

A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos

The Importance of Hyphenated Techniques (LV/UV, LC/MS, LC/NMR) in the Search of Active Principles

¹Queiroz, E. F.;
²Hostettmann, K.

¹Aché Laboratórios Farmacêuticos.
Departamento de Pesquisa e
Desenvolvimento – DMC, Rodovia
Presidente Dutra Km 222,2,
07034 904, Guarulhos, SP,Brasil.

²Laboratoire de Pharmacognosie
et Phytochimie, École de
Pharmacie Genève-Lausanne,
Université de Genève, Université
de Lausanne, CH-1211 Genève 4,
Switzerland

*Correspondência: E-mail:
emerson.queiroz@ache.com.br

Resumo

A natureza representa um extraordinário reservatório de novas moléculas. Nos últimos anos existe um verdadeiro re-interesse nos programas de triagem (screening) pelos produtos naturais como fonte de novos agentes terapêuticos. Para se descobrir novos produtos naturais ativos, a desrepliação dos extratos brutos é de importância capital para que se possa evitar o isolamento de compostos conhecidos. Neste campo, as estratégias de triagem química, baseadas em técnicas acopladas como a cromatografia líquida-detecção ultravioleta (CL-UV-DAD), cromatografia líquida-espectrometria de massa (CL-MS) e cromatografia líquida-ressonância magnética nuclear (CL-RMN) são cada vez mais utilizadas. No laboratório do Prof. Hostettmann, estes métodos analíticos foram completamente integrados no processo de isolamento e utilizados como na triagem química dos extratos brutos em complemento com ensaios biológicos on-line ou off-line. Neste artigo, possibilidades e limitações das técnicas acopladas na identificação on-line de produtos naturais serão abordadas. Devido a grande importância da CLAE-RMN, uma parte do artigo será dedicada a esta técnica. Em particular várias maneiras de integração da RMN nos processos de desrepliação.

Abstract

Nature represents an extraordinary reservoir of novel molecules and there is currently a resurgence of interest in natural products as a possible source of new lead compounds for introduction into therapeutical screening programmes. To discover new bioactive natural products, the dereplication of crude extracts performed prior to isolation work is of crucial importance for avoiding the tedious isolation of known constituents. In this respect, chemical screening strategies based on hyphenated techniques such as liquid chromatography-ultraviolet photodiode array detection (LC-UV-DAD), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) are more and more extensively used. In the laboratory of Hostettmann's group, these analytical methods have been fully integrated into the isolation process and are used for the chemical screening of crude plant extracts, in complement with online or at-line bioassays, for rapid localization and identification of new bioactive compounds. In this paper, possibilities and limitations of hyphenated techniques for online natural product

Unitermos

Produtos Naturais; Técnicas Acopladas; CL-UV; CL-MS; CL-NMR

Key Words

Natural Products; Hyphenated Techniques; LC-UV; LC-MS; LC-RMN

Cromatografia Líquida a Alta Pressão Acoplada à Detecção Ultravioleta (CL-UV-DAD)

Na última década, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi uma das técnicas mais utilizadas para análise e isolamento de produtos naturais a partir de matrizes complexas como, por exemplo, os extratos de plantas. A CLAE tem sido utilizada de maneira rotineira como "piloto" para o isolamento em escala preparativa de produtos naturais pela otimização das condições experimentais, pelo controle de diferentes frações obtidas durante o isolamento e pelo controle da pureza final dos compostos isolados (GRÄNICHER et al., 1994; NYKOLOV et al., 1993; ARSLANIAN; STERMITZ 1991; KINGSTON, 1979). A utilização de cromatogramas como a "impressão digital" de uma determinada amostra, poderá ajudar na identificação de amostras autênticas e auxiliar na identificação de possíveis compostos utilizados em uma adulteração da mesma. O nível de informação estrutural obtido é limitado pelo tipo de detector acoplado à CL. Detectores baseados em absorção de luz ultravioleta (UV), fluorescência, índice de refração, difração de luz e eletroquímica proporcionam uma boa detecção e sensibilidade, porém pouca ou nenhuma informação estrutural. A introdução das técnicas de acoplamento tais como CL/UV equipada com uma rede de detecção por fotodiodos (CL/UV-DAD) e o acoplamento com a espectrometria de massa (CL/EM), proporcionou um real avanço na identificação estrutural, em linha, de produtos naturais (LINDON et al., 1997). A CLAE acoplada com a detecção por fotodiodo tem sido utilizada há mais de uma década para o estudo da química de plantas (HOSTETTMANN et al., 1984; YOSHIMURA et al., 1994; BRAMLEY, 1992). Atualmente, esta técnica é amplamente empregada nos laboratórios de pesquisa. Os espectros no UV dos produtos naturais podem dar informações úteis sobre a classe de substâncias e, no caso de polifenóis, informações sobre a posição das oxigenações (DUCREY et al., 1995; WOLFENDER; HOSTETTMANN, 1993). Por exemplo, esta técnica combinada com a derivatização pós-coluna, utilizando a adição de reagentes clássicos para o estudo do deslocamento dos máximos de absorção no UV, propiciam a identificação de grupamentos hidroxilas livres na estrutura dos polifenóis

(HOSTETTMANN et al., 1984; YOSHIMURA et al., 1994; BRANLEY, 1992; DUCREY et al., 1995; WOLFENDER; HOSTETTMANN, 1995; MUELLER-HARVEY; BLACKWELL, 1991). Os instrumentos mais modernos possuem bancos de dados com substâncias de referência, e uma pesquisa automática pode comparar rapidamente estes dados com os espectros obtidos, permitindo identificar-se compostos conhecidos.

Cromatografia Líquida a Alta Pressão Acoplada a Espectrometria de Massa (CL-MS)

O acoplamento CL/UV tem suas limitações, porém para classes de compostos naturais UV-ativos, os avanços importantes na determinação estrutural, em linha, foram obtidos com o recente acoplamento entre a CLAE e a espectrometria de massa (WOLFENDER et al., 1997). De fato, CL/EM é um dos métodos analíticos mais sensíveis, pois o detector EM possui grande poder de separação de massas, resultando em alta sensibilidade. Além do mais, esta técnica tem o potencial de fornecer informações sobre a massa molecular dos compostos analisados. Em determinados casos informações estruturais importantes podem ser conseguidas a partir dos fragmentos obtidos em experimentos do tipo EM/EM ou EMⁿ (HOSTETTMANN; WOLFENDER, 1998). Para a análise de produtos naturais, as interfaces mais utilizadas em CL/EM são: ionização química à pressão atmosférica (IQPA) (BRUINS et al., 1987), "electrospray" (ES) (WHITEHOUSE et al., 1985) e "termospray" (TSP) (BLAKLEY; VESTAL, 1983). Cada uma destas interfaces possui características próprias e uma gama de aplicações, porém a utilização combinada das mesmas permite a análise de compostos naturais, desde apolares até moléculas extremamente polares (WOLFENDER et al., 1995). As técnicas de CL/UV, CL/EM, CL/EM/EM e CL/EMⁿ proporcionam um grande número de informações úteis porém, freqüentemente, são insuficientes para a determinação estrutural completa. Pode ser indispensável o isolamento da substância de interesse a fim de se obter dados de ressonância magnética nuclear, o que representa um ponto fraco do processo de identificação em linha, contrapondo-se algumas vezes, à eficiência da metodologia que utiliza unicamente a CL/EM.

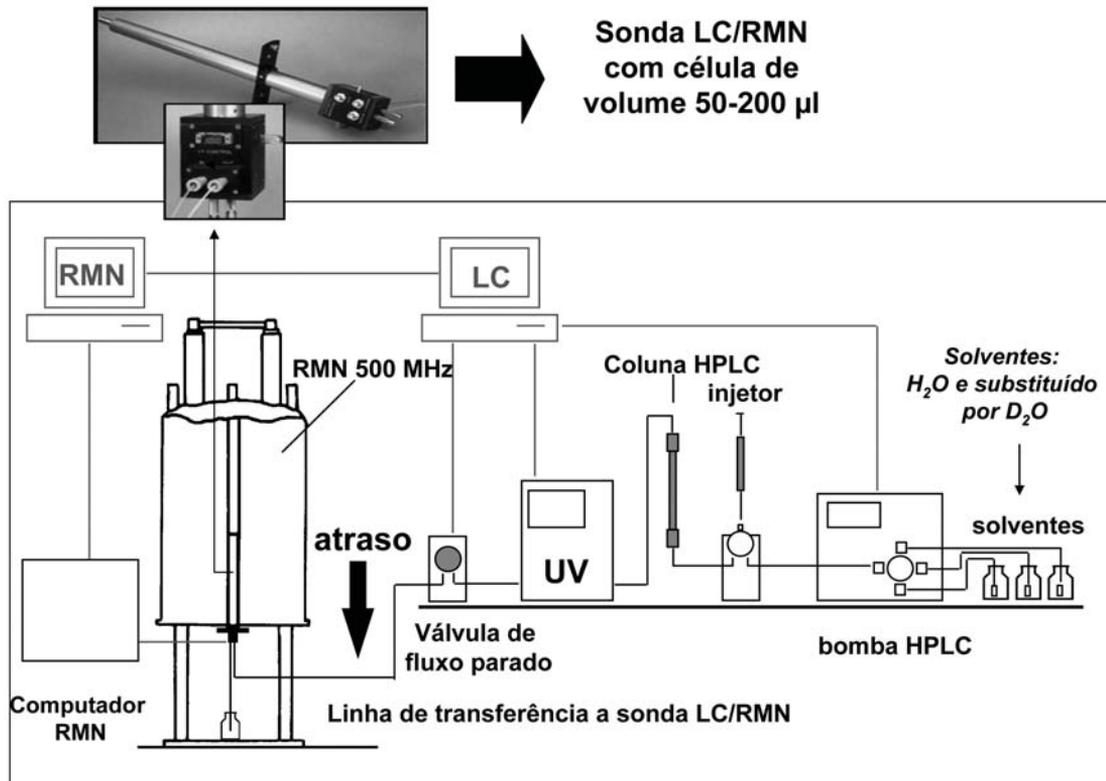
Cromatografia Líquida a Alta Pressão Acoplada a ressonância Magnética Nuclear (CL/RMN)

Recentemente foi demonstrado que o acoplamento CLAE com a ressonância magnética nuclear (RMN) é possível e eficiente. A CL/ ^1H RMN é, de fato, conhecida depois há mais de 15 anos (WATANABE et al., 1979), todavia esta técnica não atingiu um grande sucesso, provavelmente, devido à baixa sensibilidade. Porém, esta técnica promissora ganhou um novo interesse com os recentes progressos no campo do gradiente de pulso e na supressão de solventes, e o grande avanço na concepção de novas sondas e ímãs com campos magnéticos mais poderosos. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução (RMN) constitui-se em um dos principais métodos para se obter informações estruturais detalhadas de compostos orgânicos em solução. Graças ao RMN é possível em particular, diferenciar isômeros conformacionais e óticos. Além disso, a RMN proporciona informações adicionais para a identificação completa de uma nova substância (ALBERT, 1995). Desta forma, a CL/RMN representa uma técnica de acoplamento poderosa e complementar à CL/UV e à CL/EM.

O acoplamento direto entre o espectrômetro de RMN e o sistema CLAE dependeu do desenvolvimento de interfaces especiais chamadas de sondas a fluxo ("flow probes"), da mesma forma que de programas informáticos específicos para as duas técnicas. O primeiro experimento de CL utilizando ímãs supercondutores data década de oitenta (HAW et al., 1980; ALBERT et al., 1985). O experimento pioneiro foi aperfeiçoado com o aumento da sensibilidade dos espectrômetros de RMN e com a possibilidade de se realizar análises utilizando solventes deuterados, o que encareceu bastante a técnica. Com o objetivo de realizar-se, com sucesso, um acoplamento do tipo CL, vários problemas devem ser previamente resolvidos. O primeiro problema relaciona-se com o limite dinâmico do instrumento de RMN. Em CL existe a necessidade de se detectar sinais de metabólitos em baixa concentração, na presença de sinais de RMN ^1H do solvente utilizado. De fato, a maioria de separações por CLAE utiliza uma mistura de solventes binária ou terciária. Com exceção dos sistemas que

utilizam óxido de deutério (D_2O), a utilização de solventes deuterados é relativamente cara para análises de rotina. A solução para este problema foi atingida com o desenvolvimento de técnicas de supressão dos sinais dos solventes. O segundo problema diz respeito ao volume da sonda de CL/RMN. A utilização de grandes volumes na sonda causa um alargamento do pico cromatográfico provocando, assim, uma perda da resolução. Durante anos, houve um esforço na tentativa de diminuir os volumes da célula de detecção da CL. Volumes na faixa de 200-500 μL necessários para os ímãs de ferro dos RMN ^1H clássicos, foram reduzidos para 40-100 μL no caso dos ímãs supercondutores, (HAW et al., 1980; ALBERT et al., 1985). O terceiro problema refere-se à comunicação entre o sistema de CLAE e a RMN. Existe na verdade, a necessidade de sincronização entre os dois aparelhos, especialmente no caso de uma análise do tipo fluxo parado ("stop-flow mode"). O desenvolvimento de programas integrando a CLAE e a RMN tornou possível esta automatização. O último problema relaciona-se à baixa sensibilidade da RMN em relação às quantidades frequentemente separadas utilizando-se a CL/UV e a CL/EM. A sensibilidade foi aumentada, nos últimos anos, com o desenvolvimento de sondas a fluxo contínuo utilizando ímãs de alta resolução. Sensibilidades impressionantes foram conseguidas utilizando a CL e modo de fluxo parado. Geralmente, presume-se que durante as análises no modo de fluxo contínuo ("on-flow mode") utilizando colunas de 4,6 mm de diâmetro, o limite de detecção situa-se em 5 nmols com um aparelho de 500 MHz e a resolução, entre 1-2 Hz (BEHNKE et al., 1996). Como mostra a Figura 3, um CL moderno consiste em um instrumento de alta resolução (400-800 MHz) e um sistema CLAE, equipado de uma válvula especial para as análises do tipo fluxo parado e uma sonda CL de fluxo contínuo. O controle do sistema CLAE é conectado com o sistema de armazenamento de dados do RMN, para a sincronização das diferentes operações. Um detector sensível como, por exemplo, um detector UV é acoplado ao sistema CLAE para desencadear as operações do tipo fluxo parado. O sistema CLAE deve estar localizado a 2 ou 3 m de distancia do ímã. Um longo capilar de poliéter acetona (PEEK) com o menor diâmetro possível servirá de conexão entre as duas unidades.

Figura 3 – Esquema típico de equipamento utilizado para as análises em fluxo contínuo ou parado em CL/RMN. O controle da válvula de fluxo parado é realizado pelo computador do sistema CLAE, que vai acionar a bomba CLAE e a aquisição de dados em RMN. Detalhe mostrando a sonda de fluxo contínuo.



O desenho das sondas em fluxo contínuo (“on-flow probes”)

O desenho das sondas de CL é resultante do compromisso entre as necessidades da cromatografia e a RMN. O volume da célula de fluxo tem um tamanho que permite boas condições tanto de cromatografia (evitar o alargamento dos picos) quanto de detecção pela RMN. Para que se possa diminuir de forma significativa o volume e manter uma boa sensibilidade, a bobina RF da sonda CL foi fixada diretamente em torno da célula de fluxo da sonda. Desta forma, contrariamente às análises com a RMN convencional, é impossível girar a amostra no caso da CL. A rotação aumenta a homogeneidade do campo RF da amostra, porém este fator não é muito importante no caso de células com pequeno volume, como é o caso das sondas de CL. É importante ressaltar que os métodos mais modernos utilizam programas computacionais que otimizam a homogeneidade do campo, sem haver necessidade de girar a amostra. A célula de fluxo da sonda de CL consiste em um tubo de vidro não rotativo enrolado pela bobina RF e conectado pelas duas extremidades ao sistema CLAE (Figura 3).

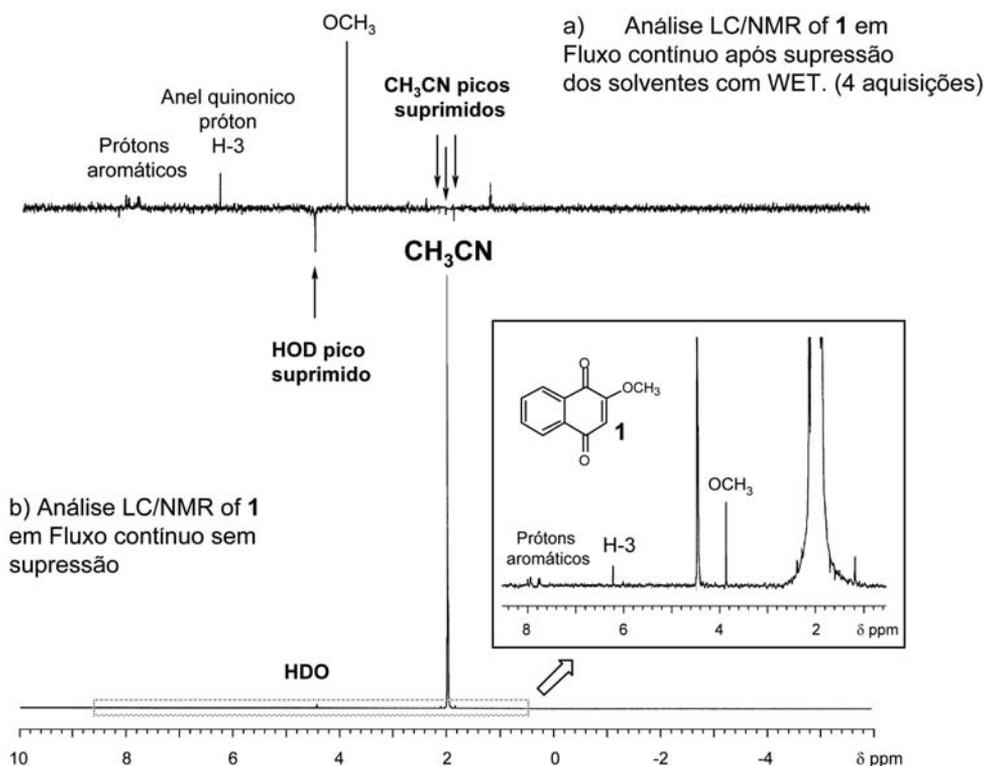
Supressão de solventes

Como mencionado anteriormente, um dos principais problemas da CL é a dificuldade em se observar os sinais do composto analisado, na presença de uma quantidade superior de fase móvel. Para contornar este problema, se deverão suprimir os sinais de RMN ¹H do solvente. A situação se complica no caso da utilização de uma separação em CL em fase reversa, quando se utiliza mais de um solvente protonado e a frequência de ressonância dos mesmos muda durante a análise (modo gradiente). Além disso, o fluxo contínuo da amostra na bobina do detector dificulta a supressão de solventes. Cada solvente é acompanhado de sinais satélites ¹³C, que também necessitam sofrer supressão. Estes problemas foram resolvidos com a criação de técnicas rápidas e eficientes de supressão de solventes diminuindo, assim, a necessidade de se utilizar solventes deuterados. Na prática, na aplicação de CL em fase reversa, D₂O é frequentemente utilizado

para a preparação da fase móvel, porém deve-se considerar que 1L de D₂O custa cerca de US\$ 250. A supressão dos picos de solventes como acetonitrila e metanol é relativamente fácil, pois, tais solventes possuem sinais simples em RMN. Existem várias possibilidades de se resolver o problema da supressão de solventes. Uma das técnicas baseia-se na pré-saturação das ressonâncias do sistema de solvente, que não serão excitadas, pois haverá uma divisão da transmissão de pulso em diferentes pulsos de excitação (ALBERT, 1995). A técnica de pré-saturação não permite a supressão dos sinais satélites de ¹³C, que poderão ser muito maiores que os sinais da amostra e, além disso, requer um tempo importante de espera (> 500 ms) o que dificulta as análises do tipo fluxo contínuo. Novas técnicas de supressão, tais como (“water suppression enhanced through T₁ effects” (OGG et al., 1994)), são muito mais rápidas e eficientes que as técnicas de pré-saturação clássicas descritas (SMALLCOMBE et al., 1995). A técnica WET consiste na utilização de uma série de pulsos RF seletivos ao solvente com ângulo variável (“variable-tip-angle-solvent-selective

RF pulses”), onde cada pulso RF seletivo será seguido de um pulso de gradiente a campo defasado (“dephasing field gradient pulse; PFG”). Esta seqüência é associada com o desacoplamento dos sinais satélites ¹³C dos solventes. Com este desacoplamento adicional, os sinais satélites ¹³C são deslocados para o interior do pico central sujeitos assim, a uma simples freqüência de supressão. A seqüência de supressão completa começará antes de cada série de aquisições, o tempo necessário para a supressão de solvente é mínimo (menos que 100 ms) e uma alta qualidade de espectros poderá desta forma, ser obtida nos dois modos de trabalho, fluxo contínuo ou fluxo parado. A Figura 4 mostra o espectro de uma substância antifúngica obtida no modo fluxo contínuo com e sem supressão de solventes (WOLFENDER et al, 1997). O sinal referente ao acetonitrila e aos dois satélites ¹³C possui várias vezes, a magnitude dos sinais da substância de interesse. A aplicação da seqüência de supressão de solventes WET tornou possível a obtenção de um espectro de RMN¹H de boa qualidade.

Figura 4 – Exemplo típico do nível de supressão de solventes utilizando a seqüência WET. Os espectros de RMN ¹H foram obtidos com a mesma substância (naftoquinona) durante a análise de CL/RMN do extrato de *Swertia calycina* (Gentianaceae)



Um outro problema ligado à supressão de solventes aparece nos casos em que os sinais da amostra possuem a mesma ressonância que a fase móvel. Estes serão suprimidos junto aos sinais do solvente, o que poderá causar problemas na análise de um composto desconhecido. Com o objetivo de detectar todos os sinais da amostra, uma alternativa a se adotar é a utilização de dois sistemas de solventes independentes tais como MeCN:D₂O e MeOH:D₂O. A CL/RMN pode detectar qualquer núcleo magneticamente ativo. Na análise de produtos naturais os núcleos de maior interesse são o ¹H e o ¹³C. Aplicações nos estudos de metabolismo de fármacos mencionam a detecção de ¹⁹F e ³¹P (LINDON et al., 1997; SPRAUL, et al., 1993; SPRAUL; HOFMANN, 1995). A detecção direta do RMN¹³C é bastante difícil, pois, este elemento existe em abundância isotópica muito baixa, na natureza. Porém, alguns pesquisadores desenvolveram uma detecção indireta do ¹³C utilizando na CL/RMN a detecção por polarização dinâmica do ¹³C (STEVENSON; DORN, 1994).

Sensibilidade da análise CL/RMN

Um ponto negativo da CL/RMN é a sensibilidade relativamente baixa, conforme comentado anteriormente. Com o objetivo melhorar a relação entre sinal/ruído (S/N) obtida por RMN, vários parâmetros podem ser ajustados:

- aumentar a quantidade de amostra. Geralmente, o volume da célula CL está situada entre 60-200 µl com 2 mm de diâmetro, representando uma boa condição para cromatografia;
- aumentar o campo magnético; frequências superiores a 750 MHz para obtenção de RMN¹H têm sido utilizados;
- aumentar o fator de sensibilidade, utilizando bobinas de RMN de alta qualidade;
- trabalhar em baixa temperatura e;
- aumentar a qualidade do pré-amplificador, ocasionando a diminuição do ruído de fundo (LINDON et al., 1997).

A obtenção de um campo magnético homogêneo pode proporcionar o estreitamento das linhas na RMN, o que também pode melhorar a relação sinal/ruído. A

incorporação de novas técnicas de aquisição de dados em RMN, tal como a filtragem digital, também pode contribuir para aumentar a sensibilidade. Combinando a eletrônica digital com CLAE "microbore", os limites de detecção para a caracterização estrutural situam-se na região de 5 ng em instrumento operando a 500 ou 600 MHz, em uma análise do tipo fluxo parado. Os limites de detecção absoluta de sinais ¹H-¹³C utilizando sondas de CL/RMN comerciais de 100 mL foram estimados com a 3'-desoxi-3'-azidotimidina (AZT) (PM 252), em aparelho de 500 MHz em modo de fluxo parado. A relação entre sinal/ruído (S/N) do H-1 da ribose desta molécula foi utilizada para definir o limite de detecção. Uma relação S/N de 3,0 foi obtida utilizando 1 µg de AZT após 64 aquisições (5 min) e 85 ng após uma noite inteira de análise. Com 21 µg de AZT, foi possível realizar um experimento do tipo H¹-H¹ 2D TOCSY em 2,6 horas e todas as correlações possíveis foram obtidas para um experimento do tipo H¹-¹³C HMQC em uma noite de análise (SWEATMAN et al., 1995). Uma estimativa aproximada foi realizada em nosso laboratório para determinar o limite de detecção de uma célula de 21 µL utilizando um secoiridóide glicosilado, a swertiamarina (PM 374). Foi necessária uma injeção de 20 µg deste composto em coluna para se obter uma relação S/N de 3 para os prótons olefínicos H-3 (16 aquisições por 1 min de incrementos). Estes limites podem ser reduzidos com o tratamento digital apropriado do sinal.

Modo de operação

De acordo com o tipo de problema e a sensibilidade desejada, vários modos de operação podem ser empregados na CL. Como já mencionado, os modos de fluxo parado e contínuo podem ser utilizados. Além disso, várias outras técnicas, tais como "time slicing" ou as coletas automáticas dos picos para análise posterior, são também possíveis. O modo de fluxo contínuo é o mais simples, pois não é necessária a sincronização entre o sistema CLAE e a RMN, e pode-se obter uma boa resolução cromatográfica. Este modo é limitado pela relativa baixa sensibilidade. Os espectros de CL são obtidos de forma contínua durante a separação, gravados com um número de aquisições e um discreto número de incrementos. O modo de fluxo contínuo é processado da mesma forma que um espectro de 2D em RMN. Uma dimensão do gráfico 2D é representada pela

escala em ppm característica da RMN e a outra escala, pelo tempo (ver p. ex. Figura 5). De acordo com as análises, um número ideal de aquisições e incrementos, e a resolução em CLAE, devem ser respeitados. Usualmente, são utilizados valores entre 4 a 32 aquisições por incremento. Um grande número de aquisições por incremento pode aumentar a sensibilidade, porém reduz, concomitantemente, a resolução em CL. No caso de uma eluição em modo gradiente, o deslocamento químico dos picos de solvente muda de acordo com a composição do mesmo. Para uma supressão efetiva destes sinais, a ressonância do solvente deverá ser determinada durante o processo cromatográfico. Uma possível solução para este problema será realizar a aquisição de um branco, com o objetivo de guardar a posição da frequência de irradiação dos sinais a suprimir, e utilizar tais valores na análise real. Este método não é muito preciso e consome muito tempo. Uma alternativa será realizar uma aquisição simples de exploração ("scout scan") antes de cada incremento, para determinar a frequência de ressonância do solvente e, conseqüentemente, realizar a supressão do mesmo (SMALLCOMBE et al., 1995).

O modo de análise que utiliza o fluxo parado é muito mais sensível que o modo em fluxo contínuo, e pode proporcionar diferentes análises do tipo 2D. Porém, este tipo de operação requer o tempo de retenção preciso do composto a analisar. A CL poderá ser conectada a outros detectores como a CL/UV e a CL/EM (HOLT et al., 1998). Um destes detectores será conectado antes do instrumento de CL/RMN, o sinal do composto de interesse poderá controlar uma válvula especial que vai para o fluxo exatamente quando o pico do composto estiver no interior da célula de RMN, graças a um tempo de atraso previamente calculado. É o tipo de análise que requer um programa computacional para sincronizar a operação entre a válvula que controla o fluxo e a aquisição da RMN (Figura 3).

Na prática, é possível se adquirir um certo número de dados em RMN do cromatograma em questão, utilizando uma série de paradas de fluxo, sem que se possa perder a resolução da separação cromatográfica, por causa de uma difusão dos compostos no interior da coluna. O método mais prático para operação do tipo fluxo contínuo é utilizar uma válvula coletora de picos integrada ao detector CL. O pico

do composto ou dos compostos que interessam será coletado sem que o fluxo precise ser parado. Cada pico será analisado automaticamente em CL após o término da cromatografia. Em caso de picos sobrepostos difíceis de serem separados, é possível se realizar análises de CL em pequenos intervalos de tempos ("time slicing") durante a passagem do composto na célula de análise. Esta técnica pode proporcionar uma avaliação da pureza de um pico cromatográfico. Como foi demonstrado a CL pode ser operada de diferentes maneiras. A estratégia empregada e o tipo de informação obtida serão discutidos em vários exemplos aplicados à química de produtos naturais, especialmente no caso de metabólitos secundários de plantas.

Aplicações da CL/RMN na química de produtos naturais

As aplicações práticas da CL/RMN ainda são raras; esta nova técnica de acoplamento, até o presente momento, tem sido utilizada principalmente para o estudo do metabolismo de fármacos (LINDON et al., 1997). Por outro lado, algumas aplicações apareceram no campo da química de produtos naturais. Uma análise das diferentes aplicações pode dar uma boa idéia das possibilidades e limitações da CL/RMN neste domínio. Para ilustrar a técnica, alguns exemplos serão discutidos aqui. Como esta técnica sozinha, geralmente não é suficiente para a completa identificação estrutural das substâncias, em análise, os dados de CL/EM e CL/UV também serão discutidos.

Experimentos de CL/RMN utilizando fluxo parado na identificação de produtos naturais

A análise por CL em fluxo contínuo é menos sensível quando comparada às análises em fluxo parado, conforme visto anteriormente. Entretanto, pode ser aplicada com sucesso para a análise de extratos brutos de plantas ou frações enriquecidas, necessitando de uma otimização cuidadosa das condições de separação. O uso de CL/RMN em fluxo contínuo é particularmente interessante no caso da análise de compostos majoritários de uma mistura e se sua solubilidade permitir injeção em CLAE de grande quantidade de amostra. Praticamente centenas de µg e vários mg de extratos de plantas ou frações enriquecidas foram injetadas em colunas de 4-8 mm de diâmetro com

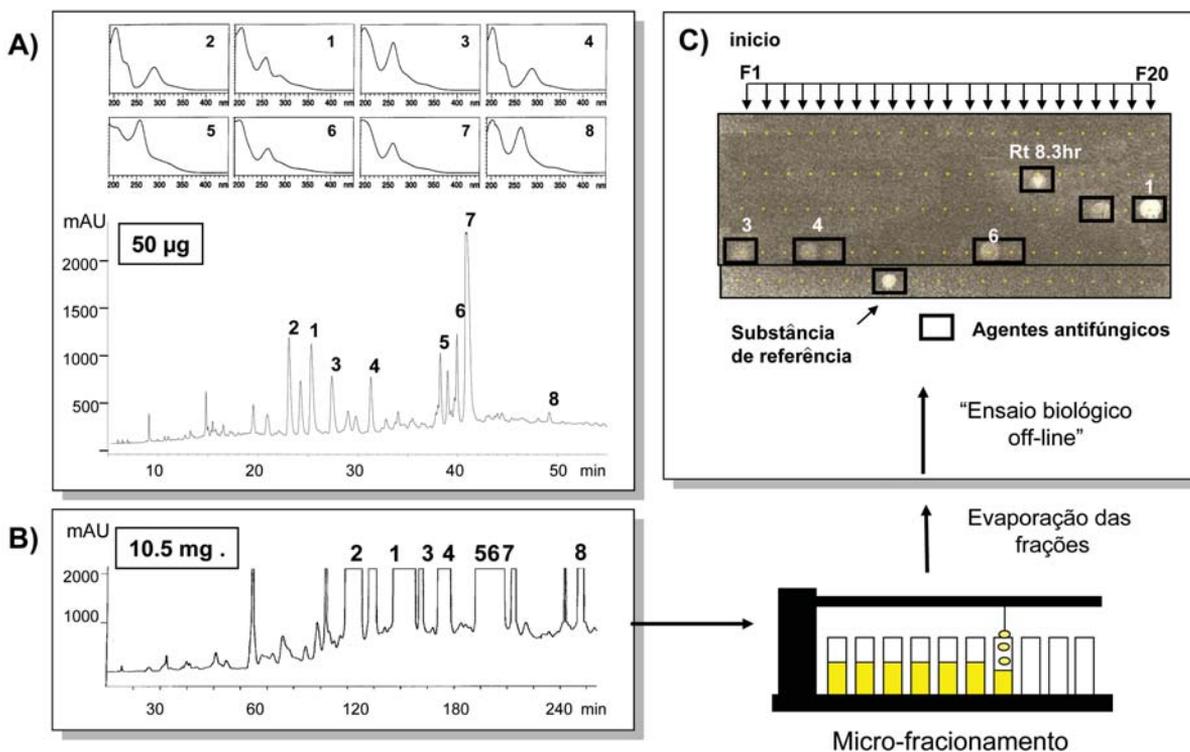
resultados satisfatórios. Colunas analíticas de 150-250 mm, combinadas com injeções contendo grandes quantidades de amostra são preferíveis.

Um exemplo de CL/RMN ^1H é fornecido pela investigação de uma fração de planta da Africana, *Erythrina vogelii* Hook. F. (Leguminosae), utilizada na medicina tradicional da Costa do Marfim para tratar infecções cutâneas (MITSCHER et al., 1987) que possui interessante atividade antifúngica (QUEIROZ et al. 2002a). Em uma análise preliminar, o extrato diclorometânico das cascas da raiz apresentou uma potente atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum*. Graças a uma análise CL/UV preliminar foi possível detectar a presença de isoflavonas e isoflavanonas como substâncias majoritárias do extrato ativo. Esta observação está de acordo com exemplos encontrados na literatura em relação à quimiotaxonomia do gênero *Erythrina* (TAHARA et al., 1995).

Com o objetivo de identificar rapidamente as substâncias responsáveis por esta atividade, o extrato foi analisado por CL/EM alta resolução e CL/RMN.

As condições de cromatografia foram otimizadas para realizar a análise de CL com a maior massa possível da amostra. Em uma coluna do tipo C18, a compressão radial com um diâmetro interno de 8 mm foi escolhida para a separação, injetando-se 10 mg do extrato bruto. Uma separação satisfatória foi obtida utilizando-se um fluxo baixo de 0,1 mL/min, conseguindo-se, também, com este fluxo um aumento da sensibilidade. Um micro-fractionamento foi realizado após a CL, desta forma, todos os picos foram coletados e testados para a atividade antifúngica utilizando-se o método de bioautografia direta. Assim, a atividade antifúngica foi relacionada a três substâncias (Figura 5).

Figura 5 = a) análise CL/UV do extrato CH₂Cl₂ de *Erythrina vogelii* Hook. F. (Leguminosae). Condições CLAE: injeção de 50 µg, Coluna Nova Pack C18 (150 x 3,9 7 mm); gradiente MeCN/H₂O (10:90 a 100:0 60 min.). b) análise LC/RMN ^1H ; condições CLAE injeção de 10 mg, Coluna Nova Pack C18 (100 x 8 mm, 10 mm), fluxo 0.1 mL/min.; gradiente MeCN/D₂O (10:90 a 100:0 em 19hs min.). c) microfracionamento e teste antifúngico por bioautografia direta contra *Cladosporium cucumerinum*.



O espectro de CL/RMN 2D em fluxo contínuo obtido mostrou a presença de sinais característicos de isoflavonas e isoflavanonas. Foram observados para cada pico sinais característicos de prótons aromáticos entre δ 5,9

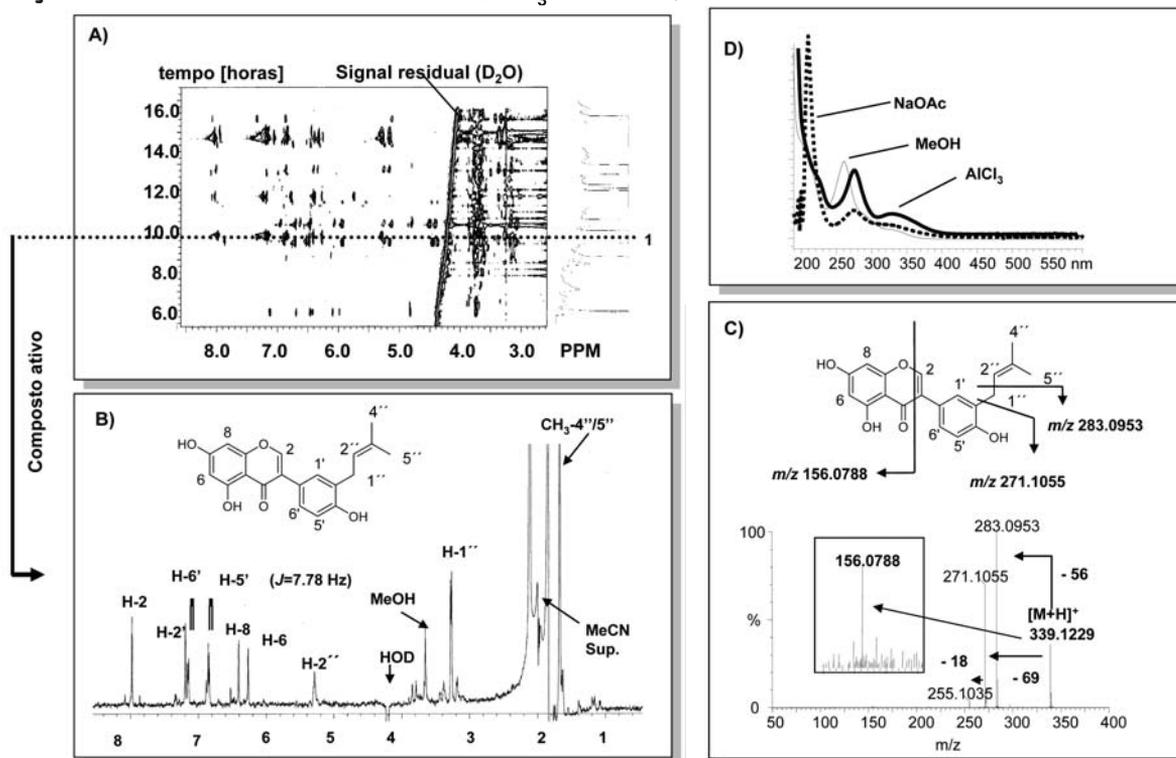
e 6,4, que foram atribuídos aos prótons do anel-A oxigenado em posição 5 e 7. As substâncias **1, 3 e 4** apresentaram sinais entre δ 4,39-4,57, atribuídos aos prótons característicos de uma isoflavanona, enquanto

que os picos **2**, **5-8** apresentam um singlete a δ 8,0, indicativo de uma isoflavona. O pico cromatográfico equivalente ao composto **1** apresentou uma forte zona de inibição no teste antifúngico por bioautografia direta. Como discutido anteriormente, segundo os dados de CL/UV e CL o composto **1** foi identificado como sendo uma isoflavona. O espectro de CL/EM em alta resolução (CL/APCIq TOF-EM) exibe um íon molecular a m/z 339.1229 $[M+H]^+$ que indica uma fórmula molecular de $C_{20}H_{19}O_5$. Os fragmentos a m/z 283.0953 $[M-56]^+$ e m/z 271.1055 $[M-68]^+$ são característicos de perda de C_4H_7 e C_5H_9 a partir de um grupamento prenil (Figura 6c). A partir da fórmula molecular foi possível deduzir a presença de três grupamentos hidroxilas em **1**. O espectro de CL/RMN 1H mostrou dois singletos a δ 6,26 e δ 6,40 atribuídos a dois prótons aromáticos, H-6 e H-8. Três sinais correspondentes a um sistema ABX a δ 6,85 (d, $J=8Hz$) e δ 7,19 (singlete largo s), são atribuídos aos prótons aromáticos a H-5', H-6' e H-2', respectivamente no anel B (Figura 6b).

Finalmente, um singlete a δ 7,9 foi atribuído ao próton H-2. A posição dos três grupamentos hidroxilas foi

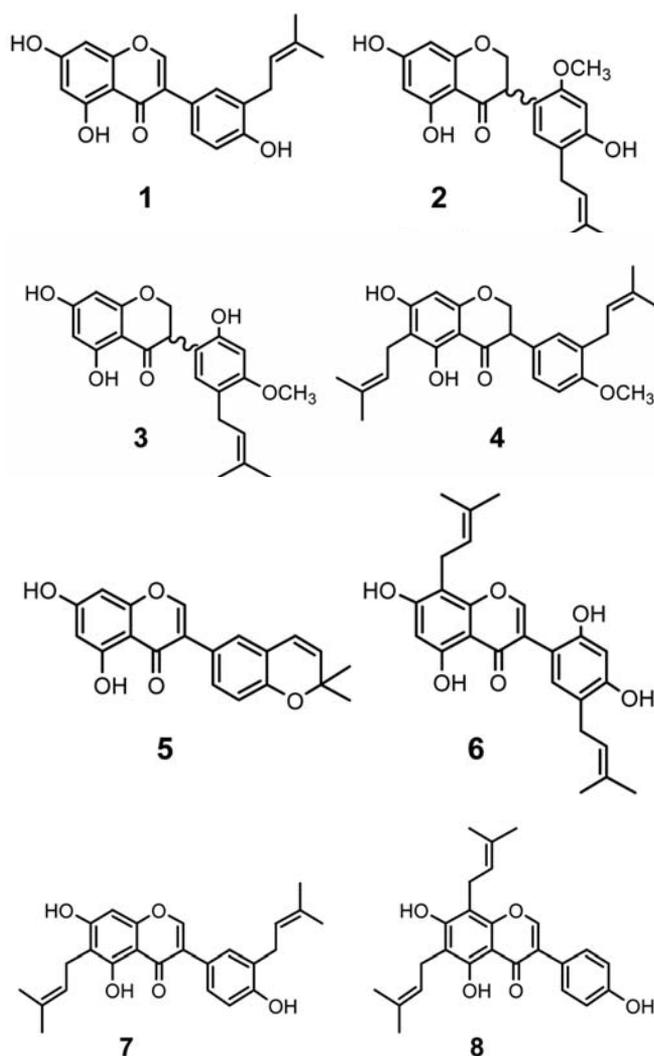
deduzida após a análise do espectro UV deslocado ("UV shifted spectra"), obtido por uma experiência adicional do tipo derivatização pós-coluna, segundo o protocolo testado por HOSTETTMANN et al. (1984), para identificação de grupamentos hidroxilas livres em flavonas e xantonas. Uma substituição do tipo 5,7 no anel A foi deduzida a partir dos espectros UV obtidos após a adição de $AlCl_3$ e NaOAc (MARKHAM; MABRY, 1975). O deslocamento batocrômico das bandas II com $AlCl_3$ indica a formação de um complexo entre o grupamento hidroxila em posição 5 e o grupamento carboxila em 4. Por outro lado, os deslocamentos das bandas I e II com a base fraca (NaOAc) sugerem a presença de um grupamento hidroxila em C7 e em C4', as posições mais ácidas da molécula (Figura 6d). O espectro de EM/EM obtido em condições de dissociação induzida por colisão (CID), apresentou um fragmento a m/z 153.0446 $[A_1]^+$ resultante de uma clivagem do tipo retro-Diels Alder (RDA), que confirma a presença de dois grupamentos hidroxila no anel A (WARIDEL et al., 2001). O composto foi identificado como isowighteona, uma isoflavona prenilada conhecida pela atividade antifúngica (DAHIYA et al., 1984).

Figura 6 – a) análise CL/RMN do extrato CH_2Cl_2 de *Erythrina vogelii* Hook. F. (Leguminosae). b) Espectro LC/RMN 1H do composto **1**. c) Espectro de CL/EM em alta resolução (CL/APCIq TOF-EM) do composto **1**. d) Espectros UV sobrepostos mostrando o deslocamento batocrômico com a adição dos reativos de deslocamento ($AlCl_3$ e NaOAc).



Utilizando a mesma estratégia empregada na identificação de 1, outras 7 substâncias puderam ser identificadas (Figura 7). Todavia, se em alguns casos a identificação dos compostos foi parcial, as diferentes informações espectroscópicas obtidas conduziram ao isolamento guiado de várias substâncias novas (ATINDEHOU et al., 2002; QUEIROZ et al., 2002b).

Figura 7 – Substâncias identificadas do extrato CH₂Cl₂ de *Erythrina vogelii* Hook. F. (Leguminosae)

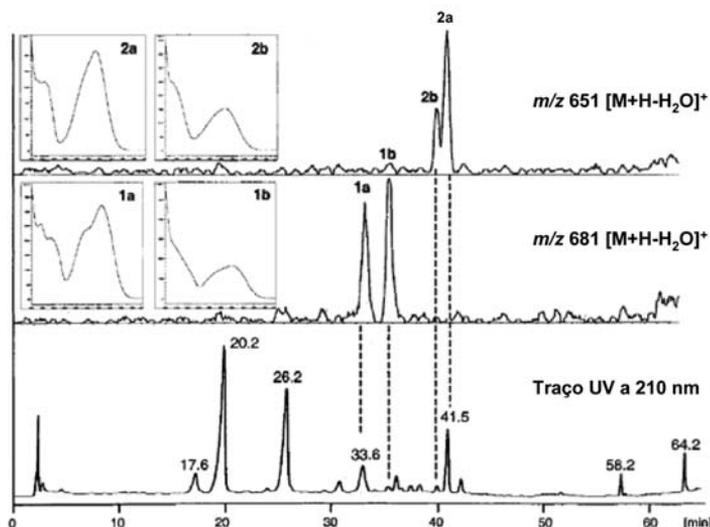


Experimentos de CL/RMN para a identificação de produtos naturais

A CL/RMN pode ser utilizada com eficiência para

obtenção de informações estruturais, baseadas no espectro de RMN ¹H de compostos presentes em extratos de plantas ou em frações enriquecidas. Entretanto, esta técnica pode ser de grande utilidade quando os picos de misturas simples são difíceis de separar, tais como compostos isoméricos do tipo *cis*, *trans* ou estruturas semelhantes. Um problema desta natureza foi encontrado durante o isolamento de secoridóides glicosilados de *Jamesbrittenia fodina* Wild (Scrophulariaceae) (COGNE et al., 2003). A análise CL/UV/EM do extrato bruto revelou a presença de dois pares de isômeros a *m/z* 699 [M+H]⁺ (1a e 1b) e *m/z* 669 [M+H]⁺ (2a e 2b) (Figura 8). Rapidamente, iniciou-se a purificação destes compostos, porém a análise por CLAE dos compostos purificados mostrava a presença da mistura inicial. Com o objetivo de se obter mais informações sobre a estrutura destes compostos, uma análise CL foi realizada com cada mistura. Uma boa separação foi conseguida utilizando-se uma mistura de MeCN:D₂O como fase móvel (gradiente 25:75 a 30:70 em 30 min) em uma coluna C18 Symmetry. Foram necessários 240 µg da amostra para se atingir uma sensibilidade adequada.

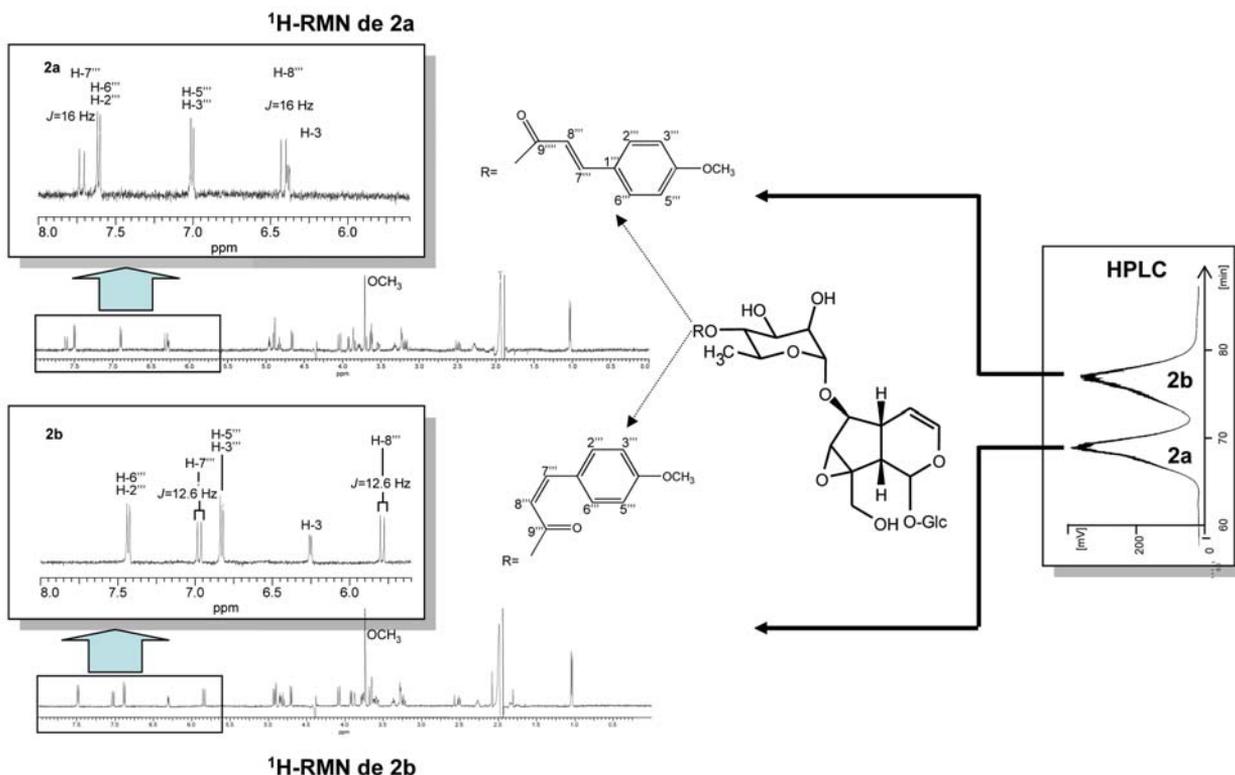
Figura 8 – Análise CL/UV/ESI-EM do extrato metanólico de *Jamesbrittenia fodina* Wild (Scrophulariaceae), utilizando uma coluna Symmetry C-18 (25x3.9 mm, 5 µm de diâmetro, Waters), gradiente metanol:H₂O (28:72 a 46:54 em 30 min, 46:54 a 62:38 em 16 min, 62:38 a 100:0 em 14 min), injeção de 50 µg, fluxo 1 mL/min Espectro UV foi obtido entre 200 e 400 nm.



Os espectros de CL/RMN ^1H de **2a** e **2b** mostraram uma grande similaridade entre o par de isômeros, pois mostraram multipletos entre δ 2,20 e δ 2,60, e um grande número de sinais entre δ 3,20 e δ 5,20 sugerindo a presença de um ou dois açúcares. Entretanto, a presença de grupamento metila (δ 1,1) sugere que um dos açúcares seja a ramnose (ANDARY et al., 1982). Um sinal em δ 3,82 sugere a presença de um grupamento metoxila. Sete sinais entre δ 5,8 e 7,8 foram atribuídos à presença de um ácido cinâmico. O espectro no UV obtido na análise CL/UV/EM confirma esta hipótese, com absorções características desse tipo de substituição (WALDRON et al., 1996). Dois sinais a δ 7,01 (2H, d, $J=8,8$ Hz) e δ 7,61 (2H, d, $J=8,2$ Hz) em **2a** e δ 6,89 (2H, d, $J=8,8$ Hz) e δ 7,50 (2H, d, $J=8,8$ Hz) em **2b** podem ser atribuídos a um anel aromático *para*-dissubstituído. A única diferença entre os espectros de **2a** e **2b** diz respeito aos sinais atribuídos à dupla ligação do ácido cinâmico: δ 7,72 (1H, d, $J=15,9$ Hz) e δ 6,42 (1H, d, $J=15,9$ Hz) são característicos de uma dupla ligação *trans* no caso

de **2a**, enquanto que em **2b**, os dois dubletos a δ 7,04 (1H, d, $J=12,6$ Hz) e δ 5,84 (1H, d, $J=12,6$ Hz) são típicos de uma dupla ligação *cis* (Figura 8). A mistura dos compostos **2a/2b** foi submetida às análises clássicas 1D e 2D NMR em CD_3OD . As análises RMN 2D (gCOSY, gHMBC e gHSQC) confirmaram a presença de dois açúcares, identificados como α -ramnose and β -glucose, assim como do ácido cinâmico. O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de sinais δ 55,77 para **2a** e δ 55,89 para **2b** atribuídos a grupamentos metoxilas. Para ambos os compostos **2a/2b**, os sinais restantes consistem em 9 carbonos e 10 prótons, que foram atribuídos através das análises de RMN 2D a uma aglicona do tipo catalpol (AGABABYAN et al., 1982). Os compostos **2a** e **2b** foram identificados como o *cis* e *trans* do 6-O-[4-O-(4-metoxicinamoil)- α -L-raminopiranosídeo]catalpol, respectivamente. A forma *trans* foi previamente descrita por AGABABYAN et al. (1982) isolada de *Verbascum georgicum* BENTH. (Scrophulariaceae).

Figura 9 – Análise de CL/RMN em fluxo parado dos compostos **2a** e **2b** (em $\text{MeCN:D}_2\text{O}$)



Os compostos 1a/1b são similares a 2a/2b exceto pela substituição da parte correspondente ao grupo cinamoila. 1a e 1b foram identificados, utilizando-se a mesma estratégia como sendo as formas *trans* e *cis* do 6-O-[4-O-(3,4-dimetoxicinamoyl)- α -L-raminopranosídeo]catalpol, respectivamente. A forma *trans* foi previamente descrita por MYASE et al. (1991) a partir de *Buddleja japonica* HEEML. (Buddlejaceae).

Conclusão

Como demonstrado nos exemplos acima a CL em combinação com outras técnicas acopladas como a CL/UV e a CL/EM proporciona uma análise rápida de produtos naturais em misturas complexas. Um grande número de informações sobre o conteúdo do extrato pode ser obtido graças às informações, em linha. De acordo com as informações estruturais obtidas, é possível guiar o isolamento de um determinado composto novo ou se identificar um composto já conhecido. O uso inteligente das técnicas acopladas pode acelerar, de forma considerável, a procura de novos compostos. O estudo químico dos extratos utilizando as complexas técnicas de acoplamento gera um grande número de informações. Com o objetivo de racionalizar este método e ampliar o número de amostras analisadas em curto espaço de tempo, o próximo desafio será encontrar maneira de centralizar as informações, para a rápida identificação de compostos conhecidos a partir de informações compostos de referência. Os químicos de produtos naturais devem concentrar seus esforços no desenvolvimento de novos alvos biológicos, sendo que estes representam o aspecto de maior dificuldade na procura de novos princípios ativos.

Referências

- AGABABYAN, E.Y.; ARUTYUNYAN, L.S.; MNATSAKANYAN, V.A.; GACH-BAITTS, E.; RADICH, L. Iridoids of *Verbascum georgicum*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.18, n.4, p.412-417, 1982.
- ANDARY, C.; WYLDE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G.; WINTERNITZ, F. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobancha rapum-genistae*. *Phytochemistry* v. 21, p.1123-1127, 1982.
- ALBERT, K. On-line use of NMR detection in separation chemistry. *Journal of Chromatography A*, v.703, p.123-147, 1995.
- ALBERT, K.; NIEDER, M.; BAYER, E.; SPRAUL, M. Continuous-flow nuclear magnetic resonance. *Journal of Chromatography*, v. 346, p.17-24, 1985.
- ARSLANIAN, R.L.; STERMITZ, F.R. High performance liquid chromatographic analysis of iridoid glycosides from *Penstemon rydbergii* varieties. *Phytochemical Analysis*, v.2, p.35, 1991.
- ATINDEHOU, K.K.; QUEIROZ, E.F.; TERREAUX, C.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K. Three new prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. *Planta Medica*, v. 68, n.2, p.181-182, 2002.
- BEHNKE, B.; SCHLOTTERBECK, G.; TALLAREK, U.; STROHSCHNEIN, S.; TSENG, L.-H.; KELLER, T.; ALBERT, K.; BAYER, E. Capillary HPLC-NMR coupling high-resolution NMR spectroscopy in the nanoliter scale. *Analytical Chemistry*, v. 68, n.7, p.1110-1115, 1996.
- BLAKLEY, C.R.; VESTAL, M.L. Thermospray interface for liquid-chromatography mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*, v.55, p.750-754, 1983.
- BRANLEY, P.M. Analysis of carotenoids by high-performance liquid-chromatography and diode-array detection. *Phytochemical Analysis*, v.3, p.97, 1992.
- BRUINS, A.P.; COVEY, T.R.; HENION, J.T. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*, v.59, p.2642-2646, 1987.
- COGNE, A.-L.; QUEIROZ, E.F.; WOLFENDER, J.-L.; MARSTON, A.; MAVI, S., HOSTETTMANN, K. On-line identification of unstable catalpol derivatives from *Jamesbrittenia fodina* by LC-MS and LC-NMR *Phytochemical Analysis*, v.14, n.2, 67-73, 2003.
- DAHIYA, J.D.; STRANGE, R.N.; BILYARD, K.G.; COOKSEY, C.J.; GARRATT, P.J. 2 Isoprenylated isoflavone phytoalexins from *Cajanus cajan*. *Phytochemistry*, v.23, p.871-873, 1984.
- DUCREY, B.; WOLFENDER, J.-L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Analysis of flavonol glycosides of 13 *Epilobium* species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry*, v.38, p.129-137, 1995.
- GRÄNICHNER, F.; CHRISTEN, P.; VUAGNAT, P. Rapid high-performance liquid-chromatographic quantification of valepotriates in hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L var. *sambucifolia* mikan. *Phytochemical Analysis*, v.5, p.297, 1994.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants - the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v.30, p.3864-3874, 1991.
- HAW, J.F.; GLASS, T.E.; HAUSLER, D.W.; MOTELL, E.; DORN, H.C. Direct coupling of a liquid chromatograph to a continuous-flow hydrogen nuclear magnetic-resonance detector for analysis of petroleum and synthetic fuels. *Analytical Chemistry*, v.52, p.1135, 1980.

HOLT, R.M.; NEWMAN, M.J.; PULLEN, F.S.; RICHARDS, D.S.; SWANSON, A.G. High-Performance liquid chromatography-NMR spectrometry-mass spectrometry: further advances in hyphenated technology. *Journal of Mass Spectrometry*, v.32, n.1, p.64-70, 1998.

HOSTETTMANN, K.; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, M. Online high-performance liquid-chromatography - ultraviolet visible spectroscopy of phenolic compounds in plant-extracts using post-column derivatization. *Journal of Chromatography*, v.283, p.137-147, 1984.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.-L. *Application of LC/MS and LC/NMR in the search for new bioactive compounds from plants of the Americas*. In *Medicinal Plants of the Americas* (HOSTETTMANN, K., GUPTA, M.P., MARSTON, M. eds.). Harwood: Amsterdam, 1998.

KINGSTON, D.G.I. High-performance liquid-chromatography of natural-products. *Journal of Natural Products*, v.42, n.3, p.237-260, 1979.

LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K.; SIDELMANN, U.G.; WILSON, I.D. Directly coupled HPLC-NMR and its application to drug metabolism. *Drug Metabolic Review*, v.29, n.3, p.705-746, 1997.

MARKHAM, K.R.; MABRY, T.J. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In *The Flavonoids*, Part 1 (Harborne, JB, Mabry, H, eds.), Academic Press, New York, 1975.

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKWUTE, S.K. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products*, v.50, n.6, p.1025-1040, 1987.

MUELLER-HARVEY, I.; BLACKWELL, P.M.S. An improved high performance liquid chromatographic post-column derivatization procedure for the UV-VIS spectroscopic characterization of phenolic compounds. *Phytochemical Analysis*, v.2, p.38, 1991.

MYASE, T.; AKAHORI, C.; KOHSAKA, H.; UENO A. Acylated iridoid glycosides from *Buddleja japonica* HELMS. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.39, p.2944-2951, 1991.

NYKOLOV, N.; IOSSIFOVA, T.; VASSILEVA, E.; KOSTOVA, I.; STOEV, G. Reverse-phase high-pressure liquid-chromatographic analysis of hydroxycoumarins in plant-extracts quantitative determination of hydroxycoumarins in *Fraxinus ornus*. *Phytochemical Analysis*, v.4, p.184-185, 1993.

OGG, R.J.; KINGSLEY, P.B.; TAYLOR, J.S. WET, a T-1-insensitive and B-1-insensitive water-suppression method for in-vivo localized H-1 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance B*, v.104, p.1-10, 1994.

QUEIROZ, E.F.; WOLFENDER, J.-L.; ATINDEHOU, K.K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection

and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. *Journal of Chromatography*, v.974, p.123-134, 2002a.

QUEIROZ, E.F.; ATINDEHOU, K.; TERREAUX, C.; ANTUS, S.; HOSTETTMANN, K. Prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. *Journal of Natural Products*, v.65, n.3, p.403-406, 2002b.

SMALLCOMBE, S.H.; PATT, S.L.; KEIFFER, P.A. WET solvent suppression and its application to LC-NMR and high-resolution NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance A Series A* v.117, p.295-303, 1995.

SPRAUL, M.; HOFMANN, M.; WILSON, D.W.; LENZ, E.; NICHOLSON, J.K.; BALES, J.R. Coupling of hplc with F-19-NMR and H-1-NMR spectroscopy to investigate the human urinary-excretion of flurbiprofen metabolites. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, v.11, n.10, p.1009-1115, 1993.

SPRAUL, M.; HOFMANN, M. 750-MHz NMR spectroscopy and food-related LC-NMR applications. *Magnetic Resonance in Food Science*, v.157, p.77-92, 1995.

STEVENSON, S.; DORN, H.C. C-13 dynamic nuclear-polarization - a detector for continuous-flow, online chromatography. *Analytical Chemistry*, v.66, n.19, p.2993-2999, 1994.

SWEATMAN, B.C.; FARRANT, R.D.; DANDERSON, P.N.; PHILIPPE, I.; SALMAN, S.R.; NICHOLSON, J. K.; LINDON, J.C. Evaluation of the detection limits of directly coupled 600 MHz, ¹H-¹³C HPLC-NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, v.1, p.9-12, 1995

TAHARA, S.; IBRAHIM, R. K. Prenylated isoflavonoids - an update. *Phytochemistry*, v.38, p.1073-1094, 1995.

WALDRON, K.W.; PARR, A.J.; RALPH, J. Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochemical Analysis*, v.7, n.6, p.305-312, 1996.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K.R.; MAJOR, H.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *Journal of Chromatography A*, v.926, p.29-41, 2001.

WATANABE, N.; NIKI, E.; SHIMIZU, S. An experiment on direct combination of high performance liquid chromatography with FT-NMR (LC-NMR). *Jeol News*, v.15 A, p.2, 1979.

WHITEHOUSE, R.C.; DREYER, R.N.; YAMASHITA, M.; FENN, J.B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry*, v.57, p.675-679, 1985.

WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K. Liquid-chromatographic UV detection and liquid-chromatographic thermospray mass-spectrometric analysis of *Chironia* (Gentianaceae) species - a rapid method for the screening of

polyphenols in crude plant-extracts. *Journal of Chromatography*, v.647, p.191-202, 1993.

WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of medicinal plants. In *Phytochemistry of Medicinal Plants*. (Arnason, J.T., Mata, R., Romeo, J. eds.). Plenum Press, New York, 1995, pp. 189.

WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K.; WAGNER-REDEKER, W. Comparison of liquid chromatography electrospray, atmospheric pressure chemical ionization, thermospray and continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry for the determination of secondary metabolites in crude plant extracts. *Journal of Mass Spectrometry and Rapid Communications Mass Spectrometry*, v.S35-S46, 1995.

WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S.; HILLER, W.; HOSTETTMANN, K. LC-UV-MS and LC-NMR analyses of crude extracts of Gentianaceae species. *Phytochemical Analysis*, v.8, n.3, p.97-104, 1997.

WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. *LC/MS: a useful tool in the search for new bioactive plant constituents*, in *Virtual activity, real pharmacology. Different approaches to the search for bioactive natural compounds*, (Verotta, L. ed.). Research Signpost, Trivandrim, India, pp. 137, 1997.

YOSHIMURA, I.; YASUHIRO, K.; YOSHIKAZU, Y.; HUNECK, S.; YASUYUKI, Y. Analysis of secondary metabolites from lichen by high-performance liquid-chromatography with a photodiode-array detector. *Phytochemical Analysis*, v.5, p.197-205, 1994.