

LAURO MERA DE SOUZA

**APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E DA CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS DE BAIXA  
MASSA MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

2008

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

## **Agradecimentos:**

À família:

Agradeço à minha mãe Maria, minha irmã Adriane e minha esposa Sandra por estarem do lado todo este tempo, sempre me apoiando;

Aos orientadores:

Agradeço aos meus orientadores Prof. Guilherme L. Sasaki e Prof. Marcello Iacomini por seus ensinamentos desde que eu comecei na Bioquímica. Agradeço pela confiança e liberdade que me foi dedicada na conduta do meu trabalho;

Ao Prof. Philip A. J. Gorin que embora não tenha sido oficialmente co-orientador, sempre contribuiu para enriquecer meu trabalho;

Aos amigos:

Durante estes anos de doutorado eu conheci muitas pessoas importantes. Estas pessoas se tornaram grandes amigos, e estes amigos ajudam a mantermos nossa sanidade mesmo nos momentos difíceis de nossa vida.

A estas pessoas eu gostaria de dedicar um agradecimento muito especial:

Guilherme L. Sasaki, Rodrigo O. Faria, Rodrigo V. Serrato, Graciele Viccini, Thales R. Cipriani, Alan G. Gonsalves, Luciana, Juliana, Marcelo Muller, Rose Adele, Phellipe, Rodrigo Reis, Renato Bochichio...

- Ao Thales e por nossa parceira de trabalho bem sucedida com a Espinheira-Santa;
- Ao Marcelo Muller pela nossa recente parceira de trabalho com a arqueia, que com certeza também vai ser muito bem sucedida;
- Aos alunos de iniciação científica Denise E. Costa, Carolina Sant'Ana e Daniel S. Riter, pela amizade e pelo trabalho;
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em nome da Prof<sup>a</sup>. Leda Satie Chubatsu, pela dedicação prestada ao crescimento deste curso. Também ao Prof. Miguel Nosedá, atual coordenador do curso

Aos amigos do laboratório: Fernanda, Elaine, Andréia, Lucimara, Ana Helena, Rodrigo e Dirce.

Ao Sr. Dalnei Serighelli, da Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Paraná, pela gentileza no fornecimento do material para esta pesquisa.

- Ao Prof. Dr. Olavo Guimarães, do Depto. de Botânica, pela identificação da planta.
- Ao CNPq e Pronex-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XV</b>
<b>ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS:</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS: BREVE HISTÓRICO.....	2
1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS: DEFINIÇÃO.....	3
1.3. INSTRUMENTAÇÃO.....	5
1.4. FONTES DE IONIZAÇÃO.....	5
1.4.1. Ionização eletrônica (EI – <i>Electron Ionization</i> ).....	6
1.4.2. Ionização química (CI – <i>Chemical Ionization</i> ).....	7
1.4.3. Ionização por bombardeamento rápido de átomos (FAB – <i>Fast Atom Bombardment</i> ).....	8
1.4.4. Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> ).....	9
1.4.5. Ionização por spray de elétrons (ESI – <i>Electrospray Ionization</i> ).....	11
1.4.6. Ionização química a pressão atmosférica (APCI - <i>Atmospheric Chemical Pressure Ionization</i> ).....	13
1.4.7. Ionização por dessorção de spray de elétrons (DESI – <i>Desorption Electrospray Ionization</i> ).....	14
1.4.8. Outras fontes de íons.....	15
1.5. ANALISADORES DE MASSAS.....	16
1.5.1. Analisadores de Setor.....	16
1.5.2. Quadrupolares (Q – <i>Quadrupole</i> ).....	16
1.5.3. Armadilha de íons (IT – <i>Ion Trap</i> , ou QIT – <i>Quadrupole Ion Trap</i> ).....	17
1.5.4. Tempo de Vôo (TOF – <i>Time of flight</i> ).....	19
1.5.5. Analisadores com Transformada de Fourier (FT- <i>Fourier-transform</i> ).....	20
1.5.6. Analisadores de mobilidade de íons (IM – <i>Ion Mobility</i> ).....	20
1.6. DETECTORES.....	21
1.6.1. <i>Faraday cup</i> .....	22
1.6.2. Multiplicadores de elétrons (EM – <i>Electron Multiplier</i> ).....	22
1.6.3. Multiplicadores de fótons.....	22
1.7. ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO <i>TANDEM-MS</i> .....	23
1.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	25
1.8.1. Cromatografia em fase gasosa.....	26
1.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	26
1.9. APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS.....	27

1.10. OLIGOSSACARÍDEOS .....	28
1.11. LIPÍDEOS.....	30
1.11.1. Fosfolipídeos.....	32
1.11.2. Glicolipídeos.....	33
1.12. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	34
1.12.1. Flavonóides.....	34
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
3.1. FONTES DAS BIOMOLÉCULAS .....	42
3.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
3.2.1. <i>Phyllorhiza punctata</i> .....	42
3.2.2. <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	43
3.2.3. <i>Haloarcula marismortui</i> .....	43
3.3. EXTRAÇÕES .....	44
3.3.1. Extração e fracionamento de lipídeos de <i>Phyllorhiza punctata</i> .....	44
3.3.2. Extrações e fracionamentos dos componentes de folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	44
3.3.3. Extração e fracionamento dos lipídeos da arquea <i>Haloarcula marismortui</i> .....	45
3.4. DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS .....	46
3.4.1. Derivatização para análise em GC-MS .....	46
3.4.2. Acetalação do flavonóis glicosídeos .....	47
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	47
3.5.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	48
3.5.2. Cromatografia líquida de alto desempenho.....	48
3.5.2.1. Cromatografia líquida de alto desempenho com derivatização pós-coluna.....	50
3.5.2.2. Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massas .....	51
3.5.3. Cromatografia em camada delgada (TLC - <i>Thin Layer Chromatography</i> ).....	51
3.5.4. Análise por espectrometria de massas do tipo electrospray .....	51
3.5.5. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	52
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
4.1. ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS .....	54
4.1.2. Influência dos adutores na fragmentação de oligossacarídeos.....	57
4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DE LIPÍDEOS.....	61
4.2.1. Análise dos padrões de fosfolipídeos.....	61
4.2.2. Análise de lipídeos de <i>Phyllorhiza punctata</i> .....	63
4.2.2.1. Análise lo lipídeo da fração Pp-F6 por NMR.....	63
4.2.2.2. Análise do lipídeo da fração Pp-F6 por ESI-MS .....	66
4.2.3. Análise dos lipídeos de folhas de <i>M. ilicifolia</i> .....	69

4.2.3.1. Identificação dos lipídeos de <i>M. ilicifolia</i> por tandem-MS em modo positivo.....	71
4.2.3.2. Identificação dos lipídeos de <i>M. ilicifolia</i> por tandem-MS em modo negativo .....	74
4.2.4. Análise dos lipídeos de <i>H. marismortui</i> .....	76
4.2.4. Análise dos fosfolipídeos de <i>H. marismortui</i> .....	78
4.2.4.1. Arquetidil fosfato (aPA).....	78
4.2.4.2. Arquetidil fosfoglicerol (aPG) .....	78
4.2.4.3. Arquetidil fosfoglicerosulfato (aPGS).....	80
4.2.4.4. Arquetidil fosfoglicerofosfato metil éster (aPGP-Me) .....	83
4.2.4.4. Estrutura do triglicolipídeo di-éter (TGD) .....	86
4.3. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FLAVONÓIDES DE <i>M. ILICIFOLIA</i> .....	89
4.3.1. Componentes de folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	89
4.3.2. Composição geral do extrato Mi-ET-SOL.....	89
4.3.3. Análise de flavonóides livres e taninos condensados .....	92
4.3.3.1. Fração Mi-F1 .....	92
4.3.3.2. Fração Mi-F2.....	94
4.3.4. Análise de flavonóides glicosilados.....	100
4.3.4.1. ESI-MS em modo negativo .....	101
4.3.4.2. Tandem-MS em modo negativo .....	102
4.3.4.3. ESI-MS em modo positivo .....	105
4.3.4.4. Tandem-MS dos compostos protonados.....	106
4.3.4.5. Tandem-MS dos compostos sodiados .....	108
4.3.4.6. Análise do glicosídeos por HPLC-UV-ESI-MS.....	110
4.3.4.7. Desenvolvimento do método de 2D-LC-UV-MS a partir de Mi-ET-SOL .....	113
4.3.4.8. Primeira dimensão: SEC .....	114
4.3.4.8. Segunda dimensão: RP.....	116
4.3.4.9. Segunda dimensão como derivatização pós-coluna.....	117
4.3.4.10. Descrição estrutural dos flavonóis glicosídeos de folhas de <i>M. ilicifolia</i> .....	120
4.3.4.11. Estrutura de flavonóis tetra-glicosídeos.....	122
4.3.4.12. Estrutura de flavonóis tri-glicosídeos.....	128
4.3.4.13. Estrutura de flavonóis di-glicosídeos.....	131
4.3.4.14. Estrutura de flavonóis mono-glicosídeos.....	136
4.3.4.15. Diferenciação parcial entre galactosídeos e glucosídeos por ESI-MS em modo off-line.....	141
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>145</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>150</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>162</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática de um espectrômetro de massas .....	05
<b>Figura 2</b> – Típico processo de ionização eletrônica a 70 eV: Formação do cátion radical, seguida de fragmentação e rearranjos moleculares.....	07
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática dos eventos de ionização química usando metano como gás reagente .....	08
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da ionização química em modo negativo .....	08
<b>Figura 5</b> – Ionização por fonte de MALDI.....	10
<b>Figura 6</b> – Modelo de ionização por electrospray: (A) modelo do resíduo carregado, e (B) modelo de dessorção de íons. ....	12
<b>Figura 7</b> – Fonte de ionização DESI .....	14
<b>Figura 8</b> – Analisador de setor magnético.....	16
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática de um quadrupolo .....	17
<b>Figura 10</b> – Representações esquemáticas dos analisadores do tipo <i>ion trap</i> .....	18
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática do analisador TOF.....	19
<b>Figura 12</b> – Representação esquemática de multiplicadores de elétrons .....	22
<b>Figura 13</b> – Modelo de triplo quadrupólo preparado para tandem-MS .....	24
<b>Figura 14</b> – Rearranjo McLafferty .....	25
<b>Figura 15</b> - Configurações possíveis para D-glucose e D-frutose .....	29
<b>Figura 16</b> – Estruturas básicas de alguns lipídeos .....	31
<b>Figura 17</b> – Estruturas básicas dos flavonóides, mostrando a distribuição dos anéis A, B e C, e a numeração de cada carbono.....	35
<b>Figura 18</b> – Estrutura de flavonóides ligados entre si, ou com carboidratos.....	36
<b>Figura 19</b> – Esquema de HPLC preparado para derivatização pós-coluna.....	50
<b>Figura 20</b> – Formação dos fragmentos de carboidratos .....	54
<b>Figura 21</b> – Nomenclatura para os fragmentos obtidos para glicoconjugados .....	56
<b>Figura 22</b> – Influência do adutor na fragmentação da celobiose e da maltose.....	58
<b>Figura 23</b> – Influencia do adutor na fragmentação da maltopentaose e da estquiiose.....	60
<b>Figura 24</b> – Fragmentação de um fosfolípideo.....	62
<b>Figura 25</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-DEPT da fração Pp-F6.....	65

<b>Figura 26</b> – Espectros de $1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC, $1\text{H}/1\text{H}$ -TOCSY e $1\text{H}/^{31}\text{P}$ -HMBC da fração Pp-F6 .....	66
<b>Figura 27</b> – Espectros positivos de ESI-MS e CID-MS da fração Pp-F6 .....	67
<b>Figura 28</b> – Espectros positivos de ESI-MS e CID-MS da fração Pp-F6 após hidrólise .....	68
<b>Figura 29</b> – Espectros ESI-MS em modo negativo e positivo da fração Mi-EL .....	69
<b>Figura 30</b> – Espectros ESI-MS em modo positivo e negativo da fração Mi-EL-S e Mi-EL-I .....	70
<b>Figura 31</b> – Espectros de CID-MS em modo positivo dos principais íons da fração Mi-EL-I .....	72
<b>Figura 32</b> – Espectro de CID-MS em modo positivo de um diglicosil diacilglicerol presente na fração Mi-EL-I .....	73
<b>Figura 33</b> – Espectro de CID-MS em modo negativo de sulfonoglicolípídeos presentes na fração Mi-EL-I .....	75
<b>Figura 34</b> – Espectros de ESI-MS modo negativo e positivo da fração Hm-EL .....	76
<b>Figura 35</b> – Nomenclatura para os fragmentos observados nos fosfolípídeos de <i>H. marismortui</i> .....	77
<b>Figura 36</b> – Estrutura e espectro de CID-MS em modo negativo do arquetidil fosfato .....	78
<b>Figura 37</b> – Estruturas e espectros de CID-MS em modo negativo do arquetidil fosfoglicerol, e ESI-MS em modo positivo do extrato após hidrólise .....	79
<b>Figura 38</b> – Esquema de substituição de $\text{H}^+$ por $\text{D}^+$ nos grupos polares do aPGS e do aPGP .....	81
<b>Figura 39</b> – Estruturas e espectros de CID-MS em modo negativo e positivo do arquetidil fosfoglicerosulfato .....	82
<b>Figura 40</b> – Estrutura e espectros de CID-MS em modo negativo e positivo do arquetidil fosfoglicerofosfato metil éster .....	85
<b>Figura 41</b> – Estrutura sugerida pelo espectro de CID-MS em modo e positivo do arquetidil triglicosídeo .....	87
<b>Figura 42</b> – Espectro de DEPT $^{13}\text{C}$ NMR do arquetidil triglicosídeo .....	88
<b>Figura 43</b> – Análise de ESI-MS em modo negativo da fração Mi-ET-SOL .....	90
<b>Figura 44</b> – Análise por HPLC-PAD e HPLC-MS da fração Mi-ET-SOL .....	91
<b>Figura 45</b> – Análise de NMR (HMQC-TOSY, COSY) da fração Mi-F1 .....	93
<b>Figura 46</b> – Espectro de ESI-MS em modo negativo da fração Mi-F2 .....	94
<b>Figura 47</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS negativo dos dímeros de taninos .....	95
<b>Figura 48</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS negativo dos trímeros de taninos .....	97
<b>Figura 49</b> – Cromatograma obtido por HPLC-MS em modo negativo da fração Mi-F2.....	98
<b>Figura 50</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ -NMR da fração Mi-F2 .....	100

<b>Figura 51</b> – Espectros de ESI-MS em modo negativo das frações Mi-F2 a Mi-F5.....	101
<b>Figura 52</b> – Espectros de ESI-MS em modo negativo mostrando alteração na formação dos íons de acordo com a energia utilizada no cone .....	102
<b>Figura 53</b> – Estruturas e espectros de CID-MS em modo negativo mostrando a formação de íons regulares e radicais .....	104
<b>Figura 54</b> – Espectros de ESI-MS em modo positivo mostrando alteração na formação dos íons de acordo com a energia utilizada no cone.....	106
<b>Figura 55</b> – Espectros de CID-MS em modo positivo mostrando o perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos na forma protonada – $m/z$ 741 e 757 .....	107
<b>Figura 56</b> – Espectros de CID-MS em modo positivo mostrando o perfil de fragmentação dos flavonóis tri-glicosídeos na forma sodiada – $m/z$ 763 e 779.....	109
<b>Figura 57</b> – HPLC-UV e HPLC-MS das frações Mi-F3 e Mi-F5 .....	112
<b>Figura 58</b> – Cromatograma da fração Mi-F5 mostrando a sobreposição dos compostos de $m/z$ 755 e 739 com aqueles de $m/z$ 887 e 871, respectivamente .....	113
<b>Figura 59</b> – Perfil de separação dos compostos da fração MI-ET-SOL por cromatografia de exclusão estérica na primeira dimensão .....	114
<b>Figura 60</b> – Perfil de cromatográfico por SEC dos compostos de $m/z$ 609 e 593 $[M-H]^-$ .....	115
<b>Figura 61</b> – Perfil de cromatográfico bi-dimensional da fração MI-ET-SOL .....	117
<b>Figura 62</b> – Espectro de ultravioleta dos flavonóis glicosídeos de <i>M. ilicifolia</i> .....	119
<b>Figura 63</b> – Perfil de fragmentação <i>in-source</i> do tetra-glicosídeo de $m/z$ 919 $[M+H]^+$ .....	122
<b>Figura 64</b> – Perfil de fragmentação <i>in-source</i> do tetra-glicosídeo de $m/z$ 903 $[M+H]^+$ .....	123
<b>Figura 65</b> – Perfil de fragmentação <i>in-source</i> do tetra-glicosídeo de $m/z$ 933 $[M+H]^+$ .....	123
<b>Figura 66</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS dos tetra-glicosídeos de $m/z$ 889 $[M+H]^+$ e $m/z$ 911 $[M+Na]^+$ .....	125
<b>Figura 67</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS dos tetra-glicosídeos de $m/z$ 873 $[M+H]^+$ e $m/z$ 895 $[M+Na]^+$ .....	127
<b>Figura 68</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina ramno-hexobiosídeo e miricetina di-ramno-hexosídeo - $m/z$ 773 $[M+H]^+$ e $m/z$ 795 $[M+Na]^+$ .....	129
<b>Figura 69</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS da miricetina ramno-hexosídeo e quercetina hexobiosídeo - $m/z$ 627 $[M+H]^+$ e $m/z$ 649 $[M+Na]^+$ .....	132

<b>Figura 70</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina ramno-hexisídeo - $m/z$ 611 $[M+H]^+$ e $m/z$ 633 $[M+Na]^+$ .....	133
<b>Figura 71</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS do campeferol ramno-hexisídeo e quercetina ramnobiosídeos - $m/z$ 595 $[M+H]^+$ e $m/z$ 617 $[M+Na]^+$ .....	134
<b>Figura 72</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina ramno-arabinosídeo - $m/z$ 581 $[M+H]^+$ e $m/z$ 603 $[M+Na]^+$ .....	135
<b>Figura 73</b> – Perfil de fragmentação <i>in-source</i> do campeferol ramno-arabinosídeo - $m/z$ 565 $[M+H]^+$ .....	136
<b>Figura 74</b> – Perfil de fragmentação <i>in-source</i> da miricetina-hexosídeo - $m/z$ 481 $[M+H]^+$ .....	137
<b>Figura 75</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina-hexosídeo - $m/z$ 465 $[M+H]^+$ e $m/z$ 487 $[M+Na]^+$ .....	137
<b>Figura 76</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS do campeferol-hexosídeo - $m/z$ 449 $[M+H]^+$ e $m/z$ 471 $[M+Na]^+$ .....	138
<b>Figura 77</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina-arabinosídeo - $m/z$ 435 $[M+H]^+$ e $m/z$ 457 $[M+Na]^+$ .....	139
<b>Figura 78</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS do campeferol-arabinosídeo - $m/z$ 435 $[M+H]^+$ e $m/z$ 457 $[M+Na]^+$ .....	139
<b>Figura 79</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS de di-glicosídeos na forma de isopropilidenos .....	142
<b>Figura 80</b> – Perfil de fragmentação por CID-MS de tri-glicosídeos na forma de isopropilidenos .....	144

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Fontes das biomoléculas estudadas neste trabalho.....	42
<b>TABELA 2</b> – Análise dos padrões de fosfolipídeos.....	62
<b>TABELA 3</b> – Tandem-MS dos fosfolipídeos de <i>H. marismortui</i> .....	86
<b>TABELA 4</b> – Composição de taninos na fração Mi-F2, por CID-MS.....	99
<b>TABELA 5</b> – Perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos em modo negativo.....	105
<b>TABELA 6</b> – Perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos sodiados.....	110
<b>TABELA 7</b> – Análise de metilação dos flavonóis glicosídeos .....	121
<b>TABELA 8</b> – Resultado obtido por 2D-LC-MS com derivatização pós-coluna.....	141

## RESUMO

A espectrometria de massas é uma das mais importantes técnicas de análise estrutural da atualidade. Ela pode ser aplicada nas mais diversas áreas da ciência, como química, biologia, medicina, forense, entre outras. Neste trabalho, várias classes de biomoléculas de baixa massa molecular como oligossacarídeos, diversos lipídeos e flavonóides, obtidos de diferentes fontes, foram analisados por espectrometria de massas através de injeções diretas, ou por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O comportamento de oligossacarídeos nos processos de fragmentação foi avaliado através de sua ionização com diferentes adutores, como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Foi determinado que o  $\text{Li}^+$  foi capaz de produzir um considerável ganho na produção de íons fragmentos, e com menores energias que os demais adutores. Para a análise de lipídeos de diferentes fontes, foi inicialmente realizada uma padronização, por meio de ionização em modo positivo e negativo, com padrões de fosfolipídeos. Um lipídeo identificado com ceramida aminoetil fosfonato, característico de invertebrados, foi encontrado na cifomedusa *Phyllorhiza punctata*. Dois glicolipídeos característicos de plantas foram encontrados em *Maytenus ilicifolia*, sendo identificados como digalactosildiacilglicerol, através de seu perfil de fragmentação em modo positivo. Outro glicolipídeo foi analisado em modo negativo, sendo identificado como sufoquinovosildiacilglicerol, que apresenta um grupo sulfonil ligado ao C-6 da quinovose. Um perfil abrangente do conteúdo de lipídeos foi obtido da arquea *Haloarcula marismortui*, um microorganismo halofílico isolado do Mar Morto. Diversos fosfolipídeos foram identificados tanto em modo positivo quanto em negativo, todos contendo uma cadeia hidrofóbica que é característica de arqueas, chamada de arqueol, que apresenta dois álcoois ramificados contendo 20 carbonos conhecidos como geranilgeraniol, ligados ao glicerol por ligações do tipo éter. Além dos fosfolipídeos, um glicolipídeo contendo duas unidades de glucose e uma de manose, ligados ao arqueol, foi identificado em *H. marismortui*. Grande parte deste trabalho também foi dedicada à análise estrutural de flavonóides, taninos e flavonóis glicosídeos de folhas de *M. ilicifolia*. Esta planta, conhecida como espinheira santa é utilizada em tratamentos de distúrbios gástricos, e demonstrou ser capaz de sintetizar uma grande variedade destes compostos. Flavonóides livres como catequina e epicatequina foram identificados por LC-MS em modo positivo e negativo. Taninos foram analisados em modo negativo, os quais demonstraram ser compostos de (epi)-catequina, (epi)-afzelequina e (epi)-galocatequina, formando estruturas com dímeros até heptâmeros, com sequências variadas. Diversos flavonóis glicosídeos contendo principalmente galactose ligada a um núcleo aglicona, tipicamente campferol ou quecetina, embora miricetina também foi encontrada. Entretanto um grande número de isômeros contendo glucose no lugar da galactose foram encontrados. Estes isômeros só puderam ser analisados através do acoplamento do espectrômetro de massas a um sistema de cromatografia líquida, o qual foi realizado em modo bi-dimensional, com uma coluna de exclusão estérica na primeira dimensão e de fase reversa na segunda, permitindo a identificação de 36 flavonóis glicosídeos. Alguns galactosídeos puderam ser diferenciados dos glucosídeos através de sua acetalação e análise direta por ESI-MS, já que os galactosídeos apresentaram um ganho na sua massa de 40 Da a mais que os glucosídeos, mostrando um grande potencial para esta aplicação.

## ABSTRACT

Mass spectrometry is one of the most important techniques currently devoted to structural analysis. It can be employed to several sciences, such as chemistry, biology, medicine, forensics, and so on. In the present work, many classes of low molecular biomolecules, such as oligosaccharides, several lipids and flavonoids, from different sources were analyzed employing direct injection on mass spectrometer source, or by coupling with liquid chromatography. The fragmentation behavior of oligosaccharides with different adducts, such as  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , were evaluated. Thus it was found that  $\text{Li}^+$  provided best results, producing more fragmentations with lower energy than other adducts. Negative and positive ionization were standardized for phospholipids analysis. Other lipids from different sources were identified as ceramide aminoethylphosphonate, common in invertebrates, it was found in the medusa *Phyllorhiza punctata*. Two glycolipids common in plants, were found in *Maytenus ilicifolia*, they were identified as digalactosyldiacylglycerol, via positive fragmentation, and in the negative analysis it was identified a sulfoquinovosyldiacylglycerol, a glycolipid containing a sulfonyl group bond to C-6 of quinovose. A comprehensive lipid profile was carried out from archaea *Haloarcuella marismortui*, a microorganism from Dead Sea. Many phospholipids were identified by negative and positive ESI-MS analysis, indicating the presence of archaeol, a structure with two branched alcohols with 20 carbons, which are known as geranylgeraniol, bond to glycerol via ether linkages. It was also found a glycolipid containing two glucose units and a mannose unit, linked to archaeol. However the major goal of this work was to develop analytical procedures for identifying flavonoids, tannins, and flavonol glycosides from leaves of *M. ilicifolia*. This medicinal plant was found to synthesize a wide range of these compounds. Free flavonoids such as catechin and epicatechin were identified by LC-MS with negative and positive ionization. Tannins were analyzed in the negative ionization, and were found to be composed by (epi)-catechin, (epi)-afzelechin and (epi)-gallocatechin, forming structures from dimers to heptamers, with variable sequence. Several flavonol glycosides containing mainly galactose linked to an aglycone moiety, typically kaempferol or quercetin, but miricetin was also found. However, many isomers containing glucose instead galactose were found. In order to resolve the isomers a two-dimensional liquid chromatography technique was employed, by using size exclusion column in the first dimension and reversed phase in the second, which allowed the identification of 36 flavonol glycosides. Some galactosides could be also differentiated from glucosides in off-line ESI-MS after its acetalation, since the galactosides had an increase of 40 Da higher than glucosides. This method proved to be efficient for this differentiation.

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS e TERMOS:

### Compostos:

(Epi)Afz: Afzelequina ou Epiafzelquina;  
(Epi)Cat: Catequina ou Epicatequina;  
(Epi)Gall: Galocatequina ou Epigalocatequina;  
2-AEP: Ácido 2-Aminoetilfosfônico;  
aPA: Arquetidil Fosfato;  
aPG: Arquetidil Fosfoglicerol;  
aPGP: Arquetidil Fosfoglicerofosfato;  
aPGP-Me: Arquetidil Fosfoglicerofosfato Metil Éster;  
aPGS: Arquetidil Fosfoglicerosulfato;  
Ara: Arabinose;  
aTGD: Arquetidil Triglicosil Lipídeo;  
CAEP: Ceramida Aminoetilfosfonato;  
Camp: Campaferol;  
DGDG: Digalactosildiacylglicerol;  
f: Furanosídeo;  
Gal: Galactose;  
Glc: Glucose;  
Gli: Glicerol;  
MGDG, Monogalactosyldiacylglycerol;  
Mir: Miricetina;  
p: Piranosídeo;  
PA: Ácido Fosfatídico;  
Pas: Proantocianidinas;  
PG: Fosfatidilglicerol;  
PHG: *Polar Head Group* (Grupo Cabeça Polar);  
Quer: Quercetina;  
Rha: Ramnose;  
SQDG; Sufoquinovosildiacylglicerol;  
TFA: *Trifluoroacetic Acid*;  
TGDG, Trigalactosildiacylglicerol;

## **Extratos e frações:**

Hm-EL: Extrato Lipídico de *H. marismortui*;  
Mi-EL: Extrato Lipídico de *M. ilicifolia*;  
Mi-EL-I: Extrato Lipídico de *M. ilicifolia* fase inferior;  
Mi-EL-S: Extrato Lipídico de *M. ilicifolia* fase superior;  
Mi-ET-SOL: Extrato aquoso de *M. ilicifolia* solúvel em etanol;  
Pp-EL: Extrato Lipídico de *P. punctata*;  
Pp-EL-I: Extrato Lipídico de *P. punctata* fase inferior  
Pp-EL-S: Extrato Lipídico de *P. punctata* fase superior

## **Espectrometria de massas e cromatografia:**

APCI: *Atmospheric Chemical Pressure Ionization* (Ionização Química A Pressão Atmosférica);  
API: *Atmospheric Pressure Ionization* (Ionização Em Pressão Atmosférica);  
CE: *Capillary Electrophoresis* (Eletroforese Capilar);  
CI: *Chemical Ionization* (Ionização Química);  
CID-MS: *Collision Induced Dissociation-Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas de Dissociação Induzida por Colisão);  
CRM: *Charged-Residue Model* (Modelo do Resíduo Carregado);  
Da: Dalton (Unidade Massa Molecular);  
DART: *Direct Analysis In Real Time* (Análise Direta em Tempo Real);  
DEPT: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*;  
EI: *Electron Ionization* (Ionização Eletrônica);  
EM: *Electron Multipliers* (Multiplicadores de Elétrons);  
ESI: *Electrospray Ionization* (Ionização Por Spray de Elétrons);  
ESI-MS: *Electrospray Ionization-Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com Fonte Electrospray);  
FAB: *Fast Atom Bombardment* (Ionização Por Bombardeamento Rápido de Átomos);  
FD: *Field Desorption* (Dessorção de Campo);  
FI: *Field Ionization* (Ionização de Campo);  
FT: *Fourier-Transform* (Transformada de Fourier);  
GC-MS: *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massas);  
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência);  
ICR: *Ion Cyclotron Resonance* (Ressonância de Íon Ciclotron);

IDM: *Íon-Desorption Model* (Modelo da Dessorção de Íons);  
IM: *Ion Mobility* (Mobilidade Iônica);  
IT: *Ion Trap* (Armadilha de Íons);  
LC-MS: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas);  
LSIMS: *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry* (espectrometria de massas de íon líquido secundário);  
m.u.: *mass units* (unidades de massa);  
*m/z*: Relação massa/carga;  
MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Ionização Por Dessorção A Laser Assistida Por Matriz);  
MS/MS: Espectro de Fragmentação de Massa (*Tandem-MS*)  
MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas);  
NL: *Neutral Loss* (Perda Neutra);  
PD: *Plasma Desorption* (Dessorção por Plasma);  
PDA: *Photodiode Array* (Detector de Arranjo de Diodos);  
Q: Quadrupólo;  
QIT: *Quadrupole Ion Trap*;  
RF: Rádio Freqüência;  
 $R_t$ : Tempo de retenção relativo;  
SEC: *Size Exclusion Chromatography* (cromatografia de exclusão por tamanho)  
TIC: *Total Ion Current* (análise de íons totais)  
TLC: *Thin Layer Chromatography* (Cromatografia Em Camada Delgada);  
TOF: *Time Of Flight* (Tempo de Vôo).

### **Ressonância Magnética Nuclear:**

$\delta$ : Delta – deslocamento químico (ppm)  
COSY: *Correlation Spectroscopy*;  
HMBC, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*;  
HMQC, *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*;  
HMQC-TOCSY, *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy-Total Correlation Spectroscopy*;  
NMR: *Nuclear Magnetic Resonance* (Ressonância Magnética Nuclear);  
ROESY: *Rotational Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*;  
TOCSY: *Total Correlation Spectroscopy*;

**Termos associados às técnicas de análise:**

- *Heart-cutting*: tipo de cromatografia bi-dimensional na qual apenas a parte de interesse é transferida da primeira para segunda dimensão.
- *On-line*: análise acoplada de cromatografia com espectrometria de massas;
- *Off-line*: análise por infusão da amostra diretamente na fonte de ionização;
- Fragmentação *in-source*: quando ocorre fragmentação do analito direto na fonte de ionização, sem acionamento da CID.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS: BREVE HISTÓRICO

Os primeiros relatos sobre a massa atômica elementar datam de 1815, quando o físico inglês W. Prout formulou sua teoria dos múltiplos do hidrogênio, no qual ele constatou que a massa atômica e molecular de diversos elementos e compostos eram múltiplos do hidrogênio, que ele havia determinado como contendo 1 unidade de massa (BUDZIKIEWICZ E GRIGSBY, 2005). Em 1886, o físico alemão Eugen Goldstein observou raios formados em descargas de gás sob baixa pressão que viajava através dos canais em um cátodo perfurado na direção do ânodo, e chamou este fenômeno de "Kanalstrahlen" (raios canais). Mais tarde (1907), utilizando campos magnéticos demonstrou que os raios produzidos revelavam que a matéria era composta por elementos de massa variável, sendo que a mais leve era a do hidrogênio. Em experimentos paralelos utilizando fortes campos magnéticos e elétricos, Wilhelm Wien (1898) identificou a presença de um elemento com carga positiva e massa igual a do hidrogênio, e em 1911 recebeu o Prêmio Nobel de Física.

Também em paralelo, diversos estudos estavam sendo realizados por Joseph J. Thomson, que em 1897 descobriu os elétrons, recebendo o Prêmio Nobel de Física em 1906, como reconhecimento por esta descoberta. Posteriormente, trabalhando sobre os experimentos de Wien, J. J. Thomson obteve um registro em chapas fotográficas obtidos pela ionização do gás neônio. Contudo seus registros acusavam a presença de duas marcas referentes ao neônio, que foram inicialmente entendidas como se o gás neônio fosse formado por uma mistura de dois gases. Mais tarde foi atribuído que a presença de compostos de massas diferentes no gás neônio era devido à presença de seus isótopos ( $^{20}\text{Ne}$ ,  $^{21}\text{Ne}$  e  $^{22}\text{Ne}$ ), assim, outros compostos isotópicos acabaram sendo identificados (ASTON, 1920a,b; 1921; THOMSON et al., 1921).

Em 1918, Arthur J. Dempster desenvolveu o primeiro espectrômetro moderno, e fez a importante descoberta do isótopo  $^{235}\text{U}$ . Em 1919, Francis W. Aston também desenvolveu e melhorou seu espectrômetro de massas, o que lhe permitiu descobrir 212 isótopos naturais e em 1922 ele recebeu o Prêmio Nobel de Química pela sua pesquisa. Os conceitos desenvolvidos por Arthur J. Dempster e Francis W. Aston são utilizados até hoje no desenvolvimento dos modernos espectrômetros de massa (BUDZIKIEWICZ E GRIGSBY, 2005; DASS, 2007).

Mais tarde, na década de 50, foi desenvolvida uma das principais técnicas de análise de massas, chamada de *íon trap* (armadilha de íons). Seus criadores, Hans G. Dehmelt e Wolfgang Paul receberam o Prêmio Nobel de Física (1989). Contudo, todas as técnicas de ionização e análise de massas até então desenvolvidas, não permitiam análises de moléculas de alta massa molecular, mas nos anos 80, John Bennett Fenn desenvolveu um método de ionização suave chamado de *electrospray ionization*, que permitiu a análise de macromoléculas com baixos níveis ou nenhuma fragmentação. Fenn juntamente com Koichi Tanaka, quem desenvolveu outra técnica suave de ionização chamada de *soft laser desorption* (1987), receberam o Prêmio Nobel de Química em 2002. A importância do desenvolvimento desta técnica analítica pode ser notada pelo grande número de Prêmios Nobel que foram dados aos seus criadores.

## 1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS: DEFINIÇÃO

Espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por  $m/z$  (*mass to charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de  $m/z$  de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (Van BRAMER, 1998). A espectrometria de massas pode ser utilizada em análises quantitativas, mas é em análises qualitativas que ela tem se destacado, como na identificação de compostos em misturas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos.

Poderíamos considerar então que a espectrometria de massas fornece informações precisas sobre a massa dos compostos analisados. Contudo devemos tomar muito cuidado com este tipo de conclusão! Na realidade um espectrômetro de massas fornece a massa obtida apenas de íons, entretanto nem todas as moléculas contêm grupos químicos naturalmente carregados. Tomemos como exemplo a

glucose (Glc), uma molécula neutra, ou seja, sem carga líquida, que apresenta uma massa molecular nominal de 180 Da. Os procedimentos de ionização para uma molécula neutra como a Glc, envolvem a incorporação de adutores iônicos, sendo o mais comum o cátion  $\text{Na}^+$ . Neste processo, o adutor interage ou mesmo participa de ligações coordenadas com o analito fornecendo a ele sua própria carga. Como consequência deste processo de ionização a massa iônica da glucose passa de 180 Da para 203 Da, ou em termos mais apropriados, seu íon pseudo-molecular tem  $m/z$  203  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , no qual  $z$  sendo igual a 1 (um) é possível pela subtração do adutor conhecer a massa do composto original:  $m/z$  203 – 23 ( $\text{Na}^+$ ) = 180 Da. É desta forma que moléculas neutras podem ser analisadas por espectrometria de massas.

Em outros processos de ionização dependendo das características químicas das moléculas a serem analisadas, pode se obter íons protonados, comuns em moléculas contendo grupamentos  $\text{R-NH}_2$ , ou então íons desprotonados, como no caso de moléculas que apresentam grupamentos ácidos em suas estruturas. Nestes dois casos os íons são chamados de íons *quasi*-moleculares (IUPAC, 2006).

A espectrometria de massas também é utilizada na determinação de razões isotópicas. Tomemos como exemplo a análise de uma amostra de  $\text{NaCl}$ . Em solução os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  estarão dissociados, e quando analisados em modo de detecção de íons positivos, será obtido apenas um íon de  $m/z$  23 referente ao  $\text{Na}^+$ . Entretanto, quando analisamos esta mesma solução em modo de detecção de íons negativos veremos o aparecimento de dois íons, um de  $m/z$  35 sendo este o íon base (aquele aparece representando 100%) e outro de  $m/z$  37, que deverá representar cerca de 1/3 do íon base. Estes resultados devem-se à relação isotópica apresentada pelos íons analisados. Átomos de sódio são mono-isotópicos, com uma massa de 22,98977 m.u. (nominal de 23 m.u.). Já os íons cloreto apresentam dois isótopos, um com massa de 34,9688527 m.u. (nominal de 35 m.u., com abundância natural de cerca de 75%) e outro com massa de cerca de 36,9659026 m.u. (nominal de 37 m.u., com abundância natural de cerca de 25%) (ASTON, 1920; 1921; COPLEN et al., 2002; BUDZIKIEWICZ E GRIGSBY, 2005).

Moléculas orgânicas são formadas essencialmente por átomos de carbono e hidrogênio, e ambos contêm dois isótopos principais, no caso do carbono temos o isótopo leve  $^{12}\text{C}$  (~99%) e o pesado  $^{13}\text{C}$  (~1%), e para o hidrogênio temos o isótopo leve  $^1\text{H}$  (>99,9%) e o isótopo pesado  $^2\text{H}$  (<0,1%). Apesar de aparecerem em baixas concentrações naturais, moléculas contendo pelo menos 1 isótopo pesado podem

representar grande parte das moléculas naturais. Moléculas contendo diferentes isótopos são designadas como isotopólogos.

### 1.3. INSTRUMENTAÇÃO

Um espectrômetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectores (Figura 1), que serão descritos a seguir, contudo as bases físicas que envolvem a análise de íons, estão fora do escopo deste trabalho.

**Figura 1** – Representação esquemática de um espectrômetro de massas



*Fontes de íons:* parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons;

*Analisadores de massas:* parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com seu  $m/z$ , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos;

*Detectores:* parte final de um espectrômetro de massas, responsável pela detecção e amplificação dos íons.

### 1.4. FONTES DE IONIZAÇÃO

A ionização é o processo físico/químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon, adicionando ou removendo partículas carregadas como elétrons ou outros íons. Este processo funciona de maneira diferente dependendo se um íon positivo ou negativo está sendo produzido. Um íon de carga positiva é produzido quando um elétron ligado a um átomo (ou molécula) absorve energia suficiente para escapar da barreira elétrica que o limitava, desfazendo assim seu vínculo com o núcleo, sendo expelido para fora da eletrosfera. A quantidade de energia necessária é chamada de potencial de ionização. Um íon negativamente carregado é produzido quando um elétron livre choca com um átomo e é então capturado, ficando no interior da barreira do potencial elétrico. Outras formas de ionização serão descritas a seguir. Em alguns casos, um próton pode ser adicionado

ou subtraído da molécula, rendendo os íons  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ , respectivamente. Em outros casos, os íons são formados através da interação com adutores, como metais alcalinos (por exemplo,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ), formando íons positivos, ou então com ânions como  $Cl^-$ , rendendo íons com cargas negativas (DASS, 2007; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Tendo em vista que os processos de ionização são fundamentais para a espectrometria de massas, diversas fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da sua história. Aqui serão descritos alguns dos principais métodos de ionização utilizados, sendo que a ionização do tipo *electrospray* será abordada com mais detalhes. As abreviações serão fornecidas com o nome em inglês, já que desta forma elas são melhor conhecidas.

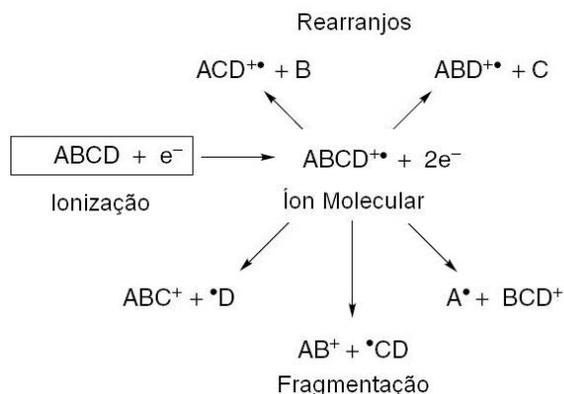
#### **1.4.1. Ionização eletrônica (EI – *Electron Ionization*)**

A ionização eletrônica, anteriormente chamada de ionização por impacto de elétrons, é uma das técnicas mais amplamente utilizada nos processos de ionização analítica, sendo muito empregada em sistemas acoplados com cromatografia gasosa. Como pré-requisito básico, todos os analitos devem estar na sua forma de vapor, e, portanto as amostras devem ser voláteis, o que acaba sendo uma limitação da técnica (ELJARRAT e BARCELO, 2005, HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Na ionização por EI, um feixe de elétrons de 70 eV ( $1 \text{ eV} = 1.60217733 \times 10^{-19} \text{ J}$ ) é produzido por um filamento. Os elétrons são então acelerados por um ânodo, e acabam interagindo e energizando as moléculas do analito na fase gasosa. Como consequência desta energização, cerca de 20 eV são transferidos para as moléculas. Como a energia de ionização típica de moléculas orgânicas é de 15 eV, ocorre a ionização destas moléculas pela remoção de um elétron, produzindo um íon com elétrons desemparelhados, portanto um íon radical. 70 eV são necessários para que a energia dos elétrons apresentem comprimento de onda similar à energia das ligações em moléculas orgânicas ( $\sim 0,14 \text{ nm}$ ), assim a transferência de energia é maximizada. Contudo, esta ionização gera íons com estado energético excedente em 5-10 eV. Como as energias de ligação típicas em moléculas orgânicas esta entre 4-5 eV, este processo de ionização é seguido por sucessivas clivagens e rearranjos moleculares (Figura. 2). Este processo de clivagem é conhecido como fragmentação, e geralmente resulta em um espectro de massas contendo apenas

fragmentos iônicos, formados a partir da molécula original (KITSON et al.,1996; ARDREY, 2003; ELJARRAT e BARCELO, 2005; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007). Novos avanços na tecnologia dos detectores têm permitido que as fontes de EI possam ter sua energia regulável, o que tem permitido a obtenção de íons moleculares através da redução da energia aplicada.

**Figura 2** – Típico processo de ionização eletrônica a 70 eV: Formação do cátion radical, seguida de fragmentação e rearranjos moleculares.



Fonte: ARDREY, 2003

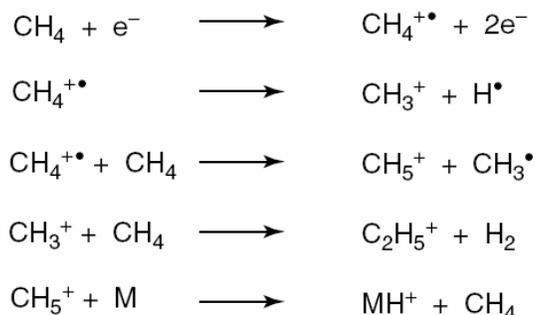
#### 1.4.2. Ionização química (CI – *Chemical Ionization*)

Uma das principais dificuldades das análises de massas através do uso da EI é a alta produção de íons-fragmentos e seus rearranjos. Se por um lado estes fragmentos são úteis para diferenciação de várias moléculas, principalmente isóbaros, por outro lado a ausência de íon-molecular e as várias possibilidades de rearranjos moleculares dificultam em muito o trabalho dos pesquisadores. Uma forma encontrada para minimizar os efeitos da alta energia utilizada no EI, surgiu com a ionização química, que consiste em produzir íons pela colisão dos analitos com íons primários, provenientes de gases reagentes, previamente formados na fonte (MUNSON e FIELD, 1966; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Alguns destes gases reagentes mais comumente utilizados incluem: metano, etano, amônia e isobutano. Os elétrons produzidos na fonte provocam a ionização destes gases, produzindo seus respectivos íons radicais (Figura 3), os quais estarão

em maior quantidade do que o analito, assegurando assim que as moléculas a serem analisadas sejam ionizadas. Os íons produzidos por este tipo de ionização podem ser positivos, negativos e ainda é possível haver a formação íons com adutores.

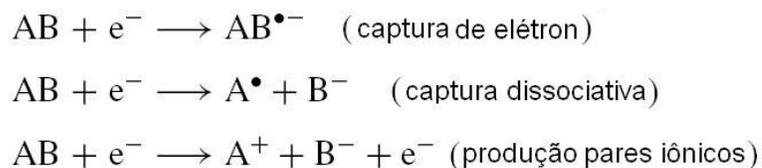
**Figura 3** – Representação esquemática de alguns eventos durante a ionização química, usando metano como gás reagente



Fonte: ARDREY, 2003

Dependendo das características do analito, a ionização química também pode produzir íons com cargas negativas (Figura 4).

**Figura 4** – Representação esquemática da ionização química em modo negativo



Fonte: HOFFMANN e STROOBANT, 2007

### 1.4.3. Ionização por bombardeamento rápido de átomos (**FAB – Fast Atom Bombardment**)

Desenvolvida no início dos anos 80 (BARBER, et al., 1981), é uma das técnicas consideradas como de ionização suave, ou seja, a energia transferida para

as moléculas do analito é suficiente para causar sua ionização sem a geração excessiva de fragmentos. Assim, diferente da EI, durante a ionização por FAB é possível obter a molécula intacta na forma de íon. Outra diferença da EI para o FAB, consiste no fato que em EI (assim como em CI), os analitos devem estar na forma de vapor afim de que a ionização possa ocorrer. Já em FAB a ionização pode ocorrer em moléculas polares, não voláteis e termicamente lábeis. FAB consiste em uma técnica de ionização que utiliza uma matriz líquida e não volátil, na qual o analito é dissolvido para que ocorra a transferência de energia. Matrizes comuns incluem glicerol, tioglicerol, álcool 3-nitrobenzílico, dietanolamina e trietanolamina, entre outras. A ionização acontece pela transferência de energia de átomos acelerados para o analito, tipicamente pela emissão de um feixe de átomos de argônio ou xenônio de alta energia (na ordem de 2-10 keV). No entanto a transferência de energia pode ser obtida pela utilização de íons de alta energia, como  $\text{Cs}^+$ , e neste caso a técnica apesar conceitualmente ser igual ao FAB, recebe o nome espectrometria de massas de íon líquido secundário (LSIMS – *liquid secondary ion mass spectrometry*). Íons *quasi*-moleculares positivos  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ou negativos  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , são geralmente obtidos por FAB ou LSIMS, embora o mecanismo exato de ionização ainda seja considerado um mistério (SURMAN e VICKERMAN, 1981; TOMER, 1989; ARDREY, 2003; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

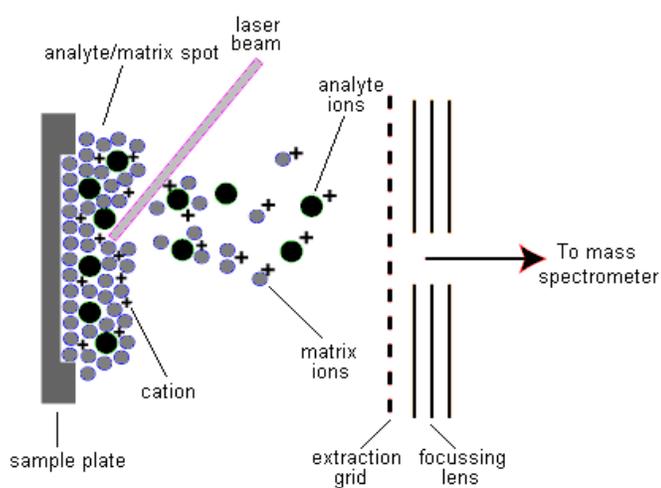
#### **1.4.4. Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)**

Ionizações à laser foram introduzidas a partir da metade dos anos 80, atendendo a mesma vertente das ionizações suaves, cujo principal objetivo era obtenção de íons–moleculares (*quasi*-moleculares ou pseudo-moleculares). Dois grupos se destacaram pelo desenvolvimento da técnica, na Alemanha, o grupo de F. Hillenkamp e M. Karas, e no Japão o grupo encabeçado por Kiochi Tanaka. Os dois grupos se destacaram em análises de proteínas e peptídeos, tendo conseguido naquela época analisar proteínas entre 10 e 100 KDa (KARAS et al., 1987; KARAS e HILLENKAMP, 1988; TANAKA et al., 1988).

Na ionização por MALDI, assim como no FAB, a amostra deve ser misturada a uma matriz específica que auxiliará na sua ionização. Entretanto, agora a matriz não é mais um líquido como em FAB, mas sim a amostra é misturada a uma matriz que quando seca cristaliza-se juntamente com a analito. A transferência de energia por MALDI ocorre através da irradiação pulsada de laser, a matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito, promovendo sua ionização (Figura 5). Esta forma de transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, já que elas não sofrem incidência direta da excessiva energia do laser, o que poderia causar sua decomposição. Este processo ocorre em uma câmara sob vácuo e os íons então formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador (ARDREY, 2003; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

Existe uma grande variedade de matrizes que podem ser utilizadas em MALDI, constituídas principalmente de compostos aromáticos. As fontes de laser também podem variar, no entanto a mais comum é a de  $N_2$ , com comprimento de onda de 337 nm. Os íons formados apresentam-se de modo geral protonados mono-carregados em modo positivo, desprotonados em negativo. Contudo, não é incomum de serem formados íons com duas ou mais cargas, ou com adutores como  $Na^+$  ou  $K^+$  (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

**Figura 5** – Ionização por fonte de MALDI



Fonte: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>

#### 1.4.5. Ionização por spray de elétrons (ESI – *Electrospray Ionization*)

ESI é uma das principais técnicas de ionização em pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*) e também uma das mais importantes na determinação estrutural de diversas moléculas biológicas, consistindo em mais uma das técnicas no conceito de ionização suave, permitindo a formação de íons a partir de macromoléculas, superando sua propensão em fragmentar-se quando ionizadas.

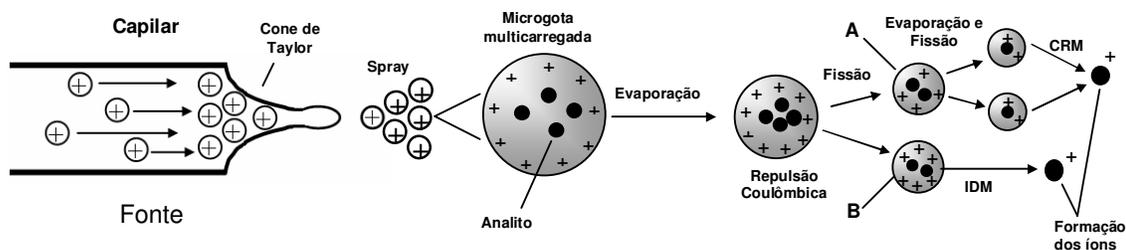
Os primeiros relatos sobre a nebulização por *electrospray* datam de 1917, descrito por Zeleny (NIESSEN, 2005), mas somente a partir de 1968 a técnica foi utilizada para ionização de moléculas em aplicações de espectrometria de massas, que surgiram com o grupo liderado por Malcom Dole, em seus estudos de transferência de macromoléculas, na forma de íons, da fase líquida para fase gasosa (DOLE et al., 1968; MACK et al., 1970; CLEGG e DOLE, 1971; TEER e DOLE, 1975). Contudo, os grandes avanços da técnica foram obtidos a partir de 1983, com o grupo liderado por John B. Fenn, (YAMASHITA e FENN, 1984), que mais tarde seria consagrado com o Prêmio Nobel em Química (2002) pelo desenvolvimento do ESI-MS. Esta técnica permitiu análise de macromoléculas de grande importância na química e biologia, assim como e em outras ciências (FENN et al., 1989). O Prêmio também foi dado a Kiochi Tanaka, pelas suas contribuições para o desenvolvimento do MALDI.

O processo de ionização por ESI ocorre quando um solvente volátil contendo os analitos é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Uma alta tensão é aplicada à ponta deste capilar, e como consequência deste forte campo elétrico, a amostra que sai pelo capilar estará dispersa em um aerosol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas (YAMASHITA e FENN, 1984). Este processo é auxiliado por um gás inerte (geralmente nitrogênio e chamado de gás de nebulização) que é introduzido na fonte ESI, fluindo externamente ao capilar. Este fluxo de gás está em temperaturas elevadas (150-200 °C) e auxilia na evaporação do excesso solvente e na formação do aerosol.

Embora os mecanismos que estão envolvidos nos processos de ionização por ESI não tenham sido completamente elucidados, existem dois principais mecanismos propostos. O modelo do resíduo carregado (CRM – *charged-residue model*) e o modelo da dessorção de íons (IDM – *ion-desorption model*). Nestes dois mecanismos, a ionização tem início pela formação do aerosol, produzido por um

processo que envolve a formação do cone de Taylor, a partir da ponta do capilar. O cone de Taylor foi descrito por Geoffrey Ingram Taylor, em 1964, baseado nos trabalhos de Zeleny. O cone começa a se formar quando as microgotas de um solvente eletricamente condutivo são expostas a fortes campos elétricos, causando uma deformação em sua superfície, que então surge como um cone com os lados convexos e ponta arredondada. Conforme o campo elétrico aumenta excedendo a tensão do solvente, o cone se inverte e um jato é lançado, formando um spray. Neste momento ocorre a formação de minúsculas gotas de solvente contendo o analito e repleto de cargas elétricas positivas ou negativas (de acordo com o modo de análise). Como as microgotas de solvente sofrem ação de um fluxo de  $N_2$  aquecido, elas passam a evaporar, tendo seu diâmetro reduzido rapidamente. Com isso as cargas ali contidas passam a ter maior proximidade, e conseqüentemente maior repulsão eletrostática. Quando esta repulsão atinge uma força maior do que a tensão do solvente ocorre um colapso, que promove ruptura da microgota com conseqüente formação de outras gotas de solvente e analito menores ainda (Figura 6). Esse processo é chamado de fissão Coulômbica porque ocorre por forças de repulsão Coulômbicas (eletrostáticas). A partir deste ponto os dois mecanismos se diferenciam. Segundo o CRM, as microgotas continuam a sofrer a evaporação e fissão num processo contínuo até que tenha ocorrido a total dessolvatação das moléculas, e assim ocorre a transferência das cargas que estavam contidas no solvente para o analito, para formação de um íon isolado (Figura 6A). Já o modelo IDM considera que com a evaporação, as gotículas de solvente chegam o determinado raio em que a densidade elétrica na sua superfície é grande o suficiente para expulsar os analitos diretamente para fora da gotícula, neste momento ocorreria a transferência de carga entre o solvente e o analito (Figura 6B). Existe ainda muita discussão quanto ao o mecanismo exato de transferência de cargas entre o solvente e o analito, mas acredita-se que ambos os mecanismos ocorram de acordo com o tipo de analito, ou seja, CRM ocorre em quando o analito é composto por moléculas hidrofílicas, enquanto que o IDM se aplicaria melhor para moléculas hidrofóbicas (YAMASHITA e FENN, 1984; FENN, et al., 1989; FENN, et al., 1990; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

**Figura 6** – Modelo de ionização por *electrospray*. (A) modelo do resíduo carregado, e (B) modelo de dessorção de íons.



Durante o processo de ionização, são comuns de serem formados íons multicarregados ( $z > 1$ ). Nestes casos, como o espectrômetro reconhece a relação massa/carga ( $m/z$ ), o resultado aparecerá com a massa do analito dividida pelo número de cargas presentes na molécula. Entretanto é possível estimar a presença de múltiplas cargas através da relação isotópica da amostra, ou seja, pela presença natural de isótopos de  $^{13}\text{C}$  ou  $^2\text{H}$  (principais isótopos encontrados em biomoléculas), entre outros. Tomemos como exemplo composto fictício de massa molecular de 199 Da, que apresentou um espectro de massa de  $m/z$  200  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . É de se esperar o aparecimento de um íon de menor abundância de  $m/z$  201  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , decorrente da presença de um isotópologo com massa molecular de 200 Da. Agora imaginemos que este composto permite ser duplamente carregado ( $z = 2$ ), então teremos um composto iônico de massa 201 Da, que aparecerá no espectrômetro como  $m/z$  100,5  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ . Já o seu isotópologo aparecerá com  $m/z$  101  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ . A diferença inicial dos isotópologos mono-carregados era 1 Da, e como a massa dos íons duplamente carregados foi dividida por dois, a diferença passou a ser de 0,5 Da (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

#### 1.4.6. Ionização química a pressão atmosférica (APCI - *Atmospheric Chemical Pressure Ionization*)

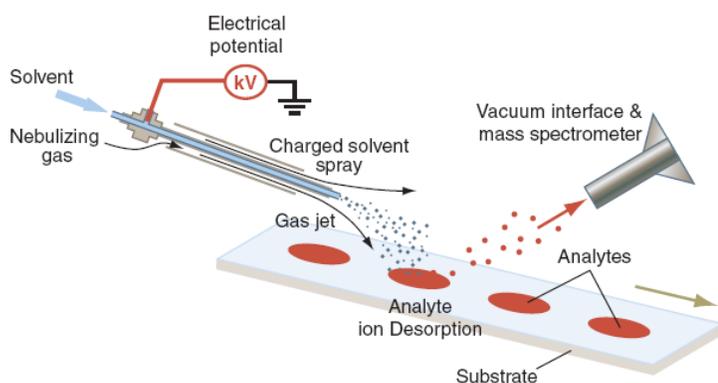
APCI é uma técnica de ionização similar à CI, entretanto como o próprio nome sugere, ocorre em pressão atmosférica. Este tipo de ionização é geralmente aplicado juntamente com fonte de *electrospray*, permitindo altas taxas de fluxo de solvente, e, portanto pode ser utilizado em sistemas mistos de cromatografia líquida-

espectrometria de massas (LC-MS – *liquid chromatography-mass spectrometry*). APCI é normalmente aplicada moléculas polares ou pouco polares, sendo que a massa molecular não deve ser maior que 1500 Da (ARDREY, 2003, HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

#### 1.4.7. Ionização por dessorção de spray de elétrons (DESI – *Desorption Electrospray Ionization*)

DESI é uma nova tecnologia de ionização baseada nos conceitos do ESI, entretanto sua principal característica é que a amostra pode ser depositada em alguma superfície, como teflon ou papel, ou ainda a ionização pode ser feita *in-situ*, sem a necessidade de preparo das amostras. Este tipo de ionização conhecido como *ambient ionization*, ou seja, a ionização pode ocorrer fora do espectrômetro, foi desenvolvido por Robert Graham Cooks na *Purdue University*. Nele a superfície onde a amostra esta depositada recebe um jato de spray, com solvente apropriado, em alta velocidade, provocando a dessorção e ionização do analito e conseqüentemente transferência dos íons para fase gasosa, pelos mesmos princípios do ESI (Figura 7). Em recente trabalho, a equipe de Cooks demonstrou um importante papel para análises forenses, recriando uma impressão digital através do DESI, com o mapeamento da presença drogas (TAKÁTS et al., 2004; COOKS et al., 2006; HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007; IFA et al., 2008).

**Figura 7** – Fonte de ionização do tipo DESI



Fonte: COOKS et al, 2006

#### 1.4.8. Outras fontes de íons

- **Ionização de Campo (FI – *Field Ionization*)** – O analito é submetido a um campo elétrico muito forte para produzir íons através da remoção de um elétron. Porém, assim como em EI e CI só pode ser aplicado em fase gasosa, contudo diferente de EI produz essencialmente íons moleculares (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

- **Dessorção de Campo (FD – *Field Desorption*)** – O ionização ocorre de forma análoga ao FI, entretanto o analito não precisa ser volátil. Neste caso ele é depositado em um filamento de tungstênio ou rênio, e então um potencial elétrico produzido entre o filamento e um eletrodo. O aquecimento do filamento e o potencial elétrico provocam a transferência do analito para fase gasosa na forma de íon (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

- **Dessorção por plasma (PD - *Plasma Desorption*)** – a amostra é depositada em uma folha de alumínio e é bombardeada por um feixe de plasma na ordem de MeV, produzido pela fissão do Califórnio-252 (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

- ***Thermospray*** – Este sistema é um dos principais antecessores do ESI, no qual o solvente contendo o analito passa por um capilar de aço sob altas temperaturas, o que promove o rápido aquecimento do solvente. Um spray é formado quando a amostra passa por uma câmara sob vácuo e os íons formados são repelidos para o analisador (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

- ***Nanoelectrospray*** – Consiste de uma miniaturização da fonte ESI, no que diz respeito a diâmetros de capilares e fluxo de solventes. Produz conseqüentemente um spray com gotículas tipicamente menores que 200 nm, com menos energia do que é necessário nas fontes ESI (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

- ***PhotoSpray*<sup>TM</sup>** – A ionização ocorre em pressão atmosférica, e utiliza radiação UV para ionizar um agente químico chamado de dopante, que irá ionizar os analitos por transferência de prótons. Desenvolvido para intensificar a resposta à ionização de compostos de baixa polaridade (Applied Biosystems)

- **Análise direta em tempo real (DART – *Direct Analysis in Real Time*)** – semelhante ao DESI, contudo a ionização ocorre através de um feixe de He ou N, excitados por energia eletrônica ou vibracional, causando a ionização das moléculas (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

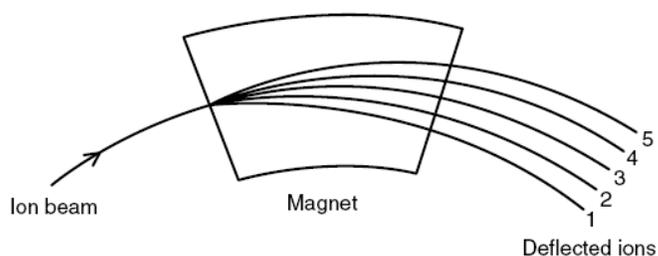
## 1.5. ANALISADORES DE MASSAS

A fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz os íons a partir dos analítos, e realiza sua transferência para a fase gasosa (nos casos onde a ionização não precisa ocorrer direto em amostra voláteis). Estes íons são então levados para dentro do espectrômetro, sob um ambiente de vácuo, e então conduzidos até o detector. A base da espectrometria de massas é a separação destes íons por suas diferenças de  $m/z$ . Para atender esta necessidade, foram desenvolvidas diferentes formas para controlar a trajetória desses íons através do espectrômetro, que são realizadas por campos elétricos e magnéticos, chamados de analisadores de massas (na realidade são analisadores de íons, ou  $m/z$ ), e são quase tão diversificados quanto as fontes de íons.

### 1.5.1. Analisadores de Setor

Um analisador de massas de setor utiliza um campo elétrico estático, ou um setor magnético (ou ainda a combinação dos dois) para afetar a trajetória e a velocidade dos íons até sua chegada ao detector. Os íons são submetidos a uma trajetória circular, e íons com maiores valores de  $m/z$  percorrem uma trajetória maior enquanto que íons de menor valor de  $m/z$  percorrem uma trajetória menor, e assim são separados (Figura 8). Como estes campos elétricos ou magnéticos alteram o percurso dos íons durante sua passagem, eles podem ser utilizados para selecionar apenas íons desejados para que estes sejam posteriormente fragmentados (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

**Figura 8** – Analisador de setor magnético

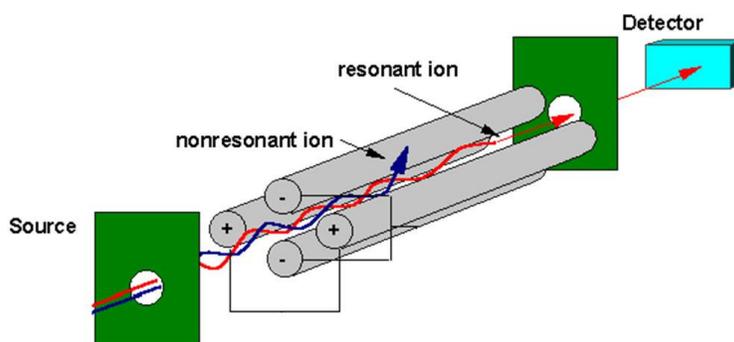


Fonte: HERBERT e JOHNSTONE, 2003

### 1.5.2. Quadrupolares (Q – *Quadrupole*)

Analisadores quadrupolares utilizam campos elétricos oscilantes, gerados por quatro barras metálicas (eletrodos), para estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, de acordo com seus valores de  $m/z$ , durante sua passagem pelo centro do quadrupólo (Figura 9). O campo elétrico oscilante é gerado nos eletrodos pela aplicação de potenciais de corrente-direta (DC – *direct-current*) e rádio-freqüência (RF). Através de variações sistemáticas nos valores de DC e RF, a trajetória dos íons é estabilizada ou desestabilizada, assim o quadrupolo funciona como um filtro. Isso permite que os íons de diferentes valores de  $m/z$  cheguem com tempos diferentes ao detector, e desta forma pode ser diferenciados. Este mesmo princípio pode ser utilizado para estabilizar a trajetória de apenas um íon desejado, que pode ser posteriormente fragmentado, como será visto posteriormente (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

**Figura 9** – Representação esquemática de um quadrupólo



Fonte: <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>

### 1.5.3. Armadilha de íons (IT – *Ion Trap*, ou QIT – *Quadrupole Ion Trap*)

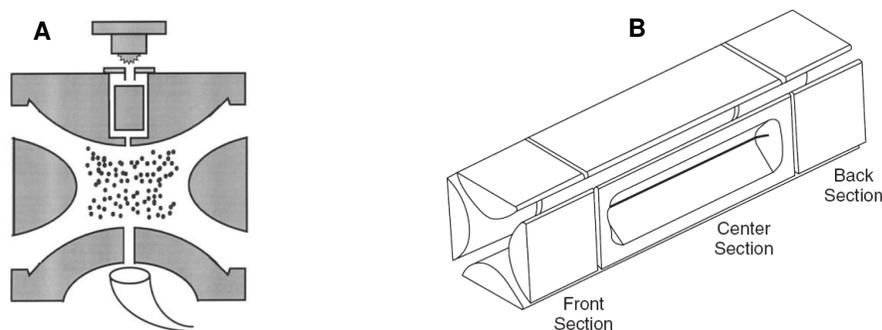
Analisador do tipo *Paul trap*, mais conhecidos como *quadrupole ion trap* ou simplesmente *ion trap*, foi desenvolvido por Wolfgang Paul em 1960, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Física em 1989 (TODD, 1991; MARCH, 2005).

Os analisadores do tipo IT, operam por princípios físicos semelhantes aos do quadrupolares. Contudo, neste caso os íons não mais descrevem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, e sim são aprisionados nele (por isso no nome armadilha de íons). Outra diferença trata-se da arquitetura dos eletrodos, que agora são 3, sendo que o central tem um formato circular, e os dois das extremidades tem geometria hiperbólica, para criar um campo elétrico quadrupolar em 3-D (Figura 10 A). Este campo elétrico mantém os íons em uma órbita estável em seu interior, contudo os íons são ejetados para fora do analisador pela aplicação de uma rampa crescente de RF, que conseqüentemente desestabiliza os íons ejetando-os em direção ao detector, de forma crescente de acordo com seus valores de  $m/z$  (MARCH, 2005; DASS, 2007).

Uma versão recente do IT 3-D é o analisador do tipo armadilha linear de íons (LIT – *linear ion trap*), que opera pelos mesmos princípios do IT, contudo criando um campo elétrico 2-D. Sua arquitetura, no entanto, é baseada no quadrupolo, ou seja, apresenta quatro barras metálicas dispostas paralelamente (Figura 10 B), para criar um ambiente quadrupolar em seu interior (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Devido a sua capacidade única de manter os íons aprisionados em seu interior, estes analisadores são capazes de proporcionar diversas ciclos fragmentação, num processo chamado na espectrometria de massas de tandem- $MS^n$ , onde  $n$  representa o número de fragmentações realizadas no analito.

**Figura 10** – Representações esquemáticas dos analisadores do tipo *ion trap*



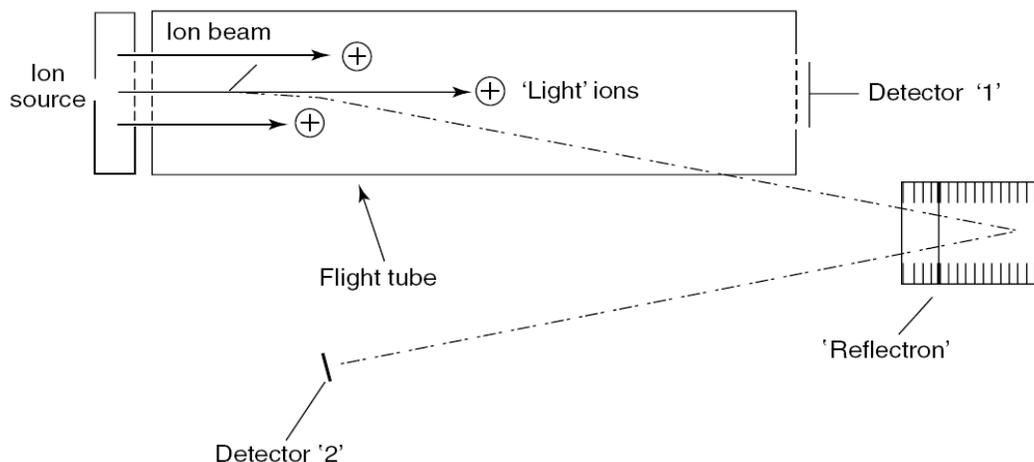
(A) 3D - *ion trap* (fonte: MARCH, 1997), e (B) *ion trap* linear (fonte: MARCH, 2005)

#### 1.5.4. Tempo de Vôo (TOF – *Time of flight*)

Detectores de tempo de vôo são baseados no princípio de que os íons com mesma carga têm energias cinéticas iguais, e sua velocidade será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Então se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com “tempos de vôo” diferentes. Assim, o íon de menor valor de  $m/z$  (menor massa neste caso) atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

O funcionamento deste tipo de analisador é fundamentalmente diferente dos demais já descritos. Para o funcionamento do TOF, é imprescindível que todos os íons formados na fonte (incluindo os com diferentes massas), entrem no analisador ao mesmo tempo, pois só assim será possível determinar o tempo que cada íon levou para percorrer toda a extensão do analisador. Para aumentar a distância percorrida pelos íons, refletores são posicionados nos analisadores, o que permite aumentar a precisão do analisador (Figura 11).

**Figura 11** – Representação esquemática do analisador TOF



Fonte: ARDREY, 2003

### 1.5.5. Analisadores com Transformada de Fourier (FT- *Fourier-transform*)

Duas principais configurações utilizam a Transformada de Fourier para converter os sinais de onda prescritos pela órbita dos íons em sinais referentes ao espectro de massas ( $m/z$ ): o analisador do tipo Orbitrap™ e o analisador de ressonância de íon ciclotron (ICR – *ion cyclotron resonance*).

O conceito do ICR foi descrito por Lawrence e Edlefsen em 1930, sendo mais tarde aplicado à espectrometria de massas (SOMMER et al., 1949). Contudo, apenas em 1974 foi desenvolvida a tecnologia de FT-ICR (COMISAROW e MARSHALL, 1974a). O conceito do ICR é similar, em alguns pontos, ao do tradicional *trap*, que aqui recebe o nome de *penning trap*, operando por fortes campos magnéticos e elétricos estáticos, a fim de aprisionar os íons. Estes íons ali aprisionados são excitados por pulsos de RF para que descrevam órbitas coerentes, e com detectores são medidos os sinais elétricos dos íons que passam próximos a eles ao longo de um período, produzindo um sinal periódico. Como a frequência de um íon em sua órbita é determinada pelo seu  $m/z$ , os sinais detectados são posteriormente deconvoluídos pela aplicação da FT, de forma semelhante de como ocorre na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (COMISAROW e MARSHALL, 1974a,b; 1975 e 1996; WANCZEK, 1984). O analisador do tipo Orbitrap™ opera de maneira muito similar ao ICR, contudo os íons são aprisionados no interior do *trap* apenas por um campo elétrico, e passam orbitar ao redor de um eletrodo central com oscilações harmônicas, das quais são obtidas as frequências em então deconvoluídas pela FT (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

### 1.5.6. Analisadores de mobilidade de íons (IM – *Ion Mobility*)

Outra tecnologia recente que incluiu uma nova dimensão nas análises por espectrometria de massas. Os analisadores de mobilidade iônica fazem parte de espectrômetros híbridos, os quais combinam tecnologias tradicionais, com analisadores capazes de diferenciar moléculas de mesma razão massa/carga, porém com conformações diferentes. Um exemplo fácil para o entendimento pode ser dado para análise de uma proteína, porém parte em seu estado nativo e parte desnaturada, mas sem degradação da estrutura primária. Estas proteínas terão

conformações diferentes, mas ambas apresentam mesma massa e portanto o mesmo valor de  $m/z$  quando analisadas por um simples analisador de massas. Quando analisadas por IM um gráfico bi-dimensional será obtido, em um dos eixos será fornecido o  $m/z$  (que será o mesmo), e no outro eixo serão obtidos dois sinais, referentes a diferenças na mobilidade das duas proteínas através do analisador. Outro exemplo prático desta tecnologia aplicado à análise de carboidratos pode ser dado pela separação de monossacarídeos na forma de metil-glicosídeos. A forma de metil-glicosídeos é importante para permitir a manutenção da configuração anomérica, e com isso foi conseguido obter a separação dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$  metil-glicosídeos, bem como a separação de seus epímeros, como por exemplo, metil-galactosídeo de metil-glucosídeo (DWIVEDI et al., 2007). Isômeros de oligossacarídeos também podem ser diferenciados por esta técnica, sendo que a separação pode ser alcançada devido a diferenças conformacionais que as ligações  $\alpha$  e  $\beta$  causam nas moléculas (LEE et al., 1997, CLOWERS et al., 2005).

A base para este tipo de separação reside na presença de uma câmara específica chamada de *drift chamber* (câmara de deslizamento) a qual é preenchida por um tipo de gás (argônio, por exemplo) oferecendo certa resistência para o deslocamento dos íons no seu interior. Lá os íons são submetidos a um campo elétrico uniforme, que conduz os íons através da câmara. A separação dos íons é então obtida pelos efeitos combinados do campo elétrico impulsionando os íons em direção ao detector, e do gás presente na câmara que tende a retardar os íons. Desta forma, moléculas com conformações mais volumosas tendem a percorrer a câmara mais lentamente, quando comparadas com moléculas de mesma massa, porém mais compactadas (CLEMMER et al., 1997; WU et al., 1998).

## 1.6. DETECTORES

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens.

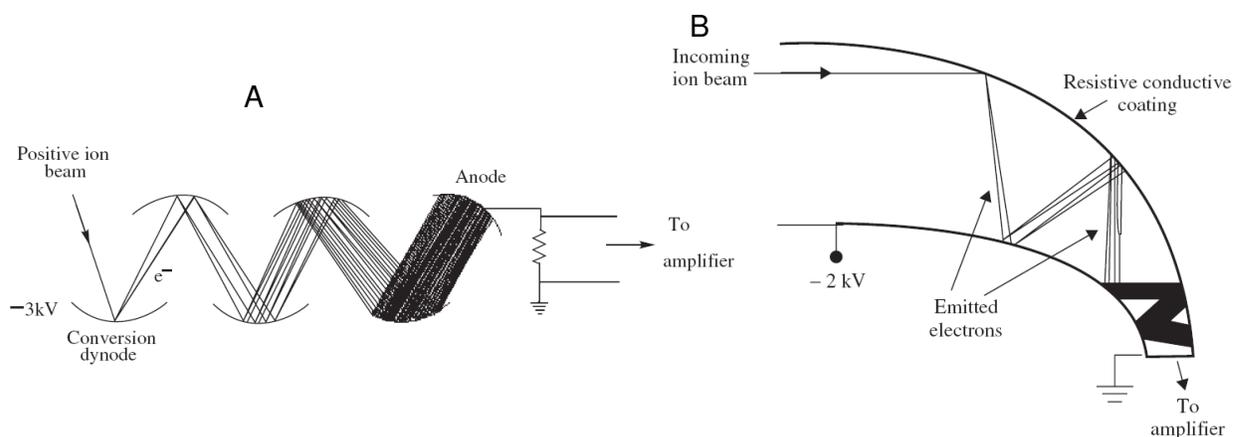
### 1.6.1. Faraday cup

Detecta os íons através da medição direta das cargas através de um eletrodo de condutância. Embora robustos estes detectores não são utilizados em espectrômetros que operam em modo varredura devido sua baixa sensibilidade e baixo tempo de resposta (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

### 1.6.2. Multiplicadores de elétrons (EM – *Electron Multiplier*)

Estão entre os detectores mais utilizados nos espectrômetros atuais. Funcionam pela emissão de elétrons secundários produzidos por *dynodes* quando os íons provenientes dos analisadores chocam-se a eles. Existem dois tipos de multiplicadores de elétrons: *discrete-dynode*, constituído por 16 a 20 *dynodes*, geralmente constituídos de cobre e berílio (Figura 12 A) e o *continuous-dynode*, no qual a superfície atua como um eletrodo contínuo (Figura 12 B). Em ambos os detectores os íons, provenientes do analisador, chocam-se com a superfície interna do *dynode*, e são refletidos, num processo que se repete varias vezes. Em cada um destes choques, cada íon emitido remove elétrons da superfície interna do detector, e como o processo se repete (chamado de efeito cascata), ao final cada íon incidente pode ser amplificado na ordem de  $10^6$  a  $10^8$  (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

Figura 12 – representação de multiplicadores de elétrons



(A) *discrete dynode*, e (B) *continuous-dynode*. Fonte: DASS 2007

### 1.6.3. Multiplicadores de fótons

Seu funcionamento é similar ao multiplicador de elétrons, porém o feixe de íons quando atingem o detector é convertido em fótons e então amplificado. Sua construção também é semelhante ao EM, mas no lugar do *dynode* existe um fotocátodo, recoberto por um material emissor de fótons (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

### 1.7. ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO *TANDEM-MS*

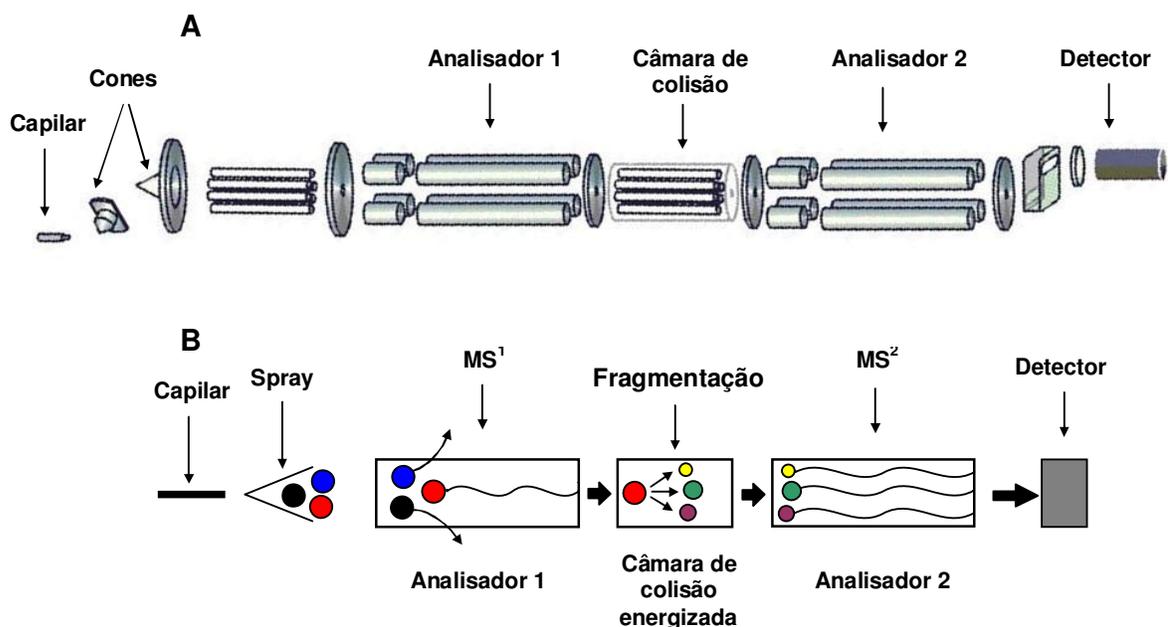
*Tandem-MS* pode ser entendido como espectrometria de massas de modo seqüencial, ou seja, uma seqüência de análise que envolve pelos menos três estágios. O primeiro estágio é a seleção de um íon precursor (assim chamado porque dele serão formados outros íons). O segundo estágio consiste na ruptura deste íon precursor para gerar íons-fragmentos (antigamente chamados de íons filhos numa adaptação do inglês *daughter ions*). O terceiro estágio compreende a análise e detecção destes fragmentos formados pelos métodos já descritos (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

Para realização de análises do tipo *tandem-MS*, também chamadas de MS/MS ou MS<sup>n</sup>, é necessário equipamentos apropriados que permitam a seleção específica de cada íon desejado. As configurações mais comuns são os triplo-quadrupólos (Q-Q-Q) (Figura 13 A), quadrupólo-TOF, TOF/TOF, que são equipamentos que apresentam três componentes em seqüência, sendo dois analisadores separados por uma câmara de fragmentação. Nestes casos o íon precursor é selecionado no primeiro analisador (chamado de MS<sup>1</sup>) e então somente ele passa pelo segundo quadrupólo, que é uma câmara adaptada para realizar a fragmentação do íon precursor, chamado de câmara de colisão. Neste caso, o modo mais comum de se obter fragmentos é através da dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*, também conhecida como CAD – *collisionally activated dissociation* – dissociação ativada por colisão). Neste processo, a câmara de colisão é preenchida com um gás inerte, como argônio (hélio e xenônio também podem ser utilizados dependendo do tipo de espectrômetro), e então os íons são acelerados pela aplicação de altos campos elétricos. Duas etapas são importantes

neste processo, a ativação por colisão, onde a energia translacional resultante é convertida em energia interna, tornando as moléculas energeticamente excitadas, e a dissociação uni-molecular, processo pelo qual as moléculas excitadas sofrem a dissociação. Os fragmentos formados serão analisados pelo terceiro quadrupólo (segundo analisador -  $MS^2$ ) antes de chegar até o detector (Figura 13 B) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

Devido à sua arquitetura, estes espectrômetros são capazes realizar apenas um ciclo de fragmentação, exceto quando a fragmentação já ocorre na fonte e é chamada de *in-source fragmentation*. Contudo estes espectrômetros podem ser construídos de forma contínua, para formar por exemplo os penta-quadrupólo, o qual com duas câmaras de colisão permitem dois ciclos de fragmentação (existem poucos penta-quadrupólos no mundo, um deles esta na Unicamp). Contudo, existem outras plataformas que permitem vários ciclos de fragmentação, permitindo realização de  $MS^n$ , no qual  $n$  representa “infinitos” ciclos de fragmentação. Estes espectrômetros são construídos com a tecnologia dos *traps*, os quais são capazes de aprisionar seletivamente os íons por vários ciclos (MARCH, 2005).

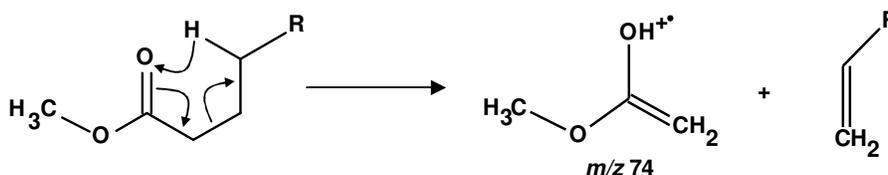
Figura 13 – Modelo de triplo quadrupólo preparado para *tandem-MS*



(A) Triplo quadrupólo, fonte: Manual de operações da Waters, (B) esquema de seleção do íon precursor e sua fragmentação

Durante os processos de fragmentação são comuns de serem obtidos fragmentos primários, aqueles produzidos por simples quebras das ligações covalentes. Contudo, outros fragmentos podem ser mais difíceis de serem interpretados, são os chamados de fragmentos secundários, produtos de rearranjos moleculares ocorridos durante o processo de fragmentação. Um dos rearranjos mais conhecidos é chamado de McLafferty, em homenagem a Fred W. McLafferty quem o descreveu. Este tipo de rearranjo ocorre quando uma molécula contendo um grupo carbonílico (como um ácido graxo metil éster) passa por uma clivagem do tipo  $\beta$ , que leva a formação de um íon radicalar (Figura 14) (McLafferty, 1959; IUPAC, 2006).

Figura 14 – Rearranjo McLafferty



Típica formação do íon de  $m/z$  74 a partir de ácidos graxos metil éster

## 1.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

“Cromatografia é um método de separação física na qual os componentes que serão separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (fase estacionária), enquanto a outra (fase móvel) se move em uma direção definida” (IUPAC, 2006).

As amostras a serem analisadas podem ser inseridas diretamente na fonte ionização num processo chamado de análise *off-line*, ou então podem passar algum tipo separação cromatográfica a caminho da fonte de ionização, neste caso a análise é conhecida como *on-line*. Análises *on-line* são geralmente obtidas através do acoplamento de um sistema de cromatografia gasosa (GC) ou líquida (LC) a um

determinado tipo de espectrômetro de massas, mais recentemente sistemas de eletroforese capilar (CE) também têm sido acoplados ao espectrômetro de massas.

### **1.8.1. Cromatografia em fase gasosa**

A cromatografia gasosa ou líquido/gasosa foi introduzida em 1952 por James e Martin (JAMES, 1952; JAMES e MARTIN, 1952a,b). Sua operação básica é a volatilização e a transferência dos analitos para uma coluna cromatográfica, através de uma interface aquecida chamada de injetor. A coluna cromatográfica também é aquecida de forma controlada podendo criar rampas com temperaturas desejadas, e para movimentar a amostra dentro da coluna usa-se um gás inerte, como hélio ou nitrogênio, que é chamado de gás de arraste, o qual faz o papel da fase móvel (KITSON et al., 1996). A aplicação desta técnica é ampla, contudo sua principal limitação deve-se ao fato de que os analitos devem ser voláteis e estáveis nas condições de análise.

A identificação dos compostos utilizando apenas o sistema de cromatografia pelo seu tempo de eluição através da coluna era bastante difícil. A identificação muitas vezes tinha que ser feita posteriormente, através da coleta do analito, geralmente feita borbulhando o efluente da coluna em solvente ou então em condensadores apropriados (chamados de *cold trap*), para só então realizar a identificação por infravermelho ou por espectrometria de massas. Contudo não demorou muito para que as técnicas de cromatografia gasosa e de espectrometria de massas fossem acopladas, dando origem ao GC-MS. Um dos primeiros relatos (senão o primeiro) sobre esta interface entre o GC e o MS é de Gohlke (1959). Hoje em dia a técnica GC-MS é muito difundida, sendo que várias configurações podem ser encontradas. Uma das mais comuns é o GC-MS utilizando ionização eletrônica com detector do tipo *ion trap*.

### **1.8.2. Cromatografia líquida de alta eficiência**

Diferente da cromatografia gasosa, onde tanto o analito quanto a fase móvel são gases, na cromatografia líquida a amostra é introduzida na coluna de separação dissolvida em um líquido (solvente). Nos sistemas modernos, uma bomba impulsiona

o solvente, e conseqüentemente o analito, através da coluna de separação até sua chegada ao detector. As bombas e as colunas devem estar preparadas para suportar grandes pressões (até  $4 \times 10^7$  Pa, nos sistemas convencionais, ou maiores, como nos sistemas de *fast-HPLC* ou UPLC – *ultra performance liquid chromatography* – que suportam cerca de 2 a 3 vezes mais pressão). O fluxo pode ser controlado através da bomba, que permite também a realização de sistemas de gradientes de solventes, no qual é possível utilizar vários solventes e controlar seu fluxo individualmente, permitindo alterar suas concentrações durante uma corrida. A fase móvel é de modo geral composta por misturas de solventes orgânicos, ou solventes orgânicos e água. As técnicas *on-line* de LC-MS permitem a transferência de uma parte do efluente da coluna para fonte de ionização, que tipicamente é do tipo *electrospray* (ARDREY, 2003).

O uso de um determinado tipo de coluna em um processo de fracionamento muitas vezes não é suficiente para assegurar a completa separação de compostos em misturas complexas. Recentemente, metodologias multi-dimensionais têm sido desenvolvidas em cromatografia líquida, como por exemplo LC bidimensional (2D-LC), a qual tem sido empregada de forma eficiente na separação e identificação de uma ampla variedade de compostos. 2D-LC consiste de duas separações cromatográficas distintas, na qual todo o efluente proveniente da primeira dimensão (primeira coluna, por exemplo) é transferido para a segunda dimensão em várias pequenas frações, esta técnica é conhecida como abrangente (*comprehensive 2D-LC*). Outra técnica, conhecida como *heart-cutting 2D-LC*, implica na transferência apenas da porção que é considerada de interesse do efluente da primeira dimensão para a segunda dimensão (STOLL et al., 2007). Técnicas bi-dimensionais mais comuns consistem de troca iônica x fase reversa, e exclusão estérica x fase reversa. Ambas as técnicas podem ser acompanhadas por detecção de massas, sendo então consideradas como análises multi-dimensionais.

## 1.9. APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS

A espectrometria de massas tem se tornado cada vez mais indispensável na caracterização estrutural de biomoléculas. Devido à sua alta sensibilidade e rápida análise, ela é a técnica de primeira escolha nos processos analíticos. Suas

aplicações são ilimitadas, podendo ser utilizadas na caracterização de proteínas e peptídeos, carboidratos como oligossacarídeos e glicoconjugados, lipídeos, produtos do metabolismo secundário, entre outras aplicações. Neste trabalho serão apresentadas aplicações da espectrometria de massas na análise estrutural de oligossacarídeos, lipídeos – incluindo fosfolipídeos e glicolipídeos, flavonóides – incluindo taninos e glicosídeos.

## 1.10. OLIGOSSACARÍDEOS

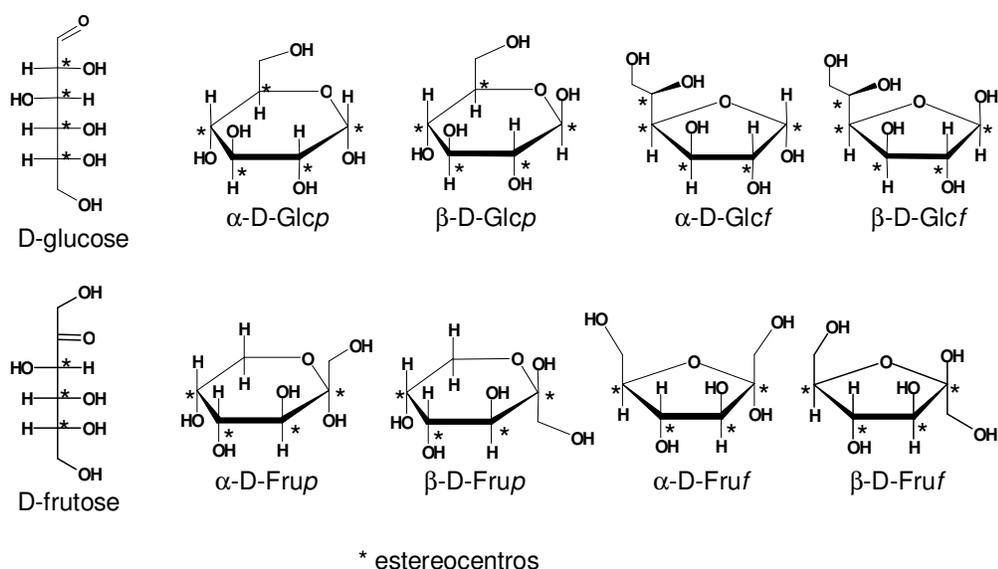
Oligossacarídeos são moléculas formadas pela ligação de dois ou mais monossacarídeos, através de ligações conhecidas como glicosídicas, ocorrendo entre a hidroxila ligada ao carbono anomérico (carbonos 1 ou 2 dependendo do tipo de monossacarídeo) de uma unidade e qualquer outra hidroxila livre da outra unidade, com conseqüente perda de uma unidade de água (STANEK et al., 1965; PAOLETTI & JOHNSON, 1995). Estruturas com mais de 10 unidades monossacarídicas são chamadas de polissacarídeos, embora de forma geral polissacarídeos sejam formados por centenas de monossacarídeos.

Os oligossacarídeos são classificados de acordo com a sua origem, em oligossacarídeos primários e secundários. Oligossacarídeos primários são aqueles sintetizados *in vivo* a partir de mono ou oligossacarídeos, pela ação de uma glicosiltransferase. Já oligossacarídeos secundários são aqueles originários por algum tipo de hidrólise ácida ou enzimática, quer *in vivo* ou *in vitro*, sendo originados de oligossacarídeos maiores, polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, ou outros glicoconjugados, (KANDLER e HOPF, 1980).

A determinação da estrutura química completa de oligossacarídeos é mais difícil do que para proteínas ou oligonucleotídeos porque envolve a determinação de outras características peculiares aos carboidratos, principalmente pela sua extensiva capacidade de formar isômeros. Por exemplo, um simples monossacarídeo composto por 6 átomos de carbono pode apresentar 4 centros quirais, gerando  $2^4 = 16$  combinações isoméricas diferentes. Além disso, carboidratos apresentam um tendência a ciclização, e com isso ganha-se um centro quiral extra no carbono anomérico que pode estar na configuração  $\alpha$  ou  $\beta$ . Contudo, ainda a ciclização pode ocorrer entre o carbono 1 e os carbonos 4 ou 5, formando anéis com configuração furanosídica ou piranosídica, respectivamente. Desta forma são teóricamente

possíveis até 64 isômeros para um monossacarídeo do tipo aldohexose (como a glucose), composto por 6 átomos de carbono (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). Entretanto, os monossacarídeos ainda podem variar na sua composição de carbonos, tipicamente de 3 a 6 átomos, mas monossacarídeos com 7 carbonos também são encontrados. Eles ainda podem ter origem de polihidroxialdeídos ou polihidroxicetonas, o que permite um aumento considerável no número de monossacarídeos diferentes (Figura 15).

**Figura 15** - Configurações possíveis para D-glucose e D-frutose



Somando-se a tudo isso, os oligossacarídeos ainda podem estar ligados a diferentes posições de suas unidade adjacentes, ou seja, uma hexose (monossacarídeos de 6 átomos de carbono) na configuração piranosídica permite ligações nos carbonos 1, 2, 3, 4 e 6, e na configuração furanosídica o carbono 4 está indisponível, contudo liberando o carbono 5. Com isso, diversos tipos de oligossacarídeos podem ser formados apenas com dois tipos de monossacarídeos.

Oligossacarídeos são moléculas conhecidas por participarem de processos de reconhecimento célula-célula, célula-hospedeiro e ainda podem estar vinculados diversas doenças. Eles podem estar na sua forma livre, ou ainda conjugados com diversas outras estruturas, como lipídeos e proteínas, formando estruturas complexas chamadas de glicoconjugados. Assim eles podem exercer a sua

influência no organismo através de interações seletivas, por exemplo, com proteínas celulares de superfície. Carboidratos apresentam reconhecida capacidade imunogênica e também estão envolvidos na diferenciação dos grupos sanguíneos (KARLSSON et al., 2004).

Devido ao alto grau de complexidade e também de sua grande importância, a caracterização da estrutura química de oligossacarídeos é um campo altamente significativo de estudo. Os principais métodos utilizados são degradações químicas ou enzimáticas seguidas da análise dos monossacarídeos constituintes através de métodos cromatográficos, como cromatografia gasosa e/ou líquida. Embora um pouco mais complexa, já que necessita que os monossacarídeos sejam derivatizados para se tornarem voláteis, a cromatografia gasosa detém a preferência nas análises devido a sua alta eficiência de separação. Com o acoplamento da espectrometria de massas à estes métodos cromatográficos, este tipo de análise tornou-se muito mais confiável, e com o desenvolvimento de derivatizações químicas específicas para identificação das ligações glicosídicas, estas metodologias tornaram-se indispensáveis para química de carboidratos.

Contudo, a análise de oligossacarídeos intactos por espectrometria de massas ainda é uma tarefa difícil, já que os tipos de ligações e os isômeros nem sempre são distinguíveis por MS. Porém o desenvolvimento destas análises é indispensável, pois fornecem informações importantíssimas sobre o tamanho do oligossacarídeo e através de *tandem-MS* ainda fornecem a seqüência das unidades monossacarídicas, principalmente quando se trata de glicoconjugados.

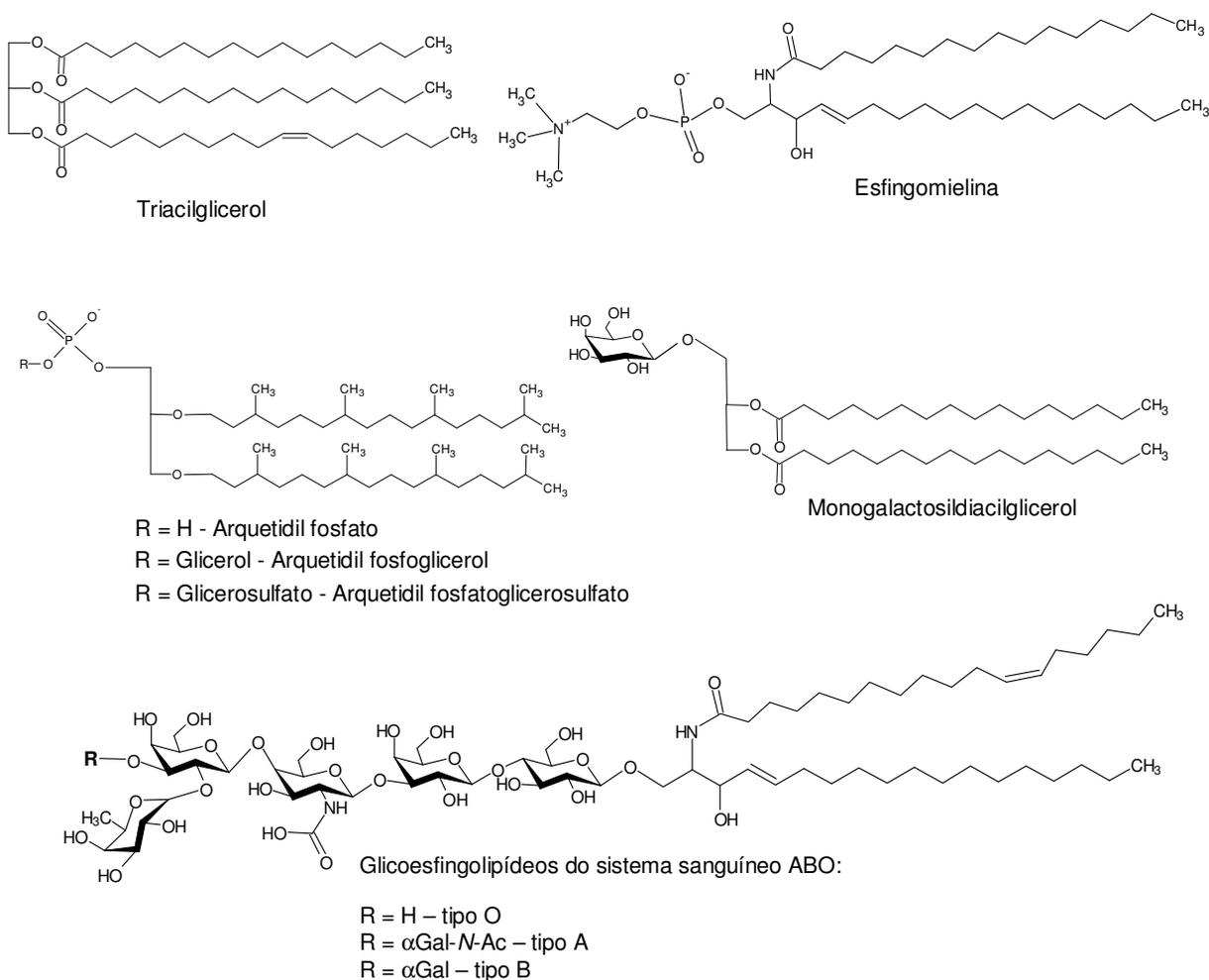
## **1.11. LIPÍDEOS**

Os lipídeos constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente variáveis, exibem características comuns, como a de apresentarem cadeias hidrofóbicas. De acordo com sua grande variabilidade estrutural (Figura 16), suas funções biológicas também são igualmente diversas. Em muitos organismos, óleos e gorduras são as principais formas de armazenar energia, enquanto os fosfolipídeos e os esteróis constituem perto de metade da massa das membranas biológicas. Alguns lipídeos estão, ainda, envolvidos com vários fenômenos celulares, como: receptores para toxinas, interações célula-célula ou célula-parasita, pigmentos que absorvem radiações luminosas, âncoras hidrofóbicas, podendo atuar também como

mensageiros intracelulares (KOCHETKOV & SMIRNOVA, 1986; HAKOMORI, 1990; MUNNIK, 1998; 2001; GRIFFITTS et al., 2005).

Lipídeos são importantes componentes das membranas biológicas, sendo que muitas funções das membranas são afetadas por alterações na composição lipídica. O metabolismo de lipídeos é conhecido por ser fortemente afetado por estresses ambientais, como estresses hídricos e contaminações por metais pesados os quais resultam em alterações na composição de ácidos graxos, reduzindo o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, como também afetando a biossíntese de glicolipídeos (MATSON et al., 1972; JONES et al., 1987; HARWOOD, 1994).

**Figura 16 – Estruturas de alguns tipos lipídeos e substituintes**



### 1.11.1. Fosfolipídeos

Grande parte dos lipídeos presentes nas membranas apresenta em comum em sua estrutura grupamentos fosfatos, estes lipídeos são anfipáticos, a orientação das suas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dirige a sua posição nas bicamadas da membrana. Os três tipos gerais de lipídeos de membrana são: glicerofosfolipídeos, nos quais as regiões hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos ligados ao glicerol; os esfingolipídeos, no qual o único ácido graxo está unido a uma amina, a esfingosina; e os esteróis, compostos caracterizados por um sistema rígido de quatro anéis hidrocarbônicos fundidos. Os glicerofosfolipídeos e os esfingolipídeos contêm álcoois polares como glicerol, inositol, etc, ou grupos carregados nas suas extremidades, como grupos fosfato, colina, serina, etc. Dentro dessas três classes de lipídeos de membrana aparece uma enorme diversidade de componentes como resultado das variadas combinações de ácidos graxos e substâncias polares.

Uma classe distinta de lipídeos é encontrada em arqueas, particularmente interessante por apresentarem características diferentes de lipídeos de outros organismos, devido à presença de grandes quantidades de éteres-lipídeos (Figura 16). Estes éteres-lipídeos conferem alta resistência a membrana das arqueas, necessários para suportar o alto stress dos ambientes onde são encontradas. Uma estrutura comum, designada como arqueol, é composta de duas cadeias de 20 carbonos ligadas ao glicerol através de ligações do tipo éter. No entanto, arqueias também podem conter lipídeos com cadeias mais curtas (C-15), mais longas (C-25) ligadas ao glicerol (MANCUSO et al., 1985; MATSUBARA et al., 1994), ou ainda uma cadeia carbônica maior, de 40 átomos de carbonos, ligados através de quatro ligações éter a 2 unidades de glicerol (MACALADY et al., 2004; FAHY et al., 2005). Cadeias carbônicas insaturadas são relatadas em arqueas (STIEHL et al., 2005; GIBSON et al., 2005).

A natureza dos diferentes componentes de membrana pode mudar como resposta a mudanças fisiológicas e ambientais (SAJBIDOR, 1997). Como são sensíveis a alterações ambientais estes lipídeos tornam-se importantes sinalizadores celulares. Em resposta a altas concentrações de sais (150 – 500 mM), foi verificado em *Chlamydomonas moewusii* grande acúmulo de ácido fosfatídico (PA) e diacilglicerol pirofosfato (DGPP) de forma dose e tempo dependente (MUNNIK et al., 2000). Ácido fosfatídico pode ser produzido indiretamente via

fosfolipase C (PLC) e diacilglicerol quinase (DAG quinase), ou diretamente via fosfolipase D (PLD), que é capaz de hidrolisar fosfolípidos como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (MUNNIK et al., 1988). O acúmulo de PA e DGPP induzidos pelo aumento na concentração de sais é um forte indício que estas moléculas são mensageiros celulares, ativados em situações de estresse hídrico.

### **1.11.2. Glicolípidos**

Como o próprio nome sugere, glicolípidos são formados pela associação de lipídeos com carboidratos. Diferentes tipos de lipídeos e diferentes tipos de carboidratos podem fazer parte destas estruturas, podendo ser glicoglicerolipídeos, quando o carboidrato e os ácidos graxos estão unidos por uma unidade de glicerol, ou então glicosfingolipídeos, quando o glicerol é substituído pela esfingosina. Glicolípidos têm sido encontrados em todos os organismos vivos, estando presente em procariotos, eucariotos, invertebrados e vertebrados (KOCHETKOV e SMIRNOVA, 1986; CHAPMAN e BARBER, 1987).

Assim como os fosfolípidos, os glicolípidos estão localizados nas membranas biológicas. Assim, através de interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, adotam conformações espaciais específicas possibilitando vários fenômenos relacionados com a superfície celular; como receptores para toxinas virais e bacterianas, interações célula-célula, moduladores bioquímicos, podendo atuar, também no controle de interações biomoleculares (KOCHETKOV e SMIRNOVA, 1986; HAKOMORI, 1990; NYHOLM e PASCHER, 1993; IZARD et al., 1994).

Os glicolípidos mais abundantes encontrados em algas e vegetais são os galactolipídeos e sulfolipídeos. Em termos estruturais os galactolipídeos podem conter uma, duas ou três unidades de galactose ligadas ao glicerol (SASSAKI et al., 1999; 2001a), enquanto no caso do sulfolipídeo o açúcar encontrado é chamado de quinovose, uma desoxihexose com configuração de hidroxilas semelhante a da glucose, e, portanto também é chamada de 6-desoxiglucose. Nestes glicolípidos a unidade de quinovose apresenta um grupo sulfonil (ou seja, com o átomo de enxofre ligado diretamente ao carbono) na posição C-6. Estes lipídeos tem sido descritos em diversos organismos, mas principalmente algas e plantas superiores (BENSON, 1963; BRUSH e PERCIVAL, 1972; KATAOKA e MISAKI, 1983; CHAPMAN e

BARBER, 1987; SASSAKI et al., 2001b). O sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) parece estar envolvido com proteínas de membranas com a função de manter a atividade catalítica das mesmas (ANDERSON, 1975; GOUNARIS e BARBER, 1985). Esta associação ocorre, provavelmente, devido à carga negativa do grupo sulfonato do glicolípido com as cargas positivas das proteínas. Uma importante atividade atribuída ao SQDG (e para o MGDG também) parece estar relacionada com a inibição da enzima transcriptase reversa, com consequente efeito contra o vírus HIV (GUSTAFSON et al., 1989; RESHEF et al., 1997). Atividades relacionadas com a proteção contra alguns tipos de câncer também são relatadas para o MGDG e SQDG (MAEDA et al., 2009)

Alguns glicolípidos apresentam importantes aplicações biotecnológicas, como os ramnolípidos encontrados em *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentam grande potencial surfactante. Estes glicolípidos são compostos por uma ou duas unidades de ramnose, à qual estão ligados dois  $\beta$ -hidroxi-ácidos graxos, tipicamente de cadeias médias, de 8 a 12 átomos de carbono. Insaturações também podem ser encontradas nos ácidos graxos (MONTEIRO et al., 2007). Outra classe de lípidos que também despertam o interesse por suas propriedades surfactantes não se tratam de glicolípidos, mas sim lipopeptídeos, como a surfactina, encontrados geralmente em bactérias do gênero *Bacillus* (BARROS et al., 2007).

## **1.12. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

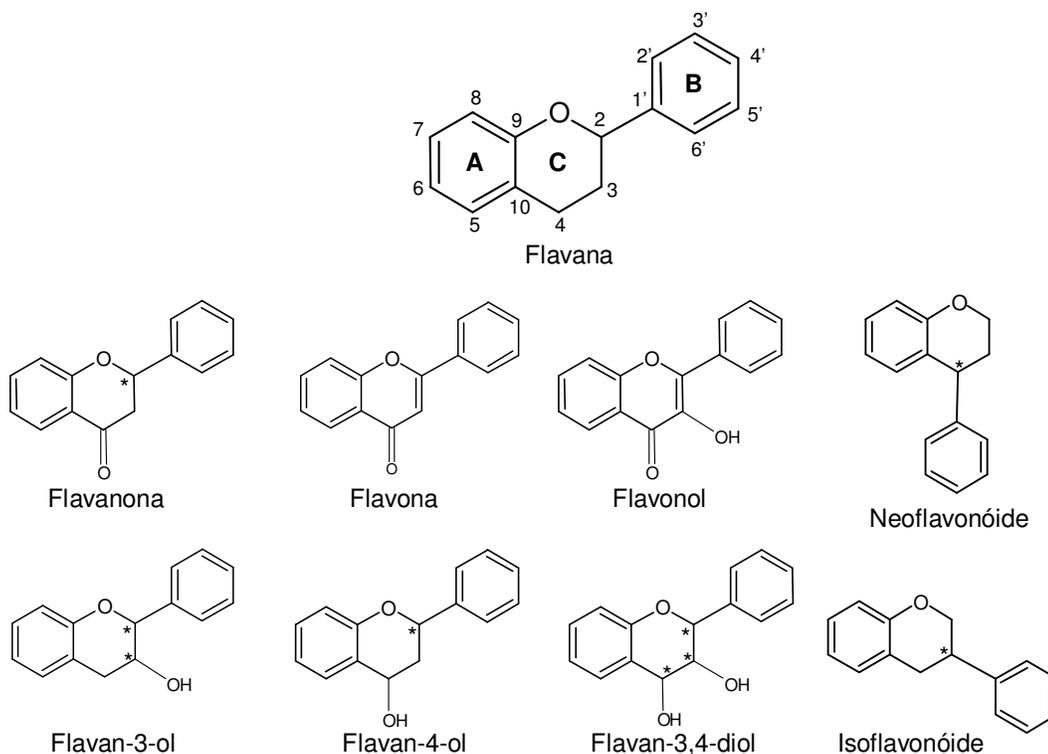
São considerados produtos do metabolismo secundário aqueles produtos que não são fundamentais para sobrevivência de um organismo. De modo geral aqueles compostos que não são lípidos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos.

### **1.12.1. Flavonóides**

Os flavonóides constituem um dos mais característicos grupos de metabólitos presentes em plantas superiores, apresentando uma cadeia carbônica constituída por 15 átomos de carbono distribuídos em 3 anéis, em uma configuração 6:3:6. Os 3 anéis são denominados de A, B e C, sendo que os anéis A e C encontram-se fusionados. Assim os vários subgrupos de flavonóides são classificados de acordo

com o perfil de substituições no anel C, tão bem quanto pelo seu estado de oxidação, podendo ser chamados flavonas, flavonóis, flavonona, flavanóis entre outros (Figura 17). Também de acordo com a posição em que o anel B encontra-se ligado ao anel C, estes compostos podem receber o tradicional nome de flavonóides – quando o anel B está ligado ao carbono 2 do anel C; isoflavonóides – quando o anel B está ligado ao carbono 3 do anel C e neoflavonóides - quando o anel B está ligado ao carbono 4 do anel C (MARAIS et al., 2006).

**Figura 17** – Estruturas básicas dos flavonóides, mostrando a distribuição dos anéis A, B e C, e a numeração de cada carbono



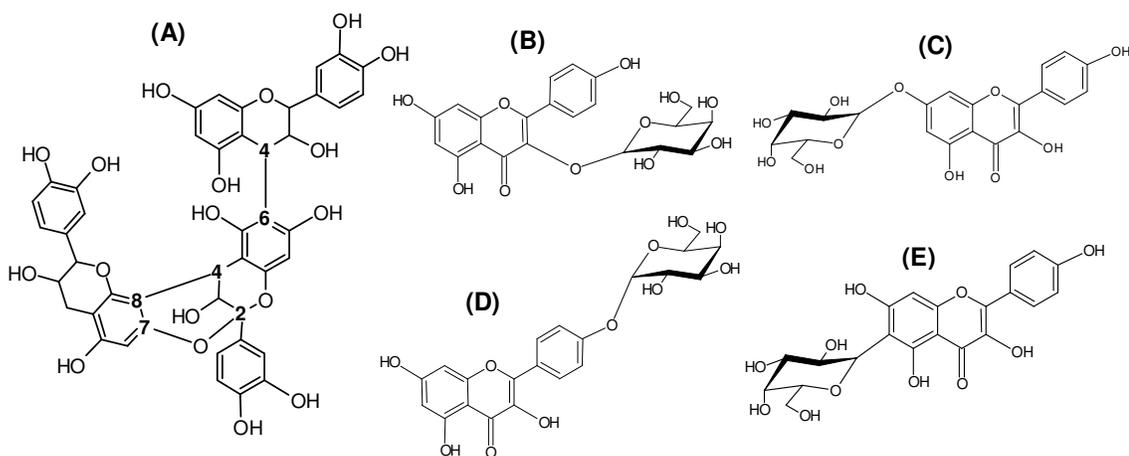
\* indicam estéreocentros

Os flavonóides podem ser encontrados na forma livre, entretanto são comumente encontrados formando oligômeros entre si, via ligações entre C-4→C-8 ou C-4→C-6, dando origem as proantocianidinas do Tipo B (PA-B) e ainda uma ligação adicional do tipo éter pode estar presente entre C-2→C-7 de unidades

adjacentes, formando as proantocianidinas do Tipo A (PA-A) (ES-SAFI et al., 2006; LI e DEINZER, 2007). Estes oligômeros também são conhecidos como taninos ou taninos condensados (Figura 18 A).

Além de poderem estar ligados entre si, muitos flavonóides são encontrados na forma de glicoconjugados, os quais podem estar ligados a carboidratos via grupos hidroxílicos, dando origem aos *O*-glicosídeos, ou ainda ligados diretamente a carbonos, na forma de *C*-glicosídeos (Figura 18 B-E) (JUSTESEN, 2000; ES-SAFI et al., 2005). Glicosil-flavonóides são freqüentemente encontrados como mono-, di-, tri- e tetra-glicosídeos. Tipicamente os monossacarídeos ligados a flavonóides são ramnose, galactose, glucose, arabinose, xilose entretanto monossacarídeos menos comuns, como a apiose, podem encontrados ligados aos flavonóides (WU et al., 2007).

**Figura 18** – Estrutura de flavonóides ligados entre si, ou com carboidratos.



(A) Proantocianidina Tipo A, com ligações do tipo C4→C6 e C4→C8, com ligação éter entre C2→C7.  
(B) Estrutura de um flavonol glicosilado na posição O-3, (C) posição O-7, (D) O-4' e (E) com ligação em C-6.

Flavonóides são constantemente alvos de muitos estudos farmacológicos, devido a importantes propriedades terapêuticas atribuídas a eles. Neste contexto

muitas evidências experimentais têm sido obtidas, as quais tem mostrado seu envolvimento em processos anti-inflamatórios (YAMAMOTO e GAYNOR, 2001), anti-microbianos e anti-câncer (RAUHA et al., 2000), bem como sua capacidade de inibir a peroxidação de lipídeos induzida por  $Fe^{2+}$ , o que mostra que um dos mecanismos de atuação dos flavonóides é através da quelação de metais, sendo importantes para sua atividade antioxidante (SEERAM e NAIR, 2002).

Alguns trabalhos têm mostrado que a posição na qual a porção glicosídica encontra-se ligada aos flavonóides pode estar diretamente associada à atividade biológica apresentada por eles (OHMORI et al., 2000; HEIM et al., 2002; YANG et al., 2006). Flavonóides livres ou na forma de glicosídeos podem atuar de formas diferentes, sendo que em muitos casos os glicosídeos apresentam melhor atividade do que a forma de aglicona livre (MISHRA et al., 2003). Entretanto, os extratos vegetais podem conter diversos isômeros, tanto em relação à posição da ligação do carboidrato na aglicona, quanto à própria composição dos monossacarídeos, ou ainda quanto ao tipo de ligação interglicosídica nos quais estes monossacarídeos podem estar arrançados. Tipicamente a porção glicosídica pode estar ligada à aglicona pelas hidroxilas das posições 3, 7 ou 4', ou então aos carbonos 6 ou 8, sendo que outros tipos de ligação são raros (CUYCKENS e CLAEYS, 2005). A glicosilação também está diretamente relacionada com a bio-disponibilidade dos flavonóides, pois alteram sua absorção intestinal (HOLLMAN et al., 1995; MATSUMOTO et al., 2004), bem como a posição onde os açúcares estão ligados afetam sua desglicosilação por células do intestino delgado e fígado (DAYA et al., 1998) que conseqüentemente podem alterar o tipo de propriedade esperada.

Devido a grande diversidade estrutural que estes glicosídeos podem apresentar diversos pesquisadores têm voltado sua pesquisa ao desenvolvimento de técnicas analíticas que proporcionem uma análise mais detalhada à cerca destes constituintes vegetais, principalmente no que diz respeito à identificação dos isômeros. Assim, a cromatografia líquida e a espectrometria de massas emergem com ferramentas imprescindíveis no desenvolvimento destas análises. Desta forma, uma análise estrutural que vise identificar o seqüenciamento de um determinado glicosídeo bem como a identificação do núcleo aglicona a ele ligado pode ser rapidamente conseguida. Entretanto, trabalhos recentes têm mostrado preocupação com desenvolvimento e simplificação de técnicas que permitam identificar a posição de ligação dos carboidratos ao núcleo aglicona, bem como das ligações

interglicosídicas e assim a diferenciação dos isômeros que podem ser formados. Estas diferenciações têm sido conduzidas de diferentes formas, tais como pela complexação de metais (como cobre, magnésio, cálcio) com flavonóides glicosilados conhecidos, e através da observação de seus comportamentos quando são analisados através de processos de fragmentação no espectrômetro de massas. Isto deve-se ao fato que os diferentes complexos metal-glicosídeo formados, podem formar diferentes perfis fragmentação, permitindo criar um padrão específico para cada um, possibilitando sua identificação (PIKULSKI e BRODBELT, 2003; DAVIS e BRODBELT, 2004).

Durante os processos de análise por espectrometria de massas, foi demonstrada a capacidade dos flavonóides glicosilados de formarem íons regulares referentes a aglicona, bem como de íons referentes a radicais formados da aglicona, obtidos por uma quebra homolítica obtidas por CID (HVATTUM e EKEBERG, 2003). Dependendo das condições de análise, foi verificado que estes íons poderiam ser formados com intensidades diferentes, e que existia uma correlação direta entre as razões íon-normal/íon-radical, e a posição na qual os açúcares estavam ligados ao flavonóide, gerando importantes dados para sua identificação (CUIYCKENS e CLAEYS, 2005). Outra maneira que tem sido utilizada na diferenciação dos sítios de ligação é através de deslocamentos no espectro de ultra-violeta (UV), obtidos pela administração de reagentes específicos. Inicialmente esta técnica era aplicada a flavonóides glicosídeos purificados, e realizada em espectrofotômetros convencionais. Entretanto, em se tratando de análise de extratos vegetais contendo diversos destes compostos, a técnica mais recente faz uso de um sistema de cromatografia líquida utilizando um detector de arranjo de fotodiodos (PDA), que permite realizar uma varredura no espectro de UV, enquanto o sistema cromatográfico efetua a separação dos diferentes compostos. Para completar a análise, um sistema de derivatização pós-coluna permite a injeção dos reagentes de deslocamento específicos, permitindo a análise *on-line* e individual dos compostos presentes em uma mistura (DUCREY et al., 1995; TIBERTI et al., 2007).

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1. OBJETIVO GERAL

- Desenvolver técnicas de separação e análise estrutural de oligossacarídeos, lipídeos e flavonóides por cromatografia e espectrometria de massas, bem como desenvolver técnicas de ionização que permitam obter diferentes informações sobre a estrutura das moléculas pela formação de diferentes fragmentos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação das melhores condições de ionização e fragmentação de oligossacarídeos por ESI-MS;
- Determinação estrutural dos lipídeos da cifomedusa *Phyllorhiza punctata*;
- Determinação estrutural dos lipídeos da arquea *Haloarcula marismortui*;
- Determinação estrutural dos lipídeos de folhas de *Maytenus ilicifolia*;
- Determinação estrutural de flavonóides de *Maytenus ilicifolia*;
- Desenvolver técnicas de separação em cromatografia líquida para análise de flavonóides;
- Desenvolver derivatizações químicas para identificação rápida do glicosídeos de *Maytenus ilicifolia*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1. FONTES DAS BIOMOLÉCULAS

Neste trabalho foram utilizadas diferentes classes de biomoléculas, como lipídeos, oligossacarídeos e flavonóides. Para o seu desenvolvimento foram utilizadas diversas fontes a fim de abranger uma grande variedade destes compostos, assim foram utilizados desde padrões comerciais de lipídeos e oligossacarídeos, assim como moléculas obtidas de diferentes fontes biológicas, como descritas na Tabela 1.

**TABELA 1** – Fontes das biomoléculas estudadas neste trabalho

Biomolécula	Fontes de estudo
Oligossacarídeos	Padrões Sigma Aldrich
Lipídeos	Padrões Sigma Aldrich (fosfolipídeos) <i>Phyllorhiza punctata</i> (medusa) <i>Maytenus ilicifolia</i> (planta) <i>Haloarcula marismortui</i> (arquea)
Flavonóides	<i>Maytenus ilicifolia</i>

### 3.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.2.1. *Phyllorhiza punctata*

*Phyllorhiza punctata* pertence ao Filo Cnidária, Classe Scyphozoa, Ordem Rhizostomeae e à família Magistiidae. Exemplares foram coletados na Baía de Guaratuba (Estado do Paraná, Brasil) durante o período de fevereiro a abril de 2003. Estes meses foram ideais para fornecer os maiores exemplares, que podem chegar

a 4,5 kg de peso fresco. Os espécimes coletados foram congelados e liofilizados. A coleta e a identificação da espécie foram realizadas pela Prof<sup>a</sup>. Maria Angélica Haddad, Departamento de Zoologia - UFPR.

### **3.2.2. *Maytenus ilicifolia***

*Maytenus ilicifolia* pertence à Divisão Angiospermae, Classe Dicotyledoneae, Subclasse Archichlamydeae, Ordem Celastrales e Família Celastraceae. Folhas de *M. ilicifolia* foram obtidas em Colombo, região metropolitana de Curitiba, PR (Sul do Brasil), foram doados pela Central de Produção e Comercialização de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas do Paraná Ltda. A planta foi identificada pelo Prof. Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica, desta Universidade, estão depositadas no Herbário da UFPR pelo *voucher* 30842.

### **3.2.3. *Haloarcula marismortui***

*Haloarcula marismortui* pertence à Super-reino Archaea, Filo Euryarchaeota; Classe Halobacteria, Ordem Halobacteriales e Família Halobacteriaceae. Células de *H. marismortui* foram gentilmente cedidas ao Msc. Marcelo Müller-Santos pelo Prof. Francisco Rodríguez-Valera (Universidade Miguel Hernández, Alicante, Espanha). As células foram cultivadas no meio utilizado para o crescimento do *Halobaculum gomorense*, que consiste nas seguintes concentrações por litro de meio: NaCl 125 g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 160 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.1 g; extrato de levedura 1 g, casamino ácidos 1 g e amido 2 g (OREN et al., 1995), sendo o seu pH ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH antes da autoclavagem. As células foram cultivadas em meio líquido em agitador orbital (160 rpm) a 37 °C. Depois de 5 dias, o meio foi centrifugado (10.000 rpm), e o material sedimentado foi lavado duas vezes com 2,5 mol/L de NaCl e, em seguida, liofilizado.

### 3.3. EXTRAÇÕES

#### 3.3.1. Extração e fracionamento de lipídeos de *Phyllorhiza punctata*

Os espécimes liofilizados (100 g) foram extraídos três vezes com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1 v/v, 400 mL) sob refluxo a 60 ° C durante 3 horas cada. Os extratos orgânicos foram filtrados e então combinados e evaporados em evaporador rotativo. Devido a extensiva concentração de sais presentes no extrato, ele foi particionado entre  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (2:1:1 v/v, 400 mL) dando origem duas frações, a superior (Pp-ELS - 17,5 g), que reteve a alta concentração de sais e portanto descartada das análises, e a fração inferior contendo o  $\text{CHCl}_3$  (Pp-ELI - 2,8 g). A presença de glicolipídeos e de lipídeos aminados e fosforilados foi determinada por análises em TLC (sílica-gel 60G – Merck) utilizando  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4, v/v) como solvente.

A fração Pp-ELI foi aplicada em uma coluna (30 cm x 2 cm) preenchida com sílica-gel 60G, tamanho da partícula 0.2-0.5 mm (Merck), e eluída com misturas  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, com sucessivos aumentos na concentração MeOH (de 5 a 50%, v/v). Cinquenta frações de 20 mL cada, foram recolhidas e analisadas por TLC, conforme descrito acima. As frações foram combinadas de acordo com suas similaridades na TLC, gerando 7 frações nomeadas de Pp-F1 a Pp-F7. Dois glicolipídeos diferentes foram isolados e tiveram sua estrutura determinada durante o mestrado (SOUZA, 2003), e um amino-fosfonolipídeo foi isolado da fração Pp-F6, eluída com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1, adicionado 0,2%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , v/v).

#### 3.3.2. Extrações e fracionamentos dos componentes de folhas de *Maytenus ilicifolia*

Folhas secas de *M. ilicifolia* (100 g) foram deslipidificadas por 3 sucessivas extrações com 300 mL de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1, v/v) sob refluxo. Os extratos foram combinados e evaporados até secura em evaporador rotativo gerando a extrato Mi-EL. O resíduo desta extração foi extraído três vezes com água (500 mL) sob refluxo (100 °C), por 3 horas cada. Os extratos foram combinados e concentrados parcialmente em evaporador rotativo (200 mL) e, em seguida, foi adicionado EtOH

frio (600 ml), a fim de precipitar macromoléculas, que foram separadas da fase solúvel por centrifugação (10.000 rpm). Os compostos solúveis em etanol (Mi-ET-SOL) foram concentrados parcialmente e, então, liofilizados.

Uma porção de Mi-ET-SOL (500 mg) foi aplicada em uma coluna (50 x 5 cm) preenchida com sílica-gel 60G (Merck) e fracionada utilizando diferentes misturas de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (variando de 95:5 v/v para 100% de MeOH). 100 frações contendo 20 mL cada, foram coletadas e evaporadas sob fluxo de nitrogênio, à temperatura ambiente (~25 °C) e analisada por TLC em placas de sílica-gel 60G (Merck). Diferentes combinações foram utilizadas como solventes de eluição na TLC, como CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:25:4, v/v), EtOAc:*n*-PrOH:AcOH:H<sub>2</sub>O (4:2:2:1, v/v) e *n*-PrOH-H<sub>2</sub>O (7:3, v/v). As placas foram coradas por orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 °C) para visualização de glicosídeos, ou por MeOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (9:1, v/v) a 100 °C, para visualização geral dos componentes das amostras (SASSAKI et al., 2008). Frações semelhantes foram combinadas para dar origem a 10 novas frações, chamadas de Mi-F1 a Mi-F10 que foram posteriormente analisadas.

### **3.3.3. Extração e fracionamento dos lipídeos da arquea *Haloarcula marismortui***

Lipídeos de *H. marismortui* foram obtidos por extração das células (1,6 g) com MeOH-CHCl<sub>3</sub> (2:1 v/v), sob refluxo a 60 °C por 2 h (2 vezes). Os extratos (Hm-EL) foram combinados, concentrados e analisados por TLC de sílica-gel 60G (Merck) e corados com orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a 100 °C, (SKIPSKI, 1975; SASSAKI et al., 2008), e por reagente de molibdato para detecção de grupamentos contendo fósforo (DITTMER e LESTER, 1964). Um glicolipídeo foi detectado no extrato, e então purificado por fracionamento em coluna (30 x 2 cm) contendo sílica-gel 60G (Merck), eluída com CHCl<sub>3</sub>-MeOH, com o aumento da proporção de MeOH (de 5 a 60%, v/v). As frações foram acompanhadas por TLC, conforme descrito previamente.

### 3.4. DERIVATIZAÇÕES QUÍMICAS

#### 3.4.1. Derivatização para análise em GC-MS

Os reagentes e solventes utilizados nesta etapa do trabalho foram adquiridos da marca Sigma ou Merck.

**Metanólise** – Amostras foram dissolvidas em 1M MeOH-HCl e mantidas a 100 °C por 4 h. As soluções foram neutralizadas com Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, transferidas para tubos do tipo *ependorf* e centrifugadas a 10.000 rpm. O precipitado foi descartado e o solúvel evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub>.

**Metilação** – 300-700 µg de amostras foram dissolvidas em 300 µL de DMSO, 10 mg de NaOH em pó foram adicionados e em seguida e 300 µL CH<sub>3</sub>I. A suspensão foi agitada vigorosamente durante 1 h, então deixada por 14 h em repouso em temperatura ambiente (~25 °C). Os derivados *per-O*-metilados foram extraídos com CHCl<sub>3</sub> e o extrato lavado várias vezes com água até pH neutro. Em seguida as amostras foram secas sob fluxo de N<sub>2</sub>, e os resultantes derivados *per-O*-metilados foram hidrolisados. Este método foi adaptado de Ciucanu e Kerek (1984).

**Hidrólise** – Para determinação da composição monossacarídica, as amostras foram dissolvidas em 1M TFA (300 µL) a uma concentração de 1 mg/mL, utilizando frascos de 4 mL com tampa rosqueável de teflon. As amostras foram mantidas a 100 °C por 14 h e posteriormente evaporadas sob fluxo de N<sub>2</sub>.

Para análise dos derivados *per-O*-metilados a hidrólise foi realizada em 45% de ácido fórmico aquoso (v/v) e as amostras foram mantidas a 100 °C por 14 h, e posteriormente evaporadas sob fluxo de N<sub>2</sub>.

**Redução** – As amostras hidrolisadas foram solubilizadas em 300 µL de H<sub>2</sub>O, e 1 mg de NaBH<sub>4</sub> (ou NaBD<sub>4</sub> para os derivados metilados) foi adicionado. As amostras foram mantidas por um período de 4-5 h em temperatura ambiente (~25 °C), após qual, foi adicionada resina trocadora de cátions fortemente ácida, até pH 6-7. A resina foi removida e as amostras foram evaporadas sob fluxo de N<sub>2</sub>. Em seguida

0,5 mL de MeOH foi adicionado e novamente evaporado em fluxo de N<sub>2</sub>. Este processo foi repetido por 3 vezes para remoção do borato residual (WOLFROM e THOMPSON, 1963a).

**Acetilação** – As amostras provenientes do processo de redução foram re-suspendidas em 400 µL de piridina-anidrido acético (1:1, v/v), e aquecidas por 2 h a 100 °C. Os derivados acetilados foram extraídos em CHCl<sub>3</sub> (500 µL) e os reagentes foram removidos por sucessivas lavagens com solução de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (5%, v/v), e no final foi adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para remoção da água residual. Após filtragem, as amostras foram transferidas para frascos limpos, e deixadas secar em temperatura ambiente, ou no caso dos derivados metilados apenas armazenados em geladeira (WOLFROM e THOMPSON, 1963b).

### 3.4.2. Acetalação do flavonóis glicosídeos

Amostras de flavonóis glicosídeos, bem como padrão de rutina (1 mg) foram solubilizados em acetona anidra (1 mL), à qual foi adicionado 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. As amostras foram deixadas sob agitação magnética intensa por 3 h e então NH<sub>4</sub>OH foi adicionado até pH 7. As amostras foram transferidas para tubos tipo *ependorf*, e centrifugados a 10.000 rpm. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub> (adaptado de MORAVCOVÁ et al., 1994).

## 3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

O principal enfoque deste trabalho é a determinação estrutural de diferentes biomoléculas por espectrometria de massas do tipo *electrospray*, com analisador do tipo triplo quadrupólo. Contudo, muitas destas moléculas também foram analisadas por outras técnicas, como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detector de UV e de arranjo de fotodiodos (PDA – *photodiode array detector*), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e ressonância magnética nuclear (NMR – *nuclear magnetic resonance*), de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H.

### 3.5.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Estas análises foram realizadas em GC-MS da marca Varian (Palo Alto, CA), modelo Saturn 2000R. A detecção por massas foi feita através de ionização eletrônica (70 eV) e analisador do tipo *ion trap*. A temperatura do injetor foi mantida em 250 °C e do *trap* em 200 °C. Hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas em coluna DB-225-MS (J&W), com duas programações, de acordo com cada tipo de composto a ser analisado:

**Análise de composição monossacarídica** – temperatura de 50 °C a 220 °C a 40 °C/min, matida por 25 min.

**Análise de derivados metilados** – temperatura de 50 °C a 210 °C a 40 °C/min, matida por 30 min.

A identificação dos compostos foi realizada pelos respectivos tempos de retenção, espectro de fragmentação de massas, e, em alguns casos, por comparação com padrões autênticos, ou pela biblioteca de massas NIST (*National Institute of Standards and Technology*) conforme será descrito nos resultados.

### 3.5.2. Cromatografia líquida de alto desempenho

Os flavonóides foram analisados por HPLC utilizando um detector convencional de UV, realizadas em um equipamento da marca Shimadzu, modelo LC-10A, com detector de UV-Vis SPA-10, ou em equipamento Shimadzu Prominence, LC-20A, com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-20A. Durante o desenvolvimento dos métodos de análise, foi utilizado o detector convencional de UV, e o flavonóides foram detectados a 280 e 360 nm, enquanto que para obtenção do espectro de absorbância no UV, o detector PDA foi programado para varrer de 200 a 500 nm.

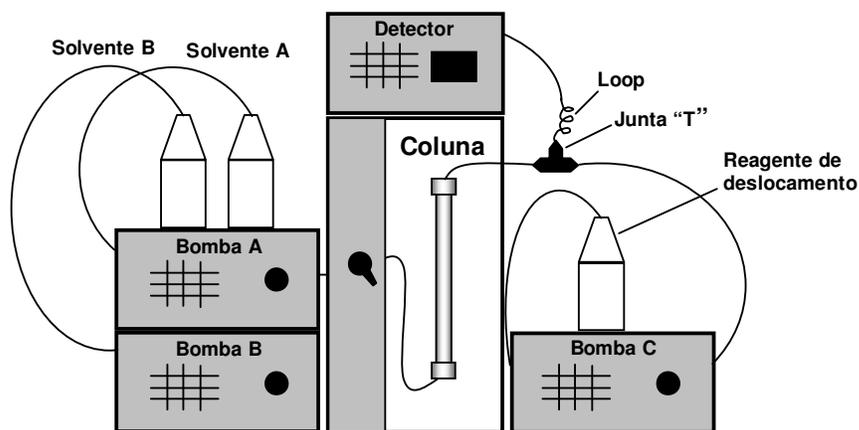
Três principais colunas foram utilizadas nas separações dos flavonóides, duas sendo de fase reversa (RP – *reveserd phase*) e uma de separação por exclusão estérica (SEC- *size exclusion chromatography*):

- **Método 1:** Coluna Synergy Fusion RP-C18, de 250 x 4,6 mm, com 4  $\mu\text{m}$  de dimensão de partículas (Phenomenex): utilizada na separação de flavonóides livres, com fase móvel isocrática  $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}-\text{AcOH}$  (89:10:1 v/v), adaptada de Soares et al. (2005), a um fluxo de 0,8 mL/min e temperatura constante de 30  $^\circ\text{C}$ . As amostras foram solubilizadas em MeOH na concentração de 1 mg/mL com volume no *loop* de injeção de 10  $\mu\text{L}$ .
- **Método 2:** Coluna Supelcosil LC-18, 250 x 4,6 mm, com 5  $\mu\text{m}$  de dimensão de partículas (Supelco): utilizada na separação dos flavonóides glicosilados, utilizando duas fases móveis em forma de gradiente. Solvente A composto de 1% de AcOH em  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v), e solvente B composto de  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{AcOH}$  (49:50:1 v/v). As análises foram realizadas a 60  $^\circ\text{C}$ , com fluxo de 1 mL/min. Com os solventes foram desenvolvidos dois gradientes diferentes, ambos com concentrações crescentes do solvente B: Gradiente A (RP-GA) iniciando com 10% de B, subindo para 30% em 5 min, de 30% a 50% em 25 min mantido por 5 min, retornando a 10% de B em 35 min e mantido assim por 10 min. O segundo gradiente, chamado de RP-GB iniciou com 10% de solvente B, subindo para 40% em 15 min, mantido até 17 min e retornando a 10% em 20 min, mantido por mais 10 min.
- **Método 3:** Coluna Ultrahydrogel 120, de 300 x 7,8 mm (Waters), também foi utilizada na separação dos glicosídeos com os mesmos solventes do método 2, com o seguinte gradiente (chamado SEC-GA): inicialmente 10% de solvente B, subindo para 40% em 24 min, para 80% em 40 min mantido até 45 min e então retornando para 10% de B em 50 min, mantido assim por mais 10 min. O fluxo foi de 1 mL/min e da temperatura 60  $^\circ\text{C}$ . As amostras foram solubilizadas na concentração de 10 mg/mL em  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v), com volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$ . Esta análise foi realizada em modo preparativo, e as frações foram coletadas em coletor automático, e concentradas sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente ( $\sim 25$   $^\circ\text{C}$ ).

### 3.5.2.1. Cromatografia líquida de alto desempenho com derivatização pós-coluna

Derivatização pós-coluna foi realizada para determinação dos deslocamentos no espectro de absorvância no UV dos flavonóides glicosilados. Foi utilizado HPLC-PDA Shimadzu Prominence, sendo que as condições de análise cromatográfica são as mesmas já descritas para análise dos glicosídeos em fase reversa. A derivatização foi feita em um *loop* de 200  $\mu$ L posicionado na saída coluna, com a função de prolongar o percurso até o detector, atuando como local de reação. Dois reativos de deslocamento foram utilizados: NaOH, 1 mol/L e AlCl<sub>3</sub>, 0,3 mol/L. Os reativos foram combinados com os efluentes na saída da coluna através de uma junção em “T” (Figura 19) injetados por uma bomba modelo LC-10A (Shimadzu) a fluxo de 0,2 mL/min.

**Figura 19** – Esquema do HPLC preparado para derivatização pós-coluna



### **3.5.2.2. Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)**

Após estabelecimento das melhores condições de separação cromatográfica, as amostras foram submetidas à análise por LC-MS. O sistema foi montado com um divisor de fluxo na saída da coluna, permitindo desviar um volume de 10 µL/min de efluente para o espectrômetro de massas.

### **3.5.3. Cromatografia em camada delgada (TLC- *Thin Layer Chromatography*)**

Estas análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), com 8 cm de altura total (7 cm a partir da origem). As análises foram desenvolvidas com diferentes solventes de acordo com o tipo de composto a ser analisado: lipídeos – CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:25:4, v/v), mono-, oligossacarídeos e glicosídeos – EtOAc-*n*-PrOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:2:2:1, v/v) ou *n*-PrOH-H<sub>2</sub>O (7:3, v/v). A visualização dos compostos foi realizada com diferentes reagentes, de acordo com o tipo de composto analisado: carboidratos – orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100 °C (SKIPSKI, 1975), compostos aminados – solução de ninhidrina a 100 °C, compostos contendo fosfatos – solução de molibdênio a temperatura ambiente (DITTMER e LESTER, 1964). Para detecção geral e inespecífica, foi utilizada uma solução de 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em EtOH (v/v) a 110 °C (SASSAKI et al., 2008).

### **3.5.4. Análise por espectrometria de massas do tipo *electrospray***

Estas análises foram realizadas em espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação e argônio como gás de colisão, para realização de fragmentações por CID. A detecção foi feita em modo positivo e negativo de ionização em pressão atmosférica (API). As amostras foram aplicadas por injeção direta utilizando uma bomba de infusão (KD-Scientific) a um fluxo de 10 µL/min, ou então em modo de LC-MS. Aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5, e as análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo.

Os padrões de oligossacarídeos foram solubilizados na concentração de 50 µg/mL em H<sub>2</sub>O-MeOH (7:3, v/v) contendo 5 mMol/L de LiCl, NaCl ou KCl. Os padrões de fosfolipídeos na concentração de 50 µg/mL, e os extratos de lipídeos na concentração de ~200 µg/mL, foram solubilizados MeOH-CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (7:2:1, v/v). Em alguns casos a H<sub>2</sub>O foi substituída por 0,1 M NaOH para obter um pH 10. Os lipídeos de *H. marismortui* passaram também por substituição de prótons por deutérios através de 2 sucessivas solubilizações seguidas de evaporação em MeOD-CHCl<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>O (7:2:1, v/v). Os solventes deuterados foram utilizados para injeção destas amostras. Amostras de flavonóides (200 µg/mL) foram solubilizadas em MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3, v/v), ou em MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) contendo 5 mMol/L de HCl ou NaCl. Como os analítos são de natureza química bastante diferente, as condições de energia utilizadas na ionização também foram bastante variadas, e serão descritas juntamente com os resultados.

### 3.5.5. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Espectros de 1D e 2D de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>31</sup>P foram realizados em um equipamento Bruker Avance DRX-400, com sonda inversa de 5 mm. Antes das análises, as amostras submetidas a troca de H por D, por sucessivas solubilizações e evaporações em solventes deuterados. Amostras de lipídeos foram trocadas com a utilização de MeOD-CHCl<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>O (7:2:1, v/v), e as amostras de flavonóides em MeOD-D<sub>2</sub>O (7:3, v/v). Os espectros de lipídeos foram obtidos em CDCl<sub>3</sub>-MeOD (1:1, v/v) com concentrações variando entre 30-50 mg/mL e o de flavonóides em MeOD-D<sub>2</sub>O (7:3) com concentrações variando entre 15-50 mg/mL para os padrões de epicatequina e catequina e 60-80 mg/mL para as amostras obtidas de *M. ilicifolia*. Todos os espectros de NMR foram obtidos com temperatura de 30 °C. Os deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C foram padronizados em relação ao Me<sub>4</sub>Si (δ = 0), enquanto que os de <sup>31</sup>P relativos a solução aquosa (85%, v/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (δ = 0).

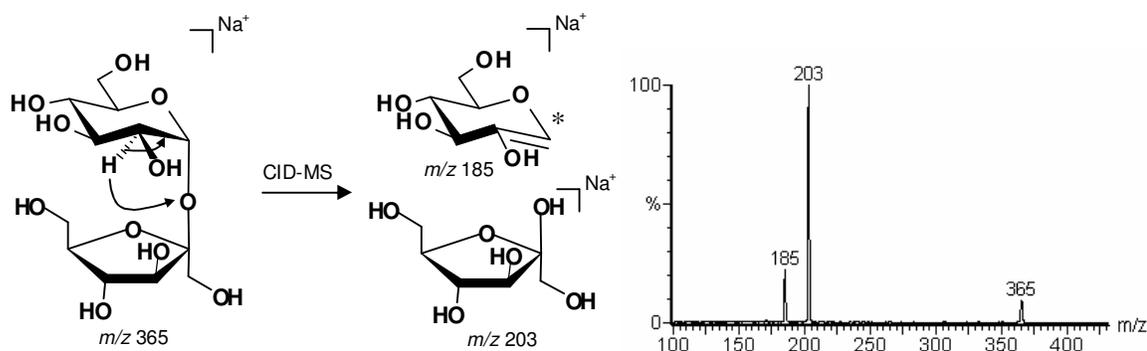
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4.1. ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS

Em análises do tipo *tandem*-MS os principais pontos de quebra nos oligossacarídeos são as próprias ligações glicosídicas, e portanto são formados fragmentos com o equivalente a massa de um açúcar a menos. Contudo estas análises devem levar em consideração que o átomo de oxigênio que une os dois monossacarídeos deve ficar em uma das unidades, enquanto que a outra terá sua massa reduzida com o equivalente a perda de uma molécula de água (- 18 m.u.), ou seja, no caso das hexoses, de massa molecular de 180 Da, pela remoção de uma unidade de água passa a ter massa 162 Da, as deoxihexoses de 164 para 146 Da e as pentoses de 150 para 132 Da. Por exemplo, a sacarose [ $\alpha$ -Glc $p$  (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -Fru $f$ ] um dissacarídeo não redutor, como característica intrínseca apresenta um cetoadúcar (frutose) na sua composição. Em análise por ESI-MS a sacarose produz íon pseudo-molecular com  $m/z$  365 [ $M+Na$ ] $^+$ . A provável via de quebra da sacarose envolve a transferência do próton de uma das unidades monossacarídicas para o oxigênio da ligação, e com isso a unidade doadora passa formar uma espécie contendo uma dupla ligação entre C-1 e C-2 (Figura 20).

**Figura 20** – Formação dos fragmentos de carboidratos



\*exemplo de formação da dupla ligação entre C1-C2

Como será visto a seguir, a formação destes íons de açúcares contendo duplas ligações entre C-1 e C-2 em outros açúcares redutores, ou em glicosídeos parece ocorrer a partir do terminal não redutor, permitindo os fragmentos formados a partir do terminal redutor ou a porção contendo a aglicona apresentem a massa completa dos açúcares que o compõem juntamente com íon adutor. Outros tipos de fragmentação podem ser obtidos de acordo com o tipo de ionização/fragmentação que esteja sendo utilizado, como os obtido por *ion trap* em modo negativo (KARLSSON et al., 2004).

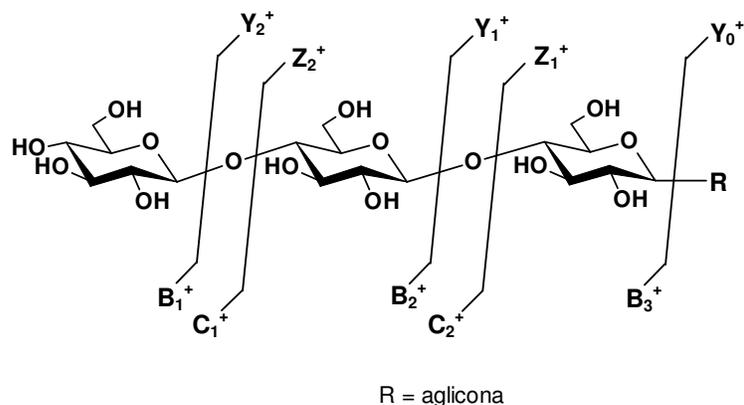
Diversos tipos de íons podem ser formados durante os processos de ionização nas análises de massas, mas as formas mais comuns de serem encontrados são os íons formados a partir adutos de sódio  $[M+Na]^+$ . Contudo, adutores como  $K^+$  também são comuns de serem encontrados ionizando carboidratos, e devido à diferença de massa entre o  $Na^+$  e o  $K^+$  (16 Da), pode levar a confusões. Já esta mesma diferença é encontrada em muitos açúcares, como ramnose e fucose em relação às hexoses (ex. Man, Gal e Glc). É possível remediar certos inconvenientes pela suplementação de algum tipo de íon adutor desejado no solvente utilizado na amostra, mas concentrações altas destes íons podem suprimir o sinal do analito.

O papel dos adutores não limita-se à formação dos íons durante a ionização, mas parece afetá-los também nos processos de fragmentação. Para obter informações quanto ao tipo de ionização que produziria melhor informação sobre oligossacarídeos, análises foram realizadas utilizando como padrões de oligossacarídeos redutores, maltose [ $\alpha$ -Glc $p$ -(1→4)-Glc], celobiose [ $\beta$ -Glc $p$ -(1→4)-Glc], maltopentaose [ $\alpha$ -Glc $p$ -(1→4)- $\alpha$ -Glc $p$ -(1→4)- $\alpha$ -Glc $p$ -(1→4)- $\alpha$ -Glc $p$ -(1→4)-Glc] e como padrão de oligossacarídeo não redutor foi utilizado a estaquiase [ $\alpha$ -Gal $p$ -(1→6)- $\alpha$ -Gal $p$ -(1→6)- $\alpha$ -Glc $p$ -(1→2)- $\beta$ -Fru $f$ ]. Os terminais redutores da maltose, celobiose e maltopentaose foram reduzidos pela utilização de  $NaBH_4$ , a fim de gerar uma diferença de 2 Da entre ele e o terminal não redutor, assim foi possível atribuir de qual parte da molécula os fragmentos eram provenientes. Como eles formaram estruturas contendo um poliol em um dos terminais, será utilizada a nomenclatura proposta por Domon e Costello (1988) para identificação dos fragmentos obtidos a partir de glicoconjugados. Seguindo esta nomenclatura os principais íons aqui observados foram os do tipo  $Y_j$  e  $B_j$ . Os fragmentos do tipo  $Y_j$  são aqueles que permanecem ligados à aglicona (neste caso ao poliol), e o  $j$  subscrito indica o

número de monossacarídeos contidos no fragmento, contados a partir da aglicona. Os fragmentos do tipo  $B_i$  referem-se à porção da molécula contendo apenas os monossacarídeos, o  $i$  subscrito indica o número de monossacarídeos contidos nos fragmentos, contados a partir do terminal não redutor. O tipo de carga contida nos fragmentos será indicado em sobrescrito (Figura 21).

Tipicamente os fragmentos  $B_i^+$  são formados como consequência de uma quebra das ligações glicosídicas, designado como clivagem tipo A1, que gera um íon oxônio devido à formação de uma tripla ligação no oxigênio do anel glicosídico, este tipo de fragmento não foi observado. Por outro lado, na formação dos fragmentos do tipo  $Y_j^+$ , a carga é mantida na porção da molécula que contém a aglicona, ocorrendo a liberação dos resíduos de açúcar adjacentes como espécies neutras, com uma dupla ligação entre C-1 e C-2 (Figura 20). Este tipo de quebra é referido como  $\beta$ -clivagem (DELL, 1987). Contudo, estas espécies neutras produzidas pela  $\beta$ -clivagem, foram observados formando íons com adutores específicos. Os demais fragmentos descritos por Domon e Costello (1988) não foram encontrados nos espectros, exceto pela presença de pequenos íons identificados como pertencendo ao tipo  $Z_j$ , quando  $Li^+$  foi utilizado como adutor.

**Figura 21** – Nomenclatura para os fragmentos obtidos para glicoconjugados



#### 4.1.2. Influência dos adutores na fragmentação de oligossacarídeos

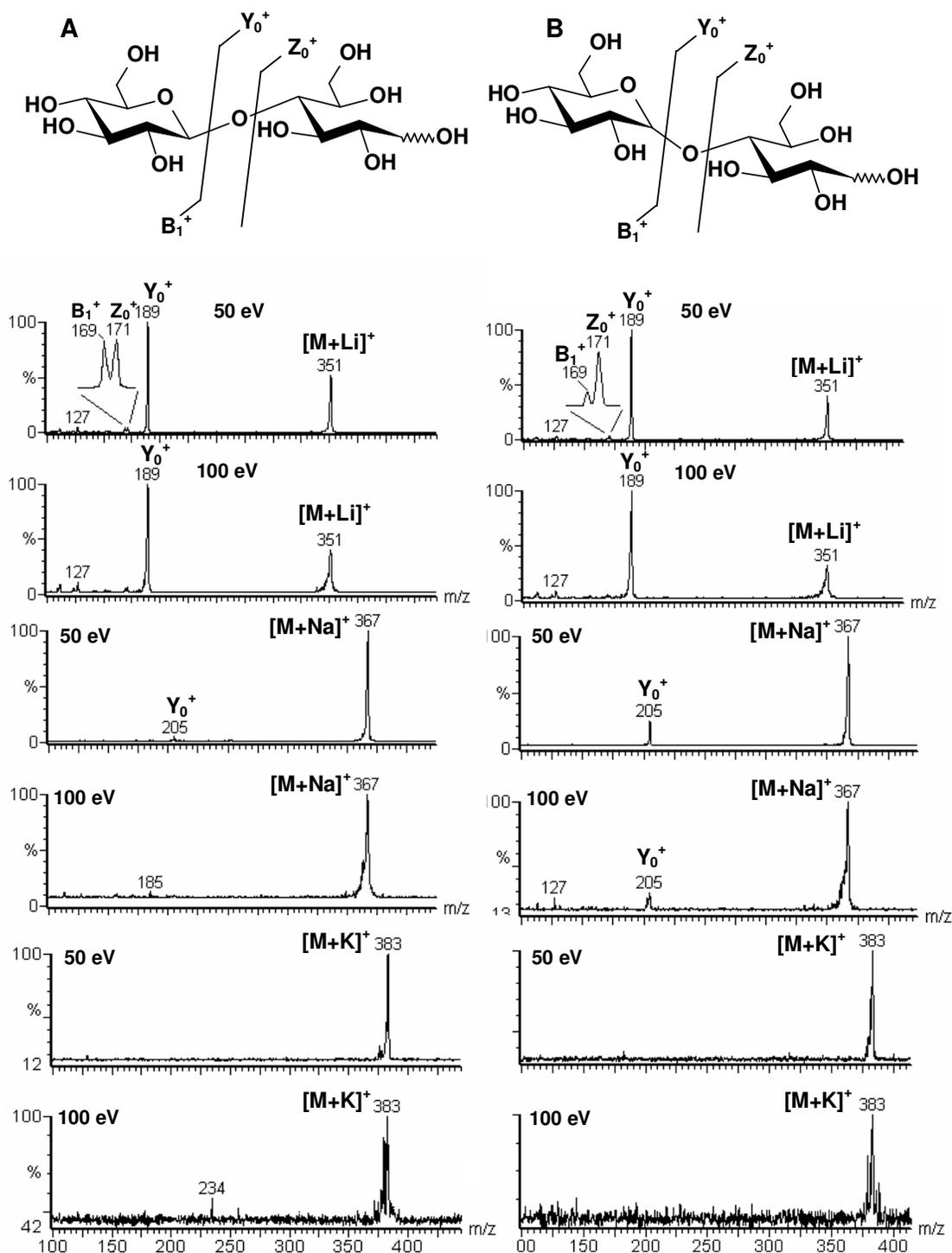
A maltose e a celobiose são dois isômeros diferenciado-se apenas pela configuração anomérica do oxigênio que participa da ligação glicosídica. Após a redução, a massa molecular de ambas passou de 342 para 344 Da.

Estes dois dissacarídeos foram submetidos a análise de fragmentação por CID-MS, mantendo as energias de ionização no cone em 80 V e no capilar em 2,8 kV, porém variando a energia de colisão, que foi testada em 50 e 100 eV, e os íons adutores, pela suplementação com 5 mMol/L de LiCl, NaCl ou KCl no solvente da amostra. A concentração das amostras foi de 50 µg/mL.

Em ambos os casos foi verificado que o uso de Li<sup>+</sup> com adutor promoveu melhor fragmentação dos dissacarídeos, que pode ser observada já com 50 eV, enquanto que com Na<sup>+</sup>, apenas um pequeno íon foi formado tanto com 50 como com 100 eV. Já com K<sup>+</sup> com adutor não houve a formação de fragmentos nestas condições (Figura 22).

O principal fragmento observado foi identificado como sendo do glucitol (Y<sub>0</sub><sup>+</sup>) somado à massa do adutor, que apareceu com  $m/z$  189 [M+Li]<sup>+</sup> e 205 [M+Na]<sup>+</sup>, destacando-se pela intensidade o íon formado com Li<sup>+</sup>. Duas características chamaram a atenção: a formação dos fragmentos de  $m/z$  205 foi mais intensa quando formados a partir da maltose em relação a celobiose, e a formação de dois fragmentos de baixa intensidade, que foram observados apenas com Li<sup>+</sup>, como adutor. Estes dois fragmentos foram interpretados como B<sub>1</sub><sup>+</sup> e Z<sub>0</sub><sup>+</sup>, com  $m/z$  169 e 171, respectivamente e foram formados em ambos os dissacarídeos, porém com intensidades diferentes, com uma razão de 1:1 a partir da celobiose e 1:3 da maltose (Figura 22 A, B). Embora estes resultados ainda sejam preliminares, esta relação entre estes dois fragmentos pode ser importante para distinguir entre ligações glicosídicas α e β.

**Figura 22** – Influência do adutor na fragmentação da celobiose e da maltose.

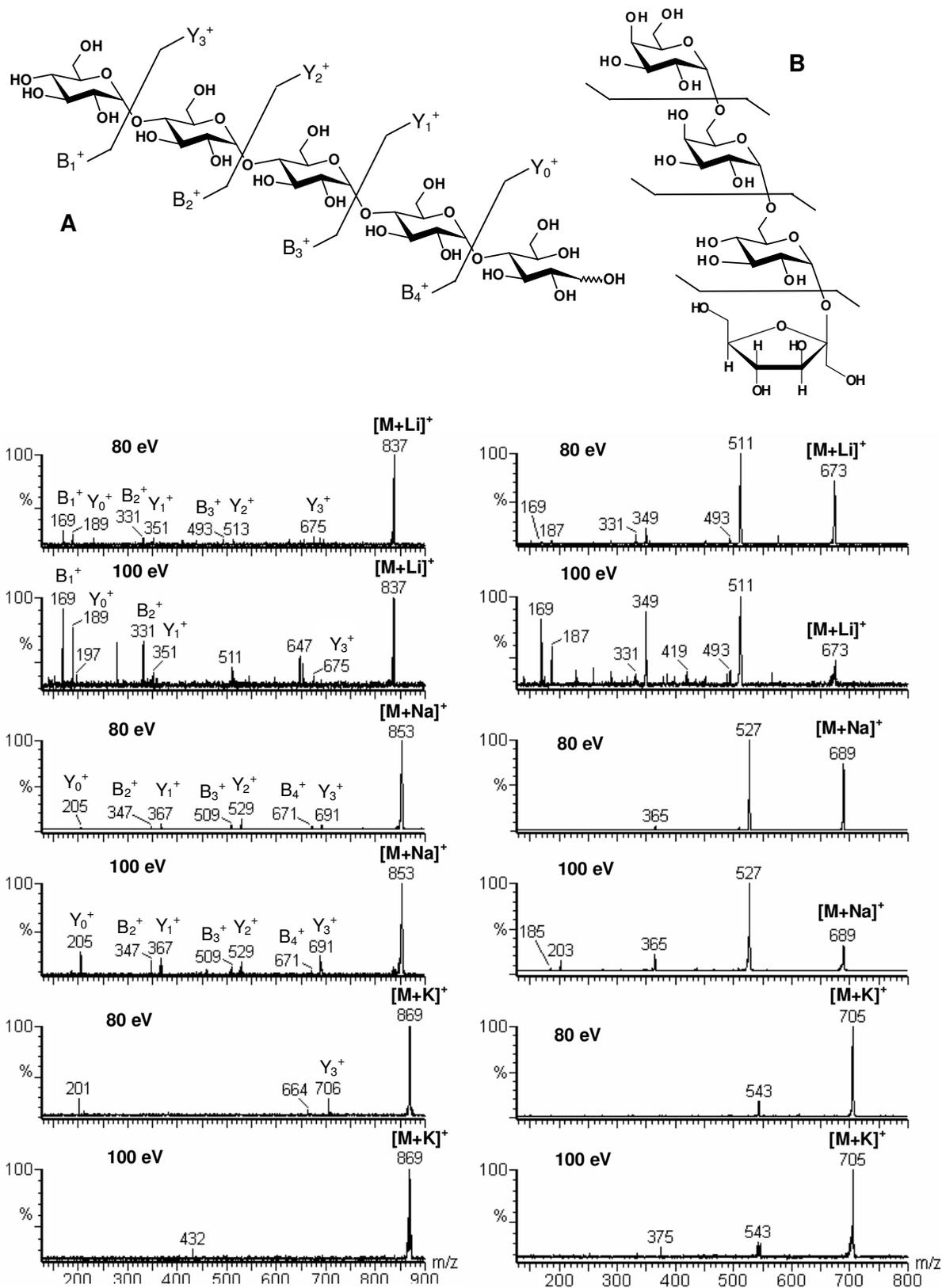


Coluna A: estrutura e fragmentações da celobiose reduzida; coluna B estrutura e fragmentações da maltose reduzida.

Dois oligossacarídeos maiores também foram testados com os diferentes adutores, seguindo os mesmos comportamentos da maltose e da celobiose. Estes oligossacarídeos foram a maltopentaose, um pentassacarídeo, que também foi reduzido gerando em uma das extremidades um poliál com aumento de massa de 2 Da, para poder diferenciar os fragmentos provenientes de uma e de outra extremidade, e a estaquiase, que é um tetrassacarídeo originado a partir da sacarose, e portanto não apresenta terminal redutor. Os fragmentos de massa obtidos a partir da maltopentaose reduzida foram nomeados de acordo com nomenclatura de Domon e Costello (1988), contudo como a estaquiase não pôde ser reduzida, esta nomenclatura não se aplica, e os fragmentos não são diferenciados entre os dois terminais.

Como anteriormente, as amostras também foram solubilizadas a uma concentração de 50 µg/mL, mesmo isso representando uma razão molar diferente entre tetra- e pentassacarídeos, já que o objetivo foi comparar apenas o efeito do adutor na mesma molécula. As energias de ionização foram as mesmas das anteriores, 80 V no cone e 2,8 kV no capilar, porém as energias de colisão foram 80 e 110 eV. Conforme comentado, o processo de fragmentação de ambos os oligossacarídeos apresentou melhor resposta de acordo com o tipo de adutor utilizado, sendo que o Li<sup>+</sup> em todos os casos foi o que gerou mais informações sobre a estrutura. Porém, no caso da estaquiase parece que sua estrutura é mais suscetível ao processo de fragmentação nas condições utilizadas, já que produziu fragmentos intensos com Na<sup>+</sup>, como os de *m/z* 527 e 365, consistentes com a remoção de um e dois monossacarídeos, respectivamente. Mesmo utilizando o K<sup>+</sup> como adutor foi possível observar um fragmento de *m/z* 543, formado pela remoção de um monossacarídeo (Figura 23).

**Figura 23** – Influência do adutor na fragmentação da maltopentaose e da estaquiose



Coluna A: estrutura e fragmentações da maltopentaose reduzida; coluna B estrutura e fragmentações da estaquiose

## 4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DE LIPÍDEOS

---

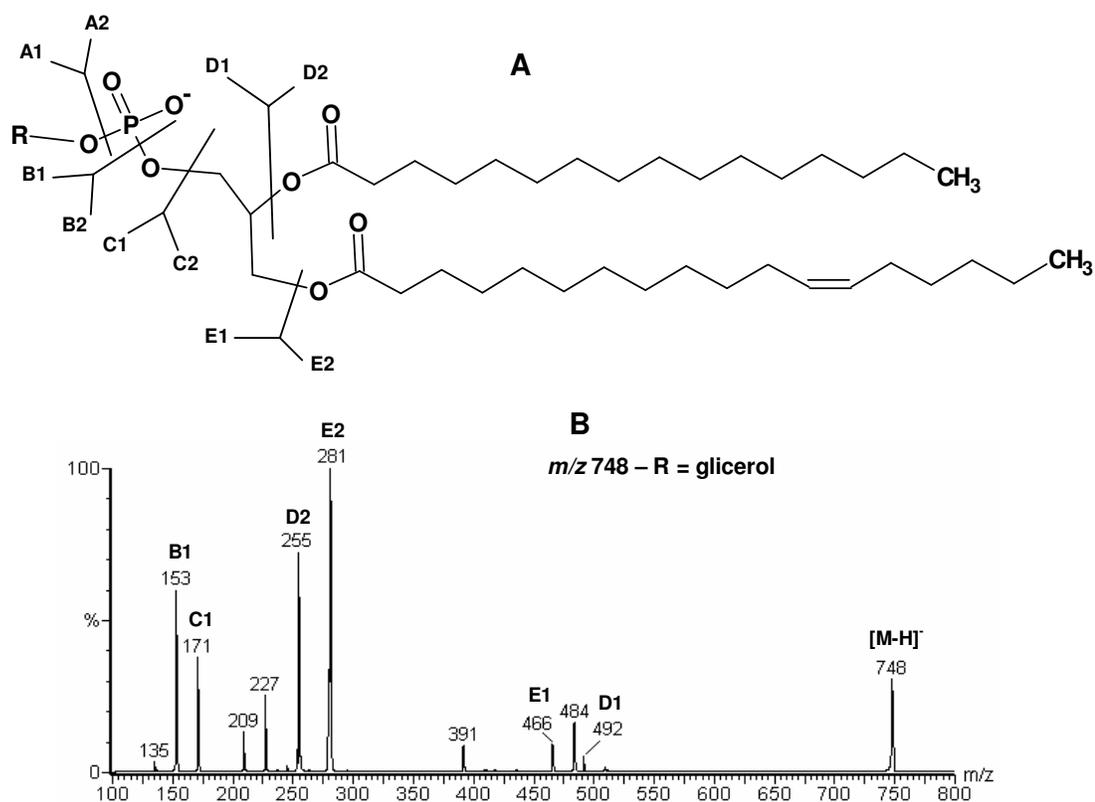
### 4.2.1. Análise dos padrões de fosfolipídeos

A caracterização de fosfolipídeos tem muita relevância, já que estes são importantes lipídeos responsáveis por várias funções celulares, e sua composição pode até mesmo ser utilizada como biomarcador em determinadas patologias como câncer, como demonstrado por Cooks et al. (2005), que utilizando o sistema de análise de massas por DESI, fizeram uma varredura em uma secção de pulmão, contendo tecido saudável e tumoral e verificaram grande variação no conteúdo de fosfolipídeos entre os tecidos.

Neste trabalho vários padrões de fosfolipídeos (Sigma) foram submetidos a análises por injeção direta na fonte de ESI-MS, para determinação de condições ideais de ionização e fragmentação. Os fragmentos foram designados por letras arábicas (A-E) indicando cada ponto de clivagem, e cada fragmento foi numerado com 1 ou 2 para identificar o lado da molécula que reteve a carga (Figura 24). Contudo, muitos fragmentos não são observados, devido ao fato de que dependendo do tipo de ionização apenas aqueles fragmentos ligados aos grupos ionizáveis acabam aparecendo, e o restante se caracteriza em perda neutra. Tipicamente os fragmentos A2, B2 e C2 não foram observados formando íons em nenhum dos fosfolipídeos analisados.

Os fosfolipídeos, devido a diferente natureza dos grupos polares ligados ao glicerol, podem formar íons facilmente em modo negativo, devido à presença do grupo fosfato. No entanto, em alguns casos, como na fosfatidilcolina (PC), a ionização ocorre em modo positivo. Isto deve-se ao fato de que a colina é formada por de amina quaternária, o qual apresenta carga positiva. Entretanto, mesmo os demais fosfolipídeos podem ser ionizados em modo positivo, dependendo das condições em que são analisados. Por exemplo, o ácido fosfatídico (PA), foi obtido em modo positivo pela substituição dos  $H^+$  do fosfato por  $Na^+$ , conseguido através de um solvente contendo NaOH em pH 10 (Tabela 2).

**Figura 24 – Fragmentação de um fosfolípido**



(A) Estrutura geral de um fosfolípido, (B) perfil de fragmentação de do fosfatidilglicerol em modo negativo

**TABELA 2 – Análise dos padrões de fosfolípeos**

Fosfolípido	Íon precursor	Fragmentos						
		A1	B1	C1	D1	E1	D2	E2
Ác. Fosfatídico	<sup>a</sup> 674	-	79	97	392	418	281	255
<sup>c</sup> Ác. Fosfatídico (pH 10)	<sup>b</sup> 741	-	125	165	460	486	327	301
Fosfatidilcolina	<sup>b</sup> 761	104	166	184	479	505	-	-
<i>liso</i> -Fosfatidilcolina	<sup>b</sup> 496	104	166	184	-	-	-	-
Fosfatidiletanolamina	<sup>b</sup> 769	62	125	142	489	461	-	-
Fosfatidilserina	<sup>b</sup> 789	106	169	186	507	507	-	-
Fosfatidilinositol	<sup>a</sup> 836	-	241	259	-	554	255	281
Fosfatidilglicerol	<sup>a</sup> 748	-	153	171	492	466	255	281

<sup>a</sup> análise em modo negativo (ESI-); <sup>b</sup> análise em modo positivo (ESI+); <sup>c</sup> obtido em solução de NaOH

#### 4.2.2. Análise de lipídeos da cifomedusa *Phyllorhiza punctata*

*P. punctata* é uma espécie invasora de medusa (Filo Cnidária), proveniente da região do Indo-Pacífico. Sua chegada em águas Brasileiras provavelmente ocorreu devido à vinda de navios daquela região. Ela pode ter vindo na forma de pólipos aderidos ao casco dos navios, ou então na água de lastro destes. *P. punctata* é uma espécie simbiótica fazendo associações com microalgas zooxantelas das quais ela pode conseguir nutrientes. Durante um trabalho prévio, foram encontrados dois glicolipídeos, de origem tipicamente vegetal, sendo monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e outro o sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) atribuídos devido a presença das microalgas. Estes dois glicolipídeos já foram estudados durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado, na qual também foi encontrado um ácido graxo poliinsaturado tipicamente de dinoflagelados, o ácido docosahexaenóico (DHA) (SOUZA, 2003).

No presente trabalho, foi isolado e caracterizado um terceiro lipídeo, presente na fração Pp-F6, proveniente do fracionamento em coluna de sílica-gel, o qual foi negativo na TLC quando corado com orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e, portanto não se tratava de um glicolipídeo. Contudo, apenas uma banda apareceu quando a TLC foi submetida à análise com ninhidrina, e também apenas uma banda de mesmo R<sub>f</sub> quando a TLC foi revelada com o reativo de molibdato (DITTMER e LESTER, 1964). Este resultado indicou a presença de um lipídeo contendo amina e fósforo na sua composição química. A seguir este lipídeo foi submetido a uma série de análises de NMR e ESI-MS para determinação de sua estrutura.

##### 4.2.2.1. Análise do lipídeo presente na fração Pp-F6 por NMR

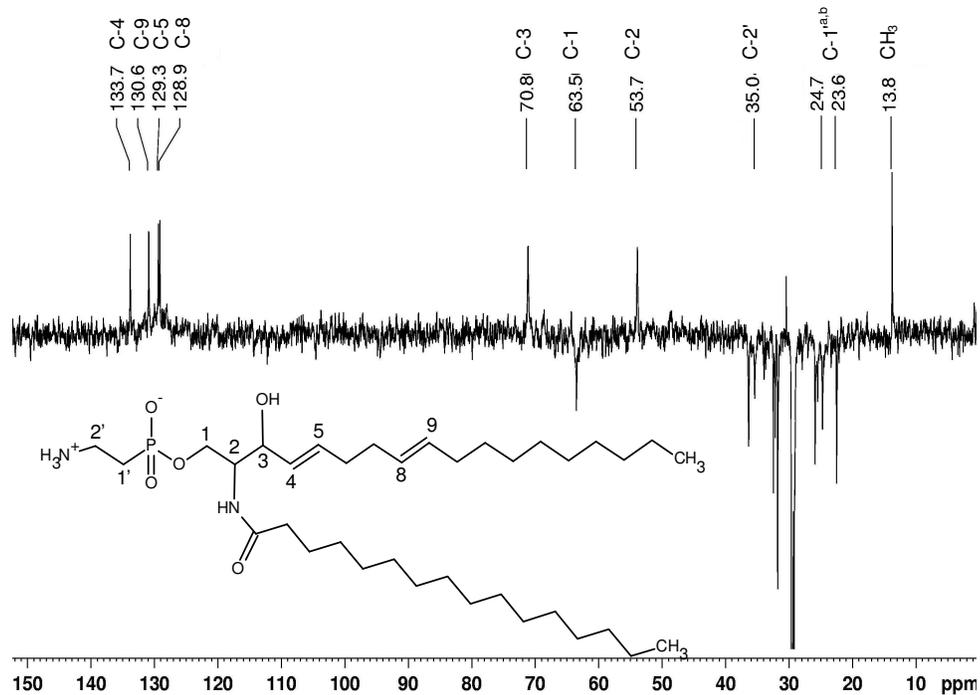
Como se tratava de um lipídeo contendo fósforo na composição, esta amostra foi submetida à análise de <sup>31</sup>P-NMR, que forneceu apenas um sinal em δ 21,26. Como os deslocamentos químicos esperados para fosfolipídeos convencionais ocorrem tipicamente entre δ -1 e ~3 (ESTRADA et al., 2008), foi possível inferir que este não era um fosfolipídeo tradicional. Lipídeos de cnidários podem apresentar grandes concentrações de lipídeos polares, como glicerosfosfolipídeos e

esfingofosfolipídeos, já encontrados na medusa *Pelagia noctiluca* e *Aurelia aurita* (NAKHEL et al., 1988; KARIOTOGLOU e MASTRONICOLIS, 2001). Os esfingofosfolipídeos foram identificados como ceramidas aminoetilfosfonadas com alguns análogos metilados. Assim como os fosfolipídeos, os fosfonolipídeos são elementos estruturais da membrana celular e podem ter função na permeabilidade e estabilização da membrana (KARIOTOGLOU e MASTRONICOLIS, 2003).

O espectro de  $^{31}\text{P}$  obtido da fração Pp-F6 foi comparado com o espectro de  $^{31}\text{P}$  obtido de um padrão de ácido 2-aminoetil-fosfônico (2-AEP), com deslocamento  $\delta$  20,40. Este resultado sugeria que o grupo fosfato do fosfolipídeo estivesse diretamente ligado a um carbono na estrutura, similar ao 2-AEP, e, como na estrutura dos fosfonolipídeos.

Esta estrutura começou a ganhar forma através dos espectros 1D e 2D de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , e  $^{31}\text{P}$  e DEPT. Um característico duplete em  $\delta$  23,3 e 24,6 foi formado devido ao seu acoplamento com  $^{31}\text{P}$ , já que os espectros foram obtidos desacoplados apenas do  $^1\text{H}$ . Estes sinais tiveram um constante de acoplamento de  $J = 132$  Hz, semelhante ao obtido para o 2-AEP, sugerindo similaridade entre eles. Os espectros de  $^{13}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$  DEPT, mostraram alguns sinais característicos da esfingosina em  $\delta$  53,7, 63,5 e 70,8 (Figura 25). Estes sinais foram similares aos encontrados no espectro de um padrão esfingomielina (Sigma-Aldrich), indicando a presença de um carbono ligado a nitrogênio (C-2 da esfingosina,  $\delta$  53,7), e dois outros ligados a hidroxilas. Como no espectro de DEPT houve a inversão do sinal em  $\delta$  63,5, foi possível determinar que este era o C-1 e o sinal em  $\delta$  70,8 sendo sinal do C-3 da esfingosina. Os outros sinais invertidos no espectro de DEPT, entre  $\delta$  20 e 40, referem-se aos demais  $\text{CH}_2$  da cadeia da esfingosina e do ácido graxo ligado à estrutura. Com isso foi possível inferir a presença de um esfingofosfolipídeo. Outros quatro sinais no espectro de  $^{13}\text{C}$  também foram observados com deslocamentos químicos em campo de maior energia (maior ppm), em  $\delta$  128,9, 129,3, 130,6 e 133,7, característicos de carbonos participando de duplas ligações

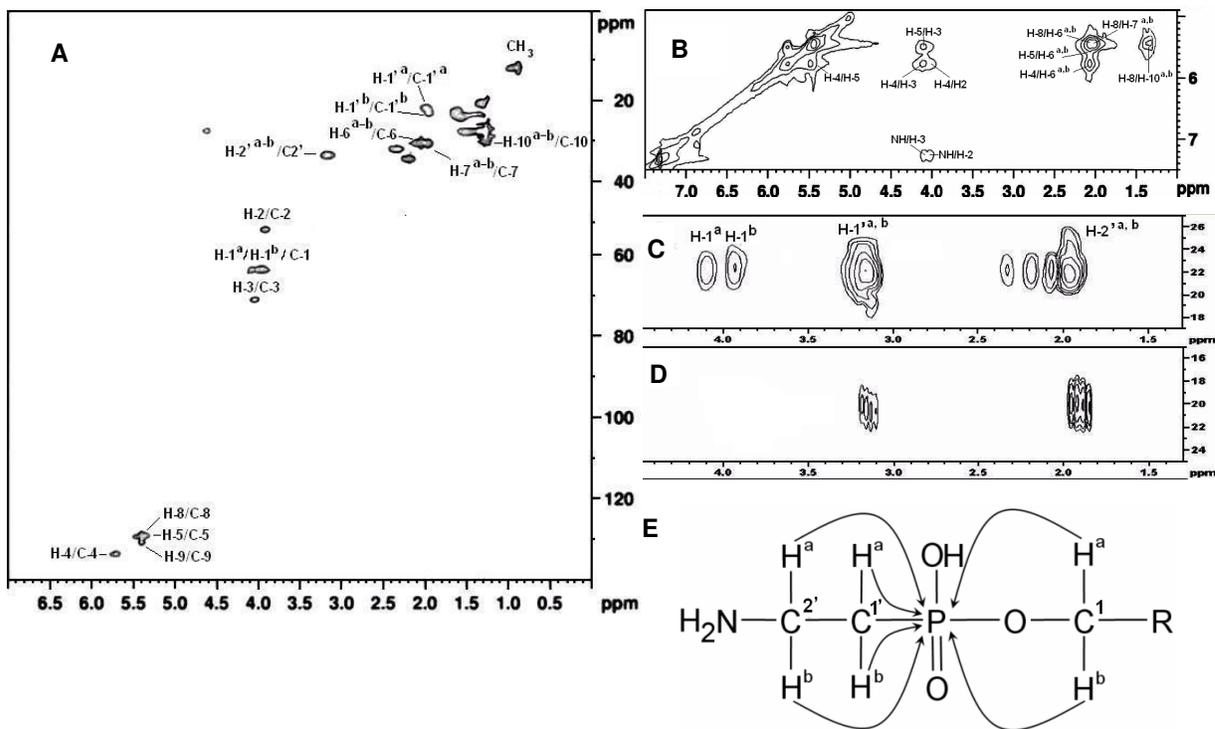
Figura 25 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -DEPT da fração Pp-F6



Os espectros bi-dimensionais de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC e  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY (Figura 26 A, B) também foram realizados, fornecendo importantes informações sobre a estrutura, principalmente a respeito da configuração das duplas ligações, que foi determinada por suas constantes de acoplamento. Uma dupla ligação foi localizada entre C-4/C-5, em  $\delta$  5.755/133.70 e 5.476/129.30, com  $J_{\text{H-H}} = 16,7$  Hz e a outra entre C-8/C-9, em  $\delta$  5.480/128.90; 5.430/130.6, com  $J_{\text{H-H}} = 18,1$  Hz. Estas constantes são características de configuração *trans* (FROST e GUNSTONE, 1975), sugerindo que o lipídeo é uma ceramida 2-aminoetilfosfonato (CAEP), cuja base de cadeia longa trata-se de um 1,3-dihidroxi-2-amino-4, 8-*trans*-octadecadieno.

Já o espectro de  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -HMBC apresentou informações importantes sobre a ligação C-P, confirmando que a estrutura contém um grupamento aminoetilfosfonato similar ao 2-AEP (Figura 26 C-E).

**Figura 26** – Espectros de 2D-NMR da fração Pp-F6

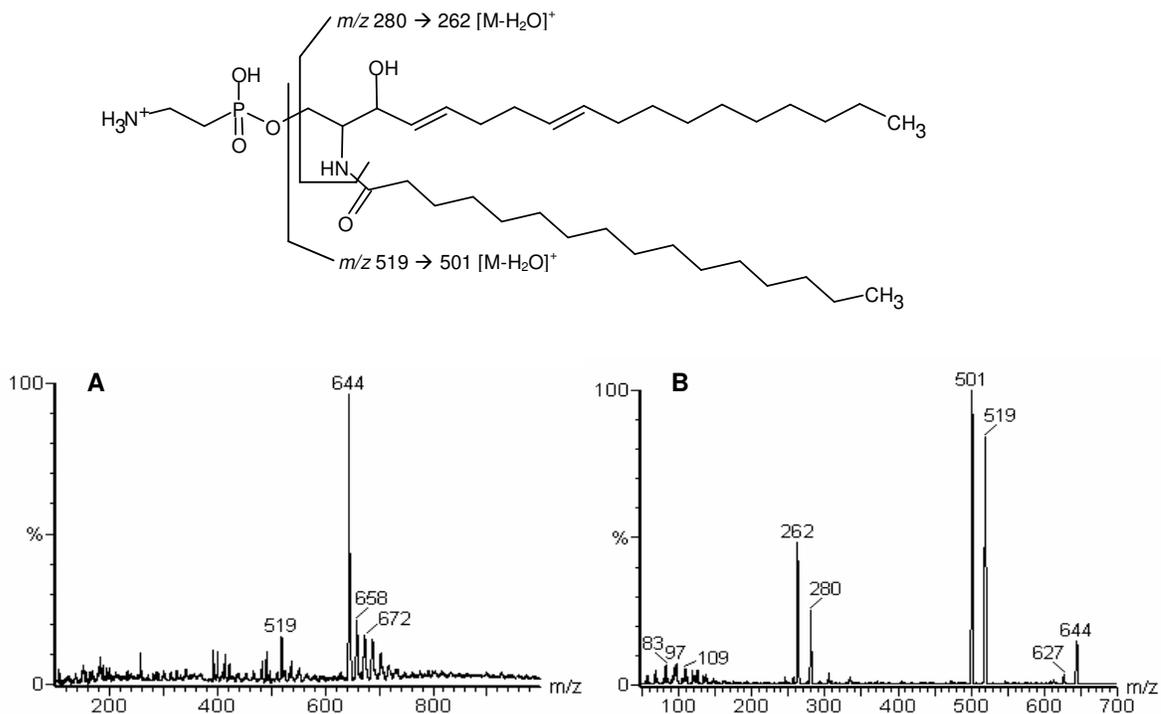


(A) Espectro de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, (B)  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY, (C)  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -HMBC da fração Pp-F6, (D)  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -HMBC do 2-AEP, e (E) conectividades entre  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  no espectro de HMBC da Fração Pp-F6

#### 4.2.2.2. Análise do lipídeo da fração Pp-F6 por ESI-MS

A fração Pp-F6 foi submetida a análises ESI-MS. A ionização em modo positivo deu um principal íon *quasi*-molecular de  $m/z$  644  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 27 A), que foi consistente com a estrutura do CAEP contendo um ácido palmítico ( $\text{C}_{16:0}$ ). Outros íons de maior  $m/z$  e menor abundância foram atribuídos ao CAEP com outros ácidos graxos maiores. *Tandem*-MS foi realizado e os principais fragmentos foram observados em  $m/z$  519 que representa a remoção do grupo 2-AEP,  $m/z$  501, formado pela desidratação do íon anterior (Figura 27 B). Outros fragmentos de  $m/z$  280 e 262 foram atribuídos à porção esfingosina, confirmando a estrutura da base como 1,3-dihidroxi-2-amino-4,8-*trans*-octadecadieno.

**Figura 27** – Espectros positivos de ESI-MS e CID-MS da fração Pp-F6

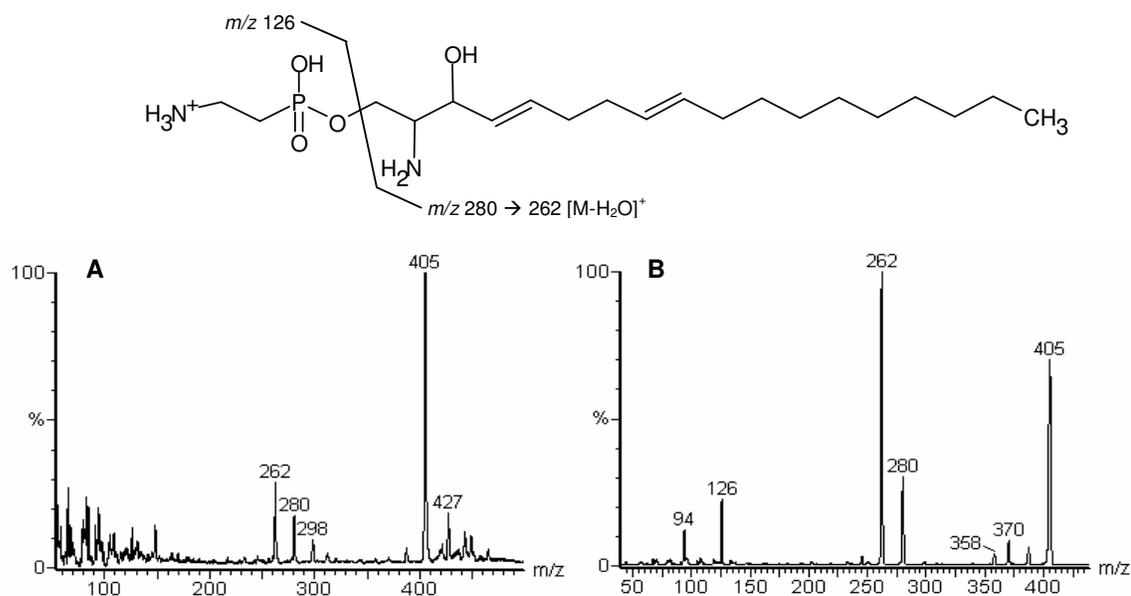


(A) Espectro de ESI-MS, e (B) fragmentação do íon com  $m/z\ 644$

Para confirmar a presença de apenas uma estrutura de esfingosina, a amostra foi hidrolisada segundo Watanabe et al. (2001), e acetilada para injeção em GC-MS. No entanto, apenas os ácidos graxos  $\text{C}_{16:0}$  (70%),  $\text{C}_{17:0}$  (9%) e  $\text{C}_{18:0}$  (21%) foram encontrados. O material hidrolisado foi então submetido a análise por ESI-MS, nos modos de ionização negativo e positivo dando sinais em  $m/z\ 403\ [\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $405\ [\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 28 A), respectivamente. Estes resultados foram consistentes com a esfingosina ligada ao 2-AEP, devido a hidrólise incompleta, que removeu os ácidos graxos, mas não o grupo cabeça polar (PHG – *polar head group*). Contudo, foi possível inferir que apenas um tipo de esfingosina estava presente no CAEP, sendo que os demais íons observados eram realmente devido à presença de outros tipos de ácidos graxos, os quais foram removidos durante a hidrólise. Ambos os íons formados no modo negativo e positivo foram submetidos à fragmentação, mas devido as suas características, o modo positivo gerou mais informações estruturais,

já que no modo negativo apenas o PHG apareceu, devido à presença do grupo fosfonato. O principal íon positivo de  $m/z$  405 quando fragmentado gerou íons de  $m/z$  280 e 262 (Figura 28 B), consistentes com a estrutura da base de cadeia longa 1,3-dihidroxi-2-amino-4,8-*trans*-octadecadieno, confirmando que as duplas ligações fazem parte da estrutura da esfingosina e não dos ácidos graxos. Outros íons de  $m/z$  126 e 94 são consistentes com o esperado para o AEP, confirmando assim a estrutura observada nos espectros de NMR.

**Figura 28** – Espectros de ESI-MS e CID-MS em modo positivo, da fração Pp-F6 após hidrólise



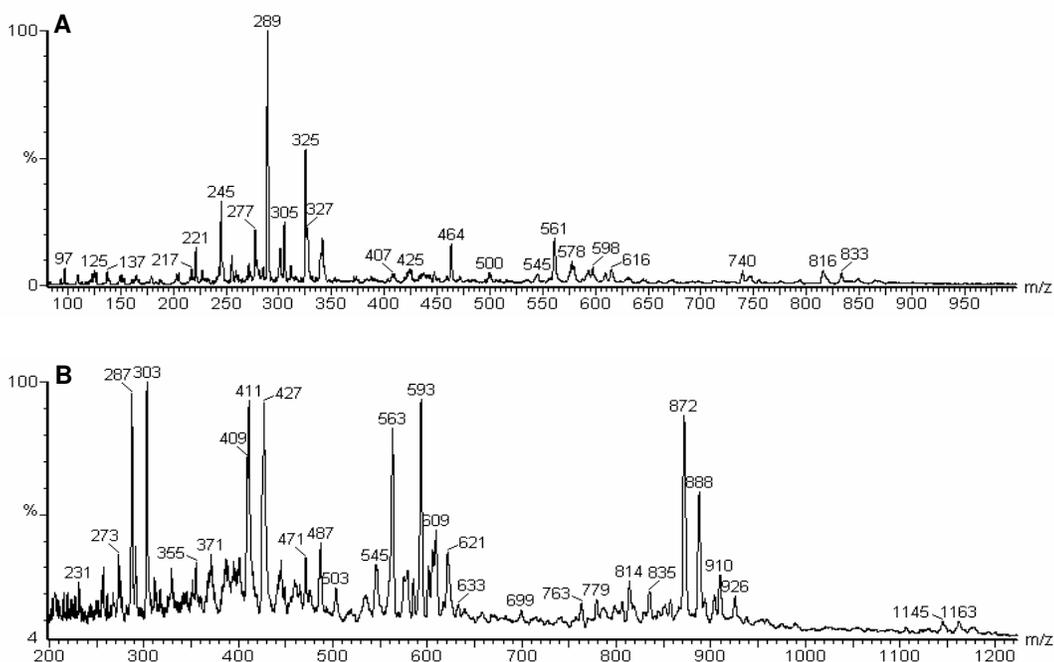
(A) Espectro de ESI-MS e (B) CID-MS em modo positivo da fração Pp-F6 hidrolizada

### 4.2.3. Análise dos lipídeos de folhas de *Maytenus ilicifolia*

Embora *M. ilicifolia* seja uma planta de grande interesse científico, dado ao grande número de atividades biológicas atribuídas a ela, os trabalhos publicados no meio científico não trazem estudos relacionados ao conteúdo de lipídeos presentes nesta planta. Aqui serão apresentados alguns resultados obtidos com extratos lipídicos das folhas de *M. ilicifolia*.

O extrato Mi-EL foi submetido à análises preliminares por ESI-MS em modo positivo e negativo (Figura 29 A e B) a fim de identificar a presença de lipídeos. Porém, foi observado um grande conteúdo de flavonóides (que serão descritos mais tarde). Então optou-se por realizar um particionamento antes de continuar as análises. Neste aspecto, extrato Mi-EL foi solubilizado em 300 mL de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1, v/v), em seguida foi adicionado 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , obtendo uma razão entre os solventes de 2:1:1, v/v. A mistura foi vigorosamente agitada, e em seguida mantida em repouso em geladeira, para que houvesse a formação de duas fases. As fases foram separadas em funil de separação gerando uma fase inferior (chamada de Mi-EL-I) contendo os compostos solúveis em  $\text{CHCl}_3$ , e outra superior (chamada de Mi-EL-S), contendo os compostos solúveis em MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ .

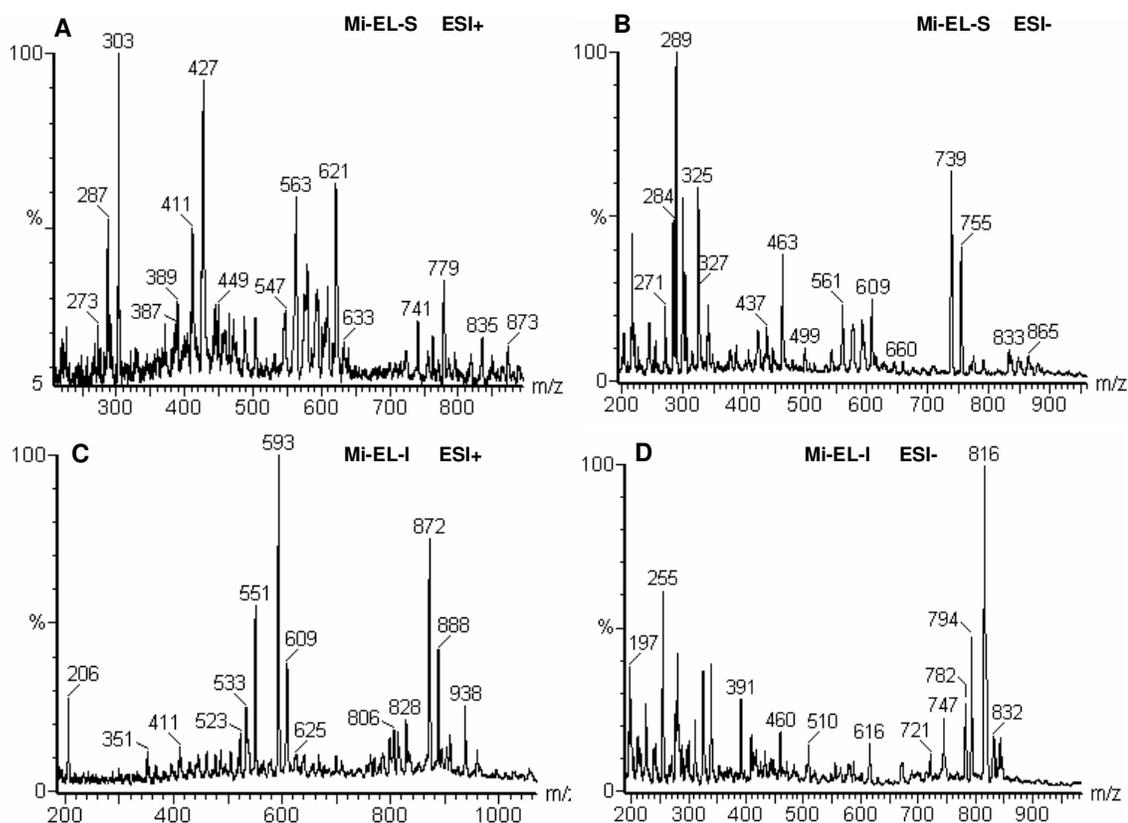
Figura 29 – Espectros ESI-MS do extrato Mi-EL



(A) ESI-MS em modo negativo, e (B) em modo positivo

As duas fases (Mi-EL-I e Mi-EL-S) foram submetidas a análises por ESI-MS, em modo positivo e negativo (Figura 30 A-D), e foi possível verificar que o particionamento foi eficiente para remoção dos flavonóides (os quais serão descritos mais adiante), que ficaram retidos na fase superior (Mi-EL-S), enquanto que os lipídeos ficaram na fase de  $\text{CHCl}_3$  (Mi-EL-I). Com isso, apenas a fração Mi-EL-I foi utilizada nesta etapa, para identificação de seus lipídeos por *tandem*-MS.

**Figura 30** – Espectros ESI-MS em modo positivo e negativo da fração Mi-EL-S e Mi-EL-I



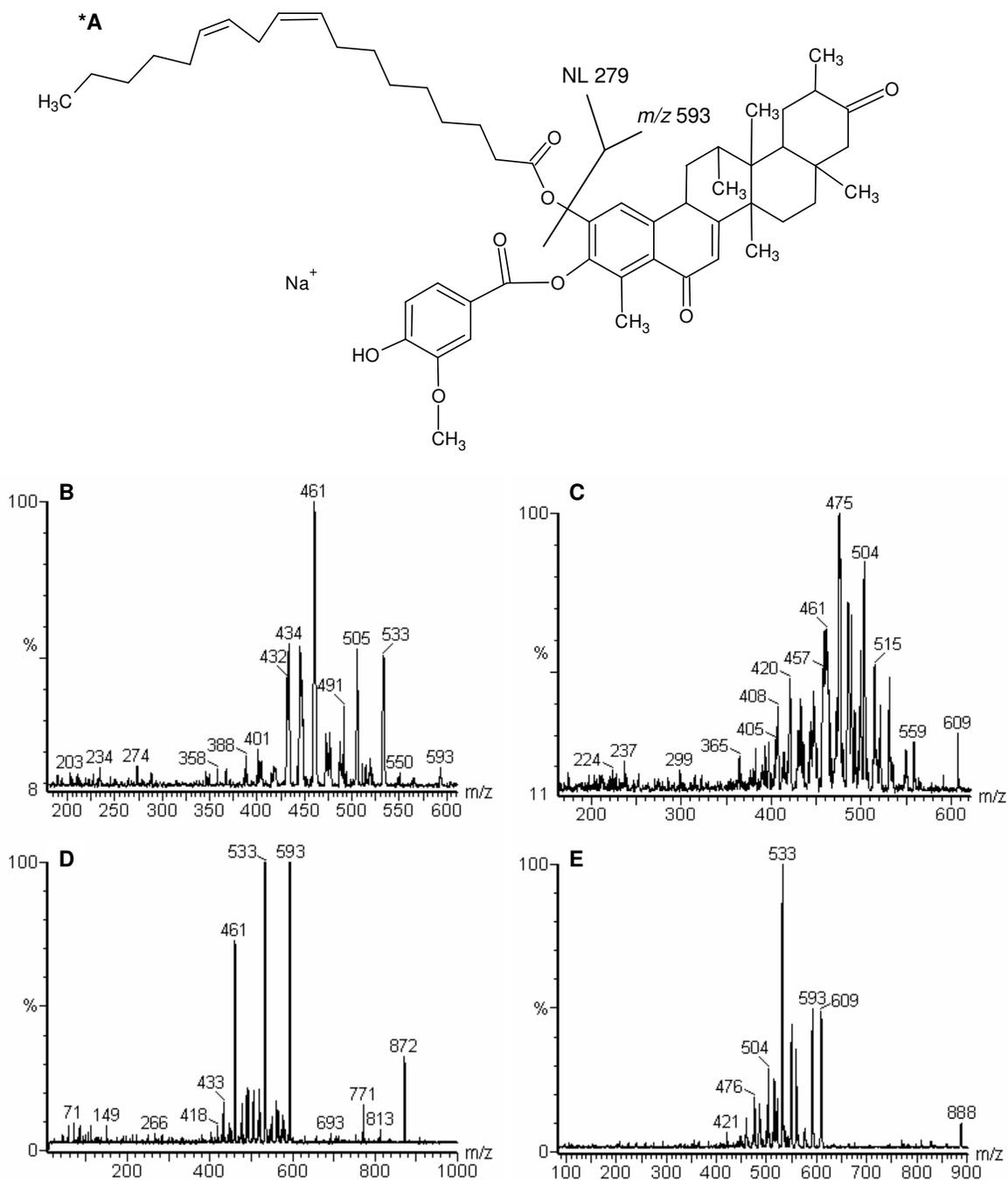
ESI-MS em modo positivo (A), e negativo (B) da fase superior do particionamento do extrato Mi-EL; e ESI-MS em modo positivo (C), e negativo (D) da fase inferior.

#### 4.2.3.1. Identificação dos lipídeos de *Maytenus ilicifolia*, presentes na fração Mi-EL-I por *tandem*-MS em modo positivo

O principal foco desta etapa são os glicolipídeos vegetais, que são tipicamente compostos por glicolipídeos neutros, como os galactolipídeos que apresentam melhor ionização em modo positivo, pois de modo geral necessitam de um cátion como  $\text{Na}^+$  para produzirem íons. Mas, no modo positivo de ionização os íons mais abundantes não foram referentes aos glicolipídeos e apareceram com  $m/z$  551, 593, 609, 872 e 888. Estes compostos não foram identificados, mas seu perfil de fragmentação por CID-MS (Figura 31 A-E) sugere que eles apresentam uma estrutura em comum com diferentes substituintes já que os fragmentos de massa são semelhantes. Como pode ser visto, o íon precursor de  $m/z$  872 deu origem a um fragmento de  $m/z$  593, enquanto que o íon precursor de  $m/z$  888 deu origem ao fragmento de  $m/z$  609. A diferença entre os íons precursores e seus fragmentos é de 279 m.u., a qual é equivalente à perda de um ácido linolêico ( $\text{C}_{18:2}$ ).

Embora para a correta determinação destas estruturas seja necessária sua purificação e análises por NMR, é possível que estas estruturas sejam derivadas de triterpenos, como os recentemente determinados em *M. ilicifolia*, que embora não tenham apresentando ligações com ácidos graxos, continham um ácido 4-metoxi-5-hidroxi-benzóico ligado a um núcleo triterpenóide, recebendo o nome de Millicifolina A (GUTIÉRREZ et al., 2007). Esta estrutura poderia formar íons de  $m/z$  609  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , e se acilada pelo ácido linolêico daria o íon de  $m/z$  872. Contudo, quando fragmentado o íon de  $m/z$  872, ele poderia não gerar o fragmento de  $m/z$  609, mas sim o fragmento de  $m/z$  593, porque na quebra a Millicifolina A pode estar perdendo um átomo de oxigênio (Figura 31 A). Os demais compostos observados podem ser estruturas semelhantes contendo mais hidroxilas, ou então podem ter sido formados devido à ionização com  $\text{K}^+$ .

**Figura 31** – Espectros de CID-MS em modo positivo dos principais íons da fração Mi-EL-I

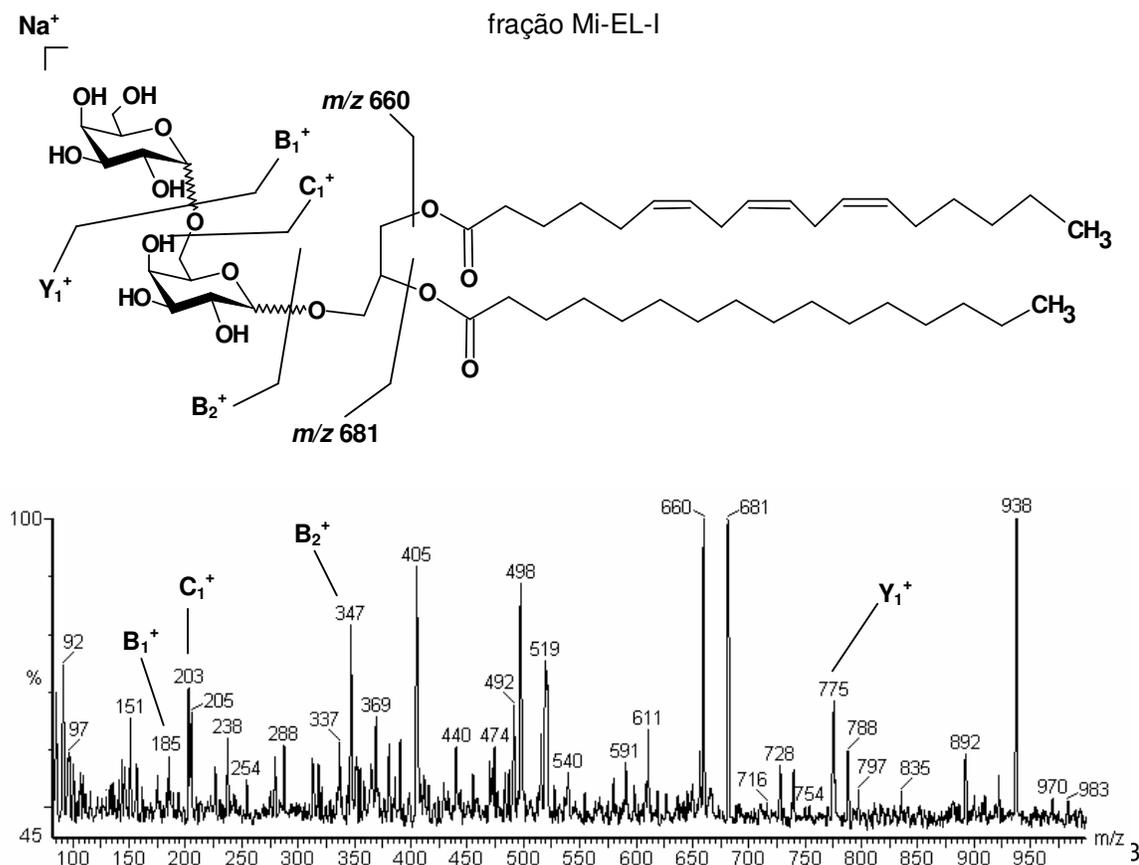


\*A) Estrutura meramente especulativa, mostrando a Milicifolina A acilada por um ácido linoléico (necessita de outros experimentos para confirmação). CID-MS dos em modo positivo dos íons de *m/z* 593 (A) e 609 (B); notar que estes íons e seu fragmentos se repetem nos espectros de CID-MS dos íons de *m/z* 872 (D) e 888 (E).

Embora as estruturas dos principais íons observados não tenham sido elucidadas, um íon de  $m/z$  938  $[M+Na]^+$ , que apareceu no espectro de massas da fração Mi-EL-I, gerou fragmentos consistentes com a estrutura esperada de um digalactosildiacylglicerol (DGDG). Os fragmentos que dão suporte a esta conclusão são  $Y_1^+$ , de  $m/z$  775,  $B_2^+$  de  $m/z$  347 e  $B_1^+$  de  $m/z$  185. O íon de  $m/z$  203 parece ser proveniente do fragmento  $C_1^+$ , consistente com o esperado para hexoses. Outros fragmentos que não participam da nomenclatura de Domon e Costello (1988), também dão suporte à estrutura de um diglicosil-lipídeo, por exemplo os fragmentos de  $m/z$  660 e 681, consistentes com a remoção de um ácido linolênico ( $C_{18:3}$ ), ou um ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ), respectivamente. Já o fragmento de  $m/z$  405 é consistente com o dissacarídeo ligado ao esqueleto carbônico do glicerol (Figura 32).

O tipo de ligação interglicosídica e quais monossacarídeos fazem parte desta estrutura ainda precisam ser confirmados por outras técnicas. Contudo galactolipídeos são bastante comuns em tecidos vegetais, principalmente nos cloroplastos, nos quais podem representar a maior parte do conteúdo lipídico, sendo essenciais para máxima eficiência da fotossíntese (HÖLZL e DÖRMANN, 2007).

**Figura 32** – Espectro de CID-MS em modo positivo de um diglicosildiacylglicerol presente na fração Mi-EL-I



#### 4.2.3.2. Identificação dos lipídeos de *Maytenus ilicifolia* por tandem-MS em modo negativo

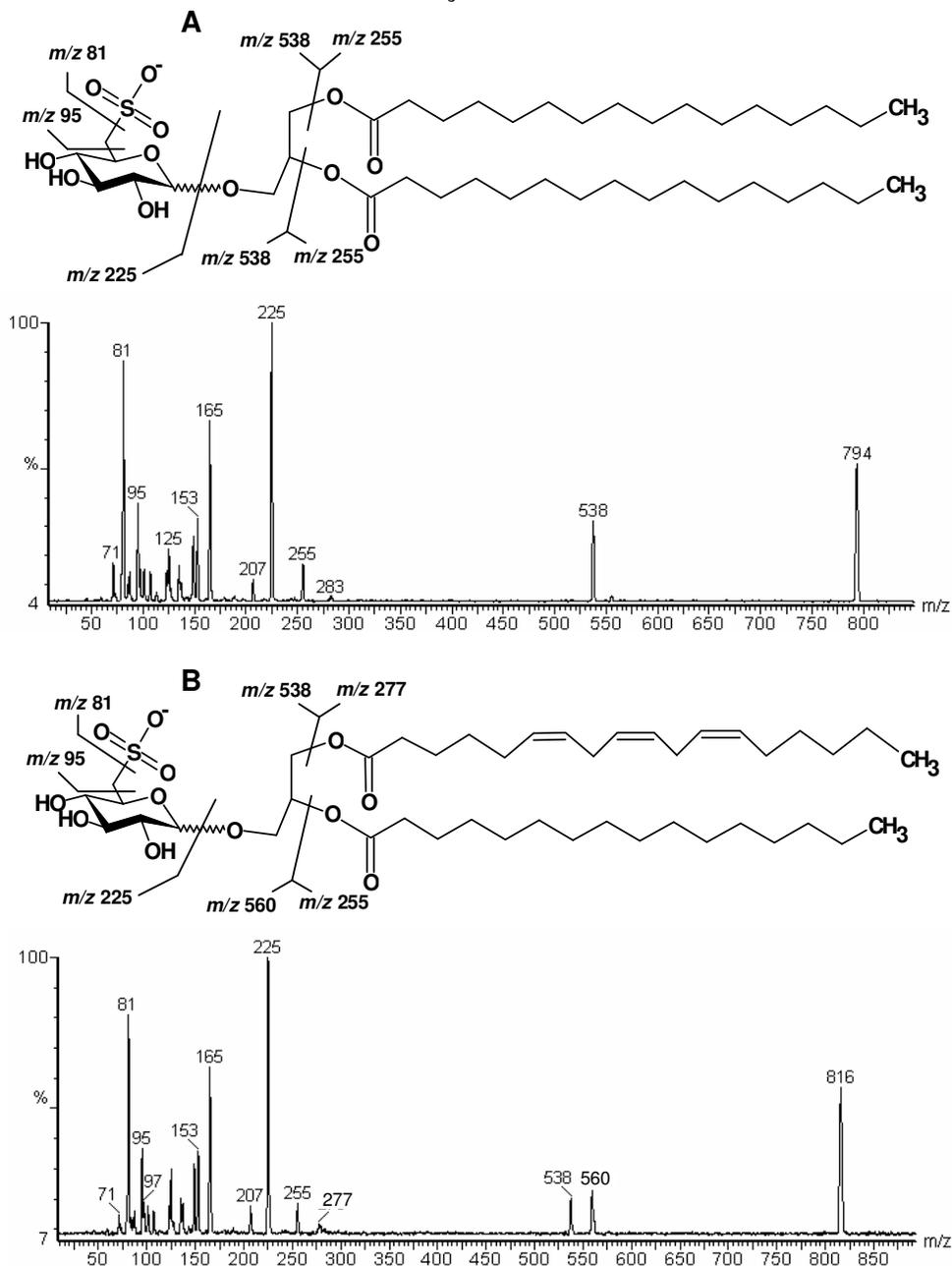
A fração Mi-EL-I rendeu dois principais lipídeos por ESI-MS em modo negativo. Lipídeos contendo grupos ácidos como alguns fosfolipídeos são melhor observados pelo modo negativo, contudo os dois principais íons observados, com  $m/z$  794 e 816 foram consistentes com sulfonolipídeos, outra classe de glicolipídeos comuns em tecidos vegetais. Assim como os galactolipídeos, os sulfonolipídeos são comumente encontrados perfazendo grande parte do conteúdo lipídico dos cloroplastos, os quais parecem estar envolvidos com complexos protéicos, juntamente com outros lipídeos carregados (ANDERSON, 1975). Os sulfonoglicolipídeos apresentam uma unidade de  $\alpha$ -quinovose (6-desoxiglucose) com um grupo sulfonil em C-6, e portando são denominados de sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG). Por ser freqüentemente encontrado em tecidos vegetais, o SQDG é referido como o “sulfolipídeo de plantas” (BENSON, 1963).

Pelo menos a metade dos ácidos graxos ligados ao SQDG está na forma de ácido palmítico (GOUNARIS e BARBER, 1985), sendo consistente com as estruturas apresentadas aqui. O íon precursor de  $m/z$  794 (Figura 33 A) gerou fragmentos indicando que o lipídeo está acilado por duas unidades de ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ), já que produziu apenas um tipo de fragmento decorrente da perda de um ácido graxo, com  $m/z$  538. O íon precursor de  $m/z$  794 poderia ser formado também por uma composição de ácidos graxos com cadeias de 14 e 18 carbonos (ácidos mirístico e esteárico, respectivamente). Contudo seriam esperados fragmentos de  $m/z$  510 e 566, os quais não estavam presentes no espectro. Além disso, o único fragmento atribuído a um ácido graxo é compatível com o ácido palmítico, com  $m/z$  255.

Os fragmentos do grupo polar são:  $m/z$  283, compatível com a remoção dos dois ácidos graxos, o fragmento  $B_1^-$  aparece com  $m/z$  225. O grupo sulfonil forma dois fragmentos, um de  $m/z$  95, quando ligado ao grupo  $CH_3$  proveniente do monossacarídeo, e outro de  $m/z$  81, formado pela remoção do grupo  $CH_3$ , com concomitante transferência de um hidrogênio para o fragmento. Outros fragmentos observados parecem fazer parte das quebras ocorridas no interior do anel glicosídico, sendo que são observados àqueles fragmentos contendo o grupo sulfonato (Figura 33 A).

O outro íon identificado como proveniente do SQDG, com  $m/z$  816, produziu fragmentos com  $m/z$  560 pela remoção de um ácido palmítico, e com  $m/z$  538 consistente com a remoção de um ácido linolênico, sendo que ambos os ácidos graxos foram observados com  $m/z$  255 e 277, respectivamente. Os demais fragmentos são similares aos já descritos (Figura 33 B).

**Figura 33** – Espectro de CID-MS em modo negativo de sulfonoglicolípideos presentes na fração Mi-EL-I



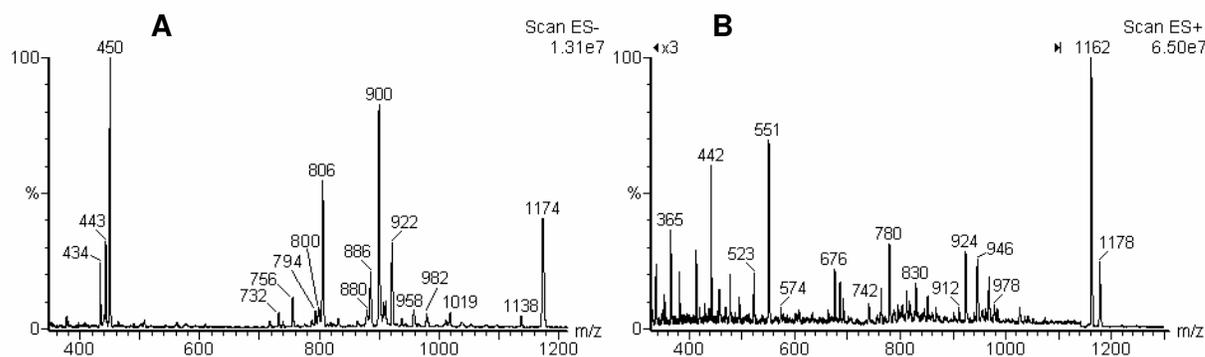
(A) Estrutura e fragmentação do sulfonoglicolípideo contendo 2 ácidos palmíticos ligados ao glicerol, e (B) contendo um ácido palmítico e um ácido linolênico.

#### 4.2.4. Análise dos lipídeos da arquea *Haloarcua marismortui*

Lipídeos de arqueas diferem dos demais organismos pela presença de ligações do tipo éter, formando estruturas chamadas de arqueol, contendo tipicamente dois grupos fitanil (estruturas contendo 20 carbonos cada) ligados ao glicerol, cadeias de 15 e 25 carbonos também já foram descritas (MANCUSO et al, 1985). Os maiores lipídeos, contudo, apresentam duas cadeias com 40 carbonos cada, ligados a duas moléculas de glicerol, pelas duas extremidades, formando os lipídeos tetra-éter (MACALADY et al., 2004). A primeira descrição dos lipídeos de *H. marismortui* por Evans et al. (1980) forneceu informações importantes sobre a estrutura dos fosfolipídeos. Isto foi, sobretudo, realizado através análises em TLC e por composição química elementar. Apenas a estrutura de um glicolipídeo neutro foi determinada por NMR e análises metilação. Mais tarde Klöppel e Fredrickson (1991) empregando FAB-MS, forneceram mais informações sobre os fosfolipídios, e, além disso, eles sugeriram a presença de lipídeos contendo cadeias insaturados.

Os lipídeos de *H. marismortui* foram extraídos com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, gerando um material solúvel de cerca de 200 mg (chamado de Hm-EL), incluindo pigmentos que puderam ser observados pela intensa coloração avermelhada do extrato. A presença de fosfolipídios foi acompanhada por TLC, utilizando o reativo de molibdato (DITTMER e LESTER, 1964). A amostra foi então analisada por ESI-MS em modo negativo e positivo, confirmando a presença de diversos fosfolipídeos (Figura 34 A, B).

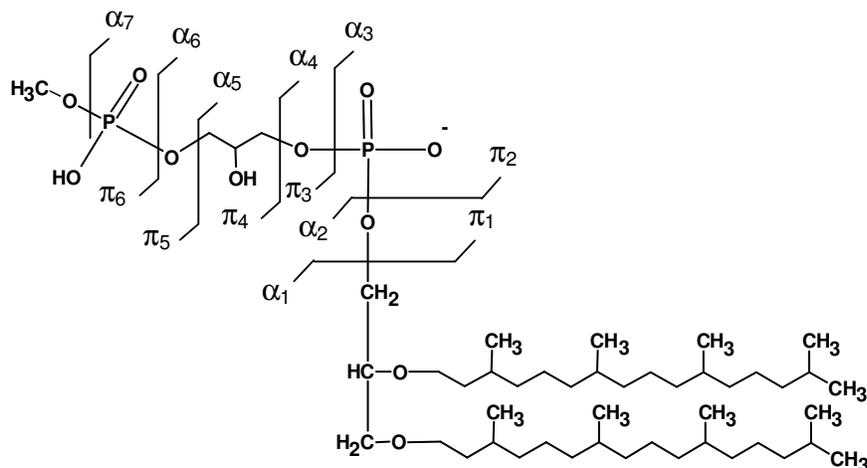
**Figura 34** – Espectros de ESI-MS da fração Hm-EL



(A) ESI-MS em modo negativo e (B) modo positivo.

Para facilitar a correlação entre os fragmentos obtidos por CID-MS e as estruturas dos fosfolipídeos, foi desenvolvida uma nomenclatura específica, na qual os fragmentos são denominados de  $\alpha_n$  e  $\pi_n$ , onde  $\alpha$  indica fragmentos contendo o arqueol e  $\pi$  indica os fragmentos contendo o PHG, contando a partir do fosfato ligado ao arqueol, e o subscrito  $n$  indica a posição da quebra (por exemplo,  $\alpha_4$ ,  $\pi_2$  - Figura 35). Como as diferenças estruturais entre estes lipídeos ocorrem principalmente na cabeça polar grupo (PHG), as principais diferenças entre os espectros de massa foram encontrados em fragmentos  $\pi_1$  e  $\pi_2$ , que são característicos de cada fosfolipídeo. Contudo os fragmentos devem ser avaliados com cautela, devido à formação de fragmentos em  $m/z$  97 e 79, que são característicos de grupos fosfato e fosfato desidratado, respectivamente, ocorrendo em todos os fosfolipídeos.

**Figura 35** – Nomenclatura para os fragmentos observados nos fosfolipídeos de *H. marismortui*



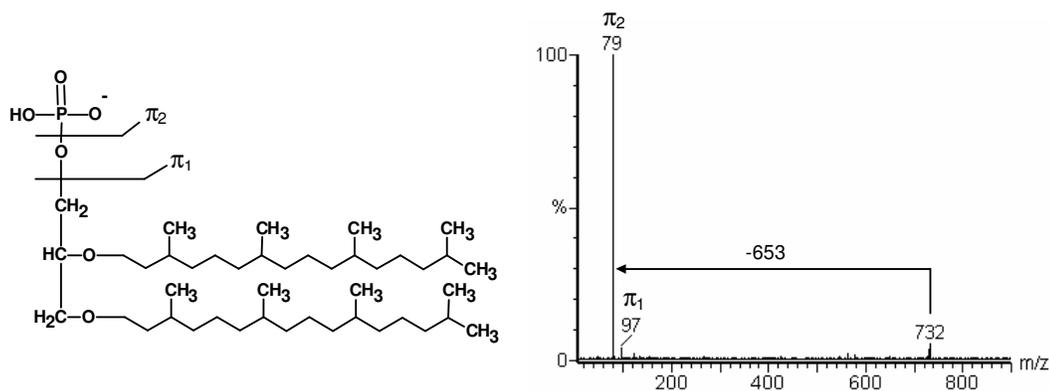
A utilização da nomenclatura também permitiu a fácil identificação dos fosfolipídeos contendo cadeia insaturadas, pelo cálculo da perda neutra (NL) referente ao arqueol, que pode ser deduzida subtraindo o fragmento  $\pi_2$  do íon quasi-molecular. Com isto foram determinadas três estruturas para os grupos arqueol presentes nos lipídeos de *H. marismortui*: àqueles com NL de 653 m.u., correspondendo ao arqueol saturado; com NL de 647 m.u., correspondendo ao arqueol tri-insaturado; e com NL de 641 m.u., correspondendo ao arqueol hexa-insaturado.

#### 4.2.4. Análise dos fosfolipídeos da arquea *Haloarcula marismortui*

##### 4.2.4.1. Arquetidil fosfato (aPA)

O mais simples fosfolipídeo encontrado por ionização negativa, apareceu com  $m/z$  732  $[M-H]^-$ , sendo coerente com a estrutura do aPA, que foi confirmado pelo seu perfil de fragmentação por CID-MS em modo negativo, que indicou a presença de uma cadeia saturada com NL de 653 m.u. (Figura 36). O aPA não foi observado formando íon no modo positivo de ionização.

**Figura 36** – Estrutura e espectro de CID-MS em modo negativo do arquetidil fosfato



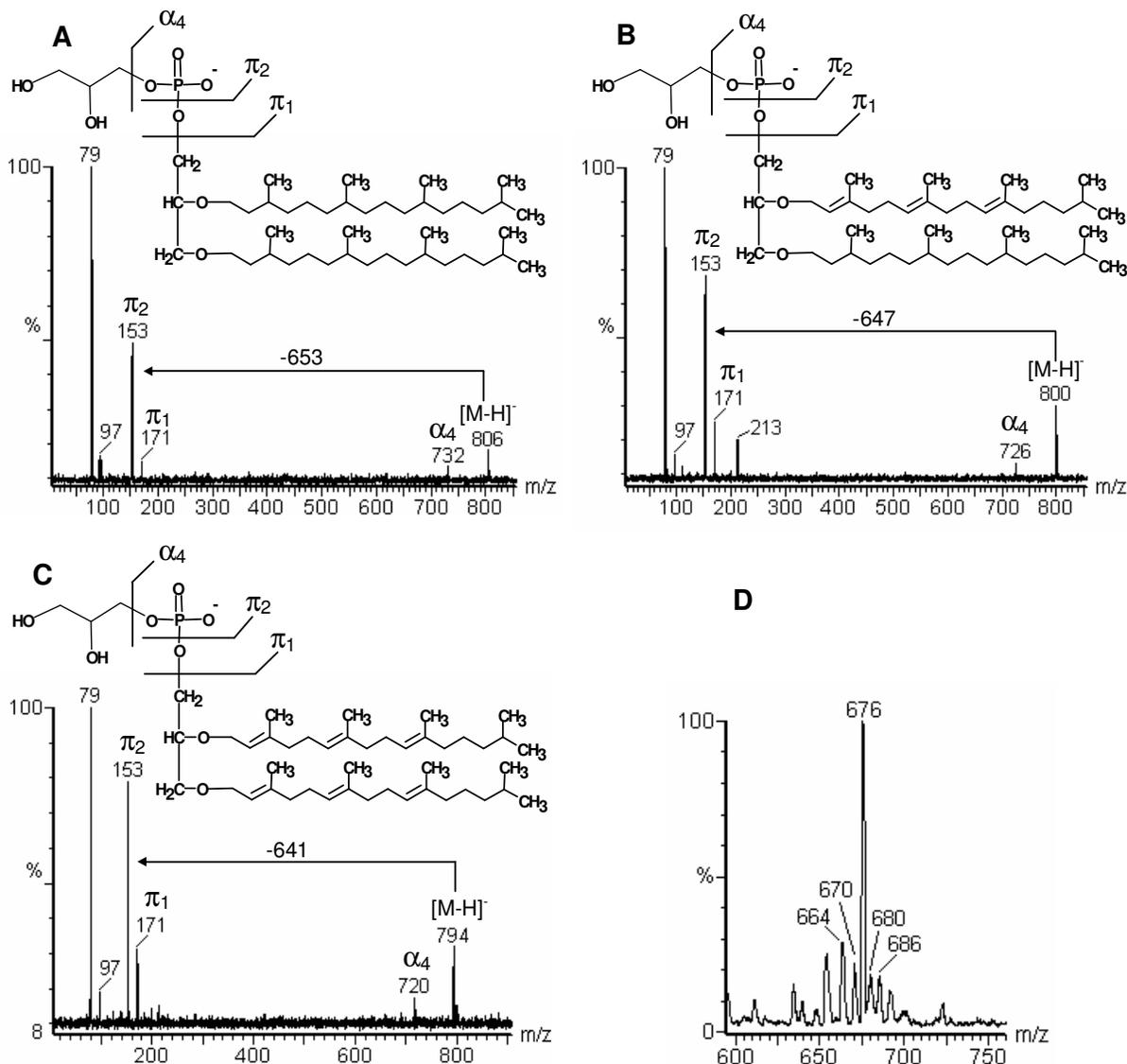
##### 4.2.4.2. Arquetidil fosfoglicerol (aPG)

O aPG apareceu formando íons de  $m/z$  806  $[M-H]^-$ , com dois análogos insaturados de  $m/z$  800  $[M-H]^-$  e 794  $[M-H]^-$ . Estes íons foram fragmentados por CID-MS gerando caracteristicamente os fragmentos de  $m/z$  171, 153, e 79, que correspondem ao glicerofosfato, glicerofosfato desidratado e fosfato desidratado, respectivamente. O íon de  $m/z$  800 foi identificado como proveniente do aPG tri-insaturado, produzindo uma NL de 647 m.u., coerente com a estrutura do dihidrogeranilgeranil-fitanilglicerol, enquanto que aquele com  $m/z$  794 foi identificado como hexa-insaturado, dando origem a uma NL de 641 m.u., coerente com 2,3-dihidrogeranilgeranil glicerol (Figura 37 A-C). Além disso, a confirmação da presença destes lipídeos insaturados foi obtida em ESI-MS positivo dos lipídeos hidrolisados, pelo aparecimento dos íons sodiados de  $m/z$  670 e 664, os quais correspondem ao

arqueol tri- e hexa-insaturado, respectivamente. O íon mais abundante refere-se justamente ao arqueol saturado, com  $m/z$  676  $[M+Na]^+$  (Figura 37 D).

Assim, em contraste com Klöppel e Fredrickson (1991), que observaram intensos íons em seus espectros de massa, que foram atribuídos a lipídios insaturados, aqui foram encontrados apenas íons de baixa abundância, interpretados como fosfolipídios insaturados.

**Figura 37** – Estruturas e espectros de CID-MS em modo negativo do arquetidil fosfoglicerol e seus análogos insaturados



Espectros de CID-MS do aPG de cadeia saturada (A), tri-insaturada (B) e hexa-insaturada (C); ESI-MS em modo positivo do extrato após hidrólise confirmando a presença de arqueol saturado ( $m/z$  676) tri-insaturado ( $m/z$  670) e hexa-insaturado ( $m/z$  664).

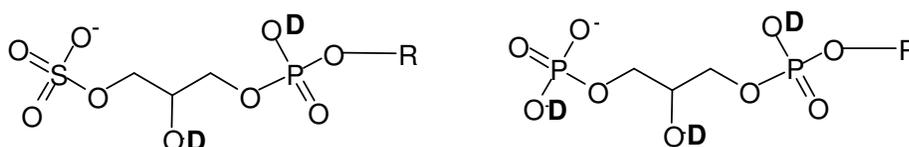
#### 4.2.4.3. Arquetidil fosfoglicerosulfato (aPGS)

O íon de  $m/z$  886 quando submetido ao *tandem*-MS originou fragmentos  $\pi$  de  $m/z$  233 ( $\pi_2$ ), 171 ( $\pi_3$ ), 153 ( $\pi_4$ ), 97 ( $\pi_5$ ), 79 ( $\pi_6$ ) e os fragmentos de  $\alpha$  de  $m/z$  732 ( $\alpha_4$ ) e 806 ( $\alpha_6$ ), sendo consistentes com a estrutura do ácido fosfoglicerosulfato (Figura 39 A, p. 82). Contudo, uma estrutura análoga contendo um grupo fosfato no lugar do sulfato, o arquetidil fosfoglicerofosfato (aPGP) já foi descrito na composição de lipídeos de *H. marismortui* (EVANS et al, 1980). Estes dois lipídeos são isóbaros, e apresentam massa molecular média não iônica de 887,19 Da (aPGP) e 887,27 Da (aPGS). A fim de distinguir entre as duas estruturas um espectrômetro de massas de alta resolução é necessário. No entanto, foi possível inferir qual estrutura estava presente no extrato utilizando algumas características que diferem entre os grupos sulfatos e fosfatos. Como ambas as estruturas podem formar íons com múltiplas cargas, a primeira característica que pôde ser observada foi a formação de um íon duplamente carregado, de  $m/z$  443 ( $m = 886 / z = -2$ ), que por si ainda não foi suficiente para diferenciar aPGS de aPGP. Mas como o aPGP poderia formar íons triplamente carregados, poderia se esperar a presença de um íon de  $m/z$  295, o qual não foi encontrado no espectro. Apenas a ausência de um íon triplamente carregado não é suficiente para excluir a presença do aPGP, já que a formação deste íon poderia estar sendo impedida devido a forte repulsão coulômbica causada por duas cargas negativas em um mesmo grupo fosfato.

Como informação adicionais eram necessárias, outra estratégia foi utilizada considerando a capacidade destes lipídeos de serem marcados com deutério. Como eles diferenciam-se na capacidade de assimilar deutério, já que existem 2 sítios disponíveis para câmbio no aPGS e 3 no aPGP (Figura 38), eles deveriam formar íons com diferença de massa de 1 Da, esperados em  $m/z$  888 (aPGS) e 889 (aPGP). A amostra foi então marcada com deutério por duas sucessivas solubilizações em  $\text{CHCl}_3$ -MeOD- $\text{D}_2\text{O}$  (7:2:1) seguidas de evaporação. A amostra foi então solubilizada no mesmo solvente deuterado e analisada por injeção direta no ESI-MS. Conforme o esperado o íon de  $m/z$  888 apareceu no espectro de massas indicando que a marcação com deutério foi eficiente. Contudo este íon foi seguido de dois outros de  $m/z$  889 e 890 que referem-se abundância isotópica elementar natural. Esta abundância isotópica já havia sido observada no espectro da amostra

antes da marcação com deutério, através da formação dos íons de  $m/z$  886, 887 e 888 com uma razão entre eles de 1,4:0,7:0,1 (Figura 39 B e C). Como esta relação se manteve inalterada após a marcação com deutério, foi possível inferir que aPGP não estava presente, já que seria esperado um aumento principalmente na proporção do íon de  $m/z$  889. Como este aumento não ocorreu, este íon foi proveniente apenas do isótopo natural de  $m/z$  887 e não do aPGP.

**Figura 38** – Esquema de substituição de H por D nos grupos polares do aPGS e do aPGP



D – indica os pontos onde os H<sup>+</sup> foram substituídos por D<sup>+</sup>

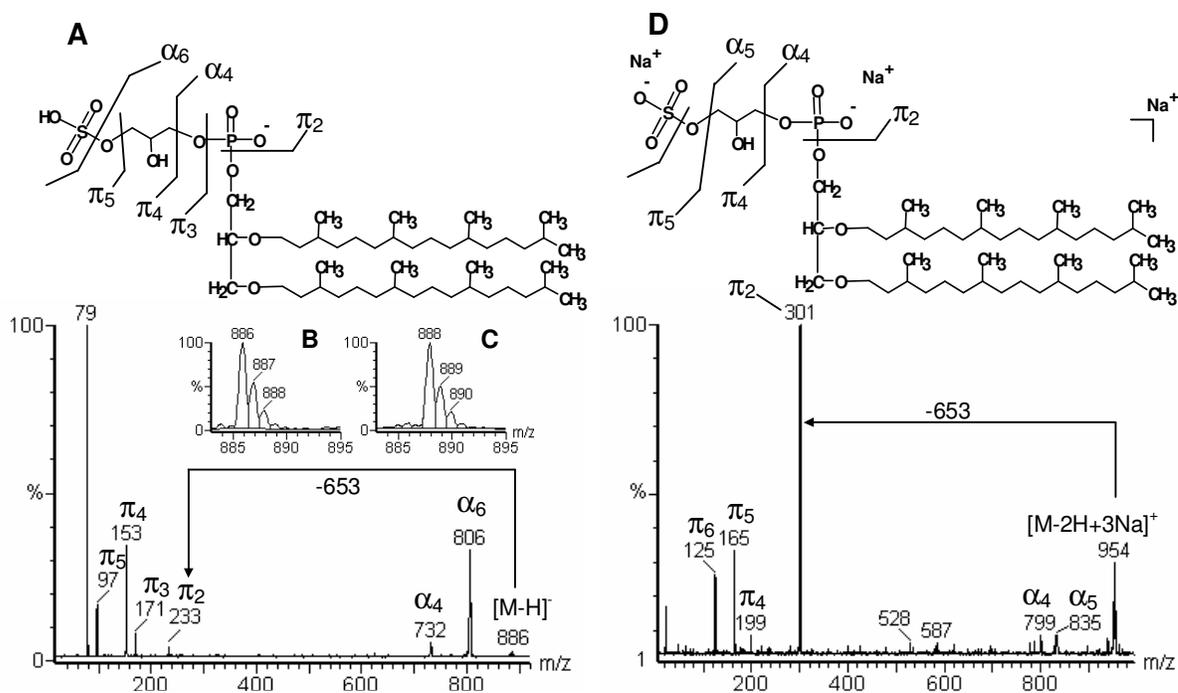
Para que não restassem dúvidas quanto a ausência do aPGP, outra estratégia levando em consideração o grau de ionização dos lipídeos foi utilizada. Agora os H<sup>+</sup> provenientes dos grupos ácidos dos lipídeos foram trocados por Na<sup>+</sup> pela utilização de solução de NaOH no solvente, até pH 10, e a análise foi realizada em modo positivo. A fim de garantir que este pH seria suficiente para desprotonação completa, o solvente foi testado em um padrão de ácido fosfatídico (PA) (Sigma-Aldrich), o qual havia formado um íon negativo principal de  $m/z$  674, compatível com PA contendo ácidos palmítico e oléico. Por ESI-MS em modo positivo utilizando o solvente alcalino, o principal íon foi observado em  $m/z$  741, consistente com o PA [M-2H+3Na]<sup>+</sup>, e outros íons equivalentes ao PA mono- e di-sodiado não foram formados, mostrando que nestas condições de análise, todos os H<sup>+</sup> foram substituídos por Na<sup>+</sup>.

A amostra foi então submetida às mesmas condições de análise do padrão de PA, e como resultado foi obtido um íon de  $m/z$  954, coerente com o aPGS [M-2H+3Na]<sup>+</sup>. Por outro lado, o íon para o aPGP [M-3H+4Na]<sup>+</sup>, esperado em  $m/z$  976, não foi observado no espectro, confirmando a ausência de aPGP. (Figura 39 D). Além disso, *tandem*-MS do íon precursor de  $m/z$  954 deu origem a um fragmento de  $m/z$  799, identificado como sendo de fragmento  $\alpha_4$ , que é equivalente à estrutura do

aPA triplamente sodiado, o que confirma que estas condições foram suficientes para causar desprotonação completa dos grupos fosfato. Isto mostra que a ausência de um íon com  $m/z$  976 é devido à ausência de aPGP, e não por uma desprotonação incompleta, o que levaria a formação do íon de  $m/z$  954 a partir do aPGP  $[M-2H+3Na]^+$ .

Uma versão insaturada apareceu com  $m/z$  880  $[M-H]^-$ , sendo identificado como contendo arqueol tri-insaturado. Este lipídeo quando marcado com deutério foi deslocado para  $m/z$  882, e na presença de NaOH, formou sais de sódio com  $m/z$  948  $[M-2H+3Na]^+$ , mostrando também ser proveniente do aPGS (Tabela 3, p. 86).

**Figura 39** – Estruturas e espectros de CID-MS em modo negativo e positivo do arquetidil fosfoglicerossulfato



Estrutura e fragmentação do aPGS em modo negativo (A) e positivo em pH 10 (B). ESI-MS em modo negativo mostrando os íons *quasi*-moleculares do aPGS na marcado (C) e do aPGS deuteroado (D)

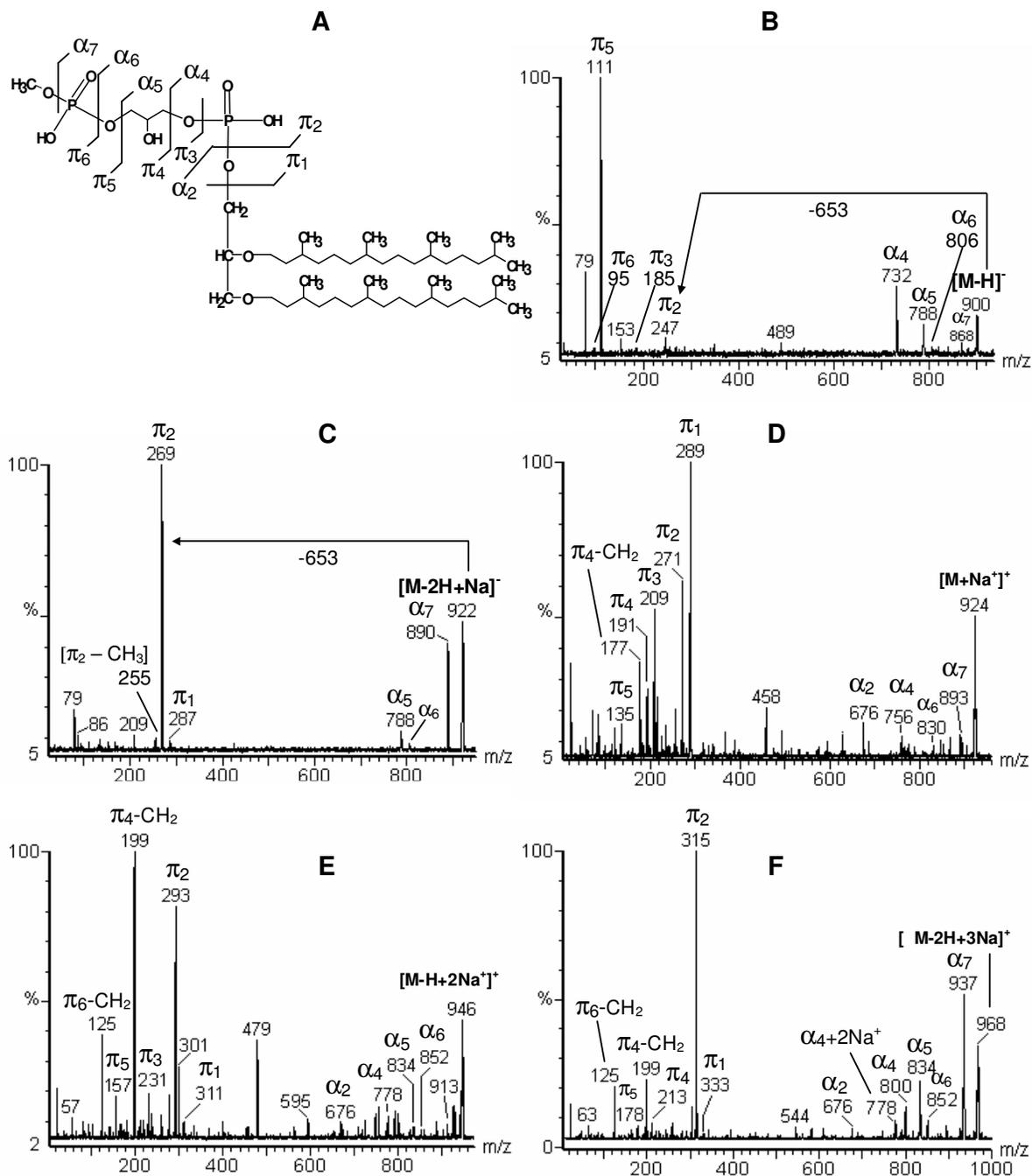
#### 4.2.4.4. Arquetidil fosfoglicerofosfato metil éster (aPGP-Me)

Embora os resultados aqui sejam semelhantes aos já obtidos em análises de lipídeos de *H. marismortui* o fosfolipídeo encontrado formando íon de maior intensidade não havia sido descrito previamente por Evans et al. (1980). Este fosfolipídeo foi identificado como sendo o arquetidil fosfoglicerofosfato metil éster (aPGP-Me) através dos íons negativos de  $m/z$  450  $[M-2H]^-$ , 900  $[M-H]^-$ , e 922  $[M-2H+Na]^-$ , assim como os íons positivos em  $m/z$  924  $[M+Na]^+$ , 946  $[M-H+2Na]^+$ , e 968  $[M-2H+3Na]^+$  (Figura 40 A-E). Este lipídeo tem estrutura similar ao aPGP, e sua presença parece estar ligada à manutenção da integridade celular, uma vez que membranas arqueas halofílicas precisam manter a sua estabilidade em altas concentrações de sal (3-5 M NaCl), enquanto que as membranas das não-halofílicas, que não apresentam aPGP-Me, são instáveis e permitem vazamentos em tais condições (TENCHOV et al., 2006).

A estrutura do aPGP-Me foi confirmada através *tandem*-MS em modo negativo, que gerou o fragmento de baixa intensidade  $\pi_2$  de  $m/z$  247 e o íon mais abundante (íon base) sendo o  $\pi_5$  de  $m/z$  111, correspondentes aos grupos fosfoglicerofosfato metil éster, e fosfato metil éster, respectivamente. Além disso, também gerou o fragmento  $\alpha_7$  de  $m/z$  868 correspondendo à remoção do grupo  $O-CH_3$ , que juntamente com os demais fragmentos tipo  $\alpha$  confirmam a estrutura (Figura 40 A). O íon negativo referente à forma monossódica deste lipídeo ( $m/z$  922), também foi analisado por *tandem*-MS, gerando um perfil de fragmentação com íons de intensidade totalmente diferentes daqueles encontrados anteriormente, com íon base sendo o fragmento  $\pi_2$ , de  $m/z$  269. Novamente aqui o importante fragmento  $\alpha_7$ , indicando a remoção do grupo  $O-CH_3$  foi encontrado com  $m/z$  890 (Figura 40 B).

Em modo positivo, o aPGP-Me formou 3 íons pseudo-moleculares com  $m/z$  924  $[M+Na]^+$ , 946  $[M-H+2Na]^+$ , e 968  $[M-2H+3Na]^+$ , que poderiam levar a uma superestimação do conteúdo lipídico de *H. marismortui*. Estas diferenças são formadas devido a capacidade do aPGP-Me formar íons mono-carregados contendo 1, 2 ou 3 unidades de  $Na^+$ , sendo que uma destas unidades está servindo como adutor (isto é, formando o íon) enquanto que as outras aparecem substituindo os  $H^+$  dos grupos ácidos. Estes íons também foram analisados por *tandem-MS*, e o que observou-se foi que cada tipo de íon precursor gerou um perfil de fragmentação próprio, apresentando fragmentos de massas diferentes devido a presença de  $Na^+$  em quantidades diferentes, mas principalmente por diferenças nas intensidades dos fragmentos  $\pi$  e  $\alpha$ , como por exemplo, o íon base encontrado em cada espectro de massa foi diferente,  $\pi_1$  ( $m/z$  289) na forma mono-sódica,  $\pi_4$  ( $m/z$  199) na forma di-sódica e  $\pi_2$  ( $m/z$  315) na forma tri-sódica. Isto poderia colaborar para interpretação errônea dos espectros, e conseqüentemente levar a superestimação do conteúdo lipídico de *H. marismortui*. Este efeito pôde ser evitado utilizando o NaOH no solvente para gerar apenas o íon de  $m/z$  968.

**Figura 40** – Estrutura e espectros de CID-MS em modo negativo e positivo do arquetidil fosfoglicerofosfato metil éster



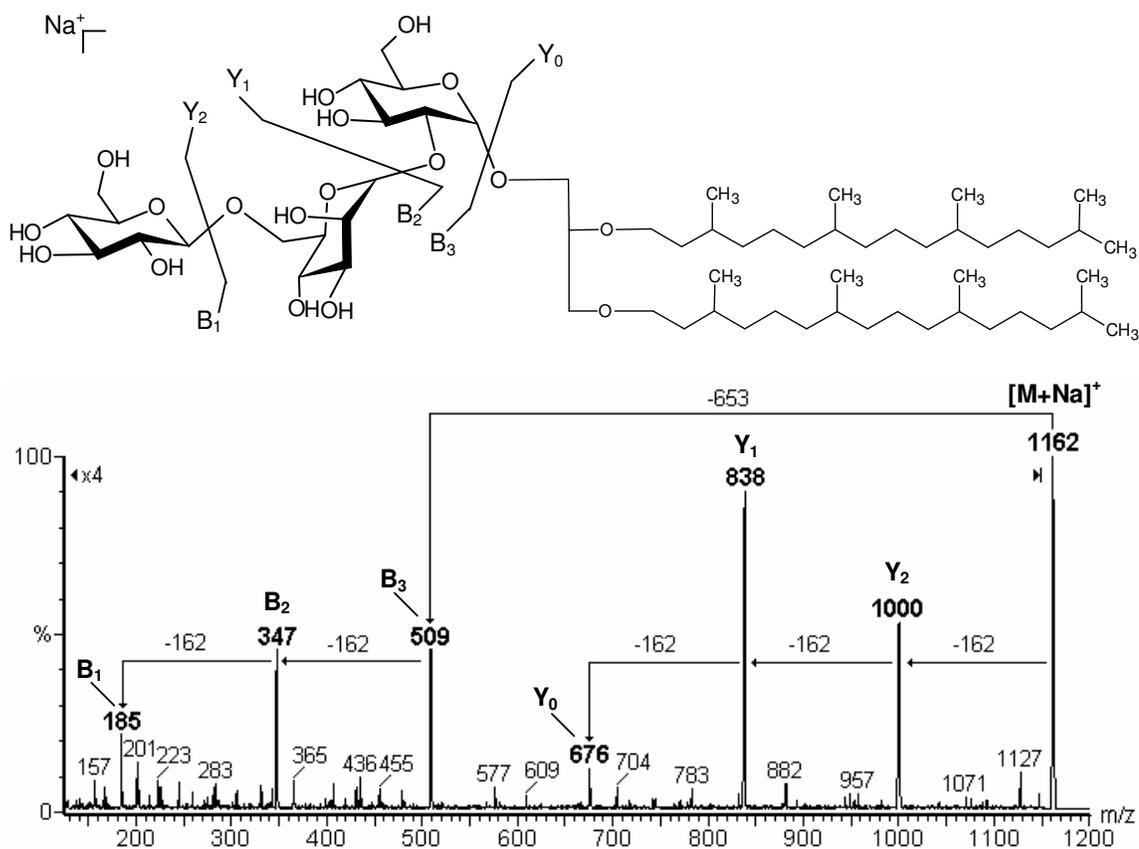
(A) Estrutura e fragmentações do aPGP-Me, (B e C) CID-MS em modo negativo; e modo positivo mono-sódico (D), di-sódico (E), e tri-sódico (F).



formação dos fragmentos  $Y_j$ , com conseqüente liberação dos monossacarídeos adjacentes contendo uma dupla ligação entre C-1 e C-2, formada por clivagem  $\beta$  (DELL, 1987), que aparecem nos espectros como íons sodiados.

A análise por CID-MS resultou na formação dos fragmentos  $Y_2^+$  com  $m/z$  1000  $[M-162+Na]^+$ ,  $Y_1^+$  com  $m/z$  838  $[M-324+Na]^+$ , e  $Y_0^+$  com  $m/z$  676  $[M-486+Na]^+$ . As massas perdidas nos fragmentos  $Y_j$  são todas múltiplos de 162 m.u, indicando remoção do mono-, di-, e trissacarídeo, respectivamente. Essas massas não foram consideradas como NL, já que apareceram na forma de fragmentos  $B_i$  sodiados, observados em  $m/z$  509 ( $B_3^+$ ),  $m/z$  347 ( $B_2^+$ ), e  $m/z$  185 ( $B_1^+$ ), que correspondem aos grupos mono-, di-, e tri-hexosil, respectivamente. O fragmento  $Y_0^+$ , de  $m/z$  676, indica que o arqueol apresenta cadeia saturada (Figura 41). Destaca-se que dois íons observados por ESI-MS em modo negativo são compatíveis com a estrutura do TGD. Eles aparecem com  $m/z$  1138  $[M-H]^-$  e 1174  $[M+Cl]^-$ , contudo não produziram íons no processo de fragmentação.

**Figura 41** – Estrutura sugerida pelo espectro de CID-MS em modo positivo do arquetidil triglicósídeo

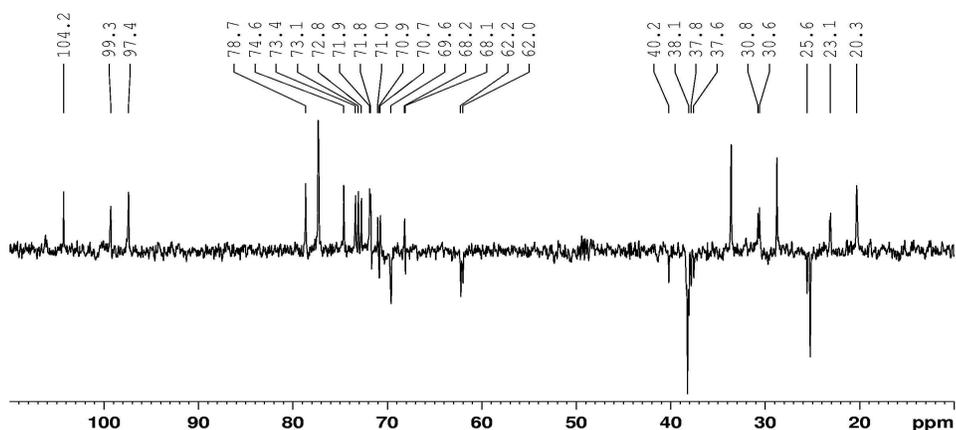


O TGD foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica. A eluição iniciada com  $\text{CHCl}_3$ , aumentando as concentrações de MeOH. A baixa polaridade do solvente inicial permitiu a remoção dos componentes com estruturas mais apolares, como pigmentos. O TGD foi eluído com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1, v /v), contudo análises de TLC mostraram que a fração ainda continha fosfolipídeos. A amostra foi tratada com resina aniônica fortemente básica, e então analisada por NMR e GC-MS.

A análise de  $^{13}\text{C}$ -NMR da região anomérica de carboidratos indicou a presença de unidades de  $\beta$ -Glc em  $\delta$  104,25 ( $J_{\text{C-1/H-1}} = 158,5$  Hz),  $\alpha$ -Glc em  $\delta$  99,27 ( $J_{\text{C-1/H-1}} = 168,8$  Hz) e  $\alpha$ -Man em  $\delta$  97,38 ( $J_{\text{C-1/H-1}} = 168,1$  Hz). Sinais consistentes com ligações, em  $\delta$  78,66, indicando substituição no O-2 de uma unidade de Glc, e em  $\delta$  68,18 consistente com substituição em O-6 da unidade de Man. Sinais de  $\text{CH}_3$  foram encontrados entre  $\delta$  20,32 e 23,09, os quais demonstraram ter conectividade como os carbonos terciários entre  $\delta$  28,78 e 33,64, observados por HMQC-TOCSY, confirmando a natureza ramificada das cadeias lipídicas do arqueol. Sinais de  $\text{CH}_2$  entre  $\delta$  25,58 e 40,21, foram atribuídos ao arqueol, juntamente com os sinais de  $\text{CH}_2\text{-O}$  entre  $\delta$  62,01 e 71,78, que foram confirmados por DEPT (Figura 42) são compatíveis com a estrutura do arqueol (FERRANTE et al., 1989), e com isso, estes deslocamentos são consistentes com a estrutura descrita por Evans et al (1980).

A análise de metilação/GC-MS resultou em um cromatograma simples, contendo picos de razão molar 1:1:1, identificados como 2,3,4,6- $\text{Me}_4$ -Glc $p$  (terminal de glucose), 2,3,4- $\text{Me}_3$ -Man $p$ , confirmando a ligação em O-6 de manose e 3,4,6- $\text{Me}_3$ -Glc $p$ , confirmando a ligação em O-2 da unidade de glucose. Contudo a sequência monossacarídica descrita [ $\beta$ -Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Man $p$ -(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ Glc $p$ -arqueol] (Figura 41) foi determinada com base no trabalho de Evans et al (1980).

**Figura 42** –Espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  NMR do arquetidil triglicósídeo



### 4.3. ANÁLISE ESTRUTURAL DE FLAVONÓIDES DE *M. ilicifolia*

---

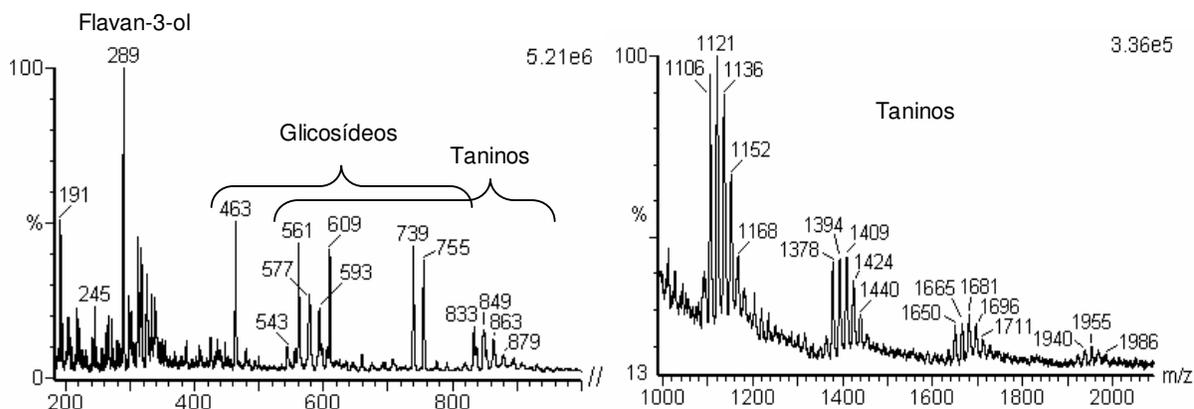
#### 4.3.1. Componentes de folhas de *Maytenus ilicifolia*

Conforme comentado anteriormente, *M. ilicifolia* é uma importante planta na medicina popular. Extratos obtidos por infusão de suas folhas mostraram eficientes no tratamento e prevenção de úlceras de estômago e gastrite (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991, CIPRIANI et al., 2006; CIPRIANI et al., 2008; BAGGIO et al., 2007). Vários metabólitos com potencial atividade biológica estão presentes nos chás de folhas de plantas do gênero *Maytenus*, incluindo flavonóides, triterpenos, e sesquiterpenos. Além disso, atividade de vaso-relaxamento foi atribuída a compostos presentes em um extrato de *M. ilicifolia* no qual foi detectado grande quantidade de flavonóides (RATTMANN et al., 2006). Além disso, recentemente foi identificado vários tipos de flavonóis-3-*O*-glicosídeos, como a rutina, quercitrina, hiperosídeo, isoquercitrina, assim como outros derivados de quercetina e kaempferol mono-di-, tri-, e tetra-glicosídeos (SANNOMIYA et al., 1988; VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007).

#### 4.3.2. Composição geral do extrato Mi-ET-SOL

A fração do extrato aquoso denominada de Mi-ET-SOL, refere-se aos compostos que permaneceram solúveis após tratamento com etanol. Esta fração foi inicialmente submetida à análise de ESI-MS, para obtenção de um panorama geral de sua composição, no qual pode ser observado íons consistentes com flavonóides livres, glicosídeos e taninos (Figura 43). Em seguida foi analisada por HPLC através do método 1 (ver pg 48), utilizando detecção por PDA, com varredura entre 200 e 400 nm. Quatro picos principais apareceram no cromatograma (picos 3, 4, 5 e 6), o quais apresentaram curvas de absorbância UV semelhantes, com  $\lambda_{\text{max}}$  em 230 e 280 nm (Figura 44 A). Por comparação com padrões autênticos (Sigma-Aldrich), catequina e epicatequina foram identificadas no cromatograma, correspondendo aos picos 3 e 5, respectivamente.

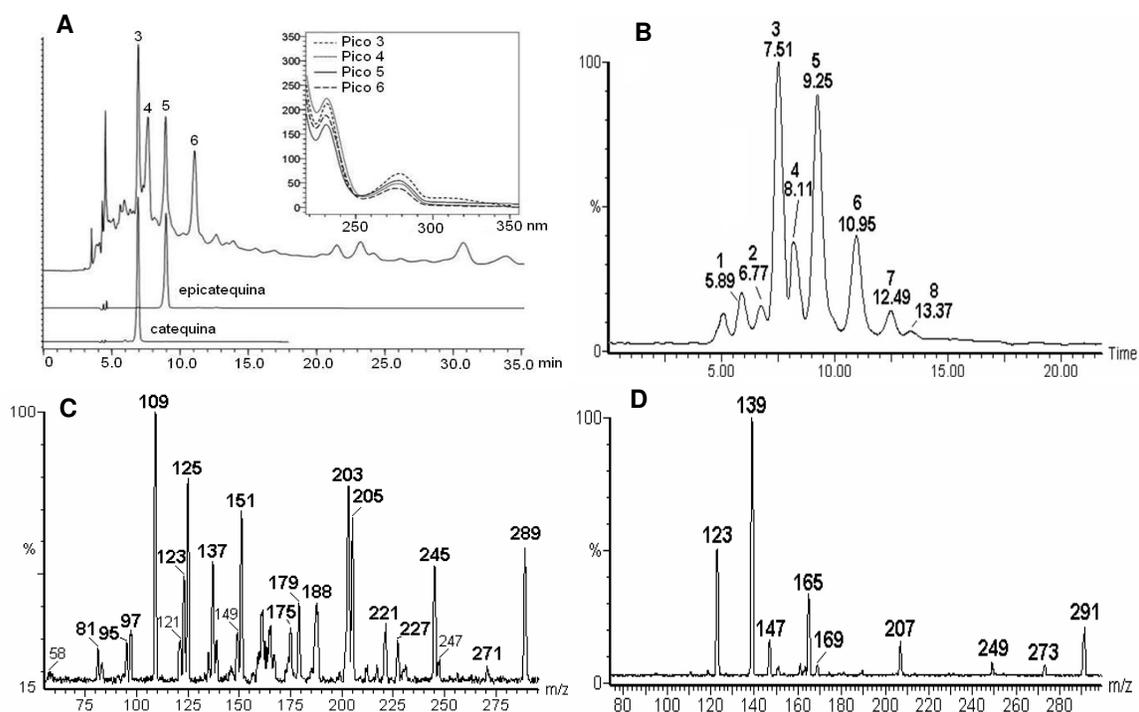
**Figura 43** – Análise de ESI-MS em modo negativo da fração Mi-ET-SOL



A amostra foi analisada por HPLC-ESI-MS em modo negativo (Figura 44 B), sendo realizada uma busca específica pelos íons de interesse. Inicialmente foi tentado localizar a catequina e epicatequina, através do  $m/z$  289. Contudo, quatro picos apareceram com esta mesma relação massa/carga. Íons negativos com valores de  $m/z$  esperados para outros flavonóides livres também foram selecionados, gerando um cromatograma com 8 picos (nomeados de 1 a 8), os quais passaram por processos de fragmentação para serem identificados. Como os demais compostos não foram comparados com seus respectivos padrões, não foi possível inferir corretamente o tipo de isômero (*cis* ou *trans*), mas a identificação do flavonóide foi possível. Os picos 1 e 2 corresponderam a <sup>1</sup>(epi)-galocatequina, e foram identificados através do íon de  $m/z$  305 [M-H]<sup>-</sup> e de seus fragmentos (Tabela 4). Os picos 3, 4, 5 e 6 apareceram com mesmo  $m/z$  289 [M-H]<sup>-</sup>, sendo que apenas os picos 3 e 5 foram identificados como catequina e epicatequina, respectivamente. Os picos 7 e 8, de  $m/z$  273 [M-H]<sup>-</sup> foram identificados como provenientes da (epi)-afzelequina, pelo seu perfil de fragmentação (Tabela 4) Embora as técnicas de *tandem*-MS sejam importantes para a identificação de compostos com a mesma massa molecular, os picos 3, 4, 5 e 6 não puderam ser distinguidos, já que tanto em modo negativo quanto em positivo, seus perfis de fragmentação foram idênticos (Figura 44 C, D). Além disso, esses picos apresentaram a mesma curva de absorção UV, sugerindo compostos com estruturas similares.

<sup>1</sup> Quando o prefixo *epi* aparecer entre parênteses antes do nome do flavonóide, significa que o tipo de isômero não foi identificado.

**Figura 44** – Análise por HPLC-PAD e HPLC-MS da fração Mi-ET-SOL



Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA (A), e por HPLC-MS (B) através da seleção dos íons negativos de  $m/z$  305, 289 e 273. Fragmentação dos picos 3-6 em modo negativo (C) e positivo (D).

Catequina e epicatequina pertencem à família flavan-3-ols, e para ambas são relatados a presença de enantiômeros (BAIS et al., 2002). Contudo esta possibilidade foi descartada, pois a separação cromatográfica de enantiômeros requer colunas especiais. Embora picos 4 e 6 tenham características semelhantes a da catequina e epicatequina, sua correta identificação não foi obtida. Outros flavonóides com estrutura similar, que poderiam gerar tais resultados incluem flavan-4-ols, como luteoforol e epiluteoforol. Luteoforol consiste em um 3',4',4,5,7-pentahidroflavanol, isolado de folhas sorgo e morango (BATE-SMITH, 1969; BATE-SMITH e CREASSY, 1969, DICKO et al., 2005), com importantes propriedades biológicas (OKUDA et al., 1991; RAMESH et al., 2001). Sua estrutura difere da (epi)-catequina por apresentar uma hidroxila em C-4. No entanto, outras possibilidades devem ser consideradas, uma vez que existe uma grande variedade de estruturas

de flavonóides, tais como isoflavonóides neoflavonóides, e ainda aqueles que diferem por posições de outras hidroxilas como o 2',5',3,5,7-pentahidroxi-flavanol (BILIA et al., 1996), que poderiam resultar em uma detecção semelhante no ESI-MS.

A fração Mi-ET-SOL mostrou ser uma mistura complexa de compostos, observados principalmente por ESI-MS em modo *off-line* e por HPLC, quando detectadas por UV-280-360 nm. Portanto, optou-se em realizar um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica-gel. As frações obtidas foram cromatografadas em placas TLC e devidamente combinadas, dando origem a dez frações (Mi-F1 a MiF10), das quais as 5 primeiras que foram então analisadas.

### **4.3.3. Análise de flavonóides livres e taninos condensados**

#### **4.3.3.1. Fração Mi-F1**

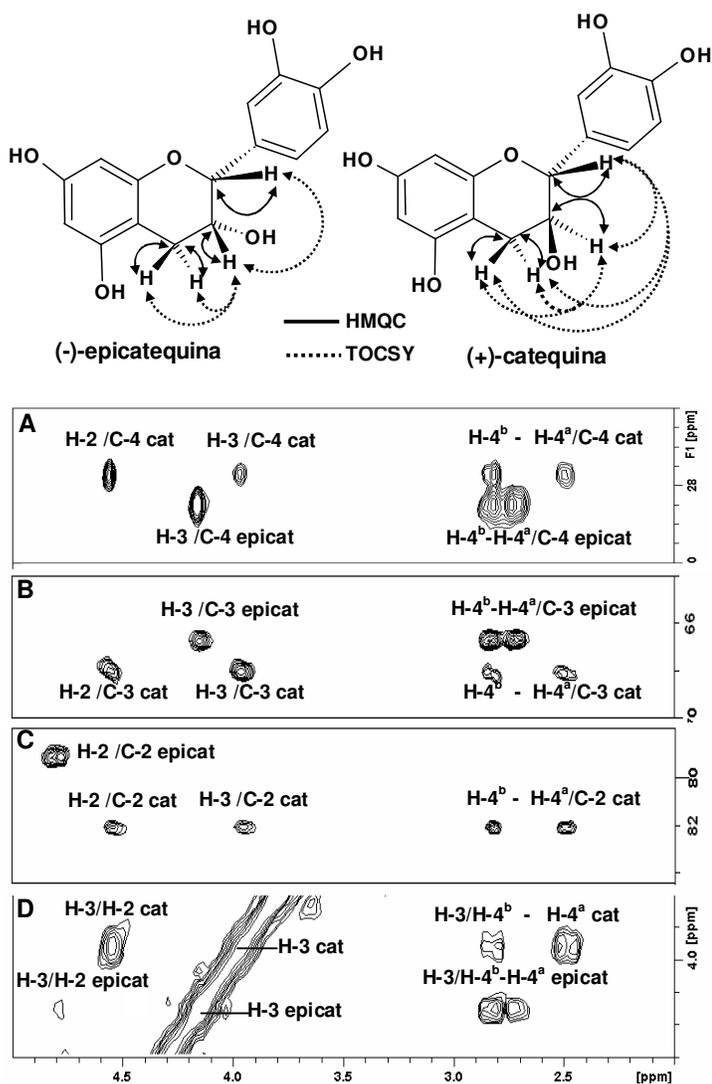
Análises por ESI-MS em modo negativo e positivo geraram apenas um íon principal de  $m/z$  289  $[M-H]^-$  e 291  $[M+H]^+$  (Figura 44). Como estes íons foram compatíveis com a (epi)-catequina, a fração Mi-F1 foi analisada por HPLC (pelo método 1, p. 48) para verificar se ambas, catequina e epicatequina, estavam presentes, bem como os picos não identificados (4 e 6). Como resultado foi obtido apenas dois picos, identificados como catequina e epicatequina.

De acordo com a Es-Safi et al. (2006), os isômeros catequina e epicatequina podem ser diferenciados por espectroscopia de  $^{13}C$ -NMR, uma vez que o deslocamento químico de C-2 varia de  $\delta$  76 (epicatequina) para  $\delta$  84 (catequina). Tal como esperado, quando a fração Mi-F1 foi analisada por NMR, foram encontrados dois sinais com deslocamentos químicos consistentes com C-2, e adicionalmente, também foram observadas variações nos deslocamentos químicos de C-3 e C-4, bem como, dos prótons ligados a esses carbonos, provenientes da catequina e epicatequina (Figura 45 A-D). Estas diferenças foram confirmadas pela análise de padrões de catequina e epicatequina.

Com os espectros multi-dimensionais (HMQC e HMQC-TOCSY), foi possível assinalar as principais diferenças ente os dois isômeros. A catequina apresentou sinais de deslocamentos químico em  $\delta$  4.55/82.1 (H-2/C-2), 3.96/68.1 (H-3/C-3) e 2.82-2.50/27.7 (H- 4<sup>a</sup>-H-4<sup>b</sup>/C-4), enquanto epicatequina apresentou estes sinais em  $\delta$

4.78/79.1 (H-2/C-2), 4.15/66.7 (H-3/C-3), e 2.82-2.73/28.5 (H-4<sup>a</sup>-H-4<sup>b</sup>/C-4). Curiosamente, no espectro de HMQC-TOCSY os sinais de conectividade entre H-2 e H-3/H-4<sup>a,b</sup> da epicatequina não apareceram, diferente da catequina, que exibiu total conectividade. Porém, no espectro de COSY (Figura 45 D) um pequeno sinal apareceu em  $\delta$  4.15/4.78, consistente com H-3/H-2, o que confirma a fraca conectividade destes prótons na configuração *cis* da epicatequina.

**Figura 45** – Análise de NMR (HMQC-TOSY, COSY) da fração Mi-F1



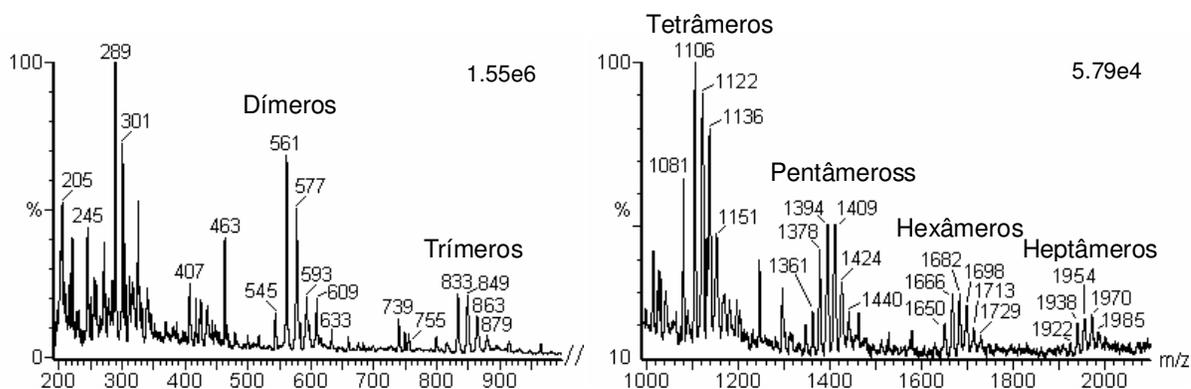
Estrutura da catequina e epicatequina mostrando a conectividade entre C-2/H-2, C-3/H-3 and C-4/H-4<sup>a</sup>-H-4<sup>b</sup>. (A, B e C) Espectro parcial de HMQC-TOCSY, e (D) espectro parcial de COSY.

### 4.3.3.2. Fração Mi-F2

Em ambos os modos de detecção de íons (positivo e negativo) foi possível observar que esta fração apresentava uma grande variedade de compostos, apresentando um espectro semelhante ao do extrato Mi-ET-SOL. Contudo, no modo negativo a detecção se mostrou mais sensível, apresentando íons dos compostos de baixa abundância que não foram observados em modo positivo, e, portanto será o principal foco desta discussão.

A presença de (epi)-catequina foi observada através do íon de  $m/z$  289, a quercetina em  $m/z$  301. Alguns flavonóides glicosilados apareceram em  $m/z$  463 e 609 similares aos já descritos em *M ilicifolia* (TIBERTI et al., 2007). Taninos condensados também foram detectados, variando de dímeros a heptâmeros, apresentando grande variabilidade estrutural (Figura 46).

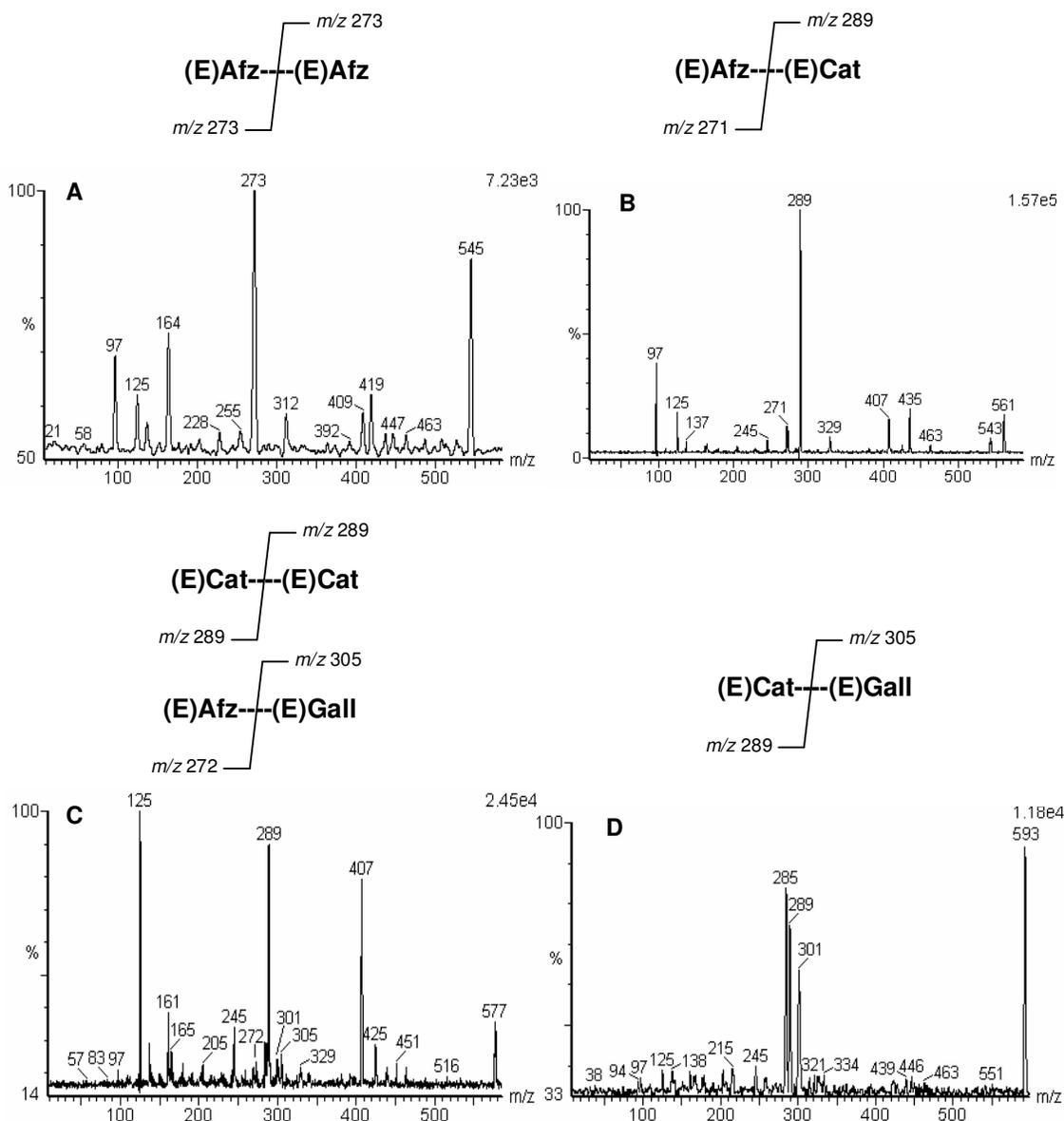
**Figura 46** – Espectro de ESI-MS em modo negativo da fração Mi-F2



Dímeros foram encontrados na forma de (E)-Afz-(E)-Afz, em  $m/z$  545, e (E)-Afz-(E)-Cat em  $m/z$  561 (Figura 47 A, B). O íon encontrado em  $m/z$  577 corresponde a duas unidades de (E)-Cat, confirmada por um fragmento a  $m/z$  289, no entanto, mesmo com baixa intensidade, fragmentos de  $m/z$  271 e 305 foram detectados, o que indica a presença de um dímero de (E)-Afz-(E)-Gall (Figura 47 C). O íon em  $m/z$  593 indica o diflavonóide (E)-Cat-(E)-Gall, porém a fragmentação foi diferente da

esperada, com três principais íons em  $m/z$  285, 289 e 301, atribuído ao campferol, (epi)-catequina e quercetina, respectivamente. Campferol e quercetina podem formar glicosídeos, com massa molecular resultante de 594 Da, portanto isóbaros entre si, e também com dímero (E)-Cat-(E)-Gall, os quais serão descritos com maiores detalhes posteriormente (Figura 47 D).

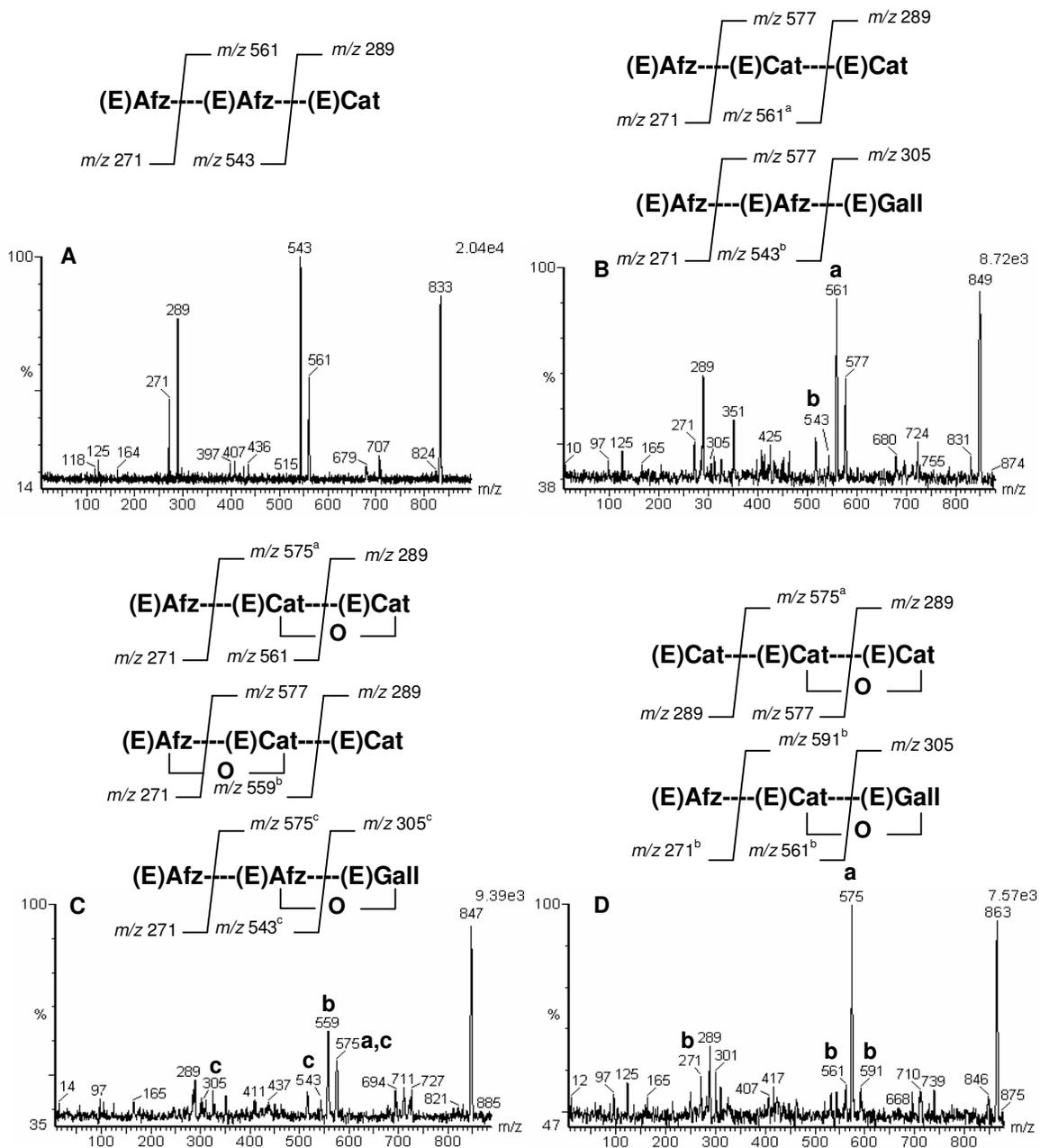
**Figura 47** – Perfil de fragmentação por CID-MS negativo dos dímeros de taninos



Espectros obtidos com energias de 3.5 kV no capilar, 85 V no cone e 20 eV de energia de colisão.

Trímeros foram observados através dos íons de  $m/z$  833, correspondendo a (E)-Afz-(E)-Afz-(E)-Cat e  $m/z$  849, correspondendo a (E)-Afz-(E)-Cat-(E)-Cat e (E)-Afz-(E)-Afz-(E)-Gall (Figura 48 A, B). Outros trímeros contendo ligações éter foram observados em  $m/z$  847, constituído por (E)-Afz-(E)-Cat (E)-Cat. Os fragmentos com  $m/z$  575 e 559 indicaram que a ligação éter pode estar entre duas unidades de (E)-Cat, entre (E)-Afz-(E)-Cat, e entre (E)-Afz-(E)-Gall (Figura 48 C). O íon de  $m/z$  863 é compatível com três unidades de (E)-Cat condensadas, e com (E)-Afz-(E)-Cat (E)-Gall. A ligação éter está localizada principalmente entre duas (E)-Cat ( $m/z$  575), e o fragmento de  $m/z$  591 indica também a ligação éter entre (E)-Cat-(E)-Gall (Figura 48 D).

**Figura 48** – Perfil de fragmentação por CID-MS negativo dos trimeros de taninos



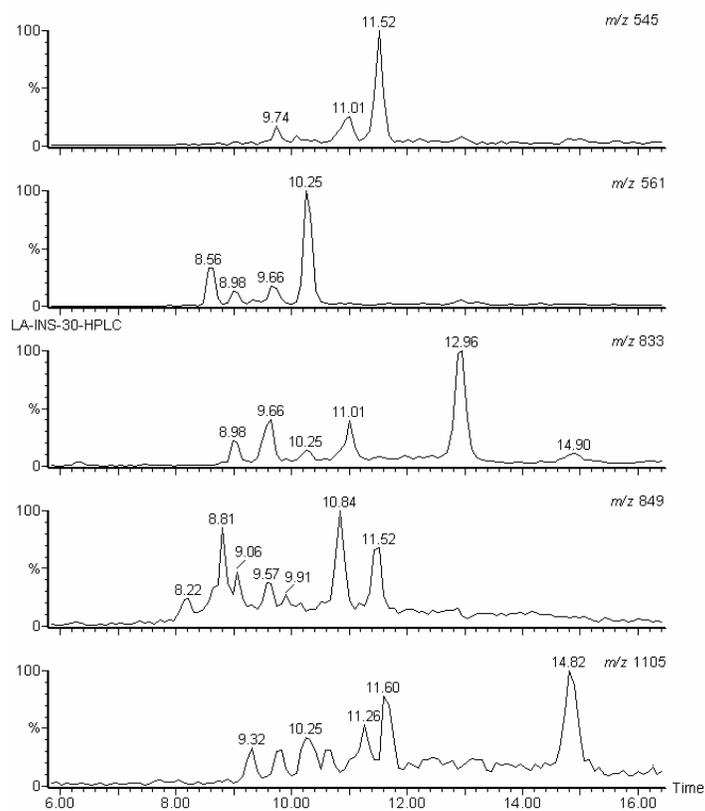
Espectros obtidos com energias de 3.5 kV no capilar, 85 V no cone e 20 eV de energia de colisão.

Íons de menor intensidade, com  $m/z$  1106, 1122, 1136 e 1151 foram identificados como resultantes de tetra-flavonóides, sendo que aqueles de  $m/z$  1136 e 1151 referem-se a proantocianidinas do TipoA (PA-A), e os íons de  $m/z$  1363,

1378, 1394, 1409, 1424, e 1440 foram identificados como penta-flavonóides. Estes compostos foram ainda analisados através de seus fragmentos, e os resultados estão resumidos na Tabela 4. Hexa-flavonóides foram observados em  $m/z$  1650, 1666, 1682, 1698, 1713, 1729, e aqueles íons de  $m/z$  1922, 1938, 1954, 1970, 1985 são compatíveis com o hepta-flavonóides, contudo devido a sua baixa abundância, seus fragmentos não puderam ser observados.

A grande diversidade estrutural dos taninos presentes em *M. ilicifolia* pode ser bem observada em análise por HPLC-MS utilizando o método 2, RP-GB (pg 49), o qual confirmou que os taninos com mesma massa molecular são formados na realidade por taninos com composição semelhante, porém com várias sequências diferentes, dado ao grande número de picos que surgiram quando íons de valores de  $m/z$  específicos foram selecionados no cromatograma da fração Mi-F2 (Figura 49).

**Figura 49** – Cromatograma obtido por HPLC-MS em modo negativo da fração Mi-F2



**TABELA 4 – Composição de taninos na fração Mi-F2, por CID-MS**

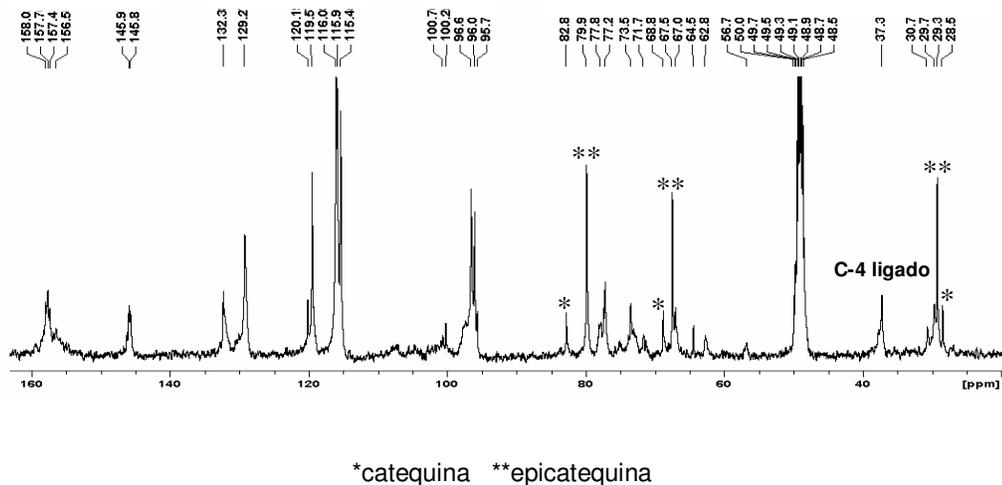
Composto	[M-H] <sup>-</sup>	Principais fragmentos
(Epi)Catequina	289	203, 187, 179, 161, 151, 137, 125, 109
Quercetina	301	256, 245, 179, 164, 151, 135, 121, 109
(E)Afz-(E)Afz	544	419, 273, 164, 97
(E)Afz-(E)Cat	561	543, 435, 407, 289, 271, 245, 125, 97
(E)Cat-(E)Cat	577	407, 289, 245, 161, 125
(E)Afz-(E)Gall	577	305, 301, 272, 125
(E)Cat-(E)Gall	593	289
(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat	833	*561, *543, 289, 271
(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	847	*575, 289
(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat (TA) A-O-C	847	*559, 289
(E)Afz-(E)Afz-(E)Gall (TA) A-O-G	847	*543, 305
(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat	849	*577, *561, 289, 271
(E)Afz-(E)Cat-(E)Gall (TA) C-O-G	863	*591, *561, 289, 271
(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	863	*575, 289
(E)Cat-(E)Cat-(E)Gall (TA) C-O-G	879	*591, *577, 289
(E)Afz-(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat	1105	*833, *815, 561, 543, 289, 271
(E)Afz-(E)Cat-(E)Afz-(E)Cat	1121	849, 831, *561, 289, 271
(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat	1121	849, 831, *577, *543, 289, 271
(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	1136	863, 848, 577, *575, *561, 289, 271
(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat-(E)Gall (TA) G-O-C	1136	863, 832, *591, 561, *543, 289, 271
(E)Afz-(E)Cat-(E)Gall-(E)Cat (TA) G-O-C	1151	879, 863, *591, *561, 289, 271
(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	1151	862, *577, *575, 289
(E)Gall-(E)Gall-(E)Afz-(E)Afz (TA) G-O-C	1151	879, 845, *609, *543, 305, 271
(E)Cat-(E)Afz-(E)Afz-(E)Afz-(E)Afz	1377	*1090, 833, 817, 543, 289, 271
(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat-(E)Afz-(E)Cat	1393	1121, 1103, *849, *833, 561, *543, 289
(E)Afz-(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat	1393	1121, *1103, 849, *577, 543, 289
(E)Afz-(E)Afz-(E)Afz-(E)Gall-(E)Cat (TA) G-O-C	1407	1135, *862, *591
(E)Cat-(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	1407	1118, *846, *832, *575
(E)Cat-(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	1423	1133, *863, *847, *575, 289
(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat-(E)Gall-(E)Cat (TA) C-O-G	1423	1151, *1133, *833, *591, *543, 289
(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat (TA) C-O-C	1439	1151, *864
(E)Gall-(E)Cat-(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat (TA) G-O-C	1439	1151, *878, *849
(E)Gall-(E)Gall-(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat (TA) A-O-C	1439	*609, *559

(E)Afz → afzelequina ou epiafzelequina; (E)Cat → catequina ou epicatequina; (E)Gall → galocatequina ou epigalocatequina. TA → proantocianidina tipo A; A-O-C → ligação éter entre (E)Afz e (E)Cat; C-O-C → ligação éter entre (E)Cat and (E)Cat; G-O-C ou C-O-G → ligação éter entre (E)Gall and (E)Cat

\* indica fragmentos chave para sequência proposta

Espectros de 1D e 2D NMR também foram realizados com a fração Mi-F2, fornecendo informações sobre a configuração das unidades que compõem os taninos. A presença de isômeros *cis* e *trans* na fração Mi-F2 ficou clara, uma vez no espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR foram observados sinais de catequina  $\delta$  em 82,8, 68,8 e 28,5; e os de epicatequina  $\delta$  em 79,9, 67,5 e 29,3. Os sinais de deslocamentos químico da (epi)-azfequina e (epi)-galocatequina devem ser próximos aos das (epi)-catequina, tornando sua análise extremamente difícil devido à presença destas misturas. No entanto, foi encontrado um importante sinal em  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  37,3 que confirma a presença de C-4 ligado (SANTOS, 2000) (Figura 50). Contudo, outros sinais não puderam ser atribuídos, considerando que é necessário a purificação destes compostos para que a análise possa refletir de fato a estrutura correta.

**Figura 50** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR da fração Mi-F2

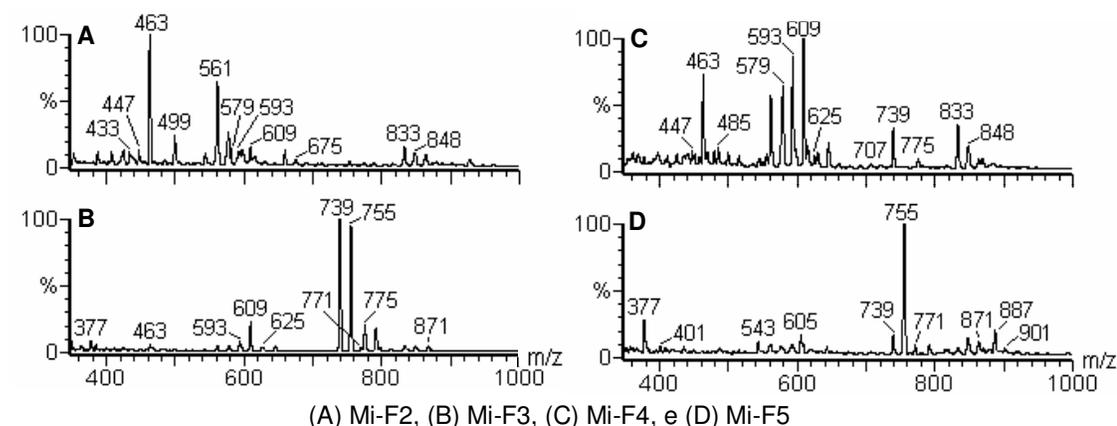


#### 4.3.4. Análise de flavonóides glicosilados

Os flavonóides glicosilados encontrados em *M. ilicifolia* apareceram contendo campferol, quercetina e miricetina (todos flavonóis), variando de mono-glicosídeos até tetra-glicosídeos, encontrados da fração Mi-F2 a Mi-F5 (Figura 51 A-D). Como a ionização e a fragmentação destes glicosídeos pode variar de acordo com as condições de energia e do tipo de adutores, foi realizada uma padronização antes de realizar as análises. Como o único padrão disponível foi a rutina [ $\alpha$ -Rhap-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-Quer], optou-se por utilizar a fração Mi-F4, a qual continha

principalmente flavonóis tri-glicosídeos, contendo os três núcleos agliconas, citados acima, e a fração Mi-F5 contendo um tri-glicosídeo majoritário. Como estruturas semelhantes a estas já haviam sido descritas (VILEGAS et al, 1999; LEITE et al, 2001), optou-se por utiliza-las na padronização. Nas análises de *tandem*-MS, os fragmentos foram assinalados de acordo com a nomenclatura proposta por Domon e Costello (1988).

**Figura 51** – Espectros de ESI-MS em modo negativo das frações Mi-F2 a Mi-F5



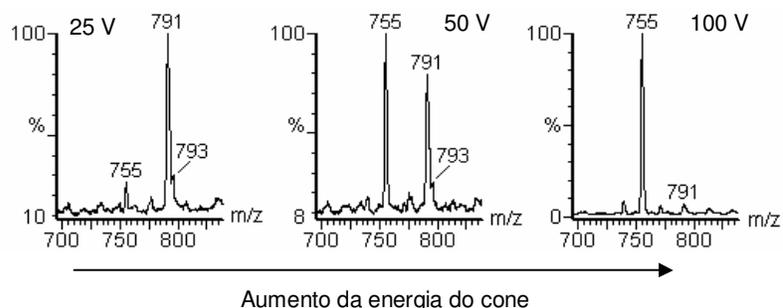
#### 4.3.4.1. ESI-MS em modo negativo

A fração Mi-F5, contendo principalmente um tri-glicosídeo de massa molecular de 756 Da ( $m/z$  755  $[M-H]^-$ ), foi solubilizada em MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) contendo 5 mM de HCl ou NaCl, e analisada por ESI-MS em modo negativo. Como a ionização por *electrospray* é diretamente influenciada pelas energias aplicadas na fonte, dois ajustes foram realizados.

Como a energia aplicada no capilar não produziu diferenças na ionização, apenas na intensidade dos íons, ela foi mantida em 2,73 kV. No entanto, foi observado que mudanças na energia do cone afetavam diretamente o tipo e a abundância relativa de íons resultantes. Assim, em baixa energia (25 V) dois principais íons foram produzidos ( $m/z$  791 e 793), resultantes dos adutos isotópicos de Cl<sup>-</sup>. Ao aumentar a energia do cone para 50 V, houve a formação dos íons de  $m/z$  755  $[M-H]^-$  e 791  $[M+Cl]^-$ , com intensidades semelhantes, e com a energia do cone

em 100 V, o principal íon formado foi resultante da desprotonação da molécula, com  $m/z$  755 (Figura 52).

**Figura 52** – Espectros de ESI-MS em modo negativo mostrando alteração na formação dos íons de acordo com a energia utilizada no cone



#### 4.3.4.2. Tandem-MS em modo negativo

O comportamento dos glicosídeos frente a diferentes condições de energia nos processos de fragmentação pode gerar importantes informações quanto ao sítio de glicosilação no flavonóide. Como os fragmentos provenientes dos precursores ionizados com  $\text{Cl}^-$  não apresentaram diferenças para os formados pela sua desprotonação dos compostos, apenas os íons desprotonados foram analisados.

Durante os processos de fragmentação em modo negativo, são formados íons regulares da aglicona desprotonada  $[\text{Y}_0]^-$ , como também ocorre a formação de íons referentes ao radical da aglicona desprotonada  $[\text{Y}_0\text{-H}]^\bullet$ , devido a possibilidade de clivagem homolítica entre a o monossacarídeo e a aglicona (HVATTUM et al., 2003; CUYCKENS e CLAEYS, 2005). Assim, os principais fragmentos observados referentes à aglicona desprotonada na forma de radical e regular foram com  $m/z$  284-285, coerentes com campferol, e  $m/z$  300-301 coerente com quercetina (Figura 53 A-C). Glicosídeos contendo estes dois flavonóis já haviam sido encontrados anteriormente em folhas de *M. ilicifolia* (LEITE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007). No entanto, pelo menos 2 íons precursores geraram fragmentos de  $m/z$  316-317, indicando que flavonóis glicosídeos de *M. ilicifolia* podem conter o flavonol miricetina

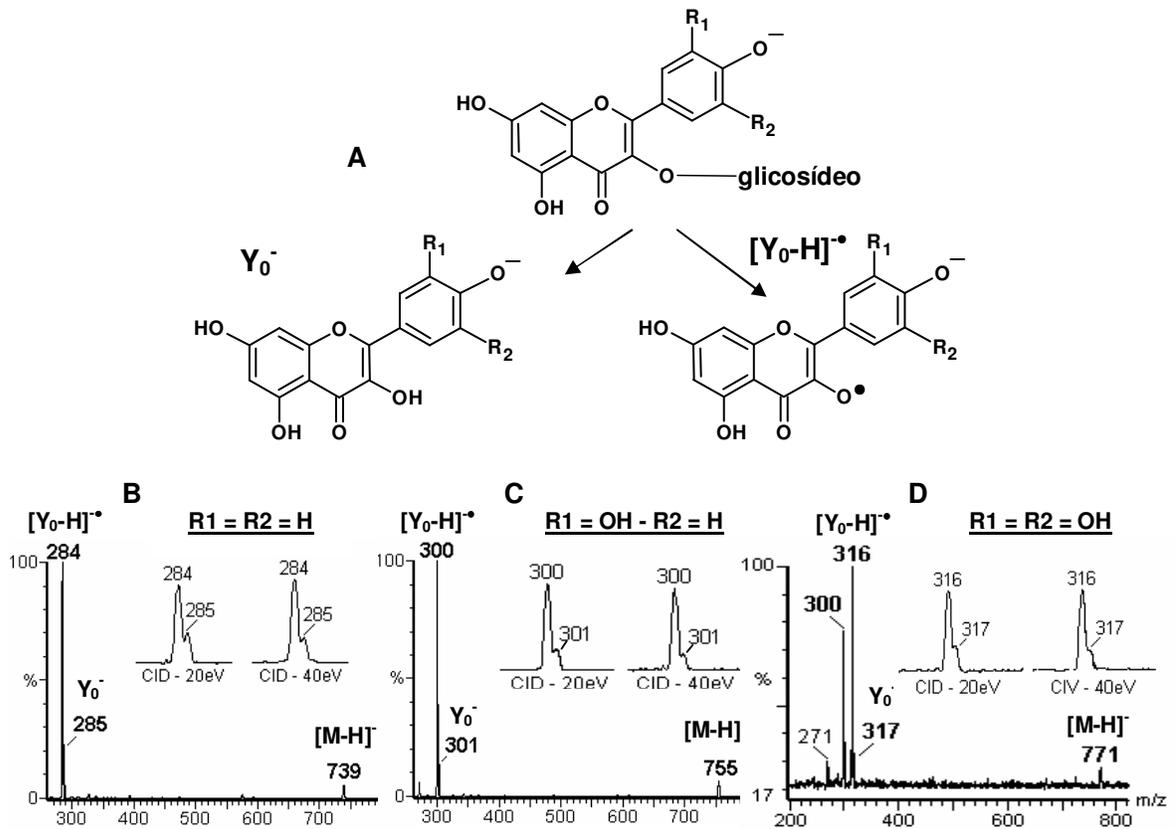
como aglicona (Figura 53 A, D). Além disso, a alta intensidade dos fragmentos  $Y_0^-$  e  $[Y_0-H]^-$  formados por CID, é um forte indício de que estes flavonóides são *O*-glicosídeos, uma vez que os glicosídeos *O*-ligados são mais lábeis que os *C*-ligados, cuja fragmentação consiste em quebras internas no anel monossacarídico com resultante desidratações moleculares (CUYCKENS e CLAEYS, 2004), que não foram observadas.

A formação do íon radical  $[Y_0-H]^-$  é dependente do sítio de glicosilação e diretamente afetada pela energia utilizada durante o CID-MS. Assim, diferentes flavonóides glicosídeos formam os íons desprotonados referentes à aglicona regular e radical com diferentes proporções, dependendo da posição onde o açúcar está ligado à aglicona, e conseqüentemente, isto fornece informações úteis sobre os sítios de glicosilação (CUYCKENS e CLAEYS, 2005). No entanto, nenhuma variação significativa na razão entre  $[Y_0-H]^-:Y_0^-$  foi observada, e ambas as energias utilizadas (20 eV e 40 eV) favoreceram a formação do radical aglicona.

Embora a fragmentação em modo negativo sozinha não forneça informação suficiente sobre o sítio de glicosilação, Cuyckens e Claeys (2005) observaram que sob certas condições de energia de CID-MS, os íons referentes aos radicais aglicona eram formados em grande abundância, especialmente para flavonóis 3-*O*-glicosídeos, sendo diferentes daqueles obtidos para os glicosídeos ligados nas posições *O*-4', ou *O*-7. Assim, como os íons  $[Y_0-H]^-$  foram formados com maior intensidade que os íons  $Y_0^-$  (Tabela 5), é possível sugerir que a glicosilação ocorre em *O*-3, contudo como será visto mais a frente, outros experimentos foram realizados para confirmar esta hipótese.

Com relação à detecção de carboidratos neutros, CID-MS em modo negativo não costuma produzir íons, e, portanto os carboidratos ligados aos flavonóis não foram detectados por esta forma de ionização. Contudo, é possível determinar a perda neutra (NL- *neutral loss*) pela diferença entre o íon *quasi*-molecular e o íon-fragmento referente a aglicona, e com isso foi possível inferir que os flavonóides estão ligados a mono-, di-, tri-, e tetrassacarídeos, e assim, concluir que a fracionamento em coluna de sílica-gel 60G foi útil para separar os glicosídeos flavonóides pela sua massa molecular, já que glicosídeos maiores são mais polares e se prendem mais fortemente à sílica, e conseqüentemente necessitam de solventes mais polares para serem removidos.

**Figura 53** – Estruturas e espectros de CID-MS em modo negativo mostrando a formação de íons regulares e radicais



Esquema de formação do íon regular e do íon radical (A). CID-MS mostrando a formação do íons regulares e radicais: (B) campferol, (C) quercetina e (D) miricetina.

**TABELA 5** – Perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos em modo negativo

MS <sup>1</sup>		MS <sup>2</sup>										NL
[M-H] <sup>-</sup>	[Y <sub>0</sub> -H] <sup>-</sup> :Y <sub>0</sub> <sup>-</sup>	R	255	227	163	179	151	135	133	121	93	
417	284 : 285	-	255	227	163	179	151	135	133	121	93	132 <sup>a</sup>
433	300 : 301	3.9	271	243	163	179	151	135	149	137	108	132 <sup>a</sup>
447	284 : 285	4.1	255	227	163	179	151	135	133	121	93	162 <sup>a</sup>
463	300 : 301	4.5	271	243	163	179	151	135	149	137	108	162 <sup>a</sup>
579	300 : 301	4.3	271	243	163	179	151	135	149	137	108	278 <sup>b</sup>
593	284 : 285	3.9	255	227	163	179	151	135	133	121	93	308 <sup>b</sup>
593	300 : 301	3.3	271	243	163	179	151	135	149	137	108	292 <sup>b</sup>
609	300 : 301	4.2	271	243	163	179	151	135	149	137	108	308 <sup>b</sup>
625	300 : 301	3.8	271	243	163	179	151	135	149	137	108	324 <sup>b</sup>
625	316 : 317	-	-	-	163	179	151	135	165	153	125	308 <sup>b</sup>
739	284 : 285	3.8	255	227	163	179	151	135	133	121	93	454 <sup>c</sup>
755	300 : 301	3.6	271	243	163	179	151	135	149	137	108	454 <sup>c</sup>
771	300 : 301	3.5	271	243	163	179	151	135	149	137	108	470 <sup>c</sup>
771	316 : 317	3.3	-	-	163	179	151	135	165	153	125	454 <sup>c</sup>
871	284 : 285	4.1	255	227	163	179	151	135	133	121	93	586 <sup>d</sup>
887	300 : 301	4.3	271	243	163	179	151	135	149	137	108	586 <sup>d</sup>
901	284 : 285	4.2	255	227	163	179	151	135	133	121	93	616 <sup>d</sup>

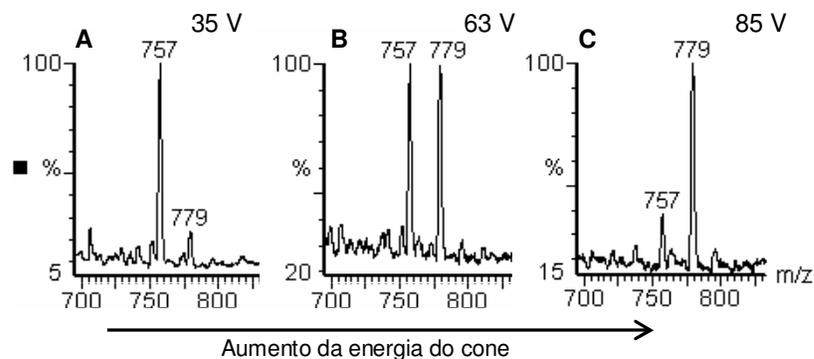
R: razão entre [Y<sub>0</sub>-H]<sup>-</sup>:Y<sub>0</sub><sup>-</sup>; NL: Perdas neutras indicando: <sup>a</sup> monossacarídeo; <sup>b</sup> dissacarídeo; <sup>c</sup> trissacarídeo; <sup>d</sup> tetrassacarídeo.

#### 4.3.4.3. ESI-MS em modo positivo

Para testar os efeitos dos adutores e da energia na ionização e posteriormente na fragmentação, a fração Mi-F5, dissolvida em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), ou então nesta solução contendo 5 mM de HCl ou NaCl. De forma geral e simplificada, sob as condições analíticas de baixa energia, os principais íons observados foram aqueles correspondendo à protonação dos analitos [M+H]<sup>+</sup>, enquanto que sob altas energias os compostos sodiados [M+Na]<sup>+</sup> foram predominantes. Com a solução com HCl a ionização seguiu este comportamento de alternar adutores conforme a energia do cone era aumentada. Em baixa energia (35 V), o principal foi a íon *m/z* 757 [M+H]<sup>+</sup>, aumentando 63 V ambas as espécies foi observada, em *m/z* 757 e *m/z* 779 [M+Na]<sup>+</sup> e, finalmente, em 85 V, o principal íon observado foi a forma mais estável em *m/z* 779 (Figura 54). Em todos os casos, a energia do capilar foi mantida em 2,6 kV. Contudo, conforme esperado os analitos dissolvidos na solução contendo NaCl não seguiram o mesmo comportamento, e

mesmo nas energias baixas apenas os íons sodiados eram formados, observados com  $m/z$  779. Outra característica muito importante foi que os íons protonados produziram fragmentos diferentes daqueles produzidos pelos íons sodiados.

**Figura 54** – Espectros de ESI-MS em modo positivo mostrando alteração na formação dos íons de acordo com a energia utilizada no cone



#### 4.3.4.4. Tandem-MS dos compostos protonados

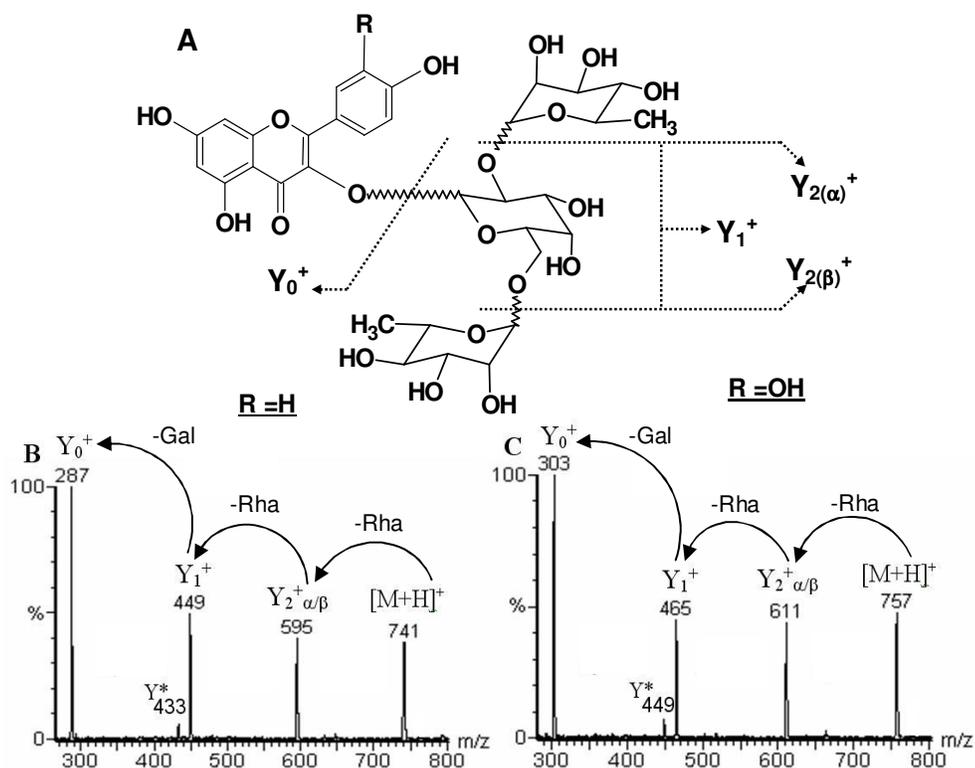
A fração Mi-F4 foi solubilizada apenas MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), em os íons protonados foram obtidos com a energia do cone mantida em 35 V. Os perfis de fragmentação foram assinalados seguindo a nomenclatura proposta por Domon e Costello (1988). Sobre estas condições, foram formados apenas os fragmentos do tipo  $Y_j^+$ . Estes fragmentos foram importantes para determinar a seqüência de monossacarídica dos glicosídeos.

A fração analisada continha principalmente dois flavonóis triglicosídeos com  $m/z$  741 e 757. Assim, quando fragmentado o íon precursor de  $m/z$  741 produziu os fragmentos  $Y_2^+$  com  $m/z$  595 [M-146]<sup>+</sup>,  $Y_1^+$  em  $m/z$  449 [M-292]<sup>+</sup>, e  $Y_0^+$  em  $m/z$  287 [M-454]<sup>+</sup>. Esta estrutura é compatível com a  $\alpha$ -Rhap-(1→6)-[- $\alpha$ -Rhap-(1→2)]- $\beta$ -Galp-(1→3)-O-Campferol (VILEGAS et al, 1999; LEITE et al., 2000). O precursor íon em  $m/z$  757 [M+H]<sup>+</sup> deu origem a fragmentos  $Y_2^+$  com  $m/z$  611 [M-146]<sup>+</sup>,  $Y_1^+$  com  $m/z$  465 [M-292]<sup>+</sup>, e  $Y_0^+$  com  $m/z$  303 [M-454]<sup>+</sup>, compatível com a  $\alpha$ -Rhap-(1→6)-[- $\alpha$ -Rhap-(1→2)]- $\beta$ -Galp-(1→3)-O-Quercetina (Figura 55 A-C) (VILEGAS et al, 1999; LEITE et al., 2000). Além disso, ambos os íons precursores tiveram NL semelhantes,

correspondentes a perdas de moléculas de açúcar, o que confirma que ambos têm estruturas de oligossacarídeos semelhantes.

Em ambos os compostos ocorreu a formação de um íon denominado como  $Y^*$ , formado, em  $m/z$  433 (Figura 55 B) e  $m/z$  449 (Figura 55 C).  $Y^*$  é um íon irregular que corresponde à perda de uma unidade hexose interna e, conseqüente rearranjo com um resíduo ramnose. Estes íons são geralmente observados em condições de energia de colisão baixa. Embora o íon  $Y^*$  possa conduzir a uma seqüência monossacarídica errada, com instrumentação adequada, a relação entre  $Y_1:Y^*$  pode fornecer informações úteis sobre o tipo de flavonóide, bem como pode ser usado para inferir diferenciação entre neohesperidose e rutinose, dois dissacarídeos comuns, encontrados em flavonóides (CUYCKENS et al., 2001).

**Figura 55** – Espectros de CID-MS em modo positivo mostrando o perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos na forma protonada –  $m/z$  741 e 757



(A) Flavonol triglicosídeo contendo galactose e ramnose, (B e C) espectros de CID-MS mostrando a remoção sequencial dos monossacarídeos até a aglicona.

#### 4.3.4.5. Tandem-MS dos compostos sodiados

Quando uma energia maior foi aplicada ao cone ( $\geq$  a 85 V), a formação de íons mais estáveis foi favorecida, os quais foram encontrados na forma de adutos de  $\text{Na}^+$ . Íons sodiados formados a partir destes glicosídeos são mais estáveis, e precisam de mais energia para produzir fragmentos, quando comparados aos íons protonados. Curiosamente, na análise de CID-MS destes íons, foram produzidos fragmentos com perfil completamente diferente daqueles obtidos a partir dos íons protonados. Enquanto que os íons protonados produziram fragmentos do tipo  $Y_j^+$ , os íons sodiados formados pelos mesmos glicosídeos produziram principalmente fragmentos do tipo  $B_i^+$ , ou seja, aqueles contendo apenas a porção carboidrato.

Por exemplo, a fração Mi-F4 deu origem a 2 grandes íons com  $m/z$  763  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $m/z$  779  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Ambos os íons produziram CID-fragmentos similares, característicos da porção sacarídica, com  $m/z$  477  $[\text{B}_3+\text{Na}]^+$ , mostrando que os dois glicosídeos apresentam um trissacarídeo similar ligado à aglicona e não monossacarídeos ligados a diferentes sítios. Também foram observados fragmentos com  $m/z$  331  $[\text{B}_2+\text{Na}]^+$ , e outros com  $m/z$  169  $[\text{B}_1+\text{Na}]^+$ , e 185  $[\text{B}_x+\text{Na}]^+$  (Figura 56 A-C).  $B_x$  foi utilizado para designar o íon referente ao monossacarídeo que está diretamente ligado à aglicona (Tabela 6).

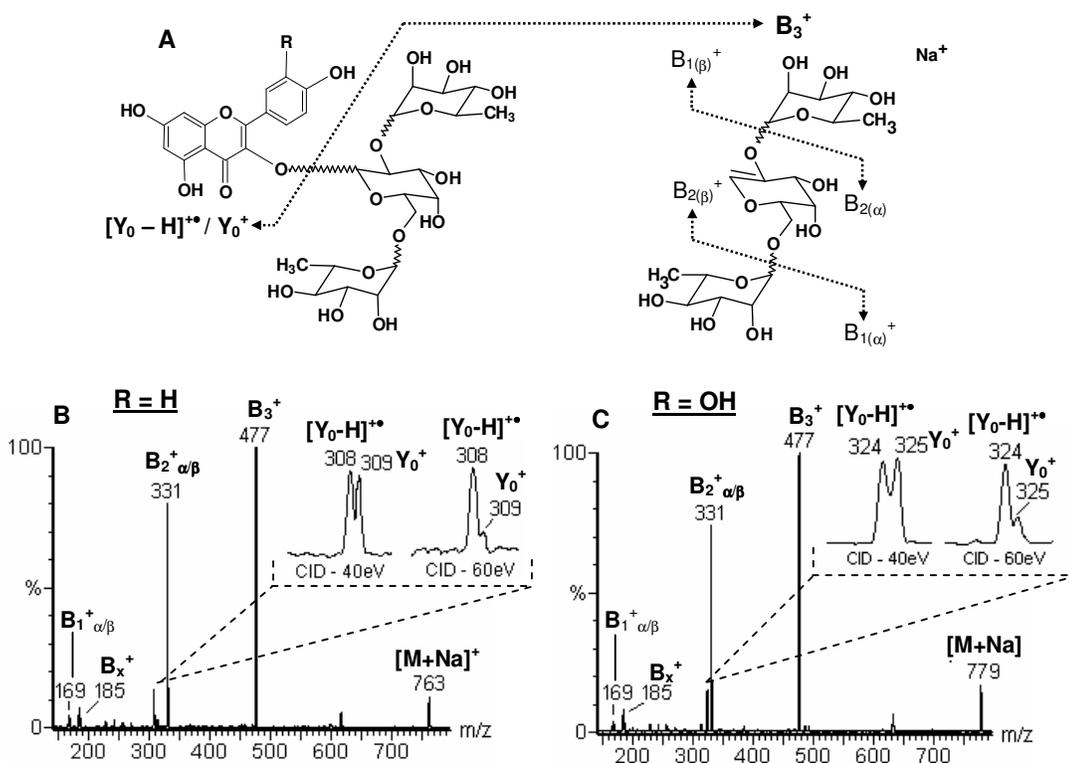
Assim como observado para os íons formados a partir dos glicosídeos desprotonados quando analisados por CID-MS, os íons sodiados também produziram os fragmentos referentes à aglicona na forma regular e radical. Mais uma vez a razão entre  $[\text{Y}_0-\text{H}]^+:\text{Y}_0^+$  é dependente do sítio de glicosilação e muda de acordo com a energia de colisão utilizada. Cuyckens e Claeys (2005) avaliaram a possibilidade de aplicar a razão entre os íons  $[\text{Y}_0-\text{H}]^+:\text{Y}_0^+$  para determinar os sítios de glicosilação flavonóides mono-glicosídeos, empregando alta energia de colisão.

Para verificar a possibilidade de aplicar esta técnica nos flavonóides glicosídeos de *M. ilicifolia*, dois ajustes de energia de colisão foram testados, sendo 40 eV, chamada baixa energia, e uma variação entre 60-80 eV chamada de alta energia. Em baixa energia de colisão, a razão entre  $[\text{Y}_0-\text{H}]^+:\text{Y}_0^+$  foi sempre próxima de 1. Por outro lado, utilizando CID com alta energia, a formação dos íons da aglicona na forma de radical foi 3-4 vezes maior do que seu íon regular (Figura 56 B, C).

A formação do íon radical com intensidade tão maior que o íon regular é uma forte evidência de flavonóides 3-O-glicosídeos, uma vez que é distinta daquela

observada para os flavonóides 7-*O*-glicosídeos, que exibem uma razão próxima de 1. Contudo, apenas o razão entre  $[Y_0-H]^+ : Y_0^+$  não é suficiente para diferenciar entre os flavonóides 3-*O*-glicosídeos e flavonóides 4'-*O*-glicosídeos, uma vez que formam íons radicais e regulares com razões semelhantes. Caracteristicamente os flavonóides 4'-*O*-glicosídeos formam fragmentos correspondentes ao anel B contendo as moléculas de carboidratos a ele ligado (CUYCKENS e CLAEYS, 2005), os quais não foram observados nos espectros. Além disso, vale a pena lembrar que a razão entre o íon radical e o regular observada em modo negativo foi algo em torno de 3-4, e que flavonóides 4'-*O*-glicosídeos apresentam esta razão menor que 1. Como pode ser visto na tabela 6, todos os flavonóis glicosídeos estudados aqui apresentaram características muito semelhantes a estes presentes em *M. ilicifolia*, assim, estes resultados sugerem fortemente que os flavonóides de *M. ilicifolia* são 3-*O*-glicosilados.

**Figura 56** – Espectros de CID-MS em modo positivo mostrando o perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos na forma sodiada -  $m/z$  763 e 779



(A) Estrutura do flavonol triglicosídeo mostrando como ocorre sua fragmentação com o adutor  $Na^+$ ; (B e C) espectros de CID-MS dos íons sodiados, mostrando a formação dos fragmentos do tipo  $B_i^+$ , e do alteração na razão entre íon aglicona regular e radical em 40 e 60 eV.

**TABELA 6** – Perfil de fragmentação dos flavonóis glicosídeos sodiados

MS <sup>1</sup> [M+Na] <sup>+</sup>	Y <sub>0</sub> <sup>+</sup> : Y <sub>0</sub> <sup>+</sup>	R	MS <sup>2</sup>							
			B <sub>x</sub> <sup>+</sup>	B <sub>1</sub> <sup>+</sup> <sub>α</sub>	B <sub>1</sub> <sup>+</sup> <sub>β</sub>	B <sub>2</sub> <sup>+</sup> <sub>α</sub>	B <sub>2</sub> <sup>+</sup> <sub>β</sub>	B <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sub>α</sub>	B <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sub>β</sub>	B <sub>4</sub> <sup>+</sup>
441	308:309	-		155	-	-	-	-	-	-
457	324:325	5.1		155	-	-	-	-	-	-
471	308:309	4.9		185	-	-	-	-	-	-
487	324:325	4.5		185	-	-	-	-	-	-
603	324:325	4.8	169	155	-	301	-	-	-	-
617	308:309	4.5	185	169	-	331	-	-	-	-
617	324:325	4.9	169	169	-	315	-	-	-	-
633	324:325	4.8	185	169	-	331	-	-	-	-
649	324:325	5.2	185	185	-	347	-	-	-	-
649	340:341	-	185	169	-	331	-	-	-	-
763	308:309	3.8	185	169	169	331	331	477	-	-
779	324:325	3.4	185	169	169	331	331	477	-	-
795	324:325	3.6	185	169	185	331	347	493	-	-
795	340:341	3.8	185	169	169	331	331	477	-	-
895	308:309	3.4	185	169	155	331	301	477	463	609
895	308:309	3.4	169	169	185	315	317	447	463	609
911	324:325	3.3	185	169	155	331	301	477	463	609
911	324:325	3.3	169	169	185	315	317	447	463	609
925	308:309	3.4	185	163	185	331	331	477	493	639

R: razão entre Y<sub>0</sub><sup>+</sup>: Y<sub>0</sub><sup>+</sup>**4.3.4.6. Análise dos flavonóis glicosídeos por HPLC-UV-ESI-MS**

Através das análises de ESI-MS foram obtidas informações importantes sobre as estruturas dos flavonóis glicosídeos de *M. ilicifolia*. Tiberti e colaboradores (2007) relataram a presença de isômeros de glicosídeos, os quais não seriam diferenciados por análises de ESI-MS em modo *off-line*. Assim, os resultados foram melhorados empregando análises por LC-MS, uma vez que por métodos cromatográficos foi possível analisar separadamente os glicosídeos e confirmar a presença de isômeros nas frações.

Os procedimentos de análise foram estabelecidos utilizando a coluna C-18 (Supelco), com detecção por UV-360 nm, comprimento de onda que favorece a detecção dos flavonóis glicosídeos. Após o estabelecimento das melhores condições de separação, as análises foram realizadas em modo *on-line*. Com a energia do cone em 50 V e os solventes ácidos utilizados na separação cromatográfica, houve

favorecimento dos íons protonados, observados por detecção positiva. Além disso, nestas condições, a ionização promoveu fragmentação *in-source*, fornecendo fragmentos semelhantes aos obtidos por CID-MS dos precursores protonados, nas análises *off-line*.

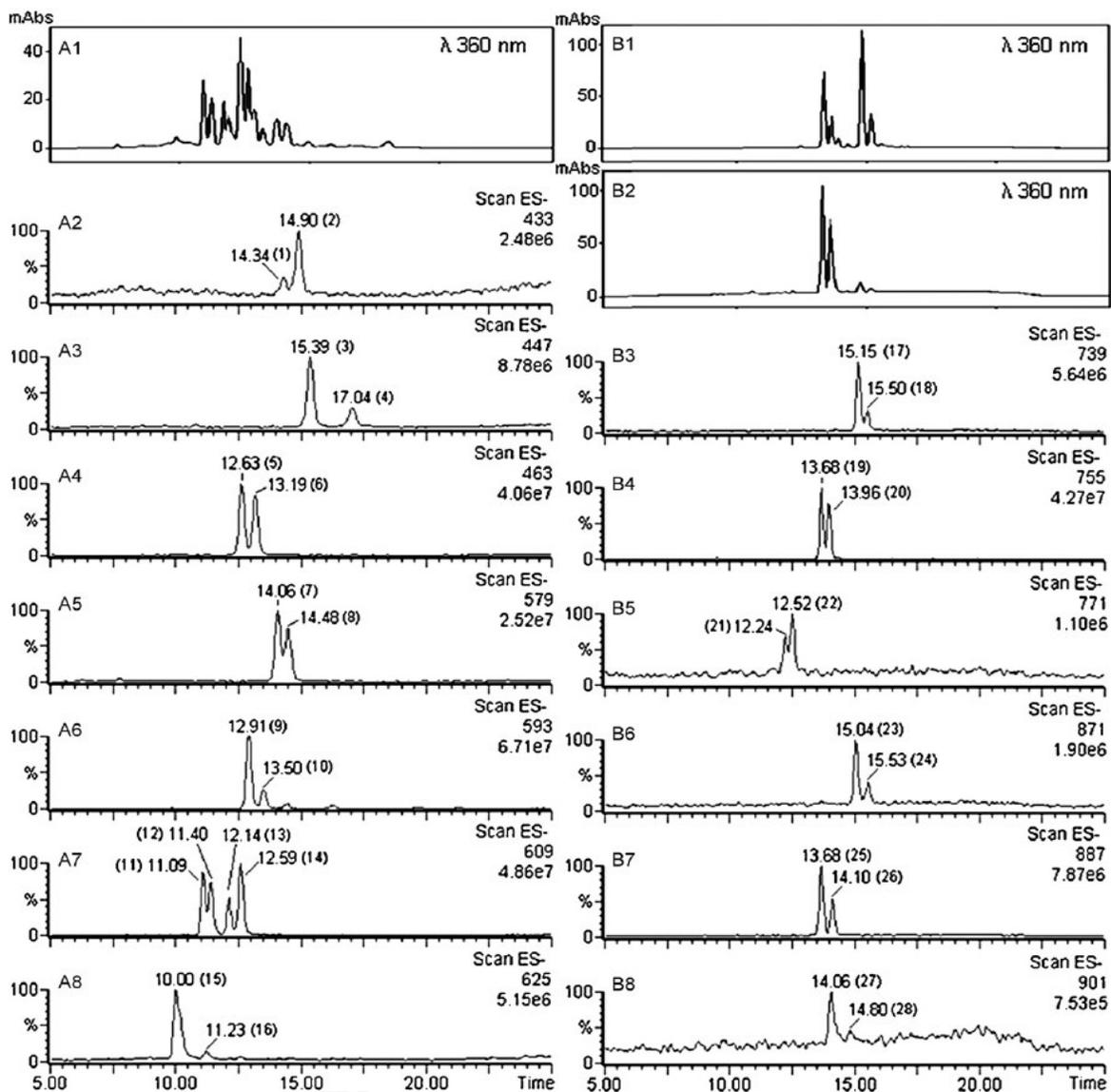
Considerando que a fragmentação dos íons protonados ocorre por remoção seqüencial das unidades de monossacarídeos, a fragmentação *in-source* poderia levar a uma falsa interpretação dos glicosídeos, como por exemplo um triglicosídeo pode gerar um fragmento *in-source* que seja semelhante ao íon *quasi*-molecular de um diglicosídeo. Para contornar esta situação, os glicosídeos foram detectados em modo negativo (o qual não produziu fragmentação *in-source*), e os cromatogramas obtidos em modo positivo e negativo foram comparados. Se por um lado a fragmentação *in-source* ocorrida na detecção positiva poderia levar a uma identificação equivocada, por outro lado, ela forneceu a seqüência de monossacarídeos de cada um dos glicosídeos detectados.

Como a detecção em modo negativo produziu somente os íons *quasi*-moleculares, foi possível fazer uma varredura nos cromatogramas a fim de localizar cada um dos glicosídeos. Mesmo com o fracionamento em coluna de sílica-gel, foi observado que as frações ainda apresentavam misturas bastante complexas. A alta complexidade das frações pode ser notada pelo elevado grau de isomerismo, como por exemplo, o íon de  $m/z$  609  $[M-H]^-$ , que formou 4 picos no cromatograma. Para os demais íons selecionados, pelo menos dois picos apareciam nos cromatogramas. No estudo anterior de Tiberti et al (2007) alguns isômeros de flavonóis glicosídeos foram identificados, e apresentaram mesmo o sítio de glicosilação, na posição O-3. Assim, se os glicosídeos eram ligados à aglicona pela mesma hidroxila, o isomerismo só poderia consistir no tipo de açúcar, ou no tipo de ligações interglicosídicas presentes. Para identificar com segurança os glicosídeos, seria então necessária sua purificação para posteriores análises. Contudo, devido à complexidade das amostras, inúmeras sobreposições de picos ocorreram, tornando sua purificação inviável, mesmo por HPLC, utilizando somente colunas de fase reversa.

Como pode observado na Figura 57, a cromatografia em fase reversa proporcionou a separação da maioria dos isômeros entre si, sendo o maior problema encontrado a sobreposição de picos referentes a glicosídeos de massa molecular diferentes, tipicamente aqueles diferenciando-se apenas por uma unidade

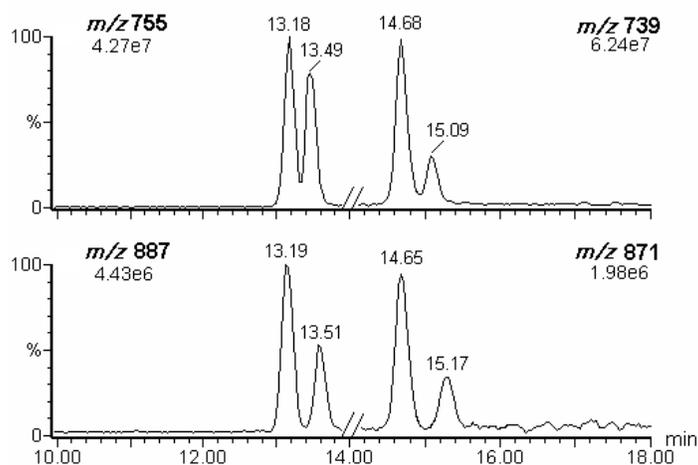
monossacarídica, como por exemplo, a sobreposição dos picos referentes aos tri-, e tetraglicosídeos, de  $m/z$  739 com 871, e de  $m/z$  755 com 887 (Figura 58). Como parecia não haver um único método cromatográfico que fosse capaz de resolver todos os compostos das frações, optou-se por desenvolver um método de cromatografia líquida bi-dimensional (2D-LC).

**Figura 57** – HPLC-UV e HPLC-MS das frações Mi-F3 e Mi-F5



Cromatogramas obtidos da fração Mi-F3 por UV – 360 nm (A1), e por seleção de íons obtidos por HPLC-MS (A2 - A8); Cromatogramas obtidos por UV – 360 nm das frações Mi-F4 (B1) e Mi-F5 (B2), e por seleção de íons obtidos por HPLC-MS da fração Mi-F5 (B3 – B8).

**Figura 58** – Cromatograma da fração Mi-F5 mostrando a sobreposição dos compostos de  $m/z$  755 e 739 com aqueles de  $m/z$  887 e 871, respectivamente.



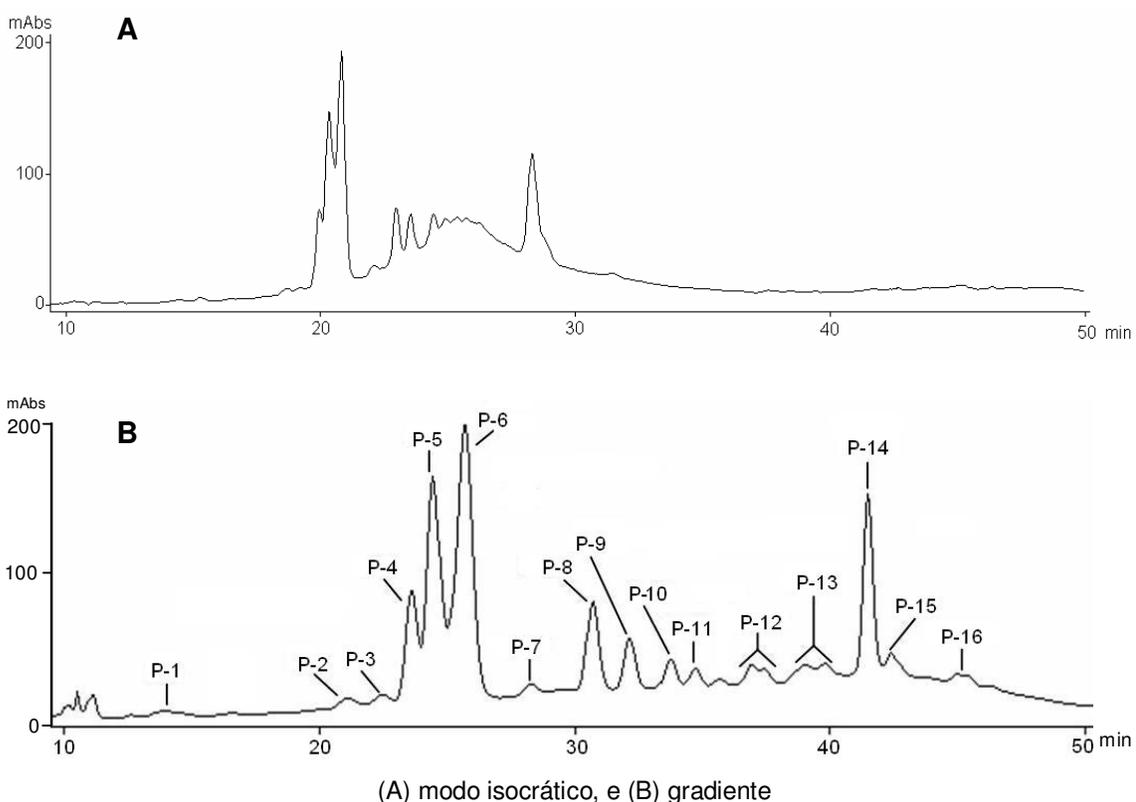
#### 4.3.4.7. Desenvolvimento do método de 2D-LC-UV-MS a partir de Mi-ET-SOL

O fracionamento em sílica-gel foi bastante importante para obtenção de frações mais limpas, contudo não foi eficiente na separação de muitos glicosídeos que permaceram na mesma fração dificultando sua análise por RP-HPLC. Como a maioria das sobreposições ocorreu entre compostos de massa molecular diferentes, a estratégia adotada foi separar estes compostos primeiramente em coluna de cromatografia por exclusão estérica (SEC – *size exclusion chromatography*), para que depois de separados por tamanho na primeira dimensão, fosse possível resolvê-los na segunda dimensão por RP-HPLC, pelo método conhecido como *heart-cutting*. Como o objetivo da SEC era similar ao resultado obtido na coluna de sílica-gel, optou-se por realizar as análises diretamente do extrato Mi-ET-SOL, já que os glicosídeos se repetiam entre as frações, e também para obter um cromatograma bi-dimensional que abrangesse todos os glicosídeos, evitando assim o consumo de tempo com injeções de várias frações.

#### 4.3.4.8. Primeira dimensão: SEC

Como principal objetivo da utilização de SEC como primeira dimensão era de se obter um cromatograma com cerca de 4 picos, representativos de cada grau de glicosilação apresentado pelos flavonóis, ou seja, um pico para os monoglicosídeos, um para os diglicosídeos e assim por diante, sem a distinção do tipo de glicosídeo. A cromatografia por SEC proporcionou resultados surpreendentemente melhores do que o esperado. Não só foram separados os glicosídeos com uma unidade de monossacarídeo de diferença, como também a coluna foi capaz de resolver vários dos isômeros presentes no extrato. Embora a separação dos glicosídeos por SEC tenha ocorrido usando um solvente isocrático (Figura 59 A) composto dos solventes A (1% AcOH em H<sub>2</sub>O) e B (H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN-AcOH, 49:50:1, v/v) na proporção de 1:1 (v/v), com a utilização de gradiente (SEC-GA, p. 49) a separação foi melhorada, uma vez que a migração de flavonóis glicosídeos foi diretamente afetada pelas concentrações dos solventes (Figura 59 B).

**Figura 59** – Perfil de separação dos compostos da fração MI-ET-SOL por cromatografia de exclusão estérica na primeira dimensão

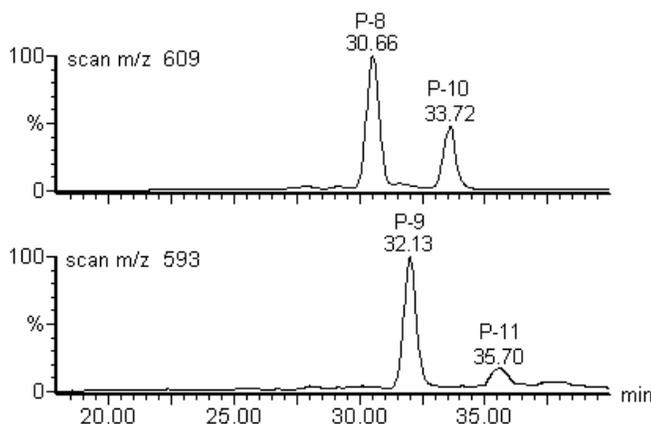


(A) modo isocrático, e (B) gradiente

Como esperado, os compostos foram eluídos em ordem decrescente de peso molecular, e 16 picos apareceram no cromatograma e nomeados de P1 a P16, consecutivamente. Embora os mecanismos cromatográficos envolvendo a separação dos glicosídeos não estejam claros, isto ocorreu principalmente em função das diferenças entre os epímeros de monossacarídeos. No entanto, parece que as moléculas de aglicona desempenharam um papel importante, tendo em vista que uma análise semelhante foi realizada com diferentes padrões oligossacarídeos livres de diferentes pesos moleculares e também com isômeros. Entretanto a total separação não foi alcançada, tanto a partir dos diastereoisômeros, como a partir de oligossacarídeos com diferentes pesos moleculares.

A solubilidade dos flavonóis glicosídeos no solvente poderia ser um caminho para explicar tal separação, já que quanto maior cadeia de oligossacarídeo, melhor será sua solubilização em baixas concentrações de solvente orgânico, como ocorre no início dos gradientes. No entanto, apenas solubilidade não explica a separação ocorrida principalmente entre os picos P8, P9, P10 e P11. Quando analisados em modo *on-line*, tanto P8 e P10 renderam o mesmo íon *quasi*-molecular, com  $m/z$  609  $[M-H]^-$ , enquanto que P9 e P11 renderam íons de  $m/z$  593  $[M-H]^-$ , com 16 unidades de massa (m.u.) menores do que a de P8 e P10. Com isso foi possível verificar que mesmo compostos de menor massa, como P9 de 594 Da, foram eluídos antes que compostos de massa molecular maior, como P10 de 610 Da (Figura 60), indicando que algum tipo de interação entre a coluna e os glicosídeos ocorreu.

**Figura 60** – Perfil de cromatográfico por SEC dos compostos de  $m/z$  609 e 593  $[M-H]^-$

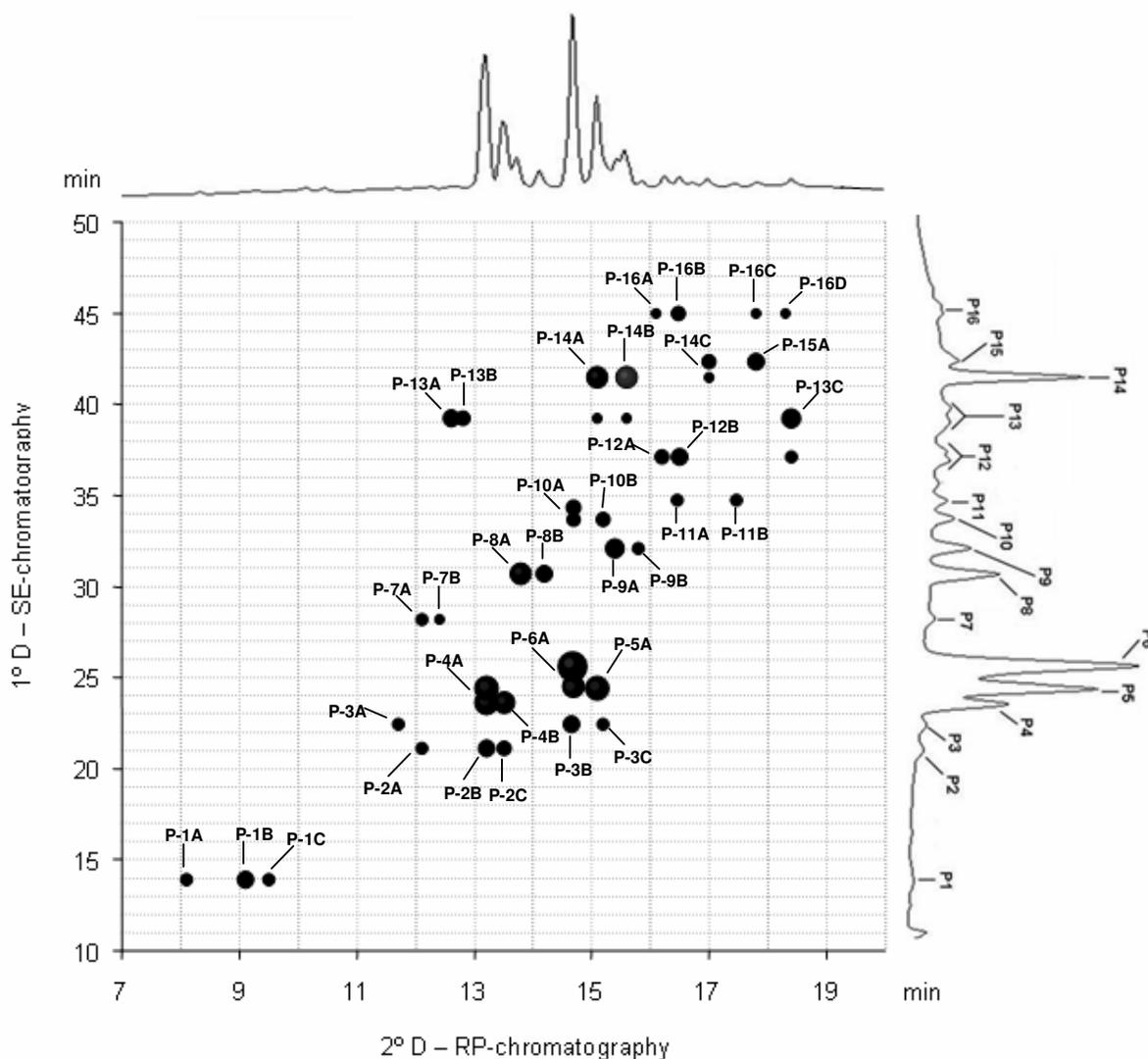


#### 4.3.4.8. Segunda dimensão: RP

Os 16 picos presentes no cromatograma de SEC foram coletados e secos sob fluxo de nitrogênio, em seguida dissolvidos em MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), e re-injetados na segunda dimensão, baseada na cromatografia do tipo *heart-cutting*. A segunda dimensão foi realizada em uma coluna C-18, com o método 2 e gradiente RP-GB (pg 49), o que rendeu picos altamente resolvidos. Pelo menos dois outros picos surgiram na segunda dimensão, resultante de cada pico obtido na primeira dimensão, sendo a única exceção de pico P6, que deu um único pico com  $m/z$  739, [M-H]<sup>-</sup>, mas seu isômero estava junto como o pico P5, que mostrou os compostos de  $m/z$  739 e 755 [M-H]<sup>-</sup>. Os picos obtidos na segunda dimensão receberam uma letra adicional para poder distingui-los, por exemplo, P1A, P1B e P1C, indicando que surgiram de 3 novos picos a partir de P1 (Figura 61).

A utilização da separação baseada em SEC na primeira dimensão permitiu o aparecimento de composto em baixas concentrações, que passaram despercebidos na cromatografia uni-dimensional. Assim, vários destes flavonóis glicosídeos puderam ser observados na segunda dimensão, sendo possível confirmar a presença dos vários isômeros, sem a interferência das sobreposições de picos ocorridas na cromatografia uni-dimensional. Com isso foi possível realizar a técnica de derivatização pós-coluna, para gerar mais informações sobre o sítio de glicosilação de cada um dos picos, como também coletar os picos individualmente, para determinação das ligações interglicosídicas, realizada por análises de metilação-GC-MS.

**Figura 61** – Perfil de cromatográfico bi-dimensional da fração Mi-ET-SOL



#### 4.3.4.9. Segunda dimensão como derivatização pós-coluna

O sítio de glicosilação dos flavonóis foi inferido com base na fragmentação de cada um dos íons precursores, que levavam a formação de íons da aglicona na forma regular e na forma de radical. Contudo, esta análise não levou em consideração a presença dos isômeros, já que em análises *off-line* eles não são distinguidos. Uma das técnicas que podem ser utilizadas para inferir a posição dos carboidratos em flavonóides é a utilização de reagentes de deslocamento do espectro

de absorvância no UV, que podem deslocar para região de maior energia (hipsocrômico) ou então região de menor energia (batocrômico).

De acordo com o tipo e a intensidade do deslocamento pode ser determinado o sítio de glicosilação (DUCREY et al., 2005; SANNOMIYA et al., 1998, TIBERTI et al., 2007). Apesar da técnica ter sido desenvolvida para análise em espectrofotômetros convencionais, utilizando compostos purificados, ela tem sido aplicada com sucesso através da derivatização pós-coluna, em HPLC-PAD. A grande vantagem é não haver necessidade de purificar os compostos, já que eles serão eluídos e derivatizados individualmente, obtendo o espectro de UV para cada pico.

Dois reagentes de deslocamento foram escolhidos, NaOH e  $AlCl_3$ , devido seu efeito sobre rutina (Sigma-Aldrich), um padrão para flavonol 3-O-glicosídeos. Os picos observados na segunda dimensão apresentaram curvas de absorvância semelhantes às da rutina, sem adição dos reagentes, com  $\lambda_{max}$  variando entre 350-365 e 255-265 nm, nas bandas I e II, respectivamente. No entanto, com adição de NaOH, houve um deslocamento batocrômico na banda I, que passou a ter  $\lambda_{max}$  entre 398 a 406 nm, com surgimento de um ombro em ~325 nm (Figura 62 A-C). Estas mudanças foram observadas devido à capacidade de bases fortes em reagir com todos os grupos fenólicos, exceto com OH-5, em posição periférica ao carbono carbonílico (C-4). Este intenso deslocamento batocrômico, com aproximadamente 40 nm foi encontrado como indicador de que a hidroxila 4', presente no anel B, não está participando de nenhum tipo de ligação (DUCREY et al., 1995).

Com a adição de  $AlCl_3$ , também foi verificado um deslocamento batocrômico na banda I, principalmente nos glicosídeos identificados posteriormente como contendo quercetina, que variaram de 30 a 50 nm ( $\lambda_{max}$  360-410 nm) (Figura 62 A-B). No entanto, glicosídeos contendo campferol exibiram apenas um pequeno ombro perto de 400 nm (Figura 62 C). O  $Al^{3+}$  pode formar complexos com hidroxilas em posição *orto* (ex. catecol), bem como com carbonos cetônicos contendo hidroxilas periféricas, como os presentes na maioria dos flavonas, incluindo quercetina e campferol.

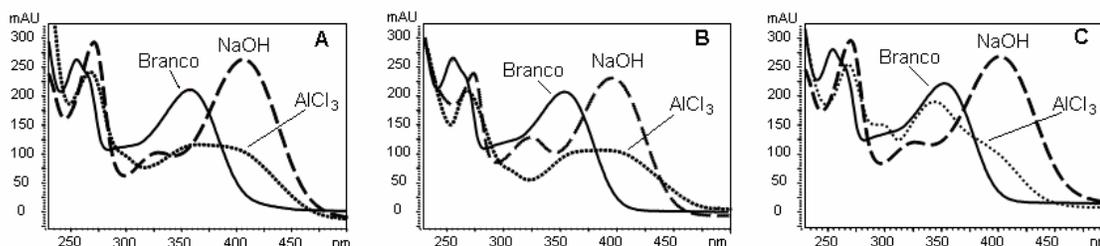
Ducrey et al. (1995), também atribuíram um deslocamento batocrômico de 42 nm na banda I, como resultado da complexação entre  $Al^{3+}$  com os oxigênios de C-4 e C-5, obtidos sem neutralizar a fase móvel utilizada no HPLC. Por outro lado, eles obtiveram um deslocamento maior, de 56 nm, decorrente da complexação

envolvendo o  $\text{Al}^{3+}$  com os oxigênios ligados aos C-4 e C-5, mas também com aqueles na posição *orto*-dihidroxi (ou seja, com catecol), obtido após a neutralização da fase móvel. Segundo os autores a neutralização foi necessária, uma vez que complexos com grupos *orto*-dihidroxi são instáveis em meio ácido.

Contudo, nos experimentos apresentados neste trabalho, foi demonstrado que os glicosídeos contendo quercetina resultam em um deslocamento batocrômico maior do que aqueles que contendo campferol, mesmo sem neutralizar a fase móvel. Esta diferença observada aqui só pode ser resultado da diferença estrutural entre quercetina e o campferol, que ocorre justamente no anel B, sendo que a quercetina apresenta hidroxilas na posição *orto*, C-3' e C-4', enquanto o campferol apresenta apenas uma hidroxila na posição C-4'. Assim, pode ser inferido que grupo de *orto*-dihidroxi da quercetina é o maior responsável pela batocrômico, e que este ocorreu sem neutralizar o solvente do HPLC.

Os deslocamentos observados foram de 40-45 nm na presença  $\text{AlCl}_3$ , o que foi previamente determinado como sendo resultado de flavonóis com configuração 5-hidroxi-3-*O*-substituído (SANNOMIYA et al., 1998), o que esta em pleno acordo com os resultados obtidos por CID-MS. Como todos os picos do cromatograma renderam deslocamentos semelhantes, na presença de NaOH ou  $\text{AlCl}_3$ , foi possível inferir que os glicosídeos de *M. ilicifolia* estudados aqui apresentam como sítio de glicosilação a hidroxila 3 do anel C, em total concordância com resultados de outros autores (SANNOMIYA et al., 1998; VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001; TIBERTI et al., 2007).

**Figura 62** – Espectro de ultravioleta dos flavonóis glicosídeos de *M. ilicifolia*.



(A) rutina, (B) glicosídeos contendo quercetina; (C) glicosídeos contendo campferol

#### 4.3.4.10. Descrição estrutural dos flavonóis glicosídeos de folhas de *Maytenus ilicifolia*

As moléculas de aglicona foram confirmadas como campferol, quercetina e miricetina segundo seus espectros de CID-MS em modo negativo (Tabela 5, pg 105) e positivo, comparando os fragmentos obtidos com os resultados disponíveis na literatura (MA et al., 1997; JUSTESEN, 2000; WOLFENDER et al., 2000; HUGHES et al., 2001; MARCH e MIAO, 2004). A composição monossacarídica foi realizada após hidrólise/redução/acetilação e análise por GC-MS, revelando a presença de arabinose 6% (Ara), ramnose (Rha) 16%, galactose (Gal) 65% e glucose (Glc) 13% na fração Mi-ET-SOL. As ligações interglicosídicas foram obtidas a partir dos compostos purificados na segunda dimensão das análises de HPLC, através das análises de metilação/GC-MS (Tabela 7, pg 121). A identificação dos derivados parcialmente metilados foi realizada por comparação de seus perfis de fragmentação por EI-MS, como descrito por Sasaki et al (2005). Como nem todos os glicosídeos foram isolados em quantidades suficientes para análises de metilação, eles tiveram apenas sua seqüência determinada por CID-MS em modo positivo. Neste aspecto, suas ligações glicosídicas foram atribuídas de acordo com a literatura, quando disponível. Já que só um tipo de pentose apareceu na composição, toda vez em que a massa de íon foi equivalente a pentose, foi atribuído à arabinose, o mesmo acontecendo com a ramnose. Como duas hexoses estavam presentes (galactose e glucose) somente com o resultado da metilação elas foram identificadas. Os sítios de glicosilação foram atribuídos como sendo O-3, de acordo com os resultados obtidos por CID-MS e de deslocamento obtidos com derivatização pós-coluna, como discutido anteriormente (Figura 62, Tabela 8 pg 140). Suas configurações anoméricas não foram determinadas, pois devido a grande complexidade, as amostras não foram obtidas em quantidades suficientes para análises de NMR. Os glicosídeos serão descritos de acordo com a sua eluição na cromatografia bi-dimensional, portando iniciando pelos tetra-glicosídeos.

**TABELA 7** – Análise de metilação dos flavonóis glicosídeos de *Maytenus ilicifolia*

PMAAs	Picos																					
	P2 B	P3 B	P4 A	P4 B	P5 A	P6 A	P8 A	P8 B	P9 A	P9 B	P10 A	P10 B	P11 A	P11 B	P12 A	P12 B	P14 A	P14 B	P14 C	P15 A	P16 A	P16 B
2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ara	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
2,4-Me <sub>2</sub> -Rha	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
3,4-Me <sub>2</sub> -Glc	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
3,4-Me <sub>2</sub> -Gal	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-

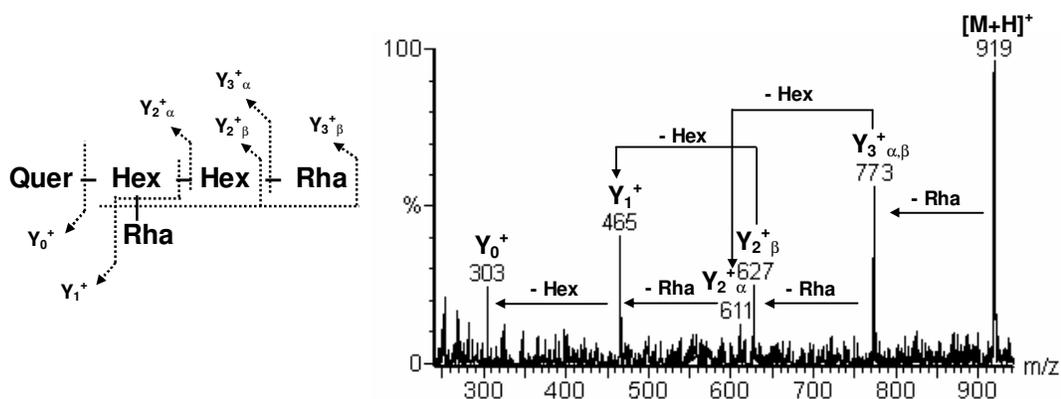
PMAAs: alditóis acetates parcialmente metilados (*partially methylated alditol acetate*)

Alguns compostos não estão presentes devido a sua baixa abundância. Os valores estão representados como razão molar entre os derivados.

#### 4.3.4.11. Estrutura de flavonóis tetra-glicosídeos

**Pico-1A** – Como este glicosídeo foi observado apenas em análises *on-line* não foi possível obtê-lo na forma de aduto de  $\text{Na}^+$ . Sua forma protonada gerou um íon com  $m/z$  919  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , compatível com a estrutura já descrita  $\text{Glc}\beta(1\rightarrow3)\text{-Rhap}(1\rightarrow6)\text{-[Rhap}(1\rightarrow2)\text{-Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{-Quer}$  (VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001). A fragmentação *in-source* ocorrida confirmou a molécula de aglicona como quercetina, pelo fragmento  $\text{Y}_0^+$  de  $m/z$  303. No entanto, os fragmentos  $\text{Y}_1^+$  de  $m/z$  465 e  $\text{Y}_2^+\beta$  de  $m/z$  627 mostram uma seqüência composta por duas hexoses ligadas entre si, e o fragmento de  $\text{Y}_2^+\alpha$  de  $m/z$  611 mostra que também uma ramnose está ligada à hexose indicando que o monossacarídeo ligado à aglicona é di-substituído. O fragmento  $\text{Y}_3^+\alpha/\beta$  de  $m/z$  773 indica a remoção de uma unidade terminal de ramnose, e como outro fragmento decorrente da remoção de uma unidade de glucose não apareceu, pode-se inferir que esta estrutura apresenta uma seqüência diferente da anteriormente descrita (Figura 63). Não foi possível determinar por metilação as ligações interglicosídicas, nem o tipo de hexose presente.

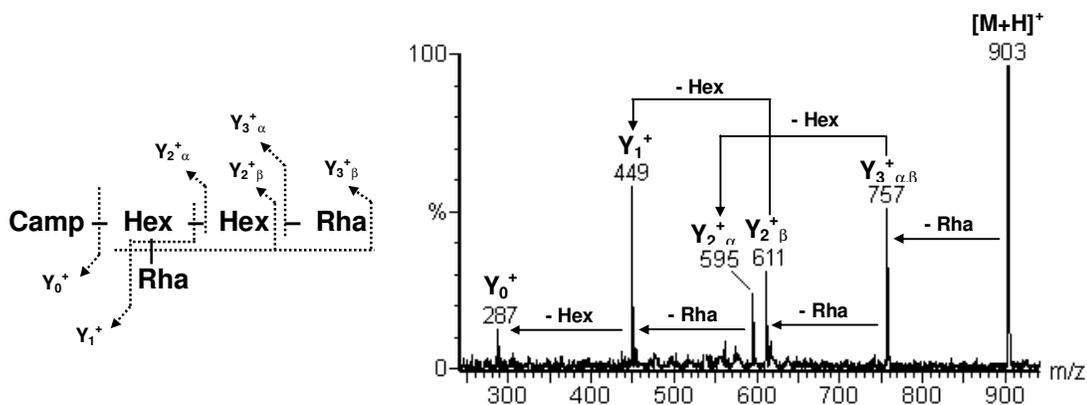
**Figura 63** – Perfil de fragmentação *in-source* do tetra-glicosídeo de  $m/z$  919  $[\text{M}+\text{H}]^+$



**Pico-1B** – A estrutura deste tetra-glicosídeo apresentou íon *quasi*-molecular de  $m/z$  903  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Assim como o P-1A, sua análise de metilação não foi possível, contudo sua fragmentação *in-source* indicou uma seqüência monossacarídica similar àquela do P-1A, mas contendo campferol como aglicona, tal como observado pelos

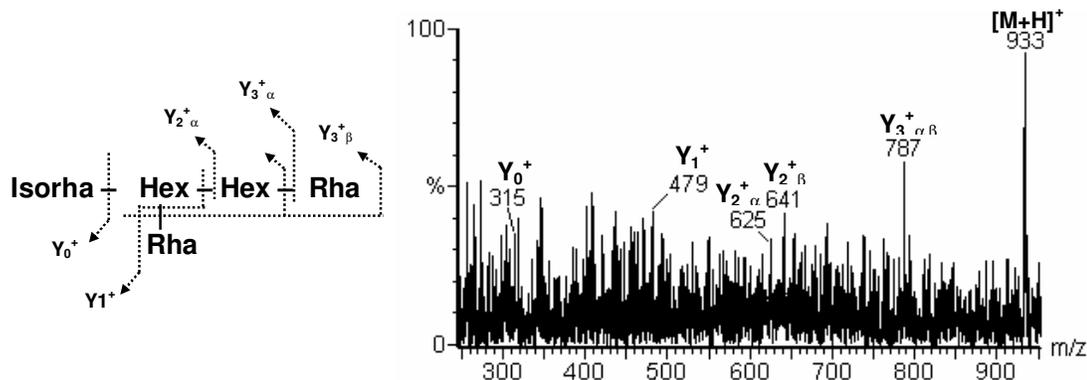
fragmentos  $Y_0^+$  de  $m/z$  287,  $Y_1^+$  de  $m/z$  449,  $Y_{2\alpha}^+$  de  $m/z$  595,  $Y_{2\beta}^+$  de  $m/z$  611,  $Y_{3\alpha\beta}^+$  de  $m/z$  757 (Figura 64).

**Figura 64** – Perfil de fragmentação *in-source* do tetra-glicosídeo de  $m/z$  903  $[M+H]^+$



**Pico-1C** – Com íon *quasi*-molecular de  $m/z$  933  $[M+H]^+$ , este tetra-glicosídeo pode ter uma estrutura semelhante a isoramnetina-di-ramno-hexobioside, encontrado em *Maytenus aquifolium* por Tiberti et al. (2007). Sua seqüência monossacarídica parece similar à de P-1A e P-1B, no entanto não pôde ser totalmente identificada devido sua pequena abundância, pois não foi possível gerar fragmentos consistentes (Figura 65).

**Figura 65** – Perfil de fragmentação *in-source* do tetra-glicosídeo de  $m/z$  933  $[M+H]^+$



**Picos-2 B e C** – O íon de  $m/z$  889  $[M+H]^+$ , observado em modo *off-line* já indicava a presença de duas estruturas como seqüências monossacarídicas diferentes (Figura 66, Tabela 8 , pg 140), sendo confirmada pela análise *on-line*, com o aparecimento de dois picos com mesmo valor de  $m/z$ . O isômero majoritário (**P-2B**) já teve sua estrutura previamente caracterizada como *Arap*-(1→3)-*Rhap*-(1→2)-[*Rhap*-(1→6)]-*Galp*-(1→3)-*O-Quer* (VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001), o que foi confirmado pelos fragmentos  $Y_0^+$   $m/z$  303,  $Y_1^+$   $m/z$  465,  $Y_2^{+\alpha/\beta}$   $m/z$  611,  $Y_3^{+\beta}$   $m/z$  743 e  $Y_3^{+\alpha}$   $m/z$  757, com as ligações confirmadas por metilação.

O composto minoritário (**P-2C**) não apresentou rendimento suficiente para gerar boa fragmentação *in-source*, e também não foi possível sua análise de metilação. Contudo no espectro de CID-MS obtido em modo *off-line*, é possível observar a presença minoritária de fragmentos que indicam sua seqüência monossacarídica, através dos íons  $Y_0^+$   $m/z$  303,  $Y_1^+$   $m/z$  449 - indicando uma ramnose ligada à quercetina,  $Y_2^{+\beta}$   $m/z$  581 e  $Y_2^{+\alpha}$  595 – indicando uma arabinose e outra ramnose, respectivamente, ligadas à primeira ramnose, e os fragmentos  $Y_3^{+\alpha}$   $m/z$  727 e  $Y_3^{+\beta}$   $m/z$  743. O fragmento de  $m/z$  727 corresponde à perda de um terminal hexose o que confirma a seqüência como sendo diferente do **P-2B**, que apresenta Ara e Rha nos terminais. Um importante fragmento foi observado na forma de íon sodiado,  $B_2^+$  de  $m/z$  315 que indica duas unidades de ramnose ligadas, sendo consistente com a seqüência proposta (Figura 66).

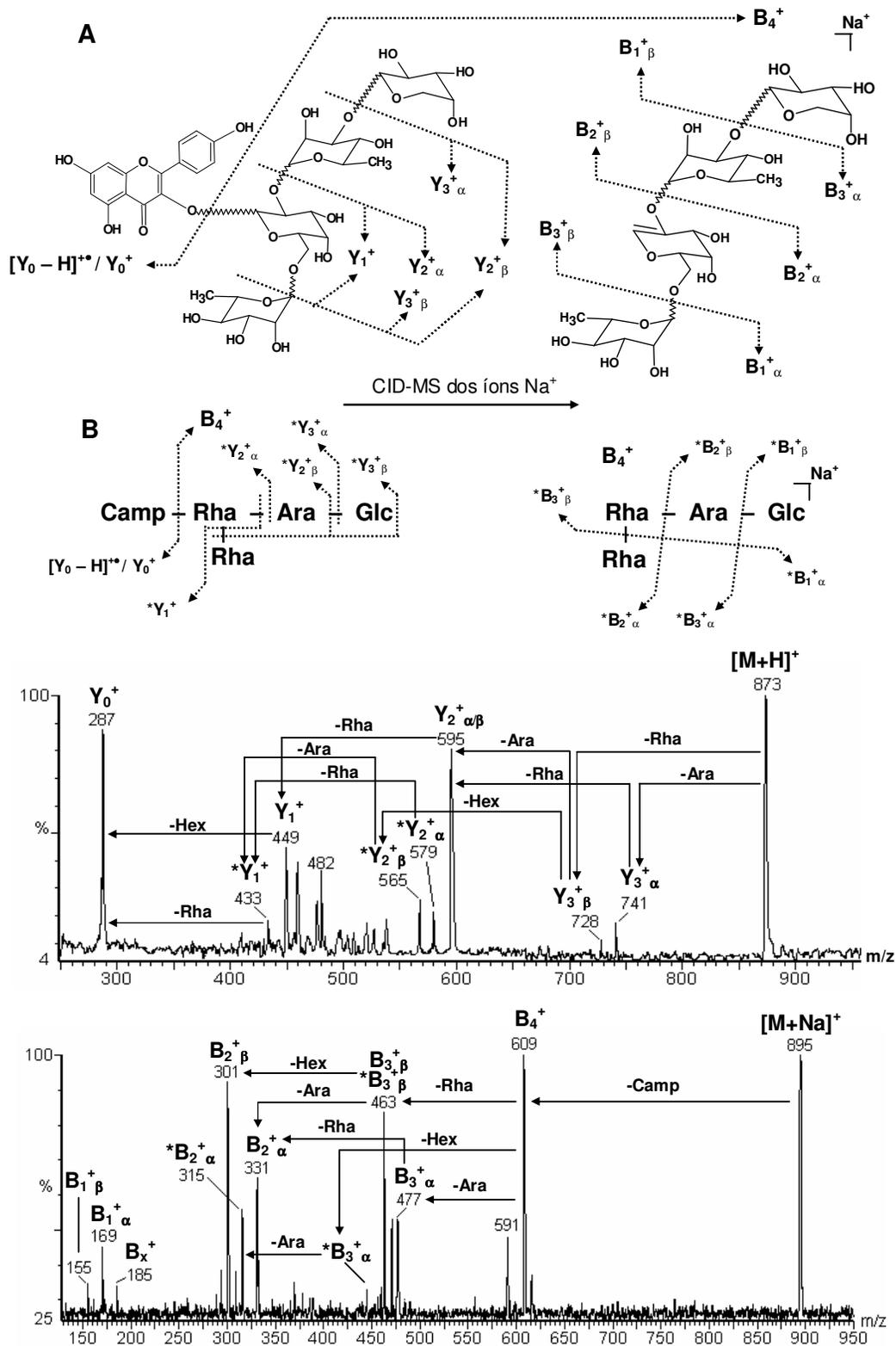


**Pico-3 B e C** – Suas estruturas são respectivamente similares às descritas anteriormente (**P-2 B e C**), contudo o campferol esta presente como aglicona no lugar da quercetina, produzindo um íon *quasi*-molecular de  $m/z$  873  $[M+H]^+$ . Também como descrito anteriormente, o composto majoritário (**P-3B**) já teve sua estrutura descrita como  $Ar\alpha p-(1\rightarrow3)-Rhap-(1\rightarrow2)-[Rhap-(1\rightarrow6)]-Gal\beta p-(1\rightarrow3)-O-Quer$  (VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001) e foi confirmada aqui por metilação (Tabela 7, pg 121), e pelos fragmentos obtidos por CID-MS de  $Y_0^+$   $m/z$  287,  $Y_1^+$   $m/z$  449,  $Y_2^{+\alpha/\beta}$   $m/z$  595,  $Y_3^{+\beta}$   $m/z$  728 e  $Y_3^{+\alpha}$   $m/z$  741 (Figura 67).

Novamente, a estrutura do pico minoritário (**P-3C**) não pode ser totalmente elucidada devido a sua baixa abundância, tendo apenas sua seqüência monossacarídica determinada pelos fragmentos  $Y_0^+$   $m/z$  287,  $Y_1^+$   $m/z$  433,  $Y_2^{+\beta}$   $m/z$  565,  $Y_2^{+\alpha}$   $m/z$  579.

O espectro de CID-MS dos compostos sodiados também confirmou estas duas seqüências monossacarídicas. Os principais íons que dão suporte a estas seqüências são os fragmentos  $B_2^+$ , encontrados em  $m/z$  301 – correspondente a uma arabinose ligada a uma ramnose, podendo ter sido gerado por ambas as estruturas; já o fragmento de  $m/z$  315 indica duas unidades de ramnose ligadas entre si, e só pode ter sido originado a partir da estrutura do composto **P-3C**, já que na estrutura do composto **P-3B** as unidade de ramnose estão separadas;  $m/z$  331 corresponde a uma unidade ramnose ligada a uma de hexose, sendo proveniente do composto **P-3B**. Os demais fragmentos do tipo B também dão suporte para ambas as seqüências (Figura 67).

**Figura 67** – Perfil de fragmentação por CID-MS dos tetra-glicosídeos de  $m/z$  873  $[M+H]^+$  e  $m/z$  895  $[M+Na]^+$



(A) Estrutura principal P3-B, (B) estrutura minoritária P3-C, indicada nos espectros de CID-MS por asteriscos

#### 4.3.4.12. Estrutura de flavonóis tri-glicosídeos

**Picos-2A e 3A** – Dois compostos formando íon *quasi*-molecular de  $m/z$  771  $[M-H]^-$ , foram encontrados. O espectro de CID-MS em modo negativo já havia fornecido a diferença entre os dois compostos, através da formação dos fragmentos  $Y_0^-$ , de  $m/z$  301 e 317, consistentes com a estrutura da quercetina e da miricetina, respectivamente. As duas agliconas foram confirmadas por seus fragmentos de massa em modo negativo (Tabela 5, pg 105), enquanto a seqüência glicosídica foi determinada por CID-MS em modo positivo.

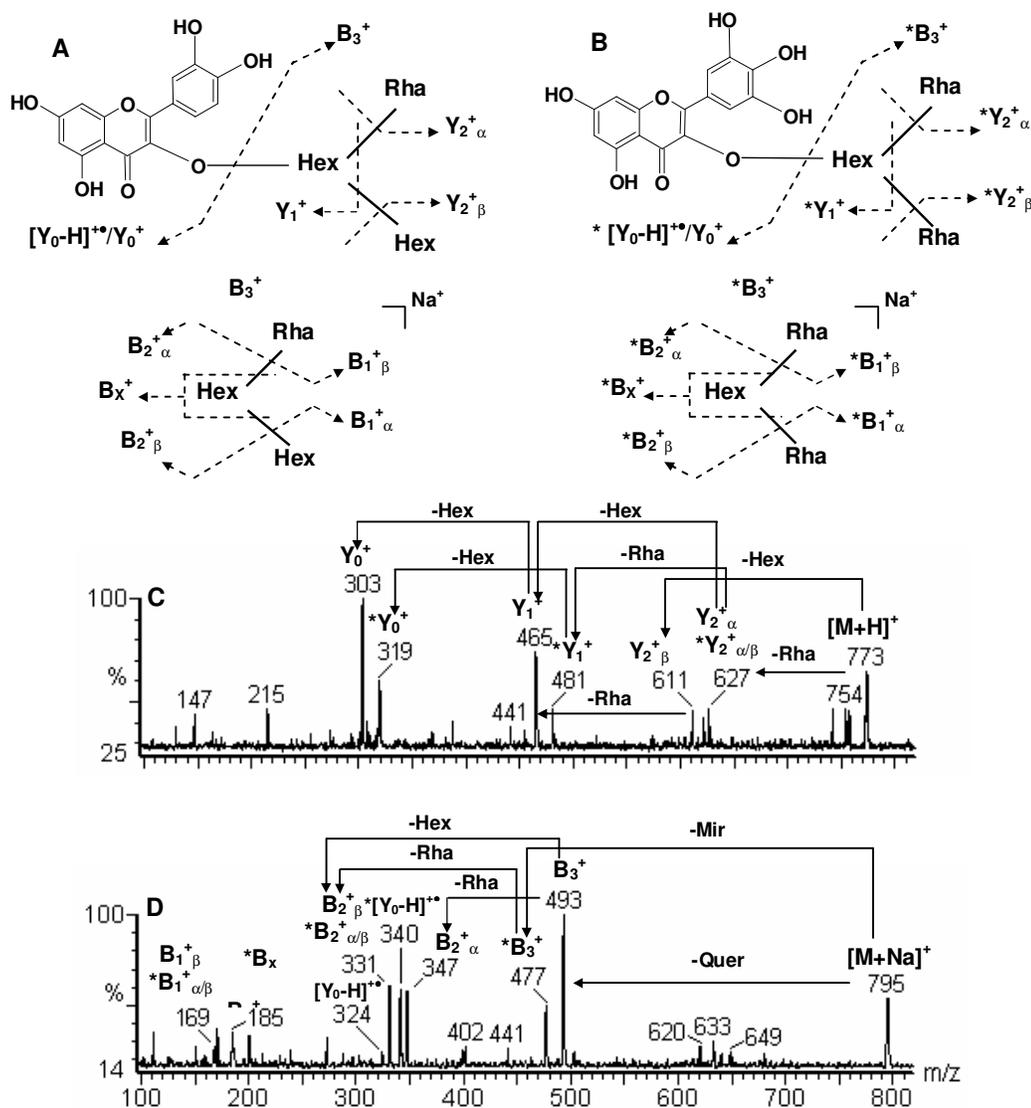
O composto mais abundante (**P-2A**) gerou fragmentos protonados consistentes com quercetina ( $m/z$  303), Quer-Hex ( $m/z$  465), Quer-Hex-Hex ( $m/z$  627), Quer-Hex-Rha ( $m/z$  611) com seu íon precursor de  $m/z$  773 sendo então consistente com a estrutura Quer-Hex-(Hex)-Rha (Figura 68 A), semelhante a uma já encontrada em *M. aquifolium* (TIBERTI et al., 2007). A fragmentação deste composto na forma de adutos de  $Na^+$  confirmou a estrutura do oligossacarídeo, pela presença dos fragmentos  $B_3^+$  de  $m/z$  493, indicando um trissacarídeo composto de Hex-Hex-Rha,  $B_2^+_{\alpha}$  de  $m/z$  347 que indica duas hexoses interligadas e de  $m/z$   $B_2^+_{\beta}$  331 consistente com Hex-Rha, o que confirma a seqüência descrita pela fragmentação do composto na forma de adutos de  $H^+$  (Figura 68 C, D).

A estrutura do composto **P-2B** pode ser diferenciada facilmente da estrutura anterior (seu isóbar) por apresentar uma molécula de aglicona diferente, a miricetina que forneceu fragmento protonado de  $m/z$  319 e sodiado de  $m/z$  341 (Figura 68 B). Glicosídeos contendo miricetina ainda não haviam sido descritos em *M. ilicifolia* e possivelmente esta seja a primeira descrição para o gênero *Maytenus*. De acordo com os fragmentos obtidos em modo positivo do íon precursor protonado, a miricetina esta ligada a uma unidade de hexose evidenciada pelo fragmento  $Y_1^+$  de  $m/z$  481. Esta unidade de hexose é provavelmente di-substituída por duas outras de ramnose, seguindo o mesmo perfil de outros glicosídeos de *M. ilicifolia*, o fragmento  $Y_2^+$  de  $m/z$  627 indica uma ramnose ligada à hexose, mas não confirma o padrão de di-substituição. Contudo, na forma sodiada foi possível inferir este padrão de di-substituição, primeiro pela formação do fragmento  $B_3^+$  de  $m/z$  477 indicando um trissacarídeo, e sabendo que a hexose esta ligada à miricetina, a formação de apenas um tipo de fragmento  $B_2^+$ , de  $m/z$  331 indicando o dissacarídeo Hex-Rha confirma a di-substituição da hexose por duas unidades de ramnose, já que se o

trissacarídeo fosse linear (Hex-Rha-Rha) deveria aparecer um fragmento de  $m/z$  315 que seria compatível com duas unidades de ramnose ligadas, o que não aparece no espectro (Figura 68 C, D).

Contudo, devido a baixa abundância de ambos os compostos, não foi possível realizar sua análise por metilação e, portanto não tiveram suas ligações interglicosídicas elucidadas, nem o tipo de hexose presente.

**Figura 68** – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina ramno-hexobiosídeo e miricetina di-ramno-hexosídeo -  $m/z$  773  $[M+H]^+$  e  $m/z$  795  $[M+Na]^+$



Isômeros contendo diferentes agliconas, (A) quercetina em P2-A e (B) miricetina em P3-A, indicada por asteriscos nos espectros de CID-MS

**Picos-4 A e B** – Estes dois compostos constituem isômeros de que apareceram com  $m/z$  755  $[M-H]^-$ , 757  $[M+H]^+$ , 779  $[M+Na]^+$ . A estrutura do isômero mais abundante (**P-4A**) foi previamente caracterizada como Rhap-(1→2)-[Rhap-(1→6)]-Galp-(1→3)-O-Quer (VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001), e foi indistinguível da estrutura **P-4B** nos espectros de massa, que apresentaram os mesmos tipos de fragmentos desprotonados,  $Y_0^{\bullet}$   $m/z$  300, protonados  $Y_0^+$   $m/z$  303,  $Y_1^+$   $m/z$  465 e  $Y_2^{+\alpha/\beta}$   $m/z$  611 e sodiados  $B_2^{+\alpha/\beta}$   $m/z$  331 e  $B_3^+$   $m/z$  477 (Figuras 55 e 56, pgs 107 e 109).

Se por um lado as análises *off-line* indicavam apenas um composto, por outro lado as análises *on-line* confirmavam a presença de dois picos com mesmas características de fragmentação *in-source*. Como neste caso os compostos apresentaram bom rendimento após coleta no HPLC, ambos foram analisados por metilação, que forneceu a informação que faltava para a identificação dos compostos. O composto **P-4A** foi confirmado com a estrutura previamente descrita, contendo galactose ligada à quercetina e di-substituída por duas unidades de ramnose nas posições O-2 e O-6. Com estrutura muito similar, o composto **P-4B** apresentou um derivado acetato parcialmente metilado de 3,4-Me<sub>2</sub>-glucitol, o que confirmou as duas estruturas como diastereoisômeros, uma contendo galactose e a outra glucose ligadas à quercetina. A glucose também apresenta-se di-substituída por duas unidades de ramnopiranosose.

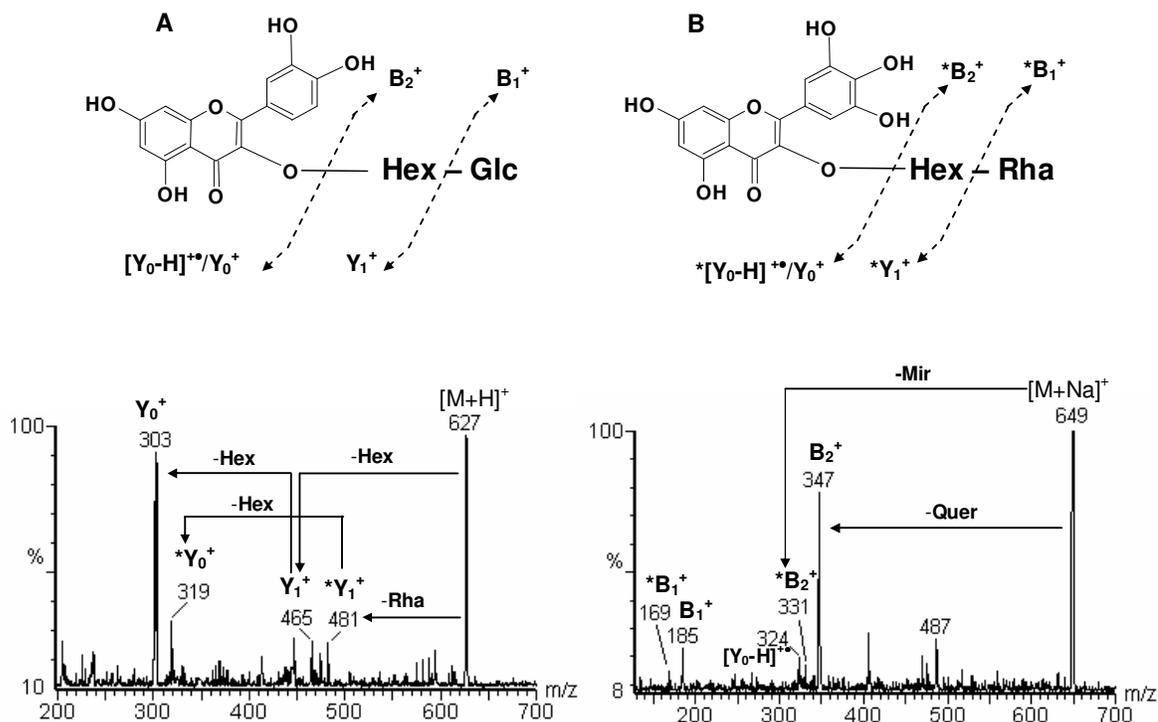
**Picos-5A e 6A** – Novamente dois diastereoisômeros contendo galactose e glucose como os descritos anteriormente, contudo contendo campferol no lugar da quercetina. A análise de massa de ambos forneceu os mesmos íons de  $m/z$  739  $[M-H]^-$ , 741  $[M+H]^+$ , 763  $[M+Na]^+$  (Figura 55 e 56, pgs 107 e 109). A estrutura do isômero mais abundante (**P-6A**) foi previamente caracterizada como Rhap-(1→2)-[Rhap-(1→6)]-Galp-(1→3)-O-Camp (VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001), enquanto que a estrutura do composto menos abundante (**P-5A**) é similar, porém contendo glucose no lugar da galactose, como mostrado por análise de metilação, pelo aparecimento do derivado acetato de 3,4-Me<sub>2</sub>-glucitol. Os fragmentos de massa que confirmam a estrutura são: desprotonados,  $Y_0^{\bullet}$   $m/z$  284, protonados  $Y_0^+$   $m/z$  287,  $Y_1^+$   $m/z$  449 e  $Y_2^{+\alpha/\beta}$   $m/z$  595 e sodiados  $B_2^{+\alpha/\beta}$   $m/z$  331 e  $B_3^+$   $m/z$  477, indicando que os trissacarídeos são iguais aos dos compostos **P-4 A e B**.

#### 4.3.4.13. Estrutura de flavonóis di-glicosídeos

**Picos 7A e B** – Foram encontrados dois isóbaros com íons desprotonados de  $m/z$  625  $[M-H]$ , protonados de  $m/z$  627  $[M+H]^+$  e sodiados de  $m/z$  649  $[M+Na]^+$ . A exemplo dos isóbaros **P-2 e 3A**, sua diferenciação pode ser observada mesmo por CID-MS em modo negativo, que forneceu dois principais fragmentos  $[Y_0-H]^-$  de  $m/z$  300 e 316, consistentes com quercetina e miricetina como agliconas. Contudo devido a sua baixa abundância, o composto contendo miricetina não foi localizado nos cromatogramas, e portanto não foi analisado por metilação. Sua estrutura foi determinada pelos fragmentos observados em modo *off-line*, do precursor protonado gerando fragmento de  $m/z$  481 ( $Y_1^+$ ), que indica uma unidade de hexose ligada à miricetina, e os fragmentos sodiados de  $m/z$  331 ( $B_2^+$ ) e 169 ( $B_1^+$ ), que confirmam a presença do dissacarídeo Hex-Rha.

Em modo *on-line*, os compostos **P-7A e B** foram identificados como quercetina-hexobioside, como indicado pela presença dos fragmentos protonados de  $m/z$  303 ( $Y_0^+$ ), e  $m/z$  465 ( $Y_1^+$ ) equivalentes a quercetina e a Quer-Hex, respectivamente, e no modo *off-line* o fragmento sodiado de  $m/z$  347 ( $B_2^+$ ), foi consistente com grupo hexobiosil. Devido a baixa abundância destes picos na segunda dimensão, eles foram coletados juntos diretamente da primeira dimensão para serem então analisados por metilação, a qual mostrou uma mistura de PMAAs, indicando uma mistura de isômeros, contendo glucose e galactose ligada à quercetina. Por está análise, Glcp foi encontrada como resíduo terminal, e podendo estar ligada à galactose ou outra glucose por ligações *O*-glicosídicas 1→2 ou 1→6 (Figura 69 A, B), contudo esta fração precisa ser melhor purificada para confirmar todos estes isômeros.

**Figura 69** – Perfil de fragmentação por CID-MS da miricetina ramno-hexosídeo e quercetina hexobiosídeo -  $m/z$  627  $[M+H]^+$  e  $m/z$  649  $[M+Na]^+$

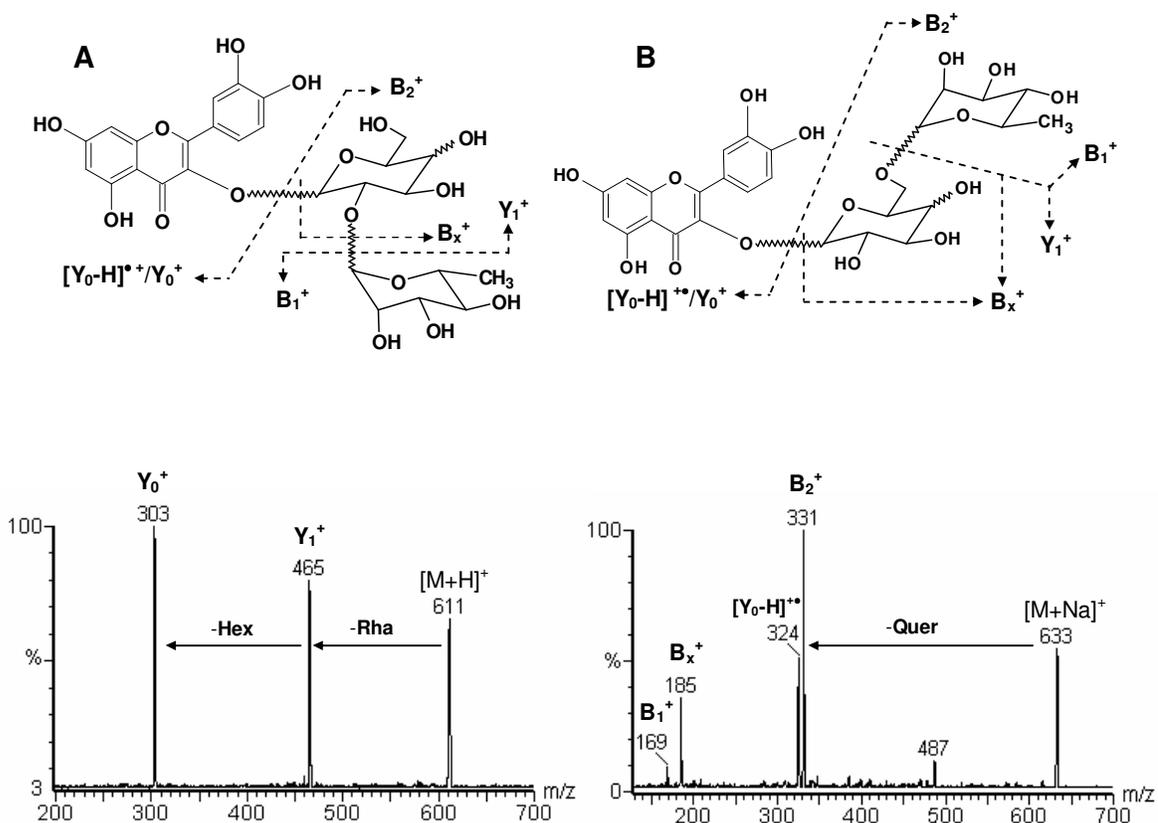


P7 A e B, contendo isômeros ligados à quercetina (A). Um outro composto isóbaro apareceu apenas em modo *off-line* contendo miricetina indicada por asteriscos nos espectros de CID-MS

**Pico-8A/B e 10A/B** – Quatro compostos foram encontrados formando os mesmo íons, e com as mesmas fragmentações. Estes compostos apresentaram íons *quasi*-moleculares de  $m/z$  611  $[M+H]^+$  e pseudo-moleculares de  $m/z$  633  $[M+Na]^+$ . Os fragmentos protonados  $Y_0^+$  de  $m/z$  303 e  $Y_1^+$  de  $m/z$  465, bem como os sodiados  $B_1^+$  de  $m/z$  169,  $B_x^+$  de  $m/z$  185 e  $B_2^+$  de  $m/z$  331 são compatíveis com a estrutura da rutina  $[\alpha\text{-Rhap-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-Glc}p\text{-(1}\rightarrow\text{3)-O-Quer}]$  (Figura 70 A, B). Como os quatro picos apresentaram bom rendimento após serem isolados no HPLC (segunda dimensão) foi possível realizar suas análises de metilação (Tabela 7, pg 121), e com isso identificá-los. O composto **P-8A** foi identificado como  $\text{Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-Gal}p\text{-(1}\rightarrow\text{3)-O-Quer}$ , pela presença do derivado PMAA 3,4,6-Me<sub>3</sub>-galactitol, enquanto o composto

**P-8B** como Rhap-(1→6)-Galp-(1→3)-O-Quer, pelo derivado acetato de 2,3,4-O-Me<sub>3</sub>-galactitol. Similarmente, o composto **P-10A** foi identificado como Rhap-(1→2)-Glcsp-(1→3)-O-Quer pela presença do derivado PMAA 3,4,6-Me<sub>3</sub>-glucitol; e o composto **P-10B** identificado como rutina através do derivado PMAA 2,3,4-O-Me<sub>3</sub>-glucitol. Em todos estes compostos o terminal de ramnopirranose foi confirmado pela presença do derivado PMAA 2,3,4-O-Me<sub>3</sub>-ramnitol (Tabela 7, pg 121).

**Figura 70** – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina ramno-hexisídeo -  $m/z$  611  
 $[M+H]^+$  e  $m/z$  633  $[M+Na]^+$

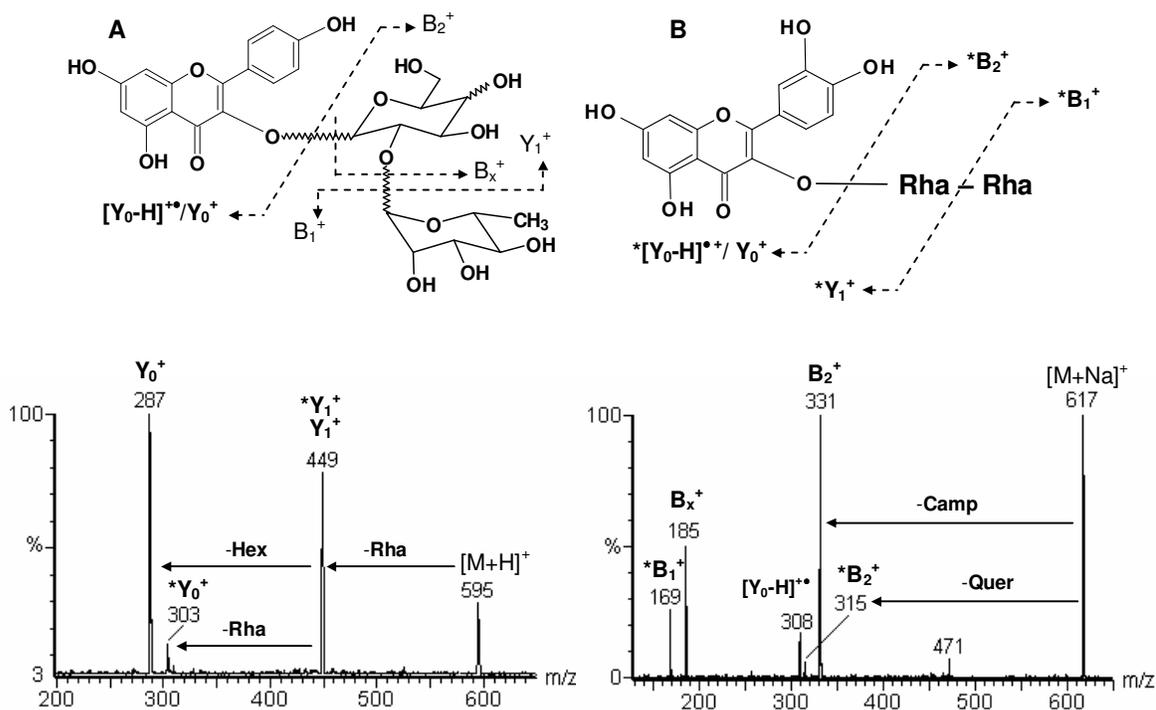


Compostos formando isômeros indistinguíveis por ESI-MS, contendo ramnose ligada à galactose ou à glucose por ligações 1→2 (A) ou 1→6 (B).

**Pico-9A/B e 11A/B** – Estes compostos também formaram 4 picos no cromatograma bi-dimensional, e foram identificados com estruturas similares aos anteriormente descritos, com ramnose ligada à galactose ou glucose por ligações 1→2 ou 1→6,

porém com campferol como aglicona no lugar da quercetina. Contudo, em modo *off-line* alguns fragmentos indicam a presença de um quinto composto, não observado no HPLC. Na análise de CID-MS em modo negativo, o íon precursor de  $m/z$  593 gerou o fragmento  $Y_0^+$  esperado para o campferol, de  $m/z$  287, mas também outro fragmento de  $m/z$  303, consistente com a quercetina. Como a diferença destas duas agliconas é uma hidroxila a mais presente na quercetina, os dissacarídeos ligados a elas deveriam ser diferente. Isto foi demonstrado através da fragmentação dos íons sodiados ( $m/z$  617), que deu origem a sinal intenso de  $m/z$  331 ( $B_2^+$ ) do dissacarídeo Hex-Rha, e um pequeno fragmento de  $m/z$  315, compatível com o dissacarídeo Rha-Rha, que esta ligado à quercetina (Figura 71 A, B).

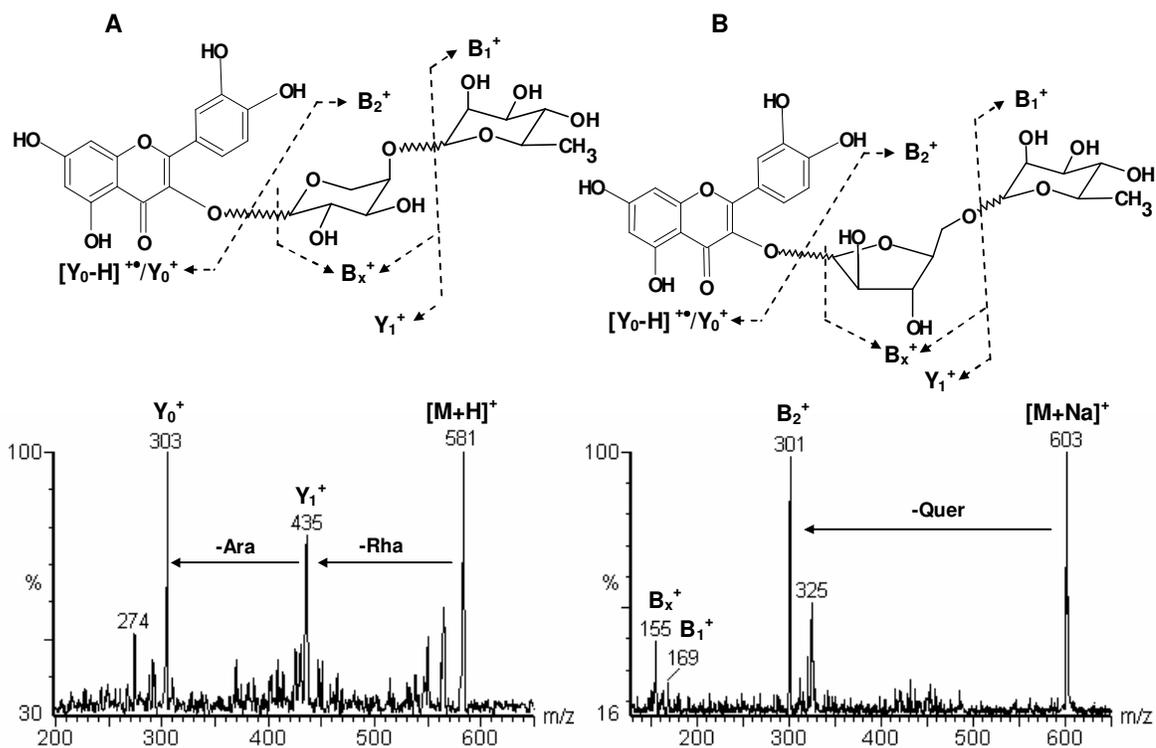
**Figura 71** – Perfil de fragmentação por CID-MS do campferol ramno-hexisídeo e quercetina ramnobiosídeos -  $m/z$  595  $[M+H]^+$  e  $m/z$  617  $[M+Na]^+$



(A) Estrutura contendo ramnose ligada à galactose ou glucose por ligações 1→2 com campferol como aglicona. Ligações 1→6 também foram encontradas. (B) estrutura minoritária contendo duas unidades ramnose ligadas à quercetina, observada apenas em modo *off-line*.

**Pico-12A e B** – Com  $m/z$  581  $[M+H]^+$  e 603  $[M+Na]^+$ , dois novos glicosídeos foram identificados em *M. ilicifolia*, sendo indistinguíveis entre si pelos métodos utilizados. Estas estruturas foram caracterizadas como contendo ramnose terminal e arabinose ligada à quercetina, observado através dos fragmentos protonados  $Y_0^+$  de  $m/z$  303 e  $Y_1^+$  em  $m/z$  435. A análise de metilação confirmou a estrutura, no entanto, não foi possível obter as ligações interglicosídicas precisamente, considerando que os derivados PMAAs encontrados na análise foram de 2,3,4-Me<sub>3</sub>-ramnitol e 2,3-Me<sub>2</sub>-arabinitol, mostrando que a ramnose pode estar ligada à arabinose em O-4 ou O-5, já que derivado acetato de 2,3-Me<sub>2</sub>-arabinitol não permite distinguir entre arabinofuranose e arabinopiranosose. Como estes compostos formaram dois picos no cromatograma, as duas estruturas parecem estar presentes: Rhap-(1→4)-Arap e Rhap-(1→5)-Araf (Figura 72 A, B).

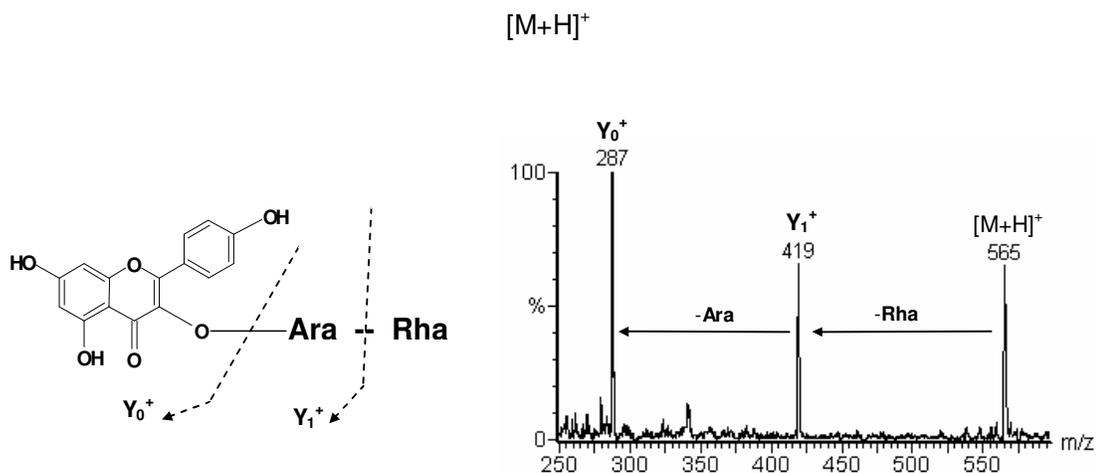
**Figura 72** – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina ramno-arabinosídeo -  $m/z$  581  $[M+H]^+$  e  $m/z$  603  $[M+Na]^+$



Glicosídeos contendo arabinopiranosose (A) e arabinofuranose (B). Ambos produzem os mesmos derivados acetatos parcialmente metilados, contudo dois picos foram observados nos cromatogramas de LC-MS indicando que as duas estruturas estão presentes no extrato.

**Pico-13C** – Este flavonol di-glicosídeo foi identificado apenas por análise *on-line* apresentando íons *quasi*-moleculares de  $m/z$  563  $[M-H]^-$ , e 565  $[M+H]^+$ . Sua estrutura foi identificada como Rha-Ara-Camp, sendo compatível com a dos compostos **P-12 A e B**, contendo campferol no lugar da quercetina. Sua fragmentação *in-source* confirmou a presença do campferol com  $m/z$  287 ( $Y_0^+$ ) e a arabinose ligada ao campferol com  $m/z$  419 ( $Y_1^+$ ) (Figura 73). Uma estrutura semelhante já foi previamente descrita em *M. ilicifolia* (TIBERTI et al., 2007).

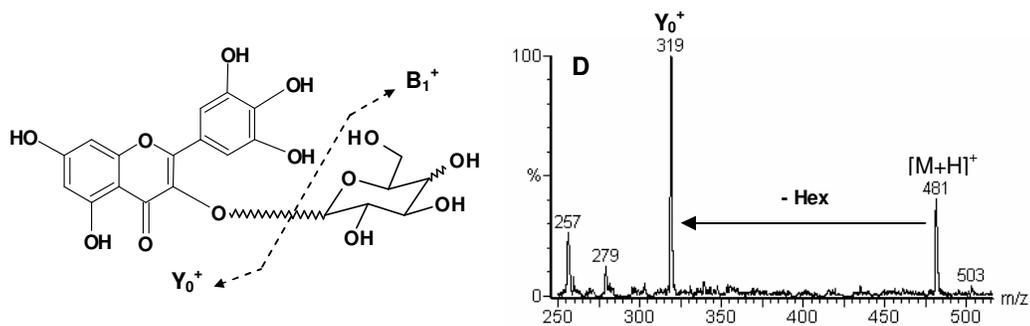
**Figura 73** – Perfil de fragmentação *in-source* do campferol ramno-arabinosídeo -  $m/z$  565



#### 4.3.4.14. Estrutura de flavonóis mono-glicosídeos

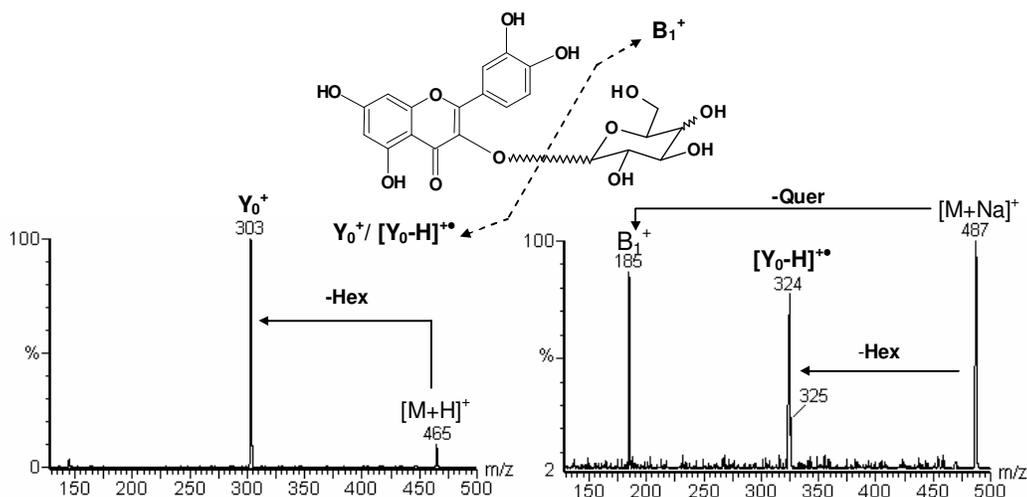
**Picos-13A e B** – Dois picos referentes flavonóis mono-glicosídeos com mesmos íons *quasi*-moleculares de  $m/z$  479  $[M-H]^-$  e  $m/z$  481  $[M+H]^+$  foram observados apenas nas análises *on-line*. Estes dois flavonóis renderam fragmentação com íon chave de  $m/z$  319 ( $Y_0^+$ ), sendo compatível com a miricetina, com NL de 162 m.u. indicando a perda de uma unidade de hexose (Figura 74). Como dois picos apareceram no cromatograma, é possível que sejam referentes à glicosídeos com galactose e com glucose, como tem sido comum aos flavonóis glicosídeos de *M. ilicifolia*. Estes dois glicosídeos ainda não haviam sido relatados em *M. ilicifolia*.

**Figura 74** – Perfil de fragmentação *in-source* da miricetina-hexosídeo -  $m/z$  481  $[M+H]^+$



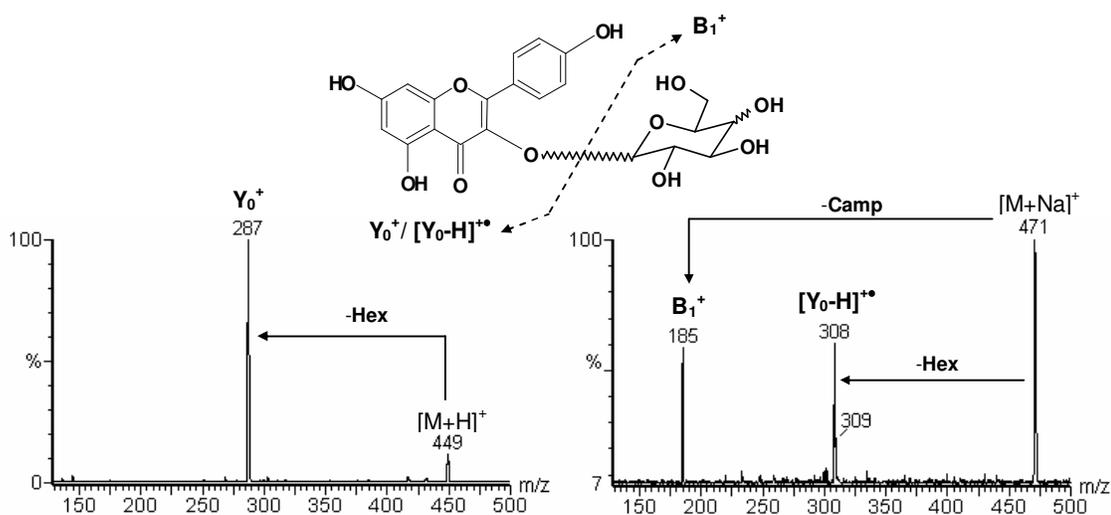
**Picos-14 A e B** – Estes dois compostos de  $m/z$  465  $[M+H]^+$  e  $m/z$  487  $[M+Na]^+$ , apresentam quercetina como aglicona, com fragmento protonado de  $m/z$  303 e sodiado de  $m/z$  324. A formação do fragmento sodiado de  $m/z$  185 foi consistente com uma hexose (Figura 75). Estes dois compostos foram analisados por metilação, e mostraram os derivados PMAA 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Galp (**P-14A**), e 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-GlcP (**P-14B**), sendo coerentes com a estrutura do hiperosídeo e da isoquercitrina, ambos já relatados em *M. ilicifolia* (TIBERTI et al., 2007).

**Figura 75** – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina-hexosídeo -  $m/z$  465  $[M+H]^+$  e  $m/z$  487  $[M+Na]^+$



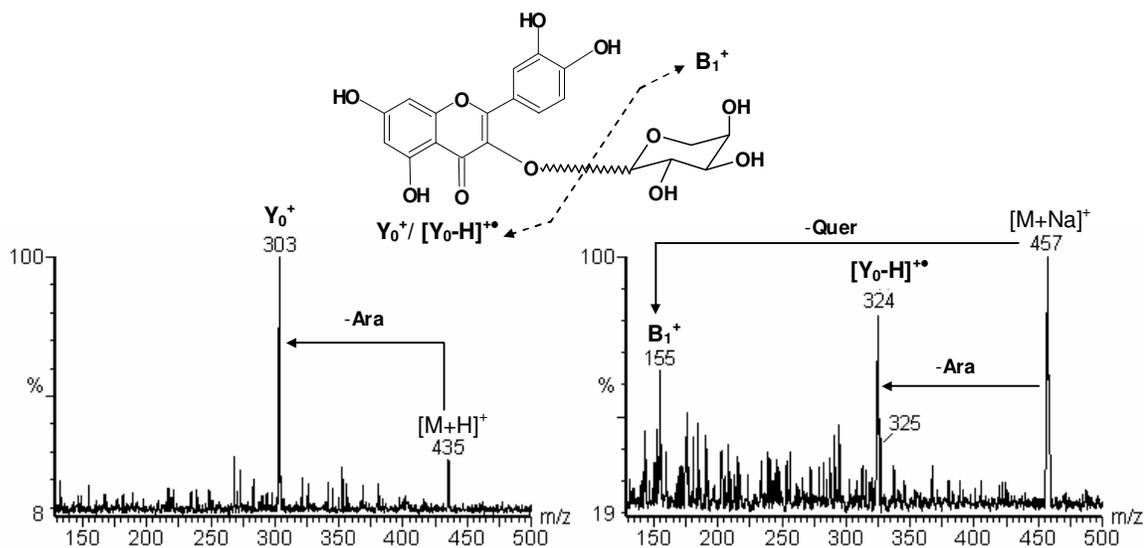
**Picos-14C e 15A** – Estes dois compostos de  $m/z$  449  $[M+H]^+$  apresentaram estruturas semelhantes ao hiperosídeo e à isoquercitrina, porém contendo campeferol como aglicona conforme indicado pelo fragmento protonado  $Y_0^+$  de  $m/z$  287 (Figura 76). Ambos geraram os mesmos derivados PMAA dos picos **P-14C** e **P-15A** (Tabela 7, pg 121).

**Figura 76** – Perfil de fragmentação por CID-MS do campeferol-hexosídeo -  $m/z$  449  $[M+H]^+$  e  $m/z$  471  $[M+Na]^+$



**Picos-16A e B** – Estes dois compostos de  $m/z$  435  $[M+H]^+$  mostraram quercetina na sua composição ( $Y_0^+$  de  $m/z$  303). Sua NL de 132 m.u. indica que uma pentose está ligada à aglicona, o que foi confirmado pelo fragmento sodiado  $B_1^+$  de  $m/z$  155 (Figura 77). Análise de metilação indicou a presença de *Araf* e *Arap* (Tabela 7, pg 121), ambos ainda não haviam sido descritos em *M. ilicifolia*.

**Figura 77** – Perfil de fragmentação por CID-MS da quercetina-arabinosídeo -  $m/z$  435  $[M+H]^+$  e  $m/z$  457  $[M+Na]^+$



**Pico-16 C e D** – Dois picos foram observados com  $m/z$  419  $[M+H]^+$  no cromatograma da segunda dimensão. Estes já haviam sido detectados em análise *off-line* formado íon pseudo-molecular de  $m/z$  441  $[M+Na]^+$ . Seus fragmentos protonados de  $m/z$  287 ( $Y_0^+$ ), e sodiado de  $m/z$  155 ( $B_1^+$ ) mostram uma unidade de arabinose ligada ao campferol (Figura 78). Como formam dois picos no cromatograma (LC-MS) é possível que estes sejam formados por *Araf* e *Arap*, como os compostos **P-16A e B**, contudo não apareceram na análise de metilação.

**Figura 78** – Perfil de fragmentação por CID-MS do campferol-arabinosídeo -  $m/z$  435  $[M+H]^+$  e  $m/z$  457  $[M+Na]^+$

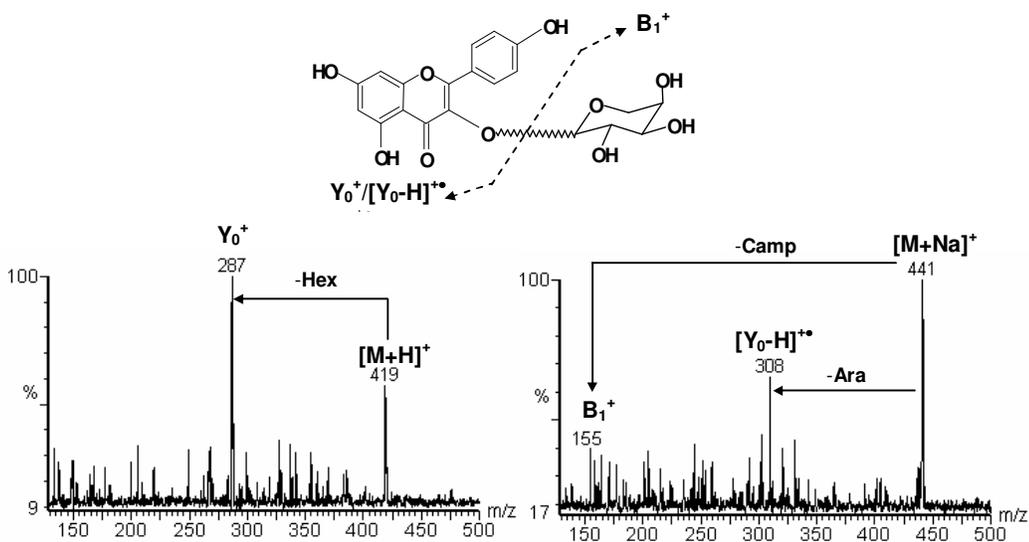


TABELA 8 – Resultado obtido por 2D-LC-MS com derivatização pós-coluna

Pico	R <sub>t</sub> (min)		[M-H] <sup>-</sup>	ESI-MS em modo positivo (fragmentação <i>in-source</i> )							λ <sub>max</sub> (nm)			Identificação dos compostos
	SEC	RP		[M+H] <sup>+</sup>	Y <sub>0</sub> <sup>+</sup>	Y <sub>1</sub> <sup>+</sup>	Y <sub>2</sub> <sup>+</sup> <sub>α</sub>	Y <sub>2</sub> <sup>+</sup> <sub>β</sub>	Y <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sub>α</sub>	Y <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sub>β</sub>	Branco	NaOH	AlCl <sub>3</sub>	
P1A	13.89	8.13	917	919	303	465	611	611	-	773	256 – 354	270 - 325 - 406	265 – 401	Rha-(1→)-Hex-(1→)-[Rha-(1→)]-Gal-(1→)-Quer
P1B	13.89	9.09	901	903	287	449	595	611	757	757	255 – 361	273 - 326 - 405	270 – 352	Rha-(1→)-Hex-(1→)-[Rha-(1→)]-Gal-(1→)-Camp
P1C	13.89	9.51	931	933	317	479	625	641	787	787	256 – 355	271 - 326 - 406	268 – 356	Rha-(1→)-Hex-(1→)-[Rha-(1→)]-Gal-(1→)-Isorhamnetin
P2A	21.09	12.06	771	773	303	303	465	611	627	-	255 – 354	273 - 325 - 405	268 – 400	Hex-(1→)-[Rha-(1→)]-Gal-(1→)-Quer
P2B	21.09	13.22	887	889	303	465	611	611	757	743	255 – 354	270 - 329 - 400	269 – 403	Arap-(1→3)-Rhap-(1→ 6)-[Rhap-(1→ 2)]-Galp-(1→3)-Quer
P2C	21.09	13.52	887	889	303	449	595	581	727	743	255 – 355	270 - 325 - 402	270 – 404	Hex-(1→)-Ara-(1→)-[Rha-(1→)]-Rha-(1→3)-Quer
P3A	22.41	10.88	771	773	319	319	481	627	-	-	255 – 354	272 - 327 - 405	271 – 406	Rhap-(1→)-[Rhap-(1→)]-Galp-(1→3)-Myr
P3B	22.41	14.63	871	873	287	449	595	595	741	727	256 – 364	275 - 325 - 406	265 – 355	Arap-(1→3)-Rhap-(1→ 6)-[Rhap-(1→ 2)]-Galp-(1→3)-Camp
P3C	22.41	15.17	871	873	287	433	565	579	711	727	255 – 356	271 - 326 - 398	268 – 358	Hex-(1→)-Ara-(1→)-[Rha-(1→)]-Rha-(1→3)-Camp
P4A	23.58	13.17	755	757	303	465	611	611	-	-	255 – 355	273 - 327 - 401	268 – 403	Rhap-(1→ 6)-[Rhap-(1→ 2)]-Galp-(1→3)-Quer
P4B	23.58	13.49	755	757	303	465	611	611	-	-	254 – 354	273 - 325 - 402	267 – 403	Rhap-(1→ 6)-[Rhap-(1→ 2)]-GlcP-(1→3)-Quer
P5A	24.42	15.06	739	741	287	449	595	595	-	-	255 – 363	270 - 325 - 405	269 – 356	Rhap-(1→ 6)-[Rhap-(1→ 2)]-GlcP-(1→3)-Camp
P6A	25.65	14.68	739	741	287	449	595	595	-	-	256 – 358	271 - 328 - 404	267 – 355	Rhap-(1→ 6)-[Rhap-(1→ 2)]-Galp-(1→3)-Camp
P7A	28.24	12.10	625	627	303	465	-	-	-	-	265 – 361	273 - 326 - 404	273 – 404	GlcP-(1→2/6)-Gal/Glc-(1→3)-Quer
P7B	28.24	12.40	625	627	303	465	-	-	-	-	255 – 354	272 - 325 - 406	269 – 405	GlcP-(1→2/6)-Gal/Glc-(1→3)-Quer
P8A	30.66	13.83	609	611	303	465	-	-	-	-	255 – 361	271 - 325 - 405	267 – 405	Rhap-(1→ 2)-Galp-(1→3)-Quer
P8B	30.66	14.23	609	611	303	465	-	-	-	-	255 – 354	271 - 325 - 405	268 – 406	Rhap-(1→ 6)-Galp-(1→3)-Quer
P9A	32.13	15.40	593	595	287	449	-	-	-	-	254 – 354	271 - 326 - 402	270 – 355	Rhap-(1→ 6)-Galp-(1→3)-Camp
P9B	32.13	15.85	593	595	287	449	-	-	-	-	255 – 355	273 - 325 - 401	270 – 356	Rhap-(1→ 2)-Galp-(1→3)-Camp
P10A	33.72	14.74	609	611	303	465	-	-	-	-	255 – 355	273 - 327 - 404	268 – 403	Rhap-(1→ 2)-GlcP-(1→3)-Quer
P10B	33.72	15.20	609	611	303	465	-	-	-	-	264 – 358	275 - 325 - 405	269 – 401	Rhap-(1→ 6)-GlcP-(1→3)-Quer (rutina)
P11A	34.70	16.44	593	595	287	449	-	-	-	-	255 – 356	270 - 325 - 405	265 – 355	Rhap-(1→ 6)-GlcP-(1→3)-Camp
P11B	34.70	17.43	593	595	287	449	-	-	-	-	255 – 358	273 - 325 - 403	266 – 353	Rhap-(1→ 2)-GlcP-(1→3)-Camp
P12A	36.88	16.22	579	581	303	435	-	-	-	-	256 – 354	271 - 325 - 403	267 – 401	Rhap-(1→ 4/5)-Ara-(1→3)-Quer
P12B	36.88	16.48	579	581	303	435	-	-	-	-	255 – 365	271 - 325 - 403	268 – 399	Rhap-(1→ 4/5)-Ara-(1→3)-Quer
P13A	39.77	12.63	479	481	319	-	-	-	-	-	255 – 356	274 - 325 - 406	268 – 404	Hex-(→)-Mir
P13B	39.77	12.84	479	481	319	-	-	-	-	-	256 – 356	271 - 329 - 403	265 – 403	Hex-(→)-Mir
P13C	39.77	18.45	563	565	287	419	-	-	-	-	261 – 357	271 - 325 - 404	267 – 354	Rha-(→)-Ara-(→)-Camp
P14A	41.50	15.03	463	465	303	-	-	-	-	-	255 – 355	273 - 326 - 405	267 – 408	Galp-(1→3)-Quer (hiperosídeo)
P14B	41.50	15.51	463	465	303	-	-	-	-	-	254 – 355	272 - 325 - 405	270 – 405	GlcP-(1→3)-Quer (isoquercetrina)
P14C	41.50	16.91	447	449	287	-	-	-	-	-	250 – 355	272 - 326 - 404	269 – 356	Galp-(1→3)-Camp
P15A	42.36	17.86	447	449	287	-	-	-	-	-	255 – 356	271 - 325 - 406	265 – 351	GlcP-(1→3)-Camp
P16A	44.98	16.09	433	435	303	-	-	-	-	-	255 – 354	273 - 325 - 406	267 – 401	Araf-(1→3)-Quer
P16B	44.98	16.47	433	435	303	-	-	-	-	-	255 – 354	274 - 325 - 405	268 – 400	Arap-(1→3)-Quer
P16C	44.98	17.80	417	419	287	-	-	-	-	-	255 – 356	273 - 325 - 402	268 – 356	Ara-(1→)-Camp
P16D	44.98	18.27	417	419	287	-	-	-	-	-	258 – 362	270 - 327 - 405	269 – 353	Ara-(1→)-Camp

#### 4.3.4.15. Diferenciação parcial entre galactosídeos e glucosídeos por ESI-MS em modo off-line

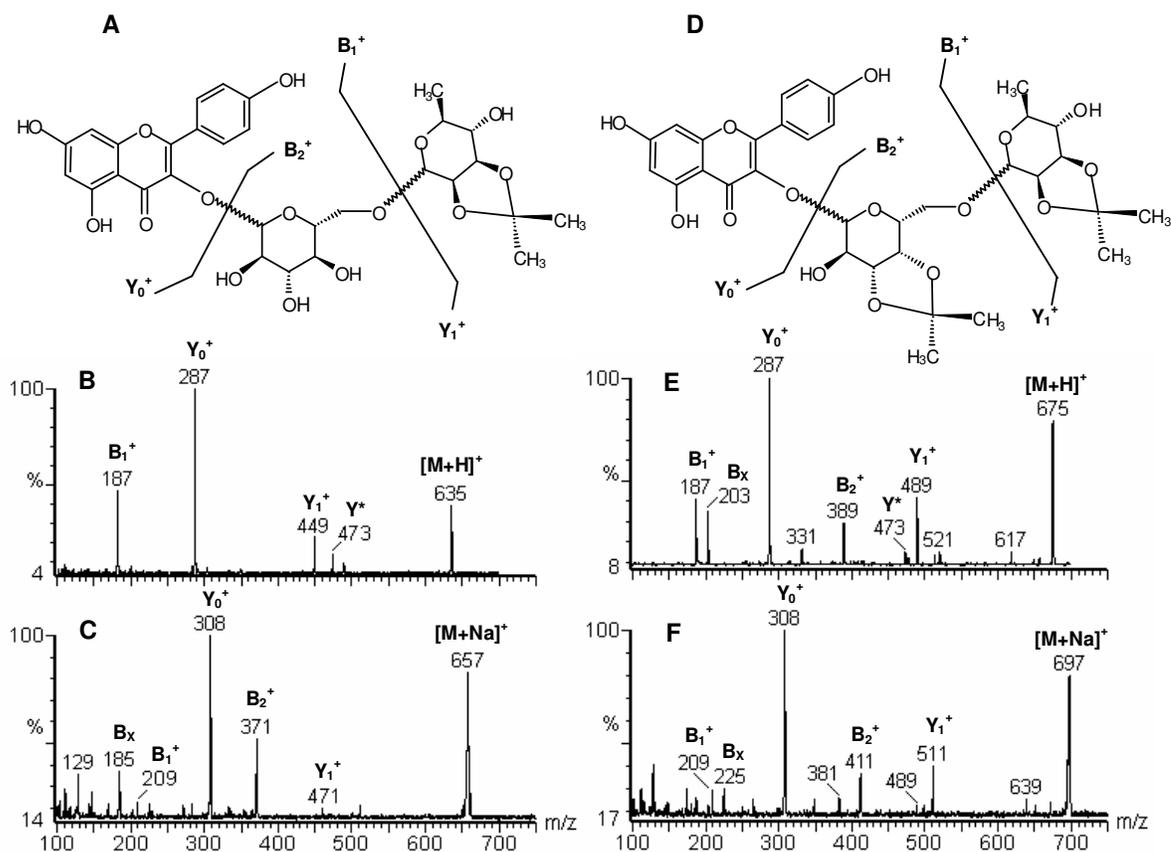
A isomeria apresentada pelos flavonóis glicosídeos de *M. ilicifolia* deve-se em grande parte à presença de galactose ou glucose ligada à aglicona. Os monossacarídeos galactose e glucose constituem-se de dois epímeros, contendo apenas a hidroxila 4 com configuração diferente (equatorial na glucose e axial na galactose). Esta diferença permite que ambos os monossacarídeos tenham propriedades de formação de derivados isopropilídenos diferentes através da acetalação, já que a posição mais favorável para que ocorra a acetalação é em hidroxilas vicinais com configuração *cis*, como em OH-3,4 da galactose. Contudo, quando não há substituição em C-6 da glucose, ocorre a acetalação nas posições OH-4,6, bem como na galactose.

Como forma de controle a derivatização foi realizada com a rutina, que contém uma unidade glucose com C-6 substituído por ramnose. Como era esperado, a reação foi positiva apenas para unidade de ramnose, e o ganho de massa foi de 40 m.u., gerando dois íons, um de  $m/z$  651  $[M+H]^+$ , e outro de  $m/z$  673  $[M+Na]^+$ . O rendimento da reação foi calculado em triplicata, através de quantificação por HPLC-UV-MS, o qual demonstrou que 95% da ramnose encontrava-se derivatizada.

Os principais flavonóis diglicosídeos de *M. ilicifolia*, apresentam cadeias de dissacarídeos, com galactose ou glucose ligadas à aglicona e substituídas em OH-2 ou OH-6 por unidades de ramnose (Figura 79 A e D). Através da acetalação, foi possível determinar a presença de rutina e do campferol-rutinosídeo, já que ambos apresentam glucose com substituição em OH-6, impedindo a formação de isopropilideno em OH-4,6, como observado no padrão. A análise de CID-MS confirmou a estrutura de ambos, através dos fragmentos protonados  $Y_1^+$ , de  $m/z$  449 (Figura 79 B) e 465, indicando a ligação de uma hexose não derivatizada (glucose) ao campferol e à quercetina, respectivamente, enquanto que a hexose na forma de isopropilideno rendeu fragmentos  $Y_1^+$  de  $m/z$  489 (Figura 79 E) e 505. Os fragmentos sodiados também mostraram a presença dos íons  $Y_1^+$  indicando a glucose não marcada ligada ao campferol ou à quercetina, mas confirmou isto principalmente pela presença dos fragmentos  $B_1^+$  e  $B_x$ , sendo possível confirmar que a unidade de

hexose em  $m/z$  185 para a não derivatizada (Figura 79 C), enquanto em  $m/z$  225 para hexose na forma e isopropilideno (Figura 79 F). Interessantemente, a fragmentação do íon precursor protonado gerou um íon de  $m/z$  187, compatível com o fragmento  $B_1^+$ , referente à ramnose isopropilideno, porém através da formação do íon oxônio (DELL, 1987; DOMON e COSTELLO, 1988), também ocorrendo no fragmento de  $m/z$  203, consistente com a Gal/Glc isopropilideno. Estes íons são decorrentes da formação de oxônio, os quais não apareceram nos glicosídeos não derivatizados.

**Figura 79** – Perfil de fragmentação por CID-MS de di-glicosídeos na forma de isopropilidenos

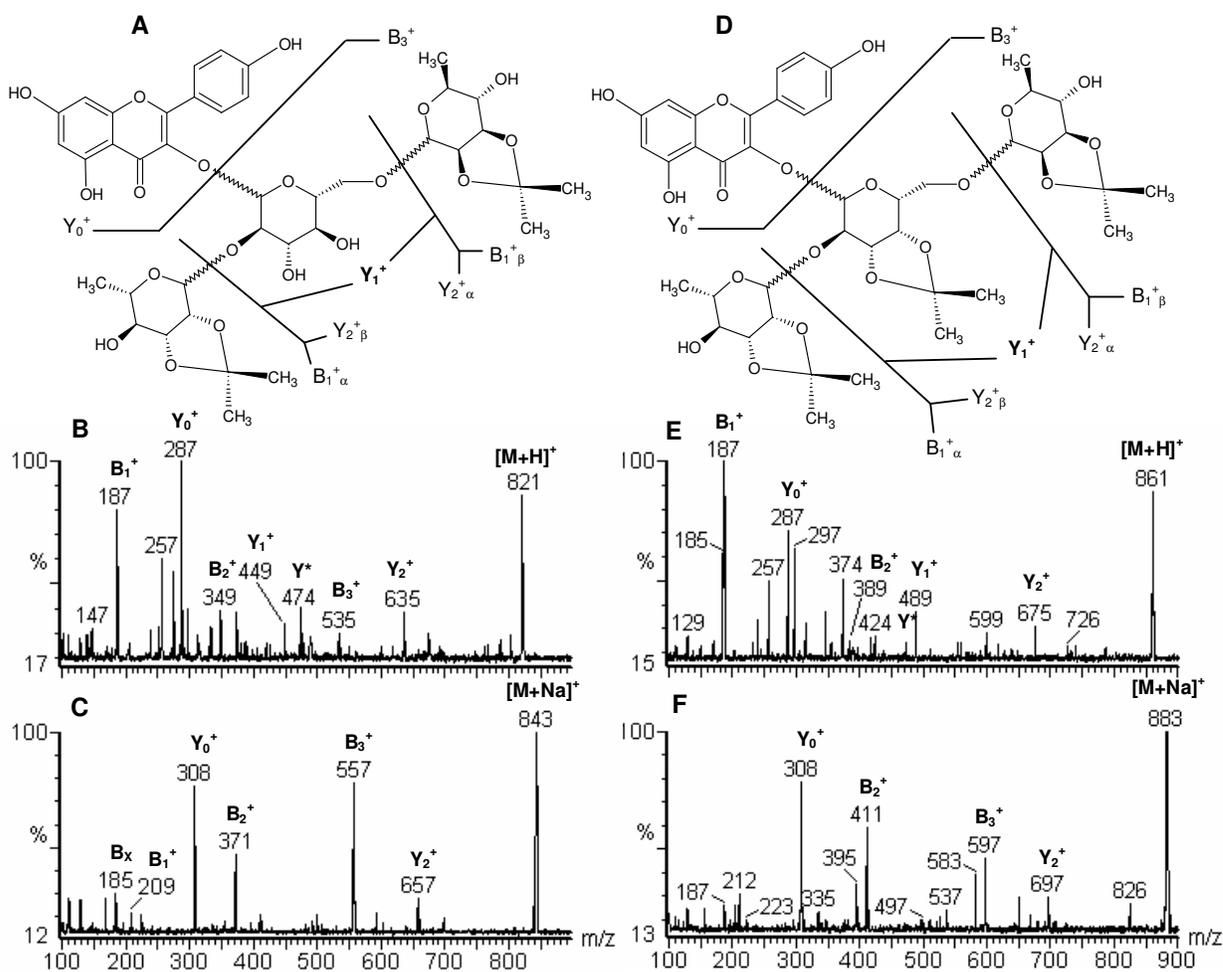


(A) Estrutura do campferol contendo ramnose ligada em O-6 da glucose, na qual não ocorre acetalação, como mostrado nos espectros de CID-MS (B e C). (D) Campferol contendo ramnose ligada em O-6 da galactose, na qual ocorre a formação de 2,3 isopropilideno, como mostrado nos espectros de CID-MS (E e F).

Se por um lado a técnica parece funcionar bem na identificação dos flavonóis rutinosídeos, por outro sua limitação foi encontrada na diferenciação dos glicosídeos contendo galactose substituída em O-2 ou O-6, já que o isopropilideno se forma nas hidroxilas 3 e 4, não permitindo sua distinção. Como os glicosídeos contendo glucose substituída apenas em O-2 também permitem a formação de derivado isopropilideno em OH-4,6, os três flavonóis diglicosídeos apareceram com as mesmas massas nas análises de ESI/CID-MS. Esta limitação pode ser superada através da derivatização seletiva da hidroxila 6, o que evitaria a formação de isopropilideno na glucose, e ainda permitiria distinguir entre os dois tipos de ligação interglicosídica apresentadas por estes glicosídeos.

Embora a técnica tenha apresentado limitações na determinação dos flavonóis diglicosídeos, os 4 principais tri-glicosídeos presentes em *M. ilicifolia* puderam ser perfeitamente distinguidos como galactosídeos e glucosídeos, já que em ambos os casos a hidroxila 6 estava bloqueada. Estes tri-glicosídeos também são formados por campferol e quercetina, e quando ligados à glucose (a qual esta substituída em O-2,6) tem um ganho de 80 m.u. decorrentes da acetalação das duas unidades de ramnose. Contudo quando a flavonol está ligado à galactose o ganho de massa passa para 120 m.u., decorrentes da acetalação das duas unidades de ramnose e da unidade de galactose. Assim foram observados íons referentes ao campferol di-ramnoglicosídeo com  $m/z$  821  $[M+H]^+$  e 843  $[M+Na]^+$ , com fragmentos  $Y_1^+$  indicando a glucose ligada ao campferol, com  $m/z$  449, e a galactose com  $m/z$  489, enquanto que o campferol di-ramnogalactosídeo apareceu com  $m/z$  861  $[M+H]^+$  e 883  $[M+Na]^+$ . Resultados similares foram obtidos para a quercetina di-ramnoglicosídeo com  $m/z$  837  $[M+H]^+$  e 859  $[M+Na]^+$  e quercetina di-ramnogalactosídeo com  $m/z$  877  $[M+H]^+$  e 899  $[M+Na]^+$ . (Figura 80 A-F)

**Figura 80** – Perfil de fragmentação por CID-MS de tri-glicosídeos na forma de isopropilidenos



(A) Estrutura do camferol contendo triglicosídeo contendo glicose, na qual não ocorre acetalação, como mostrado nos espectros de CID-MS (B e C). (D) Camferol triglicosídeo contendo galactose, na qual ocorre a formação de 2,3 isopropilideno, como mostrado nos espectros de CID-MS (E e F).

## 5. CONCLUSÕES

---

- Diversos tipos de biomoléculas de baixa massa molecular foram analisadas por espectrometria de massas, utilizando fonte do tipo *electrospray*, com analisador do tipo triplo-quadrupólo. As biomoléculas foram oligossacarídeos, lipídeos e flavonóides, especialmente flavonóis glicosídeos.
- A ionização pode ocorrer em modo positivo ou negativo dependendo das características do analito. Como oligossacarídeos neutros dificilmente formam íons em modo negativo, eles foram analisados em modo positivo, adicionando às amostras os adutores desejados. Foram testados sais de  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Foi determinado o  $\text{Li}^+$  foi o adutor que apresentou os melhores resultados, pois foi capaz de gerar mais fragmentos que os demais adutores.
- Diversos tipos de lipídeos puderam ser caracterizados por ESI-MS, tanto em modo positivo quanto em modo negativo. Em alguns casos, mesmo quando a análise em modo negativo era favorecida pela presença de grupos ácidos, como nos fosfolipídeos, foi possível realizar a análise em modo positivo através da suplementação no solvente de diluição da amostra com NaOH, para forçar a desprotonação do fosfato e conseqüente formação de sais de  $\text{Na}^+$ . Desta forma, fragmentos de moléculas que não formam íons em modo negativo podem ser observados em modo positivo.
- Um esfingolipídeo foi encontrado no extrato lipídico da cifomedusa *Phyllorhiza punctata*. Sua caracterização estrutural revelou um lipídeo com origem tipicamente de invertebrados marinhos. Ele foi identificado como ceramida aminoetilfosfonato através dos espectros de NMR e ESI-MS-MS.
- Dois tipos de glicolipídeos foram encontrados em *Maytenus ilicifolia*, um neutro analisado em modo positivo apresentou resultados compatíveis com a estrutura do digalactosildiácilglicerol (DGDG). O outro glicolipídeo foi encontrado por ionização em modo negativo, o que já sugeria a presença de um grupo negativamente carregado. Ele foi identificado como sulfoquinovosildiácilglicerol (SQDG), através de seu espectro de CID-MS. Embora ambos MGDG e SQDG não tenham sido analisados por outras técnicas para confirmação de seus monossacarídeos, eles estão entre os mais abundantes glicolipídeos vegetais,

sendo muito improvável que outros lipídeos apresentem resultados similares a ambos.

- Quatro principais fosfolipídeos foram encontrados em *Haloarcula marismortui*, uma arquea isolada do Mar Morto. Estes lipídeos foram arquetidilfosfato (aPA), arquetidilfosfoglicerol (aPG), arquetidilfosfoglicerosulfato (aPGS) e arquetidilfosfoglicerofosfato metil éster (aPGP-Me). Um lipídeo isóbaro ao aPGS já foi encontrado em *H. marismortui*, o arquetidilfosfoglicerofosfato (aPGP) (EVANS et al., 1980). Ambos são difíceis de serem diferenciados por análise de massa, pois apresentam fragmentação semelhante. Para diferenciá-los duas estratégias foram adotadas: 1) a troca de H por D, já que aPGP apresenta um sítio a mais que o aPGS para entrada de deutério, e com isso deveria ficar com 1 Da a mais; 2) pelo mesmo princípio, foi feita a troca de H<sup>+</sup> por Na<sup>+</sup> nos grupos ácidos, e com isso ganhar-se-ia 23 Da a mais no aPGP. Os resultados foram compatíveis apenas com a presença do aPGS.
- Diversos tipos flavonóides foram indentificados em folhas de *Maytenus ilicifolia*, como flavonóides livres do tipo flavan-3-ols, (epi)-catequina, (epi)-galocatequina e (epi)-afzelequina. Flavonóis livres foram identificados como campferol e quercetina. Todos eles foram analisados por CID-MS em modo positivo e negativo. Vários taninos condensados também foram identificados, principalmente por CID-MS em modo negativo, que forneceu melhor sensibilidade que o modo positivo. Foram identificados taninos de 2 a 7 unidades, os quais ainda apresentaram grande variabilidade na sua sequência, com pôde ser observado pelas análises de MS2, que indicaram a presença de mais de uma sequência possível para cada íon precursor analisado.
- *M. ilicifolia* também demonstrou a habilidade de sintetizar uma grande variabilidade de flavonóis glicosilados. Estes apresentaram-se compostos principalmente de campferol e quercetina como agliconas, mas em pequena quantidade também foi encontrada a miricetina. Os monossacarídeos encontrados foram galactose, glucose, ramnose e arabinose, formando estruturas variando de mono a tetra-glicosídeos. Os glicosídeos mais abundantes

no extrato foram os tri-glicosídeos compostos por duas unidades de ramnose ligadas a uma galactose, e esta ligada ao campferol ou à quercetina. Os flavonóis di-glicosídeos também foram encontrados em grande abundância, contendo ramnose ligada a galactose ou glucose.

- A posição na qual o monossacarídeo está ligado à aglicona, chamado de sítio de glicosilação, foi determinado através de razões específicas entre os fragmentos formados pela aglicona, que pode produzir íons regulares ou radicais em proporções que dependem do sítio de glicosilação. Outro método foi utilizado nas análises de HPLC-PDA, nas quais um reagente que causa deslocamento no espectro de UV foi adicionado pós-coluna. De acordo com os resultados obtidos tanto pela razão entre o íon radical e regular quanto pelo deslocamento no espectro de UV provocado por NaOH e AlCl<sub>3</sub>, indicaram que os flavonóis de *M. ilicifolia* apresentam-se glicosilados na posição O-3, e estes resultados estão de acordo com os já descritos na literatura.
- A presença de vários flavonóis contendo galactose ou glucose ligados à aglicona foram encontrados na maioria dos glicosídeos de *M. ilicifolia*, formando isômeros difíceis de serem identificados por ESI-MS. Para tentar resolver este problema, dois tipos de fracionamento foram realizados: 1) realizado em coluna de bancada preenchida com sílica-gel 60G, forneceu uma separação razoável, obtida em função do tamanho dos glicosídeos, como consequência do aumento da polaridade quanto maior o grau de glicosilação. Contudo não foi tão eficiente, não separando tetra-glicosídeos de tri-glicosídeos. 2) realizado em HPLC utilizando coluna de separação por exclusão estérica, onde além de separar os glicosídeos em função de seus tamanhos moleculares, ainda foi capaz de separar alguns isômeros. Esta cromatografia foi utilizada em primeira dimensão, e seu efluente coletado e re-injetado em uma coluna de fase reversa, na qual os glicosídeos foram identificados.
- A fim de identificar os isômeros de galactose e glucose em análise *off-line*, foi utilizada a acetalação dos glicosídeos. Esperava-se que com isso a galactose fosse marcada. Entretanto, quando o OH-6 da glucose estava livre a acetalação com acetona também ocorreu entre OH-4 e OH-6, impedindo a correta

identificação do glicosídeos. Mesmo assim foi possível identificar a rutina misturada com mais 3 isômeros. Também foi possível identificar o tri-glicosídeos, já que estes não apresentavam o OH-6 livre, e a acetalação ocorreu apenas na galactose e com isso foi obtido íons com 40 Da a mais para os glicosídeos contendo galactose em relação aos contendo glucose ligados à aglicona.

## **6. REFERÊNCIAS**

---

- ANDERSON, J. M. The molecular organization of chloroplast thylakoids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 416, p. 191-235, 1975.
- ARDREY, R. E., **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.
- ASTON, F. W. Isotopes and atomic weights. **Nature**, v. 107, p. 334-338, 1921
- ASTON, F. W. The constitution of atmospheric neon. **Phil. Mag.**, v. 39, p. 449-455, 1920.
- ASTON, F. W.. The mass-spectra of chemical elements. **Phil. Mag.**, v. 39, p. 611-625, 1920.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M. C. A. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and formation of nitric oxide. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 433-, 2007.
- BAIS, H. P.; WALKER, T. S.; STERMITZ, F. R.; HUFBAUER, R. A.; VIVANCO, J. M. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from Spotted Knapweed. **Plant Physiol.**, v. 128, p. 1173-1179, 2002.
- BARBER, M.; BORDOLI, R. S.; SEDGWICK, R. D.; TYLER, A. N., Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 325-327, 1981.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos **Quím. Nova**, v. 30, p. 409-414, 2007.
- BATE-SMITH, E. C. Luteoforol (3',4,4',5,7-pentahydroxyflavan) in *Sorghum vulgare* L.. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1803-1810, 1969.
- BATE-SMITH, E. C.; CREASSY, L.L. Luteoforol in strawberry leaves. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1811-1812, 1969.
- BENSON, A. A. The plant sulpholipid. **Adv. Lipid Res.**, v. 1, p. 387-394, 1963.
- BEUHLER, R. J.; FRIEDMAN, L. Low noise, high voltage secondary emission ion detector for polyatomic ions. **Int. J. Mass Spectrom. - Ion Phys.**, v. 23, p. 81-97, 1977.
- BILIA, A. R.; MORELLI I.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Flavans and A-type proanthocyanidins from *Prunus prostrata*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 887-892, 1996.
- BRUSH, P.; PERCIVAL, E. Glycolipids present in eight genera of the *Chlorophyceae*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1847-1849, 1972.
- BUDZIKIEWICZ, H.; GRIGSBY, R. D., Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 25, p. 146-157, 2006.
- CHAPMAN, D.; BARBER, J. Polar lipids of chloroplast membranes. **Meth. Enzymol.**, v. 148, p. 294-319, 1987.
- CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide

from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydr. Polym.**, v. 74, p. 274-278, 2008.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.** v. 131, p. 209-217, 1984.

CLEGG, G. A.; DOLE, M., Molecular beams of macroions. III. Zein and polyvinylpyrrolidone. **Biopolymers**, v. 10, p. 821-826, 1971.

CLEMMER D. E.; JARROLD M. F. Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules, **J. Mass Spectrom.**, v. 32, p. 577-592, 1997.

CLOWERS, B. H.; DWIVEDI, P.; STEINER, W. E.; HILL JR, H. H.; BENDIAK, B. Separation of sodiated isobaric disaccharides and trisaccharides using electrospray ionization-atmospheric pressure ion mobility-time of flight mass spectrometry **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v.16, p. 660-669, 2005.

COMISAROW, M. B.; MARSHALL A. G., Frequency-sweep Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. **Chem. Phys. Lett.**, v. 26, p. 489-490, 1974b.

COMISAROW, M. B.; MARSHALL A. G., Resolution-enhanced Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. **J. Chem. Phys.**, v. 62, p. 293, 1975.

COMISAROW, M. B.; MARSHALL, A. G. The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy. **J. Mass Spectrom.**, v. 31, p. 581-585, 1996.

COMISAROW, M. B.; MARSHALL, A. G., Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. **Chem. Phys. Lett.**, v. 25, p. 282-283, 1974a.

COOKS, R. G.; OUYANG Z.; TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M., Ambient mass spectrometry. **Science**, v. 311, p. 1566-1570, 2006.

COPLEN, T. B.; BÖHLKE, J. K.; de BIEVRE, P.; DING, T.; HOLDEN, N. E.; HOPPLE, J. A.; KROUSE, H. R.; LAMBERTY, A.; PEISER, H. S.; RÉVÉSZ, K.; RIEDER, S. E.; ROSMAN, K. J. R.; ROTH, E.; TAYLOR, P. D. P.; VOCKE JR, R. D.; XIAO, Y. K. Isotope-abundance variations of selected elements. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 1987-2017, 2002.

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. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, p. 364-372, 2005.

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

CUYCKENS, F.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E.; CLAEYS, M. Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 36, p. 1203-1210, 2001.

DASS, C., **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

- DAVIS, B. D.; BRODBELT, J. S. Determination of glycosylation site of flavonoid monoglycosides by metal complexation and tandem mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v.15 p. 1287-1299, 2004.
- DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J. C.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON G. Deglycosilation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. **FEBS Let.**, v. 436, p. 71-75, 1998.
- DELL, A. F.A.B.-Mass spectrometry of carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 45, p. 19-72, 1987
- DICKO, M. H.; GRUPPEN, H.; TRAORÉ, A. S.; Van BERKEL, W. J. H.; VORAGEN A. G. J. Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in *Sorghum* varieties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2581-2588, 2005.
- DITTMER, L. C.; LESTER, R. L. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. **J. Lipid Res.**, v. 15, p. 126-127, 1964.
- DMITRENOK, P. S.; EL'KIN, Y. N.; STEPANENKO L. S.; KRIVOSHCHKOVA, O. E. Fast-atom ionization mass spectra of some lichen metabolites. **Chem. Nat. Comp.**, v. 23, p. 249-250, 1987.
- DOLE, M.; MACK, L. L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R. C.; FERGUSON, L. D.; ALICE, M. B., Molecular beams of macroions, **J. Chem. Phys.**, v. 49, p. 2240-2249, 1968.
- DOMON, B.; COSTELLO, C. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconj. J.**, v. 5, p 397-409, 1988.
- DUCREY, B.; WOLFENDER, J. L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. **Phytochemistry**, v. 38, p. 129-137, 1995.
- DWIVEDI, P.; BENDIAK, B.; CLOWERS, B. H.; HILL JR, H. H. Rapid resolution of carbohydrate isomers by electrospray ionization ambient pressure ion mobility spectrometry-time-of-flight mass spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS) **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 18, p. 1163-1175, 2007.
- ELJARRAT, E.; BARCELO, D. Electron Impact and Chemical Ionization. In: Worsfold, P. J.; Townshend A.; Poole, C. F. (Eds), **Encyclopedia of Analytical Science**, 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier, Oxford, v. 5, p. 359-366, 2005
- ES-SAFI, N. E.; GUYOT, S.; DUCROT, P. H. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 6969-6977, 2006.
- ES-SAFI, N. E.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; DUCROT, P. H. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-*O*-glucosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-glucoside and luteolin 7-*O*-glucosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-glucoside. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 247, p. 93-100, 2005.
- ESTRADA, R.; STOLOWICH, N. M.; YAPPERT C. Influence of temperature on <sup>31</sup>P NMR chemical shifts of phospholipids and their metabolites I. In chloroform-methanol-water. **Anal. Biochem.**, v. 380, p. 41-50, 2008.

- EVANS R. W.; KUSHWAHA, S. C.; KATES, M. The lipids of *Halobacterium marismortui*, an extremely halophilic bacterium in the Dead Sea. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 619, p. 533-544, 1980.
- FAHY, E. SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL JR, A. H.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R. H.; RUSSELL, SEYAMA, D. W.; Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER F.; van MEER G.; VanNIEUWENHZE, M. S.; WHITE, S. H.; WITZTUM, J. L.; DENNIS, E. A. A comprehensive classification system for lipids. **J. Lipid Res.**, v. 46, p. 839-861, 2005.
- FERRANTE, G.; BRISSON, J. R.; PATEL G. B.; EKIEL, I.; SPROTT, G. D. Structures of minor ether lipids isolated from the acetoclastic methanogen, *Methanotheroxiphilium thermophilum* GP6. **J. Lipid Res.**, v. 30, p.1601-1609, 1989.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization – principles and practice. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 9, p. 37-70, 1990.
- 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, p. 64-71, 1989.
- FROST, D. J.; GUNSTONE F. D.. The PMR analysis of non-conjugated alkenoic and alkynoic acids and esters. **Chem. Phys. Lipids**, v. 15, p. 53-85, 1975.
- GIBSON, J. A. E.; MILLER, M. R.; DAVIES, N. W.; NEILL, G. P.; NICHOLS, D. S.; VOLKMAN, J. K. Unsaturated diether lipids in the psychrotrophic archaeon *Halorubrum lacusprofundi*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, p.19-26, 2005.
- GOHLKE, R. S. Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography, **Anal. Chem.**, v. 31, p. 535-541, 1959.
- GOUNARIS, K.; BARBER, J. Isolation and characterization of a photosystem II reaction center lipoprotein complex. **FEBS Lett.**, v. 188, p. 68-72, 1985.
- GRIFFITTS, J. S.; HASLAM, S. M., YANG, T.; GARCZYNSKI, S. F.; MULLOY, B.; MORRIS, H.; CREMER P. S.; DELL, A.; ADANG, M. J.; AROIAN, R. V. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, v. 307, p. 922-925, 2005.
- GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA I. I., J. H.; FULLER, R. W.; WEISLOW, O. W.; KISER, R. F.; SNADER, K. M.; PATTERSON, G. M. L.; BOYD, M. R. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 81, p. 1254-1258, 1989.
- GUTIÉRREZ, F.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; ASTUDILLO, L.; ZÁRATE R. Terpenoids from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1049-1052, 2007.
- HAKOMORI, S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulator for transmembrane signalling and mediators for cellular interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 18713-18716, 1990.
- HARWOOD, J. L. Environmental factors affecting lipid metabolism. **Prog. Lipid Res.**, v. 33, p. 193-202, 1994.
- HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass spectrometry basics**, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003;

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutrit. Biochem.**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HOFFMANN, E.; STROOBANT V., **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Third Edition 2007.

HOLLMAN, P. C.; de VRIES, J. H. M.; van LEEWEN, S. D.; MENGELERS, M. J. B.; KATAN, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1276-1282, 1995.

HÖLZL, G.; DÖRMANN, P. Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. **Prog. Lipid Res.**, v. 46, p. 225-243, 2007.

HUGHES, R. J.; CROLEY, T. R.; METCALFE, C. D.; MARCH, R. E. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 210/211, p. 371-385, 2001.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 38 p. 43-49, 2003.

IFA, D. R.; MANICKE, N. E.; DILL, A. L.; COOKS, R. G., Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry. **Science**, v. 321, p. 805, 2008.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught, A. D.; Wilkinson, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins

IZARD, T.; LAWRENCE, M. C.; MALBY, R. L.; LILLEY, G. G.; COLMAN, P. M. The three-dimensional structure of *N*-acetylneuraminidase from *Escherichia coli*. **Structure**, v. 2, p. 361-369, 1994.

JAMES A. T. Gas-liquid partition chromatography: the separation of volatile aliphatic amines and of the homologues of pyridine. **Biochem. J.**, v. 52, p. 242-247, 1952.

JAMES A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochem. J.**, v. 50, p. 679-690, 1952a.

JAMES A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of ammonia and the methylamines. **Biochem. J.**, v. 52, p. 238-242, 1952b.

JONES, G. J.; NICHOLS, P. D.; JOHNS, R. B.; SMITH, J. D. The effect of mercury and cadmium on the fatty acid and sterol composition of the marine diatoms *Asterionella glacialis*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1343-1348, 1987.

JUSTESEN, U. Negative atmospheric pressure chemical ionization low-energy collision activation mass spectrometry for the characterization of flavonoids in extracts of fresh herbs. **J. Chromatogr. A**, v. 902, p. 369-379, 2000.

KANDLER, O.; HOPF, H., Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Eds.). **The biochemistry of plants; a comprehensive treatise – Carbohydrates: structure and function**, New York: Academic Press, v. 3, p. 221-226, 1980.

- KARAS, M.; BACHMAN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **Int. J. Mass Spectrom.- Ion. Proc.**, v. 78, p. 53-68, 1987.
- KARAS, M.; HILLENKAMP, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, **Anal. Chem.**, v. 60, p. 2299-2301, 1988.
- KARIOTOGLOU, D. M.; MASTRONICOLIS, S. K. Sphingophosphonolipid molecular species from edible mollusks and a jellyfish. **Comp. Biochem. Phys. B**, v. 136, p. 27-44, 2003.
- KARIOTOGLOU, D. M.; MASTRONICOLIS, S. K. Sphingophosphonolipids, phospholipids, and fatty acids from Aegean jellyfish *Aurelia aurita*. **Lipids**, v. 36, p.1255-1264, 2001.
- KARLSSON, N. G.; SCHULZ, B. L.; PACKER, N. H. Structural determination of neutral O-linked oligosaccharide alditols by negative ion LC-electrospray-MS<sup>n</sup>. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 15, p. 659-672, 2004.
- KATAOKA, N.; MISAKI, A. Glycolipids isolated from *Spirulina maxima*: structure and fatty acid composition. **Agric. Biol. Chem.**, v. 47, p. 2349-2355, 1983.
- KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; McEWEN, C. N., **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide**. Academic Press, San Diego, CA., 1996.
- KLÖPPEL, K. D.; FREDRICKSON, H. L. Fast atom bombardment mass spectrometry as a rapid means of screening mixtures of ether-linked polar lipids from extremely halophilic archaeobacteria for the presence of novel chemical structures. **J. Chromatogr. B**, v. 562, p. 369-376, 1991.
- KOCHETKOV, N. K.; SMIRNOVA, G. P. Glycolipids of marine invertebrates. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 44, p. 387-438, 1986.
- LAWRENCE, E. O.; EDLEFSEN, N. E. On the production of high speed protons, **Science**, v. 72, p. 376-377, 1930.
- LEE, S.; WYTTEBACH, T.; BOWERS, M. T. Gas phase structures of sodiated oligosaccharides by ion mobility/ion chromatography methods. **Int. J. Mass Spectrom. - Ion Proc.**, v. 167/168, p. 605-614, 1997.
- LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 3796-3801, 2001.
- LI, H. J.; DEINZER, M. L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. **Anal. Chem.**, v. 79, p.1739-1748, 2007.
- MA, Y. L.; LI, Q.; van den HEUVEL, M. H.; CLAEYS M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v 11, p. 1357-1364, 1997.
- MACALADY, J. L.; VESTLING, M. M.; BAUMLER, D.; BOEKELHEIDE, N.; KASPAR; C. W.; BANFIELD, J. F. Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. **Extremophiles**, v. 8, p. 411-419, 2004.
- MACK, L. L.; KRALIK, P.; RHEUDE, A.; DOLE, M. Molecular beams of macroions. II. **J. Chem. Phys.**, v. 52, p. 4977-4986, 1970.

- MAEDA, N.; KOKAI, Y.; OHTANI, S.; HADA, T.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA Y. Inhibitory effects of preventive and curative orally administered spinach glycolipid fraction on the tumor growth of sarcoma and colon in mouse graft models. **Food Chem.** v. 112, p. 205-210, 2009.
- MANCUSO, C. A.; ODHAM, G.; WESTERDAHL, G.; REEVE, J. N.; WHITE, D. C. C15, C20, and C25 isoprenoid homologues in glycerol diether phospholipids of methanogenic archaeobacteria. **J. Lipid Res.**, v. 26, p. 1120-1125, 1985.
- MARAI, J. P. J.; DEAVOURS, B. E.; DIXON, R. A.; FERREIRA, D. The stereochemistry of flavonoids. In: GROTEWOLD E. (Ed.), **The Science of Flavonoids**. Springer: Ohio, USA, p. 1-46, 2006
- MARCH, R. E. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 32, p. 351-369, 1997.
- MARCH, R. E. Ion traps. In: mass spectrometry, In: Worsfold, P. J.; Townshend A.; Poole, C. F. (Eds), **Encyclopedia of Analytical Science**, Second Edition. Elsevier, Oxford, vol. 5, pp. 404-412, 2005.
- MARCH, R. E.; MIAO, X. S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 231, p. 157-167, 2004.
- MATSON, R. S.; MUSTOE, G. E.; CHANG, S. B. Mercury inhibition on lipid biosynthesis in freshwater algae. **Environ. Sci. Technol.**, v. 6, p. 158-160, 1972
- MATSUBARA, T.; TANAKA, N. I.; KAMEKURA, M.; MOLDOVEANU, N.; ISHIZUKA, I.; ONISHI, H.; HAYASHI, A.; KATES, M. Polar lipids of a non-alkaliphilic extremely halophilic archaeobacterium strain 172: a novel bis-sulfated glycolipid. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1214, p. 97-108, 1994.
- MATSUMOTO, M.; MATSUKAWA, N.; MINEO H.; CHIJI H.; HARA, H. A soluble flavonoid-glycoside,  $\alpha$ G-rutin, is absorbed as glycosides in the isolated gastric and intestinal mucosa. **Biosc. Biotech. Biochem.**, v. 68, p.1929-1934, 2004.
- McLAFFERTY, W. Mass spectrometric analysis. Molecular rearrangements. **Anal. Chem.**, v. 31, p 82-87, 1959.
- MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I.; KUMAR, M. S.; UNNIKRIISHNAN, M. K.; MOHAN, H. Effect of *O*-glycosylation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 2677-2685, 2003.
- MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J. A.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chem. Phys. Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.
- MORAVCOVÁ, J.; CAPKOVÁ, J.; STANEK, J. One-pot synthesis of 1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-xylofuranose. **Carbohydr. Res.**, v. 263, p. 61-66, 1994.
- MUNNIK, T. Phosphatidic acid: and emerging plant lipid second messenger. **Trends Plant Sci.**, v. 6, p. 227-233, 2001.
- MUNNIK, T.; IRVINE, R. F.; MUSGRAVE, A. Phospholipid signalling in plants. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1389, p. 222-272, 1988.

- MUNNIK, T.; MEIJER, H. J. G.; ter RIET, B.; FRANK, W.; BARTELS, D.; MUSGRAVE, A. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase-D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. **Plant J.**, v. 22, p. 147-154, 2000.
- MUNSON, M. S. B.; FIELD, F. H., Chemical ionization mass spectrometry. General introduction. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, p. 2621-2630, 1966.
- NAKHEL, I. C.; MASTRONICOLIS, S. K.; MEIMAROGLOU, S.M. Phospho- and phosphonlipids of the Aegean pelagic scyphomedusa *Pelagia noctiluca*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 958, p. 300-307, 1998.
- NIESSEN, W. M. A., Electrospray. In: WORSFOLD, P. J.; TOWNSHEND A.; POOLE, C. F. (Eds.), **Encyclopedia of Analytical Science**, Second Edition. Elsevier, Oxford, vol. 5, pp. 373-379, 2005.
- NYHOLM, P. G.; PASCHER, I. Orientation of the saccharide chains of glycolipids at the membrane surface. Conformational analysis of the glucose-ceramide and glucose-glyceride linkages using o molecular mechanics. **Biochemistry**, v. 32, p. 1225-1234, 1993.
- OHMORI, K.; OHRUI, H.; SUZUKI, K. First synthesis of astilbin, biologically active glycosyl flavonoid isolated from Chinese folk medicine. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, p. 5537-5541, 2000.
- OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T. Chemistry and biological activity of tannins in medicinal plants. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R. (Eds.), **Economic and medicinal plant research**, Academic Press, London, 1991, pp. 129-165.
- OREN, A.; GUREVICH, P.; GEMMELL, R. T.; TESKE, A. *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 747-754, 1995.
- PAOLETTI, L. C.; JOHNSON, K. D., Purification of preparative quantities of group B *Streptococcus* type III oligosaccharides. **J. Chromatogr.**, v. 705, p. 363-368, 1995.
- PIKULSKI, M.; BRODBELT, J. S. Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 14, p. 1437-1453, 2003.
- RAMESH, N.; VISWANATHAN, M. B.; SARASWATHY, A.; BRINDHA, P.; BALAKRISHNA, K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibacterial activity of luteoforol from *Bridelia crenulata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 409-411, 2001.
- RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v.104, p. 328-335, 2006.
- RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KAHKONEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, p. 3-12, 2000.
- RESHEF, V.; MIZRACHI, E.; MARETZKI, T.; SILBERSTEIN, C.; LOYA, S.; HIZI, A.; CARMELI, S. New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 1251-1260, 1997.

- SAJBIDOR, J. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 17, p. 87-103, 1997.
- SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; RATRELLI, L.; PIZZA, C. A Flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 237-239, 1998.
- SANTOS, S. C.; WATERMAN, P. G. Condensed tannins from *Myrica gale*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 610-612, 2000.
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Sulfonoglycolipids from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*: isolation, NMR, and ESI-MS approaches. **Glycobiology**, v. 11, p. 345-351, 2001b.
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Characterization of a *lyso*-galactolipid, C-2 or C-3 *O*-acyl trigalactosylglycerol isomers, obtained from the lichenized fungus *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 194, p. 155-158, 2001a.
- SASSAKI, G. L.; MACHADO, M. J.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*, **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 844-847, 1999.
- SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J., KOWALSKA T. (Eds.), **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Boca Raton, FL. CRC Press: 2008; p. 255-276.
- SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5308-5312, 2002.
- SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids. **Meth. Enzymol.**, v. 35, p. 396-425. 1975.
- SOARES, L. A.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 36, p. 787-790, 2004.
- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Organic Chemistry**, 7<sup>th</sup> Edition. John Wiley, New York, NY, 2000, cap. 22.
- SOMMER, H.; THOMAS, H. A.; HIPPLE, J. A. The measurement of  $e/m$  by cyclotron resonance. **Phys. Rev.**, v. 82, p. 697-702, 1951.
- SOUZA, L. M. **Estudo das biomoléculas encontradas na cifomedusa *Phyllorhiza punctata*: Isolamento e caracterização estrutural**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 34, p. 21-27, 1991.

- STAFFORD-JR, G. C.; KELLEY, P. E.; SYKA, J. E. P.; REYNOLDS, W. E.; TODD, J. F. J. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. **Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes**, v. 60, p. 85-98, 1984.
- STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J., **The oligosaccharides**. 1<sup>st</sup> Edition. Academic Press, New York, 567 pp, 1965.
- STIEHL, T.; RULLKÖTTER J.; NISSENBAUM, A. Molecular and isotopic characterization of lipids in cultured halophilic microorganisms from the Dead Sea and comparison with the sediment record of this hypersaline lake. **Org. Geochem.**, v. 36, p. 1242–1251, 2005.
- STOLL, D. R.; LI, X.; WANG, X.; CARR, P. W.; PORTER, S. E. G.; RUTAN, S. C. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1168, p. 3-43, 2007.
- SURMAN D. J.; VICKERMAN, J. C., Fast atom bombardment quadrupole mass spectrometry. **J. Chem. Soc. - Chem. Commun.**, p. 324-325, 1981.
- TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G., Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v. 306, p. 471-473, 2004.
- TANAKA, K.; WAKI H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA; Y.; YOSHIDA T.; MATSUO, T., Protein and polymer analysis up to  $m/z$  100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 2, p. 151-153, 1988.
- TAYLOR, G. Disintegration of water droplets in an electric field. **Proc. Roy. Soc. London. Ser. A**, v. 280, p. 383 - 397, 1964;
- TEER, D.; DOLE, M., Electrospray mass spectroscopy of macromolecule degradation in the electrospray. **J. Polym. Sci.**, v. 13, p. 985-995, 1975.
- TENCHOV, B.; VESCIO, E. M.; SPROTT, G. D.; ZEIDEL, M. L.; MATHAI, J. C. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 1016-1023, 2006.
- THOMSON, J. J.; ASTON, F. W, SODDY, F.; MERTON, T. R.; LINDEMANN, F. A. Discussion on isotopes. **Proc. Roy. Soc. London**, v. 99, p. 87-104, 1921.
- TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 846, p. 378-384, 2007.
- TODD, J.F.J. Ion trap mass spectrometer - past, present, and future (?) **Mass Spectrom. Rev.**, v. 10, p. 3-52, 1991.
- TOMER, K. B., The development of fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of biomolecules. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 8, p. 445-482, 1989.
- Van BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Widener University, Chester PA, 1998.

VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 403-406, 1999.

WANCZEK, K. P. Ion cyclotron resonance spectrometry - a review. **Int. J. Mass Spectrom. - Ion Proc.**, v. 60, p. 11-60, 1984.

WATANABE, Y.; NAKAJIMA, M.; HOSHINO, T.; JAYASIMHULU, K.; BROOKS, E. E.; KANESHIRO, E. S. A novel sphingophosphonolipid head group 1-hydroxy-2-aminoethyl phosphonate in *Bdellovibrio stolpii*. **Lipids**, v. 36, p. 513-519, 2001.

WOLFENDER, J. L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MS<sup>n</sup> for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analisis**, v. 28, p. 895-906, 2000.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WU, B.; TAKAHASHI, T.; KASHIWAGI, T.; TEBAYASHI, S. I.; KIM, C. S. New flavonoid glycosides from the leaves of *Solidago altissima*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, p. 815-816, 2007.

WU, C.; SIEMS, W. F.; ASBURY, G. R.; HILL JR, H. H. Electrospray ionization high-resolution ion mobility spectrometry-mass spectrometry, **Anal. Chem.**, v. 70, p. 4929-4938, 1998.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-KB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J. Clin. Investig.** v. 107, p. 135-142, 2001.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **J. Phys. Chem.**, 88: 4451-4459, 1984.

YANG, X.; SUN, Y.; XU, Q.; GUO, Z. Synthesis and immunosuppressive activity of L-rhamnopyranosyl flavonoids. **Org. Biomol. Chem.**, v. 4, p. 2483-2491, 2006.

YOSHIMURA, I.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; HUNECK, S. Analysis of secondary metabolites from Lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. **Phytochem. Anal.**, v. 5, p. 197-205, 1994.

**ANEXOS**

---

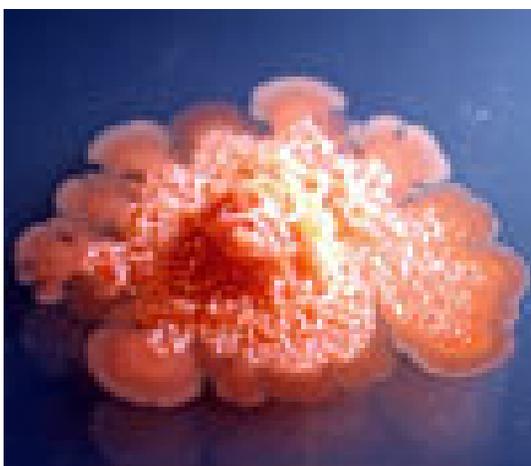
## Anexo I



*Phyllorhiza punctata* von Lendenfeld, 1884

Filo: Cnidária  
Classe: Scyphozoa  
Ordem: Rhizostomeae  
Família: Magistiidae

Fonte da imagem:  
[www2.bishopmuseum.org/HBS/invertguide/species\\_pdf/phyllorhizapunctata.pdf](http://www2.bishopmuseum.org/HBS/invertguide/species_pdf/phyllorhizapunctata.pdf)



*Haloarcula marismortui*

Super-reino: Archaea  
Filo: Euryarchaeota  
Classe: Halobacteria  
Ordem: Halobacteriales  
Família: Halobacteriaceae



*Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa)

Divisão: Angiospermae  
Classe: Dicotyledoneae  
Subclasse: Archichlamydeae  
Ordem: Celastrales  
Família: Celastraceae

Fonte da imagem:  
Thales R. Cipriani, Tese de doutorado

## Anexo II