

Determinação de flavonóides glicosilados em folhas de *Azadirachta indica* (Neem) utilizando a técnica de UPLC MS/MS.

Alessandra V. Jager¹ (PQ), Fernando G. Tonin^{2*} (PQ)
[*fgtonin@usp.br](mailto:fgtonin@usp.br)

1- Departamento de Engenharia de Alimentos – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo (USP/FZEA), Campus Pirassununga/SP.

2- Departamento de Engenharia de Biosistemas – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo (USP/FZEA), Campus Pirassununga/SP.

Palavras Chave: *Neem*, flavonoides, UPLC MS/MS, espectrometria de massas, cromatografia líquida

Tabela 1. Parâmetros do espectrômetro de massas.

Analito	m/z	transições	Cone (V)	Colisão (V)
Astragalina	447	227 ^a ; 285 ^b	64	42; 26
Isoquercitrina	463	271 ^a ; 300 ^b	62	42; 26
Miricitrina	463	287 ^a ; 316 ^b	60	40; 24
Nicotiflorina	593	255 ^a ; 285 ^b	74	56; 32
Quercitrina	447	271 ^a ; 300 ^b	60	44; 26
Rutina	609	271 ^a ; 300 ^b	82	56; 30

a: transição de confirmação de identidade

b: transição utilizada na quantificação

Introdução

Uma imensa gama de atividades biológicas tem sido atribuídas às folhas da espécie *Azadirachta indica* (Neem), muitas delas relacionadas à capacidade de combater radicais livres. Estudos fitoquímicos relatam a presença de flavonóides derivados de quercetina, kaemperol e miricetina, porém sem dados quantitativos ou mesmo sem a especificação necessária. Dentro deste contexto o presente trabalho propõe a utilização da técnica de separação por UPLC aliada a sensibilidade e seletividade da espectrometria de massas triploquadrupolar no desenvolvimento de um método sensível e seletivo para quantificação dos flavonoides astragalina, isoquercitrina, miricitrina, nicotiflorina, quercitrina e rutina, presentes nas folhas da espécie em questão.

Resultados e Discussão

As condições cromatográficas foram otimizadas para uma coluna C₁₈ (BEH, 2,1 X 50 mm, 1,7 µm) operando na vazão de 0,5 mL/min, resultando na utilização de uma fase móvel aquosa (A) e uma fase orgânica (B) composta por acetonitrila, ambas com 0,01% (v/v) de ácido fórmico. O gradiente otimizado consistiu em 10% de B no tempo inicial, 15,3% de B no tempo 3,5 minutos, 95% de B no tempo 3,6 minutos, 95% de B no tempo 4 minutos e 10% de B no tempo 4,5 minutos. As condições de detecção do espectrômetro de massas (XEVO TQ-S – Waters) com fonte ESI operando no modo negativo em "Multiple Reaction Monitoring" (MRM) foram otimizadas com o auxílio do software IntelliStartTM, sendo selecionadas duas transições mais intensas para cada flavonóide analisado. Na tabela 1 encontram-se os parâmetros utilizados para cada analito com suas respectivas transições. O procedimento de extração otimizado em banho de ultrassom (40 kHz, 100 W), comprovadamente exaustivo, resultou numa relação massa de planta finamente triturada/volume de solvente (etanol 70% v/v) de 100 mg para 50 mL, com tempo total de 30 minutos. Após a extração as amostras foram diluídas 200 vezes com água deionizada.

Para a quantificação foram utilizadas curvas de calibração na faixa de 0,35 a 35 ng/mL, resultando em coeficientes de determinação de 0,9994 a 0,9999. Testes de recuperação (adição de padrão) efetuados nos níveis de 12,5%, 25% e 50% com relação aos níveis encontrados nas amostras resultaram em valores que variaram de 93,3% a 98,2%. Os valores de concentração encontrados para duas amostras analisadas de diferentes procedências são mostradas na tabela 2.

Tabela 2. Resultados das amostras de *Neem* analisadas.

Analito	Silvânia/GO		Piracicaba/SP	
	% (m/m)	CV (%)	% (m/m)	CV (%)
Astragalina	0,0262	3,3	0,0198	3,5
isoquercitrina	0,1906	2,2	0,1511	1,5
Miricitrina	0,0058	3,4	0,0051	3,8
nicotiflorina	0,0274	2,5	0,0307	1,5
Quercitrina	0,0471	3,0	0,0299	3,1
Rutina	0,1807	0,5	0,2075	1,1

Conclusões

O método desenvolvido mostrou-se adequado quanto à exatidão, seletividade, sensibilidade, e precisão para quantificação e especificação dos flavonóides majoritários presentes nas folhas de *Neem*.

Agradecimentos

CNPq; Fapesp