

DANIEL RINALDO

Determinação de enantiômeros em extratos vegetais por cromatografia quiral e dicroísmo circular

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL RINALDO

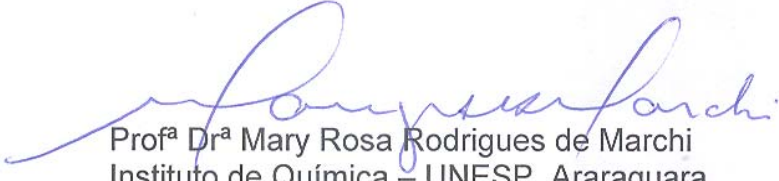
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 19 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



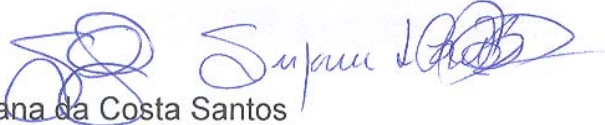
Profª Drª Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maysa Furlan
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes
Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina



Profª Drª Suzana da Costa Santos
Instituto de Química – UFG, Goiânia

DADOS CURRICULARES

DANIEL RINALDO

Dados Pessoais

Nascimento: 31/12/1979

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara-SP

Estado Civil: Solteiro

Filiação: João Bosco Rinaldo

Ana Rita Casuscelli Rinaldo

Endereço: Rua dos Libaneses, 2973 – Bairro Santana – Araraquara-SP

Telefone: (16) 3335-3428

E-mail: danielrinaldo@gmail.com

Formação Acadêmica

Licenciado em Química

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Ano: 2000 a 2004.

Mestre em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Ano: 2005 a 2007.

Doutor em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Ano: 2007 a 2010.

Disciplinas cursadas no Doutorado

Cromatografia gasosa	Conceito A
RMN de produtos naturais	Conceito A
Bioensaios para químicos	Conceito A
Tópicos especiais: Desenvolvimento de fases estacionárias para cromatografia de alta performance	Conceito A
Tópicos especiais: Espectrometria de massas	Conceito A
Tópicos especiais: Atribuição de configuração absoluta em compostos orgânicos por RMN e CD	Conceito A

Supervisão Científica

1. Guilherme Augusto Decari Trevisan. Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Neea schwackeana* Heimerl. 2009. **Monografia**. Bolsista de Iniciação Científica Fapesp.

Estágio de docência

1. Química Orgânica 1 (Bacharelado), 2009.

Apresentações orais em congressos

1. “Metodologias para análises de diastereoisômeros da catequina e enantiômeros da naringenina por CLAE-DAD-DC” na **31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 2008.
2. “Análise qualitativa de chás de plantas do gênero *Neea* e identificação de compostos opticamente ativos por HPLC-DAD-CD” no **14º Encontro Nacional de Química Analítica**, João Pessoa-PB, 2007.
3. “Determinação Quali e Quantitativa da composição química do extrato metanólico das folhas de *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) por HPLC-DAD” no **II Simpósio de Cromatografia (SIMCRO)**, São Pedro-SP, 2006.

Organização de eventos

1. Participação como membro da Comissão Organizadora do **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**. Araraquara-SP, 2008.
2. Participação como membro da Comissão Organizadora do **V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**. Águas de Lindóia-SP, 2005.
3. Participação como membro da Comissão Organizadora do **III Workshop do Nubbe - Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Bioprodutos**. Araraquara-SP, 2008.

Artigos Publicados e Aceitos para publicação

1. **RINALDO, D.**; BATISTA JR., J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, 2010. DOI: 10.1002/chir.20824.
2. TRINDADE, M. A. G.; **RINALDO, D.**; VILEGAS, W.; ZANONI, M. V. B. Determinação de corantes marcadores do tipo azo e antraquinona em combustíveis por cromatografia líquida com detecção eletroquímica. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 146-150, 2010.
3. BATISTA JR., J. M.; LOPEZ, S. N.; VANZOLINI, K. L.; CASS, Q. B.; **RINALDO, D.**; VILEGAS, W.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Resolution and absolute configuration assignment of a natural racemic chromane from *Peperomia obtusifolia*. **Chirality**, v. 21, p. 799-801, 2009.
4. AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; **RINALDO, D.**; VILEGAS, W.; VIEIRA JUNIOR, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc. **Química Nova**, v. 32, p. 1509-1512, 2009.
5. KUSHIMA, H.; NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; **RINALDO, D.**; SASSÁ, M. F.; BAUAB, T. M.; DI STASI, L. C.; CARLOS, I. Z.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: Gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 430-438, 2009.
6. RODRIGUES, C. M.; **RINALDO, D.**; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 17-24, 2008.
7. RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; **RINALDO, D.**; ZOCCOLO, G. J.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 120-126, 2008.
8. MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; **RINALDO, D.**; DOS SANTOS, L. C.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 690-695, 2008.
9. **RINALDO, D.**; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J. ; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. New Flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1132-1135, 2007.
10. RODRIGUES, J. ; **RINALDO, D.**; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. An unusual C6-C6" linked flavonoid from *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 1781-1784, 2007.

11. RODRIGUES, C. M.; **RINALDO, D.**; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1907-1914, 2007.
12. BARBASTEFANO, V. ; COLA, M. ; LUIZ-FERREIRA, A. ; FARIAS-SILVA, E. ; HIRUMA-LIMA, C. A.; **RINALDO, D.**; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, p. 545-551, 2007.
13. LOPES, F. C. M.; PLACERES, M. C. P.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; HIGUCHI, C. T.; **RINALDO, D.**; VILEGAS, W.; LEITE, C. Q. F.; CARLOS, I. Z. Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 769-772, 2007.
14. **RINALDO, D.**; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CALVO, T. R.; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by High-Speed Counter-Current chromatography. **Química Nova**, v. 29, p. 947-949, 2006.
15. CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDAO JUNIOR, C. M.; **RINALDO, D.**; CALVO, T. R.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) na resposta imune. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, n. 01, p. 44-50, 2005.
16. MICHELIN, D. C.; IHA, S. M.; **RINALDO, D.**; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. . Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 15, n. 03, p. 209-211, 2005.
17. DOS SANTOS, L. C.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J.; **RINALDO, D.**; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Fast preparative separation of flavones from capitula of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith (Eriocaulaceae) by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 2, p. 101-103, 2005.

À minha mãe Ana Rita, ao meu pai João Bosco e ao meu irmão Davi

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Rita e João Bosco, pelos exemplos de amor, esforço e honestidade. Sempre fizeram o possível e impossível para que seus filhos pudessem cursar uma universidade.

Ao meu irmão Davi pelo incentivo e amizade.

À minha namorada Simone pela paciência, incentivo e cumplicidade quando mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Wagner e a minha co-orientadora Profa. Lourdes, pela amizade, paciência, ensinamento, confiança, incentivo e respeito desde a iniciação científica.

Aos professores do Instituto de Química pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao Clenilson e à Viviane, pelos seus ensinamentos e amizade.

Ao grande amigo e exemplo de vida Magno Trindade, pela amizade e ensinamentos de química analítica.

À Profa. Miriam e ao Prof. Marcelo, pelo companheirismo, conselhos e amizade.

Ao Nivaldo e Gaspar, pelas risadas e discussões construtivas sobre futebol no café.

Ao Guilherme (Bisonho), meu primeiro aluno de IC, pela amizade e aprendizado.

Aos amigos de laboratório Adriana, Aninha, Carol, Felipe (Bozo), Thiago (Jaspion), Jú Severi, Mariana e Michelle pelo apoio, ensinamentos e distrações.

Aos grandes e velhos amigos, de graduação: Amadeu, André, Antônio Carlos (Tonho), Chicão, Elaine, Jú Rodrigues, Marcão F., José Antônio Maruyama (Japonês), Patrícia Dametto.

Aos amigos Cristiano, João Marcos, Magela e Marcão Paraíba, pela amizade e parceria nas pesquisas.

Aos amigos Gabriel, João Flávio, Rodrigo e Thiago Sequinel, Tanabi, Zé Rufino, Piá, Zé Renato e Murilo, pela amizade e futebol nas sextas-feiras.

Aos amigos do departamento Andreinha, Álan, Alberto Alécio, Fausto, Glenda, Néia, pelos ensinamentos, conselhos, companheirismo e muitas risadas.

À FAPESP e ao Programa BIOTA pela bolsa concedida e demais apoios financeiros.

Aos professores e alunos do nosso grupo de Produtos Naturais, pela amizade.

A todos os funcionários do IQ que contribuíram para a realização desse trabalho.

"A ciência não pode prever o que vai acontecer. Só pode prever a probabilidade de algo acontecer."
(César Lattes)

RESUMO

Este trabalho abordou a determinação quali e quantitativa de enantiômeros de catequinas em extratos e infusões das folhas de espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae), tais como: *B. basiloba*, *B. coccolobifolia*, *B. crassa*, *B. intermedia* e *B. verbascifolia*. O trabalho descreve a determinação rápida e eficiente de catequina, *ent*-catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos e dicrismo circular, usando coluna de fase estaconária quirál. O método possui alta seletividade e permite identificar inequivocadamente diastereômeros de catequinas em matrizes complexas como extratos vegetais, com limites de detecção (0,42 a 0,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e quantificação (1,27 a 2,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) satisfatórios para as condições analisadas, e valores de precisão (0,3 to 4,8%) e exatidão (70,0 a 110,2%) recomendados pela ANVISA. Com exceção da espécie *B. intermedia*, quatro espécies do gênero apresentaram em seus extratos e infusões os diastereômeros catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina. Experimentos para avaliar a epimerização da catequina indicaram que a incomum *ent*-epicatequina não é um artefato, podendo ser um produto do metabolismo de espécies do gênero *Byrsonima*. Enantiômeros da catequina apresentam diferentes atividades farmacológicas, o que pode causar a ocorrência de efeitos colaterais diversos, danosos à saúde humana. Portanto, esses resultados podem alertar quanto ao consumo indiscriminado de plantas medicinais pela população e contribuir para criação de políticas mais rigorosas no controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil.

Palavras-chave: *Byrsonima*, Malpighiaceae, catequina, enantiômero, dicrismo circular, cromatografia quirál.

ABSTRACT

This work deals with the qualitative and quantitative determination of catechin and epicatechin enantiomers both in extracts and infusions from the leaves of the *Byrsonima* (Malpighiaceae) species (*B.basiloba*, *B. cocolobifolia*, *B. crassa*, *B. intermedia* and *B. verbascifolia*). This work describes a simple and reliable analytical high performance liquid chromatographic (HPLC) method coupled with photodiode array detector and circular dichroism for simultaneous determination of catechin, *ent*-catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin. The direct separation was obtained in normal phase by HPLC using chiral stationary phase. The method has high selectivity. Regardless of variations in retention time, it was possible to identify unequivocally the enantiomers of catechin and epicatechin in complex matrices like plant extracts with satisfactory limit of detection (0.42 to 0.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and limite of quantification (1.27 to 2.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Under the conditions used, precision values were 0.3 to 4.8%, whereas accuracy values were 75.0 to 110.2%, recommended by ANVISA. Aside from *B. intermedia* specie, the other four *Byrsonima* species presented catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin diastereomers both in methanolic extract and infusions. Experiments were carried out for verification the possibility of catechin epimerization. It was observed that the unusual *ent*-epicatechin was not an artifact, but product of *Byrsonima* species metabolism. Enantiomers of catechin present dissimilar pharmacological activities, which may cause the occurrence of various side effects, harmful to human health. Therefore, these results may warn about the indiscriminate use of medicinal plants by the population and contribute to the quality control of Brazilian herbal medicines.

Keywords: *Byrsonima*, Malpighiaceae, catechin, enantiomer, circular dichroism, chiral chromatography.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ε	Absortividade molar
A	Fator de separação
λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
ANR	Enzima Antocianidina Redutase
ANS	Enzima Antocianidina Sintase
t -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
C	Catequina
CFI	Enzima Chalcona Flavanona
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos (<i>Diode array detector</i>)
DC	Dicroísmo circular
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Epicatequina
EMeOH	Extrato metanólico
EtOH	Etanol
n -Hex	n -Hexano
K	Fator de retenção
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato (reduzido)
2-PrOH	Propan-2-ol
r^2	Coefficiente de correlação
R_s	Resolução
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
t_0	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
V_0	Volume morto

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – Dicroísmo Circular.	34
Equação 2. Cálculos dos parâmetros cromatográficos.	44
Equação 3. Cálculo do Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).	60
Equação 4. Cálculo da precisão.	62
Equação 5. Cálculo da recuperação dos analitos.	63

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1. Fluxograma de preparação dos EMeOH das folhas das espécies de *Byrsonima*. 46
- Esquema 2. Fluxograma de preparação das infusões das folhas das espécies de *Byrsonima*. 47
- Esquema 3. Fluxograma do *clean-up* por SPE dos EMeOH e infusões das folhas das espécies de *Byrsonima*. 48
- Esquema 4. Estratégia para otimização de métodos cromatográficos quirais com colunas Chiralcel OD. 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático da interação de moléculas quirais com enzimas receptoras: Teoria dos três pontos.	25
Figura 2. Talidomida.	25
Figura 3. Diastereômeros da catequina.	26
Figura 4. Taninos condensados.	27
Figura 5. Tipo de ciclodextrinas.	30
Figura 6. (A) Diâmetro das ciclodextrinas e (B) desenho esquemático da inclusão de flavonóide quiral na β -ciclodextrina.	30
Figura 7. Luz plano polarizada: campo elétrico (E) em função do tempo (t).	33
Figura 8. Luz circularmente polarizada a direita (E_d) e a esquerda (E_e).	34
Figura 9. Espectro de dicroísmo circular (DC).	35
Figura 10. Constituintes eletrônicos de um detector de DC para CLAE.	35
Figura 11. <i>Byrsonima intermedia</i> : foto representativa de plantas do gênero <i>Byrsonima</i> (Malpighiaceae).	39
Figura 12. Separação obtida por CLAE entre os enantiômeros <i>ent</i> -catequina e catequina nas colunas avaliadas. [25°C; DAD (220 nm); DC (280 nm); vazão 0,5 mL min ⁻¹].	51
Figura 13. Cromatogramas da separação dos enantiômeros da catequina (C) e epicatequina (EC) com diferentes fases móveis. [Coluna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm); 25°C; DAD (220 nm), vazão 0,5 mL min ⁻¹].	53
Figura 14. Espectro UV característico de catequinas.	53
Figura 15. Espectros de DC da <i>ent</i> -catequina (<i>ent</i> -C), catequina (C), epicatequina (EC) e <i>ent</i> -epicatequina (<i>ent</i> -EC).	55
Figura 16. Cromatograma da separação dos enantiômeros da catequina (C) e epicatequina (EC) e seus respectivos espectros de DC. [Coluna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm, 5 μ m), <i>n</i> -Hex/EtOH (75:25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), 25°C; DC (280 nm), vazão 0,5 mL min ⁻¹].	56

- Figura 17. Cromatogramas representativos das frações do EMeOH das folhas de *B. crassa* provenientes do *clean-up* utilizando cartuchos SPE de C18. Fr1: MeOH/H₂O (2:8, v/v), Fr2: MeOH/H₂O (1:1, v/v), Fr3: MeOH. [Coluna Synergi Hydro (250 x 4,6 mm, 5µm), 0 a 100% de B em 60 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 25°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹]. 58
- Figura 18. Curva analítica da (A) catequina e (B) epicatequina. 60
- Figura 19. (A) Cromatogramas dos EMeOH (linha sólida) e infusões (linha tracejada) das folhas de espécies de *Byrsonima* e (B) cromatogramas dos EMeOH fortificados com 50 µg de cada padrão de catequina (C), epicatequina (EC) e *ent*-epicatequina (*ent*-EC). [Coluna Chiralcel OD-H (250, 4,6 mm, 5µm), *n*-Hex/EtOH (75,25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), 25°C, DAD (220 nm), vazão 0,5 mL min⁻¹]. 66
- Figura 20. Quantidade de catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina nas folhas das espécies de *Byrsonima* (mg analito / g folhas). 68
- Figura 21. Cromatogramas dos padrões de catequina (C) e epicatequina (EC): 50 µg mL⁻¹ (linha tracejada): extração com (A) MeOH (linha sólida) e (B) H₂O 80°C (linha sólida). [Coluna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm), *n*-Hex/EtOH (75,25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), 25°C, DAD (220 nm), vazão 0,5 mL min⁻¹]. 70
- Figura 22. Epimerização da catequina em *ent*-epicatequina em solução com pH > 6 a alta temperatura (T > 50°C) na presença de oxigênio. 71
- Figura 23. Biossíntese da catequina e epicatequina a partir da estereoespecificidade enzimática na ciclização da chalcona. CFI: Chalcona Flavanona Isomerase; NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (reduzido); ANS: Antocianidina Sintase; ANR: Antocianidina Redutase. 72
- Figura 24. Biossíntese da naringenina. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases estacionárias quirais utilizadas para CLAE.	31
Tabela 2. Substâncias naturais identificadas por DC acoplado em série com outros detectores por CLAE em extratos vegetais.	36
Tabela 3. Coletas das espécies de <i>Byrsonima</i> .	44
Tabela 4. Parâmetros cromatográficos da separação dos enantiômeros <i>ent</i> -catequina (1)/catequina (2) e epicatequina (3)/ <i>ent</i> - epicatequina (4) na coluna Chiralcel OD-H.	52
Tabela 5. Parâmetros obtidos das curvas analíticas dos padrões de catequina e epicatequina.	60
Tabela 6. Valores referentes à precisão do método.	62
Tabela 7. Recuperação de catequina e epicatequina obtidos após <i>clean-up</i> com diferentes cartuchos C ₁₈ (EMeOH e infusão das folhas de <i>Byrsonima crassa</i>).	64
Tabela 8. Recuperação de catequina e epicatequina após <i>clean-up</i> com o cartucho C ₁₈ Strata Phenomenex (EMeOH e infusão das folhas de espécies de <i>Byrsonima</i>).	65
Tabela 9. Quantidade de catequina, epicatequina e <i>ent</i> -epicatequina no EMeOH e infusão das folhas de espécies de <i>Byrsonima</i> (µg analito / g folhas).	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. As normas vigentes para fitoterápicos	21
1.2. Enantiômeros	24
1.2.1. Catequinas	26
1.3. Cromatografia quiral	29
1.4. Dicroísmo circular eletrônico (DC)	33
1.5. O gênero <i>Byrsonima</i> (Malpighiaceae)	38
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivos Gerais	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Reagentes utilizados	41
3.1.1. Solventes grau analítico	41
3.1.2. Solventes grau HPLC	41
3.1.3. Padrões	41
3.2. Materiais	42
3.3. Instrumentação	42
3.4. Coleta e identificação do material vegetal	43
3.5. Condições cromatográficas	44
3.6. Soluções padrão	45
3.7. Construção das curvas analíticas	45
3.8. Preparação das amostras	46
3.8.1. Extrato metanólico (EMeOH)	46
3.8.2. Infusão	47

3.8.3. Procedimento de <i>Clean-up</i>	47
3.9. Identificação e quantificação	48
4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Separação e identificação dos enantiômeros	49
4.2. Avaliação da seletividade do <i>Clean-up</i>	56
4.3. Parâmetros avaliados	59
4.3.1. Linearidade e sensibilidade	59
4.3.2. Seletividade	61
4.3.3. Precisão	62
4.3.4. Recuperação (exatidão)	63
4.4. Análises dos extratos e infusões das folhas de espécies de <i>Byrsonima</i>	65
4.5. Avaliação da epimerização de catequinas durante a preparação dos extratos e infusões das folhas de espécies de <i>Byrsonima</i>	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO	84

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, elas são comercializadas livremente em mercados ou feiras livres e são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (MACIEL et al., 2002).

Esse uso indiscriminado é muito perigoso, pois a toxicidade de plantas medicinais e de fitoterápicos é um problema sério de saúde pública. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas ainda ocorrem em um ritmo muito mais lento do que o uso pela população. Desconhecer as características de um produto de consumo generalizado pode, por uso exagerado ou equivocado, gerar sérios problemas de saúde (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

Para tentar garantir maior segurança no uso de fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu uma série de requisitos para o registro de um medicamento fitoterápico. Dentre os requisitos fundamentais estão o conhecimento da composição química e da atividade farmacológica da planta, a fim de estabelecer critérios e metodologias para análise, controle de qualidade e preparo de formulações fitoterápicas.

1.1. As normas vigentes para fitoterápicos

Os fitoterápicos sofreram uma série de normatizações através dos tempos. A primeira norma referente às plantas medicinais no Brasil foi a publicação da Farmacopeia Brasileira (SILVA, 1929), que oficializou o uso de plantas medicinais como matéria-prima farmacêutica (MARQUES, 2001).

O grande marco entre Fitoterapia e Ciência ocorreu com a publicação da Portaria 06/95 da Vigilância Sanitária de 1995 (AGÊNCIA..., 2009a). Essa portaria, bastante avançada e rigorosa, exigia de todos os produtos a comprovação clínica da eficácia e segurança. Foi substituída pela RDC 17/2000 e, mais tarde, pela RDC 48/04, todas preservando o conceito do embasamento científico e do controle de qualidade farmacopeico. A aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006) estabeleceu novas diretrizes e prioridades, sempre com o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, o desenvolvimento

de tecnologias e inovações, assim como o fortalecimento das cadeias produtivas e o uso sustentável da biodiversidade (BRASIL, 2006).

No contexto da saúde pública brasileira, o evento mais marcante foi a adoção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS). Sua aplicação disciplina o emprego da fitoterapia *de base científica* extraída do conjunto de plantas colecionadas por gerações em várias regiões do país.

Para que a Fitoterapia possa ter um embasamento científico, é necessário que se compreenda, à luz das leis, o que é um Fitoterápico.

A definição empregada pela ANVISA em sua resolução RDC n. 48 de 2004 (AGÊNCIA..., 2009c) para um Fitoterápico é: *“medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3”*. A Fórmula Fitoterápica é a *“Relação quantitativa de todos os componentes de um medicamento fitoterápico”*. Um Marcador é o *“componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos”*. O princípio ativo de medicamento fitoterápico é a *“substância, ou classes químicas (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.), quimicamente caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico”*.

A mesma legislação em seu capítulo II estabelece que para registrar um fitoterápico, o proponente deverá, dentre outros documentos apresentar:

1) uma bula, que *“deve informar a parte utilizada da planta, a composição do medicamento, indicando a relação real, em peso ou volume, da matéria prima vegetal usada e a correspondência em marcadores e/ou princípios ativos, quando conhecidos”*;

2) a referência bibliográfica da Farmacopeia consultada e reconhecida pela ANVISA, de acordo com a legislação vigente. No caso de não se tratarem de compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA, descrição detalhada de todas as metodologias utilizadas no controle de qualidade, com métodos analíticos devidamente validados, somente para matéria(s)-prima(s) ativa(s) vegetal(is), de acordo com o Guia

de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, indicando a fonte bibliográfica ou de desenvolvimento.

3) Análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie.

4) Resultado da prospecção fitoquímica, ou perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG), quando cabível.

5) No caso de produtos importados, [...] a “metodologia de controle de qualidade físico-química, química, microbiológica e biológica que o importador realizará, de acordo com a forma farmacêutica e apresentação: produto terminado, a granel ou na embalagem primária. Caso o método não seja farmacopeico, enviar a validação da metodologia analítica”.

6) É necessário “apresentar levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações tecnicocientíficas ou publicações), que será avaliado”, dentre vários critérios, “com relação à ausência de risco tóxico ao usuário e à ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, ou presentes dentro de limites comprovadamente seguros”. Esse parâmetro é muito importante, pois não são raros os casos de intoxicações graves e até mesmo morte de usuários devido à presença de venenos naturais (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008). Em 2007, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registrou 1.657 casos de intoxicação humana por plantas no país, em que aproximadamente 60% foram devido ao uso para cura, sendo a sua quase totalidade na zona urbana (SISTEMA..., 2010).

Essas normas deixam evidente a preocupação com a necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos eficazes e seguros, cuja qualidade deve ser inquestionável. O controle de qualidade deve ter como base a Farmacopeia Brasileira ou outras farmacopeias reconhecidas pela ANVISA ou ainda guias publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Observa-se que as normas vigentes não discutem sobre estudos de moléculas naturais quirais presentes nos extratos vegetais. Como comprovado há décadas, enantiômeros podem apresentar diferenças em suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas ou tóxicas.

1.2. Enantiômeros

A similaridade estrutural entre pares de enantiômeros reflete-se igualmente nas suas propriedades físicas e químicas. Essas propriedades são idênticas em meios isotrópicos, o que torna difícil a distinção entre eles, bem como o seu isolamento e separação. Até recentemente, resolver uma mistura racêmica, isto é, separar individualmente cada um dos constituintes de um par de enantiômeros, era uma tarefa laboriosa, envolvendo recristalizações fraccionadas ou conversão do par de enantiômeros em diastereômeros (isômeros configuracionais que não são a imagem especular um do outro). Bem mais difícil ainda era reconhecer a presença de pares de enantiômeros em matrizes de origem biológica.

Em meios anisotrópicos, contudo, cada um dos enantiômeros de um par comporta-se de modo diferente e distinguível. A capacidade de interação com a luz polarizada promove a rotação do plano de vibração em sentidos opostos (atividade ótica), o que introduziu a expressão de “compostos opticamente ativos ou estereoisômeros” (BRUICE, 2003).

O primeiro sistema para a diferenciação de enantiômeros foi descrito por Pasteur, que mostrou que as leveduras e bolores eram capazes de consumir preferencialmente um dos enantiômeros do tartarato de amônio racêmico. De fato, a atividade enzimática possui uma estereosseletividade intrínseca geral. Por exemplo, com exceção de alguns casos em micro-organismos, apenas os aminoácidos L são bioquimicamente utilizáveis (BRUICE, 2003). O mesmo se verifica no campo da farmacologia, dos aromas, dos sabores, etc., onde apenas um enantiômero possui efetiva ação terapêutica, ou possui odor ou gosto diferente do seu enantiômero correspondente.

A atividade biológica de substâncias opticamente ativas não é idêntica para ambos os enantiômeros. Um modelo explicativo deste é a teoria dos três pontos: a formação do complexo enzima-substrato só é possível para o enantiômero que possui três pontos corretamente posicionados para ocorrer interação com o sítio ativo da enzima (BRUICE, 2003; Figura 1).

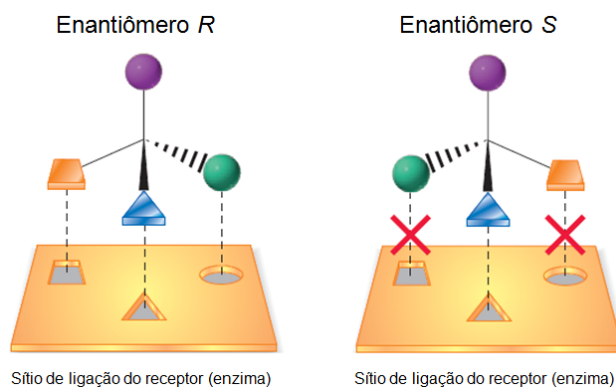


Figura 1. Diagrama esquemático da interação de moléculas quirais com enzimas receptoras: Teoria dos três pontos.

Existem muitos exemplos de enantiômeros de moléculas que apresentam diferenças em suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas ou tóxicas: o dos barbitúricos, os enantiômeros (+) possuem efeito sedativo, enquanto que os enantiômeros (-) estimulam o sistema nervoso central provocando excitação; o do fármaco etambutol, o enantiômero (*S,S*) inibe o crescimento do bacilo da tuberculose, e o seu enantiômero (*R,R*) causa cegueira; o da (+)-penicilamina, que possui atividade antirreumática, enquanto que a (-)-penicilamina possui efeito neurotóxico (ZHANG et al., 2004). Porém, o exemplo mais conhecido é a tragédia ocorrida com o fármaco talidomida.

No início da década de 60, o fármaco talidomida (Figura 2) foi prescrito mundialmente como sedativo e agente anti-naúseas, indicado no alívio do mal-estar matinal comum em gestantes, sendo responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas que foi, posteriormente, atribuído ao seu perfil teratogênico. Posterior tentativa de resolução cromatográfica e administração das espécies enantiomericamente puras, demonstrou que o efeito teratogênico da talidomida era proveniente do emprego do enantiômero de configuração absoluta (*S*), enquanto que seu enantiômero correspondente (*R*) era responsável pela propriedade sedativa (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001).

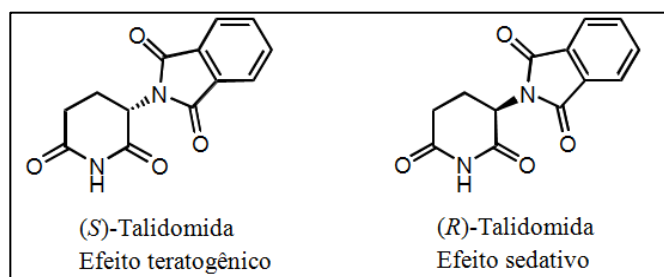


Figura 2. Talidomida.

Na natureza também se encontram inúmeras moléculas quirais, cujos enantiômeros possuem atividades diferenciadas. Um dos exemplos mais conhecidos é o da carvona, muito utilizada na indústria alimentícia, em que o enantiômero (*S*) possui odor de hortelã e o (*R*) de cariz (BRUICE, 2003).

Uma classe muito importante de moléculas naturais são os flavonóides, amplamente encontrados em espécies vegetais, alimentos e bebidas. Incluídos nessa classe, as catequinas são as moléculas quirais que mais vêm despertando interesse na comunidade científica devido às suas propriedades farmacológicas.

1.2.1. Catequinas

As catequinas são moléculas produzidas pelo metabolismo vegetal e possuem pelo menos dois centros assimétricos, nas posições C-2 e C-3. Portanto, existem quatro possíveis diastereômeros: (*2R,3S*)- 2,3-*trans*, (*2S,3R*)-2,3-*trans*, (*2R,3R*)-2,3-*cis*, e (*2S,3S*)-2,3-*cis* (Figura 3).

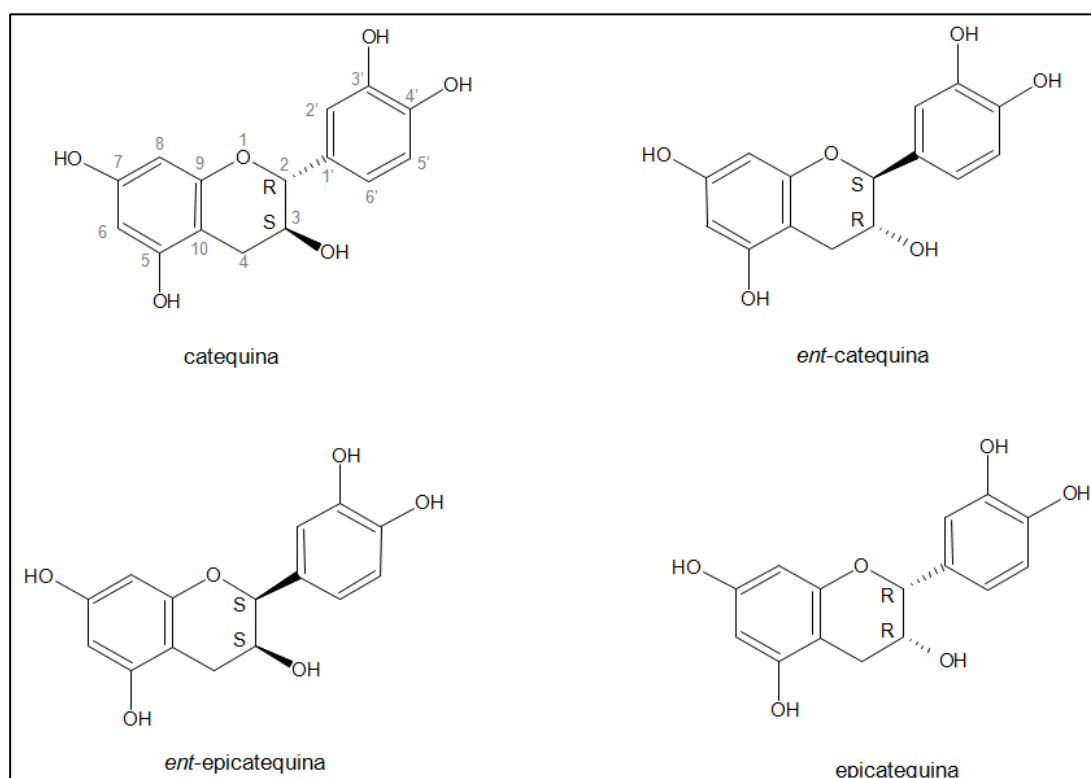


Figura 3. Diastereômeros da catequina.

Essas substâncias são incolores, hidrossolúveis que contribuem para o amargor e adstringência de alimentos como frutas e chocolates, e bebidas como chás e vinhos (ITO et al., 2003).

São encontradas em diversas espécies vegetais das mais variadas famílias, como por exemplo, *Camellia sinensis* (“chá verde”, família Theaceae; ITO et al., 2003), *Theobroma cacao* (“cacau”, família Malvaceae; KOFINK, PAPAGIANNOPOULOS, GALENSA, 2007b), *Hancornia speciosa* (“mangaba”, família Apocynaceae; RODRIGUES et al., 2007) etc.

Polímeros de catequinas (taninos condensados ou proantocianidinas, Figura 4) possuem função protetora em espécies vegetais. Eles inibem o ataque às plantas por herbívoros vertebrados ou invertebrados e também por microorganismos patogênicos. Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Daltons, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides. Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glucoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante (MONTEIRO et al. 2005; VITAL et al., 2004).

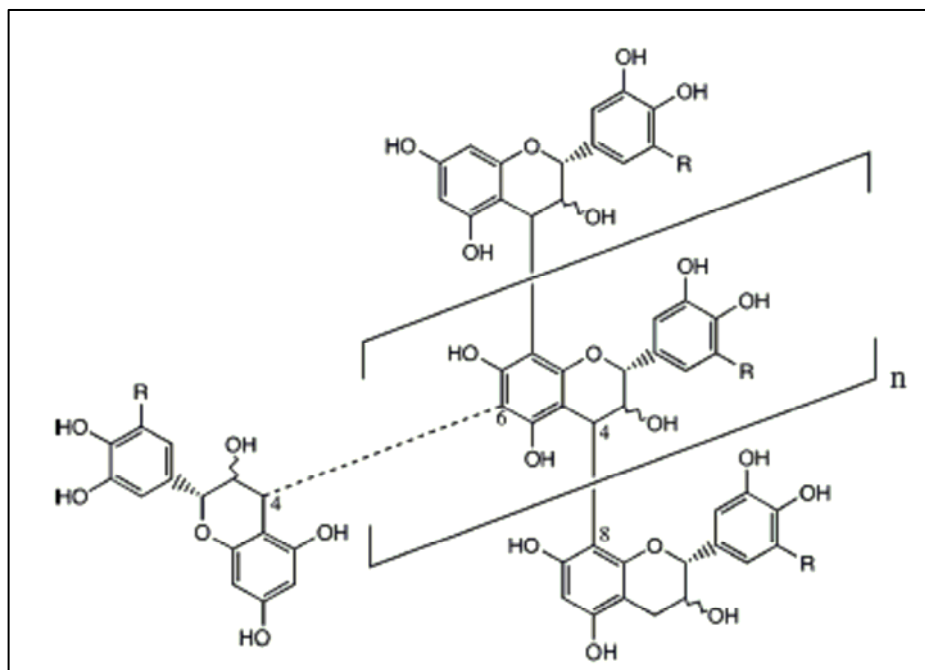


Figura 4. Taninos condensados.

As catequinas têm recebido maiores atenções devido as suas importantes atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antitumoral (XU; CHANG, 2010; HENRY; STEPHENS-LARSON, 1984; LARSEN et al., 2009; ITO et al., 2003).

Estudos realizados há mais de duas décadas com essas substâncias demonstram que enantiômeros da catequina apresentam atividades opostas no metabolismo glicogênico de ratos: enquanto a catequina estimulou em 90% a produção do glicogênio, a *ent*-catequina inibiu em 90% a produção do mesmo (NYFELER, MOSER, WALTER, 1983). Enantiômeros da catequina exibiram diferentes atividades alelopáticas: a *ent*-catequina é fitotóxica, e a catequina possui atividade antimicrobiana contra patógenos presentes em raízes de *Centaurea maculosa* (Asteraceae), “Flor do mal” (BAIS et al., 2002).

A catequina {(2*R*, 3*S*)-2-[-3,4-di-hidroxifenil]-3,4-di-hidro-1-[2*H*]-benzopiran-3,5,7-triol} e a epicatequina {(2*R*, 3*R*)-2-[-3,4-di-hidroxifenil]-3,4-di-hidro-1-[2*H*]-benzopiran-3,5,7-triol} são os estereoisômeros mais comuns encontrados na natureza.

Em extratos de plantas, elas são quase sempre identificadas como (2*R*,3*S*)-catequina e/ou (2*R*, 3*R*)-epicatequina, provavelmente devido à estereosseletividade das enzimas envolvidas na biossíntese dessas substâncias (DEWICK, 2002). No entanto, as diferenças significativas nas atividades farmacológicas dos enantiômeros da catequina e epicatequina geram preocupações sobre a pureza destes enantiômeros em extratos ou chás de plantas medicinais. A preparação de extratos ou chás e as condições de armazenamento da matéria prima vegetal podem levar a diferentes proporções de estereoisômeros, devido à epimerização das mesmas ou hidrólise de galatos de catequinas presentes no material vegetal (ITO et al., 2003).

A compreensão das relações entre quiralidade e atividade biológica de moléculas naturais ainda é incipiente. É necessário desenvolver técnicas e métodos analíticos adequados. Nesse contexto, as técnicas cromatográficas têm oferecido uma grande contribuição.

1.3. Cromatografia quiral

A separação cromatográfica quiral, geralmente, baseia-se em levar os componentes de uma mistura a percorrer um meio com o qual interagem fisicamente (fase estacionária) arrastados por um fluido líquido (cromatografia líquida) ou gasoso (cromatografia gasosa) adequado. Dos diferentes equilíbrios dinâmicos estabelecidos entre cada um dos componentes com ambas as fases, móvel e estacionária, resultam diferentes velocidades de percurso (tempo de retenção) para cada um que, deste modo, emergem do meio a tempos diferentes (GÜBITZ; SCHMID, 2004).

Dada a sua alta eficiência, os processos cromatográficos de alto desempenho são os mais utilizados para a separação de enantiômeros.

Existem dois tipos de métodos de análise de enantiômeros: os métodos indiretos e os métodos diretos.

Os métodos indiretos consistem na transformação de enantiômeros em diastereômeros, e com isso permite a utilização de métodos não quirais de cromatografia. No entanto, tais transformações demandam tempo e nem sempre são reversíveis.

Os métodos cromatográficos diretos são mais rápidos e não geram transformações irreversíveis dos enantiômeros. Podem ser utilizados com o emprego de aditivos quirais na fase móvel ou de uma fase estacionária quiral.

Quando se acrescentam aditivos quirais no eluente de um sistema cromatográfico, a resolução dos enantiômeros ocorre pela formação de complexos diastereoméricos com esse aditivo quiral. A separação dos enantiômeros é resultado da diferença de estabilidade dos complexos diastereoméricos na solvatação da fase móvel ou na ligação dos complexos ao suporte sólido (LINDNER, PETTERSSON, 1985).

Os aditivos quirais mais utilizados para análises de flavonóides por cromatografia são as ciclodextrinas (VALLS et al., 2009; KOFINF, PAPAGIANNOPOULOS, GALENSA, 2007a; KOFINF, PAPAGIANNOPOULOS, GALENSA, 2007b; GOTTI et al., 2006).

As ciclodextrinas podem interagir hidrofóbicamente no seu interior e hidrofílicamente no exterior de sua estrutura (SAENGER, 1983; Figura 5).

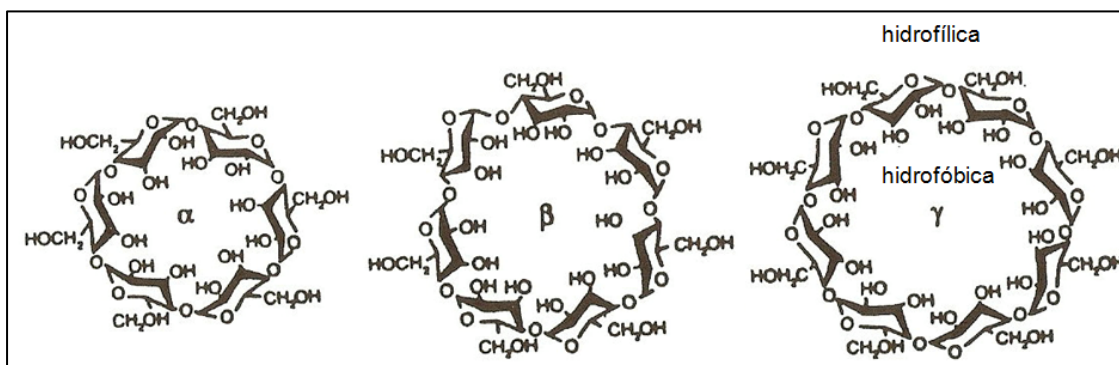


Figura 5. Tipo de ciclodextrinas.

O diâmetro interno e a ocorrência de fortes ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da β -ciclodextrina (oligômero com sete unidades de glicose) e dos flavonóides concedem alta estabilidade ao complexo (YAN et al., 2006; CALABRO et al., 2004; Figura 6).

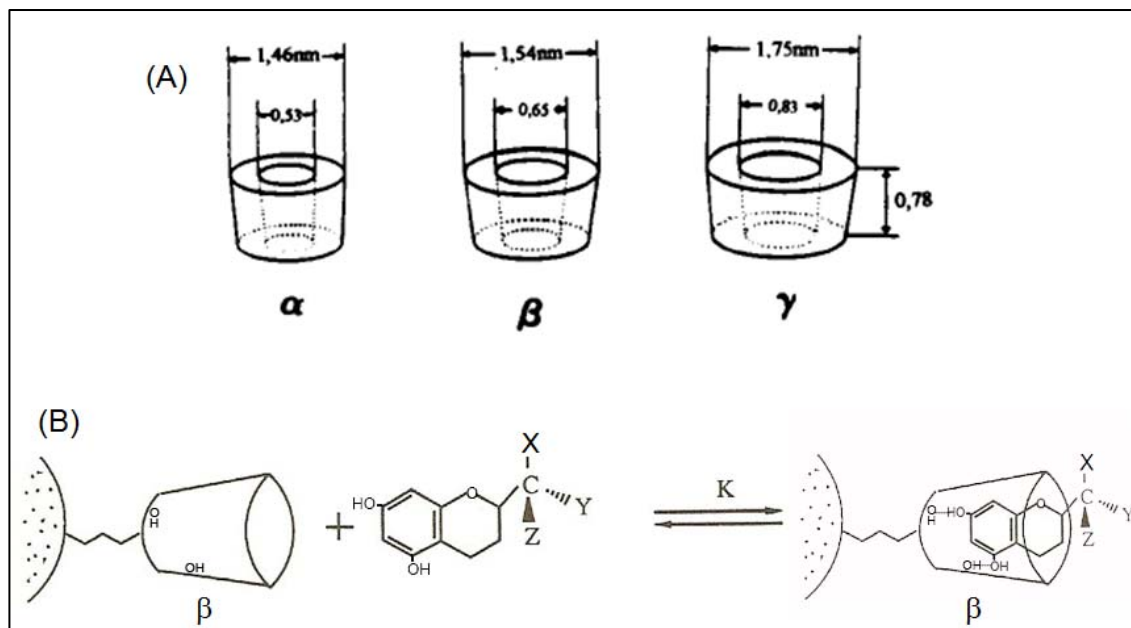


Figura 6. (A) Diâmetro das ciclodextrinas e (B) desenho esquemático da inclusão de flavonóide quiral na β -ciclodextrina.

Na utilização de aditivos quirais devem ser observados alguns fatores:

- a) a fase móvel deve ser simples e de fácil manipulação, permitindo diferentes modificações;
- b) evitar reagentes instáveis e de difícil obtenção e preparação;
- c) o reagente quiral deve formar diastereômeros estáveis com os enantiômeros;
- d) a complexação enantiômero-aditivo deve ser reversível;

e) o processo deve permitir o uso de colunas comuns (Ex.: C₈ e C₁₈) e disponíveis comercialmente;

f) o processo deve permitir a determinação das impurezas, pois os aditivos podem complexar com outras substâncias presentes na matriz dificultando a identificação dos analitos de interesse.

A adição de aditivos torna a fase móvel mais complexa, o que constitui uma limitação do método, principalmente quando se visa a aplicação em escala preparativa (SINGH, 2002).

Os métodos que utilizam CLAE com colunas quirais são os mais empregados na separação e quantificação de enantiômeros.

No mercado são encontradas colunas com diferentes tipos de fases estacionárias quirais, tais como as baseadas em proteínas, ciclodextrinas, polímeros de carboidratos, tipo Pirkle, troca de ligantes e antibióticos macrocíclicos. Em cada tipo de fase estacionária ocorrem diferentes interações com os analitos quirais, proporcionando seletividade e resolução diferentes (Tabela 1; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

Tabela 1. Fases estacionárias quirais utilizadas para CLAE.

Tipo de fase estacionária quiral	Mecanismo de interação	Características dos analitos
Proteína	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas	Grupos ionizáveis (i.e., amina ou ácido); grupos aromáticos
Ciclodextrina	Inclusão por complexação; ligações de H	Grupos aromáticos e polares
Polímero de carboidrato	Inclusão por complexação; interações por atração	Centros quirais com ligantes volumosos; habilidade para ligações de H
Tipo Pirkle	Ligações de H; interações π - π ; interações dipolo-dipolo	Grupos aromáticos; habilidade para ligações de H e π - π
Troca de ligante ^a	Coordenação por complexos de metais	α -amino e α -hidroxi aminoácidos
Antibióticos macrocíclicos ^b	Ligações de H; interações π - π ; interações dipolo-dipolo; interações estéricas e hidrofóbicas	Centros quirais com ligantes volumosos; habilidade para ligações de H e dipolo-dipolo

^a Fase estacionária raramente utilizada.

^b Fase estacionária com poucos dados na literatura e aplicações limitadas.

Os mecanismos de separação por coluna quiral ainda não são bem entendidos. Eles podem também derivar da formação reversível de complexos diastereoméricos de diferente estabilidade entre cada um dos enantiômeros constituintes de um par e a fase estacionária quiral (mais raramente a fase móvel) ou por inclusão de moléculas quirais nas cavidades das fases estacionárias quirais (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; SINGH, 2002).

O método direto de análise por CLAE com emprego de coluna quiral é muito eficiente na separação de enantiômeros. A aplicação com detectores aquirais implica no uso de padrões autênticos de enantiômeros para determinar a identidade desses em matrizes reais. Ainda assim, podem ocasionar equívocos quando estes se encontram em matrizes complexas as quais podem possuir outras substâncias com estruturas semelhantes.

Existem diversas técnicas que permitem estabelecer a estereoquímica de moléculas quirais, tais como: raios-x, ressonância magnética nuclear (RMN) utilizando agentes de derivação, polarimetria, dispersão rotatória ótica (DRO), dicroísmo circular eletrônico (DC), dicroísmo circular vibracional (DCV), dentre outros (MCCONNELL et al., 2007). Porém, somente algumas dessas técnicas permitem o acoplamento com a cromatografia.

A cromatografia quiral acoplada a detectores quirais pode não só fornecer informações sobre a presença/ausência de enantiômeros (pureza ótica), mas também estabelecer a configuração absoluta de moléculas quirais em tempo relativamente rápido e sem a necessidade de purificá-las.

Dentre os detectores quirais que permitem o acoplamento com a CLAE destaca-se o dicroísmo circular eletrônico (DC), o qual possui características semelhantes a de um detector UV. Esse acoplamento permite o uso de solventes comuns e possui uma maior estabilidade da linha de base, quando comparado com o acoplamento CLAE-DRO (necessidade de um controle rígido de temperatura para a realização das análises). O acoplamento CLAE-DC está em crescente desenvolvimento no estudo de substâncias naturais, principalmente flavonóides, uma classe de metabólitos muito comum nas plantas (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005).

1.4. Dicroísmo circular eletrônico (DC)

A origem da palavra dicroísmo vem do grego *dikhroos*, cor-de-dois, e refere-se a qualquer dispositivo ótico que possa dividir um feixe de luz em dois feixes com diferentes comprimentos de onda. Esse fenômeno foi inicialmente observado pelo austríaco Wilhelm Carl Ritter von Haidinger em 1847 em cristais de quartzo ametista. Posteriormente, esse fenômeno foi observado em moléculas opticamente ativas, mais especificamente em soluções de tartarato de cobre e cromo, pelo francês Aimé Cotton (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000).

A luz é constituída por ondas eletromagnéticas que oscilam por todos os planos do espaço. Com a utilização de um filtro polarizador é possível selecionar ondas que oscilem em um único plano, conhecidas como luz plano-polarizada (Figura 7).

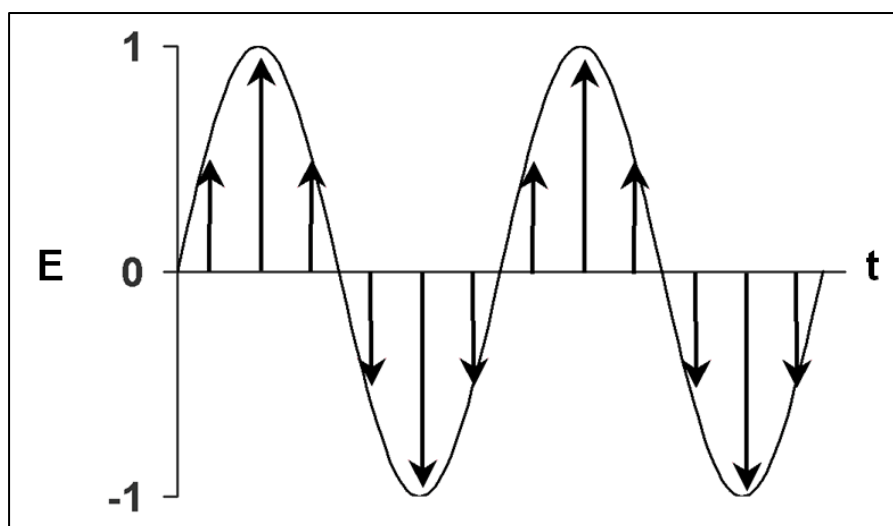


Figura 7. Luz plano polarizada: campo elétrico (E) em função do tempo (t).

A polarização circular da luz resulta da sobreposição de duas ondas com a mesma amplitude, linearmente polarizadas, em planos perpendiculares, com diferença de fase entre si de 90° ou -90° (Figura 8).

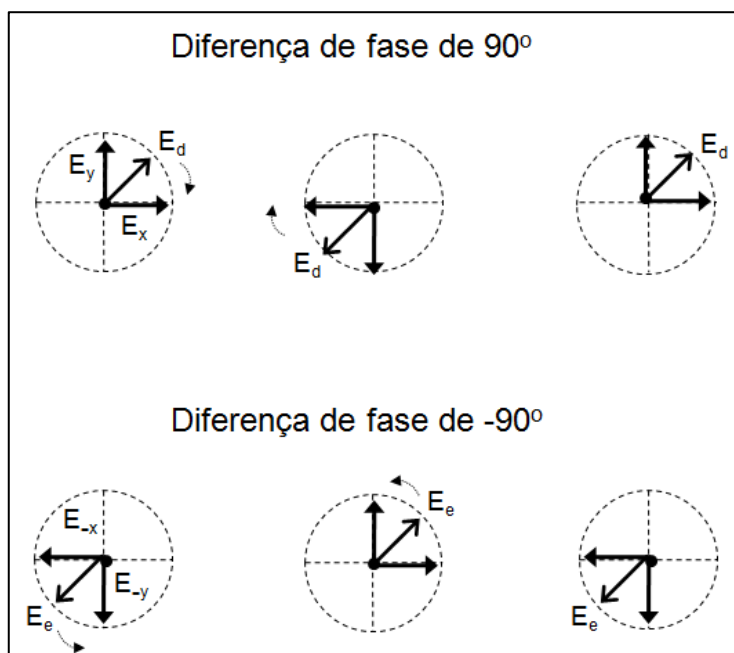


Figura 8. Luz circularmente polarizada a direita (E_d) e a esquerda (E_e).

Os enantiômeros possuem a propriedade de absorver de formas diferenciadas a luz circularmente polarizada à esquerda e a luz circularmente polarizada à direita. O valor de DC é calculado pela diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à esquerda (AE) e a circularmente polarizada à direita (AD) em certo comprimento de onda (Equação 1; ZHANG et al., 2004).

$$\Delta A = A_E - A_D$$

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_e - \varepsilon_d = \frac{\Delta A}{c l}$$

A = absorvância

ε = Absortividade molar;

c = concentração molar da amostra (mol.L^{-1})

l = comprimento do caminho ótico da cela (cm)

Equação 1. Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – Dicroísmo Circular.

O espectro de DC de uma molécula quiral é representado pelo $\Delta \varepsilon$ em função do comprimento de onda (λ ; Figura 9). As bandas máximas e mínimas de absorção são conhecidas como efeito Cotton. A intensidade e o λ das bandas são característicos para cada enantiômero (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000).

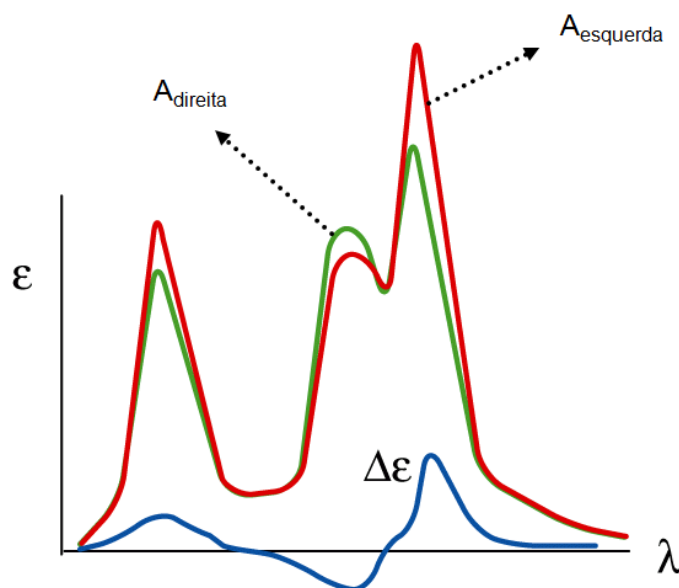


Figura 9. Espectro de dicroísmo circular (DC).

O detector de DC acoplado a um sistema de CLAE possui constituintes eletrônicos semelhantes aos de um detector UV (Figura 10).

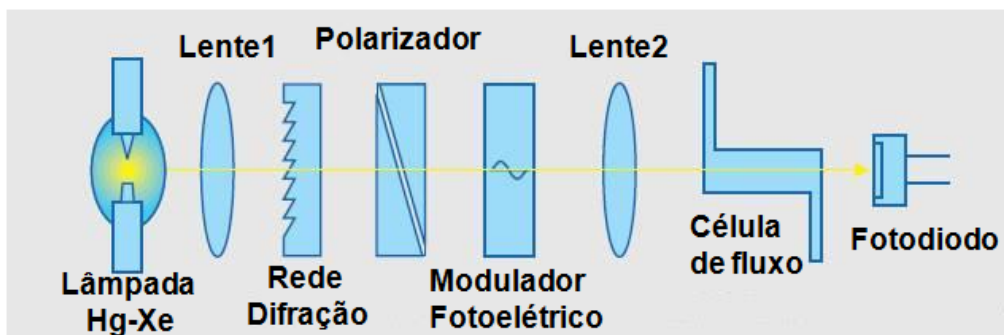


Figura 10. Constituintes eletrônicos de um detector de DC para CLAE.

Fonte: JASCO, 2007.

A facilidade do acoplamento CLAE-DC possibilita o uso em série com outros detectores, como DAD, índice de refração (IR), espectrometria de massas (EM), RMN etc.

O DC acoplado em série com outros detectores por CLAE permite realizar análises rápidas e confiáveis de moléculas com aplicação em bioquímica, em farmacologia, na síntese orgânica e de complexos organometálicos (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000; ELIEL; WILEN, 1994).

Na área de produtos naturais a CLAE-DC em série com outros detectores ainda é pouco aplicada, porém os estudos demonstram a elucidação completa de moléculas diretamente em extratos brutos sem a necessidade de custosas e demoradas etapas de isolamento (Tabela 2).

Tabela 2. Substâncias naturais identificadas por DC acoplado em série com outros detectores por CLAE em extratos vegetais.

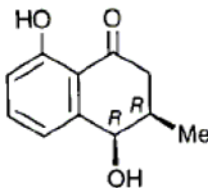
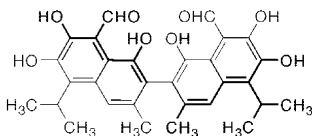
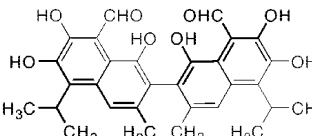
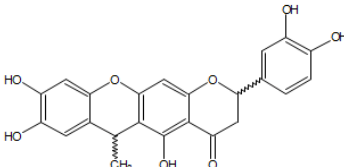
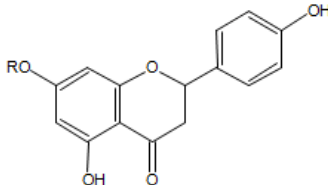
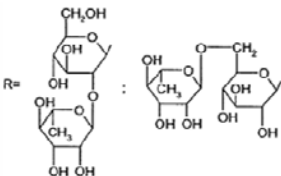
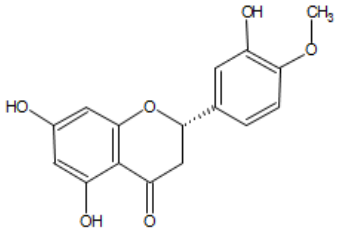
Técnica	Matriz	Substância	Referência
CLAE-DAD-DC-RMN-EM	Extratos das raízes de <i>Habropetalum dawei</i> (Dioncophyllaceae)	Dioncofilina + oito alcalóides	BRINGMANN et al., 1999
			
CLAE-DAD-DC-MS-RMN	Extratos ramos (folhas + flores) de <i>Thespesia danis</i> (Malvaceae)	Gossipóis	SPROGOE et al., 2008.
		 (Sa)	
		 (Ra)	
CLAE-UV-DC	Extrato das partes aéreas de <i>Dracocephalum rupestre</i> (Lamiaceae)	Flavanonas	REN et al., 2007.
			
CLAE-UV-DC	Extratos de toranja	Flavanonas	CACCAMESE; MANNA; SCIVOLI, 2003.
		 	

Tabela 2 (Continuação). Substâncias naturais identificadas por DC acoplado em série com outros detectores por CLAE em extratos vegetais.

CLAE-DAD-DC	Preparos de cascas de <i>Citrus unshiu</i> e <i>C. reticulata</i> (Rutaceae)	Flavanonas	UCHIYAMA et al. 2005
			

A determinação dos enantiômeros de catequinas tem sido feita usando-se CLAE com colunas quirais, mas com detectores aquirais como: detector eletroquímico, de fluorescência e no UV (COOPER et al., 2007; ITO et al., 2003; YANG, ARAI, KUSU, 2000). Além disso, nenhum artigo reporta a separação simultânea dos quatro diastereômeros das catequinas. Foram reportadas separações envolvendo apenas um único par de enantiômeros em cada corrida, sendo necessárias duas corridas cromatográficas para a determinação dos quatro diastereômeros.

A identificação de enantiômeros por CLAE com detectores não quirais é realizada pela comparação do t_R dos analitos com os de padrões. Para a identificação inequívoca, é necessária alta resolução entre os enantiômeros.

Nesse contexto, o acoplamento CLAE-DAD-DC fornece maior segurança na identificação dessas moléculas mesmo com baixa resolução. Com o DAD é possível conhecer a classe dos metabólitos pela análise dos espectros UV; com o DC é possível estabelecer a estereoquímica absoluta pela análise de seus espectros de DC, permitindo assim a identificação de cada diastereômero da catequina numa única corrida cromatográfica.

Diante da complexidade dos extratos vegetais e da importância em se investigar a presença de enantiômeros de moléculas naturais quirais, este trabalho teve como objetivo utilizar o acoplamento CLAE-DAD-DC para determinação, rápida e eficiente, de enantiômeros da catequina e epicatequina em extratos e infusões de plantas medicinais consumidos pela população.

As espécies selecionadas para esse estudo foram as do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae), pois são amplamente consumidas pela população na forma de infusões e possuem resultados científicos promissores quanto às atividades farmacológicas.

1.5. O gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae)

A família Malpighiaceae compreende aproximadamente 60 gêneros e 1200 espécies, 50% delas no Brasil. Sua distribuição geográfica é pantropical, com concentração na América do Sul. São árvores, arbustos ou trepadeiras simples. Seu uso econômico se dá como frutos comestíveis, ornamental ou como ingrediente chave em misturas alucinógenas desenvolvidas por tribos indígenas na Amazônia (HEYWOOD, 1993). É o caso do gênero *Banisteriopsis*, cujas espécies são empregadas em rituais indígenas, e cujo efeito alucinógeno está relacionado com a presença de alcalóides carbolínicos (GHOSAL, 1972). Os gêneros mais importantes da América meridional são *Malpighia* e *Byrsonima* (JOLY, 1977 apud RODRIGUES, 2007).¹

As espécies do gênero *Byrsonima* são popularmente conhecidas como “murici-vermelho” ou “murici-cascudo” e são encontradas no Brasil em fisionomias campestres de cerrado (PEIXOTO, 2002).

No Brasil, plantas do gênero *Byrsonima* são usadas para fins medicinais, geralmente como chás, no tratamento de úlceras gástricas, inflamação, infecções de pele, febre, asma (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; SILVA et al., 2001; HEINRICH; RIMPLER; BARRERA, 1992) e também como fonte alimentícia no preparo de sucos, geléias e licores, principalmente na região Norte e Nordeste (PEIXOTO, 2002).

Espécies de *Byrsonima* possuem atividades farmacológicas cientificamente comprovadas tais como: antiúlcera (SANNOMIYA et al., 2005a), mutagênica (CARDOSO et al., 2006; LIRA et al., 2008; SANNOMIYA et al., 2007) e antimicrobiana (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1999; SANNOMIYA et al., 2005b).

Estudos químicos dessas espécies revelaram a presença de ácido gálico, ácido galoilquínico, catequinas, galocatequinas, taninos condensados, flavonóis e flavonas (LIRA et al., 2008; SANNOMIYA et al., 2007; AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; SANNOMIYA et al., 2005a; SANNOMIYA et al., 2005b; GEISS et al., 1995).

Apesar do vasto uso popular de plantas do gênero *Byrsonima* como medicamento, encontram-se poucos estudos sobre a composição química e praticamente nenhum estudo sobre a presença de enantiômeros de moléculas naturais quirais produzidas por essas espécies. Isso motivou o estudo da determinação de enantiômeros de catequinas em extratos e infusões das folhas de *Byrsonima basiloba*, *B.*

¹ JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 4. ed. São Paulo: Nacional, 1977. 778 p.

coccolobifolia, *B. crassa*, *B. intermedia* e *B. verbascifolia* (Figura 11) por CLAE-DAD-DC.



Figura 11. *Byrsonima intermedia*: foto representativa de plantas do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae).
Fonte: Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro, Instituto de Biologia da Unicamp

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Contribuir para aumentar o conhecimento sobre a composição química de espécies vegetais da biodiversidade brasileira.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o uso do acoplamento CLAE-DAD-DC para investigações de substâncias quirais em matrizes complexas;
- Desenvolver métodos para determinar quali e quantitativamente enantiômeros da catequina e epicatequina em extratos e infusões de folhas de espécies do gênero *Byrsonima*;
- Aprofundar o conhecimento sobre a constituição química de espécies do gênero *Byrsonima*;
- Contribuir para o controle de qualidade de fitoterápicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes utilizados

3.1.1. Solventes grau analítico

- Clorofórmio (CHCl_3), Synthlab[®];
- Metanol (MeOH), Synthlab[®];

3.1.2. Solventes grau HPLC

- Acetonitrila (ACN), Tedia[®];
- Ácido trifluoroacético (TFA), Tedia[®];
- *terc*-Butanol (*t*- BuOH), Tedia[®];
- Etanol (EtOH), Tedia[®];
- *n*-Hexano (*n*-Hex), Tedia[®];
- Metanol (MeOH), Tedia[®];
- Propan-2-ol (2- PrOH), Tedia[®];
- Água purificada em sistema Milli-Q (H_2O), Millipore[®].

3.1.3. Padrões

Os padrões utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich[®]:

- Catequina (98 %, 10 mg, Ref. C1251, Lote 036K1604);
- *ent*-Catequina (98 %, 1 mg, Ref. C0567, Lote 066K1088);
- Epicatequina (98 %, 10 mg, Ref. E1753, Lote 026K2611);
- *ent*-Epicatequina (98 %, 1 mg, Ref. E4018, Lote 100K1673).

3.2. Materiais

- Cartuchos de extração em fase sólida (SPE):
 - a) cartucho de fase normal Classic SiO₂ (500 mg, 6 mL, Waters[®]);
 - b) cartucho de fase polimérica Oasis HLB (poliestirenovinilpirrolidol, 150 mg, 10 mL, Waters[®]);
 - c) cartucho de fase reversa C₁₈ (500 mg, 6 mL, 19 % de carbono, Supelco[®]);
 - d) cartucho de fase reversa Strata C₁₈ (500 mg, 6 mL, 17,5 % de carbono, Phenomenex[®]).
- Microfiltro de polipropileno GHP (25 mm, 0,45 µm, Waters[®]).

3.3. Instrumentação

- Balança analítica (Bioprecisa[®]) com capacidade de 200 g e precisão de 0,0001 g, modelo FA2104N;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Jasco[®], CLAE-DAD-DC):
 - a) Bomba de quatro canais e degaseificador *on-line*, modelo PU-2089;
 - b) Detector de arranjo de fotodiodos (DAD), modelo MD-2010;
 - c) Detector de dicroísmo circular (DC), modelo CD-2095;
 - d) Injetor automático com estante para 50 amostras, modelo, AS-2055.
- Coluna analítica (Phenomenex[®]) de C₁₈ (250 x 4,6 mm, 4 µm) e pré-coluna (4 x 3 mm, 5 µm), modelo Synergi Hydro (fase reversa);
- Coluna analítica (Diacel[®]), de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-diclorofenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5 µm), modelo Chiralcel IC (fase normal);
- Coluna analítica (Diacel[®]), de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5 µm), modelo Chiralcel OD-RH (fase reversa);

- Coluna analítica (Diacel[®]), de sílica encapada com celulose ligada a 3,5-dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5µm), modelo Chiralcel OD-H (fase normal);
- Evaporador centrífugo a vácuo (Labconco[®]);
- Micropipetas de alta precisão (Gilson[®]) com faixa de transferência de volume compreendida entre 2 e 1000 µL; modelos P20, P200 e P1000;
- Purificador de água (Millipore[®]), modelo Direct-QTM.

3.4. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas das espécies foram coletadas por diferentes especialistas:

- *Byrsonima crassa* e *B. verbascifolia*: coletadas por Cristiano Borges Pereira e autenticadas pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos da Universidade do Tocantins (Palmas-TO);
- *B. basiloba* e *B. intermedia*: coletadas pelo Dr. Luis Fernando R. de Almeida e autenticadas por José Clemente Campos do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu-SP;
- *B. cocolobifolia*: coletada e autenticadas pelo Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do Instituto de Biologia da Unicamp.

As folhas foram coletadas de espécies adultas, secas em estufa a 30 °C. Após secas, as folhas foram moídas em moinho de facas e guardadas em local seco e protegido da luz a temperatura ambiente.

Os dados de coleta de cada espécie estudada estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3. Coletas das espécies de *Byrsonima*.

Espécies	Local (cidade-estado)	Data (mês/ano)	Voucher
<i>B. basiloba</i>	Pratânia-SP	12/2005	24163 (BOTU) ^a
<i>B. cocolobifolia</i>	Itirapina-SP	02/2006	1397 (UEC) ^b
<i>B. crassa</i>	Porto Nacional-TO	12/2005	6398 (HUTO) ^c
<i>B. intermedia</i>	Pratânia-SP	01/2006	24164 (BOTU) ^a
<i>B. verbascifolia</i>	Porto Nacional-TO	12/2007	481 (HUTO) ^c

^a Herbário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”^b Herbário da Universidade Estadual de Campinas^c Herbário da Universidade do Tocantins

3.5. Condições cromatográficas

- As análises das frações provenientes da avaliação da seletividade dos cartuchos de SPE foram realizadas por CLAE [coluna Synergi Hydro; 25°C; (Solvente A: 0,1% TFA, Solvente B: ACN 0,1% TFA) 0 a 100% de B em 60 min; vazão 1 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; DAD (254 nm)].

- As análises dos padrões, extratos e infusões foram realizadas por CLAE [coluna Chiralcel OD-H; 25°C; *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v) 0,1% TFA; vazão 0,5 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; DAD (220 nm); DC (280 nm)].

Os parâmetros cromatográficos (volume morto, V_0 ; tempo morto, t_0 ; fator de retenção, k ; fator de separação, α ; resolução, R_s) foram calculados segundo Snyder, Kirkland e Glajch (1997; Equação 2) usando os sinais obtidos pelo DAD.

$$V_0 \text{ (volume morto)} = 0,5.L.d^2$$

$$\alpha \text{ (fator de separação)} = \frac{k_2}{k_1}$$

$$t_0 \text{ (tempo morto)} = \frac{V_0}{F}$$

$$R_s \text{ (resolução)} = 1,177 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W^{1/2}_2 + W^{1/2}_1}$$

$$k \text{ (fator de retenção)} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

L = comprimento da coluna
d = diâmetro da coluna
F = vazão da fase móvel
W^{1/2} = largura do pico a meia altura

Equação 2. Cálculos dos parâmetros cromatográficos.

3.6. Soluções padrão

- Ensaios de linearidade, recuperação (exatidão), construção da curva analítica e avaliação de epimerização: 5,0 mg de catequina e epicatequina foram transferidos para balão volumétrico acrescido com 2,5 mL de EtOH (grau HPLC) acidificados com 0,1% de TFA (pH 4). O volume foi ajustado para 5 mL com *n*-Hex (grau HPLC) também acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), obtendo-se a solução de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições foram efetuadas a partir da solução inicial;

- Ensaio de repetibilidade (precisão): 1,0 mg de cada padrão de catequina, *ent*-catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina foram transferidos para balão volumétrico acrescido com 0,5 mL de EtOH (grau HPLC) acidificados com 0,1% de TFA. O volume foi ajustado para 1 mL com *n*-Hex (grau HPLC) também acidificado com 0,1% de TFA, obtendo-se a solução de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diluições foram efetuadas a partir da solução inicial.

Todas as soluções foram armazenadas em geladeira a 4°C e protegidas da luz até serem utilizadas e filtradas em microfiltro de polipropileno GHP (0,45 μm de poro e 25 mm de diâmetro) antes de serem injetadas no cromatógrafo.

3.7. Construção das curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas a partir da solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de catequina e epicatequina.

Alíquotas foram retiradas da solução estoque com micropipetas de alta precisão e diluídas em balões volumétricos de 5 mL. Os volumes retirados foram de 5, 10, 25, 50, 100, 250, e 500 μL para as concentrações de 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o preparo da solução com concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, alíquota de 25 μL foi retirada da solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e diluída em balão volumétrico de 5 mL.

Cada uma das soluções de 0,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada em triplicata, filtradas em microfiltro de polipropileno GHP (0,45 μm ; 25 mm) e injetadas em quintuplicata no cromatógrafo.

As áreas foram obtidas a partir da integração dos picos obtidos pelo DAD (220 nm).

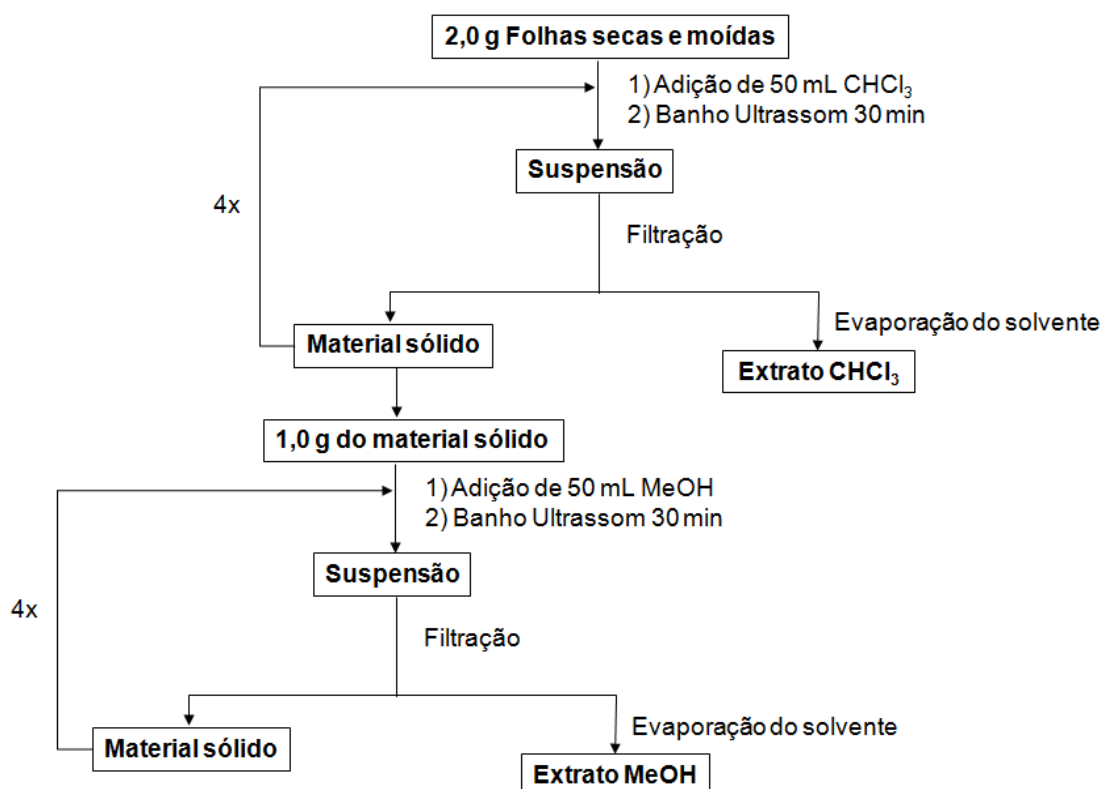
Os valores das áreas foram submetidos ao Teste de Huber (baseado na rejeição de valores anômalos em relação a medianas), com $k = 2$ (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO, 2003).

Os valores não rejeitados foram usados para a construção de três curvas analíticas.

3.8. Preparação das amostras

3.8.1. Extrato metanólico (EMeOH)

O pó das folhas secas (2,0 g) das espécies de *Byrsonima* foi extraído com auxílio de ultrassom durante 30 min com CHCl_3 (50 mL, para remoção de substâncias lipofílicas) e filtrado em papel de filtro. Após a filtração, 1,0 g do material sólido resultante foi extraído com auxílio de ultrassom durante 30 min com 50 mL de MeOH. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro, e o filtrado seco em capela originou o extrato metanólico (Esquema 1).

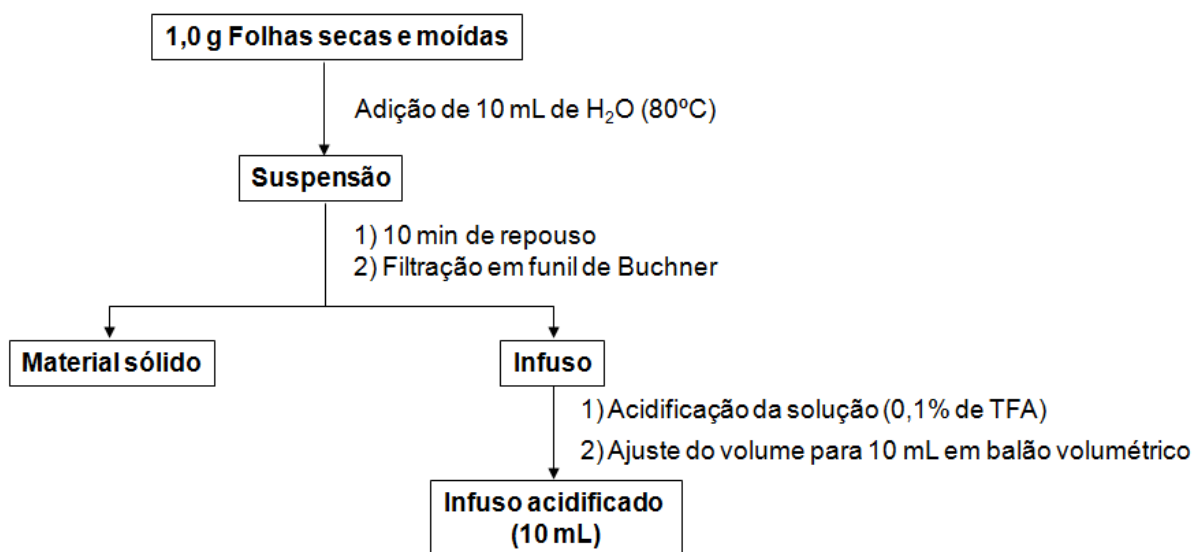


Esquema 1. Fluxograma de preparação dos EMeOH das folhas das espécies de *Byrsonima*.

3.8.2. Infusão

As infusões foram preparadas utilizando procedimento de extração que simula as condições reais de preparo de chás pela população: 1,0 g de pó de folhas secas foi imerso em 10 mL de H₂O a 80 °C e mantido por 10 min.

Cada amostra foi filtrada com papel de filtro e o volume final ajustado em balão volumétrico de 10 mL. A solução foi acidificada para pH 4 com TFA (Esquema 2).



Esquema 2. Fluxograma de preparação das infusões das folhas das espécies de *Byrsonima*.

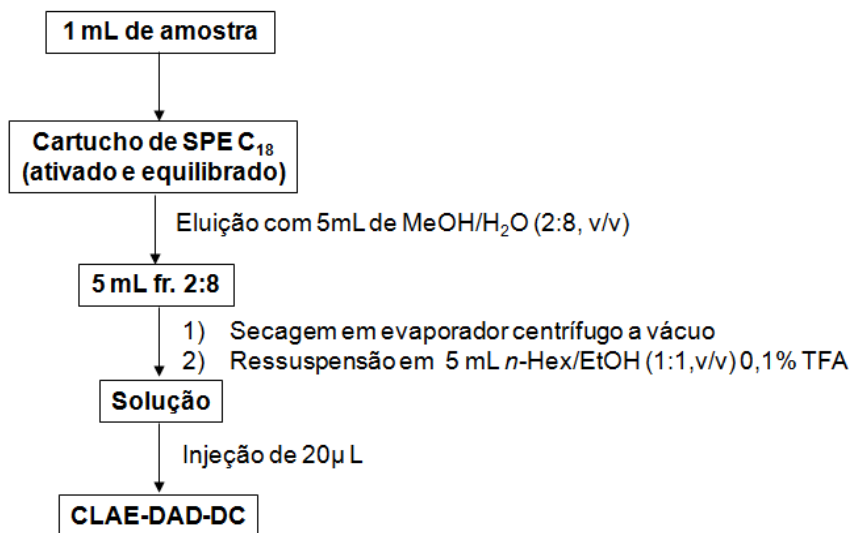
3.8.3. Procedimento de *Clean-up*

Para a remoção de interferentes foi realizado *clean-up* por extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos de C₁₈ Strata Phenomenex[®], previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de H₂O.

20,0 mg de cada EMeOH foram dissolvidos em 1,0 mL da mistura MeOH/H₂O (2:8, v/v) acidificada com 0,1% de TFA (pH 4). 1 mL dessa solução foi aplicada no cartucho SPE e eluída com 5 mL de MeOH/H₂O (2:8, v/v) e posteriormente secas em evaporador centrífugo a vácuo (30 °C). Após a secagem, as amostras foram ressuspendidas em *n*-Hex/EtOH (1:1, v/v, pH 4) e o volume ajustado em balão volumétrico de 5 mL. As amostras foram filtradas em microfiltro de polipropileno GHP. Esse *clean-up* foi realizado em triplicata.

Alíquotas de 20 μL provenientes de cada replicata foram analisadas em triplicata por CLAE-DAD (Esquema 3).

O mesmo procedimento foi realizado para as infusões.



Esquema 3. Fluxograma do *clean-up* por SPE dos EMeOH e infusões das folhas das espécies de *Byrsonima*.

3.9. Identificação e quantificação

A identificação das substâncias foi feita por comparação de seus tempos de retenção (t_R), espectros no UV e DC com os obtidos para os padrões.

A quantificação dos analitos foi feita pelo método de calibração externa: a quantidade dos analitos em cada amostra foi determinada pela medição das áreas dos picos e comparando-as com aquelas obtidas para as soluções de referência de epicatequina e catequina. A *ent*-epicatequina identificada nas amostras foi quantificada usando a curva analítica do seu enantiômero (epicatequina), uma vez que no DAD as respostas para enantiômeros são semelhantes, pois ambos apresentam a mesma absortividade molar (ϵ).

4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Separação e identificação dos enantiômeros

O primeiro passo para o desenvolvimento da metodologia para CLAE-DAD-DC foi a escolha do método de análise quiral a ser utilizado.

Métodos de derivação indireta demandam tempo e são limitados, além de provocarem modificações nas estruturas das moléculas ocasionando alterações em suas características físicas e químicas, o que pode induzir a erros na determinação da configuração absoluta (YÁÑEZ; ANDREWS; DAVIES, 2007).

Alguns métodos utilizam eletroforese capilar com β -ciclodextrina como aditivo quiral para análises de enantiômeros de catequinas (VALLS et al., 2009; KOFINF, PAPAGIANNOPOULOS, GALENSA, 2007a; KOFINF, PAPAGIANNOPOULOS, GALENSA, 2007b; GOTTI et al., 2006). Porém, esses métodos não permitem a transposição para análises em escala preparativa, o que impossibilita a obtenção de enantiômeros purificados que possam ser utilizados para realização de ensaios biológicos. Esse é um fator limitante para a escolha da técnica, principalmente em estudos de bioprospecção.

A β -ciclodextrina possui baixa solubilidade em solventes orgânicos, o que é um sério inconveniente para a análise de substâncias de média polaridade como as catequinas.

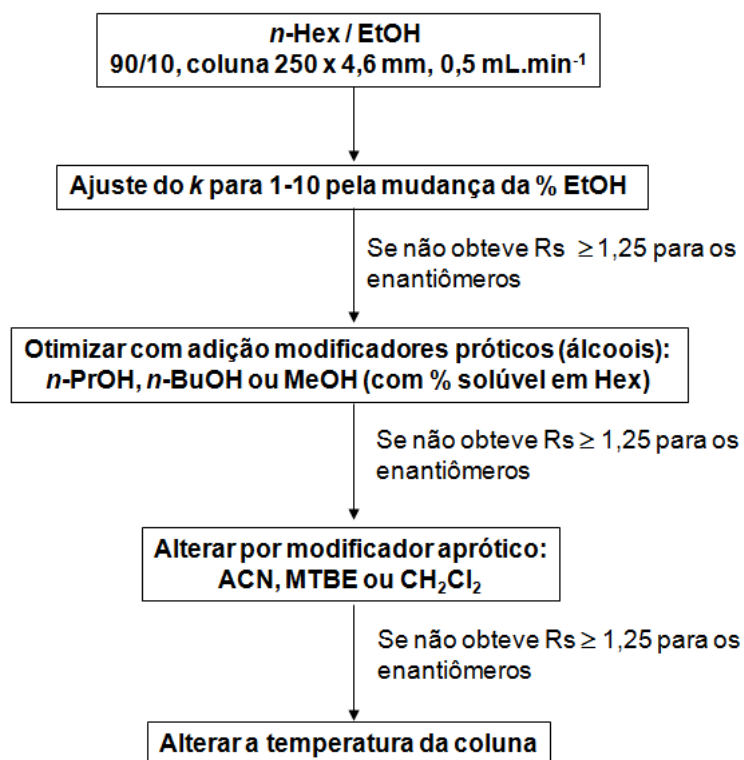
Devido a esse fato, o método escolhido foi o método direto com a utilização de coluna quiral.

As catequinas são substâncias de média e alta polaridade com grupos aromáticos hidroxilados. Para análise desse tipo de metabólito secundário, o tipo de fase estacionária quiral recomendada e com ampla aplicação na literatura é o de polímeros de carboidratos. Dentre as colunas à base de polímeros de carboidratos, aquelas que podem ser usadas para análise de uma ampla faixa de tipos de analitos são as de celulose (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

Para avaliar a separação simultânea das catequinas, foram utilizadas soluções contendo os quatro diastereômeros em concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Iniciaram-se os estudos pela avaliação da fase estacionária quiral. A primeira coluna testada foi a Chiralcel OD-H [fase normal, celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)].

A otimização do método cromatográfico foi realizada segundo estratégia descrita por Snyder, Kirkland e Glajch (1997; Esquema 4).



Esquema 4. Estratégia para otimização de métodos cromatográficos quirais com colunas Chiralcel OD.

Inicialmente utilizou-se um sistema isocrático de *n*-Hex/EtOH (90:10 v/v, Esquema 4). Porém, esta mistura não possuiu força de eluição suficiente para superar a força de interação entre as catequinas e a fase estacionária, provocando assim a retenção das substâncias na coluna.

Foram testadas outras misturas como eluentes com aumento da porcentagem do solvente com maior força de eluição em fase normal (EtOH) a fim de ajustar o coeficiente *k* dos analitos na faixa entre $1 < k < 10$. A mistura *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v) foi a que apresentou valores de *k* dentro da faixa desejada.

Apesar de os enantiômeros da epicatequina apresentarem *R*_s > 1,25, os enantiômeros da catequina não apresentaram boa separação. Foram testados outros modificadores próticos (2-PrOH e *t*-BuOH), porém apresentaram valores de resolução menores ou iguais aos já obtidos com a mistura *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v).

Devido à dificuldade na separação dos enantiômeros da catequina, outras colunas quirais foram avaliadas com os seguintes sistemas:

1. Coluna Chiralcel OD-RH [250 x 4,6 mm, 5 μ m; fase reversa; celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)]: H₂O, MeOH, 2-PrOH e ACN em diversas proporções e vazões;
2. Coluna Chiralpak IC [250 x 4,6 mm, 5 μ m; fase normal, celulose tris-(3,5-diclorofenilcarbamato)]: *n*-Hex, EtOH, 2-PrOH e *t*-BuOH em diversas proporções e vazões;

Com as colunas 1 e 2 não foi possível obter resoluções satisfatórias entre os enantiômeros, havendo coeluição dos picos do par enantiomérico catequina e *ent*-catequina. Os melhores resultados obtidos para as colunas testadas estão apresentados na Figura 12.

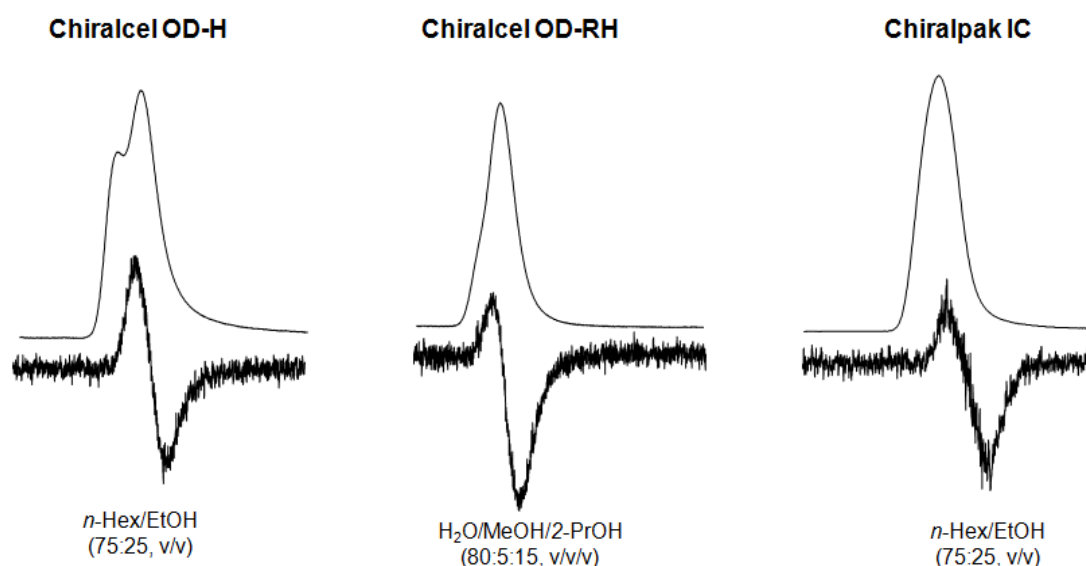


Figura 12. Separação obtida por CLAE entre os enantiômeros *ent*-catequina e catequina nas colunas avaliadas. [25°C; DAD (220 nm); DC (280 nm); vazão 0,5 mL min⁻¹].

Em fases móveis acidificadas ocorre protonação dos grupos silanóis residuais da fase estacionária (C₈, C₁₈, sílica etc) diminuindo fortes interações (p.e. ligações de hidrogênio) com os analitos, em especial analitos hidroxilados, como as catequinas. Essas fortes interações podem gerar alargamento dos picos e consequentemente possível coeluição.

Tang (1996) realizou estudos sobre a influência de ácidos em colunas quirais encapadas com celulose e constatou que o TFA (pH 4) apresentou os melhores

resultados para a separação de enantiômeros de drogas quirais. Portanto, para as análises das catequinas, o pH da fase móvel foi ajustado para 4 com a adição 0,1 % de TFA na fase móvel.

A acidificação da fase móvel com TFA provocou aumento na resolução dos enantiômeros da epicatequina e catequina em todos os sistemas testados.

Os melhores resultados foram obtidos com a coluna Chiralcel OD-H (Figura 13). Esses resultados estão de acordo com a literatura, que reporta que a coluna Chiralcel OD-H (fase normal) é a que apresenta a melhor retenção, seletividade e resolução em análises de enantiômeros de flavonóides (YÁÑEZ; ANDREWS; DAVIES, 2007; CACCAMESE et al. 2005).

Para análises por CLAE-DAD-DC utilizando a coluna Chiralcel OD-H, a fase móvel *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v) permitiu obter R_s satisfatórias entre os enantiômeros de catequina ($R_s = 0,8$) e epicatequina ($R_s = 5,0$) em menor tempo de análise (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos da separação dos enantiômeros *ent*-catequina (1)/catequina (2) e epicatequina (3)/*ent*- epicatequina (4) na coluna Chiralcel OD-H.

Fase móvel	Catequina				Epicatequina			
	k_1^a	k_2^a	$\alpha_{1,2}^a$	$R_{s1,2}^a$	k_3^a	k_4^a	$\alpha_{3,4}^a$	$R_{s3,4}^a$
<i>n</i> -Hex/2-PrOH ^b	1,74	2,21	1,27	0,6	5,25	7,50	1,43	1,3
<i>n</i> -Hex/ <i>t</i> -BuOH ^c	2,50	2,82	1,13	0,8	5,26	10,9	2,07	5,2
<i>n</i> -Hex/EtOH ^d	1,46	1,67	1,14	0,8	3,16	6,61	2,09	5,0

^a k é o fator de retenção para $V_0 = 2,64$ mL e $t_0 = 5,28$ min; α é o fator de separação; R_s é a resolução;

^b *n*-Hex/2-PrOH: *n*-hexano/propan-2-ol (75:25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA;

^c *n*-Hex/*t*-BuOH: *n*-hexano/*t*-butanol (60:40, v/v) acidificado com 0,1% de TFA.

^d *n*-Hex/EtOH: *n*-hexano/etanol (75:25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA;

É importante ressaltar que as análises foram monitoradas com DAD em $\lambda = 220$ nm devido à maior sensibilidade das catequinas nesse comprimento de onda e, com o DC em $\lambda = 280$ que permite melhor diferenciação entre os enantiômeros da catequina e epicatequina.

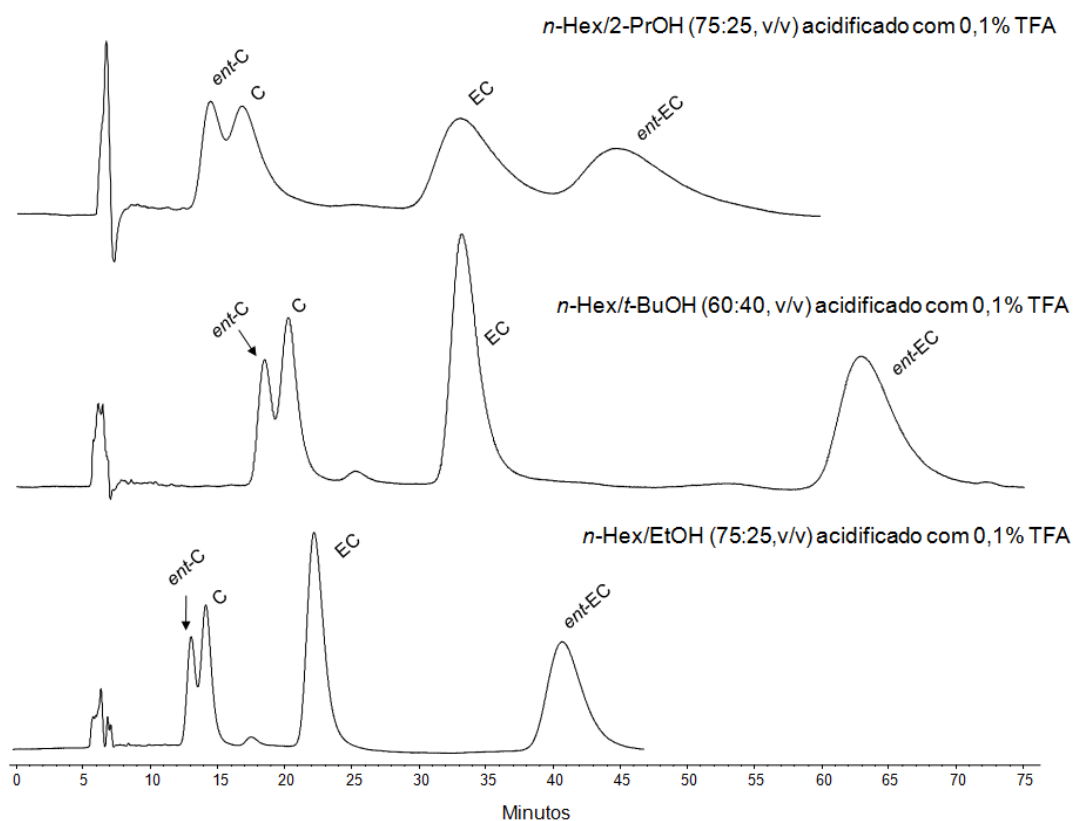


Figura 13. Cromatogramas da separação dos enantiômeros da catequina (C) e epicatequina (EC) com diferentes fases móveis. [Coluna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm); 25°C; DAD (220 nm), vazão 0,5 mL min⁻¹].

As catequinas possuem dois cromóforos aromáticos, chamados de anel A e B, com bandas de absorção em 280 nm (transição ¹L_b) e 240 nm (transição ¹L_a, Figura 14, KORVER, WILKINS, 1971).

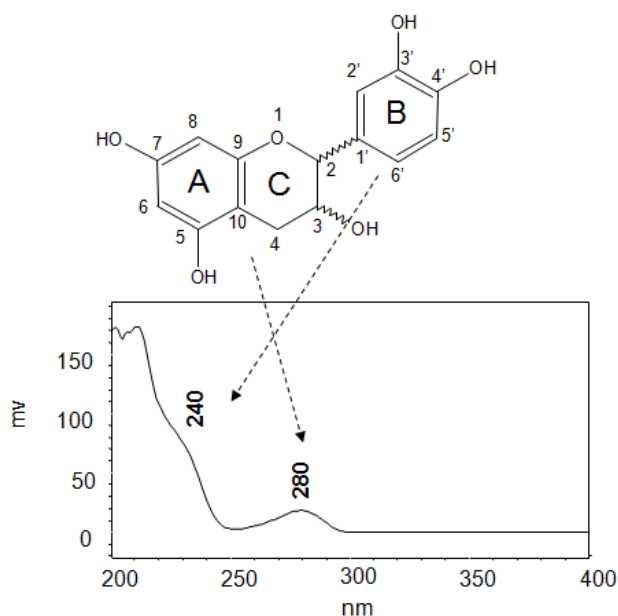


Figura 14. Espectro UV característico de catequinas.

De acordo com Snatzke, Kajta' R e Snatzke (1973), o cromóforo anel-A é a primeira esfera quiral; o heterociclo anel-C forma a segunda esfera; o cromóforo anel-B e o substituinte do C-3 formam a terceira esfera quiral.

O anel-C (segunda esfera) é mais próximo do cromóforo anel-A (primeira esfera) e, portanto, determina não apenas o sinal do efeito Cotton dentro de cada banda de absorção, mas também a magnitude desses efeitos. O sinal do efeito Cotton do cromóforo anel-A é determinado pela quiralidade do heterociclo anel-C, tendo uma menor influência na configuração absoluta do C-3 e maior influência na configuração do C-2 (CLARK-LEWIS, 1968). Os dados de DC indicam que as configurações *2R* e *2S* provocam efeito Cotton negativo e positivo, respectivamente, para o cromóforo anel-A (transição 1L_b).

Já o efeito Cotton do cromóforo anel-B é determinado pela configuração absoluta do C-3. Para a transição 1L_a (cromóforo anel-B), CE negativo e positivo caracterizam configurações *3S* e *3R*, respectivamente (REINIER et al., 1999; SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005). Exceções a essa regra ocorrem quando o anel-A é desprovido de hidroxilação (VAN RENSBURG et al., 1999).

É importante salientar que, dependendo do solvente utilizado, os espectros de DC podem apresentar bandas de absorção em comprimentos de ondas diferentes. Neste trabalho, os espectros de DC dos enantiômeros da catequina e epicatequina foram obtidos utilizando *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v) como solvente e, os efeitos Cotton foram observados em 227 e 280 nm para catequina/*ent*-catequina e 240/280 nm para epicatequina/*ent*-epicatequina (Figura 15). Os mesmos efeitos são observados quando são utilizados como solventes MeOH ou EtOH (KORVER, WILKINS, 1971).

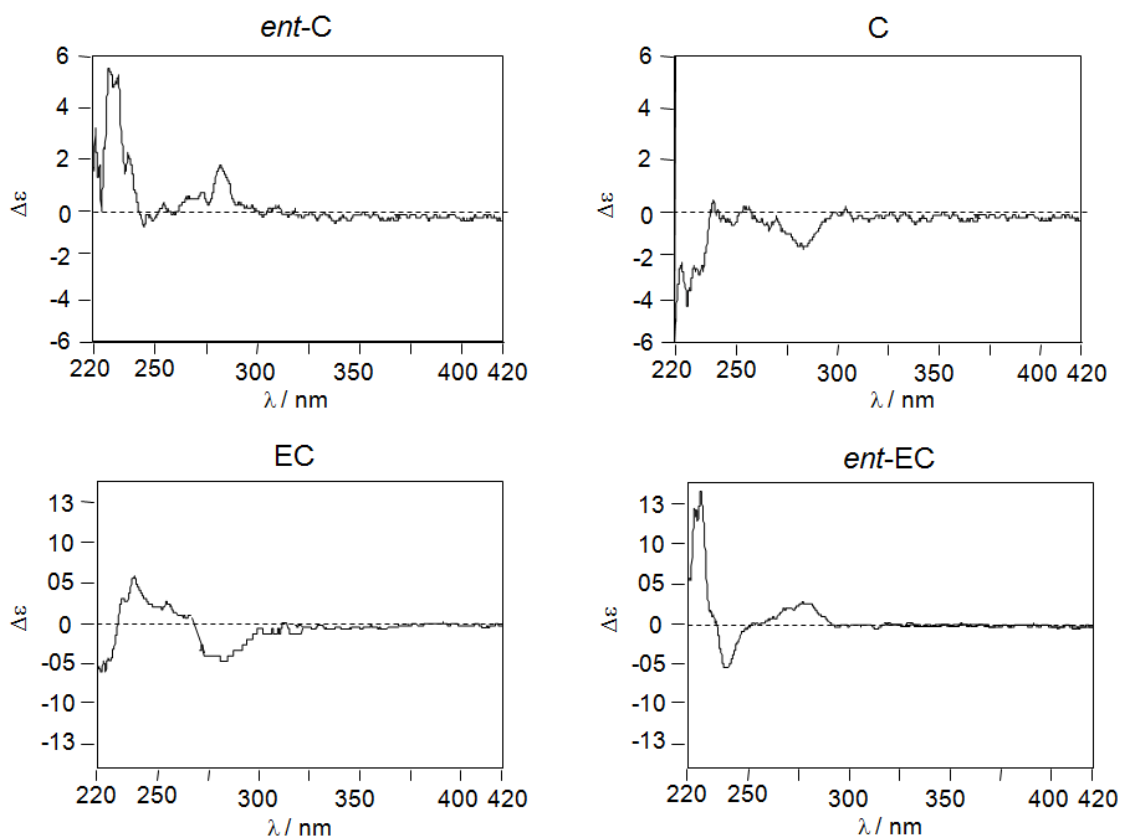


Figura 15. Espectros de DC da *ent*-catequina (*ent*-C), catequina (C), epicatequina (EC) e *ent*-epicatequina (*ent*-EC).

Embora a R_s entre os enantiômeros da catequina esteja abaixo do valor ótimo de 1,25, é possível identificar inequivocamente cada um deles nos cromatogramas pela análise dos espectros UV e DC. Assim, foi possível estabelecer a ordem de eluição dos enantiômeros da catequina e epicatequina nas condições testadas como: *ent*-catequina ($t_R = 13,0$ min), catequina ($t_R = 14,1$ min), epicatequina ($t_R = 22,0$ min) e *ent*-epicatequina ($t_R = 40,2$ min; Figura 16).

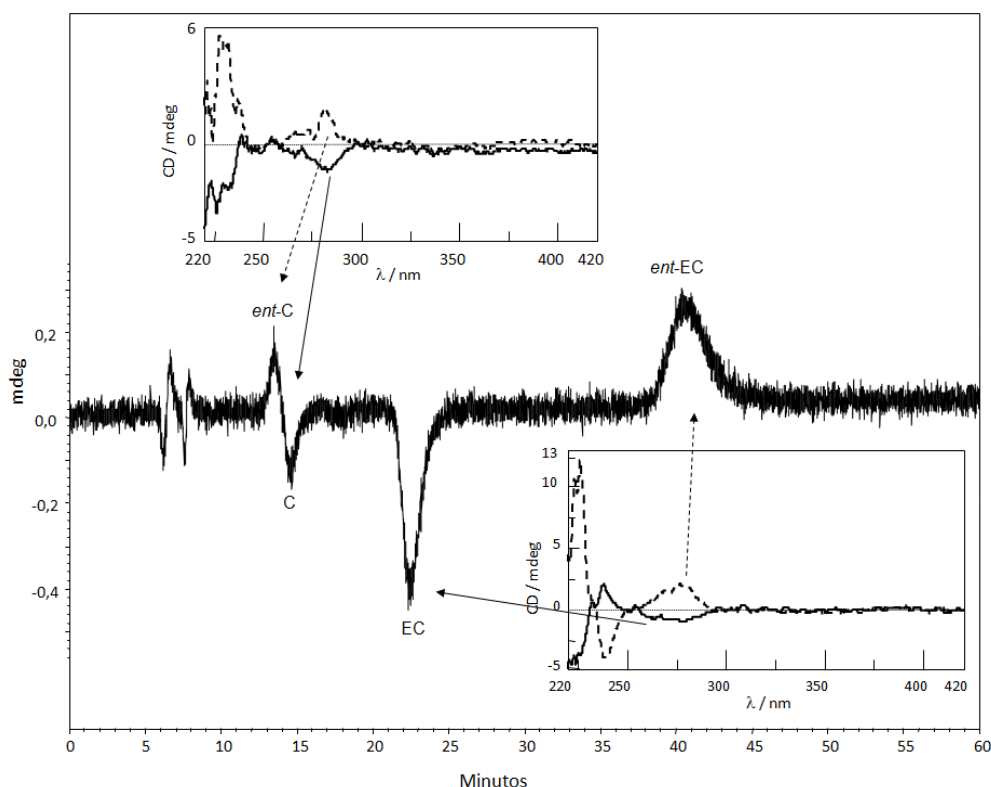


Figura 16. Cromatograma da separação dos enantiômeros da catequina (C) e epicatequina (EC) e seus respectivos espectros de DC. [Coluna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm, 5 μ m), *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), 25°C; DC (280 nm), vazão 0,5 mL min⁻¹].

4.2. Avaliação da seletividade do *Clean-up*

Para minimizar custos e maximizar resultados da análise, o uso da extração por fase sólida (SPE) permite a caracterização física de um extrato ou da eliminação de possíveis interferentes na etapa de avaliação cromatográfica (CANNELL, 1998).

Nesta etapa, utilizou-se o sistema CLAE em fase reversa para analisar as frações provenientes dos cartuchos avaliados. Nos cromatogramas foram observadas as classes de metabólitos presentes em cada fração pelo espectro UV de cada pico.

O objetivo desse estudo foi escolher o cartucho que apresenta melhor seletividade, ou seja, capacidade de separar as catequinas dos outros metabólitos presentes nos extraos e infusões das folhas de espécies de *Byrsonima*. Para a realização dos testes, foram avaliados três tipos de cartuchos diferentes:

1. de fase normal (sílica) e solventes orgânicos de baixa polaridade;
2. de fase reversa (C₁₈) com solventes orgânicos de alta polaridade e água;
3. de fase reversa polimérica (poliestirenovinilpirrolidol).

O primeiro cartucho avaliado foi o de fase normal (SiO_2), o qual foi previamente condicionado com 5 mL de *n*-Hex. As amostras (EMeOH e infusões) foram ressuspensas em 1 mL de *n*-Hex/EtOH acidificado com TFA (pH 4) e aplicadas sobre os cartuchos. Foram coletadas três frações eluídas com: 5 mL de *n*-Hex (Fr1); 5 mL da mistura de *n*-Hex/EtOH 1:1 (Fr2) e 5 mL de EtOH (Fr3). As frações foram secas, ressuspensas em MeOH/ H_2O (2:8, v/v) e analisadas por CLAE-DAD.

Para os testes em fase reversa (C_{18}), utilizaram-se cartuchos de 2 marcas diferentes, Strata Phenomenex[®] e Supelco[®]. Os cartuchos foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e em seguida condicionados com 5 mL de H_2O . Aliquotas de 1 mL das amostras foram ressuspensas em MeOH/ H_2O (2:8, pH 4) e aplicadas em cada um dos cartuchos. De cada amostra foram obtidas três frações eluídas com: 5 mL de MeOH/ H_2O (2:8, v/v, Fr1); 5 mL de H_2O /MeOH (1:1, v/v, Fr2) e 5 mL de MeOH (Fr3). Aliquotas de 20 μL de cada fração foram analisadas por CLAE.

O cartucho de fase reversa polimérica utilizado foi o OASIS (Waters[®]), o qual foi previamente ativado com 5 mL de MeOH e em seguida condicionado com 5 mL de H_2O . O restante do procedimento foi semelhante ao desenvolvido para os cartuchos de fase reversa C_{18} .

Os procedimentos empregando cartuchos de fase normal e polimérica não foram seletivos para as catequinas em todos os extratos e infusões das espécies estudadas, pois as frações se mostravam misturadas com flavonóides em proporções equivalentes.

Os *clean-up* realizados com cartuchos de C_{18} permitiram obter frações enriquecidas com catequinas e derivados, quando eluídas com MeOH/ H_2O (2:8, v/v, Figura 17).

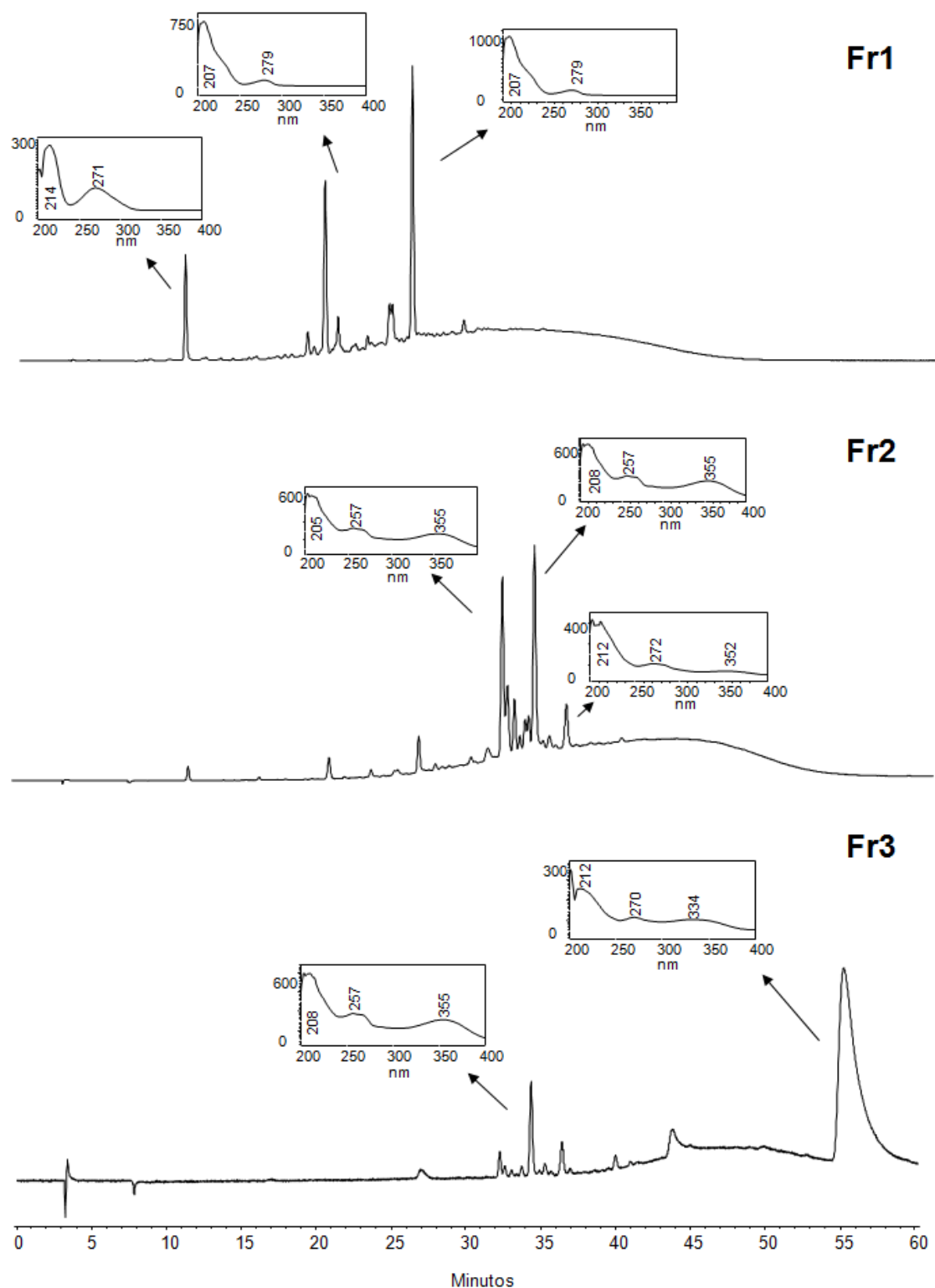


Figura 17. Cromatogramas representativos das frações do EMeOH das folhas de *B. crassa* provenientes do *clean-up* utilizando cartuchos SPE de C18. Fr1: MeOH/H₂O (2:8, v/v), Fr2: MeOH/H₂O (1:1, v/v), Fr3: MeOH. [Coluna Synergi Hydro (250 x 4,6 mm, 5µm), 0 a 100% de B em 60 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 25°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹].

4.3. Parâmetros avaliados

4.3.1. Linearidade e sensibilidade

Os valores das áreas dos picos nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, injetados em quintuplicatas (15 valores para cada concentração), foram submetidos ao Teste de Huber para a rejeição dos anômalos. Usando $k = 2$, houve a necessidade de rejeição dos 15 valores correspondentes às áreas dos picos de concentração 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ referentes à catequina e 18 valores, sendo 15 dos picos de concentração 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 3 dos picos de concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ referentes à epicatequina.

Os valores não rejeitados foram utilizados para a construção de três curvas analíticas de cada padrão (catequina e epicatequina). As áreas dos picos (resposta do detector, y) de cada substância foram relacionadas com sete concentrações: 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As melhores curvas apresentaram coeficientes de correlação (r^2) de 0,992 e 0,995 para a catequina e epicatequina, respectivamente (Tabela 5, Figura 18). Esses valores indicam boa relação linear da área do pico com a concentração, cujo valor mínimo recomendado pela ANVISA para análises de princípios ativos em matéria-prima vegetal é de 0,99 (AGÊNCIA..., 2009b).

É importante salientar que foram construídas curvas analíticas somente para catequina e epicatequina, pois seus enantiômeros correspondentes apresentam respostas similares no DAD.

A partir dos parâmetros extraídos das curvas analíticas foi possível determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema para a catequina e epicatequina, empregando as relações recomendadas pela IUPAC (CURRIE, 1999; Equação 3).

Os LDs e LQs obtidos para catequina (0,77 e 2,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e epicatequina (0,42 e 1,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$) indicam detectabilidade aceitável quando comparados com os de métodos descritos na literatura. Kofink e cols (2007) relatam LD = 5 e LQ = 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando eletroforese capilar com detecção no UV em análises de chocolates, enquanto Dias e cols (2010) relatam LD de 0,27-0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LQ de 0,91-1,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para catequina e epicatequina, respectivamente, utilizando CLAE com detecção por fluorescência em análises de vinhos.

Tabela 5. Parâmetros obtidos das curvas analíticas dos padrões de catequina e epicatequina.

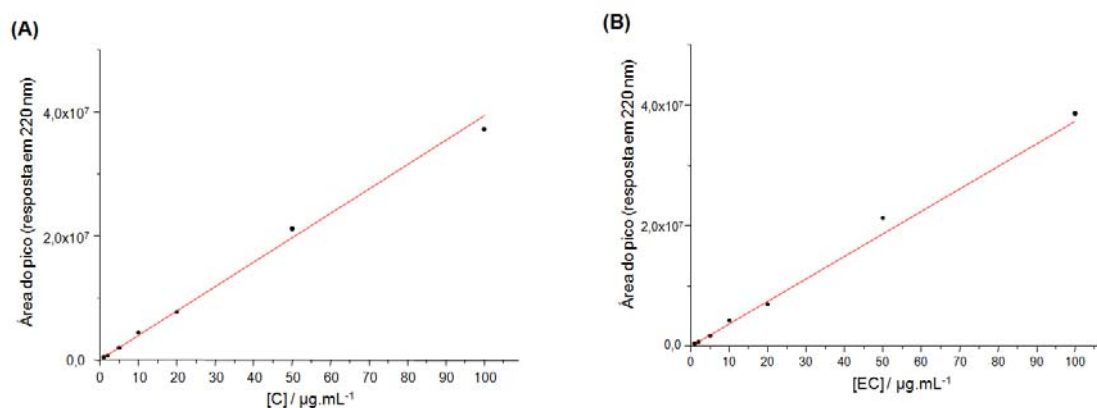
Substância	Faixa de linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da curva analítica ^a	LD ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fator de correlação (r^2)
C	2,32-100	$y = 3,9 \cdot 10^5 [C] + 6,6 \cdot 10^4$	0,77	2,32	0,992
EC	1,27-100	$y = 3,7 \cdot 10^5 [EC] - 1,9 \cdot 10^3$	0,42	1,27	0,995

^a Sete pontos ($n = 5$);^b LD= limite de detecção; LQ= limite de quantificação.

$$\text{LD} = \frac{\text{DPa} \cdot 3}{\text{IC}}$$

$$\text{LQ} = \frac{\text{DPa} \cdot 10}{\text{IC}}$$

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y de 3 curvas analíticas
 IC = inclinação da curva analítica

Equação 3. Cálculo do Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).**Figura 18.** Curva analítica da (A) catequina e (B) epicatequina.

4.3.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação do espectro no UV e espectro de DC de cada padrão com os dos picos obtidos pelas análises dos extratos e infusões das folhas de espécies de *Byrsonima*. Os espectros no UV e de DC foram obtidos na faixa de 200-400 nm e 220-420 nm, respectivamente.

Confirmações foram feitas pelo enriquecimento dos extratos e infusões com os padrões autênticos de catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina (Figura 19, pág. 66).

É possível observar que o efeito da matriz afetou acentuadamente o t_R da *ent*-epicatequina. Ela eluiu em menor tempo quando presente nos extratos e infusões que quando analisada somente com padrões ($t_R = 40,2$, Seção 4.1). Nos extratos e infusões das folhas das espécies de *B. crassa*, *B. intermedia*, *B. verbascifolia* a eluição da *ent*-epicatequina ocorreu em 35,0 min e na espécie *B. basiloba* 38,5 min.

Os extratos vegetais podem ter em suas composições uma variedade muito grande de moléculas. Embora se tenha feito um *clean-up* para a obtenção de frações livre de interferentes, estas podem apresentar substâncias não detectadas nas análises realizadas por CLAE-DAD-DC, ou seja, substâncias que não absorvem na região do UV, tais como: saponinas, açúcares, inositóis, entre outros. Estas substâncias possuem grande número de hidroxilas que podem interagir fortemente com a fase estacionária (sílica-celulose) provocando impedimento estérico e, com isso, diminuindo a interação da mesma com os analitos de interesse. Consequentemente, provocam alterações nos t_R .

Porém, independentemente do t_R , é possível detectar os enantiômeros da catequina e epicatequina pela análise dos espectros UV e DC. Com os espectros no UV (Figura 14) foi possível determinar a classe e com os espectros de DC foi possível determinar a estereoquímica de cada diastereômero (Figura 15).

Portanto, o método proposto com a utilização de CLAE-DAD-DC é altamente seletivo para catequinas nas condições analisadas.

4.3.3. Precisão

A repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia) do método foram avaliadas em relação aos t_R e áreas dos picos dos padrões de *ent*-catequina, catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina.

A precisão de cada padrão foi calculada de acordo com as recomendações da ANVISA (Equação 4, AGÊNCIA..., 2009b), em três níveis de concentração: 2, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 6). Foram realizadas dez injeções para cada concentração ($n=10$).

Os resultados encontrados estão compreendidos na faixa de 0,3 e 3,8% para os experimentos intra-dia e 2,0 e 4,8% para os experimentos inter-dia. Portanto, o método proposto possui precisão satisfatória, pois métodos de análises de princípios ativos em extratos vegetais são considerados precisos se apresentarem desvio padrão relativo menor que 5% (AGÊNCIA..., 2009b).

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP} \cdot 100}{\text{CMD}}$$

DPR = desvio padrão relativo
DP = desvio padrão
CMD = concentração média determinada

Equação 4. Cálculo da precisão.

Tabela 6. Valores referentes à precisão do método.

Analitos	Tempo de retenção (DPR%)		Área do pico (DPR%)	
	intra-dia ^a	inter-dia ^{ab}	intra-dia ^a	inter dia ^{ab}
<i>2 $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>				
<i>ent</i> -Catequina	0,5	2,1	0,4	2,0
Catequina	0,3	2,6	0,7	3,0
Epicatequina	1,5	3,1	2,0	4,3
<i>ent</i> -Epicatequina	2,3	3,7	2,2	4,0
<i>50 $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>				
<i>ent</i> -Catequina	1,0	3,2	2,5	2,5
Catequina	2,3	2,8	2,1	2,9
Epicatequina	3,5	3,6	3,2	3,3
<i>ent</i> -Epicatequina	3,4	4,3	3,8	4,5
<i>100 $\mu\text{g mL}^{-1}$</i>				
<i>ent</i> -Catequina	0,3	2,2	0,8	3,5
Catequina	0,7	2,6	0,7	3,1
Epicatequina	2,5	3,6	2,5	4,0
<i>ent</i> -Epicatequina	3,3	4,0	3,0	4,8

^a $n = 10$;

^b Três dias diferentes.

4.3.4. Recuperação (exatidão)

A exatidão do método foi investigada por estudos de recuperação somente dos padrões de catequina e epicatequina, pois a similaridade estrutural entre pares de enantiômeros reflete-se igualmente nas suas propriedades físicas e químicas e, de um modo geral, estas propriedades são idênticas em meios isotrópicos.

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração: $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (menor concentração dentro da faixa linear), $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração média dentro da faixa linear) e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração máxima dentro da faixa linear).

Inicialmente os testes foram realizados na preparação da infusão e EMeOH das folhas de *Byrsonima crassa* e as análises realizadas por CLAE quirál.

Para a preparação da infusão, três porções de 1 g de folha foram enriquecidas com 20 μL , 500 μL e 1000 μL de solução contendo 1 mg mL^{-1} de catequina e epicatequina, respectivamente.

Para a preparação do EMeOH, três porções de 2 g de folhas foram enriquecidas com 10 μL , 250 μL e 500 μL da mesma solução padrão contendo 1 mg mL^{-1} de catequina e epicatequina.

Após as fortificações, foram realizados os procedimentos de preparo e *clean-up* das amostras (Seção 3.8) em que os cartuchos utilizados foram os de fase reversa C_{18} (Seção 4.2).

A quantidade total dos analitos foi determinada e comparada com as obtidas pela análise de testemunhas (EMeOH e infusões), a fim de avaliar a porcentagem de recuperação nos cartuchos de fase reversa (C_{18}) Strata e Supelco (Equação 5).

$$\%R = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{pd}} \cdot 100$$

%R = porcentagem do padrão recuperada
 C_f = concentração do analito fortificada com padrão
 C_{nf} = concentração do analito não fortificada com padrão
 C_{pd} = concentração do padrão usado para fortificar a amostra

Equação 5. Cálculo da recuperação dos analitos.

Embora os cartuchos de fase reversa tenham apresentado seletividade satisfatória, o Strata foi o que apresentou melhores níveis de recuperação para catequina

e epicatequina no EMeOH e infusão das folhas de *Byrsonima crassa* (Tabela 7). Portanto, foi o escolhido para as análises.

Tabela 7. Recuperação de catequina e epicatequina obtidos após *clean-up* com diferentes cartuchos C₁₈ (EMeOH e infusão das folhas de *Byrsonima crassa*).

Cartuchos de C ₁₈	Recuperação (%) ^a			
	EMeOH		Infusão	
	Catequina	Epicatequina	Catequina	Epicatequina
<i>2 µg mL⁻¹</i>				
STRATA Phenomenex	88	100	80	78
Supelco	56	61	46	49
<i>50 µg mL⁻¹</i>				
STRATA Phenomenex	89	101	84	83
Supelco	58	55	48	51
<i>100 µg mL⁻¹</i>				
STRATA Phenomenex	91	105	89	91
Supelco	60	63	50	53

^a Cada valor representam a média de três replicatas (n = 3).

Devido ao fato de espécies de plantas possuírem composições químicas diferentes, foi avaliada a recuperação para os EMeOH e infusões das folhas das outras quatro espécies estudadas (*Byrsonima basiloba*, *B. coccolobifolia*, *B. intermedia* e *B. verbascifolia*). Os valores de recuperação variaram de 75,0 a 110,2% nos EMeOH e 70,0 a 89,5 nas infusões (Tabela 8).

A ANVISA determina que a porcentagem aceitável de recuperação em análises de princípio ativo em matéria prima vegetal deve estar compreendida entre 80 e 120% (AGÊNCIA..., 2009b).

Como é possível observar na Tabela 8, na maioria das aplicações foi possível obter recuperações acima de 80%, o que evidencia boa exatidão do método empregado. Os menores valores encontrados para a epicatequina na infusão podem estar relacionados a possíveis processos de degradação (OSZMIANSKI et al., 1996; CHEN et al., 2001; WANG; ZHOU; JIANG, 2008). Isso também foi observado em nossos ensaios (Seção 4.5).

Tabela 8. Recuperação de catequina e epicatequina após *clean-up* com o cartucho C₁₈ Strata Phenomenex (EMeOH e infusão das folhas de espécies de *Byrsonima*).

Espécies	Recuperação (%) ^a			
	EMeOH		Infusão	
	Catequina	Epicatequina	Catequina	Epicatequina
2 µg mL⁻¹				
<i>B. basiloba</i>	78	80	83	70
<i>B. cocolobifolia</i>	88	85	80	72
<i>B. crassa</i>	88	100	80	78
<i>B. intermedia</i>	86	88	81	81
<i>B. verbascifolia</i>	93	80	89	80
50 µg mL⁻¹				
<i>B. basiloba</i>	89	84	80	71
<i>B. cocolobifolia</i>	86	80	81	74
<i>B. crassa</i>	89	101	84	83
<i>B. intermedia</i>	81	79	83	73
<i>B. verbascifolia</i>	110	75	86	70
100 µg mL⁻¹				
<i>B. basiloba</i>	90	91	88	83
<i>B. cocolobifolia</i>	86	91	86	78
<i>B. crassa</i>	91	105	89	81
<i>B. intermedia</i>	91	99	85	80
<i>B. verbascifolia</i>	99	95	89	77

^a Cada valor representam a média de cinco replicatas (n = 5).

4.4. Análises dos extratos e infusões das folhas de espécies de *Byrsonima*

Depois de estabelecidos os parâmetros do método, os diastereômeros da catequina foram determinados nos EMeOH e infusões das folhas de espécies de *Byrsonima* (Figura 19).

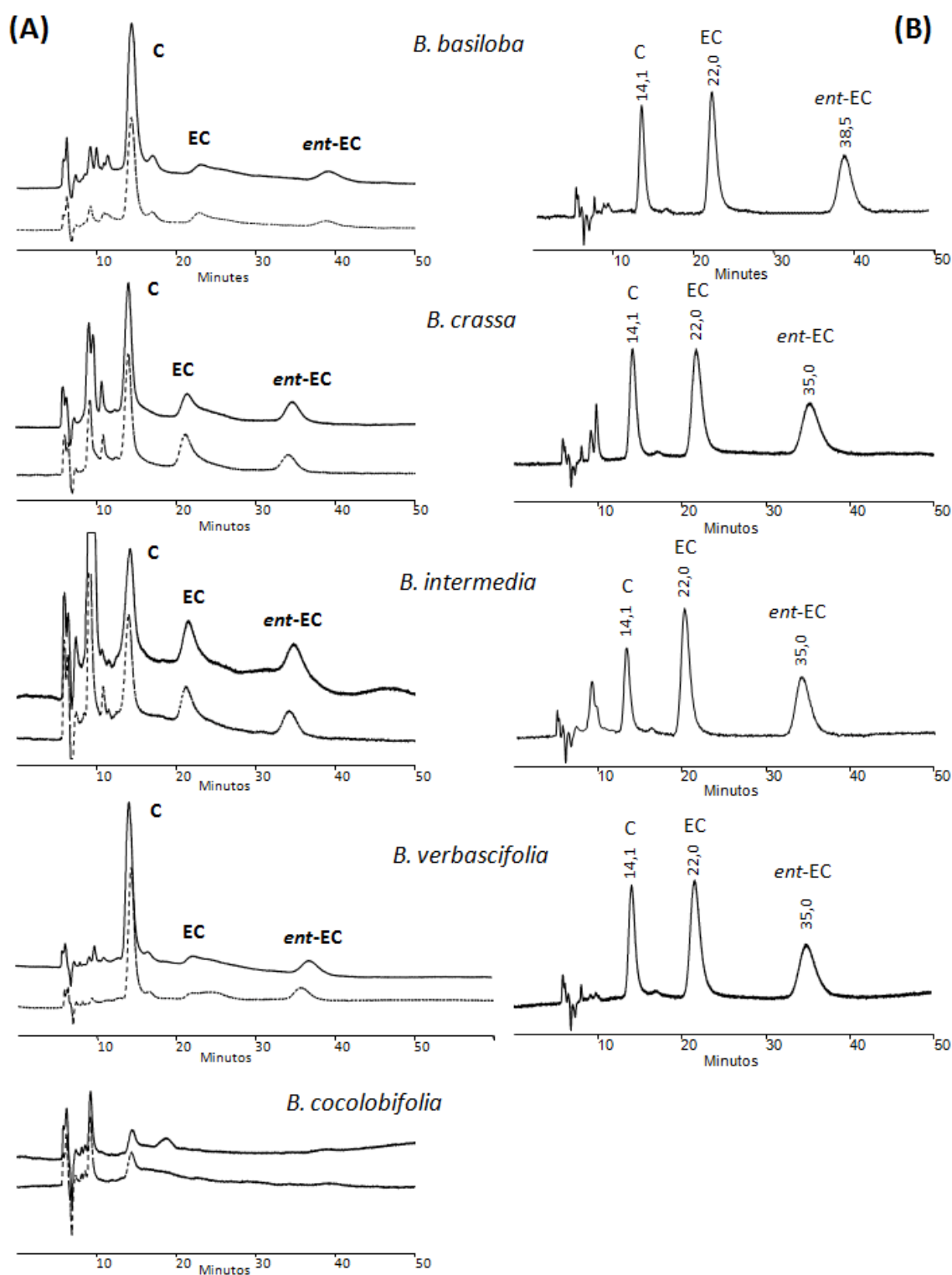


Figura 19. (A) Cromatogramas dos EMeOH (linha sólida) e infuões (linha tracejada) das folhas de espécies de *Byrsonima* e (B) cromatogramas dos EMeOH fortificados com 50 µg de cada padrão de catequina (C), epicatequina (EC) e *ent*-epicatequina (*ent*-EC). [Coluna Chiralcel OD-H (250, 4,6 mm, 5µm), *n*-Hex/EtOH (75,25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), 25°C, DAD (220 nm), vazão 0,5 mL min⁻¹].

Em *B. coccolobifolia* não foi possível observar a presença de diastereômeros da catequina, enquanto que nas outras quatro espécies analisadas foi possível determinar a quantidade de catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina (Tabela 9).

Tabela 9. Quantidade de catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina no EMeOH e infusão das folhas de espécies de *Byrsonima* (μg analito / g folhas).

Espécies de <i>Byrsonima</i>	EMeOH			
	C ^b	EC ^b	<i>ent</i> -EC ^b	Total
<i>B. basiloba</i>	3610,2 $\pm$ 0,3	193,6 $\pm$ 0,1	377,9 $\pm$ 0,8	4182 $\pm$ 1
<i>B. coccolobifolia</i>	ND ^c	ND ^c	ND ^c	
<i>B. crassa</i>	1279,0 $\pm$ 0,5	224,2 $\pm$ 0,2	322,1 $\pm$ 0,3	1825 $\pm$ 1
<i>B. intermedia</i>	519,9 $\pm$ 0,8	193,8 $\pm$ 0,4	197,2 $\pm$ 0,9	911 $\pm$ 1
<i>B. verbascifolia</i>	4277,8 $\pm$ 0,9	148,3 $\pm$ 0,1	725,0 $\pm$ 0,7	5151 $\pm$ 1
	Infusão			
	C ^b	EC ^b	<i>ent</i> -EC ^b	Total
<i>B. basiloba</i>	2213,9 $\pm$ 0,6	252,1 $\pm$ 0,1	162,1 $\pm$ 0,9	2628 $\pm$ 1
<i>B. coccolobifolia</i>	ND ^c	ND ^c	ND ^c	
<i>B. crassa</i>	1139,1 $\pm$ 0,9	471,6 $\pm$ 0,5	371,2 $\pm$ 0,2	1982 $\pm$ 1
<i>B. intermedia</i>	425,8 $\pm$ 0,3	197,9 $\pm$ 0,6	207,0 $\pm$ 0,3	831 $\pm$ 1
<i>B. verbascifolia</i>	2370,8 $\pm$ 0,6	< LQ ^d	374,8 $\pm$ 0,2	2745,6 $\pm$ 0,9

^a Os valores representam a média de cinco replicatas (n = 3);

^b C: catequina; EC: epicatequina;

^c ND: Não detectado;

^d Valor abaixo do limite de quantificação (LQ).

As folhas de *B. verbascifolia* apresentaram maior quantidade de catequinas quando comparada com as demais espécies, seguida por *B. basiloba*, *B. crassa* e *B. intermedia*.

Os gráficos da Figura 20 apresentam a comparação das quantidades de catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina determinadas nos EMeOH e infusões das folhas de *Byrsonima basiloba*, *B. crassa*, *B. intermedia* e *B. verbascifolia*.

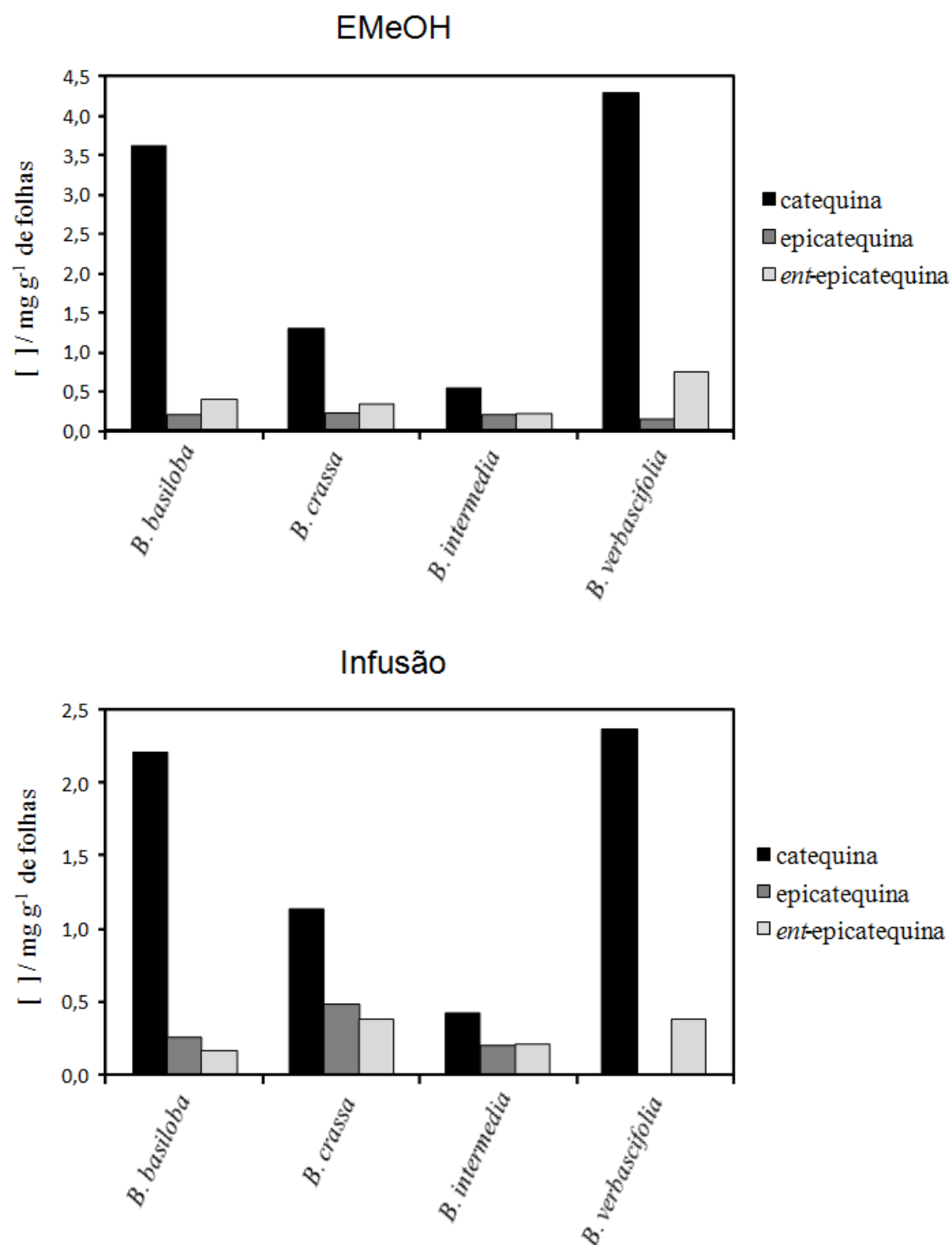


Figura 20. Quantidade de catequina, epicatequina e ent-epicatequina nas folhas das espécies de *Byrsonima* (mg analito / g folhas).

A *ent*-epicatequina encontrada nas folhas de espécies de *Byrsonima* é uma substância incomum na natureza. A Figura 20 mostra que os teores de epicatequina e seu enantiômero, *ent*-epicatequina, são aproximadamente iguais tanto nos EMeOH quanto na infusão de *B. crassa* e *B. intermedia*. Baseado nesse fato é possível questionar sobre a identificação de moléculas naturais quirais isoladas sob condições aquirais, normalmente descritos na literatura. É, portanto, possível, que muitos desses resultados envolvam na verdade, um par enantiomérico e não uma substância pura.

Tal fato pode ainda ocasionar conclusões equivocadas de resultados farmacológicos obtidos por essas substâncias.

Como amplamente discutido na literatura, a maioria dos flavonóides são biossintetizados por enzimas presentes nas plantas e, em relação a flavonóides quirais, acredita-se que essas enzimas sejam estereosseletivas e, portanto, levem à formação de apenas um enantiômero (GRISEBACH, 1973; DAVIES, SCHWINN, 2006; DWICK, 2002).

As catequinas podem sofrer epimerização no C-2 em soluções alcalinas ou neutras na presença de luz ou em temperaturas acima de 40°C (KENEDY et al., 1984).

Isso implica em que a *ent*-epicatequina identificada nas folhas de *Byrsonimas* pode estar relacionada com a epimerização da catequina ocorrida nos processos de preparo e *clean-up* dos extratos e infusões.

Devido a esse fato, realizou-se estudo de estabilidade das catequinas nas etapas de preparação dos extratos e infusões das folhas de espécies de *Byrsonima* (Seção 4.5).

4.5. Avaliação da epimerização de catequinas durante a preparação dos extratos e infusões das folhas de espécies de *Byrsonima*

Duas soluções contendo 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de padrões de catequina e epicatequina foram submetidos aos mesmos procedimentos de extração e *clean-up* realizados no preparo dos extratos e infusões e analisadas por CLAE-DAD-DC.

A avaliação da ocorrência de epimerização das catequinas foi realizada pela comparação das áreas dos picos dos padrões submetidos aos procedimentos de preparo de amostras (Seção 3.8) com as áreas dos padrões que não foram submetidos a tais procedimentos.

Foi possível constatar que as extrações com MeOH não apresentaram significativa diminuição na quantidade dos padrões analisados (Figura 21a). No entanto,

nas preparações das infusões, foi possível observar diminuição de aproximadamente 10% da área do pico correspondente à epicatequina e a presença de picos que eluíram no V_0 do sistema cromatográfico (Figura 21b) nos dois níveis de concentração analisados.

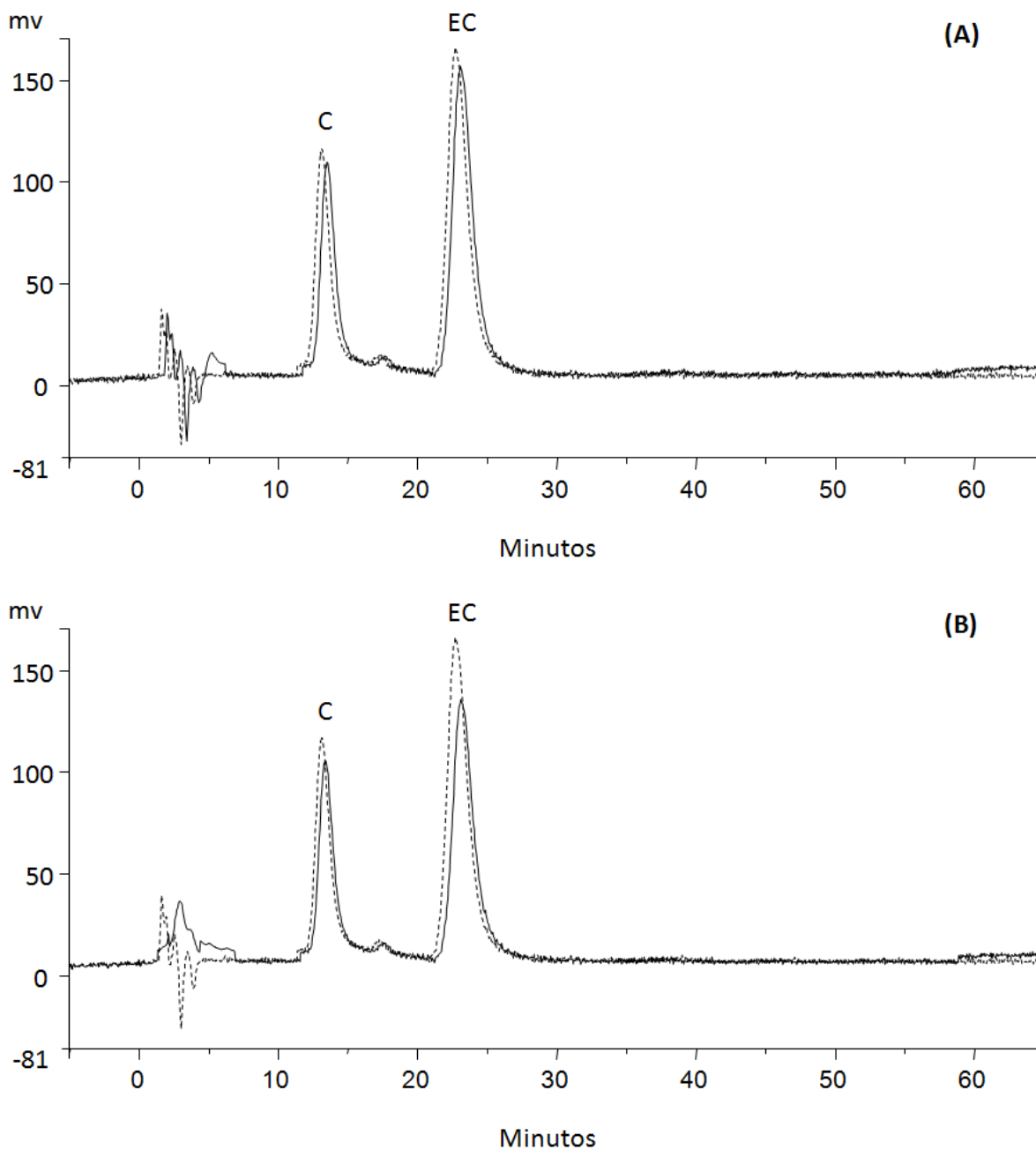


Figura 21. Cromatogramas dos padrões de catequina (C) e epicatequina (EC): $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (linha tracejada): extração com (A) MeOH (linha sólida) e (B) H_2O 80°C (linha sólida). [Coluna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm), *n*-Hex/EtOH (75,25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA (pH 4), 25°C , DAD (220 nm), vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$].

As catequinas, individualmente, podem sofrer epimerização no C-2 em soluções alcalinas ou neutras na presença de luz ou em temperaturas acima de 40°C (KENEDY et al., 1984, Figura 22). As catequinas na forma 2,3-*cis* epimerizam mais facilmente que seus diastereômeros na forma 2,3-*trans*. Tal fato se deve, provavelmente, à diferença na estereoquímica: a forma *trans*, em geral, é mais estável do que a forma *cis* (SUZUKI et al., 2003; ITO et al., 2003; STACH; SCHMITZ, 2001; CHEN et al., 2001; WANG; HELLIWELL, 2000; WANG; HELLIWELL; YOU, 1999; DELCOUR; FERREIRA; ROUX, 1983; KIATGRAJAI et al., 1982; ANIRUDHAN; MATHIESON; WHALLEY, 1966; ANIRUDHAN; MATHIESON; WHALLEY, 1964; MEHTA; WHALLEY, 1963; FREUDENBERG, 1957;).

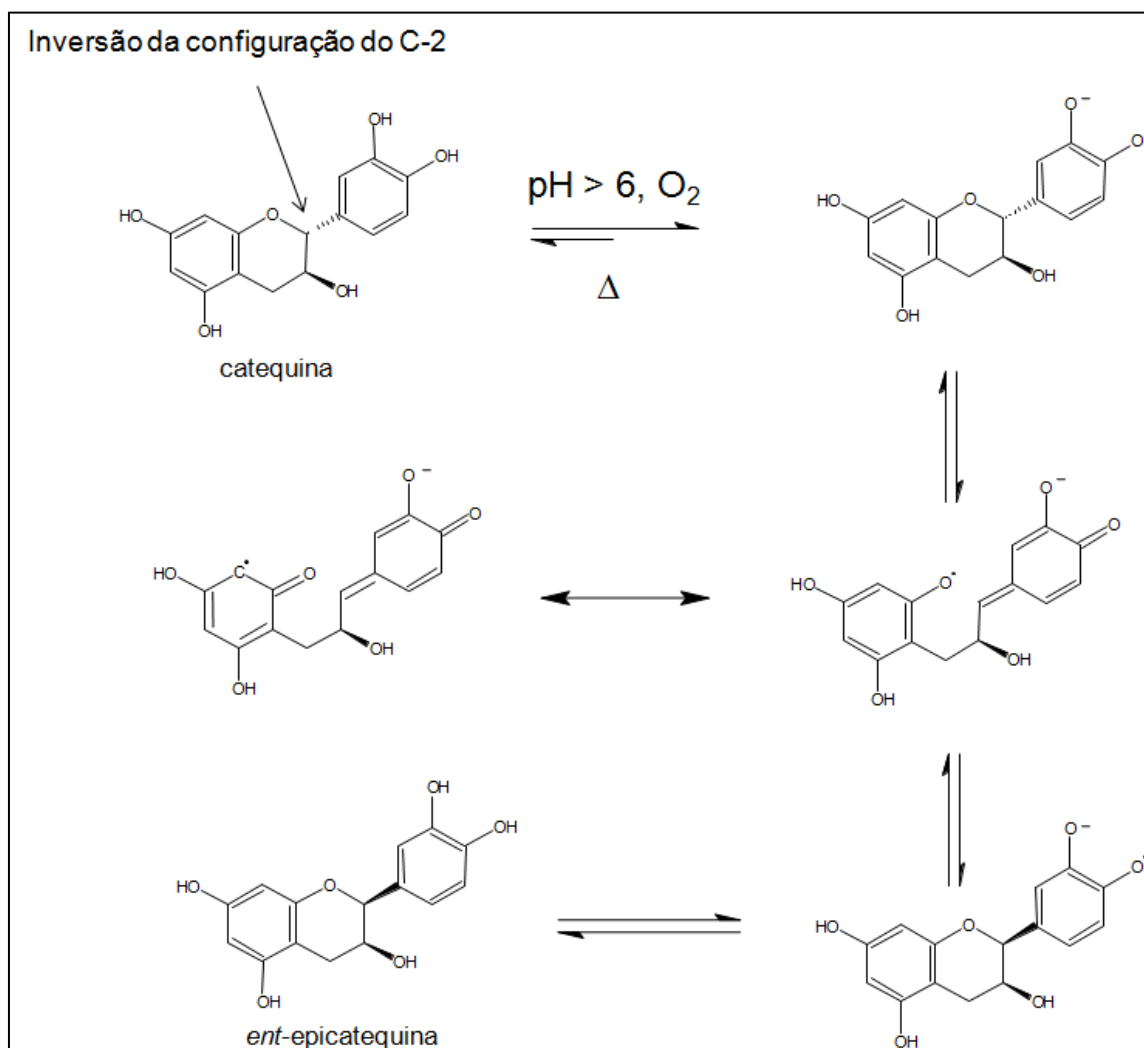


Figura 22. Epimerização da catequina em *ent*-epicatequina em solução com $\text{pH} > 6$ a alta temperatura ($T > 50^\circ\text{C}$) na presença de oxigênio.

Embora a epimerização das catequinas seja mais lenta em soluções ácidas, a temperaturas acima de 40°C podem provocar degradação ou polimerização das mesmas (CHEN et al., 2001; WANG; ZHOU; JIANG, 2008). Além disso, metais podem catalizar a degradação de catequinas em meio aquoso (OSZMIANSKI et al., 1996).

No preparo das infusões foi utilizado H₂O filtrada, simulando o preparo popular, que pode conter metais. Portanto, os picos observados no V_0 do cromatograma da Figura 21b podem pertencer a produtos de degradação da epicatequina, formados devido à alta temperatura da H₂O utilizada.

No entanto, não foi detectada a presença da *ent*-epicatequina.

As catequinas são formadas pela ciclização de uma chalcona mediada pela enzima CFI (GRISEBACH, 1973). O C-2' do **anel A** da **chalcona** sofre um ataque nucleofílico da hidroxila e leva à formação da (*S*)-naringenina (Figura 23, DEWICK, 2002).

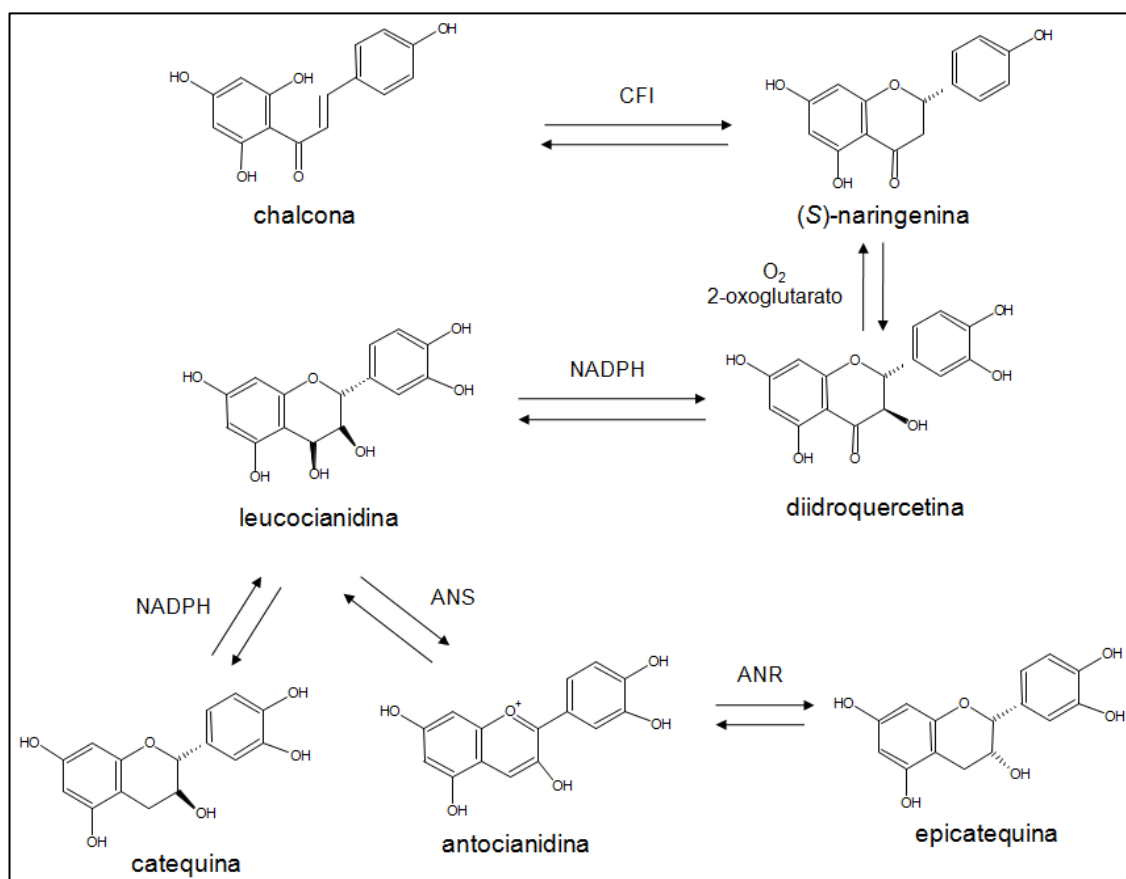


Figura 23. Biossíntese da catequina e epicatequina a partir da estereoespecificidade enzimática na ciclização da chalcona. CFI: Chalcona Flavanona Isomerase; NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (reduzido); ANS: Antocianidina Sintase; ANR: Antocianidina Redutase.

Durante a maturação de folhas e frutos de espécies vegetais pode ocorrer a abertura do anel C da naringenina e posteriormente um fechamento não enzimático, podendo ocasionar a formação de racemato de naringenina e com isso causar a formação dos enantiômeros *ent*-catequina e *ent*-epicatequina, incomuns na natureza (Figura 24, GAFFIELD et al., 1975).

Os resultados indicaram que a *ent*-epicatequina não é um artefato. Não esta relacionada com a ocorrência da epimerização da catequina nos processos de extração e *clean-up*, pois não foi possível detectar sua presença nos ensaios realizados com padrões de catequina e epicatequina.

Portanto, é possível propor que espécies vegetais adultas do gênero *Byrsonima* possuam *ent*-epicatequina em suas folhas. Tal fato não é reportado na literatura, porém a presença de proantocianidinas com unidades de *ent*-epicatequina isoladas das cascas de *Byrsonima crassifolia* (GEISS et al., 1995) e de um derivado metoxilado da *ent*-epicatequina isolado do caule de *B. microphylla* (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005) evidenciam possível incidência desse diastereômero no gênero.

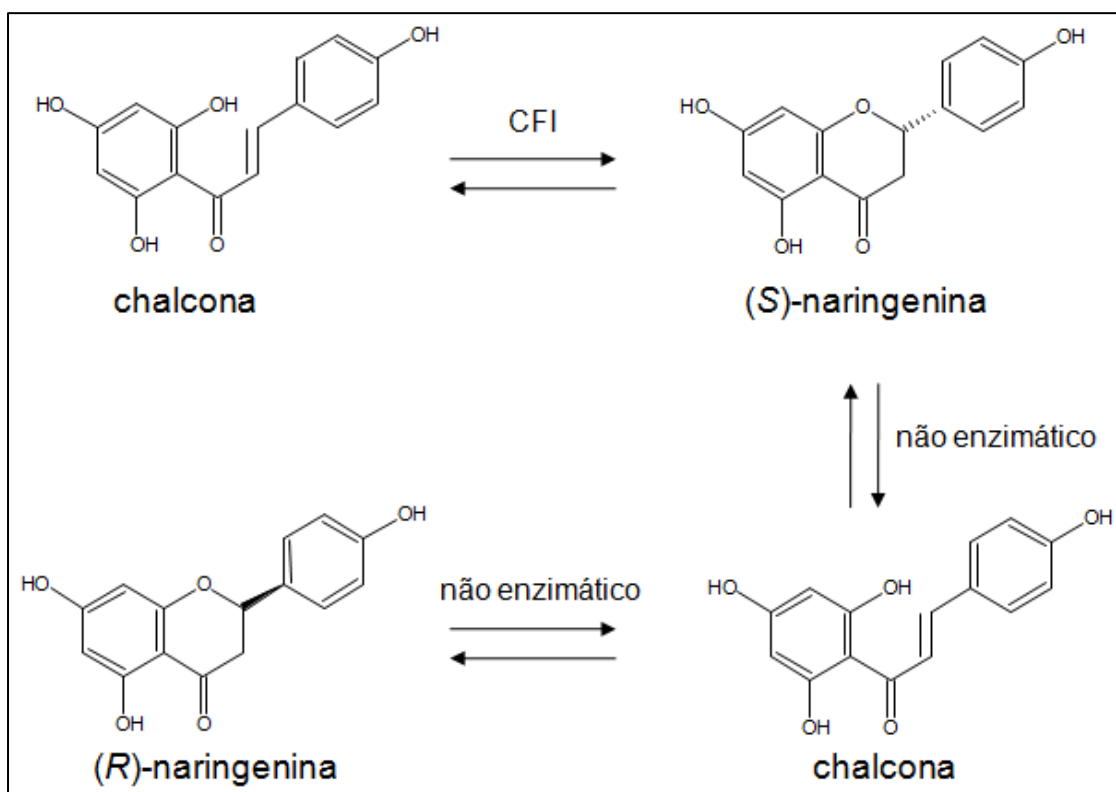


Figura 24. Biossíntese da naringenina.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi desenvolvido método para a determinação direta de catequina, *ent*-catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina, em extratos e infusões das folhas das espécies *Byrsonima basiloba*, *B. coccolobifolia*, *B. crassa*, *B. intermedia* e *B. verbascifolia* por CLAE-DAD-DC com a coluna quirál Chiralcel OD-H e *n*-Hex/EtOH (75:25, v/v) acidificado com 0,1% de TFA como fase móvel.

Para obter frações de catequinas livres de interferentes, foram avaliados 3 tipos diferentes de cartuchos de extração em fase sólida: fase normal (sílica), fase reversa (C₁₈) e fase reversa polimérica. O cartucho que apresentou melhor seletividade e melhores resultados de recuperação, para extratos e infusões, foi o cartucho de C₁₈ Strata Phenomenex.

Deve-se destacar a seletividade do sistema CLAE-DAD-DC que, independentemente das variações dos t_R , permitiu identificar inequivocadamente os enantiômeros da catequina e epicatequina em matrizes complexas como extratos vegetais.

No âmbito de determinações de princípios ativos em extratos vegetais, o método desenvolvido apresentou boa sensibilidade nas condições aplicadas, com limites de detecção e quantificação (0,77 - 0,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2,32 - 1,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$) satisfatórios para as concentrações encontradas nas matrizes analisadas.

Além disso, bons resultados foram obtidos com relação à precisão, com valores de DPR na faixa de 0,3 a 3,8% para repetibilidade (intra-dia) e 2,0 a 4,8% para a precisão intermediária (inter-dia).

A exatidão do método foi determinada por testes de recuperação, cujos valores ficaram compreendidos na faixa de 75,0 a 110,2% nos EMeOH e 70,0 a 89,5% nas infusões. Na maioria das aplicações foi possível obter recuperações acima de 80%. Tendo em vista as recomendações da ANVISA, esses valores evidenciam boa exatidão do método empregado.

A aplicação do método foi realizada em dois tipos diferentes de preparos, extração com MeOH e infusão, em cinco espécies do gênero *Byrsonima*.

As folhas de *B. verbascifolia* apresentaram maior quantidade de catequinas quando comparada com as demais espécies, seguida por *B. basiloba*, *B. crassa* e *B. intermedia*. Porém, nas folhas de *B. coccolobifolia* não foi possível detectar a presença de catequinas.

Os procedimentos de extração e *clean-up* empregados no método não provocaram epimerização das catequinas. Os experimentos mostraram que a *ent*-epicatequina presente nas folhas de espécies de *Byrsonima* não é artefato.

Como comprovado há décadas, enantiômeros podem apresentar diferenças em suas propriedades farmacológicas, farmacocinéticas ou tóxicas. A ingestão de medicamentos ou fitomedicamentos sem o conhecimento completo da composição química pode provocar graves danos a saúde e inclusive ocasionar a morte.

Embora a legislação brasileira tenha evoluído quanto ao controle de qualidade de fitoterápicos, a avaliação da composição quiral de fitomedicamentos torna-se necessária.

Outro fator relevante quanto à presença de misturas racêmicas ou excesso enantiomérico de substâncias naturais em plantas medicinais é a idade da espécie vegetal. Assim como na agricultura de cana-de-açúcar e laranja, estudos sobre o período mais adequado para a coleta das partes vegetais utilizadas em preparos julgam-se pertinentes, tanto para a obtenção de maior quantidade de princípio ativo quanto para garantir a composição enantiomérica de substâncias naturais quirais.

A CLAE-DAD-DC é uma ferramenta eficiente para análises de substâncias quirais em extratos vegetais, sendo uma possível alternativa para a aplicação no controle de qualidade de fitoterápicos.

Os resultados aqui apresentados contribuem para o conhecimento da composição química de espécies vegetais da flora brasileira, auxiliando para criação de políticas mais rigorosas que possam garantir a qualidade de fitoterápicos no Brasil.

Como perspectivas futuras, propõem-se a análise dos sistemas enzimáticos envolvidos na biossíntese das catequinas nas plantas do gênero *Byrsonima* (proteômica) e, com isso, obter propostas sólidas e confiáveis sobre a incidência da *ent*-epicatequina nas folhas dessas espécies. Sugere-se também, a aplicação do método desenvolvido neste trabalho para avaliar a presença dos diastereômeros da catequina em diferentes estágios de crescimento de espécies vegetais cultivadas de grande interesse comercial.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 fev. 1995. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/6_95.htm>. Acesso em: 14 dez. 2009a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 25 mar. 2009b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de mar. 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>>. Acesso em: 14 dez. 2009c.

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2388-2392, 2005.

ANIRUDHAN, C. A.; MATHIESON, D. W.; WHALLEY, W. B. A novel rearrangement in the catechin series. **Proc. Chem. Soc.**, p. 84-85, 1964.

ANIRUDHAN, C. A.; MATHIESON, D. W.; WHALLEY, W. B. A novel rearrangement in the catechin series. **J. Chem. Soc.**, n. 6, p. 634-636, 1966.

BAIS, H. P.; WALKER, T. S.; STERMITZ, F. R.; HUFBAUER, R. A.; VIVANCO, J. M. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (±)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from Spotted Knapweed. **Plant Physiol.**, v. 128, n. 4, p. 1173-1179, 2002.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular dichroism**: principles and applications. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. 877 p.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2006. 60 p.

BRINGMANN, G.; MESSER, K.; WOHLFARTH, M.; KRAUS, J.; DUMBUYA, K.; RUECKERT, M. HPLC-CD on-line coupling in combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts. **Anal. Chem.**, v. 71, n. 14, p. 2678-2686, 1999.

BRUCE, P. Y. **Organic chemistry**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003. v. 1. 1344 p.

CACCAMESE, S.; MANNA, L.; SCIVOLI, G. Chiral HPLC separation and CD spectra of the C-2 diastereomers of naringin in grapefruit during maturation. **Chirality**, v. 15, n. 8, p. 661-666, 2003.

CACCAMESE, S.; CARUSO, C.; PARRINELLO, N.; SAVARINO, A. High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and other flavanones. **J. Chromatogr. A**, v. 1076, n. 1-2, p. 155-162, 2005.

CALABRO, M. L.; TOMMASINI, S.; DONATO, P.; RANERI, D.; STANCANELLI, R.; FICARRA, P.; FICARRA, R.; COSTA, C.; CATANIA, S.; RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G. Effects of α - and β -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 35, n. 2, p. 365-377, 2004.

CANNELL, R. J. P. **Natural products isolation**. New Jersey: Humana Press, 1998. 473 p.

CARDOSO, C. R. P.; CÓLUS, I. M. S.; BERNARDI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 55-63, 2006.

CHEN, Z. Y.; ZHU, Q. Y.; TSANG, D.; HUANG, Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 1, p. 477-482, 2001.

CLARK-LEWIS, J. W. Flavan derivatives. XXI. Nuclear magnetic resonance spectra, configuration, and conformation of flavan derivatives. **Aust. J. Chem.**, v. 21, n. 8, p. 2059-2075, 1968.

COOPER, K. A.; CAMPOS-GIMÉNEZ, E.; ALVAREZ, D. J.; NAGY, K.; DONOVAN, J. L.; WILLIAMSON, G. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major *Cocoa* polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 8, p. 2841-2847, 2007.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Anal. Chim. Acta**, v. 391, n. 1, p. 105-126, 1999.

DAVIES, K. M.; SCHWINN, K. E. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. (Ed.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 1197 p.

DELCOUR, J. A.; FERREIRA, D.; ROUX, D. G. Synthesis of condensed tannins. Part 9. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)- catechin and with the resultant procyanidins. **J. Chem. Soc.**, n. 8, p. 1711-1717, 1983.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 501 p.

DIAS, F. S.; LOVILLO, M. P.; BARROSO, C. G.; DAVID, J. M. Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. **Microchem. J.** doi:10.1016/j.microc.2010.01.004. In press.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 1267 p.

FREUDENBERG, K. Chemistry of catechin and flavan. **Festschr. ArthurStoll**, p. 199-202, 1957.

GAFFIELD, W.; LUNDIN, R. E.; GENTILI, B.; HOROWITZ, R. M. C-2 stereochemistry of naringin and its relation to taste and biosynthesis in maturing grapefruit. **Bioorg. Chem.**, v. 4, n. 3, p. 259-269, 1975.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 635-643, 1995.

GHOSAL, S. Occurrence of psychedelic substances in some indian medicinal-plants. **Planta Med.**, v. 21, n. 2, p. 200-209, 1972.

GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S.; CAVRINI, V. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1112, n. 1-2, p. 345-352, 2006.

GRISEBACH, H. Comparative biosynthetic pathways in higher plants. **Pure. Appl. Chem.**, v. 34, n. 3-4, p. 487-513, 1973.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. G. **Chiral separation: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2004. 432 p.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; ANTONIO BARRERA, N. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. **J. Ethnopharmacol.** v. 36, n. 1, p. 63-80, 1992.

HENRY, J. P.; STEPHENS-LARSON, P. Reduction of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeinated tea. **Hypertension**, v. 6, n. 3, p. 437-444, 1984.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. 335 p.

ITO, R.; YAMAMOTO, A.; KODAMA, S.; KATO, K.; YOSHIMURA, Y.; MATSUNAGA, A.; NAKAZAWA, H. A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. **Food Chem.**, v. 83, n. 4, p. 563-568, 2003.

JASCO, INC. **HPLC detectors**. Disponível em: <<http://www.jascoinc.com>>. Acesso em: 03 abr. 2007.

KENNEDY, J. A.; MUNRO, M. H. G.; POWELL, H. K. J.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds. **Aust. J. Chem.**, v. 37, n. 4, p. 885-892, 1984.

KIATGRAJAI, P.; WELLONS, J. D.; LAWRENCE, G.; WHITE, J. D. Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. **J. Org. Chem.**, v. 47, n. 15, p. 2910-2912, 1982.

KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 225, n. 3-4, p. 569-577, 2007a.

KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. (-)-Catechin in *Cocoa* and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1274-1288, 2007b.

KORVER, O.; WILKINS, C. Circular dichroism spectra of flavonols. **Tetrahedron**, v. 27, n. 22, p. 5459-5465, 1971.

LARSEN, C. A.; BISSON, W. H.; DASHWOOD, R. H. Tea catechins inhibit hepatocyte growth factor receptor (MET Kinase) activity in human colon cancer cells: kinetic and molecular docking studies. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 21, p. 6543-6545, 2009.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.

LINDNER, W. F.; PETTERSSON, C. Resolution of optical isomers by liquid chromatographic techniques. In: WAINER, I. (Ed.). **Liquid chromatography in pharmaceutical development**. Springfield: Aster, 1985. p. 63-133.

LIRA, W. M.; SANTOS, F. V. dos; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **J. Med. Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARQUES, L. C. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001. Cap. 14, p. 259-289.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; LUNAM L. C.; GUTIÉRREZ, M. N. M.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 1, p. 79-82, 1999.

McCONNELL, P.; BACH II, A.; BALIBAR, C.; BYRNE, N.; CAI, Y.; CARTER, G.; CHLENOV, M.; DI, L.; FAN, K.; GOIJER, I.; HE, Y.; HEROLD, D.; KAGAN, M.; KERNS, E.; KOEHN, F.; KRAML, C.; MARATHIAS, V.; MARQUEZ, B.; McDONALD, L.; NOGLE, L.; PETUCCI, C.; SCHLINGMANN, G.; TAWA, G.; TISCHLER, M.; WILLIAMSON, R. T.; SUTHERLAND, A.; WATTS, W.; YOUNG, M.; ZHANG, M. Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, D.; HO, D. Enantiomeric separation and determination of absolute stereochemistry of asymmetric molecules in drug discovery-building chiral technology toolboxes. **Chirality**, v. 19, n. 9, p. 658-682, 2007.

MEHTA, P. P.; WHALLEY, W. B. The stereochemistry of some catechin derivatives. **J. Chem. Soc.**, p. 5327-5332, 1963.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

NYFELER, F.; MOSER, U. K.; WALTER, P. Stereospecific effects of (+)- and (-)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.**, v. 763, n. 1, p. 50-57, 1983.

OSZMIANSKI, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 7, p. 1712-1715, 1996.

PEIXOTO, A. M. **Enciclopédia agrícola brasileira**. São Paulo: Ed. USP, 2002. v. 4.

REINIER, J. J.; VAN RENSBURG, N. H.; VAN HEERDENA, P. S.; FERREIRA, D. Stereoselective synthesis of flavonoids. part 8. Free phenolic flavan-3-ol diastereoisomers. **J. Chem. Res.**, n. 10, p. 606-607, 1999.

REN, D. M.; GUO, H. F.; WANG, S. Q.; LOU, H. X. Separation and structure determination of two diastereomeric pairs of enantiomers from *Dracocephalum rupestre* by high-performance liquid chromatography with circular dichroism detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1161, n. 1-2, p. 334-337, 2007.

RODRIGUES, C. M. R. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

- RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. dos; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, n. 12, p. 1907-1914, 2007.
- SAENGER, W. Stereochemistry of circularly closed oligosaccharides: cyclodextrin structure and function. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 11, n. 2, p. 136-139, 1983.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A. da; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C. dos; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005a.
- SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SALGADO, H. R. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. S. M.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **J. Basic Appl. Pharm. Sci.**, v. 26, n. 1, p. 71-75, 2005b.
- SANNOMIYA, M.; CARDOSO C. R. P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C. dos; SANTOS, F. V. dos; SERPELONI, J. M.; CÔLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 319-326, 2007.
- SILVA, R. A. D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Editora Nacional, 1929. 1149 p.
- SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA JUNIOR, M. C.; MEDEIROS, M. B. **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília: WWF - Brasil, 2001. 132 p.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SINGH, A. K. **Separação enantiomérica de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida com fase estacionária quirais**. 2002. 263 f. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS. **Estatística dos casos de intoxicações e envenenamentos**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 08 fev. 2010.
- SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, n. 8, p. 2177-2215, 2005.

SNATZKE, G.; KAJTA', R. M.; SNATZKE, F. Aromatic chromophores. In: CIARDELLI, F.; SALVADORI, P. (Ed.). **Fundamental aspects and developments in optical rotatory dispersion and circular dichroism**. London: Heyden & Son, 1973. p. 148-172.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SPROGOE, K.; STAERK, D.; ZIEGLER, H. L.; JENSEN, T. H.; HOLM-MOLLER, S. B.; JAROSZEWSKI, J. W. Combining HPLC-PDA-MS-SPE-NMR with circular dichroism for complete natural product characterization in crude extracts: levorotatory gossypol in *Thespesia danis*. **J. Nat. Prod.**, v. 71, n. 4, p. 516-519, 2008.

STACH, D.; SCHMITZ, O. J. Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 924, n. 1-2, p. 519-522, 2001.

SUZUKI, M.; SANO, M.; YOSHIDA, R.; DEGAWA, M.; MIYASE, T.; MAEDA-YAMAMOTO, M. Epimerization of tea catechins and *O*-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate: relationship between epimerization and chemical structure. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 2, p. 510-514, 2003.

TANG, Y. B. Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase. **Chirality**, v. 8, n. 1, p. 136-142, 1996.

UCHIYAMA, N.; KIM, I. H.; KAWAHARA, N.; GODA, Y. HPLC separation of hesperidin and the C - 2 epimer in commercial hesperidin samples and herbal medicines. **Chirality**, v. 17, n. 7, p. 373-377, 2005.

VALENTE, A. L.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/br/category/todos-os-artigos/cromatografia>>. Acesso em: 03 nov. 2003.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-7172, 2009.

VAN RENSBURG, H.; STEYNBERG, P. J.; BURGER, J. F. W.; VAN HEERDEN, P. S.; FERREIRA, D. Circular dichroic properties of flavan-3-ols. **J. Chem. Res.**, n. 7, p. 450-451, 1999.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O.; PIMENTA, A. S.; DELLA-LUCIA, R. M. Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucalipto para produção de chapas de flocos. **R. Árvore**, v. 28, n. 4, p. 571-582, 2004.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. **Food Chem.**, v. 70, n. 3, p. 337-344, 2000.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chem.**, v. 68, n. 1, p. 115-121, 1999.

WANG, R.; ZHOU, W.; JIANG, X. Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 8, p. 2694-2701, 2008.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Phenolic substance characterization and chemical and cell-based antioxidant activities of 11 lentils grown in the Northern United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 3, p. 1509-1517, 2010.

YAN, C.; LI, X.; XIU, Z.; HAO, C. A quantum-mechanical study on the complexation of β -cyclodextrin with quercetin. **Theochem**, v. 764, n. 1-3, p. 95-100, 2006.

YÁÑEZ, J. A.; ANDREWS, P. K.; DAVIES, N. M. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. **J. Chromatogr. B**, v. 848, n. 2, p. 159-181, 2007.

YANG, B.; ARAI, K.; KUSU, F. Determination of catechins in human urine subsequent to tea ingestion by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Anal. Biochem.**, v. 283, n. 1, p. 77-82, 2000.

ZHANG, Y.; WATTS, W.; NOGLE, L.; McCONNELL, O. Rapid method development for chiral separation in drug discovery using multi-column parallel screening and circular dichroism signal pooling. **J. Chromatogr. A**, v. 1049, n. 1-2, p. 75-84, 2004.

ANEXO

Artigo aceito para publicação na Chirality (DOI: 10.1002/chir.20824)

Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD

Daniel Rinaldo¹, João M. Batista Jr.¹, Juliana Rodrigues¹, Ana C. Benfatti¹, Clenilson M. Rodrigues¹, Lourdes C. dos Santos¹, Maysa Furlan¹, Wagner Vilegas^{1*}

¹Institute of Chemistry, São Paulo State University – Unesp, Av. Francisco Degni s/n, PO Box 355, 14801-900 Araraquara-SP, Brazil.

Catechin diastereomers from *Byrsonima* species

Key Words: Chiral chromatography; Enantioseparation; Circular dichroism; Plant extract

***Corresponding Author:** Wagner Vilegas

Address: Institute of Chemistry, São Paulo State University – Unesp, Av. Francisco Degni s/n, PO Box 355, 14801-900 Araraquara-SP, Brazil

Phone: +55-16-33016600

Fax: +55-16-3016600

E-mail address: vilegasw@gmail.com

Contract grant sponsor: The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

ABSTRACT

When catechins are found in plant extracts, they are almost always identified as catechin and/or epicatechin probably due to stereoselectivity of the enzymes involved in the biosynthesis of these substances. However, the lack of reports regarding to *ent*-catechin as well as *ent*-epicatechin does not necessarily mean that these compounds have not been produced. In fact, most of the previous reports used chromatographic conditions not suitable for such separation. This paper describes a simple and reliable analytical HPLC-PAD-CD method for simultaneous determination of catechin diastereomers both in infusions and extracts from the leaves of *Byrsonima* species. The direct separation of catechin, *ent*-catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin was obtained in normal phase by HPLC-PAD-CD using Chiralcel OD-H as chiral stationary phase and *n*-hexane/ethanol with 0.1% of TFA as mobile phase.

INTRODUCTION

Catechins have received a great deal of attention due to their antioxidative and antitumoural activities^{1,2,3,4,5,6,7,8}. Catechin, *ent*-catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin⁹ (Fig. 1) have different activities in the metabolism of glycogen¹⁰ and in membrane fluidity which are responsible for their pharmacological and toxicological mechanisms¹¹. When catechins are found in plant extracts, they are almost always identified as catechin and/or epicatechin probably due to stereoselectivity of the enzymes involved in the biosynthesis of these substances¹². However, due to significant differences in the pharmacological activities of catechin and *epicatechin* enantiomers, it raises concerns about the purity of these enantiomers, especially in extracts or tea of medicinal plants consumed by the population. Moreover, it is well known that tea preparation and storage conditions may lead to different proportions of catechin stereoisomers, either due to epimerisation or hydrolysis of gallate derivatives, which are commonly present¹³.

In Brazil, plants of the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) represent a rich source of catechin and epicatechin derivatives. This genus is used in folk medicine, generally as tea, for the treatment of gastric ulcers, inflammation, skin infections, fever and asthma^{14,15,16}. They are popularly known as ‘murici-vermelho’ or ‘murici-cascudo’ and they widely grow in cerrado lands of Brazil. *Byrsonima* species have scientifically been proven to present several pharmacological activities such as antiulcerogenic¹⁷, mutagenic^{18,19,20} and antimicrobial^{21,22}. Phytochemical investigations on *Byrsonima* species revealed the occurrence of catechin and/or epicatechin derivatives^{14,17,19,20,22,23}. Catechin [(2*R*,3*S*)-*trans*-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan] and epicatechin [(2*R*,3*R*)-*cis*-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan] are the most common diastereomers found in nature. The present study describes a simple and reliable analytical HPLC-PAD-CD method for simultaneous determination of catechin diastereomers in infusions and extracts from the leaves of *Byrsonima* species.

(Fig. 1)

EXPERIMENTAL

Plant material

Byrsonima crassa and *B. verbascifolia* were collected by Cristiano Borges Pereira and authenticated by Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos from the University of Tocantins, Palmas, Tocantins state, Brazil. *B. basiloba* and *B. intermedia* were collected by Dr. Luis Fernando R. de Almeida and authenticated by José Clemente Campos from

the Institute of Biosciences - Unesp, Botucatu, São Paulo state, Brazil. *B. cocolobifolia* was collected and authenticated by Dr. Jorge Yoshio Tamashiro from the Institute of Biology - Unicamp, Campinas, São Paulo state, Brazil. Leaves of each *Byrsonima* species were collected from adult specimens, shadow dried and stored in darkness at room temperature. The collection data of *Byrsonima* species are shown in Table I.

(Table I)

Materials

Trifluoroacetic acid (TFA) and all solvents (methanol, ethanol and 95% *n*-hexane) were HPLC grade and purchased from Tedia Company, Inc (Fairfield, OH, USA). Catechin (Ref. C1251 Lot 036K1604), *ent*-catechin (Ref. C0567 Lot 066K1088), epicatechin (Ref. E1753 Lot 026K2611) and *ent*-epicatechin (Ref. E4018 Lot 100K1673) standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water was purified in-house with a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). All solutions prepared for HPLC were filtered through a 0.45µm GHP filter (Waters, Milford, MA, USA) before use.

Instrumentation

The HPLC system used was a JASCO 2000 HPLC (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with PU-2089 Plus pump, a MD-2010 Plus Photodiode Array detector (PAD), a CD-2095 Plus circular dichroism detector (CD) and an AS-2055 Plus autosampler. The software EZChrom Elite 3.1.7 was used for control of the analytical system, data collection and processing.

Chromatographic Conditions

Liquid chromatography was carried out at room temperature using a Chiracel OD-H column (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) protected by a Chiracel OD-H guard column (5 µm, 10 mm x 4.0 mm), both from Diacel Chemical Ind., Ltd. (West Chester, PA, USA). The mobile phase consisted of *n*-hexane/ethanol doped with 0.1% of TFA (75:25, v/v) in isocratic elution. Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ and sample injection volume was 20 µl. Signal was monitored at 220 nm with the PAD and at 280 nm with the CD detector in order to determine the elution order of the enantiomers. The chromatographic parameters (V_0 , t_0 , k , α , R_s) were calculated according to Snyder et al.²⁴ using PAD.

Standard solutions

Catechin and epicatechin stock solutions were prepared in *n*-hexane/ethanol (1:1, v/v) doped with 0.1% of TFA at the concentration of 999.6 and 993.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively, taking into account the purity of the standards. These solutions were stored at 4 °C in darkness.

Sample preparation

Methanolic extract

The dried and powdered leaves of *Byrsonima* species (1.0 g) were extracted successively, in an ultrasonic bath, during 30 min with chloroform (to remove lipophilic compounds) and methanol. Approximately 20.0 mg of each methanolic extract were dissolved in 1.0 ml of methanol/H₂O (2:8, v/v) doped with 2% of acetic acid (pH 4). For the removal of possible contaminants, each solution was purified by solid phase extraction (SPE), using Phenomenex Strata C₁₈ cartridges (500 mg of stationary phase), previously activated with 5 ml of methanol and equilibrated with 5 ml of Milli-Q water. Catechins and epicatechins were eluted from cartridges using 5 ml of a mixture of methanol/H₂O (2:8, v/v). The eluted compounds were dried under nitrogen and set to a final volume of 5 ml of *n*-hexane/ethanol (1:1, v/v). The samples were then filtered through a 0.45 μm GHP filter and aliquots of 20 μl were directly injected into HPLC.

Infusion

The infusions were prepared using an aqueous extraction procedure which simulated actual brewing conditions for a cup of tea. A precise known amount of powder of dried leaves (1.0 g) was steeped at 80°C for 10 min in 10 ml of water. Each sample was filtered in a paper filter and acidified with 2% of acetic acid (pH 4). For each sample the final volume was adjusted to 10 ml. For the removal of interferents, each solution was subjected to the same SPE clean up method used for the methanolic extracts.

Identification and Quantification

Extracts and infusions from the leaves of *Byrsonima* species were prepared as described in the *Sample preparation* section and analyzed by HPLC-PAD at 220 nm. Identification of the different compounds was made by comparison of their retention times (t_R), UV and CD spectra with those obtained for pure standards. The amount of

the analytes in each sample was determined by measuring the peak areas and comparing them with those obtained for reference solutions of epicatechin and catechin. *Ent*-epicatechin identified in the samples were quantified by using the calibration curve of its enantiomer, epicatechin, since the response for enantiomers is the same in PAD. Although the chromatographic method described in this work deals with both catechin and epicatechin enantiomers, only epicatechin, catechin and *ent*-epicatechin were found in *Byrsonima* species extracts and infusions.

RESULTS AND DISCUSSION

Chiral Separations and Identification of the enantiomers

Four chiral compounds, *ent*-catechin, catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin (Fig. 1) were separated in this study using a Chiralcel OD-H column at room temperature. For the separation of these substances, various proportions of mixtures of *n*-hexane with some alcohol (2-propanol, ethanol and *t*-butanol) with flow rate of 0.5 ml min⁻¹ have been tested. The best results were obtained when using ethanol doped with 0.1% of TFA (Fig. 2). The mixture of *n*-hexane/ethanol (75: 25, v/v) doped with 0.1% of TFA (pH 4) showed good resolution between each enantiomeric pair in a shorter analysis time when compared to the other alcohols tested. The resolution (R_s) obtained for epicatechin and *ent*-epicatechin was 5.0 while 0.80 was obtained for *ent*-catechin and catechin (Table II).

(Fig. 2)

(Table II)

Several methods for the separation of catechin and epicatechin enantiomers using chiral capillary electrophoresis^{25,26,27,28} as well as chiral HPLC with electrochemical, fluorescence and PAD detectors have been reported^{29,30,13}. The method described here presented resolution for both catechin and epicatechin antipodes similar to those cited above, however the main advantages of the present method are the use of a CD detector coupled with the HPLC-PAD system and the simultaneous detection of the four catechin diastereomers in the same chromatographic run. HPLC-PAD-CD coupling gives higher sureness regarding the identification of these compounds in complex mixtures, such as plant extracts.

The catechin diastereomers were identified by analyzing their UV and CD spectra. The catechin derivatives have two aromatic chromophores: the benzenoid rings

A (A-ring) and B (B-ring), with bands of absorption around 280 nm and 240 nm, respectively. CD data indicate that 2*R* and 2*S* absolute configurations give rise to negative and positive Cotton Effects (CE), respectively, for the chromophore A (1L_b transition)^{31,32,33}. For the 1L_a transition (chromophore B), negative and positive CEs characterize absolute configurations 3*S* and 3*R*, respectively. Additionally, regarding to catechin, these effects are observed at 227 nm when the experiment is carried out in methanol³⁴ (Fig. 3). Therefore, it was possible to establish the elution order of catechin and epicatechin enantiomers in the tested conditions as: 1 – *ent*-catechin (t_R = 13.0 min), 2 – catechin (t_R = 14.1 min), 3 – epicatechin (t_R = 22.0 min) and 4 – *ent*-epicatechin (t_R = 40.2 min) (Fig. 3).

(Fig. 3)

Parameters evaluated

Linearity and sensitivity

The linearity to the PAD was investigated at the wavelength of 220 nm for both catechin (C) and epicatechin (EC) by selecting the ranges of calibration according to the amount of these analytes in the investigated samples. The experimental results of the curves were submitted to Huber Test for rejection of those anomalous; by using $k = 2$, there was a need for rejection of the values 3 for catechin and 3 values for epicatechin, and the correlation coefficients (r^2) were within 0.992 and 0.995, respectively. The limits of detection (LOD – 0.77 for C and 0.42 for EC) and quantification (LOQ – 2.32 for C and 1.27 for EC) were calculated according to Eurachem. The linear ranges were within 2.32–100.0 and 1.27–100.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for catechin and epicatechin, respectively. Five injections were made for each solution and the peak area (response, y) of each analyte was plotted against its concentration (c) in $\mu\text{g ml}^{-1}$ in order to obtain the calibration curve with seven data points (1, 2, 5, 10, 20, 50 and 100 μg to C and EC/ml; $y = 392872.04176c + 66099.56619$ for C and $y = 372426.3894c - 1917.03676$ for EC).

Selectivity

Selectivity was evaluated by comparing the retention time (t_R) of each standard reference compound with that of the peaks obtained by analyzing real extracts and infusions from *Byrsonima* species; further confirmations of the peaks identity were provided by spiking experiments (Fig. 4) and comparison with UV and CD spectra recorded. The difference in the retention time of *ent*-EC in *Byrsonima basiloba*

compared to the other species is probably due to the matrix effect. The UV and CD spectra were obtained at the range of 200–400 nm and 220–420 nm, respectively.

Repeatability

Inter-day and intra-day precision of retention times were determined by ten injections of the methanolic extracts of each species spiked with 20 µg ml⁻¹ of catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin. The intra-day precision was evaluated for three different days. The results were within 0.3 and 3.8 % for the intra-day experiment and within 2.0 and 4.8 % for the inter-day one.

Accuracy and precision

The accuracy of the method was investigated by recovery studies. Samples of powdered *Byrsonima* species (1.0 g) were spiked with aliquots containing 10 µl, 250 µl and 500 µl of the standard solution and subjected to the extraction procedure as described in the *Sample preparation* section. The total amount of the analytes was determined and compared with those obtained by analyzing blank samples in order to evaluate the recovery percentage. The recovery was ranged within 70.0–110.2% with precision lower than 4.2 (Table III).

(Table III)

Analysis methanolic extracts and infusions of *Byrsonima* species

Methanolic extracts and infusions from the leaves of five *Byrsonima* species were analyzed (Fig. 4). Only in *B. coccolobifolia* species it was not possible to observe the presence of catechins and epicatechins. Nevertheless, in the other four species analyzed, it was possible to observe that the methanolic extracts showed higher amounts of catechins than infusions per gram of leaves. *B. verbascifolia* showed higher concentration of catechin diastereomers followed by *B. basiloba*, *B. crassa* and *B. intermedia* (Table IV).

An interesting result was the presence of *ent*-epicatechin in leaves of four *Byrsonima* species since such substance is uncommon in nature.

(Table IV)

(Fig. 4)

Preservation of catechins from epimerisation during extraction

Individual catechins undergo C-2 epimerisation at high temperatures. Catechins with 2*R*,3*R* configuration, i.e. 2,3-*cis* form, give higher levels of conversion to their corresponding epimer than do catechins with 2*R*,3*S* configuration, i.e. 2,3-*trans* form. This is thought to be due to the difference in the stereochemistry: *trans*-forms, in general, are more stable than *cis*-forms^{13,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46}. Thus, the optimized extraction conditions (*Sample preparation* section) were tested on catechin and epicatechin standards.

The extraction with methanol did not show any decrease in the amount of each standard analyzed. However, the preparation of infusions showed a decrease in the concentration of epicatechin, followed by the detection of little amount of substances eluted in the dead volume of chiral column. This finding is in accordance with the data previously reported by Ito and collaborators wherein degradation of catechins in green tea preparations was observed both after heat-treatment and storage while almost no epimerisation was reported for samples not submitted to thermal treatment¹³.

The aim of this test was to verify the authenticity of the qualitative data analysis since the results showed the presence of the unusual compound *ent*-epicatechin in the leaves of *Byrsonima* species. Therefore, the results indicated that the *ent*-epicatechin is not an artifact because extraction with methanol did not result in epimerisation of the standards tested. Additionally, although the use of TFA during chromatography could have induced epimerisation, it was not observed for the standards tested as well. This result is in accordance with the identification of an *ent*-epicatechin dimer isolated from *Byrsonima crassifolia* species²³.

CONCLUSION

This work describes a direct separation of catechin, *ent*-catechin, epicatechin and *ent*-epicatechin obtained in normal phase HPLC mode using PAD and CD as detectors, Chiralcel OD-H as chiral stationary phase and *n*-hexane/ethanol with 0.1% of TFA as mobile phase. The method is sensitive enough for the analysis of the four catechin diastereomers, with limits of quantification according to the Eurachem and ANVISA (Brazil) Legislation. Good levels of accuracy and precision were obtained for catechin and epicatechin. Also, good results were obtained with respect to repeatability (relative standard deviation - RSD < 4.8%) and recovery (70.0–110.2%). The method

was applied to five *Byrsonima* species in two different types of matrices, methanolic extract and infusion. In the leaves of *B. coccolobifolia* species it was not possible to observe the presence of catechins and epicatechins. The *B. verbascifolia* species showed the highest concentration of catechin diastereomers when compared to the other *Byrsonima* species (Table IV). The method was successfully applied to the analysis of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species. The optimized procedure could also be employed for the separation of catechin diastereomers in other plant extracts or teas. Over the last several decades a number of methods and techniques have been developed for the analysis of chiral compounds by scientific researchers from a number of disciplines. The direct chromatographic approach has dominated this field of investigation with resolution being achieved through chiral polymer phases of oligosaccharides and their derivatives, especially in natural products. Indirect derivatization methods have been very limited and mostly observational⁴⁷. Obviously, the concern in the study of enantiomers in drugs or phytodrugs has been increased, especially after the tragic case of thalidomide. Further studies are in progress to extend the application of the developed methodology to determine the enantiomeric purity of other chiral compounds in plant extracts.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for funding and fellowships to D. Rinaldo, J. M. Batista Jr. and C. M. Rodrigues, to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants to W. Vilegas.

LITERATURE CITED

1. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 1996; 44:3426–3431.
2. Shu-Wen H, Edwin NF. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *J Agric Food Chem* 1997; 45:3033–3038.
3. Deng Z, Tao B, Li X, He J, Chen Y. Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood triglycerides, and antioxidation on aged rats. *J Agric Food Chem* 1998; 46:3875–3878.
4. Pietta P, Simonetti P, Mauri P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J Agric Food Chem* 1998; 46:4487–4490.

5. Dulloo AG, Duret C, Rohrer D, Girardier L, Mensi N, Fathi M, Chantre P, Vandermander J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 1999;70:1040–1045.
6. Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition* 2001;131:2248–2251.
7. Constable A, Varga N, Richoz J, Stadler RH. Antimutagenicity and catechin content of soluble instant teas. *Mutagenesis* 1996, 11:189–194.
8. Weyant MJ, Carothers AM, Dannenberg AJ, Bertagnolli MM. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+ mouse. *Cancer Res* 2001;61:118–125.
9. Ferreira D, Slade D, Marais JPI. Flavans and Proanthocyanidins. In: Andersen ØM, Markham KR, editors. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2006. P 553-615.
10. Nyfeler F, Moser UK, Walter P. Stereospecific effects of (+)- and (–)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1983;763:50-57.
11. Tsuchiya H. Stereospecificity in membrane effects of catechins. *Chem Biol Interact* 2001;134:41–54.
12. Dewick PM. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley & Sons; 2002. 507 p.
13. Ito R, Yamamoto A, Kodama S, Kato K, Yoshimura Y, Matsunaga A, Nakazawa H. A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chem* 2003;83:563-568.
14. Aguiar RM, David JP, David JM. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry* 2005;66:2388–2392.
15. Silva SR, Silva AP, Munhoz CB, Silva Jr. MC, Medeiros MB. *Guia de Plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros*. Brasília: WWF; 2001. 132 p.
16. Heinrich M, Rimpler H, Antionio Barrera N. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic Evaluation. *J Ethnopharmacol* 1992;36:63-80.
17. Sannomiya M, Fonseca VB, da Silva MA, Rocha LRM, dos Santos LC, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS, Vilegas W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J Ethnopharmacol* 2005;97:1-6.

18. Cardoso CRP, Cólus IMS, Bernardi CC, Sannomiya M, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology* 2006;225:55-63.
19. Lira WM, dos Santos FV, Sannomiya M, Rodrigues CM, Vilegas W, Varanda EA. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *J Med Food* 2008;11:111-119.
20. Sannomiya M, Cardoso CRP, Figueiredo ME, Rodrigues CM, dos Santos LC, dos Santos FV, Serpeloni JM, Cólus IMS, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 2007;112:319-326.
21. Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Lunam LC, Gutiérrez MNM, García-Argáez NA. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharmacol* 1999;66:79-82.
22. Sannomiya M, Michelin DC, Rodrigues CM, Santos LC, Salgado HRN, Hiruma-Lima CA, Brito ARSM, Vilegas W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. *J Basic Appl Pharm Sci* 2005;26:71-75.
23. Geiss F, Heinrich M, Hunkler D, Rimpler H. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry* 1995;39:635-643.
24. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC Method Development. New York: John Wiley & Sons; 1997. 765 p.
25. Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J Chromatogr A* 2009;doi:10.1016/j.chroma.2009.07.030
26. Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *Eur Food Res Technol* 2007;225:569-577.
27. Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R. (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. *Molecules* 2007;12:1274-1288.
28. Gotti, R, Furlanetto S, Pinzauti S, Cavrini B. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 2006;1112: 345-352.
29. Yang B, Arai K, Kusu F. Determination of Catechins in Human Urine Subsequent to Tea Ingestion by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Anal Biochem* 2000;283:77-82.
30. Cooper KA, Campos-Giménez E, Alvarez DJ, Nagy K, Donovan JL, Williamson G. Rapid Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography Analysis of the Major Cocoa Polyphenols and Inter-relationships of their Concentrations in Chocolate. *J Agric Food Chem* 2007;55:2841-2847.

31. Van Rensburg H, Steynberg PJ, Burge JFW, Van Heerden PS, Ferreira D. Circular dichroic properties of flavan-3-ols. *J Chem Res* 1999;7:450-451.
32. Reinier JJ, Van Rensburg NH, Van Heerden PS, Ferreira, D. Stereoselective synthesis of flavonoids. part 8. Free phenolic flavan-3-ol diastereoisomers. *J Chem Res* 1999;10:606-607.
33. Slade D, Ferreira D, Marais JPI. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* 2005;66:2177-2215.
34. Korver O, Wilkins C. Circular dichroism spectra of flavonols. *Tetrahedron* 1971;27:5459-5465.
35. Freudenberg K. Chemistry of catechin and flavan. *Festschr. Arthur Stoll* 1957; 199-202.
36. Mehta PP, Whalley WB. The stereochemistry of some catechin derivatives. *J Chem Soc* 1963;5327-5332.
37. Anirudhan CA, Mathieson DW, Whalley WB. A novel rearrangement in the catechin series. *Proceedings of the Chemical Society* 1964;84-85.
38. Anirudhan CA, Mathieson DW, Whalley WB. A novel rearrangement in the catechin series. *J Chem Soc* 1966;6:634-636.
39. Kiatgrajai P, Wellons, JD, Lawrence G, White JD. Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. *J Org Chem* 1982;47:2910-2912.
40. Delcour JA, Ferreira D, Roux DG. Synthesis of condensed tannins. Part 9. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)- catechin and with the resultant procyanidins. *J Chem Soc* 1983;8:1711-1717.
41. Kennedy JA, Munro MHG, Powell HKJ, Porter LJ, Foo, LY. The protonation reactions of catechin, epicatechin and related compounds. *Aust J Chem* 1984;37:885-892.
42. Wang H, Helliwell K, You X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chem* 1999;68:115-121.
43. Wang H, Helliwell K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chem* 2000;70:337-344.
44. Chen ZY, Zhu QY, Tsang D, Huang YJ. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *Agric Food Chem* 2001;49:477-482.
45. Stach D, Schmitz OJ. Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 2001;924:519-522.

46. Suzuki M, Sano M, Yoshida R, Degawa M, Miyase T, Maeda-Yamamoto M. Epimerization of tea catechins and *O*-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate: relationship between epimerization and chemical structure. J Agric Food Chem 2003;51:510-514.
47. Yáñez JA, Andrews PK, Davies NM. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. J Chromatogr B 2007;848:159–181.

TABLE I. Collection data of *Byrsonima* species

Species	Local (City-State)	Date (month/year)	Voucher specimens
<i>B. basiloba</i>	Pratânia-SP	12/2005	24163 (BOTU) ^a
<i>B. cocolobifolia</i>	Itirapina-SP	02/2006	1397 (UEC) ^b
<i>B. crassa</i>	Porto Nacional-TO	12/2005	6398 (HUTO) ^c
<i>B. intermedia</i>	Pratânia-SP	01/2006	24164 (BOTU) ^a
<i>B. verbascifolia</i>	Porto Nacional-TO	12/2007	481 (HUTO) ^c

^a Herbarium of São Paulo State University^b Herbarium of São Paulo State University of Campinas^c Herbarium of the University of Tocantins

TABLE II. Chiral separations of catechin and epicatechin enantiomers on the Chiralcel OD-H[®] column

Mobile Phase	Catechin				Epicatechin			
	k_1^a	k_2^a	$\alpha_{1,2}^a$	$R_{s1,2}^a$	k_3^a	k_4^a	$\alpha_{3,4}^a$	$R_{s3,4}^a$
<i>n</i> -Hex/ <i>t</i> -BuOH ^b	1.74	2.21	1.27	0.6	5.25	7.50	1.43	1.3
<i>n</i> -Hex/EtOH ^c	1.46	1.67	1.14	0.8	3.16	6.61	2.09	5.0
<i>n</i> -Hex/2-PrOH ^d	2.50	2.82	1.13	0.8	5.26	10.9	2.07	5.2

^a k is the retention factor for $V_0 = 2,64$ mL and $t_0 = 5,28$ min; α is separation factor; R_s is resolution factor.

^b *n*-Hex/*t*-BuOH: *n*-hexane/*t*-butanol (60:40, v/v) doped with 0.1% of TFA;

^c *n*-Hex/EtOH: *n*-hexane/ethanol (75:25, v/v) doped with 0.1% of TFA (pH 4);

^d *n*-Hex/2-PrOH: *n*-hexane/2-propanol (75:25, v/v) doped with 0.1% of TFA.

TABLE III. Accuracy data (recovery) for catechin and epicatechin standards (n=5).

Analyte	Recovery $\pm$ RSD%			
	Methanolic extract		Infusion	
	Catechin	Epicatechin	Catechin	Epicatechin
<i>B. basiloba</i>	88.6 $\pm$ 1.0	83.7 $\pm$ 0.7	80.1 $\pm$ 0.8	70.6 $\pm$ 1.0
<i>B. cocolobifolia</i>	85.9 $\pm$ 0.8	80.0 $\pm$ 0.5	81.0 $\pm$ 2.4	74.3 $\pm$ 1.2
<i>B. crassa</i>	89.2 $\pm$ 4.2	100.7 $\pm$ 2.3	83.8 $\pm$ 3.5	83.5 $\pm$ 1.3
<i>B. intermedia</i>	81.0 $\pm$ 0.6	78.9 $\pm$ 1.1	83.2 $\pm$ 3.5	73.3 $\pm$ 4.1
<i>B. verbascifolia</i>	110.2 $\pm$ 1.2	75.0 $\pm$ 0.3	85.6 $\pm$ 0.9	70.0 $\pm$ 3.3

TABLE IV. Content of methanolic extrates and infusions of leaves of *Byrsonima* species.

<i>Byrsonima</i> species	Analytes ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a $\pm$ RSD%					
	Methanolic extract			Infusion		
	C ^b	ent-EC ^b	EC ^b	C ^b	ent-EC ^b	EC ^b
<i>B. basiloba</i>	3610.2 $\pm$ 0.3	377.9 $\pm$ 0.8	193.6 $\pm$ 0.1	2213.9 $\pm$ 0.6	162.1 $\pm$ 0.9	252.1 $\pm$ 0.1
<i>B. coccolobifolia</i>	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c
<i>B. crassa</i>	1279.0 $\pm$ 0.5	322.1 $\pm$ 0.3	224.2 $\pm$ 0.2	1139.1 $\pm$ 0.9	371.2 $\pm$ 0.2	471.6 $\pm$ 0.5
<i>B. intermedia</i>	519.9 $\pm$ 0.8	197.2 $\pm$ 0.9	193.8 $\pm$ 0.4	425.8 $\pm$ 0.3	207.0 $\pm$ 0.3	197.9 $\pm$ 0.6
<i>B. verbascifolia</i>	4277.8 $\pm$ 0.9	725.9 $\pm$ 0.7	148.3 $\pm$ 0.1	2370.8 $\pm$ 0.6	374.8 $\pm$ 0.2	< LOQ ^d

^a The concentration data of analytes were shown as means (n=5) in μg of analytes per g of leaves;^b C: catechin; EC: epicatechin;^c ND: Not detected;^d Lower Limit of Detection (LOQ).

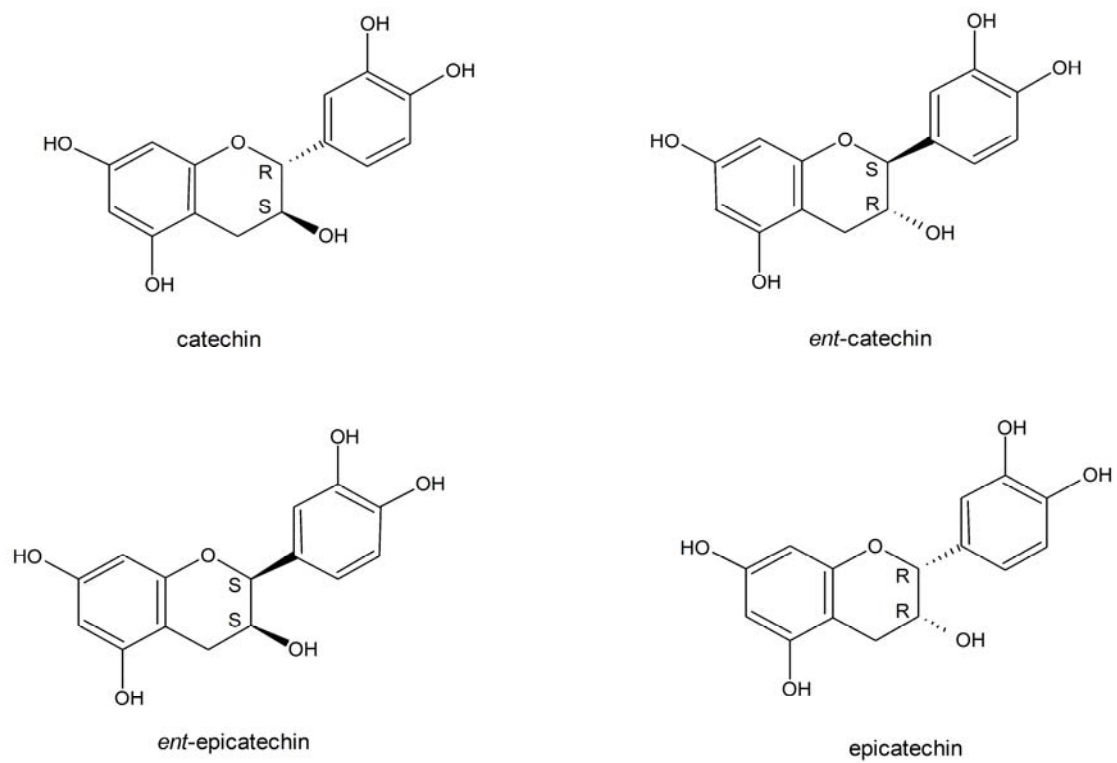


Fig. 1. Chemical structures of catechin and epicatechin enantiomers.

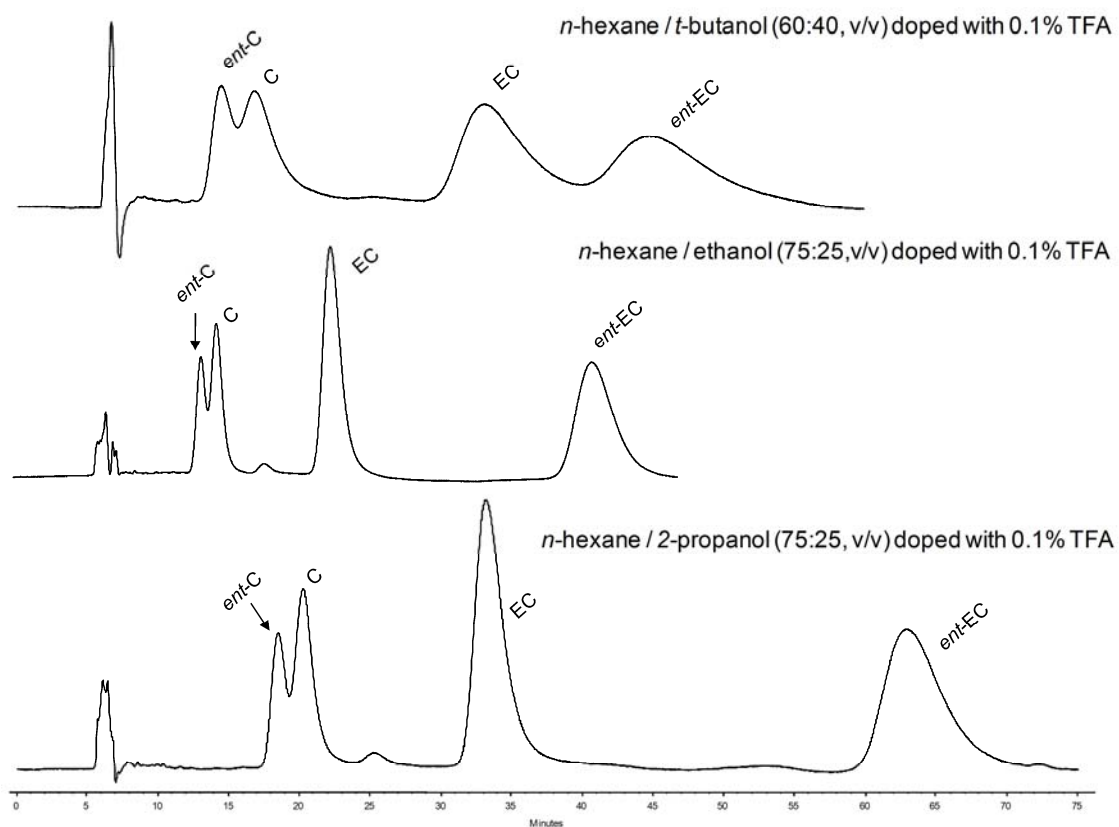


Fig. 2. Chromatograms showing the separation of catechin (C) and epicatechin (EC) enantiomers under different conditions; monitored at 220 nm with PDA using Chiralcel OD-H column with flow rate of 0.5 ml min⁻¹.

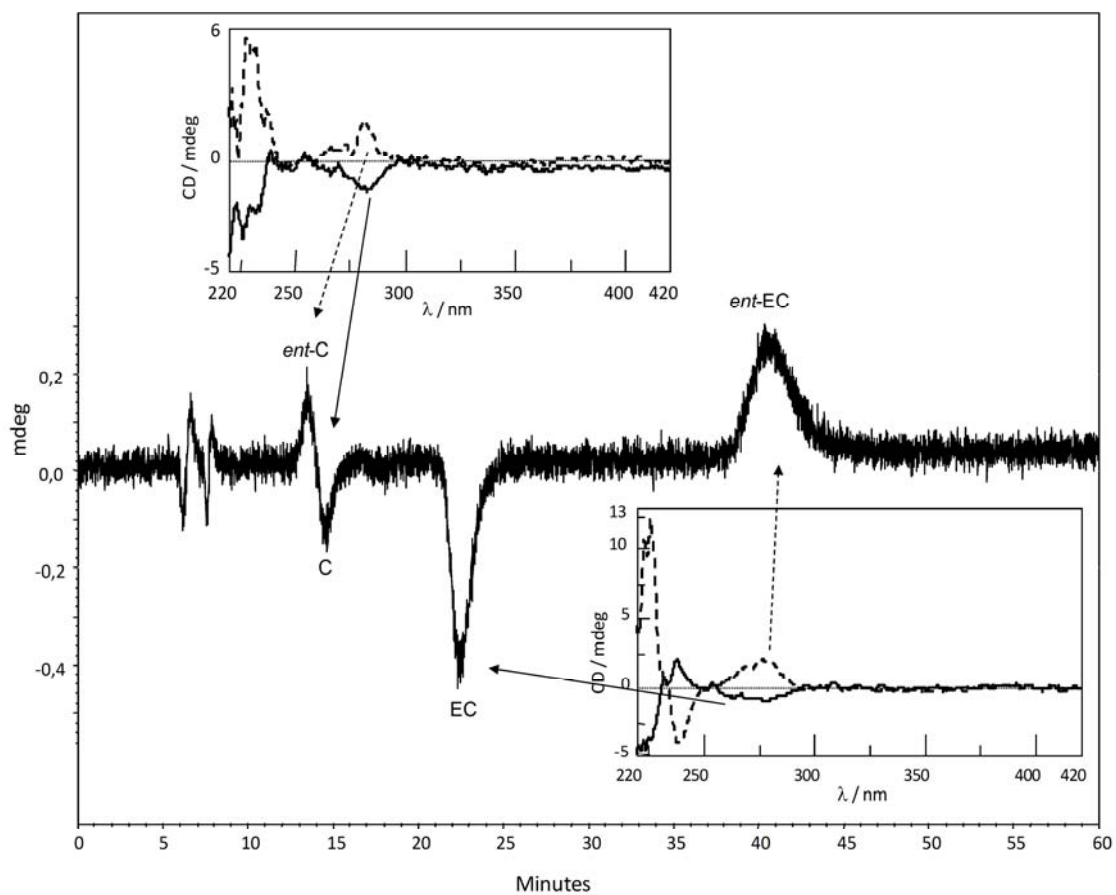


Fig. 3. Chromatogram showing the separation of catechin (C) and epicatechin (EC) enantiomers monitored with CD detector at 280 nm and their CD spectra in *n*-hexane/ethanol (75:25, v/v) doped with 0.1% of TFA (pH 4) on the Chiralcel OD-H column with flow rate of 0.5 ml min⁻¹.

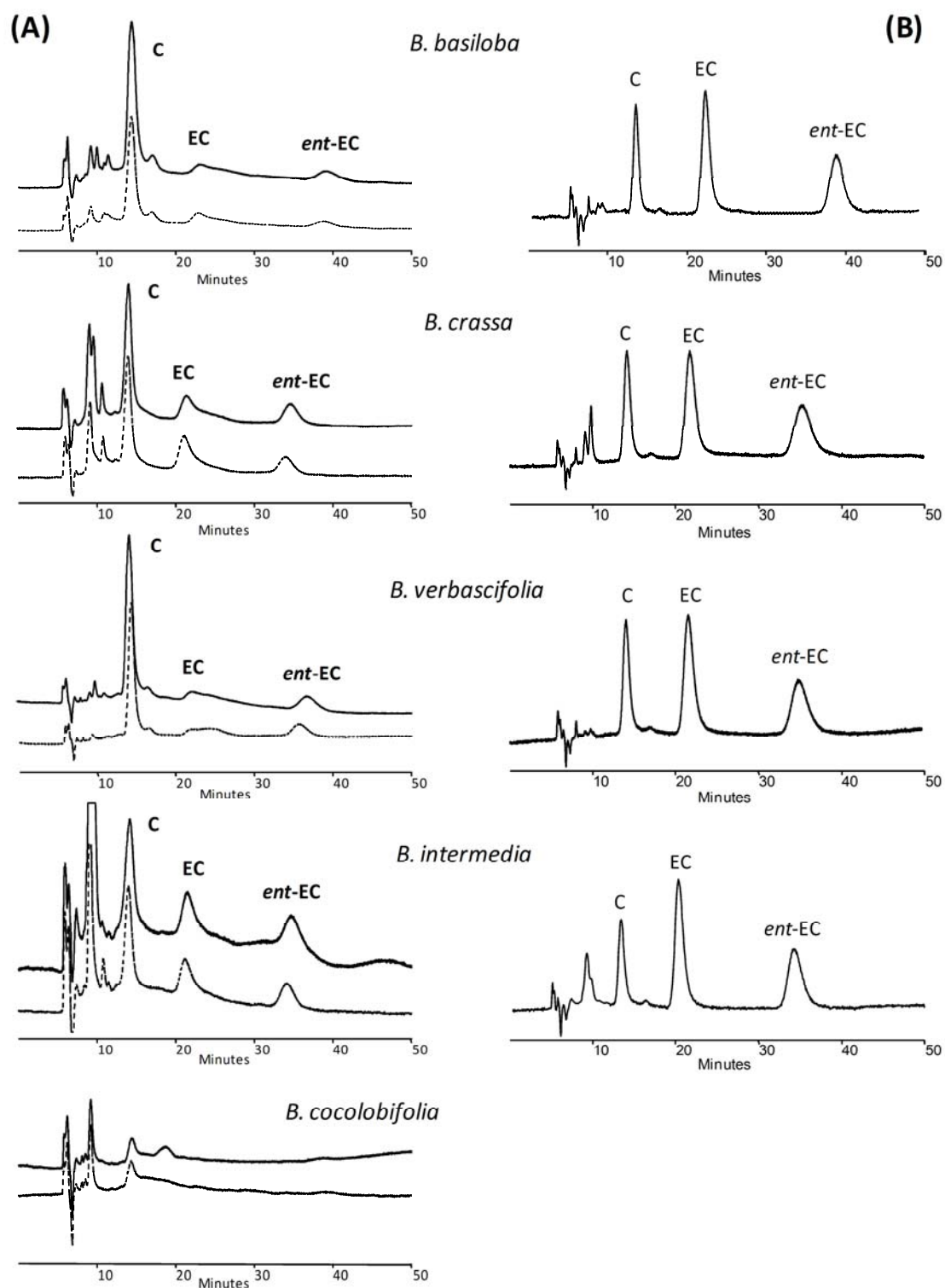


Fig. 4. Chromatograms of the methanolic extracts (solid line) and infusions (dashed line) from the leaves of *Byrsonima* species (A) and chromatograms of the methanolic extracts spiked with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of C, EC and ent-EC (B); isocratic elution using *n*-hexane/ethanol (75:25, v/v) doped with 0.1% of TFA (pH 4) on the Chiralcel OD-H column, with flow rate of 0.5 ml min⁻¹, monitored at 220 nm using PAD. C: catechin, EC: epicatechin; ent-EC: ent-epicatechin.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)