

Aplicação de LC-SPE/NMR na Rápida Identificação de Compostos Orgânicos em Fitoterápico

Application of LC-SPE/NMR in the rapid identification of organic compounds in phytotherapeutic medicine

Sérgio Scherrer Thomasi⁽¹⁾; Lyege Magalhães Oliveira⁽¹⁾;
Tiago Venâncio⁽²⁾; Antonio Gilberto Ferreira⁽²⁾

⁽¹⁾ Estudante do Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); São Carlos, SP; E-mail: secherrer@yahoo.com.br; ⁽¹⁾ lyegemagalhaes@yahoo.com.br

⁽²⁾ Professor: Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); São Carlos, SP; E-mail: venancio@ufscar.br; ⁽²⁾ giba@ufscar.br

RESUMO: Este artigo descreve a análise do perfil químico de um medicamento fitoterápico à base de *Ilex paraguariensis* utilizando a tecnologia acoplada LC-SPE/NMR, que levou à rápida separação e identificação de oito compostos orgânicos em um único experimento. Dessa forma, metodologias clássicas de isolamento não foram necessárias. A alta seletividade alcançada na separação cromatográfica, somada à adequada retenção por SPE e a aplicação da tecnologia criogênica de RMN de alto campo magnético (14,1 Tesla) permitiu a obtenção de dados conclusivos acerca das estruturas encontradas, eliminando a necessidade de experimentos por espectrometria de massa.

Palavras-chave: LC-SPE/NMR, *Ilex paraguariensis*, hifenação.

ABSTRACT: This article describes the analysis of the chemical profile of a phytotherapeutic supplement of *Ilex paraguariensis* that was rapidly conducted by using the LC-SPE/NMR hyphenated technique providing the rapid separation and identification of eight organic compounds in a single experiment. Therefore, bench isolation methods were not necessary. The high selectivity achieved in the chromatographic separation combined with adequate retention by SPE and the application of cryogenic technology of high magnetic field NMR (14.1 Tesla) allowed to reach conclusive data on the structure of the substances found, thus the use of mass spectrometry was unnecessary.

Keywords: LC-SPE/NMR, *Ilex paraguariensis*, hyphenation NMR.

INTRODUÇÃO

Extratos vegetais são misturas complexas que geralmente contêm muitas substâncias com uma grande diversidade estrutural. Seguir a metodologia clássica para a determinação do perfil metabólito de um extrato vegetal não é um trabalho fácil e envolve um protocolo específico da área de produtos naturais. Várias extrações com solventes de diferentes polaridades e o uso de colunas de bancada tornam a análise longa e muitas vezes não fornecem as substâncias com o grau de pureza necessário para a sua completa determinação estrutural. Por isso, uma eficiente separação somada a uma rápida caracterização tem papel fundamental na pesquisa de produtos naturais moderna. Nesse sentido, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hifenadas, proporcionou um papel importante na elucidação de estruturas químicas dos produtos de origem natural. Quando comparado com os métodos clássicos de extração e purificação esta técnica evita o gasto excessivo de tempo, reagentes e solventes no isolamento e purificação de substâncias orgânicas, além também de evitar e/ou

minimizar perdas de substâncias potencialmente interessantes.

Os níveis de sensibilidade e seletividade alcançados atualmente eram impensáveis até poucos anos atrás (LEVSEN *et al.*, 200). Esse desenvolvimento possibilitou o estudo de extratos brutos, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, na maioria das vezes, leva a compostos já conhecidos, à perda de compostos minoritários e à possibilidade de decomposição de substâncias. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através dessas ferramentas analíticas, agora acessível a pesquisadores no Brasil. Vale deixar claro que o isolamento de grandes quantidades de uma determinada substância ainda não exclui o trabalho de bancada, porém a prévia triagem química direciona o foco da extração de acordo com a substância que se deseja isolar.

Fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais e constituem uma fonte de compostos orgânicos bioativos. Eles representam uma significativa fração da venda e compra de medicamentos, sobretudo em países subdesenvolvidos, onde a população usa esse tratamento como alternativa aos medicamentos

alopáticos. O grande problema é que muitos desses medicamentos são vendidos livremente na internet e no comércio, e nem sempre correspondem a um fitoterápico. Em um trabalho recente foi mostrado que um medicamento analgésico vendido livremente na internet, supostamente de origem natural, apresenta na realidade uma mistura de vários medicamentos de origem alopática como: ranitidina, orfenadrina, piroxicam e dexametasona (SILVA *et al.*, 2013). Isso revela um problema grave, pois substâncias que só deveriam ser administradas com acompanhamento médico estão sendo vendidas indiscriminadamente em meios de difícil controle, como é o caso da internet. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de CLAE-EFS/RMN para analisar um produto descrito como suplemento fitoterápico à base de *Ilex paraguariensis* (erva-mate), adquirido no mercado nacional, uma vez que não foi encontrado nenhum estudo avaliando a autenticidade e confiabilidade do medicamento. O intuito foi isolar e identificar o maior número possível de constituintes químicos obtidos de um único cromatograma, da maneira mais rápida possível e utilizando apenas as informações obtidas por espectroscopia de RMN.

HIFENAÇÃO CLAE-RMN

O termo técnica hifenada refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de se obter uma ferramenta mais rápida e eficiente que as técnicas convencionais (LEVSEN *et al.*, 2000). As técnicas acopladas devem ser ortogonais, ou seja, devem gerar informações distintas. É o caso do acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), com técnicas espectrométricas que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes presentes na amostra, funcionando como detectores, como espectrofotômetro de UV-Vis (ou com arranjos de diodo - do inglês DAD), espectrômetro de massa (EM e EM-EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (EXARCHOU *et al.*, 2005).

Atualmente, existem vários modos de operação para o acoplamento CLAE-RMN, e que, devem ser escolhidos em função das características da amostra e dos objetivos da análise. Três modos de operação são muito utilizados desde os anos 2000: CLAE-RMN no modo contínuo (do inglês *On-flow LC-NMR*), CLAE-RMN no modo parado (do inglês *Stopped-flow LC-NMR*) e CLAE-RMN com coletor de amostras (do inglês *Loop Storage Mode LC-NMR*) (BRINGMANN *et al.*, 2003; NOVAK *et al.*, 2006; TODE *et al.*, 2009; NOVAK *et al.*, 2009; AKIRA *et al.*, 2010).

No primeiro modo de operação o espectrômetro

de RMN é utilizado de maneira similar a um detector de UV em um cromatógrafo, pois a aquisição dos espectros é feita sem interrupção do fluxo. Os primeiros experimentos de CLAE-RMN realizados no final da década de 70 foram feitos neste modo de operação em uma mistura de compostos conhecidos (WATANABI; NIKI, 1978). No segundo modo de operação, o fluxo é interrompido quando a fração de interesse alcança a cela de detecção do RMN. Após a aquisição dos dados, tanto no modo 1D quanto 2D, o processo pode ser repetido para a próxima fração, e dessa forma, uma série de picos cromatográficos pode ser estudada. Esse modo de operação foi demonstrado pela primeira vez também em 1978 (BAYER *et al.*, 1978). Nesse estudo, a comparação dos espectros adquiridos através do acoplamento CLAE-RMN com espectros dos compostos purificados por métodos convencionais revelaram que a resolução destes ainda era melhor. De qualquer forma, este trabalho foi um passo muito importante para o desenvolvimento desse modo de hifenação. A grande desvantagem desses métodos é a necessidade de se utilizar um solvente deuterado na mistura de solventes utilizados para a separação cromatográfica. Finalmente, no terceiro modo de operação, as frações separadas são armazenadas em coletores de frações (*loops* capilares) para posterior aquisição dos espectros de RMN. Um importante requisito para o uso dessa modalidade da técnica é que os analitos armazenados, para posteriores análises, devem ser estáveis durante todo o período da aquisição dos espectros e do tempo que ficarem armazenadas no coletor de frações (ELIPE, 2003). Porém, essa modalidade de hifenação, permite obter um perfil (*screening*) de todo (ou parte) do cromatograma usando a modalidade denominada de faixas por tempo (*time slice*).

Um dos principais problemas encontrados quando se faz uso da técnica de RMN como um detector cromatográfico, é a baixa sensibilidade da técnica. Para contornar esse problema, uma alternativa é concentrar as amostras de interesse para obter uma maior quantidade possível do analito e, ao mesmo tempo, utilizar acessórios que aumentem significativamente a sua sensibilidade de detecção, como é o caso do uso das sondas criogênicas. Este modo de operação é chamado de CLAE-EFS-RMN, onde picos cromatográficos são enviados para cartuchos individuais de fase sólida (Extração por Fase Sólida – EFS), os quais são previamente condicionados com solvente orgânico e equilibrados com água. Após a adsorção dos analitos os solventes utilizados no processo de separação cromatográfica são evaporados com nitrogênio gasoso, normalmente durante trinta minutos e, a fração adsorvida no cartucho é eluída com solvente deuterado. Ela pode ser enviada automaticamente

para a sonda de detecção do RMN, onde pode ser usado células especiais com um volume de 60 ou 120 μL , ou ainda, ser concentrada e armazenada para posterior utilização. Essa modalidade de hifenação permite que se faça o uso dos solventes normais utilizados na separação cromatográfica, sem a necessidade de se utilizar solventes deuterados durante o processo de separação. Por outro lado, ela exige a necessidade da supressão do(s) sinal(is) do(s) solvente(s) para aumento do ganho na sensibilidade. O acoplamento CLAE-EFS-RMN proporciona um aumento muito grande de sensibilidade quando comparado ao acoplamento CLAE-RMN convencional (EXARCHOU *et al.*, 2005). Esse sistema tem sido empregado com sucesso nos últimos anos e a literatura mostra relatos da utilização do sistema na identificação de constituintes de caldo fermentação fúngica (SORENSEN *et al.*, 2007; SUMARAH *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013), veneno de sapos chineses (GAO *et al.*, 2010), extrato de óleo vegetal (PÉREZ-TRUJILLO *et al.*, 2010) e extratos vegetais (LE GALL *et al.*, 2003; RIJKE *et al.*, 2004).

Campos magnéticos mais intensos têm dado uma importante contribuição para área de CLAE-RMN nos últimos anos. Atualmente já se fabricam, para esse propósito, magnetos com 21,1 Tesla (900 MHz para frequência do hidrogênio) que quando comparados ao equipamento de 1,4 Tesla (60 MHz para frequência do hidrogênio) utilizado no primeiro experimento de CLAE-RMN em 1978 (WATANABI; NIKI, 1978) a sensibilidade é incrivelmente maior. Também já se sabe há muito tempo que resfriando a bobina transmissora e receptora de radiofrequência, assim como os pré-amplificadores eletrônicos, à temperaturas criogênicas – tipicamente de 77 a 50K, o ruído eletrônico termal associado aos estágios iniciais da detecção é virtualmente eliminado (STYLES *et al.*, 1984). Isso proporciona um aumento da relação sinal/ruído em um fator de três a quatro vezes. A primeira aplicação de uma sonda criogênica em CLAE-RMN foi reportada em 2003 e mostrou que é possível combinar as vantagens da sonda criogênica com o modo de operação “on-flow” (SPRAUL *et al.*, 2003). Além disso, a tecnologia criogênica em combinação com a técnica de CLAE-EFS-RMN possibilitou pela primeira vez a observação direta de um espectro de ^{13}C de um produto natural, o que, até então, não havia sido feito utilizando esse conjunto de técnicas (EXARCHOU *et al.*, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

A. Equipamento hifenado

O sistema acoplado utilizado foi um cromatógrafo Agilent (1200 series) acoplado a uma unidade Prospekt 2. O sistema de CLAE constitui-se de uma

bomba quaternária (Agilent Pump Control, Bruker Daltonik GmbH©, G1311A), degaseificador (G1322A), detector de arranjo de diodos com comprimento de onda variável (DAD Diode Array Detector Control, G1315D) e amostrador automático (LC Autosampler Control, Bruker Daltonik GmbH©, G1329A).

A unidade Prospekt 2 é constituída por uma bomba extra (K120 Knauer Smartline Pump Control 100, Bruker Daltonik GmbH©, V01.11) (Figura 1) que diminui a proporção do modificador orgânico da fase móvel que sai da coluna cromatográfica, um organizador (C) onde são alocados os frascos com solventes deuterados e não deuterados usados nos cartuchos de extração por fase sólida, uma unidade trocadora automática de cartuchos (G) (ACE – Automatic Cartridges Exchanger – LC-SPE-NMR Interface, Prospekt 2, Bruker Biospin GmbH©) que transporta automaticamente os cartuchos para a direção do fluxo da fase móvel contendo os compostos de interesse, uma unidade de Stopped-Flow (H) (BSFU-HP – Bruker Stopped Flow Unit – High Performance Bruker Biospin GmbH©) e válvulas VALCO. A válvula A controla a seringa 1 que injeta solvente não deuterado nos cartuchos na etapa de equilíbrio e condicionamento. A válvula B controla a seringa 2 que injeta solvente deuterado nos cartuchos na etapa de eluição dos cartuchos para análises espectroscópicas. A área tracejada na Figura 1 (a) contém o “ponto de interseção”, um ponto fundamental para que a adsorção dos compostos de interesse nos cartuchos ocorra de fato. Esta região está ampliada na Figura 1.

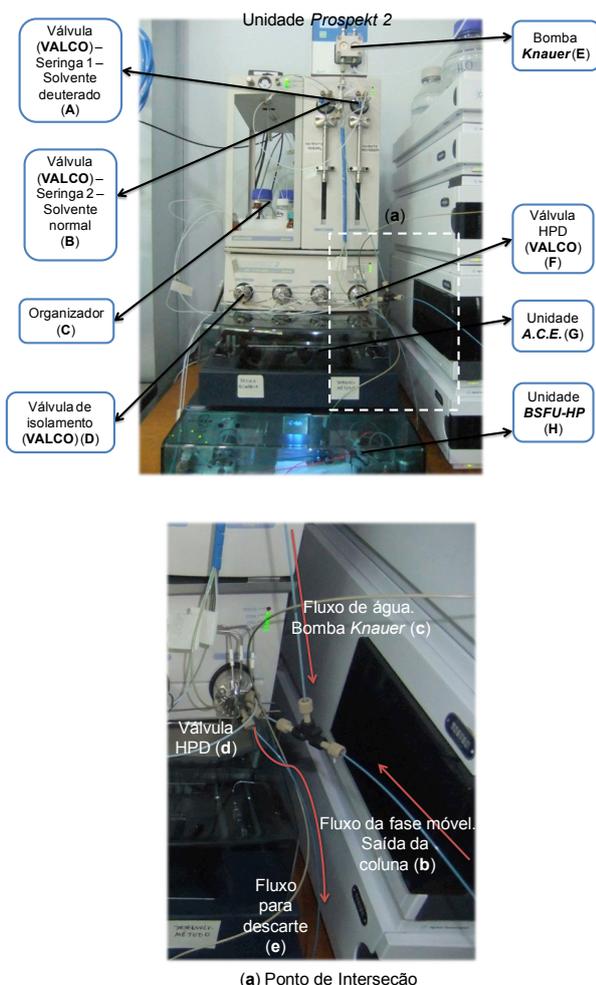


Figura 1. Visão da unidade Prospekt 2

O ponto de interseção é o responsável pela adsorção dos compostos nos cartuchos. Enquanto não existem frações de interesse no fluxo da fase móvel que sai da coluna cromatográfica (b), a válvula HPD (*High Pressure Dispenser*) (d) direciona o fluxo para o descarte (e). Quando uma fração de interesse surge no cromatograma, a válvula HPD desvia o fluxo na direção dos cartuchos de EFS, ao mesmo tempo em que a bomba Knauer (c) é acionada. Essa bomba aumenta a quantidade de água na fase móvel em uma proporção de 3:1 diminuindo assim a força de eluição, dessa forma, ao passar pela fase estacionária dos cartuchos, o(s) composto(s) de interesse fica(m) retido(s).

O sistema que controla a etapa de extração por fase sólida é a unidade trocadora automática de cartuchos (G) (*ACE – Automatic Cartridges Exchanger – LC-SPE-NMR Interface*, Prospekt 2, Bruker Biospin GmbH©) equipada com duas linhas de fluxo onde os cartuchos são posicionados por um braço mecânico que transporta os cartuchos das linhas de fluxo para duas bandejas de cartuchos com diferentes fases estacionárias. Uma das

bandejas contém noventa e seis cartuchos de fase estacionária *General Phase* (*HysphereTM*-resin, 10 mm x 2 mm, 10 μ m, formato esférico e fase estacionária de polidivinibenzeno). A justificativa para uma bandeja completa com noventa e seis cartuchos da mesma fase estacionária é baseada nos resultados de um estudo realizado por um grupo de pesquisa da Dinamarca, que mostrou que essa fase polimérica é capaz de reter uma grande variedade de compostos orgânicos, cobrindo uma ampla faixa de polaridades (CLARKSON *et al.*, 2007). A segunda bandeja é destinada para o desenvolvimento de método. São oito linhas, cada uma contendo doze cartuchos preenchidos com oito fases estacionárias que são utilizadas quando a fase estacionária de polidivinibenzeno não adsorve os compostos, que é o caso de compostos muito polares.

O programa *Hystar 2.3* foi usado para controlar o sistema acoplado CLAE-EFS e o número de repetições para a adsorção dos compostos nos cartuchos. Embora existam seis diferentes formas de desviar o fluxo da fase móvel na direção da linha de fluxo que contém o cartucho, todas as análises deste trabalho foram feitas utilizando uma única modalidade conhecida como seleção pela intensidade da banda (*threshold*). Nessa forma de operação, o sistema direciona o fluxo do descarte para o cartucho toda vez que a intensidade de absorção no detector UV-DAD ultrapassa o valor estipulado pelo operador. Quando a intensidade do sinal diminui, o fluxo volta a ser direcionado para o descarte. Uma grande vantagem desse modo de operação se deve ao fato de que mesmo que o tempo de retenção (t_R) varie entre uma corrida cromatográfica e outra (considerando que são realizadas múltiplas injeções), a região equivalente ao sinal sempre será direcionada para o cartucho.

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (*Ultrashield Plus[®]*). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (*Triple Resonance Cryoprobe Inverse*) de 5 mm, com bobinas de ^1H e ^{13}C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA[®] (*Automatic Tuning e Matching*). O equipamento ainda possui uma unidade *CryoFIT[®]*, 60 μL de volume útil, que acopla o RMN diretamente ao equipamento de CLAE para realização dos experimentos diretamente acoplados. Para todas as amostras identificadas, os experimentos de RMN obtidos foram: ^1H , gCOSY, gHSQC e gHMBC sendo que os deslocamentos químicos de ^{13}C foram obtidos por observação

indireta. Esse conjunto de experimentos mostrou-se suficiente para a completa determinação estrutural das substâncias encontradas.

B. Procedimentos gerais

Uma cápsula do medicamento fitoterápico à base de *Ilex paraguariensis* (500 mg) foi dissolvida em 1,5 mL de uma mistura 1:1 de água milli-Q e acetonitrila e submetida à filtração em filtro de membrana (Fluoreto de polivinilideno - PVDF *Membrane Syringe Filter*, Tedia Brazil, 25 mm, 0,45 µm). A amostra foi submetida à análise por CLAE a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, o volume de injeção foi de 20 µL, o comprimento de onda monitorado foi de 254 nm e foram utilizados os eluentes A (H₂O mili Q) e B (Acetonitrila – HPLC/SPECTRO, Tedia Brazil, LOT# 1110358), cada um contendo 0,05% de ácido trifluoracético – (TFA HPLC, Tedia Brazil, LOT# 1011342). Foi utilizada uma coluna cromatográfica Prontosil Eurobond C18[®] (125,0 x 4,0 mm, 5 µm). O método cromatográfico constituiu de um gradiente linear variando de 5 à 36% de B em 20 minutos. Na sequência a coluna passou por uma etapa de limpeza (*cleaning step*) durante 5 minutos, retornou à condição inicial e foi recondicionada por 5 minutos, totalizando 36 minutos de corrida. Sete bandas cromatográficas de interesse foram adsorvidas nos cartuchos de EFS por 30 corridas cromatográficas consecutivas. Após o processo de adsorção, que durou 18 horas, os cartuchos foram evaporados com nitrogênio gasoso por 30 minutos para a remoção do solvente residual. Acetonitrila deuterada-*d*₃ (99,8% D) foi usada para eluir os compostos dos cartuchos diretamente em tubos de RMN (Bruker 3 mm de diâmetro externo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização da separação cromatográfica levou à resolução de linha de base entre sete diferentes bandas cromatográficas. Essas bandas apresentaram uma largura que sugere boa seletividade, o que garante maior pureza e fácil determinação por RMN. Optou-se então por repetir essa mesma corrida por 30 vezes direcionando a região do cromatograma equivalente a esses sete sinais de absorção no ultra-violeta (UV-DAD) para os cartuchos de EFS. Foram geradas sete amostras a partir das frações A (banda 1 – *t*_R = 6,79 min), B (banda 2 – *t*_R = 8,70 min), C (banda 3 – *t*_R = 9,16 min), D (banda 4 – *t*_R = 12,92 min), E (banda 5 – *t*_R = 14,68 min), F (banda 6 – *t*_R = 15,43 min) e G (banda 7 – *t*_R = 16,00 min).

Após a análise dos dados espectroscópicos de RMN foi possível identificar oito substâncias orgânicas no medicamento fitoterápico, tipicamente encontradas em extratos aquosos de *Ilex*

paraguariensis (Peres et al., 2013). Ácido neoclorogênico (1), ácido clorogênico (2), cafeína (3), ácido criptoclorogênico (4), rutina (5), ácido 3,4-dicafeoilquínico (6), ácido 3,5-dicafeoilquínico (7) e ácido 4,5-dicafeoilquínico (8).

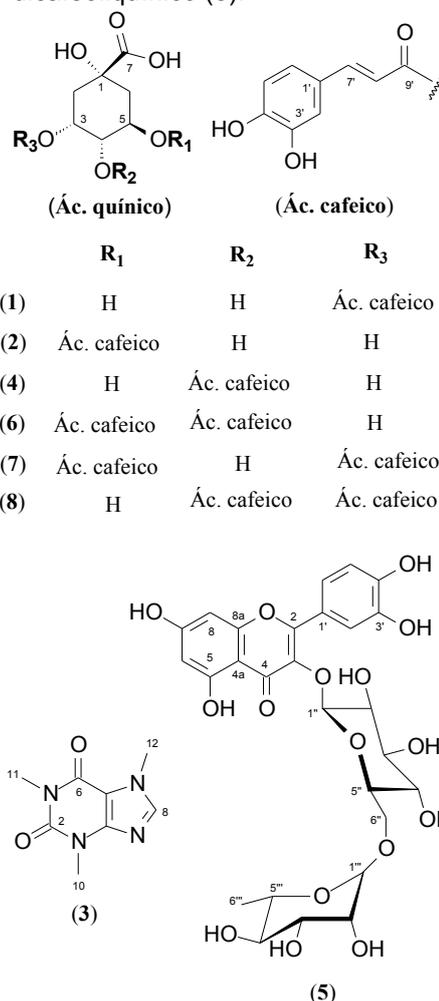


Figura 2. Formulas estruturais das substâncias orgânicas encontradas

Os espectros de RMN das frações A, B e C apresentaram sinais semelhantes, em quantidade e deslocamento, sugerindo que os compostos possivelmente são isômeros constitucionais e que o esqueleto carbônico é constituído de uma unidade de ácido quínico. Através da análise dos espectros de ¹H (em ACN-*d*₃) e do HSQC da fração B, por exemplo, foi possível verificar a presença de um duplo duplo duplo(H2a, δ_H 2,03, 2H, ddd) e um duplo duplo(H2b, δ_H 2,07, 2H, dd), ambos diretamente ligados à um carbono *sp*³ (C2, δ_C 39,4). Também foi detectado outro carbono alifático (C6, δ_C 40,5) diretamente ligado a hidrogênios que também originaram um duplo duplo duplo(H6a δ_H 1,93, 2H, ddd) e um duplo duplo(H6b, δ_H 2,16, 2H, dd). Na região mais desblindada do espectro foi verificada a presença de um duplo duplo(H4, δ_H 3,69, 1H, ddd), equivalente ao hidrogênio diretamente ligado ao carbono C4 (δ_C 75,1), um

duplo duplo(H3, δ_H 4,16, 1H, ddd), equivalente ao hidrogênio diretamente ligado ao carbono C3 (δ_C 73,4) e um duplo duplo duplo(H5, δ_H 5,26, 1H, ddd), equivalente ao hidrogênio diretamente ligado ao carbono C5 (δ_C 72,8). As análises das correlações à longa distância através do espectro de HMBC mostraram que os hidrogênios H2 e H6 apresentam, ambos, correlações com os carbonos C1 (δ_C 78,3) e C7 (δ_C 176,9). Posteriormente, verificou-se que a unidade de ácido quínico era comum aos compostos isolados nas frações A, B, C, E, F e G. Apenas a fração D não apresentou um esqueleto carbônico contendo essa estrutura.

Na sequência, identificou-se a presença de ácido cafeico como substituinte no ácido quínico. O padrão de substituição varia com a fração analisada. Ainda na fração B, a análise da região de hidrogênios olefínicos mostrou um duplo (H5', δ_H 6,84, 1H, d) equivalente a um hidrogênio ligado diretamente a carbono sp^2 C5' (δ_C 118,1), um duplo duplo(H6', δ_H 7,03, 1H, dd) equivalente a um hidrogênio ligado diretamente ao carbono C6' (δ_C 124,8) e um duplo (H2', δ_H 7,11, 1H, d) equivalente a um hidrogênio ligado diretamente ao carbono C2' (δ_C 117,1). Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento entre os sinais indicam claramente um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Os deslocamentos químicos dos carbonos ligados às hidroxilas foram determinados por HMBC através das correlações observadas com os carbonos C1' (δ_C 129,8), C3' (δ_C 147,7) e C4' (δ_C 150,1). Ainda na região de hidrogênios olefínicos também foi verificado a presença de dois dupletos com constante de acoplamento de 16,0 Hz, indicando uma ligação dupla de configuração *E* (H7', δ_H 7,57, 1H, d e H8', δ_H 6,29, 1H, d). Essa suposição foi confirmada pelo espectro de COSY. Esses hidrogênios apresentaram ainda correlação com o carbono C9' (δ_C 169,5). Através da análise do HMBC, determinou-se que a fração A era composta majoritariamente por ácido neoclorogênico (**1**), a fração B era uma mistura 2,5:1 de ácido clorogênico (**2**) e cafeína (**3**) e a fração C por ácido criptoclorogênico (**4**).

Nas frações E, F e G também foram verificadas a presença de uma unidade de ácido quínico, entretanto os sinais equivalentes ao ácido cafeico estavam, em todos os casos, duplicados indicando que existem dois desses substituintes ligados às estruturas encontradas. Por exemplo, através da análise de HMBC da fração G, verificou-se que o hidrogênio H3 (δ_H 5,59, 1H, ddd) apresentou correlação com o carbono C9' (δ_C 165,8) e o hidrogênio H4 (δ_H 5,10, 1H, dd) também apresentou correlação com o carbono equivalente à carbonila de éster, indicando que este era o ácido 4,5-dicafeoilquínico (**8**). Para todos os casos, a confirmação da configuração relativa de cada centro

estereogênico foi feita através da multiplicidade dos sinais, que apresentaram resolução suficiente para essa determinação. A constante de acoplamento de 10,0 Hz entre H3 e H4 confirma que eles estão em geometria *cis*, enquanto a constante de acoplamento de 3,0 Hz entre H4 e H5 indica que eles estão em geometria *trans*. Os sinais de H3 e H5 estão ampliados na **Figura 3**. Nos casos em que a multiplicidade não foi muito evidente, uma apodização matemática gaussiana (gb) de 0,3 foi aplicada aos espectros de hidrogênio.

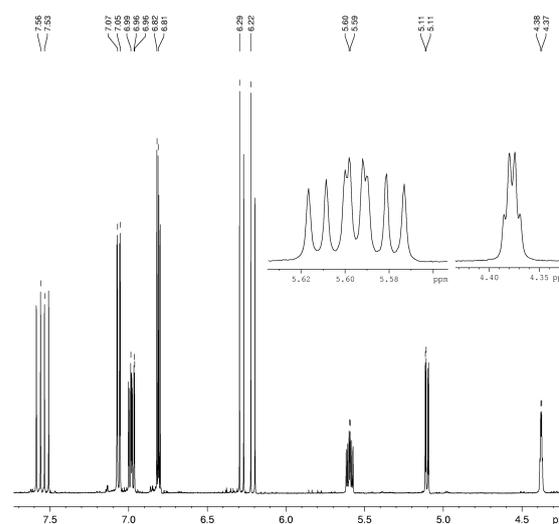


Figura 3. Espectro de ^1H (600 MHz, ACN-d_3) da fração G - ácido 4,5-dicafeoilquínico (**8**)

Em se tratando de espectrometria de correlação bidimensional, um dos grandes problemas está relacionado à baixa quantidade de amostra que geralmente é isolada, somada à sensibilidade limitada dos equipamentos de RMN em uso na maior parte dos centros de pesquisa brasileiros. Além disso, o grau de pureza é um fator determinante, pois pode gerar sinais com multiplicidades irreconhecíveis dependendo da complexidade da mistura. Entretanto, a alta seletividade de uma única corrida cromatográfica, aliada a sensibilidade alcançada pela tecnologia de sondas criogênicas em RMN foi capaz de gerar dados inequívocos. Em relação aos espectros bidimensionais obtidos, todos apresentaram uma excelente relação sinal-ruído. As correlações podem ser vistas com clareza, o que facilitou a rápida identificação dos constituintes de cada fração isolada. A **Figura 4** mostra o espectro de HMBC da fração G equivalente ao ácido 4,5-dicafeoilquínico (**8**).

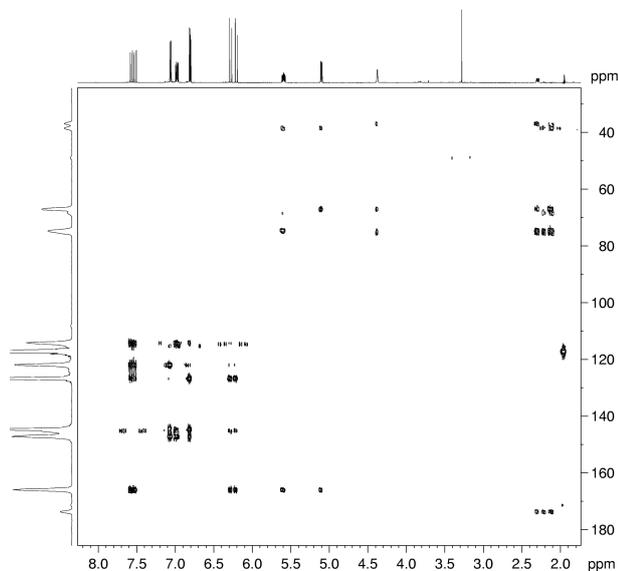


Figura 4. Espectro de HMBC selecionado da fração G - ácido 4,5-dicafeoilquínico (8)

O único composto que apresentou um padrão de sinais diferentes estava presente na fração D. Através da análise da região de hidrogênio olefínicos no espectro de ^1H (600 MHz, $\text{ACN-}d_3$) verificou-se a presença de dois dupletos (H_6 , δ_{H} 6,27, 1H, d e H_8 , δ_{H} 6,48, 1H, d duplete) que apresentaram correlações HMBC com os carbonos C_{4a} (δ_{C} 107), C_5 (δ_{C} 165), C_6 (δ_{C} 101), C_7 (δ_{C} 166), C_8 (δ_{C} 96) e C_{8a} (δ_{C} 160). Ainda na mesma região do espectro de ^1H , a presença de um duplete ($\text{H}_{2'}$, δ_{H} 7,76, 1H, d) ligado ao carbono $\text{C}_{5'}$ (δ_{C} 119), um duplete duplo ($\text{H}_{6'}$, δ_{H} 7,663, 1H, dd) ligado ao carbono $\text{C}_{6'}$ (δ_{C} 125) e um duplete ($\text{H}_{5'}$, δ_{H} 6,93, 1H, d) ligado diretamente ao carbono $\text{C}_{2'}$ (δ_{C} 117) indicam um anel aromático 1,3,4-trissubstituído também nesta estrutura. Os deslocamentos químicos dos carbonos contendo os substituintes foram determinados por HMBC através das correlações observadas com os carbonos $\text{C}_{1'}$ (δ_{C} 125), $\text{C}_{3'}$ (δ_{C} 146) e $\text{C}_{4'}$ (δ_{C} 150). Esses dados permitem concluir que o composto possui um esqueleto compatível com um flavonóide, a quecirtina. Entretanto, a análise por HSQC (**Figura 5**) e HMBC mostrou claramente que na posição 3 existe uma unidade de glicose-raminose conectada ao composto. Dessa forma, conclui-se que a substância presente em maior quantidade na fração D é a rutina (**5**). A ampliação na **Figura 5** mostra os sinais das unidades de açúcar presentes na estrutura. Em todas as frações analisadas, a espectrometria de ressonância magnética nuclear foi suficiente para determinação estrutural dos compostos presentes, dessa forma a espectrometria de massa pôde ser dispensada.

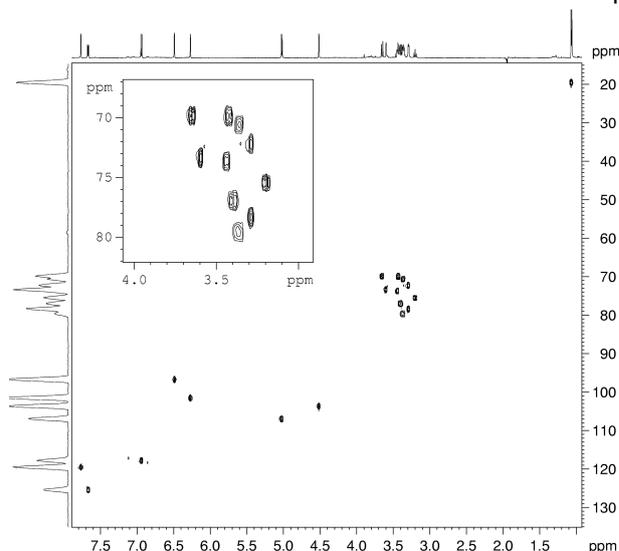


Figura 5. Espectro de HSQC da fração D - Rutina (5)

Ácido neoclorogênico (1): RMN de ^1H ($\text{CH}_3\text{CN-}d_3$, 600 MHz) δ 7.57 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, $\text{H-}7'$), δ 7.12 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{H-}2'$), δ 7.03 (1H, dd, $J = 2.1$ e 8.3 Hz, $\text{H-}6'$), δ 6.80 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, $\text{H-}5'$), δ 6.32 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, $\text{H-}8'$), δ 5.31 (1H, t_{AB} , $J = 3.2$ e 5.2 Hz, $\text{H-}3$), δ 4.00 (1H, ddd, $J = 4.4$, 8.0 e 9.1 Hz, $\text{H-}5$), δ 3.59 (1H, dd, $J = 3.2$ e 8.0 Hz, $\text{H-}4$), δ 2.10-2.01 (2H, m, $\text{H-}2$), δ 1.93-1.88 (2H, m, $\text{H-}6$); RMN de ^{13}C ($\text{CH}_3\text{CN-}d_3$, 150 MHz) δ 177.9 (C, $\text{C-}7$), δ 170.3 (C, $\text{C-}9'$), δ 150.6 (C, $\text{C-}4'$), δ 148.2 (C, $\text{C-}3'$), δ 147.9 (CH, $\text{C-}7'$), δ 129.3 (C, $\text{C-}1'$), δ 124.0 (CH, $\text{C-}6'$), δ 117.7 (CH, $\text{C-}5'$), δ 116.9 (CH, $\text{C-}8'$), δ 116.4 (CH, $\text{C-}2'$), δ 77.1 (C, $\text{C-}1$), δ 74.6 (CH, $\text{C-}4$), δ 73.6 (CH, $\text{C-}3$), δ 71.0 (CH, $\text{C-}5$), δ 39.0 (CH_2 , $\text{C-}2$), δ 38.7 (CH_2 , $\text{C-}6$).

Ácido clorogênico (2): RMN de ^1H ($\text{CH}_3\text{CN-}d_3$, 600 MHz) δ 7.57 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $\text{H-}7'$), δ 7.11 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $\text{H-}2'$), δ 7.03 (1H, dd, $J = 2.1$ e 8.1 Hz, $\text{H-}6'$), δ 6.84 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, $\text{H-}5'$), δ 6.29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, $\text{H-}8'$), δ 5.26 (1H, ddd, $J = 4.8$, 9.5 e 11.3 Hz, $\text{H-}5$), δ 4.16 (1H, dd, $J = 3.1$ e 4.9 Hz, $\text{H-}3$), δ 3.69 (1H, dd, $J = 3.1$ e 9.5 Hz, $\text{H-}4$), δ 2.16 (1H, dd, $J = 9.5$ e 13.4 Hz, $\text{H-}6b$), δ 2.07 (1H, dd, $J = 3.4$ e 14.1 Hz, $\text{H-}2b$), δ 2.03 (1H, ddd, $J = 2.2$, 4.9 e 14.1 Hz, $\text{H-}2a$), δ 1.93 (1H, ddd, $J = 2.2$, 4.5 e 13.4 Hz, $\text{H-}6a$); RMN de ^{13}C ($\text{CH}_3\text{CN-}d_3$, 150 MHz) δ 176.9 (C, $\text{C-}7$), δ 169.5 (C, $\text{C-}9'$), δ 150.1 (C, $\text{C-}4'$), δ 147.7 (C, $\text{C-}3'$), δ 147.3 (CH, $\text{C-}7'$), δ 129.8 (C, $\text{C-}1'$), δ 124.8 (CH, $\text{C-}6'$), δ 118.9 (CH, $\text{C-}8'$), δ 118.1 (CH, $\text{C-}5'$), δ 117.1 (CH, $\text{C-}2'$), δ 78.3 (C, $\text{C-}1$), δ 75.1 (CH, $\text{C-}4$), δ 73.4 (CH, $\text{C-}3$), δ 72.8 (CH, $\text{C-}5$), δ 40.5 (CH_2 , $\text{C-}6$), δ 39.4 (CH_2 , $\text{C-}2$).

Cafeína (3): RMN de ^1H ($\text{CH}_3\text{CN-}d_3$, 600 MHz) δ 7.61 (1H, s, $\text{H-}8$), δ 3.88 (3H, s, $\text{H-}12$), δ 3.45 (3H, s, $\text{H-}10$), δ 3.27 (3H, s, $\text{H-}11$); RMN de ^{13}C ($\text{CH}_3\text{CN-}d_3$, 150 MHz) δ 158.1 (C, $\text{C-}6$), δ 154.5 (C, $\text{C-}2$), δ 150.5 (C, $\text{C-}4$), δ 144.9 (CH, $\text{C-}8$), δ 110.2 (C, $\text{C-}5$), δ 35.8 (CH_3 , $\text{C-}12$), δ 31.7 (CH_3 , $\text{C-}10$), δ 29.7 (CH_3 , $\text{C-}11$).

Ácido criptoclorogênico (4): RMN de ^1H

(CH₃CN-d₃, 600 MHz) δ 7.63 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7'), δ 7.13 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), δ 7.04 (1H, dd, J = 2.2 e 8.4 Hz, H-6'), δ 6.84 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), δ 6.37 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8'), δ 4.75 (1H, dd, J = 2.9 e 9.5 Hz, H-4), δ 4.26 (1H, dt, J = 2.9 e 3.9 Hz, H-3), δ 4.19 (1H, ddd, J = 5.0, 9.5 e 11.3 Hz, H-5), δ 2.14 (1H, ddd, J = 2.9, 5.0 e 13.5 Hz, H-6b), δ 2.07 (1H, dd, J = 3.5 e 14.4 Hz, H-2b), δ 2.03-1.98 (1H, m, H-2a), δ 1.91 (1H, dd, J = 11.3 e 13.5 Hz, H-6a); RMN de ¹³C (CH₃CN-d₃, 150 MHz) δ 177.4 (C, C-7), δ 169.4 (C, C-9'), δ 150.1 (C, C-3' e C-4'), δ 147.8 (CH, C-7'), δ 129.8 (C, C-1'), δ 124.9 (CH, C-6'), δ 118.1 (CH, C-5'), δ 117.8 (CH, C-8'), δ 117.1 (CH, C-2'), δ 80.4 (CH, C-4), δ 78.7 (C, C-1), δ 71.2 (CH, C-3), δ 66.5 (CH, C-5), δ 43.9 (CH₂, C-6), δ 39.7 (CH₂, C-2).

Rutina (5): RMN de ¹H (CH₃CN-d₃, 600 MHz) δ 7.76 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), δ 7.66 (1H, dd, J = 2.1 e 8.5 Hz, H-6'), δ 6.93 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), δ 6.48 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), δ 6.27 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), δ 5.02 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1''), δ 4.51 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-1'''), δ 3.65 (2H, dd, J = 1.3 e 11.3 Hz, H-6''), δ 3.59 (1H, dd, J = 1.5 e 3.3 Hz, H-3'''), δ 3.45-3.34 (5H, m, H-3'', H-4'', H-5'', H-2'''), δ 3.30-3.27 (1H, m, H-2''), δ 3.20 (1H, t, J = 9.3 Hz, H-4'''); RMN de ¹³C (CH₃CN-d₃, 150 MHz) δ 181.0 (C, C-4), δ 166.5 (C, C-7), δ 165.0 (C, C-5), δ 160.5 (C, C-2), δ 160.0 (C, C-8a), δ 150.6 (C, C-4'), δ 146.9 (C, C-3'), δ 137.6 (C, C-3), δ 125.5 (C, C-1'), δ 125.2 (CH, C-6'), δ 119.4 (CH, C-2'), δ 117.7 (CH, C-5'), δ 107.8 (C, C-4a), δ 106.9 (CH, C-1''), δ 103.5 (CH, C-1'''), δ 101.5 (CH, C-6), δ 96.9 (CH, C-8), δ 79.5 (CH, C-3''), δ 78.3 (CH, C-2''), δ 75.3 (CH, C-4'''), δ 73.5 (CH, C-4''), δ 73.2 (CH, C-3'''), δ 72.2 (CH, C-5''), δ 70.75 (CH, C-5'''), δ 69.85 (CH₂, C-6''), δ 69.7 (CH, C-2'''), δ 19.4 (CH₃, C-6''').

Ácido 3,4-dicafeoilquínico (6): RMN de ¹H (CH₃CN-d₃, 600 MHz) δ 7.53 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7'), δ 7.54 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7''), δ 7.10 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), δ 7.06 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2''), δ 7.00 (1H, dd, J = 2.0 e 8.2 Hz, H-6'), δ 6.95 (1H, dd, J = 2.0 e 8.2 Hz, H-6''), δ 6.83 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), δ 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5''), δ 6.30 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8'), δ 6.25 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8''), δ 5.53 (1H, ddd, J = 3.5, 3.8 e 4.9 Hz, H-5), δ 4.96 (1H, dd, J = 3.5 e 8.7 Hz, H-4), δ 4.23 (1H, ddd, J = 4.2, 8.7 e 9.7 Hz, H-3), δ 2.34 (1H, dd, J = 3.8 e 15.0 Hz, H-6b), δ 2.21 (1H, ddd, J = 2.5, 4.2 e 13.6 Hz, H-2b), δ 2.13 (1H, ddd, J = 2.5, 4.9 e 15.0 Hz, H-6a), δ 2.08 (1H, dd, J = 9.8 e 13.6 Hz, H-2a); RMN de ¹³C (CH₃CN-d₃, 150 MHz) δ 178.2 (C, C-7), δ 168.9 (C, C-9' e C-9''), δ 150.2 (C, C-3' e C-3''), δ 148.0 (CH, C-7' e C-7''), δ 147.6 (C, C-4' e C-4''), δ 129.8 (C, C-1' e C-1''), δ 124.6 (CH, C-6' e C-6''), δ 118.1 (CH, C-5' e C-5''), δ 117.5 (CH, C-8' e C-8''), δ 117.0 (CH, C-2' e C-2''), δ 77.7 (C, C-1), δ 77.2 (CH, C-4), δ 71.2 (CH, C-5), δ 67.2 (CH, C-3), δ 43.0 (CH₂, C-2), δ 38.3 (CH₂, C-6).

Ácido 3,5-dicafeoilquínico (7): RMN de ¹H (CH₃CN-d₃, 600 MHz) δ 7.60 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-7''), δ 7.57 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-7'), δ 7.13-7.12 (2H, m, H-2' e H-2''), δ 7.05-7.02 (2H, m, H-6' e H-6''), δ 6.85 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-5' e H-5''), δ 6.27 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8'), δ 6.25 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-8''), δ 5.39 (1H, t_{AB}, J = 3.2 e 5.4 Hz, H-5), δ 5.33 (1H, ddd, J = 4.0, 8.3 e 9.0 Hz, H-3), δ 3.90 (1H, dd, J = 3.2 e 8.3 Hz, H-4), δ 2.25 (1H, dd, J = 4.0 e 14.1 Hz, H-6b), δ 2.16-2.04 (1H, m, H-6a), δ 2.20-2.02 (2H, m, H-2); RMN de ¹³C (CH₃CN-d₃, 150 MHz) δ 177.6 (C, C-7), δ 169.1 (C, C-9' e C-9''), δ 150.0 (C, C-4' e C-4''), δ 147.7 (C, C-3' e C-3''), δ 147.5 (CH, C-7' e C-7''), δ 129.8 (C, C-1' e C-1''), δ 124.6 (CH, C-6' e C-6''), δ 118.1 (CH, C-5' e C-5''), δ 117.7 (CH, C-8' e C-8''), δ 117.0 (CH, C-2' e C-2''), δ 76.6 (C, C-1), δ 72.8 (CH, C-3), δ 72.6 (CH, C-4), δ 39.8 (CH₂, C-2), δ 37.7 (CH₂, C-6).

Ácido 4,5-dicafeoilquínico (8): RMN de ¹H (CH₃CN-d₃, 600 MHz) δ 7.57 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'), δ 7.52 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7''), δ 7.07 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), δ 7.05 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2''), δ 6.99 (1H, dd, J = 2.1 e 8.1 Hz, H-6'), δ 6.96 (1H, dd, J = 2.1 e 8.1 Hz, H-6''), δ 6.81 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), δ 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5''), δ 6.28 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'), δ 6.21 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2''), δ 5.59 (1H, ddd, J = 4.8, 10.0 e 11.0 Hz, H-5), δ 5.10 (1H, dd, J = 3.0 e 10.0 Hz, H-4), δ 4.37 (1H, t_{AB}, J = 3.0 e 3.9 Hz, H-3), δ 2.30 (1H, ddd, J = 2.9, 4.8 e 13.3 Hz, H-6b), δ 2.26-2.06 (2H, m, H-2), δ 2.16-2.08 (1H, m, H-6a); RMN de ¹³C (CH₃CN-d₃, 150 MHz) δ 173.7 (C, C-7), δ 165.8 (C, C-9' e C-9''), δ 147.1 (C, C-3' e C-3''), δ 145.0 (CH, C-7' e C-7''), δ 144.7 (CH, C-4' e C-4''), δ 126.6 (C, C-1' e C-1''), δ 121.8 (CH, C-6' e C-6''), δ 115.2 (CH, C-5' e C-5''), δ 114.6 (CH, C-8' e C-8''), δ 114.1 (CH, C-2' e C-2''), δ 75.3 (C, C-1), δ 74.5 (CH, C-4), δ 68.5 (CH, C-3), δ 67.0 (CH, C-5), δ 38.0 (CH₂, C-6), δ 36.0 (CH₂, C-2).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que a tecnologia acoplada CLAE-EFS/RMN é uma ferramenta muito valiosa no estudo de fitoterápicos à base de produtos naturais. Oito substâncias orgânicas foram rapidamente identificadas sem a necessidade de isolamento de bancada, e tratam-se de compostos encontrados em extratos de *Ilex paraguariensis*, o que corrobora para atestar a autenticidade do fitoterápico em estudo. A versatilidade, rapidez, e principalmente reprodutibilidade com que os experimentos foram conduzidos mostram que é possível fazer uma varredura (*screening*) de extratos vegetais de forma eficiente e segura. Certamente a utilização de uma sonda criogênica permitiu que tivéssemos medidas espectroscópicas de excelente qualidade e com elevada sensibilidade.

REFERÊNCIAS

- AKIRA K. *et al.* LC-NMR identification of a novel taurine-related metabolite observed in ¹H NMR-based metabonomics of genetically hypertensive rats. **J. Pharmaceut. Biomed.** n. 51, vol. 5, 2010. p. 1091-1096.
- BAYER, E. *et al.* On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance. **J. Chromatogr.** n. 186, 1979. p. 497-451.
- BRINGMANN, G.; LANG, G. Full absolute stereostructures of natural products directly from crude extracts: the HPLC-MS/MS-NMR-CD triad. **Mar. Mol. Biotec.** n. 89, 2003. p. 89-116.
- CLARKSON, C. *et al.* Evaluation of on-line solid-phase extraction parameters for hyphenated, high-performance liquid chromatography–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance applications. **J. Chromatogr. A.** n. 1165, vol. 1-2, 2007. p. 1 – 9.
- ELIPE, M. V. S. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. **Anal. Chim. Acta.** n. 497, 2003. p. 1-25.
- EXARCHOU, V. *et al.* LC–NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magn. Reson. Chem.** n. 43, 2005. p. 681-687.
- EXARCHOU, V. *et al.* LC-UV-Solid-Phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in greek oregano. **J. Anal. Chem.** n. 75, 2003. p. 6288-6294.
- GAO, H. *et al.* Rapid structural identification of cytotoxic bufadienolide sulfates in toad venom from *Bufo melanostictus* by LC-DAD-MSⁿ and LC-SPE-NMR. **J. Nat. Prod.** n. 73, 2010. p. 603-608.
- LE GALL G. *et al.* Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. **J. Agric. Food Chem.** n. 51, vol. 9, 2003. p. 2438-2446.
- LEVSEN, K. *et al.* Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry to complex environmental samples. **Trends Anal. Chem.** n. 19, vol. 1, 2000. p. 27-48.
- NOVAK P. *et al.* LC–NMR and LC–MS identification of an impurity in a novel antifungal drug icofungipen. **J. Pharmaceut. Biomed.** n. 50, vol. 1, 2009. p. 68-72.
- NOVAK, P. *et al.* The application of LC–NMR and LC–MS for the separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. **J. Pharmaceut. Biomed.** n. 40, 2006. p. 1268-1272.
- PERES, R. G. *et al.* HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. **Molecules.** n. 18, vol. 4, 2013. p. 3859-3871.
- PÉREZ-TRUJILLO, M. *et al.* Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycone. **J. Agric. Food Chem.** n. 58, vol.16, 2010. p. 9129-9136.
- RIJKE E. D. *et al.* Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pratense* leaves. **J. Sep. Sci.** n. 27, 2004. p. 1061-1066.
- SILVA, L. M. A. *et al.* Use of diffusion-ordered NMR spectroscopy and HPLC–UV–SPE–NMR to identify undeclared synthetic drugs in medicines illegally sold as phytotherapies. **Magn. Reson. Chem.** n. 9, vol. 51, 2013. p. 541-548.
- SORENSEN, D. *et al.* Isolation and structural elucidation by LC-MS-SPE/NMR: PR toxin and cuspidatol-related eromophilane sesquiterpens from *Penicillium roquerforti*. **J. Nat. Prod.** n.70, 2007. p. 121-125.
- SOUZA, G. D. *et al.* Identification of *Alternaria alternata* mycotoxins by LC-SPE-NMR and their cytotoxic effects to soybean (*Glycine Max*) cell suspension culture. **Molecules.** n. 18, 2013. p. 2528-2538.
- SPRAUL, M. *et al.* Advancing NMR sensitivity for LC-NMR-MS using a cryoflow probe: application to the analysis of acetaminophen metabolites in urine. **Anal. Chem.** n. 75, vol. 6, 2003. p. 1536-1541.
- STYLES, P. *et al.* A high-resolution NMR probe in which the coil and preamplifier are cooled with liquid helium. **J. Mag. Reson.** n. 60, 1984. p. 397-404.
- Sumarah, M. W. *et al.* Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. **Phytochemistry.** n. 71, vol. 7, 2010. p. 760-765.

TODE, C. *et al.* Application of LC-NMR to analysis of carotenoids in foods. **J. Sep. Sci.** n. 32, vol. 21, 2009. p. 3659-3663.

WATANABE, N; NIKI, E. Direct coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B. Phys. Biol. Sci.** n. 54, 1978. p. 194-199.