

PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS POLARES DAS FOLHAS, GALHOS E CASCAS DE *Copaifera multijuga* HAYNE (COPAÍBA MARI-MARI DA AMAZÔNIA) POR ESI-EM

Davi S. Oliveira^a, Leandro S. Lima^a, Ananda S. Antonio^a, Larissa S. M. Wiedemann^a e Valdir F. Veiga-Junior^{a,b,*} 

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, 69079-00 Manaus – AM, Brasil

^bDepartamento de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Urca, 22290-270 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 03/06/2019; aceito em 23/09/2019; publicado em 02/10/2019

METABOLIC PROFILE OF THE POLAR EXTRACTS OF THE LEAVES, BRANCHES AND BARKS OF *Copaifera multijuga* HAYNE (COPAÍBA mari-mari AMAZÔNIA) BY ESI-MS. *Copaifera multijuga* Hayne is the main species of the genus in the Amazon region, being exploited for copaiba oil production mainly because of its therapeutic properties. The plant parts (leaves, branches, and barks) are widely used in folk medicine. However, they are little explored in terms of chemical composition. In this study, the polar extracts of leaves, branches, and barks of the species were analysed by direct infusion in ESI-MS with the aid of reference standards and MS² fragmentation experiments. Twenty-six substances (carboxylic acids, flavonoids, condensed tannins, a diterpene and fifteen isomers of galloylquinic acids) were detected. Metabolic profiles were similar between extracts of leaves and branches, especially with the detection of galloylquinic acids and carboxylic acids. In bark extract, condensed tannins epicatechin-(4 β -8)-epiafzelechin (dimer) and epicatechin-(4 β -8)-epiafzelechin-(4 β -8)-epiafzelechin (trimer) were detected. The PCA showed differences and similarities in the chemical composition of the copaiba mari-mari extracts. Thus, galloylquinic acids and flavonoids kaempferol, 7-*O*-methyl-kaempferol, quercetin-3-*O*-L-pentoside, and quercetin-3-*O*-L-rhamnoside are described for the first time in *C. multijuga*. The phytotherapeutic properties of teas of the plant parts of the species may be associated with the suggested polyphenols.

Keywords: *Copaifera multijuga*, Copaiba, Metabolomic, Amazonia, Mass Spectrometry.

INTRODUÇÃO

Copaifera multijuga Hayne (Fabaceae), popularmente conhecida como copaibeira, pau d'óleo, copaíba mari-mari ou copaíba da folha pequena, encontra-se distribuída entre os estados do Amazonas e Pará, sendo considerada a principal espécie do gênero *Copaifera* na Amazônia.¹ Há registros de sua ocorrência também nos estados da Bahia, Mato Grosso e Acre, alcançando o Peru e a Bolívia.^{1,2} A espécie é reconhecida por suas propriedades medicinais, principalmente devido ao óleo-resina, um fitoterápico natural utilizado na medicina popular para o tratamento de doenças urinárias, respiratórias, cutâneas e inflamatórias.^{1,3} O óleo-resina é rico em sesquiterpenos tais como, β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -copaeno, α -humuleno e γ -muuroloeno, bem como nos ácidos diterpênicos eperúico, agático, pinifólico, copálico e derivados, entre outros.^{1,3} Os chás das folhas e cascas do caule de *C. multijuga* são muito utilizados na medicina popular e podem ser preparados por infusão ou decocção para tratar doenças gástricas, digestivas e respiratórias.⁴ Embora a espécie apresente enorme potencial fitoterápico, pouco se conhece em relação à sua composição química.

A maior parte dos conhecimentos químicos e farmacológicos de extratos do gênero (sem contar a oleoresina) se concentram na espécie *C. langsdorffii* Desf., que é típica do Cerrado.² Sua composição destaca-se pela presença de substâncias fenólicas, como os 16 ácidos galolilquínicos descritos para os extratos de suas folhas,⁵ formando um grupo diversificado de mono-, di- ou tri-ésteres de ácido quínico nas variedades estruturais correspondentes aos ácidos gálico e 3-*O*-metil-gálico. Os ésteres de ácido quínico apresentam isomeria de posição entre os carbonos C3, C4 e C5 na cadeia do

ácido quínico. Os glicosídeos quercetina-3-*O*-L-ramnosídeo e canferol-3-*O*-L-ramnosídeo são derivados da estrutura da flavona e são considerados substâncias marcadoras das folhas desta espécie.⁶⁻⁹ A quercetina pode ser encontrada em outras formas de glicosídeos como a quercetina-3-*O*-L-glicosídeo e a quercetina-3-*O*-rutosídeo, identificados nos frutos dessa espécie.¹⁰ Os ácidos cumárico, cinâmico, benzóico e gálico, e derivados de catequinas, como: epicatequina galato, epicatequina e catequina nas formas diméricas epicatequina-(4 β -8)-catequina e epicatequina-(4 β -8)-epicatequina e os diterpenos nivenolídeo e os ácidos *ent*-caurenóico e poliáltico também foram descritos em extratos dos frutos da espécie.^{10,11}

Em estudos realizados com os extratos das cascas de *C. multijuga* foram observadas propriedades antioxidantes e redução do estresse oxidativo induzido por paracetamol e o efeito antineoplásico em células tumorais de Ehrlich em testes *in vitro* e *in vivo*.¹² As atividades antioxidantes podem estar relacionadas com a presença de polifenóis, como taninos condensados nas formas de dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina e trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina sugeridos por experimentos de espectrometria de massas.¹² Os usos medicinais das plantas nativas estão relacionados com a presença das substâncias fenólicas que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e gastroprotetoras, as quais proporcionam efeitos benéficos à saúde na prevenção contra radicais livres e doenças cancerígenas.^{7,12}

A presença de polifenóis potencialmente ionizáveis descritos nos extratos das espécies de *Copaifera* estimulam os estudos de definição do *fingerprint* em análises com inserção direta em espectrômetro de massas (EM) utilizando a ionização por electrospray (ESI) associada aos experimentos de fragmentação MS² induzida por colisão, abordagem que tem se mostrado eficiente em estudos preliminares da composição química.¹³ O experimento de fragmentação MS² com analisador triplo

*e-mail: valdir.veiga@gmail.com

quadropolo (QqQ) permite caracterizar parcial e integralmente os metabólitos de um extrato a partir de seus íons moleculares e respectivos fragmentos.¹⁴ As substâncias fenólicas são eficientemente ionizadas por meio da fonte ESI, transferidas para a fase gasosa e detectadas em modo negativo como íons $[M-H]^-$. A técnica exige pouca quantidade de amostra (mg), preparação simples, é rápida, altamente seletiva e precisa na produção de informações sobre as substâncias potencialmente ionizáveis.¹⁵ A interpretação dos dados espectrais obtidos por ESI-MS e o reconhecimento de padrões em análises estatísticas multivariadas estão cada vez mais presentes nos tratamentos dos dados, sendo a Análise de Componentes Principais (PCA) uma das técnicas mais empregadas, permitindo a distribuição das amostras em um plano bidimensional de acordo com o grau de importância das variáveis.¹⁶

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a composição química de diferentes extratos obtidos das partes vegetais de *C. multijuga*, principal espécie de copaíba da Amazônia Central e Ocidental utilizando ESI-QqQ-EM, contribuindo para o conhecimento da composição química e a promoção da segurança no consumo das partes vegetais da espécie na medicina popular.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal, extração e padrões de referência

As partes vegetais (folhas, galhos e cascas) de *C. multijuga* foram coletadas na Reserva Florestal Ducke do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), em Manaus, AM, Brasil. A excisada do espécime foi depositada no herbário do INPA, sob o número INPA82.418. Ácido quínico, canferol e quercetina-3-O-L-ramosídeo foram obtidos da *Sigma Aldrich* (EUA). O ácido *ent*-agáctico foi obtido e identificado em estudos anteriores do grupo de pesquisa Q-Bioma na Universidade Federal do Amazonas com o óleo-resina da espécie. O metanol grau P.A. (Tedia Brasil) foi utilizado como solvente extrator e grau HPLC (Tedia EUA) para as análises espectrométricas.

As folhas, galhos e cascas foram secos à temperatura ambiente, triturados e submetidos, separadamente, à extração por maceração em metanol P.A. por 48 horas, as soluções foram filtradas e os extratos foram concentrados em evaporador rotativo com o auxílio de vácuo. Secos, os extratos foram padronizados em soluções em metanol na proporção de 1 mg mL⁻¹. Alíquotas de 20 µL foram separadas e avolumadas para 1000 µL para os experimentos espectrométricos.

Experimentos em espectrômetro de massas de varredura completa e fragmentação MS²

Os experimentos foram realizados em espectrômetro de massas de LCQ-Fleet (*ThermoScientific*, CA, EUA) equipado com uma fonte de ESI com analisador QqQ, operando em modo negativo de detecção. Os espectros de massas foram adquiridos e processados usando o software fornecido pelo fabricante (*Xcalibur 2.1*). As condições típicas do equipamento foram as seguintes: voltagem do capilar em 30 V, voltagem de pulverização de 5,0 kV, temperatura do capilar a 275 °C, gás de revestimento nitrogênio. Os experimentos de varredura completa e a fragmentação MS² foram realizadas por inserção direta utilizando uma bomba de seringa a uma vazão de 15 µL min⁻¹. A varredura foi realizada na faixa de *m/z* 100-1000 e os íons precursores $[M-H]^-$ com intensidades relativas superiores a 10% foram selecionados para a fragmentação MS². A energia de colisão relativa foi padronizada em 30 V.

Análise quimiométrica de dados

PCA foi realizada usando o software *ChemoFace*. As intensidades relativas normalizadas dos íons sugeridos nas partes vegetais

constituíram o conjunto de dados multivariados que foi interpretado pela PCA. O pré-processamento dos dados foi realizado por meio do auto-escalonamento por norma suprema, com o objetivo de reduzir a influência de variações indesejáveis no conjunto de dados. Foi criada uma matriz de dados (3 linhas – 16 colunas), 3 linhas correspondentes às 3 partes vegetais (folhas, galhos e cascas) e 16 colunas correspondentes às 16 substâncias sugeridas. A PCA mostrou a distribuição das partes vegetais e a importância das variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos das folhas, galhos e cascas de *C. multijuga* obtidos em metanol contendo misturas complexas das substâncias polares foram investigados. Considerando as classes fenólicas de interesse, o modo negativo de ionização em ESI-EM proporcionou resultados abrangentes com alta seletividade e sensibilidade para o perfil metabólico das partes vegetais, compreendendo uma grande variedade de substâncias fenólicas, pois são facilmente desprotonadas devido ao caráter ácido e transferidas para a fase gasosa como íons $[M-H]^-$.¹⁵ Os perfis metabólicos foram similares entre os extratos das folhas e dos galhos e ambos foram diferentes do perfil do extrato das cascas da *C. multijuga*. Os principais íons precursores observados nos extratos das folhas, galhos e cascas de *C. multijuga* foram fragmentados e os perfis de fragmentação foram confrontados com dados da literatura e com os padrões de referência.

Perfis de fragmentação MS² das substâncias detectadas nas partes vegetais

A partir dos perfis de fragmentação obtidos por ESI-QqQ-MS foram sugeridos ácidos galoilquímicos, flavonóides e um diterpeno na composição química dos extratos das folhas e galhos, e no extrato das cascas a presença dos taninos condensados. Os dados da fragmentação MS² dos íons sugeridos estão dispostos da Tabela 1.

Os íons precursores *m/z* 133, 195 $[M-H]^-$, corresponderam às formas desprotonadas do ácido málico (MM: 134) e ácido glucónico (MM: 196). A fragmentação MS² do íon precursor *m/z* 133 induziu a formação do íon fragmento *m/z* 115 $[M-H_2O-H]^-$ resultado da perda de H₂O. O íon fragmento *m/z* 71 $[M-H_2O-CO_2-H]^-$ surgiu da perda simultânea de H₂O e CO₂ e a descarboxilação direta do íon precursor gerou o íon fragmento *m/z* 89 $[M-CO_2-H]^-$.¹⁷ A fragmentação MS² do íon precursor *m/z* 195 levou ao íon fragmento *m/z* 177 $[M-H_2O-H]^-$ resultado da perda de H₂O. Outros íons fragmentos característicos foram detectados, como os íons *m/z* 119 $[M-C_2H_4O_3-H]^-$ e 75 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ provenientes do Rearranjo de *McLafferty* a partir do íon precursor.¹⁸ O ácido málico (*m/z* 133) e o ácido glucónico (*m/z* 195) foram detectados nas folhas e nos galhos de *C. multijuga*. O ácido málico e o ácido glucónico estão entre os principais ácidos orgânicos encontrados nas espécies leguminosas, são mais precisamente encontrados nas folhas e frutos e são utilizados como aditivos alimentares e para fins farmacológicos.^{19,20}

O íon precursor *m/z* 285 $[M-H]^-$ correspondeu ao flavonoide canferol (MM: 286) e o íon precursor 299 $[M-H]^-$ ao flavonoide 7-O-metil-canferol (MM: 300), ambos foram detectados apenas nos galhos de *C. multijuga*. A fragmentação MS² do íon precursor *m/z* 285 resultou nos íons fragmentos *m/z* 257 $[M-CO-H]^-$ e que originou-se da perda de CO, o íon fragmento *m/z* 229 $[M-2CO-H]^-$ que resultou da segunda perda consecutiva de CO e o íon fragmento *m/z* 268 $[M-OH-H]^-$ como resultado da perda do radical •OH a partir do íon precursor (*m/z* 285).²¹ A fragmentação MS² do íon precursor *m/z* 299 resultou na perda proeminente do radical •CH₃ gerando o íon fragmento *m/z* 284 $[M-CH_3-H]^-$ e a perda consecutiva do radical •CHO gerou o íon fragmento *m/z* 255 $[M-CH_3-CHO-H]^-$.²¹

Os íons precursores m/z 433 e 447 $[M-H]^-$ estão relacionados às formas desprotonadas de dois glicosídeos derivados da aglicona quercetina. A fragmentação MS^2 dos íons precursores m/z 433 e 447 $[M-H]^-$ resultaram em um íon fragmento comum m/z 301, característico da unidade de aglicona quercetina. O íon precursor m/z 433 ao fragmentar perdeu um grupo neutro característico de pentosídeo (-133 U), o qual sugeriu-se a quercetina-3-*O*-L-pentosídeo (MM: 434),²² sendo detectado apenas nos galhos de *C. multijuga*. A fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 447 $[M-H]^-$ revelou a perda de um grupo de ramnosídeo (-147 U), logo sugeriu-se a quercetina-3-*O*-L-ramnosídeo.²² A quercetina-3-*O*-L-ramnosídeo também foi identificada nas folhas de *C. langsdorffii* em diversos relatos na literatura, sustentando a presença dos demais derivados da aglicona como a quercetina-3-*O*-L-pentosídeo identificada na *C. multijuga*.⁶⁻⁹

Os flavonóides são importantes metabólitos secundários e desempenham nas plantas a função de proteger contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias.²³ São potenciais agentes terapêuticos e antioxidantes e exercem atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antivirais, além de agir nos sistemas imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso.^{23,24} As substâncias detectadas nos extratos de *Copaifera multijuga* (canferol, 7-*O*-metil-canferol, quercetina-3-*O*-L-pentosídeo e quercetina-3-*O*-L-ramnosídeo) podem estar associadas às propriedades terapêuticas dos chás em usos medicinais dessa planta, que incluem o tratamento de enfermidades e disfunções gástricas.

O íon precursor m/z 333 $[M-H]^-$ foi atribuído à forma desprotonada do diterpeno ácido *ent*-agático (MM: 334) em comparação

com o padrão. O principal fragmento detectado em MS^2 foi o íon m/z 289 $[M-CO_2-H]^-$ decorrente da perda de CO_2 . O ácido *ent*-agático faz parte da composição química do óleo-resina da *C. langsdorffii*,²⁵ *C. paupera*,²⁶ *C. reticulata*.²⁷ Este ácido diterpênico se destaca pelas atividades antileishmanial,²⁸ e anti-trypanosoma.²⁹

Os íons precursores m/z 191, 357, 495, 509, 523 e 689 $[M-H]^-$ foram atribuídos ao ácido quínico (MM:192) e os derivados ésteres do ácido quínico com os ácidos gálico e 3-*O*-metil-gálico, cujos serão considerados como ácidos galoilquínicos e foram detectados nos extratos das folhas e galhos de *C. multijuga*. Os ácidos galoilquínicos possuem como núcleo principal o ácido quínico, que pode ser esterificado por uma ou mais unidades de ácido gálico e/ou ácido 3-*O*-metil-gálico.⁵ As diferenças observadas nos perfis de fragmentação dos íons precursores originaram-se das variações nas perdas dos grupos galoil e/ou 3-*O*-metil-galoil ligados ao ácido quínico. Alguns íons detectados podem estar relacionados as diferentes séries dos ácidos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos. A partir dos experimentos de fragmentação MS^2 e as limitações do analisador QqQ, não foi possível estabelecer a caracterização completa dos ácidos galoilquínicos, uma vez que existem isômeros específicos para cada íon detectado de acordo com a Tabela 1.³⁰

O íon precursor m/z 191 $[M-H]^-$ correspondeu à forma desprotonada do ácido quínico (MM: 192), sendo um importante precursor na biossíntese dos ácidos fenólicos. A fragmentação MS^2 do íon precursor resultou no íon fragmento m/z 173 $[M-H_2O-H]^-$ relacionado à perda de H_2O . O íon fragmento m/z 129 $[M-C_2H_2O-H]^-$ resultou da segmentação *retro Diels-Alder* e a perda sequencial de CO_2 resultou

Tabela 1. Substâncias propostas para as partes vegetais de *C. multijuga* por ESI-QqQ-MS

FM	Modo Negativo de Ionização			Intensidade relativa (%)			Substâncias sugeridas
	MM	m/z $[M-H]^-$	MS^2 e íons fragmentos m/z	Folhas	Galhos	Cascas	
$C_4H_6O_5$	134	133	115, 89, 71	10,1	11,7	ND	Ác. málico ^b
$C_7H_{12}O_6$	192	191	173, 129, 85	76,4	43,3	ND	Ác. quínico ^a
$C_6H_{12}O_7$	196	195	177, 119, 75	28,2	11,1	ND	Ác. glucônico ^b
$C_{15}H_{10}O_6$	286	285	268, 257, 229, 243	ND	14,9	ND	Canferol ^a
$C_{16}H_{12}O_6$	300	299	284, 255	ND	25,3	ND	7- <i>O</i> -metil-canferol ^b
$C_{20}H_{30}O_4$	334	333	289	13,9	ND	ND	Ác. agático ^a
$C_{16}H_{20}O_9$	358	357	191, 183	46,8	38,6	ND	Ác. 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 4- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 5- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b
$C_{20}H_{18}O_{11}$	434	433	301	ND	12,4	ND	Quercetina-3- <i>O</i> -D-pentosídeo ^b
$C_{21}H_{20}O_{11}$	448	447	301	10,3	18,3	ND	Quercetina-3- <i>O</i> -L-ramnosídeo ^a
$C_{21}H_{20}O_{14}$	496	495	343; 191,169	12,3	ND	ND	Ác. 3,5-di- <i>O</i> -(galoil)-quínico ^b ; Ác. 3,4-di- <i>O</i> -(galoil)-quínico ^b ; Ác. 4,5-di- <i>O</i> -(galoil)-quínico ^b
$C_{22}H_{22}O_{14}$	510	509	357, 343, 191, 183, 169	ND	11,7	ND	Ác. 3- <i>O</i> -(galoil)-5- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 3- <i>O</i> -(galoil)-4- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 4- <i>O</i> -(galoil)-5- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-5- <i>O</i> -(galoil)-quínico ^b ; Ác. 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-4- <i>O</i> -(galoil)-quínico ^b ; Ác. 4- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-5- <i>O</i> -(galoil)-quínico ^b
$C_{23}H_{24}O_{13}$	524	523	357, 191, 183	100	94,8	ND	Ác. 3,5-di- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 3,4-di- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico ^b ; Ác. 4,5-di- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil galoil)-quínico
$C_{30}H_{26}O_{11}$	562	561	289	ND	11,1	100	Epicatequina-(4β-8)-epiafzelequina (dímero) ^b
$C_{31}H_{30}O_{18}$	690	689	523, 357, 191, 183	90,7	100	ND	Ác. 3,4,5-tri- <i>O</i> -(metil-3- <i>O</i> -galoil)-quínico ^b
$C_{45}H_{38}O_{16}$	834	833	561, 289	ND	18,2	97,3	Epicatequina-(4β-8)-epiafzelequina-(4β-8)-epiafzelequina (trímero) ^b

^aComparado com o padrão; ^b Comparado com dados da literatura; Os íons base estão em negrito; ND: Não detectado, MS^2 .

no íon fragmento m/z 85 $[M-C_2H_2O-CO_2-H]^-$.³¹ Já o íon precursor m/z 357 $[M-H]^-$ pode estar relacionado com a forma desprotonada do ácido 3-*O*-(3-*O*-metil-galoil)-quínico (estrutura 1, Figura 1). A fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 357 levou ao reconhecimento de íons fragmentos característicos, como o íon m/z 191 $[M-C_8H_6O_4-H]^-$ correspondendo a forma desprotonada ácido quínico decorrente da perda do grupo 3-*O*-metil-galoil (-166 Da) e o íon m/z 183 $[M-C_7H_{11}O_5-H]^-$ associado a forma desprotonada do ácido 3-*O*-metil-gálico decorrente da perda do radical quínico (-174 Da).^{5,30}

O íon precursor m/z 495 $[M-H]^-$ pode estar associado às formas desprotonadas dos três possíveis isômeros dos ácidos di-(galoil)-quínicos (Estruturas 2-4, Figura 1).^{5,30} A partir da fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 495 foi possível inferir duas perdas consecutivas de radicais galoil, o íon fragmento m/z 343 $[M-C_7H_5O_4-H]^-$ resultou da perda de um radical galoil (-152 Da) e o íon fragmento m/z 191 $[M-2C_7H_5O_4-H]^-$ resultou da perda do segundo radical galoil (-304 Da).^{5,30} A detecção do íon fragmento m/z 169 está associada a forma desprotonada do ácido gálico.

O íon precursor m/z 509 $[M-H]^-$ pode estar relacionado às formas desprotonadas dos seis possíveis isômeros dos ácidos (galoil)-(metil-galoil)-quínicos (Estruturas 5-10, Figura 1). A partir da fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 509 foi possível observar duas perdas características, o íon fragmento m/z 357 $[M-C_7H_5O_4-H]^-$ resultou da perda do radical galoil (-152 Da) e o íon fragmento m/z 343 $[M-C_8H_7O_5-H]^-$ resultou da perda do radical 3-*O*-metil-galoil (-166 Da).^{5,30} Outros íons fragmentos característicos foram detectados, como o íon m/z 183 correspondendo à forma desprotonada do ácido 3-*O*-metil-gálico, o íon m/z 169 ao ácido gálico desprotonado e o íon m/z 191 ao ácido quínico desprotonado.

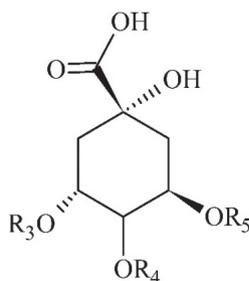
O íon precursor m/z 523 $[M-H]^-$ pode estar relacionado às formas desprotonadas dos três possíveis isômeros dos ácidos di-(metil-galoil)-quínicos (Estruturas 11-13, Figura 1). A partir da fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 523 foi possível observar duas perdas consecutivas de radicais 3-*O*-metil-galoil, o íon fragmento m/z 357 $[M-C_8H_7O_5-H]^-$ resultou de uma perda de radical 3-*O*-metil-galoil (-166 Da) e o íon m/z 191 $[M-2C_8H_7O_5-H]^-$ resultou da perda do

segundo radical 3-*O*-metil-galoil (-166 Da).^{5,30} O íon fragmento m/z 183 pode estar relacionado a detecção da forma desprotonada do ácido 3-*O*-metil-gálico.

O íon precursor m/z 689 $[M-H]^-$ pode estar relacionado ao ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil-galoil)-quínico desprotonado (Estrutura 14, Figura 1). A fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 689 resultou em duas perdas de radicais 3-*O*-metil-galoil (-166 Da), a primeira perda formou o íon fragmento m/z 523 $[M-C_8H_7O_5-H]^-$ e a segunda perda o íon fragmento m/z 357 $[M-2C_8H_7O_5-H]^-$.^{5,30} Outros fragmentos importantes foram detectados, como o íon fragmento m/z 183 e 191 que podem corresponder as formas desprotonadas dos ácidos 3-*O*-metil-gálico e ácido quínico, respectivamente.

Os ácidos galoilquínicos sugeridos foram identificados, anteriormente, nos extratos polares das folhas de *C. langsdorffii*.⁵ Os extratos polares e os ácidos galoilquínicos isolados apresentaram atividades de gastroproteção em modelos de úlceras induzidas por etanol-HCl em camundongos.¹² Os ácidos galoilquínicos reduziram significativamente a área total da lesão e aumentaram a taxa de cura em comparação com o pantoprazol e apresentaram citotoxicidade contra células de adenocarcinoma gástrico.¹² Logo, os ácidos galoilquínicos sugeridos para a espécie de *C. multijuga* abrem novas perspectivas sobre o potencial químico e farmacológico da espécie, além de viabilizar a obtenção de novos marcadores químicos para a espécie e o gênero *Copaifera*.

Os íons precursores de m/z 833 e 561 $[M-H]^-$ corresponderam às formas desprotonadas dos taninos condensados epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (dímero) e epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina (trímero), respectivamente. A fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 561 levou ao íon fragmento m/z 289 $[M-C_{15}H_{14}O_5-H]^-$ resultado da perda de um monômero de epiafzelequina (-274 Da).¹² A fragmentação MS^2 do íon precursor m/z 833 resultou em perdas consecutivas de dois monômeros de epiafzelequina gerando o íon fragmento m/z 561 $[M-C_{15}H_{14}O_5-H]^-$ e o m/z 289 $[M-2C_{15}H_{14}O_5-H]^-$.¹² O íon fragmento m/z 289 detectado em ambos precursores pode estar relacionado à forma desprotonada da epicatequina.



Nº	R ₃	R ₄	R ₅	Nomenclatura
1	3- <i>O</i> -mGa	H	H	Ácido 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
2	Ga	Ga	H	Ácido 3,4-di- <i>O</i> -(galoil)-quínico
3	Ga	H	Ga	Ácido 3,5-di- <i>O</i> -(galoil)-quínico
4	H	Ga	Ga	Ácido 4,5-di- <i>O</i> -(galoil)-quínico
5	Ga	3- <i>O</i> -mGa	H	Ácido 3- <i>O</i> -(galoil)-4- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
6	Ga	H	3- <i>O</i> -mGa	Ácido 3- <i>O</i> -(galoil)-5- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
7	H	Ga	3- <i>O</i> -mGa	Ácido 4- <i>O</i> -(galoil)-5- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
8	3- <i>O</i> -mGa	H	Ga	Ácido 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-5- <i>O</i> -(galoil)-quínico
9	3- <i>O</i> -mGa	Ga	H	Ácido 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-4- <i>O</i> -(galoil)-quínico
10	H	3- <i>O</i> -mGa	Ga	Ácido 4- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-5- <i>O</i> -(galoil)-quínico
11	3- <i>O</i> -mGa	3- <i>O</i> -mGa	H	Ácido 3,4-di- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
12	3- <i>O</i> -mGa	H	3- <i>O</i> -mGa	Ácido 3,5-di- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
13	H	3- <i>O</i> -mGa	3- <i>O</i> -mGa	Ácido 4,5-di- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico
14	3- <i>O</i> -mGa	3- <i>O</i> -mGa	3- <i>O</i> -mGa	Ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico

Abreviações:

Galoil = Ga

3-*O*-metil-galoil = 3-*O*-mGa

Figura 1. Derivados do ácido quínico detectados nos extratos de *C. multijuga*

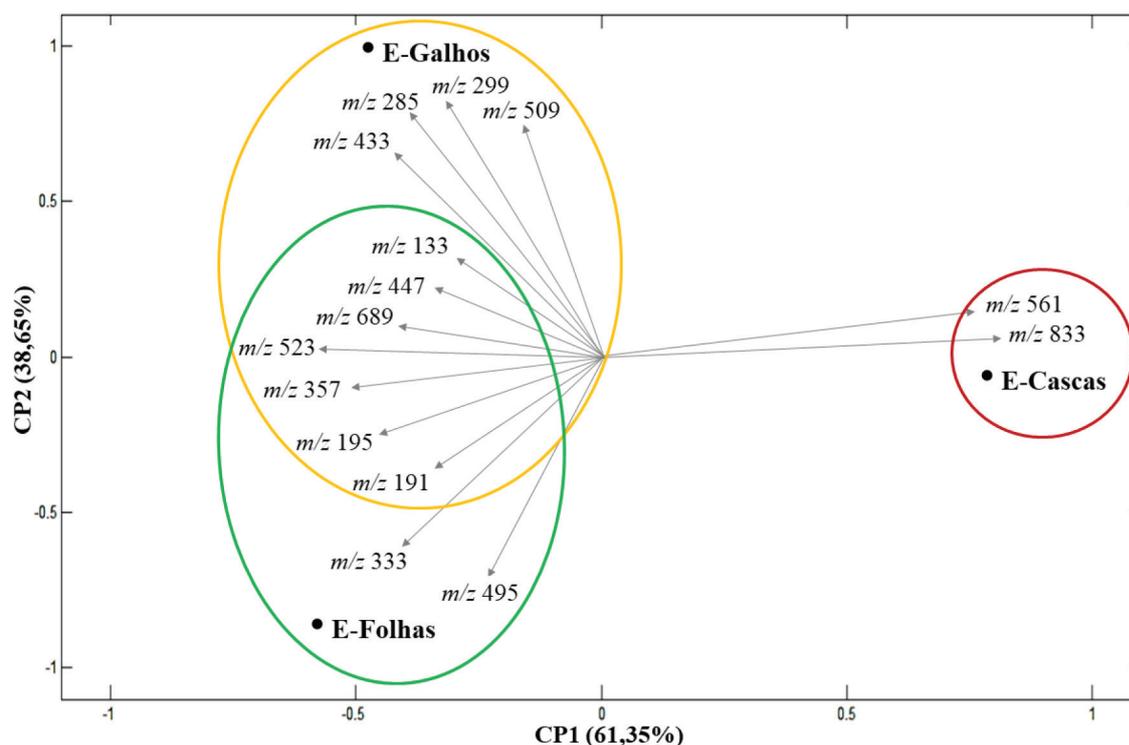


Figura 2. Gráfico de biplot: extrato das folhas (E-Folhas); extrato dos galhos (E-Galhos) e extrato das cascas (E-Cascas) de *C. multijuga*

Os taninos condensados apresentaram boa ionização em modo negativo e foram detectados em altas intensidades nos extratos das cascas de *C. multijuga*, tais substâncias podem estar relacionadas às propriedades fitoterápicas dos chás das cascas na medicina popular, visto que os extratos possuem propriedades antioxidantes relatadas frente aos testes *in vitro* e *in vivo* com redução do estresse oxidativo, além do potencial efeito antineoplásico em células tumorais de Ehrlich.¹

Análise dos Componentes Principais (PCA)

A PCA da intensidade relativa dos íons sugeridos (Tabela 1) representou uma variância explicada dos dados nas componentes principais 1 e 2 de 61,35% e 32,75%, respectivamente (Figura 2). Por esta análise é possível observar que as amostras do extrato das cascas se separam das demais partes vegetais devido à presença de taninos condensados nas formas de dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 561) e trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 833), detectados apenas nas cascas.

Os extratos das folhas e dos galhos foram separados ao longo de CP2, as substâncias detectadas unicamente em cada parte vegetal foram cruciais para a distinção das partes: nas folhas o ácido entagático (m/z 333) e os ácidos di-(galoil)-quínicos, relacionados ao íon m/z 495 foram substâncias características (Estruturas 2-4, Figura 1); e nos galhos o canferol (m/z 285), 7-*O*-metil-canferol (m/z 299), quercetina-3-*O*-L-pentosídeo (m/z 433) e os seis ácidos (galoil)-(metil-galoil)-quínicos (Estruturas 5-10, Figura 1), associados ao íon m/z 509, foram característicos. Apesar da distinção entre folhas e galhos, ambas amostras compartilharam perfis metabólicos similares, ou seja, o ácido málico (m/z 133), ácido quínico (m/z 191), ácido glucônico (m/z 195), quercetina-3-*O*-L-ramnosídeo (m/z 447), e os ácidos galoilquínicos representados pelos íons m/z 357, 523 e 689 (Tabela 1) foram substâncias detectadas em ambas as partes vegetais.

CONCLUSÃO

A técnica de *fingerprint* por inserção direta em espectrômetro de

massas (ESI-QqQ-EM) possibilitou a distinção dos extratos dos três órgãos vegetais de *C. multijuga*. Foi possível realizar a identificação putativa de 26 substâncias por meio de experimentos de fragmentação MS² dos principais íons detectados. Este é o primeiro relato dos compostos identificados nos extratos de folhas e galhos de *C. multijuga*, destacando-se os derivados do ácido quínico e flavonóides. Taninos condensados foram detectados unicamente no extrato das cascas de *C. multijuga*, podendo ser utilizados como seus marcadores químicos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas. Ao INPA pelo apoio na coleta e identificação do material vegetal e à Central Analítica Multidisciplinar da UFAM pelas análises espectrométricas.

REFERÊNCIAS

- Brun, H. D.; Camargo, J. L. C.; Ferraz, I. D. K. Copaíba-roxa, *Copaifera multijuga* Hayne; Ferraz, I. D. K.; Camargo, J. L. C., eds.; Manual de Sementes da Amazônia: Manaus, 2009, Fascículo 9; Patitucci, M. L.; Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Zogbi, M. G. B.; Silva, J. R. D.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 262; Barbosa, P. C. S.; Medeiros, R. S.; Sampaio, P. T. B.; Vieira, G.; Wiedemann, L. S. M.; Veiga-Junior, V. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1823; Barbosa, P. C. S.; Wiedemann, L. S. M.; Medeiros, R. S.; Sampaio, P. T. B.; Vieira, G.; Veiga-Junior, V. F.; *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 1350.
- Arruda, C.; Mejía, J. A. A.; Ribeiro, V. P.; Borges, C. H. G.; Martins, C. H. G.; Veneziani, R. C. S.; Ambrosio, S. R.; Bastos, J. K.; *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 1.
- Trindade, R.; Silva, J. K.; Setzer, W. N.; *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1511; Vargas, F. S.; Almeida, P. D. O.; Aranha, E. S. P.; Boletí, A. P. A.; Newton, P.; Vasconcellos, M. C.; Junior, V. F. V.; Lima, E. S.; *Molecules* **2015**, *20*, 6194.
- Vásquez, S. P. F.; Medonça, M. S.; Noda, S. N.; *Acta Amazonica* **2014**, *44*, 457; Leandro, Y. A. S.; Jardim, I. N.; Gavilanes, M. L.; *Biodiversidade* **2017**, *16*, 30.

5. Motta E. V. S.; Lemos, M.; Costa, J. C.; Bandero-Filho, V. C.; Sasse, A.; Sheridan H.; Bastos, J. K.; *Chem-Biol. Interact.* **2017**, *261*, 145.
6. Lemos M.; Santin, J. R.; Mizuno, C. S.; Bociing, T.; Sousa, J. P. B.; Nanayakkara, D.; Bastos, J. K.; Andrade, S. F.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25*, 238.
7. Costa, A. R. M.; Freitas, L. A. P.; Mendiola, J.; Ibáñez, E.; *J. Supercrit. Fluid.* **2015**, *100*, 86.
8. Furtado, R. A.; Bernades, C. T. V.; Silva, M. N.; Zoccal, K.F.; Faccioli, L. H.; Bastos, J. K.; *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 1.
9. Nogueira, M. S.; Furtado, R. A.; Bastos, J. K.; *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 6939.
10. Batista, A. G.; Ferrari, A. S.; Cunha, D. C.; Silva, J. K.; Cazarin, C. B. B.; Correa, L. C.; Prado, M. A.; Silva, L. B. C.; Esteves, E. A.; Júnior, M. R. M.; *Food Chem.* **2016**, *197*, 1153.
11. Neto, J. S. L.; Gramosa, N. V.; Silveira, E. R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1078.
12. Albiero, L. R.; Nery, E. F.; Dalazen, J. C.; Kelly, T. O.; Pereira, D. L.; Sinhoro, V. D. G.; Kamenno, R.; Castoldi, L.; *J. Pharm. Biol. Sci.* **2016**, *11*, 30.; Cunha, A. P. S.; Baldissera, L.; Pereira, D. L.; Albiero, L. R.; Castoldi, L.; Sinhoro, A. P.; Sinhoro, V. D. G.; *Acta Amazonica* **2018**, *48*, 347; Pereira, D. L.; Cunha, A. P. S.; Cardoso, C. R. P.; Rocha, C. Q.; Vilegas, W.; Sinhoro, A. P.; Sinhoro, V. D. G.; *Acta Amazonica* **2018**, *48*, 347.
13. Ye, Z.; Dai, J. R.; Zhang, C. G.; Lu, Y.; Wu, L. L.; Gong, A. G. W.; Xu, H.; Tsim, K. W. K.; Wang, Z. T.; *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.* **2017**, *2017*; Quirós-Guerrero, L. Albertazzi, F.; Araya-Valverde, E.; Romero, R. M.; Villalobos, H.; Poveda, L.; Chavarría, M.; Tamayo-Castillo, G.; *Metabolomics* **2019**, *15*, 14; Taamalli, A.; Román, D. A.; Gómez, C.; Zarrouk, M.; Carretero, A. S.; *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, 2018.
14. Niculau, E. S. N. Freitas, S. D. L.; Sá, I. C. G.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; *Rev. Virtual Quim.* **2016**, *8*, 204.; Mari, A.; Montoro, P.; D'Urso, G.; Macchia, M.; Pizza, C.; Piacente, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *102*, 215; Klockmann, S.; Reiner, E.; Cain, N.; Fischer, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1456.
15. Wolfender, J. L.; Glauser, L.; Boccard J.; Raduz, S.; *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *10*, 1417.
16. Hongry, K.; Sadanielo, V. L. M.; Junior, G. J. O.; *Eng. Sci.* **2015**, *1*, 83.
17. Roesler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G.; *Food Chem.* **2007**, *104*, 1048; Fernández-Fernández, R.; López-Martínez, J.; Romero-González, R.; Martínezz-Vidal, J. L.; Flores, M. I. A.; Frenich, A. G.; *Chromatographia* **2010**, *72*, 55.
18. Cádiz-Gurrea, M. L. L.; Fernández-Arroyo, S.; Joven, J.; Segura-Carretero, A.; *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 197; Felipe, D. F.; Branbilla, L. Z. S.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Cortez, D. A. G.; *Molecules* **2014**, *19*, 15720; Grossert, J. S.; Cook, M. C.; White, R. L.; *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1511.
19. Ceylan, R.; Katanic, J.; Zengin, G.; Matic, S.; Aktumsek, A.; Boroja, T.; Stanic, S. Mihailovic, V.; Guler, G. O.; Boga, M.; Yilmaz, M. A.; *Ind. Crops Prod.* **2016**, *84*, 254.
20. Cañete-Rodríguez, A. M.; Santos-Dueñas, I. M.; Jiménez-Hornero, J. E.; Ehrenreich, A.; Liebl, W.; García-García, I.; *Process Biochem.* **2016**, *51*, 1891.
21. Justesen, U.; *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 169 March, R. E.; Miao, X. S.; *J. Mass Spectrom.* **2004**, *231*, 157.
22. Mercolini, L.; Protti, M.; Saracino, M. A.; Mandrone, M.; Antognoni, F.; Poli, F.; *Phytochem. Anal.* **2015**, *27*, 41.
23. Agrawal, A. D.; *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* **2011**, *4*, 1394; Oliveira, T. T. D.; Gomes, S. M.; Nagem, T. J.; Costa, N. M. B.; Secom, P. R.; *Rev. Nutr.* **2002**, *15*, 45; Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572; Shashank, K.; Abhay, K.; *Sci. World J.* **2013**, *4*, 32.
24. Georgiev, V.; Ananga, A.; Tsoolova, V.; *Nutrients* **2014**, *6*, 391.
25. Souza, A. B.; Martins, C. H. G.; Souza, M. G. M.; Furtado, N. A. J. C.; Heleno, V. C. G.; Sousa, J. P. B.; Rocha, E. M. P.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R.; Veneziani, R. C. S.; *Phyther. Res.* **2011**, *25*, 215.
26. Tincusi, B. M.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. M.; Mamani, Z. A.; Barroso, J. P.; Ravelo, A. G.; Hernández, B. V.; *Planta Med.* **2002**, *68*, 808.
27. Geris, R.; Silva, I. G.; Silva, H. H. G.; Barison, A.; Rodrigues-Filho, E.; Ferreira, A. G.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **2008**, *50*, 25.
28. Santos, A. O.; Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; da Veiga-Júnior, V. F.; Vataru-Nakamura, C.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 59.
29. Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Veiga, V. F.; Pinto, A. C.; Nakamura, C. V.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2994.
30. Sannomiya, M.; Santos, L. C.; Carbone, V.; Napolitano, A.; Piacente, S.; Pizza, C.; Souza-Brito, A. R. M.; Vilegas, W.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1393.
31. Parveen, I.; Threadgill, M. D.; Hauck, B.; Donnison, I.; Winters, A.; *Phytochemistry* **2011**, *72*, 2376.; Bastos, D. H. M.; Saldanha, L. A.; Catharino, R. R.; Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Carvalho, P. O.; Eberlin, M. N.; *Molecules* **2007**, *12*, 423.