

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

JOÃO PEDRO MOLINA GIL

**ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANOL 70% DAS
FOLHAS DE *SOLANUM LYCOCARPUM*
(SOLANACEAE)**

Araraquara

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

João Pedro Molina Gil

Estudo Químico do Extrato Etanol 70% das Folhas de *Solanum Lycocarpum*
(Solanaceae)

Orientadora: Lourdes Campaner dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título Bacharel em Química.

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

G463e Gil, João Pedro Molina
Estudo químico do extrato etanol 70% das folhas de
Solanum lycocarpum / João Pedro Molina Gil. –
Araraquara : [s.n.], 2019
77 f. : il.

Trabalho de conclusão (bacharelado) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos
Coorientador: Alexander Bárbaro Valerino-Díaz
Coorientador: Ana Caroline Zanatta Silva

1. Solanaceae. 2. Metabólitos. 3. Cromatografia líquida.
4. Flavonoides. 5. Saponinas. I. Título.

JOÃO PEDRO MOLINA GIL

ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANOL 70% DAS FOLHAS DE *SOLANUM*
LYCOCARPUM (SOLANACEAE)

Monografia apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Araraquara, 11 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Lourdes Campaner dos Santos (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



Prof^ª. Dr^ª. Angela Regina Araújo
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



Prof^ª. Dr^ª. Cintia Duarte Freitas Milagre
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: João Pedro Molina Gil

Registro Acadêmico (RA): 151140405

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Araraquara, SP

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Alessandra de Lima Peres e Everaldo Molina Gil

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Apresentação do trabalho intitulado "Estudo Químico do Extrato Etanol 70% das Folhas de *Solanum lycocarpum*" na primeira fase do XXX Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Apresentação do trabalho intitulado "Estudo Químico da fração aquosa do Extrato Etanol 70% das Folhas de *Solanum lycocarpum*" na primeira fase do XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Araraquara, 11/12/2019

Dedico este trabalho aos meus pais,
especialmente minha mãe pelo apoio moral e
aos amigos do Laboratório de Fitoquímica

AGRADECIMENTOS

Este é um trabalho realizado com esforço conjunto, portanto agradeço a diversas pessoas, primeiramente, meus pais Alessandra e Everaldo por todo o apoio e suporte proporcionado em momentos de dificuldade e por todo carinho. Especialmente minha mãe, que sempre me encorajou a seguir estudando, seguir meu coração e a fazer as coisas no meu tempo.

Agradeço à Prof^a Lourdes Campaner dos Santos pela confiança, e por abrir as portas de seu laboratório para desenvolver o projeto junto ao seu grupo de pesquisa, por todos os anos de ensinamento e por me ensinar o significado de perseverança e dedicação.

Ao Dr. Alexander e à Dr^a. Daylin, por seus ensinamentos, suporte e presença no laboratório para o decorrer correto do projeto, assim como a doutorando Ana Zanatta por me auxiliar na etapa final desse projeto.

Agradeço a todos os Pós- Graduandos e Graduandos do Laboratório de Fitoquímica, por proporcionar momentos de ensino e também momentos alegres no laboratório, obrigado Weslei Botero, Marcelo Amorim, Felipe Hilário, Alexander, Daylin, Ana, Thayna, Gabriela e Gisla.

Agradeço a minha família, especialmente minha falecida tia Eliana Molina Gil por sempre me incentivar a cursar química e por me levar em diversos vestibulares e meus avós Nelson e Margarida por todo amor, carinho e apoio que eles me deram.

Aos meus amigos de graduação pela amizade e convívio nos momentos cruciais do curso, assim como nos momentos felizes também.

Agradeço especialmente aos servidores do Instituto de Química, em especial ao Nivaldo, Lucinéia, João, Albertinho,

Por fim agradeço ao auxílio financeiro da FAPESP, da CAPES e da CNPq.

RESUMO

A família Solanaceae possui aproximadamente 3000 espécies, sendo o gênero *Solanum* o mais representativo com mais de 1500 espécies espalhadas pelo mundo e com alta importância econômica e farmacológica. São encontradas no Brasil mais de 500 espécies da família Solanaceae, sendo uma delas a *Solanum lycocarpum*. Apesar do grande número de estudos relacionados a essa espécie, a maior parte são direcionados ao estudo dos frutos e há poucos dados sobre as suas folhas, sendo necessária a identificação de seu perfil químico. Sendo assim, foi obtido o Ext EtOH 70% a partir das folhas de *Solanum lycocarpum* que foi submetido a um fracionamento por partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade: *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol, sendo a fração final chamada de aquosa. Foram realizados perfis por CCD e por HPLC-PDA para analisar as classes dos metabólitos no extrato e suas frações, nos quais foram evidenciados um perfil majoritário de flavonoides. Foi identificada a presença de rutina e quercetina na fração *n*-BuOH por coinjeção de padrões de flavonoides utilizando HPLC-PDA. Após isso, fracionou-se a fração *n*-BuOH por cromatografia de permeação em gel e a fração XIII obtida foi re-fracionada usando HPLC-PDA Semipreparativo a partir da qual foram obtidas 3 frações que foram analisadas por técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear. As frações **SL-4**, **SL_6 - 7** foram analisadas por RMN unidimensionais como ^1H , ^{13}C e TOCSY ^1D e bidimensionais como HSQC e HMBC, levando a identificação de flavonoides glicosilados, como: quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (**SL_4a**) e quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (**SL_4b**); kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (**SL_6**); kaempferol 3-O- β -D-glucopiranosídeo (**SL_7b**). Posteriormente, foi traçado um perfil da fração *n*-BuOH por LC-MS/MS no modo negativo com o intuito de anotar as substâncias comparando os espectros MS² com base de dados da literatura de metabólitos secundários do gênero *Solanum* e de espectrometrias de massas. Foram anotadas 17 substâncias, entre elas há 10 flavonoides derivados da quercetina e do kaempferol e 7 saponinas. Sendo assim, foi possível verificar um perfil de flavonoides no Ext EtOH 70% das folhas de *Solanum lycocarpum*, sendo que estes podem estar relacionados com as atividades descritas na medicina popular para esta planta.

ABSTRACT

The Solanaceae family has approximately 3000 species, the *Solanum* genus being the most representative with over 1500 species worldwide with high economic and pharmacological importance. More than 500 species of the Solanaceae family are found in Brazil, one of them being *Solanum lycocarpum*. Despite the large number of studies related to this species, most of them are directed to the study of fruits and there is not so much data on its leaves, requiring the identification of its chemical profile. Thus, 70% Ext EtOH was obtained from *Solanum lycocarpum* leaves which were subjected to fractionation by liquid-liquid partition with solvents in increasing order of polarity: n-hexane, ethyl acetate and n-butanol final fraction called aqueous. Profiles were performed by CCD and HPLC-PDA to analyze the metabolite classes, revealing a major profile of flavonoids. The presence of rutin and quercetin in the *n*-BuOH fraction was identified by co-injection of flavonoid using HPLC-PDA. After that, the *n*-BuOH fraction was fractionated by gel permeation chromatography and the fraction XIII obtained was re-fractionated using Semipreparative HPLC-PDA from which 3 fractions were obtained and analyzed by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic techniques. The SL-4, SL_6 - 7 fractions were analyzed by one-dimensional NMR as ¹H, ¹³C and TOCSY 1D and two-dimensional as HSQC and HMBC, leading to the identification of glucosylated flavonoids such as: quercetin-3-O-β-D-glucopiranosil-(6→1)-α-L-rhamnopyranoside (**SL_4a**) e quercetina-3-O-β-D-glucopiranosil-(2→1)-α-L-rhamnopyranoside (**SL_4b**); kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosil-(6→1)-α-L-rhamnopyranoside (**SL_6**); kaempferol 3-O-β-D-glucopiranoside (**SL_7b**). Subsequently, a negative-mode profile was plotted by LC-MS/MS with the *n*-BuOH fraction in order to annotate the substances comparing the MS² spectra with literature data from secondary metabolites of the *Solanum* genus and mass spectrometry database. Seventeen substances were noted, including 10 flavonoids derived from quercetin and kaempferol and 7 saponins. Thus, it was possible to verify a profile of flavonoids in Ext EtOH 70% of *Solanum lycocarpum* leaves, which may be related to the activities described in folk medicine for this plant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPLC-PDA	High-Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector
HPLC-IR	High-Performance Liquid Chromatography – Index Refraction
LC	Liquid Chromatography
ESI	Electrospray Ionization
MS	Mass Spectrometry
MS/MS or MS ²	Tandem Mass Spectrometry
LC-MSMS	Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
TOCSY ¹ D	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultravioleta
GPC	Gel Permeation Chromatography
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DMSO-d ₆	Deuterated Dimethyl Sulfoxide
SPE	Solid-Phase Extraction
RP18	Reversed Phase Octadecylsilane
Ext EtOH 70%	Extrato etanólico 70%
EtOH	Etanol
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
AcOEt	Acetato de Etila
Aq	Aquosa
TFA	Trifluor Acetic Acid
MeOH	Metanol
GPS	Global Positioning System
<i>m/z</i>	Relação massa-carga

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
°C	graus Celsius
Da	Dalton ou Unidade de Massa Atômica
δ	Deslocamento Químico
g	Gramma
h	Hora
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
L	Litro
m	Metro
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	Mililitro por minuto
nm	nanômetro
T	Tesla
v/v	Volume por volume
μL	microlitro
μm	micrômetro
%	porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folha, fruto e flor de <i>S. lycocarpum</i>	18
Figura 2 - Esqueleto dos flavonoides.	20
Figura 3 - Estrutura de alguns flavonoides.....	20
Figura 4 - Estrutura geral de um flavonoide, com os anéis A e B em destaque e seus sistemas benzoil e cinamoil.....	21
Figura 5 - Análise por CCD dos extratos etanol 70%, <i>n</i> -butanol, acetato de etila e hexano.	28
Figura 6 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA do extrato etanol 70% das folhas de <i>S. lycocarpum</i>	29
Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração <i>n</i> -butanol das folhas de <i>S. lycocarpum</i>	30
Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração acetato de etila das folhas de <i>S. lycocarpum</i>	31
4.2 Identificação de metabólitos por HPLC-PDA (Coinjeção de padrões).....	32
Figura 9 - Perfis cromatográficos do: A) extrato <i>n</i> -butanol branco, B) coinjeção da rutina no extrato <i>n</i> -BuOH, C) do padrão de rutina.....	33
Figura 10 - Perfis cromatográficos do: a) extrato <i>n</i> -butanol branco, b) extrato <i>n</i> -butanol com coinjeção de padrão de quercetina das folhas de <i>S. lycocarpum</i> , c) do padrão de quercetina.	34
4.3 Fracionamento da Fração <i>n</i> -BuOH	35
Figura 11 - Imagens da coluna durante a GPC em Sephadex LH-20. A imagem da esquerda representa 15 minutos após a injeção da amostra na coluna e a imagem da direita representa 3 horas após a injeção.....	36
Figura 12 - Análise por CCD das 129 frações obtidas após a cromatografia por permeação em gel em Sephadex LH-20. Fase Estacionária de sílica gel; Fase Móvel = CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (43:37:20, v/v/v), revelador: anisaldeído/H ₂ SO ₄	36
Figura 13 - Cromatograma por HPLC-PDA da fração XIII da fração <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>S. lycocarpum</i>	37
Figura 14 - Estruturas dos flavonoides em mistura na fração SL-4 da fração aquosa proveniente do extrato EtOH 70% das folhas de <i>S. lycocarpum</i>	40
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H da Fração SL-4 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	41
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H(DMSO-d ₆ , 600 MHz) – Região 4,10-5,70 ppm e 0,8-1,1 ppm)..	41
Figura 17 - Mapa de Contorno HSQC Fração SL-4 – (DMSO-D ₆ , 14,1 T).	42
Figura 18 - Mapa de Contorno HMBC da Fração SL-4 – (DMSO-D ₆ , 14,1 T).	42
Figura 19 - TOCSY 1D da fração SL_4 com irradiações em 5,24; 4,32; 4,41; 5,27; 0,98; 1,16.	43
Figura 20 - Espectro de massas (LC-MS/MS) da fração SL_4 . Coluna Luna [®] C ₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min ⁻¹	44
Figura 21 - Espectro de RMN ¹ H da substância SI_6 (14,1 T, DMSO-d ₆).	46
Figura 22 - Mapa de Contorno HSQC Fração SL_6 – (DMSO-D ₆ , 14,1 T).	47
Figura 23 - TOCSY 1D da fração SL_6 com irradiações em 5,31 e 1,06.....	47

Figura 24 - Espectro de massas MS/MS do íon m/z 593 referente à fração SL_6	48
Figura 25 - Estrutura da substância SL-6	49
Figura 26 - Estrutura da substância majoritária da fração SL_7	49
Figura 27 - Espectro de RMN ^1H da substância SL_7 (14,1 T, DMSO- d_6). Região estendida 5,0 - 8,5 Hz.....	50
Figura 28 - Mapa de Contorno HSQC Fração SL_7 (DMSO- D_6 , 14,1 T).	50
Figura 29 - TOCSY 1D da fração SL_7b com irradiação em 5,45.....	51
Figura 30 - Espectro de massas da fração SL_7 : a) MS/MS SL_7a m/z 593; b) MS/MS SL_7b 447..	52
Figura 31 - Perfil cromatográfico por LC/MS das frações obtidas a partir do extrato etanol 70% das folhas de <i>S. lycocarpum</i> : A) Fração <i>n</i> -BuOH; B) Fração III; C) Fração IV. Coluna Luna [®] (250 x 4.60 mm, 5 micron).....	54
Figura 32 - Padrão de fragmentação para moléculas <i>O</i> -glicosiladas com o rearranjo de hidrogênios.	55
Figura 33 - Padrão de fragmentação de flavonoides metoxilados desprotonados.	57
Figura 34 - Espectros de massas LC/MSMS obtidos para as substâncias da fração BuOH: 1) substância 1 ; 2) substância 2 ; 3) substância 3 ; 4) substância 4 ; 5) substância 5 ; 6) substância 6 ; 7) substância 7 ; 8) Substância 8 . Coluna Luna [®] C ₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min ⁻¹	61
Figura 35 - Espectros de massas obtidos da literatura relativos às substâncias 1 a 7	62
Figura 36 - Espectros de massas LC/MSMS obtidos para as substâncias da fração BuOH: 8) substância 8 ; 9) substância 9 ; 10) substância 10 . Coluna Luna [®] C ₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min ⁻¹	63
Figura 37 - Espectros de massas MS ² obtidos para as substâncias da fração <i>n</i> -BuOH: 11) substância 11 ; 12) substância 12 ; 13) substância 13 ; 14) substância 14 ; 15) substância 15 ; 16) substância 16 ; 17) substância 17 . Coluna Luna [®] C ₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min-1.....	67
Figura 38 - Estrutura moleculares dos compostos 11-17	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Junção das 129 frações obtidas (segunda linha) em 14 novas frações.....	36
Tabela 2 - Massas de cada fração obtidas pela cromatografia por permeação em gel.	37
Tabela 3 - Valores de massas obtidos para cada amostra da fração XIII.....	37
Tabela 4 - Valores de massas obtidos para as frações SL_4 , SL_5 , SL_6 e SL_7	38
Tabela 5 - Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C da mistura de flavonoides na fração SL-4 ..	44
Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C da mistura de flavonoides na fração SL-6	48
Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C da mistura de flavonoides na fração SL_7 ...	51
Tabela 8 - Substâncias anotadas com seus íons moleculares desprotonados, fragmentos e tempos de retenção.	60
Tabela 9 - Estruturas propostas para os compostos anotados 1-10 por LC-MS/MS da fração <i>n</i> -BuOH:	64

Sumário

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. Introdução	16
1.1 Família Solanaceae e gênero <i>Solanum</i>	16
1.2 <i>Solanum lycocarpum</i>	17
1.3 Flavonoides	19
2. Objetivos	22
Objetivo	22
Objetivos Específicos	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Equipamentos, materiais, reagentes e soluções	23
3.2 Etapa Botânica	24
3.2.1 Obtenção e identificação do material vegetal	24
3.2.2 Secagem e moagem	24
3.3 Etapa Química	24
3.3.1 Extração	24
3.3.2 Fracionamento do Extrato EtOH 70% por partição líquido-líquido	25
3.3.3 Obtenção do perfil químico utilizando HPLC-PDA	25
3.3.4 Identificação de metabólitos por HPLC-PDA (coinjeção de padrão)	25
3.3.5 Fracionamento da fração <i>n</i> -BuOH	26
3.3.6 Identificação por Ressonância Magnética Nuclear	26
3.3.7 Obtenção do perfil químico por LC-MS/MS	27
4. Resultados e Discussões	27
4.1 Determinação do perfil químico do extrato EtOH 70% por meio de HPLC-PDA e análise de espectros UV	28
4.2 Identificação de metabólitos por HPLC-PDA (Coinjeção de padrões)	32
4.3 Fracionamento da Fração <i>n</i> -BuOH	35
4.4 Identificações dos flavonoides da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>S. Lycocarpum</i> por RMN .	38
4.5 Estudos da Fração <i>n</i> -BuOH por LC-MS/MS	52
5. Conclusão	71
6. Referências	72

1. Introdução

As plantas sempre desempenharam um papel importante na história do homem por serem essenciais fontes de alimentos. Antigamente, o homem observava o comportamento dos animais ao se alimentar ou rejeitar uma espécie vegetal para aprender a distinguir quais plantas eram benéficas e quais eram prejudiciais à saúde. A busca por alívio de dores e cura de doenças em produtos naturais obtidos ao tomar um chá de ervas e folhas pode ter sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos naturais (FABREGA et al, 1975; KATZ; BALTZ, 2016).

Dentre os produtos naturais, temos os metabólitos primários que compreendem os aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e derivados fosforilados que são necessários para a manutenção da vida do organismo, sobrevivência e crescimento, sendo estes os produtos centrais de rotas metabólicas que ocorrem em quase toda célula animal e vegetal (FALKENBERG et al., 2003; NELSON; COX, 2011).

Como os organismos vegetais não podem se locomover, eles apresentam uma variada produção metabólica que exercem papel específico de adaptação e perpetuação da espécie no meio em que se encontra. Essas substâncias são os metabólitos secundários e suas classes e quantidades podem variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos, como o solo, pH, altitude, temperatura, fertilização, exposição à luz, entre outras. (SANTOS et al, 2003; CORDELL, 2011).

Na literatura existem muitas referências relacionadas com atividades biológicas de metabólitos secundários, associando o estudo químico e farmacêutico às propriedades de plantas, principalmente aquelas reportadas na medicina popular como medicinais, sendo, portanto, estas, necessárias para o desenvolvimento de novas drogas (HEINRICH, 2003; SILVA, 2007).

1.1 Família Solanaceae e gênero *Solanum*

A Família Solanaceae é formada por 98 gêneros que abrangem aproximadamente 3000 espécies espalhadas ao redor do mundo com maior incidência nas Américas do Sul e Central. As espécies dessa família são conhecidas pela sua grande gama de alcaloides que podem variar sua concentração de acordo com a espécie e o estresse sofrido (CRUZ, 1982; PEREIRA, 2018).

Dentro da família Solanaceae, o gênero *Solanum* é o mais amplo e abundante contendo mais de 1500 espécies. Existem aproximadamente 500 espécies da família Solanaceae divididas em 31 gêneros apenas no Brasil, sendo comumente encontrado no Nordeste (PEREIRA et al, 2018) e Centro-Oeste brasileiro (OLIVEIRA et al, 2004).

O gênero *Solanum* possui grande impacto econômico, principalmente por algumas espécies serem alimentos presentes no cotidiano da população, como a batata (*S. tuberosum*), tomate (*S. lycopersum*), berinjela (*S. melongena*) (VALERINO-DIAZ et al, 2018). Há também outros tipos de batatas com *flesh* de coloração roxa ou avermelhado com propriedades anti-inflamatórias devido a presença de antocianinas (REDDIVARI et al, 2018).

Plantas produzem metabólitos secundários para sua própria defesa, mas há estudos que indicam que algumas substâncias extraídas dos frutos e das folhas de diversas espécies possuem diversas atividades biológicas (PEREIRA et al, 2016).

São diversos os metabólitos secundários encontrados no gênero *Solanum*, como ácidos fenólicos, flavonoides, glicosídeos esteroidais, terpenos esteroidais, alcaloides, entre outros (CARVALHO et al, 2019; OLIVEIRA, 2009). O gênero *Solanum* também é conhecido pela sua alta toxicidade e por haverem relatos de caracterizar um perfil químico desse gênero de flavonoides, além disso, há diversos alcaloides, principalmente solamargina e solasonina que são encontrados em mais de 100 espécies do gênero (ANDERSON; COOPER; STEINHARTER, 1987; MUNARI et al 2012).

Diversos estudos *in vitro* reportaram que a solamargina pode combater diversas linhagens de câncer, como fígado, pulmões, mama, leucemia, de pele (*squamous*), próstata, osteosarcoma, *murine melanoma*, cólon intestinal, adenocarcinoma cervical e em células glioblastoma. A solamargina combate o câncer por causa de seus efeitos em diversas vias biológicas como: mitocondrial; de supressão tumoral; de ativação da *caspase*; de morte do receptor; inibição de proteínas quinases e/ou de mensageiros (KALALINIA; KARIMI-SANI, 2017).

Metabólitos encontrados em algumas espécies de *Solanum* como saponinas esteroidais e alcaloidais já foram estudadas e tiveram propriedades medicinais investigadas e comprovadas, como citotóxico (CHEN, 2019) antibacteriana e antifúngico (AKSHARA, 2016), antiviral (BALASUBRAMANIAM et al, 2007), anti-inflamatório e antioxidante (ALAWODE, 2017), hipertensão (BAHGAT et al, 2008), antialérgico (NIRMAL et al, 2012) e até mesmo no combate contra patógenos bucais (VALERINO-DIAZ, 2018).

1.2 *Solanum lycocarpum*

Solanum lycocarpum é uma espécie dentro do gênero *Solanum* que pode ser encontrada no Brasil na região do Cerrado (CLEMENTINO et al, 2018) e em diversas regiões do Nordeste, podendo aparecer em cerradões ou próximo de estradas. É comumente chamada de “jurubebão”, “fruta-do-lobo” e “lobeira” porque seus frutos servem de alimento para o lobo-

guará que ajuda a disseminar suas sementes (MUNARI et al, 2012). É um arbusto que pode atingir até 4m de altura que floresce e frutifica o ano inteiro. Suas flores são roxas e seus frutos são verdes (Figura 1) (OLIVEIRA, 2009).

Figura 1 - Folha, fruto e flor de *S. lycocarpum*.



Fonte: <https://bit.ly/2k8YIqI>

Os frutos da *S. lycocarpum* são usados na medicina popular para reduzir colesterol, controle de obesidade e tratar diabetes. Além disso, suas folhas são usadas como sedativos para o sistema nervoso contra epilepsia e espasmos e também para tratar dores estomacais e dos rins. As flores são utilizadas para formular xaropes expectorantes para ajudar os sintomas da gripe e também no tratamento de hemorroida e as raízes são usadas para tratar hepatite (DALL'AGNOL; VON POSER, 2000; MUNARI, 2012).

Foram isolados metabólicos secundários dos frutos de *S. lycocarpum* com atividade inibitória na elevação do nível de glicose em ratos laboratoriais, podendo ser utilizado para futuros tratamento de hiperglicemia. Esses metabólitos são a solamargina e solasonina, sendo estes muito frequentes em diversas espécies do gênero *Solanum* (YOSHIKAWA et al, 2007). Uma mistura de solamargina e solasonina extraída dos frutos e folhas da “lobeira” também revelou atividade leishmanicida no combate ao parasita *L. mexicana* resistente às drogas convencionais (LEZAMA-DÁVILA et al, 2016), sendo também utilizada no combate da esquistossomose (MIRANDA et al, 2011).

Além disso, compostos esteroidais também estão presentes nos extratos de *S. lycocarpum* e possuem atividades biológicas confirmadas, como a chaconina que possui atividade anti-malária (CHEN et al, 2010).

Outra característica dos extratos preparados a partir das folhas da “lobeira” é a atividade alelopática, onde ela afeta o crescimento de plantas ao seu redor. Oliveira (2004) verificou que a “lobeira” apresentava a inibição da germinação da semente do gergelim, assim como pode inibir o crescimento tanto das raízes, como do caule e das folhas do gergelim. No mesmo estudo, extratos metabólicos obtidos das folhas se mostraram como inibidores tanto na germinação

quanto no crescimento de partes aéreas ou radicalares de espécies alvo de tomate, cebola e alface (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA, 2012), podendo agir no controle de pragas na agricultura.

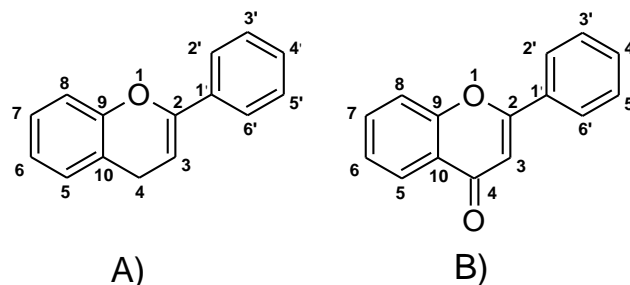
Costa e colaboradores (2015) já testaram as atividades anti-inflamatórias, antibacteriana, antioxidante e a citotoxicidade de um extrato das folhas de *S. lycocarpum* utilizando etanol como solvente extrator. Após particionar o extrato com hexano, diclorometano e acetato de etila, a fração restante ele denominou hidroalcoólica e esta última possui atividade anti-inflamatória e antioxidante especificamente. As outras frações demonstraram essas mesmas atividades além de atividades antibacteriana e alta citotoxicidade. Nesse mesmo estudo, foi reportada a presença de flavonoides nas folhas das plantas, sendo que as frações com maior conteúdo de flavonoides apresentaram maiores atividades antioxidante e anti-inflamatória.

1.3 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos produzidos pelas plantas e são metabólitos secundários relacionados com diversas atividades como na atração de polinizadores e crescimento de tubos polínicos, assim como disseminação de sementes. Também estão relacionados com pigmentação de flores, frutas, sementes e folhas e possuem papel importante na defesa da planta, pois são compostos que protegem contra radiação ultravioleta (UV) e contra agentes bióticos como herbívoros e patógenos. Além disso, a biossíntese de flavonoides está relacionada com o estresse sofrido pela planta por fatores abióticos, pois os flavonoides proporcionam maior tolerância a fatores de estresse como falta de recursos hídricos, alta incidência solar e resistência ao estresse oxidativo, pois esta classe de compostos é geralmente caracterizada pelo seu efeito antioxidante (MABRY, 1970; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

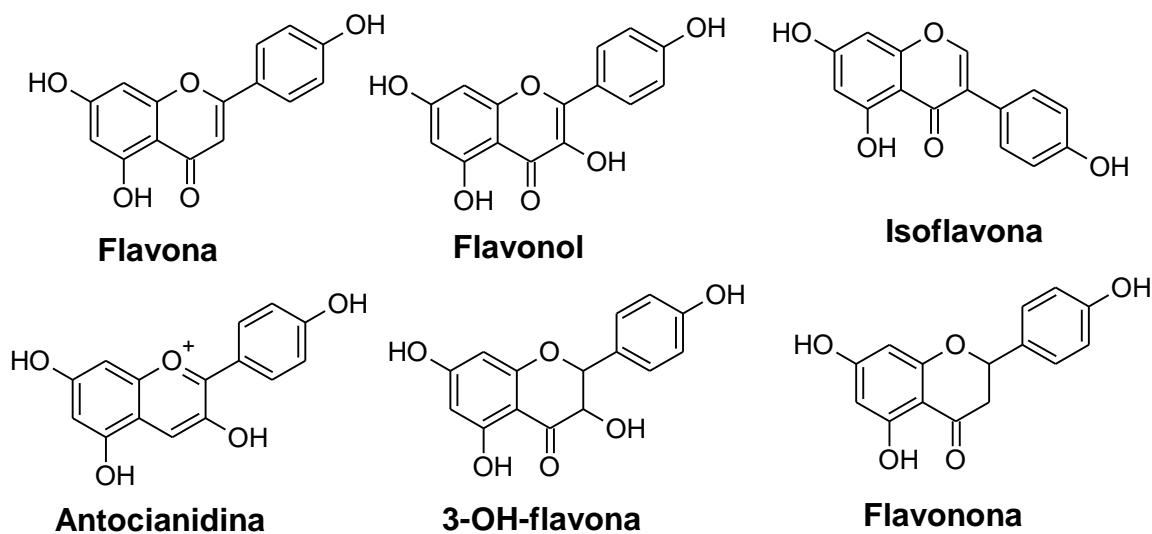
O núcleo dos flavonoides é chamado de aglicona que possui 15 átomos de carbono distribuídos entre três anéis fenólicos A, C e B com configuração C₆-C₃-C₆. Dentre os flavonoides, há outras classes como flavonóis, flavononas e isoflavonas que possuem uma carbonila no carbono C-4 (Figura 2.B-3) enquanto as antocianidinas (Figura 2.A-3) não possuem (MABRY, 1970; KACHLICKI et al, 2016).

Figura 2 - Esqueleto dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008.

Figura 3 - Estrutura de alguns flavonoides.



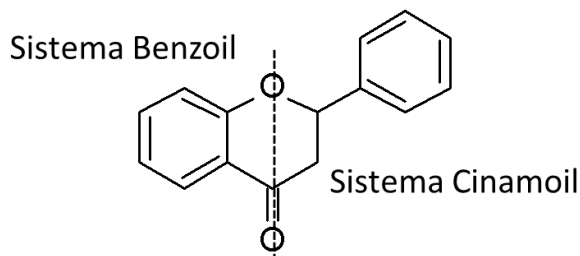
Fonte: Adaptado de KACHLICKI *et al*, 2016.

São conhecidos mais de 10000 compostos nessa classe encontrados em provavelmente quase todas as espécies de plantas. Durante a biossíntese dos flavonoides, diversas reações podem ocorrer para diferenciar as substâncias como reações de hidroxilação, metilação, acetilação, amidação, esterificação, dimerização ou polimerização, *O*-glicosilação ou *C*-glicosilação (KACHLICKI *et al*, 2016). Todas essas mudanças estruturais alteram as propriedades físico-químicas das moléculas, assim como sua solubilidade e toxicidade.

Por conta da estrutura das agliconas dos flavonoides, estes apresentam duas bandas de absorção do espectro eletromagnético na região visível correspondentes aos dois sistemas aromáticos presentes em agliconas, sendo que a banda II, com máximo na faixa espectral de 240-290 nm, é atribuída ao anel A do flavonoide que possui o sistema benzoil com menor extensão da conjugação eletrônica. Enquanto a banda I apresenta máximo na faixa espectral de 300-390 nm atribuída ao anel B que possui o sistema cinamoil com maior extensão das ligações conjugadas (Figura 4). Quanto maior a extensão da conjugação eletrônica, menor será a energia

absorvida pelo sistema e, portanto, maior será o comprimento de onda absorvido (HUBER; RODRIGUES-AMAYA, 2008; MERKEN; BEECHER, 2000).

Figura 4 - Estrutura geral de um flavonoide, com os anéis A e B em destaque e seus sistemas benzoil e cinamoil.



Fonte: Adaptado de HIRUMA-LIMA et al, 2017.

Análises por UV de flavonoides podem revelar diversas informações sobre a natureza do flavonoide, ou seja, sua subclasse e o seu grau de oxigenação que podem ser determinados pela posição e intensidade relativa dos máximos de absorção. As variações nas faixas de absorção irão depender do número de hidroxilas e do grau de substituição destas. Alterações na absorção da banda II correspondem a diferentes substituições causadas no anel A enquanto as alterações nos anéis B e C tendem a modificar a absorção da Banda I. Deslocamentos batocrômicos são causados por hidroxilações adicionais nos anéis que alteram o máximo de absorção da banda para maiores comprimentos de ondas, enquanto deslocamentos hipsocrômicos, que deslocam o máximo de absorção para comprimentos de ondas menores, são causados por metilações ou glicosilação nos anéis (MARKHAM, 1982; ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Devido à alta diversidade de flavonoides (mais de 10000 compostos), não é surpreendente que estes apresentem atividades biológicas confirmadas como: combate à parasitas da leishmaniose resistentes às drogas convencionais pela rutina (CHAUHAN et al, 2018); usar quercetina para reduzir os teores totais de colesterol, de triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), assim como o aumento de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (TORRES-PIEDRA et al, 2010), e também estão relacionados com redução de doenças cardiovasculares (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), além das suas atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antifúngica (KANDASWAMI et al, 2005; MIDDLETON, 1998). A atividade antioxidante dos flavonoides pode estar relacionada com sua capacidade de reduzir as chances de obter câncer por espécies oxidativas como as espécies reativas de oxigênio (ERO's) ou por lipídeos oxidados.

Shukla e Gupta (2010) realizaram um levantamento bibliográfico que mostrava a atividade da apigenina, quercetina e kaempferol no combate da leucemia, câncer cervical, neuroblastoma e alguns carcinomas de cólon humano em testes *in vitro*. Já em testes *in vivo*, foram avaliados em ratos laboratoriais o combate à certas linhagens de câncer mamário, nos pulmões, ovário, próstata, de pele e fornecem também proteção hepática e gástrica.

Algumas das atividades medicinais reportadas na medicina popular para a *Solanum lycocarpum* podem ocorrer devido à presença de flavonoides, portanto faz-se necessário o conhecimento da composição química do extrato etanol 70%, pois a população consome o chá de suas folhas e também as utilizam em bebidas alcoólicas sem o devido conhecimento científico validado. O estudo de flavonoides nesse extrato poderá fornecer dados fundamentais para formar um perfil químico de seus compostos, possibilitando uma maior compreensão sobre os efeitos medicinais de *Solanum lycocarpum*.

2. Objetivos

Objetivo

Contribuir para o conhecimento da composição química do extrato etanol 70% das folhas de *Solanum lycocarpum*.

Objetivos Específicos

- Preparar o extrato etanol 70% das folhas de *S. lycocarpum* por percolação;
- Realizar a partição do extrato etanol 70% com solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e *n*-butanol) sendo a fração final correspondente à aquosa;
- Utilizar técnica de CCDC para análise das frações obtidas;
- Traçar o perfil químico do extrato e das frações por HPLC-PDA;
- Identificar as classes dos compostos através dos espectros de absorção no UV;
- Analisar o extrato por coinjeção de padrões de flavonoides para identificação;
- Fracionar a fração *n*-butanol utilizando cromatografia por permeação em gel (GPC) Sephadex[®] LH-20;
- Purificar por HPLC Semipreparativo as frações obtidas por GPC;
- Identificar os metabólitos secundários por técnicas espectroscópicas como RMN mono e bidimensionais;
- Realizar um perfil químico da fração *n*-butanol por LC-MS/MS;

-Anotar as substâncias utilizando base de dados de metabólitos e base de dados de espectrometrias de massas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Equipamentos, materiais, reagentes e soluções.

Os procedimentos experimentais, como CCDC, foram realizados utilizando solventes grau PA: acetato de etila, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, metanol, *n*-propanol (Synthlab[®]); as análises em HPLC utilizaram solventes grau HPLC: metanol e ácido trifluoracético (Tedia Company Inc.) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]); as análises de espectrometria de massas utilizaram solventes grau LC/MS: metanol (Merck[®]) e para as análises em RMN dos compostos isolados nos procedimentos cromatográficos foi utilizado solvente deuterado DMSO-d₆ (Aldrich[®]). As análises de co-injeção utilizaram padrões Sigma-Aldrich[®] de flavonoides, como quercetina, miricetina, luteolina e rutina (pureza 99,5 %).

O extrato etanol 70% foi concentrado em um evaporador rotativo Heidolph[®] Laborota 4000, com bomba a vácuo (Heidolph[®], Rotavac valve control). Os extratos foram evaporados em temperatura menor que 40 °C e o extrato aquoso foi liofilizado (Savant[®] Micro Modulyo com bomba Weich[®] B917). Os extratos foram transferidos para vidros tarados (balança - Sartorius[®] - com capacidade para 200g e precisão de 0,0001 g).

A cromatografia em camada delgada de fase normal utilizou-se placas comerciais de sílica gel 60 (Sigma Aldrich[®] e Merck[®]), de tamanho 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente. As placas foram eluídas em cubas saturadas com os sistemas HCCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20, *v/v/v*, fase orgânica), *n*-butanol:CH₃COOH:H₂O (65:25:15, *v/v/v*) e CHCl₃:MeOH:H₂O (80:18:2, *v/v/v*). Para análise dos resultados, foram utilizados agentes reveladores como anisaldeído/H₂SO₄ e luz ultravioleta (Câmara com luz UV 254 nm - Chromatovue[®]).

As amostras foram preparadas em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa a base de octadecilsilano (RP18) com 500 mg 6 mL⁻¹ (33 µm, Supelco[®]). A obtenção dos perfis cromatográficos foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo CD 2065 Plus (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos (HPLC-PDA), modelo MD-2010 (Jasco[®]) e a um injetor automático modelo MD-2018 Plus (Jasco[®]), com uma bomba quaternária modelo PU-2089s Plus, um forno de coluna CO-2065 Plus e uma coluna de fase

reversa C₁₈, Luna[®] (250 x 4.60 mm, 5 micron). O software *ChromNav* 1.18.03 foi utilizado para controle, coleta e processamento dos dados.

Para obtenção do perfil LC/MSMS foi utilizado um HPLC Shimadzu[®] Prominence com duas bombas LC-20AD, desgaseificador de fase móvel DGU-20A3R, amostrador automático SIL-20AHT, forno para colunas CTO-20^a e detector de arranjo de diodos SPD-M20A acoplado a um espectrômetro de massas Bruker[®] Amazon com fonte de ionização por eletrospray com configuração ESI-IT-MS. Para processar os dados, foi utilizado o *software Data Analysis Bruker Daltonik GmbH* (versão 4.3).

3.2 Etapa Botânica

3.2.1 Obtenção e identificação do material vegetal

A coleta e a identificação do material vegetal de *Solanum lycocarpum* foram realizadas pelo Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva da Universidade Federal de Alfenas MG na Fazenda Ponte Alta no município de Alfenas-MG, com determinação do GPS (S 21° 25' 13" e O 45° 52' 20"). Elevação: 836 m). Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas (Departamento de Botânica) com voucher UALF 190. Esta espécie possui número de cadastro **A36F405 no SISGEN**.

3.2.2 Secagem e moagem

As folhas das espécies vegetais previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45 °C durante 7 dias, sendo este o tempo necessário para uma secagem completa e homogênea.

O material, após secagem, foi moído em moinho de facas. O pó obtido foi armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados.

3.3 Etapa Química

3.3.1 Extração

Para obtenção do extrato EtOH 70% das folhas de *S. lycocarpum*, 267,4 g do pó foi intumescida com EtOH:H₂O (7:3, v/v) durante 24 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + EtOH 70%), com altura de enchimento de 5:1 (percolador: pó da espécie) sendo a vazão do solvente de 1,0-2,0 mL/min/Kg.

O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida em temperatura inferior a 40 °C. O extrato concentrado foi transferido para vidro tarado e deixado em capela até completa eliminação do solvente. A massa obtida está no item **4**.

3.3.2 Fracionamento do Extrato EtOH 70% por partição líquido-líquido

Utilizando 19,9 g do extrato etanólico 70% obtido na percolação, foram realizadas três partições múltiplas com 330 mL de cada solvente em ordem crescente de polaridade: *n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol. As frações obtidas passaram pelo processo de rotaevaporação/liofilização para facilitar o manuseio, armazenamento e aumentar a proteção contra fatores externos, como fungos. As massas obtidas para cada fração estão disponíveis no item 4.

3.3.3 Obtenção do perfil químico utilizando HPLC-PDA

Para obter o perfil químico foi feito o *clean-up* das frações obtidas, utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE) a base de octadecilsilano (RP18). Os cartuchos foram ativados usando 4 mL de MeOH e ambientados em solução MeOH:H₂O (7:3, *v/v*).

Foram preparadas soluções de 10 mg.mL⁻¹ do extrato EtOH 70% e 5 e 10 mg.mL⁻¹ das frações AcOEt e *n*-BuOH para serem injetadas no cartucho após sua ativação, eluídas com solução MeOH:H₂O (7:3, *v/v*) e filtradas em filtro Simplepure® PTFE de 0,22 µm.

Após isso, o extrato e as frações nas concentrações citadas acima foram analisados em HPLC-PDA analítico (modelo CD 2065 Plus Jasco®) em volume de 15 µL para obtenção do perfil cromatográfico em método 5-100% B (MeOH) em 60 min, com vazão de 1 mL.min⁻¹ em coluna Thermo® (250 x 4.60 mm, 5 micron), sendo H₂O o solvente A. Os picos mais representativos nos cromatogramas foram selecionados e seus espectros no UV foram analisados e comparados com a literatura (MABRY, 1980). Os extratos e frações foram também analisados em Coluna Luna® (250 x 4.60 mm, 5 micron) utilizando o mesmo método acima mencionado.

3.3.4 Identificação de metabólitos por HPLC-PDA (coinjeção de padrão)

Uma amostra foi preparada a partir da fração butanólica com concentração de 5 mg.mL⁻¹ (78,7 mg em 15,8 mL) e foram separadas 5 alíquotas de 1,5 mL. Para as análises de coinjeção foram utilizados padrões Sigma-Aldrich® de flavonoides (quercetina, miricetina, luteolina e rutina, com pureza 99,8 %) que foram solubilizados em MeOH:H₂O (7:3 *v/v*) grau HPLC (0,5 mg.mL⁻¹). Adicionou-se separadamente a estas alíquotas um volume de 10 µL das soluções preparadas com os padrões, sendo a quinta alíquota o branco comparativo sem adição de padrão.

As 5 soluções foram injetadas em HPLC-PDA analítico com volume de 15 µL para obtenção do perfil cromatográfico utilizando um método gradiente de eluição de 5-100% MeOH (B) em 60 min, com vazão de 1 mL.min⁻¹ em coluna Luna® (250 x 4.60 mm, 5 micron).

As soluções com os padrões também foram injetadas no mesmo método para análise comparativa com o branco e com o cromatograma da solução com padrão.

3.3.5 Fracionamento da fração *n*-BuOH

A fração *n*-butanol (3,0 g) foi solubilizada em 9,0 mL de solução EtOH:H₂O em proporção 7:3 (v/v), com auxílio de ultrassom, para ser fracionada utilizando cromatografia de permeação em gel (GPC) em uma coluna de vidro de 90 cm x 3 cm (d.i.), empacotada com Sephadex LH-20 (Pharmacia[®]). O solvente foi bombeado na coluna por uma bomba peristáltica (Pharmacia[®]) modelo P1 18-1110-91 a uma vazão de 2 mL.min⁻¹. As frações foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]).

As frações foram analisadas por CCDC usando como sistema de solvente de fase móvel uma solução de clorofórmio:metanol:água (HCCl₃:MeOH:H₂O, 43:37:20, v/v/v). Estas frações foram reveladas sob luz UV e com anisaldeído sulfúrico e, posteriormente, reunidas de acordo com a coloração e o valor do R_f por CCDC.

A fração XIII descrita no item 4.3 foi selecionada para ser fracionada novamente utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Semi-Preparativo modelo LC 2086 Plus Jasco[®] NET II/ADC, acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 Jasco[®] plus multiwavelength, com uma bomba modelo Jasco[®] plus 2086 Intelligent Preparative Pump, misturador modelo Jasco[®] Mx-2086-32 Dynamic mixer, a coluna utilizada foi a Hypersil Gold C18 Thermo[®] (5 μ, 250 mm x 30 mm).

A amostra fracionada em HPLC-PDA Semi-preparativo foi preparada em concentração de 10 mg.100 μL⁻¹.

3.3.6 Identificação por Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN unidimensional: ¹H e ¹³C e bidimensional: ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC e TOCSY 1D foram realizadas em espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear Bruker[®] Avance III HD 600 (14,1 Tesla) Triple Inverse TCI Cryo-probehead com sonda criogênica de 5mm com detecção inversa, bobina de gradiente em z (50 G/cm), sistema ATMA para três canais (¹H, ²H e ¹³C), trocador automático SampleXpress, sistema de sintonia automática ATMA e de controle de temperatura BSVT atuando de 0 a 50 °C. Os compostos de interesse foram dissolvidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆ (Aldrich)). O *software* MestReNova versão 6.0.2 (Mestrelab Research L.S[®]) foi utilizado na aquisição dos deslocamentos químicos e interpretação de cada espectro.

3.3.7 Obtenção do perfil químico por LC-MS/MS

O extrato EtOH 70% e a fração *n*-BuOH, assim como algumas amostras de interesse purificadas a partir da fração *n*-BuOH foram analisadas por LC-MS/MS utilizando um HPLC Shimadzu® Prominence com detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e acoplado a um espectrômetro de massas Bruker® Amazon com fonte de ionização por eletrospray com configuração ESI-IT-MS. Todas as amostras foram preparadas em concentração de 1 mg.mL⁻¹ e analisadas por um gradiente linear como método de eluição com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (B), de 5 a 100% (B) em 45 min com vazão de 1 mL.min⁻¹ utilizando coluna Luna® (250 x 4.60 mm, 5 µm).

As seguintes condições foram empregadas: tensão capilar 4,5 kV; temperatura capilar de 300 °C; tensão *offset* da placa de extremidade de 500 V; pressão do gás nebulizador 50 psi (3,45 bar), gás secante (He) 10 L.min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos no modo negativo na região de *m/z* 50-1500 e processados no *software Data Analysis Bruker Daltonik GmbH* (versão 4.3). Para a identificação e proposta estrutural dos compostos detectados foi utilizada uma biblioteca de metabólitos secundários e uma base de dados de referência online (KNApSAcK Core System, MoNA, HMDB e SciFinder®).

4. Resultados e Discussões

A extração por percolação do extrato etanol 70% (EtOH 70%) utilizou 267,4 g de folhas de *S. lycocarpum*, fornecendo 47,1 g de extrato EtOH 70% com rendimento de 17,6%. Utilizando 19,9 g deste extrato, realizou-se o fracionamento por partição líquido-líquido e foram obtidos as frações hexano (Hex; 1,0 g, 5,4 %), acetato de etila (AcOEt; 4,0 g, 20,4%), *n*-butanol (*n*-BuOH; 9,3g, 47,1%) e a fração restante foi denominada de aquosa (Aq). Todas as 4 frações passaram pelo processo de rotaevaporação ou liofilização para facilitar o manuseio, armazenamento e aumentar a proteção contra fatores externos, como fungos, porém mesmo após liofilização, a fração aquosa continuou retendo água, pois a massa obtida para essa fração foram 27 g.

O extrato e suas frações foram analisados por CCD com a função de identificar quais classes de metabólitos estavam presentes em cada fração. A Figura 5 apresenta o perfil por CCD realizada com os extratos obtidos.

Figura 5 - Análise por CCD dos extratos etanol 70%, *n*-butanol, acetato de etila e hexano.



Fase Estacionária = sílica gel; Fase Móvel = CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20, v/v/v), revelador: anisaldeído/H₂SO₄.

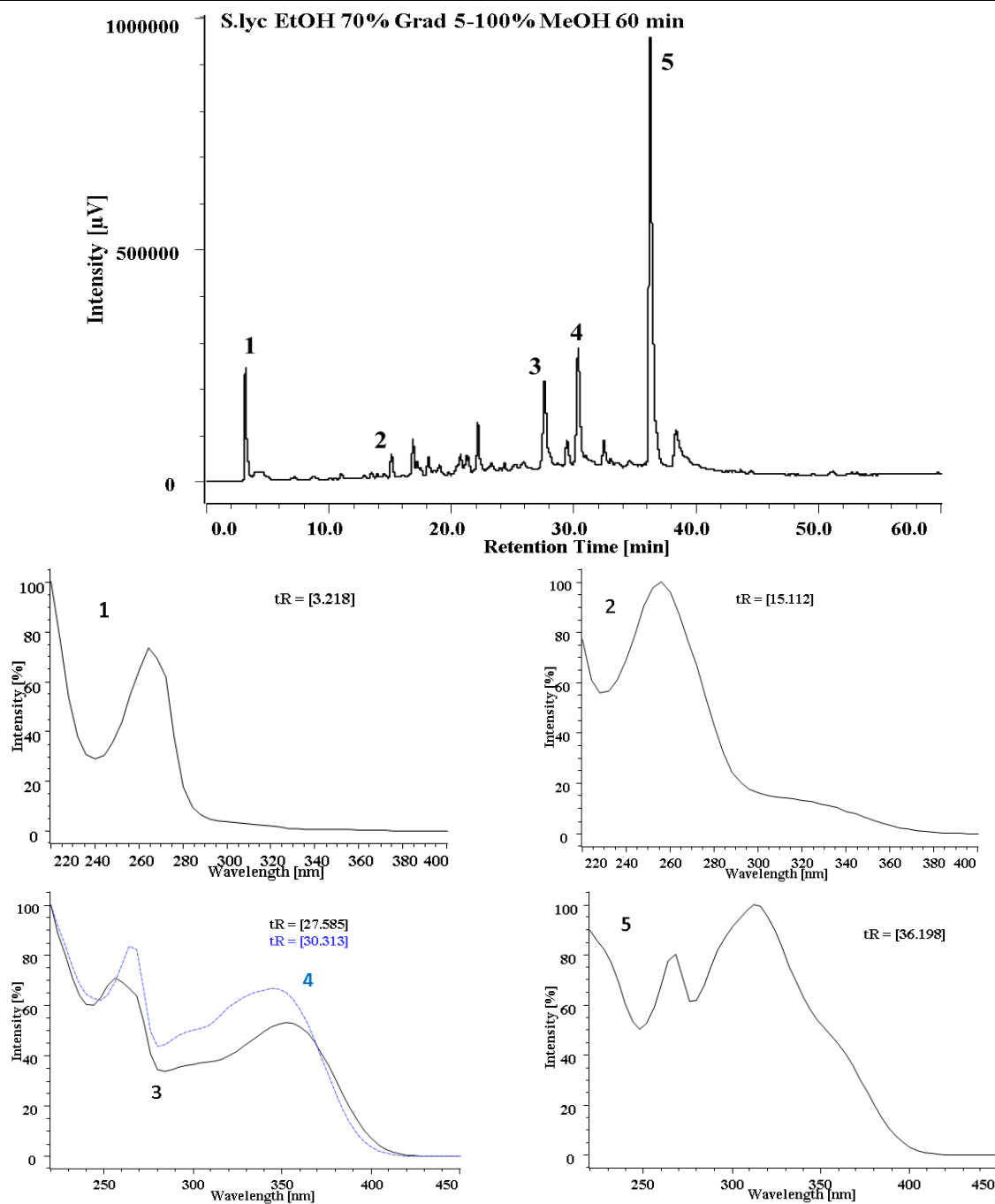
Anisaldeído foi utilizado como agente revelador para a CCD, sendo este um revelador universal que pode indicar diversas classes de metabólitos secundários, portanto não é específico. Segundo Hotstetmann e Marston (1995), a coloração amarelo-alaranjada obtida após o uso de anisaldeído é um indicativo da presença de flavonoides, portanto a análise da CCD forneceu os primeiros indícios da presença de flavonoides nas frações AcOEt e *n*-BuOH. Já no extrato *n*-hexano pode-se observar a presença de compostos mais apolares de acordo com o R_f apresentado sendo uma característica para este tipo de substâncias, no sistema de solventes descrito na Figura 5.

4.1 Determinação do perfil químico do extrato EtOH 70% por meio de HPLC-PDA e análise de espectros UV

O extrato EtOH 70% e suas frações AcOEt e *n*-BuOH foram submetidas a um processo de *clean-up* por SPE antes de serem analisadas por HPLC-PDA e o material, após seco e verificado sua massa, foi solubilizado em MeOH:H₂O (7:3, v/v) para obter soluções de 10 mg soluto/mL.

Foram traçados os perfis cromatográficos das frações AcOEt, *n*-BuOH e do extrato EtOH 70% em duas colunas diferentes (Thermo[®] e Luna[®] analíticas), para comparação das bandas cromatográficas obtidas e posteriormente análise de seus respectivos espectros no UV. A figura 6 mostra o gradiente linear do extrato EtOH 70% em coluna Thermo[®] monitorado em 254 nm, assim como os seus espectros no UV representativos. Os espectros no UV foram comparados com os da literatura possibilitando sugerir a classe de metabólitos presentes no extrato e nas frações (MABRY, 1980).

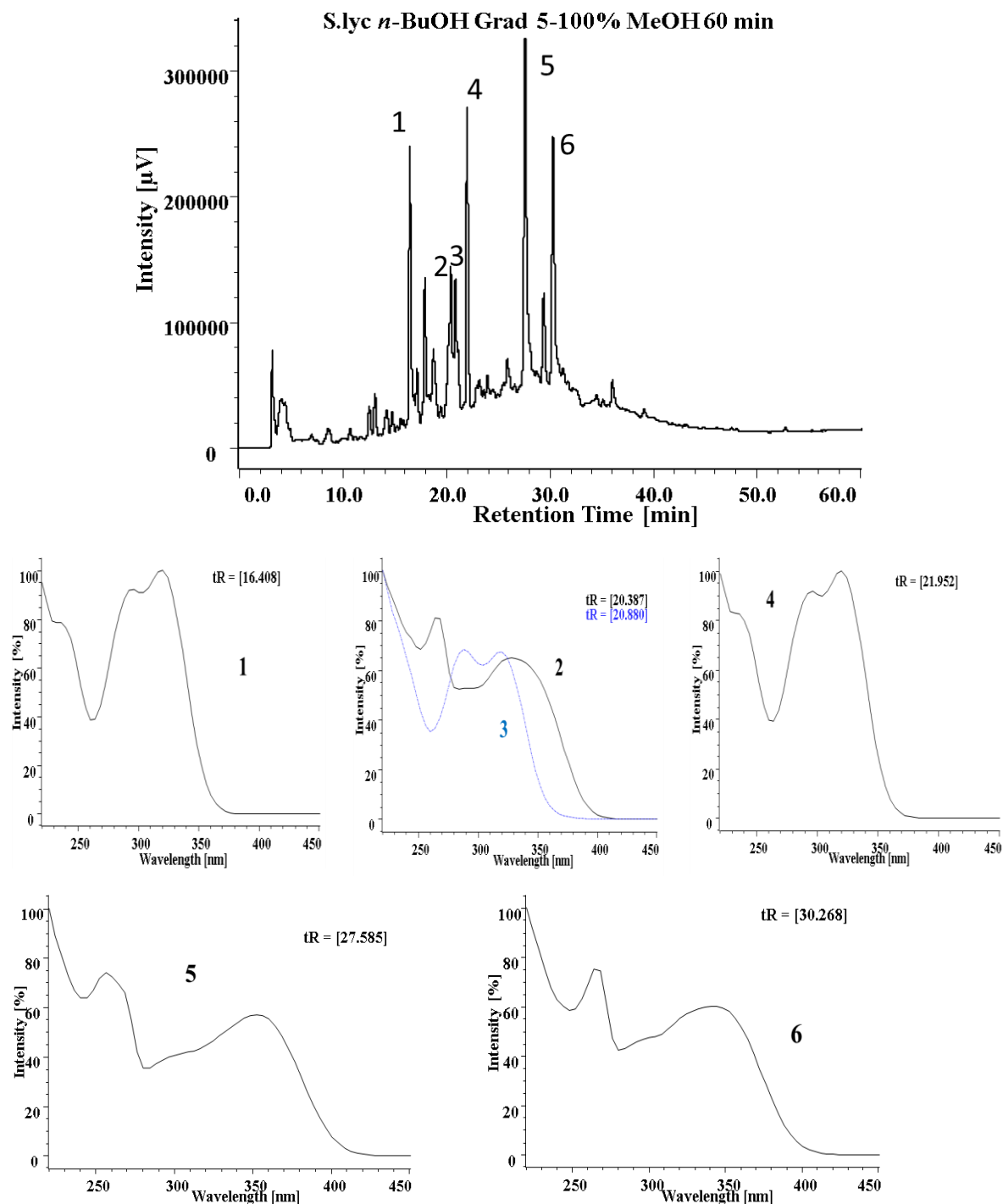
Figura 6 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA do extrato etanol 70% das folhas de *S. lycocarpum*.



Coluna Hypersil gold Thermo® (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Gradiente linear de 5% a 100% MeOH, 60 min a 254 nm com espectros no UV dos picos representativos.

A análise por UV dos picos representativos do cromatograma obtido por HPLC-PDA do extrato EtOH 70% (Figura 6) sugere a presença de compostos fenólicos (picos 1 e 2), no entanto os picos 3, 4 e 5 sugerem a presença de flavonoides. Os flavonoides são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (HUBER; RODRIGUES-AMAYA, 2008; MERKEN; BEECHER, 2000).

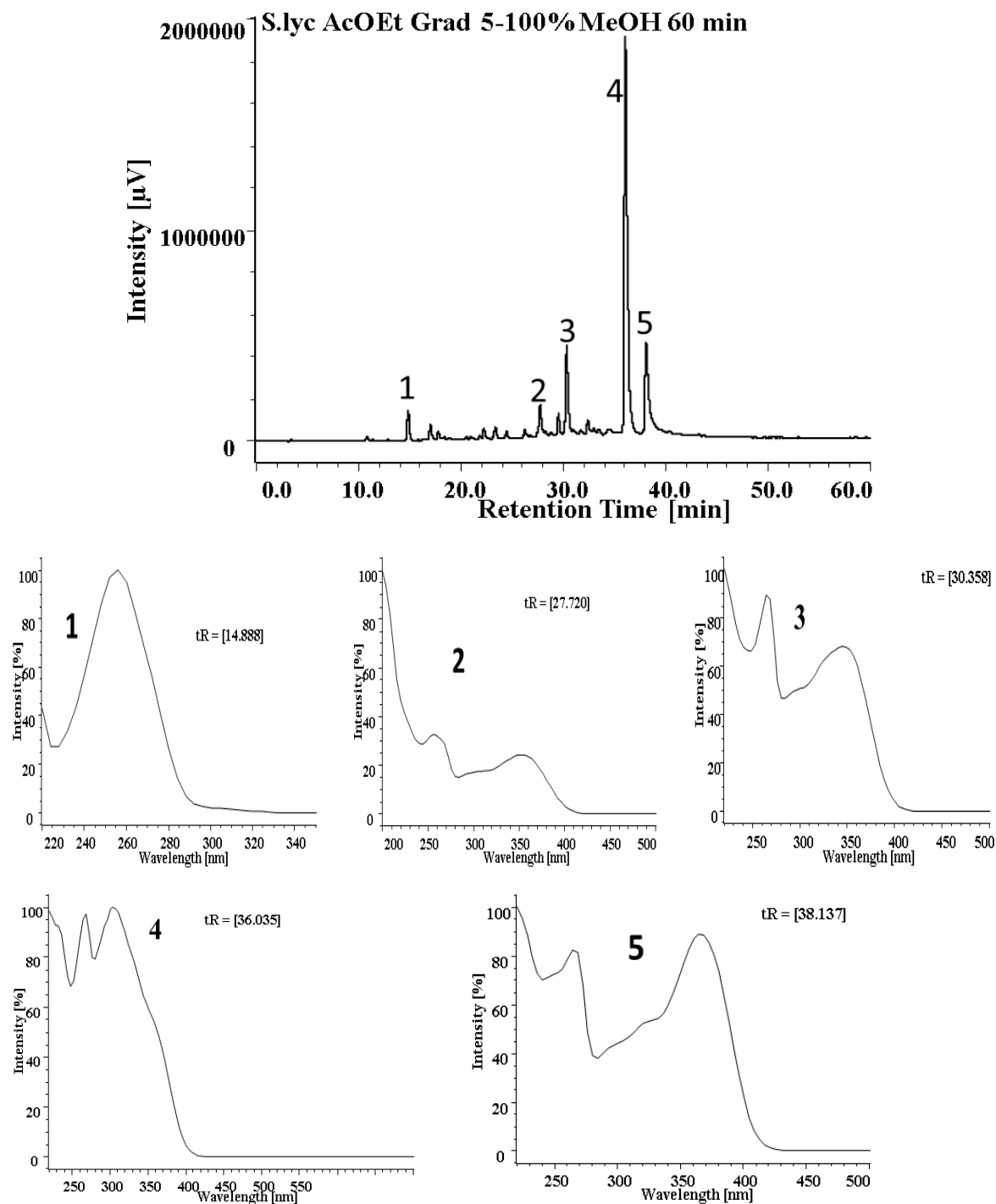
Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração *n*-butanol das folhas de *S. lycocarpum*.



Coluna Hypersil gold Thermo® (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Gradiente linear de 5% a 100% MeOH, 60 min a 254 nm com espectros no UV dos picos representativos.

O cromatograma da fração butanólica (Figura 7) mostra a presença de diversos compostos de diferentes polaridades, nos quais os picos 2, 3, 5 e 6 sugerem a presença de flavonoides de acordo com seu espectro UV. Entretanto, os picos 1 e 4 sugerem a presença de ácidos fenólicos (RODRIGUES, 2007).

Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração acetato de etila das folhas de *S. lycocarpum*.



Coluna Hypersil gold Thermo® (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Gradiente linear de 5% a 100% MeOH, 60 min a 254 nm com espectros no UV dos picos representativos.

Na Figura 8, observa-se o cromatograma da fração acetato de etila com os respectivos espectros UV dos picos majoritários. O pico 2 sugere a presença de um flavonoide, assim como os picos 3, 4 e 5 (HUBER; RODRIGUES-AMAYA, 2008; MERKEN, BEECHER, 2000). Já o

pico 1 indica a presença de um composto muito polar que, de acordo com o espectro UV, sugere a presença de um ácido fenólico (MABRY, 1980).

As análises dos picos representativos obtidos nos cromatogramas do ext EtOH 70% e de suas frações *n*-BuOH e AcOEt revelaram a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, portanto o estudo foi direcionado para identificação desta classe de substâncias. Observou-se, também, que a fração AcOEt (4,0 g) apresentou perfil nos espectros de UV majoritariamente de flavonoides. Porém devido ao baixo rendimento de massa obtido, a fração *n*-BuOH (9,3 g) foi selecionada para prosseguimento dos estudos.

4.2 Identificação de metabólitos por HPLC-PDA (Coinjeção de padrões)

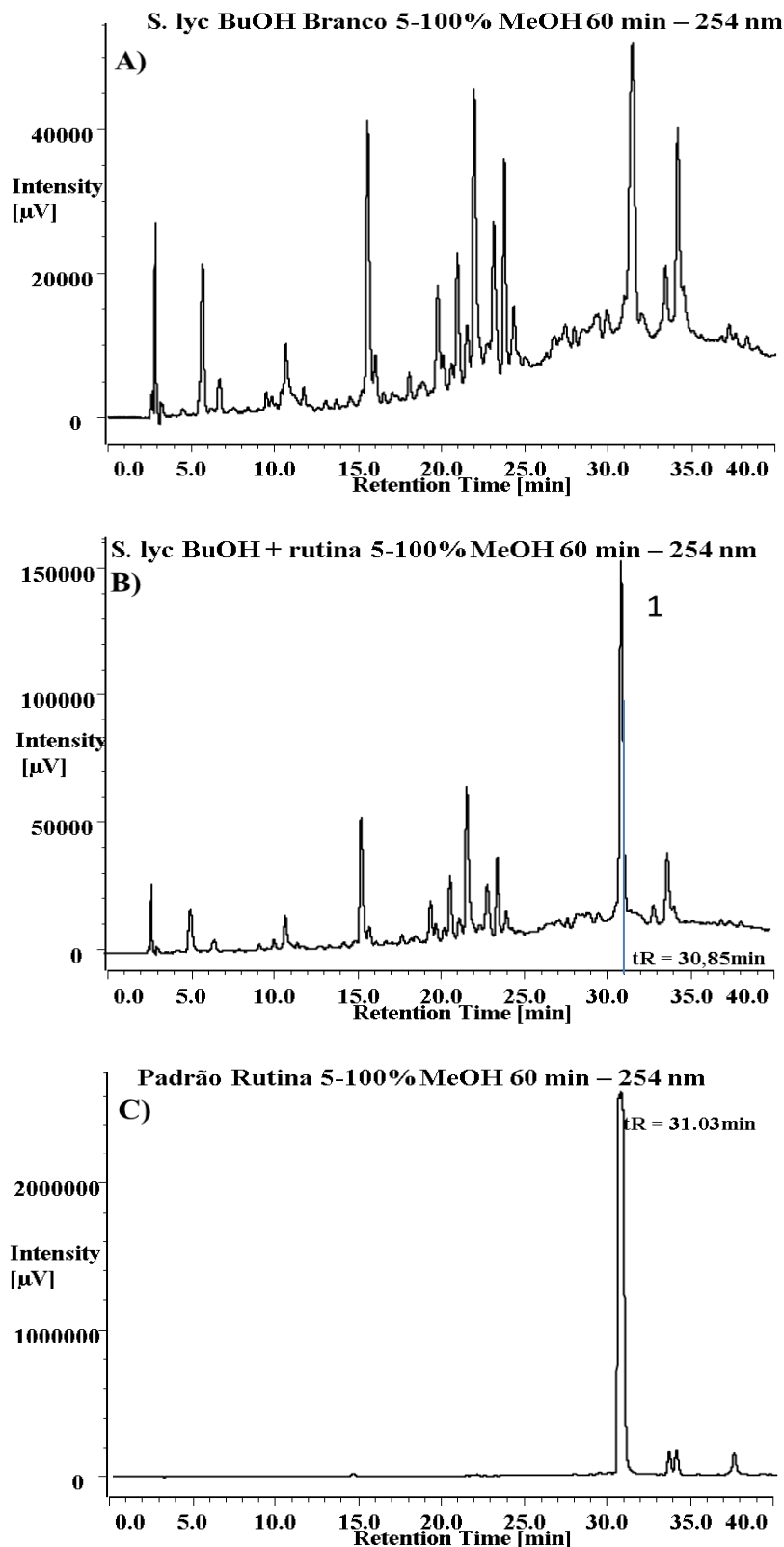
As 5 soluções preparadas foram injetadas em HPLC-PDA analítico para obtenção do gradiente linear conforme método descrito no item 3.4. As soluções com os padrões também foram injetadas no mesmo método para análise comparativa com o branco e com o cromatograma da solução com padrão. A obtenção dos cromatogramas “branco” e das soluções com padrões coinjetados permitiu comparar os perfis cromatográficos do extrato *n*-butanol das folhas de *S. lycocarpum* apresentados nas Figuras 9-10.

Analisando-se a Figura 9, é possível observar o aumento da intensidade do pico 1 no cromatograma de coinjeção da rutina (B). Além disso, o tempo de retenção é o mesmo apresentado no cromatograma do padrão de rutina (C) com tempo de 31 min. Portanto, confirma-se a presença de rutina no extrato *n*-BuOH. Já a análise da Figura 10 revelou que há um aumento na intensidade do pico 2 no cromatograma da coinjeção de quercetina (B) quando comparada com o cromatograma do branco (A). Para corroborar com esse fato, nota-se que o tempo de retenção da quercetina isolada (C) é igual ao tempo de retenção do pico 2 que ocorre em 37 min. Além disso, a rutina já identificada é um derivado glicosilado da quercetina, portanto, era esperado encontrá-la na mesma fração (*n*-BuOH).

A quercetina é um flavonoide com uma enorme gama de atividades farmacológicas e atua suprimindo a tolerância à glicose, reduzindo o colesterol e triglicérides no plasma, aumentando a atividade da glucoquinase hepática e aumentando a liberação de insulina em ratos diabéticos (GAIKWAD et al, 2012; GAIKWAD; MOHAN e RANI, 2014). A rutina, sendo um derivado diglicosilado da quercetina, também apresenta estas atividades em testes realizados *in vitro* e *in vivo* e, também, outras atividades biológicas mais específicas como melhorar os sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede dos vasos. Além disso, sintomas de fragilidade capilar também são atenuados, entre eles, a perda

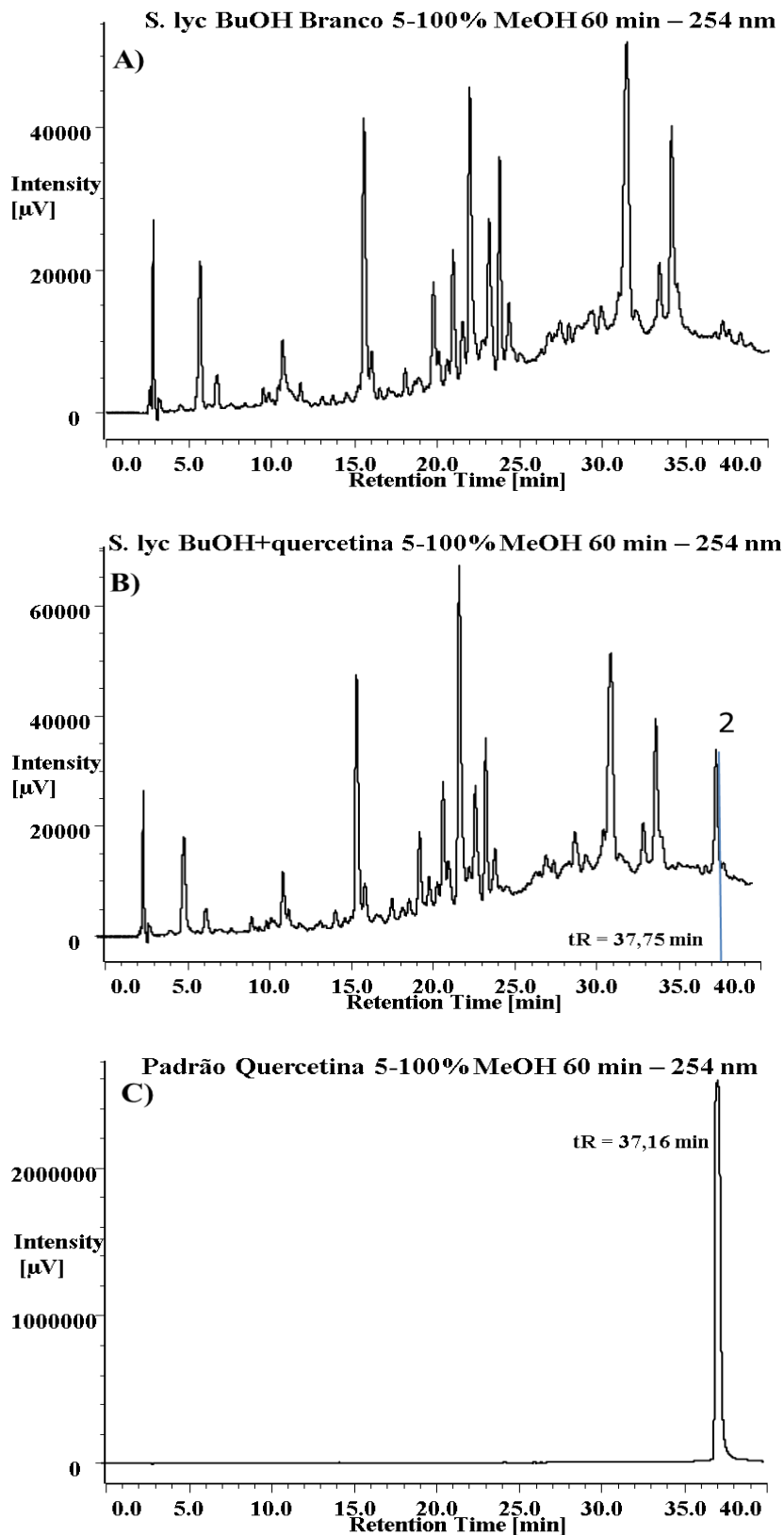
da acuidade visual e alterações do campo visual (PATHAK, et al., 1991; MARQUES-BECHO, et al., 2009; GAIKWAD; MOHAN e RANI, 2014).

Figura 9 - Perfis cromatográficos do: A) extrato *n*-butanol branco, B) coinjeção da rutina no extrato *n*-BuOH, C) do padrão de rutina.



Coluna Luna® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Gradiente linear usando H₂O (solvente A) e MeOH (B) com método 5% a 100% B, 60 min a 254 nm.

Figura 10 - Perfis cromatográficos do: a) extrato *n*-butanol branco, b) extrato *n*-butanol com coinjeção de padrão de quercetina das folhas de *S.lycocarpum*, c) do padrão de quercetina.



Coluna Luna® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Gradiente linear usando H₂O (solvente A) e MeOH (B) com método 5% a 100% B, 60 min a 254 nm.

Os resultados obtidos para os outros dois padrões de flavonoides utilizados para coinjeção (miricetina e luteolina) mostraram resultados negativos na fração *n*-BuOH e quando foram testados na fração AcOEt não mostraram resultados satisfatórios, portanto concluiu-se que esses flavonoides não se encontram na fração *n*-BuOH obtida a partir do extrato EtOH 70% das folhas de *Solanum lycocarpum*.

Sendo assim, utilizar a técnica de coinjeção se mostrou viável na identificação de substâncias sem a necessidade de isolamento e purificação. Além disso, a quercetina e a rutina foram reportadas em diversas espécies do gênero *Solanum* (SILVA; CARVALHO, 2003).

4.3 Fracionamento da Fração *n*-BuOH

Após analisar o perfil químico obtido por UV da fração *n*-BuOH e analisar os resultados obtidos a partir da técnica de coinjeção utilizando HPLC-PDA, decidiu-se fracionar a fração *n*-BuOH utilizando cromatografia de permeação em gel (GPC) para concentração das frações ricas em flavonoides e posterior purificação.

Primeiramente, 3,0 g do extrato foram dissolvidos em 9,0 mL de solução MeOH:H₂O 7:3 (*v/v*). Depois, a mistura foi homogeneizada em vórtex até completa dissolução e em seguida centrifugada para eliminação de partículas sólidas. O sobrenadante foi aplicado no topo de uma coluna (90cm x 3cm) contendo resina empacotada Sephadex LH-20. Utilizando solução MeOH:H₂O (1:1, *v/v*) como fase móvel a uma vazão de 2mL.min⁻¹, foram recolhidas frações com aproximadamente 4 mL em coletor automático sendo obtidas, no total, 129 frações (Figura 11). A análise por CCD das 129 frações permitiu reuni-las em 14 frações de acordo com a coloração e valores de R_f observados. A Figura 12 mostra as CCDs nesse sistema de fase móvel. Após a análise das CCD's, juntaram-se as 129 frações segundo a **Tabela 1** e as massas dessas 14 novas frações estão resumidas na **Tabela 2**.

Figura 11 - Imagens da coluna durante a GPC em Sephadex LH-20. A imagem da esquerda representa 15 minutos após a injeção da amostra na coluna e a imagem da direita representa 3 horas após a injeção.

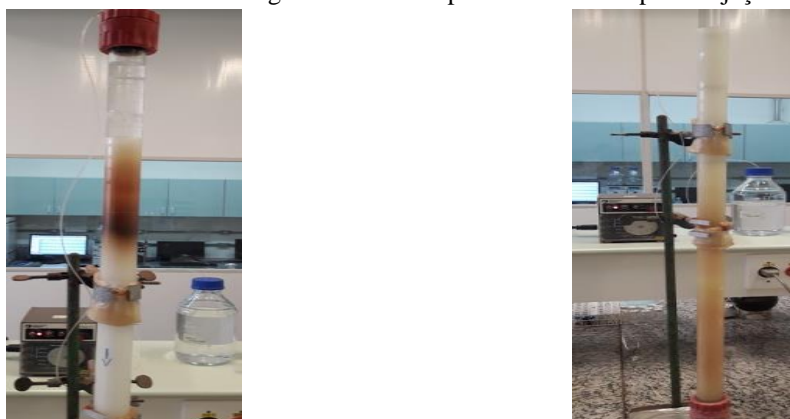


Figura 12 - Análise por CCD das 129 frações obtidas após a cromatografia por permeação em gel em Sephadex LH-20. Fase Estacionária de sílica gel; Fase Móvel = $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, v/v/v), revelador: anisaldeído/ H_2SO_4 .

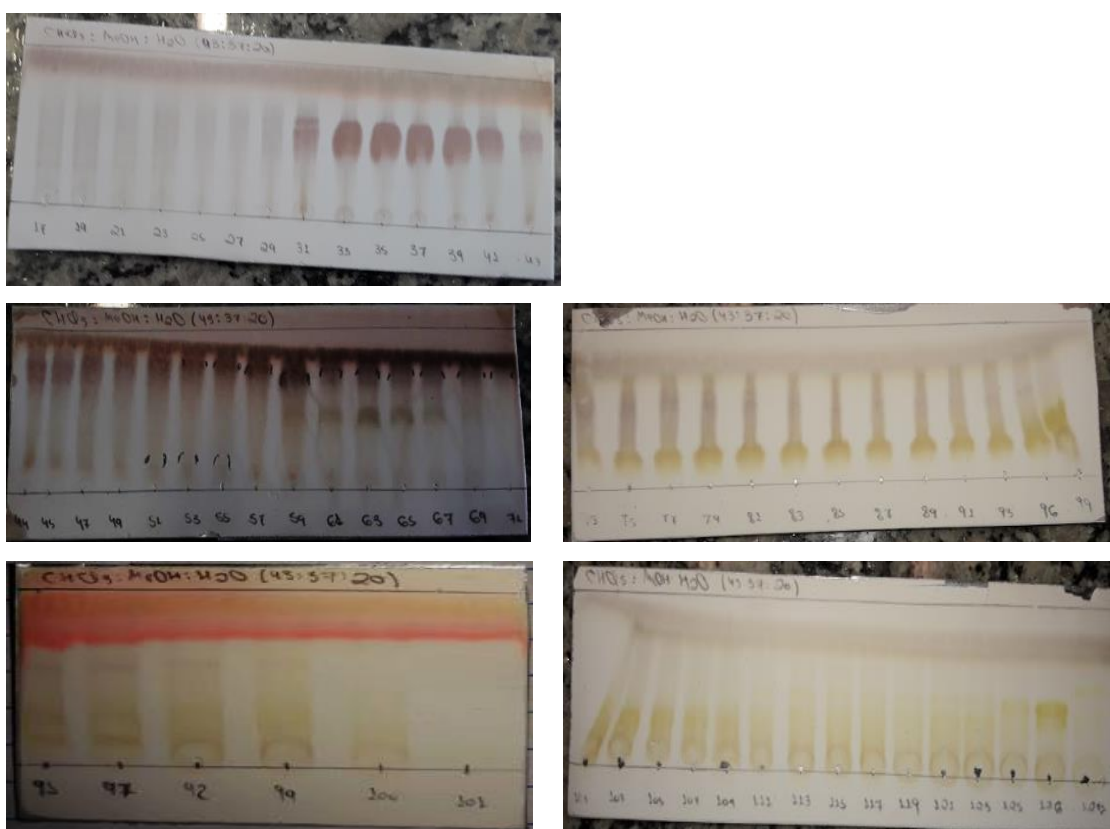


Tabela 1 - Junção das 129 frações obtidas (segunda linha) em 14 novas frações.

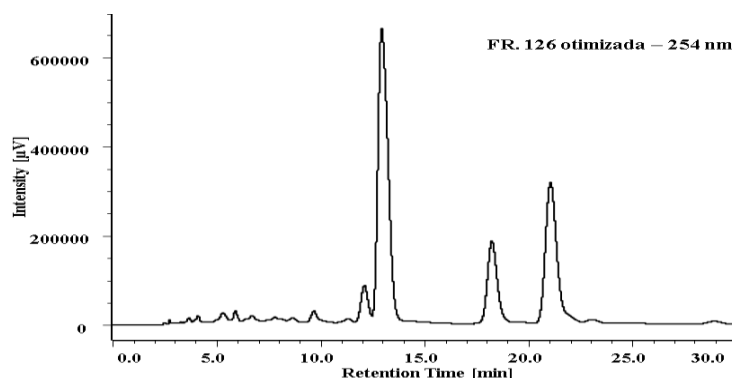
Fr I	Fr II	Fr III	Fr IV	Fr V	Fr VI	Fr VII	Fr VIII	Fr IX	Fr X	Fr XI	Fr 125	Fr XIII	Fr 129
1-16	17-29	30-43	44-49	50-58	59-67	68-71	72-98	99-105	106-111	112-124	125	126-128	129

Tabela 2 - Massas de cada fração obtidas pela cromatografia por permeação em gel.

Fração (Fr.)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	125	XIII	129
Massa (mg)	1	0,7	373,7	72,7	150	211,7	23	720,1	52,5	18,6	35,2	26,7	29	9

A fração XIII continha flavonoides de baixa massa molecular, uma vez que esta técnica separa os compostos por tamanho, sendo que os últimos a eluírem são os compostos menores que ficam mais retidos nos poros da fase estacionária (Sephadex LH-20), ou seja, de menor massa molecular. Otimizou-se o método de análise do cromatograma em HPLC-PDA Analítico para um método isocrático 40% MeOH em 30 min para obter melhor resolução e separação entre as bandas para posterior injeção em HPLC-Semi-preparativo. Seu cromatograma otimizado está abaixo na Figura 13.

Figura 13 - Cromatograma por HPLC-PDA da fração XIII da fração *n*-BuOH das folhas de *S.lycocarpum*.



Coluna Hypersil Gold C18 Thermo® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Método isocrático 40% B usando H₂O como solvente A e MeOH como solvente B em 30 min a 254 nm.

Após a análise, decidiu-se injetar 27 mg da fração XIII em uma coluna Luna® Semi-preparativa (250 mm x 10 mm, 5 micron) na concentração de 10 mg/100 µL. Foram realizadas coletas de amostra em determinados tempos: 3 min (Amostra SL_1); 6min (Amostra SL_2); 10 min (Amostra SL_3); 13 min (Amostra SL_4); 18 min (Amostra SL_5); 20 min (Amostra SL_6); 22 min (Amostra SL_7); 25 min (Amostra SL_8). As respectivas massas obtidas após injeções em HPLC Semi-preparativo estão resumidas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Valores de massas obtidos para cada amostra da fração XIII.

Amostra	SL_1	SL_2	SL_3	SL_4	SL_5	SL_6	SL_7	SL_8
Massa (mg)	0,2	0,3	0,3	2,2	0,6	0,7	0,7	0,1

As frações *n*-butanólica **SL_4 - 7** foram analisadas por RMN mono e bidimensionais, discutidas no item 4.4.

4.4 Identificações dos flavonoides da fração *n*-butanólica das folhas de *S. lycocarpum* por RMN

Como discutido no item 4.3, o fracionamento da fração *n*-BuOH por Sephadex LH-20 forneceu a fração XIII que foi re-fracionada em HPLC Semi-preparativo e forneceu as frações **SL_4 – 7** que foram analisadas por RMN e por MS. As respectivas massas obtidas para estas frações estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de massas obtidos para as frações **SL_4**, **SL_5**, **SL_6** e **SL_7**.

Amostra	SL_4	SL_5	SL_6	SL_7
Massa (mg)	2,2	0,6	0,7	0,7

A Fração **SL_4** proveniente da fração *n*-BuOH mostrou no espectro de RMN ¹H (Figura 15) sinais referentes a uma mistura de flavonoides e, após as análises dos espectros de RMN mono e bidimensional, foi comprovada que as substâncias são derivadas da quercetina (**4a** e **4b**). Para a substância **4a**, na região dos hidrogênios aromáticos foram observados deslocamentos químicos de hidrogênios acoplados em *meta* em δ 7,51 ($J = 1,8$ Hz, 1 H) atribuídos aos H-2' e δ 7,54 ($J = 1,8; 8,4$ Hz, 1 H) atribuído ao H-6'. Já o sinal em δ 6,82 ($J = 8,4$ Hz, 1 H) foi atribuído ao H-5' do anel B do flavonoide, comprovando que o anel B é trissubstituído. Constantes de acoplamento (J) com valores entre 0,5 – 2,0 Hz indicam que os hidrogênios estão orientados em *meta*, enquanto valores entre 7,0 – 9,0 Hz indicam acoplamento em *orto* (HARBORNE, 1996).

Os hidrogênios do Anel A foram observados em δ 6,19 ($J = 1,8$ Hz, 1 H) para H-6 e δ 6,36 ($J = 1,8$ Hz, 1 H) para o H-8, comprovando que o Anel A do flavonoide é tetrassubstituído. Na região entre δ 4,5 e 5,4 foram observados os deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos. O deslocamento químico em δ 4,38 ($J = 1,2$ Hz), aliado ao deslocamento químico dos hidrogênios de uma metila em δ 0,98 ($J = 6,6$ Hz, 3 H), foi atribuída a uma rhamnose com configuração em α . Estes dados foram corroborados com análise do espectro TOCSY 1 D (Figura 19). A rhamnose foi confirmada pela irradiação do sinal em δ 4,38 que mostrou transferência NOE para o sinal do hidrogênio 2 da rhamnose em δ 3,39, evidenciando que estes dois hidrogênios estão em equatorial e também pela irradiação dos hidrogênios em δ 0,98 que mostrou transferência de coerência para os hidrogênios em δ 3,05; 3,09 e 3,25, evidenciando que estes encontram-se em axial (HARBORNE, 1996).

Os sinais em δ 5,25 ($J = 7,8$ Hz, 1 H) foram atribuídos às hexoses com configuração em β . Esta informação foi também confirmada no espectro TOCSY 1 D (Figura 19) pois irradiação dos hidrogênios em δ 5,25 mostrou todos os sistemas de spins dos hidrogênios da glicose (HARBORNE, 1996). O mapa de contorno HSQC (Figura 17) fornece as correlações à 1J de ^1H - ^{13}C . (Tabela 5). O mapa de contorno HMBC (Figura 18), forneceu as correlações à 2J e a 3J de ^1H - ^{13}C , possibilitando avaliar as ligações dos glicosídeos. O hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,25 C (C-1'') apresentou correlação com o carbono (C-3) em δ 133,2 da aglicona. O hidrogênio anomérico em δ 4,38 (C1-1''') apresentou correlação com carbono em 65,7 (C6'') da glicose, comprovando a ligação (6 \rightarrow 1) (AGRAWAL, 1989). O espectro MS/MS (Figura 20) evidenciou o íon da molécula desprotonada em m/z 609 $[\text{M}-\text{H}]^-$ comprovando que este flavonoide é um diglicosídeo. Também apresentou íons fragmentos em m/z 463 $[\text{M} - 146 - \text{H}]^-$ e m/z 301 $[\text{M} - 162 - 146 - \text{H}]^-$. Então esta substância é a quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (Figura 14).

A outra substância majoritária (**4b**), em mistura nesta fração também é um derivado da quercetina. A diferença observada para esta substância no espectro de RMN ^1H e nos mapas de contorno HMBC (Figuras 15 - 18) refere-se à ligação dos açúcares na posição 3 do flavonoide. Desta vez observou-se que o hidrogênio anomérico da rhamnose em δ 4,42 ($J = 1,2$ Hz, 1 H) C-1''' apresenta correlação com o carbono em δ 70,3 (C-2'') da glicose. O espectro de massas desta substância (Figura 20b) mostrou também o íon da molécula desprotonada em m/z 609 e os espectros MS/MS evidenciou as perdas de unidades de deoxihexose em m/z 609 $[\text{M} - 146 - \text{H}]^-$ e hexose gerando os íons m/z 463 e 301 $[\text{M} - 162 - 146 - \text{H}]^-$. Portanto este flavonoide foi determinado como sendo quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (Figura 14) (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996).

Figura 14 - Estruturas dos flavonoides em mistura na fração **SL-4** da fração aquosa proveniente do extrato EtOH 70% das folhas de *S. lycocarpum*.

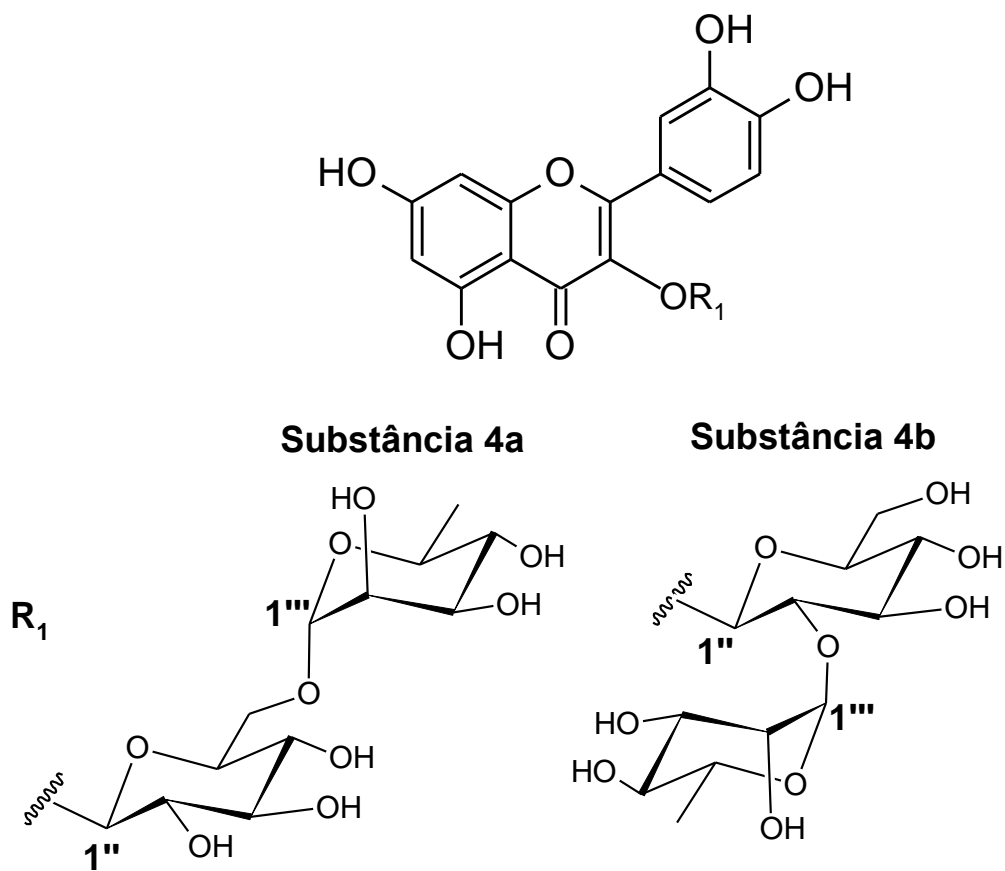


Figura 15 - Espectro de RMN ¹H da Fração SL-4 (DMSO-d₆, 600 MHz).

Joao_Pedro_SL_4.1.fid

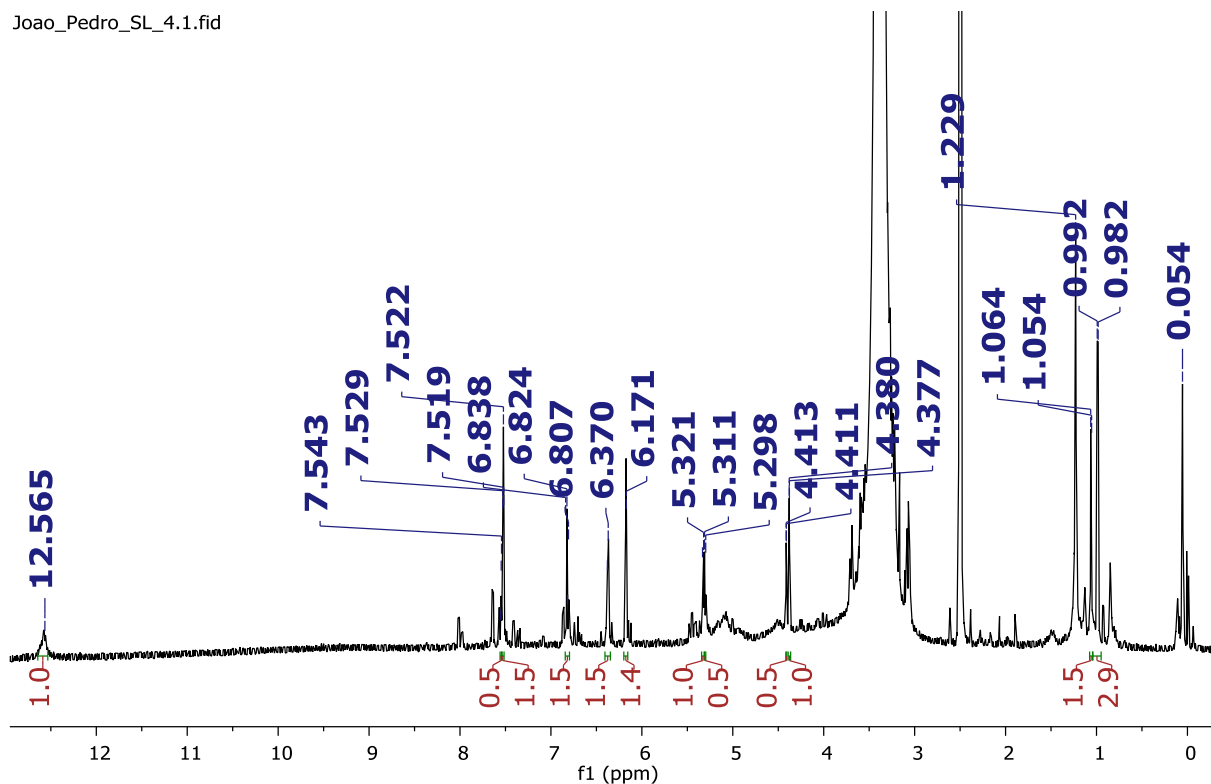


Figura 16 - Espectro de RMN ¹H(DMSO-d₆, 600 MHz) – Região 4,10-5,70 ppm e 0,8-1,1 ppm).

Joao_Pedro_SL_4.1.fid

Joao_Pedro_SL_4.1.fid

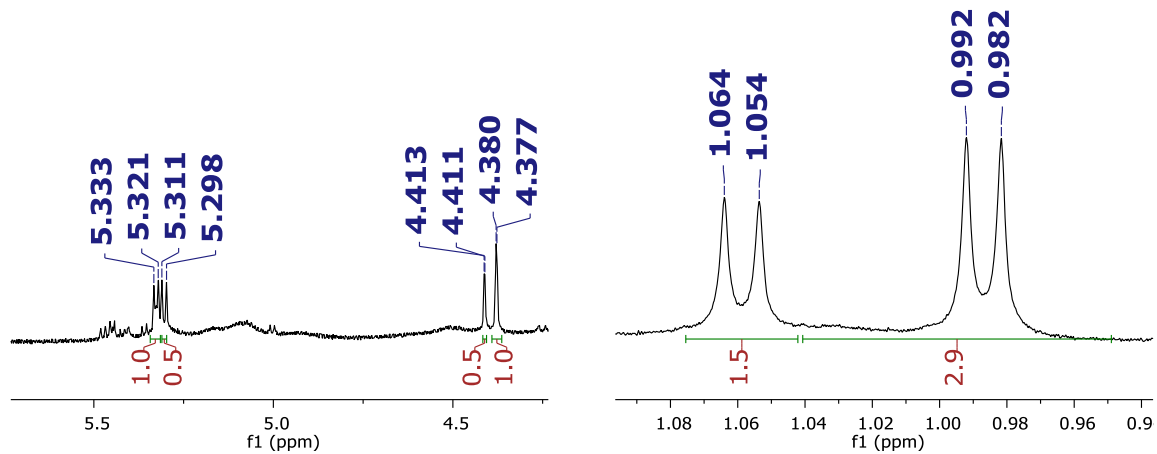


Figura 17 - Mapa de Contorno HSQC Fração **SL-4** – (DMSO-D₆, 14,1 T).

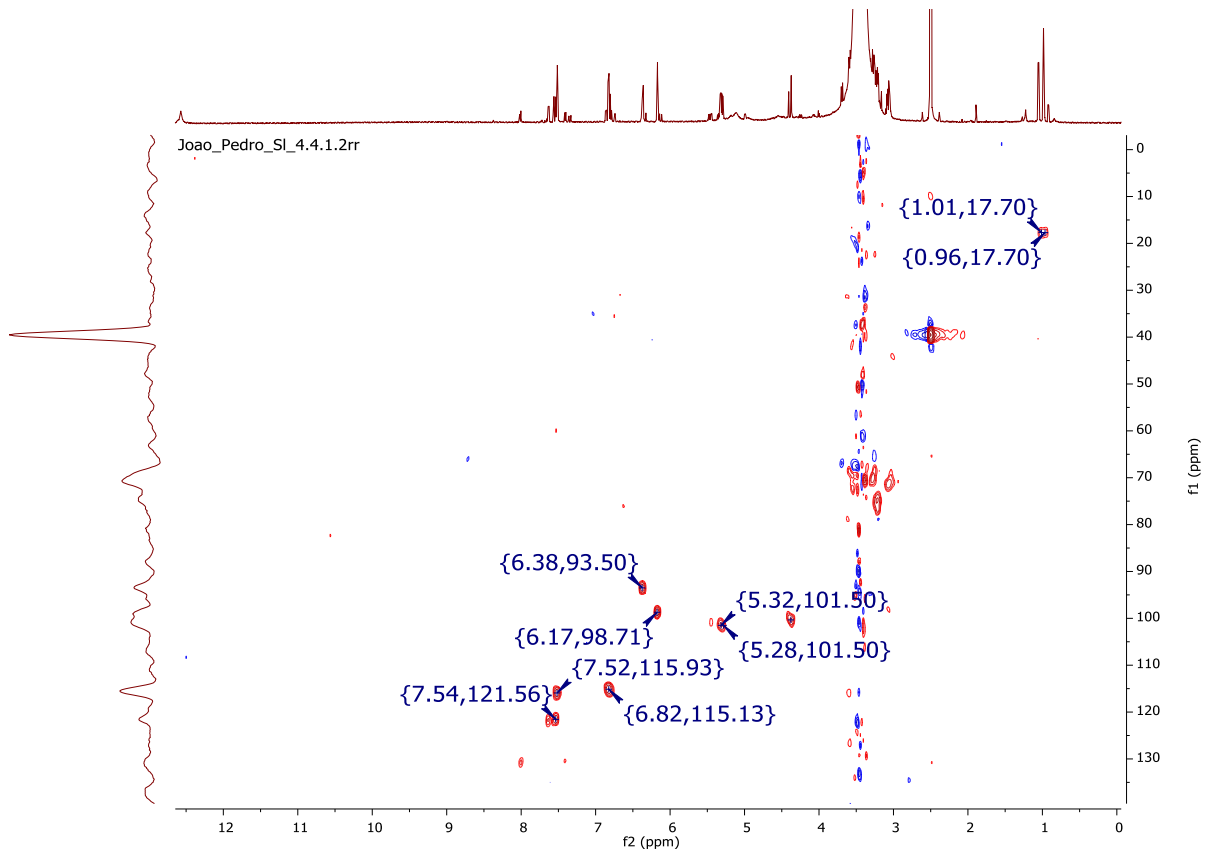


Figura 18 - Mapa de Contorno HMBC da Fração **SL-4** – (DMSO-D₆, 14,1 T).

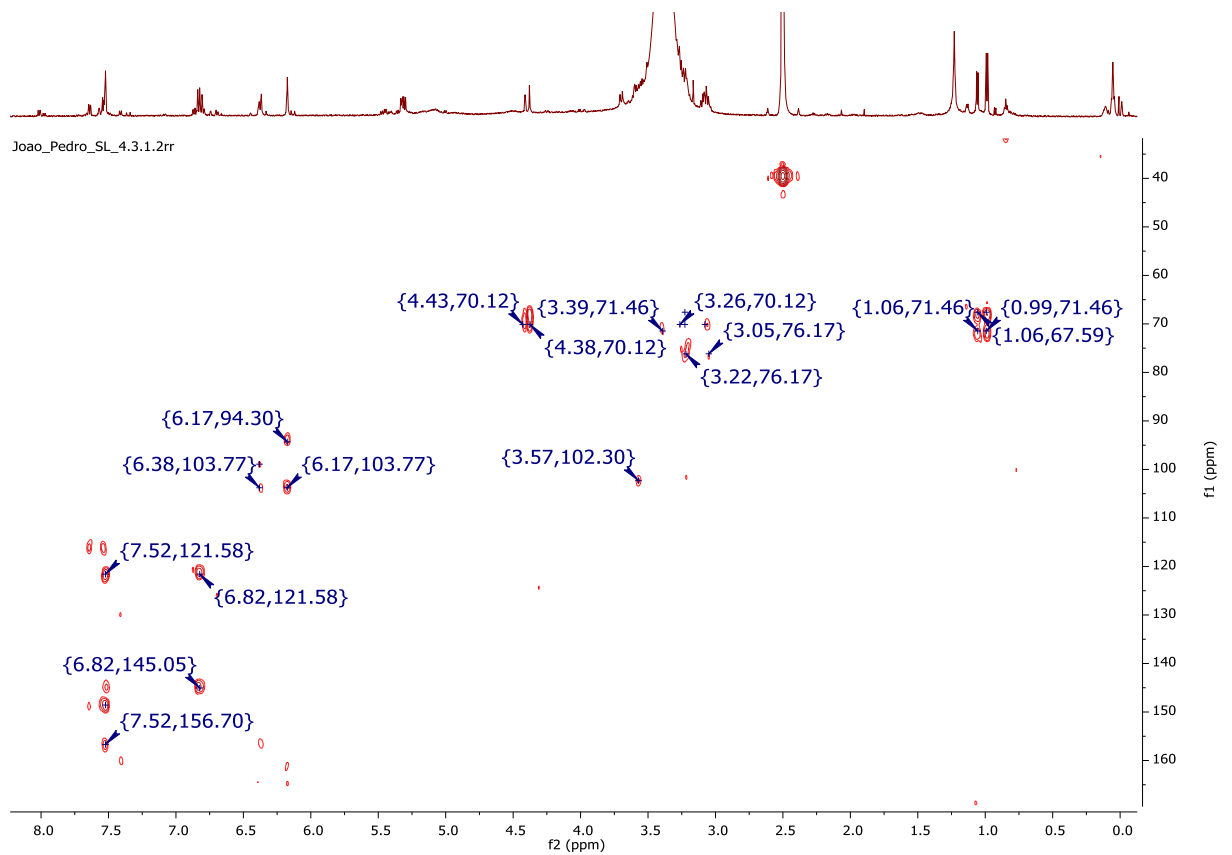


Figura 19 - TOCSY 1D da fração SL_4 com irradiações em 5,24; 4,32; 4,41; 5,27; 0,98; 1,16.

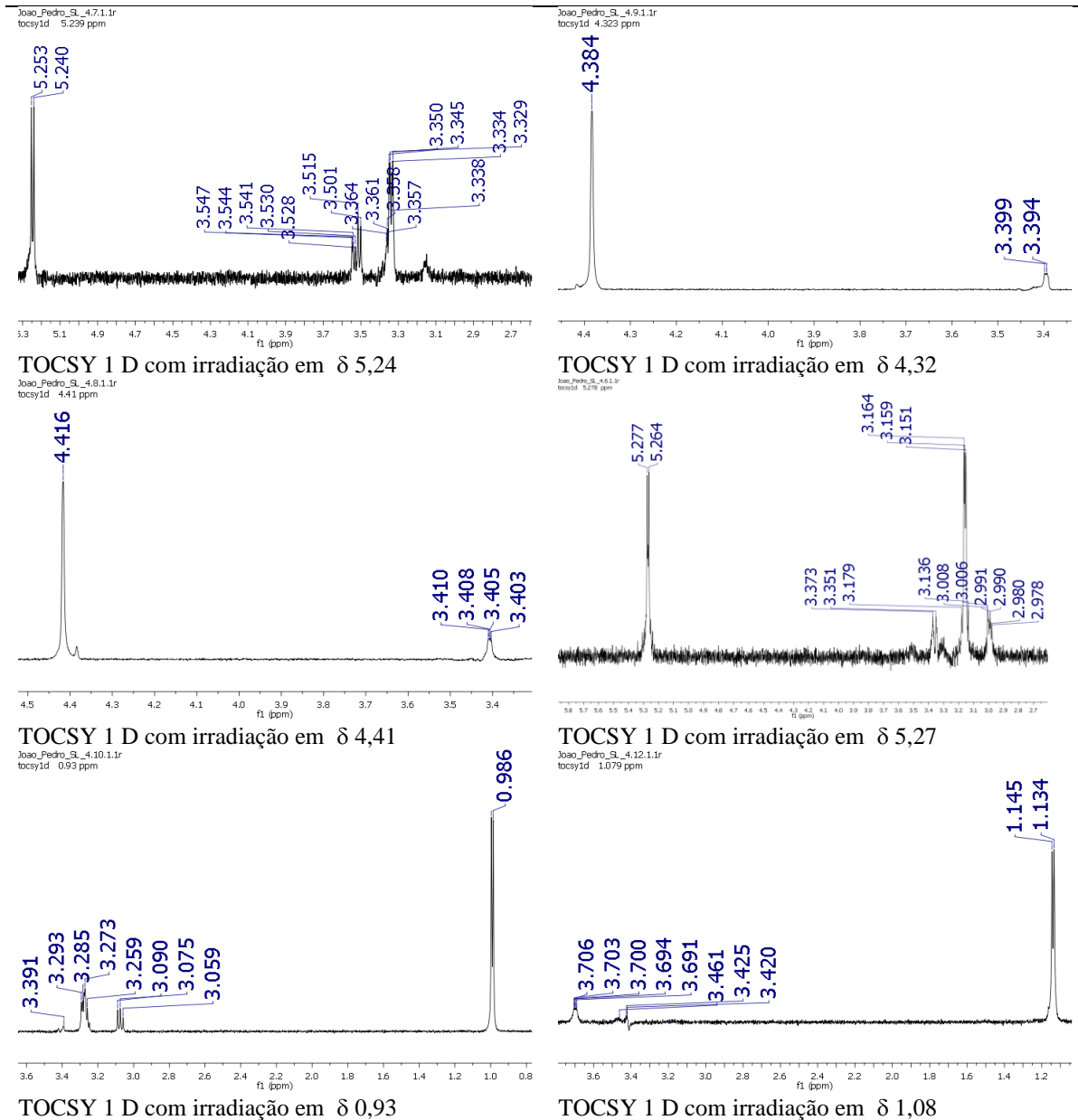


Figura 20 - Espectro de massas (LC-MS/MS) da fração **SL_4**. Coluna Luna® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min⁻¹.

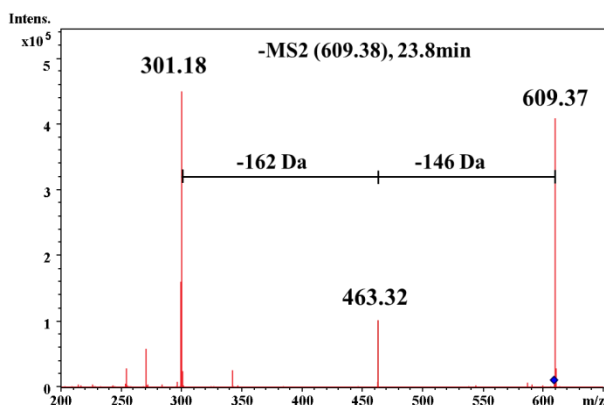


Tabela 5 - Deslocamentos químicos de RMN ¹H e ¹³C da mistura de flavonoides na fração **SL-4**.

4a			4b	
Posição	¹ H (J = Hz)	¹³ C	¹ H (J = Hz)	¹³ C
2	-	157,1		157,1
3	-	133,2		133,2
4	-	178,0		178,0
5	-	161,3		161,3
6	6,19 d (1,8)	99,2	6,19 d (1,8)	99,2
7	-	164,9		162,9
8	6,36 d (1,8)	91,0	6,36 d (1,8)	91,0
9	-	157,0		157,0
10	-	104,5		104,0
1'	-	121,8		121,8
2'	7,51 d (1,8)	115,2	7,52 d (1,8)	115,2
3'	-	145,2	-	145,2
4'	-	148,9		148,4
5'	6,82 d (8,4)	115,1	6,80 d (8,4)	115,1
6'	7,54 d (8,4; 1,8)	122,2	7,55 d (8,4)	122,2
1''	5,25d (7,8) glc ⁶	101,9	5,27 d (7,8) glc ²	101,9
2''	3,77 dd (7,8; 9,0)	74,9	3,37 dd (7,8; 9,0)	70,3
3''	3,69 d (3,6)	73,7	3,40 m	77,1
4''	3,54 m	68,4	3,01 t (8,8)	70,7
5''	3,59m	73,6	3,29 m	68,4
6''	3,51 d (10,0) 3,32 d (10,0)	65,7	3,77 d (10,0) 3,23 d (10,0)	66,0
1''' rha	4,39 d (1,2)	100,9 rha	4,42 d (1,2)	100,9
2'''	3,39 dd (0,7; 4,0)	68,4	3,41 dd (1,2; 3,4)	70,2
3'''	3,25 dd (9,0; 4,0)	70,5	3,28 dd (3,4; 9,0)	75,8
4'''	3,09 t (9,0)	70,7	3,08 t (9,0)	71,6
5'''	3,27 m	68,5	3,34 m	67,7
6'''	0,98 d (6,6)	17,5	1,05 d (6,6)	17,7

(14,1 T, DMSO-d₆).

Deslocamentos químicos comparados com a literatura: HARBORNE, 1996 e AGRAWAL, 1989.

A fração **SL-5** apresentou uma mistura de flavonoides derivados do kaempferol e da quercetina. Devido sua baixa massa e pela mistura apresentada, não foi possível continuar com o sua purificação e identificação estrutural.

A fração **SL_6** proveniente da fração butanólica mostrou no espectro de RMN ^1H sinais referentes a um derivado do kaempferol (Figura 21). Foram observados dois duplos dupletos ($J = 9,0$ e $1,8$ Hz, 2 H cada) em δ_{H} 6,81 e δ_{H} 7,99 que foram atribuídos aos hidrogênios H-3'/5' e H-2'/6' respectivamente do anel B, comprovando que o anel B é dissubstituído. Os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios do anel A (H-6 e H-8) foram observados em δ 6,12 e 6,35 ($J = 1,8$ Hz, 1 H cada). O sinal em δ 5,25 ($J = 7,8$ Hz, 1 H) foi atribuído a hexose com configuração em β , enquanto que o deslocamento químico em δ 4,34 ($J = 1,2$ Hz, 1 H) foi atribuído a uma deoxihexose com configuração α . O deslocamento químico em 1,01 (3 H, $J = 6$ Hz) foi atribuída a uma metila, confirmando que a deoxihexose é a rhamnose terminal (HARBORNE, 1996).

O mapa de contorno HSQC (Figura 22) possibilitou atribuir os carbonos ligados aos hidrogênios a 1J (Tabela 6). A análise dos TOCSY 1D (Figura 23) permitiram uma comparação dos deslocamentos químicos da região dos açúcares desta fração com a literatura (AGRAWAL, 1989) confirmando que os açúcares são a glicose e rhamnose respectivamente ligados na posição C-3 do flavonoide.

O espectro de massas no modo negativo desta substância (Figura 24) apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 593 comprovando que esta molécula é um diglicosídeo do kaempferol. A perda de 308 Da forneceu o íon da aglicona em m/z 285 e, além disso, há uma perda de 162 Da visto o sinal do íon m/z 447 evidenciando que uma glicose está ligada a uma rhamnose terminal. Portanto esta substância é o kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (Figura 25).

Figura 21 - Espectro de RMN ¹H da substância **SI_6** (14,1 T, DMSO-d₆).

Joao_SL_6.1.1.1r

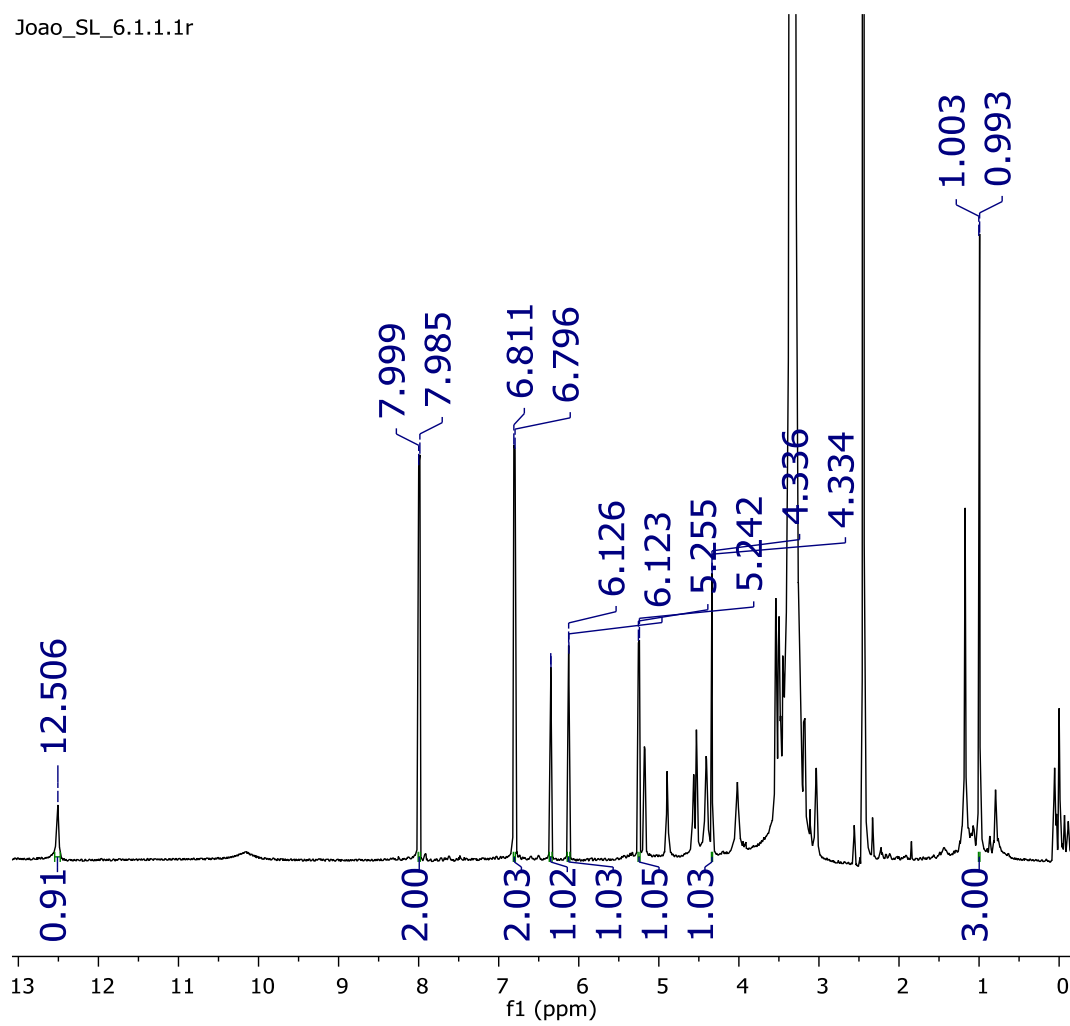


Figura 22 - Mapa de Contorno HSQC Fração SL₆ – (DMSO-D₆, 14,1 T).

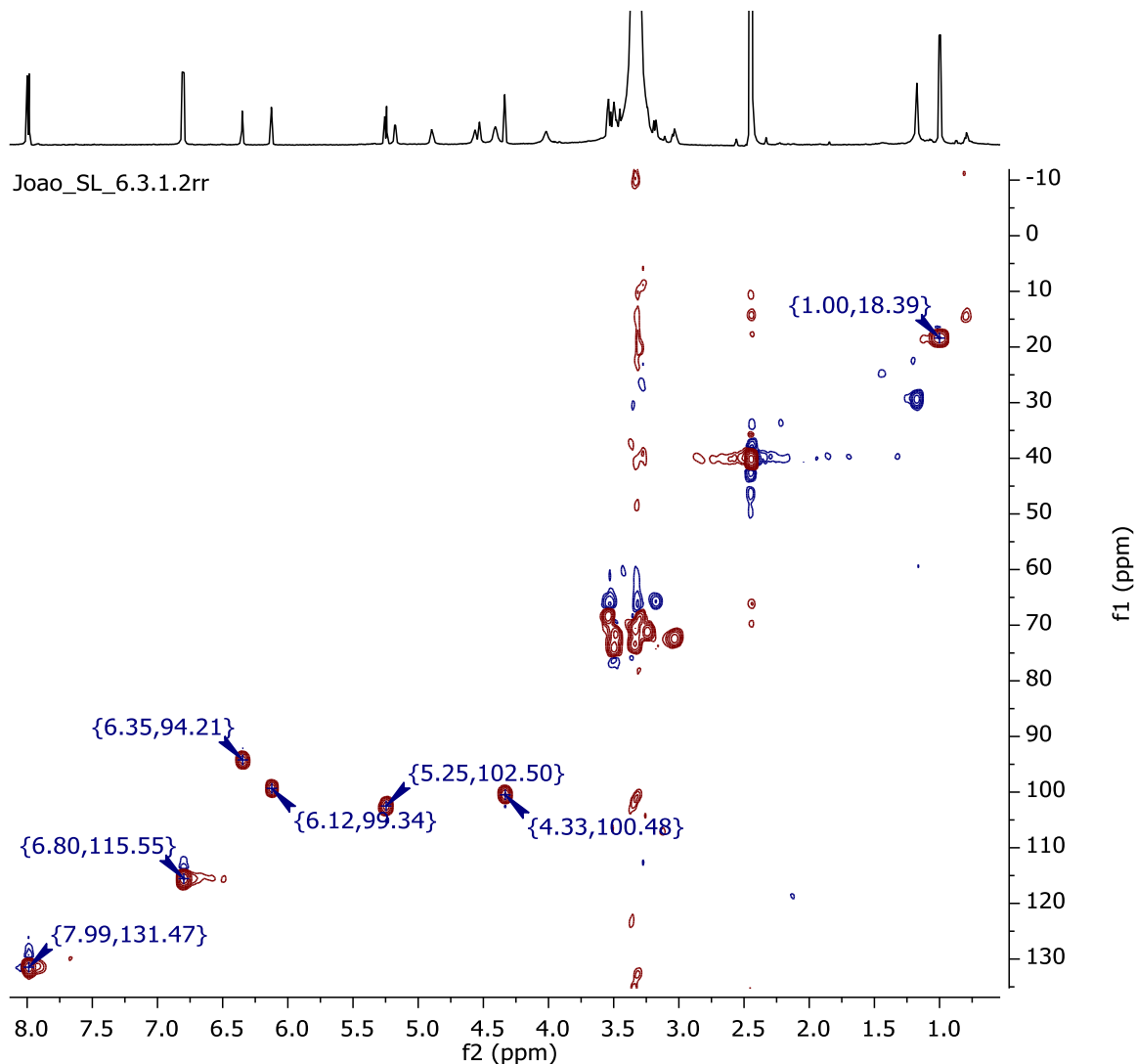


Figura 23 - TOCSY 1D da fração SL₆ com irradiações em 5,31 e 1,06.

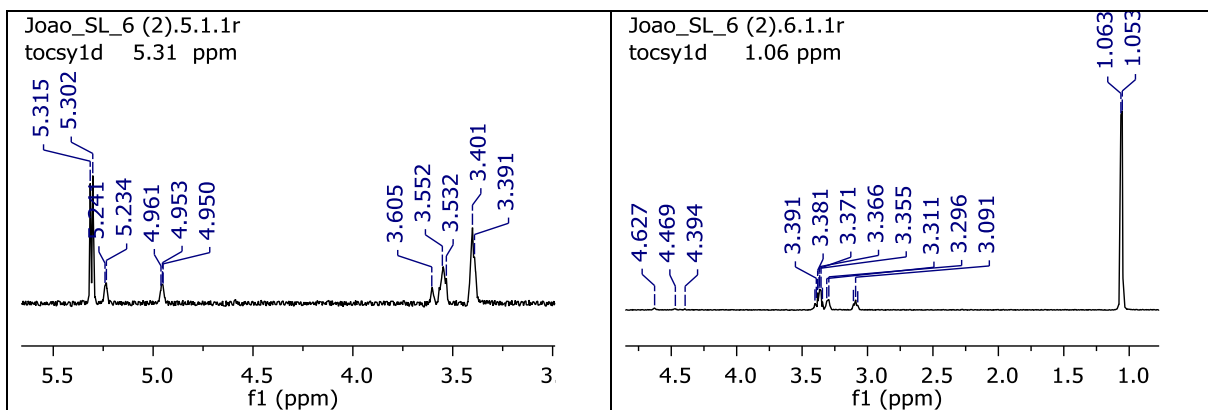


Figura 24 - Espectro de massas MS/MS do íon m/z 593 referente à fração **SL_6**.

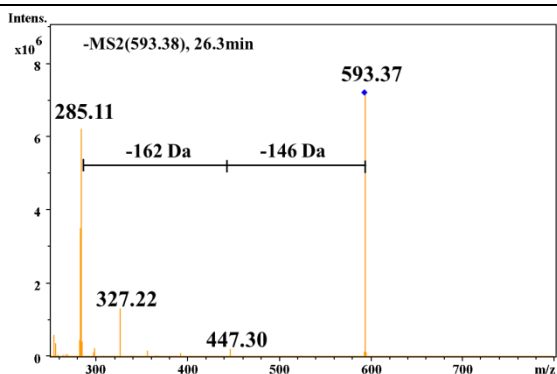


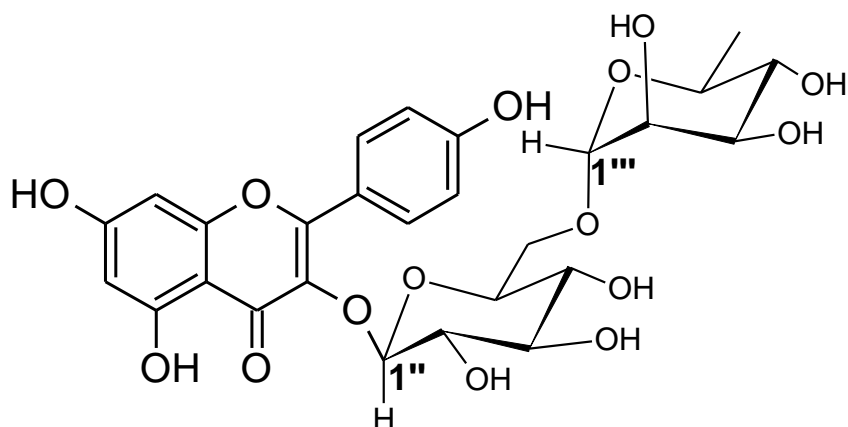
Tabela 6 - Deslocamentos químicos de RMN ¹H e ¹³C da mistura de flavonoides na fração **SL-6**.

SL-6		
Posição	¹H (J = Hz)	¹³C
2	-	156,5
3	-	134,3
4	-	-
5	-	161,3
6	6,12 d (1,8)	99,3
7	-	165,0
8	6,35 d (1,8)	94,2
9	-	157,0
10	-	104,1
1'	-	121,3
2'	7,99 dd (9,0; 1,8)	131,4
3'	6,81 dd (9,0; 1,8)	115,5
4'	-	160,5
5'	6,81 dd (9,0; 1,8)	115,5
6'	7,99 dd (9,0; 1,8)	131,4
1''	5,25d d (7,8) glc	102,5
2''	3,33 dd (7,8; 9,0)	73,5
3''	3,53 d (3,6)	74,2
4''	3,54 m	68,5
5''	3,46 m	74,6
6''	3,32 d (10,2)	65,9
	3,53 d (10,2)	
1'''	4,34 d (1,2) rha	100,5
2'''	3,04 dd (0,6; 4,2)	70,6
3'''	3,36 dd (9,0; 4,2)	72,6
4'''	3,34 t (9,0)	73,3
5'''	3,30 m	69,2
6'''	1,01 d (6,0)	18,4

14,1 T, DMSO-d₆).

Deslocamentos químicos comparados com a literatura:
HARBORNE, 1996 e AGRAWAL, 1989.

Figura 25 - Estrutura da substância SL-6.



A fração **SL-7** apresentou-se como uma mistura de flavonoides, onde no espectro de RMN (Figura 27) o perfil da substância majoritária é idêntico ao composto **SL-6**.

As diferenças desta substância para a **SL-6** foram observadas no espectro de RMN onde se observam os sinais de outro derivado do kaempferol (minoritário), porém monoglicosilado, denominado de **SL_7b** (Figura 27). Observa-se que os deslocamentos químicos dos H-8 do Anel A e H-2'/6' do Anel B são mais desblindados (δ 6,42 e δ 8,05 respectivamente). O espectro de massas (Figura 30) apresentou o ion da molécula desprotonada em m/z 447, comprovando que este flavonoide é um monoglicosídeo do kaempferol e, também, mostrou pico base em m/z 285. Juntamente com a análise do TOCSY 1D (Figura 29) irradiado em δ 5,45 e do HSQC (Figura 28), esta substância foi determinada como sendo o kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (Figura 26).

Figura 26 - Estrutura da substância majoritária da fração **SL_7**.

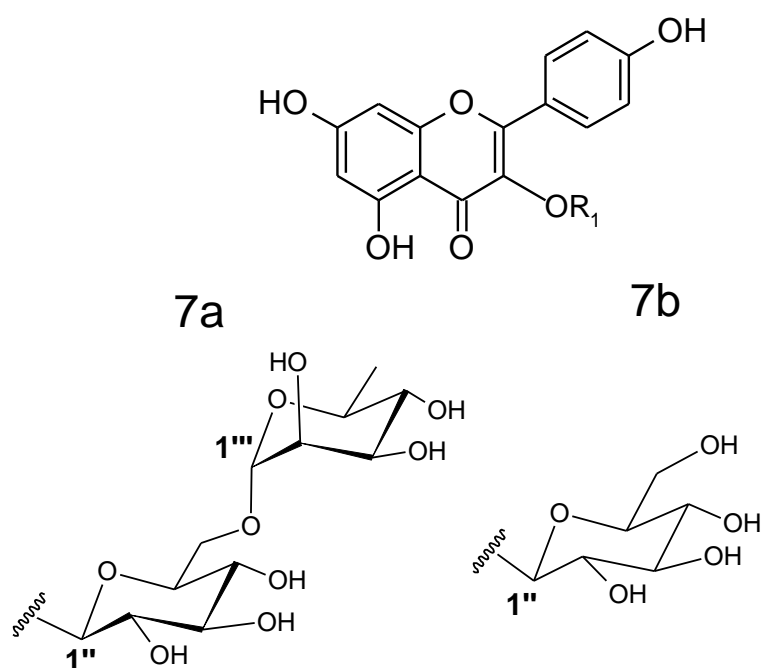


Figura 27 - Espectro de RMN ^1H da substância **SL_7** (14,1 T, DMSO-d_6). Região estendida 5,0 - 8,5 Hz.

Joao_SL_7 (2).5.1.1r

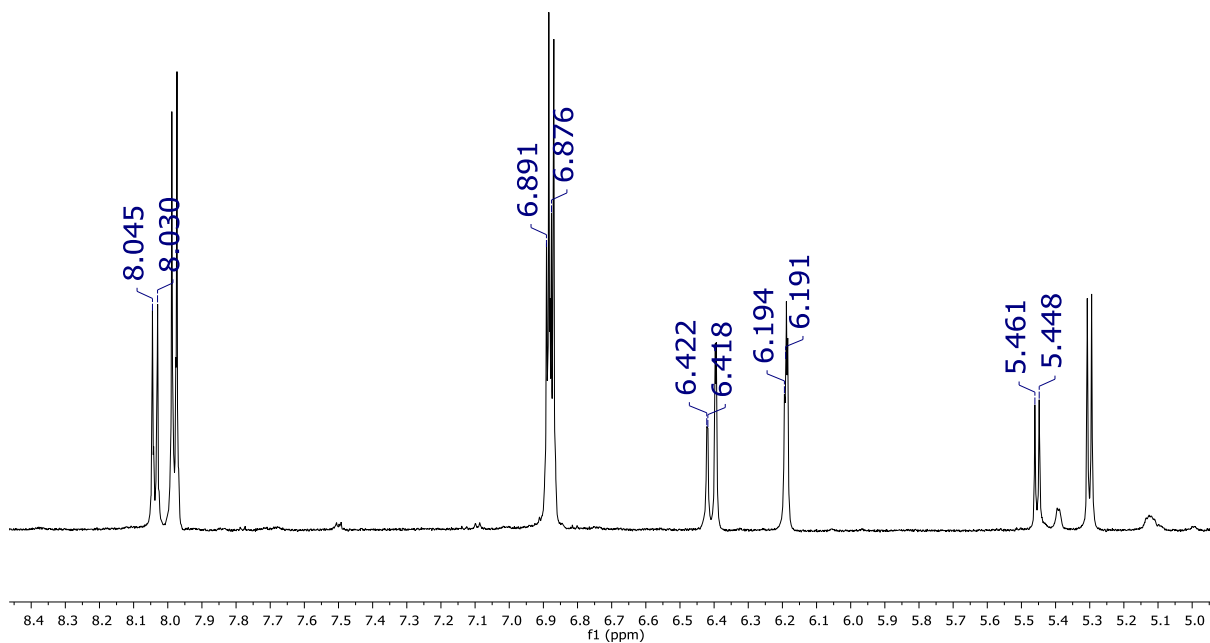


Figura 28 - Mapa de Contorno HSQC Fração **SL_7** (DMSO-D_6 , 14,1 T).

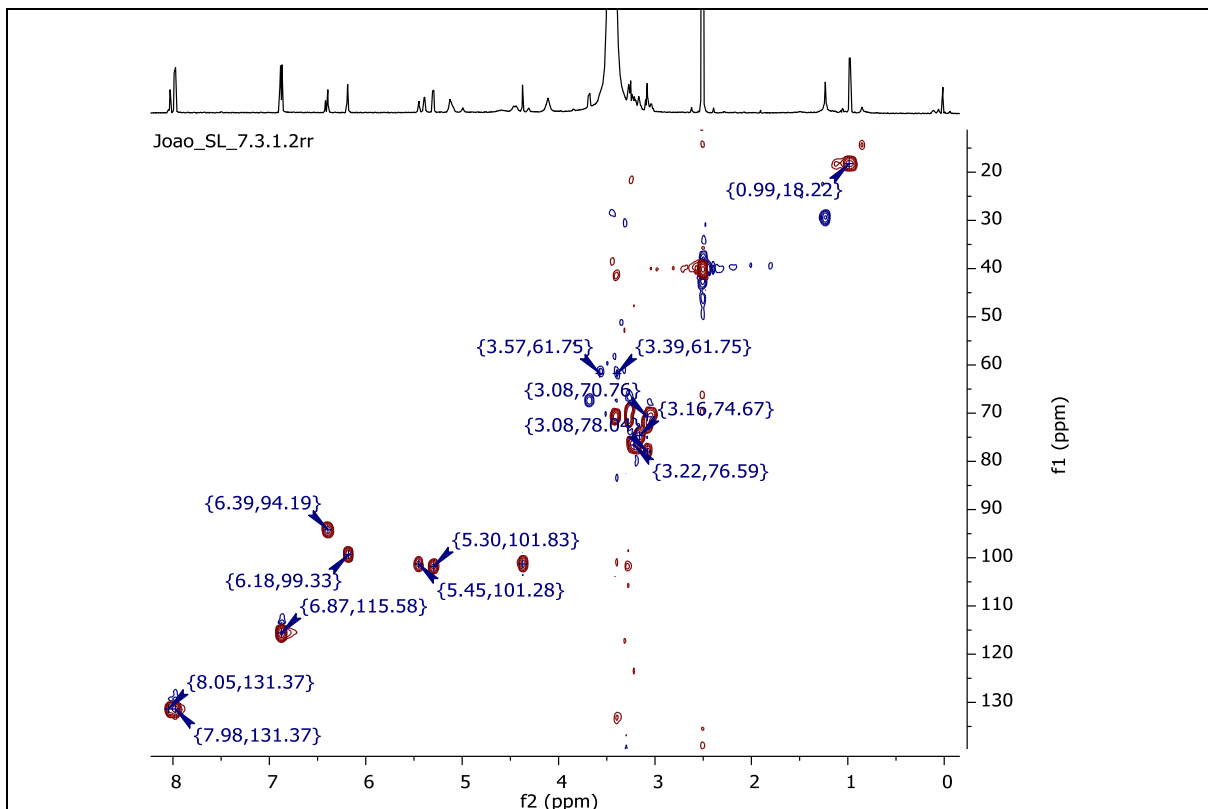


Figura 29 - TOCSY 1D da fração **SL_7b** com irradiação em 5,45.

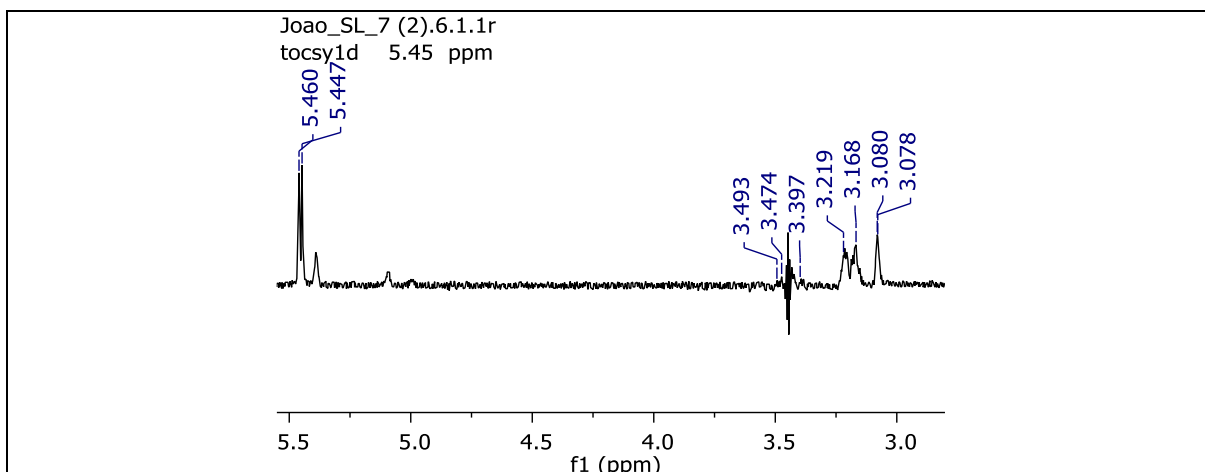


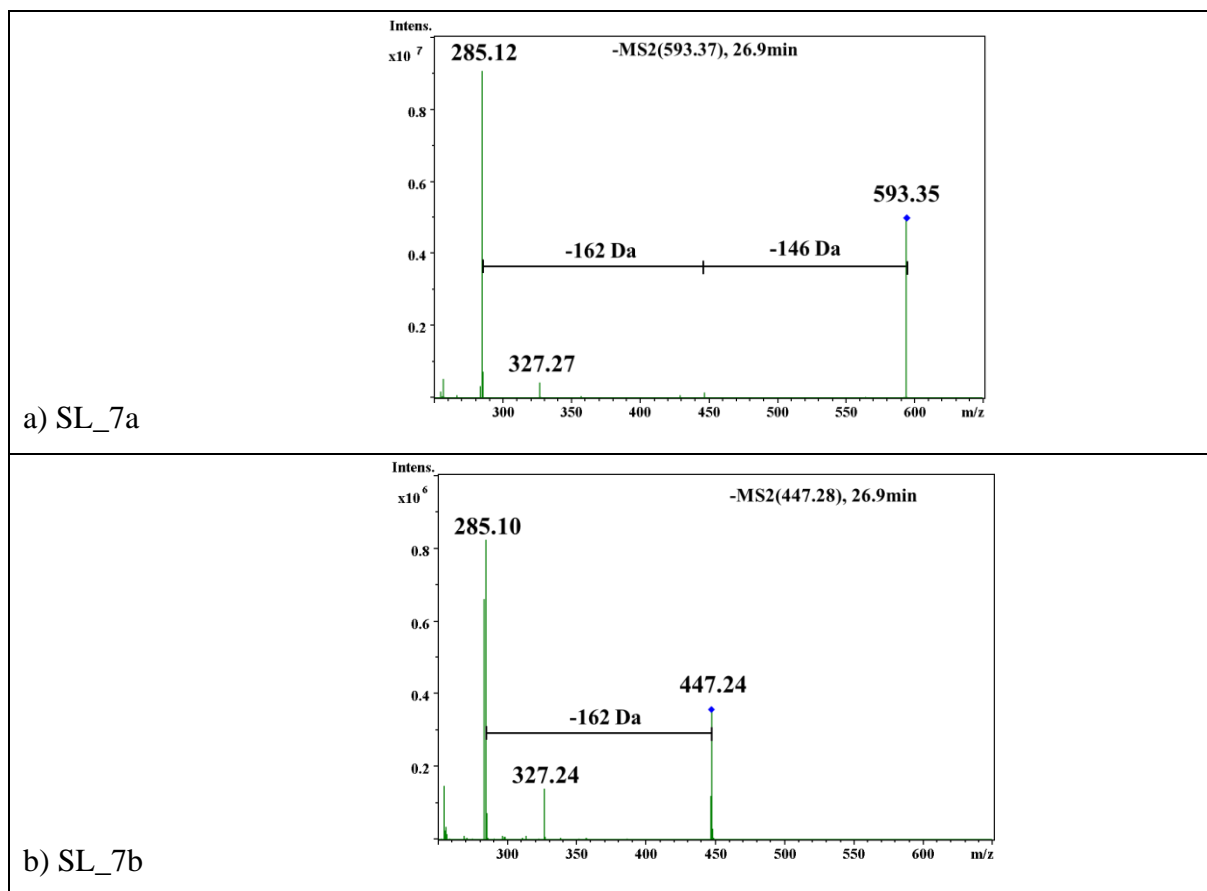
Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C da mistura de flavonoides na fração **SL_7**.

7a			7b	
Posição	^1H (J = Hz)	^{13}C	^1H (J = Hz)	^{13}C
2	-	156,5		156,5
3	-	134,3		134,3
4	-	-		-
5	-	161,3		161,3
6	6,18 d (1,8)	99,3	6,19 d (1,8)	99,3
7	-	165,0		165,0
8	6,39 d (1,8)	94,2	6,42 d (1,8)	94,2
9	-	157,0		157,0
10	-	104,1		104,1
1'	-	121,3		121,3
2'	7,98 dd (9,0; 1,8)	131,4	8,04 dd (9,0; 1,8)	131,4
3'	6,88 dd (9,0)	115,5	6,89 dd (9,0)	115,5
4'	-	160,5	-	160,5
5'	6,88 dd (9,0)	115,5	6,89 dd (9,0)	115,5
6'	7,99 dd (9,0; 1,8)	131,4	8,04 dd (9,0; 1,8)	131,4
1''	5,30 d (7,8) glc	102,5	5,45 d (7,8) glc	101,5
2''	3,33 dd (7,8; 9,0)	73,5	3,16 dd (7,8; 9,0)	74,6
3''	3,53 t (3,6)	74,2	3,22 t	76,5
4''	3,54 m	68,5	3,08 m (8,8)	70,7
5''	3,46 m	74,6	3,08 m	78,0
6''	3,32 d (10,2) 3,53 d (10,2)	65,9	3,49 d (10,1) 3,39 d (10,1)	61,7
1'''	4,37 d (1,2) rha	100,5	-	-
2'''	3,04 dd (0,6; 4,2)	70,6	-	-
3'''	3,36 dd (9,0; 4,2)	72,6	-	-
4'''	3,34 t (9,0)	73,3	-	-
5'''	3,30 m	69,2	-	-
6'''	0,98 d (6,0)	18,4	-	-

14,1 T, DMSO-d₆).

Deslocamentos químicos comparados com a literatura: HARBORNE, 1996 e AGRAWAL, 1989.

Figura 30 - Espectro de massas da fração SL_7: a) MS/MS SL_7a m/z 593; b) MS/MS SL_7b 447.



4.5 Estudos da Fração *n*-BuOH por LC-MS/MS

Diversos flavonoides são isômeros de posição e/ou estereoisômeros com diferentes padrões de substituição, portanto possuem polaridade e solubilidade muito parecidas, o que faz com que essas substâncias acabem coeluído durante uma cromatografia líquida (STOBIECKI et al, 2010). Portanto, métodos tradicionais de isolamento e purificação por cromatografia líquida (HPLC, UPLC) para posterior elucidação estrutural por espectroscopias de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) podem ser comprometidas.

MS/MS ou MS^2 ou *tandem mass spectrometry* é um método alternativo a esse problema e envolve pelo menos duas etapas de análise de massas sendo que na primeira etapa ocorre a seleção do íon precursor (MS^1) que será fragmentado novamente, por exemplo, por colisão com gás (N_2 , He, Ar) e irá gerar os íons produtos (MS^2) (HOFFMANN; STROOBANT, 2008). Este método possui alta especificidade e sensibilidade, sendo que os analitos podem ser medidos em misturas complexas de acordo com sua fragmentação, ou seja, pela análise dos íons precursores, íons produtos e perda neutra (PIRAUD et al, 2018). Além disso, essa técnica envolve um rápido preparo de amostra e baixo consumo devido sua alta sensibilidade e não requer várias etapas de

preparo de amostra o que a torna mais viável em relação a outros métodos analíticos (QIN et al, 2017).

Uma fonte de ionização muito utilizada na determinação de flavonoides é *Electrospray Ionization* (ESI). Após aplicação da amostra na fonte de ionização, a solução/mistura atravessará o capilar e, quando chegar à saída deste, sofrerá a ação de um forte campo elétrico que irá induzir o acúmulo de cargas no líquido, gerando gotículas carregadas que são submetidas a um gás secante para remoção do solvente. Essa técnica pode ser aplicada tanto para compostos polares quanto para apolares, principalmente para ionizar substâncias sensíveis à degradação térmica (HOFFMANN; STROOBANT, 2008).

Pilon e colaboradores (2019) utilizaram cromatografia líquida combinada com espectrômetro de massas equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS) como uma maneira de caracterizar estruturalmente os flavonoides e reportaram que essa técnica está sendo muito utilizada para esse fim. A literatura reportou análises para flavonoides mono-, di-, tri- e treta-glicosídeos (QIN et al, 2017).

A caracterização da fração butanólica utilizando LC-ESI-MS/MS de baixa resolução, acoplado a um sistema de separação, como o HPLC, permite obter seletividade e certa sensibilidade para obter informações estruturais de um extrato vegetal, que é considerado uma matriz biológica complexa (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013; WOLFENDER et al., 2015). Auxiliado pelo *software* DataAnalysis 4.3 e utilizando dados da literatura e bibliotecas de metabólitos (KNAPSAcK®) e de espectros de massas (MoNA, HMDB), é possível analisar os espectros, anotar as substâncias e propor parcialmente as estruturas dos compostos presentes na fração *n*-BuOH, mas ainda assim, fornece informações úteis para caracterizar um perfil químico.

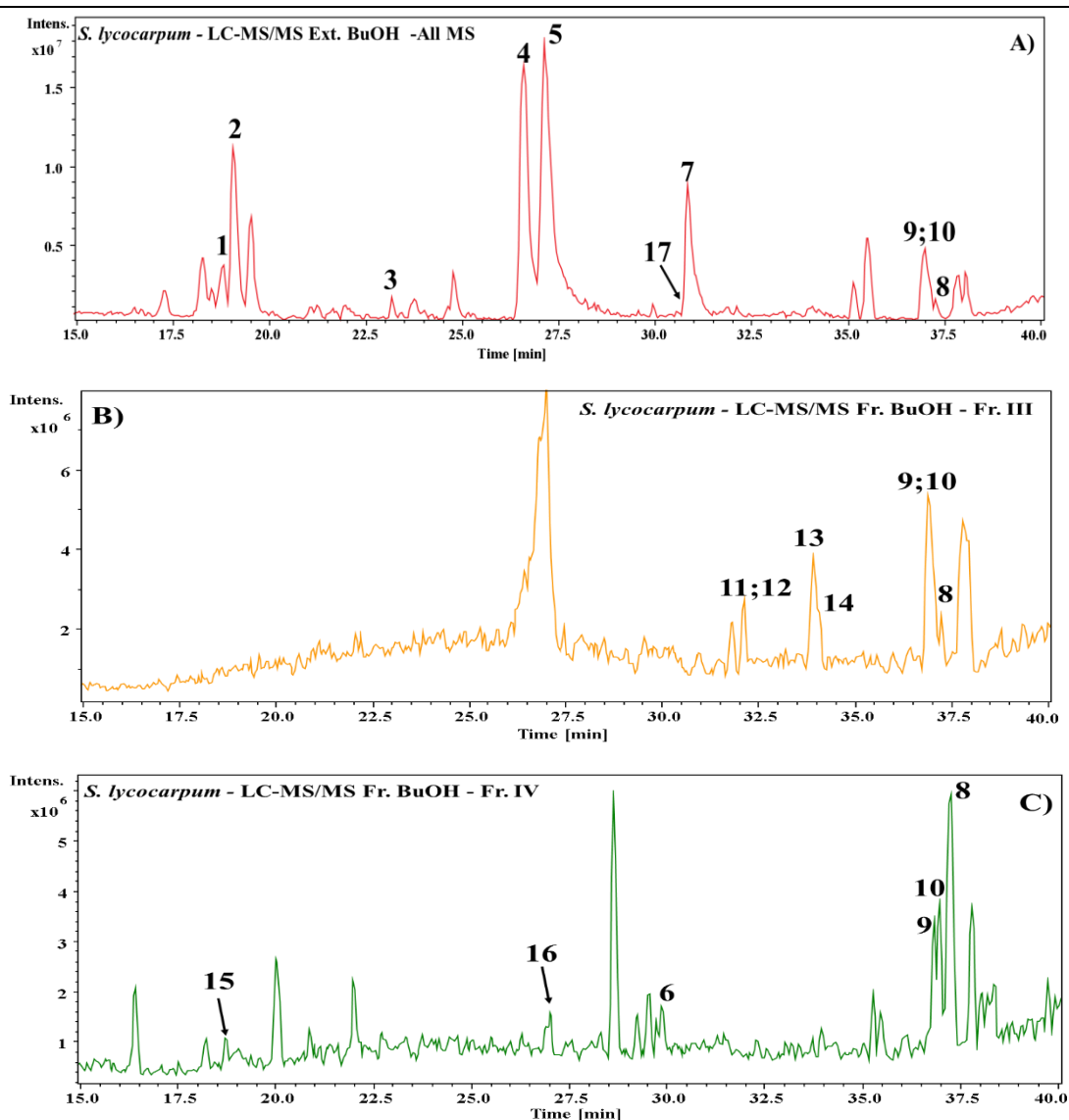
O perfil químico obtido por LC-MS/MS da fração butanólica e de duas frações obtidas pelo Sephadex LH-20, Fr. III e Fr. IV (Figura 31) permitiram a anotação dos íons das moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ nos espectros de massas de primeira ordem (MS^1).

Uma análise minuciosa do espectro de ESI-MS/MS permitiu propor os padrões de fragmentação de compostos fenólicos na fração *n*-BuOH proveniente do extrato EtOH 70%. Estudando-se os padrões de fragmentação individual de cada íon foi possível diferenciar e determinar o grau de glicosilação das substâncias anotadas pela análise das perdas características de unidades glicosídicas.

Foi reportada na literatura que é possível evidenciar o grau de glicosilação e a natureza glicosídica pela análise dos padrões de clivagem da ligação *O*-glicosídica. Os átomos de

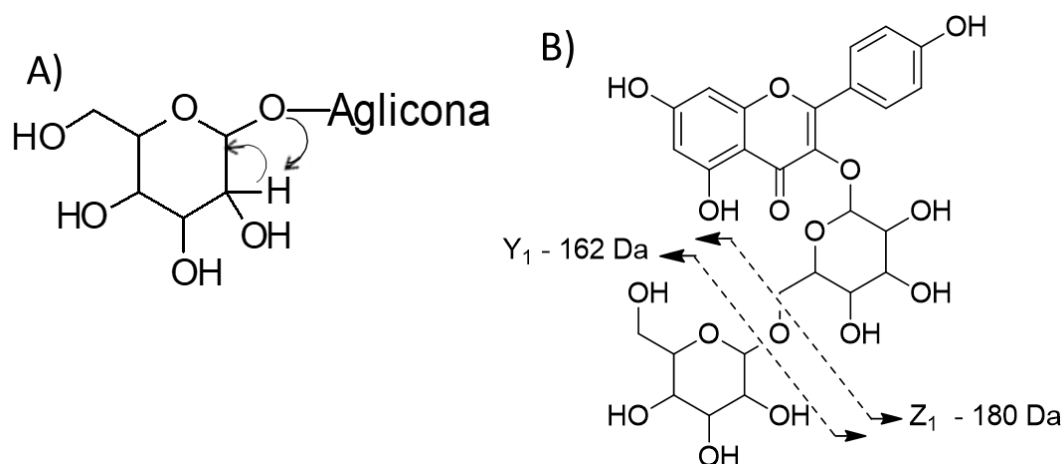
hidrogênio do grupo hidroxila nas posições C-3, C-5 e C-7 da aglicona do flavonoide sofrem um rearranjo com a unidade de açúcar, seguidas pela eliminação de monossacarídeo com perdas de massa de 162 Da (hexose), 146 Da (deoxihexose) e/ou 132 Da (pentose) como ocorre na Figura 32.A. Este tipo de fragmentação é chamada de Y_i (SILVA, 2016; VUKICS; GUTTMAN, 2008). Quando dois, ou mais, açúcares estão ligados entre si (di-, tri-, tetrassacarídeos), eles podem sofrer as clivagens descritas acima, mas também sofrem uma clivagem minoritária que libera a molécula de açúcar inteira (íon Z_i), com perdas de massa de 180 Da (hexose), 164 Da (deoxihexose) e/ou 150 Da (pentose), visto na Figura 32.B (VUKICS; GUTTMAN, 2008; CABRERA, 2006; CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Figura 31 - Perfil cromatográfico por LC/MS das frações obtidas a partir do extrato etanol 70% das folhas de *S. lycocarpum*: A) Fração *n*-BuOH; B) Fração III; C) Fração IV. Coluna Luna® (250 x 4.60 mm, 5 micron).



Coluna Luna® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Gradiente linear com método 5% a 100% MeOH, 45 min a 254 nm. Região estendida de 15-40 min.

Figura 32 - Padrão de fragmentação para moléculas *O*-glicosiladas com o rearranjo de hidrogênios.



Fonte: Modificado de CUYCKENS; CLAEYS, 2004 e VUKICS; GUTTMAN, 2008.

A posição dos glicosídeos nos flavonoides pode ser sugerida de acordo com a análise da intensidade dos sinais dos íons produtos da molécula desprotonada da aglicona, em que os flavonoides 3-*O*-glicosilados apresentam uma abundância relativa dos íons produtos superiores à dos íons produtos formados decorrentes da fragmentação de flavonoides 7-*O*-glicosilados, como ocorre com a substância **1** (VUKICS; GUTTMAN, 2008). Além disso, os íons produtos formados podem caracterizar fragmentos de flavonoides *O*-diglicosilados e di-*O*-glicosilados, permitindo a diferenciação de ligações interglicosídicas (SILVA, 2016; ZANATTA et al, 2017).

A partir da análise do espectro LC-MS/MS obtido foram observados os padrões de fragmentação de certos picos e algumas substâncias foram anotadas. Com isso, foram observadas 19 substâncias divididas em 2 classes de metabólitos: as substâncias **1-7** e **15-17** são flavonoides enquanto as substâncias **8-14** foram anotadas como sendo saponinas. Os padrões de fragmentação de cada substância, assim como seu tempo de retenção (t_R) e íons moleculares desprotonados estão dispostos na Tabela 7. Os espectros de massas LC-MS/MS das substâncias **1-8** obtidas a partir da fração *n*-BuOH estão dispostos na Figura 34 e os espectros encontrados na literatura para comparação das substâncias 1-7 estão na Figura 35. As estruturas moleculares das substâncias anotadas **1-10** estão dispostas na Tabela 8.

A análise do espectro de massas da substância **1** (Figura 34.1) permitiu observar o pico base em m/z 593, sendo o íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ observado em m/z 755 (12%). O íon com m/z 285 (10%) confirma que sua aglicona é de um kaempferol. O padrão de fragmentação mostra 3 clivagens principais, revelando a presença de um derivado do kaempferol triglicosilado. O íon da molécula desprotonada em m/z 755 sofre uma clivagem fornecendo o íon m/z 593 com liberação de uma molécula de hexose $[M-162-H]^-$. Dados da

literatura (VUKICS; GUTTMAN, 2008) apontam que essa hexose esteja isolada dos outros açúcares em uma posição diferente na aglicona, potencialmente na posição C-3, dado a alta intensidade do íon produto. É observada a perda de 308 Da em m/z 593 para 285 (5%) $[M-162-308-H]^-$ e esta informação, segundo Vukics e Guttman (2008), sugerem que dois açúcares estão ligados entre si e que há uma deoxihexose terminal, visto que há uma outra fragmentação com perda de 146 Da gerando o íon fragmento m/z 447 (8%) $[M-162-146-H]^-$. Portanto, o padrão de fragmentação permitiu anotar essa substância como sendo o Kaempferol-3-*O*-hexose-7-*O*-hexose-deoxihexose.

O padrão de fragmentação da substância **2** apresentou alguns fragmentos, como seu pico base em m/z 447, o íon da molécula desprotonada em m/z 609 e a aglicona em m/z 285 (54 % e 34 % respectivamente). Seu padrão de fragmentação pode ser visto na figura 34.2, cuja análise revelou que as clivagens geram perdas iguais de massa de 162 Da, quando ocorre clivagem de m/z 609 gerando o fragmento m/z 447 $[M-162-H]^-$ e de m/z 447 gerando m/z 285 $[M-162-162-H]^-$. Isso indica que há a presença de dois açúcares ligados em posições diferentes, pois pela técnica da espectrometria de massas de baixa resolução, as hexoses possuem massas iguais e irão gerar fragmentos com a mesma relação m/z , não importando onde ocorra a clivagem e, por conta disso, o pico base em m/z 447 possui alta intensidade. Sendo assim, essa substância foi anotada como sendo o Kaempferol-3,7-*O*-dihexose. Porém uma substância semelhante já foi reportada no gênero *Solanum* na base de dados KNApSACk e seu padrão de fragmentação é semelhante, sendo esta o Kaempferol-3,7-*O*- β -D-diglucopiranosídeo (FERRERES et al, 2005).

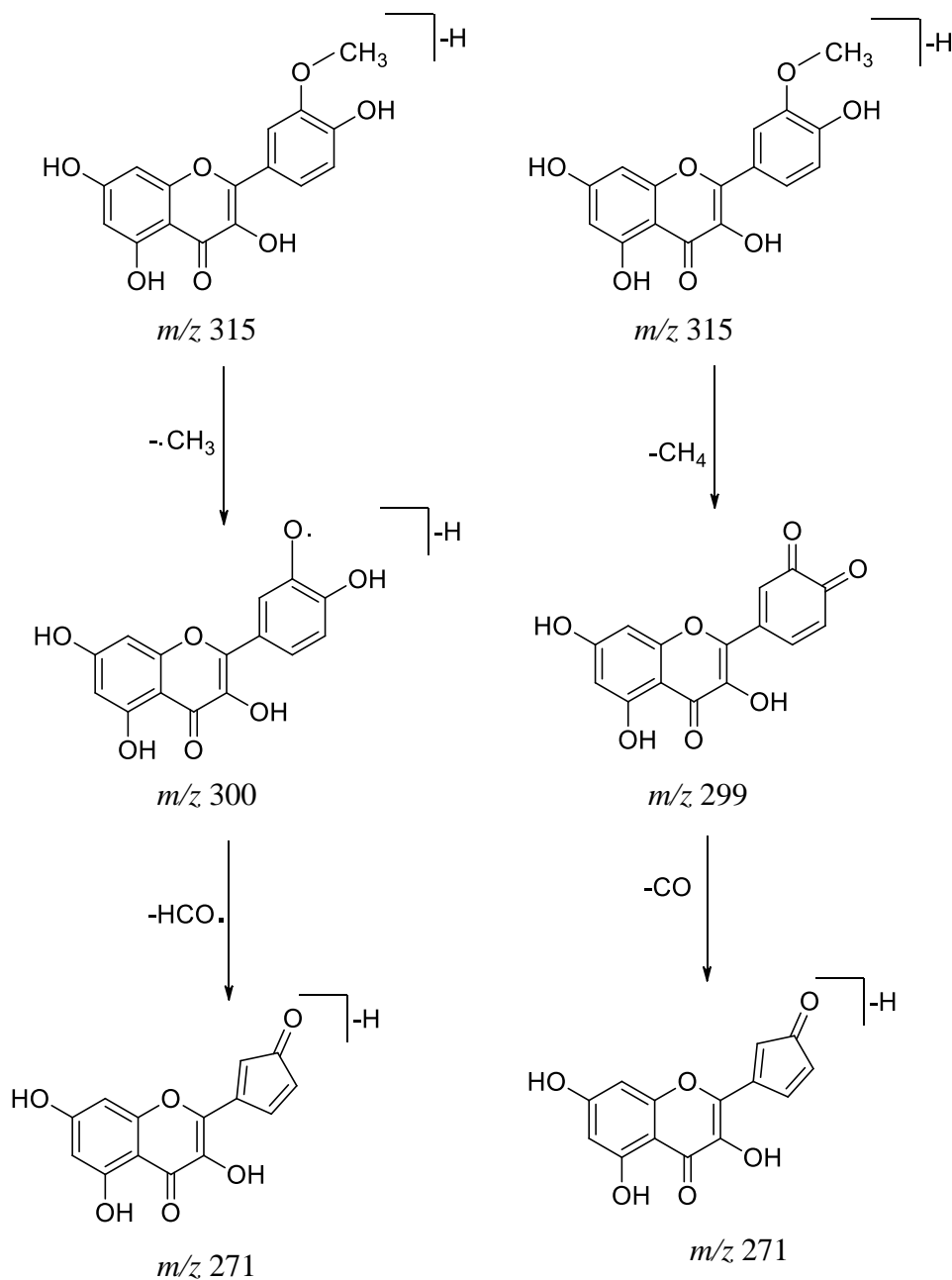
A análise do espectro da substância **3** (Figura 34.3) revelou um derivado diglicosilado do kaempferol, devido ao pico em m/z 285 (72%) com pico base em m/z 609. Seu padrão de fragmentação revelou a perda de 324 Da, correspondente a duas unidades de hexoses que estão ligadas entre si, dado que a clivagem majoritária elimina os dois açúcares juntos. Um sinal em m/z 447 (35%) $[M-162-H]^-$ e outro em m/z 429 (íon Z_1 – 29%) $[M-180-H]^-$ confirmam a presença de duas hexoses ligadas entre si. Sendo, assim essa substância foi anotada como Kaempferol-3-*O*-hexose-hexose. Uma substância análoga encontrada na literatura e no gênero *Solanum* é o Kaempferol-3-*O*-sophorosídeo (Figura 35.3) (LLORACH, 2003).

O espectro de massas da substância **4** (Figura 34.4) mostrou um derivado do kaempferol monoglicosilado visto pico base em m/z 285. É observada uma clivagem de 162 Da a partir de m/z 447 (53%) $[M-162-H]^-$. Portanto essa substância possui uma hexose e foi anotada como Kaempferol-3-*O*-hexose. Diversos análogos foram reportados anteriormente no gênero, como

o Kaempferol 3-glucosídeo ou Astragalina e seu padrão de fragmentação encontrado na literatura está na Figura 32.4 (AN et al, 2013).

A substância **5** revelou ser um derivado metoxilado de flavonoide, visto que o padrão de fragmentação destes compostos estão bem descritos na literatura. Quando analisados por *electrospray*, estas moléculas apresentam perdas concomitantes de 15 e 29 Da, referidos aos radicais $\bullet\text{CH}_3$ e $\bullet\text{HCO}$ gerando rearranjo nos anéis (ZANATTA, 2017) (Figura 33).

Figura 33 - Padrão de fragmentação de flavonoides metoxilados desprotonados.



Fonte: Modificado de ZANATTA, 2017.

A análise do espectro de massas da substância **5** (Figura 34.5) mostrou perdas de 15 Da de m/z 315 para m/z 300 (37 %) $[\text{M}-\text{H}-15]^-$ e de 29 Da $[\text{M}-\text{H}-15-29]^-$ formando o íon m/z 271

(11 %), comprovando a metoxilação do composto. Além disso, revelou o pico base em m/z 315 Da e o íon da molécula desprotonada em m/z 623 (88 %) que sofre uma clivagem com perda de massa de 308 Da referente a duas unidades de açúcar $[M-H-308]^-$, sugerindo, também, dois açúcares ligados entre si. Além disso, a perda de 146 Da fornece o íon em m/z 477 (3%) e comprova que há uma deoxihexose terminal. Sendo assim, essa substância foi anotada como Metóxiquercetina-3-*O*-hexose-deoxihexose e, após comparação com dados da literatura (Figura 35.5) (INBARAJ, 2010), foi encontrado uma substância com padrão de fragmentação semelhante, sendo esta a Isorhamnetina-3-*O*-rutinosídeo, já identificada anteriormente no gênero *Solanum*.

As substâncias **6** e **7** (espectros nas Figuras 34.6 e 34.7) apresentam o mesmo padrão de fragmentação, porém possuem agliconas diferentes (quercetina e kaempferol, respectivamente), visto que a substância 6 possui um sinal em m/z 301 (91 %) e a 7 possui pico base em m/z 285. Ambas apresentam perda de 308 Da partindo dos íons moleculares desprotonados (pico base em m/z 609 e íon m/z 593, respectivamente) até a aglicona. Possuem uma deoxihexose terminal devido a perda de 146 Da seguida pela perda de 164 Da e, portanto, podem ser consideradas ambas rutinosídeos. Estas substâncias já foram reportadas no gênero *Solanum* e são, respectivamente, quercetina-3-*O*-rutinosídeo e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo. A rutina já foi identificada neste trabalho no item 4.2 e o derivado do kaempferol foi identificado na literatura por Ferreres e colaboradores (2005). Ambos os espectros de massas encontrados na literatura podem ser vistos nas Figuras 35.6 e 35.7.

A substância **8** foi identificada como sendo o Lyconosídeo III mesmo sem ter sido encontrado um padrão de fragmentação por MS na literatura. Isso se deve porque esse composto já foi identificado anteriormente por Nakamura e colaboradores (2008) na espécie *Solanum lycocarpum*. A análise do padrão de fragmentação obtido por LC-MS/MS observado na Figura 31.8 revelou ser compatível com o Lyconosídeo III. Essa molécula possui tanto uma hexose quanto uma deoxihexose terminais, podendo gerar perdas de 162 Da ou 146 Da. A análise dos espectros possibilita inferir inicialmente a eliminação dos açúcares, ou seja, se houver perda de 162 Da, observa-se na sequencia outra perda de 146 Da e vice-versa. Após perder 308 Da, é observado um sinal em m/z 591 (7%). A análise minuciosa revelou também um sinal em m/z 429, porém com baixa intensidade (1 %) e seria o sinal da sapogenina, porém não foi considerado.

A análise dos espectros MS² dos compostos **9** e **10** (Figura 36) revelaram que eles podem ser derivados da substância **8** com uma unidade a mais de açúcar, porém não foram encontrados

os padrões de fragmentação. Estas substâncias foram também identificadas nas três frações (*n*-BuOH, Fr. III e Fr. IV) com os mesmos tempos de retenção e muito próximas ao pico do Lyconosídeo III (Figuras 31.A - C).

A análise da Figura 36 evidenciou a adição de uma unidade deoxihexose na substância **9** enquanto a substância **10** possui adição de uma hexose. A substância **9**, com íon da molécula desprotonada em m/z 1045 com intensidade de 40 % e pico base em m/z 899, teve seus fragmentos analisados que possibilitaram identificar duas deoxihexose ligada a uma hexose, visto que há duas perdas seguidas de 146 Da, gerando o pico base em m/z 899 e outro sinal em 773 (40 %) $[M-H-146-146]^-$. Outra possibilidade de clivagem foi encontrada, visto um sinal em m/z 737 (2 %) na qual ocorre a clivagem de uma unidade deoxihexose seguida pela clivagem de uma hexose $[M-H-146-162]^-$. Ambas as clivagens são seguidas de um sinal em m/z 591 (4 %), demonstrando a mesma fragmentação. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para a substância **10** que possui íon da molécula desprotonada com m/z 1061 havendo possibilidade de perder 162 Da inicialmente, dada a adição de uma hexose terminal.

Sendo assim, os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **7** são derivados do kaempferol enquanto os compostos **5** e **6** são derivados da quercetina. Já os compostos **8**, **9** e **10** são saponinas derivadas do Lyconosídeo III. As estruturas moleculares dos compostos anotados **1-10** obtidas pela análise dos espectros MS² estão dispostas na Tabela 8.

Tabela 8 - Substâncias anotadas com seus íons moleculares desprotonados, fragmentos e tempos de retenção.

	t_R (min)	[M-H]⁻	MS²	Substância	Amostra	Referência
1	18,8	755	593, 447, 285	Kaempferol-3- <i>O</i> -hexose-7-hexose-deoxihexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Proposta do autor
2	19,1	609	447, 285	Kaempferol-3,7- <i>O</i> -hexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Ferreres, 2005
3	23,4	609	447, 285	Kaempferol-3- <i>O</i> -hexose-hexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Llorach, 2003
4	26,8	447	285	Kaempferol-3- <i>O</i> -hexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	An, 2013
5	27,3	623	477, 315, 300, 271, 255	3'-Metóxi- <i>quercetina</i> -3- <i>O</i> -hexose-deoxihexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Inbaraj, 2010
6	29,7	609	463, 301	<i>Quercetina</i> -3- <i>O</i> -hexose-deoxihexose	Fr. IV	Ferreres, 2005
7	30,8	593	447, 285	Kaempferol-3- <i>O</i> -hexose-deoxihexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Ferreres, 2005
8	37,2	899	753, 737, 591	3,12-hidróxi-espiro- <i>stano</i> -3- <i>O</i> -hexose-hexose-deoxihexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Nakamura, 2008
Derivados Lyconosídeo III						
9	36,9	1045	899; 881; 753; 737; 591	3,12-hidróxi-espiro- <i>stano</i> -3- <i>O</i> -hexose-hexose-deoxihexose-deoxihexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Proposta do autor
10	36,9	1061	899; 881; 753; 737; 591	3,12-hidróxi-espiro- <i>stano</i> -3- <i>O</i> -hexose-hexose-hexose-deoxihexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Proposta do autor
Traços encontrados de saponinas (11-14) e flavonoides (15-17)						
11	32,4	882	720; 574	<i>Solasodina</i> -3- <i>O</i> -hexose-hexose-deoxihexose	Fr. III	Nakamura, 2008
12	32,8	866	720; 574	<i>Solasodina</i> -3- <i>O</i> -hexose-deoxihexose-deoxihexose	Fr. III	Nakamura, 2008
13	35	898	736; 590	12-hidróxi- <i>solasodina</i> -3- <i>O</i> -hexose-hexose-deoxihexose	Fr. III	Nakamura, 2008
14	35,2	882	736; 590	12-hidróxi- <i>solasodina</i> -3- <i>O</i> -hexose-deoxihexose-deoxihexose	Fr. III	Nakamura, 2008
15	18,9	609	447; 301	<i>Quercetina</i> -3- <i>O</i> -deoxihexose-hexose	Fr. IV	Proposta do autor
16	27,5	463	301	<i>Quercetina</i> -3- <i>O</i> -hexose	Fr. IV	Proposta do autor
17	30,6	593	431; 285	Kaempferol-3- <i>O</i> -deoxihexose-hexose	Fr. <i>n</i> -BuOH	Proposta do autor

Figura 34 - Espectros de massas LC/MSMS obtidos para as substâncias da fração BuOH: 1) substância **1**; 2) substância **2**; 3) substância **3**; 4) substância **4**; 5) substância **5**; 6) substância **6**; 7) substância **7**; 8) Substância **8**. Coluna Luna® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min⁻¹.

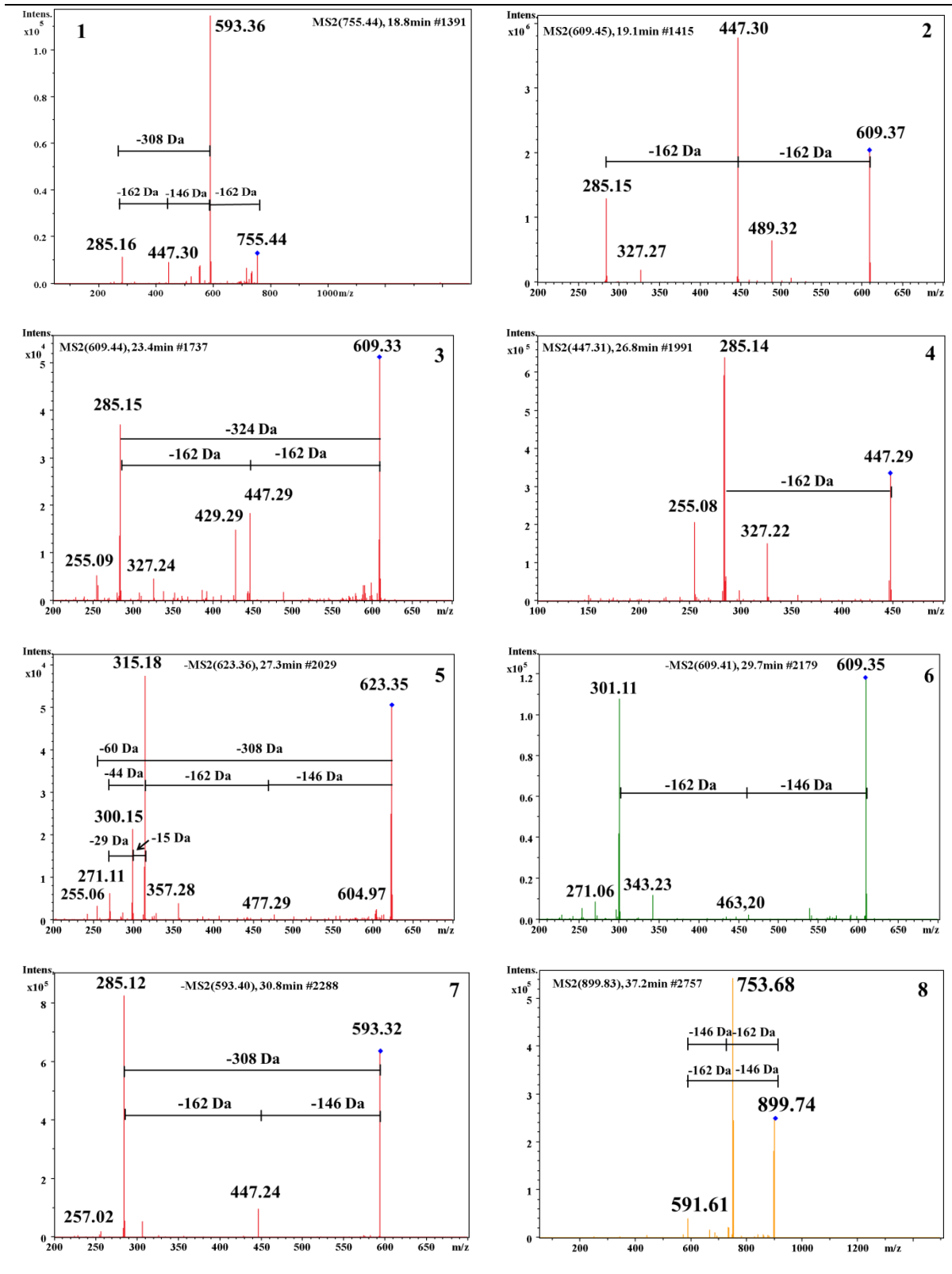
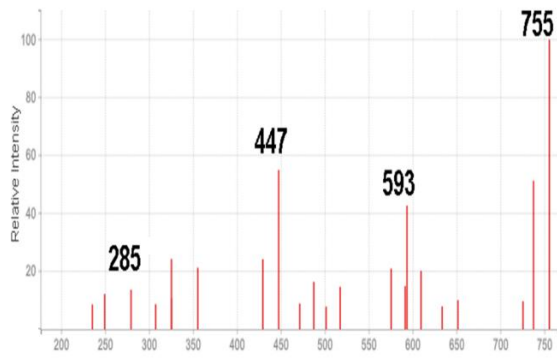
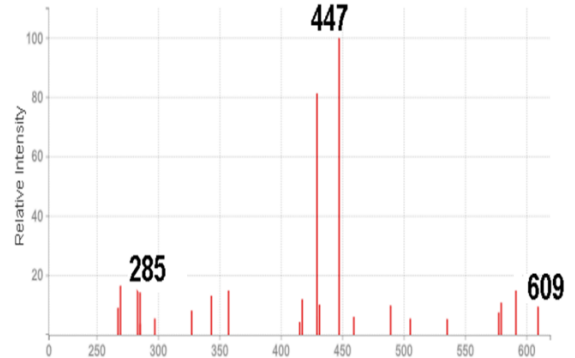


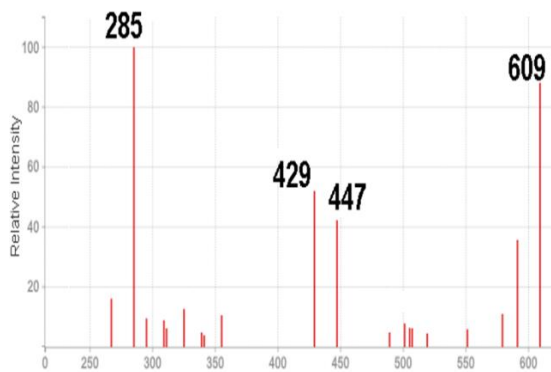
Figura 35 - Espectros de massas obtidos da literatura relativos às substâncias **1** a **7**.



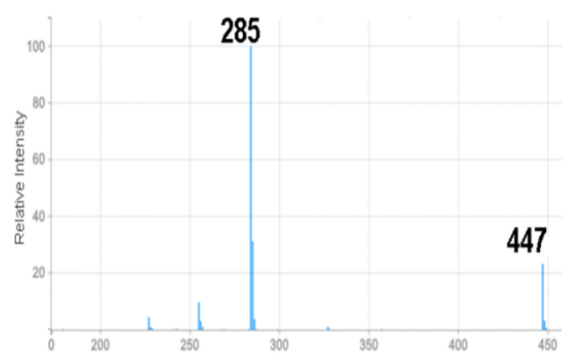
Fonte: <https://bit.ly/2QqPjIA>



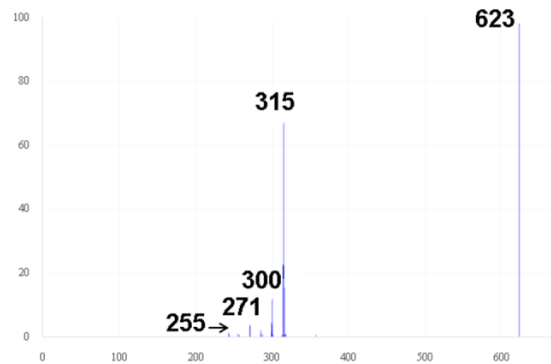
Fonte: <https://bit.ly/2XoSy50>



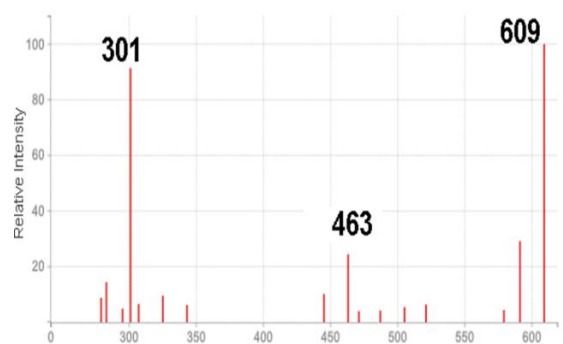
Fonte: <https://bit.ly/2NSjXJ9>



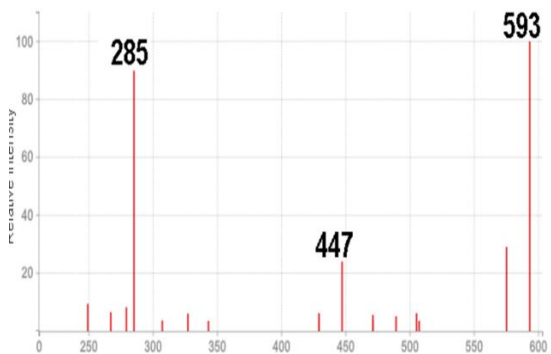
Fonte: <https://bit.ly/2XlgSV7>



Fonte: <https://bit.ly/37atGCn>



Fonte: <https://bit.ly/2lW8Wv9>



Fonte: <https://bit.ly/2OhcNND>

Figura 36 - Espectros de massas LC/MSMS obtidos para as substâncias da fração BuOH: 8) substância **8**; 9) substância **9**; 10) substância **10**. Coluna Luna® C₁₈ (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min⁻¹.

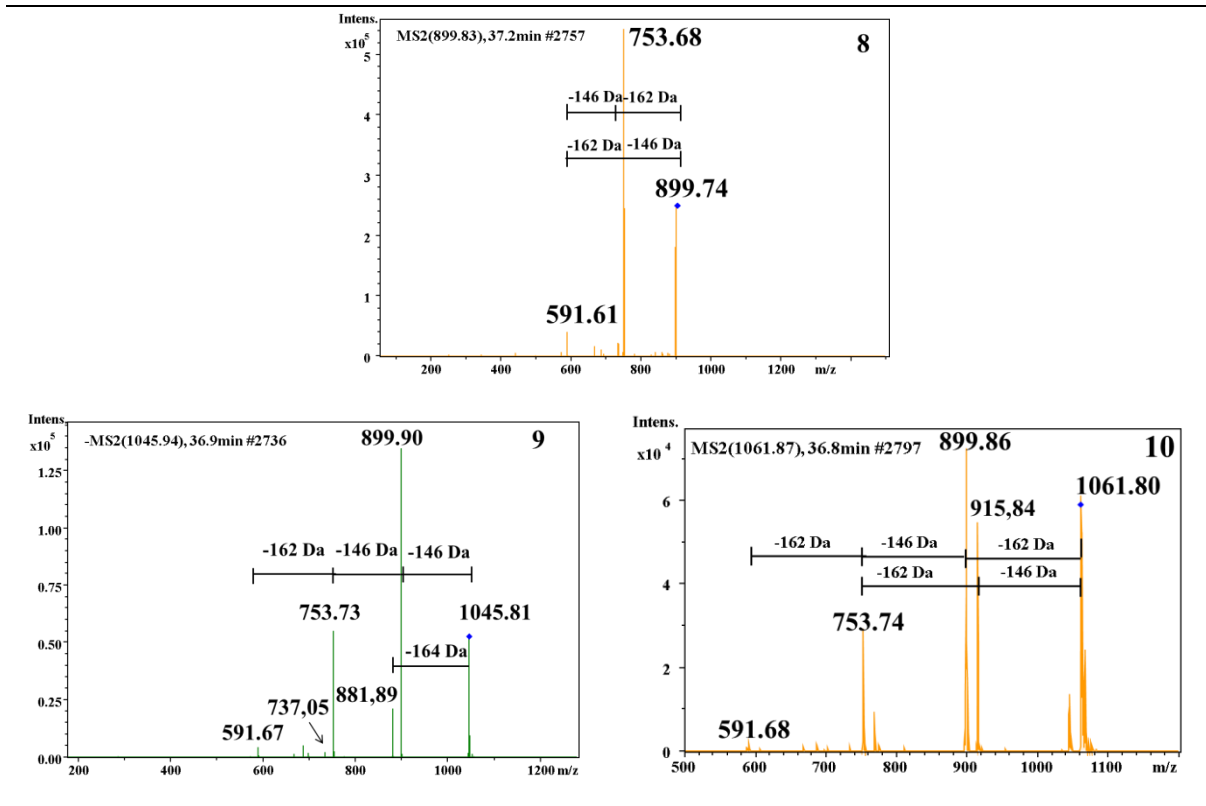
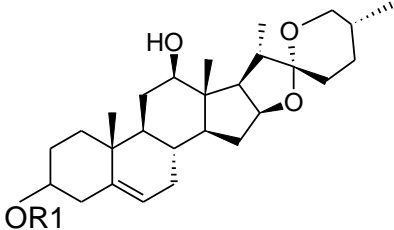
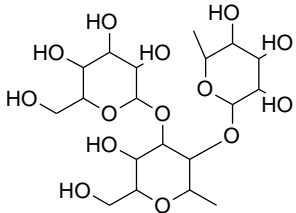
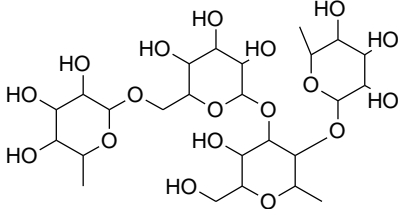
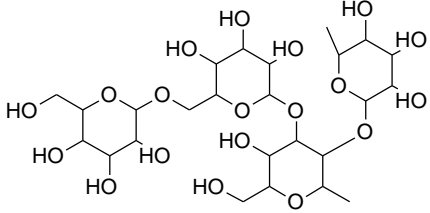


Tabela 9 - Estruturas propostas para os compostos anotados 1-10 por LC-MS/MS da fração *n*-BuOH:

		R₁	R₂
Derivados Kaempferol			
1			
2			
3			H
4			H
7			H
Derivados da Quercetina			
5			CH₃
6			H

	R₁	R₂	
Derivados Lyconosídeo III			
8			—
9			—
10			—

A análise dos espectros de massas LC-MS/MS das substâncias **11-19** permitiu observar sinais com baixa intensidade (10^4). As substâncias **11-14** foram identificadas na fração III, as substâncias **15-16**, na fração IV e a substância **17** foi identificada na fração butanólica. Suas estruturas moleculares estão dispostas na Figura 38.

A análise dos compostos **11-14** revelou padrão de fragmentação parecido com algumas substâncias identificadas por Nakamura e colaboradores (2008) na espécie *Solanum lycocarpum* e foram anotadas, respectivamente como Solasonina (**11**), Solamargina (**12**), Robeneosídeo B (**13**) e Robeneosídeo A (**14**).

O espectro de massas da substância **11** mostrou a clivagem de dois monossacarídeos seguidos, com perda de massa de 162 Da e 146 Da a partir do íon m/z 882 gerando o pico base em m/z 720 $[M-H-162]^-$ e o íon m/z 574 (5%) $[M-H-162-146]^-$ e, portanto, foi anotada como sendo a Solasonina, já que esta possui uma hexose e uma deoxihexose terminais.

O espectro MS^2 da substância **12** (Solamargina) segue um padrão de fragmentação parecido ao da substância **11**, com perdas seguidas de dois monossacarídeos, porém ele mostra a perda de duas deoxihexoses (Figura 37), sendo ambos açúcares terminais $[M-H-146-146]^-$, portanto foi anotado como sendo a Solamargina.

Os padrões de fragmentação das substâncias **13** e **14** são idênticos ao das substâncias **11** (Solasonina) e **12** (Solamargina) respectivamente. As diferenças entre as moléculas **11**, **12** e **13**, **14** estão na sapogenina, sendo que os Robeneosídeos B e A possuem uma hidroxila a mais na posição 12. Sendo assim, as substâncias **13** e **14** foram anotadas como sendo o Robeneosídeo B e Robeneosídeo A respectivamente.

Outras substâncias já identificadas na espécie *Solanum lycocarpum*, porém não foram encontradas no LC-MS/MS da fração *n*-BuOH, sendo estas: os Lyconosídeo Ia e Ib, o Lyconosídeo II, o Lyconosídeo IV, a 12-hidroxisolasonine, o lobofrutosídeo, o ácido clorogênico, o ácido cafeico e a Solasodina (NAKAMURA et al, 2008; KAUNDA; ZHANG, 2019).

Além dessas saponinas, foram identificadas também traços de flavonoides. As substâncias **15** e **17** possuem o mesmo padrão de fragmentação com perdas de massa de 162 Da e 146 Da seguidas ou com perdas totais de massa de 308 Da. A substância **15** possui pico base em m/z 609 e sua aglicona é uma quercetina, visto pico em m/z 301 (85%). A clivagem que ocorre majoritariamente elimina as duas unidades de açúcares com perda de 308 Da $[M-H-308]^-$, mas possui clivagem dos açúcares separadamente, na qual a hexose terminal é clivada gerando perda de massa de 162 Da e fornecendo o íon m/z 447 (48 %) $[M-H-162]^-$ seguida pela clivagem da deoxihexose revelando a aglicona $[M-H-162-146]^-$. Essa substância foi anotada como sendo quercetina-3-*O*-deoxihexose-hexose. A substância **17** é um derivado do kaempferol, visto o pico base em m/z 285 e possui o mesmo padrão de clivagem, portanto foi anotada como kaempferol-3-*O*-deoxihexose-hexose.

O espectro MS² da substância **16** revelou pico base em m/z 301 e outro pico em m/z 463 (20 %) e uma única clivagem com perda de massa de 162 Da $[M-H-162]^-$, indicando que uma unidade de quercetina está ligada a uma hexose. Sendo assim, essa substância foi anotada como Quercetina-3-*O*-hexose e um análogo já encontrado no gênero *Solanum* na base de dados KNApSACk[®] é a Quercetina-3-*O*-glucosídeo.

Figura 37 - Espectros de massas MS² obtidos para as substâncias da fração *n*-BuOH: 11) substância **11**; 12) substância **12**; 13) substância **13**; 14) substância **14**; 15) substância **15**; 16) substância **16**; 17) substância **17**. Coluna Luna® C18 (250 x 4.60 mm, 5 micron). Método 5-100% MeOH 45 min. Vazão 1mL.min-1.

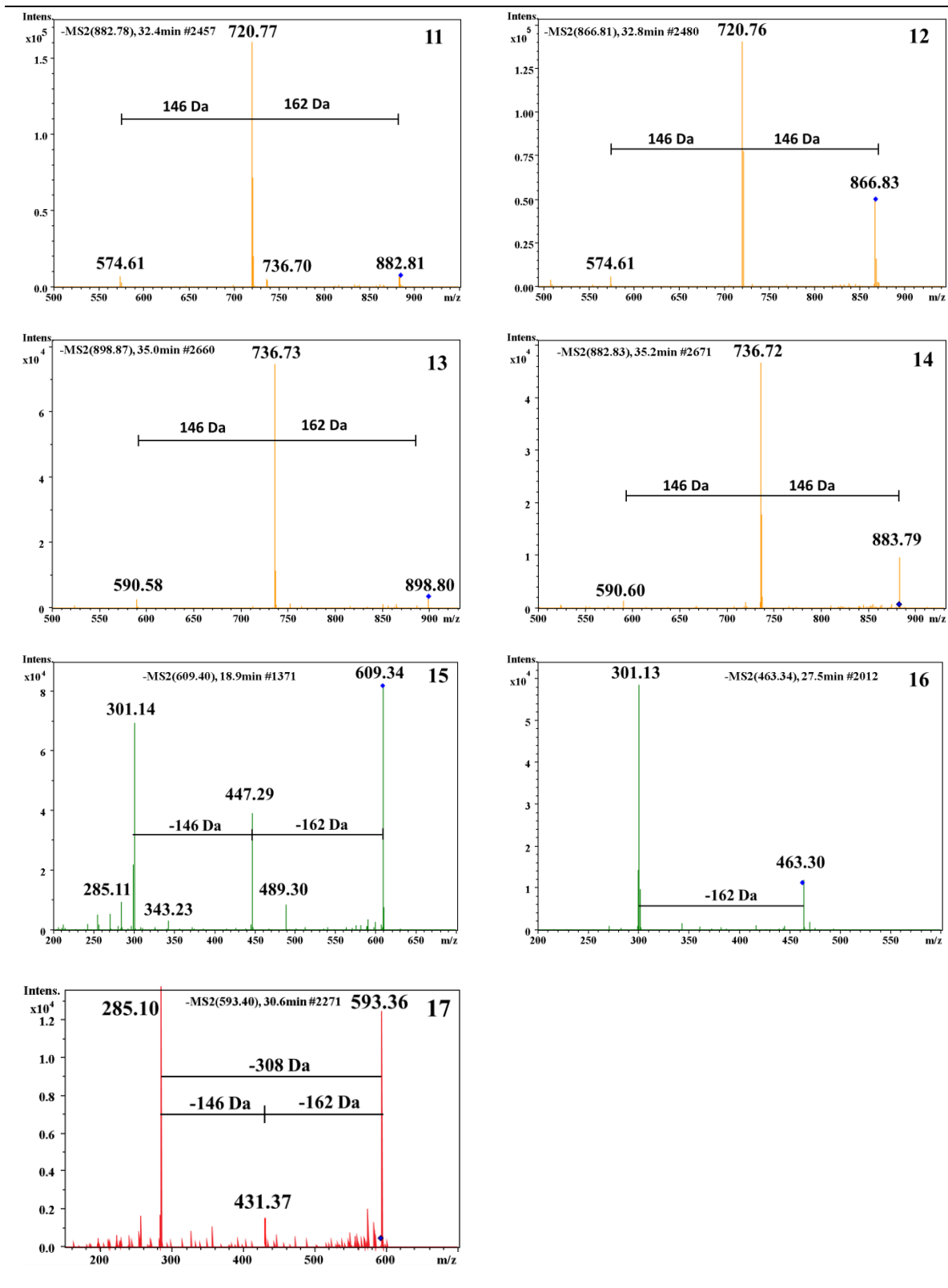
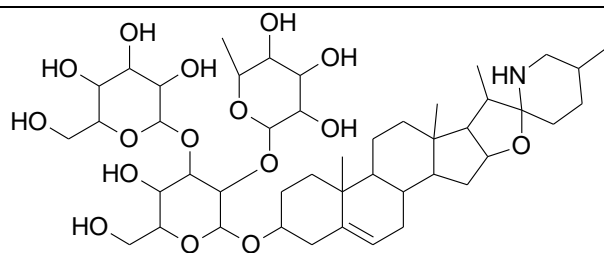
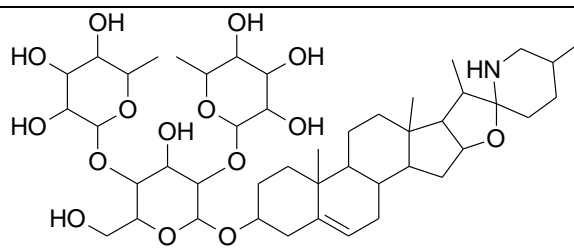


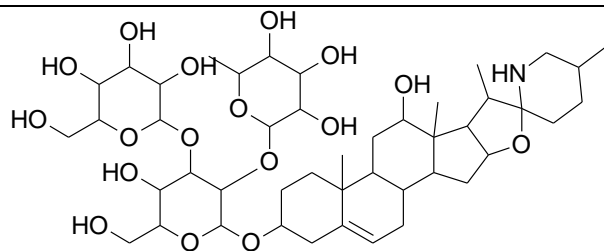
Figura 38 - Estrutura moleculares dos compostos **11-17**.



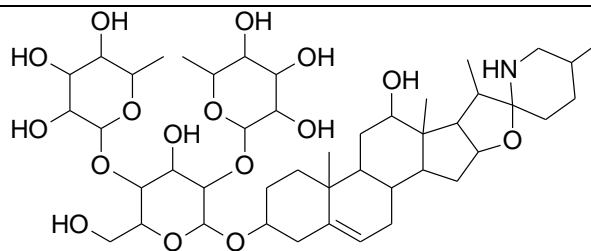
Subs **11**. Solasonina.



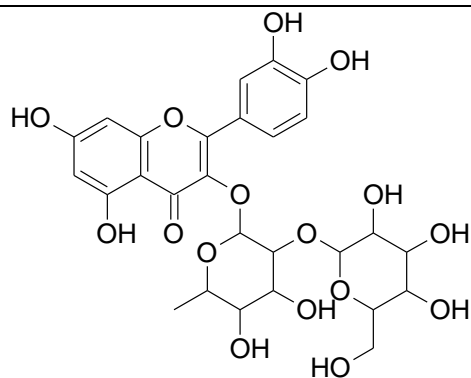
Subs **12**. Solamargina.



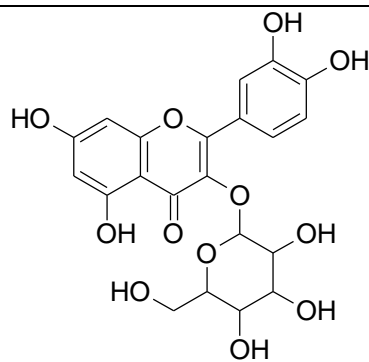
Subs **13**. Robeneoside B.



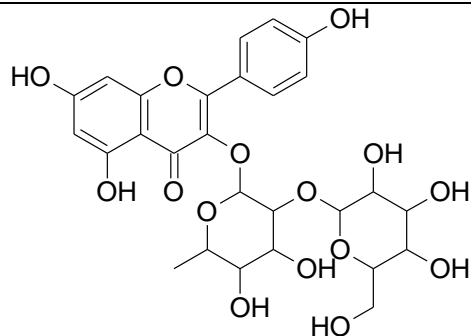
Subs **14**. Robeneoside A.



Subs. **15**. Derivado da quercetina.



Subs. **16**. Derivado da quercetina.



Subs. **17**. Derivado do kaempferol.

A presença de flavonoides e sapogeninas glicosiladas na fração butanólica proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanol 70% das folhas era esperado, uma vez que esta fração é mais polar, podendo ser encontrados substâncias di-, tri- e tetraglicosilados.

Como dito anteriormente, flavonoides possuem uma vasta gama de atividades farmacológicas reportadas na literatura, como atividades antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, além de suas atuações no sistema cardiovascular e na inibição de enzimas (DIMAS et al, 2000). Além disso, podem ser responsáveis pelos efeitos reportados pela medicina popular para a espécie *Solanum lycocarpum*.

Gamiotea-Turro e colaboradores (2018) citam que diversos trabalhos publicados na literatura já mostraram que frações fenólicas possuem potente atividade hipolipidêmica que ajudam a prevenir doenças do coração. Mesmo que o mecanismo ainda não seja bem esclarecido, sabe-se que os efeitos dos flavonoides incluem restauração de enzimas antioxidantes que impedem a formação de compostos radicalares e inibição da peroxidação de lipídeos, assim como inibem os efeitos negativos de espécies reativas de oxigênio (ERO's) por causa de sua atividade antioxidante (MULVIHILL; HUFF, 2010; ADEGBOLA et al, 2017).

Outra atividade descrita na literatura para os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides (agliconas ou glicosilados), é seu efeito hipoglicêmico que auxilia no tratamento de diabetes, principalmente para flavonoides glicosilados que apresentam efeitos de redução dos níveis de glicose sanguínea em ratos normais e diabéticos (YOSHIKAWA et al, 2006). A rutina age, também, como um potente inibidor de absorção intestinal de glicose (GAMIOTEATURRO et al, 2018) e auxilia no tratamento de diabetes podendo até auxiliar no controle de obesidade.

Além disso, a rutina e sua aglicona, quercetina, apresentam uma variedade de atividades farmacológicas como nefroprotetor, hepatoprotetor e uroprotetor, assim como antioxidante e anti-inflamatório (HOSSEINZADEH, NASSIRI-ASL, 2014; GHORBANI, 2017). A literatura descreve as atividades hipoglicêmica e hipolipidêmica da rutina e da quercetina, pois além das citadas, também agem na supressão de intolerância à glicose e aumentam a taxa de liberação de insulina em ratos diabéticos, assim como agem na redução de triglicérides e de colesterol no plasma sanguíneo e aumenta a atividade da glucoquinase hepática (GAIKWAD; MOHAN; RANI, 2014).

Habtemariam (2011) afirma que tanto a quercetina quanto o kaempferol 3-O-rutinosídeos são ótimas substâncias utilizadas no combate à diabetes, sendo mais potentes que suas agliconas. Ele também analisa que a mistura de kaempferol-3-O-rutinosídeo com

quercetina e kaempferol é mais potente no combate à diabetes do que essas substâncias isoladamente, demonstrando um efeito sinérgico entre elas atuando na inibição de enzimas e na liberação de insulina.

Outro efeito observado pela medicina popular é o alívio de dores estomacais geradas pelos extratos das folhas. Já foi comprovado que o extrato etanólico das folhas de *S. lycocarpum* possui ação antiulcerogênica por reduzir a secreção gástrica de ácido clorídrico (FERREIRA et al, 2002). Como o perfil do extrato etanol 70% é majoritariamente formado por flavonoides e, como neste trabalho foram anotados também a presença de flavonoides diglicosilados e triglicosilados, essa atividade antiulcerogênica pode estar relacionada com os flavonoides.

Como citado no item 1.3, quercetina e kaempferol apresentaram atividade no combate às diversas linhagens de carcinomas em testes *in vitro*, como, leucemia, câncer cervical, neuroblastoma e carcinoma no cólon. Em testes *in vivo* utilizando ratos laboratoriais, foi observado o combate à certas linhagens de câncer mamário, nos pulmões, ovário, próstata, de pele e, assim como a quercetina, o kaempferol também apresenta proteção gástrica e hepática (SHUKLA; GUPTA, 2010).

Alguns glicoalcaloides esteroidais foram anotados e estes possuem diversas atividades já citadas no item 1.3, entre elas: citotóxico (CHEN, 2019) antibacteriana e antifúngico (AKSHARA, 2016), antiviral (BALASUBRAMANIAM et al, 2007), anti-inflamatório e antioxidante (ALAWODE, 2017), hipertensão (BAHGAT et al, 2008), antialérgico (NIRMAL et al, 2012), antimalárica (CHEN et al, 2010), e no combate contra patógenos bucais (VALERINO-DIAZ, 2018), atuando também contra esquistossomose (MIRANDA et al, 2011) e parasitas da leishmaniose (LEZAMA-DÁVILA et al, 2016; MIRANDA et al, 2013). Além disso, essa classe de compostos atua no combate às diversas linhagens de câncer, como fígado, pulmões, nas glândulas mamárias, leucemia, de pele, próstata, cólon intestinal, entre outros (KALALINIA; KARIMI-SANI, 2017).

5. Conclusão

O perfil químico obtido por HPLC-PDA para o extrato EtOH 70%, obtido das folhas de *Solanum lycocarpum*, e para suas frações, AcOEt e *n*-BuOH, evidenciaram a presença majoritária de compostos fenólicos, principalmente de flavonoides.

Através da técnica de coinjeção utilizando padrões de flavonoides, foi possível determinar a presença da rutina e da sua aglicona, quercetina, na fração *n*-BuOH, sendo que estes dois já foram previamente identificados em espécies do gênero *Solanum* (SILVA; CARVALHO, 2003).

O fracionamento da fração *n*-BuOH seguida de purificação por HPLC-PDA Semipreparativo, juntamente com técnicas espectroscópicas de RMN permitiram identificar flavonoides glicosilados derivados da quercetina e do kaempferol sendo estes: quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (**SL_4a**) e quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (**SL_4b**); kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosídeo (**SL_6**); kaempferol 3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**SL_7b**).

A obtenção dos perfis químicos da fração butanólica, e de suas frações, Fr III e Fr IV, por LC-MS/MS permitiram anotar 7 flavonoides derivados do kaempferol e da quercetina e 3 compostos esteroidais, além de ser capaz de detectar traços de mais 4 saponinas e 3 flavonoides, corroborando com o perfil químico de flavonoides obtido por HPLC-PDA para o extrato EtOH 70% e suas frações.

A *Solanum lycocarpum* é utilizada na medicina popular para tratar diabetes, reduzir colesterol e reduzir dores estomacais e uma revisão bibliográfica demonstrou que os flavonoides podem estar relacionados com essas atividades, visto que auxiliam na redução do nível de colesterol e na redução do nível de açúcar sanguíneo.

Sendo assim, o extrato EtOH 70% das folhas de *Solanum lycocarpum* apresentou um perfil químico formado majoritariamente por compostos fenólicos como saponinas e, principalmente, flavonoides.

6. Referências

ADEGBOLA, P.; ADERIBIGBE, I.; HAMMED, W.; OMOTAYO, T. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease: a review. **American Journal of Cardiovascular Disease**, 2017, v. 7 (2), p. 19–32.

AGRAWAL, P. K. Carbon13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.

AKSHARA, R.; ELAKIYA, C.; MUTHUKUMARAN, P.; SARASWATHY, N. Comparative evaluation of antibacterial, antifungal activity and phytochemical screening of leaf and bark extract of *Solanum trilobatum* L. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 2016, v. 8(7), p. 198-202.

ALAWODE, T. T.; LAJIDE, L.; OWOLABI, B. J.; OLALEYE, M. T.; ILESANMI, O. B. Phytochemical Investigation, *in vitro* Antioxidant and Anti-inflammatory Evaluation of Leaf Extracts of *Solanum erianthum*. **Current Journal of Applied Science and Technology**, 2017, v. 24(5), p. 1-11.

AN, H.; WANG, H.; LAN, Y.; HASHI, Y.; & CHEN, S. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC–DAD–ESI–IT–TOF–MS and HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2013, v. 85, p. 295–304.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, 2006, caps. 1 e 2.

ANDERSON, G. J.; STEINHARTER, T. P.; COOPER-DRIVER, G. A.; Foliar Flavonoids and the Systematics of *Solanum* sect. *Basarthurum*. **Systematic Botanic**, 1987, v. 12(4), p. 534-540.

BAHGAT A.; ABDEL-AZIZ, H.; RAAFAT, M.; MAHIDY, A.; EL-KIHATIB, A.S.; *Solanum indicum* ssp. *distichum* extract is effective against L-NAME-induced hypertension in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 2008, v.22, p. 693-699.

BALASUBRAMANIAN, G.; SARATHI, M.; KUMARA, S. R.; HAMEED, A. S.; Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. **Aquaculture**, 2007, v. 263, p. 15-9.

CABRERA, G. M. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: glycosides. In: IMPERATO, F. (Ed.) **Phytochemistry: advance in research**. Trivandrum: Research Signpost, 2006. p. 1-22.

CARMONA, M.; SÁNCHEZ, A. M.; FERRERES, F.; ZALACAIN, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; ALONSO, G. L. Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. **Food Chemistry**, 2007, v. 100(2), p. 445–450.

CARVALHO, I. P. S.; MIRANDA, M. A.; SILVA, L. B.; CHRYSOSTOMO-MASSARO, T. N.; PASCHOAL, J. A. R.; BASTOS, J. K.; MARCATO, P. D. *IN VITRO* Anticancer Activity and Physicochemical Properties of *SOLANUM LYCOCARPUM* Alkaloidic Extract Loaded in Natural Lipid-Based Nanoparticles. **Colloid and Interface Science Communications**, 2019, v. 28, p 5-14.

CHAUHAN, K.; KAUR, G.; KAUR, S. Activity of rutin, a potent flavonoid against SSG-sensitive and -resistant *Leishmania donovani* parasites in experimental leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, 2018, v. 64, p. 372–385.

CHEN, Y.; LI, S.; SUN, F.; HAN, H.; ZHANG, X.; FAN, Y.; TAI, G.; ZHOU, Y. *In vivo* antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from Solanaceae plants. **Pharmaceutical Biology**, 2010, v. 48 (9), p. 1018-1024.

CHEN, H.; DU, K.; SUN, Y.; HAO, Z.; ZHANG, Y.; BAI, J.; WANG, Q-H.; HU, Y.; FENG, W. Solanubiellin A, a hydroanthraquinone dimer with antibacterial and cytotoxic activity from *Solanum lyratum*. **Natural Product Research**, 2019, v. 8, p. 1-6.

CLEMENTINO, L. C.; VÉLASQUEZ, A. M. A.; PASSALACQUA, T. G.; ALMEIDA, L. GRAMINHA, M. A. S.; MARTINS, G. Z.; SALQUEIR, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C.; MOREIRA, R. R. D. In Vitro Activities Of Glycoalkaloids From The *Solanum Lycocarpum* against *Leishmania Infantum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2018, v. 28 (6), p. 673-677.

CORDELL, G. A. Phytochemistry and tradicional medicine – A revolution in process. **Phytochemistry Letters**, 2011, v. 4 (4), p. 391-398.

COSTA, G. A. F.; MORAIS, M. G.; SALDANHA, A. A.; SILVA, I. C. A.; ALEIXO, A. A.; FERREIRA, J. M. S.; SOARES, A. C.; LIMA, L.A. R. S. Antioxidant, Antibacterial,

Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Potential of the Leaves of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015, v. 2015, p. 1-8.

CRUZ, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, segunda ed. Civilização Brasileira, 1982, Rio de Janeiro.

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

DALL'AGNOL, R., VON POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, 2000, 71 (1-2), p. 337-241.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C.; MITAKU, S.; MARSELOS, M.; TZAVARAS, T.; KOKKINOPOULOS, D. Citotoxic Activity of Kaempferol Glycosides Against Human Leukaemic Cell Lines *In Vitro*. **Pharmacological Research**, 2000, v. 41 (1), p. 83-86.

FABREGA, H. Jr.; The need for an ethnomedical science. **Science**, 1975, v. 189 (4207), p. 969-975.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. Cap. 10, p.163-195.

FERREIRA, P. M.; MATOS, L. G.; NOGUEIRA, D. C. F.; COSTA, E. A. Acao gastroprotetora do extrato etanólico das folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (lobeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2002, v. 4 (2), p. 60-64.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; JUSTIN, M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; LLORACH, R.; RODRIGUES, A.; SEABRA, R. M.; LEITÃO, A. Characterisation of the phenolic profile of *Boerhaavia diffusa* L. by HPLC-PAD-MS/MS as a tool for quality control. **Phytochemical analysis**, 2005, v. 16(6), p. 451-458.

GAIKWAD, S. B.; MOHAN, G. K. and RANI, M. S.; Phytochemicals for Diabetes Management. **Pharmaceutical Crops**. 2014, v.5, p. 11–28.

GAMIOTEIA-TURRO, D.; CAMAFORTE, N. A. P.; VALERINO-DIAZ, A. B.; NUNEZ, Y. O.; RINALDO, D.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R.; SANTOS, L. C.

Qualitative and quantitative analysis of ethanolic extract and phenolic fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) leaves and their hypoglycemic potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018, v. 66 (6), p. 1419-1427.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine Pharmacotherapy**, 2017, v. 96, p. 305–312.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 676.

HABTEMARIAM, S. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Kaempferol-3-O-rutinoside. **Natural Product Communications**, 2011, v. 6 (2), p. 201-203.

HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2003, v. 3 (2), p. 141-154.

HIRUMA-LIMA, C.A.; RODRIGUES, C.M.; SANTOS, L.C.; SILVA, V.C.; VILEGAS, W. Farmacognosia. ISBN : 9788538807643. Capitulo: Flavonoids, v. 19, p.387-406- 7^a. Ed. Atheneu, 2017.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3^a edição. , Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2008.

HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, 2014, v. 37 (9), p. 783–788.

HOTSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; Saponins: Chemistry and pharmacology of natural products. **Journal of the American Chemical Society**, 1996, v. 118 (35), p. 8509-8510.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e Fatores que Influenciam a Composição em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, 2008, v. 19 (1), p. 97-108.

INBARAJ, B. S.; LU, H.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum Linnaeus* by HPLC–DAD–ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2010, v. 51, p. 529-556.

.JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 2001, v. 36 (2), p. 169-178.

KACHLICKI, P.; PIASECKA, A.; STOBIECKI, M.; MARCZAK, L. Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques. **Molecules**, 2016, v. 21 (11), p. 1494.

KALALINIA, F.; KARIMI-SANI, I. Anticancer Properties of Solamargine: A Systematic Review. **Phytoterapy Research**, 2017, v. 31 (6), p. 858-870.

KANDASWAMI, C.; LEE, L. T.; LEE, P. P.; HWANG, J. J.; KE, F. C.; HUANG, Y. T.; LEE, M. T. The Antitumor Activity of Flavonoids. **In Vivo**, 2005, v. 19 (5), p. 895–909.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2016, v. 43 (2/3), p. 155-176.

KAUNDA, J. S.; ZHANG, Y.-J. The Genus *Solanum*: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review. **Natural Products and Bioprospecting**, 2019, v. 9, p. 77-137.

LEZAMA-DÁVILA, C. M.; MCCHESENEY, J. D.; BASTOS, J. K.; MIRANDA, M. A.; TIOSSI, R. F.; COSTAS, J. C.; BENTLEYS, M. V.; GAITAN-PUCH, S. E.; ISAAC-MÁRQUEZ, A. P. A New Antileishmanial Preparation of Combined Solamargine and Solasonine Heals Cutaneous Leishmaniasis through Different Immunochemical Pathways. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2016, v. 60 (5), p. 2732–2738.

LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. HPLC-DAD-MS/MS ESI Characterization of Unusual Highly Glycosylated Acylated Flavonoids from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) Agroindustrial By products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003, v. 51, p. 3895-99.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of Flavonoids. 1. ed. New York: Springer Verlag, 1970. 354 p.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; CHAN, V. M.; Advances in Flavonoid Research. In: **Chapman and Hall**, London, 1980.

MARKHAM, K. R. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, 1982.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000, v. 48, p. 577-599.

MIDDLETON, E., JR. Flavonoids in the Living System, 1^a ed. Plenum Pub Corp: New York, 1998.

MIRANDA, M. A.; MAGALHAES, L. G.; TIOSSI, R. F. J.; KUEHN, C. C.; OLIVEIRA, L. G. R.; RODRIGUES, V.; MCCHESENEY, J. D.; BASTOS. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitology Research**, 2011, v. 111 (1), p. 257-262.

MIRANDA, M. A.; TIOSSI, R. F. J.; SILVA, M. R.; RODRIGUES, K. C.; KUEHN, C. C.; OLIVEIRA, L. G.; ALBUQUERQUE, S.; MCCHESENEY, J. D.; LEZAMA-DÁVILA, C. M.; BASTOS, J. K. *In vitro* Leishmanicidal and Cytotoxic Activities of the Glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) Fruits. **Chemistry & Biodiversity**, 2013, v. 10(4), p. 642-648.

MUNARI, C. C.; OLIVEIRA, P.F.; LIMA, I. M. S.; PAULA, L. M. S; COSTAS, J. C.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloid extract in V79 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 2012, v. 50 (10), p. 3696-3701.

MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Canadian Journal of Cardiology**, 2010, v. 26, p. 17A–21A.

NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, “fruta do lobo” (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, 2008, v. 68, p. 1565-72.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – Princípios de Bioquímica. 5^a ed. São Paulo: Artmed, 2011.

NIRMAL, S. A.; PATEL, A. P.; BHAWAR, S. B.; PATTAN, S. R.; Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: possible role in the treatment of asthma. **Journal of Ethnopharmacol**, 2012, v. 142 (1), p. 91–97.

OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F.; Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasilica**, 2004, v. 18 (3), pg 401-406.

OLIVEIRA, S. C. C.; Estudo Alelopático de espécies do gênero *Solanum* do Distrito Federal. 2009. 163f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos.

OLIVEIRA, S. C. C.; GUALTIERI, S. C. J.; DOMINGUEZ, F. A. M.; MOLINILLO, J. M. G.; MONTOYA, R. V.; Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hill (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Botanica Brasilica**, 2012, v.26 (3), pg 607-618.

PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEGA, M. R. G. Flavonoides do Gênero *Solanum*. **Revista Virtual de Química**, 2016, v. 8(1), p. 4-26.

PEREIRA, A. P. A. ANGOLINI, C. F. F.; PAULINO, B. N.; LAURETTI, L. B. C.; ORLANDO, E. A.; SILVA, J. G. S.; NERI-NUMA, I. A.; SOUZA, J. D. R. P.; PALLONE, J. A. L.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. A comprehensive characterization of *Solanum lycocarpum* St. Hill and *Solanum oocarpum* Sendtn: Chemical composition and antioxidant properties. **Food Research International**, 2018, v. 124, p. 61-69.

PILON, A. C.; GU, H.; RAFTERY, D.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; NETO, F. C. Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, 2019, v. 91 (16), p.10413-10423.

PIRAUD, M.; PETTAZZONI, M.; LAVOIE, P.; RUET, S.; PAGAN, C.; CHEILLAN, D.; FROISSART, R. Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 2018, v. 41 (3), p. 457–477.

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

REDDIVARI, L.; WANG, T.; WU, B.; LI, S. Potato: An Anti-inflammatory Food. **American Journal of Potato Research**, 2018, v. 96 (2), p. 164-169.

RODRIGUES, C.M; Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. 197 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.

RODRIGUEZ-ALLER, M.; GURNY, R.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. **Journal of chromatography A**, v. 1292, p. 2-18, 2013.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. Cap. 16, p. 323-354.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. **Pharmaceutical Research**, 2010, v. 27(6), p. 962–978.

SIVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. OCORRÊNCIA DE FLAVONAS, FLAVONÓIS E SEUS GLICOSÍDEOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *SOLANUM* (SOLANACEAE). **Química Nova**, 2003, v. 4, p. 517-522.

SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. 2007, v. 55 (11), p. 1635-1639.

SILVA, A. C. Z. Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Körn). 2016. 141f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara.

STOBIECKI, M.; STASZKO'W, A.; PIASECKA, A.; GARCIA-LOPEZ, P. M.; ZAMORA-NATERA, F.; KACHLICKI, P. LC-MSMS Profiling of Flavonoid Conjugates in Wild Mexican Lupine, *Lupinus reflexus*. **Journal of Natural Products**, 2010, v. 73, p. 1254-1260.

TORRES-PIEDRA, M.; ORTIZ-ANDRADE, R.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; SINGH, N.; MEDINA-FRANCO, J. L.; WEBSTER, S. P.; ESTRADA-SOTO, S. A

comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010, v. 45(6), p. 2606–2612.

VALERINO-DÍAZ, A. B.; GAMIOTECA-TURRO, D.; ZANATTA, A.C.; VILEGAS, W.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, T. S.; RASTRELLI, L.; SANTOS, L.C. New Polyhydroxylated Steroidal Saponins from *Solanum paniculatum* L. Leaf Alcohol Tincture with Antibacterial Activity against Oral Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018, v. 66, p. 8703-8713.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, 2008, v. 29 (10), p. 1-16.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136-164, 2015.

YOSHIKAWA, M.; NAKAMURA, S.; OZAKI, K.; KUMAHARA, A.; MORIKAWA, T.; MATSUDA, H.; Structures of Steroidal Alkaloid Oligoglycosides, Robeneosides A and B, and Antidiabetogenic Constituents from the Brazilian Medicinal Plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of Natural Products**, 2007, v. 70 (2), pg 210-214.

ZANATTA, A. C.; MARI, A.; MASULLO, M.; ZEPPONE-CARLOS, I.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. Chemical metabolome assay by high-resolution Orbitrap mass spectrometry and assessment of associated antitumoral activity of *Actinocephalus divaricatus*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2017, v. 32 (3), p. 241-250.