UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
JULIANO GERALDO AMARAL

***Passiflora* L. (Passifloraceae): estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**

Ribeirão Preto 2018

JULIANO GERALDO AMARAL

***Passiflora* L. (Passifloraceae): estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 2018

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.

Amaral, Juliano Geraldo

Passiflora L. (Passifloraceae): estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Ribeirão Preto, 2018.

226 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. Espectrometria de massas. 2. Rede molecular. 3. *Passiflora*. 4. Produtos naturais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliano Geraldo Amaral

Passiflora L. (Passifloraceae): estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus, pelo dom da vida e por me guiar, iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

Aos meus pais, José Expedito do Amaral e Maria da Graças Pereira Amaral, pelo amor incondicional. Vocês são o meu maior exemplo.

Aos meus irmãos, José Expedito do Amaral Júnior e Tânia de Fátima Amaral. O amor de vocês e nossa amizade são os meus maiores títulos.

E, em especial, à minha esposa, Cristhiane Teixeira Tolentino Amaral, pelo seu amor, carinho e coragem em me apoiar em todos os momentos desta nossa jornada. Não seria possível chegar até aqui sem seu amor. Eu te amo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pelo exemplo de cientista e por todos os ensinamentos, orientações, oportunidades, incentivos e amizade. Obrigado pela confiança, você sempre fará parte da minha vida.

A todos os professores do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos. Levo para sempre os seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Mateus Freire Leite e sua família, por todo incentivo, acolhimento e apoio na realização deste projeto. A amizade de vocês é um presente de Deus.

Ao Dr. João Paulo Barreto de Sousa e sua esposa Lidiane Sousa, por toda atenção, amizade e carinho. Vocês são essenciais em nossa vida.

Ao Prof. Me. Marcelo Reis da Costa, pelos ensinamentos e amizade fraterna.

Ao Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana e à Dra. Teonildes Sacramento Nunes, pelo fornecimento das amostras e pelo apoio na realização deste projeto.

A todos meus amigos de bancada, vocês transformaram os dias tristes em alegres e as tarefas difíceis em fáceis. A amizade e o aprendizado que tive com vocês jamais esquecerei. Muito obrigado, meus bons amigos.

A José Carlos Tomaz, Isabel Cristina Casanova Turatti e Jacqueline Nakau Mendonça, pelo apoio, ensinamentos, paciência e, sobretudo, pela amizade. Vocês sempre estarão presentes na minha vida.

A todos os funcionários do NPPNS, vocês foram fundamentais na realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FCFRP.

A todos os docentes responsáveis pelas disciplinas que cursei durante a pós-graduação, os seus ensinamentos foram primordiais.

A todos os professores responsáveis por minha formação, da alfabetização até os dias de hoje, sou eternamente grato.

À Universidade Federal da Bahia, em especial, ao Instituto Multidisciplinar em Saúde, pela concessão do afastamento, incentivo e apoio na realização deste projeto.

A todos os colegas docentes e técnicos do Instituto Multidisciplinar em Saúde da UFBA que me apoiaram e incentivaram a realizar este trabalho.

À bióloga Marluce Veira Campos, pelo apoio e carinho de sempre.

A todos os pesquisadores e alunos em cujos projetos tive a oportunidade de colaborar.

A todos os alunos e ex-alunos do laboratório 109 do IMS/UFBA, vocês fizeram a diferença.

À minha família, que, desde criança, me incentivou, apoiou e acreditou no meu trabalho. Que Deus ilumine todos vocês!

À minha família Tolentino e Souza, pelo apoio incondicional. Que Deus abençoe vocês sempre!

Aos meus amigos, vocês foram indispensáveis nesta jornada.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

A Capes, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro na realização deste projeto.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

Epígrafe

*Todo jardim começa com um sonho de
amor. Antes que qualquer árvore seja
plantada ou qualquer lago seja construído, é
preciso que as árvores e os lagos tenham
nascido dentro da alma. Quem não tem
jardins por dentro não planta jardins por fora.
E nem passeia por eles...*

Rubem Alves

RESUMO

AMARAL, J. G. ***Passiflora* L. (Passifloraceae): estudos fitoquímicos suportados no desenvolvimento de estratégias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2018. 226f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os produtos naturais são considerados excelentes fontes de princípios ativos. O gênero *Passiflora* L. pertencente à família Passifloraceae, possui cerca de 500 espécies e, devido à sua ampla distribuição pela América do Sul, faz do Brasil uma região importante de sua ocorrência. Desde o século XVIII, há estudos científicos voltados ao conhecimento desse gênero, e suas espécies são tradicionalmente utilizadas como sedativas. Quanto à sua composição química, sabe-se que seus metabólitos majoritários são pertencentes à classe dos flavonoides, principalmente os do tipo C-glicosilados. Apesar da grande importância do gênero, os trabalhos concentram-se nas espécies de uso tradicional, *P. incarnata*; *P. alata* e *P. edulis*. Esse fato gera a necessidade da extensão dos estudos a espécies de menor conhecimento científico. *P. cincinnata* é uma espécie nativa do Brasil, com ampla distribuição geográfica, sendo encontrada facilmente no estado da Bahia, entretanto há poucas informações quanto à sua composição química. O avanço da espectrometria de massas, juntamente com a eficiência da CLAE, faz dessas técnicas hífenadas a principal ferramenta para o estudo da química de produtos naturais. Recentemente a estratégia de integração da espectrometria de massa com rede molecular criada pelo GNPS alterou os métodos convencionais de estudo da química de produtos naturais, auxiliando na desreplicação de compostos conhecidos e na identificação de novos metabólitos. Visando o melhor conhecimento da química de espécies de *Passiflora*, realizou-se um estudo fitoquímico de *P. cincinnata*, isolando e identificando os seus compostos majoritários: isoorientina; isovitexina; isoscoparina; isovitexina-2"-O- β -glicopiranosídeo; isovitexina-2"-O- β -xilopiranosídeo e isoorientina-2-O- β -xilopiranosídeo, bem como a determinação do perfil fitoquímico dos principais metabólitos presentes em suas folhas e caules por CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ, que levou à identificação de mais 19 metabólitos pertencentes à classe dos flavonoides e dos derivados do ácido clorogênico. Utilizando os dados de EM/EM das substâncias isoladas e das identificadas em *P. cincinnata*, foram geradas redes moleculares pelo GNPS, identificando mais 16 flavonoides e obtendo um modelo que auxiliou no estudo de desreplicação de 46 espécies mantidas em herbário. A obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM dessas espécies e sua integração com redes moleculares viabilizou a realização de uma proposta de identificação de mais de 100 derivados fenólicos, pertencentes às classes dos flavonoides, proantocianidinas e derivados do ácido clorogênico, gerando maior conhecimento sobre a composição química dessas espécies, abrindo, assim, fronteira para novos estudos e confirmando o potencial da combinação dessas ferramentas no estudo da química de produtos naturais.

Palavras-chave: Espectrometria de massas. Rede molecular. *Passiflora*. Produtos naturais.

ABSTRACT

AMARAL, J. G. ***Passiflora* L. (Passifloraceae): phytochemical studies supported in the development of liquid chromatography coupled to mass spectrometry strategies**. 2018. 225f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Natural products historically have been considered excellent source of active principles. The genus *Passiflora* L. belonging to the Passifloraceae family, has about 500 species and due to its wide distribution in South America, makes Brazil an important region of its occurrence. Since the 18th century, there are scientific studies aimed at the knowledge of this genus and its species have traditionally been used as sedatives. Regarding its chemical composition, it is well known that its major metabolites belong to the class of flavonoids, especially C-glycosylated type. Despite the great importance of the genus, the research are focused on species of traditional use, *P. incarnata*; *P. alata* and *P. edulis*. This fact generates the need to extend the studies to species with less scientific knowledge. *P. cincinnata* is a native species of Brazil, with a large geographic distribution, being easily found in the State of Bahia, however, there is little information about its chemical composition. The advance of mass spectrometry together with the efficiency of the HPLC makes these hyphenated techniques the main tool for the study of the chemistry of natural products. Recently the strategy of integrating mass spectrometry with molecular networking created by GNPS has changed the conventional methods of studying the chemistry of natural products, assisting the dereplication of known compounds and the identification of new metabolites. Aiming to expand the knowledge of the chemistry of *Passiflora* species, the phytochemical study of the species *P. cincinnata* was carried out, isolating and identifying its major compounds, isoorientin, isoorientin-(1''→2'')-O-β-xyloside, isovitexin-(1''→2'')-O-β-xyloside, isovitexin, isovitexin-(1''→2'')-O-β-glucopyranoside and isoscoparin, as well as determinating the phytochemical profile of the main metabolites present in its leaves and stems by HPLC-DAD-ESI-IT-MSⁿ, the identification of 19 more metabolites belonging to the class of flavonoids and derivatives of chlorogenic acid. Using the MS/MS data of the isolated and identified substances in *P. cincinnata*, molecular networking were generated by the GNPS identifying 16 flavonoids and obtaining a model that assisted in the study of the dereplication of another 46 species from the herbarium. The chromatographic profile obtained by HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS of these species and the integration of them with molecular networking enabled a proposal to identify about 100 phenolic derivatives belonging to the classes of flavonoids, proanthocyanidins and chlorogenic acid derivatives, generating a greater knowledge about the chemical composition of these species, opening up for new studies and confirming the potential of the combination of these tools in the study of the chemistry of natural products.

Keywords: Mass spectrometry. Molecular networking. *Passiflora*. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem das folhas, fruto, botão floral e flor da espécie <i>Passiflora</i> . <i>cincinnata</i> Mast.....	4
Figura 2 – Metabólitos secundários identificados no gênero <i>Passiflora</i> (Passifloraceae).....	7
Figura 3 – Gráfico com as variações dos valores dos parâmetros utilizados para geração de RM pelo GNPS.....	26
Figura 4 – Estruturas moleculares propostas para as substâncias isoladas JGA – 11-16.....	41
Figura 5 – Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de <i>Passiflora</i> <i>cincinnata</i> (IES ⁻).....	42
Figura 6 – Estruturas moleculares propostas para os derivados do ácido clorogênico identificados em <i>Passiflora cincinnata</i>	46
Figura 7 – Nomenclatura de fragmentação para flavonoides e principais eliminações neutras observadas para flavonoides C-glicosilados.....	48
Figura 8 – Estruturas moleculares propostas para os flavonoides identificados em <i>Passiflora cincinnata</i> Parte – I.....	51
Figura 9 – Estruturas moleculares propostas para os flavonoides identificados em <i>Passiflora cincinnata</i> Parte – II.....	52
Figura 10 – Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para <i>Passiflora</i> <i>cincinnata</i> e substâncias isoladas após remoção do branco.....	54
Figura 11 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização para <i>Passiflora cincinnata</i> e substâncias isoladas, representando os nós que possuem proposta de identificação.....	56
Figura 12 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para <i>Passiflora cincinnata</i> e substâncias isoladas, representando os nós que possuem proposta de identificação.....	57

Figura 13 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização para <i>Passiflora cincinnata</i> e substâncias isoladas, representando os nós formados pelo composto luteolina-O-hexose-deoxihexose (16).....	58
Figura 14 – Mapa de rede molecular gerada pelo GNPS, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização para as amostras de <i>Passiflora</i> ssp. após remoção do branco.....	63
Figura 15 – Mapa de rede molecular gerada pelo GNPS, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para as amostras de <i>Passiflora</i> ssp. após remoção do branco.....	65
Figura 16 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para <i>Passiflora</i> ssp, representando os flavonoides C-glicosilados que possuem proposta de identificação – Parte I.....	67
Figura 17 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para <i>Passiflora</i> ssp, representando os flavonoides C-glicosilados que possuem proposta de identificação – Parte II.....	68
Figura 18 – Proposta de fragmentação de um novo derivado fenólico com extensiva fragmentação da glicose.....	69
Figura 19 – Estruturas moleculares dos principais flavonoides C-glicosilados com proposta de identificação detectados em <i>Passiflora</i> ssp.....	71
Figura 20 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para <i>Passiflora</i> ssp, representando os flavonoides O-glicosilados que possuem proposta de identificação.....	73
Figura 21 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para <i>Passiflora</i> ssp. representando as proantocianidinas que possuem proposta de identificação.....	75
Figura 22 – Estruturas moleculares das principais proantocianidinas com proposta de identificação detectadas em <i>Passiflora</i> ssp.....	77
Figura 23 – Estruturas moleculares dos derivados do ácido clorogênico com proposta de identificação detectados em <i>Passiflora</i> ssp.....	78

Figura 24 – Diagrama de Venn da distribuição dos metabólitos detectados (IES ⁺) na rede molecular entre os subgêneros de <i>Passiflora</i> ssp.....	79
Figura 25 – Diagrama de Venn da distribuição dos principais metabólitos detectados e identificados (IES ⁺) na rede molecular entre os subgêneros de <i>Passiflora</i> ssp.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das exsicatas de <i>Passiflora</i> fornecidas pelo HUEFS....	17
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA – 11.....	31
Tabela 3 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA – 14.....	33
Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA – 16.....	35
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA – 15.....	37
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA – 13.....	39
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA – 12.....	40
Tabela 8 – Porcentagem extraída entre a 1 ^a e a 2 ^a extração em relação ao somatório das áreas obtidas para os principais metabólitos secundários majoritários de <i>Passiflora cincinnata</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	ácido clorogênico
AcOEt	acetato de etila
AR	alta resolução
auto-EM/EM	espectrometria da massas/espectrometria de massas em modo automático
BuOH	<i>n</i> -butanol
C-18	octadecilsilano
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CL	cromatografia líquida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAE-DAD-IES-EM	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por <i>electrospray</i>
CLAE-DAD-IES-IT-EM ⁿ	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e acoplada ao espectrômetro de massas sequencial com ionização por <i>electrospray</i>
CLAE-DAD-Prep	cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa com detector de arranjo de diodos
<i>d</i>	duplete
DAD	detector de arranjo de diodo
<i>dd</i>	duplo duplete
diCQA	di-cafeoilquínico
(E)	<i>epi</i>
(E)Cat	catequina/epicatequina
<i>edge</i>	arestas
EM	espectrometria de massas

EM/EM	espectrometria de massas/espectrometria de massas
EM/EM/EM	espectrometria de massas/espectrometria de massas/espectrometria de massas
EtOH	etanol
eV.	Elétron-volt
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
Hex	hexano
<i>HMBC</i>	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation</i>
<i>HMQC</i>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HUEFS	Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana
IES	ionização por <i>eltrospray</i>
IES ⁻	ionização por <i>eltrospray</i> em modo negativo
IES ⁺	ionização por <i>eltrospray</i> em modo positivo
IES-EM	espectrometria de massas com ionização por <i>eltrospray</i>
IES-EM ⁿ	espectrometria de massas sequencial com ionização por <i>eltrospray</i>
IT	<i>ion trap</i>
<i>J</i>	constante de acoplamento
JGA – 11	isoorientina
JGA – 12	isovitexina-2''-O- β -xilopiranosídeo
JGA – 13	isoorientina-2-O- β -xilopiranosídeo
JGA – 14	isovitexina
JGA – 15	isovitexina-2''-O- β -glicopiranosídeo
JGA – 16	isoscoparina
[M – H] ⁻	Molécula desprotonada

$[M + H]^+$	Molécula protonada
$[M + Na]^+$	Molécula cationizada
$[M + K]^+$	Molécula cationizada
<i>m</i>	Múltiplo
<i>m/z</i>	relação massa-carga
MeCN	acetonitrila
MeOH	metanol
Min	minuto
Na-TFa	ácido trifluoroacético sodiado
<i>Node</i>	nó
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
ppm	partes por milhão
rcf	força centrífuga relativa
RDA	Reação de Retro Diels-Alder
Rede molecular	<i>molecular networking</i>
RM	redes moleculares
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singleto
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
<i>sl</i>	singleto largo
TFa	ácido trifluoroacético
TOF	Tempo de voo
Tr.M.	tempo de retenção médio
<i>u</i>	unidade de massa atômica
UFBA	Universidade Federal da Bahia
<i>upload</i>	envio
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta
UV-DAD	Detector de ultravioleta por arranjo de diodo

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Estruturas químicas, espectros de IES-EM e de RMN das substâncias isoladas	97
Apêndice B – Tabela e figuras com os dados de espectrometria de massas e espectros de UV e massas obtidos para <i>Passiflora cincinnata</i>	183
Apêndice C – Tabela com os dados de espectrometria de massas para <i>Passiflora</i> ssp.	213

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Lista de Apêndices	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Família Passifloraceae e o Gênero <i>Passiflora</i> L.....	2
1.2 Morfologia do Gênero <i>Passiflora</i> L.....	3
1.3 A espécie <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	4
1.4 Composição química	5
1.5 Atividades biológicas dos metabólitos secundários do gênero <i>Passiflora</i> L.....	8
1.6 Espectrometria de Massas	10
1.7 <i>Global Natural Products Social Molecular Networking: Molecular Networking</i> ..	12
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Reagentes e materiais.....	16
3.1.1 Evaporador rotativo, liofilizador, estufa e moinhos	19
3.1.2 Banho de ultrassom, agitador de tubos, centrífuga, balanças e micropipetas	19
3.1.3 Análises por ressonância magnética nuclear	19
3.1.4 Análise de espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i> em alta resolução – IES-EM	19
3.1.5 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por <i>eletrospray</i> em alta resolução – CLAE-DAD-IES-EM.....	20
3.1.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (CLAE-DAD-IES-IT-EM ⁿ)	20
3.1.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (CLAE- DAD-Prep).....	21
3.2 Métodos.....	21

3.2.1 Preparo do material vegetal	21
3.2.2 Preparo do extrato bruto.....	21
3.2.3 Fracionamento do extrato bruto das folhas de <i>Passiflora cincinnata</i>	21
3.2.4 Avaliação do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Passiflora cincinnata</i> e suas frações por cromatografia em camada delgada.....	22
3.2.5 Fracionamento do extrato BuHO por Sephadex LH-20	22
3.2.6 Fracionamento da fração BuOH-2 por CLAE-DAD-Prep.....	22
3.2.7 Preparo das amostras de <i>Passiflora cincinnata</i> para análise por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EM ⁿ	23
3.2.8 Preparo de amostra de <i>Passiflora</i> ssp. para análise por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM	23
3.2.9 Metodologia analítica para análise do extrato metanólico das folhas de <i>Passiflora cincinnata</i> por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EM ⁿ	24
3.2.10 Desenvolvimento de metodologia analítica para análise do extrato metanólico das folhas de <i>Passiflora</i> ssp. por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM	25
3.2.11 Identificação dos compostos fenólicos das folhas e caules de <i>Passiflora cincinnata</i> por rede molecular e espectrometria de massas	25
3.2.12 Desreplicação dos compostos fenólicos das folhas de <i>Passiflora</i> ssp. por rede molecular e espectrometria de massas.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Estudo fitoquímico das folhas e caules de <i>Passiflora cincinnata</i>	27
4.1.1 Isolamento e identificação dos metabólitos majoritários das folhas e caules de <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.....	27
4.1.1.1 Isolamento dos metabólitos majoritários das folhas e caules de <i>Passiflora cincinnata</i>	27
4.1.1.2 Identificação das substâncias isoladas por ressonância magnética nuclear e IES-EM	29
4.1.2 Análises e identificação dos metabólitos das folhas e caules de <i>Passiflora cincinnata</i> por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EM ⁿ	41
4.1.2.1 Identificação dos metabólitos derivados do ácido clorogênico	44
4.1.2.2 Identificação de Flavonoides	47
4.1.3 Aplicação de rede molecular e espectrometria de massas na identificação dos metabólitos de <i>Passiflora cincinnata</i>	52

4.1.4 Importância farmacológica e ocorrência das substâncias isoladas e identificadas de <i>Passiflora</i> cincinnata no gênero <i>Passiflora</i> L.	59
4.2 Análises e desreplicação de compostos fenólicos das folhas de <i>Passiflora</i> ssp. por rede molecular e espectrometria de massas.....	61
4.2.1 Análise.....	61
4.2.2 Seleção dos parâmetros para geração das redes moleculares pelo GNPS	61
4.2.3 Análise das redes moleculares geradas pelo GNPS.....	62
4.2.4 Desreplicação dos compostos fenólicos das folhas de <i>Passiflora</i> ssp.	66
4.2.4.1 Desreplicação dos flavonoides C-glicosilados.....	66
4.2.4.2 Desreplicação dos flavonoides O-glicosilados	72
4.2.4.3 Desreplicação das proantocianidinas	74
4.2.4.4 Desreplicação dos derivados do ácido clorogênico.....	77
4.2.4.5 Detecção dos metabólitos das espécies de <i>Passiflora</i> ssp. na rede molecular.....	78
5 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICES	97

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, os produtos naturais são considerados excelentes fornecedores de princípios ativos com propriedades terapêuticas, sendo que um expressivo número de fármacos de diferentes classes terapêuticas deriva de protótipos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O estudo da composição química de matérias-primas vegetais objetivando o conhecimento do seu perfil fitoquímico e a descoberta de novos princípios ativos é de extrema relevância para o desenvolvimento de novos medicamentos (ATANASOV et al., 2015), contudo, também é de grande importância o conhecimento fitoquímico de maior amplitude, com análises metabolômicas para aplicação em estudos de sistemática, visando conhecermos um pouco mais sobre a função dos metabólitos secundários (ERNST, M. et al., 2014), pois as plantas produzem inúmeras substâncias de diferentes características químicas que são otimizados para exercer funções biológicas e ainda estão longe de serem investigados de forma exaustiva (ATANASOV et al., 2015).

Com o desenvolvimento e acoplamento de técnicas espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas, tornou-se possível a elaboração de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar substâncias com segurança, eficácia e qualidade, possibilitando a elucidação estrutural de moléculas complexas de fontes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas em larga escala (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013; VIEIRA; SANTOS; SILVA, 2018).

Recentemente, com a criação da plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), que visa o compartilhamento de dados de espectrometria de massas de diferentes fontes de produtos naturais, foi criada uma estrutura que permite a análise de dados brutos por uma biblioteca espectral de referência alimentada por toda a comunidade científica e livremente compartilhada. Assim sendo, o processo de identificação de substâncias conhecidas e de novos metabólitos foi facilitada, e também se implantou o conceito de “dados vivos”, através do qual os dados depositados são continuamente reanalisados, buscando a identificação de novas moléculas (WANG et al., 2016).

Esses avanços são fundamentais, pois há uma enorme quantidade de plantas existente no planeta, sendo a maioria desconhecida sob o ponto de vista científico. Estima-se que apenas 17% foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal, e, na

maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos, farmacológicos (FOGLIO et al., 2006; MORA et al., 2011) e com uma abrangência muito menor de investigação do ponto de vista metabólico (ERNST, M. et al., 2014). No Brasil, esse enfoque ainda se encontra em uma fase muito inicial, mas existe uma grande perspectiva de uso, principalmente com foco em gêneros e famílias com uso popular, como, por exemplo, o gênero *Passiflora*.

1.1 Família Passifloraceae e o Gênero *Passiflora* L.

A família Passifloraceae Juss. ex Roussel, *mon. cons.* pertence à ordem Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl e possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo entre as regiões tropicais e temperadas do planeta (BYNG et al., 2016). Estima-se que a família possua cerca de 750 espécies, distribuídas entre 17 gêneros (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007).

Ela é dividida em duas tribos, Paropsieae e Passiflorieae. A tribo Paropsieae está representada somente no *Velho Mundo*, Madagascar e África; a tribo Passiflorieae possui o maior número de gêneros da família e, na América Latina, é representada por cinco gêneros: *Tetrastylis* Barb.Rodr., *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast., *Ancisthrothyrus* Harms. e *Passiflora* L, sendo este último o mais representativo em relação ao número de espécies: cerca de 500 (ESCOBAR, 1988; ULMER; MACDOUGAL; ULMER, 2004; FEUILLET; MACDOUGAL, 2007).

No Brasil, também existe o relato da ocorrência dos cinco gêneros descritos para tribo Passiflorieae na América Latina, nos quais estão distribuídas cerca de 150 espécies, sendo a maior parte pertencente ao gênero *Passiflora* (cerca de 130 spp.), considerado o mais representativo devido à sua diversidade taxonômica (ARAÚJO; ALVES, 2013; BERNACCI et al., 2016).

A distribuição do gênero *Passiflora*, assim como sua família, ocorre de forma pantropical, com maior concentração de espécies entre os Trópicos de Câncer e Capricórnio, sendo que a maioria das espécies presentes no continente americano ocorre na região centro e sul da América do Sul (DEGINANI, 2001).

O gênero *Passiflora* possui uma classificação que o divide em 23 subgêneros, compostos por várias seções e séries (KILLIP, 1938; ESCOBAR, 1989), entretanto, a divisão mais utilizada hoje é proposta por Feuillet e Macdougall (2003), que agruparam esses subgêneros em quatro: *Passiflora*, *Deidamoides* (Harms) Killip, *Astropheia* (DC.) Mast. e *Decaloba* (DC.) Rchb. A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* está

distribuída nas Américas, sendo o Brasil e a Colômbia os países com maior variedade de espécies (CERVI, 1997).

No Brasil, as espécies desse gênero são denominadas popularmente como *maracujá*, especialmente aquelas que compõem o subgênero *Passiflora*. Várias espécies possuem importância comercial e farmacológica e são cultivadas principalmente para fabricação de doces, sucos e consumo de seus frutos (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL; ULMER, 2004)

1.2 Morfologia do Gênero *Passiflora* L.

A morfologia geral do gênero *Passiflora* L. possui basicamente a seguinte estrutura: raiz axial, com possibilidade de possuir raízes adventícias (VANDERPLANK, 2000); os caules podem ser cilíndricos, angulares e, raramente, quadrangulares, com estrias longitudinais (CERVI, 1997).

As espécies desse gênero possuem característica liana/trepadeira, constituída de gavinhas (normalmente solitárias e axilares, bem desenvolvidas, robustas ou finas) e estípulas sempre presentes e de forma variável, podendo ser lineares ou ovaladas (CERVI, 1997).

As folhas estão dispostas, geralmente, de maneira alternada (VANDERPLANK, 2000), possuem forma variável, podendo ser orbiculares, elípticas ou bastante ovaladas e inteiras ou lobadas. As margens foliares geralmente são inteiras, apesar de algumas espécies apresentarem bordas serradas ou denteadas. Podem ainda ser trinervadas ou pentanervadas (CERVI, 1997).

As flores são hermafroditas, completas, isoladas ou em pares nas axilas das folhas. O cálice pode ser verde ou colorido, constituído por cinco sépalas. A corola, normalmente de cinco pétalas, pode ser verde, amarelada ou fortemente colorida. O fruto é do tipo baga: ovoide, globosa ou fusiforme de casca quebradiça, lisa e de aspecto coriáceo. As sementes são ovoides, com endosperma carnoso (VANDERPLANK, 2000).

Quanto aos subgêneros *Astrophea*, com cerca de 50 espécies, é o mais diferenciado, podendo ocorrer espécies na forma de árvores, arbustos ou lianas arbustivas, com folhas não lobadas, sendo a maioria nativa da região norte da América do Sul. *Decaloba* geralmente é formada por pequenas trepadeiras, com a maioria das espécies possuindo folhas variegadas ou bilobadas e flores pequenas, distribuída pelo sudeste do continente asiático, Austrália e nas Américas do Norte e Sul, sendo constituída por cerca de 200 espécies. *Deidamioides* possui como principal característica o surgimento das flores a partir das gavinhas, e sua distribuição

ocorre principalmente na região noroeste da América do Sul, sendo constituída por cerca de 10 espécies. *Passiflora*, por sua vez, possui o maior número de espécies entre os subgêneros, mais de 230, sendo caracterizado por possuir flores grandes, normalmente com uma coroa com faixas de diversas cores, e ocorre nas Américas do Norte, Central e do Sul (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003; MUSCHNER et al., 2012).

1.3 A espécie *Passiflora cincinnata* Mast.

Passiflora cincinnata Mast. é uma espécie pertencente ao gênero *Passiflora* L. (APONTE; JÁUREGUI, 2004), e ao subgênero *Passiflora* (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003), com ampla distribuição na América do Sul, sendo registrada do leste do Brasil até o oeste da Bolívia, ocorrendo em campos rupestres, caatinga, floresta estacional e cerrado (NUNES; QUEIROZ, 2006).

Tal espécie é popularmente conhecida como maracujá-brabo, maracujá-cultivado, maracujá-de-boi, maracujá-do-mato e maracujá-mochila (NUNES, 2002).

Ocorre naturalmente e com ampla distribuição nas regiões semiáridas do nordeste brasileiro (VANDERPLANK, 2000). Na região de Vitória da Conquista (Bahia), esta espécie é nativa e pode ser facilmente observada nas margens de suas rodovias (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). A espécie está representada a seguir, na figura 1.

Figura 1 – Imagem das folhas, fruto, botão floral e flor da espécie *Passiflora cincinnata* Mast.

Fonte: Autoria própria

Quanto às suas características morfológicas, é uma trepadeira inerme, com caule cilíndrico; estípulas persistentes, inteiras; pecíolo medindo de 1,5-5 cm de comprimento, com duas glândulas sésseis situadas na sua porção basal; as folhas são membranáceas, (3-)5-lobada à (3-)5-partida, 3-lobada nas folhas jovens; pedúnculos verdes de 2-8 cm de comprimento; flores de 8-12 cm de diâmetro, face externa verde, face interna roxa ou violácea; baga, globosa, verde-escura, glabra; sementes ovaladas, reticuladas, foveoladas (NUNES; QUEIROZ, 2006).

Embora essa espécie seja cultivada em escala doméstica, dispõe de grande potencial agrônomo, pois pode contribuir com o melhoramento genético do maracujazeiro comercial, além de apresentar características interessantes como resistência a doenças e a algumas pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, androginóforo mais curto (aspecto que facilita a polinização por insetos menores) e, assim como outras espécies silvestres de *Passiflora*, pode apresentar maior concentração de componentes químicos, sendo esses de grande interesse científico (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; MELETTI et al., 2005; KIILL et al., 2010). Essas características justificam o empenho na caracterização química detalhada desta espécie e também sua co-localização entre outras espécies da família.

1.4 Composição química

O gênero *Passiflora* possui importantes constituintes fitoquímicos, como carotenoides, flavonoides, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, esteroides, lignanas, ácidos graxos, aminoácidos, derivados do ácido clorogênico e proantocianidinas (AOYAGI; KIMURA; MURATA, 1974; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; BIRK et al., 2005; FARAG et al., 2016; GADIOLI et al., 2016).

Apesar da composição química presente no gênero *Passiflora* variar muito entre as espécies, os flavonoides e os alcaloides são as classes mais estudadas, pois são as de maior interesse para a indústria farmacêutica e cosmética (DUTRA et al., 2016).

Os flavonoides estão presentes em muitas partes das plantas, principalmente nas folhas e frutos, e são principalmente do tipo flavonas glicosiladas. Já os alcaloides encontram-se principalmente em folhas e caules e são indólicos simples, do tipo β -carbolina (ZIBADI et al., 2007), porém são encontrados em baixa concentração. Em um estudo realizado por Abourashed, Vanderplank e Khan (2003) com 104 espécies de *Passiflora* (folhas), foi verificada a presença de alcaloides harmônicos em aproximadamente 50% das amostras,

porém a concentração média encontrada foi inferior a 1 ppm. Mais recentemente, em uma análise metabolômica realizada com 17 espécies do gênero (folhas), apenas em *P. incarnata* foi detectado, ao nível de traços, o alcaloide harmana (FARAG et al., 2016).

Os compostos fenólicos são os principais constituintes do gênero, principalmente os flavonoides C-glicosilados (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; PATEL et al., 2011). Derivados do ácido clorogênico foram encontrados em *P. edulis* (fruto e semente), *P. inccarnata* (flores), *P. bahiensis* (folhas) e *P. leschenaultii* (folhas) (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012; GADIOLI et al., 2016). Proantocianidinas foram encontrados nos frutos de *P. mollissima* (GARCIA-RUIZ et al., 2017) e nas folhas de *P. coccínea* (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012).

Vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina e seus derivados são os metabólitos mais frequentemente encontrados no gênero e, devido à sua alta prevalência, têm sido frequentemente utilizados como marcadores químicos em diferentes estudos (ZUCOLOTTI et al., 2012; COSTA et al., 2013).

A figura 2 apresenta os principais metabólitos já identificados no gênero *Passiflora*.

Figura 2 – Metabólitos secundários identificados no gênero *Passiflora* (Passifloraceae)

A: Flavonoides; B: Alcalóides indólicos; C: Glicosídeos cianogênicos; D: Derivados do ácido clorogênico; E: Proantocianidinas; G: glicose; R: ramnose; X: xilose; Deo: deoxihexose; (E)Cat: catequina/epicatequina
 Fonte: Adaptado de: Abourashed; Vanderplank e Khan (2003); Dhawan; Dhawan e Sharma (2004); Patel et al., (2011); Sakalem; Negri e Tabach (2012); Farag et al. (2016); Gadioli et al. (2016).

Quanto a *Passiflora cincinnata*, não há, na literatura, um estudo dedicado ao conhecimento da sua composição química, mas existem alguns poucos trabalhos em que os pesquisadores relatam a presença de carotenoides em seus frutos (WONDRACEK et al., 2011) e folhas (LIMA, 2011); ácido linoleico nas sementes (LOPES et al., 2010); compostos voláteis nas flores (MONTERO et al., 2016); e os flavonoides isorientina, orientina, isovitexina e vitexina em suas folhas (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002; WOSCH et al., 2017).

1.5 Atividades biológicas dos metabólitos secundários do gênero *Passiflora* L.

O estudo da família Passifloraceae iniciou-se no século XVIII (CERVI, 1997), e muitas espécies possuem uma longa história de uso na medicina tradicional, mas poucas foram avaliadas cientificamente (BRASSEUR; ANGENOT, 1984).

Passiflora incarnata é considerada a espécie mais comum utilizada na fitoterapia ocidental para o tratamento da ansiedade e, junto com *P. alata* e *P. edulis*, são as espécies mais estudadas (BERGNER, 1995; ZUCOLOTTI et al., 2012).

Tradicionalmente, extratos das partes aéreas de espécies de *Passiflora* são utilizados para o tratamento da ansiedade, insônia e excitação, mas estudos realizados para avaliar os efeitos das substâncias presentes em diferentes espécies do gênero *Passiflora* relatam também atividades antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, antitumoral, hemolítica, ansiolítica, anti-hipertensiva, hipnótica, sedativa e analgésica (BRASSEUR; ANGENOT, 1984; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; INGALE; HIVRALE, 2010).

Entre as espécies nativas no Brasil, *P. alata* é uma das mais utilizadas medicinalmente, e *P. edulis* é a espécie do gênero mais explorada pela indústria alimentícia (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Essas duas espécies apresentam atividades biológicas semelhantes, e estudos já avaliaram seu potencial analgésico e sedativo e também observaram um discreto efeito anticonvulsivante em *P. alata* (OGA et al., 1984). O efeito ansiolítico dessas espécies também já foi testado, apresentando bons resultados (PETRY et al., 2001; KLEIN et al., 2014). Atividade antioxidante (RUDNICKI et al., 2007) e anti-inflamatória (MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007) são outras propriedades já avaliadas que apresentaram respostas positivas, demonstrando a importância dessas espécies.

P. incarnata demonstra um amplo espectro de atividades farmacológicas, incluindo atividades ansiolítica, sedativa, antitussígena, antiasmática e antidiabética, mas o uso mais

comum é para o tratamento de ansiedade e distúrbios do sono (MIRODDI et al., 2013). Dhawan e Sharma (2004) destacam que o extrato das folhas desta espécie é um depressor significativo do sistema nervoso central, sendo tradicionalmente utilizada para esse fim em diferentes países no mundo, inclusive no Brasil, mesmo não sendo uma espécie nativa.

Passiflora cincinnata é utilizada popularmente em algumas regiões para o tratamento de doenças venéreas (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; YAZBEK et al., 2016), como calmante e para insônia, doenças renais (RIBEIRO et al., 2014), hipertensão (SOUZA et al., 2014) e inflamações (SARAIVA et al., 2015). Alguns estudos reportam que seu extrato possui potencial como agente antimicrobiano (SIEBRA et al., 2016) e também demonstraram atividade neuroprotetora (BRANDÃO et al., 2017).

Embora haja ampla atribuição de atividades biológicas relacionadas às espécies do gênero, o emprego mais usual são aqueles relacionados ao sistema nervoso central. Entretanto, mesmo com um grande volume de estudos, ainda não está claro quais são as substâncias responsáveis por essa ação (GOSMANN et al., 2011), sendo essa atividade frequentemente relacionada à presença de alcaloides. A ocorrência de alcaloides indólicos em algumas espécies do gênero sugere que estes constituintes químicos podem ser os responsáveis pela ação ansiolítica, mas eles são encontrados em concentração ao nível de traços e, além disso, foram classificados como estimulantes e inibidores de monoamina oxidase, o que promoveria ação antidepressiva em vez de efeitos sedativos (INGALE; HIVRALE, 2010).

A crisina (5,7-dihidroxi-flavona) também é relacionada ao seu potencial ansiolítico (ZANOLI; AVALLONE; BARALDI, 2000), mas a correlação dessa substância com ação central não é clara (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Vários trabalhos avaliaram atividade farmacológica da benzoflavona (5,6-benzoflavona), porém os resultados do seu potencial ansiolítico não foram conclusivos, e também foi observado que a produção dessa substância, quando ocorre, é muito baixa para as espécies de *P. incarnata* avaliadas (HOLBIK et al., 2010; MIRODDI et al., 2013). Os flavonoides, característicos do gênero, também têm sua presença ligada à ação ansiolítica, e há estudos que demonstraram que eles podem ser metabolizados pela flora intestinal, produzindo ácidos hidroxi-feniláceticos, e que estes seriam os responsáveis pela ação ansiolítica dessa classe (VISSIENNON et al., 2012). Esse conjunto de informações leva ao entendimento de que não é possível atribuir essa ação a uma só substância, mas sim ao conjunto delas, reforçando a necessidade do conhecimento químico das espécies do gênero.

Outras atividades relacionadas ao gênero também são atribuídas aos metabólitos presentes em suas espécies: derivados do ácido clorogênico são correlacionados com atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética (DOS SANTOS, et al., 2005, 2006); proantocianidinas, com atividades antioxidante e anti-inflamatória (DIXON; XIE; SHARMA, 2005); e os flavonoides possuem uma ampla distribuição no gênero e diversas indicações farmacológicas, entre elas antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

1.6 Espectrometria de Massas

Espectrometria de massas é uma das principais técnicas analíticas utilizadas para identificação e confirmação de moléculas. A capacidade dessa técnica em detectar e quantificar metabólitos de diferentes fontes, ou até mesmo *in situ* em material vegetal ou tecido animal, abriu um universo de possibilidades do uso dessa ferramenta na biologia sistêmica (LOPES; DA SILVA, 2017).

O segundo grande avanço da espectrometria de massas se deu com o desenvolvimento da fonte de ionização por *electrospray* por John B. Fenn. Através do seu desenvolvimento, foi possível analisar moléculas termolábeis de baixa e alta massa molecular mediante sua ionização e transferência para o estado gasoso, desenvolvendo, assim, novas aplicações da espectrometria de massas na biologia molecular, na metabolômica e na medicina (DEMARQUE et al., 2016). A ionização por *electrospray* tornou possível o acoplamento do espectrômetro de massas à cromatografia líquida, proporcionando análises de misturas complexas, como amostras de produtos de origem natural, e criando uma técnica altamente sensível e seletiva, capaz de prover informações para quantificar moléculas conhecidas, identificar moléculas desconhecidas e elucidar estruturas e propriedades químicas de diferentes moléculas (DIAS; DE MELO; CROTTI, 2012; HERRERO et al., 2017).

A análise em um espectrômetro de massas se inicia com a introdução da amostra, que pode ocorrer diretamente, através de um sistema cromatográfico ou por outras técnicas de separação compatíveis, seguida da geração de um íon em fase gasosa. Os íons gerados são separados de acordo com sua relação massa-carga (m/z) e, então, detectados conforme sua abundância (GATES et al., 2007). Um espectrômetro de massas basicamente pode ser dividido em três partes: fonte de ionização, analisador e detector.

Na fonte de ionização por *electrospray*, a amostra em fase líquida é introduzida de forma contínua em um capilar metálico, no qual é aplicado um potencial elétrico, promovendo

a migração de cargas para interface capilar/solução, formando uma dupla camada elétrica. Na forma de um spray, essa solução é nebulizada, formando gotas com superfícies carregadas que são secas por um gás. A evaporação do solvente provoca a diminuição do tamanho das gotas e, por consequência, aumenta a repulsão entre as cargas, até que ocorra o fenômeno denominado “explosão coulômbica”, liberando os íons em fase gasosa (FENN et al., 1989; CROTTI et al., 2006; GATES et al., 2007). Os íons formados apresentam baixo conteúdo energético, de forma que é observada pouca ou nenhuma fragmentação, e sim moléculas desprotonadas ou protonadas e/ou íon aduto formados pela interação com cátions ou ânions, normalmente com K^+ , Na^+ e Cl^- (FENN et al., 1989; CROTTI et al., 2006; GATES et al., 2007).

Os íons gerados, por diferença de potencial, são acelerados em direção ao analisador, no qual campos magnéticos ou elétricos os resolvem (separam) conforme suas relações massa-carga (GATES et al., 2007; HERRERO et al., 2017). Em analisadores do tipo tempo de voo (ToF), a separação dos íons com diferentes m/z ocorre através de sua dispersão sobre o tempo em uma região livre de campo (*flight tube*) após serem acelerados, ao mesmo tempo, por uma voltagem fixa. Isso faz com que os íons de diferentes m/z levem tempos distintos para percorrerem a mesma distância e atingirem o detector, íons de menor m/z são detectados primeiro e os de maiores m/z por último, e este tipo de analisador é capaz de gerar resultados em alta resolução (KRAJ; DESIDERIO; NIBBERING, 2008; HERRERO et al., 2017).

Já em analisadores de massa sequencial, os íons gerados podem ser seletivamente selecionados e fragmentados. Analisadores do tipo *trap* possuem a capacidade de reter um íon em um determinado espaço de forma seletiva e estável. Mais especificamente, o analisador do tipo *ion trap*, através do ajuste de amplitude, é capaz de fragmentar esse íon e ejetar seus íons produtos para serem detectados, ou, quando necessário, pode-se aprisionar e acumular seus íons produtos e, de forma seletiva, promover sua fragmentação. Desse modo, é possível obter múltiplos estágios de fragmentação em uma mesma análise (KRAJ; DESIDERIO; NIBBERING, 2008; VESSECCHI et al., 2011; HERRERO et al., 2017).

Ao detector de um equipamento de espectrometria de massas cabe a responsabilidade de converter a energia dos íons em um sinal elétrico, que é gravado eletronicamente, gerando respostas lineares, com baixo ruído e em um curto período de tempo, promovendo, assim, as informações necessárias para a interpretação dos resultados (VESSECCHI et al., 2011; HERRERO et al., 2017).

O avanço da espectrometria de massas gerou o desenvolvimento de novas fontes de ionização, bem como novos analisadores ou combinação entre si, e criou os espectrômetros de

analisadores híbridos. Seus acoplamentos com técnicas de separação promoveu essa técnica à ferramenta essencial para o estudo da química de produtos naturais (VIEIRA; SANTOS; SILVA, 2018). Assim, vastos são os campos possíveis de estudo, e a desreplicação é um deles. Ela se baseia na identificação de uma substância desconhecida fundamentando-se em informações prévias, evitando a necessidade de isolamento de substâncias já conhecidas e auxiliando na descoberta de novas moléculas, no conhecimento do perfil químico de misturas complexas e no estudo da biologia sistêmica (LANG et al., 2008; WURTZEL; KUTCHAN, 2016; VIEIRA; SANTOS; SILVA, 2018).

A espectrometria de massas também é uma das principais técnicas utilizadas em metabolômica (DA SILVA; LOPES; SILVA, 2018) e na criação de bancos de dados (PILON et al., 2018). Seus avanços têm impactado profundamente no entendimento de funções biológicas, gerando progresso no conhecimento científico, que poderá, no futuro, promover uma melhor qualidade de vida (BAUERMEISTER et al., 2018).

1.7 *Global Natural Products Social Molecular Networking: Molecular Networking*

Os avanços da espectrometria de massas são notáveis, pois, em um único experimento, podem-se gerar milhares de espectros em um curto espaço de tempo, e um projeto com um grande conjunto de dados é capaz de gerar milhões de espectros. A análise desse alto volume de informações manualmente torna-se impossível, o que faz com que seja necessária a aplicação de ferramentas que, quando combinadas com a versatilidade da espectrometria de massas, possa superar esses obstáculos (YANG et al., 2013; BOUSLIMANI et al., 2014; WANG et al., 2016).

Dentro dessa perspectiva, surgiu o *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). GNPS é uma plataforma livre, capaz de agrupar espectros baseados em suas similaridades espectrais, gerando, assim, um *molecular networking* (rede molecular) que facilita a análise de dados espectrais e acelera a desreplicação (WANG et al., 2016). A abordagem de criação de rede molecular é fundamentada no agrupamento de substâncias de acordo as semelhanças nos padrões de fragmentação EM/EM de cada molécula detectada, formando grupos que partilham semelhanças em seus perfis espectrais (YANG et al., 2013; WANG et al., 2016).

GNPS armazena e analisa dados de espectrometria de massas, permitindo seu compartilhamento entre a comunidade científica. Ele possui uma biblioteca espectral construída pelos seus próprios usuários, através da inserção de espectros de substâncias de

referência, comerciais ou isoladas, e também congrega outras bibliotecas (*MassBank*, *ReSpect* e *NIST*), de tal forma que dispõe de milhares de espectros de EM/EM relativos a mais de 12000 substâncias diferentes, sendo que esse número aumenta a cada dia devido ao compartilhamento comunitário, que baseia sua criação (WANG et al., 2016).

Para a construção das redes moleculares, é preciso, inicialmente, realizar a conversão dos dados brutos para um formato de arquivo compatível com o sistema (.mgf; .mzXML e .mzML) e, em sequência, o envio (*upload*) desses dados para plataforma. No fluxo de trabalho do GNPS, é necessária a inserção dos padrões de análise que levam em consideração o tipo de espectrômetro de massas utilizado (alta ou baixa resolução). Deve-se determinar qual o valor de tolerância de massa do íon precursor e também para os íons produtos que serão permitidos, que, por padrão, é de $\pm 0,2 u$ para dados em alta resolução e $\pm 2,0 u$ para dados em baixa resolução (WANG et al., 2016).

Nos parâmetros avançados, define-se o valor mínimo de cosseno que deve ocorrer entre um par de espectros EM/EM de consenso para que eles sejam agrupados: esse índice varia de 0 a 1, sendo que 1 indica espectros idênticos, e 0, o inverso, por padrão, esse valor é de 0,7; o mínimo de íons produtos emparelhados - que consiste no número mínimo de íons fragmentos comuns que são compartilhados por dois espectros de EM/EM de consenso separados para serem agrupados na rede molecular - tem 6 como valor padrão, e também o número mínimo de espectros de consenso necessário para serem considerados na rede molecular, por padrão, este valor é de 2 espectros quando se analisa baixo conjunto de dados e 5 espectros quando se analisam grandes conjuntos de dados. Contudo, esses valores são passíveis de alterações, dependendo da especificidade da amostra ou método de análise (WANG et al., 2016).

Após definição desses dados, o GNPS realiza a comparação de todos os espectros de EM/EM relativos à(s) amostra(s) em análise entre si, buscando semelhanças espectrais, de forma que os espectros serão agrupados de acordo com seus padrões espectrais, utilizando, para isso, um algoritmo computacional próprio e do *software* MSCluster. Paralelo a esse processo, esses espectros também são confrontados com a biblioteca espectral, de forma a encontrar semelhanças entre os espectros em análise e os relativos às substâncias de referência. Aqueles correspondentes são anotados e exibidos (FRANK et al., 2007; YANG et al., 2013; WANG et al., 2016).

Após a geração da rede molecular, ela pode ser exportada em forma de texto e importada para o *software* livre Cytoscape, podendo, então, ser visualizada em forma de um mapa de rede molecular, que é formado por nós (*node*), unidos por arestas (*edge*), dando

origem aos grupos (*clusters*), que possuem substâncias análogas e apresentam padrões de fragmentação semelhantes (SHANNON et al., 2003; WANG et al., 2016).

O processo de desreplicação se inicia pela análise da rede molecular, os nós anotados são úteis como ponto de partida para determinação das demais substâncias pertencentes à rede, que, por estarem conectados, partilham de um perfil de fragmentação semelhante, de forma que possivelmente possuem similaridades estruturais, facilitando, assim, a descoberta parcial ou total das demais substâncias pertencentes ao grupo. Outra vantagem nesse processo é que os dados depositados publicamente são continuamente reanalisados em busca de novas anotações, criando, assim, um conceito denominado “dados vivos” (WANG et al., 2016).

Desde sua criação, o GNPS tem sido utilizado em diferentes estudos, e a aplicação da estratégia de rede molecular ao estudo de produtos naturais relacionados ao ambiente marinho levou à descoberta de uma série de derivados policetídeos com atividade antibacteriana (LIAW et al., 2015), bem como anti-inflamatórios e analgésicos análogos de nucleosídeos (BERTIN et al., 2015). Uma abordagem de metabolômica e genômica conjunta permitiu a detecção de análogos não relatados e os intermediários biossintéticos de quatro famílias moleculares derivadas de peptídeo sintase não ribossômicas com atividades antibacterianas em *Streptomyces roseosporus* (LIU et al., 2014).

Em nosso grupo, diversos trabalhos têm utilizado a estratégia de rede molecular no estudo da química de produtos naturais, entre eles, pode-se destacar o realizado com anfíbios da espécie *Hypsiboas punctatus*, que levou à identificação de substâncias responsáveis pela fluorescência desta espécie, contrariando a ideia de que, no ambiente terrestre, a fluorescência existiria apenas em insetos e abrindo novos caminhos para entendimento do papel biológico dessas substâncias (TABOADA et al., 2017).

Embora as redes moleculares tenham sido recentemente implementadas, a amplitude de suas aplicações se expande cada dia mais. A natureza visual das redes moleculares permite uma interpretação rápida dos dados de EM, crucial para a tradução, em um período de tempo clinicamente relevante, e o entendimento da diversidade química (QUINN et al., 2017). Entretanto, deve-se considerar que as redes moleculares não superaram plenamente os desafios clássicos em espectrometria de massas (aquisição e interpretação), de forma que ainda é necessário investigar os mecanismos envolvidos nas reações de fragmentação e a cooperação entre jovens e experientes espectrometristas de massas para que se possa superar esses desafios e alcançar os objetivos propostos (DEMARQUE et al., 2016; QUINN et al., 2017).

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são: identificar os principais metabólitos secundários presentes nas folhas e caules de *Passiflora cincinnata* Mast. e isolar os seus constituintes majoritários; obter dados de espectrometria de massas desses metabólitos por CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ; e realizar um estudo de desreplicação dos compostos fenólicos presentes nas folhas de 46 espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) mantidas em herbário, através da combinação de dados de massas e rede molecular.

Pontualmente os objetivos específicos são:

- Isolamento de padrões de metabólitos secundários de *Passiflora cincinnata* Mast;
- Análise das principais reações de fragmentação em IES-EMⁿ;
- Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM para a análise de 46 espécies conservadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana;
- Análise dos dados através do sistema de redes moleculares aplicando o sistema do GNPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e materiais

Para análise por cromatografia em camada delgada, colunas cromatográficas, preparo e fracionamento dos extratos e solubilização das amostras, foram utilizados metanol (MeOH), acetato de etila (AcOEt), diclorometano (CH₂Cl₂), hexano (Hex), etanol (EtOH), grau técnico, purificados no laboratório de destilação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP) e *n*-butanol (BuOH) grau analítico (Synth).

Como solvente para preparação de amostras e análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (EM), foram utilizados (MeOH), acetonitrila (MeCN), ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico (HCOOH) grau HPLC (J.T. Baker) e água purificada (H₂O) (18 mΩ Direct-Q[®], Merck Millipore).

Para solubilização e análise das amostras pela técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), utilizou-se metanol deuterado (CD₃OD), da marca Sigma-Aldrich, e tubos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 175 x 5 mm (Sigma-Aldrich[®]).

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), foram utilizadas folhas de sílica gel 60 F254 (Riedel-de-Haen) para cromatografia em camada fina, com 0,2 mm de espessura e diâmetro de 20 x 20 cm. Também foram utilizadas placas de vidro (10 x 5 cm) recobertas com uma fina camada (0,25 mm) de sílica gel GF254 (Merck).

Para observação dos perfis cromatográficos obtidos por CCDC, utilizou-se, como agente revelador, solução de anisaldeído sulfúrico e/ou irradiação na região do UV (254 nm).

Para análise por cromatografia em coluna por gel de exclusão, foi utilizada uma coluna cromatográfica de 1000 mm de comprimento por 70 mm de diâmetro empacotada com 300 g de Sephadex LH-20 (GE).

Aproximadamente 7,0 Kg de folhas e caules de uma população da espécie *Passiflora cincinnata* Mast. foram coletados no campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia (UFBA), no município de Vitória da Conquista BA (W 40°. 48'. 41"; S 14°. 52'. 39" – 923 m de altitude). Uma exsicata dessa população foi preparada e depositada (NHESBVC 8053) no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Vitória da Conquista – BA.

Amostras de *Passiflora* ssp. (76 amostras; 46 espécies) oriundas de exsicatas foram fornecidas pelo Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana - HUEFS, Feira de Santana – BA, pela Dra. Teonildes Sacramento Nunes, conforme descrito na tabela 1.

A permissão de acesso e pesquisa ao patrimônio genético (AB0AE7A) foi obtida através de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen.

Tabela 1 – Identificação das exsicatas de *Passiflora* fornecidas pelo HUEFS

Nr	Espécie	Bioma de Coleta	Subgênero	Registro HUEFS [#]
1	<i>P. acuminata</i>	Amazônia	<i>Decaloba</i>	201386 ²⁰¹⁰
2	<i>P. acuminata</i>	Amazônia	<i>Decaloba</i>	151156 ²⁰⁰³
3	<i>P. alata</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	142424 ²⁰⁰⁸
4	<i>P. alata</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	110342 ²⁰⁰⁶
5	<i>P. amethystina</i>	*Cerrado/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	108183 ²⁰⁰⁶
6	<i>P. amethystina</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	110381 ²⁰⁰⁶
7	<i>P. auriculata</i>	Amazônia	<i>Decaloba</i>	201325 ²⁰¹²
8	<i>P. bahiensis</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	110644 ²⁰⁰⁶
9	<i>P. bahiensis</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	91337 ²⁰⁰⁴
10	<i>P. cacao</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	202504 ²⁰¹³
11	<i>P. caerulea</i>	Pampa	<i>Passiflora</i>	115190 ²⁰⁰⁶
12	<i>P. caerulea</i>	Argentina	<i>Passiflora</i>	47192 ¹⁹⁹⁹
13	<i>P. capsularis</i>	Mata Atlântica	<i>Decaloba</i>	117474 ²⁰⁰⁶
14	<i>P. cincinnata</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	22067 ¹⁹⁹⁵
15	<i>P. cincinnata</i>	*Cerrado/Caatinga	<i>Passiflora</i>	43634 ²⁰⁰⁰
16	<i>P. coccinea</i>	Amazônia	<i>Passiflora</i>	112091 ²⁰⁰⁵
17	<i>P. coccinea</i>	Amazônia	<i>Passiflora</i>	98561 ²⁰⁰⁵
18	<i>P. contracta</i>	Mata Atlântica	<i>Deidamioides</i>	124222 ²⁰⁰⁷
19	<i>P. contracta</i>	Mata Atlântica	<i>Deidamioides</i>	124218 ²⁰⁰⁷
20	<i>P. contracta</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Deidamioides</i>	124279 ²⁰⁰⁷
21	<i>P. edmundoi</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	133018 ²⁰⁰¹
22	<i>P. edmundoi</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	133653 ²⁰⁰⁸
23	<i>P. edulis</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	142404 ²⁰⁰⁸
24	<i>P. edulis</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	126760 ²⁰⁰⁷
25	<i>P. eicheleriana</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	173585 ²⁰⁰⁸
26	<i>P. foetida</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	64448 ²⁰⁰⁴
27	<i>P. foetida</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	92786 ²⁰⁰⁴
28	<i>P. foetida</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	146023 ²⁰⁰⁸
29	<i>P. glandulosa</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	117606 ¹⁹⁸⁵
30	<i>P. haematostigma</i>	Mata Atlântica	<i>Astrohea</i>	88104 ²⁰⁰⁴
31	<i>P. jilekii</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	172403 ¹⁹⁹⁵
32	<i>P. jilekii</i>	Cerrado	<i>Passiflora</i>	104461 ²⁰⁰⁶
33	<i>P. luetzelburgii</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	157662 ²⁰⁰⁹
34	<i>P. luetzelburgii</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	131089 ²⁰⁰⁷
35	<i>P. malacophylla</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	58609 ¹⁹⁶⁸

Continua

Conclusão

Nr	Espécie	Bioma de Coleta	Subgênero	Registro HUEFS [#]
36	<i>P. malacophylla</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	66775 ²⁰⁰²
37	<i>P. mansoi</i>	Mata Atlântica	<i>Astrohea</i>	196423 ²⁰¹²
38	<i>P. mendoncae</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	175660 ²⁰¹¹
39	<i>P. mierssi</i>	Cerrado	<i>Passiflora</i>	9114 ¹⁹⁸⁹
40	<i>P. mierssi</i>	Cerrado	<i>Passiflora</i>	64087 ²⁰⁰⁰
41	<i>P. misera</i>	Mata Atlântica	<i>Decaloba</i>	118805 ²⁰⁰⁵
42	<i>P. misera</i>	Mata Atlântica	<i>Decaloba</i>	115606 ²⁰⁰⁶
43	<i>P. mucronata</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	118124 ²⁰⁰⁵
44	<i>P. mucronata</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	141287 ²⁰⁰⁶
45	<i>P. mucugeana</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	58081 ²⁰⁰²
46	<i>P. mucugeana</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	91705 ²⁰⁰⁵
47	<i>P. nitida</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	108852 ²⁰⁰⁵
48	<i>P. organensis</i>	Cerrado	<i>Decaloba</i>	104460 ²⁰⁰⁶
49	<i>P. organensis</i>	Mata Atlântica	<i>Decaloba</i>	115605 ²⁰⁰⁶
50	<i>P. ovalis</i>	Mata Atlântica	<i>Deidamioides</i>	106464 ¹⁹⁹³
51	<i>P. ovalis</i>	Mata Atlântica	<i>Deidamioides</i>	124248 ²⁰⁰⁷
52	<i>P. pohlii</i>	Mata Atlântica	<i>Decaloba</i>	110366 ²⁰⁰⁶
53	<i>P. quadrangularis</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	179840 ²⁰¹³
54	<i>P. racemosa</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	80660 ²⁰⁰⁴
55	<i>P. recurva</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	133035 ²⁰⁰⁸
56	<i>P. recurva</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	131779 ²⁰⁰⁷
57	<i>P. rhamnifolia</i>	Caatinga	<i>Astrohea</i>	21529 ¹⁹⁹⁴
58	<i>P. rhamnifolia</i>	Caatinga	<i>Astrohea</i>	104248 ²⁰⁰⁶
59	<i>P. setacea</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	118097 ²⁰⁰⁷
60	<i>P. setacea</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	108482 ²⁰⁰⁶
61	<i>P. sidaefolia</i>	Cerrado	<i>Passiflora</i>	104465 ²⁰⁰⁶
62	<i>P. silvestres</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	126244 ²⁰⁰⁷
63	<i>P. silvestres</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	128756 ²⁰⁰⁷
64	<i>P. speciosa</i>	*Cerrado/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	70529 ²⁰⁰³
65	<i>P. suberosa</i>	Caatinga	<i>Decaloba</i>	65694 ¹⁹⁹⁵
66	<i>P. suberosa</i>	Caatinga	<i>Decaloba</i>	1100 ¹⁹⁹²
67	<i>P. subrotunda</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	181534 ²⁰¹¹
68	<i>P. subrotunda</i>	Caatinga	<i>Passiflora</i>	145948 ²⁰⁰⁸
69	<i>P. tenuifolia</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	10238 ¹⁹⁸⁵
70	<i>P. tholozanii</i>	Amazônia	<i>Passiflora</i>	176308 ²⁰¹⁰
71	<i>P. timboensis</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Deidamioides</i>	170739 ²⁰¹¹
72	<i>P. trintae</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	205267 ²⁰¹⁴
73	<i>P. trintae</i>	*Caatinga/Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	58613 ¹⁹⁶⁸
74	<i>P. vespertilio</i>	Amazônia	<i>Decaloba</i>	176305 ²⁰¹¹
75	<i>P. watsoniana</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	6798 ¹⁹⁸⁶
76	<i>P. watsoniana</i>	Mata Atlântica	<i>Passiflora</i>	199344 ²⁰¹³

*Zona de transição; HUEFS[#]: Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana^{Ano de Coleta}

3.1.1 Evaporador rotativo, liofilizador, estufa e moinhos

Para concentração de extratos e amostras, foi utilizado aparelho de rota-evaporação IKA, modelo RV 10 Digital V e, para secagem, liofilizador Liotop, modelo L101. Para secagem do material vegetal coletado, utilizou-se estufa de ar circulante SPlabor modelo SP 102 a 45°C por 72 horas; e, para trituração, moinho de facas Biothec BT 602 e moinho analítico Quimis q298a21.

3.1.2 Banho de ultrassom, agitador de tubos, centrífuga, balanças e micropipetas

Foi utilizado banho de Ultrassom Sanders, modelo Soniclean 2PS, agitador de tubos tipo vortex modelo Phoenix AP56, centrífugas (Fanem 206; Boeco M-240 R, Rotor 2424-B), balanças analíticas (Marte As1000; MettlerToledo AG 245; Shimadzu AY220) e Micropipetas (Gilson).

3.1.3 Análises por ressonância magnética nuclear

Utilizou-se espectrômetro Bruker Avance® DRX-500 e DRX-400, operando respectivamente em 500 MHz e 400 MHz para ^1H e 100 MHz, e 125 MHz para ^{13}C , no Departamento de Química (FFCLRP-USP).

3.1.4 Análise de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* em alta resolução – IES-EM

Para os experimentos de EM com ionização por *eltrospray* (IES) em alta resolução (AR), utilizou-se espectrômetro de massas micrOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics®. Os espectros foram adquiridos em modo positivo e negativo, empregando IES via bomba de infusão 200 $\mu\text{L h}^{-1}$ (Kd Scientific) e analisador de massas híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF). Capilar 3000 V; end plate -500 V; transfer 100 μs ; temperatura do gás de secagem (N_2) 180 °C, vazão 4 L min^{-1} e pressão 0,4 Bar. As amostras foram previamente diluídas em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1 v/v). Para calibração interna, utilizou-se solução de Na-TFa a 10 mg mL^{-1} .

3.1.5 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por *eletrospray* em alta resolução - CLAE-DAD-IES-EM

Estas análises foram realizadas em CLAE da marca Shimadzu®, composto de bombas de alta pressão (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A3), injetor com amostrador de 100 µL (SIL-20A HT), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo SPD-M20A, módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A). O CLAE então foi acoplado a um espectrômetro de massas micrOTOF II - IES-ToF Bruker Daltonics®. Os espectros foram adquiridos em modo negativo, empregando IES e analisador de massas do tipo tempo de voo (ToF). Capilar 3500 V; end plate offset -500 V; skimmer (1) 40 V; skimmer (2) 22 V; hexapolo (1) 23 V; hexapolo RF 80 V; temperatura do gás de secagem (N₂) 220 °C; vazão 10 L min⁻¹ e pressão 5,5 Bar. Para calibração interna, utilizou-se solução de Na-TFa a 10 mg mL⁻¹.

As injeções foram realizadas automaticamente via injetor automático (20 µL). Utilizou-se coluna cromatográfica Sigma-Aldrich analítica (Spherisorb ODS-2, 5 µm, 250 X 4,6 mm), acoplada a uma pré-coluna (10 X 4,6 mm).

3.1.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ)

Para os experimentos de espectrometria de massas sequencial (EMⁿ), utilizou-se equipamento de CLAE com as mesmas especificações do descrito no item anterior, porém este foi acoplado a um espectrômetro de massas amaZon-SL ion trap (IT) Bruker Daltonics®. Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo e negativo, empregando IES, e analisador de massas do tipo *ion trap*. Capilar 3000 v; end plate offset 500 v; nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás de secagem e de nebulização, e hélio foi utilizado como gás de colisão.

As injeções foram realizadas automaticamente via injetor automático. Utilizaram-se colunas cromatográficas: Sigma-Aldrich analítica (Spherisorb ODS-2; 5 µm, 250 X 4,6 mm), acoplada a uma pré-coluna (10 X 4,6 mm), e Phenomenex analítica (Kinetex XB C18; 2,6 µm, 100 x 2,1 mm), acoplada a uma pré-coluna (10 X 2,1 mm).

3.1.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (CLAE-DAD-Prep)

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-6AD, equipado com um detector UV-DAD modelo SPD-M10Avp e injetores, um automático modelo SIL-10AF com amostrador de 100 µL e outro manual (Rheodyne 7725I) com *loop* de 1 mL, ambos controlados pelo software CLASS-VP 6.14. Utilizou-se coluna cromatográfica semipreparativa Shimadzu (Shimpack ODS(H); 5,0 µm, 200 mm x 20 mm).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo do material vegetal

Do material vegetal coletado, *P. cincinnata*, foram separados os caules das folhas, resultando em aproximadamente 3,0 kg de folhas e 4,0 Kg de caules. Esse material, separadamente, foi seco em estufa de ar circulante por 72 horas e triturado em moinho de facas, obtendo aproximadamente 1,2 kg de folhas e 3,0 Kg de caules.

3.2.2 Preparo do extrato bruto

Para obtenção do extrato bruto, pesou-se cerca de 1,0 kg das folhas secas e pulverizadas de *P. cincinnata*, transferiu-se para erlenmeyer com capacidade para cinco litros e submeteu-se tal material à extração por maceração utilizando 3 litros de solvente (EtOH:H₂O (7:3 v/v)), que foram renovados a cada 24 horas, cinco vezes.

Após o término da extração, o solvente empregado na maceração (15 litros) foi evaporado sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, e secagem por ar comprimido, obtendo aproximadamente 50 g (5%) de extrato hidroalcoólico bruto.

3.2.3 Fracionamento do extrato bruto das folhas de *Passiflora cincinnata*

Parte do extrato bruto (30 g) foi suspenso com 500 mL de hexano, homogeneizado em banho de ultrassom e filtrado em sistema de vácuo utilizando papel de filtro qualitativo, 80

gramas e com 11 cm de diâmetro (Qualy). O precipitado foi ressuspenso em 500 mL de MeOH:H₂O (7:3 v/v) e particionado com CH₂Cl₂ (3 X 250 mL). A fase em diclorometano foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, originando o extrato CH₂Cl₂ (5,2 g; $\approx$ 17%). Adicionou-se 400 mL de H₂O à fase MeOH:H₂O e particionou-se com AcOEt (3 X 250 mL). A fase referente ao AcOEt foi concentrada sob pressão reduzida, originando o extrato AcOEt (4,3 g; $\approx$ 14%). Adicionou-se 200 mL de H₂O à fase MeOH:H₂O e particionou-se com BuOH (4 X 250 mL). A fase referente ao BuOH foi concentrada sob pressão reduzida, originando o extrato BuOH (10,0g; $\approx$ 33%).

3.2.4 Avaliação do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Passiflora cincinnata* e suas frações por cromatografia em camada delgada

Aplicando a técnica de CCDC, utilizando placas de vidro e folhas de sílica gel 60 F254, o extrato bruto e as frações obtidas foram analisados conforme preconizado pela literatura (WAGNER; BLADT, 1996), sendo testados diferentes eluentes. Após eluição, as placas foram reveladas com reveladores físico (luz UV 254/365 nm) e químico (anisaldeído sulfúrico e ácido sulfúrico).

3.2.5 Fracionamento do extrato BuOH por Sephadex LH-20

Parte do extrato BuOH (5 g) foi suspenso em 5 mL de MeOH, centrifugado a 2870 rcf (força centrífuga relativa) por 15 minutos e o sobrenadante aplicado a uma coluna cromatográfica contendo Sephadex LH – 20 empacotada com MeOH. Essa amostra foi eluída de forma isocrática com MeOH, mantendo um fluxo de aproximadamente 5 mL min⁻¹ e coletando 3 frações de aproximadamente 500 mL, após eluição do volume morto. Essas frações foram concentradas em evaporador rotativo, secas com auxílio de nitrogênio, pesadas e analisadas por CCDC. Elas foram nomeadas de BuOH-1, BuOH-2 e BuOH-3.

3.2.6 Fracionamento da fração BuOH-2 por CLAE-DAD-Prep

A fração BuOH-2 inicialmente foi analisada no sistema CLAE-DAD-Prep conforme método estabelecido por Costa et al. (2013), porém foi utilizada fase móvel composta pelos solventes H₂O:MeCN, como fase móvel A e B, respectivamente, ambas contendo 0,01% (v/v) de TFA. Após ajustes para condições semipreparativas e definição do tempo de retenção das

substâncias de interesse, utilizando esta mesma fase móvel, efetuou-se o fracionamento dessa fração empregando coluna semipreparativa Shimadzu (Shimpack ODS(H); 5,0 μm , 200 mm x 20 mm), com detector operando em $\lambda = 270/320 \text{ nm}$ e vazão de 9,0 mL min^{-1} e o seguinte perfil de eluição: 0-90 min: 13.8 % B (isocrático), 90-120 min: 13.8-28 % B (gradiente linear), 130-140 min: 28-100% B (gradiente linear).

As amostras foram preparadas na concentração de 20 mg mL^{-1} , sendo aplicado 1 mL por análise via injetor manual, utilizado um total de 500 mg de amostra.

3.2.7 Preparo das amostras de *Passiflora cincinnata* para análise por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ

Para obtenção do método de preparo das amostras de *P. cincinnata* por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ, 20, 30, 40 e 50 mg de folhas e 20, 30, 40, 50 e 100 mg caules previamente triturados, item 3.2.1, foram transferidos separadamente para tubos de ensaio de vidro com capacidade para 10 mL, acrescentou-se 3 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v) em cada tubo, submeteram-se as amostras à extração em banho de ultrassom por dez minutos, centrifugou-se a 2870 rcf por 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de ensaio previamente identificados. Aos tubos contendo os precipitados foi adicionado novamente o mesmo volume de solvente, repetindo o procedimento de extração.

Alíquotas de 1000 μL dos sobrenadantes foram filtradas para frasco de 2,0 mL utilizando filtros de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro, e todas as amostras preparadas foram analisadas por CLAE, sendo calculada a taxa de extração das substâncias majoritárias entre a primeira e a segunda extração. A metodologia que apresentou a melhor taxa de extração foi repetida, essas amostras então foram analisadas nos tempos 0 e 36 h, visando avaliar a estabilidade das principais substâncias majoritárias presentes nessas soluções durante esse período.

3.2.8 Preparo de amostra de *Passiflora* ssp. para análise por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM

As amostras de *Passiflora* ssp. foram preparadas seguindo o protocolo estabelecido no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) por Ernst, Madeleine et al. (2015), conforme descrito a seguir: as folhas secas de cada exsicata (tabela 1) foram individualmente homogeneizadas e pulverizadas em nitrogênio líquido utilizando almofariz e

com ajuda de um pistilo. Em seguida, tiveram o tamanho de suas partículas padronizadas através de peneira granulométrica de aço inox com abertura de malha de 150-180 μm . Um total de 5 mg do pó obtido das folhas foram extraídos com 0,5 mL de MeOH:H₂O (9:1, v/v). Para esse fim, as amostras foram submetidas à agitação em vortex por 10 segundos na velocidade máxima e, em seguida, mantidas no banho ultrassônico por 10 min. O volume de água do banho foi mantido constante para garantir homogeneidade dos extratos. Finalmente, os extratos foram centrifugados por 10 min a 21382 rcf. O sobrenadante foi filtrado para frasco de 2 mL utilizando filtro de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro e utilizado para as análises.

3.2.9 Metodologia analítica para análise do extrato metanólico das folhas de *Passiflora cincinnata* por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ

A metodologia analítica foi desenvolvida baseada na proposta por Costa et al. (2013). Em equipamento de CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ, utilizando uma amostra das folhas de *P. cincinnata* preparada conforme descrito no item anterior. O método foi adaptado para as condições necessárias deste estudo. Esta metodologia analítica consiste na utilização de coluna analítica Sigma-Aldrich analítica (Spherisorb ODS-2; 5 μm , 250 mm x 4,6 mm), coluna de guarda (10 mm x 4,6 mm), com vazão de 1,0 mL min⁻¹, com o seguinte perfil de eluição: 0-45 min: 13.8 % B (isocrático), 45-60 min: 13.8-28 % B (gradiente linear), 60-65 min: 28-100% B (gradiente linear). A fase móvel A e B foi constituída pelos solventes H₂O e MeCN, respectivamente, ambos contendo 0,1% (v/v) de HCOOH. O volume de injeção, via injetor automático, foi de 20 μL .

O eluente do DAD foi dividido fazendo uso de um separador de fluxo na proporção de 1:1 entre o descarte e o espectrômetro de massas. No espectrômetro de massas, foi utilizado o método auto-EM/EM, no qual o analisador seleciona para fragmentar os íons de maior intensidade que forem detectados. Os espectros foram adquiridos em modo positivo e negativo em janela espectral de 50 a 1300 m/z , empregando IES, e analisador de massas do tipo *ion trap*. Capilar 3500 V; end plate offset 500 V; amplitude 0,8 V; temperatura do gás de secagem (N₂) 330 °C, vazão 10 L min⁻¹ e pressão 60 psi.

Utilizando esse mesmo método, foi realizada uma varredura de perda neutra, obtendo, assim, espectros de perda neutra constante de todos os íons precursores que sofreram um decréscimo de uma determinada massa. Também foram obtidos espectros massas utilizando aquisição dependente de dados.

3.2.10 Desenvolvimento de metodologia analítica para análise do extrato metanólico das folhas de *Passiflora* ssp. por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM

Baseando-se no método desenvolvido e descrito no item anterior e seguindo os mesmos conceitos, uma nova metodologia foi desenvolvida para análise dos extratos das folhas de *Passiflora* ssp.. Para tal, utilizou-se coluna analítica Phenomenex (Kinetex XB C18; 2,6 μm , 100 mm x 2,1 mm), acoplada a uma coluna de guarda (10 mm X 2,1 mm), sendo a fase móvel A e B constituídas pelos solventes H_2O e MeCN, respectivamente, ambas contendo 0,1% (v/v) de HCOOH ; vazão de 0,250 mL min^{-1} , com o seguinte perfil de eluição: 0-5 min – 5-10 % B (gradiente linear); 5-35 min – 10-16 % B (gradiente linear); 35-55 min – 16-100% B (gradiente linear). O volume de injeção da amostra, via injetor automático, foi de 10 μL .

No espectrômetro de massas, foi utilizado o método auto-EM/EM. Os espectros foram adquiridos em modo positivo e negativo em janela espectral de 50 a 1300 m/z , empregando IES, e analisador de massas do tipo *ion trap*. Capilar 3500 V; end plate offset 500 V; amplitude 0,8 V; temperatura do gás de secagem (N_2) 300 $^\circ\text{C}$, vazão 9 L min^{-1} e pressão 40 psi.

3.2.11 Identificação dos compostos fenólicos das folhas e caules de *Passiflora cincinnata* por rede molecular e espectrometria de massas

Seguindo as especificações padrão estabelecidas pela plataforma GNPS (WANG et al., 2016), a inserção dos dados e geração das redes moleculares se deu através da conversão dos dados brutos obtidos por CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM para o formato mzXML pelo *software* MSConvert (KESSNER et al., 2008). A correta conversão dos dados foi avaliada no *software* livre TOPP View (OpenMS), em seguida, os arquivos foram submetidos ao fluxo de trabalho da plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) – <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>.

As redes moleculares (RM) foram criadas usando os parâmetros gerais a seguir: os dados foram filtrados removendo todos os picos EM/EM dentro de ± 17 u do íon precursor m/z . Os espectros EM/EM foram filtrados por janela, escolhendo apenas os 6 melhores picos na janela de ± 50 u em todo o espectro. Os dados foram, então, agrupados com *MS-Cluster* (FRANK et al., 2007), aplicando uma tolerância de massa original de 1,0 u e uma tolerância de íons produtos EM/EM de 0,5 u para criar espectros de consenso. Além disso, os espectros de consenso que continham menos de 2 espectros foram descartados. Uma rede molecular foi,

então, criada, onde as arestas (conexões) foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno maior ou igual a 0,65 e o mínimo de 4 íons produtos emparelhados. Outras arestas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós tivesse aparecido nos respectivos 10 principais nós mais comuns. Os espectros na rede foram comparados com as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as comparações mantidas entre os espectros de rede e os espectros da biblioteca foram obrigados a ter uma pontuação maior ou igual a 0,65 e, pelo menos, 4 picos combinados.

As redes moleculares espectrais criadas no GNPS foram importadas para o *software* Cytoscape 3.5 (SHANNON et al., 2003) e visualizadas utilizando o *layout organic*. As legendas dos nós representam as massas dos íons precursores, e as formas das arestas correspondem aos escores de cosseno.

3.2.12 Desreplicação dos compostos fenólicos das folhas de *Passiflora* ssp. por rede molecular e espectrometria de massas

Seguindo as mesmas especificações padrão estabelecidas pela plataforma GNPS (WANG et al., 2016) e descritas no item anterior, redes moleculares foram criadas para *Passiflora* ssp. utilizando as seguintes variações: valor mínimo de cosseno (cosseno) de 0,5-0,7; mínimo de íons produtos emparelhados (*match*) de 4-6 e tolerância de massa dos íons produtos (delta EM/EM) 0,5-0,7 *u*. O valor de tolerância de massa do íon precursor (delta EM) foi mantido constante em 1 *u*, conforme figura 3. Além disso, os espectros de consenso que continham menos de 5 espectros foram descartados.

Figura 3 – Gráfico com as variações dos valores dos parâmetros utilizados para geração de RM pelo GNPS

Fonte: Autoria própria

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo fitoquímico das folhas e caules de *Passiflora cincinnata*

O estudo fitoquímico da espécie *P. cincinnata* Mast. *Passiflora* L foi realizado com três propósitos: primeiramente, para identificação dos compostos fenólicos presentes nas suas folhas, visando o conhecimento do seu perfil químico; o segundo propósito foi o entendimento dos padrões de fragmentação em fase gasosa por IES-EM/EM desses compostos; e, por fim, a identificação desses metabólitos através da combinação de EM/EM e redes de interações moleculares na plataforma GNPS, gerando, assim, informações básicas para realização de um estudo de desreplicação do gênero através da combinação de redes moleculares e EM/EM.

Desta forma três etapas foram realizadas para gerar as informações pretendidas nesta parte do estudo: (1) isolamento e identificação das substâncias majoritárias presentes na espécie em estudo por IES-EM e RMN; (2) identificação dos demais compostos fenólicos presentes no caules e nas folhas de *P. cincinnata* utilizando os dados gerados pelas análises realizadas por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ; (3) criação de redes moleculares contendo os espectros de EM/EM obtidos para caules, folhas e substâncias isoladas.

4.1.1 Isolamento e identificação dos metabólitos majoritários das folhas e caules de *Passiflora cincinnata* Mast.

4.1.1.1 Isolamento dos metabólitos majoritários das folhas e caules de *Passiflora cincinnata*

O isolamento dos metabólitos majoritários presentes nas folhas de *P. cincinnata* teve início com a obtenção do extrato bruto etanólico das folhas (item 3.2.2), seguido de fracionamento por partição líquido-líquido (item 3.2.3) e otimização da fase móvel para análise por CCDC (item 3.2.4).

Neste processo, foi verificado que a fase móvel testada que apresentou a melhor resolução foi aquela composta de AcOEt:MeOH:H₂O nas proporções 77:13:10 (v/v), por isso esta fase móvel foi utilizada em todas as análises por CCDC realizadas.

Após obtenção e análise das frações CH₂Cl₂, AcOEt e BuOH por CCDC, foi possível observar que a fração BuOH apresentou o maior número de metabólitos.

Essa fração foi eluída em coluna de Sephadex LH-20 (conforme descrito no item 3.2.5), sendo coletadas 3 frações, BuOH-1 (1,2 g; 24% da fração BuOH; 4,0% do extrato bruto; 0,2% das folhas), BuOH-2 (0,9g; 18% da fração BuOH; 3% do extrato bruto; 0,15% das folhas) e BuOH-3 (0,1g; 2% da fração BuOH; 0,33% do extrato bruto; ≈ 0,02% das folhas). Ao analisar essas frações por CCDC, observou-se que a fração BuOH-2 era a única que preservava os mesmos sinais observados no extrato bruto.

Posteriormente, através de análise por CLAE-DAD-prep, utilizando as condições informadas no item 3.2.6, foi possível observar que as substâncias presentes na fração BuOH-2 apresentavam apenas espectros de absorção na região do UV típicos de flavonoides, com máximos de absorção entre 250 e 347 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Dessa forma, foi possível definir que essa metodologia é eficiente para promover o fracionamento das substâncias dessa classe presentes no extrato bruto.

Sendo assim, optou-se por fracionar a fração BuOH-2 por CLAE-DAD-prep utilizando a metodologia em escala semipreparativa, descrita no item 3.2.6.

Nessa análise, coletaram-se quinze frações, que foram nomeadas conforme seus tempos de retenção em minutos (17,0; 36,8; 39,8; 46,0; 57,0; 63,2; 68,0; 71,0; 98,0; 108,0; 112,0; 118,0; 112,0; 118,0; 125,0; 129,0 e 139,0), concentradas em evaporador rotativo, liofilizadas, pesadas e novamente injetadas no sistema CLAE-DAD em condições analíticas (conforme método estabelecido no item 3.2.6). Após pesagem e análise dos cromatogramas gerados por CLAE-DAD-Prep, observou-se que as frações 57,0 (50,2 mg); 108,0 (15,0 mg); 71,0 (14,4 mg); 112,0 (80,0 mg); 118,0 (57,3 mg); e 125,0 (19,2 mg) apresentavam grau de pureza adequada ao estudo, sendo assim, elas foram nomeadas de JGA 11 a 16, respectivamente, e analisadas por IES-EM e RMN.

4.1.1.2 Identificação das substâncias isoladas por ressonância magnética nuclear e IES-EM

As substâncias isoladas foram analisadas por RMN de ^1H , ^{13}C , Dept. 135° e IES-EM, sendo identificadas principalmente pela comparação dos resultados obtidos com os disponíveis na literatura.

Analisando os espectros de RMN de ^1H dessas substâncias, foi possível visualizar que esses apresentaram sinais na região de hidrogênios aromáticos, pois se observa a presença de sinais entre 6 e 8 ppm correspondentes a, pelo menos, dois anéis aromáticos. Levando em consideração as informações já obtidas até o presente momento e comparando esses sinais com os resultados já divulgados na literatura (MARKHAM et al., 1978; AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1995), é possível inferir que eles são compatíveis com a classe dos flavonoides.

Na análise do espectro de RMN de ^1H da substância JGA 11 (figura 4), observou-se um duplete de $J = 8,5$ Hz em δ 6,88 (1H), sinal esse que é característico do deslocamento do H-5' acoplado em orto com o H-6' no Anel B (AGRAWAL, 1989; KUMAZAWA et al., 2000) (conforme figuras 3-5 do apêndice). Outros dois sinais sobrepostos, observados como singlete largo, em δ 7,36 (1H) e em δ 7,34 (1H), possuem deslocamentos correspondentes aos sinais observados por Kumazawa et al. (2000) para o H-6' (δ 7,42, *dd*, $J = 2,3$; 8,2 Hz) e para o H-2' em δ 7,40 (*d*, $J = 2,3$ Hz), respectivamente, sugerindo que o anel B do núcleo flavonoídico é orto-di-oxigenado e tri-substituído. A correlação desses sinais, na análise espectroscópica por *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* – (HMQC), com os carbonos em δ 116.9 (C-5'), δ 120.3 (C-6') e 114.2 (C-2'), reforça essas atribuições (AGRAWAL, 1989; KUMAZAWA et al., 2000) (figuras 6-10 do apêndice).

Os demais sinais presentes na região de hidrogênios aromáticos são semelhantes aos pertencentes ao anel A e C da flavona. Verificou-se que o singlete em δ 6,46 (1H, H-8) correlaciona-se com o carbono em δ 95.2 no HMQC, e que o outro singlete em δ 6,52 (1H, H-3), com o carbono em δ 103.9, sendo este último um sinal característico de flavona (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1995).

O duplete $J = 10,0$ Hz, típico de uma ligação β -glicosídica, em δ 4,90 (1H, H-1'') apresenta sinal coerente com um hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar, fazendo ligação do tipo C-C com a flavona, δ 4,58-4,90 (HARBORNE, 1995).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 21 sinais: 15 são referentes aos carbonos da aglicona, que, após suas atribuições, em conjunto com os dados discutidos sobre os

hidrogênios aromáticos e anomérico, indicam a presença de uma luteolina substituída na posição C-6 (figuras 6-7 do apêndice). O sinal em δ 184,0 refere-se à carbonila (C-4) de uma flavona, enquanto o sinal em δ 109,2, ao C-6. No *HMQC*, o sinal em δ 75,3 (C-1'') foi correlacionado com o hidrogênio anomérico em δ 4,90 (H-1''), sendo posteriormente observada a correlação deste hidrogênio com os carbonos C-5 e C-7 na análise de *Heteronuclear multiple-bond correlation* – (*HMBC*), informações essas que reforçam que a unidade de açúcar está ligada à posição 6 do anel A (KUMAZAWA et al., 2000) (figuras 11-13 do apêndice).

Os outros 5 sinais do espectro de RMN de ^{13}C , ainda não mencionados, são referentes à porção glicosídica da estrutura, que propomos se tratar de uma glicose. A atribuição desses sinais se deu principalmente através da análise dos espectros de *HMQC* e *HMBC* e comparação com a literatura (KUMAZAWA et al., 2000).

A comparação de todos os dados obtidos com os disponíveis na literatura (KUMAZAWA et al., 2000) (tabela 2) são condizentes com as atribuições propostas e confirmam a identificação de JGA-11 como sendo luteolina-6-*C*- β -glicopiranosídeo (isoorientina).

Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA - 11

Posição	Deslocamento Químico (PPM)/Multiplicidade/ (J/Hz)			
	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	Literatura ¹ (KUMAZAWA et al., 2000)	JGA-11 ²	Literatura ³ (KUMAZAWA et al., 2000)	JGA-11 ⁴
2	—	—	163,6	166,3
3	6,67 <i>s</i>	6,52 <i>s</i>	102,7	103,9
4	—	—	181,7	184,0
5	—	—	160,6	162,0
6	—	—	108,8	109,1
7	—	—	163,2	164,9
8	6,48 <i>s</i>	6,46 <i>s</i>	93,4	95,2
9	—	—	156,1	158,7
10	—	—	103,3	105,2
1'	—	—	121,4	123,6
2'	7,40 <i>d</i> (2,3)	7,34 <i>sl</i>	113,2	114,2
3'	—	—	145,7	147,0
4'	—	—	149,6	151,0
5'	6,89 <i>d</i> (8,2)	6,88 <i>d</i> (8,5)	116,0	116,9
6'	7,42 <i>dd</i> (2,3; 8,2)	7,36 <i>sl</i>	118,8	120,3
1''	4,58 <i>d</i> (9,8)	4,90 <i>d</i> (10,0)	73,0	75,3
2''	4,07 <i>dd</i> (9,8; 10,2)	4,19 - 4,15 <i>m</i>	70,5	72,6
3''	3,19 <i>dd</i> (8,5; 10,2)	3,50 - 3,41 <i>m</i>	78,9	80,1
4''	3,12 <i>dd</i> (8,5; 8,9)	3,50 - 3,41 <i>m</i>	70,2	71,8
5''	3,17 <i>ddd</i> (1,8; 6,1; 8,9)	3,50 - 3,41 <i>m</i>	81,4	82,6
6''a	3,40 <i>dd</i> (6,1; 11,3)	3,74 <i>dd</i> (5,5; 12)	61,4	62,9
6''b	3,68 <i>dd</i> (1,8; 11,3)	3,88 <i>dd</i> (2; 12)	—	—

¹(500 MHz DMSO- d_6); ²(500 MHz CD_3OD); ³(100 MHz DMSO- d_6); ⁴(100 MHz CD_3OD)

Adicionalmente, na análise por IES-EM, essa substância apresentou íon molecular desprotonado $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 447,0935 com erro de 0,5 ppm e íon molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 449,1093 com erro de 3,3 ppm, para a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$.

Todos os espectros de RMN, IES-EM e fórmula estrutural proposta para isoorientina podem ser consultados nas figuras 1-13 do apêndice.

Em relação à substância JGA – 14 (figura 4), ela se diferenciou da isoorientina por não possuir substituição no C-3', por isso, no espectro de RMN de ^1H , foram observados dois dupletos, um em δ 7,81 com J de 8,5 Hz integrando para dois hidrogênios, sendo atribuídos aos hidrogênios (H-2' e H-6'); e outro em δ 6,91 com J de 8,5 Hz também integrando para dois hidrogênios (H-3' e H-5') (figuras 16-18 do apêndice). A integração e constante de acoplamento desses sinais indicam que eles estão acoplados em *orto* e que o anel B é *para*-disubstituído. A correlação de ambos no *HMQC* com os carbonos δ 129,4 C-2' e C-6' (H-2'/-6') e δ 117,0 C-3' e C-5' (H-3'/5') reforçam esta proposta (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1995; HOSOYA; YUN; KUNUGI, 2005) (figuras 19-25 do apêndice).

No anel A, observa-se um singlete em δ 6,48 (1H, H-8), que, na análise espectroscópica por HMQC, correlacionou-se com o carbono em δ 95,3 (C-8). O singlete em δ 6,57 integra para um hidrogênio e corresponde ao H-3, mantendo, assim, as características de uma flavona.

No espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em δ 184,1 é correspondente à carbonila (C-4) e em δ 109,2 C-6. Assim como na isoorientina, foi possível observar no HMQC correlação entre o hidrogênio anomérico δ 4,90 ($J = 10$ Hz; 1H; H-1'') com o carbono δ 75,3 (C-1) e posterior correlação desse hidrogênio com os carbonos C-5 e C-6 no HMBC (figuras 26-28 do apêndice), indicando que esta substância também está substituída na posição C-6 (AGRAWAL, 1989; HARBORNE 1995; HOSOYA; YUN; KUNUGI, 2005).

Comparando esses sinais e os demais, disponíveis na tabela 3, com os disponíveis na literatura (HOSOYA; YUN; KUNUGI, 2005), propõe-se que a substância em análise corresponde ao flavonoide apigenina-6- $C\beta$ -glicopiranosídeo (isovitexina). Na análise por IES-EM, a isovitexina apresentou íon molecular desprotonado $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 431,0978 com erro de 0,9 ppm e íon molecular protonado de $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 433,1134 com erro de 1,1 ppm, para a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$.

Todos os espectros de RMN, IES-EM e fórmula estrutural proposta para isovitexina podem ser consultados nas figuras 14-28 do apêndice.

Tabela 3 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA - 14

Posição	Deslocamento Químico(PPM)/Multiplicidade/ (J/Hz)			
	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	Literatura ¹ (HOSOYA et al., 2005)	JGA-14 ²	Literatura ³ (HOSOYA et al., 2005)	JGA-14 ⁴
2	—	—	163,4	166,18
3	6,78 <i>s</i>	6,57	102,7	103,9
4	—	—	181,9	184,1
5	—	—	160,6	162,8
6	—	—	108,9	109,2
7	—	—	163,4	164,8
8	6,51 <i>s</i>	6,48	93,6	95,3
9	—	—	156,2	158,7
10	—	—	103,3	105,2
1'	—	—	121,1	123,1
2'	7,93 <i>d</i> (8,8)	7,81 <i>d</i> (8,5)	128,4	129,4
3'	6,93 <i>d</i> (8,8)	6,91 <i>d</i> (8,5)	115,9	117,0
4'	—	—	161,2	162,0
5'	6,93 <i>d</i> (8,8)	6,91 <i>d</i> (8,5)	115,9	117,0
6'	7,93 <i>d</i> (8,8)	7,81 <i>d</i> (8,5)	128,4	129,4
1''	4,59 <i>d</i> (9,8)	4,90 <i>d</i> (10,0)	73,0	75,3
2''	4,04 <i>dd</i> (8,5; 9,8)	4,19 - 4,14 <i>m</i>	70,2	72,6
3''	3,20 <i>m</i>	3,50 - 3,41 <i>m</i>	78,9	80,1
4''	3,13 <i>m</i>	3,50 - 3,41 <i>m</i>	70,6	71,8
5''	3,17 <i>m</i>	3,50 - 3,41 <i>m</i>	81,5	82,6
6''a	3,41 <i>dd</i> (5,9; 11,7)	3,75 <i>dd</i> (5,5; 12)	61,4	62,9
6''b	3,68 <i>d</i> (11,7)	3,90 - 3,88 <i>m</i>	—	—

¹(500 MHz DMSO- d_6); ²(500 MHz CD_3OD); ³(125 MHz DMSO- d_6); ⁴(100 MHz CD_3OD)

A substância JGA -16 (figura 4) também apresentou deslocamentos químicos típicos de um flavonoide C-glicosilado com uma hexose e com acoplamentos entre hidrogênios em *meta* e *orto* no anel B em seu espectro de RMN de ^1H (figuras 31-33 do apêndice). Ao levarmos em consideração essas observações e as correlações observadas no *HMQC*, é possível atribuir que a presença de um duplete com $J = 8,0$ Hz em δ 6,91 (δ 116,8 C-5'), um singlete largo em δ 7,42 (δ 110,5 C-2') sobreposto a um duplete com $J = 8,0$ Hz em δ 7,46 (δ 121,7 C-6'), todos integrando para um hidrogênio, correspondem respectivamente aos hidrogênios H-5', H-2' e H-6', sugerindo, assim, que o anel B é tri-substituído (figuras 34-38 do apêndice). Os deslocamentos δ 123,5 (C-1'), δ 149,5 (C-3'), δ 152,1 (C-4') não são observados na análise realizada por (DEPT 135° : C) (figura 35 do apêndice), sendo condizente com o proposto, ou seja, que o anel B é tri-substituído.

Um singlete em δ 3,94 integrado para três hidrogênios indica a presença de um grupo metoxila no carbono 4' ou 3', que, segundo Park et al. (2007), ocorre em δ 3,89 para o

flavonoide aglicona chrisoeriol (C-3') e, em δ 3,85, para diosmetina (C-4'). Quando comparado com a literatura (CHENG et al., 2005; PARK et al., 2007), sugere-se que o grupo metoxila se encontra no carbono 3'. As correlações observadas no *HMBC* para o anel B são condizentes com essa proposta, principalmente com aquela observada entre o grupo metoxila (δ 3,94) e o C-3' (δ 149,5) (figuras 39-41 do apêndice).

O singlete em δ 6,59 (1H, H-3), levando em consideração a classe dos flavonoides, é um sinal característico da subclasse flavona. O singlete em 6,47 (1H,) pode ser atribuído ao hidrogênio H-8 (HARBORNE, 1995).

Observa-se também um duplete, sobreposto ao sinal da água residual do solvente (δ 4,90), em δ 4,92 ($J = 8,5$ Hz; 1H; H-1''), que é referente a hidrogênios anoméricos de glicosídeo, que, neste caso, está ligado ao carbono 6, através de uma C-glicosilação. Esse fato é evidenciado pelo deslocamento de C-6 (δ 109,1), muito baixo para ser um O-glicosídeo, e muito alto para ser uma ligação C-H, já que o esperado é estar entre δ 94,0 e 99,0 (HARBORNE, 1995).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 15 sinais referentes aos carbonos da aglicona, 1 referente ao grupo metoxila (δ 56,4) e mais 6 sinais referentes ao açúcar, que pôde ser identificado como glicose através das análises de correlações no *HMBC*, *HMQC* e em comparação aos dados obtidos (tabela 6 do apêndice) com a literatura (MAATOOQ et al., 1997). O sinal em δ 184,0 é correspondente ao C-4, o que foi confirmado por sua ausência no DEPT 135° : C, enquanto o δ 95,3 é referente ao C-8, também confirmado através de análise por DEPT 135°(CH).

A partir da comparação desses sinais e dos demais, exibidos na tabela 4, com os disponíveis na literatura (MAATOOQ et al., 1997; SENATORE; D'AGOSTINO; DINI, 2000), propõe-se que a substância em análise corresponde ao flavonoide chrisoeriol-6-C- β -glicopiranosídeo (isoscoparina). Na análise por IES-EM, ela apresentou íon molecular desprotonado $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 461,1094 com erro de 1,1 ppm e íon molecular protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 463,1246 com erro de 2,5 ppm, para a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$.

Todos os espectros de RMN, IES-EM e fórmula estrutural proposta para isoscoparina podem ser consultados nas figuras 29-41 do apêndice.

Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA - 16

Posição	Deslocamento Químico(PPM)/Multiplicidade/ (J/Hz)			
	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	Literatura ¹ (MAATOOQ et al., 1997)	JGA-16 ²	Literatura ³ (MAATOOQ et al., 1997)	JGA-16 ⁴
2	—	—	163,3	166,0
3	6,55 <i>s</i>	6,59	103,0	104,2
4	—	—	181,9	184,0
5	—	—	160,5	162,0
6	—	—	108,7	109,1
7	—	—	163,2	164,8
8	6,91 <i>s</i>	6,47	93,6	95,3
9	—	—	156,2	158,6
10	—	—	103,3	105,2
1'	—	—	121,3	123,5
2'	7,56 <i>s</i>	7,42 <i>sl</i>	110,0	110,5
3'	—	—	147,9	149,5
4'	—	—	150,6	152,1
5'	6,96 <i>d</i> (8,6)	6,91 <i>d</i> (8,0)	115,7	116,8
6'	7,57 <i>d</i> (8,6)	7,46 <i>d</i> (8,0)	120,2	121,7
-OCH ₃	3,90 <i>s</i>	3,94 <i>s</i>	55,9	56,4
1"	4,62 <i>d</i> (9,7)	4,92 <i>d</i> (8,5)	73,0	75,3
2"	n.i.	4,19 - 4,16 <i>m</i>	70,5	72,61
3"	n.i.	3,49 - 3,43 <i>m</i>	78,8	80,1
4"	n.i.	3,49 - 3,43 <i>m</i>	70,2	71,8
5"	n.i.	3,49 - 3,43 <i>m</i>	81,4	82,6
6"a	n.i.	3,75 <i>dd</i> (4,5; 12,5)	61,4	62,9
6"b	n.i.	3,90 - 3,88 <i>m</i>		

¹(360/600 MHz DMSO-*d*₆); ²(500 MHz CD₃OD); ³(90,56/150 MHz DMSO-*d*₆); ⁴(100 MHz CD₃OD); n.i.: Não informado.

A substância JGA-15 (figura 4) apresentou deslocamentos químicos típicos de um flavonoide di-glicosilado, com substituição do tipo *para* no anel B. Como as demais substâncias isoladas e analisadas até o presente momento, é possível observar os sinais em δ 6,59 (1H, H-3) e em δ 6,49 (1H, H-8), e os sinais que caracterizam o anel B como *para*-di-substituído em δ 7,83 com *J* de 8,5 Hz (2H, H-2' e H-6') e em δ 6,92 com *J* de 8,5 Hz (2H, H-3' e H-5') (figuras 44-46 do apêndice).

Também foi possível observar o sinal referente à carbonila no carbono 4, δ 184,1, e aos carbonos C-6 δ 109,0 e C-8 δ 95,1, propondo-se que a C-glicosilação ocorra no carbono 6, o que pôde ser confirmado através de análise espectroscópica por *HMQC*, que correlacionou o hidrogênio em δ 6,49 (1H, H-8) ao carbono em δ 95,1 (C-8) e não demonstrou existência de correlação para C-6 (figuras 47-53 do apêndice).

Em relação à fração glicosídica, na análise espectroscópica por *HMQC*, o duplete, sobreposto pelo sinal da água residual do solvente, em δ 4,93 com J de 10,0 Hz integrando para um hidrogênio, correlacionou-se com o carbono em δ 74,9, indicando corresponder ao hidrogênio anomérico H-1". Esse dado sugere que este açúcar está ligado diretamente ao carbono C-6. Já o duplete em δ 4,62 com J de 8,0 Hz integrando para um hidrogênio correlaciona-se com o carbono em δ 105,2, representando o hidrogênio anomérico H-1"' da outra unidade de açúcar. Sendo assim, essa informação condiz com uma ligação C-O glicosídica (AGRAWAL, 1989).

Para se determinar a posição em que ocorre a ligação interglicosídica, utilizaram-se as correlações obtidas através de análise espectroscopia por *HMBC*, na qual foi possível observar a correlação do carbono em δ 90,00 (C-2'') com os hidrogênios anoméricos, sugerindo, desta forma, que a ligação interglicosídica seja do tipo (1 $\rightarrow$ 2) (figuras 54-56 do apêndice). Além disso, o alto valor das constantes de acoplamento dos hidrogênios anoméricos, típico para o acoplamento *trans*-diaxial, indica que as ligações de ambos açúcares ocorram na forma β , pois, caso essas ligações se apresentassem como α , essa constante seria característica de acoplamento *cis*-equatorial-axial ($J \approx 3,0$ Hz) (HARIBAL; RENWICK, 1998). Através dessas análises e subsequente avaliação dos deslocamentos químicos dos carbonos, que compõem a porção glicídica, bem como de suas correlações nas análises espectroscopia por *HMQC* e *HMBC*, propõe-se que esta substância possui duas glicoses interligadas através de uma ligação éter do tipo (1 $\rightarrow$ 2).

A comparação desses sinais e dos demais, exibidos na tabela 5, com os disponíveis na literatura (RABELO et al., 2013) nos levou a propor que a substância em análise corresponde ao flavonoide apigenina-6-*C*- β -glicopiranosídeo-(1''' $\rightarrow$ 2'')-*O*- β -glicopiranosídeo (isovitexina-2''-*O*- β -glicopiranosídeo). Na análise por IES-EM, ela apresentou íon molecular desprotonado $[M - H]^-$ m/z 593,1522 com erro de 1,6 ppm e íon molecular protonado $[M + H]^+$ m/z 595,1671 com erro de 2,3 ppm, para a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{15}$.

Todos os espectros de RMN, IES-EM e fórmula estrutural proposta para isovitexina-2''-*O*- β -glicopiranosídeo podem ser consultados nas figuras 42-56 do apêndice.

Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA - 15

Posição	Deslocamento Químico(PPM)/Multiplicidade/ (J/Hz)			
	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	Literatura ¹ (RABELO et al., 2013)	JGA-15 ²	Literatura ³ (RABELO et al., 2013)	JGA-15 ⁴
2	—	—	166,2	166,2
3	6,61 <i>s</i>	6,59 <i>s</i>	103,8	103,9
4	—	—	184,5	184,1
5	—	—	162,0	162,1
6	—	—	109,1	109,0
7	—	—	165,3	164,8
8	6,47 <i>s</i>	6,49 <i>s</i>	95,6	95,1
9	—	—	159,1	158,8
10	—	—	104,7	105,2
1'	—	—	122,9	123,1
2'	7,85 <i>d</i> (8,7)	7,83 <i>d</i> (8,5)	129,5	129,5
3'	6,92 <i>d</i> (8,7)	6,92 <i>d</i> (8,5)	117,2	117,0
4'	—	—	162,9	162,8
5'	6,92 <i>d</i> (8,7)	6,92 <i>d</i> (8,5)	117,2	117,0
6'	7,85 <i>d</i> (8,7)	7,83 <i>d</i> (8,5)	129,5	129,5
1''	5,06 <i>d</i> (10)	4,93 <i>d</i> (10)	73,4	74,9
2''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,68 - 3,64 <i>m</i>	81,7	90,0
3''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,47 - 3,27 <i>m</i>	79,9	75,5
4''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,59 - 3,55 <i>m</i>	71,9	70,3
5''	3,15 a 4,05 <i>m</i>	3,47 - 3,27 <i>m</i>	82,7	82,5
6''a	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,68 - 3,64 <i>m</i>	62,9	62,9
6''b	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,75 <i>dd</i> (5,5; 12)	—	—
1'''	4,33 <i>d</i> (8,2)	4,62 <i>d</i> (8,0)	105,8	105,2
2'''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	4,37 - 4,40 <i>m</i>	75,7	71,8
3'''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,47 - 3,27 <i>m</i>	77,4	77,9
4'''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,47 - 3,27 <i>m</i>	71,2	71,6
5'''	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,47 - 3,27 <i>m</i>	77,8	78,2
6'''a	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,89 <i>dd</i> (2; 12)	62,4	62,6
6'''b	3,34 - 4,00 <i>m</i>	3,92 <i>dd</i> (2; 12)	—	—

¹(400 MHz CD₃OD); ²(500 MHz CD₃OD); ³(100 MHz CD₃OD); ⁴(100 MHz CD₃OD); n.i.: Não informado.

As substâncias codificadas como JGA-12 e JGA-13 apresentaram deslocamentos químicos muito semelhantes, indicando que ambas são flavonoides di-glicosilado. Sugere-se que JGA-12 tenha padrão *para* de substituição no anel B e que também seja um derivado da flavona. Ela apresenta os sinais em δ 6,60 (1H, H-3) e em δ 6,23 (1H, H-8) e os dupletos que caracterizam o anel B como *para*-di-substituído em δ 7,98 com *J* de 8,0 Hz (2H, H-2' e H-6') e em δ 6,95 com *J* de 8,0 Hz (2H, H-3' e H-5') (figuras 59-61 do apêndice).

Já para JGA-13, sugere-se que o anel B seja *orto*-di-oxigenado e tri-substituído, pois foram observados dois dupletos: um de *J* = 8,0 Hz em δ 6,92 (1H, H-5') e outro de *J* = 8,0 Hz

em δ 7,51 (1H, H-6'); e um singlete largo (sobreposto ao duplete em δ 7,51), em δ 7,55 (1H, H-2'). Ele também apresenta os sinais em δ 6,54 (1H, H-3) e em δ 6,23 (1H, H-8) (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1995) (figuras 74-76 do apêndice).

Através de análise espectroscópica por *HMBC*, *HMQC* e DEPT 135°, é possível sugerir que os dupletos em δ 5,02 e em 4,13 com *J* de 10,0 Hz e 7,5 Hz, respectivamente, integrando para um hidrogênio cada um, são relativos aos hidrogênios anoméricos dos açúcares presentes em JGA-12, que se correlacionam com os carbonos em δ 73,7 (C-1'') e δ 106,2 (C-1''') respectivamente, e que o sinal em δ 107,0 (DEPT 135° : C) é relativo ao C-6 (figuras 62-71 do apêndice). Tais informações são condizentes com a presença de uma ligação C-O glicosídica (AGRAWAL, 1989). Através de análise espectroscópica por *HMBC*, foi possível correlacionar o sinal de ^{13}C em δ 81,0 (JGA 12) com esses hidrogênios, sugerindo, assim, que este sinal se trata do C-2'' e que, devido ao seu deslocamento para uma região mais desblindada do espectro, a ligação interglicosídica seja do tipo 1 $\rightarrow$ 2.

Também foi possível correlacionar os hidrogênios anoméricos de JGA-13, sendo que, no *HMQC*, o duplete em δ 5,02 *J* de 10,0 Hz correlaciona-se com o carbono em δ 73,7 (C-1''), e o duplete em δ 4,14 *J* de 7,5 Hz correlaciona-se com o carbono em δ 106,2 (C-1'''); já no *HMBC*, eles se correlacionam com o C-2'' (δ 80,9), mantendo, assim, as mesmas características da porção glicosídica do JGA 12 (figuras 77-86 do apêndice). Também podemos sugerir que todas as ligações glicosídicas, para ambas as substâncias, ocorram na forma β , devido aos valores de suas constantes de acoplamento (> 7 Hz).

Além disso, é possível observar que cada uma das substâncias apresenta mais 9 sinais referentes aos carbonos das unidades glicosídicas, indicando, assim, que estes açúcares são formados por unidades de 6 e 5 membros. Os sinais em (DEPT 135° : CH₂) δ 63,0 (JGA 13) e (DEPT 135° : CH₂) δ 62,9 (JGA 12) foram atribuídos aos carbonos C-6''. Os sinais (DEPT 135° : CH₂) δ 66,7 (JGA 13) e (DEPT 135° : CH₂) δ 66,7 (JGA 12), aos carbonos C-5''', que se correlacionam, no *HMBC*, com os hidrogênios anoméricos (H-1''') de suas respectivas unidades glicosídicas. Sendo assim, após interpretação destes sinais e comparação dos demais com a literatura (MATSUZAKI et al., 1990; RAYYAN; FOSSEN; ANDERSEN, 2005; ZIELINSKA-PISKLAK et al., 2015), foi possível propor que o glicosídeo ligado à aglicona é uma glicose e que ela está ligada a uma xilose por uma ligação éter entre o C-2'' da glicose e o C-1''' da xilose.

Por fim, através da comparação destes sinais e dos demais, exibidos na tabela 6 e 7, com os disponíveis na literatura (MATSUZAKI et al., 1990; RAYYAN; FOSSEN; ANDERSEN, 2005; ZIELINSKA-PISKLAK et al., 2015), propõe-se que as substâncias em

análise correspondem aos flavonoides (JGA-12) apigenina-6-*C*- β -glicopiranosídeo-(1''' $\rightarrow$ 2'')-*O*- β -xilopiranosídeo (isovitexina-2-*O*- β -xilopiranosídeo) e (JGA-13) luteolina-6-*C*- β -glicopiranosídeo-(1''' $\rightarrow$ 2'')-*O*- β -xilopiranosídeo (isoorientina-2-*O*- β -xilopiranosídeo).

Na análise por IES-EM, a isovitexina-2''-*O*- β -xilopiranosídeo apresentou íon molecular desprotonado $[M - H]^-$ m/z 563,1396 com erro de 1,8 ppm e íon molecular protonado $[M + H]^+$ m/z 565,1563 com erro de 2,0 ppm, para a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{14}$. A isoorientina-2-*O*- β -xilopiranosídeo apresentou íon molecular desprotonado $[M - H]^-$ m/z 579,1337 com erro de 3,2 ppm e íon molecular protonado $[M + H]^+$ m/z 581,1503 com erro de 0,3 ppm, para a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{15}$.

Tabela 6 – Dados de RMN de 1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA - 13

Posição	Deslocamento Químico(PPM)/Multiplicidade/ (J/Hz)			
	RMN 1H		RMN ^{13}C	
	Literatura ¹ (MATSUZAKI, et al., 1990)	JGA-13 ²	Literatura ³ (RAYYAN, FOSSEN e ANDERSEN, 2005)	JGA-13 ⁴
2	—	—	n.i.	166,5
3	6,68 <i>s</i>	6,54 <i>s</i>	103,8	103,6
4	—	—	n.i.	184,1
5	—	—	n.i.	158,7
6	—	—	n.i.	104,9
7	—	—	n.i.	164,6
8	6,46 <i>s</i>	6,23 <i>s</i>	94,7	99,2
9	—	—	n.i.	162,6
10	—	—	n.i.	105,5
1'	—	—	n.i.	124,1
2'	7,40 a 7,43 <i>m</i>	7,55 <i>br</i>	114,1	114,9
3'	—	—	n.i.	147,2
4'	—	—	n.i.	150,9
5'	n.i.	6,92 <i>d</i> (8,0)	116,8	116,8
6'	7,40 a 7,43 <i>m</i>	7,51 <i>d</i> (8,0)	120,2	120,8
1''	4,64 <i>d</i> (9,6)	5,02 <i>d</i> (10,0)	73,5	73,7
2''	n.i.	4,32 - 4,29 <i>m</i>	82,1	80,9
3''	n.i.	3,72 - 3,68 <i>m</i>	79,9	80,2
4''	n.i.	3,72 - 3,68 <i>m</i>	71,7	72,0
5''	n.i.	3,50 - 3,43 <i>m</i>	82,6	82,9
6''a	n.i.	3,99 - 3,86 <i>m</i>	62,9	63,0
6''b	n.i.	3,99 - 3,86 <i>m</i>		
1'''	4,12 <i>d</i> (6,7)	4,14 <i>d</i> (7,5)	106,8	106,2
2'''	n.i.	3,10 - 3,06 <i>m</i>	75,6	77,3
3'''	n.i.	2,98 - 2,95 <i>m</i>	77,7	75,2
4'''	n.i.	3,16 - 3,12 <i>m</i>	71,0	71,0
5'''a	n.i.	3,22 - 3,17 <i>m</i>	66,9	66,7
5'''b	n.i.	2,63 - 2,58 <i>m</i>		

¹(DMSO- d_6); ²(500 MHz CD_3OD); ³(100 MHz $CF_3CO_2D-CD_3OD$, 5:95, v/v); ⁴(100 MHz CD_3OD); n.i.: Não informado.

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância JGA - 12

Posição	Deslocamento Químico(PPM)/Multiplicidade/ (J/Hz)			
	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	Literatura ¹ (ZIELINSKA-PISKLAK et al., 2015)	JGA-12 ²	Literatura ³ (ZIELINSKA- PISKLAK et al., 2015)	JGA-12 ⁴
2	—	—	163,5	166,50
3	6,78 <i>s</i>	6,60 <i>s</i>	102,7	103,6
4	—	—	181,9	184,1
5	—	—	160,5	158,7
6	—	—	108,0	107,0
7	—	—	161,7	164,6
8	6,54 <i>s</i>	6,23 <i>s</i>	93,8	99,3
9	—	—	156,3	162,6
10	—	—	103,2	105,0
1'	—	—	121,0	123,6
2'	7,93 <i>d</i> (8,8)	7,98 <i>d</i> (8,0)	128,4	130,0
3'	6,94 <i>d</i> (8,8)	6,95 <i>d</i> (8,0)	116,0	117,1
4'	—	—	161,2	162,8
5'	6,94 <i>d</i> (8,8)	6,95 <i>d</i> (8,0)	116,0	117,1
6'	7,93 <i>d</i> (8,8)	7,98 <i>d</i> (8,0)	128,4	130,0
1''	4,66 <i>d</i> (9,8)	5,02 <i>d</i> (10,0)	71,2	73,7
2''	3,17 - 4,42 <i>m</i>	4,32 - 4,28 <i>m</i>	81,6	81,0
3''	3,17 - 4,42 <i>m</i>	3,72 - 3,65 <i>m</i>	78,3	80,2
4''	3,17 - 4,42 <i>m</i>	3,72 - 3,65 <i>m</i>	70,3	72,1
5''	3,17 - 4,42 <i>m</i>	3,50 - 3,42 <i>m</i>	81,0	82,9
6''a	3,17 - 4,42 <i>m</i>	3,97 - 3,77 <i>m</i>	61,3	62,9
6''b	3,17 - 4,42 <i>m</i>	3,97 - 3,77 <i>m</i>		
1'''	4,13 <i>d</i> (7,2)	4,13 <i>d</i> (7,5)	106,0	106,2
2'''	2,57 - 3,17 <i>m</i>	3,09 - 3,05 <i>m</i>	74,2	77,4
3'''	2,57 - 3,17 <i>m</i>	2,99 - 2,95 <i>m</i>	76,2	75,2
4'''	2,57 - 3,17 <i>m</i>	3,16 - 3,13 <i>m</i>	69,3	71,0
5'''a	2,57 - 3,17 <i>m</i>	3,22 - 3,17 <i>m</i>	65,7	66,7
5'''b	2,57 - 3,17 <i>m</i>	2,61 - 2,57 <i>m</i>		

¹(300 MHz DMSO- d_6); ²(500 MHz CD $_3$ OD); ³(75 MHz D $_2$ O); ⁴(100 MHz CD $_3$ OD)

Todos os espectros de RMN, IES-EM e fórmula estrutural proposta para isovitexina-2''-*O*- β -glicopiranosídeo podem ser consultados nas figuras 57-71 do apêndice e, para isoorientina-2-*O*- β -xilopiranosídeo, nas figuras 72-86 do apêndice.

As estruturas moleculares propostas para todas as substâncias isoladas (JGA - 11-16) são apresentadas na figura 4.

Figura 4 - Estruturas moleculares propostas para as substâncias isoladas JGA – 11-16.

Fonte: Autoria própria

4.1.2 Análises e identificação dos metabólitos das folhas e caules de *Passiflora cincinnata* por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ

A identificação dos metabólitos secundários de *P. cincinnata* iniciou-se pela obtenção de um método analítico cromatográfico e de um método de preparo das amostras.

Durante esse processo, foi observado que as amostras apresentavam predominantemente metabólitos de natureza polar e que um grande número de sinais

cromatográficos possuía baixa resolução cromatográfica. Outro fator observado é que as folhas e caules não continham diferenças significativas em sua composição qualitativa, mas foi possível inferir que os metabólitos estão presentes, em maior concentração, nas folhas, mesmo sem análises quantitativas, fator esse que é observado para outras espécies, como, por exemplo, na *P. incarnata*, para a qual se observou um conteúdo quatro vezes inferior dos metabólitos analisados quando comparados com as folhas (SCHILCHER, 1968).

A baixa resolução cromatográfica em amostras que contêm extratos vegetais se deve principalmente à sua complexidade química, podendo ser formados por metabólitos de semelhantes ou diferentes polaridades e com concentrações distintas, o que dificulta a detecção e identificação dos seus constituintes, uma vez que a baixa resolução cromatográfica pode levar à incorreta interpretação espectral (WOLFENDER, 2009). Dessa maneira, a resolução cromatográfica é um fator a ser melhorado.

Assim, para obter um método cromatográfico capaz de separar os constituintes químicos presentes nas amostras em estudo, com a melhor resolução cromatográfica possível, foi necessário adaptar o método desenvolvido por Costa et al. (2013) e optar pela utilização de baixa concentração da fração orgânica na fase móvel, bem como por um gradiente linear com menor variação dessa fração (item 3.2.9), obtendo, assim, um método cromatográfico capaz de separar os metabólitos presentes nas amostras com resolução cromatográfica adequada para o desenvolvimento deste trabalho, conforme figura 5.

Figura 5 – Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de *Passiflora cincinnata* (IES⁻)

Quanto ao preparo da amostra, com o propósito de obter uma elevada taxa de extração de metabólitos secundários presentes nas folhas e caules de *P. cincinnata*, foi desenvolvido

um método de preparo da amostra visando uma metodologia capaz de ser empregada em uma única etapa de extração. Esta escolha foi avaliada com base nas proporções relativas entre os sinais detectados nos cromatogramas obtidos após duas extrações consecutivas do mesmo material.

Após o processo de preparação e análise das amostras (item 3.2.7), o método utilizado revelou uma porcentagem de extração em torno de 90%, na primeira extração, para todos os metabólitos analisados nas amostras preparadas contendo 20 mg e 30 mg de folhas, não havendo diferenças marcantes entre a porcentagem de metabólitos extraídos, conforme pode ser verificado na tabela 8.

Tabela 8 – Porcentagem extraída entre a 1ª e a 2ª extração em relação ao somatório das áreas obtidas para os principais metabólitos secundários majoritários de *Passiflora cincinnata*.

Sinal	Amostra							
	20 mg		30 mg		40 mg		50 mg	
	1ª Ext.	2ª Ext.	1ª Ext.	2ª Ext.	1ª Ext.	2ª Ext.	1ª Ext.	2ª Ext.
6	88	12	86	14	84	16	79	21
10	87	13	87	13	84	16	75	25
13	88	12	90	10	88	12	80	20
14	90	10	90	10	87	13	82	18
15	88	12	87	13	85	15	80	20

Ext.: Extração (%)

Já para as amostras provenientes do caule, só foi possível observar sinais cromatográficos que pudessem ser comparados na amostra preparada com 100 mg de caule. Nessa concentração, obteve-se taxa de extração superior a 90% quando comparada a primeira com a segunda extração.

Em relação à estabilidade das substâncias avaliadas, após o preparo (tempo 0) e transcorrido o tempo de 36 h, tomando como 100% a área obtida para essas substâncias no tempo 0, não foram observadas variações superiores a $\pm 5\%$.

As porcentagens de extração obtidas e a semelhança dos valores de extração entre todos os metabólitos (tabela 8) foram consideradas satisfatórias para os propósitos deste estudo. Considerando que este processo extraiu, em uma única etapa, os metabólitos avaliados e em proporções muito semelhantes, optou-se pelo seu emprego no estudo de identificação. Sendo assim, padronizou-se o preparo das amostras utilizando 30 mg de folhas e 100 mg de caule, extraídas com 3 mL de MeOH:H₂O (8:2 v/v).

Após a padronização do método de preparo das amostras e obtenção do método analítico, as amostras foram analisadas por CLAE-DAD-IES-EM em modo negativo e por CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ nos modos positivo e negativo.

Através das análises por CLAE-DAD-IES-EM, obtiveram-se espectros de massas em alta resolução dos íons majoritários (tabela 1 do apêndice), e, após inspeção manual de cada espectro, foi possível determinar suas prováveis fórmulas moleculares. Nessa determinação, só foram consideradas as fórmulas moleculares propostas em que a diferença entre a massa experimental observada e a calculada (teórica) não diferiu 10 ppm.

Já com a realização de análise por CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ obtiveram-se espectros na região do UV, espectros de EM/EM e espectros de perda neutra constante de todos os íons precursores majoritários que sofreram um decréscimo de -120 *u*. Também foram obtidos espectros de EM/EM/EM através da seleção de íons produtos que, quando fragmentados, geraram íons diagnósticos; estes íons auxiliaram na correta identificação das substâncias em análise (tabela 1 do apêndice).

Após obtenção desses dados, foi realizada uma comparação dos íons precursores formados, de seus respectivos produtos de fragmentação (relação *m/z* e intensidade dos fragmentos em relação ao pico base, em porcentagem), espectros de UV e fórmulas moleculares propostas com os dados disponíveis na literatura. Para este fim, os espectros gerados foram analisados de forma convencional, inspecionando manualmente cada espectro de interesse obtido (figuras de 87-111 do apêndice).

Através dessas análises, foi possível detectar a presença de derivados do ácido clorogênico (ACG) e flavonoides derivados da apigenina, luteolina e quercetina.

4.1.2.1 Identificação dos metabólitos derivados do ácido clorogênico

O termo ácido clorogênico é utilizado para designar uma família de ésteres formados pela esterificação entre um derivado do ácido *trans*-cinâmico e o ácido quínico (ácido 1L-1(OH), 3, 4, 5-tetra-hidroxicicloexanóico); este último com hidroxilas na posição axial nos carbonos 1 e 3 e hidroxilas equatoriais nos carbonos 4 e 5. Isto gera uma série de isômeros de posição, ou seja, subgrupos de substâncias com um mesmo número de ácidos *trans*-cinâmicos esterificados em posições diferentes no ácido quínico (CLIFFORD, 1999).

Os sinais cromatográficos 1, 21, 22 e 24 apresentaram, nos espectros de massas, os íons $[M - H]^-$ *m/z* 353; $[M - H]^-$ *m/z* 515; $[M - H]^-$ *m/z* 515 e $[M - H]^-$ *m/z* 515, respectivamente, quando analisados em modo negativo. Também pôde ser observado em

modo positivo os íons $[M + Na]^+$ m/z 377,11 referentes ao sinal cromatográfico 1 e $[M + H - 18]^+$ m/z 449 para os sinais cromatográficos 22 e 24, não sendo observado ionização no modo positivo para o sinal cromatográfico 21. Os espectros de UV das substâncias relativas a esses sinais exibiram UV max: ≈ 299 e 325 nm, absorções características de ácidos cafeoilquínicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2008).

Os espectros de íons produtos obtidos para os íons precursores $[M - H]^-$ m/z 353 (modo negativo) e $[M + Na]^+$ m/z 377 (modo positivo) apresentaram os íons produtos m/z 191 e m/z 163, respectivamente, resultados estes que condizem com os ácidos quínicos esterificados com uma única unidade de ácido cafeico.

Na análise dos íons precursores $[M - H]^-$ m/z 515, obteve-se o íon produto m/z 353 como pico base, indicando, desta forma, a presença de isômeros posicionais de ácidos di-cafeoilquínico (diCQA).

Comparando estes resultados com os dados das chaves de identificação de ácidos cafeoilquínicos por CLAE-EM/EM publicados por Clifford et al., (2003), Clifford, Knight, Kuhnert (2005) e Clifford et al. (2006), foi possível a identificação da substância relativa ao sinal cromatográfico 1 como ácido 5-*O-E*-cafeoilquínico, pois, segundo esses autores, em modo negativo, ele apresenta os íons produtos m/z 191 como pico base e m/z 179 com intensidade relativa menor que 5%, conforme observado.

Utilizando desta mesma estratégia de identificação, também foi possível identificar o sinal cromatográfico 22 como sendo o derivado do ácido clorogênico denominado ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico. A ausência da formação do íon produto m/z 335 é uma das características que auxilia na diferenciação dos seus pares de isômeros: o ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoilquínico (aproximadamente 35%) e o 1,5-di-*O-E*-cafeoilquínico (aproximadamente 10%). Para sua correta identificação, obteve-se também espectro de EM/EM/EM, utilizando como precursor o íon produto m/z 353. Essa análise gerou o íon m/z 191 como pico base, formação do íon m/z 179 (40%) e ausência da formação do íon m/z 335. Estes resultados confirmam a atribuição proposta, pois a formação do íon m/z 191 como pico base e do íon m/z 179 (<50%) é o padrão de fragmentação esperado para esta substância, pois seus isômeros geram este íon (m/z 179) com intensidade superior a 50% (ácido 1,3-di-*O-E*-cafeoilquínico) ou inferior a 10% (ácido 1,5-di-*O-E*-cafeoilquínico).

A presença do íon produto m/z 173 no sinal cromatográfico 21 e 24 indica que há uma unidade cafeica esterificada na posição 4 do ácido quínico. Esse íon é formado por não haver proximidade espacial com a carboxila ou hidroxila no carbono 1 do ácido quínico, havendo, assim, a necessidade de eliminar H_2O a partir de uma das hidroxilas vizinhas antes da

eliminação da unidade de ácido cafeico. Essa característica também é destacada no espectro EM/EM/EM, no qual este íon é formado com pico base a partir da fragmentação do íon produto m/z 353. A presença dos íons produtos m/z 299 e m/z 203 com intensidade superior a 50% distingue o ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico dos seus isômeros esterificados na posição 3 ou 5. Estes dois últimos podem ser diferenciados através da formação do íon m/z 335 nos espectros de EM/EM, que normalmente não é observado no ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, e também pela formação do íon m/z 191 nos espectros de EM/EM/EM, utilizando como precursor o íon produto m/z 353, com metade da intensidade observada para o ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico. Outra característica que se pode levar em consideração é que, em fase reversa, a sequência de eluição é 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA (CLIFFORD et al., 2003; CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; CLIFFORD et al., 2006).

A partir dessas informações e da comparação dos íons gerados com os dados presentes na literatura, pôde-se identificar a substância correspondente ao sinal cromatográfico 21 como o ácido 3,4-di-*O-E*-cafeoilquínico, e ao sinal cromatográfico 24 como ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico.

Os espectros de massas sequenciais e espectros na região do UV estão disponíveis nas figuras 87, 107, 108 e 110 do apêndice, e as estruturas moleculares propostas estão na figura 6. As fórmulas moleculares propostas e seus respectivos erros estão dispostos na tabela 1 do apêndice.

Figura 6 – Estruturas moleculares propostas para os derivados do ácido clorogênico identificados em *Passiflora cincinnata*

Fonte: Autoria própria

4.1.2.2 Identificação de Flavonoides

Os flavonoides e suas formas conjugadas representam um grande grupo de metabólitos de origem natural que são encontrados em diversas espécies vegetais. A estrutura química dessa classe é baseada em um esqueleto C₆-C₃-C₆. Eles são diferenciados pela insaturação no anel C, pela posição da ligação do anel B com o anel C e pelos padrões gerais de hidroxilação, sendo classificados como flavonol, isoflavona, flavanona, flavona, flavonol, catequinas e antocianidina. Os flavonoides podem também ser modificados principalmente por metoxilação, metilação, isoprenilação e/ou glicosilação, levando, assim, a um enorme número de diferentes estruturas (WILLIAMS; GRAYER, 2004; STOBIECKI, MACIEJ; KACHLICKI, 2006).

Os flavonoides glicosilados são comumente encontrados na natureza em formas conjugadas com açúcares através de uma ligação *O*-glicosídica, principalmente na hidroxila da posição 7 da aglicona, na posição 3 em flavonols, na posição 4' e, menos frequentemente, em outras posições. Glicosilação também pode ocorrer através de uma ligação direta do açúcar no núcleo básico do flavonoide via uma ligação ácido resistente *C-C*, formando flavonoides *C*-glicosilados. Este tipo de glicosilação ocorre quase que exclusivamente na posição 6 e/ou 8. Outros grupos incluem aqueles que possuem ligações conjugadas do tipo *O*-glicosil-*C*-glicosil, onde a *O*-glicosilação pode ocorrer na hidroxila fenólica ou no açúcar ligado na aglicona (CAVALIERE et al., 2005; FERRERES et al., 2007).

Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência é amplamente utilizada para identificação de flavonoides, sendo objeto de estudo de vários centros de pesquisa (STOBIECKI, M. et al., 2015). Em trabalhos pioneiros como os de Cuyckens, Claeys (2004); Ferreres et al. (2007); Domon, Costello (1988); Vukics, Guttman (2010), os autores propuseram nomenclaturas que expõem os principais íons gerados para essa classe, sendo largamente utilizadas em trabalhos referentes ao estudo dessas substâncias (figura 7); e, mais recentemente, Demarque et al. (2016) discutiram os mecanismos de fragmentação em fase gasosa que estão envolvidos na formação desses íons.

Figura 7 – Nomenclatura de fragmentação para flavonoides e principais eliminações neutras observadas para flavonoides *C*-glicosilados

A: Nomenclatura usual para fragmentação de flavonoides; B: Principais eliminações neutras observadas em flavonoides *C*-glicosilados.

Fonte: A: Adaptado de: Ferreres et al. (2007); Vukics e Guttman (2010); B: Adaptado de: Silva et al. (2014); Demarque et al. (2016).

Logo, observando estas propostas de fragmentação e comparando os dados obtidos, através de uma investigação sistemática do padrão de fragmentação em fase gasosa e levando em consideração a presença e ausência de íons produtos, bem como suas intensidades, com os disponíveis na literatura, iniciou-se o processo de identificação das substâncias pertencentes a essa classe.

Os resultados obtidos indicaram a presença de isômeros de flavonoides *O*-glicosilados, *C*-glicosilados e *C, O*-glicosilados, que apresentaram espectros de absorção na região do UV

com máximos de absorção entre 250 e 347 nm, região típica da absorção de flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

A partir dos experimentos de CLAE-DAD-IES-IT-EM/EM (IES^{+/-}), foi observada, primeiramente, a presença dos íons que caracterizam o tipo de ligação glicosídica presente, que, para os flavonoides que possuem ligações do tipo *O*-glicosil, apresentam como sinal mais abundante a formação de íons relativos à perda neutra da unidade de açúcar (Y_i), 162 *u* (hexose), 146 *u* (deoxihexose) e/ou 132 *u* (pentose), geradas pela clivagem heterolítica de sua ligação éter. Já para aqueles que possuem ligações do tipo *C*-glicosil, as fragmentações que os caracterizam são aquelas relativas à perda neutra de H₂O (18 *u*) e as relativas à clivagem interna do açúcar ($^{i,j}X$), gerando íons que também identificam o tipo de açúcar presente: $[M - 120/90]^{+/-}$ para *C*-hexose, $[M - 90/60]^{+/-}$ para *C*-pentose e $[M - 104/74]^{+/-}$ para *C*-deoxihexose. Adicionalmente, estes íons também auxiliam na identificação da aglicona, *m/z* $[311/341]^-$ e $[353/383]^-$ para apigenina, *m/z* $[327/357]^-$ e $[369/399]^-$ para luteolina e *m/z* $[295/325]^-$ e $[337/367]^-$ para crisina, mono-*C* e di-*C*-glicosilados, respectivamente (FERRERES et al., 2007; VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Os flavonoides também podem apresentar ligações conjugadas, que podem ser diferenciadas através das abundâncias relativas dos íons Y_0 e Y_1 nos flavonoides *O*-glicosilados, sendo que, quando o íon Y_0 é formado com abundância relativa inferior ao do íon Y_1 ($Y_0 < Y_1$), é característico da presença de di-*O*-glicosídeos (flavonoides com duas unidades de açúcar ligadas em hidroxilas fenólicas diferentes). Já quando o contrário ocorre ($Y_0 > Y_1$), é característico de *O*-di-glicosídeos (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004). Para os *C*-glicosilados, a presença do íon Y_0 com relativa intensidade e, na maioria das vezes, como pico base, é característico de flavonoides *C*; *O*-glicosilados. Já a presença do íon Z_1 com relativa intensidade caracteriza os flavonoides do tipo *C*-*O*-glicosilados (CUYCKENS et al., 2000; FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004).

Para determinação das ligações interglicosídicas (1→2) ou (1→6) em flavonoides dissacarídeos *O*-glicosilados, avalia-se a abundância dos íons produtos Y_1^- frente ao pico base (Y_0^-), que, quando apresenta intensidade entre 13-89%, indica que a ligação interglicosídica ocorre na forma (1→2) e, quando inferior a 13%, que ela ocorre na forma (1→6) (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004; QIN et al., 2017). Nos *C*-glicosilados, a presença do íon produto $^{0,2}X$ e $^{0,2}X - 18$ *u* é um indicativo de que a ligação ocorra na forma (1 → 2); contudo, este íon também pode ser formado pela clivagem interna do açúcar da porção *O*-glicosilada, sendo assim, a forma mais adequada de garantir a correta atribuição dessa ligação é realizando uma análise de EM/EM/EM, selecionando este íon ($^{0,2}X$) como precursor,

pois essa análise é capaz de confirmar a presença da ligação (1 → 2) quando se observa a perda da unidade *O*-glicosil (FERRERES et al., 2007; VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Em relação à posição em que a glicosilação ocorre, é possível sugerir que ela ocorra na posição *O*-3 quando há formação do íon radicalar $Y^* [Y_0 - H]^{\bullet}$ em intensidade de 3-4 vezes maior que a do íon Y_0^- (CUYCKENS; CLAEYS, 2005; VUKICS; GUTTMAN, 2010). Já para os *C*-glicosil, Cuyckens e Claeys (2004) relatam que é comum a formação do íon produto $E_1^{-/+} (-H_2O)$ em relativa abundância quando a unidade de açúcar está ligada no carbono 6. Esse fato ocorre com maior facilidade para este isômero devido a esse processo ser facilitado pela formação da ligação de hidrogênio entre a hidroxila na posição C-2” do açúcar residual e a hidroxila na posição 5 ou 7 da aglicona. Corroborando essa proposta, Ferreres et al. (2003) avaliaram diferentes flavonoides *C*-glicosilados isômeros (C-6 e C-8): neste estudo, os autores verificaram que a principal fragmentação observada é aquela que corresponde ao açúcar que está ligado ao carbono C-6 em relação ao açúcar que está ligado ao carbono C-8. Ao avaliarem diferentes pares de isômeros, observaram que o principal íon formado foi aquele correspondente à fragmentação $^{0,2}X$ e alta abundância do íon que representa a fragmentação $^{0,3}X$ para os isômeros glicosilados na posição C-6. Os autores também relatam que, para os di-*C*-glicosilados, a fragmentação do açúcar localizado na posição C-6 é preferencial frente ao do açúcar que está ligado à posição C-8, gerando, assim, os íons com maior abundância no espectro.

Baseado nessas considerações, os espectros de íons produtos gerados para *P. cinnamata* foram avaliados e identificados, conforme apresentado na tabela 1 do apêndice.

Os espectros de massas sequenciais e espectros na região do UV estão disponíveis nas figuras 88-106, 109 e 111 do apêndice, e as estruturas moleculares propostas estão nas figuras 8 e 9. As fórmulas moleculares propostas e seus respectivos erros estão dispostos na tabela 1 do apêndice.

Figura 8 – Estruturas moleculares propostas para os flavonoides identificados em *Passiflora cincinnata* Parte - I

Fonte: Autoria própria

Figura 9 – Estruturas moleculares propostas para os flavonoides identificados em *Passiflora cincinnata* Parte - II

Fonte: Autoria própria

4.1.3 Aplicação de rede molecular e espectrometria de massas na identificação dos metabólitos de *Passiflora cincinnata*

A identificação dos metabólitos presentes nas folhas e/ou nos caules de *P. cincinnata*, como pôde ser observado nas seções anteriores, foi realizada de forma convencional, sendo necessária a inspeção individual de todos os dados gerados e sua interpretação e comparação com a literatura e ou bases de dados (como SciFinder, METLIN, MassBank e *Dictionary of Natural Products*). Esse processo é demorado e se torna impossível sua aplicação quando se trata de análises de grande conjunto de dados, a partir dos quais são gerados milhares de espectros de matrizes complexas, necessitando, assim, de estratégias de análises de dados que permitam organizar e analisar esses tipos de dados (YANG et al., 2013).

GNPS é uma plataforma *online* livre baseada em dados para o armazenamento, análise e divulgação de conhecimento de espectros EM/EM. Ela permite o compartilhamento comunitário de espectros brutos, anotação contínua de dados depositados, inserção de espectros de referência, agrupamento e organização de conjuntos de dados através da criação

de redes moleculares (*Molecular Networking*) (WANG et al., 2016). GNPS tem sido utilizado frequentemente para acelerar a desreplicação de metabólitos (DE OLIVEIRA et al., 2017) e no auxílio à identificação de novas moléculas (TABOADA et al., 2017).

Então, utilizando essa capacidade da plataforma, os dados de EM/EM das folhas e caules de *P. cinnata* e dos padrões isolados foram inseridos e analisados na plataforma GNPS, e redes moleculares para esses dados foram geradas, visando à identificação de substâncias até então não identificadas e à obtenção de informações que possam auxiliar no estudo de desreplicação do gênero.

As redes moleculares foram criadas conforme descrito no item 3.2.11: somando os dois modos de ionização (positivo/negativo) e excluindo os dados relativos ao branco, foram criadas através da combinação de mais de 8000 espectros de EM/EM com janela espectral de 50 a 1300 *m/z*. Baseados na similaridade de cosseno, esses espectros foram agrupados em 426 nós, gerando uma rede molecular, no positivo, com 240 nós e uma, no modo negativo, com 186 nós.

Os grupamentos foram organizados de acordo com os seguintes fatores básicos: (1) força de aresta (forma), que representa o nível de similaridade (cosseno) entre os nós, variando de 0,65 a 1,0; (2) cor do nó, que representa a origem da amostra na qual a substância foi detectada; (3) legenda do nó, que corresponde ao íon precursor; (4) legenda da aresta, valor de cosseno entre dois nós, conforme figura 10.

Figura 10 – Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para *Passiflora cincinnata* e substâncias isoladas após remoção do branco

Superior: dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização; Inferior: dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização.

Fonte: Autoria própria

A identificação de cada nó (substância) foi baseada nas informações discutidas nos itens 4.1.1.1 e 4.1.1.2, nas anotações realizadas pela biblioteca espectral do GNPS e na comparação com a literatura, sendo primeiramente analisados os nós que agruparam nos mesmos *clusters* dos padrões, seguido daqueles que apresentaram íon precursor com mesma *m/z* das substâncias já identificadas (tabela 1 do apêndice) e, por último, os demais nós.

Seguindo essa ordem, primeiramente foi observado que, para ambos os modos de ionização, houve formação de mapas de redes moleculares com *clusters* tendo como elementos básicos (nós) substâncias da classe dos flavonoides (Figura 10). Dentre as substâncias já identificadas (tabela 1 do apêndice B), duas não foram detectadas no mapa de rede molecular para o modo negativo (**3** e **17**) e quatro para o modo positivo (**2**, **3**, **4** e **11**). Todos os padrões foram detectados, e a utilização deles, nesta parte do estudo, foi importante, pois eles ajudaram na avaliação das redes moleculares geradas quanto à capacidade de agrupamento de moléculas iguais ou semelhantes e também na distinção dentro dos *clusters*, de acordo com suas características específicas.

Os isômeros de posição como isoorientina e orientina (**6** e **9**), derivados do ácido clorogênico (**21**; **22** e **24**) e os demais presentes tiveram seus espectros considerados como sendo da mesma substância, portanto, foram representados, cada par ou série de isômeros, como a mesma substância.

Em relação aos nós gerados que não correspondiam às substâncias já identificadas, foi possível propor a identificação de 16 (conforme tabela 2 do apêndice B), todos pertencentes à classe dos flavonoides, sendo que nove são derivados da flavona (apigenina e luteolina) e sete do flavonol (quercetina, kaempferol e aromadendrina). Dessas substâncias, três são triglicosilados, sete são di-glicosilados e seis são mono-glicosilados. Foi também proposto que seis são metoxilados e um acetoxilado e que duas substâncias derivadas da quercetina possuem o grupo malonil ligados à sua porção glicosídica.

A fim de organizar melhor a visualização dessas informações, os nós não identificados foram ocultados, e os demais foram organizados conforme o tipo de aglicona, de ligação glicosídica e unidade glicosídica presentes em suas estruturas moleculares.

A partir dessa organização foi possível verificar que, embora as duas redes moleculares geradas apresentem como principais *clusters* nós referentes às substâncias em estudo, a rede relativa ao modo de ionização negativo exibiu agrupamentos com menor correlação molecular e nós conectados com valor de cosseno inferior a 0,75, como pode ser observado na figura 11.

Figura 11 – Mapa de rede molecular associado aos dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização para *Passiflora cincinnata* e substâncias isoladas, representando os nós que possuem proposta de identificação.

Fonte: Autoria própria

Já para a rede molecular gerada pelos espectros de massas adquiridos no modo positivo, foi possível verificar uma forte tendência de as substâncias se agruparem por tipo de aglicona: os derivados da flavona se separam dos derivados do flavonol pelo número de unidades glicosídicas e também pelo tipo de ligação que essas unidades fazem com a porção aglicona. Outro fator positivo, que deve ser considerado nessa rede molecular, é que os nós foram conectados, em sua grande maioria, com valor de cosseno superior a 0,85,

demostrando, assim, maior similaridade entre eles. Todas essas tendências podem ser observadas na figura 12.

Figura 12 – Mapa de rede molecular associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para *Passiflora cincinnata* e substâncias isoladas, representando os nós que possuem proposta de identificação.

Fonte: Autoria própria

Um ponto importante a ser considerado é que a qualidade dos espectros de EM/EM é fundamental para formação das redes de interações moleculares (OLIVON et al., 2017). Durante a aquisição dos dados espectrais, podem ser gerados espectros com diferentes qualidades entre o início e o final da aquisição, isto pode fazer com que espectros de qualidade inferior, mesmo similares ao de qualidade superior, agrupem-se em diferentes nós. A figura 13 mostra que três nós (m/z 595), com tempos de retenção médios (Tr. M.) praticamente iguais (Tr. M. de 51,3; 51,3 e 51,5 min), foram gerados para o mesmo íon precursor (16).

Olivon et al. (2017) destacam que o agrupamento de dados é um passo crucial durante o fluxo de trabalho do GNPS, mas sua eficácia nem sempre é ótima, particularmente quando grandes conjuntos de dados são comparados. Para ambas as redes moleculares, foi observado agrupamento de espectros relativos à mesma substância em diferentes nós, ocorrendo principalmente para o modo negativo; entretanto não houve impacto, na qualidade das redes geradas, que pudesse afetar a identificação de seus componentes.

Figura 13 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização para *Passiflora cincinnata* e substâncias isoladas, representando os nós formados pela substância luteolina-*O*-hexose-deoxihexose (16)

Fonte: Autoria própria

Após essas análises, pôde-se verificar que a estratégia de combinação de CLAE-EM/EM com rede molecular, gerada pelo GNPS, permitiu a comparação e visualização não

apenas das substâncias já observadas pelas análises anteriores, mas também forneceu informações para identificação de substâncias análogas a essas, levando à identificação de mais 16 flavonoides glicoconjugados.

Também se pôde verificar que, para a classe estudada, a rede molecular criada no modo positivo é mais eficiente, possuindo a capacidade de agrupar substâncias análogas com maior índice de cosseno e com melhor semelhança estrutural. Cuyckens e Claeys (2004) destacam que a análise de flavonoides pelo modo negativo é mais sensível, mas, no modo positivo, é gerado um maior número de íons fragmentos, podendo esses fornecer maiores informações espectrais, que auxiliam na determinação estrutural dessas substâncias.

Levando em consideração essa informação e os resultados até aqui alcançados, é possível propor que o padrão de fragmentação dessas substâncias obtidas no modo positivo ajudou a encontrar melhores relações estruturais entre as moléculas análogas, formando uma rede molecular com qualidade superior de agrupamento do que aquelas obtidas para o modo negativo, obtendo, assim, um melhor padrão de agrupamento e auxiliando na identificação de seus componentes, pois permitiu a exploração visual simultânea de moléculas idênticas e análogas, acelerando sua identificação. Esses fatores serão fundamentais na aplicação dessa estratégia para o estudo de grande conjunto de dados (YANG et al., 2013; WANG et al., 2016).

Todos os dados utilizados para geração das redes de interações moleculares estão disponíveis em:

- (1) Negativo: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=004634a3ead54c36868e5ed2c45f04c5>;
- (2) Positivo: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=0d5eb084efbd404691f1dad46fcacea0>.

4.1.4 Importância farmacológica e ocorrência das substâncias isoladas e identificadas de *Passiflora cincinnata* no gênero *Passiflora* L.

Os flavonoides são os principais constituintes químicos presentes em espécies do gênero *Passiflora*; especificamente em relação aos C-glicosilados, as substâncias isovitexina (JGA11), isoorientina (JGA 14) e seus isômeros vitexina (12) e orientina (9) são frequentemente relatados na literatura como majoritários, podendo ser utilizados como marcadores químicos do gênero (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; ZUCOLOTTO et al., 2012). Diversas atividades farmacológicas são atribuídas a essas substâncias, dentre elas,

pode-se destacar seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório, ansiolítico e antinociceptivo (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; HE et al., 2016). Já o flavonoide isoscoparina (JGA-16) é relatado, na literatura, nas espécies *P. palmeri* (ULUBELEN et al., 1984) e *P. incarnata* (VOIRIN et al., 2000). Para essa substância, são descritas atividades biológicas comuns àquelas atribuídas às espécies do gênero, tais como anti-inflamatória (LUYEN et al., 2014) e antioxidante (DEVKOTA et al., 2013).

Já JGA 15 tem sua ocorrência frequentemente relatada para *P. incarnata*: esta espécie tem grande importância no gênero e, juntamente com *P. edulis* e *P. alata*, são as mais utilizadas na medicina popular. A *P. incarnata* é atribuída principalmente a atividades hipnóticas e sedativas (PROLIAC; RAYNAUD, 1988; ZUCOLOTTI et al., 2012). Também é observada sua presença em *P. loefgrenii* (ARGENTIERI et al., 2015).

Em um estudo realizado por Nishiyama et al. (1993), foi observada uma forte capacidade de JGA 15 em promover redução de danos oxidativos causados pela irradiação ultravioleta em lipídios da pele, quando comparado com a vitamina E. A produção desse metabólito pode, então, ter função semelhante à sugerida por Silva et al. (2014) para vicenina-2 em espécies do gênero *Lychnophora*, na qual é observada a provável formação de uma barreira de luz UV para proteger as plantas por essa substância, uma vez que as plantas são organismos sésseis que precisam se proteger de condições externas difíceis, como a luz solar intensa.

Não foi encontrada ocorrência de JGA-13 no gênero, enquanto que, para JGA-12, foi observada sua presença em *P. incarnata*, *P. serratodigitata*, *P. serratifolia*, *P. foetida* (GADIOLI et al., 2016) e *P. quadrangulares* (COSTA et al., 2013).

Devido à maioria dos estudos do gênero *Passiflora* ser direcionado às espécies com maior uso popular (GADIOLI et al., 2016), é difícil afirmar que a produção de JGA-13 é exclusiva de *P. cincinnata*, contudo, com as abordagens modernas de análises de grandes conjuntos de dados, é possível que, no futuro, esta informação se confirme, o que será importante, pois essa substância poderá ser utilizada para diferenciar *P. cincinnata* das demais espécies do gênero e até mesmo como marcador químico da espécie. Quanto às atividades biológicas, essas substâncias seguem o padrão da classe e do gênero, principalmente no tocante às atividades antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (BATYUK et al., 1987; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

A identificação desses metabólitos foi importante, pois confirma a presença de substâncias de ocorrência clássica no gênero, estabelece, pela primeira vez, o perfil fitoquímico da espécie e, além disso, sugere que *P. cincinnata* tenha atividades

farmacológicas semelhantes às já bem estabelecidas para as demais espécies de *Passiflora*, podendo, assim, direcionar estudos futuros relacionados à sua avaliação farmacológica.

4.2 Análises e desreplicação de compostos fenólicos das folhas de *Passiflora* ssp. por rede molecular e espectrometria de massas

4.2.1 Análise

Para realização desta parte do estudo, todas as amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.2.8.

Inicialmente, algumas amostras foram analisadas de acordo com o método descrito no item 3.2.9, mas este método não se mostrou adequado para esta fase do estudo, sendo assim, foi adaptado às condições necessárias, e todas as amostras foram analisadas conforme metodologia descrita no item 3.2.10.

4.2.2 Seleção dos parâmetros para geração das redes moleculares pelo GNPS

Para geração de redes de interações moleculares no GNPS, é necessária a escolha de quatro parâmetros básicos: valor de cosseno, mínimo de íons produtos emparelhados, delta EM/EM e delta EM. Para *Passiflora* ssp., foi testada a combinação de nove parâmetros diferentes, conforme descrito no item 3.2.12. Após análise de todas as redes moleculares geradas, observou-se que a combinação de parâmetros que apresentou a melhor interação foi a V02.1 (valor de cosseno 0,55; *match* 5 e delta EM/EM 0,7) (Figura 3), sendo essa a utilizada no estudo de desreplicação das amostras de *Passiflora* ssp.

Somando os dois modos de ionização (positivo/negativo) e excluindo os dados relativos ao branco, as redes foram geradas através da combinação de mais de 188.000 espectros de EM/EM com janela espectral de 50 a 1300 *m/z*. Esses espectros foram agrupados, baseados na similaridade de cosseno dos seus espectros de EM/EM, em 2734 nós, gerando uma rede molecular, no modo positivo, com 1295 nós e, no modo negativo, com 1439 nós.

Todos os dados utilizados para geração das redes moleculares estão disponíveis em:

(1) Negativo: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=d561a3bfb95840dc9cd6d1f7574b92a7>;

(2) Positivo: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=3480d42c189f48d49a5904dc3ae7e944>.

4.2.3 Análise das redes moleculares geradas pelo GNPS

Durante a análise das redes geradas (modo positivo e negativo), verificou-se que aquela referente ao modo negativo, assim como para *P. cinnamomum*, apresentou qualidade inferior em relação ao modo positivo. Embora se tenha alcançado a capacidade de agrupar substâncias semelhantes em um mesmo *cluster*, houve a formação de um grande número de nós referente a uma mesma substância em diferentes *clusters*, demonstrando baixa capacidade de agrupamento de dados relativos às substâncias presentes em nossas amostras para este modo de aquisição e impactando significativamente na qualidade da RM.

A figura 14 demonstra o mapa da RM criada no modo negativo, onde é possível observar, em destaque, um *cluster* formado por 78 nós, no qual 48 são relativos ao íon precursor $[M - H]^-$ m/z 563, com Tr. M. 21,2 min ($\pm$ 3,0 min) e que apresentou como principais íons produtos $[M - H - 60]^-$ m/z 503; $[M - H - 90]^-$ m/z 473; $[M - H - 120]^-$ m/z 443; $[M - H - 180]^-$ m/z 383 e $[M - H - 210]^-$ m/z 353, sendo anotado pela biblioteca do GNPS como o flavonoide di-C-glicosilado schaftosídeo e confirmado através da comparação com a literatura (GOMES et al., 2016). Outros 12 nós são relativos ao íon precursor $[M - H]^-$ m/z 593, com Tr. M. 16,5 min ($\pm$ 1,4) e que apresentou como principais íons produtos $[M - H - 90]^-$ m/z 503; $[M - H - 120]^-$ m/z 473; $[M - H - 210]^-$ m/z 383; $[M - H - 240]^-$ m/z 353, sendo anotado pela biblioteca do GNPS como o flavonoide, também di-C-glicosilado, vicianina-2 e confirmado através da comparação com a literatura (SILVA et al., 2014). O GNPS foi eficaz em agrupar essas duas substâncias em um mesmo *cluster*, entretanto não demonstrou a mesma eficiência quanto ao agrupamento de seus respectivos espectros em um só nó, criando, assim, um *cluster* praticamente de apenas duas substâncias e perdendo sua principal qualidade, que é capacidade de agrupar espectros de alta similaridade e formar *clusters* de metabólitos análogos que partilham de um perfil espectral semelhante, corroborando o que foi observado anteriormente.

Figura 14 – Mapa de rede molecular gerada pelo GNPS, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo negativo de ionização para as amostras de *Passiflora* ssp. após remoção do branco

A: mapa de rede molecular completo com destaque para o *cluster* formado por schaftosídeo e vicenina-2;
B: ampliação do destaque de A.

Fonte: Autoria própria

Já para a RM gerada com os dados relativos aos espectros de EM/EM adquiridos no modo positivo, não ocorreu o mesmo problema. Foi possível observar a detecção de um grande número de metabólitos de interesse, sendo esses agrupados e distribuídos em diferentes *clusters*. Pôde-se observar também que, mesmo substâncias de uma mesma classe, mas que apresentam características estruturais diferentes, foram separadas conforme suas especificidades em diferentes *clusters*, mantendo, assim, o princípio dessa abordagem, que é baseada no agrupamento de substâncias de acordo com as semelhanças nos padrões de fragmentação EM/EM, formando famílias moleculares dentro de uma rede (YANG et al., 2013; WANG et al., 2016).

A figura 15 demonstra o mapa de RM criado com os espectros adquiridos no modo positivo. Através dela, é possível observar que, em relação aos compostos de interesse, foi possível detectar derivados do ácido clorogênico, proantocianidinas e, principalmente, como esperado, flavonoides. Este último foi separado em diferentes *clusters*, levando em consideração principalmente o tipo de aglicona e ligação glicosídica.

Figura 15 – Mapa de rede molecular gerada pelo GNPS, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para as amostras de *Passiflora* ssp. após remoção do branco

Fonte: Autoria própria

Após essa análise, foi possível definir a RM gerada com os espectros de EM/EM no modo positivo como preferencial para a desreplacação dos metabólitos de interesse detectados nas amostras de *Passiflora* ssp.

4.2.4 Desreplicação dos compostos fenólicos das folhas de *Passiflora* ssp.

Para desreplicação dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *Passiflora* ssp., utilizaram-se as mesmas informações discutidas no item 4.1.2.1 e 4.1.2.2, as anotações geradas pela biblioteca espectral do GNPS e a comparação com dados da literatura.

4.2.4.1 Desreplicação dos flavonoides C-glicosilados

Flavonoides C-glicosilados são os constituintes químicos mais citados para as espécies de *Passiflora*, apresentando uma ampla distribuição no gênero (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Substâncias dessa classe são bastante utilizadas como marcadores químicos, principalmente pela sua grande ocorrência, estabilidade química, diversidade estrutural e disponibilidade de métodos de análises (GOSMANN et al., 2011).

A partir da análise da RM pôde ser observada a formação de dois *clusters* predominantemente contendo esses metabólitos: um sugerindo ser formado apenas por flavonoides C-glicosilados e outro contendo também O-glicosilação na hidroxila fenólica e/ou no açúcar ligado à porção aglicona (figura 15).

Após análise dos espectros de EM/EM relativos aos nós que compõem os *clusters* dessa subclasse, pôde-se verificar uma tendência dessas substâncias em se agruparem por número de unidades de açúcar presentes em suas estruturas, sendo que os flavonoides com três unidades de açúcares são aqueles que mais se destacaram, como pode ser observado na figura 16.

Figura 16 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para *Passiflora* ssp, representando os flavonoides C-glicosilados que possuem proposta de identificação – Parte I

Fonte: Autoria própria

Seguindo a análise, percebeu-se também que o tipo de ligação glicosídica contribuiu fortemente para formação dos *clusters*, sendo observadas aglomerações bem definidas para cada uma delas, conforme figura 17. O tipo de aglicona também auxiliou, porém em menor proporção quando comparado com o tipo de ligação e número de unidades glicosídicas. O valor de cosseno entre os análogos identificados foi superior a 0,85, reforçando a grande similaridade entre eles e contribuindo para uma correta identificação. Essas tendências também foram observadas nas análises realizadas para *P. cincinnata* e aqui foram fundamentais para qualidade da RM gerada e para a identificação das substâncias que a compõem.

Figura 17 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para *Passiflora* ssp, representando os flavonoides C-glicosilados que possuem proposta de identificação – Parte II

Fonte: Autoria própria

Dentre os flavonoides C-glicosilados identificados, a substância 92 (tabela 3 do apêndice), chamou-nos a atenção pelo seu perfil de fragmentação, sugerindo a presença de três unidades glicosídicas, sendo todas ligadas à aglicona por C-glicosilação. Ela apresentou como íon precursor $[M + H]^+ m/z$ 727, e, no espectro de EM/EM, foi observado como pico base o íon precursor $[M + H - 18]^+ m/z$ 709 seguido do íon $[M + H - 66]^+ m/z$ 661, $[M + H - 36]^+ m/z$ 691, $[M + H - 108]^+ m/z$ 619, sendo este último possivelmente relativo à perda neutra de 90 u de uma das unidades glicosídicas e a eliminação de H₂O de outra unidade. A eliminação de uma unidade glicosídica é normalmente observada em flavonoides que possuem uma O-glicosilação em ambos os modos de ionização como pico base (VUKICS;

GUTTMAN, 2010); devido à ausência de um íon com essas características, os dados obtidos nos levaram a sugerir que esta substância pode apresentar três ligações C-glicosídicas. Entretanto, não há relato, na literatura, de substâncias dessa classe com essas características.

A literatura relata a possibilidade de extensiva fragmentação da porção glicídica para flavonoides O-glicosilados analisados no modo positivo de ionização (MARCH et al., 2006). Como parte complementar deste trabalho, nós estudamos o perfil de fragmentação de um novo derivado fenólico isolado de *Eremanthus glomerulatus* (AMARAL et al., 2017) no modo negativo de ionização, e também observamos extensiva fragmentação da glicose presente nessa substância com perdas neutras de 60, 90 e 120 u, como pode ser observado na figura 18.

Figura 18 – Proposta de fragmentação de um novo derivado fenólico com extensiva fragmentação da glicose

Fonte: Amaral et al. 2017

Então, visando o encontro de novas informações que possam definir uma melhor proposta de identificação, o espectro de ionização no modo negativo para essa substância foi consultado na plataforma GNPS e analisado.

O espectro de EM/EM de 92, no modo negativo, apresentou como íon precursor o íon $[M - H]^-$ m/z 725 e o íon produto $[M - H - 162]^-$ m/z 563 (Y^-) como pico base, indicando, desta forma, a perda de uma unidade glicosídica através da quebra heterolítica da ligação

hemiacetal glicosídica pela transferência de um próton do açúcar para o átomo de oxigênio glicosídico (DEMARQUE et al., 2016). Essa fragmentação caracteriza que um dos açúcares é do tipo hexose e está ligado à aglicona por uma ligação *O*-glicosídica em uma das hidroxilas fenólicas da aglicona (FERRERES et al., 2007; VUKICS; GUTTMAN, 2010), e não em uma ligação do tipo *C*-glicosídica, como sugere a fragmentação no modo positivo, verificando, assim, que esta substância apresenta padrão de fragmentação no modo positivo não trivial, mas semelhante a alguns outros compostos fenólicos relatados na literatura (MARCH et al., 2006) e também avaliados pelo nosso grupo (AMARAL et al., 2017).

Também observamos a formação do íon $[M - H - 162 - 210]^-$ m/z 353 ($^{0,2}X_{6,8}$), indicando que as outras duas unidades de açúcar estão ligadas por *C*-glicosilação e são do tipo hexose e pentose e que, devido à formação do íon $[M - H - 120]^-$ m/z 605 ($^{0,2}X_6$) com 49% de intensidade relativa, a hexose está ligada no carbono 6 (FERRERES et al., 2003; FERRERES et al., 2007).

Com essa análise, pôde-se identificar esta substância como sendo apigenina-6-*C*-hexose-*C*-8-pentose-*O*-Hexose, substância ainda não identificada no gênero e aqui encontrada para as espécies *P.foetida* e *P.edulis*, de acordo com a tabela 3 do apêndice.

A organização dos dados por RM, juntamente com as anotações realizadas pela biblioteca do GNPS e com os dados da literatura, levou-nos a propor a identificação de 109 substâncias detectadas que possuem ao menos uma ligação *C*-glicosídica. Os derivados de flavona (apigenina, luteolina e crisina) foram as principais substâncias presentes, sendo os disubstituídos a maioria e a hexose o principal substituinte. Foram observadas também substâncias com três unidades de açúcar do tipo deoxihexose, dideoxihexose e pentose. A proposta de identificação de cada uma dessas substâncias pode ser observada na tabela 3 do apêndice. As estruturas moleculares para os principais flavonoides *C*-glicosilados com proposta de identificação estão na figura 19.

Figura 19 – Estruturas moleculares dos principais flavonoides *C*-glicosilados com proposta de identificação detectados em *Passiflora* ssp.

185

187

207

93

96

92

105

97

Fonte: Autoria própria

4.2.4.2 Desreplicação dos flavonoides *O*-glicosilados

Além dos flavonoides *C*-glicosilados, também foram encontrados flavonoides *O*-glicosilados. A ocorrência desta subclasse no gênero *Passiflora* também é bem relatada, sendo tais compostos encontrados comumente em diversas espécies (GADIOLI et al., 2016).

Como pode ser observado na figura 15, essas substâncias foram distribuídas principalmente por dois *clusters* na RM. A organização desses *clusters* nos levou a verificar que, como nos demais casos já analisados durante este estudo, o número de unidades glicídicas contribuiu muito para separação desses metabólitos, separando os mono-glicosilados dos di- e tri-glicosilados, sendo que este último, embora no mesmo *cluster*, destacou-se dos di-glicosilados.

Prosseguindo a análise, podemos também verificar que as substâncias identificadas apresentaram similaridade de cosseno superior a 0,90, indicando um alto grau de correlação entre as substâncias que compõem estes *clusters*; também observamos que o tipo de aglicona gerou uma melhor separação dentro dos *clusters* e que o tipo de ligação glicosídica, assim como observado para os flavonoides *C*-glicosilados, foi fundamental para promover o agrupamento dessas substâncias. Essas informações são ilustradas na figura 20.

Figura 20 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para *Passiflora* ssp, representando os flavonoides *O*-glicosilados que possuem proposta de identificação

Fonte: Autoria própria

Após análise de todo o *cluster*, foi possível propor a identificação de 44 flavonoides detectados que continham apenas ligações *O*-glicosídicas (tabela 3, do apêndice). Verificou-se

que os mono-glicosilados são principalmente derivados da flavona. e que os di-glicosilados, do flavonol, sendo que o maior número de substâncias presentes são derivadas do kaempferol e são di-*O*-glicosilados. Também foi possível a detecção de flavonoides com três unidades glicídicas, sendo esses pouco relatados no gênero (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; GADIOLI et al., 2016).

4.2.4.3 Desrepliação das proantocianidinas

Proantocianidinas são polímeros de flavonoides, mais especificamente flavan-3-ol, que são formados por ligações *C-C*, geralmente em C-4 e C-8 ou, menos frequentemente, em C-4 e C-6. Proantocianidinas que contêm uma única ligação interflavonoídica são denominados do tipo-B, já aquelas que apresentam uma ligação éter adicional, usualmente entre C-2 e O-7, são chamadas do tipo-A (DIXON; XIE; SHARMA, 2005).

A análise da RM indicou a presença de proantocianidinas (figura 15) em diferentes espécies dos quatro subgêneros estudados, mas com destaque para espécie *P. contracta* do subgênero *Deidamioides*. A biblioteca do GNPS exibiu anotação para as substâncias 162 e 167 como (E)-Cat-(E)-Cat A e (E)-Cat-(E)-Cat B, o que foi confirmado através da comparação do seu perfil de fragmentação com a literatura (FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; LI; DEINZER, 2007; FERREIRA et al., 2010).

A análise do *cluster* relativo a essa classe demonstrou separação entre os dímeros e trímeros, porém o trímero se dividiu em 3 nós relativos à mesma substância, e o valor de cosseno para ligação entre os nós, em sua grande maioria, foi superior a 0,75. Não foi possível verificar um atributo para que pudéssemos classificá-lo como principal fator de aglomeração dos nós, mas é possível verificar que a unidade básica formadora dessas substâncias, juntamente com a presença ou ausência de metoxilação, influenciou mais no agrupamento do que a presença de uma ligação éter adicional (tipo B). A figura 21 ilustra essas informações.

Figura 21 – Mapa de rede molecular, associado aos dados de EM/EM obtidos no modo positivo de ionização para *Passiflora* ssp, representando as proantocianidinas que possuem proposta de identificação

Fonte: Autoria própria

A formação do *cluster* relativo a essa classe, juntamente com anotação da biblioteca do GNPS, levou-nos a propor a identificação de mais nove substâncias análogas, sendo oito dímeros e um trímero. Essa proposta foi baseada na comparação do perfil de fragmentação obtido através dos espectros de EM/EM para essas substâncias com a literatura (FRIEDRICH;

EBERHARDT; GALENSA, 2000; LI; DEINZER, 2007; FERREIRA et al., 2010; DEMARQUE et al., 2016). Assim, foram observados, como principais mecanismos de fragmentação, a clivagem heterocíclica do anel C, retro-Diels-Alder no anel B e formação de quinona metídeo; fragmentações relativas à eliminação de H₂O também foram observadas, contudo não é possível diferenciar por EM a estereoquímica dos carbonos C-2 e C-3, sendo, então, utilizada a representação (E)*epi* (LI; DEINZER, 2007).

A presença de proantocianidinas é pouco descrita no gênero, sendo apenas relatada ocorrência nos frutos de *P. mollissima* (GARCIA-RUIZ et al., 2017) e nas folhas de *P. coccínea* (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012), de forma que essas informações contribuem para melhor caracterização química do gênero.

A proposta de identificação de cada uma dessas substâncias pode ser observada na tabela 3 do apêndice. As estruturas moleculares para as principais proantocianidinas com proposta de identificação estão na figura 22.

Figura 22 – Estruturas moleculares das principais proantocianidinas com proposta de identificação detectadas em *Passiflora* ssp.

Fonte: Autoria própria

4.2.4.4 Desrepliação dos derivados do ácido clorogênico

Os derivados do ácido clorogênico foram detectados na RM (figura 15), mas tais derivados não formaram um *cluster* específico, sendo distribuídos entre os flavonoides, assim como ocorreu na análise para *P. cincinnata*. O número de nós relativos a essa classe foi

pequeno, o que acreditamos ter acontecido devido à sua baixa ocorrência na amostra e à grande semelhança do perfil de fragmentação entre os isômeros. Sendo assim, conseguimos atribuir identificação apenas às substâncias 44, como o ácido cafeoilquínico, e 45, como o ácido *p*-curamoilquínico (tabela 3 do apêndice).

As estruturas moleculares para os derivados do ácido clorogênico com proposta de identificação estão na figura 23.

Figura 23 – Estruturas moleculares dos derivados do ácido clorogênico com proposta de identificação detectados em *Passiflora* ssp.

Fonte: Autoria própria

4.2.4.5 Detecção dos metabólitos das espécies de *Passiflora* ssp. na rede molecular

Transcorridas as análises das redes moleculares, foi possível observar que as espécies estudadas, quanto aos compostos fenólicos, produzem metabólitos referentes à classe dos flavonoides, derivados do ácido clorogênico e proantocianidinas. Os flavonoides, como já mencionado anteriormente, compreendem o principal grupo de metabólitos relatados para o gênero *Passiflora*; quanto aos derivados do ácido clorogênico, poucos estudos citam a ocorrência dessa classe no gênero; já as proantocianidinas são ainda menos relacionadas e, neste estudo, foram detectadas em algumas espécies.

Dentre as espécies estudadas (tabela 1), as amostras se dividem em quatro subgêneros. Avaliando a distribuição dos metabólitos detectados na rede molecular criada com os dados de EM/EM obtidos no modo positivo, verificou-se que o maior número de metabólitos está presente no subgênero *Passiflora*, fato esperado, pois ele representa o maior número de amostras (71%) utilizadas neste estudo e também o maior número de espécies entre os subgêneros propostos por Feuillet e Macdougall (2003). Verificou-se também que 6,8% dos metabólitos detectados estão presentes em todos os subgêneros, conforme ilustra a figura 24.

Figura 24 – Diagrama de Venn da distribuição dos metabólitos detectados (IES⁺) na rede molecular entre os subgêneros de *Passiflora* ssp

A: Distribuição de todos os metabólitos detectados; B: Distribuição dos metabólitos com proposta de identificação.

Fonte: Autoria própria

Ao analisarmos os metabólitos detectados com a identificação proposta, foi possível observar uma distribuição muito similar ao quadro geral (figura 24), verificando que 11% deles é comum a todos os subgêneros e que os flavonoides C-glicosilados são a maioria, sendo os derivados da flavona os principais metabólitos presentes.

Assim como é relatado na literatura, isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina foram as substâncias mais detectadas entre as espécies. A vicenina-2 também foi detectada em uma ampla variedade de espécies e, como já observado em estudos anteriores do nosso grupo (SILVA et al., 2014), em espécies de *Lychnophora*, acredita-se que, devido às suas propriedades de absorção de raios ultravioleta e por sua localização nas folhas, a vicenina-2 pode estar envolvida no processo de proteção solar dessas plantas, função semelhante também pode ocorrer no gênero em estudo. Outras substâncias semelhantes à vicenina-2 também foram detectadas, chamando-nos atenção a substância 93 (tabela 3 do apêndice), a qual sugerimos se tratar do flavonoide luteolina-6-C-deoxihexose-8-C-pentose, que aqui foi amplamente detectado entre as espécies, mas só foi observado na literatura um único estudo relatando sua presença na espécie *P. edulis* (FARAG et al., 2016), de forma que abre a possibilidade de estudos posteriores, visando a confirmação da sua proposta de identificação, bem como sua importância no gênero e suas possíveis atividades biológicas.

Chemical Structures and Legend:

- Top Left:** Flavone structure with R₁ and R₂ substituents.
- Top Right:** Flavone structure with R₁ and R₂ substituents.
- Bottom Left:** Flavone structure with R₁ and R₂ substituents.
- Bottom Right:** Flavone structure with R₁ and R₂ substituents.
- Legend:** R = H; OH; mono-; di-; ou tri-glicosilado

Venn Diagram Data:

Region	Count	Percentage
Astrorea only	0	0%
Passiflora only	68	39.5%
Decaloba only	6	3.5%
Deidamioides only	7	4.1%
Astrorea & Passiflora	9	5.2%
Passiflora & Deidamioides	4	2.3%
Deidamioides & Decaloba	0	0%
Decaloba & Astrorea	3	1.7%
Astrorea & Decaloba	3	1.7%
Passiflora & Decaloba	26	15.1%
Passiflora & Deidamioides	3	1.7%
Decaloba & Deidamioides	9	5.2%
Astrorea & Decaloba & Deidamioides	19	11%
Passiflora & Decaloba & Deidamioides	0	0%
Astrorea & Passiflora & Deidamioides	0	0%
Passiflora & Astrorea & Decaloba	18	10.5%
Decaloba & Astrorea & Passiflora	3	1.7%
Passiflora & Decaloba & Deidamioides	0	0%
Decaloba & Deidamioides & Astrorea	0	0%
All four genera	0	0%

Fonte: Autoria própria

Ao final da análise da RM, foi possível, então, verificar que a aplicação da estratégia de combinação de rede molecular com espectrometria de massas acelerou a desreplicação dos metabólitos secundários, não apenas no tempo, mas também na eficiência das propostas de identificação, gerando, assim, informações sobre o perfil dos metabólitos das espécies estudadas, o que dificilmente seria possível de obter pelos métodos convencionais, e criando um padrão para estudos posteriores, reforçando, dessa forma, o grande potencial da combinação dessas ferramentas para o estudo da química de produtos naturais.

5 CONCLUSÃO

A execução deste estudo possibilitou responder as questões propostas como objetivos para este trabalho, sendo elas pontualmente listadas a seguir:

Foi possível o isolamento e identificação dos compostos majoritários presentes nas folhas e nos caules de *Passiflora cincinnata*, sendo elas: isoorientina; isovitexina; isoscoparina; isovitexina-2''-O- β -glicopiranosídeo; isovitexina-2-O- β -xilopiranosídeo; e isoorientina-2-O- β -xilopiranosídeo.

Também se desenvolveram métodos cromatográficos por CLAE-DAD-IES-IT-EMⁿ para análises de diferentes espécies de *Passiflora* ssp..

Houve a obtenção do perfil químico de *Passiflora cincinnata* através da análise das principais reações de fragmentação em IES-EMⁿ dos metabólitos secundários presentes em suas folhas e caules.

Gerou-se um modelo de estudo para o gênero *Passiflora* L. pela combinação de espectrometria de massas com rede molecular, utilizando os dados de IES-EM/EM de *Passiflora cincinnata*.

Obtiveram-se os perfis cromatográficos e os dados de IES-EM/EM de 46 espécies do gênero *Passiflora* L. oriundas do HUEFS.

A aplicação do modelo de combinação de IES-EM/EM e RM demonstrou que o modo positivo de ionização, nas condições deste trabalho, é o mais adequado para o estudo de desreplicação de compostos fenólicos.

A análise da RM gerada para *Passiflora* ssp. acelerou a desreplicação dos compostos fenólicos presentes nas espécies estudadas, viabilizando a realização de proposta de identificação de mais de 100 metabólitos.

Geraram-se, assim, informações sobre a composição química de 46 espécies do gênero *Passiflora* L., bem como a definição de metabólitos específicos e comuns entre os subgêneros e também a identificação de substâncias ainda não relatadas para o gênero, sendo estas possivelmente novas moléculas da flora brasileira.

Dessa forma, podemos concluir que a estratégia de combinação de EM e RM expande o uso da espectrometria de massas, possibilitando a interpretação rápida dos dados gerados. Sua aplicação, neste estudo, possibilitou a informação química de 46 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* L., bem como a correlação química entre elas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 2, p. 81-91, 2002.

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - II. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 2, p. 100-106, 2003.

AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AGRAWAL, P. **Carbon-13 of Flavonoids: Studies in Organic Chemistry**, vol. 3: secondary title: Elsevier, New York, 1989.

AMARAL, J. G.; BAUERMEISTER, A.; PILON, A. C.; GOUVEA, D. R.; SAKAMOTO, H. T.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation pathway and structural characterization of new glycosylated phenolic derivatives from *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae) by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 11, p. 783-787, 2017.

AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. Studies on *Passiflora incarnata* Dry Extract .1. Isolation of Maltol and Pharmacological Action Of Maltol and Ethyl Maltol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 5, p. 1008-1013, 1974.

APONTE, Y.; JÁUREGUI, D. Algunos aspectos de la biología floral de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 21, n. 3, p.211- 219, 2004.

ARAÚJO, D.; ALVES, M. Flora of Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Passifloraceae ss. **Rodriguésia**, v. 64, n. 2, p. 247-254, 2013.

ARGENTIERI, M. P.; LEVI, M.; GUZZO, F.; AVATO, P. Phytochemical analysis of *Passiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolin-derived flavonoids with antioxidant properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 11, p. 1603-1612, 2015.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSC, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L. M.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BATYUK, V. S.; VASIL'CHENKO, E. A.; VASIL'EVA, L. N.; CHERNOBROVAYA, N. V.; KOMISSARENKO, N. F. Flavonoids of *Desmodium canadense* and their analgesic effect. **Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 21, n. 1, p. 63-67, 1987.

BAUERMEISTER, A.; ROLIM, L. A.; SILVA, R.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. CHAPTER 10 Perspectives for the Future. In: (Ed.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology: Evolving Applications**: The Royal Society of Chemistry, 2018, p.264-287.

BERGNER, P. Passionflower. **Medical Herbalism**, v. 7, n. 1-2, p. 13-14, 1995.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. Passifloraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 13 Jun. 2016

BERTIN, M. J.; SCHWARTZ, S. L.; LEE, J.; KOROBAYNIKOV, A.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Spongiosine Production by a *Vibrio harveyi* Strain Associated with the Sponge *Tectitethya crypta*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 3, p. 493-499, 2015.

BIRK, C. D.; PROVENSI, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 14, p. 2285-2291, 2005.

BOUSLIMANI, A.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 718-729, 2014.

BRANDÃO, L. E. M.; NÔGA, D. A. M. F.; DIERSCHNABEL, A. L.; CAMPÊLO, C. L. D. C.; MEURER, Y. D. S. R.; LIMA, R. H.; ENGELBERTH, R. C. G. J.; CAVALCANTE, J. S.; LIMA, C. A.; MARCHIORO, M. *Passiflora cincinnata* Extract Delays the Development of Motor Signs and Prevents Dopaminergic Loss in a Mice Model of Parkinson's Disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. The pharmacognosy of the passion flower. **Journal of Pharmacie de Belgique**, v. 39, n. 1, p. 15, 1984.

BYNG, J. W.; CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; JUDD, W. S.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F.; BRIGGS, B.; BROCKINGTON, S.; CHAUTEMS, A.; CLARK, J. C.; CONRAN, J.; HASTON, E.; MOLLER, M.; MOORE, M.; OLMSTEAD, R.; PERRET, M.; SKOG, L.; SMITH, J.; TANK, D.; VORONTSOVA, M.; WEBER, A.; ANGIOSPERM PHYLOGENY, G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

CARVALHO-OKANO, R. D.; VIEIRA, M. Morfologia externa e taxonomia. In: **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 33-50, 2001.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 21, p. 3143-3158, 2005.

CERVI, A. C. Estudo do gênero *Passiflora* L., Subgênero *Passiflora*. Departamento de Botânica. Universidade Federal do Paraná. **Passifloraceae do Brasil**. Fontqueria XLV, Madrid. P. 4-6, 1997.

CHENG, Y. X.; SCHNEIDER, B.; OBERTHUR, C.; GRAF, H.; ADLER, S.; HAMBURGER, M. Flavone C-glycosides from *Isatis tinctoria* leaves. **Heterocycles**, v. 65, n. 7, p. 1655-1661, 2005.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821-3832, 2005.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MS n of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1957-1969, 2006.

COSTA, G. M.; GAZOLA, A. C.; MADOGGIO, F. A.; ZUCOLOTTI, S. M.; REGINATTO, F. H.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* Linn. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 12, p. 1697-1707, 2013.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CUYCKENS, F.; MA, Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAEYS, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analisis**, v. 28, n. 10, p. 888-895A, 2000.

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

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 3, p. 364-372, 2005.

DA SILVA, R. R.; LOPES, N. P.; SILVA, D. B. CHAPTER 3 Metabolomics. In: (Ed.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology: Evolving Applications**: The Royal Society of Chemistry, 2018, p.57-81.

DE OLIVEIRA, G. G.; NETO, F. C.; DEMARQUE, D. P.; PEREIRA, J. A. D.; PEIXOTO, R. C. S.; DE MELO, S. J.; ALMEIDA, J.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 7, p. 636-646, 2017.

DEGINANI, N. B. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana**, v., n., p. 43-129, 2001.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.

DEVKOTA, H. P.; FUKUSAKO, K.; ISHIGURO, K.; YAHARA, S. Flavone C-glycosides from *Lychnis senno* and their antioxidative activity. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, p. 1413-1414, 2013.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DIAS, H. J.; DE MELO, N. I.; CROTTI, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In: (Ed.). **Tandem Mass Spectrometry-applications and Principles**: InTech, 2012.

DIXON, R. A.; XIE, D. Y.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? **New Phytologist**, v. 165, n. 1, p. 9-28, 2005.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397-409, 1988.

DOS SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; DE SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 545-549, 2005.

DOS SANTOS, M. D.; ALMEIDA, M. C.; LOPES, N. P.; DE SOUZA, G. E. P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VENCIO, R. Z. N.; LOPES, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 784-806, 2014.

ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R.; MONGE, M.; SEMIR, J.; VÊNCIO, R. Z.; LOPES, N. P. A metabolomic protocol for plant systematics by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 859, p. 46-58, 2015.

ESCOBAR, L. K. Passifloraceae. **Flora de Colombia**, 1988.

ESCOBAR, L. K. A new subgenus and five new species in Passiflora (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 877-885, 1989.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. **Embrapa Cerrados-Livros científicos (ALICE)**, 2005.

FARAG, M. A.; OTIFY, A.; PORZEL, A.; MICHEL, C. G.; ELSAYED, A.; WESSJOHANN, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus Passiflora leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 12, p. 3125-3143, 2016.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J.; COLEMAN, C. M.; SLADE, D. 6.18 - Proanthocyanidins: Chemistry and Biology. In: Liu, H.-W. e Mander, L. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier, 2010, p.605-661.

FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (Cydonia oblonga). **Phytochemical Analysis**, v. 14, n. 6, p. 352-359, 2003.

FERRERES, F.; LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 312-321, 2004.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTAO, P.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1-2, p. 214-223, 2007.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of Passiflora. **Passiflora**, v. 13, n. 2, p. 34-35, 2003.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. Passifloraceae. In: (Ed.). **Flowering Plants-Eudicots**: Springer, 2007, p.270-281.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. D. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FRANK, A. M.; BANDEIRA, N.; SHEN, Z.; TANNER, S.; BRIGGS, S. P.; SMITH, R. D.; PEVZNER, P. A. Clustering millions of tandem mass spectra. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 01, p. 113-122, 2007.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 1, p. 56-64, 2000.

GADIOLI, I. L.; DA CUNHA, M. D. S. B.; DE CARVALHO, M. V. O.; COSTA, A. M.; PINELI, L. D. L. D. O. A systematic review on phenolic compounds in Passiflora plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 1-23, 2016.

GARCIA-RUIZ, A.; GIRONES-VILAPLANA, A.; LEON, P.; MORENO, D. A.; STINCO, C. M.; MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; RUALES, J. Banana Passion Fruit (*Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey): Microencapsulation, Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 12, 2017.

GATES, P. J.; SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; CAROLLO, C. A.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, N. P. Mass Spectrometry Ionisation Techniques and Applications for the Analysis of Organic Compounds. In: (Ed.). **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics: Research Signpost**, 2007, p.187-206.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart.(Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.

GOMES, J. A. D.; FELIX-SILVA, J.; FERNANDES, J. M.; AMARAL, J. G.; LOPES, N. P.; DO EGITO, E. S. T.; DA SILVA, A. A.; ZUCOLOTO, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. D. Aqueous Leaf Extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail Decreases Local Effects Induced by Bothropic Venom. **Biomed Research International**, v. 2016, p. 13, 2016.

GOSMANN, G.; PROVENSI, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L.(Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. S1, p. 88-99, 2011.

HARBORNE, Jeffrey, B. **The flavonoids**: Advances in research since 1986, London, UK, Chapman & Hall 1995, 676 p.

HARIBAL, M.; RENWICK, J. A. A. Isovitexin 6 "-O- β -D-glucopyranoside: a feeding deterrent to *Pieris napi oleracea* from *Alliaria petiolata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1237-1240, 1998.

HE, M.; MIN, J.-W.; KONG, W.-L.; HE, X.-H.; LI, J.-X.; PENG, B.-W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, n., p. 74-85, 2016.

HERRERO, P.; DELPINO-RIUS, A.; RAS-MALLORQUÍ, M.; AROLA, L.; CANELA, N. Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation and Methods Used in Chemical Biology. In: (Ed.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology**, 2017, p.17-56.

HOLBIK, M.; KRASTEVA, S.; MAYER, N.; KAHLIG, H.; KRENN, L. Apparently No Sedative Benzoflavone Moiety in *Passiflorae Herba*. **Planta Medica**, v. 76, n. 7, p. 662-664, 2010.

HOSOYA, T.; YUN, Y. S.; KUNUGI, A. Five novel flavonoids from *Wasabia japonica*. **Tetrahedron**, v. 61, n. 29, p. 7037-7044, 2005.

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 10, p. 417-426, 2010.

KESSNER, D.; CHAMBERS, M.; BURKE, R.; AGUS, D.; MALLICK, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534-2536, 2008.

KIILL, L. H. P.; SIQUEIRA, K. M. M. D.; ARAÚJO, F. P. D.; MONTEIRO TRIGO, S. P.; FEITOZA, E. D. A.; LEMOS, I. B. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* MAST.(PASSIFLORACEAE) na região de Petrolina-PE. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 115-127, 2010.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. **The American species of Passifloraceae.**, n. 407, 1938.

KLEIN, N.; GAZOLA, A. C.; DELIMA, T. C. M.; SCHENKEL, E.; NIEBER, K.; BUTTERWECK, V. Assessment of Sedative Effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* Extracts in Mice, Measured by Telemetry. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 706-713, 2014.

KRAJ, A.; DESIDERIO, D. M.; NIBBERING, N. M. **Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications**: John Wiley & Sons, 2008, v.20

KUMAZAWA, T.; MINATOGAWA, T.; MATSUBA, S.; SATO, S.; ONODERA, J. An effective synthesis of isoorientin: the regioselective synthesis of a 6-C-glucosylflavone. **Carbohydrate Research**, v. 329, n. 3, p. 507-513, 2000.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1595-1599, 2008.

LI, H. J.; DEINZER, M. L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 1739-1748, 2007.

LIAW, C. C.; CHEN, P. C.; SHIH, C. J.; TSENG, S. P.; LAI, Y. M.; HSU, C. H.; DORRESTEIN, P. C.; YANG, Y. L. Vitroprocines, new antibiotics against *Acinetobacter baumannii*, discovered from marine *Vibrio* sp QWI-06 using mass-spectrometry-based metabolomics approach. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12856, 2015.

LIMA, C. A. ATIVIDADE REDOX-PROTETORA DA PASSIFLORA CINCINNATA MAST SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO EXERCÍCIO FÍSICO. **Dissertação (Mestrado). Núcleo de Pós-graduação em Medicina**, 2011.

LIU, W. T.; LAMSA, A.; WONG, W. R.; BOUDREAU, P. D.; KERSTEN, R.; PENG, Y.; MOREE, W. J.; DUGGAN, B. M.; MOORE, B. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G.; POGLIANO, K.; DORRESTEIN, P. C. MS/MS-based networking and peptidogenomics guided genome mining revealed the stenothricin gene cluster in *Streptomyces roseosporus*. **Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 99-104, 2014.

LOPES, N. P.; DA SILVA, R. R. **Mass Spectrometry in Chemical Biology: Evolving Applications**: Royal Society of Chemistry, 2017, v.4.

LOPES, R. M.; SEVILHA, A. C.; FALEIRO, F. G.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. D. S. Estudo comparativo do perfil de ácidos graxos em semente de *Passifloras* nativas do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 498-506, 2010.

LUYEN, B. T. T.; TAI, B. H.; THAO, N. P.; CHA, J. Y.; LEE, Y. M.; KIM, Y. H. A New Phenolic Component from *Triticum aestivum* Sprouts and its Effects on LPS-Stimulated Production of Nitric oxide and TNF- α in RAW 264.7 Cells. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 7, p. 1064-1070, 2014.

MAATOOQ, G. T.; ELSHARKAWY, S. H.; AFIFI, M. S.; ROSAZZA, J. P. N. C-p-hydroxybenzoyl glycoflavones from *Citrullus colocynthis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 187-190, 1997.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**: Springer, 1970

MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAO, X. S.; ZHAO, X. M.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 248, n. 1-2, p. 61-85, 2006.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, n. 9, p. 1389-1397, 1978.

MATSUZAKI, K.; WANG, Y.-Q.; TAKAHASHI, K.; OKUYAMA, T. Flavonoid glycosides of *Lespedeza* species. **Japanese Society of Pharmacognosy**, v. 44, n. 3, p. 251-253, 1990.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. D. S. Melhoria genética do maracujá: passado e futuro. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados**, v. 1, n., p. 55-78, 2005.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P. L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791-804, 2013.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.

MONTERO, D. A. V.; MARQUES, M. O. M.; MELETTI, L. M. M.; VAN KAMPEN, M. H.; POLOZZI, S. C. Floral scent of brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace. **Anais da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 88, n. 3, p. 1191-1200, 2016.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **Plos Biology**, v. 9, n. 8, p., 2011.

MUSCHNER, V. C.; ZAMBERLAN, P. M.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1036-U1355, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NISHIYAMA, T.; HAGIWARA, Y.; HAGIWARA, H.; SHIBAMOTO, T. Inhibition of malonaldehyde formation from lipids by an isoflavonoid isolated from young green *Barley* leaves. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 8, p. 811-813, 1993.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. D. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, v. 6, n. 3, p. 194-226, 2006.

NUNES, T. S. L. **A família Passifloraceae no estado da Bahia, Brasil**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2002.

OGA, S.; DEFREITAS, P. C. D.; DASILVA, A. C. G.; HANADA, S. PHARMACOLOGICAL TRIALS OF CRUDE EXTRACT OF PASSIFLORA-ALATA. **Planta Medica**, v. 50, n. 4, p. 303-306, 1984.

OLIVON, F.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; TOUBOUL, D. Optimized experimental workflow for tandem mass spectrometry molecular networking in metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5767-5778, 2017.

PARK, Y.; MOON, Y. H.; YANG, H.; LEE, Y.; LEE, E.; LIM, Y. Complete assignments of NMR data of 13 hydroxymethoxyflavones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 1072-1075, 2007.

PATEL, S. S.; SONI, H.; MISHRA, K.; SINGHAI, A. K. Recent updates on the genus *Passiflora*: a review. **International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2011.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 162-164, 2001.

PILON, A. C.; PAEZ-GARCIA, A.; PAVARINI, D. P.; SCOTTI, M. T. CHAPTER 9 Chemical Biology Databases. In: (Ed.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology: Evolving Applications**: The Royal Society of Chemistry, 2018, p.221-263.

PROLIAC, A.; RAYNAUD, J. 2"-O-Glucosyl-6-C-glucosylapigenin from *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae). **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 63, n. 6, p. 174-175, 1988.

QIN, Y.; GAO, B. Y.; SHI, H. M.; CAO, J.; YIN, C. L.; LU, W. Y.; YU, L. L.; CHENG, Z. H. Characterization of flavonol mono-, di-, tri- and tetra-O-glycosides by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and its application for identification of flavonol glycosides in *Viola tianschanica*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, n., p. 113-124, 2017.

QUINN, R. A.; NOTHIAS, L. F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RABELO, A. S.; OLIVEIRA, I. D.; GUIMARAES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; PRATA, A. P. N.; GELAIN, D. P.; VENCESLAU, E. M.; SANTOS, J. P. A.; QUINTANS, L. J.; BONJARDIM, L. R.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SANTOS, A. D. C.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; ARAUJO, A. A. S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 11-17, 2013.

RAYYAN, S.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, Ø. M. Flavone C-glycosides from leaves of *Oxalis triangularis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10057-10060, 2005.

RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA, L. G. S.; DE MACEDO, D. G.; DE MENEZES, I. R. A.; DA COSTA, J. G. M.; DA SILVA, M. A. P.; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. D. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. D.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1219-1232, 2012.

SARAIVA, M. E.; ULISSES, A.; RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA, L. G. S.; DE MACEDO, D. G.; DE SOUSA, F. D. S.; DE MENEZES, I. R. A.; SAMPAIO, E.; SOUZA, M. M. D. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, n., p. 141-153, 2015.

SCHILCHER, H. Zur Kenntnis der Flavon-C-Glykoside in *Passiflora Incarnata* L. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 23, n. 10, p. 1393-1393, 1968.

SENATORE, F.; D'AGOSTINO, M.; DINI, I. Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2659-2662, 2000.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SIEBRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. R.; MARTINS, A. O.; SIEBRA, D. C.; ALBUQUERQUE, R. S.; LEMOS, I. C. S.; DELMONDES, G. A.; TINTINO, S. R.; FIGUEREDO, F. G.; DA COSTA, J. G. M. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v., n., p., 2016.

SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; GOUVEIA, D. R.; ERNST, M.; TEIXEIRA, S. P.; LOPES, N. P. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora species*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 8, 2014.

SOUZA, R. K. D.; DA SILVA, M. A. P.; DE MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO, D. A.; BEZERRA, L. R.; SOUZA, M. M. D. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, n., p. 99-104, 2014.

STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Isolation and identification of flavonoids. In: (Ed.). **The science of flavonoids**: Springer, 2006, p.47-69.

STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P.; WOJAKOWSKA, A.; MARCZAK, L. Application of LC/MS systems to structural characterization of flavonoid glycoconjugates. **Phytochemistry Letters**, v. 11, n., p. 358-367, 2015.

TABOADA, C.; BRUNETTI, A. E.; PEDRON, F. N.; NETO, F. C.; ESTRIN, D. A.; BARI, S. E.; CEMES, L. B.; LOPES, N. P.; LAGORIO, M. G.; FAIVOVICH, J. Naturally occurring fluorescence in frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 14, p. 3672-3677, 2017.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M.; ULMER, B. **Passiflora**: passionflowers of the world. Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus., 2004.

ULUBELEN, A.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. Flavonoids from *Passiflora palmeri*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 384-385, 1984.

VANDERPLANK, J. *Passion Flowers*. The MIT Press. **Cambridge, Massachusetts**, 2000.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 112-119, 2007.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VIEIRA, P. C.; SANTOS, A. C. A.; SILVA, T. L. CHAPTER 5 Mass Spectrometry for Discovering Natural Products. In: (Ed.). **Mass Spectrometry in Chemical Biology: Evolving Applications**: The Royal Society of Chemistry, 2018, p.144-158.

VISSIENNON, C.; NIEBER, K.; KELBER, O.; BUTTERWECK, V. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin - are they prodrugs? **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 733-740, 2012.

VOIRIN, B.; SPORTOUCH, M.; RAYMOND, O.; JAY, M.; BAYET, C.; DANGLES, O.; EL HAJJI, H. Separation of flavone C-glycosides and qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by capillary zone electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 90-98, 2000.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF FLAVONOID GLYCOSIDES BY MULTI-STAGE MASS SPECTROMETRY. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**: Springer Science & Business Media, 1996

WANG, M. X.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W. T.; CRIISEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERON, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C. C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E.; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELSBK, L.; SOHLENKAMP, C.; PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C. C.; YANG, Y. L.; HUMPF, H. U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA, C. A.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; O'NEILL, E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.;

TRAXLER, M. F.; ENGINE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J. Q.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRIGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P. M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L. F.; ALEXANDROVR, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J. L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PERYEA, T.; NGUYEN, D. T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MULLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W. Y.; LIU, X. T.; ZHANG, L. X.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B. O.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIERREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WILLIAMS, C. A.; GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 4, p. 539-573, 2004.

WOLFENDER, J. L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER, J. L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant Metabolomics: From Holistic Data to Relevant Biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

WONDRACEK, D. C.; FALEIRO, F. G.; SANO, S. M.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. D. S. Carotenoid composition in cerrado passifloras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1222-1228, 2011.

WOSCH, L.; DOS SANTOS, K. C.; IMIG, D. C.; SANTOS, C. A. M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 40-49, 2017.

WURTZEL, E. T.; KUTCHAN, T. M. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1232-1236, 2016.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.

YAZBEK, P. B.; TEZOTO, J.; CASSAS, F.; RODRIGUES, E. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, n., p. 310-331, 2016.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v. 71, n., p. S117-S123, 2000.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L. Y.; TEHRANI, P. M.; ULREICH, J. B.; WATSON, R. R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, n. 7, p. 408-416, 2007.

ZIELINSKA-PISKLAK, M. A.; KALISZEWSKA, D.; STOLARCZYK, M.; KISS, A. K. Activity-guided isolation, identification and quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant *Desmodium adscendens* using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spectrometry and multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, n., p. 54-63, 2015.

ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232-239, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A – Estruturas químicas, espectros de IES-EM e de RMN das substâncias isoladas

Figura 1 – Estrutura química do composto JGA – 11 (isoorientina).

Figura 2 – Espectro de massas em alta resolução do composto JGA – 11 (A) IES- e (B) IES+.

Figura 3 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 11.

Figura 4 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 11, expansão de 3.3 a 4.9 ppm.

Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 11, expansão de 6.3 a 7.5 ppm.

Figura 6 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 11.

Figura 7 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 11.

Figura 8 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 11.

Figura 9 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 11, expansão de 90 a 125 ppm para F1 e 6.3 a 7.7 ppm para F2.

Figura 10 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 11, expansão de 60 a 95 ppm para F1 e 3.2 a 5.0 ppm para F2.

Figura 11 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 11.

Figura 12 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 11, expansão de 90 a 190 para F1 e 6.0 a 7.6 para F2.

Figura 14 – Estrutura química do composto JGA – 14 (isovitexina)

Figura 15 – Espectro de massas em alta resolução do composto JGA – 14 (A) IES- e (B) IES+.

Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14

Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14, expansão de 3.3 a 4.9 ppm.

Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14, expansão de 6.5 a 7.9 ppm.

Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14

Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14, expansão de 60 a 135 ppm.

Figura 21 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14, expansão de 155 a 189 ppm.

Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 14

Figura 23 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 14

Figura 24 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 14, expansão de 90 a 130 ppm para F1 e 6.3 a 7.9 ppm para F2.

Figura 25 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 14, expansão de 50 a 85 ppm para F1 e 3.3 a 5.0 ppm para F2.

Figura 26. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 14.

Figura 27. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 14, expansão de 70 a 190 para F1 e 6.3 a 8.0 para F2.

Figura 28. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 14, expansão de 60 a 170 para F1 e 3.0 a 5.2 para F2.

Figura 29 – Estrutura química do composto JGA – 16 (isoscoparina).

Figura 30 – Espectro de massas em alta resolução do composto JGA – 16 (A) IES- e (B) IES+.

Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 16.

Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 16, expansão de 3.2 a 5.1 ppm.

Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 16, expansão de 6.3 a 7.6 ppm.

Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 16.

Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 16

Figura 36 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 16

Figura 37 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 16, expansão de 90 a 130 ppm para F1 e 6.4 a 7.6 ppm para F2.

Figura 38. – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 16, expansão de 45 a 80 ppm para F1 e 3.2 a 5.1 ppm para F2.

Figura 39. – Experimento de HMBC para o composto JGA – 16 (100 MHz, CD₃OD).

Figura 40. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 16, expansão de 100 a 180 para F1 e 6.4 a 7.5 para F2.

Figura 41. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 16, expansão de 60 a 180 para F1 e 3.4 a 5.0 para F2.

Figura 42 – Estrutura química do composto JGA – 15 (isovitexina-(1'''→2'')-O-β-glucopiranosídeo)

Figura 43 – Espectro de massas em alta resolução do composto JGA – 15 (A) IES- e (B) IES+.

Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15.

Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15, expansão de 3.3 a 5.0 ppm.

Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15, expansão de 6.4 a 7.9 ppm.

Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15.

Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15, expansão de 61 a 96 ppm.

Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15, expansão de 100 a 185 ppm.

Figura 50 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 15

Figura 51 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 15

Figura 52 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 15, expansão de 90 a 130 ppm para F1 e 6.3 a 7.9 ppm para F2.

Figura 53 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 15, expansão de 50 a 105 ppm para F1 e 3.3 a 5.0 ppm para F2.

Figura 54 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 15.

Figura 55. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 15, expansão de 90 a 180 para F1 e 6.2 a 7.9 para F2.

Figura 56. – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 15, expansão de 60 a 170 para F1 e 3.1 a 5.1 para F2.

Figura 57 – Estrutura química do composto JGA – 12 (isovitexina-(1'''→2'')-O-β-xilosídeo)

Figura 58 – Espectro de massas em alta resolução do composto JGA – 12 (A) IES- e (B) IES+.

Figura 59 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12.

Figura 60 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12, expansão de 6.0 a 8.3 ppm.

Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12, expansão de 2.6 a 5.0 ppm.

Figura 62 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12.

Figura 63 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12, expansão de 62 a 108 ppm.

Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12, expansão de 115 a 185 ppm.

Figura 65 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 12

Figura 66 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 12

Figura 67 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 12, expansão de 95 a 135 ppm para F1 e 6.0 a 8.0 ppm para F2.

Figura 68 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 12, expansão de 45 a 105 ppm para F1 e 2.6 a 5.0 ppm para F2.

Figura 69 – Experimento de HMBC para o composto JGA – 12 (100 MHz, CD₃OD).

Figura 70 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 12, expansão de 100 a 180 para F1 e 5.9 a 8.1 para F2.

Figura 71 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 12, expansão de 50 a 160 para F1 e 2.7 a 5.1 para F2.

Figura 72 – Estrutura química do composto JGA – 13 (isoorientina-(1'''→2'')-O-β-xilosídeo)

Figura 73 – Espectro de massas em alta resolução do composto JGA – 13 (A) IES- e (B) IES+.

Figura 74 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13.

Figura 75 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13, expansão de 2.5 a 5.0 ppm.

Figura 76 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13, expansão de 6.0 a 7.8 ppm.

Figura 77 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13.

Figura 78 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13, expansão de 115 a 185 ppm.

Figura 79 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13, expansão de 62 a 108 ppm.

Figura 80 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° (100 MHz, CD_3OD) do composto JGA – 13

Figura 81 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 13

Figura 82 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 13, expansão de 95 a 125 ppm para F1 e 6.1 a 7.7 ppm para F2.

Figura 83 – Experimento de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto JGA – 13, expansão de 60 a 105 ppm para F1 e 2.7 a 5.1 ppm para F2.

Figura 84 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 13

Figura 85 – Experimento de HMBC (100 MHz, CD₃OD) para o composto JGA – 13, expansão de 100 a 180 para F1 e 5.9 a 7.8 para F2.

Apêndice B – Tabelas e figuras com os dados de espectrometria de massas e espectros de UV e massas obtidos para *Passiflora cincinnata*

Tabela 1 – Lista dos sinais cromatográficos dos extratos metanólicos das folhas e caule de *Passiflora cincinnata*, identificação, dados de espectrometria de massas e UV obtidos por CLAE-DAD-IES-EM e CLAE-DAD-IT-IES-EM/EM.

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	F.M.	(IES ⁻) AR-EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	(IES ⁻) EM ³ (m/z)	UV Max nm
1	Ác. 5- <i>O</i> -cafeoilquinico	9.2	[M + Na] ⁺ 377	359.08; 331.06; 314.99; 300.18; 260.09; 215.01 ; 203.00; 196.96; 184.98; 179.01; 163.09	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0853	1.4	[M – H] ⁻ 353	190.94 ; 178.96	–	296; 325
2	Tax-3- <i>O</i> -Hex	17.9	–	–	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	465.1027	2.5	[M – H] ⁻ 465	447.05; 339.00; 302.98; 284.97 ; 150.90	–	287; 334
3	Ap-C-Hex- <i>O</i> -Hex	20.7	[M + H] ⁺ 595	577.16; 559.17; 541.15; 529.13; 499.14; 475.10; 433.12 ; 415.10; 397.10; 379.09; 367.09; 337.09; 313.08; 283.07	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1455	9.6	[M – H] ⁻ 593	503.04; 473.06; 445.02; 431.04 ; 413.05; 383.01; 341.02; 322.97; 310.98; 283.02	–	269; 329
4	Que-di- <i>O</i> -Hex	21.6	–	–	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625.1413	0.4	[M – H] ⁻ 625	463.05 ; 300.96	–	269; 338
5	Me-Lu-C-Hex- <i>O</i> -Hex	24.1	[M + H] ⁺ 625	607.16; 571.13; 559.15; 529.14; 505.13; 463.14 ; 445.13; 427.12; 409.12; 397.10; 367.10; 343.11; 313.08	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1601	2.7	[M – H] ⁻ 623	608.13; 533.07; 503.08; 461.07; 413.08; 382.98; 371.03; 341.02 ; 326.97; 331.00; 298.00	–	252 ^{Sh} ; 269; 346
6	isoorientina	25.4	[M + H] ⁺ 449	431.09; 413.09; 395.08; 383.08 ; 353.08; 329.08; 299.05	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0929	0.8	[M – H] ⁻ 447	429.03; 411.03; 387.03; 371.02; 357.02; 339.03; 327.04 ; 285.02	–	253 ^{Sh} ; 269; 348
7	Lu-8- <i>C</i> -Hex-2''- <i>O</i> -Hex	24.3	[M + H] ⁺ 611	491.12; 449.10 ; 431.10; 413.08; 383.07; 353.07; 329.08; 311.05; 287.04	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1460	0.1	[M – H] ⁻ 609	519.09; *489.05; 449.06; 429.03; 393.01; 357.00; 326.99 ; 308.94	326.99	253 ^{Sh} ; 269; 346

Continua

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	F.M.	(IES ⁻) AR-EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	(IES ⁻) EM ³ (m/z)	UV Max nm
8	Lu-6- <i>C</i> -Hex-2''- <i>O</i> -Hex	27.2	[M + H] ⁺ 611	593.17; 491.12; 449.10 ; 431.10; 395.08; 383.08; 353.07; 329.07; 299.05; 287.05	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1461	0.1	[M – H] ⁻ 609	591.13; 519.08 ; *489.06; 429.03; 356.97; 338.99; 326.98	326.98	254 ^{Sh} ; 269; 342
9	orientina	29.1	[M + H] ⁺ 449	431.09 ; 413.09; 395.07; 383.08; 367.09; 353.08; 329.07; 311.08	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0941	1.8	[M – H] ⁻ 447	393.00; 369.00; 357.01; 327.02 ; 284.98	–	254 ^{Sh} ; 266; 346
10	Lu-6- <i>C</i> -Hex-2''- <i>O</i> -Pen	30.3	[M + H] ⁺ 581	461.09; 449.10 ; 431.11; 413.09; 395.08; 383.08; 367.06; 353.07; 329.07; 311.05; 287.05	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579.1347	1.5	[M – H] ⁻ 579	*459.05; 449.06; 429.02; 393.00; 368.99; 357.00; 326.99 ; 308.98	326.99	255 ^{Sh} ; 267; 347
11	Ap-8- <i>C</i> -Hex-2''- <i>O</i> -Hex	37.3	[M + H] ⁺ 595	475.12; 433.11 ; 415.10; 379.07; 367.08; 337.08; 313.07; 295.06; 283.05; 271.04	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1492	3.3	[M – H] ⁻ 593	*473.08; 413.03 ; 341.00; 322.97; 310.98; 292.97;	311.02	269; 335
12	vitexina	44.4	[M + H] ⁺ 433	415.11 ; 397.07; 379.09; 367.06; 352.19; 337.08; 313.06; 283.06; 271.09	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0989	1.2	[M – H] ⁻ 431	340.99; 311.00 ; 283.05	–	268; 324
13	Ap-6- <i>C</i> -Hex-2''- <i>O</i> -Pen	45.9	[M + H] ⁺ 565	445.10; 433.11 ; 415.11; 397.10; 379.09; 367.09; 337.07; 313.07; 295.06; 271.05	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1398	1.4	[M – H] ⁻ 563	*443.03; 413.03 ; 340.99; 310.98; 292.97	310.98	268; 334
14	isovitexina	49.4	[M + H] ⁺ 433	415.10; 397.10; 379.09; 367.08 ; 337.08; 313.08; 283.06	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0977	1.6	[M – H] ⁻ 431	413.03; 341.01; 311.01 ;	–	269; 336

Continua

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	F.M.	(IES ⁻) AR-EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	(IES ⁻) EM ³ (m/z)	UV Max nm
15	Ap-6- <i>C</i> -Hex-2''- <i>O</i> -Hex	51.6	[M + H] ⁺ 595	577.17; 433.12 ; 415.12; 397.08; 379.09; 367.07; 337.11; 313.09; 283.07	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1505	1.1	[M – H] ⁻ 593	575.07; 503.06 ; 413.04; 395.00; 364.95; 342.90; 323.00; 308.99	–	269; 331
16	Lu- <i>O</i> -Hex-Deo	52.7	[M + H] ⁺ 595	449.10 ; 433.12; 287.04	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1507	0.9	[M – H] ⁻ 593	503.05; 323.05; 284.94	–	269; 333
17	Lu- <i>O</i> -Hex-Pen- <i>O</i> -Deo	53.0	[M + H] ⁺ 727	595.15; 581.16; 449.11; 433.09; 397.10; 299.12; 287.04	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	725.1941	0.8	[M – H] ⁻ 725	707.14; 593.13; 579.13; 459.04; 417.00; 392.87; 326.97; 284.97	–	286; 340
18	3'-Me-Ap-6- <i>C</i> -Hex	54.1	[M + H] ⁺ 463	445.12; 427.10; 397.10 ; 367.10; 343.09; 313.07	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1077	2.6	[M – H] ⁻ 461	443.04; 371.02; 341.03	–	252 ^{Sh} ; 270; 347
19	Que- <i>O</i> -Hex	54.6	[M + H] ⁺ 465	303.06	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0877	1.0	[M – H] ⁻ 463	300.97	–	254; 265 ^{Sh} ; 351
20	Me-Lu- <i>C</i> -Hex-Hex	54.8	[M + H] ⁺ 625	607.15; 492.13; 463.12 ; 445.12; 427.10; 409.10; 397.10; 367.09; 343.09; 313.09; 301.07	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1602	2.4	[M – H] ⁻ 623	605.12; 533.10 ; 443.05; 425.06; 395.02; 353.02; 338.02; 309.00	–	269; 348
21	Ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico	58.7	–	–	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1203	1.6	[M – H] ⁻ 515	*353.04 ; 335.01; 316.90; 298.97; 255.02; 202.87; 190.93; 178.90 172.91	190.93; 178.91; 172.93 ; 134.96	299; 330
22	Ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico	59.9	[M + H – 18] ⁺ 499	337.07; 319.07 ; 163.01; 144.97	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1196	0.2	[M – H] ⁻ 515	*353.02 ; 335.03; 190.95	190.93 ; 178.93; 172.95; 134.98	297; 326

Continua

Conclusão

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	F.M.	(IES ⁻) AR-EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	(IES ⁻) EM ³ (m/z)	UV Max nm
23	Ace-Lu-O-Hex-O-Pen	60.0	[M + H] ⁺ 623	491.12 ; 473.11; 455.10; 377.07; 353.07; 329.07; 311.05; 287.06	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₆	621.1439	3.6	[M - H] ⁻ 621	579.12; 561.10; 471.06; 459.06; 459.06; 431.11; 393.00; 368.98; 357.01; 326.98 ; 309.00		268; 345
24	Ácido 4.5-di-O-cafeoilquínico	62.0	[M + H - 18] ⁺ 499	337.07; 319.08 ; 162.99; 144.99	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1182	2.6	[M - H] ⁻ 515	*353.03 ; 335.02; 317.15; 298.99; 254.96; 226.96; 202.93; 178.96; 172.91	190.93; 178.93; 172.95 ; 134.98	297; 325
25	Ace-Ap-O-Hex-O-Pen	62.3	[M + H] ⁺ 607	475.13 ; 457.12; 439.11; 379.08; 361.09; 337.07; 331.06; 295.07; 271.08	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₅	605.1500	2.0	[M - H] ⁻ 605	545.05; 455.05 ; 443.03; 310.94; 293.01		269; 333

t.r.: tempo de retenção; **Negrito**: pico base; Sh: ombro; F.M.: Fórmula Molecular; *Íon Precursor EM³; #Conforme observado na figura 2, item 4.1.1; Me: metoxi; Ace: acetoxi; Ap: apigenina; Lu: luteolina; Que: quercetina; Tax: taxifolina; Hex: hexose; Deo: deoxihexose; Pen: pentose

Figura 87 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (1): Ác. 5-*O*-cafeoilquínico

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 353; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 377

Figura 88 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (2): Tax-3-*O*-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon *m/z* 465

Figura 89 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (3): Ap-C-Hex-O-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 593; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 595

Figura 90 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (4): Que-di-*O*-Hex

(A) UV (B) Espectro de Massas (IES-) EM^2 do íon m/z 625

Figura 91 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (5): Me-Lu-C-Hex-O-Hex

(A) UV; (B) Espectro de Massas (IES-) EM² do íon m/z 623; (C) Espectro de Massas (IES+) EM² do íon m/z 625

Figura 92 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (6): isoorientina

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 447; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 449

Figura 93 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (7): Lu-8-*C*-Hex-2''-*O*-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 609; (C) Espectro de Massas (IES+) EM² do íon m/z 611; (D) EM³ para m/z 609 $\rightarrow$ 489

Figura 94 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (8): Lu-6-C-Hex-2''-O-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 609; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 611; (D) EM³ para o íon m/z 609 → 489

Figura 95 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (9): orientina

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 447; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 449

Figura 96 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (10): Lu-6-C-Hex-2''-O-Pen

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM^2 do íon m/z 579; (C) Espectro de massas (IES+) EM^2 do íon m/z 581; (D) EM^3 para o íon m/z 579 $\rightarrow$ 459

Figura 97 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (11): Ap-8-C-Hex-2''-O-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 593; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 595; (D) EM³ para o íon m/z 593 $\rightarrow$ 473

Figura 98 – Espectros de massas do sinal cromatográfico (12): vitexina

(A) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 431; (B) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 433

Figura 99 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (13): Ap-6-C-Hex-2''-O-Pen

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM^2 do íon m/z 563; (C) Espectro de massas (IES+) EM^2 do íon m/z 565; (D) EM^3 para o íon m/z 563 $\rightarrow$ 443

Figura 100 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (14): isovitexina

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 431; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 433

Figura 101 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (15): Ap-6-C-Hex-2''-O-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 593; (C) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 595

Figura 102 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (16): Lu-*O*-Hex-Deo

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 593; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 595

Figura 103 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (17): Lu-*O*-Hex-Pen-*O*-Deo

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 725; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 727

Figura 104 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (18): 3'-Me-Ap-6-C-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 461; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 463

Figura 105 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (19): Que-O-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM^2 do íon m/z 463; (C) Espectro de massas (IES+) EM^2 do íon m/z 465

Figura 106 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (20): Me-Lu-C-Hex-Hex

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM^2 do íon m/z 623; (C) Espectro de massas (IES+) EM^2 do íon m/z 625

Figura 107 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (21): Ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 515; (C) EM³ para m/z 515 $\rightarrow$ 353

Figura 108 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (22): Ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon *m/z* 515; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon *m/z* 449; (D) EM³ para o íon *m/z* 515 → 353

Figura 109 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (23): Ace-Lu-O-Hex-O-Pen

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 621; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 623

Figura 110 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (24): Ácido 4.5-di-*O*-cafeoilquínico

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon *m/z* 515; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon *m/z* 449; (D) EM³ para *m/z* 515 → 353

Figura 111 – Espectros de massas e UV do sinal cromatográfico (25): Ace-Ap-*O*-Hex-*O*-Pen

(A) UV; (B) Espectro de massas (IES-) EM² do íon m/z 605; (C) Espectro de massas (IES+) EM² do íon m/z 607

Tabela 2 – Metabólitos identificados das folhas e caules de *Passiflora cincinnata* através da combinação de redes moleculares e espectrometria de massas

Nr	Identificação	Tr. médio	[M + H] ⁺	EM/EM	[M – H] ⁻	EM/EM
26 ^{C;F}	Ap-C-Hex-Hex-O-Hex	17,1	–	–	755,589	593; 575; 503 ; 431; 395; 377; 353; 323; 295; 269; 229
27 ^C	Lu-C-Hex-Deo	27	–	–	593,552	503; 473 ; 429; 423; 393; 369; 357; 327; 309; 297; 285
28 ^C	Aro-O-Hex	33,9	–	–	449,431	403; 343; 323; 287; 269 ; 259; 169; 151
29 ^{C;F}	Ap-C-Hex-Deo	41,8	579,384	433 ; 415; 397; 379; 367; 337; 313; 295; 283; 271	577,606	457; 431; 413 ; 341; 335; 323; 293
30 ^C	Me-Lut-C-Hex-O-Pen	55,2			593,635	547; 503; 473; 443 ; 341; 323
31 ^{C;F}	Lu-O-Glu-Pen	55,3	595,378	475; 463 ; 445; 427; 409; 397; 367; 343; 287	–	–
32 ^{C;F}	Me-Lu-tri-glicosilado	58,0	741,501	595; 463; 301	–	–
33 ^{C;F}	Que-O-Hex-Mal	58,4	551,307	533; 515; 471; 465; 447; 411; 389; 383; 369; 345; 327; 303	–	–
34 ^{C;F}	Ap-tri-glicosilado	58,8	711,477	565; 433; 313; 271	–	–
35 ^{C;F}	Me-Lu-O-Hex-Deo	59,0	609,439	463 ; 301	–	–
36 ^C	Ace-Lu-O-Hex-Hex	59,1	653,389	491 ; 473; 455; 395; 377; 353; 329; 311; 287	–	–
37 ^C	Kae-O-Hex	59,3	449,234	287	–	–
38 ^C	Quercetina derivado	59,3	695,34	533; 465; 447; 345; 303	–	–
39 ^{C;F}	Me-Que-O-Hex	60,4	479,311	317	–	–
40 ^F	Me-Kae-O-Hex	60,9	463,25	301	–	–
41 ^{C;F}	Me-Que-O-Hex-Mal	63,2	565,302	359; 317	–	–

Me: metoxi; Ace: acetoxi; Ap: apigenina; Lu: luteolina; que: quercetina; Kae: kaempferol; Aro: aromadendrina; mal: malonil; Hex: hexose; Deo: deoxihexose; Pen: pentose; Glu: glucoronídeo; X^C: caule; X^F: Folha; **Negrito**: pico base

Apêndice C – Tabela com os dados de espectrometria de massas para *Passiflora* ssp.

Tabela 3 – Metabólitos identificados das folhas de exsicatas de *Passiflora* ssp. através da combinação de redes moleculares – GNPS e espectrometria de massas

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
42	4,4	19	<i>Deidamioides</i>	431,393	300; 299	di-Me-Ap-O-Pen
43	5,9	13	<i>Decaloba</i>	417,312	288; 287	Lu-O-Dideo
44	9,5	30, 35, 57	<i>Passiflora, Astrohea</i>	355,175	163 ; 145; 135; 117	Ác. cafeoilquínico (ISO46)
45	12,3	30, 71, 1, 35, 58	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	339,207	147 ; 119	Ác <i>p</i> -curamoilquínico
46	16,2	15, 31	<i>Passiflora</i>	[M + H -18] ⁺ 337.19	319; 181; 163 ; 145	Ác. cafeoilquínico (ISO44)
47	20,8	38	<i>Passiflora</i>	489,272	471; 457; 453; 443; 343 328; 327	327-O-Hex
48	25,5	43, 12	<i>Passiflora</i>	433,216	272; 271	Ap-O-Hex (ISO53;56)
49	25,8	38, 13, 48	<i>Decaloba, Passiflora</i>	449,224	288; 287	Lu-O-Hex (ISO50;54;55)
50	26,0	27, 43, 21, 16, 25, 7, 12, 38, 13, 48, 17	<i>Decaloba, Passiflora</i>	449,253	288; 287	Lu-O-Hex (ISO49;54;55)
51	26,3	22	<i>Passiflora</i>	519,343	373 ; 311; 283	373-O-Deo
52	27,6	14, 21, 16, 30, 39, 44, 71, 62, 17, 8	<i>Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	465,248	304; 303	Que-O-Hex (ISO200)
53	27,7	43, 21, 7, 12	<i>Decaloba, Passiflora</i>	433,187	272; 271	Ap-O-Hex (ISO48;56)
54	28,9	27, 40, 43, 21, 55, 16, 25, 7, 12, 22, 38, 9, 13, 10, 48, 67, 57, 17, 75, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	449,233	431; 413; 288; 287	Lu-O-Hex (ISO49;50;55)
55	30,0	40, 43, 25, 7, 12, 38, 13, 48, 76, 17, 75	<i>Decaloba, Passiflora</i>	449,257	413; 288; 287	Lu-O-Hex (ISO49;50;54)
56	32,1	43, 7, 12, 42, 59, 29	<i>Decaloba, Passiflora</i>	433,398	415; 397; 367; 337; 313; 272; 271	Ap-O-Hex (ISO48;53)
57	33,1	30, 39, 53, 3	<i>Passiflora, Astrohea</i>	449,268	304; 303	Que-O-Deo
58	34,1	22, 38	<i>Passiflora</i>	575,358	429 ; 413; 411; 385; 349 341; 331; 321; 311	267-O-Hex-O-Deo
59	34,8	4, 30, 72, 71, 76, 3	<i>Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	435,221	304; 305	Tax-O-Dideo
60	37,1	61, 43, 49	<i>Decaloba, Passiflora</i>	433,293	415; 288; 287	Lu-O-Deo
61	39,4	43, 12	<i>Passiflora</i>	417,301	256; 255	Cri-O-Hex
62	41,1	14	<i>Passiflora</i>	491,251	288; 287	Lu-O-Hex-Ace

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
63	42,9	22	<i>Passiflora</i>	529,309	384; 383 ; 367; 355; 313; 309; 245; 227; 221	383-O-Deo
64	12,6	49, 30, 9, 64, 3	<i>Decaloba, Passiflora,</i> <i>Astrohea</i>	627,382	609, 507, 465 , 447, 429, 411, 399, 369, 345, 327, 315, 303	303-C-Hex-O-Hex
65	15,4	12, 38, 72	<i>Passiflora</i>	741,523	595 , 577, 559, 541, 529, 499, 475, 445, 433, 415, 397, 379, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-O-Deo-di-C-Hex
66	18,2	40, 25, 38	<i>Passiflora</i>	757,58	611 , 593, 575, 559, 557, 545, 515, 491, 461, 449, 431, 413, 395, 383, 353, 339, 329, 299	Lu-O-Deo-di-C-Hex
67	19,4	14, 16, 15, 2, 42, 41, 37, 48, 57, 66	<i>Decaloba, Passiflora,</i> <i>Astrohea</i>	609,406	489, 447 , 429, 411, 393, 381, 351, 327, 297, 285, 267	Me-Ap-C-Hex-O-Hex
68	20,7	14, 15, 59, 64, 17, 54	<i>Passiflora</i>	757,61	595 , 577, 559, 541, 529, 499, 475, 457, 433, 415, 397, 379, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-O-Hex-C-Hex-Hex
69	22,6	4, 38, 72, 31	<i>Passiflora</i>	771,859	753, 735, 625, 607 , 589, 571, 559, 529, 505, 489, 463, 445, 427, 409, 397, 367, 343, 325, 313	Me-Lu-O-deo-di-C-Hex
70	22,7	43	<i>Passiflora</i>	637,238	491 , 473, 455, 437, 425, 395, 371, 353, 341, 329, 319, 299	Ace-Lu-C-Hex-O-Deo
71	23,3	14, 68, 4, 44, 15, 51, 2, 67, 50, 3	<i>Decaloba, Passiflora,</i> <i>Deidamioides</i>	607,378	589, 571, 553, 517, 487, 445, 427, 409, 391, 379, 349, 325 , 295, 283	Cri-C-Hex-O-Hex
72	24,4	27, 44, 15, 51, 42, 41, 59, 19, 60, 28, 33, 34	<i>Decaloba, Passiflora,</i> <i>Deidamioides</i>	595,367	433 , 415, 397, 379, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-O-Hex-C-Hex
73	25,8	49, 63, 11, 45, 12, 9, 72, 31, 62, 24, 17	<i>Decaloba, Passiflora</i>	741,526	595, 579, 561, 529, 499, 475, 457, 433 , 415, 397, 379, 367, 337, 313, 295, 283, 271	Ap-O-Hex-C-Hex-Deo

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
74	27,2	2, 6	<i>Decaloba, Passiflora</i>	667,444	547, 463 , 445, 427, 409, 397, 367, 343, 325, 313, 301	Me-Lu-C-Hex-O-Hex-Ace
75	27,5	37, 6, 57	<i>Passiflora, Astrohea</i>	579,378	447 , 429, 411, 393, 381, 363, 351, 327, 297, 285	Ap-C-Hex-O-Pen
76	28,8	14, 53, 26, 23, 28, 17	<i>Passiflora</i>	577,33	445, 427 , 409, 391, 379, 349, 325, 321, 295, 283	283-C-Hex-O-Pen
77	28,8	44	<i>Passiflora</i>	701,423	683, 581, 539 , 521, 503, 485, 473, 455, 443, 419, 405, 389, 377, 335, 331, 285, 273	377-C-Hex-O-Hex
78	29,3	70, 43, 11, 12, 44, 10, 23, 24, 65	<i>Decaloba, Passiflora</i>	579,383	417 , 399, 381, 351, 345, 321, 297, 255	Cri-C-Hex-O-Hex
79	30,0	44, 2	<i>Decaloba, Passiflora</i>	705,438	687, 585, 573, 543 , 525, 507, 489, 477, 447, 423, 405, 393, 381, 343, 307, 295, 285, 283, 271	381-C-Hex-O-Hex
80	30,3	42	<i>Decaloba</i>	755,552	635, 617, 609, 593, 575, 489, 473, 463, 447, 429, 411, 393, 381, 351, 327 , 323, 297, 285, 267	Me-Ap-C-Hex-Hex-O-Deo
81	32,0	5, 21, 22, 2, 42, 37	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	593,402	447 , 429, 411, 393, 381, 351, 327, 297, 285	Me-Ap-C-hex-O-Deo
82	32,0	70, 2, 6, 50, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	653,39	533, 491, 473, 455, 449 , 431, 413, 395, 383, 371, 353, 329, 311, 299, 287	Lu-O-Hex-C-Hex-Ace
83	32,2	11, 12, 62, 23, 24	<i>Passiflora</i>	725,499	579, 561, 545, 525, 513, 483, 459, 441, 425, 417 , 399, 381, 363, 351, 321, 297, 293, 279, 267, 255, 251	Cri-O-Hex-C-Hex-Deo
84	33,3	43, 12, 17	<i>Passiflora</i>	621,338	475 , 457, 439, 421, 409, 379, 355, 337, 325, 313	Ace-Ap-C-Hex-O-Deo
85	33,8	14, 70, 11, 15, 2, 59, 52, 26, 6, 28, 54, 3	<i>Decaloba, Passiflora</i>	637,39	517, 475, 457, 439, 433 , 415, 397, 379, 367, 337, 313, 295, 283, 271	Ap-O-Hex-C-Hex-Ace

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
86	35,3	21, 22, 31, 37	<i>Passiflora, Astrohea</i>	623,43	477, 459, 441, 423, 387, 381, 357, 327, 315	di-Me-Lu-C-hex-O-Deo
87	35,5	2, 48, 6	<i>Decaloba, Passiflora</i>	651,427	531, 447, 429, 411, 393, 381, 351, 327, 323, 311, 297, 285	Me-Ap-C-Hex-O-Hex-Ace
88	35,7	14, 49, 44, 15, 2, 59	<i>Decaloba, Passiflora</i>	653,384	491, 473, 455, 437, 425, 395, 371, 353, 341, 329, 323, 307, 295, 283	329-C-Hex-O-Hex
89	11,3	5, 74, 42, 41, 57	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	625,403	607, 589, 571, 559, 529, 505, 475, 463, 445, 427, 409, 397, 367, 343, 313, 299	Me-Lu-di-C-Hex (ISO90;186)
90	11,5	5, 42, 41	<i>Decaloba, Passiflora</i>	625,407	589, 571, 559, 529, 505, 475, 367, 343, 313	Me-Lu-di-C-Hex (ISO89;186)
91	11,7	5, 41	<i>Decaloba, Passiflora</i>	479,302	461, 443, 425, 413, 383, 359, 329, 317	di-Me-Eri-C-Hex
92	12,8	27, 28, 24	<i>Passiflora</i>	727,573	709, 691, 661, 643, 631, 619, 607, 577, 571, 559, 547, 511, 493, 481, 445, 427, 409, 397, 379, 355, 337, 315	Ap-C-Hex-C-Pen-O-Hex
93	19,7	5, 70, 74, 27, 18, 47, 55, 11, 30, 51, 9, 32, 71, 1, 37, 48, 64, 52, 26, 56, 35, 20, 23, 60, 28, 24, 57, 58, 65, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	565,374	547, 529, 511, 499, 427, 409, 379, 355, 325, 313, 307, 295	Lu-C-Deo-C-Pen (ISO94;121;125)
94	19,8	74, 27, 47, 11, 22, 51, 2, 9, 32, 71, 37, 48, 64, 52, 56, 35, 20, 23, 24, 57, 58, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	565,348	547, 529, 511, 499, 481, 445, 427, 409, 403, 379, 337, 325, 307, 283	Lu-C-Deo-C-Pen (ISO93;121;125)
95	20,0	61, 27, 43, 49, 55, 68, 4, 12, 59, 26, 56, 35, 23, 60, 24, 65	<i>Decaloba, Passiflora</i>	461,306	443, 425, 407, 395, 365, 341, 311, 299, 281	299-C-Hex
96	22,0	5, 14, 70, 74, 27, 40, 46, 21, 18, 47, 49, 55, 11, 16, 45, 25, 22, 30, 51, 9, 31, 32, 71, 41, 1, 59, 13, 37, 48, 64, 52, 26, 19, 56, 35, 20, 23, 60, 28, 50, 24, 57, 33, 17, 58, 8, 65, 29, 54	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	565,357	547, 529, 511, 499, 481, 469, 457, 445, 427, 415, 409, 397, 379, 367, 337, 325, 313, 307, 283	Ap-C-Hex-C-Pen

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
97	22,3	5, 14, 61, 70, 74, 27, 40, 43, 21, 18, 49, 55, 68, 4, 11, 16, 25, 7, 12, 22, 38, 39, 44, 69, 15, 51, 9, 42, 72, 31, 32, 71, 41, 62, 73, 59, 53, 13, 37, 10, 64, 52, 76, 26, 6, 56, 35, 20, 23, 60, 67, 28, 24, 33, 34, 17, 58, 75, 8, 65, 29, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	449,267	431, 413, 395, 383 , 354, 329, 299, 287	Lu-C-Hex
98	22,8	11, 31, 56, 20, 50	<i>Passiflora, Deidamioides</i>	565,545	547 , 529, 499, 481, 469, 457, 445, 415, 403, 379, 372, 345	Ap-C-Hex-Pen
99	24,1	61, 43, 49, 4, 12, 51, 2, 9, 59, 60, 28, 50, 24, 8, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	445,306	427 , 409, 391, 379, 349, 325, 295	283-C-Hex
100	25,4	5, 74, 21, 49, 2, 42, 41, 37, 48, 6, 50, 57, 58, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	447,302	429 , 411, 393, 381, 351, 327, 297, 285	Me-Ap-C-Hex (ISO205)
101	25,8	5, 14, 61, 70, 74, 27, 43, 21, 18, 49, 55, 4, 16, 22, 44, 15, 51, 42, 72, 41, 59, 13, 37, 48, 52, 26, 56, 35, 20, 60, 28, 50, 57, 33, 34, 17, 58, 29, 54, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	463,29	445, 427, 409, 397 , 367, 343, 314, 301	Me-Lu-C-Hex (ISO206)
102	26,8	40, 21, 47, 11, 22, 39, 13, 37, 24, 57, 58, 75	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	535,336	517, 499 , 481, 469, 427, 415, 409, 397, 337, 325, 307, 295	Ap-di-C-Pen
103	27,2	40, 11, 39, 58	<i>Passiflora, Astrohea</i>	551,336	533, 515 , 497, 485, 443, 431, 425, 413, 341	Lu-di-C-Pen (ISO109)
104	27,6	5, 12, 37, 10, 23, 58	<i>Passiflora, Astrohea</i>	417,327	399, 381 , 351, 327, 321, 297, 279, 267	Cri-C-Hex (ISO107;110)
105	27,8	5, 61, 70, 74, 27, 40, 43, 21, 18, 47, 49, 55, 68, 4, 11, 16, 25, 7, 12, 22, 30, 44, 15, 51, 2, 9, 42, 72, 32, 71, 73, 59, 13, 37, 10, 64, 52, 76, 26, 19, 6, 56, 35, 20, 23, 60, 67, 28, 50, 24, 57, 17, 58, 75, 8, 65, 29, 54, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	433,278	415 , 397, 379, 367, 337, 314, 295, 283, 271	Ap-C-Hex
106	28,9	5, 74, 2, 41, 37, 57, 58, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	477,29	459 , 441, 423, 411, 381, 357, 327	di-Me-Lu-C-Hex (ISO108)
107	29,0	43, 12, 44, 10, 23, 58	<i>Passiflora, Astrohea</i>	417,268	399 , 381, 363, 351, 321, 297, 278, 267, 255	Cri-C-Hex (ISO110;104)

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
108	29,6	5, 74, 41, 37, 57, 58, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	477,333	459 , 441, 423, 411, 381, 357, 327, 315, 301	di-Me-Lu-C-Hex (ISO106)
109	29,7	40, 11	<i>Passiflora</i>	551,321	533, 515 , 497, 485, 443, 431, 425, 413, 341, 323	Lu-di-C-Pen (ISO103)
110	30,1	43, 12, 10, 23	<i>Passiflora</i>	417,279	399, 381, 363, 351 , 321, 297, 279, 267, 255	Cri-C-Hex (ISO107;104)
111	30,1	11, 24	<i>Passiflora</i>	549,356	531, 513, 495, 483, 465, 411 , 393, 363, 309, 291, 279	Me-Ap-di-C-Pen
112	30,5	47, 24, 58	<i>Passiflora, Astrohea</i>	549,347	531, 513 , 495, 483, 427, 411, 409, 376, 355, 331, 325, 308, 267	Ap-C-Deo-C-Pen (ISO127)
113	30,7	29, 54	<i>Passiflora</i>	577,338	559, 541, 523, 511 , 481, 457, 439, 427, 409, 379, 367, 337, 325, 307, 295	283-C-Hex-C-Pen
114	31,3	60, 8	<i>Passiflora</i>	543,327	525 , 507, 489, 477, 459, 447, 423, 405, 393, 379, 337, 313, 295	235-C-Hex-C-Deo
115	31,7	5, 8	<i>Passiflora</i>	567,333	549 , 531, 513, 501, 471, 447, 417, 405, 339, 323, 315, 311, 275, 247, 241, 239	Nar-C-Hex-C-Pen
116	31,7	5, 74	<i>Decaloba, Passiflora</i>	655,409	637, 619, 601, 589 , 559, 535, 505, 493, 461, 433, 391, 367, 337, 325	Ace-Eri-di-C-Hex
117	32,7	5, 61, 27, 13, 26	<i>Decaloba, Passiflora</i>	641,273	623 , 605, 587, 575, 545, 521, 491, 479, 445, 427, 409, 379, 367, 353, 335, 317, 295, 259	di-Me-Eri-di-C-hex
118	33,1	61, 27, 40, 11, 25, 10, 76, 23, 75	<i>Passiflora</i>	419,252	401, 383 , 353, 329, 300, 287	Lu-C-Pen (ISO119)
119	33,3	27, 11, 25, 23	<i>Passiflora</i>	419,286	401, 383 , 353, 329, 299, 287	Lu-C-Pen (ISO118)
120	33,5	55, 15, 32, 56, 23, 29	<i>Passiflora</i>	507,21	489 , 471, 453, 441, 411, 387, 369, 357, 345, 327, 309, 277, 243	345-C-Hex

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
121	33,6	23, 24	<i>Passiflora</i>	565,359	547, 529 , 511, 485, 461, 457, 443, 439, 397, 365, 353, 341, 329, 323, 281	Lu-C-Deo-C-Pen (ISO93;94;125)
122	34,4	5	<i>Passiflora</i>	581,383	563, 545, 527, 515 , 485, 461, 431, 419, 401, 384, 355, 273, 159	Nar-C-Hex-C-Deo
123	35,6	5, 70, 27, 43, 49, 15, 51, 2, 59, 52, 56, 60, 50, 24, 58, 8, 29	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	491,265	473 , 455, 437, 425, 395, 371, 353, 341, 329, 311	Ace-Lu-C-Hex
124	35,8	40, 21, 22, 39, 69, 10, 76, 23, 24, 75	<i>Passiflora</i>	433,265	415, 397 , 353, 329, 299, 287	Lu-C-Deo (ISO128)
125	36,2	23, 24	<i>Passiflora</i>	565,396	547, 529 , 511, 499, 443, 427, 425, 401, 383, 341, 339, 323, 299, 277, 269	Lu-C-Deo-C-Pen (ISO93;94;121)
126	37,7	61, 27, 47, 23	<i>Passiflora</i>	403,304	385, 367 , 337, 313, 283, 271	Ap-C-Pen
127	37,9	23, 24	<i>Passiflora</i>	549,248	531, 513 , 495, 469, 445, 441, 427, 423, 397, 387, 357, 329, 325, 313	Ap-C-Deo-C-Pen (ISO112)
128	38,3	61	<i>Passiflora</i>	433,295	415, 397 , 367, 343, 313, 301, 287	Lu-C-Deo (ISO124)
129	40,8	61, 74, 27, 44, 26, 58	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	671,439	653, 635, 617, 605 , 575, 551, 533, 521, 509, 473, 457, 433, 415, 391, 387, 383, 365, 339, 285	347-di-C-Hex
130	41,4	21, 22, 38	<i>Passiflora</i>	447,315	429, 411 , 367, 343, 313, 301	Me-Lu-C-Deo
131	41,5	74	<i>Decaloba</i>	685,427	667, 649, 631, 619 , 589, 565, 547, 535, 523, 505, 491, 461, 433, 415, 367, 356, 341, 337, 325, 313, 299, 275, 263, 203	361-di-C-Hex
132	41,6	49, 15, 60, 8	<i>Decaloba, Passiflora</i>	569,386	551 , 533, 503, 473, 449, 419, 391, 379, 349, 325, 305, 295, 449, 287	Ap-C-Hex-136
133	19,3	27, 21, 18, 55, 7, 51, 42, 71, 41, 1, 62, 48, 76, 57, 17	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	595,37		Kae-O-Hex-Deo (ISO134;139;145)
134	24,3	21, 7, 42, 71, 41, 76	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	595,381	287	Kae-O-Hex-Deo (ISO133;139;145)

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
135	24,5	30, 1	<i>Decaloba, Astrohea</i>	757,478	611, 595, 577, 557, 541, 491, 489, 465, 449, 447, 419, 413, 369, 345, 315, 309, 303	Que- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Deo- <i>O</i> -Deo (ISO136)
136	24,9	30, 1	<i>Decaloba, Astrohea</i>	757,462	611, 595, 491, 465, 455, 449, 431, 413, 369, 345, 309, 303	Que- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Deo- <i>O</i> -Deo (ISO135)
137	24,9	65, 66	<i>Decaloba</i>	743,45	611, 597, 581, 579, 561, 557, 489, 465, 449, 447, 435, 429, 399, 369, 345, 315, 303	Que- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Deo- <i>O</i> -Pen
138	24,9	30, 71, 53, 65, 66	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	597,337	465, 447, 429, 411, 399, 369, 345, 327, 315, 303	Que- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Pen
139	26,3	74, 55, 1, 48, 76, 6, 56, 8	<i>Decaloba, Passiflora</i>	595,349	449, 287	Kae- <i>O</i> -Hex-Deo (ISO133;134;145)
140	28,1	4, 3	<i>Passiflora</i>	701,402	539, 449, 287	Kae- <i>O</i> -Hex-252
141	28,3	21, 55, 7, 44, 51, 41, 56, 57, 58, 54	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	609,394	463, 301	Me-Kae- <i>O</i> -Hex-Deo
142	28,7	14, 61, 74, 68, 16, 44, 9, 72, 59, 53, 26, 56, 67, 28, 17, 8, 3	<i>Decaloba, Passiflora</i>	581,348	449, 431, 419, 413, 395, 383, 353, 329, 311, 299, 287	Me-Kae- <i>O</i> -Hex-Pen (ISO150)
143	29,7	17, 3	<i>Passiflora</i>	743,524	611, 581, 449, 431, 419, 329, 287	Kae- <i>O</i> -Pen- <i>O</i> -Hex-Hex
144	30,3	14, 18, 55, 15, 51, 42, 41, 48, 23, 24, 54	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	579,335	433, 271	Ap- <i>O</i> -Hex-Deo (ISO149)
145	31,0	14, 61, 74, 21, 18, 68, 16, 25, 7, 22, 30, 44, 51, 9, 42, 71, 41, 1, 62, 53, 10, 48, 76, 6, 56, 23, 67, 24, 57, 17, 8, 54	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	595,361	449, 433, 287	Kae- <i>O</i> -Hex-Deo (ISO133;134;139)
146	31,5	30, 1	<i>Decaloba, Astrohea</i>	741,443	595, 579, 473, 455, 449, 433, 415, 397, 353, 329, 293, 287	Kae- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Deo-Deo (ISO147)
147	31,7	1	<i>Decaloba</i>	741,489	579, 577, 541, 497, 489, 481, 449, 433, 415, 397, 395, 383, 353, 335, 329, 293, 287	Kae- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Deo-Deo (ISO146)

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
148	31,9	14, 61, 16, 44, 9, 59, 26, 60, 33, 8, 29	<i>Passiflora</i>	565,414	433, 271	Ap- <i>O</i> -Hex-Pen
149	32,3	14, 21, 18, 55, 15, 51, 42, 41, 10, 48, 23, 24, 54	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	579,379	433, 271	Ap- <i>O</i> -Hex-Deo (ISO144)
150	34,2	74, 16, 9, 72, 1, 67, 8	<i>Decaloba, Passiflora</i>	581,392	449, 287	Me-kae- <i>O</i> -Hex-Pen (ISO142)
151	35,2	1, 17	<i>Decaloba, Passiflora</i>	727,465	595, 581, 577, 565, 559, 461, 449, 441, 433, 431, 395, 383, 353, 329, 299, 287	Kae- <i>O</i> -Hex- <i>O</i> -Deo- <i>O</i> -Pen
152	35,4	27	<i>Passiflora</i>	595,349	433, 271	Lu- <i>O</i> -Hex-Hex
153	36,2	39, 65	<i>Decaloba, Passiflora</i>	611,331	479, 461, 443, 425, 413, 383, 359, 345, 317	Me-Que- <i>O</i> -Hex-Pen
154	37,0	70, 71, 57, 17	<i>Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	625,363	479, 317	Me-Que- <i>O</i> -Hex-Deo
155	31,2	21, 55, 7, 44, 69, 37	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	289,177	271, 253, 247, 179, 171, 163 , 153, 145	Eri
156	31,3	70, 27, 21, 16, 7, 42, 37, 64, 26, 28, 17	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	273,18	255, 245, 231, 189, 179, 163, 153, 147 , 127, 123	Nar
157	34,3	28	<i>Passiflora</i>	305,192	287 , 269, 263, 203, 179, 161, 153, 133, 111, 105	Tax
158	41,8	27, 28	<i>Passiflora</i>	319,201	301 , 283, 217, 193, 183, 179, 153, 133, 111	Me-Tax
159	44,6	28	<i>Passiflora</i>	333,257	315 , 291, 283, 217, 193, 167, 161, 141, 133, 125	di-Me-Tax
160	6,2	71, 13, 20, 75	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	591,323	573, 555, 465, 451, 447, 439 , 421, 411, 303, 301, 291, 289, 287, 283	di-Me-(E)-Cat-(E)-Afz
161	8,9	20	<i>Deidamioides</i>	575,387	557, 539, 439, 423 , 405, 299, 287, 285, 267, 243, 197, 179, 169, 163	di-Me-(E)-Afz-(E)-Afz
162	13,2	70, 21, 16, 39, 51, 71, 13, 37, 76, 50, 17, 75	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	579,347	561, 543, 453, 439, 435, 427 , 421, 411, 301, 291, 289, 287, 273, 247, 229	(E)-Cat-(E)-Cat
163	14,3	20	<i>Deidamioides</i>	559,422	541, 523, 435, 423 , 405, 379, 299, 285, 275, 267, 243, 179	Me-(E)-Afz-(E)-Afz A

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
164	17,4	21, 71, 76, 17, 75	<i>Passiflora, Deidamioides</i>	867,256	740, 714, 696, 678, 577 , 558, 534, 434, 426, 409, 410, 301, 289, 272, 261	(E)-Cat-(E)-Cat-(E)-Cat
165	18,7	18, 16, 51, 71, 20, 50	<i>Passiflora, Deidamioides</i>	563,364	545, 527, 437, 427, 411, 393, 291 , 285, 273, 231, 213, 179, 165	(E)-Afz-(E)-Cat
166	24,7	20	<i>Deidamioides</i>	547,393	529, 511, 423, 411, 393 , 379, 287, 285, 275, 273, 243, 231, 213, 199, 179, 163, 151	(E)-Afz-(E)-Afz
167	29,0	70, 18, 16, 51, 71, 76, 50, 17	<i>Passiflora, Deidamioides</i>	577,256	559, 541, 451, 437, 425 , 409, 299, 287, 271, 247	(E)-Cat-(E)-Cat A
168	39,5	20	<i>Deidamioides</i>	573,349	555, 537, 509, 505, 495, 449, 419 , 381, 375, 361, 313, 299, 269, 257, 245, 211, 193, 175, 165	di-Me-(E)-afz-(E)-afz A
169	41,3	20	<i>Deidamioides</i>	545,345	527, 509, 499, 477, 421, 419, 409 , 393, 297, 287, 271, 255, 231, 213	(E)-Afz-(E)-Afz A
170	42,3	20	<i>Deidamioides</i>	561,386	543, 525, 497, 487, 437, 425 , 407, 381, 363, 301, 287, 275, 245, 217, 189, 181, 163, 151	Me-(E)-afz-(E)-afz
171	30,1	40, 25, 22, 38, 69, 76, 75	<i>Passiflora</i>	593,437	575, 557, 531, 519, 491, 489, 463, 447, 431, 413 , 395, 369, 357, 329, 327, 313, 301	Me-Lu-C-Dideo-Hex
172	33,8	40, 25, 38, 39, 69, 10, 76, 75	<i>Passiflora</i>	579,282	561, 543, 517, 505, 499, 475, 449, 433, 417, 399 , 381, 355, 343, 313, 299, 287	Lu-C-Dideo-Hex
173	39,0	40, 43, 25, 12, 39, 69, 76, 24	<i>Passiflora</i>	563,385	545, 527, 501, 489, 459, 433, 417, 399 , 381, 355, 343, 313, 287	Lu-C-Dideo-Deo (ISO174)

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
174	40,2	38	<i>Passiflora</i>	563,414	545, 527, 501, 489, 431, 417, 413 , 395, 369, 357, 313, 301, 287	Lu-C-Dideo-Deo (ISO173)
175	41,5	40, 25, 39, 69	<i>Passiflora</i>	547,402	529 , 511, 485, 473, 417, 401, 383, 365, 339, 327, 299, 271	Ap-C-Dideo-Deo
176	24,1	5, 61, 22	<i>Passiflora</i>	565,325	403 , 385, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-C-Pen-O-Hex(ISO177)
177	25,7	47, 11, 22, 76	<i>Passiflora</i>	565,376	403 , 385, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-C-Pen-O-Hex(ISO176)
178	27,5	12, 44, 17	<i>Passiflora</i>	549,335	417 , 399, 381, 351, 321, 297, 267, 255	Cri-C-Hex-O-Pen
179	32,3	43, 46, 11, 45, 12, 44, 10, 23, 24	<i>Passiflora</i>	563,387	417 , 399, 351, 321, 298, 267, 255	Cri-C-Hex-O-Deo
180	32,6	61, 47	<i>Passiflora</i>	535,374	403 , 385, 367, 337, 313, 283	Ap-C-Pen-O-Pen(ISO182)
181	34,4	11, 12, 10, 23, 24	<i>Passiflora</i>	563,379	545, 527, 417, 401 , 383, 365, 321, 297, 267, 255	Cri-C-Deo-O-Hex
182	35,7	61, 47	<i>Passiflora</i>	535,395	403 , 385, 367, 337, 313, 283	Ap-C-Pen-O-Pen(ISO180)
183	39,7	11	<i>Passiflora</i>	549,34	531, 513, 483, 459, 403, 387 , 369, 351, 321, 297, 267, 255	Cri-C-Pen-O-Hex
184	13,0	5, 27, 55, 28, 24	<i>Passiflora</i>	773,601	755, 737, 719, 707, 701, 689, 659, 653, 635 , 611, 593, 587, 557, 545, 533, 527, 497, 473, 437, 427, 417, 395, 371, 341, 323, 303	303-triglicosilado (Hex; Hex; Deo)
185	13,1	5, 74, 27, 40, 47, 55, 11, 16, 7, 12, 30, 2, 9, 42, 32, 71, 41, 53, 13, 37, 10, 52, 26, 56, 35, 23, 60, 28, 24, 57, 17, 58, 8, 65, 29, 54, 3	<i>Decaloba</i> , <i>Passiflora</i> , <i>Deidamioides</i> , <i>Astrohea</i>	611,364	593, 575, 557, 545, 539, 527, 497, 473 , 443, 437, 431, 425, 395, 371, 353, 341, 329, 323, 299, 287	Lu-di-C-Hex
186	16,1	55, 16, 22, 13, 57, 17, 58, 29	<i>Decaloba</i> , <i>Passiflora</i> , <i>Astrohea</i>	625,392	607, 589, 571, 559, 553, 541, 511, 487 , 457, 451, 439, 409, 385, 367, 355, 343, 337, 325, 301	Me-Lu-di-C-Hex (ISO89;90)

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
187	16,6	5, 70, 74, 27, 21, 18, 47, 49, 55, 11, 16, 45, 25, 7, 12, 22, 30, 44, 51, 2, 9, 42, 72, 31, 32, 71, 41, 1, 59, 53, 13, 37, 10, 48, 64, 52, 76, 26, 19, 6, 56, 35, 20, 23, 60, 67, 28, 50, 24, 57, 17, 58, 75, 8, 65, 66, 29, 54, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	595,385	577, 559, 541, 529, 523, 511, 481, 457 , 427, 421, 409, 379, 355, 337, 325, 313, 307, 283, 271	Ap-di-C-Hex
188	28,4	27, 18, 55, 9, 59, 56, 23, 60, 24, 65	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides</i>	579,406	561, 543, 525, 513, 495, 465, 457, 441 , 411, 393, 363, 339, 325, 321, 309, 291, 267	Ap-C-Hex-C-Deo
189	19,6	5, 14, 61, 74, 27, 40, 18, 47, 55, 68, 11, 16, 7, 39, 44, 2, 9, 32, 73, 59, 53, 13, 37, 48, 64, 52, 26, 19, 6, 56, 35, 23, 60, 67, 28, 24, 57, 17, 58, 29, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	581,349	563, 545, 527, 515, 497, 473, 449 , 443, 431, 413, 383, 353, 341, 329, 299, 287	Lu-C-Hex-C-Pen (ISO207)
190	29,9	56, 23, 24	<i>Passiflora</i>	595,384	577, 559, 541, 529, 511, 499, 475, 473, 449 , 427, 397, 367, 353, 341, 329, 287	Lu-C-Deo-C-Hex (ISO208;210)
191	28,9	5, 14, 61, 27, 40, 43, 46, 21, 47, 63, 11, 16, 45, 25, 12, 22, 38, 44, 15, 2, 9, 72, 31, 62, 73, 59, 53, 13, 52, 76, 26, 23, 60, 28, 24, 33, 34, 17, 75, 8	<i>Decaloba, Passiflora</i>	579,364	561, 543, 525, 513, 483, 459, 457, 441, 415 , 397, 361, 349, 309, 295, 271, 267	Ap-C-Hex-Deo
192	37,0	11, 10	<i>Passiflora</i>	595,377	577, 559, 415 , 397, 379, 353, 351, 337, 323, 295, 283, 271	Ap-C-Hex-Hex
193	43,4	11	<i>Passiflora</i>	603,383	567, 541, 399, 381 , 363, 337, 319, 291, 267, 255	Derivado da Cri
194	24,3	46, 63, 45, 31, 62	<i>Passiflora</i>	741,511	595, 577, 449 , 431, 413, 395, 383, 353, 329, 299, 287	Lu-C-Hex-O-Deo-Deo
195	28,9	63, 45, 31, 62, 64, 65	<i>Decaloba, Passiflora</i>	725,513	579, 561, 433 , 415, 397, 379, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-C-Hex-O-Deo-Deo
196	31,3	46, 63, 45, 12, 44, 31, 62, 64	<i>Passiflora</i>	709,48	563, 545, 417 , 399, 381, 363, 351, 321, 297, 267, 255	Cri-C-Hex-O-Deo-Deo
197	33,5	63, 38, 31, 62, 57, 58	<i>Passiflora, Astrohea</i>	755,549	609 , 591, 463, 445, 427, 409, 397, 367, 343, 313, 301, 286	Me-Lu-C-Hex-O-Deo-Deo

Continua

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
198	38,2	12	<i>Passiflora</i>	663,384	645, 627, 609, 579, 541, 517, 499, 481, 417 , 405, 399, 381, 351, 321, 297, 267, 255	Derivado da Cri
199	23,8	21, 16, 7, 69, 37, 17	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	451,173	289	Eri-O-Hex
200	27,0	5, 14, 70, 21, 49, 16, 30, 39, 44, 71, 62, 37, 6, 35, 17, 75, 8, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	465,247	303	Que-O-Hex (ISO52)
201	4,8	41, 48, 52	<i>Decaloba</i>	433,267	287	Kae-O-Hex
202	26,6	21, 10, 23, 24, 75	<i>Passiflora</i>	595,381	559, 541, 529, 523, 515, 511, 457, 449, 439, 433 , 415, 397, 379, 353, 329, 299, 287	Lu-C-Deo-O-Hex
203	29,8	21, 47, 11, 22, 9, 10, 76, 23, 24, 75	<i>Passiflora</i>	579,386	561, 543, 525, 499, 491, 475, 433, 417 , 401, 381, 363, 337, 329, 313, 295, 283, 271	Ap-C-Deo-O-Hex
204	32,7	76	<i>Passiflora</i>	611,337	593, 575, 557, 449 , 431, 413, 395, 369, 345, 313, 303, 287	Lu-C-Hex-O-Hex
205	27,8	21, 22, 42, 41, 48, 6, 57, 58	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	447,286	429, 381, 327 , 313, 297, 285	Me-Ap-C-Hex (ISO100)
206	21,9	5, 74, 40, 21, 55, 22, 42, 41, 53, 37, 57, 58, 75, 54	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	463,267	445, 427, 397, 373, 343 , 313, 301	Me-Lu-C-Hex (ISO101)
207	23,3	61, 47, 11, 76, 23, 75	<i>Passiflora</i>	581,327	563, 545 , 527, 515, 491, 461, 443, 419, 401, 383, 365, 353, 329, 311, 299, 287	Lu-C-Hex-C-Pen (ISO189)
208	29,1	40, 21, 25, 22, 38, 39, 69, 10, 76, 23, 24, 75	<i>Passiflora</i>	595,377	577, 559 , 541, 515, 491, 449, 433, 415, 397, 353, 329, 313, 311, 299, 287	Lu-C-Deo-C-Hex (ISO190;210)
209	31,9	5, 43, 21, 11, 16, 12, 22, 38, 44, 42, 72, 31, 62, 13, 37, 52, 26, 33, 34, 17	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	609,382	591, 573, 555, 511, 489, 463, 447, 409, 397 , 391, 381, 367, 325, 301, 286	Me-Lu-C-Hex-C-Deo

Continua

Conclusão

Nr.	Tr. M	*Espécies	Subgêneros	[M + H] ⁺	EM/EM	Identificação
210	27,4	40, 43, 46, 21, 16, 45, 25, 12, 22, 38, 39, 44, 69, 2, 9, 72, 31, 62, 73, 13, 37, 10, 52, 76, 56, 23, 24, 17, 75, 8	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	595,371	577, 559, 541, 529, 523, 515, 475, 457, 433, 413, 395, 383 , 377, 365, 353, 311, 299, 287	Lu-C-Deo-C-Hex (ISO208;190)
211	33,4	16, 30, 53, 35, 17, 8, 65, 66, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Astrohea</i>	303,103	285, 275, 257 , 247, 229, 165, 153, 149, 137, 121, 111, 93	Que
212	33,7	25, 12, 22, 38	<i>Passiflora</i>	605,365	459, 441, 423, 415, 395, 371, 341, 327, 313	Ace-Ap-C-Deo-C-Deo
213	37,0	40, 21, 25, 22, 38, 39, 75, 29	<i>Passiflora</i>	591,399	445 , 427, 409, 401, 383, 381, 327, 313	Ace-Ap-O-Deo-C-Pen
214	33,4	61, 47, 11, 75	<i>Passiflora</i>	549,383	531, 513, 483, 459, 429, 403 , 385, 367, 337, 313, 283, 271	Ap-C-Pen-O-Deo
215	33,0	61, 40, 21, 25, 39, 76, 75	<i>Passiflora</i>	565,34	547, 529, 511, 499, 485, 475, 419 , 401, 383, 353, 329, 298, 287	Lu-C-Pen-O-Deo
216	54,5	5, 14, 61, 70, 74, 27, 40, 43, 46, 21, 18, 47, 49, 55, 68, 63, 4, 11, 16, 45, 7, 12, 22, 38, 39, 44, 69, 51, 2, 9, 42, 72, 31, 32, 71, 41, 1, 62, 73, 59, 53, 13, 37, 10, 48, 64, 52, 76, 19, 6, 56, 35, 20, 23, 60, 67, 50, 24, 57, 33, 34, 17, 58, 75, 8, 65, 29, 54, 3	<i>Decaloba, Passiflora, Deidamioides, Astrohea</i>	609,551	489; 463 ; 445; 427; 409; 367; 343; 313; 301	Me-Lu-C-Hex-O-Deo

Me: metoxi; Ace: acetoxi; Ap: apigenina; Lu: luteolina; Que: quercetina; Kae: kaempferol; Aro: aromadendrina; Tax: taxifolina; Cri: crisina; Eri: eriodictiol; Nar: naringenina; Hex: hexose; Deo: deoxihexose; Pen: pentose; Dideo: dideoxihexose; (E): *epi*; Cat: catequina; Afz: afzelequina; ISO: Isômero; *identificação botânica conforme enumeração da tabela 1 do item 3.1; **Negrito**: pico base