12 (ácido 5'-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 37. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-13 (5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 38. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-13 (5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 39. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-13 (5''-*O*-metil-4,5-di-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 40. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-14 (ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (500 MHz).

Apêndice 41. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-14 (ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (125 MHz).

Apêndice 42. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-14 (ácido 3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em (CD₃)₂SO.

Apêndice 43. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-15 (ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 44. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-15 (ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 45. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-15 (ácido 5''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 46. Estrutura química e espectro de RMN de ^1H de AGQ-16 (ácido 5',5'',5'''-*O*-trimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 47. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 de AGQ-16 (ácido 5',5'',5'''-*O*-trimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 48. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) de AGQ-16 (ácido 5',5'',5'''-*O*-trimetil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.

Apêndice 49. Estruturas químicas e espectro de RMN de ^1H da mistura AGQ-17 (ácido 5'-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) e AGQ-18 (ácido 5'''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 50. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 da mistura AGQ-17 (ácido 5'-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) e AGQ-18 (ácido 5'''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 51. Mapas de contorno de HSQC (400 MHz) e HMBC (500 MHz) da mistura AGQ-17 (ácido 5'-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) e AGQ-18 (ácido 5'''-*O*-metil-3,4,5-tri-*O*-galoilquínico) em CD₃OD.