



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

AMANDA LEMOS QUINTELA

DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *PHYLLANTHUS NIRURI* Linn
POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

FORTALEZA

2016

AMANDA LEMOS QUINTELA

DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *PHYLLANTHUS NIRURI* Linn POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Monografia apresentada ao Curso de Química do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Orientadora Pedagógica: Prof^ª. Dr^ª. Otília Deusdênia Loiola Pessoa

Orientador Vocacional: Dr. Kirley Marques Canuto

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Q71d Quintela, Amanda Lemos.
Desreplicação do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* Linn. por ressonância magnética nuclear (RMN) /
Amanda Lemos Quintela. – 2016.
108 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Otilia Desudênia Lioiolo Pessoa.
Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Camuto.
1. Desreplicação. 2. Ressonância. I. Título.

CDD 540

AMANDA LEMOS QUINTELA

DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *PHYLLANTHUS NIRURI* Linn POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Química Bacharelado, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Bacharel
em Química, com Habilitação Industrial.

Aprovada em: 08/07/16

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Otilia Deusdênia Loliola Pessoa
(Orientadora Pedagógica)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Kirley Marques Canuto
(Orientador Profissional)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA

Dr^a. Lorena Mara Alexandre e Silva
(Examinadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA

A Deus

Aos meus pais, Quintilío e Suerli.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tanto amor e cuidado para comigo, por ter feito coisas grandiosas na minha vida. Não sou merecedora de tudo isso, pois sou humana e falha, mas o Senhor com a sua infinita misericórdia tem cumprido em minha vida suas promessas.

À minha família, especialmente aos meus pais: Quintílio Alves e Suerli Lemos por sempre terem me apoiado em todas as decisões e todo o meu reconhecimento, pela batalha diária que eles se puseram para darem uma educação de qualidade a mim e ao meu irmão.

À Profa. Dra. Otília D. L. Pessoa, pela orientação, competência profissional, confiança, dedicação na transmissão de conhecimentos científicos, e principalmente pela amizade durante esses anos.

Ao meu orientador profissional Dr. Kirley Marques Canuto pela orientação, paciência, apoio e confiança na realização deste trabalho, sempre me ajudando da melhor forma possível.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, pela oportunidade e infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos analistas do Laboratório Multiusuário Químico de Produtos Naturais-Embrapa, que foram de suma importância para a realização do meu trabalho, principalmente a Lorena em que tive o prazer de trabalhar desde o início, sempre se mostrou solícita e presente na realização dos meus experimentos.

Aos companheiros do LMQPN, em especial a Adriana Dutra e Caroline Gondim, pela amizade e apoio nesta trilha

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM 2), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, Ana Karine, Alejandro, Alisson, Bruno, Fábio, Francisco das Chagas, Herbert, Hozana Patrícia, Karisia, Lidivânia, Nayara, Patrícia Coelho, Paula, Pedro Henrique, Sabrina e Taynara pelo agradável convívio e pelos vários momentos de descontrações, tornando mais prazeroso trabalhar com vocês.

Agradeço em especial a minha co-orientadora, Maria da Conceição (Ceíça) a quem devo grande parte do conhecimento em química de produtos naturais que adquiri durante esses três anos como bolsista de iniciação científica. Também sou grata pela amizade, confiança e pela grande dedicação com que me ajudou durante a realização desse trabalho, pelas sugestões e correções sugeridas.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos de graduação das turmas 2012.1 e 2013.1. Pessoas que estão presentes em todos os momentos importantes da minha vida e, mostrando o

quanto é importante a amizade para o crescimento pessoal e profissional. Nossa batalha foi difícil, mas não impossível. E a nossa amizade só nos ajudou a vencer essa etapa. A vocês, deixo registrado o meu mais sincero agradecimento. Amo vocês “grupo dos aleatórios”.

Esse trabalho reflete um período de muito aprendizado, então não posso deixar de agradecer aos amigos monografistas, Davi Rabelo, Igor Alves, Lícia dos Reis e Thiago Kelvin por estarem juntos comigo durante todo o semestre, pela ajuda mútua, e pelas noites não dormidas compartilhadas.

À minha amiga Luiza Sena, pela amizade, incentivo constante e apoio nos momentos difíceis em que passamos para o término de nossos trabalhos.

Aos meus amigos Caroline Sales e Luís Alves, que já fazem parte da minha família, por quem eu tenho um grande carinho e admiração.

Aos professores do Departamento de Química, pelos ensinamentos compartilhados e motivações.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado... muito obrigada!

“A persistência é o caminho do
êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Phyllanthus niruri (Euphorbiaceae) é uma planta medicinal reconhecida popularmente por suas propriedades diuréticas, sendo utilizada na eliminação de cálculos renais. Neste trabalho foi realizado a avaliação do perfil cromatográfico e o uso de uma metodologia rápida e eficiente para a identificação e caracterização dos constituintes químicos. O extrato das folhas e frutos de *P. niruri* foi obtido através da extração acelerada por solvente (ASE) usando água como solvente de extração e, posteriormente submetidos a cromatografia líquida de fase reversa, obtendo dez frações que foram analisadas por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-QTOF) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A investigação química resultou na caracterização de nove substâncias: ácido repandusínico A (**39**), caempferol-O-galloil-ramnosídeo (**55**), corilagina (**41**), filantusiina C (**42**), filantusiina U (**43**), furosina, geraniina (**45**), rhoiptleanina H (**54**) e vitexina-2''-O-rhamnosídeo (**25**). As estruturas de todas as substâncias isoladas foram elucidadas através de métodos espectrométricos (EM-IES e RMN ¹H e ¹³C 1D e 2D) além de comparação com dados disponíveis na literatura.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; *Phyllanthus niruri*; compostos fenólicos; desrepliação; RMN.

ABSTRACT

Phyllanthus niruri (Euphorbiaceae) is a medicinal plant that is popularly recognized for its diuretic properties. This plant is being used in removing kidney stones. In this work, its chromatography profile was evaluated and the use of a rapid and efficient methodology to identify and characterize the chemical constituents. The extract of the leaves and fruits of *P. niruri* was obtained through accelerated solvent extraction (ASE) using water as a solvent extraction and, subsequently subjected to reversed-phase liquid chromatography. Ten fractions were obtained and analyzed by Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-QTOF) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The chemical investigation was done with the aqueous extract from the fruits and leaves of the referred species, which resulted in the characterization of nine substances: repandusinic acid A (**39**), kaempferol-O-galloyl-rhamnoside (**55**), corilagin (**41**), phyllanthusiin C (**42**), phyllanthusiin U (**43**), furosin (**44**), geraniin (**45**), rhoipteleanins H (**54**) and vitexin-2''-O-rhamnoside (**25**). The structures of all isolated substances were elucidated by spectrometric methods (MS-IES e NMR 1H e 13C 1D e 2D) and comparison with literature data.

Keywords: Euphorbiaceae; *Phyllanthus niruri*; phenolic compounds; dereplication; NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto da espécie <i>Phyllanthus niruri</i>	20
Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.	22
Figura 3 - Esqueletos básicos da classe de flavonoides.	23
Figura 4 - Estrutura básica de um lignóide.....	24
Figura 5 - Unidades de monômeros formadores de taninos condensados.....	25
Figura 6 - Estrutura do isopreno.....	26
Figura 7 - Diagrama esquemático do ASE.	35
Figura 8 - Etapas da SPE no modo de concentração ou isolamento do (s) analito (s) de interesse.	36
Figura 9 - Procedimento de ressonância magnética nuclear.	38
Figura 10 - Representação esquemática de um quadrupólo.	39
Figura 11 – Representação esquemática do fluxo de trabalho no processo de desreplicação com RMN.	41
Figura 12 - Cartuchos utilizados na extração em fase sólida (SPE).....	44
Figura 13 – Metodologia para a caracterização das substâncias do extrato aquoso das folhas e frutos de <i>Phyllanthus niruri</i>	47
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] do extrato bruto e da FPnir após SPE.	48
Figura 15 - Cromatograma do fracionamento FrPnir em CLAE/preparativo (λ_{max} 254 nm).	50
Figura 16 - Cromatograma do fracionamento FrPnir em CLAE/preparativo (λ_{max} 274 nm).	51
Figura 17 – Cromatogramas ($\lambda = 270$ nm) das frações de <i>P. niruri</i> obtidas na primeira injeção por cromatografia preparativa.	52
Figura 18 - Cromatogramas ($\lambda = 270$ nm) das frações de <i>P. niruri</i> obtidas na segunda injeção por cromatografia preparativa.	52
Figura 19 - Cromatogramas ($\lambda = 270$ nm) das frações de <i>P. niruri</i> obtidas na terceira injeção por cromatografia preparativa.....	53
Figura 20 - Estruturas dos compostos identificados, ácido repandusínico, corilagina e furosina.	60
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 3.....	65
Figura 22 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 3.	65

Figura 23 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 3	66
Figura 24 - Estrutura do composto denominando geraniina.	68
Figura 25 - Espectro de massas da geraniina.....	70
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 4.....	71
Figura 27 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 4.	71
Figura 28 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 4.	72
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 4.	72
Figura 30 - Estrutura do composto filantusiina C.	73
Figura 31 - Espectro de massas da filantusiina C.....	75
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 5.....	76
Figura 33 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 5.	76
Figura 34 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 5.	77
Figura 35 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 5.	77
Figura 36 – Estrutura do composto rhoipteleanina H.....	78
Figura 37 - Espectro de massas da rhoipteleanina H.....	80
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 6.....	81
Figura 39 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6.	81
Figura 40 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6.	82
Figura 41 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6.	82
Figura 42 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6	83
Figura 43 - Estrutura do composto vitexina-2''-O-ramnosídeo.	84
Figura 44 - Espectro de massas da vitexina-2''-O-ramnosídeo.	86
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 7.....	87
Figura 46 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 7.	87
Figura 47 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 7.	88

Figura 48 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 7.	88
Figura 49 - Estrutura do composto filantusiina U.	89
Figura 50 - Espectro de massas da filantusiina U.....	91
Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 8.....	92
Figura 52 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 8.	92
Figura 53 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 8.	93
Figura 54 - Estrutura do composto caempferol-O-galloil-rhamnosídeo	94
Figura 55 - Espectro de massa do caempferol-O-galloil-rhamnosídeo.....	96
Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 9.....	96
Figura 57 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 9	97
Figura 58 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 9.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas das principais substâncias encontrada na espécie <i>P. niruri</i>	27
Tabela 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FPnir.	49
Tabela 3 - Componentes das amostras de <i>Phyllanthus niruri</i> no modo de ionização negativo	55
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da fração FPnir 3 comparado com os valores relatados na literatura (COLOMBO et al., 2009; GLEŃSK et al., 2016; MIGUEL et al., 1996) para as substancias 1 , 2 e 3	61
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da FPnir 4 comparado com os valores relatados na literatura (GLEŃSK et al., 2016) para a substancia geraniina.....	69
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da FPnir 5 comparado com os valores relatados na literatura (LATTÉ et al., 2008) para a substancia filantusiina C.....	74
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da FPnir 6 comparado com os valores relatados na literatura (JIANG; TANAKA; KOUNO, 1999) para a substancia rhoipteleanina H.	79
Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/75 MHz, MeOD) da FPnir 7 comparado com os valores relatados na literatura (PRINZ et al., 2007) para a substância vitexina-2''-O-ramnosídeo.	85
Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/75 MHz, MeOD) da FPnir 8 comparado com os valores relatados na literatura (Zhang et al., 2000) para a substancia filantusiina U.	90
Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/75 MHz, MeOD) da FPnir 9 comparado com os valores relatados na literatura (LI, 2013) para a substância caempferol-O-galloil-rhamnosídeo.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASE	Accelerated Solvent Extraction
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EM-IES	Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	massa/carga
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SPE	Solid Phase Extraction
T_R	Tempo de retenção
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Considerações botânicas da família Euphorbiaceae, do gênero <i>Phyllanthus</i> e da espécie <i>Phyllanthus niruri</i>.	19
2.2 Aspectos químicos do gênero <i>Phyllanthus</i> sp.	21
2.2.1 <i>Compostos fenólicos do gênero <i>Phyllanthus</i> sp.</i>	21
2.2.2 <i>Alcaloides do gênero <i>Phyllanthus</i> sp.</i>	25
2.2.3 <i>Terpenos</i>	26
2.3 Constituintes químicos isolados da espécie <i>P. niruri</i>.	26
2.4 Aspectos Farmacológicos	33
2.5 Fundamentações teóricas das técnicas de extração, purificação e identificação de compostos orgânicos.	34
2.5.1 <i>Extração Acelerada por Solvente (ASE)</i>	34
2.5.2 <i>Extração em Fase Sólida (SPE)</i>	35
2.5.3 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	36
2.5.4 <i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	37
2.5.5 <i>Espectrometria de massa</i>	38
2.5.6 <i>Desreplicação</i>	40
3. OBJETIVOS	42
3.1 Gerais	42
3.2 Específicos	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Obtenção e preparo do extrato aquoso das folhas e frutos de <i>P. niruri</i>	43
4.2 Extração em fase sólida	43
4.3 Fracionamento preparativo de <i>P. niruri</i>	44
4.4 Análise do perfil cromatográfico por CLAE analítica	45
4.5 Experimentos em UPLC-QTOF-MS (/MS)	46
4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Extração em fase sólida.....	48
5.2 Fracionamento da fração FPnir em coluna de fase reversa.....	48
5.3 Otimização do método cromatográfico.....	51
5.4 Determinação estrutural dos compostos majoritários	54
5.4.1 <i>Caracterização química da Fração FPnir 3</i>	59
5.4.2 <i>Caracterização química da Fração FPnir 4</i>	67
5.4.3 <i>Caracterização química da Fração FPnir 5</i>	73
5.4.4 <i>Caracterização química da Fração FPnir 6</i>	78
5.4.5 <i>Caracterização química da Fração FPnir 7</i>	84
5.4.6 <i>Caracterização química da Fração FPnir 8</i>	89
5.4.7 <i>Caracterização química da Fração FPnir 9</i>	94
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais estão entre os recursos terapêuticos de maior interesse científico por apresentarem uma diversidade química rica em metabólitos secundários com diferentes atividade biológicas, representando uma importante fonte de fitofármacos para o desenvolvimento de novos medicamentos, para as mais diversas doenças (ALVES, 2001; PINTO *et al.*, 2002). Entretanto, a caracterização química de extratos naturais bioativos geralmente requer procedimentos demorados e laborioso com várias etapas de purificação para o isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários, por causa do perfil metabólico das plantas ser altamente complexo (HUBERT *et al.*, 2014).

No início dos anos 1990 foi desenvolvida uma estratégia que busca novas maneiras de fazer a identificação das mais diversas classes de substâncias em misturas complexas de produtos naturais (HALABALAKI *et al.*, 2014). Esta prática comumente conhecida como desrepliação (do inglês, dereplication, e que significa “não replicar”) foi introduzida na literatura científico-acadêmica, fazendo uso de instrumentação analítica acoplada, como LC-MS e LC-NMR, associada a bancos de dados (DA SILVA *et al.*, 2012). É definida como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos a fim de evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias já conhecidas por meio dos métodos convencionais. A desrepliação tem como objetivo final a análise detalhada tanto qualitativamente quanto quantitativamente dos metabólitos de uma planta, visando à descoberta de compostos farmacologicamente ativos. (FUNARI *et al.*, 2013).

Entre as técnicas espectrométricas utilizadas no mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie, a ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) destaca-se devido a sua robustez, sensibilidade na quantificação dos núcleos orgânicos ativos mais abundantes: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , além de ser uma metodologia específica e reprodutível para a elucidação estrutural de diversas substâncias (SIMMLER *et al.*, 2014). Tratando de ressonância magnética nuclear, uma maneira de se otimizar tempo e reduzir custos é empregar o uso de bibliotecas de produtos naturais e bancos de dados com informações que auxiliem neste processo de identificação das substâncias, utilizando suportes computacionais para a manipulação no processamento destes dados (FUNARI *et al.*, 2013).

Tendo em vista as potencialidades da RMN como método de desrepliação expostas acima, o presente estudo visou a caracterização química do extrato aquoso das folhas de *Phyllanthus niruri* através da análise de espectros de RMN ^1H e RMN-HSQC.

P niruri é uma erva daninha com aproximadamente 40 cm de altura, conhecida popularmente por quebra-pedra (TORRES, 2003); (MAGALHÃES, 2000) e que ocorre principalmente no sul do país, onde é tradicionalmente usada no tratamento de doenças urinárias. Quimicamente, *P. niruri* é constituída basicamente por alcaloides, lignanas, flavonoides e taninos, os quais apresentam uma variedade de atividades farmacológicas tais como antinociceptiva, antiviral, antimutagênico, antitumoral e antiinflamatória, sendo, portanto, uma fonte rica em componentes bioativos, muitos deles encontrados apenas em espécies do gênero *Phyllanthus* (BOIM; HEILBERG; SCHOR, 2010)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações botânicas da família Euphorbiaceae, do gênero *Phyllanthus* e da espécie *Phyllanthus niruri*.

De acordo com CALIXTO (1998), as euforbiáceas são formadas por aproximadamente 320 gêneros e 8.000 espécies, agrupadas em 49 tribos e 5 subfamílias, são plantas de habitat tropical, possuindo, entretanto, algumas espécies em áreas temperadas (CALIXTO; SANTOS, 1998). O gênero *Phyllanthus*, do grego phyllon (folha) e anthos (flor), em alusão às flores produzidas em ramos que se assemelham a folhas compostas, está entre os maiores gêneros da família Euphorbiaceae, com cerca de 200 espécies distribuídas pelo continente americano, principalmente no Brasil e Caribe (BAGALKOTKAR *et al.*, 2006; EMBRAPA, 2006).

Botanicamente, o gênero *Phyllanthus* é constituído de ervas, arbustos ou árvores monoicas e, mais raramente, dióicas. Possuem porte herbáceo, com caules medindo entre 40 e 60 cm de altura, sendo delgados e flexíveis. As folhas podem ser simples, inteiras, alternas, estipuladas, às vezes presentes apenas nas plantas jovens, com os ramos modificados em cladódios; pecíolos menores que as lâminas. Inflorescências cimosas, axilares, paucifloras, estando às vezes reduzidas a uma única flor ou com flores estaminadas monoclamídeas, sépalas; disco nectarífero usualmente segmentado; estames e filetes livres ou unidos (TORRES, 2003). Os frutos são dotados de três compartimentos, contendo seis sementes, duas das quais em cada uma das divisões (SILVA, JOSÉ; SALES, 2002).

É um gênero bastante complexo, cuja identificação das espécies é difícil e confusa, dificultando a classificação e a caracterização botânica destas plantas. Como exemplo disto, por muitos anos a espécie *P. amarus* Schum & Thorn foi classificada como *P. niruri* L., e estudos botânicos recentes comprovaram a existência de diferenças significativas entre elas, sendo apontado o tipo de base, sementes e estigma como as principais diferenças.(CALIXTO *et al.*, 1998).

No Brasil, o gênero *Phyllanthus* está presente em quase todo o seu território, com representantes nas regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul, com cinco espécies, *P. niruri* L., *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. sellowianus* Mull. Arg Roxb., *P. urinaria* L., as quais são popularmente conhecidas pelas mesmas designações: quebra-pedra, arrebeta-pedras, arranca-pedras, fura parede, erva-pombinha e filantro (CALIXTO *et al.*, 1998).

P. niruri (**Fig. 1**) é uma erva daninha com aproximadamente 40 cm de altura, conhecida popularmente por quebra-pedra (TORRES, 2003); (MAGALHÃES, 2000). De acordo com dados previamente reportados, a espécie *P. niruri* ocorre principalmente no sul do país. Devido ao clima quente e úmido das regiões tropicais e subtropicais do Brasil que favorece o crescimento espontâneo desta espécie, é comum encontrá-la em rachaduras de calçadas e muros. É pouco exigente com relação ao tipo de solo, mas prefere os terrenos argilosos, com elevado teor de matéria orgânica (CALMON, 2005).

Figura 1 - Foto da espécie *Phyllanthus niruri*.



Fonte 1: Rita de Cássia A. Pereira

2.2 Aspectos químicos do gênero *Phyllanthus* sp.

Sob o aspecto fitoquímico, dados reportados, indicam que o gênero *Phyllanthus* apresenta diversos indivíduos, em que a espécie *P. niruri* é apontada com mais estudos relacionados tanto à pesquisa química, quanto à atividade biológica (MARTINS, 2008).

Muitas espécies do gênero *Phyllanthus* são empregadas na medicina popular, no tratamento de hepatite e diabetes, infecções urinárias da bexiga e para tratar distúrbios renais, especialmente para eliminação de cálculos renais (SANTOS *et al.*, 1995). Devido a esses fatores, diversos pesquisadores voltaram sua atenção para o isolamento dos constituintes químicos desta espécie e para a análise de atividades biológicas. Flavonoides, taninos, alcaloides, lignanas e terpenos são as classes de compostos mais abundante do gênero e foram descritos como sendo os responsáveis pelas ações antivirais, hipoglicemiante, antiespasmódica e antialérgicas (HARISH; SHIVANANDAPPA, 2006; HUANG *et al.*, 2003; VENKATESWARAN; MILLMAN; BLUMBERG, 1987).

2.2.1 Compostos fenólicos do gênero *Phyllanthus* sp.

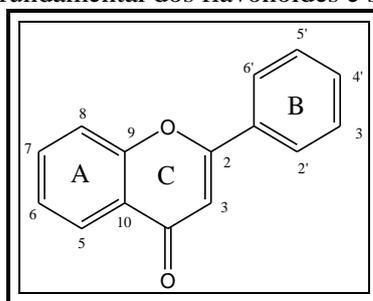
Os compostos fenólicos pertencem a uma classe química que apresenta grande variedade de estruturas, simples ou complexas, as quais possuem no mínimo um anel aromático em que ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila (SIMÕES *et al.*, 1999). Estes compostos estão distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo também parte do metabolismo animal (CARVALHO *et al.*, 2004). Contudo, somente vegetais e microrganismos conseguem sintetizar o anel benzênico e, a partir dele os compostos fenólicos são gerados tornando-se responsáveis pela proteção das plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias (STRACK, 1997). Além disso contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas (SIMÕES *et al.*, 1999)

Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais é encontrada uma variedade de estruturas, que abrangem os flavonoides, lignanas e taninos, polímeros com importantes funções (TAIZ & ZIGER, 2004).

2.2.1.1 Flavonoides

Flavonoides (palavra latina *flavus* significado amarelo, sua cor na natureza) é uma importante classe de polifenóis, abundantes entre os metabólitos secundários de vegetais (KASHTRIYA; SHAIKH; NAZERUDDIN, 2015). Podem ser encontrados em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe apresentam um esqueleto aromático C₆-C₃-C₆, um anel cromano (anel benzênico-A + anel heteronuclear-C) ligado a um anel benzênico (anel B), totalizando 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (**Fig. 2**) (SIMÕES *et al.*, 1999).

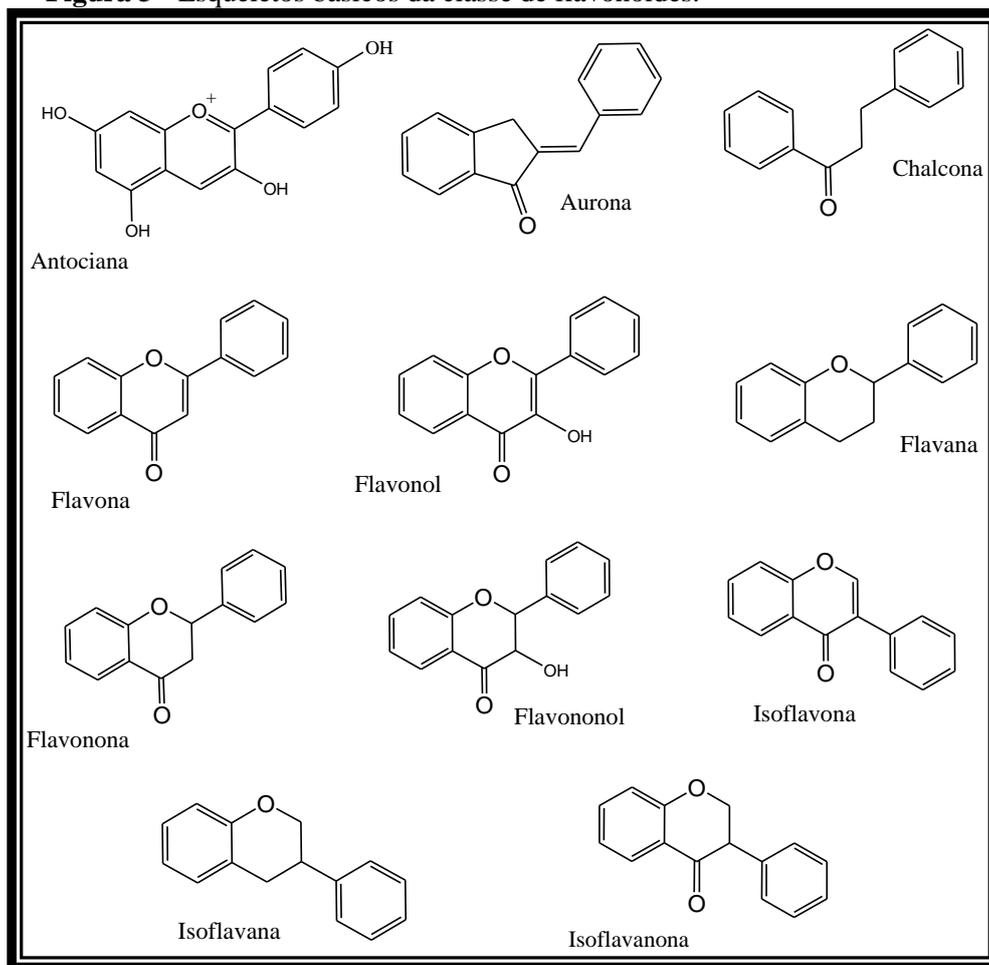
Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.



Fonte 2: SIMÕES *et al.*, 1999.

As inúmeras possibilidades de arranjos estruturais, em virtude dos diferentes padrões de oxigenação, metilação, glicosilação e dimerização dos flavonoides resultam numa gama elevada de compostos flavonoidicos, os quais podem ser classificados nas seguintes categorias, como ilustrados na **Fig. 3**:

Figura 3 - Esqueletos básicos da classe de flavonoides.

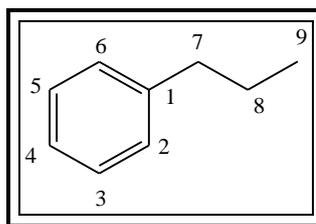


Fonte 3: SIMÕES *et al.*, 1999.

Estudos fitoquímicos realizados com a espécie *P. niruri* apontam o isolamento e caracterização de alguns flavonoides, como quercetina (**22**), quercitrina (**23**) e rutina (**24**), que são compostos antioxidantes (CALIXTO *et al.*, 1998; PATEL *et al.*, 2011). A catequina (**13**) inibe o crescimento de células cancerígenas e hepáticas, induzindo a apoptose das mesmas (BAGALKOTKAR *et al.*, 2006). A astragalina (**11**) possui atividade diurética com a capacidade imunológica de aumentar a fagocitose e o número de macrófagos para promover a síntese de anticorpos (BAGALKOTKAR *et al.*, 2006).

2.2.1.2 Lignanas

As lignanas são micromoléculas mais simples, designadas genericamente como pertencentes a um dos grupos dos lignóides. O grupo de lignóide caracteriza uma micromolécula cujo esqueleto é formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico (C6-C3)_n. (**Fig. 4**) (SIMÕES *et al.*, 1999).

Figura 4 - Estrutura básica de um lignóide

Fonte 4: SIMÕES *et al.*, 1999.

Constituem um grupo de compostos fenilpropanóides, que se depositam nas paredes das células vegetais, conferindo rigidez. São encontradas em várias partes das plantas incluindo xilema, raízes, folhas, flores, frutos, rizomas, caules e sementes (ZHANG *et al.*, 2014). Possuem distribuição universal nas espécies lenhosas e compreendem uma grande quantidade de compostos, com inúmeras propriedades farmacológicas tais como atividade antitumoral, hepatoprotetora, antioxidativas e anticâncer (ZHANG *et al.*, 2014).

Das lignanas presentes na *Phyllanthus niruri* a filantina (**26**), filtetralina (**28**), hipofilantina (**30**), nirantina (**32**) e nirtetralina (**34**) demonstraram possuir atividade hepatoprotetora e anti-genotóxica. (SATYANARAYANA; VENKATESWARLU, 1991). Estes compostos também são responsáveis por inativar o vírus da hepatite B, tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*” (BAGALKOTKAR *et al.*, 2006).

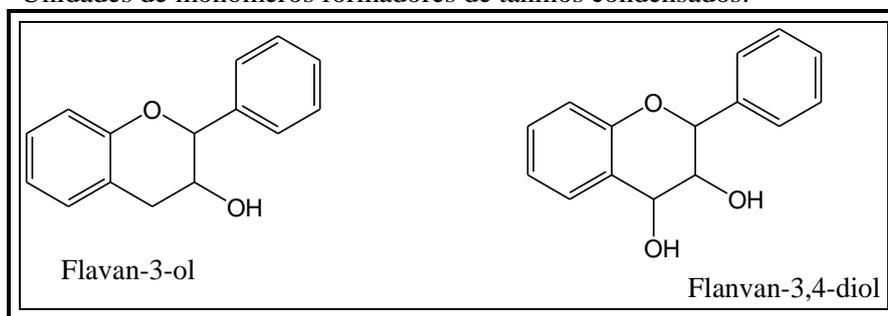
2.2.1.3 Taninos

São fenóis poliméricos, que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SALUNKHE *et al.*, 1990). Apresentam alto peso molecular (500-3000 Da) e contém grupos hidroxila- fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas (SIMÕES *et al.*, 1999). São classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (HAGERMAN; BUTLER, 1981). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, usualmente D-glicose, com seus grupos hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadihidroxifênico (elagitaninos). Estão presentes em folhas, galhos, cascas e madeiras de várias árvores como por exemplo as do gênero *Phyllanthus* (PAES *et al.*, 2013).

Produzem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina, após degradação com ácido diluído a quente (SIMÕES *et al.*, 1999). Os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas são oligômeros e polímeros constituídos pela condensação de duas ou mais unidades de flavanol: flavan-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianidina) (**Fig. 5**) (SIMÕES *et al.*, 1999). Possuem estrutura complexa; são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura. (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Figura 5 - Unidades de monômeros formadores de taninos condensados.



Fonte 5: SIMÕES *et al.*, 1999.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª edição, 2004, ácido elágico (tanino hidrolisável) (**37**) e ácido gálico (tanino hidrolisável) (**38**) são apontados como marcadores no controle de qualidade dos extratos e medicamentos fitoterápicos do gênero *Phyllanthus*, através de um método validado por HPLC. A corilagina (**41**) possui efeito anti-hipertensivo através da diminuição da liberação de noradrenalina e vaso-relaxação direta em rato espontaneamente hipertensos (CHENG *et al.*, 1995). Além disso, este tanino já demonstrou atividade antifúngica contra *Candida glabrata*, (LATTE & KOLODZIEJ 2000). Geraniina (**45**) apresenta atividades antinociceptiva e hipotensora (CHENG *et al.*, 1995).

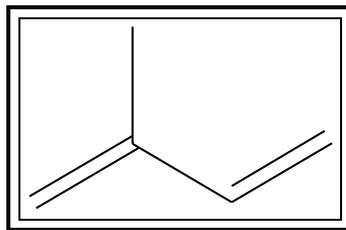
2.2.2 Alcaloides do gênero *Phyllanthus sp.*

Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel. São farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente nas angiospermas (PERES, 2008). Plantas do gênero *Phyllanthus* são ricas em alcaloides com esqueletos dos tipos indólico e pirrolidínicos. Norsecurinina (**7**) apresenta forte atividade antiespasmódica (JOSHI *et al.*, 1986). A securinina (**8**) exibe atividades antimalárica e antibacterianas (BAGALKOTKAR *et al.*, 2006).

2.2.3 Terpenos

Os terpenos constituem uma classe de compostos que se assemelham aos polímeros. São formados pela união de unidades de isopreno (C_5H_8) (**Fig. 6**), formando cadeias maiores. Desse modo, os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que fazem parte da sua estrutura em sua montagem (PERES, 2008).

Figura 6 - Estrutura do isopreno.



Fonte 6: SIMÕES *et al.*, 1999.

Os terpenoides são encontrados em abundância em plantas superiores, sendo conhecidos aproximadamente 20.000 terpenoides isolados e caracterizados. Atribuem-se a estes compostos funções de defesa contra herbívoros, hormônios de sinalização, agentes de atração e fitoalexinas, entre outros (MARIA LUCIA; VALDIR F; ANGELO, 1995; VIEIRA *et al.*, 2007).

Na espécie *P.niruri* os principais terpenos isolados são filantenol (**46**), filanteol (**47**), filantol (**48**) e lupeol (**49**) usados para tratamento ou prevenção de infecções causadas por hepatite (HUANG *et al.*, 2003).

2.3 Constituintes químicos isolados da espécie *P. niruri*.

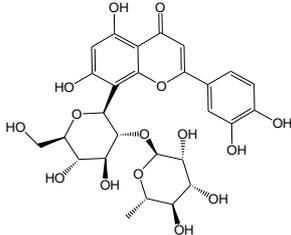
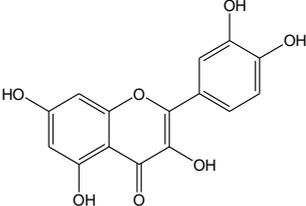
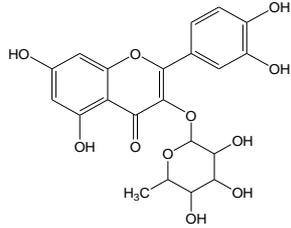
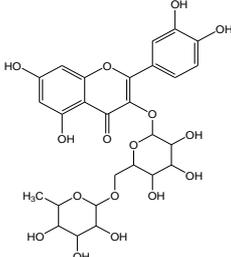
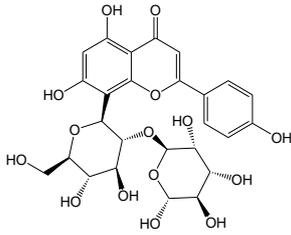
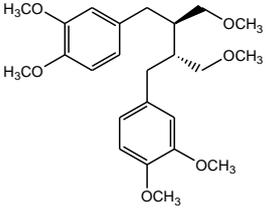
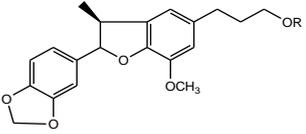
Para a construção de uma base de dados com os compostos de *P. niruri*, o levantamento foi fundamentado em artigos publicados no período de 1980 a 2016 disponíveis nas bases ScienceDirect e Scifinder. Os descritores utilizados para a busca dos artigos foram “*Phyllanthus niruri*”, “Review”, “NMR” e “Activity in plants of the genus”. Os termos de buscas utilizados resultaram em um apanhado de 212 artigos científicos.

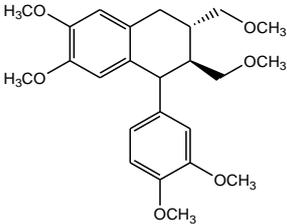
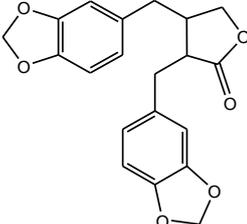
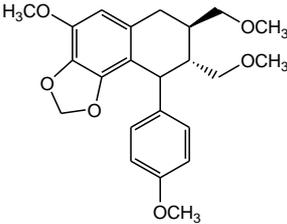
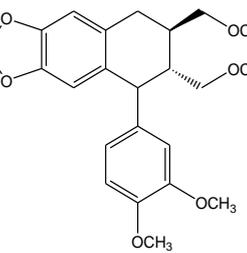
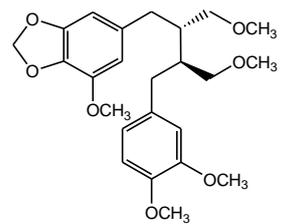
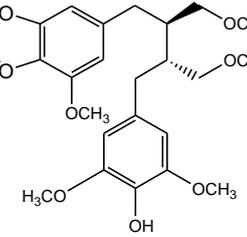
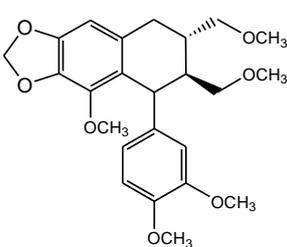
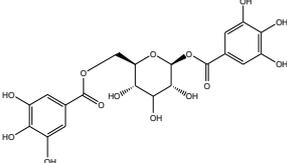
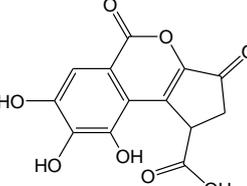
Na **Tabela 1** estão relacionadas as principais substâncias da espécie *Phyllanthus niruri* relatadas nos artigos pesquisados.

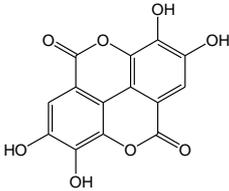
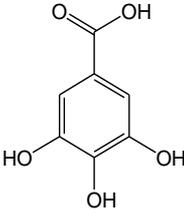
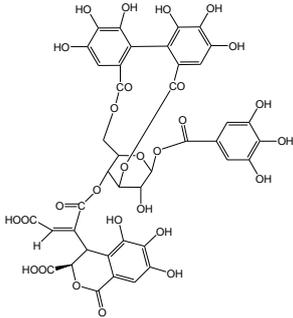
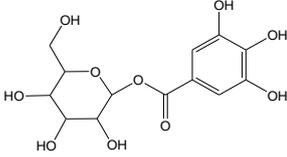
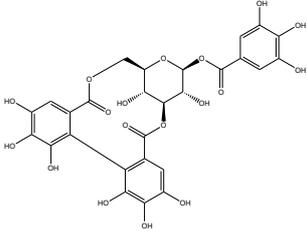
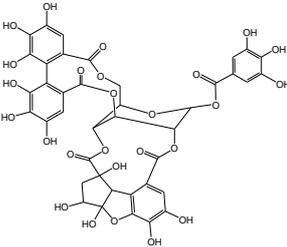
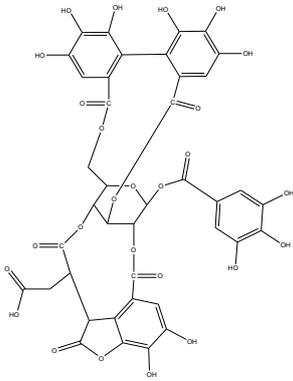
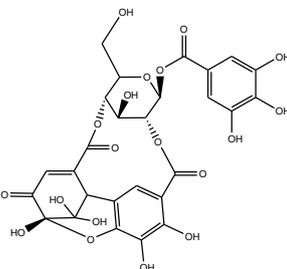
Tabela 1: Estruturas das principais substâncias encontrada na espécie *P. niruri*.

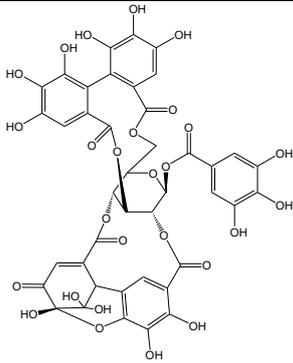
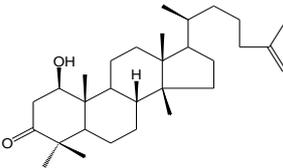
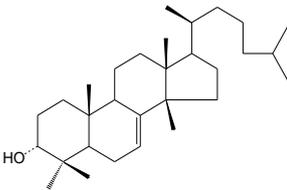
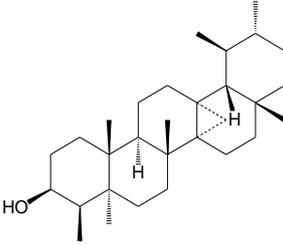
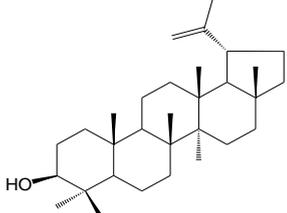
Estruturas	Referências	Estruturas	Referências
Alcaloides			
	(CALIXTO; SANTOS, 1998)		(CALIXTO; SANTOS, 1998) (JOSHI <i>et al.</i> , 1986)
4-Metoxinorsecurinina (1)		4-Metoxitetrahydrosecurinina (2)	
	(DIALLO <i>et al.</i> , 2015) (HOUGHTON <i>et al.</i> , 1996)		(CALIXTO <i>et al.</i> , 1998)
15-Metoxidihidrosecurinina (3)		Alosecurinina (4)	
	(HOUGHTON <i>et al.</i> , 1996)		(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006) (CALIXTO; SANTOS, 1998)
Epibubbialina (5)		Nirurina (6)	
	(JOSHI <i>et al.</i> , 1986)		(DIALLO <i>et al.</i> , 2015) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006) (JOSHI <i>et al.</i> , 1986)
Norsecurinina (7)		Securinina (8)	
	(DIALLO <i>et al.</i> , 2015)		(DIALLO <i>et al.</i> , 2015)
Securinol A (9)		Securinol B (10)	

Estruturas	Referências	Estruturas	Referências
Flavonoides			
	(THANH et al., 2014) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)		(AHMED; GRUPTA, 1984)
Astragalina (11)		Caempferol (12)	
	(ISHIMARU, 2015)	Epicatequina (14)	(DAVID; SANTOS; MIRANDA, 2002)
Catequina (13)			
	(ISHIMARU, 2015)		(ISHIMARU, 2015)
Epicatequina-3-galato (15)		Epigallocatequina (16)	
	(ISHIMARU, 2015)		(ISHIMARU, 2015) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)
Fisetina-4-O-glicosídeo (17)		Galocatequina (18)	
	(ISHIMARU, 2015)		(ISHIMARU, 2015)
Isoquercetina (19)		Isoquercitrina (20)	

Estruturas	Referências	Estruturas	Referências
	(PRINZ <i>et al.</i> , 2007)		(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)
Orientina-2''-O-ramnosídeo (21)		Quercetina (22)	
	(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)		(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)
Quercitrina (23)		Rutina (24)	
	(PRINZ <i>et al.</i> , 2007)		
Vitexina-2''-O-ramnosídeo (25)			
Lignan			
	(ANIERASMUS, MATTHEW, JONAS, 2007) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006) (BRITTAIN; WEBB, 1995)		(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)
Filantina (26)		Filnirurina (27)	

Estruturas	Referências	Estruturas	Referências
	<p>(BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006) (HUANG <i>et al.</i>, 2003)</p>		<p>(HUANG <i>et al.</i>, 2003)</p>
<p>Filtetralina (28)</p> 	<p>(THANH <i>et al.</i>, 2014) (ANIERASMUS, MATTHEW, JONAS, 2007) (HUANG <i>et al.</i>, 2003) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006)</p>	<p>Hinokinina (29)</p> 	<p>(ANIERASMUS, MATTHEW, JONAS, 2007) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006)</p>
<p>Hipofilantina (30)</p> 	<p>(THANH <i>et al.</i>, 2014) (ANIERASMUS, MATTHEW, JONAS, 2007) (KASSUYA <i>et al.</i>, 2006) (HUANG <i>et al.</i>, 2003)</p>	<p>Isolintetralina (31)</p> 	<p>(BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006)</p>
<p>Nirantina (32)</p> 	<p>(BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006) (HUANG <i>et al.</i>, 2003) (BRITAIN; WEBB, 1995) (GANESHPURE; SCHNEIDERS; STEVENSON, 1981)</p>	<p>Nirfilina (33)</p>	
<p>Nirtetralina (34)</p>			
Taninos			
	<p>(FOO, 1993)</p>		<p>(HAWAS, 2007)</p>
<p>1,6-Digalloylglucopiranoze (35)</p>		<p>Ácido carboxílico de brevifolina (36)</p>	

Estruturas	Referências	Estruturas	Referências
	(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)		(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006)
Ácido elágico (37)		Ácido gálico (38)	
	(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006) (YEAP FOO, 1995)		(BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006) (SUBEKI <i>et al.</i> , 2005)
Ácido repandusínico A (39)		β-glucogalina (40)	
	(AGYARE <i>et al.</i> , 2011) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i> , 2006) (HUANG <i>et al.</i> , 2003) (FOO, 1993)		(LATTÉ <i>et al.</i> , 2008)
Corilagina (41)		Fillantusiina C (42)	
	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)		(AGYARE <i>et al.</i> , 2011)
Fillantusiina U (43)		Furosina (44)	

Estruturas	Referências	Estruturas	Referências
	<p>(AGYARE <i>et al.</i>, 2011) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006) (HUANG <i>et al.</i>, 2003)</p>		
<p>Geraniina (45)</p>			
Terpenos			
	<p>(FOO, 1993)</p>		<p>(FOO, 1993)</p>
<p>Filantenol (46)</p>		<p>Filanteol (47)</p>	
	<p>(FOO, 1993)</p>		<p>(FOO, 1993) (BAGALKOTKAR <i>et al.</i>, 2006)</p>
<p>Filantol (48)</p>		<p>Lupeol (49)</p>	

2.4 Aspectos Etnofarmacológicos

Com relação aos aspectos farmacológicos é notado que desde a década de 1920, as espécies do gênero *Phyllanthus*, especialmente *P. niruri*, estão sendo alvo de estudos científicos. O chá é utilizado para o tratamento de distúrbios urinários dos rins e bexiga (infecções urinárias e cálculos renais), diabetes, infecções intestinais e hepatite B (MARTINS; LIMA, 2011).

Recentes estudos farmacológicos têm sido realizados com o intuito de verificar o efeito do extrato aquoso de *P. niruri* sobre cálculos renais em ratos e em humanos. Os resultados experimentais e clínicos têm demonstrado que o extrato não apresenta toxicidade aguda ou crônica, sugerindo efeitos que promovem a eliminação destes cálculos renais.

Barros, Schor e Boim demonstraram que o extrato aquoso de *P. niruri* interfere no processo de cristalização de oxalato de cálcio por reduzir seu crescimento e agregação, além de favorecer a formação de estrutura cristalina de oxalato de cálcio menos aderente. Assim, *P. niruri* pode potencialmente interferir com a patogênese da urolitíase e pode representar uma alternativa atrativa para a prevenção da litíase urinária (CALIXTO; SANTOS, 1998).

A atividade hepática também é investigada nos extratos de *P. niruri* que tem demonstrado ação contra o vírus da hepatite B e ação hepatoprotetora. O extrato aquoso inibiu a peroxidação de lipídeos da membrana causada por 1,1-difenil-2-picrilhidrazil com inibição da atividade de espécies reativas de oxigênio “in vitro”. Já a atividade antioxidante e a ação hepatoprotetora “in vivo” podem ser verificadas pela redução da formação de peróxidos de lipídeos induzida por tetracloreto de carbono no fígado de ratos, pré-tratados com os extratos de *P. niruri*, através dos níveis plasmáticos de glutamato oxaloacetato transaminase (TGO) e glutamato piruvato transaminase (TGP) (HARISH; SHIVANANDAPPA, 2006). Quanto a ação direta sobre o vírus da hepatite B, o extrato aquoso é capaz de inibir a DNA polimerase viral e ligar o antígeno ao vírus (OGATA *et al.*, 1992; QIAN-CUTRONE *et al.*, 1996).

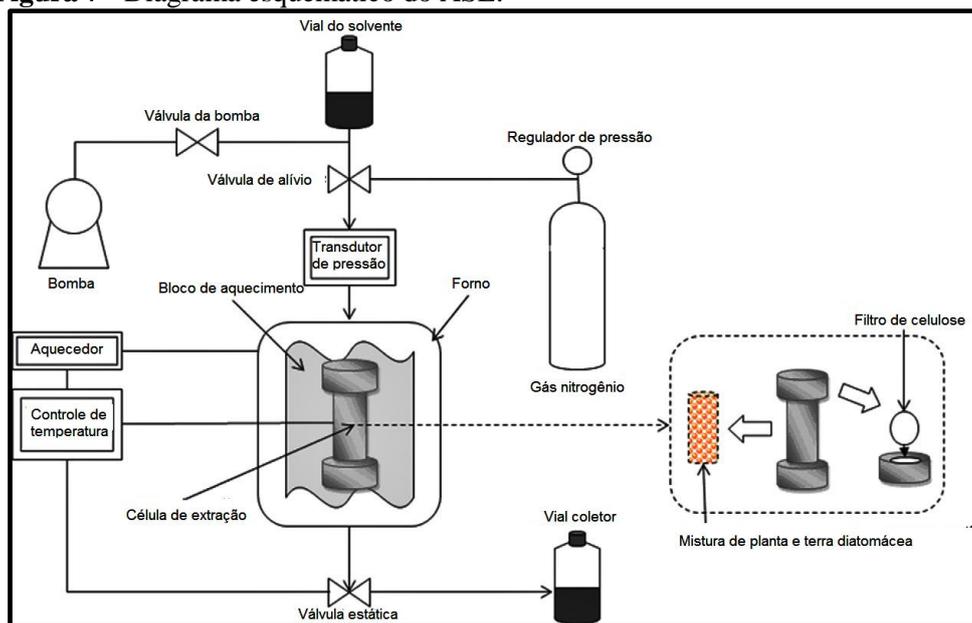
2.5 Fundamentações teóricas das técnicas de extração, purificação e identificação de compostos orgânicos.

2.5.1 Extração Acelerada por Solvente (ASE)

A extração acelerada por solvente (ASE) é uma técnica relativamente nova que proporciona maior eficiência no processo de extração, principalmente com amostras sólidas ou semissólidas que são mantidas em contato com o solvente aquecido sob alta pressão (FLANAGAN, 2007). A elevação da temperatura aumenta a solubilidade dos analitos, diminui a viscosidade do solvente (permitindo melhor penetração na amostra), e também auxilia no rompimento de interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interação dipolo-dipolo, responsáveis pela ligação do analito à matriz. A pressão elevada é responsável por manter o solvente no estado líquido mesmo em temperaturas acima do seu ponto de ebulição (RICHTER *et al.*, 1996). Estes fatores permitem utilizar menores volumes de solventes não orgânicos e orgânicos nas extrações, permitindo maior reprodutibilidade, eficiência e rapidez frente muitas técnicas convencionais de preparo de amostras (LAU; GAN; NG, 2010).

O procedimento é realizado de maneira automatizada, em que as amostras são inseridas em uma célula, que por sua vez é preenchida pelo solvente pressurizado, enquanto o sistema é mantido sob aquecimento (FLANAGAN, 2007). Um esquema do sistema de extração acelerada por solvente pode ser visualizado na **Fig. 7**.

Figura 7 - Diagrama esquemático do ASE.



Fonte 7: LI et al., 2010.

A extração utilizando o ASE pode ser realizada com grande variedade de solventes, sendo a seleção determinada pela compatibilidade físico-química com o propósito da extração (SUN et al., 2012). A eficiência do processo é influenciada pela temperatura, pressão, número de ciclos e duração do ciclo estático.

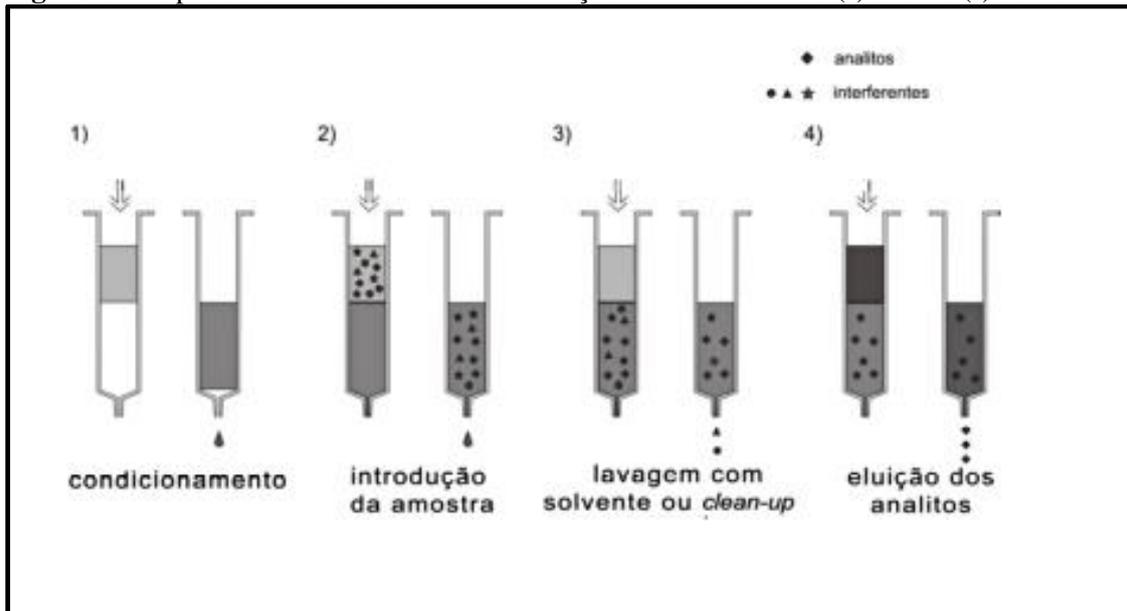
2.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração em fase sólida (ASE) é uma técnica necessária para o preparo da amostra, que tem como objetivo promover a extração e a concentração dos analitos de interesse, bem como a remoção dos interferentes (JARDIM, 2010). É uma separação líquido-sólido usada para extrair analitos semi-voláteis e não voláteis de amostras líquidas, mas também pode ser usada para amostras sólidas pré-extraídas com solventes (JARDIM, 2010).

As vantagens apresentadas pela SPE em comparação com a extração líquido-líquido clássica são: emprego reduzido de solventes orgânicos, maior recuperação dos analitos, reduzidos limites de detecção e quantificação, compatibilidade com analitos que apresentam diferentes características físico-químicas, e maior pureza dos extratos. Tais características tornam esta técnica atrativa, especialmente no caso de matrizes biológicas complexas (RICHTER *et al.*, 1996). As desvantagens são: o tempo elevado de análise, e os altos custos dos cartuchos (JARDIM, 2010).

A SPE, na sua forma mais comum, emprega fases sólidas (FS) também denominadas de sorventes, cartuchos recheados nas formas de barril ou seringa. Os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna (JARDIM, 2010). Na **Fig. 8** estão representadas as etapas da extração em fase sólida.

Figura 8 - Etapas da SPE no modo de concentração ou isolamento do (s) analito (s) de interesse.



Fonte 8: JARDIM, 2010.

2.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição (SKOOG, DOUGLAS *et al.*, 2013). Consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e na interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. (HUIE, 2002)

Esta técnica emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, apresentando vantagens em relação a outras técnicas cromatográficas como, por exemplo, capacidade de reciclagem da fase estacionária, redução do tempo de análise, alta resolução, eficiência e sensibilidade (CEFET-RIO DE JANEIRO, 2010). Porém algumas limitações são relatadas quanto ao

uso da técnica, como o alto investimento da instrumentação e alto custo da manutenção e/ou operação.

2.5.4 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica versátil que pode ser utilizada para a análise e elucidação estrutural de compostos químicos. A elucidação estrutural se baseia na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos (LUZYANIN; ABRANTES, 2010).

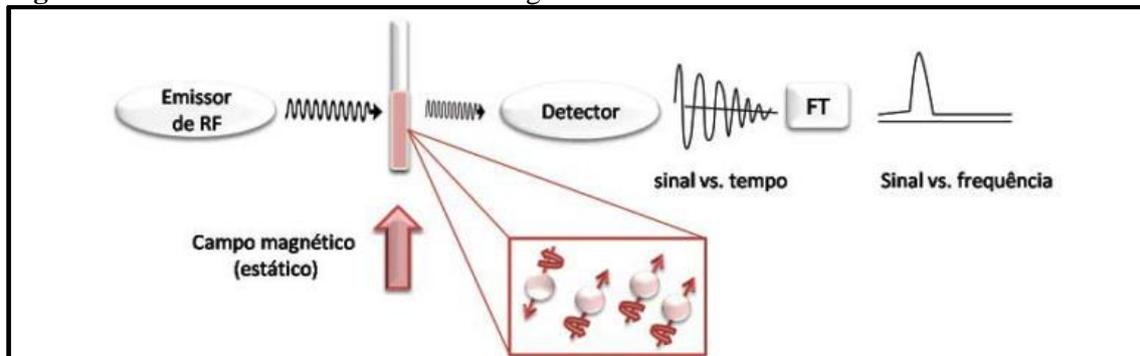
Para que um determinado isótopo possa ser analisado por RMN é necessário que este tenha propriedades específicas de spin, massa ímpar ou número atômico ímpar ou ambos ímpar. Entretanto, as aplicações de RMN a núcleos que não o ^1H e ^{13}C são limitadas, devido à baixa sensibilidade ou baixa abundância natural destes outros núcleos (PAVIA *et al.*, 2010).

Os núcleos dos átomos são vistos como pequenos piões com carga que rodopiam em torno do seu eixo, gerando o seu próprio campo magnético local. Apesar de existirem núcleos que não exibem qualquer campo magnético (por exemplo, o ^{12}C), a maior parte dos núcleos comportam-se como pequenos ímãs (por exemplo, o ^1H ou o ^{13}C) (CLARIDGE, 2009).

Com base neste fenômeno, a amostra é colocada a um intenso campo magnético onde os núcleos ficam alinhados com um campo B_0 e são induzidos a absorver energia mudando a orientação de spin em relação ao campo, quando a frequência do aparelho corresponde exatamente à frequência de ressonância característica do núcleo (que se designa por frequência de Larmor). Desligando a fonte de radiação eletromagnética, os núcleos retomam a sua orientação original emitindo uma radiação que origina um sinal elétrico. Após tratamento matemático (transformação de Fourier - FT) é possível traçar um gráfico da intensidade do sinal em função da frequência aplicada a que chamamos espectro de RMN (PAVIA *et al.*, 2010).

A frequência da radiação de radiofrequência que é absorvida por um dado núcleo é fortemente afetada pelo seu ambiente químico, isto é, por elétrons e núcleos próximos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Na **Fig. 9** está representado o procedimento resumido da técnica de RMN. Um espectro de RMN típico mostra aumento do deslocamento químico expresso em partes por milhão (ppm) da direita para esquerda. Isso implica que os prótons menos blindados aparecerão mais à esquerda e os mais blindados à direita do espectro.

Figura 9 - Procedimento de ressonância magnética nuclear.



Fonte 9: K. Luzyanin, K.; Abrantes, M. Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imaginologia Médica. Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, v. 117, n.2, p. 25-30, Jun 2010.

Além de possibilitar uma fácil manipulação da amostra, a quantificação por RMN traz vantagens adicionais como ser uma técnica não destrutiva, ter baixo tempo de análise, permite o acesso simultâneo aos aspectos qualitativos e quantitativos da amostra, além de possibilitar a quantificação de vários analitos em uma mesma análise (CLARIDGE, 2009).

2.5.5 Espectrometria de massas

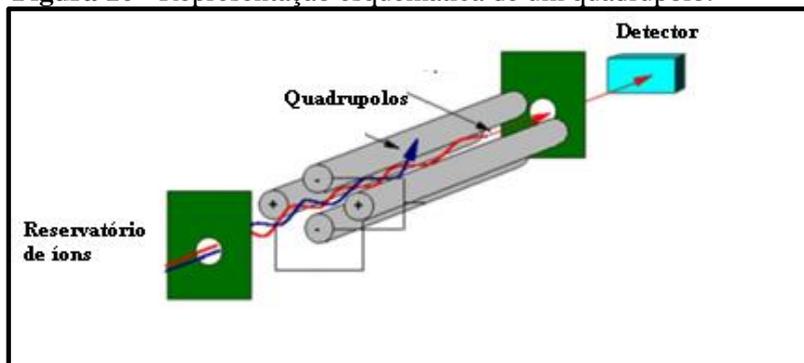
De acordo com Silverstein, Webster e Kiemle (2007), a espectrometria de massas pode ser descrita como a ionização de um ou mais compostos, onde seus íons são separados com base na razão massa/carga e o número de íons que corresponde a cada unidade de massa/carga é registrado na forma de um espectro. Tem sido reconhecida como a técnica de separação direta mais eficiente em análises e caracterização de produtos naturais, na identificação de compostos em misturas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos (BRAMER, 1986).

A espectrometria de massa (MS) consiste em um método de ionização suave, que torna possível a análise de compostos não-voláteis e termolábeis (HOFFMANN; STROOBANT, 2007), é constituída por três componentes principais: uma fonte de ionização; o analisador de massa e o detector. No presente trabalho o método de ionização utilizado foi a ionização por electrospray (ESI).

. O processo de ionização por ESI ocorre quando um solvente volátil contendo os analitos é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Uma alta tensão é aplicada na ponta deste capilar, e como consequência deste forte campo elétrico, a amostra que sai pelo capilar estará dispersa em um aerossol, composto por uma névoa de gotículas carregadas que fluem em direção ao orifício do capilar, seguindo para o analisador (BRAMER, 1986).

O analisador Quadrupolo acoplado a um analisador de Tempo de Voo (TOF) (Fig. 10) são utilizados para separar os íons de acordo com a sua razão m/z . O analisador quadrupolo é composto por quatro barras metálicas (eletrodos) que geram campos elétricos oscilantes, para estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, de acordo com seus valores de m/z , durante sua passagem pelo centro do quadrupolo, como mostrado na Figura 10 (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Figura 10 - Representação esquemática de um quadrupólo.



Fonte 10: <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/ms/quadrupo.htm>.

O princípio de operação do analisador de massa por tempo de voo (TOF) envolve a medida do tempo que um íon leva para viajar da fonte de íons até o detector. A velocidade dos íons criados no mesmo instante, com a mesma energia cinética, variarão conforme a massa dos íons – o íon mais leve, sairá mais rápido e chegará primeiro ao detector (PAVIA *et al.*, 2010). São analisadores que apresentam alta sensibilidade e fornecem massa de alta resolução.

2.5.6 Desreplicação

A caracterização química de extratos naturais bioativos geralmente requer procedimentos demorados com várias etapas de purificação para o isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários, por causa do perfil metabólico das plantas ser altamente complexo (HUBERT *et al.*, 2014). No início dos anos 1990 foi desenvolvida uma estratégia que busca novas maneiras de fazer a identificação das mais diversas classes de substâncias em misturas complexas de produtos naturais (HALABALAKI *et al.*, 2014).

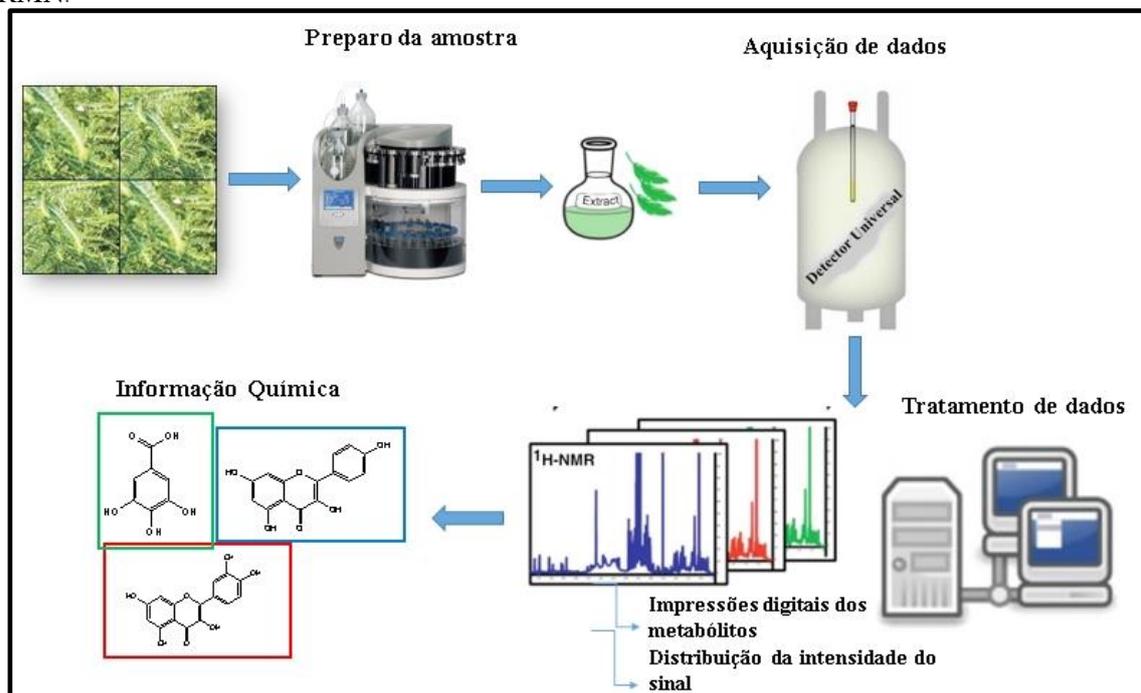
Esta prática comumente conhecida como desreplicação (do inglês, dereplication, e que significa “não replicar”) foi introduzida na literatura científico-acadêmica, fazendo uso de instrumentação analítica acoplada, como LC-MS e LC-RMN, associada a bancos de dados (DA SILVA *et al.*, 2012). É definida como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos a fim de evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias já conhecidas por meio dos métodos convencionais, e tem como objetivo final a análise detalhada tanto qualitativamente quanto quantitativamente dos metabólitos de uma planta. (FUNARI *et al.*, 2013).

Entre as técnicas espectrométricas utilizadas no mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie, a ressonância magnética nuclear (NMR 1D e 2D) destaca-se devido a sua robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos orgânicos ativos mais populosos: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P (SIMMLER *et al.*, 2014).

Tratando de ressonância magnética nuclear, uma maneira de se otimizar tempo e reduzir custos é empregar o uso de bibliotecas de produtos naturais e bancos de dados com informações que auxiliem neste processo de identificação das substâncias, utilizando suportes computacionais para a manipulação no processamento destes dados (FUNARI *et al.*, 2013).

A **Figura 11** traz resumidamente, as etapas do estudo de desreplicação de uma planta. Técnicas analíticas são utilizadas em conjunto para construir uma base de dados sobre o extrato do organismo em questão. Os dados então são tratados para a identificação dos compostos.

Figura 11 – Representação esquemática do fluxo de trabalho no processo de desreplicação com RMN.



Fonte 11: Adaptado de (SIMMLER et al., 2014)

Um exemplo de estudos utilizando métodos de desreplicação envolvendo técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear, já é aplicado para avaliar o controle da qualidade dos fitoterápicos de plantas “quebra-pedras”(SANTOS *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Determinar a composição química do extrato aquoso de *P. niruri* por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.2 Específicos

- ❖ Preparar extrato aquoso das folhas e frutos de *P.niruri*
- ❖ Desenvolver e validar um método de perfil cromatográfico, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para caracterização química da espécie *Phyllanthus niruri*;
- ❖ Através de estudo de desreplicação, usando técnicas espectrométricas: EM-IES, RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), caracterizar os compostos presentes nas frações, reduzindo a necessidade de estudos fitoquímicos clássicos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparo do extrato aquoso das folhas e frutos de *P. niruri*

A planta de espécie *P. niruri* foi coletada no município de Paraipaba, Ceará, Brasil. As folhas e frutos foram separados do restante da planta e foram submetidas a secagem durante sete dias a 40°C. O material vegetal seco foi pulverizado grosseiramente em moinho de facas do tipo Willye (Fortinox) modelo Star FT 80.

Pesaram-se aproximadamente 15,00g da amostra pulverizada da planta para o preparo do extrato aquoso (ExtAq1). Utilizou-se um equipamento de extração acelerada por solvente, modelo ASE™ 350 da marca Dionex, com células de aço inoxidável com capacidade de 66 mL para a extração de líquido pressurizado. A amostra foi inserida na célula e o volume foi completado com terra diatomácea (agente dispersante). Misturou-se homogeneamente a amostra com a terra diatomácea e fechou-se a célula hermeticamente. As células de extração foram colocadas no carrossel e as amostras foram extraídas.

O método de extração consistiu em utilizar água ultrapura (Milli-Q) como solvente de extração, a temperatura constante ($T = 80^{\circ} \text{C}$), pressão variando entre 1500-1700 psi, com três ciclos de 5 min no modo estático. O tempo de extração amostra foi de 30 minutos. As soluções aquosas preparadas foram transferidas para tubos falcons de 50 mL, previamente tarados. As soluções foram então congeladas em um ultrafreezer (Liotop) por um dia e liofilizadas em um equipamento K₁₀₅ (Liotop) por 4 dias. Depois de secas, as amostras foram pesadas, obtendo do ExtAq1 (*P. niruri*) 4,16g. O extrato foi armazenado em local protegido contra umidade e calor.

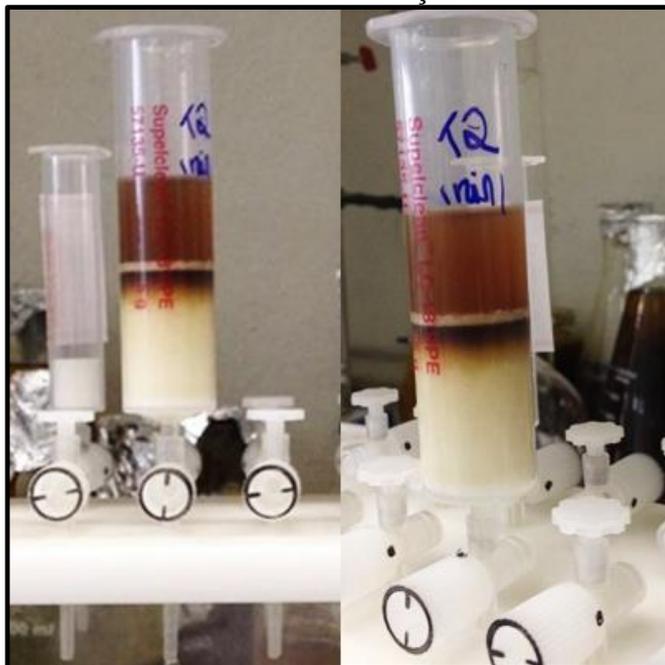
4.2 Extração em fase sólida

As extrações em fase sólida (SPE) do ExtAq1 (*P. niruri*) foram realizadas em cartuchos de fase reversa (C₁₈) de 5,0 g da Phenomenex. Na etapa de preparo, 250,0 mg do ExtAq1 foram solubilizados em 20 mL de água Milli-Q e homogeneizados em banho de ultrassom por cinco minutos.

O uso dos cartuchos foi precedido por ativação do adsorvente com 20 mL de metanol, seguida de acondicionamento com 20 mL do solvente de eluição (MeOH/H₂O 70:30). Após aplicada no cartucho, a amostra foi eluída com 20 mL de água Milli-Q. A

fase aquosa foi descartada. Posteriormente, o cartucho foi eluído com 40 mL do solvente MeOH/H₂O (70:30 v/v) e a fase orgânica foi coletada em béquer de 100 mL, como mostrado na **Fig. 12**.

Figura 12 - Cartuchos utilizados na extração em fase sólida (SPE).



Fonte 12: Próprio autor.

A fração MeOH/H₂O (70:30 v/v) foi destilada em um rotoevaporador da marca IKA[®] modelo RV10, a 40° C sob pressão reduzida (20 mbar) e rotação de 100 rpm até a remoção total de metanol. Depois transferida para balão volumétrico de 250 mL e liofilizada em um equipamento K₁₀₅ (Liotop) por 4 dias. Este procedimento foi repetido cinco vezes, rendendo 170,8 mg da amostra seca FPnir (Fração MeOH/H₂O 30%).

4.3 Fracionamento preparativo de *P. niruri*.

Sessenta miligramas da fração (FPnir) foi dissolvida em 6 mL de água Milli-Q (concentração 10 mg/mL) e homogeneizada durante 4 minutos em aparelho de ultrassom e filtrada em filtro com membrana de nylon 0.45 µm, 25mm, acondicionado previamente com MeOH. Para o fracionamento utilizou-se o cromatógrafo a líquido Waters 2489, equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodo, e um sistema de bomba binário. A separação foi efetuada em coluna preparativa da marca Sunfire[®],

modelo C₈ OBD (19 mm X 100 mm, 5 µm), em fluxo de 17 mL/min, volume de injeção 5,0 mL.

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (MeOH-Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex). Fase móvel composta por solução aquosa com 0,05% de ácido trifluoracético (solvente A) e metanol com 0,05% de ácido trifluoracético (solvente B). A separação cromatográfica foi feita em gradiente de eluição variando de 5 a 95% de B por 20 minutos, seguindo por um isocrático de 100% de B por 10 minutos e, monitoradas nos comprimentos de onda 250 e 270 nm.

Foram coletadas 10 frações de aproximadamente 8 mL cada (em triplicata), registradas com tempo de retenção de 4 a 13 minutos, as quais após liofilizadas forneceram as massas descritas nas **Tabela 2** (p. 49).

4.4 Análise do perfil cromatográfico por CLAE analítica

Para avaliar as características de retenção dos compostos presentes em cada fração e a reprodutibilidade do método de fracionamento, as frações foram analisadas por CLAE. Aproximadamente 2,0 mg de cada fração foram solubilizados em 1,0 mL de MeOH/H₂O (50:50 v/v) e filtradas através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm de 25 mm de diâmetro da marca Simplepure™ Syringe filters (EUA). As análises das 30 frações (10 amostras x 3 repetições) obtidas por fracionamento em HPLC preparativo foram realizadas em aparelho de *HPLC* SHIMADZU Prominence, equipado com injetor automático, detector UV-Vis com arranjo de diodo a uma faixa de comprimento de onda de 210 a 400nm (SPD-M20A), e um sistema de bomba ternário, em fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 40 µL, mantidas em forno termostático a 30°C

Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (MeOH-Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex). A fase móvel consistiu de solução aquosa com 0,05% de ácido trifluoracético (solvente A) e metanol com 0,05% de ácido trifluoracético (solvente B), com gradiente de eluição variando de 5 a 95% de B de 0 a 48,0 minutos, em seguida elevando-se imediatamente, para 100% de B e, sendo assim mantido durante 6 minutos.

4.5 Experimentos em UPLC-QTOF-MS (MS)

As dez frações obtidas por fracionamento em HPLC preparativo foram também analisadas por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplado a analisadores de massas arranjados em série dos tipos quadrupolo e Tempo-de-Voo (TOF). As análises foram efetuadas em um sistema UPLC-q-TOF Acquity-Xevo (Waters), equipado com uma fonte de ionização de electrospray (ESI). As separações foram realizadas em colunas C₁₈ (Waters Acquity UPLC C₁₈, 150 milímetros × 2,1 milímetros, 1.7µm). Os perfis dos metabólitos nas frações foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório, sendo as fases móveis: H₂O (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico (0,1% volume/volume). As amostras foram submetidas ao seguinte gradiente exploratório: 2 – 95%. A vazão de 500 µL min⁻¹.

As análises de cada fração foram realizadas em modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI) no intervalo de 100 – 1200 Da com o tempo de aquisição de 0,1 segundo no modo centróide. As condições no modo negativo foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2600 V, tensão cone 20V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura dessolvatação 350 °C, fluxo de gás de cone de 5 L.h⁻¹, o fluxo de gás dessolvatação 500 L.h⁻¹, e MCP (microcanais tensão da placa) – detector a 1900 V. As condições no modo positivo foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 3200 V, tensão cone 32V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura dessolvatação 350 °C, fluxo de gás de cone de 65 L.h⁻¹, o fluxo de gás dessolvatação 500 L.h⁻¹, e MCP (microcanais tensão da placa) – detector a 1900 V.

4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. As amostras foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 5 mg das frações em 600 μL de metanol deuterado com 0,17 mg/mL de TSP-d4.

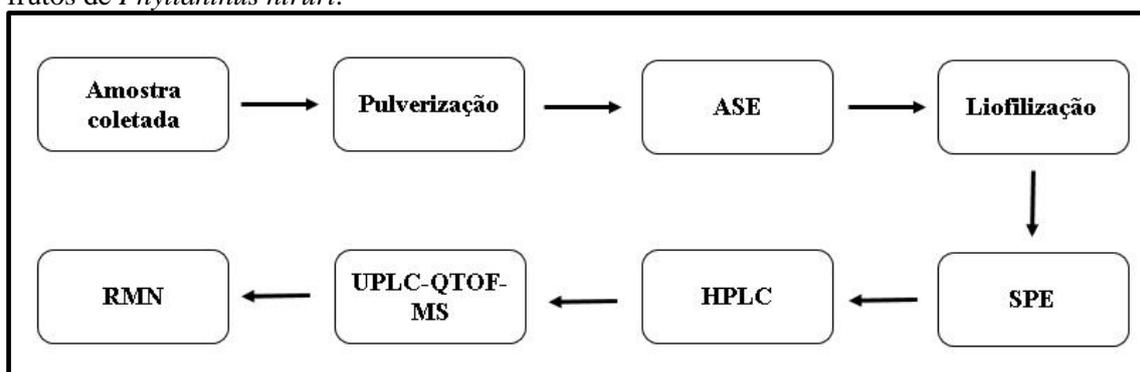
Para realizar a quantificação, o pulso de 90° foi calibrado e a sonda, devidamente sintonizada. Inicialmente a sequência de pulsos de inversão-recuperação foi utilizada para estimar o tempo de relaxação dos núcleos amostrais. O valor encontrado foi distribuído entre o d1 (tempo de espera para relaxação dos núcleos) e o tempo de aquisição (AQ). Assim, os espectros unidimensionais de ^1H foram adquiridos com o tempo do pulso de 90° de 7,65 s; um tempo de espera entre cada aquisição de 30 s, AQ de 5,0 s, ganho de 30, 64 transientes em uma janela espectral de 22 ppm e 32k de número de pontos reais a 26°C . Foi feita a supressão do sinal da água residual (HOD) em δ 4,9 ppm.

O experimento de HSQC foi otimizado. Desta forma, o HSQC foi realizado com largura espectral em F2 de 16 ppm e F1 de 200 ppm, número de promediações (ns) de 48. Além disto, foi utilizado um tempo de espera entre cada aquisição de 1 s, com 192 pontos durante a aquisição (td) em F1 e 1.442 pontos durante a aquisição em F2. No processamento foram utilizados 1.024 pontos (si) em F1 e 2.000 pontos em F2.

Um esquema da metodologia utilizada neste trabalho está representado na

Fig. 13.

Figura 13 – Metodologia para a caracterização das substâncias do extrato aquoso das folhas e frutos de *Phyllanthus niruri*.

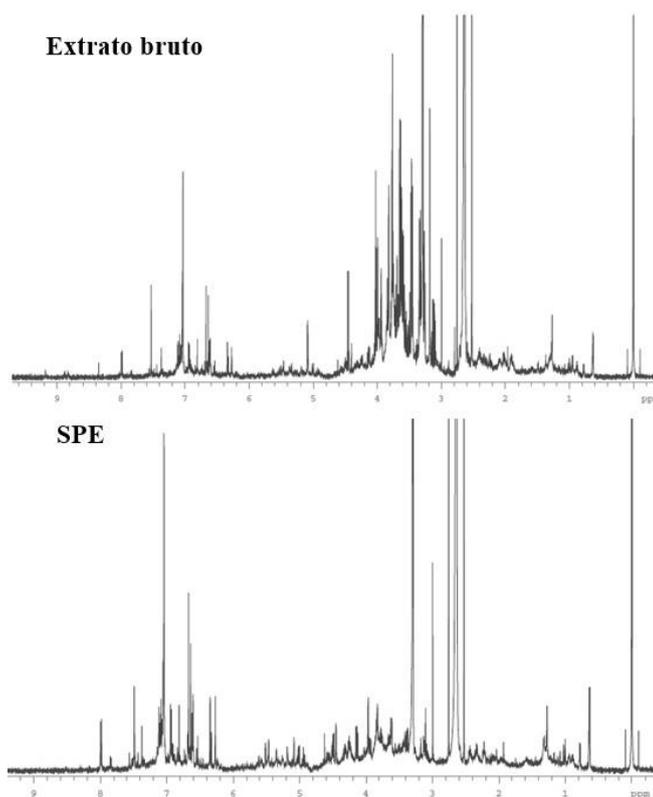


5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração em fase sólida

Considerando a elevada concentração de açúcares no extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, foi realizado um tratamento prévio da amostra utilizando o método de extração em fase sólida (SPE), com cartucho C₁₈ eluído com MeOH/H₂O (7:3). Os espectros de RMN ¹H da **Figura 14** mostram que o processo empregado viabilizou a remoção dos açúcares livres, além das possíveis impurezas presentes na amostra, a qual foi constatada pelo desaparecimento dos sinais na faixa de 3,5-2,5 ppm característicos de hidrogênios glicosídicos, sucedendo o enriquecimento de uma fração composta majoritariamente por compostos fenólicos.

Figura 14 - Espectro de RMN de ¹H [600 MHz, MeOD] do extrato bruto e da FPnir após SPE.



5.2 Fracionamento da fração FPnir em coluna de fase reversa

Compostos fenólicos estão normalmente presentes em extratos vegetais preparados com solventes polares. São substâncias ionizáveis de caráter ácido que em

solução aquosa podem estar parciais ou totalmente ionizadas. Nesses casos, a supressão da ionização é uma condição muitas vezes desejável, pois as tornam mais hidrofóbicas, aumentando sua retenção na fase estacionária. Por isso, adicionou-se ácido trifluoracético (ácido forte) nos solventes utilizados na fase móvel. A diminuição do pH da fase móvel acarreta na otimização e separação cromatográfica e tem sido bastante utilizada em diversos trabalhos (JI *et al.*, 2005; SVEDSTRÖM *et al.*, 2006)

Considerando a complexidade química da amostra, a fração FPnir foi fracionada em um sistema preparativo, em que permitiu a injeção de uma maior quantidade de amostra (massa e volume), totalizando 150,0 mg, as quais foram injetadas em três corridas cromatográficas nas condições já descritas nos materiais e métodos. Obteve-se 10 frações com volume de aproximadamente 8 mL cada. Na **Tabela 2** estão fornecidos os rendimentos e as massas das três injeções.

Tabela 2 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da FPnir.

Nome da fração	Tempo de retenção (min)	1ª Injeção (mg)	2ª Injeção (mg)	3ª Injeção (mg)	Total (mg)	Rendimento (%)
FPnir 1	4	0,8	0,4	0,6	1,8	1,2
FPnir 2	5	1,2	1,2	1,4	3,8	2,5
FPnir 3	6	2,1	2,3	2,3	6,7	4,4
FPnir 4	7	7,6	7,8	7,7	23,1	15,4
FPnir 5	8	9,5	10,2	10,7	30,4	20,2
FPnir 6	9	6,5	6,3	6,8	19,6	13,06
FPnir 7	10	3,7	3,9	4,1	11,7	7,8
FPnir 8	11	2,4	2,7	2,2	7,3	4,86
FPnir 9	12	1,1	1,4	1,3	3,8	2,53
FPnir 10	13	1,3	1,2	1,4	3,9	2,6
Total (%)		72,4	74,8	77,0	74,73	

Foi notado que o processo acarretou em frações em um rendimento percentual satisfatório, por conta da redução da matriz interferente, formada por sais, açúcares e substâncias mais apolares, muitas das quais não são detectadas no detector de ultravioleta.

Nas **Figs 15 e 16** estão apresentados os cromatogramas do fracionamento cromatográfico da fração FPnir. Pode-se observar uma pequena variação na intensidade dos picos ao mudar o comprimento de onda de 254 para 274 nm. Estes comprimentos de ondas foram escolhidos por uma análise preliminar em *HPLC* com detector de arranjo de diodo que apontou as maiores absorbâncias, características de compostos fenólicos.

Figura 15 - Cromatograma do fracionamento FrPnir em CLAE/preparativo (λ_{max} 254 nm).

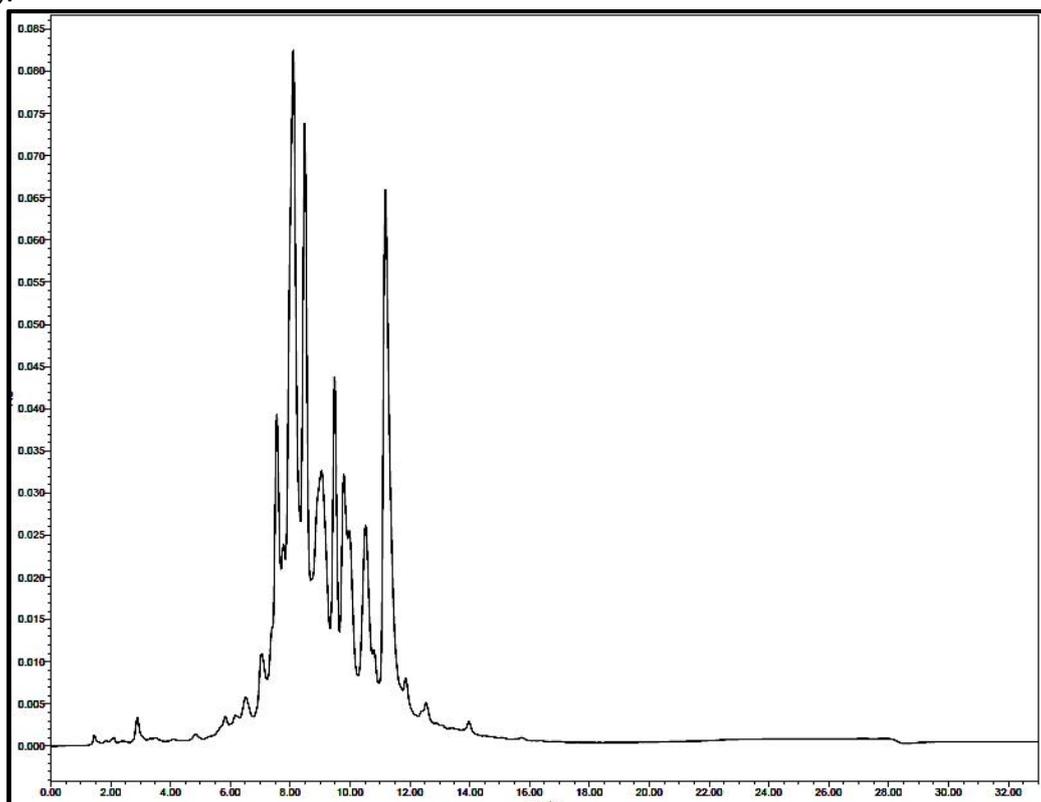
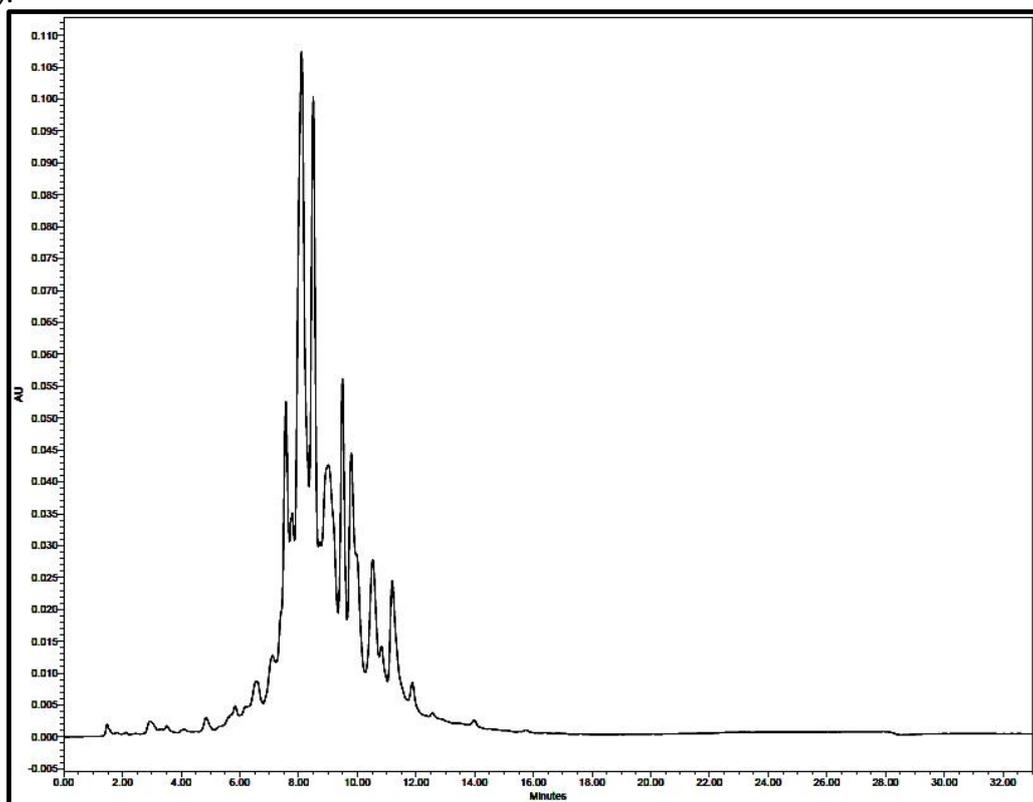


Figura 16 - Cromatograma do fracionamento FrPnir em CLAE/preparativo (λ_{\max} 274 nm).



5.3 Otimização do método cromatográfico

Avaliou-se a reprodutibilidade do método, baseado nos valores de tempo de retenção (t_r) e área das bandas cromatográficas, para verificar a reprodutibilidade das frações obtidas após o fracionamento do extrato FPnir, os quais foram submetidos às mesmas condições cromatográficas.

Nas **Figs 17, 18 e 19** estão apresentados os cromatogramas das replicatas das frações no comprimento de onda de 270 nm, o qual foi selecionado em virtude de exibir melhor intensidade.

Figura 17 – Cromatogramas ($\lambda = 270$ nm) das frações de *P.niruri* obtidas na primeira injeção por cromatografia preparativa.

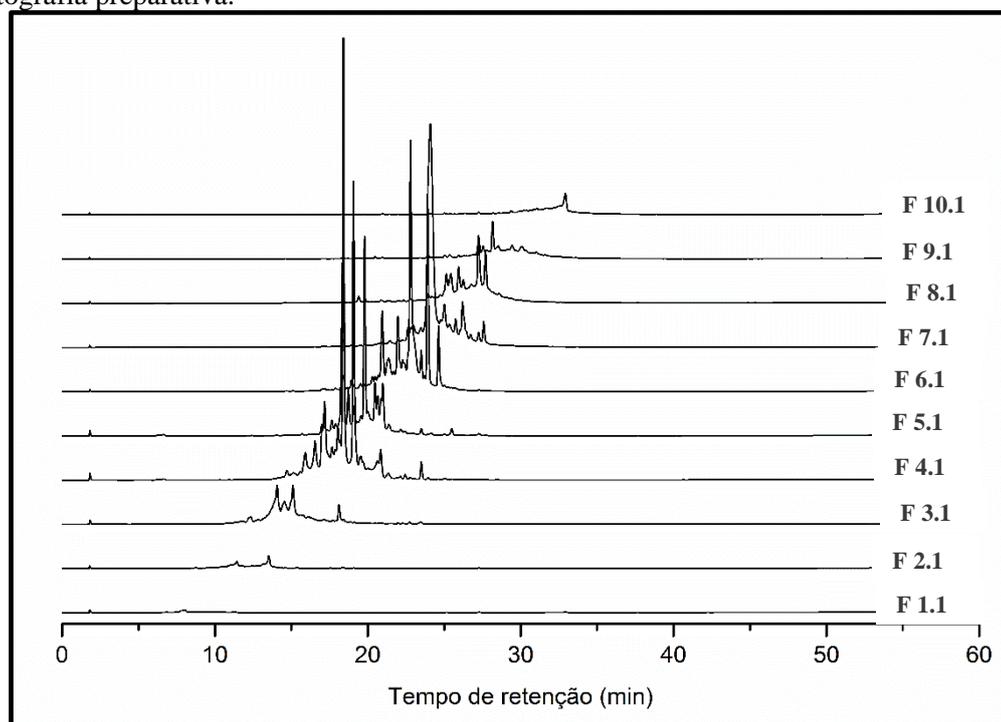


Figura 18 - Cromatogramas ($\lambda = 270$ nm) das frações de *P.niruri* obtidas na segunda injeção por cromatografia preparativa.

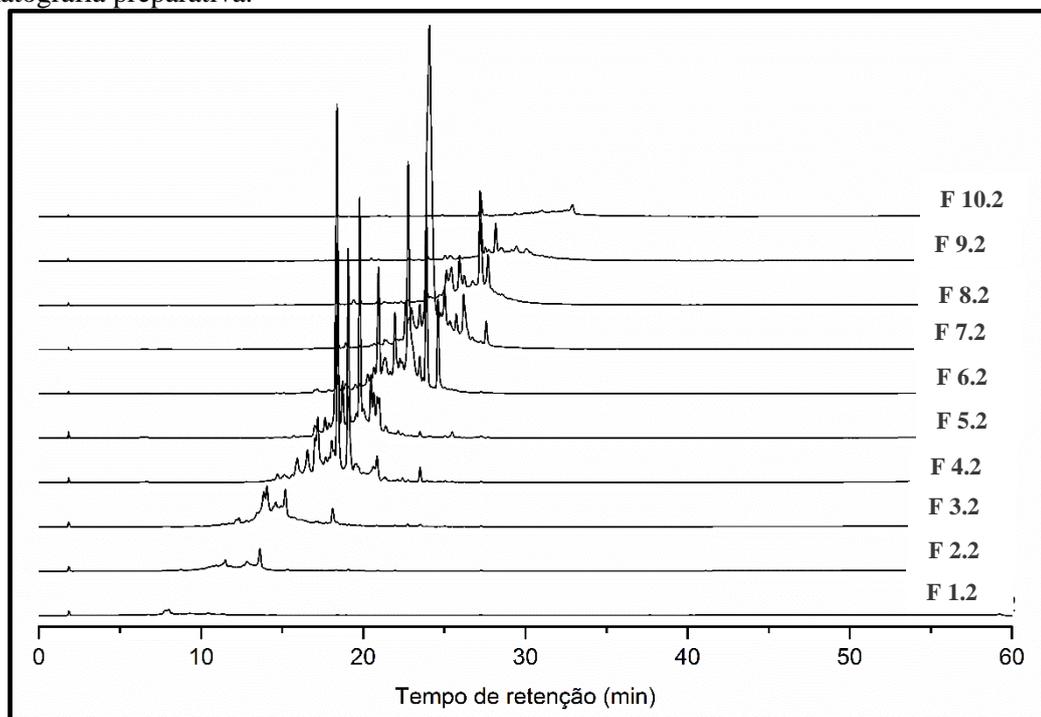
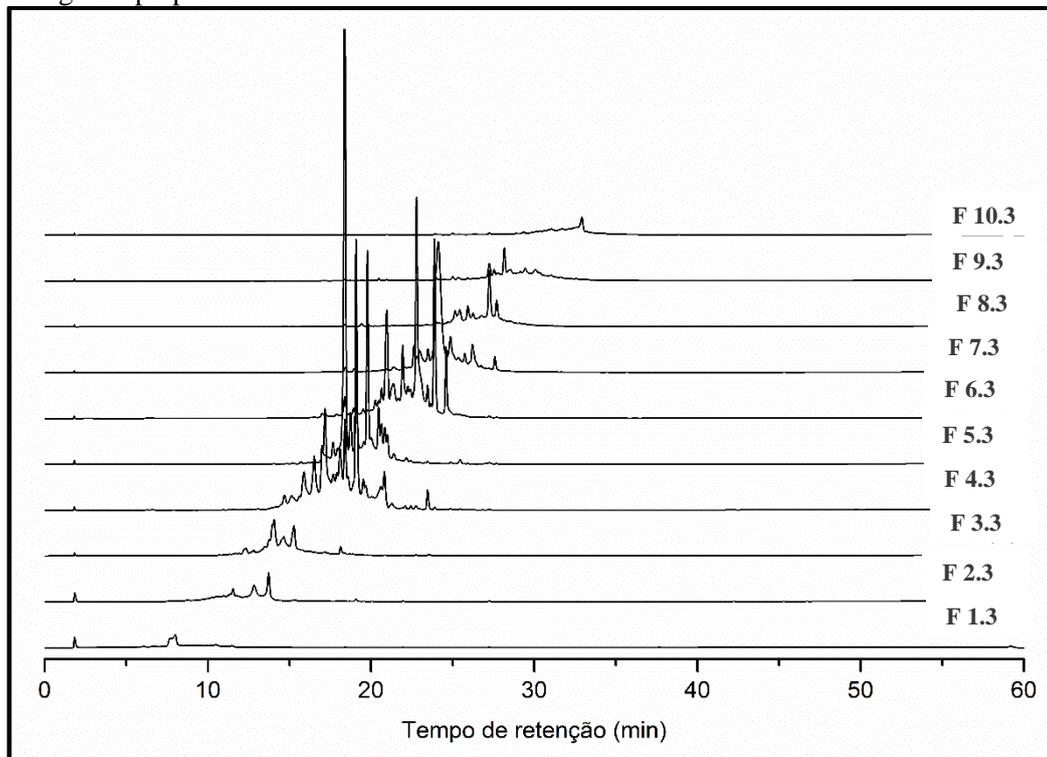


Figura 19 - Cromatogramas ($\lambda = 270$ nm) das frações de *P.niruri* obtidas na terceira injeção por cromatografia preparativa.



Pode-se notar comparando os três cromatogramas apresentados que a técnica de fracionamento e preparo de amostra, proporcionaram boa separação dos compostos em estudo, com picos resolvidos e bem definidos. Também percebe-se um deslocamento gradativo dos picos cromatográficos das frações 1 a 10, o aumento da característica apolar dos picos, indicando separação eficiente feita no *HPLC* preparativo. Desta forma, a condição é considerada adequada para a análise do perfil cromatográfico de frações do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, por demonstrar reprodutibilidade, precisão e um bom desempenho analítico, o que comprova o método ser reprodutível.

5.4 Determinação estrutural dos compostos majoritários

As análises de UPLC-q-TOF das 10 frações originadas do fracionamento por HPLC preparativo do extrato aquoso das folhas de *Phyllanthus niruri* proporcionou a detecção de 44 compostos no modo de ionização negativo, dos quais 21 foram devidamente identificados, correspondendo a 13 taninos hidrolisáveis, 3 flavonoides, 3 ácidos fenólicos e 2 compostos heterosídeos.

A **Tabela 3** traz as estruturas caracterizadas, suas fragmentações de maior intensidade e referências para corroborar as identificações desses metabólitos em outras amostras de *Phyllanthus niruri*. As moléculas não identificadas foram caracterizadas como N.I (não identificada). Este resultado subsidiou a caracterização química destas mesmas frações na análise por RMN. Deste modo, foi possível caracterizar nove compostos majoritários, entre os quais dois flavonoides glicosilados, além de sete taninos. As frações 1 e 2 não apresentaram compostos de interesse, já a fração 10 não foi possível realizar a elucidação estrutural da mesma até o presente momento. A seguir serão apresentadas as identificações moleculares e as determinações estruturais das substâncias.

Tabela 3 - Componentes das amostras de *Phyllanthus niruri* no modo de ionização negativo

Pico	t _r (min)	[M-H] ⁻ Observado	[M-H] ⁻ Calculado	Erro* (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Composto	Referências
1	1,69	331,0665	331,0665	0,0	271,438; 211,0198; 169,0103; 130,0849	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	Monogalloil-hexosídeo	(SENTANDREU <i>et. al.</i> , 2013)
2	2,37	447,1115	447,1139	-5.4	435,0576; 337,0154; 300,9724	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	N.I	---
3	2,40	669,0979	669,0939	6,0	447,1093; 337,0149; 300,9789	C ₂₇ H ₂₆ O ₂₀	Neochebuloygalloil- glicosídeo (isômero)	(YANG <i>et. al.</i> , 2012)
4	2,55	649,0646	649,0677	-4.8	435,0705; 300,9955; 169,0117	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉	Furosina	(LAI <i>et. al.</i> , 2013)
5	2,58	961,1168	--	--	707,1177; 353,0787; 191,0506; 179,0315	--	N.I	---
6	2,80	969,0864	969,0845	2,0	337,0134; 300,9938; 247,0239; 169,0084	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₈	Ácido repandusínico A	(OGATA <i>et al.</i> , 1992)
7	2,86	649,0615	649,0677	-9,6	435,0542; 301,056; 169,0536	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉	Furosina (isômero)	(LAI <i>et. al.</i> , 2013)
8	3,09	981,1122	981,1122	1,4	337,0120; 247,0200; 169,0101	C ₄₁ H ₃₄ O ₂₉	N.I	---
9	3,13	291,0135	291,0141	-2,1	247,0173; 220,0306; 191,0095	C ₁₃ H ₈ O ₈	Ácido carboxílico de brevifolina	(SENTANDREU <i>et. al.</i> , 2013)
10	3,29	951,0716	951,0740	-2,5	933,1627; 300,9928; 169,0127	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Geraniina	(KUMAR <i>et. al.</i> , 2015)
11	3,36	633,0709	633,0728	-3,0	463,0543; 300,9903	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Corilgina	(KUMAR <i>et. al.</i> , 2015)
12	3,51	387.1678	387.1655	5,9	207,1007; 169,0133	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	Ácido tuberônico hexosídeo	(KUMAR <i>et. al.</i> , 2015)

13	3,57	925,0974	925,0947	2,9	301,0007	C ₄₀ H ₃₀ O ₂₆	Fillantusiina C	(LATTÉ and KOLODZIEJ, 2000)
14	3,66	969,0861	969,0845	1,7	300,9979; 247,0177; 169,0129	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₈	Ácido repandusínico A	(OGATA <i>et al.</i> , 1992)
15	3,75	483,0174	--		450,9891	--	N.I	---
16	3,83	593,1497	593,1506	-1,5	473,1142; 429,0864; 357,0626; 327,0443	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Orientina-2'-O-ramnosídeo	(SPRENGER; <i>et. al.</i> , 2013)
17	3,88	447,0921	447,0927	-1,3	300,9987	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	N.I	---
18	3,89	951,0793	951,0740	5,6	300,9981; 169,0123	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Geraniina (isômero)	(KUMAR <i>et. al.</i> , 2015)
19	3,96	363,0681	--	--	300,9975; 169,0103	--	N.I	--
20	4,03	341,0872	341,0873	-0,3	--	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	N.I	---
21	4,09	577,1516	577,1557	-7,1	413,0957; 300,9958	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	Vitexina-2'-O ramnosídeo	(SPRENGER; <i>et. al.</i> , 2013)
22	4,13	300,9965	--	--	--	--	N.I	---
23	4,19	983,0989	983,1002	-1,3	--	C ₄₂ H ₃₂ O ₂₈	N.I	---
24	4,20	907,0898	--	--	--	--	N.I	---
25	4,22	965,0903	965,0896	0,7	300,9940; 247,0159; 169,0088	C ₄₂ H ₂₉ O ₂₇	Rhoiptleanina H	---

26	4,40	923,0833	923,0791	4,5	435,0550; 337,0254; 300,9973	C ₄₀ H ₂₈ O ₂₆	Fillantusiina U	(CHEN <i>et. al.</i> , 2013)
27	4,44	458,0198	--	--	--	--	--	--
28	4,46	951,0760	951,0740	2,1	301,0017; 169,0132	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Geraniina	(KUMAR <i>et. al.</i> , 2015)
29	4,49	983,1002	983,1002	0,0	951,0728; 300,9951; 169,0098	C ₄₂ H ₃₂ O ₂₈	--	---
30	4,50	363,0156	--	--	--	--	N.I	---
31	4,57	729,1609	--	--	--	--	N.I	---
32	4,65	401,1448	--	--	--	--	N.I	---
33	4,67	951,0812	951,0740	7,6	300,9993	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Geraniina (isômero)	KUMAR <i>et. al.</i> , 2015)
34	4,84	923,0812	923,0791	2,3	751,1198; 461,0203; 300,9968	C ₄₀ H ₂₈ O ₂₆	Fillantusiina U (isômero)	(CHEN <i>et. al.</i> , 2013)
35	4,93	889,0782	--	--	--	--	--	--
36	5,04	417,2054	--	--	--	--	--	---
37	5,28	583,1052	583,1088	-6,2	431,0991; 413,0855; 395,0760; 169,0117	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	Caempferol-O-galloil- rhamnosídeo	(GU <i>et. al.</i> , 2013)
38	5,31	571,1801	--	--	533,1989; 377,1223; 225,1088; 169,0094	--	N.I	--

39	5,44	575,2123	--	--	377,1223; 255,1088	--	N.I	--
40	5,52	545,2025	--	--	483,1849	--	N.I	---
41	5,70	559,1442	559,1452	-1,8	395,0741	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	Ácido 3-O-Sinapoyl-5-O-caffeoilquínico	--
42	6,15	571,1828	--	--	--	--	N.I	--
43	7.83	1041,5509	--	--	--	--	N.I	---
44	8.32	1055,5577	--	--	--	--	N.I	---

* representa a diferença entre a massa/carga do íon observada no espectrômetro de massas (experimental) e a sua massa/carga teórica.

-- Não apresentam valores

N.I: não identificada

5.4.1 Caracterização química da Fração FPnir 3

O espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Fig. 21**) apresentou sinais de 0,7 a 8,0 ppm, contudo a região de interesse entre δ_{H} 7,21-6,62 na forma de singletos para hidrogênios aromáticos, referentes aos grupos galoil, hexahidrodifenil (HHDP) e a um hidrogênio olefínico. Três singletos largos, sendo um deles em δ_{H} 6,18 (H-1'''), e dois na faixa de δ_{H} 5,30-4,60 (H-3'''), correspondentes aos hidrogênios glicosídicos. Foram observados também sinais para hidrogênios metínicos em δ_{H} 5,47 e 5,40 (H-2b e H-3b).

A fração FPnir 3 exibiu 3 picos majoritários no cromatograma de UPLC-q-TOF, sendo os compostos furosina (**44**), ácido repandusínico A (**39**) e corilagina (**41**) os componentes majoritários. O espectro de massas (ESI-) da furosina apresentou pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 649,0691 (calculado m/z 649,0677; erro = 2,2 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{19}$. O espectro de massas (ESI-) do ácido repandusínico A apresentou pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 969,0864 (calculado m/z 969,0845; erro = 2,0 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{O}_{28}$ e o espectro de massas (ESI-) da substância corilagina apresentou pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 633,0709 (calculado m/z 633,0728; erro = -3,0 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$.

O espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 22 e 23**) possibilitou a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, conforme mostrado na **Tabela 4**. Através deste experimento foram atribuídos os sinais dos hidrogênios de metoxilas em δ_{H} 4,21 e 4,01 cujos carbonos em δ_{C} 62,0 e 61,0 ppm, respectivamente, compatíveis com os apresentados na literatura (COLOMBO *et al.*, 2009; GLEŃSK *et al.*, 2016; MIGUEL *et al.*, 1996).

A comparação dos dados apontados com aqueles obtidos na literatura, levou a sugestão de taninos hidrolisados, como furosina (**44**), ácido repandusínico A (**39**) e corilagina (**41**) (**Fig 20**).

Figura 20 - Estruturas dos compostos identificados, ácido repandusínico, corilagina e furosina.

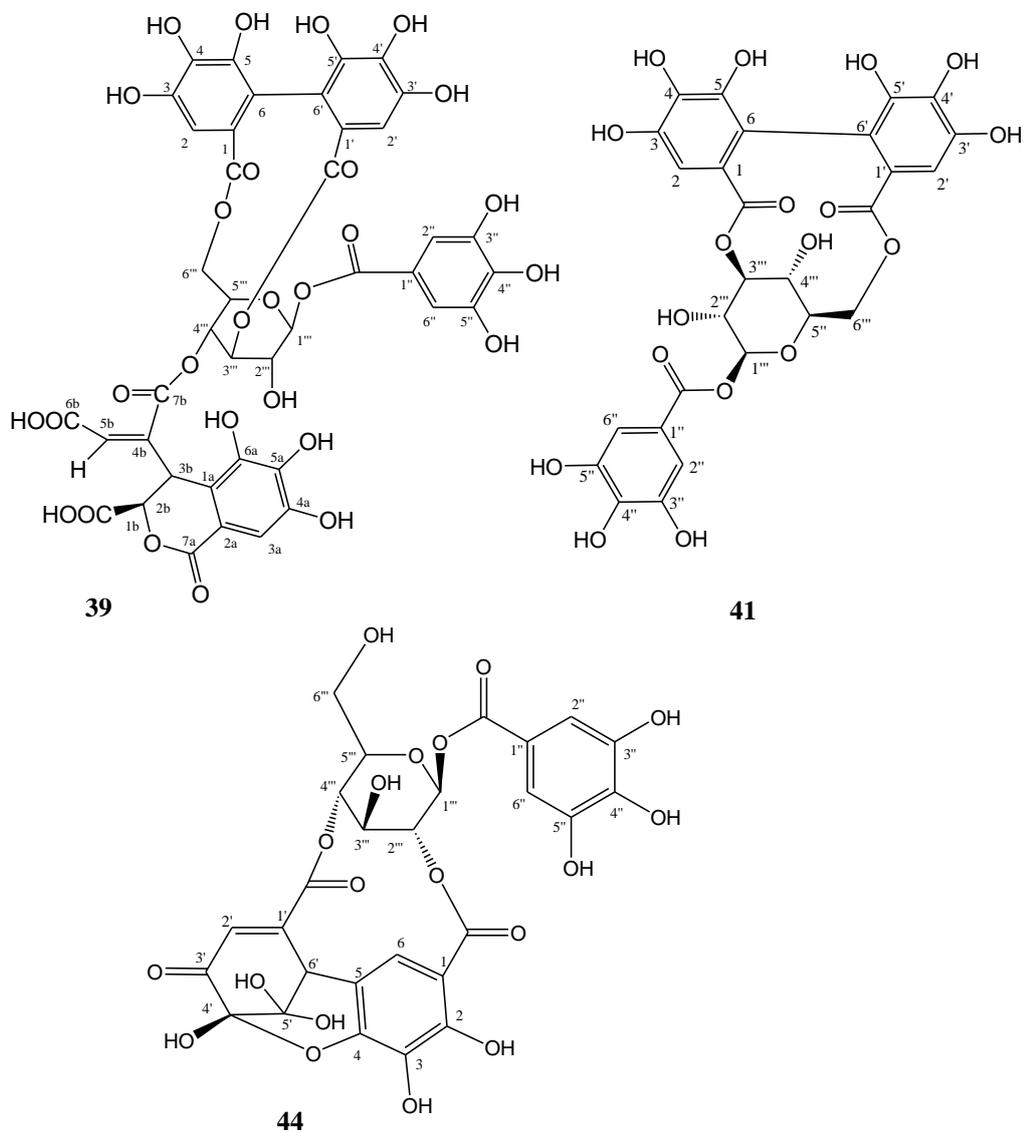


Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da fração FPnir 3 comparado com os valores relatados na literatura (COLOMBO *et al.*, 2009; GLEŃSK *et al.*, 2016; MIGUEL *et al.*, 1996) para as substancias **1**, **2** e **3**.

Posição	Ácido repandusínico A		Corilagina		Furosina		HSQC*-FPnir 3	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C=O	168,65	--	167,1	--	166,5	--	**	--
C=O	170,50	--	166,8	--	166,1	--	**	--
5'	138,18	--	145,6	--	113,4	--	**	--
5	138,75	--	144,9	--	119,3	--	**	--
3'	110,60	--	144,3	--	192,5	--	**	--
3	109,26	--	143,9	--	137,2	--	**	--
4'	146,11	--	135,6	--	137,2	--	**	--
4	146,51	--	135,5	--	149,1	--	**	--
1'	116,84	--	123,9	--	154,6	--	**	--
1	117,69	--	123,1	--	109,0	--	**	--
6'	145,67	--	115,8	--	45,9	4,05 (dd; J=5.5, 10.6 Hz)	48	4,05 (s)
6	145,76	--	115,6	--	120,8	7,13 (s)	**	N.I

Posição	Ácido repandusínico A		Corilagina		Furosina		HSQC*-FPnir 3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2'	125,55	6,713 (s)	107	6,55 (s)	139,5	7,22 (s)	106,0	7,21-6,62 (s)
2	125,83	6,711 (s)	106,1	6,48 (s)	143,0	7,25 (s)	106,0	6,62 (s)
Galloil								
C=O	167,06	--	164,8	--	165,5	--	**	--
3''	146,92	--	145,6	--	145,5	--	**	--
5''	146,92	--	145,6	--	145,5	--	**	--
4''	141,23	--	139	--	139,0	--	**	--
1''	120,99	--	118,7	--	125,6	--	**	--
2''	111,29	7,06 (s)	109	7,01 (s)	110,41	6,54 (s)	109,02	7,12-7,05 (s)
6''	111,29	7,06 (s)	109	7,01 (s)	110,41	6,54 (s)	109,02	7,12-7,05 (s)
Glicose								
1'''	95,72	6,18 (d)	92,2	6,2 (d; J = 7,5 Hz)	92,4	6,42 (d, J = 8.4 Hz)	91,0	6,18 (s)

Posição	Ácido repandusínico A		Corilagina		Furosina		HSQC*-FPnir 3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
3'''	71,73	4,82 (s)	77,4	4,58 (br s)	63,4	5,15 (d; $J = 3.3\text{Hz}$)	67,0	5,26-4,65 (s)
5'''	74,47	4,49 (t; $J = 8,29\text{ Hz}$)	76,3	4,35 (t; $J = 8.5\text{ Hz}$)	77,8	4,20 (m)	77,0	4,32 (m)
2'''	70,12	4,05 (s)	71,6	3,87 (d; $J = 7.5\text{ Hz}$)	71,2	5,34 (d; $J = 3.05\text{Hz}$)	**	N.I
4'''	65,80	5,59 (d)	63,9	4,22 (br s)	78,5	4,45 (s)	**	N.I
6'''	65,44	4,23 (dd $J = 8,3\text{ Hz}$)	62,2	4,21 (dd; $J = 11.0\text{ Hz}$)	62,8	4,05 (dd)	62,0	4,21-3,93 (d)
2,4-acil								
1a	117,41	--	--	--	--	--	**	--
2a	117,73	--	--	--	--	--	**	--
3a	109,81	7,07 (s)	--	--	--	--	88,48	7,05 (s)
4a	147,13	--	--	--	--	--	**	--
5a	140,93	--	--	--	--	--	**	--
6a	144,58	--	--	--	--	--	**	--

Posição	Ácido repandusínico A		Corilagina		Furosina		HSQC*-FPnir 3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
7a	167,38	--	--	--	--	--	**	--
1b	171,50	--	--	--	--	--	**	--
2b	80,15	5,46 (d)	--	--	--	--	67,15	5,47 (d; $J = 6,72$ Hz)
3b	36,62	5,40 (d)	--	--	--	--	48,28	5,40 (m)
4b	140,53	--	--	--	--	--	**	--
5b	134,35	7,13 (s)	--	--	--	--	109,02	7,12 (s)
6b	166,44	--	--	--	--	--	**	--
7b	166,42	--	--	--	--	--	**	--

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I: não identificado

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 3.

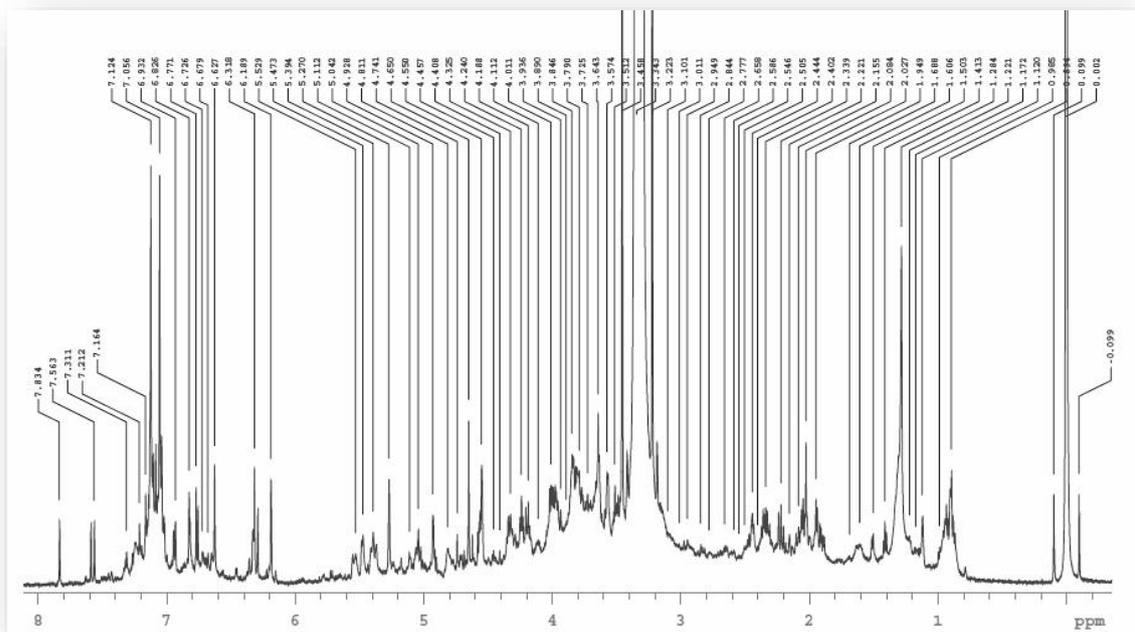


Figura 22 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 3.

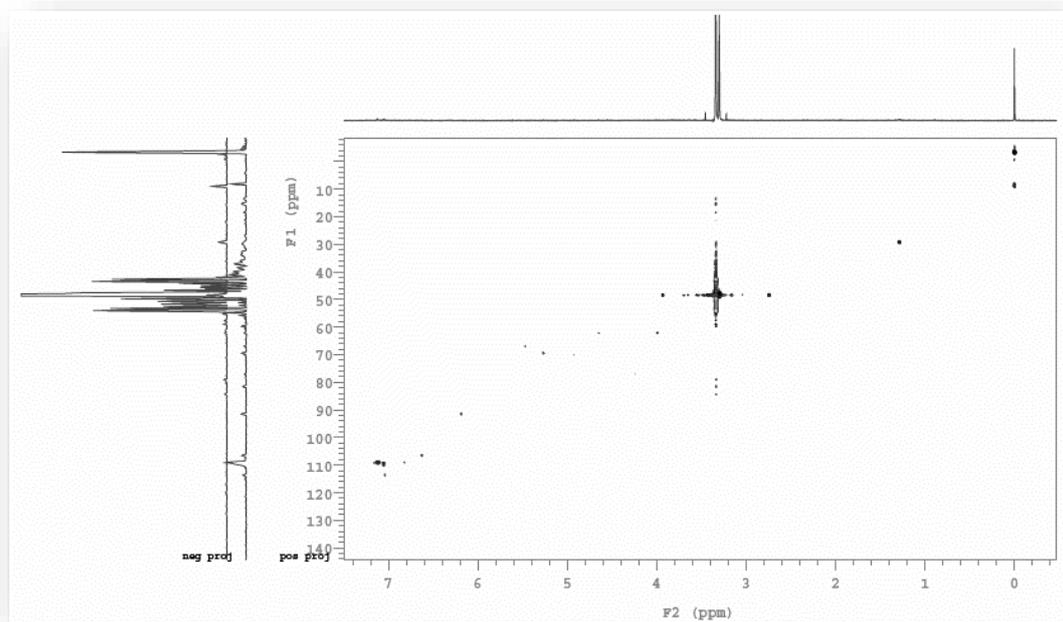
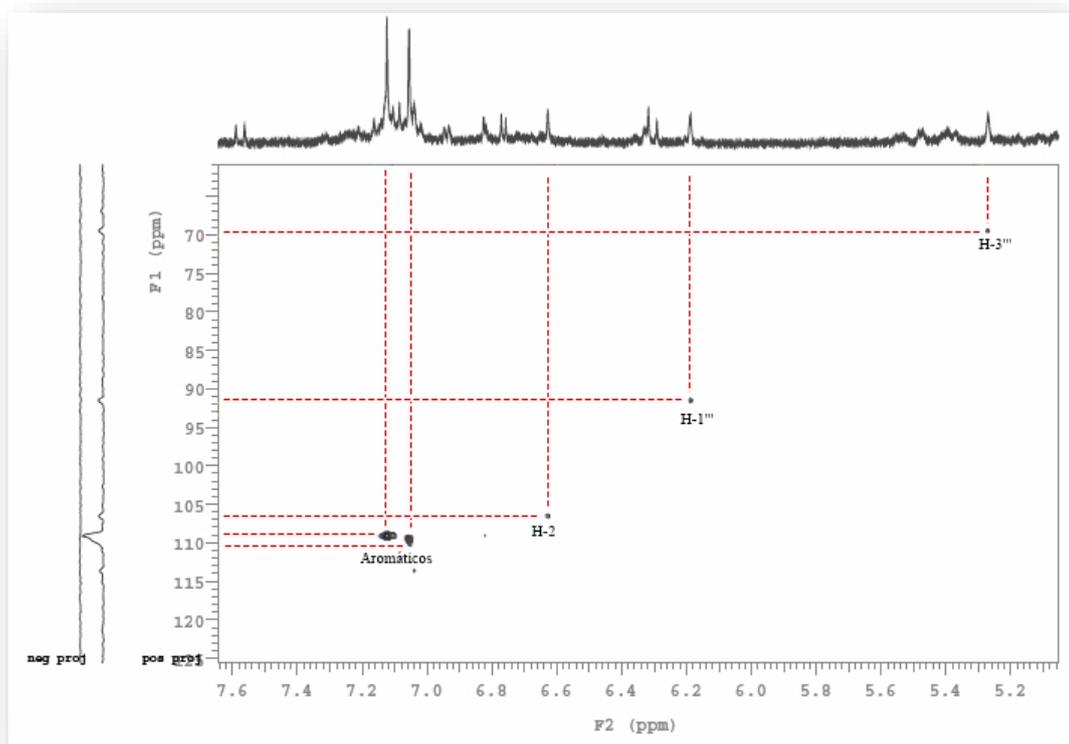


Figura 23 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 3



5.4.2 Caracterização química da Fração FPnir 4

O espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Figs. 26**) demonstrou sinais na região de aromáticos na faixa entre δ_{H} 7,07-7,03 compatível com hidrogênios do grupo galloil. Quatro sinais para hidrogênios ligados a carbono oxigenado em δ_{H} 6,24 (s; H-1'''), δ_{H} 5,48 (s; H-2'''), δ_{H} 4,80 (s; H-3''') e δ_{H} 4,50 (d; $J = 7,92$ Hz; H-4'''), dois dupletos para hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 4,23 (dd; $J = 8,22$ Hz H-6'''), característicos do esqueleto da glicose. Foram observados ainda sinais olefinicos em δ_{H} 7,21 (H-2b).

A fração FPnir4 também exibiu 3 picos no cromatograma de UPLC-q-TOF, sendo os compostos, ácido repandusínico A (**39**), corilagina (**41**) e geraniina (**45**) os componentes majoritários. O espectro de massas (ESI-) do composto **39** apresentou pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 969,0909 (calculado m/z 969,0845; erro = 5,9 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{O}_{28}$. O espectro de massas (ESI-) do composto **41** apresentou pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 633,0685 (calculado m/z 633,0728; erro = -6,8 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$, e, o espectro de massas (ESI-) do composto geraniina apresentou pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 951,0793 (calculado m/z 951,0740; erro = 5,6 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{28}\text{O}_{27}$.

Cada sinal de hidrogênio foi devidamente correlacionado ao seu respectivo sinal de carbono através da análise do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 27, 28 e 29**), conforme demonstrado na **Tabela 5**. Os dados apresentados e uma pesquisa àqueles relatados na literatura levaram a conclusão de que os compostos presentes na fração 4 se tratavam de ácido repandusínico A, corilagina, além do composto geraniina, com sua estrutura demonstrada abaixo (**Fig. 24**).

Figura 24 - Estrutura do composto denominado geraniina.

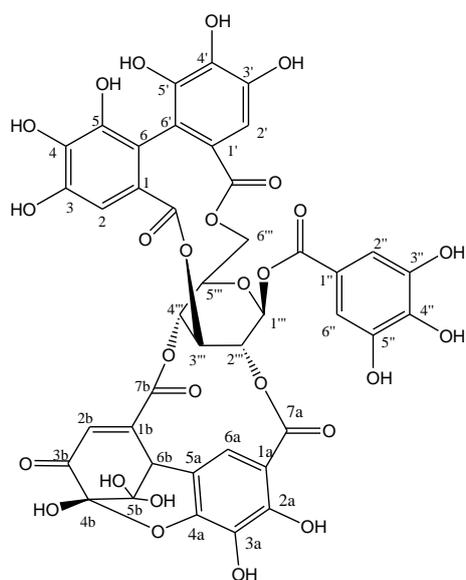


Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da FPnir 4 comparado com os valores relatados na literatura (GLEŃSK *et al.*, 2016) para a substancia geraniina..

Posiçã	Geraniina		HSQC*- FPnir 4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C=O	166,2	--	**	--
C=O	168,4	--	**	--
5'	145,6	--	**	--
5	144,9	--	**	--
3'	144,3	--	**	--
3	143,9	--	**	--
4'	135,6	--	**	--
4	135,5	--	**	--
1'	123,9	--	**	--
1	123,1	--	**	--
6'	115,8	--	**	--
6	115,6	--	**	--
2'	107,0	6,71 (s)	106,8	6,63 (s)
2	106,1	6,71 (s)	106,8	6,65 (s)
		Galloil		
C=O	164,8	--	**	--
3''	145,5	--	**	--
5''	145,5	--	**	--
4''	139,0	--	**	--
1''	125,6	--	**	--
2''	110,41	6,58 (s)	109,6	7,07-7,03 (s)
6''	110,41	6,59 (s)	109,6	7,07-7,03 (s)
		Glicose		
1'''	92,2	6,18 (d)	93,73	6,24 (d; $J = 3,73$ Hz)
3'''	77,4	4,82 (s)	70,45	4,80 (s)
5'''	76,3	4,49 (t; $J = 8,29$ Hz)	74,82	4,50 (d; $J = 7,92$ Hz)
2'''	71,2	5,34(d)	68,83	5,48 (s)
4'''	78,5	4,45 (d)	74,40	4,50 (d; $J = 7,92$ Hz)
6'''	62,2	4,23 (dd; $J = 8,3$ Hz)	63,56	4,23 (dd; $J = 8,22$ Hz)

Posição	Geraniina		HSQC*- FPnir 4	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1a	109,0	--	**	--
2a	143,0	7,15 (s)	**	--
3a	137,2	--	**	--
4a	149,1	--	**	--
5a	119,3	--	**	--
6a	120,8	7,17 (s)	112,80	7,21 (s)
7a	165,4	--	**	--
1b	154,6	--	**	--
2b	139,5	7,22 (s)	N.I	7,23 (s)
3b	191,7	--	**	--
4b	137,2	--	**	--
5b	113,4	--	**	--
6b	45,9	4,05 (s)	68,10	4,03 (s)
7b	165,6	--	**	--

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I: não identificado

Figura 25 - Espectro de massas da geraniina.

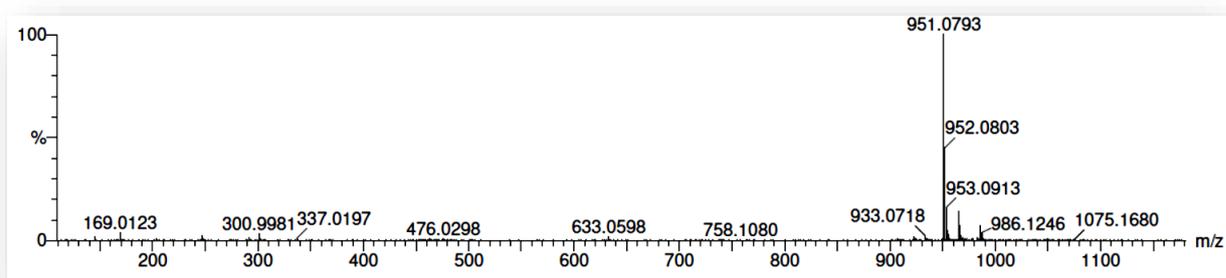


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnr 4.

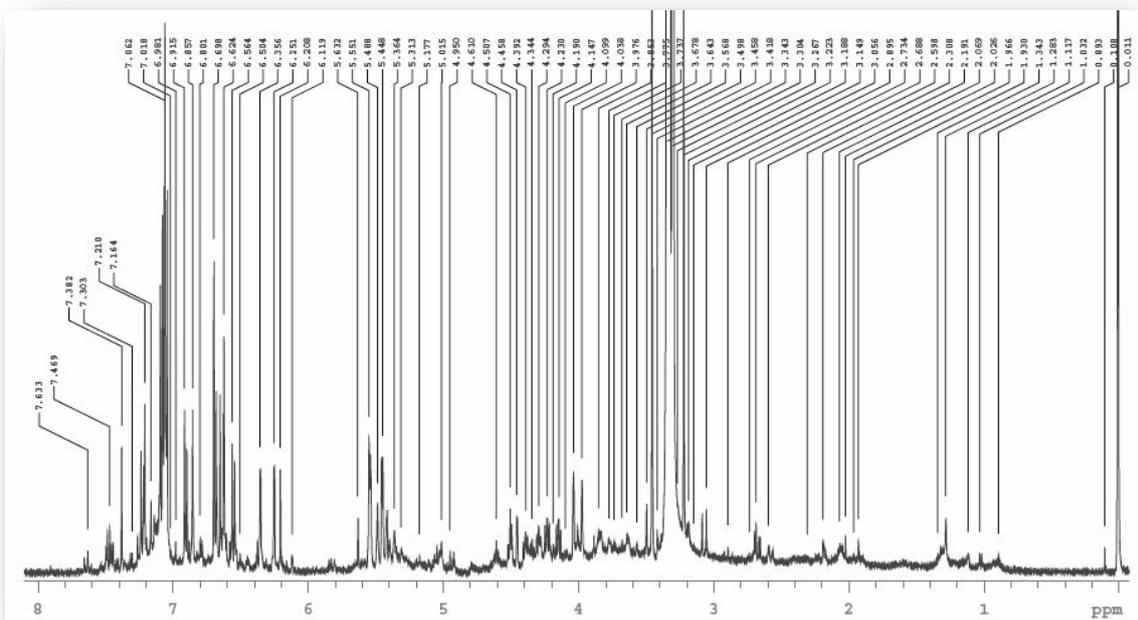


Figura 27 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnr 4.

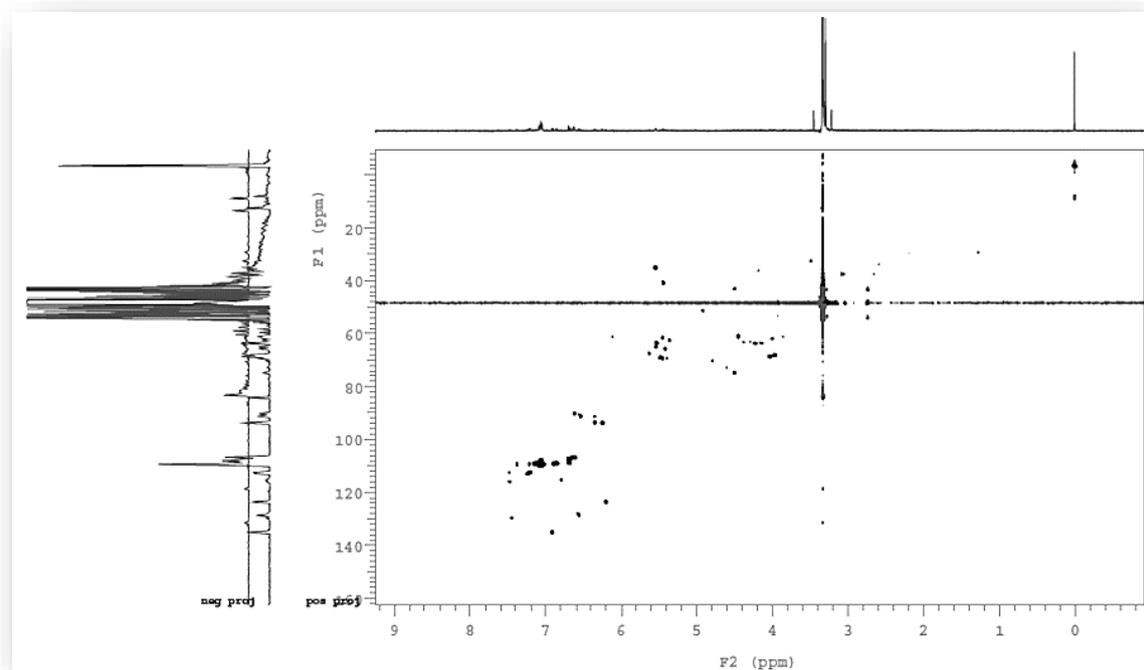


Figura 28 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 4.

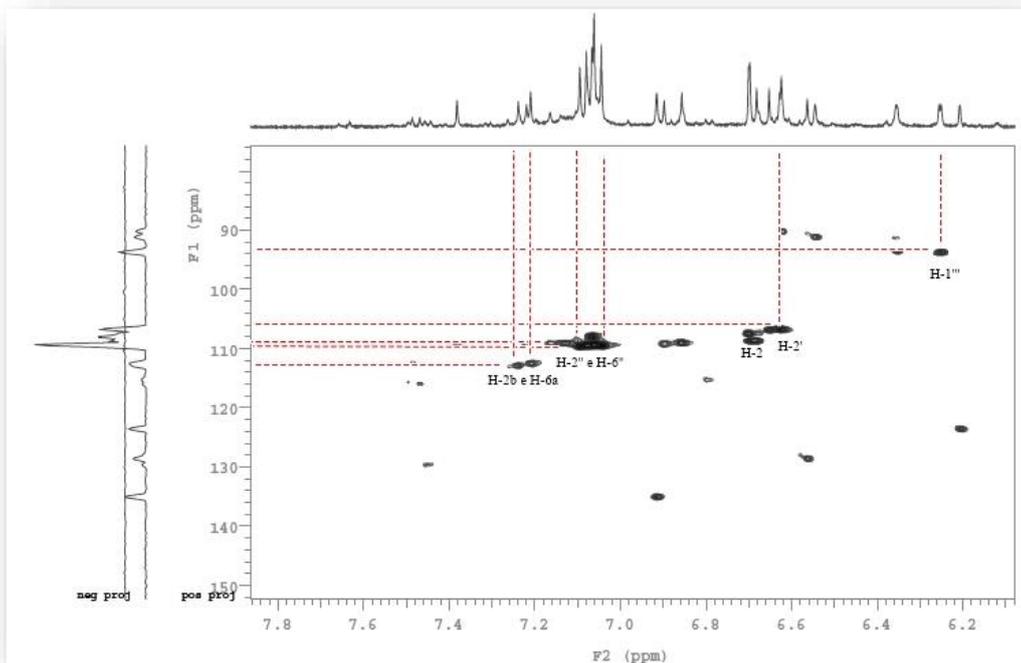
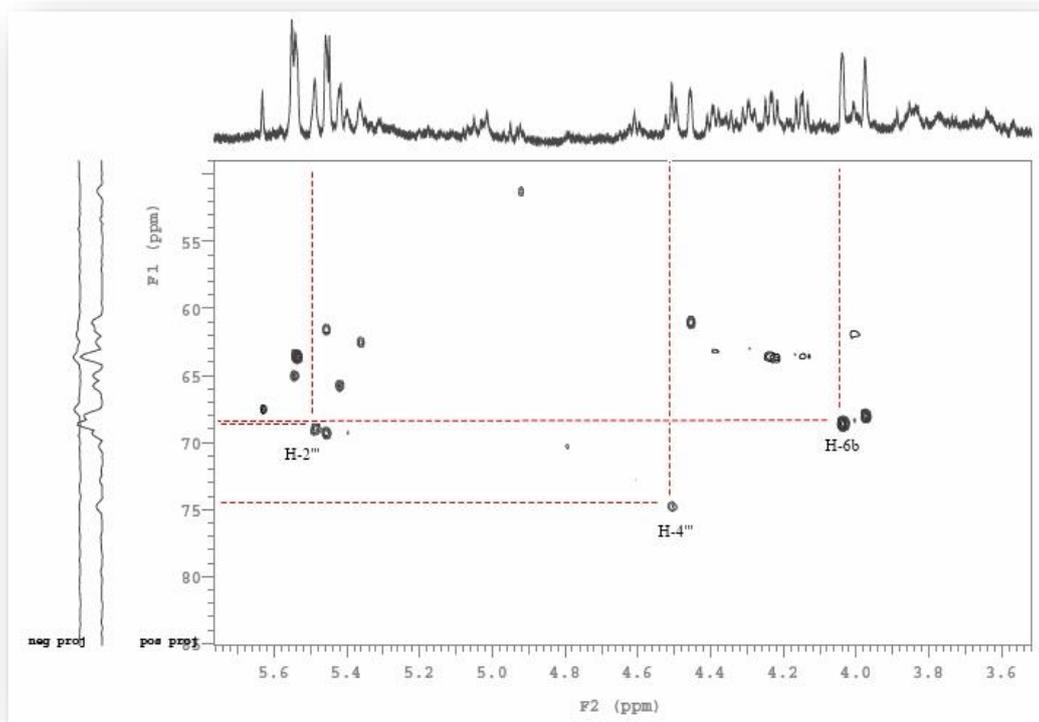


Figura 29 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 4.



5.4.3 Caracterização química da Fração FPnr 5

O espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Fig. 32**) apresentou sinais para hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,09 (H-3a), δ_{H} 7,04 (H-2''' e H-6'''), δ_{H} 6,65 (H-2) e δ_{H} 6,63 (H-2'). Dois sinais para hidrogênios metilênicos em δ_{H} 4,14 (t; $J = 8,04$ Hz; H-6''') e δ_{H} 2,23 (m; H-3b). Um sinal para hidrogênio ligado a carbonos com hidroxila em δ_{H} 4,56 (H-4b) e um sinal para hidrogênio metínico em δ_{H} 4,63 (s; H-1b).

A fração FPnr 5 exibiu 4 picos no cromatograma de UPLC-q-TOF, sendo os compostos **39**, **41**, **45**, e **42** os componentes majoritários. O espectro de massas (ESI-) apresentou além dos picos já identificados nas frações 3 e 4, o pico $[\text{M-H}]^-$ com m/z 925,0969 (calculado m/z 925,0947; erro = 2,4 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{O}_{26}$ do composto **42**, identificado como filantusiina C.

Através do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 33, 34 e 35**) foi possível correlacionar cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, conforme mostrado na **Tabela 6**.

Quando comparados com dados relatados na literatura, os dados aqui discutidos levam a concluir que as estruturas presentes nesta fração são: ácido repandusínico A, corilagina, geraniina e filantusiina C (**Fig. 30**) (LATTÉ et al., 2008).

Figura 30 - Estrutura do composto filantusiina C.

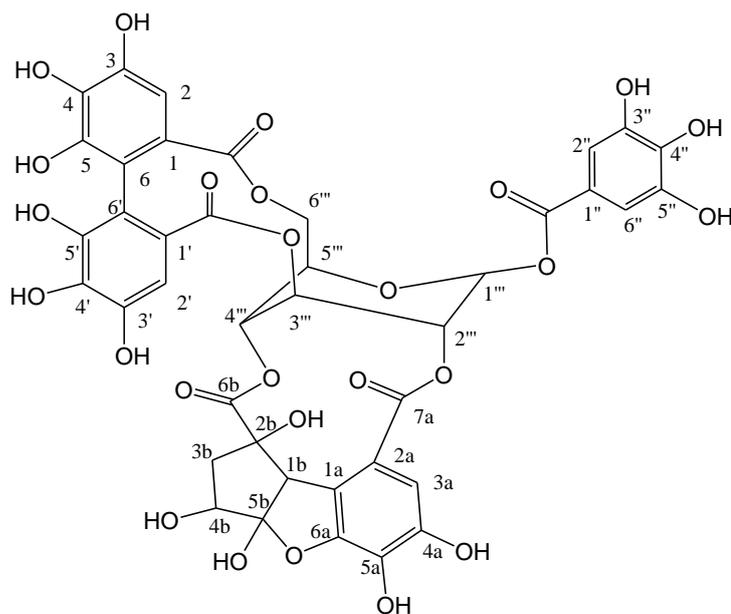


Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da FPnir 5 comparado com os valores relatados na literatura (LATTÉ et al., 2008) para a substancia filantusiina C.

Posição	Filantusiina C		HSQC*- FPnir 5	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C=O	167,6	--	**	--
C=O	170,3	--	**	--
5'	138,6	--	**	--
5	137,7	--	**	--
3'	124,4	--	**	--
3	125,6	--	**	--
4'	146,3	--	**	--
4	145,7	--	**	--
1'	117,4	--	**	--
1	116,3	--	**	--
6'	145,7	--	**	--
6	146,2	--	**	--
2'	110,5	6,64 (s)	106,63	6,63 (s)
2	108,1	6,82 (s)	106,63	6,65 (s)
		Galoil		
C=O	166,0	--	**	--
3''	146,5	--	**	--
5''	146,5	--	**	--
4''	140,8	--	**	--
1''	120,0	--	**	--
2''	111,0	7,06 (s)	109,98	7,04 (s)
6''	111,0	7,06 (s)	109,98	7,04 (s)
		Glicose		
1'''	92,6	6,34 (s)	91,24	6,33 (s)
3'''	63,0	5,52 (s)	61,52	5,52 (s)
5'''	73,4	5,06 (t; $J = 10,9$ Hz)	74,23	4,56 (m)
2'''	68,3	5,48 (s)	66,79	5,47 (s)
4'''	66,0	5,37 (s)	64,84	5,35 (s)
6'''	64,5	4,32 (dd; $J = 8,3$ Hz)	63,47	4,14 (t; $J = 8,04$ Hz)

Posição	Filantusiina C		HSQC*- FPnr 5	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
		2,4-acil		
7a	165,8	--	**	--
6b	174,3	--	**	--
1a	119,3	--	**	--
2a	117,7	--	**	--
3a	111,9	7,09 (s)	109,71	7,09 (s)
4a	147,7	--	**	--
5a	136,5	--	**	--
6a	150,2	--	**	--
1b	63,9	4,63 (s)	62,36	4,63 (s)
2b	78,9	--	**	--
3b	46,9	2,23 (t); 2,35 (dd)	45,0	2,23 (t)
4b	74,9	4,57 (dd; $J =$ 6,8 Hz)	75,0	4,56 (m)
5b	117,3	--	**	--

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I não identificado

Figura 31 - Espectro de massas da filantusiina C.

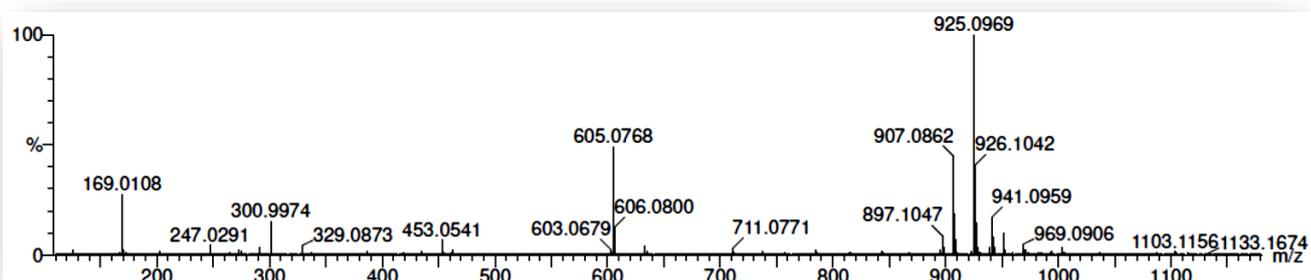


Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 5.

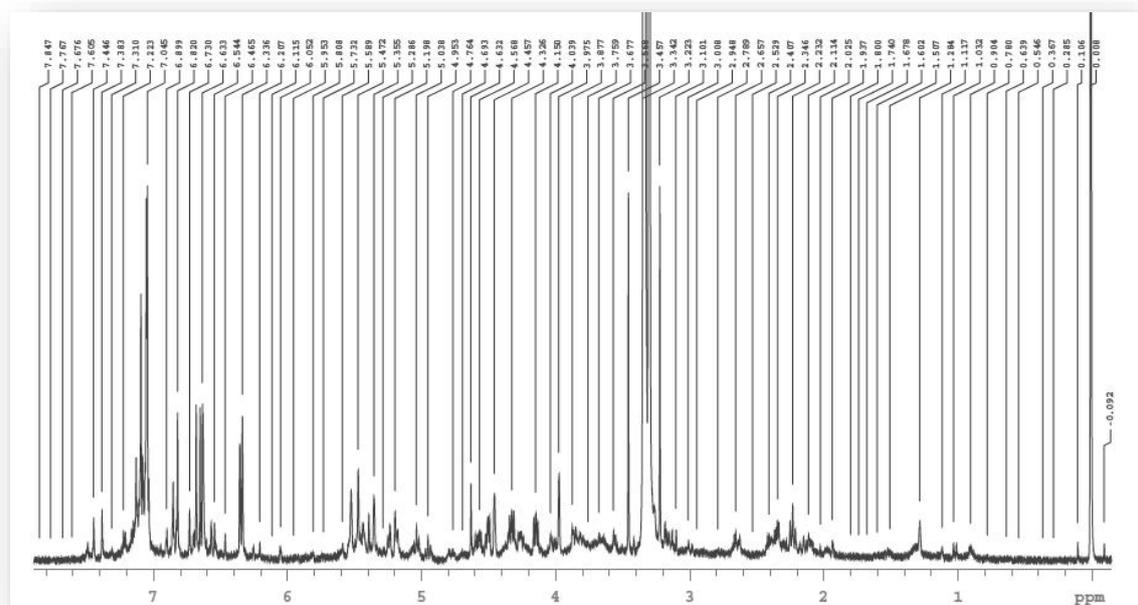


Figura 33 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 5.

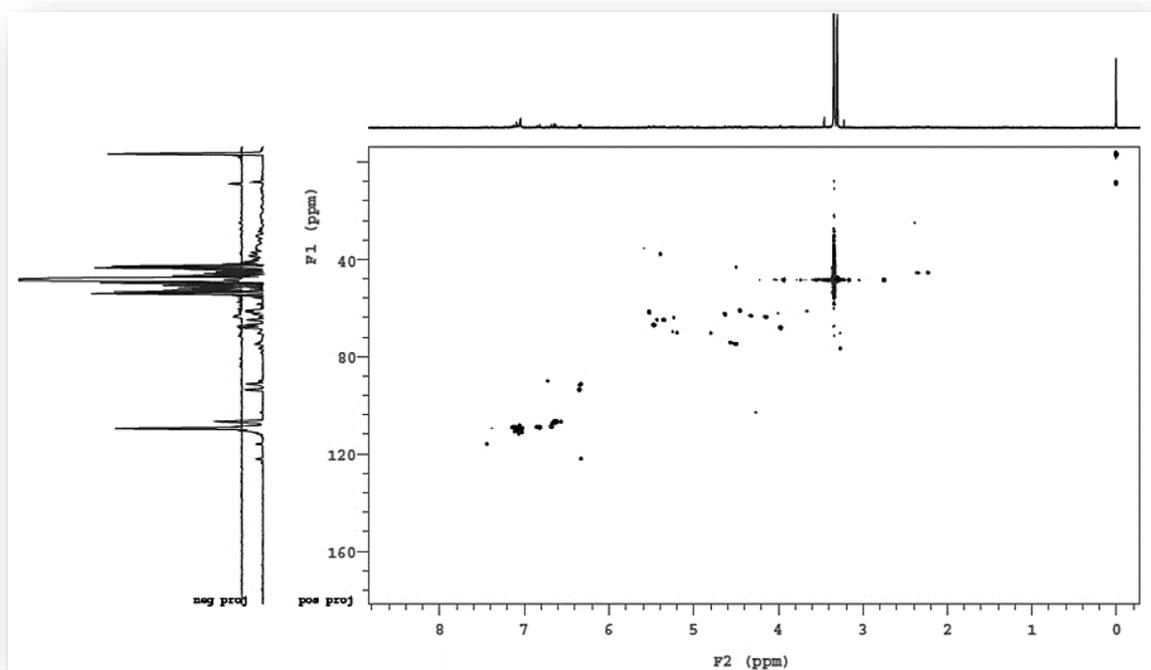


Figura 34 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 5.

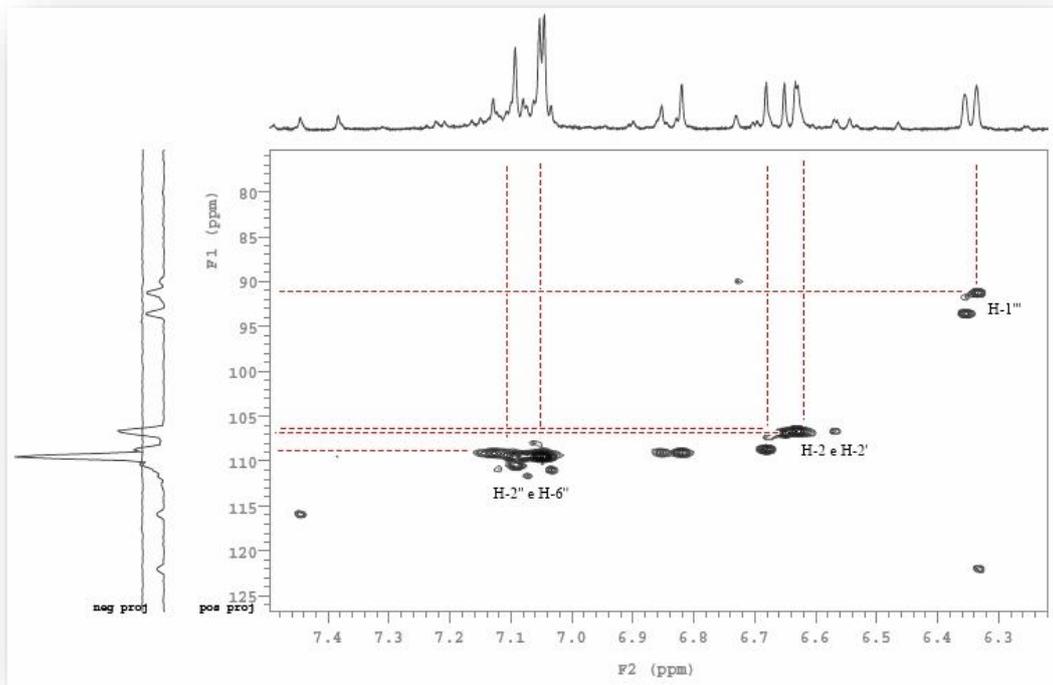
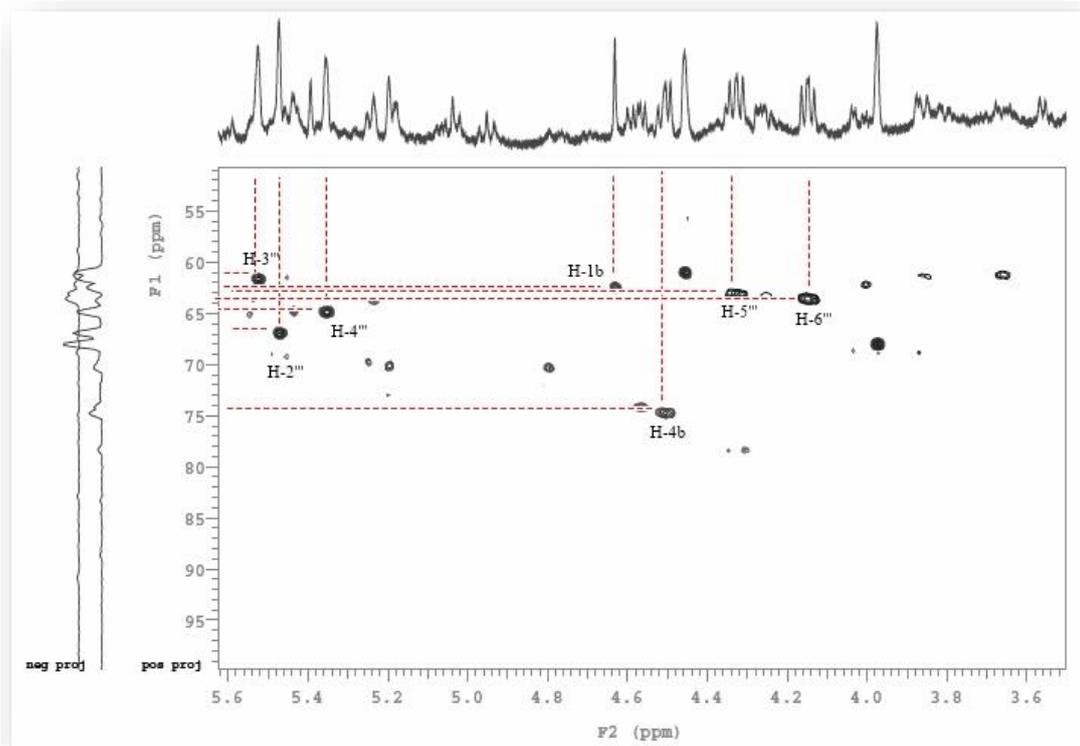


Figura 35 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 5.



5.4.4 Caracterização química da Fração FPnir 6

O espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Fig. 38**) demonstrou vários sinais na faixa δ_{H} 7,1-6,5, pertencentes a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, semelhantes aos visualizados para corilagina, furosina, ácido repandusínico e geraniina. Foi observado um singlete para hidrogênio oximetínico em δ_{H} 5,19 (H-5''') e singletos e dubletos para sinais de metilas na região de δ_{H} 2,0-0,5.

A fração FPnir 6 exibiu um pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 965,0903 (calculado m/z 965,0896; erro = 0,7ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{42}\text{H}_{29}\text{O}_{27}$.

Através do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 39, 40, 41 e 42**), foi possível identificar a correlação do hidrogênio em δ_{H} 5,27 ao carbono metínico em δ_{C} 37,56, além do sinal em δ_{H} 3,34 correlacionado ao carbono com deslocamento de δ_{C} 48,35, possivelmente ser de uma metoxila, conforme os dados apresentados na **Tabela 7**.

A reunião destes dados espectroscópicos obtidos e a comparação minuciosa com dados relatados na literatura, seguindo a tendência dos compostos discutidos anteriormente, levou a concluir que a estrutura majoritária da fração 6 seja consistente com de um ellagitannino, previamente isolada da espécie *Rhoiptelea chiliantha* (Rhoipteleaceae) (JIANG; TANAKA; KOUNO, 1999), denominada rhoipteleanina H (**54**), conforme apresentada na **Fig. 36**.

Figura 36 – Estrutura do composto rhoipteleanina H.

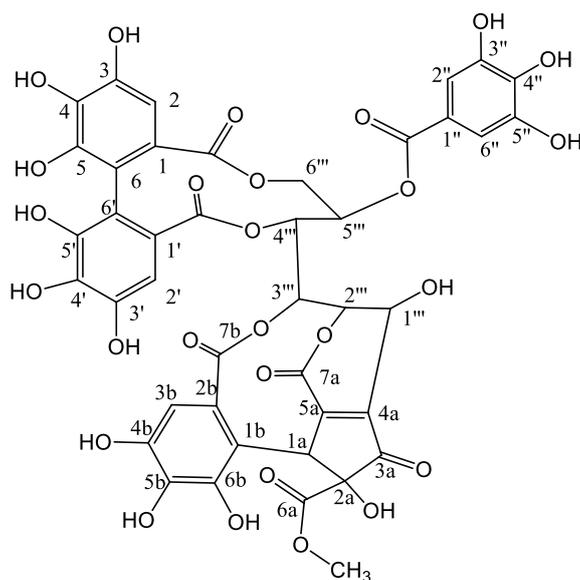


Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/150 MHz, MeOD) da FPnir 6 comparado com os valores relatados na literatura (JIANG; TANAKA; KOUNO, 1999) para a substancia rhoipteleanina H.

Posição	Rhoipteleanins H		HSQC*-FPnir 6	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C=O	169,1	--	**	--
C=O	168,8	--	**	--
5'	136,8	--	**	--
5	136,1	--	**	--
3'	126,4	--	**	--
3	125,1	--	**	--
4'	144,6	--	**	--
4	144,6	--	**	--
1'	117,4	--	**	--
1	116,3	--	**	--
6'	144,8	--	**	--
6	144,8	--	**	--
2'	108,5	6,60 (s)	106,98	6,62 (s)
2	107,2	6,91 (s)	106,98	6,62 (s)
Galoil				
C=O	166,8	--	**	--
3''	146,0	--	**	--
5''	146,0	--	**	--
4''	139,8	--	**	--
1''	120,2	--	**	--
2''	111,0	7,20 (s)	119,8	7,04 (s)
6''	111,0	7,20 (s)	119,8	7,04 (s)
Glicose				
1'''	62,8	5,42 (dd)	64,0	5,62
2'''	79,3	4,98 (d)	73,21	4,99 (m)
3'''	67,0	6,10 (d)	92,91	6,22 (d; $J = 5,53$ Hz)
4'''	73,4	5,59 (dd)	81,19	5,27 (s)
5'''	69,7	5,38 (dd)	69,90	5,19 (s)
6'''	64,7	5,01 (dd) 4,02 (d)	61,02	3,96 (d; $J = 10,02$ Hz)

Posição	Rhoipteleanins H		HSQC*-FPnir 6	
	δ_C	δ_H		δ_C
1 ^a	44,9	5,32 (d; 3)	37,56	5,27
2 ^a	82,7	--	**	--
3 ^a	200,4	--	**	--
4 ^a	142,7	--	**	--
5 ^a	155,5	--	**	--
6 ^a	171,5	--	**	--
OCH ₃	53,8	3,76 (s)	48,35	3,34 (s)
1b	110,5	--	**	--
2b	124,4	--	**	--
3b	107,2	6,43 (s)	122,46	6,36 (s)
4b	145,7	--	**	--
5b	135,3	--	**	--
6b	146,3	--	**	--
7b	166,8	--	**	--

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D ¹H, ¹³C-HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I não identificado

Figura 37 - Espectro de massas da rhoipteleanina H.

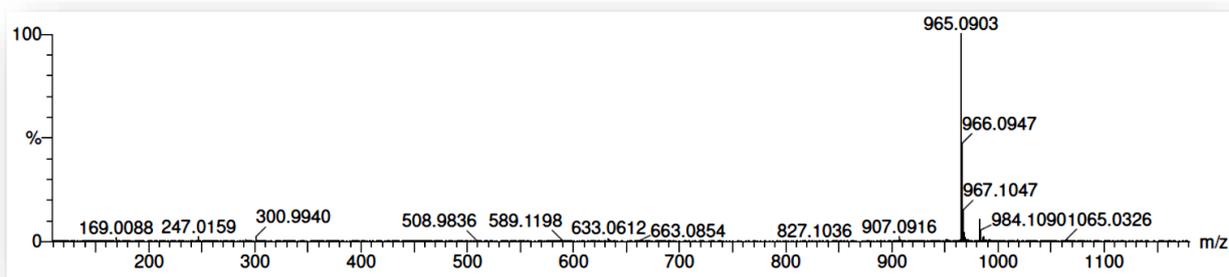


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 6.

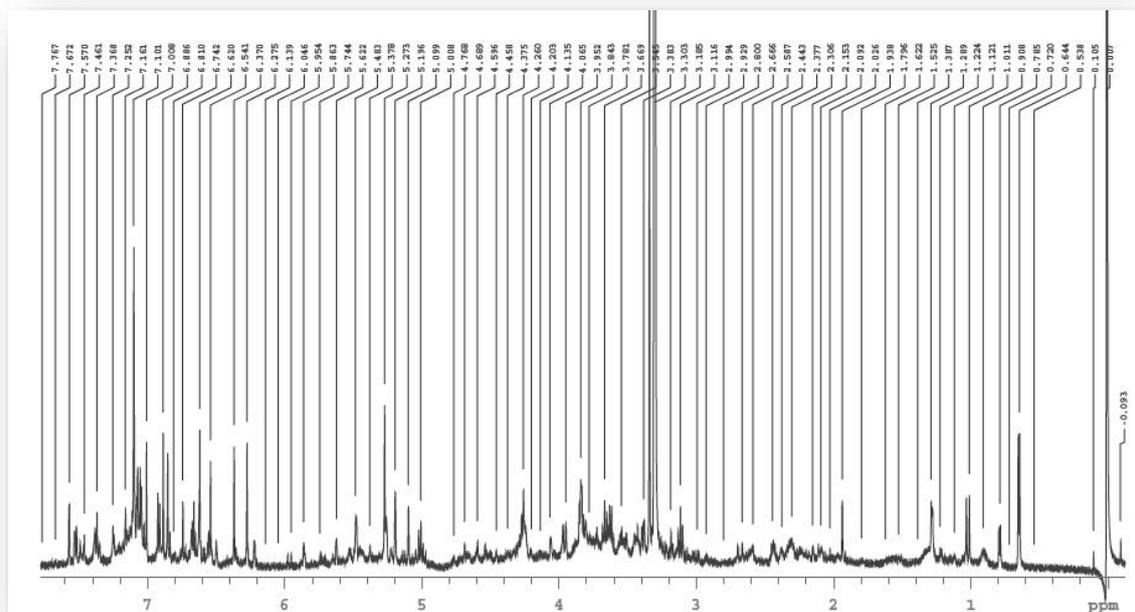


Figura 39 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6.

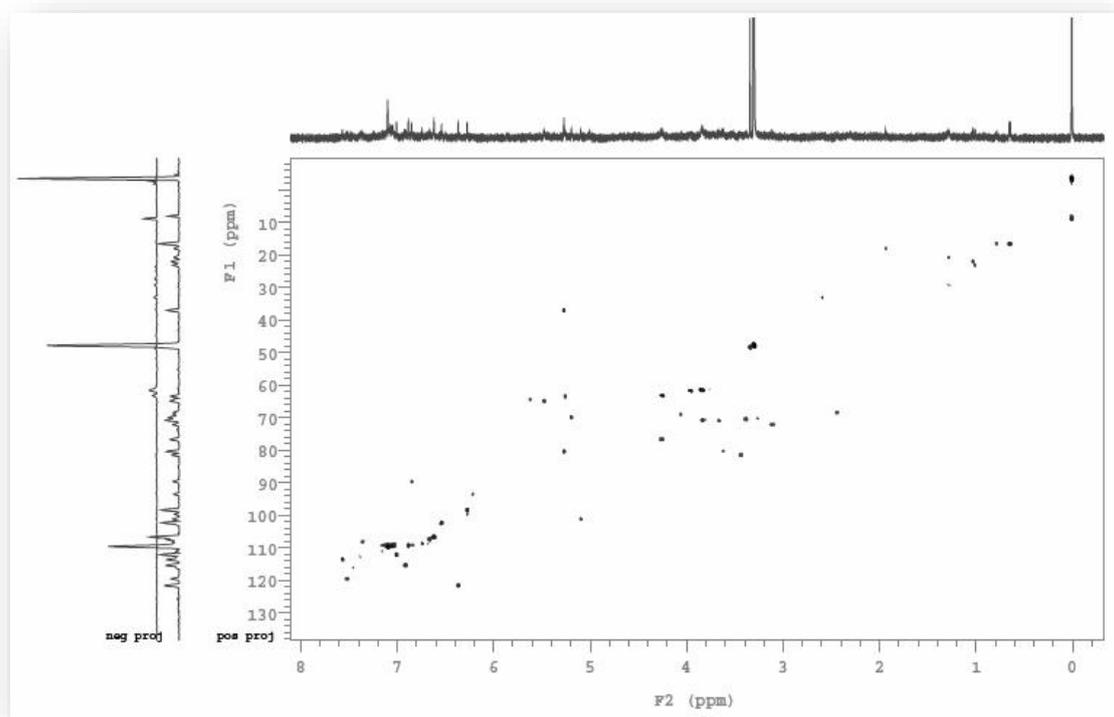


Figura 40 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6.

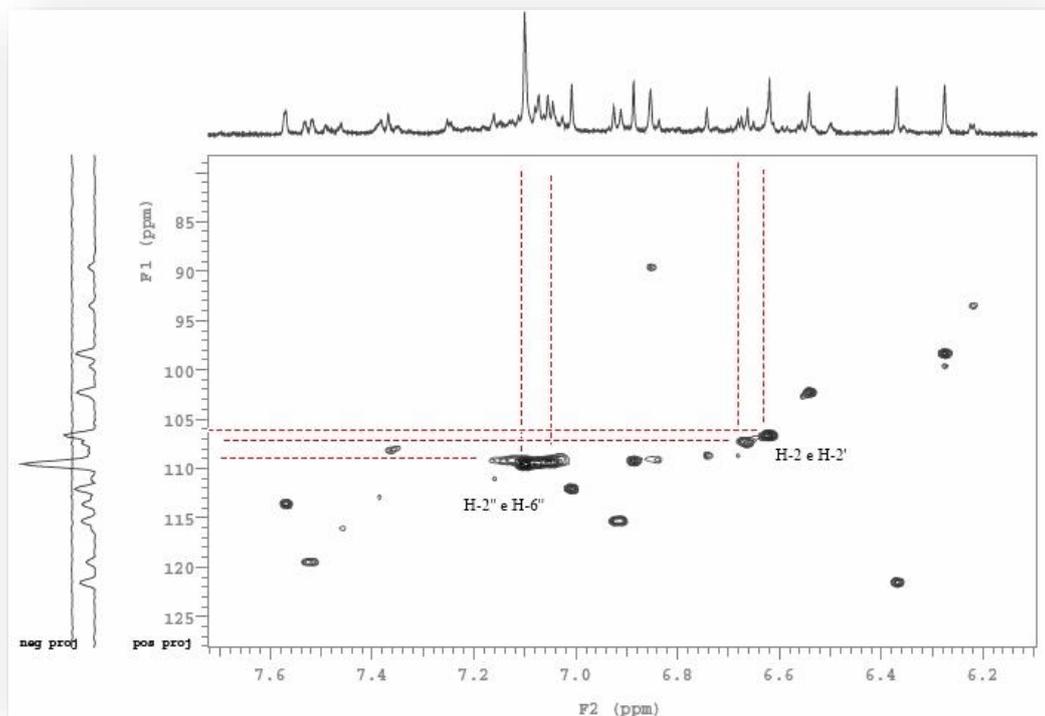


Figura 41 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6.

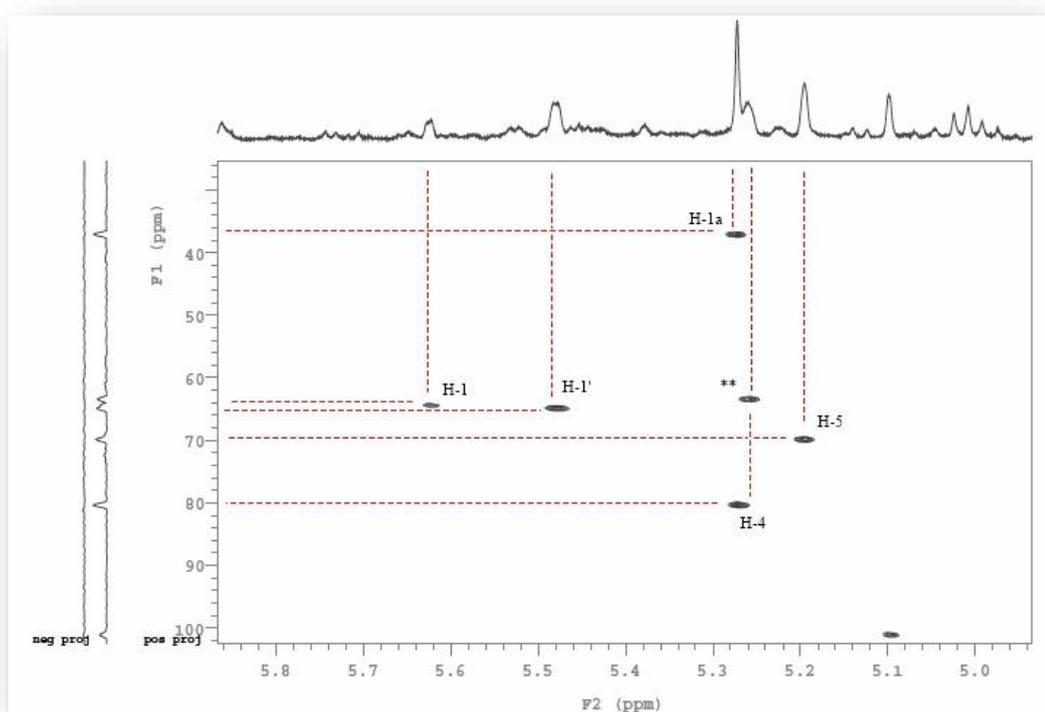
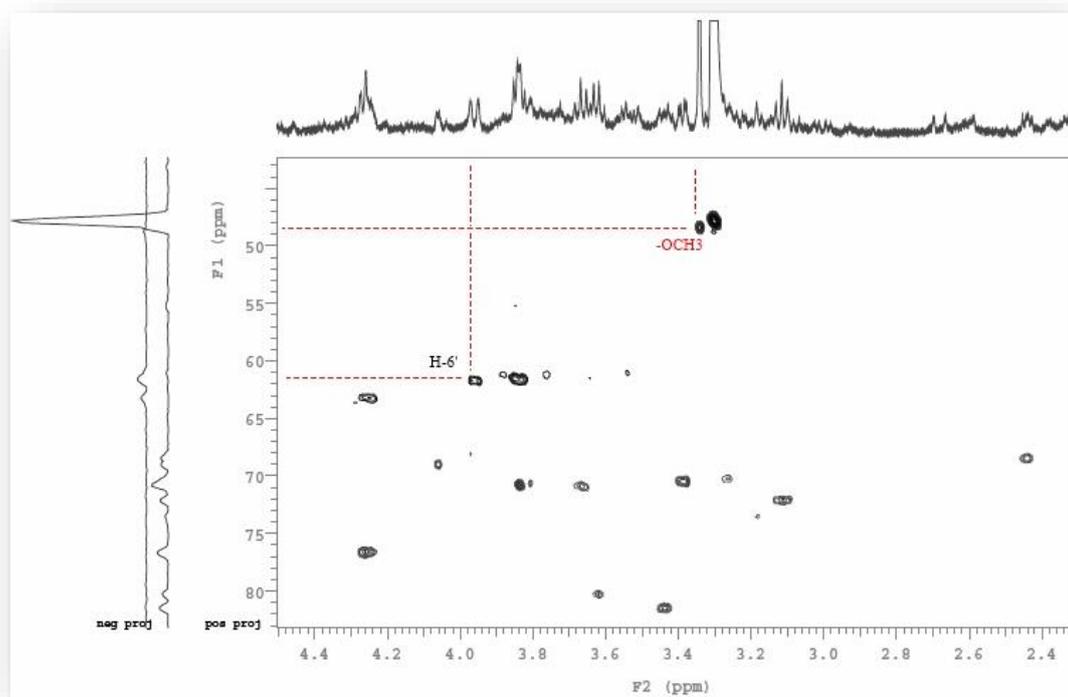


Figura 42 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, MeOD) da FPnir 6



5.4.5 Caracterização química da Fração FPnir 7

A análise do espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Fig. 45**) permitiu verificar a presença um simpleto em δ_{H} 6,26 (H-6) atribuído a hidrogênio na posição *orto* de duas hidroxilas. Foi observado um duplete para hidrogênio oximetínico em δ_{H} 5,03 (H-1''). Um duplete para hidrogênio metilênico em δ_{H} 3,95 (d, $J = 11,66$ Hz, H-6''), sinais na faixa entre δ_{H} 4,10-3,00 para um conjunto de hidrogênios metínicos ligados a carbonos com hidroxilas, além de dupletos para uma metila em δ_{H} 0,83-0,78 (H-6''').

A fração FPnir 7 exibiu um pico no cromatograma de UPLC-q-TOF, [M-H]⁻ com m/z 577,1536 (calculado m/z 577,1557; erro = -3,6 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$.

Através da análise comparativa dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , incluindo informações do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 46, 47 e 48**) (**Tabela 8**) comparado com os dados da literatura (PRINZ et al., 2007), observou-se que o composto em discussão tem estrutura semelhante ao composto orientina-2''-O-ramnosídeo (**21**), que diferem apenas no deslocamento químico do hidrogênio H-3' (δ_{H} 6,93, $J = 8,64$ Hz), apresentado com um duplete intenso, devido à ausência da hidroxila. Essas informações, aliadas àquelas obtidas através do espectro de massas, indicam que o composto em discussão se trata do flavonoide glicosilado, vitexina-2''-O-ramnosídeo (**25**) (**Fig. 43**)

Figura 43 - Estrutura do composto vitexina-2''-O-ramnosídeo.

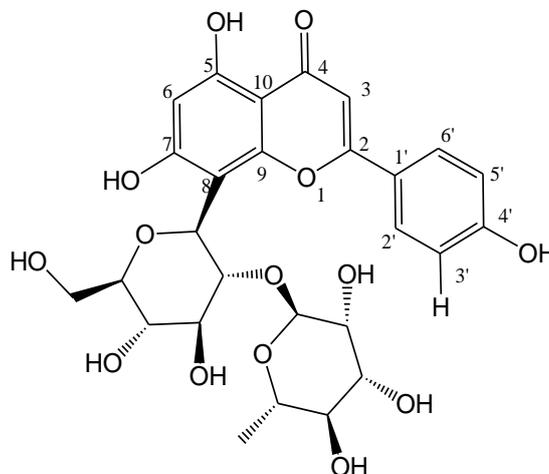


Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/75 MHz, MeOD) da FPnr 7 comparado com os valores relatados na literatura (PRINZ *et al.*, 2007) para a substância vitexina-2''-O-ramnosídeo.

Posição	Vitexina-2''-O-ramnosídeo		HSQC*-FPnr 7	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	164,3	--	**	--
3	102,6	6,64 (s)	102,18	6,60 (s)
4	182,2	--	**	--
5	162,6	--	**	--
6	98,2	6,25 (s)	98,71	6,26 (s)
7	160,6	--	**	--
8	104,4	--	**	--
9	156,0	--	**	--
10	104,6	--	**	--
1'	122,1	--	**	--
2'	114,2	7,48 (d, $J = 2,2$)	**	N.I
3'	115,4	6,90 (d, $J = 8,8$)	115,43	6,93 (d; $J = 8,67$ Hz)
4'	150,0	--	**	--
5'	115,9	6,87 (d, $J = 8,5$)	**	N.I
6'	119,6	7,54 (dd, $J = 8,5; 2,1$)	127,15	7,85 (d, $J = 8,46$ Hz)
1''	72,1	4,74 (d, $J = 9,9$); 4,84 (d, $J = 9,9$)	72,55	5,03 (d, $J = 10,68$ Hz)
2''	75,1	4,03 (t, $J = 9,2$); 4,10 (t, $J = 9,2$)	76,60	4,25 (m)
3''	80,3	3,38-3,47 (m), 3,42-3,54(m)	80,01	3,62 (m)
4''	770,8	3,31-3,41(m)	70,20	3,39-3,37
5''	82,1	3,21-3,30 (m)	81,29	3,42(m)
6''	61,6	3,78 (d, $J = 11,0$), 3,52-3,58 (m)	61,46	3,95 (d, $J = 11,66$ Hz)
1'''	100,2	4,96 (s); 4,99 (s)	101,12	5,08 (s)
2'''	70,3	3,56 (s)	70,84	3,63 (s)
3'''	70	3,07 (dd, $J = 9,6; 2,9$)	71,91	3,09 (s)

Posição	Vitexina-2''-O-ramnosídeo		HSQC*-FPnir 7	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
4'''	71,7	2,90 (t, J = 9,4); 2,86 (t, J = 9,4)	72,12	3,11 (m)
5'''	68,5	2,15 (dd, J = 9,2; 6,0)	68,50	2,45 (m)
6'''	17,9	0,46 (d, J = 6,4); 0,65 (d, J = 6,4)	16,75	0,64 (d, J = 6,18 Hz) 0,79 (d, J = 6,18 Hz)

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I não identificado

Figura 44 - Espectro de massas da vitexina-2''-O-ramnosídeo.

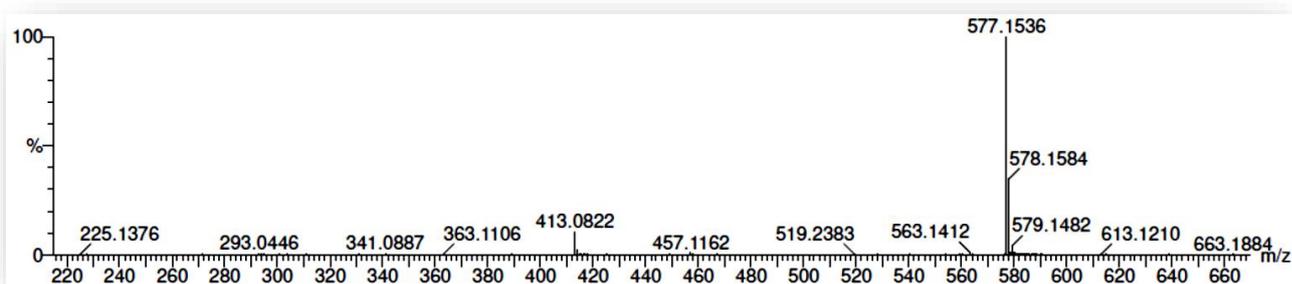


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 7.

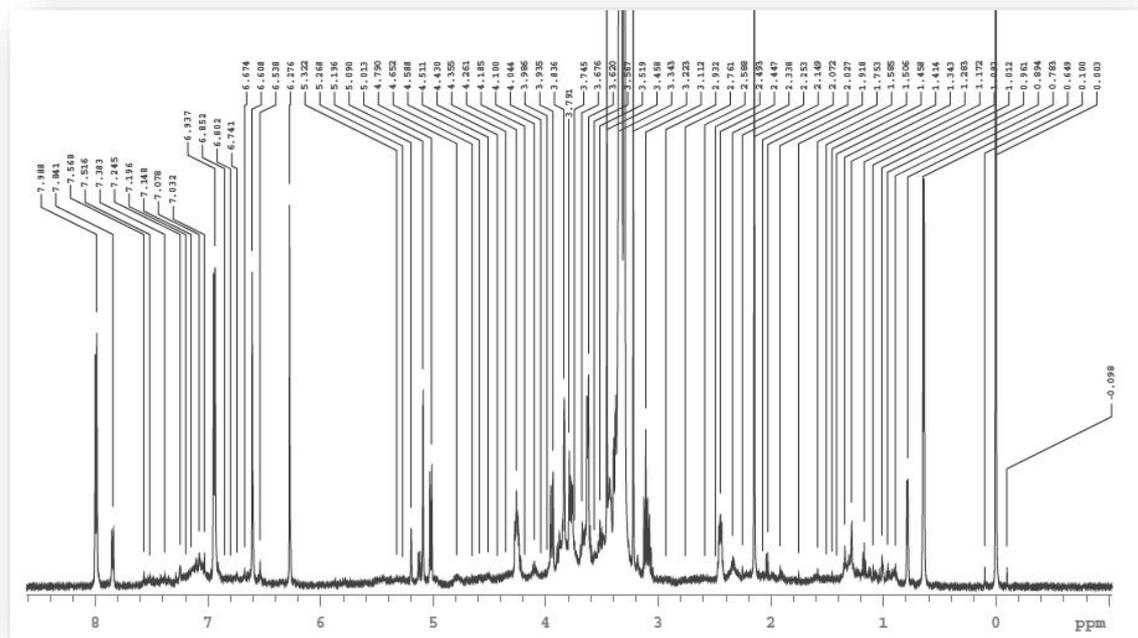


Figura 46 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 7.

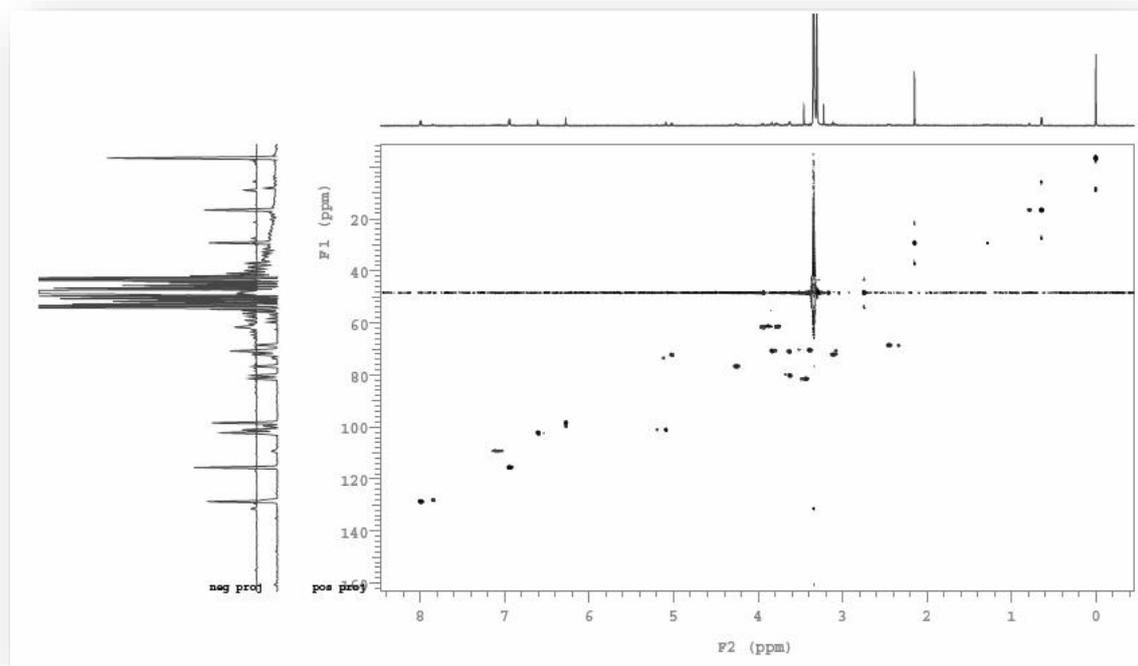


Figura 47 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 7.

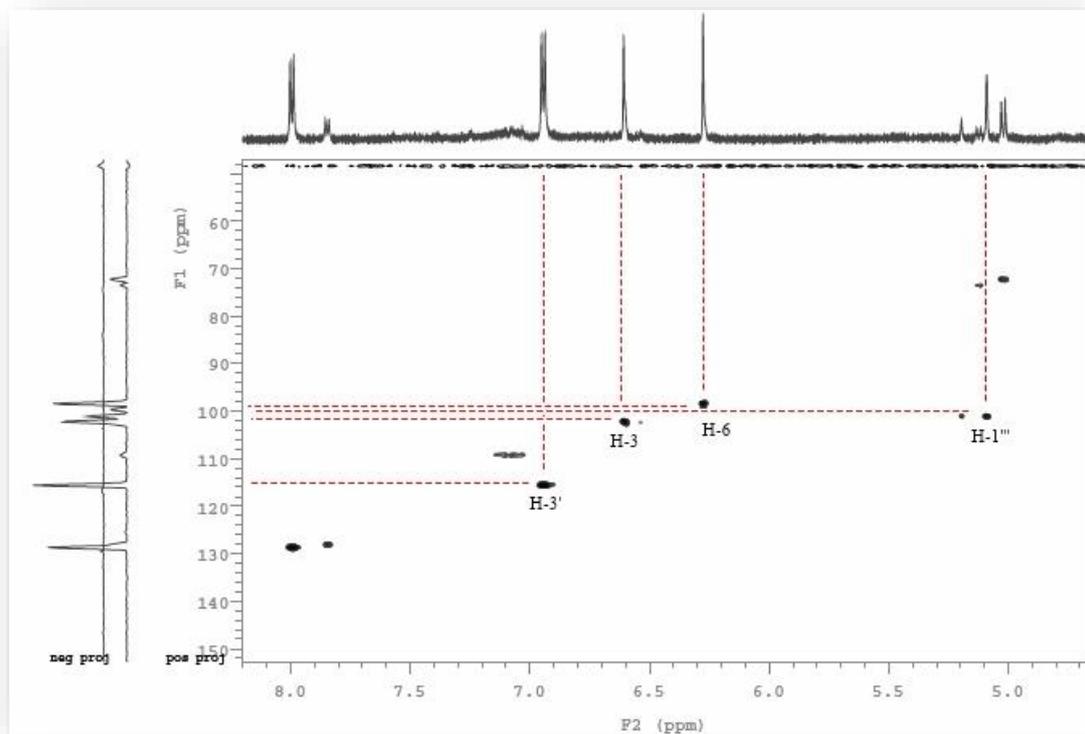
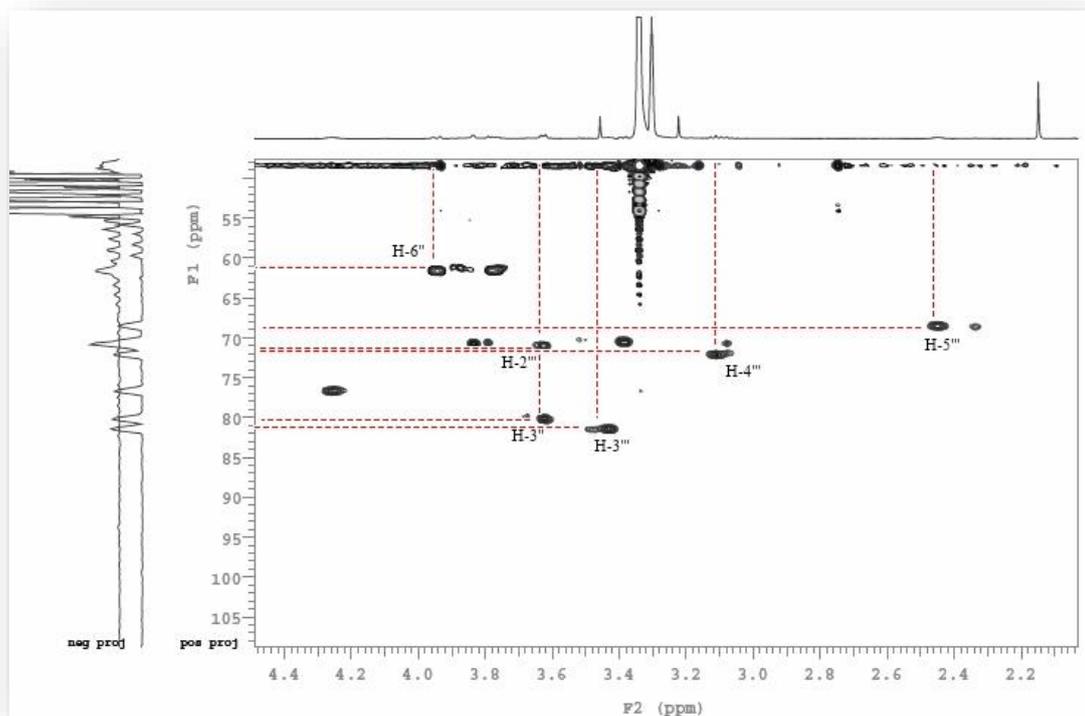


Figura 48 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 7.



5.4.6 Caracterização química da Fração FPnir 8

O espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Fig. 51**) mostrou três singletos em δ_{H} 7,07, 7,04 e 6,93, compatível com sinais de hidrogênios aromáticos, bem como um conjunto de sinais na faixa entre δ_{H} 5,30-5,0 referentes a hidrogênios metínicos ligados ao átomo carbono oxigenado do esqueleto da glicose. Foi possível caracterizar um multipletto em δ_{H} 4,26 (H-2b), sinais na faixa entre δ_{H} 4,0-3,5 de hidrogênios metínicos e um dupletto sobreposto em δ_{H} 2,44 (H-4b) de diastereotópicos, ausente no espectro de RMN ^1H do composto filantusiina C (**42**), sendo um fator importante para a proposição de que se trata de um análogo.

A fração FPnir 8 exibiu um pico $[\text{M-H}]^-$ com m/z 923,0833 (calculado m/z 923,0791; erro = 4,5 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{28}\text{O}_{26}$.

No espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 52 e 53**) foi possível a correlação de cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono, exceto para os sinais característicos da região da glicose que não se mostraram visíveis no espectro, conforme demonstrado na **Tabela 9**. Porém, a partir da análise comparativa dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C com os dados da literatura (Zhang *et al.*, 2000), incluindo informações obtidas no espectro de massa (**Fig.49**), aponta que o composto majoritário presente é filantusiina U (**43**) (**Fig. 49**)

Figura 49 - Estrutura do composto filantusiina U.

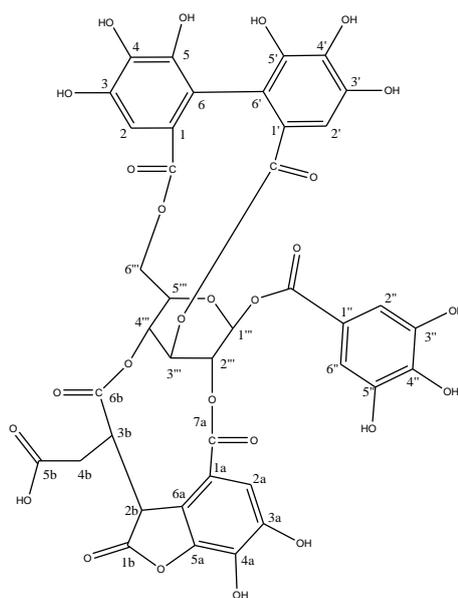


Tabela 9 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/75 MHz, MeOD) da FPnr 8 comparado com os valores relatados na literatura (Zhang *et al.*, 2000) para a substancia filantusiina U.

Posição	Filantusiina U		HSQC*- FPnr 8	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C=O	168,4	--	**	--
C=O	168,4	--	**	--
5'	145,6	--	**	--
5	145,6	--	**	--
3'	147,5	--	**	--
3	146,5	--	**	--
4'	140,8	--	**	--
4	140,8	--	**	--
1'	124,3	--	**	--
1	124,3	--	**	--
6'	115,3	--	**	--
6	115,3	--	**	--
2'	110,2	6,89 (s)	106,68	6,63 (s)
2	110,2	6,91 (s)	106,68	6,63 (s)
		Galoil		
C=O	166,0	--	**	--
3''	148,6	--	**	--
5''	148,6	--	**	--
4''	140,3	--	**	--
1''	125,6	--	**	--
2''	109,7	7,06 (s)	109,32	7,05 (s)
6''	109,7	7,06 (s)	109,32	7,07 (s)
		Glicose		
1'''	91,2	6,66	93,33	5,77
3'''	67,0	5,25	N.I	N.I
5'''	70,9	4,78	N.I	N.I
2'''	68,6	5,25	N.I	N.I
4'''	69,6	4,65	N.I	N.I
6'''	65,1	4,51/4,26	N.I	N.I
		2,4-acil		
1a	123,9	--	**	--
2a	114,0	7,05	109,51	7,04 (s)

Posição	Filantusiina U		HSQC*- FPnir 8	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
3a	144,9	--	**	--
4a	146,1	--	**	--
5a	143,1	--	**	7,09 (s)
6a	140,0	--	**	--
7a	168,7	--	**	--
1b	174,0	--	**	--
2b	47,6	4,23	48,64	4,33 (m)
3b	45,2	3,66	47,23	3,83 (m)
4b	34,5	2,70/2,45	23,99	2,04 (s)
5b	177,3	--	N.I	--
6b	173,8	--	**	--

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D 1H , ^{13}C -HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I não identificado

Figura 50 - Espectro de massas da filantusiina U.

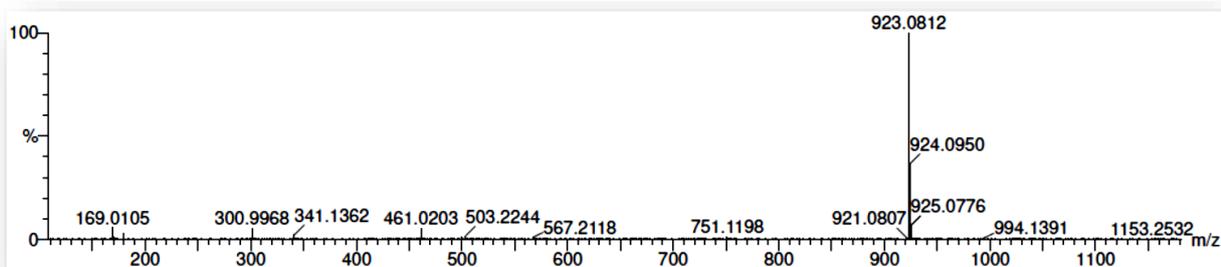


Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnir 8.

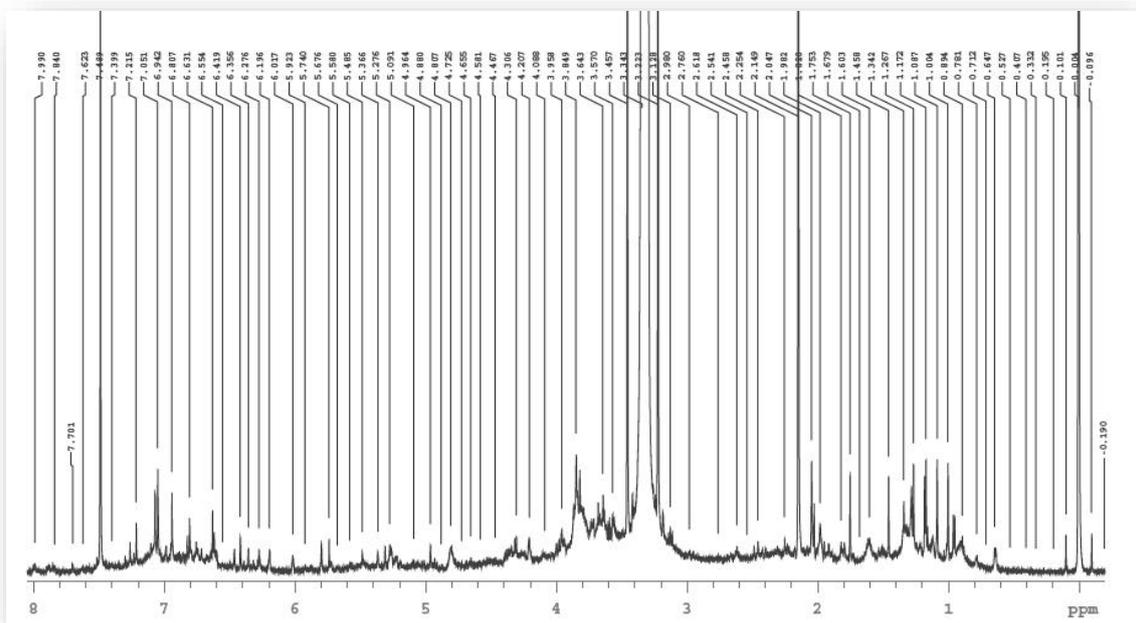


Figura 52 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 8.

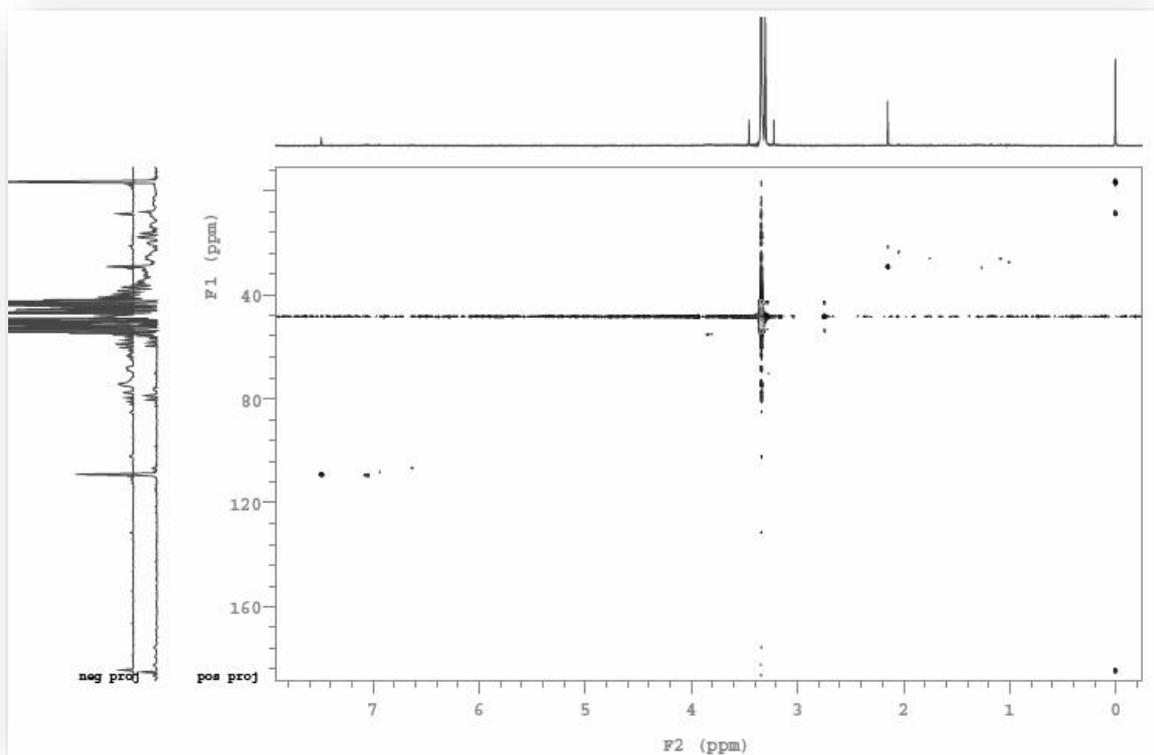
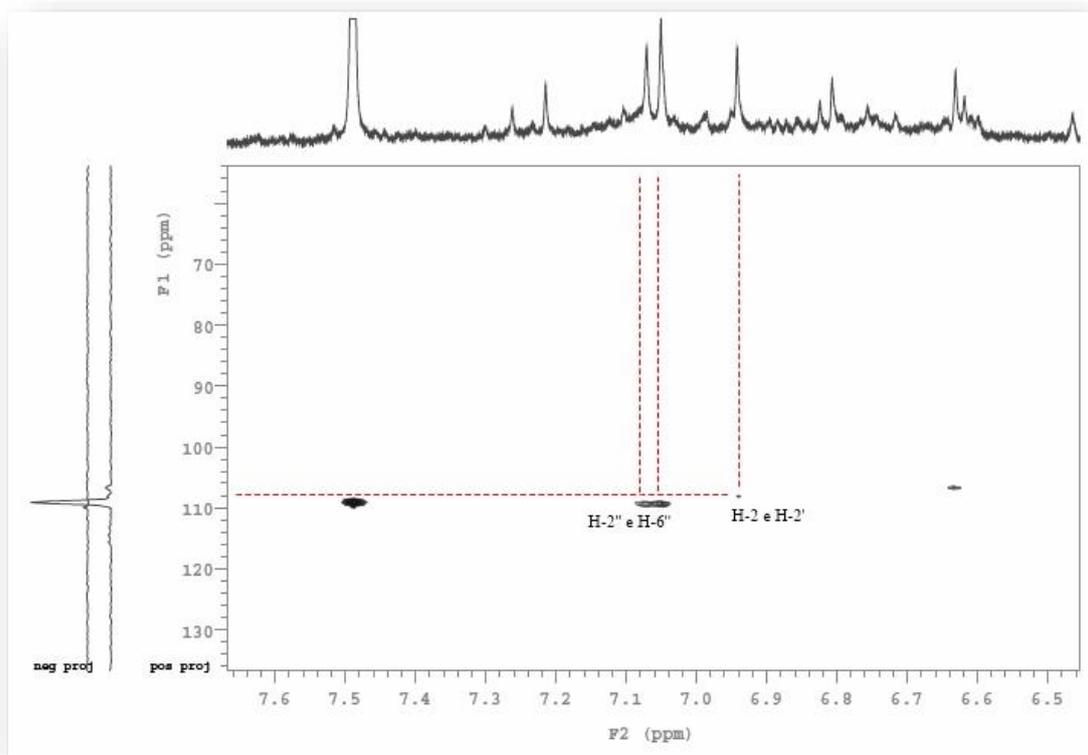


Figura 53 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 8.



5.4.7 Caracterização química da Fração FPnir 9

Observando-se o espectro de RMN de ^1H (600MHz, MeOD – **Fig. 56**), foi possível visualizar a presença de sinais na faixa de δ_{H} 7,4-6,30, os quais foram associados a hidrogênios aromáticos. Destes, foi assinalado um singlete centrado em δ_{H} 7,33 (1H; H- 2' e 6') e um multiplete δ_{H} 6,92 (1H; H- 3' e 5') relativos a hidrogênios vizinhos em posição *orto*. Os outros dois sinais referentes a aromáticos foram assinalados em δ_{H} 6,36 (1H; H- 8) e δ_{H} 6,19 (1H; H- 6) e apresentam acoplamento *meta* entre si. Dois sinais para hidrogênios oximetínicos apareceram em δ_{H} 5,79 (1H; H-1'') e δ_{H} 5,34 (1H; H- 2'') e sinal para uma metila ligada a carbono saturado observado em δ_{H} 1,17.

A fração FPnir 9 exibiu um pico pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 583,1052 (calculado m/z 583,1088; erro = -6,2 ppm) referente à fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{14}$.

Através da análise do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (**Figs. 57 e 58**), cada sinal de hidrogênio foi devidamente correlacionado ao seu respectivo sinal de carbono, conforme demonstrado na **Tabela 10**.

A análise dos dados espectroscópicos obtidos e a posterior comparação com dados registrados na literatura (LI, 2013) confirmaram que tratava-se da substância caempferol-O-galloil-ramnosídeo (**55**) (**Fig. 54**)

Figura 54 - Estrutura do composto caempferol-O-galloil-rhamnosídeo

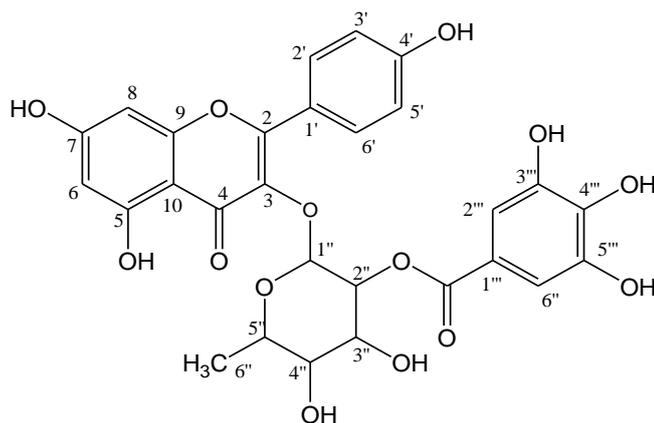


Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600/75 MHz, MeOD) da FPnir 9 comparado com os valores relatados na literatura (LI, 2013) para a substância caempferol-O-galloil-rhamnoside.

Posição	Caempferol-O-galloil-rhamnosídeo		HSQC*-FPnir 9	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	156,4	--	**	--
3	135,1	--	**	--
4	178,2	--	**	--
5	161,8	--	**	--
6	98,3	6,20 (s)	98,54	6,19 (s)
7	166,4	--	**	--
8	94,0	6,40 (s)	93,38	6,36 (s)
9	158,8	--	**	--
10	104,5	--	**	--
1'	122,9	--	**	--
2'	129,2	7,28 (d; $J = 8,4$ Hz)	116,36	7,33 (s)
3'	115,8	6,83 (d; $J = 8,4$ Hz)	116,36	6,92 (m)
4'	157,7	--	**	--
5'	115,8	6,83 (d; $J = 8,4$ Hz)	116,36	6,92 (m)
6'	129,2	7,28 (d; $J = 8,4$ Hz)	116,36	7,33 (s)
1''	106,4	5,49 (s)	124,31	5,79 (s)
2''	73,8	5,46 (s)	101,82	5,34 (s)
3''	68,5	N.I	71,33	4,20
4''	73,9	N.I	**	--
5''	74,0	N.I	74,15	3,87
6''	17,5	N.I	**	1,17 (s)
1'''	121,2	--	**	--
2'''	109,6	6,97 (s)	115,43	6,94
3'''	146,1	--	**	--
4'''	140,3	--	**	--
5'''	146,1	--	**	--
6'''	109,6	6,97 (s)	115,43	6,94
7'''	165,9	--	**	--

* Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos foram identificados somente pelos valores do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC

** Valores não correlacionados

-- Não apresentam valores de deslocamentos químicos

N.I não identificado

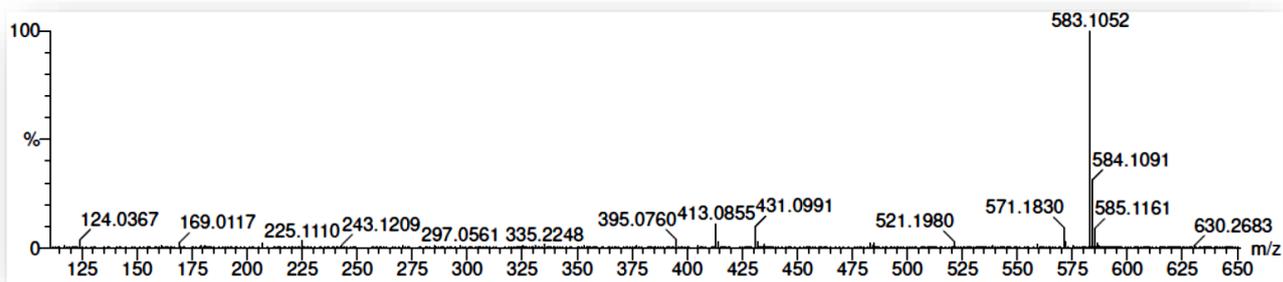
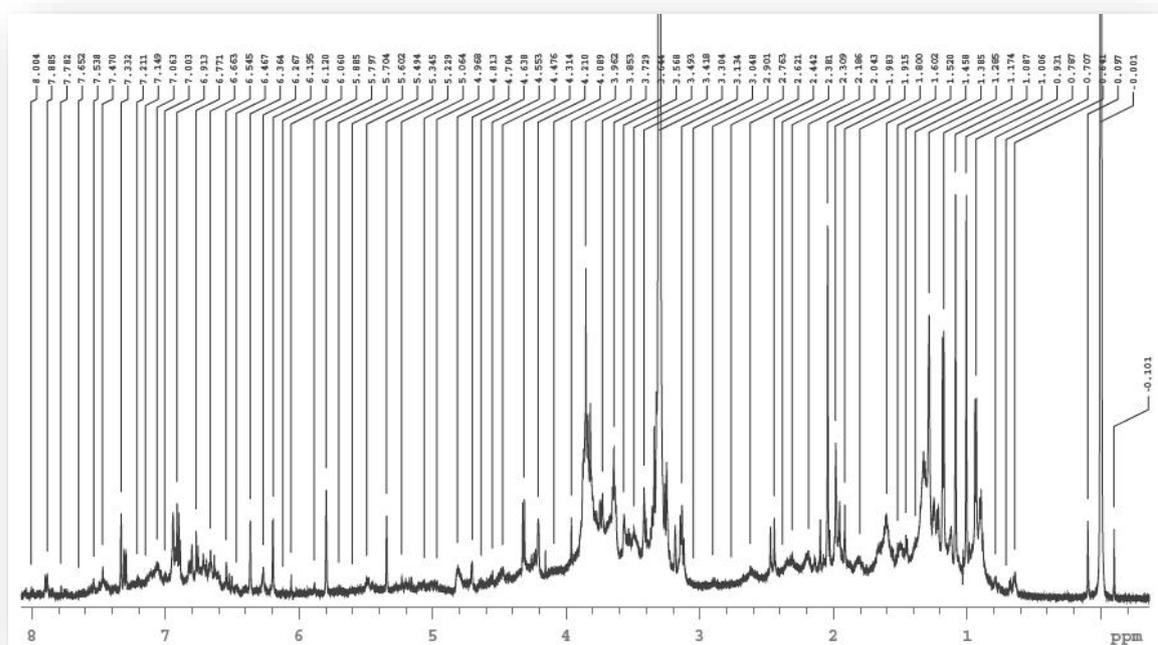
Figura 55 - Espectro de massa do caempferol-O-galloil-rhamnoside.**Figura 56** - Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, MeOD] da FPnr 9

Figura 57 - Espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 9

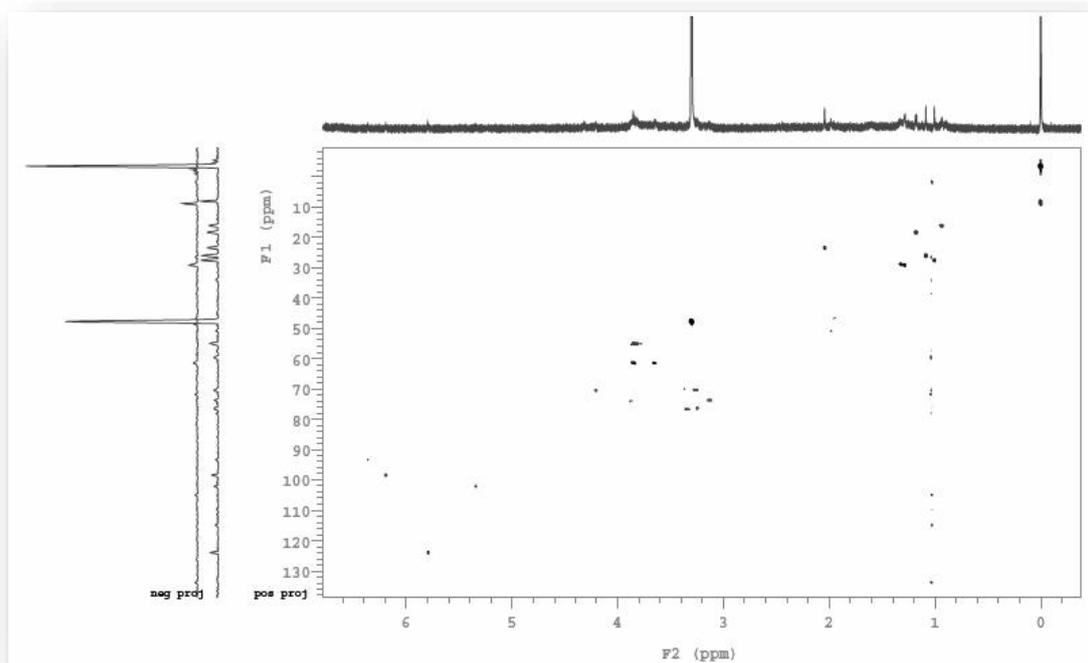
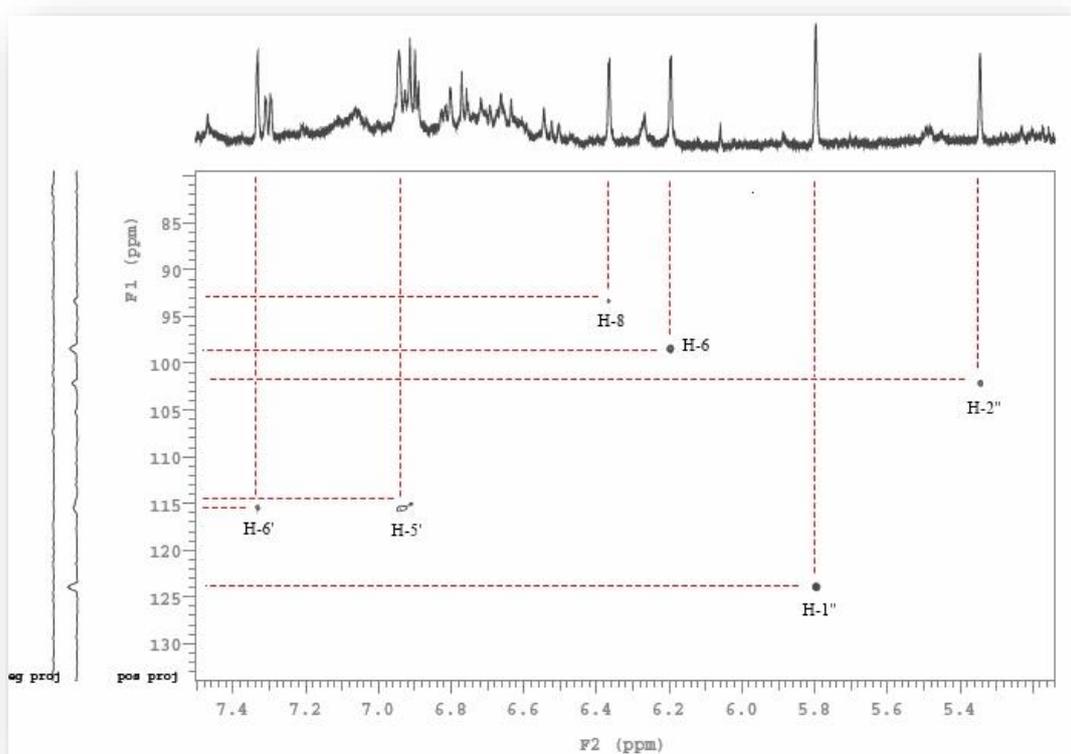


Figura 58 - Expansão do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HSQC (300 x 75 MHz, MeOD) da FPnir 9.



6. CONCLUSÕES

O estudo de desreplicação permitiu o desenvolvimento de um método cromatográfico apropriado para o fracionamento dos constituintes químicos da espécie *Phyllanthus niruri*, já que mostrou ser reprodutível e forneceu perfis cromatográficos com precisão para a realização das análises cromatográficas.

Através da análise por Ressonância Magnética Nuclear das frações obtidas do extrato aquoso das folhas e frutos de *Phyllanthus niruri*, pode se caracterizar nove compostos, todos derivados fenólicos, classe de substâncias comum no gênero *Phyllanthus*.

As estruturas caracterizadas foram estabelecidas como ácido repandusínico A, caempferol-O-galloil-ramnosídeo, corilagina, filantusiina C, filantusiina U, furosina, geraniina, rhoiptleanina H (caracterizada pela primeira vez no gênero) e vitexina-2''-O-rhamnosídeo.

Desta forma, por meio dos resultados obtidos no presente trabalho, os trabalhos serão dados continuidade com a intenção de caracterizar outras ou até mesmo novas substâncias

7. REFERÊNCIAS

- AGYARE, C. et al. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 617–624, 2011.
- AHMED, B. .; GRUPTA, D. R. . Nirurin: A new prenylated flavanone glycoside from *phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 9, n. 6, p. 958–963, 1984.
- ALVES, H. D. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10–15, 2001.
- ANI ERASMUS, MATTHEW, JONAS, D. NMR Characterization of Bioactive Lignans from *Phyllanthus amarus* Schum &. **Annals of Magnetic Resonance**, v. 6, p. 76–82, 2007.
- BAGALKOTKAR, G. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 12, p. 1559–1570, 2006.
- BARROS, M. E.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. **Urological research**, v. 30, n. 6, p. 374–379, 2003.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de Taninos e Tanases em alimentos. **Alimentação Nutricional**, v. 15, n. 1, p. 63–72, 2004.
- BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. **Phyllanthus niruri as a promising alternative treatment for nephrolithiasis** *International Braz J Urol*, 2010.
- BRAMER, S. E. VAN. Introduction to mass spectrometry. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 124–125, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 73. *Fascículo 5 da Parte II da 4a Edição da Farmacopéia Brasileira*. Monografias 246 e 247. 13 de abril de 2004
- BRITTAIN, J.; WEBB, L. A novel class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb. v. 1, n. October, p. 15–20, 1995.

CALIXTO, J. B. et al. A Review of the Plants of the Genus *Phyllanthus* : and Therapeutic Potential. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, p. 225–258, 1998.

CALIXTO, J.; SANTOS, A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Medicinal research Reviews**, 1998.

CALMON, A. *Guia de Plantas Mediciniais 2006*, Editora On Line, n.2, ANO 2, São Paulo, SP, p.73, 2005.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS; UFSC, 2004. p.520-535.

CEFET-RIO DE JANEIRO. Análise instrumental - cromatografia líquida de alta resolução. **Apostila**, 2010.

CHEN, Y.W., REN, L.J., Li, K.M., ZHANG, Y.W. Isolation and identification of a novel polyphenolic compound from *Phyllanthus urinaria*. **Yaoxue Xuebao**, v. 34, p. 526–529, 1999.

CHENG, J. T., LIN, T. C., HSU, F. L. Antihypertensive effect of corilagin in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, 1425–1429, 1995.

CLARIDGE, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. **Tetrahedron organic chemistry series ; 27**, n. 27, 2009.

COLOMBO, R. et al. Validated HPLC method for the standardization of *Phyllanthus niruri* (herb and commercial extracts) using corilaginas a phytochemical marker. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 6, p. 573–580, 2009.

DA SILVA, F. M. A. et al. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *unonopsis guatterioides* por Esi-It-MS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 944–947, 2012.

DAVID, J. P.; SANTOS, E. O.; MIRANDA, M. S. Atividade antioxidante da epicatequina (2 β \rightarrow 7,4 β \rightarrow 8)-epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. supl, p. 5–6, 2002.

DIALLO, M. S. T. et al. Ethnomedical , phytochemical and biological investigations of *Margaritaria discoidea* (Baill .) Webster , a plant species widely used in Guinean traditional medicine. v. 3, p. 40–46, 2015.

EMBRAPA. Quebra-pedra. Série Plantas Medicinaias, Condimentares e Aromáticas. **Corumbá**, 2006. .

FOO, L. Y. Amariin, a di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 487–491, 1993.

FUNARI, C. S.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma Abordagem Otimizada para Exploração da Biodiversidade Brasileira: Estado da Arte, Perspectivas e Desafio. **Química Nova**,. v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GANESHPURE, P. A; SCHNEIDERS, G. E.; STEVENSON, R. Constituents isolated from *Phyllanthus niruri* Linn. **Tetrahedron Letters**, v. 22, p. 393–396, 1981.

GLEŃSK, M.; GLINSKI, J. A.; JAMRÓZ, M.; STEFANOWICZ, P.; KAZMIERSKI, S. Phenolic Constituents from *Alchornea castaneifolia*. v. 1, p. 32–39, 2016.

GUO, J., CHEN, Q., WANG, C., QIU, H., LIU, B., JIANG, Z.-H., ZHANG, W. Comparison of two exploratory data analysis methods for classification of *Phyllanthus* chemical fingerprint: unsupervised vs. supervised pattern recognition technologies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 1389–1401, 2015.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 9, p. 4494–4497, 1981.

HALABALAKI, M.; VOUGOGIANNOPOULOU, K.; MIKROS, E.; SKALTSOUNIS, A. L. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 1–7, 2014.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 180–185, 2006.

HAWAS, U. W. Antioxidant activity of brocchlin carboxylic acid and its methyl ester from *Chrozophora brocchiana*. **Natural product research**, v. 21, n. 7, p. 632–40, 2007.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry - Principles and Applications**.. 30rd. ed. Jonh Wiley & Sons, Ltd, 2007.

HOUGHTON, P. J.; WOLDEMARIAM, T. Z.; SHEA, S. O.; THYAGARAJAN, S. P. Two securinega-type alkaloids from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p.

715–717, 1996.

HUANG, R. L.; HUANG, Y. L.; OU, J. C.; CHEN, C. C.; HSU, F. L., CHANG, C. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 449–453, 2003.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; PURSON, S.; HAMZAOU, M.; BORIE, N.; REYNAUD, R.; RENAULT, J. H. Identification of natural metabolites in mixture: A pattern recognition strategy based on ¹³C NMR. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 6, p. 2955–2962, 2014.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 23–30, 2002.

ISHIMARU, K. ET. AL. . Phenolic Constituents in Tissue Cultures of *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2015–2018, 2015.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JI, Y.-B.; XU, Q. S.; HU, Y. Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography. A**, v. 1066, n. 1-2, p. 97–104, 2005.

JIANG, Z.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Three Novel C-Glycosidic Ellagitannins, Rhoipteleans H, I, and J, from *Rhoiptelea chilantha*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 425–429, 1999.

JOSHI, B. S.; GAWARD, D. H.; PELLETIER, S. W.; KARTHA, G.; BHANDARY, K.. Isolation and structure (X-ray analysis) of ent-norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 614–620, 1986.

KASHTRIYA, R. B.; SHAIKH, Y. I.; NAZERUDDIN, G. M. A Brief Review: Flavonoids as a Pharmacophore. **Journal of Applied Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 801–817, 2015.

KASSUYA, C. A. L.; COUTO, A. G.; CALIXTO, J. B.; PETROVICK, P. R. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from

Phyllanthus amarus. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 546, n. 1-3, p. 182–188, 2006.

KUMAR, S., CHANDRA, P., BAJPAI, V., SINGH, A., SRIVASTAVA, M., MISHRA, D.K., KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Industrial. Crops Products**, v. 69, p. 143–152, 2015.

LATTÉ, K. P.; KOLODZIEJ, H. Pelargonins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. **Phytochemistry**, v. 54, p.701–708, 2000

LATTÉ, K. P.; KOLODZIEJ, H. An ellagitannin, n-butyl gallate, two aryltetralin lignans, and an unprecedented diterpene ester from *Pelargonium reniforme*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 820–826, 2008.

LAU, E. V; GAN, S.; NG, H. K. Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **International journal of analytical chemistry**, v. 2010, p. 398381, 2010.

LI, R.-L.; JIE, Z.; XIANG, C.; JING, J.; HUI, Z.; JIA, S. Studies on Chemical Constituents from Ethyl Acetate Extracts of *Acer ginnala* Maxim. Leaves. **Journal of Jilin Agricultural University**, v. 35, n. 6, p. 684–687, 2013.

LUZIANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imagiologia Médica. **Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 117, n. 2, p. 25–30, 2010.

MAGALHÃES, P.M. Agrotecnología para el cultivo de quebra-pedra o erva-pombinha. Santafé de Bogotá (Colombia), p.333- 340, 2000.

MARIA LUCIA, P.; VALDIR F, J.; ANGELO, P. Utilização de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução na Detecção de Classe de Terpenos em Extratos Brutos Vegetais. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 262–266, 1995.

MARTINS, E.; LIMA, L. DE. Sinopse do gênero *Phyllanthus*L.(Phyllanthaceae) do Estado de São Paulo. **Hoehnea**, v. 38, n. 1, p. 123–133, 2011.

MARTINS, L. R. R. Tese - **Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o Controle de Qualidade de Amostras Comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra)**. Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 154, 2008.

MIGUEL, O. G.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; FILHO, V. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Medica**, v. 62, n. 2, p. 146–149, 1996.

OGATA, T.; HIGUCGI, H.; MOCHIDA, S.; MATSUMOTO, H.; KATO, A.; ENDO, T.; KAJI, A.; KAJI, H. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 8, n. 11, p. 1937–1944, 1992.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; LIMA, C. R.; BASTOS, P. M.; NETO, P. N. M. Taninos condensados da casca de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 22–27, 2013.

PATEL, J. R.; TRIPATHI, P.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. *Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 286–313, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 1. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p. 1–26, 2008.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S., LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

PRINZ, S.; RINGL, A.; HUEFNER, A.; PEMP, E.; KOPP, B. 4'-Acetylvitexin-2''-O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). **Chemistry and Biodiversity**, v. 4, n. 12, p. 2920–2931, 2007.

QIAN-CUTRONE, J.; HUANG, S.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P. F.; ALAM, M.; KLOHR, S. E.; KADOW, K. F. Niruriside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 196–199, 1996.

RICHTER, B. E.; JONES, B. A.; EZZELL, J. L.; PORTER, N. L.; AVDALOVIC, N.; POHL, C. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation.

Analytical Chemistry, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, 1996.

ROMANIK, G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMINSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 253–261, 2007.

SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary tannins: Consequences and remedies**. Boca Raton: CRC Press, p.1-310, 1990.

SANTOS, M. S.; FILHO, E. R. P; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; FIQUEIRA, G. M. Authenticity Study of Phyllanthus Species by NMR and Ft-IR Techniques Coupled with Chemometric Methods. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2210-2217, 2012.

SANTOS, A R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus Phyllanthus. **General pharmacology**, v. 26, n. 7, p. 1499–1506, 1995.

SATYANARAYANA, P.; VENKATESWARLU, S. Isolation, structure and synthesis of new diarylbutane lignans from Phyllanthus niruri : Synthesis of 5' -desmethoxy niranthin and an antitumour extractive. **Tetrahedron**, v. 47, n. 42, p. 8931–8940, 1991.

SENTADREU, E., CERDÁN-CALERO, M., SENDRA, J.M. Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer. **Journal Food Composition Analysis**, v. 30, p. 32–40, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro, LTC Editora, 2007.

SILVA, JOSÉ, M.; SALES, M. F. DE. O gênero Phyllanthus L . (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss .) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco - Brasil. **Rodriguésia**, v. 54, p. 101–126, 2002.

SIMÕES, C.M, SCHENKELI, E. P., GOSMANN,G., MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao Medicamento** . Porto alegre- Florianópolis, UFRGS EDITORA, p. 1102, 1999.

SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J. G.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 51–59, 2014.

SKOOG, DOUGLAS, A.; WEST, DONALD, M.; HOLLER, JAMES, F.; CROUCH, STANLEY, R. **Fundamentos da Química Analítica**. 8 ed, Cengage learning, 2013.

SOUSA, A. D.; MAIA, A. I. V.; RODRIGUES, T. H. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; PEREIRA, R. C. A.; VIEIRA, R. F.; BRITO, E. S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 91–103, 2016.

SPRENGER, R. F.; CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 97–103, 2013.

STRACK, D. Phenolic metabolism. **Plant Biochemistry**, p. 387–416, 1997.

SUBEKI, MATSUURA, H.; TAKAHASHI, K.; YAMASAKI, M.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; KATAKURA, K.; KOBAYASHI, S.; TRIMURNINGSIH, CHAIRUL, YOSHIHARAL, T. Anti-babesial and anti-plasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 537–539, 2005.

SUN, H.; GE, X.; LV, Y.; WANG, A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v.1237, p.1-23, 2012

SVEDSTRÖM, U.; VUORELA, H.; KOSTIAINEN, R.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 103–111, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 792, 2004

THANH, N. V.; HUONG, P. T. T.; NAM, N. H.; CUONG, N. X.; THAO, N. P.; DEJAEGHER, B.; GORDIEN, A.; HEYDEN, Y. V.; LECLERCQ, J. Q.; MINH, C. V. A new flavone sulfonic acid from *Phyllanthus urinaria*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 182–185, 2014.

TORRES, D. S. 265 O Gênero. **Flora**, v. 17, n. 2, p. 265–278, 2003.

VENKATESWARAN, P. S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B. S. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: in vitro and in

vivo studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 1, p. 274–8, 1987.

VIEIRA, G. M.; SILVA, H. R.; BITTENCOURT, T. C.; CHAVES, M. H.; SIMONE, C. A. Terpenos e ácidos graxos de *Dipteryx lacunifera* Ducke. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1658–1662, 2007.

YANG, B., LIU, P. Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, 529–541, 2014.

YEAP FOO, L. Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 217–224, 1995.

ZHANG, J.; CHEN, J.; LIANG, Z.; ZHAO, C. New lignans and their biological activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 1, p. 1–54, 2014.

ZHANG, L. Z.; GUO, Y. I.; TU, G. Z.; MIAO, F.; GUO, W. B. Isolation and Identification of a Novel Polyphenolic Compound from *Phyllanthus urinaria* L. **Zhong Yao Za Zhi**, v. 25, n. 12, p. 724–725, 2000.