

DARYNE LU MALDONADO GOMES DA COSTA

Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae)

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, no âmbito do Programa DINTER - CAPES com o Instituto Federal do Mato Grosso, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Baldoqui

Araraquara – SP
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

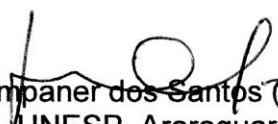
C837e	Costa, Daryne Lu Maldonado Gomes da Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Pouteria torta</i> e <i>Pouteria ramiflora</i> (Sapotaceae) / Daryne Lu Maldonado Gomes da Costa. – Araraquara : [s.n], 2014 144 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Lourdes Campaner dos Santos Coorientador: Débora Cristina Baldoqui 1. Padronização de extratos vegetais. 2. Flavonoides. 3. Espectrometria de massas. 4. Antirradicalar. 5. Testes de mutagenicidade. I. Título.
-------	---

DARYNE LU MALDONADO GOMES DA COSTA

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

Araraquara, 15 de agosto de 2014.

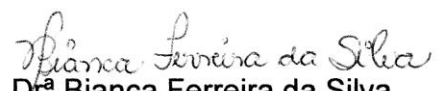
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Lourdes Campaner dos Santos (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a Dr^a Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Dr^a Bianca Ferreira da Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a Dr^a Rozilaine Aparecida Pelegrine Gomes de Faria
Instituto Federal do Mato Grosso – IFMT, Cuiabá



Prof. Dr. Gerardo Magela Vieira Junior
Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais – UFMT, Sinop

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nascimento: 11/10/1979

Filiação: Sebastião Gomes da Costa e Lucia Maldonado Gomes da Costa

Naturalidade: Maringá-PR

Endereço residencial: Rua Primavera, 190, Bosque da Saúde, Cuiabá-MT

Telefone: (65) 8127-0710

E-mail: daryne@gmail.com

Formação Acadêmica

Engenheira de Alimentos

Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Ano de conclusão: 2004.

Especialista em Docência no Ensino Superior

Centro Universitário de Maringá (CESUMAR).

Ano de conclusão: 2006.

Mestre em Ciência de Alimentos

Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Ano de conclusão: 2008.

Atuação profissional

Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT

Período: 2013-Atual, Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professora de ensino básico, técnico e tecnológico, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Instituto Federal do Paraná - IFPR

Período: 2011-2013, Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professora de ensino básico, técnico e tecnológico, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT

Período: 2008-2011, Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professora de ensino básico, técnico e tecnológico, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Artigos completos publicados em periódicos

FAKHOURI, F. M.; **COSTA, D.**; YAMASHITA, F.; MARTELLI, S. M.; JESUS, R. C.; ALGANER, K.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; INNOCENTINI-MEI, L. H. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. **Carb. Pol.**, v.95, p. 681-689, 2013.

FLORES, S. K.; **COSTA, D.**; YAMASHITA, F.; GERSCHENSON, L. N.; GROSSMANN, M. V. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. **Mater. Sci. Eng., C**, v.30, p.196-202, 2010.

Artigo aceito para publicação

COSTA, D. L. M. G.; RINALDO, D.; VARANDA, E. A.; SOUSA, J. F.; NASSER, A. L. M.; SILVA, A. C. Z.; BALDOQUI, D. C.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) leaves by HPLC-DAD and the determination of its mutagenic activity. **J. Med. Food**, 2014.

Capítulo de livro publicado

FAKHOURY, F. M.; CARVALHO, C. W. P.; **COSTA, D. L. M. G.**; MARTELLI, S. M.; YAMASHITA, F.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; COLLARES-QUEIROZ, F.P. **Bioplásticos**: Uma nova perspectiva para redução do impacto ambiental no descarte de embalagens flexíveis In: Tendências e Inovações Em Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos.1 ed.São Paulo : Atheneu, 2013, v.1, p. 53-81.

Participações em congressos

COSTA, D. L. M. G.; RINALDO, D.; NASSER, A. L. M.; SILVA, A. C. Z.; BALDOQUI, D. C.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of flavonoids from the leaves of *Pouteria torta* (Sapotaceae) by HPLC-PAD. In: **4º Brazilian Congress on Natural Products**, Natal-RN, 2013.

NOGUEIRA, L. G.; CARVALHO, M. S.; ROZATTO, M. R.; SANTOS, V. A. F. F. M.; **GOMES DA COSTA, D. L. M.**, FURLAN, M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; BAUAB, T. M. Determinação da atividade antibacteriana de extratos de *Pouteria torta* (Sapotaceae) e *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). In: **26 ºCongresso Brasileiro de Microbiologia, 2º Encontro Nacional de Professores de Microbiologia, Latin America ISME Symposium, Simposio Internacional de Bactérias Láticas, 4º**

Simpósio de Coleções de Culturas, Foz do Iguaçu-PR, 2011.

MARTINELLI, R. C.; BORRALHO, I. C.; **COSTA, DARYNE L. M. G.** Extração e caracterização de amido de banana verde: aplicações em potencial In: **II Jornada de Iniciação Científica do IFMT**, Cuiabá-MT, 2009.

COSTA, D. L. M. G.; YAMASHITA, F.; FAKHOURI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; SCAPIM, M. R. S. Filmes Biodegradáveis com alto teor de amido produzidos por extrusão: coeficientes de solubilidade e de difusão efetivo e permeabilidade ao vapor de água In: **10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Foz do Iguaçu-PR, 2009.

COSTA, D. L. M. G.; SCAPIM, M. R. S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Manufacturing of cassava/polybutylene adipate co-terephthalate films with high starch content In: **8th World Congress of Chemical Engineering**, Montreal, Canadá, 2009.

COSTA, D. L. M. G.; YAMASHITA, F.; RAMOS, B. E. Produção por extrusão de filmes de alto teor de amido termoplástico de mandioca com poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) In: **II Jornada da Produção Científica da Educação Profissional e Tecnológica da Região Centro-Oeste**, Cuiabá-MT, 2008.

COSTA, D. L. M. G.; SCAPIM, M. R. S.; BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Mechanical properties of high content cassava starch/poly(butylene adipate coterephthalate) films produced by blow extrusion In: **2nd French-Brazilian meeting on polymers**, Florianópolis-SC, 2008.

FAKHOURI, F. M.; COSTA, D. L. M. G.; INOCENTINNI-MEI, L. H.; YAMASHITA, F.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. The influence of gelatin content on starch blown films plasticized with sorbitol In: **2nd French-Brazilian Meeting on Polymers**, Florianópolis-SC, 2008.

FAKHOURI, F. M.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; COSTA, D. L. M. G.; MARIM, A. S. S. P.; YAMASHITA, F. Desenvolvimento e caracterização de filmes compostos extrudados de amido de milho modificado e gelatina, plastificados com sorbitol. In: **7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas-SP, 2007.

COSTA, D. L. M. G.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; THOMASI, R. DE O. Otimização do crescimento micelial do fungo comestível *Agaricus blazei* em meios à base de coroa de abacaxi In: **XIII ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Londrina-PR, 2004.

COSTA, D. L. M. G.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; THOMASI, R. DE O. Otimização do crescimento micelial do fungo comestível *Agaricus blazei* em meios à base de coroa de abacaxi In: **I Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul**, Cascavel-PR, 2004.

COSTA, D. L. M. G.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; THOMASI, R. DE O. Uso de folhas de coroa de abacaxi para obtenção de massa miceliana do cogumelo do sol (*Agaricus blazei murrii*). In: **XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife-PE, 2004.

Produção técnica

Costa, D. L. M. G. Cinética Enzimática, 2008. (Especialização, Curso de curta duração ministrado.)

COSTA, D. L. M. G.; GUALDA, I. P. Introdução à Ciência de Alimentos, 2007. (Extensão, Curso de curta duração ministrado.)

COSTA, D. L. M. G. Novos Ingredientes Alimentares, 2007. (Extensão, Curso de curta duração ministrado.)

COSTA, D. L. M. G.; MARIM, A. S. S. P. Segurança Alimentar, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Orientação de iniciação científica

Thailine Santos Figueiredo Silva. **CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE BANANA VERDE E SEU APROVEITAMENTO NA ELABORAÇÃO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**. 2010. Iniciação científica (Engenharia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

Rafaella Cristine Martinelli. **REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA EXTRAÇÃO DE AMIDO DE BANANA VERDE: CARACTERIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DA POLPA RESIDUAL**. 2010. Iniciação científica (Engenharia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

Rafaella Cristine Martinelli. **Extração de Amido de Banana Verde e sua Aplicação no Revestimento de Frutas in natura e na Produção de Filmes Biodegradáveis por casting**. 2009. Iniciação científica (Técnico em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

Liz de Castro Monteiro. **Extração de Amido de Banana Verde e sua Aplicação no Revestimento de Frutas in natura e na Produção de Filmes Biodegradáveis por casting**. 2009. Iniciação científica (Médio Integrado em Meio Ambiente) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

Indiana Campos Borralho. **Extração de Amido de Banana Verde e sua Aplicação em Panificação**. 2009. Iniciação científica (Técnico em Alimentos) - Instituto Federal

de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

Orientação de trabalho de conclusão de curso (TCC)

Mitsi Margarete Marques. **Liofilização de Frutas: Uma Revisão**. 2011. Orientação de outra natureza (Técnico em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Julyane Fatima Silva Gonçalves. **Liofilização de Frutas: Uma Revisão**. 2011. Orientação de outra natureza (Técnico em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Participação em banca de comissões julgadoras

Concurso para Professor de Ensino Básico, Técnico e tecnológico, 2010. Instituto Federal de Mato Grosso. Área: Alimentos.

Concurso para Professor de Ensino Básico, Técnico e tecnológico, 2010. Instituto Federal de Mato Grosso. Área: Engenharia de Alimentos.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Alencar e minha mãe Lucia pelo cuidado e pelo incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, por ter ido muito além de suas obrigações enquanto orientadora, sempre me ajudando e me impulsionando, sempre presente, proativa, e me encorajando a aceitar os desafios propostos por esse doutorado. Sem o seu incentivo eu não teria chegado tão longe. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas pela oportunidade de trabalhar no projeto temático Produtos Naturais: fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas, do programa Biota.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Débora Cristina Baldoqui por ter me acolhido tão prontamente quando estive no Paraná.

Aos meus colegas de laboratório, a quem sempre guardarei no coração, por terem me alegrado tanto, me ensinado tanto, e por terem feito com que o tempo em que passei no Instituto de Química fosse tão agradável: Aninha, Carlinhos, Weslei, Felipe, Marcelo, Claudinha, Carlos César e Francisco.

Ao meu colega de DINTER Demétrio pela valiosa contribuição no desenvolvimento e discussão da validação do método analítico para quantificação dos compostos.

Aos professores do Instituto de Química pelos valiosos ensinamentos, em especial à Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre, em quem com certeza vou me espelhar enquanto docente.

Aos técnicos do Instituto de Química, em especial ao Dr. Alberto Camilo Alécio, à Dra. Bianca Ferreira da Silva, à Dra. Lucinéia Vizzotto Marconcini e ao Dr. Nivaldo Borallo. Muito obrigada pelo tempo dedicado às minhas análises e pela boa vontade em solucionar os problemas de última hora.

Aos servidores do Instituto de Química, em especial à Célia Maria Chicareli Vieira Coelho, da Seção Técnica de Pós-graduação, a quem sempre me atendeu com muita paciência e simpatia.

Ao Prof. Dr. Daniel Rinaldo por ter se disposto a vir até Araraquara me ensinar a quantificação por HPLC-DAD e por sempre me atender com seu bom humor característico.

À Ana Livia Ferreira Furtado pelas análises por espectrometria de massas em São Vicente.

Ao IFMT, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. José Bispo Barbosa, pela oportunidade de ter cursado este programa de doutorado interinstitucional, contribuindo com a formação do seu quadro de servidores.

Aos colegas de IFMT, em especial ao Prof. Dr. Wander Miguel de Barros, que sempre esteve disposto a me ajudar nos trâmites burocráticos em Cuiabá. Sua contribuição para a conclusão deste doutorado é inestimável.

À coordenadora do DINTER em Cuiabá, Profa. Dra. Valéria de Souza, por ter viabilizado a execução deste programa.

À CAPES pela bolsa concedida e pela oportunidade de cursar este programa de doutorado interinstitucional.

À FAPESP pela verba concedida ao projeto temático Biota Fapesp número 09/52237-9, intitulado Produtos Naturais – Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo químico, determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais e a avaliação das atividades antirradicalar e mutagênica dos extratos hidroalcoólicos (70% de etanol, v/v) de folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae). O estudo por HPLC-DAD, HPLC-ESI-IT-MS², HPLC-ESI-QTRAP-MS² e ESI-IT-MS/MS possibilitou a identificação de treze substâncias derivadas da miricetina, quercetina, apigenina além do ácido gálico e do ácido quinico. Com a técnica HPLC-DAD foi possível quantificar as substâncias miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo nos extratos hidroalcoólicos das duas espécies. Os teores de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo encontrados foram de 2,53 e 13,55 mg.g⁻¹ de extrato para *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente. Para miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo foi encontrado 1,33 mg.g⁻¹ de extrato de *P. torta*. Os valores encontrados para miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo foram de 2,20 e 9,61 mg.g⁻¹ de extrato para *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente. O extrato hidroalcoólico de *P. torta* apresentou 11,66 mg.g⁻¹ de extrato de fenóis totais e 16,11 mg.g⁻¹ de extrato de flavonoides totais, enquanto a infusão das folhas apresentou 90,83 mg.g⁻¹ de infuso de fenóis totais e 5,56 mg.g⁻¹ de infuso de flavonoides totais. *Pouteria ramiflora* apresentou 125,87 mg.g⁻¹ de extrato de fenóis totais e 48,82 mg.g⁻¹ de extrato de flavonoides totais. O teor de fenóis totais na infusão folhas de *P. ramiflora* foi de 55,85 mg.g⁻¹ de infuso, enquanto o teor de flavonoides totais foi de 27,84 mg.g⁻¹ de infuso. A atividade antirradicalar utilizando DPPH indicou IC₅₀ de 3,83 e 0,18 mg.mL⁻¹ para os extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente, quando comparados aos valores encontrados para os padrões de quercetina (0,03 mg.mL⁻¹) e ácido gálico (0,01 mg.mL⁻¹). Para as infusões os valores encontrados foram de 0,53 e 2,62 mg.mL⁻¹ para *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente. Ambos os extratos apresentaram atividade mutagênica *in vitro* pelo Teste de Ames. O extrato hidroalcoólico de *P. torta* apresentou mutagenicidade às linhagens TA97a e TA98, enquanto o extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora* apresentou mutagenicidade à linhagem TA97a, em ausência de metabolização, sugerindo a necessidade de estudos mais criteriosos dessas espécies, que são utilizadas na medicina popular como vermífugos e no combate à diarreia.

Palavras-chave: Padronização de extratos vegetais, flavonoides, espectrometria de massas, atividade antirradicalar, teste de Ames.

ABSTRACT

This work aimed the chemical study, and the determination of total phenols and flavonoids amounts and the evaluation of the antiradical and mutagenic activities of hydroethanolic extracts (70% ethanol, v / v) of *Pouteria torta* and *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae). The study by HPLC-DAD, HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS and ESI-IT-MS/MS allowed the identification of thirteen substances derived from myricetin, quercetin, apigenin, and, in addition, gallic acid and quinic acid. It was possible to quantify substances by HPLC-DAD technique: myricetin-3-O- β -D-galactopyranoside, myricetin-3-O- α -L-arabinopyranoside and myricetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside (M-3-O-RHA) in the hydroethanolic extracts of *P. torta* and *P. ramiflora* leaves. The amounts of M-3-O-GAL found were 2,53 and 13,55 mg.g⁻¹ of extract for *P. torta* and *P. ramiflora* respectively. For M-3-O-ARA was found 1,33 mg.g⁻¹ of *P. torta* extract. The values found for M-3-O-RHA were 2,20 and 9,61 mg.g⁻¹ of extract for *P. torta* and *P. ramiflora* respectively. The hydroalcoholic extract of *P. torta* presented 11,66 mg.g⁻¹ of extract for total phenols and 16,11 mg.g⁻¹ of extract for total flavonoids, while the infusion of the leaves showed 90,83 mg.g⁻¹ of infusion for total phenols and 5,56 mg.g⁻¹ of infusion for total flavonoids. *Pouteria ramiflora* showed 125,87 mg.g⁻¹ of extract for total phenols and 48,82 mg.g⁻¹ of extract for total flavonoids. The total phenolic content in leaves infusion of *P. ramiflora* was 55,85 mg.g⁻¹, whereas the content of total flavonoids was 27,84 mg.g⁻¹ of infusion. The antiradical activity using DPPH showed IC₅₀ of 3,83 and 0,18 mg.mL⁻¹ for the hydroethanolics extracts of *P. torta* and *P. ramiflora*, respectively, when compared to the values found for the standards of quercetin (0,03 mg .mL⁻¹) and gallic acid (0,01 mg.mL⁻¹). For infusions the values were 0,53 and 2,62 mg.mL⁻¹ for *P. torta* and *P. ramiflora* respectively. Both extracts showed *in vitro* mutagenic activity by the Ames Test. The hydroethanolic extract of *P. torta* showed mutagenicity against TA97 and TA98 strains, while the hydroethanolic extract of *P. ramiflora* showed mutagenicity against TA97 strain in the absence of metabolism, suggesting that more careful studies of these species are necessary, once these species are used in folk medicine as vermifuges and combating diarrhea.

Keywords: Plant extracts padronization, flavonoids, mass spectrometry, antiradicalar activity, Ames test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas e flores de <i>P. torta</i> .	25
Figura 2. Frutos de <i>P. torta</i> .	25
Figura 3. Frutos de <i>P. ramiflora</i> .	28
Figura 4. Fluxograma da preparação dos extratos hidroalcoólicos de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> .	35
Figura 5. Fluxograma da preparação das infusões de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> .	36
Figura 6. Cromatogramas a 254 nm e espectros no UV, obtidos por HPLC-DAD, dos padrões não comerciais utilizados: M-3-O-GAL (a), M-3-O-ARA (b), M-3-O-RHA (c) e Q-3-O-GAL (d).	46
Figura 7. Estrutura representativa de um flavonol glicosilado.	48
Figura 8. Espectro RMN ^1H de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	49
Figura 9. Espectro TOCSY/1D de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	50
Figura 10. Mapa de contornos por $g\text{HSQC}$ de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	51
Figura 11. Mapa de contornos por $g\text{HMBC}$ de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	52
Figura 12. Espectro RMN ^1H de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	54
Figura 13. Espectro TOCSY/1D de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	55
Figura 14. Mapa de contornos por $g\text{HSQC}$ de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	56
Figura 15. Mapa de contornos por $g\text{HMBC}$ de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	57
Figura 16. Espectro RMN ^1H de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	59
Figura 17. Espectro TOCSY/1D de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	60
Figura 18. Mapa de contornos por $g\text{HSQC}$ de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).	61

Figura 19. Mapa de contornos por <i>g</i> HMBC de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO _{d6}).	62
Figura 20. Espectro RMN ¹ H de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO _{d6}).	64
Figura 21. Espectro TOCSY/1D de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO _{d6}).	65
Figura 22. Mapa de contornos por <i>g</i> HSQC de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO _{d6}).	66
Figura 23. Mapa de contornos por <i>g</i> HMBC de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO _{d6}).	67
Figura 24. Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>P. torta</i> (a) e <i>P. ramiflora</i> (b). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 5 a 100% de B em 60 min (Solvente A: H ₂ O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: MeOH acidificado com 0,1% de TFA), 40°C, λ = 254 nm, vazão 1 mL min ⁻¹ .	71
Figura 25. Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>P. torta</i> (a) e <i>P. ramiflora</i> (b). Cromatogramas sobrepostos (c). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H ₂ O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, λ = 254 nm, vazão 1 mL min ⁻¹ .	72
Figura 26. Cromatogramas do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>P. torta</i> (a) e de sua coinjeção com ácido gálico (b), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (c), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (d), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (e) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (f). Cromatogramas sobrepostos (c). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H ₂ O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min ⁻¹ .	74
Figura 27. Cromatogramas do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>P. ramiflora</i> (a) e de sua coinjeção com ácido gálico (b), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (c), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (d), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (e) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (f). Cromatogramas sobrepostos (c). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H ₂ O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min ⁻¹ .	75
Figura 28. Cromatogramas HPLC-DAD dos extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>P. torta</i> (a) e <i>P. ramiflora</i> (b). Picos identificados: ácido gálico (1), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (2), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (3), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (4) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (5). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H ₂ O	

acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹. 76

Figura 29. Representação dos sistemas benzoil e cinamoil em um núcleo flavonoídico e bandas I e II em um espectro no UV de flavonoide. 77

Figura 30. Estrutura dos compostos fenólicos identificados em extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*. Ácido gálico (**Substância I**), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (**Substância IX**), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (**Substância VI**), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (**Substância VIII**) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (**Substância VII**). 78

Figura 31. Cromatogramas das infusões de folhas de *P. torta* (**a**) e *P. ramiflora* (**b**). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹. 79

Figura 32. Cromatogramas de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* avaliado em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Detector UV, λ = 254 nm (**a**) e cromatograma de íons totais ou TIC (**b**). Para condições cromatográficas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1). 81

Figura 33. Espectros de massas dos picos obtidos pelo detector UV, em 254 nm, na análise de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Pico 1, t_R = 11,47 min (**a**); pico 2, t_R = 27,33 min (**b**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1). 82

Figura 34. Espectros de massas dos picos obtidos pelo detector UV, em 254 nm, na análise de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Pico 3, t_R = 28,56 min (**a**); pico 4, t_R = 28,91 min (**b**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1). 83

Figura 35. Espectros de massas dos picos obtidos pelo detector UV, em 254 nm, na análise de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Pico 5, t_R = 29,78 min (**a**); pico 6, t_R = 30,86 min (**b**); pico 7, t_R = 31,81 min (**c**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1). 84

Figura 36. Fragmentação de segunda ordem dos íons m/z 479 (**a**), m/z 449 (**b**) e m/z 463 (**c**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1). 85

Figura 37. Cromatograma do íon extraído para m/z 191 de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* (**a**) e espectro de massas em 4,53 min (**b**) Dados obtidos por HPLC-ESI-IT-MS/MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1). 87

Figura 38. Cromatogramas de íons totais de extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* (**a**) e *P. ramiflora* (**b**) obtidos por HPLC-ESI-QTrap-MS em modo

negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).	88
Figura 39. Cromatogramas dos íons extraídos de m/z 479 de extratos de <i>P. torta</i> (a) e <i>P. ramiflora</i> (c); espectros de massas para os tempos de retenção 5,52 min para <i>P. torta</i> (b) e em 5,53 para <i>P. ramiflora</i> (c). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTRAP-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).	89
Figura 40. Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 479 de extrato hidroalcoólico de <i>Pouteria ramiflora</i> em $t_R = 2,74$ min (a) e $t_R = 5,53$ min (b). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTrap-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).	91
Figura 41. Cromatogramas dos íons extraídos de m/z 449 de extratos de <i>P. torta</i> (a) e <i>P. ramiflora</i> (c); espectros de massas para os tempos de retenção 6,74 min para <i>P. torta</i> (b) e em 6,74 para <i>P. ramiflora</i> (c). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTRAP-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).	92
Figura 42. Cromatogramas dos íons extraídos de m/z 463 de extratos de <i>P. torta</i> (a) e <i>P. ramiflora</i> (c); espectros de massas para os tempos de retenção 6,73 min para <i>P. torta</i> (b) e em 6,77 para <i>P. ramiflora</i> (c). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTrap-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).	93
Figura 43. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 169 e 191 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo (20 V) do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>P. ramiflora</i> . Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).	95
Figura 44. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 433, 447, 449, 463 e 479 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo (20 V) do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>P. ramiflora</i> . Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).	97
Figura 45. Íons produto característicos de clivagens de moléculas de açúcares em flavonoides C-glicosilados.	98
Figura 46. Perda de água observada em flavonoides 6-C-glicosilados (LI et al., 1992).	99
Figura 47. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 431, 547, 563, 577 e 593 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo (20 V) do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>P. ramiflora</i> . Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).	100
Figura 48. Diferentes tipos de clivagens por retrociclicização para os flavonoides estudados e a nomenclatura adotada por Fabre et al. (2001).	102
Figura 49. Fragmentação proposta para a molécula desprotonada de uma flavona, a luteolina (FABRE et al., 2001).	103

Figura 50. Fragmentação proposta para a molécula desprotonada de um flavonol, a quercetina (FABRE et al., 2001).	104
Figura 51. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 269, 301 e 317 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>P. ramiflora</i> . Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).	106
Figura 52. Fragmentação observada para miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo.	107
Figura 53. Fragmentação observada para apigenina-6-C-pentosil-8-C-deoxixosídeo.	108
Figura 54. Estrutura das moléculas parcialmente elucidadas por ESI-IT-MS/MS.	109
Figura 55. Curva analítica da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) versus área do pico (UA).	114
Figura 56. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente reagente de Folin-Ciocalteau (SINGLETON, et al. 1999). No detalhe, placa de 96 poços contendo padrão de ácido gálico em várias diluições e amostras analisadas após a reação com o reagente Folin-Ciocalteau.	120
Figura 57. Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Folin-Ciocalteau.	121
Figura 58. Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (MARKHAM et al., 1982). No detalhe, placa de 96 poços contendo padrão de quercetina em várias diluições e amostras analisadas após a reação com AlCl_3 .	122
Figura 59. Curva de calibração de quercetina obtida por reação de complexação com AlCl_3 .	123
Figura 60. Reação de redução de DPPH. No detalhe, imagem de uma placa que ilustra a coloração do DPPH antes (violeta) e após a redução (amarelo).	125
Figura 61. Gráficos de colunas comparativos dos teores de fenóis totais, flavonoides totais e IC_{50} de infusões e extratos hidroalcoólicos de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> .	126
Figura 62. Principais características da quercetina para a captura de radicais livres.	128
Figura 63. Via oxidativa da quercetina a o-semiquinona, o-quinona e quinona metídeo.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempos de retenção e máximos de absorção dos padrões obtidos por HPLC-UV-DAD. Para condições cromatográficas veja Seção 2.4.	45
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (150 MHz) de M-3-O-GAL, M-3-O-ARA, M-3-O-RHA e Q-3-O-GAL - 600 MHz (DMSO-d_6).	68
Tabela 3. Máximos de absorção no UV e tempos de retenção (t_R) dos picos identificados nos extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> .	76
Tabela 4. Substâncias encontradas em extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> em análises por HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTrap-MS e fragmentadas sequencialmente por ESI-IT-MS/MS.	94
Tabela 5. Fragmentos comumente encontrados em apigenina, quercetina e miricetina em ensaios de fragmentação de segunda ordem por ionização do tipo <i>electrospray</i> em modo negativo.	105
Tabela 6. Teores de derivados de miricetina em extratos hidroalcoólicos (70% EtOH, v/v) de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> .	111
Tabela 7. Pureza dos picos, tempos de retenção (t_R) e coeficiente de correlação entre os espectros de UV dos derivados de miricetina e seus respectivos padrões.	112
Tabela 8. Dados para a construção da curva analítica da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) <i>versus</i> área do pico (UA).	113
Tabela 9. Parâmetros estatísticos da curva analítica da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) <i>versus</i> área do pico (UA).	114
Tabela 10. Desvio padrão relativo (%) das áreas calculadas para os picos dos derivados de miricetina glicosilados.	115
Tabela 11. Resultados para a exatidão do método para os extratos de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> dopados com diferentes concentrações de miricetina.	117
Tabela 12. Parâmetros do método de quantificação alterados para avaliação da robustez.	118
Tabela 13. Ordem das variações no método adotadas para cada corrida para avaliação da robustez.	119
Tabela 14. Tempos de retenção (min) dos picos atribuídos à miricetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo obtidos por HPLC-DAD em extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> nas 8 corridas para avaliação da robustez.	119
Tabela 15. Teores de fenóis totais em extratos hidroalcoólicos e infusões de folhas de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i> , acompanhados do desvio padrão relativo.	121

Tabela 16. Teores de flavonoides totais em extratos hidroalcoólicos e infusões de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*, acompanhados do desvio padrão relativo. 123

Tabela 17. Valores de IC₅₀ para os padrões, extratos hidroalcoólicos e infusões de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*, acompanhados do desvio padrão relativo. 126

Tabela 18. Atividade mutagênica expressa como a média e desvio padrão do número de revertentes por placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas ao extrato hidroalcoólico de *P. torta*, em várias concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. 131

Tabela 19. Atividade mutagênica expressa como a média e desvio padrão do número de revertentes por placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas ao extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora*, em várias concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. 131

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AlCl_3	Cloreto de alumínio
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
EtOH	Etanol
ESI-IT-MS/MS	Electrospray-Ion Trap-Tandem Mass spectrometry
H_2O	Água
HMBC	Gradient heteronuclear multiple bond correlations
HMQC	Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence
HPLC-DAD	High performance liquid chromatography-Diode array detector
HPLC-ESI-IT-MS/MS	High performance liquid chromatography-Electrospray-Ion Trap-Tandem Mass spectrometry
HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS	High performance liquid chromatography-Electrospray-Quadrupole Ion Trap- Tandem Mass spectrometry
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography (cromatografia em contracorrente de alta velocidade)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipeto
M-3-O-ARA	Miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo
M-3-O-GAL	Miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo
M-3-O-RHA	Miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo
<i>m/v</i>	Relação massa/volume
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
PTFE	Polytetrafluoroethylene
Q-3-O-GAL	Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo
RDC	Resolução do Colegiado
RE	Resolução

RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RP18	Reverse phase 18
s/	Simpleto largo
TFA	Ácido trifluoracético
TOCSY-1D	Total correlation spectroscopy
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Gênero <i>Pouteria</i>	24
1.2 <i>Pouteria torta</i>	25
1.3 <i>Pouteria ramiflora</i>	28
1.4 Padronização de extratos vegetais	29
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Solventes e reagentes	34
3.2 Material vegetal	34
3.3 Extrações e infusões	35
3.4 Análise por HPLC-DAD	37
3.5 Análises de RMN	38
3.6 Espectrometria de massas	38
3.6.1 HPLC-ESI-IT-MS/MS	38
3.6.2 HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS	39
3.6.3 ESI-IT-MS/MS	40
3.7 Ensaios químicos e biológicos	41
3.7.1 Avaliação do Potencial Antirradicalar	41
3.7.2 Determinação do Teor de Fenóis Totais	41
3.7.3 Determinação do Teor de Flavonoides Totais	42
3.7.4 Ensaio <i>Salmonella</i> /Microssoma (Teste de Ames)	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1 Confirmação Estrutural dos padrões não comerciais	45
4.2 <i>Fingerprint</i> dos extratos hidroalcoólicos e infusões e coinjeção com padrões por HPLC-DAD	70
4.3 Análise dos extratos por HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI- QTrap-MS/MS e ESI-IT-MS/MS	80
4.3.1 HPLC-ESI-IT-MS/MS	81
4.3.2 HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS	88
4.3.3 ESI-IT-MS/MS	94

4.4 Padronização dos extratos por HPLC-DAD e validação do método	110
4.4.1 Especificidade	111
4.4.2 Linearidade e Intervalo	113
4.4.3 Precisão	115
4.4.4 Limites de detecção e quantificação	116
4.4.5 Exatidão	116
4.4.6 Robustez	118
4.5 Quantificação de fenóis totais	120
4.6 Quantificação de flavonoides totais	122
4.7 Determinação do potencial antirradicalar com DPPH	125
4.8 Atividade mutagênica	130
5. CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS	137

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Pouteria*

A família Sapotaceae Juss. é subdividida em 5 classes com 53 gêneros e cerca de 1250 espécies, distribuídas por todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e da América do Sul (SWENSON e ANDERBERG, 2005). Dentre os 53 gêneros, o gênero *Pouteria* Aubl. possui cerca de 325 espécies (TRIONO et al., 2007). Muitas delas produzem frutos comestíveis e muitas espécies são utilizadas na medicina popular para diversos propósitos.

Algumas das atividades biológicas reportadas para este gênero são antioxidante (MANOSROI et al., 2005), antibacteriana e antifúngica (AGRIPINO et al., 2004; BOLETI et al., 2007).

Muitas espécies de *Pouteria* têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de febre, inflamação, erupções cutâneas, úlcera, diabetes (MA et al., 2004; MONTENEGRO et al., 2006), diarreia (PERFEITO et al., 2005), náusea, vômito, dor nas costas, além do uso para estimular a lactação (MANOSROI et al., 2005). Em muitos casos, estudos científicos que comprovem as atividades farmacológicas atribuídas a essas plantas são inexistentes.

Os principais metabólitos secundários encontrados neste gênero são triterpenos e flavonóides (MA et al., 2004; MONTENEGRO et al., 2006; CHE et al., 1980).

Dentre as espécies deste gênero estão *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., árvores encontradas no Brasil nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (ALVES-ARAUJO, 2014), as quais foram objeto de investigação deste trabalho.

1.2 *Pouteria torta*

As figuras 1 e 2 mostram as folhas e frutos de *P. torta*. Esta espécie apresenta porte arbóreo e pode medir entre 8 e 14 m de altura (LORENZI, 1992).

As cascas da árvore *P. torta*, comumente chamada de “guapeva”, “curiola”, “acá ferro”, “abiu do cerrado” e “grão de galo”, são utilizadas como remédio contra diarreia (PERFEITO et al., 2005).

Figura 1. Folhas e flores de *P. torta*.



Fonte: LOPES, 2014.

Figura 2. Frutos de *P. torta*.



Fonte: KUHLMANN, 2014a.

Os resultados de estudos químicos e biológicos encontrados na literatura são apresentados abaixo.

Silva et al. (2009) isolaram e identificaram a partir do extrato metanólico folhas de *P. torta*, por *high speed counter current chromatography* (HSCCC), os flavonoides miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo e miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo. Souza et al. (2012a) também citam o isolamento de miricetina-3-O-rhamnopiranosídeo na espécie sem, no entanto, esclarecer o tipo de extrato e qual parte vegetal foram utilizados.

Che et al. (1980) isolaram triterpenos a partir de extratos metanólico e etéreo de galhos de *P. torta*, sendo eles acetato de β -amirina, acetato de α -amirina, ácido betulínico e ácido ursólico. Perfeito et al. (2005) isolaram acetato de lupeol do extrato hexanólico da mesma espécie.

Os extratos aquosos e etanólicos de folhas de *P. ramiflora* e *P. torta* apresentam atividade antioxidante superior ao controle positivo (BHT – butil hidroxitolueno) (Castro et al., 2006).

Quanto à citotoxicidade, Perfeito et al. (2005) encontraram valores de 0,28 mg.L⁻¹ e 0,27 mg.L⁻¹ de atividade citotóxica para *Artemia salina*, respectivamente, para extrato aquoso bruto e fração acetonitrila: clorofórmio do extrato etanólico de folhas de *P. torta*.

Mesquita et al. (2009) testaram os extratos hexânicos e etanólicos de folhas, hastes e raízes de *P. torta* para efeito citotóxico em linhagens de células de câncer de cólon, cerebral, leucemia e melanoma, sendo que os extratos não demonstraram efeito antiproliferativo em concentrações menores ou iguais a 50 µg.mL⁻¹.

Os resultados de Elias et al. (2013) para citotoxicidade de extratos aquoso, etanólico e hexânico de folhas de *P. torta* demonstraram que, em linhagens de células de câncer oral e câncer de mama, todos os extratos apresentaram efeito citotóxico em concentração de 500 mg.mL⁻¹, sendo o extrato hexânico o que apresentou maior citotoxicidade às células estudadas. Ainda neste trabalho, foi observado que para o extrato hexânico, o aumento da concentração do extrato aplicado às células aumentou o efeito citotóxico. Já para os extratos aquoso e

etanólico, a mesma correlação não foi observada. Os autores utilizaram concentrações de 125, 250, 500, 750 e 1000 mg.mL⁻¹ de extrato, sendo que o efeito citotóxico foi observado até a concentração de 500 mg.mL⁻¹ e, em concentrações maiores, ocorreu um aumento no número de células viáveis.

Extratos aquoso, etanólico e hexânico de folhas de *P. torta* também foram testados para atividade inibidora de α -Amilase e α -Glucosidase, enzimas digestivas responsáveis pelo aumento da taxa glicêmica no sangue, sendo esta atividade inibidora uma alternativa para o tratamento de diabetes mellitus (SOUZA et al., 2012b). Os autores concluíram que os extratos apresentaram alta porcentagem de inibição enzimática, relacionando a atividade inibitória à presença de fenóis, flavonoides e terpenos nesta espécie.

Souza et al. (2012a) estudaram o efeito inibitório de extratos aquoso, etanólico e hexânico de folhas de *P. torta* sobre a enzima tirosinase, que atua na biossíntese de melanina. Sua inibição pode ser uma alternativa para o tratamento de hiperpigmentação da pele por acúmulo de melanina. O extrato aquoso de folhas de *P. torta* demonstrou ter boa atividade inibitória contra essa enzima, apresentando IC₅₀ de 30,01 µg.mL⁻¹. Entretanto, neste mesmo estudo, não houve efeito citotóxico dos extratos na concentração do IC₅₀ em linhagens de células de fibroblastoma e queratinócitos.

1.3 *Pouteria ramiflora*

A espécie *P. ramiflora* (Figura 3) é uma árvore que mede cerca de 10 m de altura (LORENZI, 1992).

Figura 3. Frutos de *P. ramiflora*.



Fonte: KUHLMANN, 2014b.

As raízes e as cascas de *P. ramiflora*, chamada de “grão de galo”, “massaranduba” ou “pitomba de leite”, também são usadas como remédios contra diarreia, bem como vermífugo (CASTRO et al., 2006).

Fontes Junior et al. (2009) verificaram em ensaios farmacológicos clássicos que o extrato etanólico de *P. ramiflora* apresentou efeito anti-inflamatório e analgésico em camundongos em concentrações de 50 e 100 mg.Kg⁻¹, entretanto os mecanismos de ação dos extratos não foram elucidados.

Em estudo sobre o efeito citotóxico de extratos hexânicos e etanólicos de folhas, hastes e raízes de *P. ramiflora* em linhagens de células de câncer de cólon, cerebral, leucemia e melanoma, Mesquita et al. (2009) concluíram que os extratos não apresentam efeito antiproliferativo em concentrações menores ou iguais a 50 µg.mL⁻¹.

Extratos aquoso, etanólico e hexânico de folhas de *P. ramiflora* também foram testados para atividade inibidora de α -Amilase e α -Glucosidase (SOUZA et al., 2012b), sendo que os extratos aquoso e etanólico apresentaram alta porcentagem de inibição enzimática. Os dados corroboram com os apresentados por Gouveia et al. (2013), que em estudos com camundongos concluíram que o extrato etanólico

das folhas de *P. ramiflora* apresentaram inibição de α -Amilase salivar de 61%, sendo a redução mais pronunciada ainda para extratos de caule e raiz, que apresentaram inibição maior que 95%. Os autores concluíram que a administração diária do extrato de *P. ramiflora* nas doses de 25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹, por oito dias, foi capaz de reduzir o peso corporal e o nível glicêmico nos animais. Esses dados sugerem que o extrato polar de *P. ramiflora* diminui a atividade amilolítica da saliva e reduz os níveis de glicose sanguínea.

O efeito neuroprotetor de extrato hidroalcoólico (50%, v/v) de folhas de *P. ramiflora* foi avaliado por Costa et al. (2013). Os autores observaram que ratos com diabetes induzida por streptozotocina e tratados com o extrato apresentaram melhora no índice glicêmico e concluíram que houve um efeito neuroprotetor contra danos oxidativos no cérebro dos animais tratados com 500 mg.Kg⁻¹ de extrato.

Souza et al. (2012a) também estudaram o efeito inibitório de extratos aquoso, etanólico e hexânico de folhas de *P. ramiflora* sobre a enzima tirosinase. Os extratos de *P. ramiflora* não apresentaram valores de IC₅₀ significativos, assim como para *P. torta*.

1.4 Padronização de extratos vegetais

O uso da biodiversidade brasileira para a obtenção de fitoterápicos é um tema que tem ganhado cada vez mais atenção. Nesse sentido, foi publicado o Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006) que aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Este decreto tem como um de seus objetivos ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais.

O estudo das espécies *P. torta* e *P. ramiflora* está inserido no projeto temático Biota Fapesp número 09/52237-9 intitulado Produtos Naturais – Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas.

No contexto do panorama nacional e mundial, as doenças crônicas representam um sério problema no sistema público de saúde. Dentre essas

doenças, estão aquelas relacionadas ao sistema gastrointestinal (úlceras, colites, diarreia), diabetes, dor e inflamação, problemas do sistema imunológico e cânceres.

Este projeto tem como um de seus principais objetivos o estudo químico e farmacológico de plantas nativas da flora brasileira a fim de se obter fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas. Para tanto, este projeto estuda os extratos hidroalcoólicos (EtOH:H₂O, 70:30, v/v), obtidos por percolação exaustiva, do material vegetal seco e pulverizado.

No caso de *P. torta* e *P. ramiflora*, as partes dos vegetais escolhidas para obtenção dos extratos foram as folhas, pois estas espécies se encontram na forma de arbustos e árvores. Assim, as folhas apresentam maior viabilidade para a coleta, podendo ser coletadas em qualquer época do ano, o que não representa um risco de extermínio para a espécie, como no caso da coleta de cascas ou raízes.

A avaliação química e farmacológica de espécies vegetais é condição *sine qua non* para sua utilização segura como fitoterápico (AGÊNCIA..., 2004).

Como definição de fitoterápico, citamos a RDC N° 48/04 da ANVISA (AGÊNCIA..., 2004) que preconiza: “medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3”, sendo ensaios clínicos fase 3 aqueles responsáveis por comprovar a eficácia e segurança de um medicamento (AGÊNCIA..., 2008).

Outro importante conceito trazido pela RDC N° 48/04 da ANVISA (AGÊNCIA..., 2004) é o de Marcador, que é o “componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos”.

Dentre a documentação necessária para registro de medicamento fitoterápico, de acordo com a RDC N° 14/10, está o laudo de análise da droga vegetal, que deve

conter “o perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica da espécie” e “análise quantitativa do(s) marcador(es) ou controle biológico” (AGÊNCIA..., 2010).

O perfil de uma planta traçado pelo uso de HPLC contendo um ou mais componentes característicos da planta pode ser considerado a impressão digital (*fingerprint*) da espécie, proporcionando a identificação da presença dos marcadores e também de outros compostos, oferecendo uma caracterização completa da planta ou do produto analisado além de permitir a distinção entre espécies próximas (DRASARA & MORAVCOVA, 2004; LIU et al., 2007).

A técnica de HPLC é frequentemente acoplada com detectores ultravioleta (UV) ou de arranjo de diodos (DAD), sendo HPLC-DAD amplamente utilizada devido à sua rapidez, simplicidade e conveniência.

Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados (DAVID et al., 2004).

A quantificação de marcadores em extratos vegetais requer um método validado para sua confiabilidade. De acordo com a ANVISA, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (AGÊNCIA..., 2003).

O uso de HPLC-DAD na quantificação de compostos em extratos vegetais pode ser verificado na literatura como uma alternativa econômica, simples e confiável para a padronização de extratos vegetais (IRAKLI et al., 2012; CARDOSO et al., 2012, SALDANHA et al., 2013;).

Portanto, diante deste contexto e considerando que as espécies *P. torta* e *P. ramiflora* são amplamente utilizadas pela população, este trabalho realizou a padronização dos extratos hidroalcoólicos das folhas destas espécies utilizando HPLC-DAD. Paralelamente, a caracterização química dos extratos hidroalcoólicos foi realizada por HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS e ESI-IT-MS/MS, além da avaliação da atividade mutagênica pelo teste de Ames. Também foram

avaliados os teores de flavonoides e fenóis totais e a atividade antirradicalar dos extratos hidroalcoólicos, infusões, e das substâncias derivadas da miricetina, isoladas dos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico, determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais e a avaliação das atividades antirradicalar e mutagênica dos extratos hidroalcoólicos (70% de etanol, v/v) de folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae).

2.1 Objetivos específicos

A partir dos extratos hidroalcoólicos (70% EtOH, v/v) obtidos das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*:

- Traçar o perfil cromatográfico por HPLC-DAD dos extratos hidroalcoólicos e infusões das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*;
- Identificar metabólitos secundários dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* por HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS e ESI-IT-MS/MS;
- Detectar e identificar os marcadores químicos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*;
- Padronizar os extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* por meio da quantificação de seus marcadores químicos por HPLC-DAD;
- Quantificar os fenóis e flavonoides totais nos extratos hidroalcoólicos e infusões das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*;
- Avaliar as atividades antirradicalar com DPPH e mutagênica pelo Teste de Ames dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes e reagentes

Solventes grau analítico: etanol e metanol (Synth[®]).

Solventes grau HPLC: Ácido trifluoracético, acetato de etila e metanol (Tedia[®]) e água purificada em sistema Milli-Q (Merck Millipore).

Solvente deuterado: DMSO-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories).

Padrões: Miricetina (98%), quercetina (98%), e ácido gálico (99%) (Sigma-Aldrich[®]).

Demais metabólitos, isolados e caracterizados por RMN de ¹H, HMBC, HSQC e TOCSY-1D, fazem parte de um banco de padrões pertencente ao Laboratório de Fitoquímica. Miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (M-3-O-GAL), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (M-3-O-ARA) e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (M-3-O-RHA) foram isolados do extrato metanólico de *P. torta* por Silva et al., 2009. Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (Q-3-O-GAL) foi isolada por Rodrigues (2007) de infusão de *Davilla elliptica*.

Reagentes para avaliação do potencial antirradicalar, fenóis totais e flavonoides totais: 1,1-difenil-1-picril-hidrazila (Merck), reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica[®]), carbonato de sódio (Synth[®]), cloreto de alumínio (Synth[®]).

3.2 Material vegetal

Folhas de *P. torta* foram coletadas na cidade de Botucatu, São Paulo, em maio de 2011, pelo Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu. Uma exsicata foi identificada e depositada no IB – UNESP de Botucatu, sob o número BOTU 27806.

Folhas de *P. Ramiflora* foram coletadas na cidade de Cáceres, Mato Grosso, em setembro de 2011, pelo Prof. Dr. Fernando Ferreira de Moraes, da Universidade

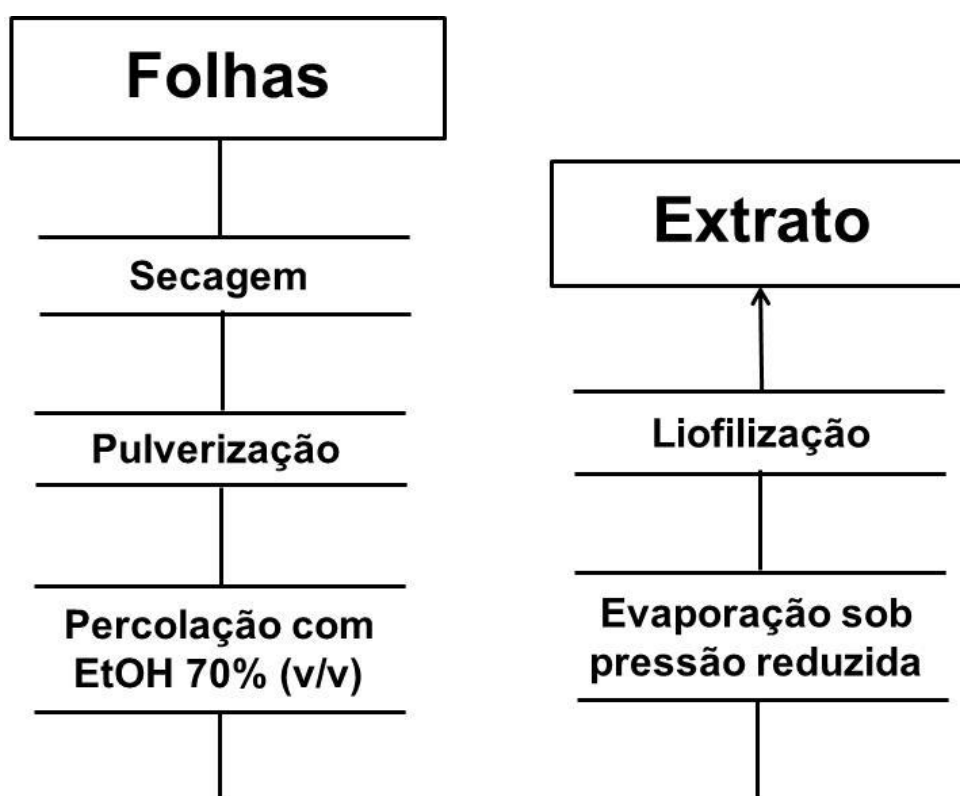
Estadual de Mato Grosso. Uma exsicata foi identificada e depositada no Herbário Rioclarense da UNESP, sob o número HRCB 58166.

3.3 Extrações e infusões

As folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* foram secas em estufa a 40°C até peso constante. Em seguida foram trituradas em moinho de facas.

Os extratos e infusões foram preparados a partir das folhas secas e pulverizadas conforme os fluxogramas apresentados nas Figuras 4 e 5.

Figura 4. Fluxograma da preparação dos extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora*.



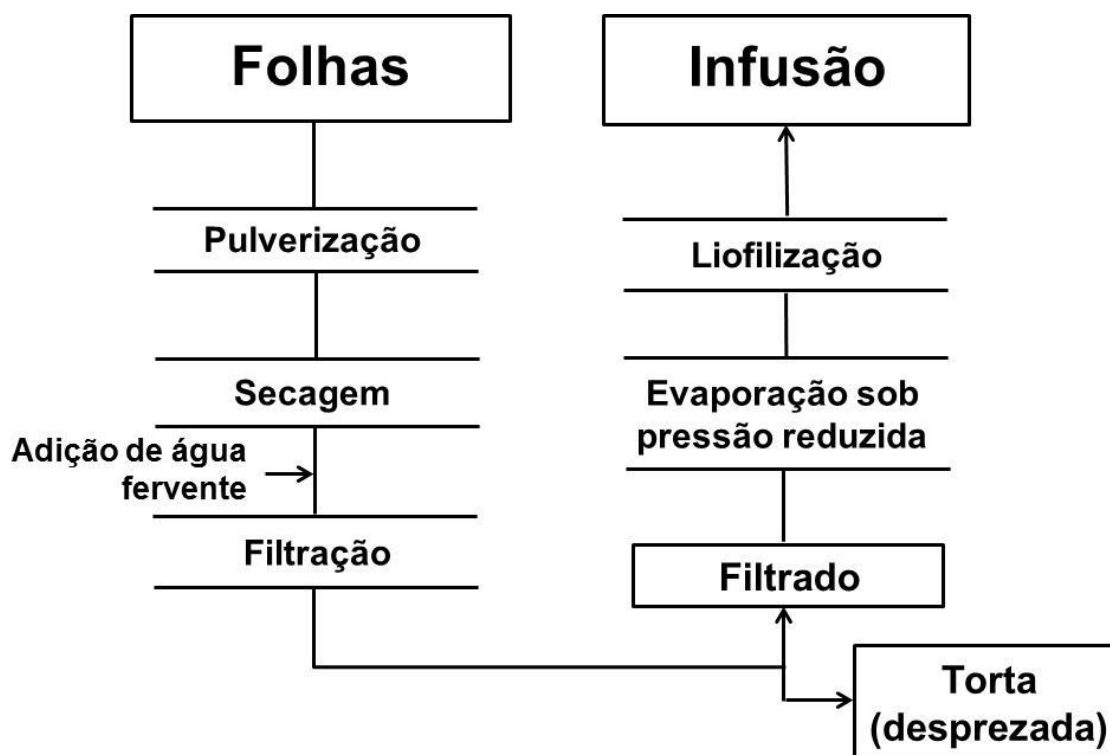
O material vegetal foi submetido ao procedimento de percolação exaustiva com EtOH:H₂O (70:30, v/v) (PRISTA, 1995). Um volume de material moído foi previamente intumescido com dois volumes de etanol 70% (v/v) durante 2 horas. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a

formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador ficou entre 1,0 e 2,0 mL.min⁻¹.Kg⁻¹ de droga vegetal comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

Uma parte do pó das folhas de *P. torta* (500 g) foi percolado, originando 152,0 g de extrato EtOH 70% (30,4 % de rendimento).

Foram percolados 601, 87 g de pó das folhas de *P. ramiflora* (601,87 g), fornecendo 90,54 g de extrato EtOH 70% (15,04 % de rendimento).

Figura 5. Fluxograma da preparação das infusões de *P. torta* e *P. ramiflora*.



Infusões foram utilizadas na preparação de extratos aquosos de folhas das espécies vegetais. Os infusos foram preparados na proporção de 10% (m/v), sendo adicionado ao material vegetal moído água fervente (AGÊNCIA..., 2013). O recipiente foi mantido fechado e deixado em repouso por 10 min. Posteriormente, a solução do infuso foi filtrada em papel filtro.

Os extratos e os infusos foram rotaevaporados sob pressão reduzida, em temperatura de 40°C, e posteriormente liofilizados para completa remoção da água.

Foram armazenados em recipientes fechados e acondicionados em dessecador. O rendimento para a infusão de *P. torta* foi de 1,64%, enquanto para *P. ramiflora* foi de 17,57%.

Foram utilizados rotaevaporador modelo Laborota 4001 - efficient, marca Heidolph®, equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac valve control Heidolph® e liofilizador da marca Savant Instruments INC., modelo Micro Modulyo.

3.4 Análise por HPLC-DAD

A pesagem dos extratos e dos padrões comerciais ou purificados utilizados na preparação das amostras e soluções estoque foi feita em balança analítica TE214S, de capacidade para 200 g e precisão de 0,001 g (Sartorius®).

A preparação dos extratos consistiu de uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida, utilizando-se um cartucho Phenomenex® Strata C18 (500 mg.6 mL⁻¹), previamente ativado com 5 mL de metanol e equilibrado com 5 mL de MeOH:H₂O (95:5, v/v). Uma solução de 2 mL de extrato EtOH 70% em MeOH:H₂O (95:5, v/v), contendo de 60 mg de extrato, foi eluída com a mesma fase móvel utilizada para equilíbrio do cartucho e coletada em balão volumétrico de 5 mL, tendo seu volume completado ao final da eluição, fornecendo uma solução de extrato com concentração de 12 mg.mL⁻¹. Ao final, a solução foi filtrada em um filtro de PTFE Millex® com tamanho de poro de 0,22 µm. Alíquotas de 20 µL destas soluções foram injetadas no HPLC-DAD.

As soluções de infuso foram preparadas na concentração de 5 mg.mL⁻¹ em água e filtradas em filtro de PTFE Millex® com tamanho de poro de 0,22 µm.

Foram realizados ensaios cromatográficos com os extratos EtOH 70% e infusos das espécies em um equipamento HPLC Jasco constituído de bomba quaternária PU-2089S Plus, detector MD-2018 Plus Photodiode Array Detector (PAD), injetor automático AS-2055 Plus e forno de coluna CO-2065 Plus. O software ChromNAV 1.18.03 (Jasco) foi utilizado para controle, coleta e processamento dos dados. A coluna utilizada foi Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (25 cm x 4.6 mm x 5 µm), sendo que uma pré-coluna de mesmo recheio, C18 AQ,

(2.5 cm x 3 mm) foi utilizada para proteção da coluna. A vazão utilizada na análise foi de 1 mL.min⁻¹. A temperatura utilizada no forno da coluna foi ajustada para 40°C.

3.5 Análises de RMN

Os experimentos realizados para confirmação da estrutura dos padrões não comerciais foram: ¹H, TOCSY-1D, *g*HMBC e *g*HMQC.

A obtenção dos espectros dos padrões de miricetinas glicosiladas e de Q-3-O-GAL foi realizada em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 600 MHz (14,1 T) Bruker Ascend™ III 600.

3.6 Espectrometria de massas

3.6.1 HPLC-ESI-IT-MS/MS

O extrato EtOH 70% de *P. torta* foi analisado por HPLC-ESI-IT-MS². O extrato foi diluído a uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ em MeOH:H₂O (95:5, v/v) e filtrado em filtro de PTFE Millex com tamanho de poro de 0,22 µm.

Os experimentos foram realizados em espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet™ (Thermo Scientific®), com analisador de massa Ion Trap 3D e ionização por *electrospray* acoplado a um sistema de HPLC e UHPLC Accela™ High Speed LC (Thermo Scientific®).

A coluna utilizada foi Phenomenex® Synergi® Hydro RP18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), sendo que uma pré-coluna de mesmo recheio (2,5 cm x 3 mm) foi utilizada para proteção da coluna. Foi feita a análise por gradiente exploratório utilizando água:metanol de 95:5 a 0:100 em 60 minutos, sendo ambos os solventes acidificados com 0,1% de ácido acético. A vazão durante a corrida de HPLC foi de 0,8 mL.min⁻¹. Foram injetados 20 µL de amostra.

O ESI-MS operou nas seguintes condições: Modo negativo; Voltagem do capilar -4 V, voltagem do “spray” -4,5 kV, temperatura do capilar 275°C, gás de arraste N₂ com uma vazão de 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z*

50-1000, com dois eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa estabelecida. Posteriormente foram realizados experimentos de MS/MS a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados, com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento.

O *software* Xcalibur™ versão 1.3 (Thermo Scientific®) foi utilizado para tratamento dos dados.

3.6.2 HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS

Os extratos EtOH 70% de *P. torta* e *P. ramiflora* foram analisados por HPLC-ESI-QTRAP-MS².

As amostras foram preparadas em MeOH:H₂O (95:5, v/v) na concentração de 5 ppm e filtradas em filtro de PTFE Millex com tamanho de poro de 0,22 µm.

Foi utilizado equipamento HPLC da Agilent® 1200 Series (autosampler 1200 Series, detector DAD 1260, bomba quaternária 1200 e forno para coluna 1200 Series) acoplado a espectrômetro de massas 3200 QTRAP (quadrupolo – ion trap linear) AB SCIEX®, com ionização por electrospray, que foi operada no modo negativo.

A coluna utilizada foi Phenomenex® Synergi® Hydro RP18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), sendo que uma pré-coluna de mesmo recheio (2,5 cm x 3 mm) foi utilizada para proteção da coluna. A vazão utilizada na análise foi de 1 mL.min⁻¹.

A análise foi realizada utilizando gradiente, onde, inicialmente, a fase móvel consistiu de água:acetoneitrila (80:20, v/v), levando 30 minutos para atingir água:acetoneitrila (58:42, v/v). A fase móvel utilizada foi acidificada com 0,1% de ácido acético. A temperatura do forno da coluna foi ajustada pra 40°C.

O equipamento de ESI-IT-MS operou nas seguintes condições: Modo negativo; Voltagem “spray” -4,5 kV, temperatura do capilar 600°C, gás de arraste N₂ com uma pressão de 12 psi. Gás 1: 50 psi, Gás 2: 50 psi, Interface heater: ON, DP

(Declustering Potential) -45.0 V, EP (Entrance Potential) -10.0 V e CEP (Cell entrance potential) -20.0 V. A faixa de aquisição foi m/z 120-700. Energia de colisão: 25,0 V.

Inicialmente, as análises foram realizadas no modo varredura de íons utilizando o analisador Quadrupolo. No entanto, devido à baixa concentração das amostras, optou-se por utilizar o modo de varredura de íons aprisionados no *ion trap* linear. Já para os experimentos de fragmentação utilizou-se o triplo quadrupolo, onde diferentes íons (m/z) foram selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), fragmentados na câmara de indução (CID, câmara de colisão, Q2) e os respectivos fragmentos foram monitorados no terceiro quadrupolo (Q3).

O *software* Analyst 1.5 (AB SCIEX®) foi utilizado para tratamento dos dados.

3.6.3 ESI-IT-MS/MS

Os extratos de *P. torta* e *P. ramiflora* foram analisados em um espectrômetro LTQ-XL (Thermo Scientific®) no modo de ionização por electrospray (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS/MS) realizadas em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido. Para a geração e análise dos espectros de massas foram ajustadas as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de m/z 150-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LTQ-XL. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Posteriormente foram realizados experimentos de MS/MS a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados, com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O *software* Xcalibur 1.3 (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e para processamento dos dados espectrométricos.

3.7 Ensaios químicos e biológicos

Ensaios químicos para avaliação do teor de fenóis totais, flavonoides totais e a capacidade de captura do radical livre por DPPH foram realizados em triplicata utilizando-se equipamento Thermo Plate TP-READER Basic para leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda selecionados para cada ensaio.

3.7.1 Avaliação do Potencial Antirradicalar

O potencial antirradicalar foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico, de acordo com metodologia descrita por Pauletti et al. (2003) e Brand-Williams et al. (1995) utilizando-se uma solução de DPPH 0,004 % em metanol, o que foi misturado à solução da amostra em análise. Soluções estoque de padrões foram preparadas a partir de 1 mg da amostra teste em 1 mL de metanol. Em seguida foram realizadas diluições até as concentrações de 500,00; 250,00; 125,00; 62,50; 31,25; 15,63 e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os padrões. Soluções estoque de extratos e infusões foram preparadas a partir de 10 mg da amostra teste em 1 mL de metanol. Em seguida foram realizadas diluições até as concentrações de 5.000,00; 2.500,00; 1.250,00; 625,00; 312,50; 156,25 e 78,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os extratos e infusões. A cada 20 μL da amostra foram adicionados 200 μL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias das soluções foram medidas a 517 nm. A solução referência foi constituída de 20 μL de metanol acrescido de 200 μL da solução de DPPH. Foram utilizados padrões de quercetina, Q-3-O-GAL, miricetina, M-3-O-GAL e ácido gálico, os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental.

3.7.2 Determinação do Teor de Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais foi determinada colorimetricamente conforme o procedimento padrão de Folin-Ciocalteu (KÄHKÖNEN, M.P. et al. 1999; GHASEMZADEH, A. et al. 2010). Para o mesmo, utilizou-se:

- Extratos e infusões a 1 mg.mL^{-1} de metanol;
- Solução de Folin-Ciocalteu 6,67% em água;
- Solução de Na_2CO_3 saturada (200 mg.mL^{-1});

- Ácido Gálico, utilizado como padrão a 1 mg.mL^{-1} de metanol.

Procedimento:

- Primeiramente procedeu-se às diluições para a curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,00 e 250,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- Adicionou-se em placa de 96 poços, 150 μL da solução de *Folin-Ciocalteu* e 50 μL de amostra e diluições padrões;
- Aguardou-se 3 minutos;
- Adicionou-se 50 μL de solução de Na_2CO_3 saturada;
- Aguardou-se 2 horas;
- Após isto, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível (ELISA) a λ 750 nm.
- Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.7.3 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

Foi realizada a partir do método colorimétrico no qual ocorre a complexação dos flavonoides com cloreto de alumínio de acordo com metodologia padrão de Peixoto Sobrinho et al. (2008) e Jurd & Geissman, (1956) modificado, onde a quercetina foi utilizada como padrão. Para este experimento preparou-se:

- Extratos e infusões a 1 mg.mL^{-1} de metanol;
- Quercetina a 1 mg.mL^{-1} de metanol;
- AlCl_3 solubilizado em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (8:2) a uma concentração de 2% (m/v).

Procedimento:

- Primeiramente procedeu-se às diluições para a curva de calibração da quercetina nas concentrações de 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,00 e 250,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- Adicionou-se em placa de 96 poços 100 μL de solução de AlCl_3 2%;
- Em seguida, adicionou-se 100 μL da amostra ou diluições da solução padrão de quercetina;

- Aguardou-se 1 hora;
- Após isto, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível (ELISA) a $\lambda = 415 \text{ nm}$.

3.7.4 Ensaio *Salmonella*/Microsoma (Teste de Ames)

Os ensaios de atividade mutagênica foram realizados pela aluna de iniciação científica Juliana Ferreira de Souza, orientada pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, do programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia do Centro de Ciências Farmacêuticas da UNESP, câmpus Araraquara.

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA, com e sem ativação metabólica pelo método de pré-incubação (Maron & Ames, 1983).

As cepas de culturas congeladas foram cultivadas em caldo nutriente Onoid nº2 por 12-14h. A fração microsomal S9, preparada de fígados de ratos Sprague-Dawley tratados com Aroclor 1254 (Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA). O sistema de ativação metabólica consistiu de 4% de fração S9, 1% de MgCl_2 0,4 M, 1% de KCl 1,65 M, 0,5% de D-glucose-6-fosfato dissódica, 4% de NADP 0,1 M, 50% de tampão fosfato 0,2 M e 39,5% de água destilada estéril. A mistura de ativação metabólica (S9) foi preparada antes de cada teste.

Cinco doses diferentes do extrato hidroalcoólico de *P. torta* e *P. ramiflora* foram diluídas em DMSO. As concentrações foram selecionadas com base em um teste preliminar de toxicidade. Em todos os ensaios subsequentes, o limite máximo de dosagem foi a maior concentração não tóxica ou a menor concentração tóxica do teste preliminar.

As várias concentrações (0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 7,5 mg/placa para *P. torta* e 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/placa para *P. ramiflora*) dos extratos foram misturadas a 0,1mL de cultura de bactérias e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 (ou 0,5 mL da mistura S9 em ensaios com ativação metabólica) e incubadas por 20-30 minutos a 37° C.

Após esse tempo, adicionou-se 2 mL de ágar superfície (“top agar”) e plaqueiou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do “top agar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C e as colônias revertentes His⁺ foram contadas manualmente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados foram analisados com o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, version 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, USA), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). O efeito dose-resposta foi avaliado por análise de variância (ANOVA) entre as médias do controle negativo e os testes, seguindo uma regressão linear. Foram também calculadas as razões de mutagenicidade (RM), que são a média do número de revertentes do teste dividida pela média de revertentes do controle negativo. O teste foi considerado positivo quando a RM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma concentração (SANTOS et al., 2006). O controle negativo foi feito com o solvente dos extratos vegetais (DMSO, 75 µL/placa). Os controles positivos, para confirmação da reversão, foram 4-nitrofenilenodiamina (NPD) para TA98 e TA97a, azida sódica para TA100 e mitomicina C para TA102. Nos ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-antramine para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno para TA102.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Confirmação Estrutural dos padrões não comerciais

Os padrões não comerciais (M-3-O-GAL, M-3-O-ARA, M-3-O-RHA e Q-3-O-GAL) utilizados para a identificação dos picos obtidos nos cromatogramas por HPLC-DAD dos extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora* foram submetidos a análises por HPLC-DAD e RMN.

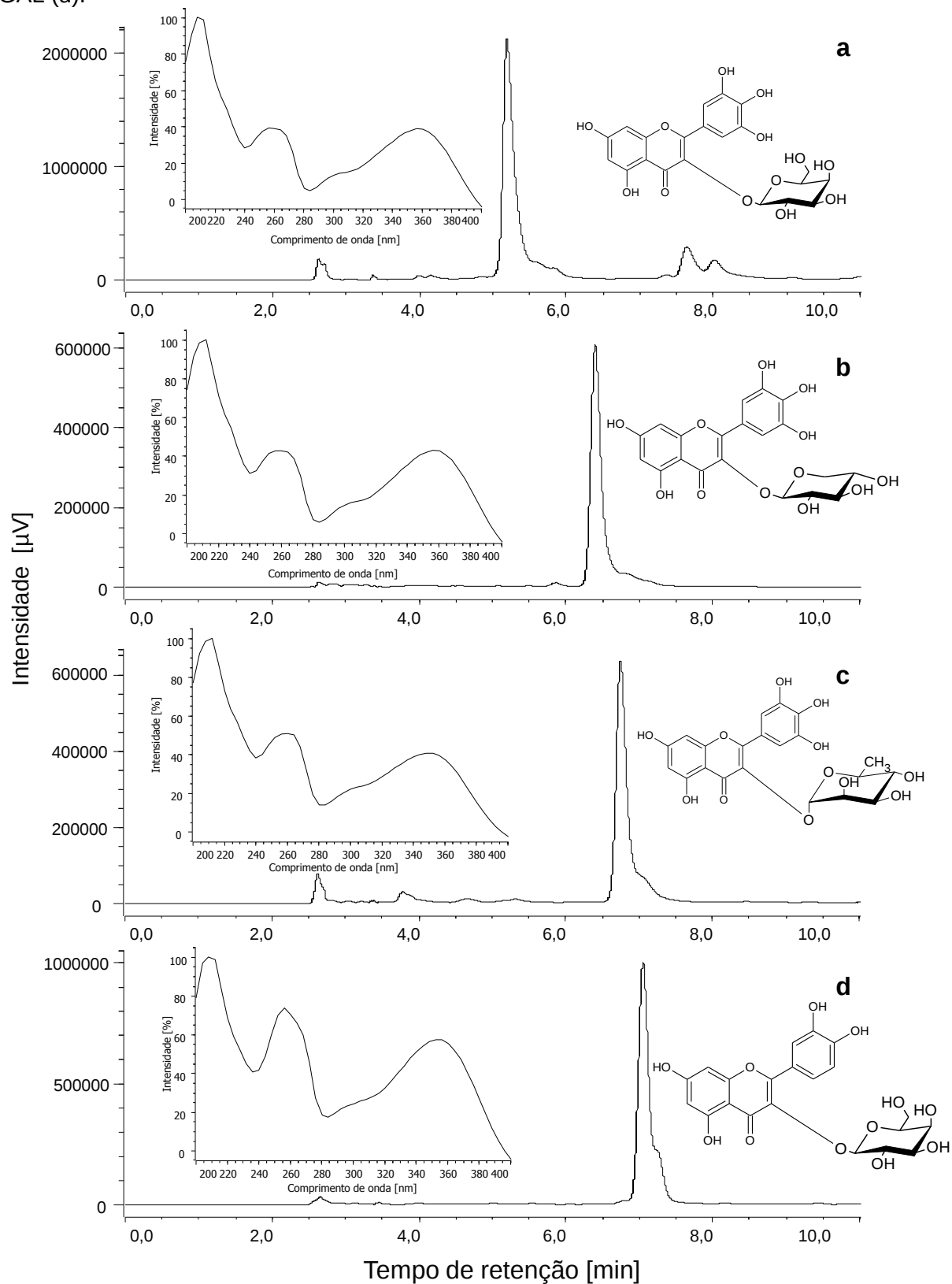
Os cromatogramas a 254 nm e os espectros no UV obtidos da análise por HPLC-DAD dos padrões não comerciais são mostrados na Figura 6. Dados da literatura (MARKHAM, 1982) confirmam que estas substâncias são flavonoides, sendo que os máximos de absorção apresentados na Tabela 1 estão dentro da faixa esperada para flavonóis 3-O-substituídos ($\lambda = 250-280$ nm para a banda I e $\lambda = 330-360$ nm para a banda II).

Tabela 1. Tempos de retenção e máximos de absorção dos padrões obtidos por HPLC-UV-DAD. Para condições cromatográficas veja Seção 2.4.

Substância	$\lambda_{\max}$ (nm)	t_R (min)
Miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	258, 357	5,11
Miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo	257, 357	6,39
Miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo	259, 349	6,74
Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	256, 354	7,03

Para a confirmação estrutural completa dos padrões, registramos os espectros de RMN mono e bidimensionais, que serão discutidos a seguir. Os dados foram comparados e encontraram-se em concordância com os encontrados na literatura (AGRAWAL, 1989; ANDERSEN e MARKHAM, 2006; MARKHAM, 1982).

Figura 6. Cromatogramas a 254 nm e espectros no UV, obtidos por HPLC-DAD, dos padrões não comerciais utilizados: M-3-O-GAL (a), M-3-O-ARA (b), M-3-O-RHA (c) e Q-3-O-GAL (d).



Miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (M-3-O-GAL)

Esta substância apresentou-se como um sólido de cor amarela. O espectro de RMN ^1H desta substância (Figura 8) mostrou sinais de hidrogênios na região aromática sendo: um simpleto largo em δ 7,21 (1H) indicando que o anel B do flavonoide é tetrassubstituído. Outros dois dupletos, de hidrogênios acoplados em *meta* (1H cada, $J = 2,4$ Hz) foram observados em δ 6,20 e 6,38, que foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente. A falta do simpleto em δ 6,70 (ANDERSEN & MARKAM, 2006) confirmou que a posição 3 do flavonoide está substituído, sugerindo a presença de derivado de flavonol.

Foi observado ainda um duplete em δ 5,34 (1H, $J = 7,8$ Hz) indicando que este flavonoide possui um açúcar com configuração em β . Os demais hidrogênios do açúcar foram observados entre δ 3,29 e 3,64 (Tabela 2).

A identidade do açúcar foi confirmada com o experimento TOCSY/1D (Figura 9). Neste experimento observou-se que quando o hidrogênio em δ 5,34 (H-1') sofreu irradiação, este apresentou correlações com os hidrogênios em δ 3,61 (H-2''); 3,36 (H-3'') e 3,64 (H-4''), confirmando portanto que tratava-se de uma galactose.

O mapa de contornos $g\text{HSQC}$ (Figura 10) possibilitou atribuir todos os hidrogênios e seus respectivos carbonos 1J . Com o mapa de contornos $g\text{HMBC}$ (Figura 11) foi possível verificar a 3J as correlações entre os hidrogênios e os carbonos, indicados na Tabela 2.

Portanto os dados espectroscópicos confirmam que esta substância é a miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo.

Figura 7. Estrutura representativa de um flavonol glicosilado.

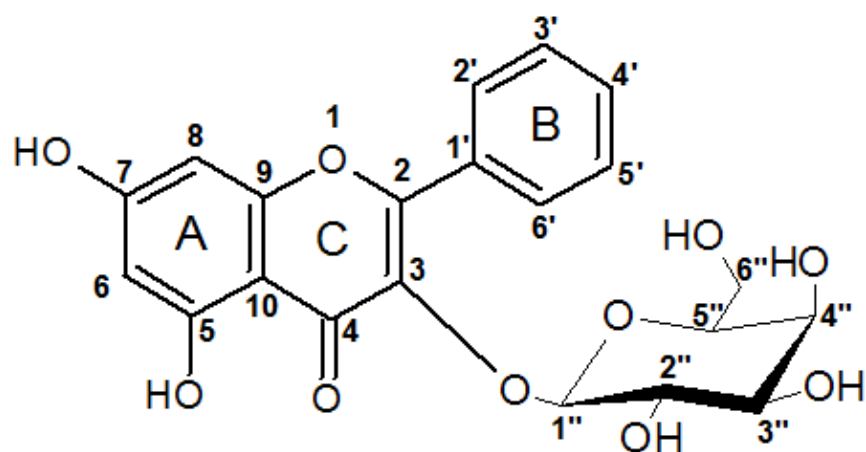


Figura 8. Espectro RMN ^1H de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d_6}).

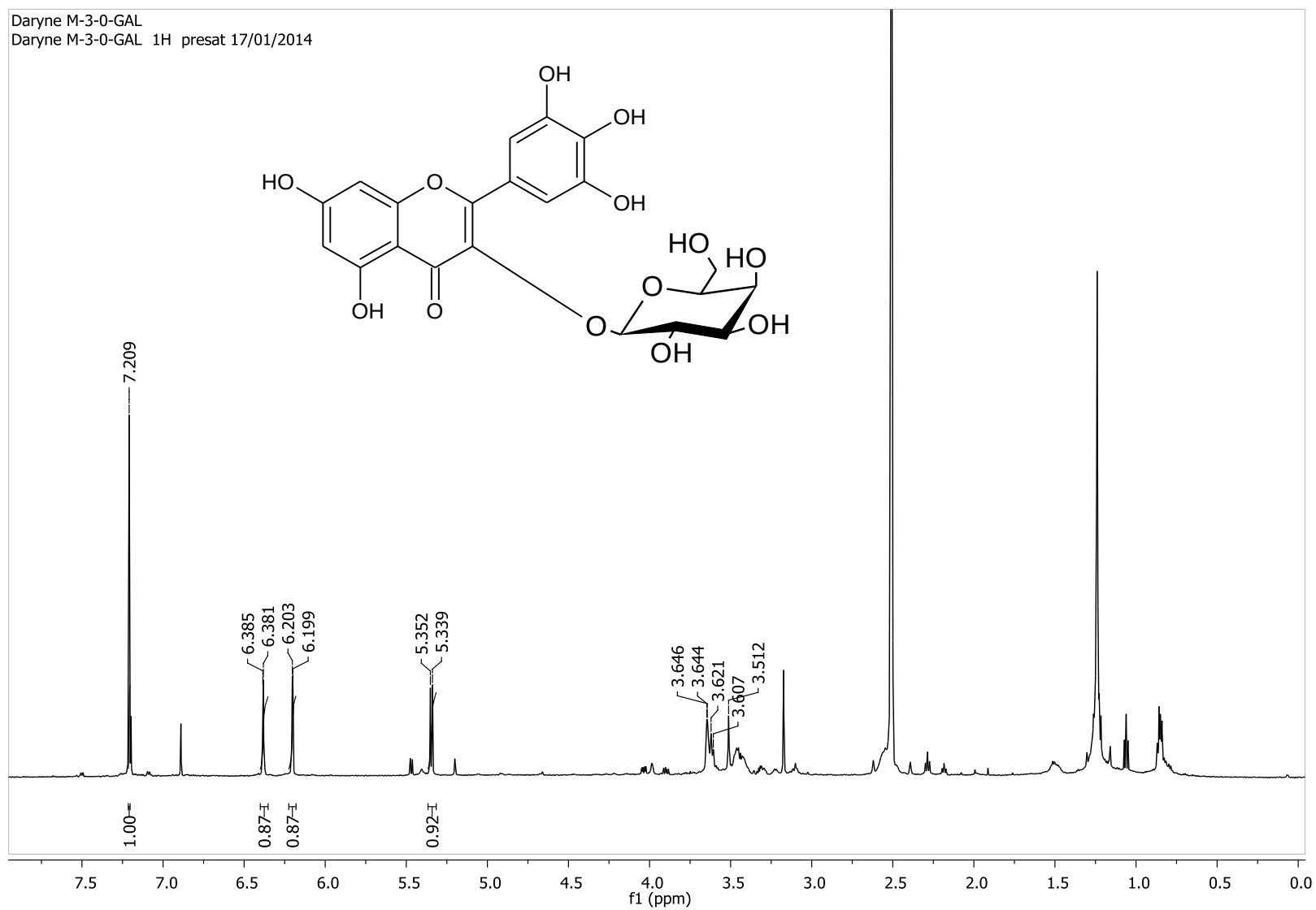


Figura 9. Espectro TOCSY/1D de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

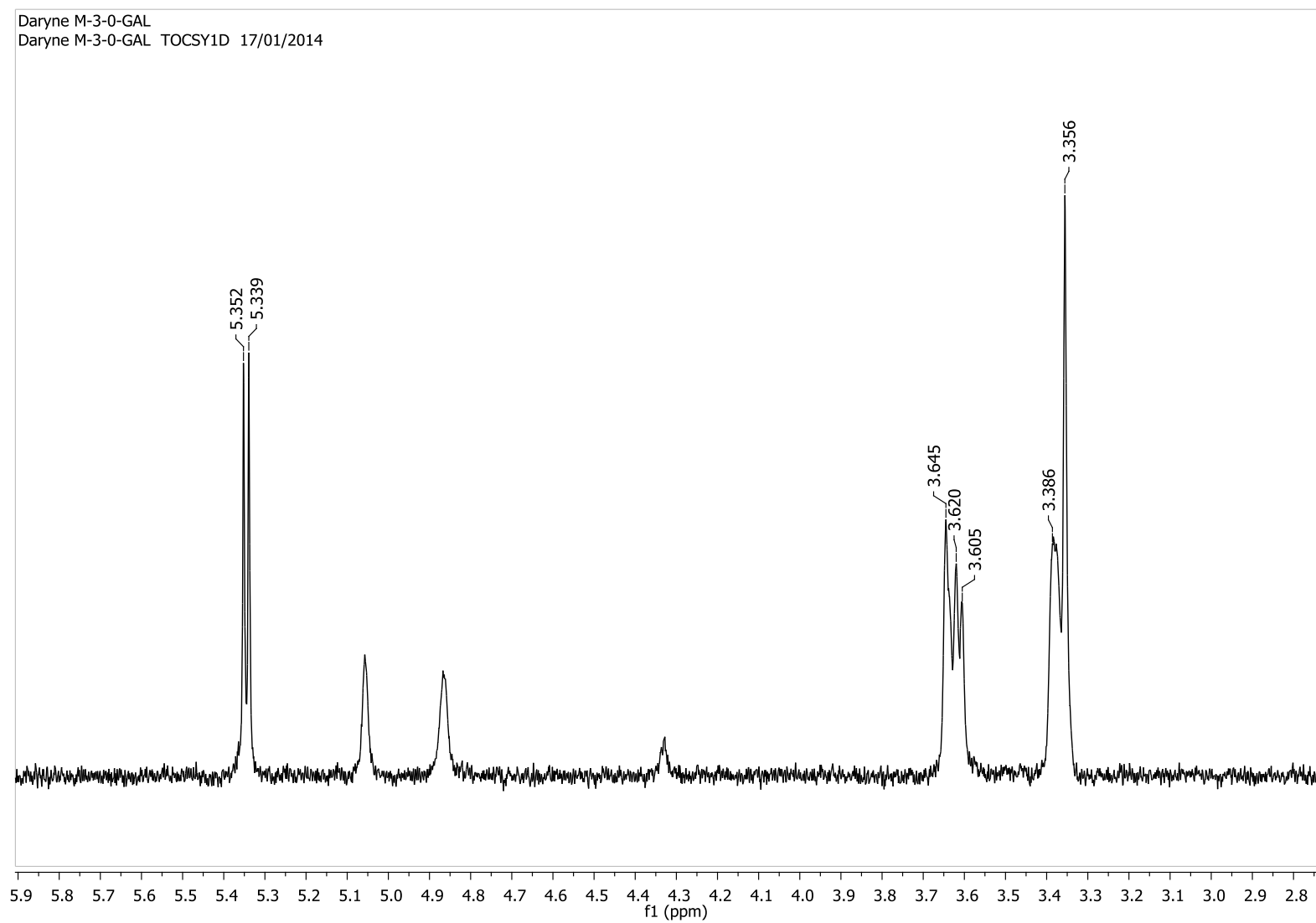


Figura10. Mapa de contornos por *g*HSQC de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

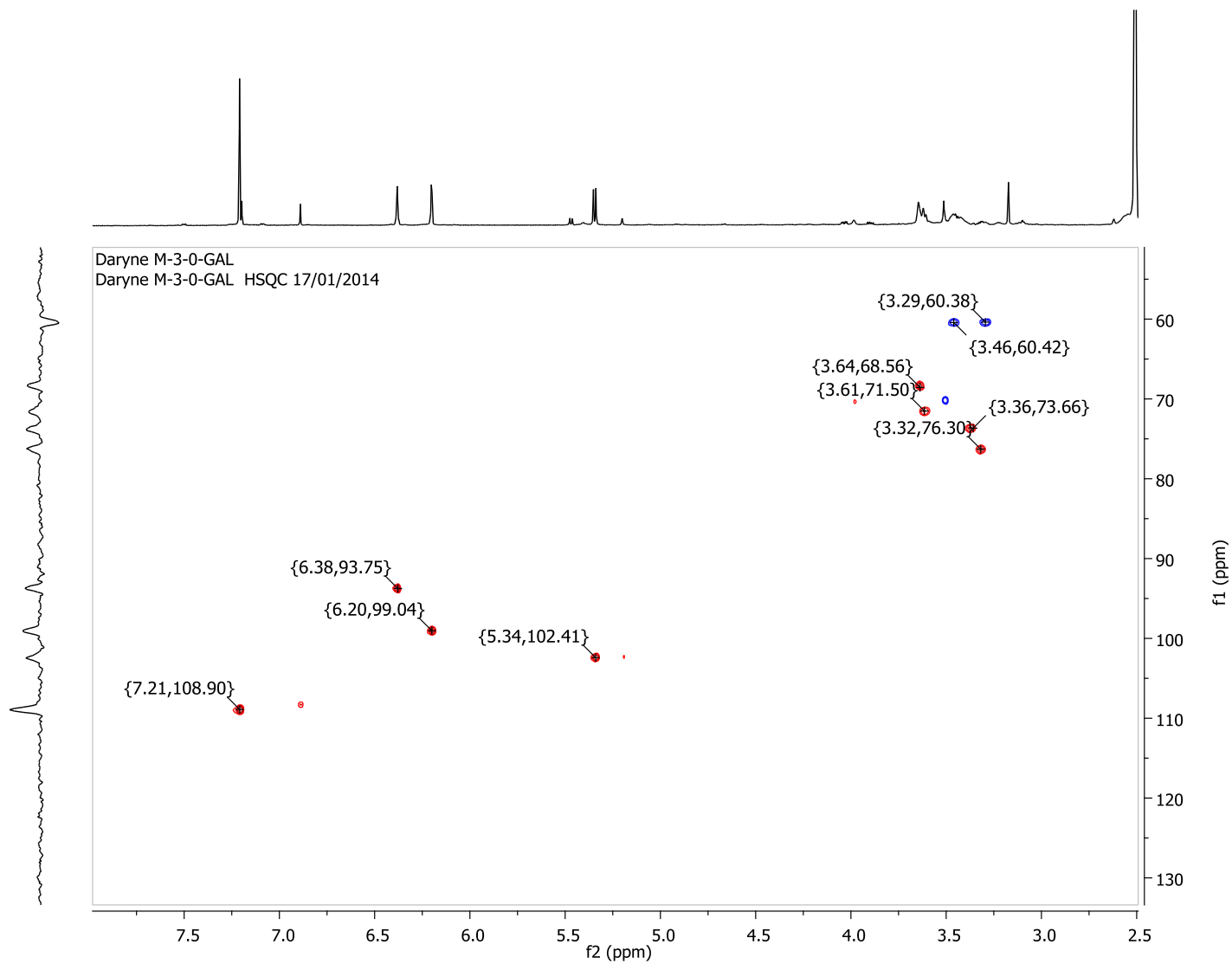
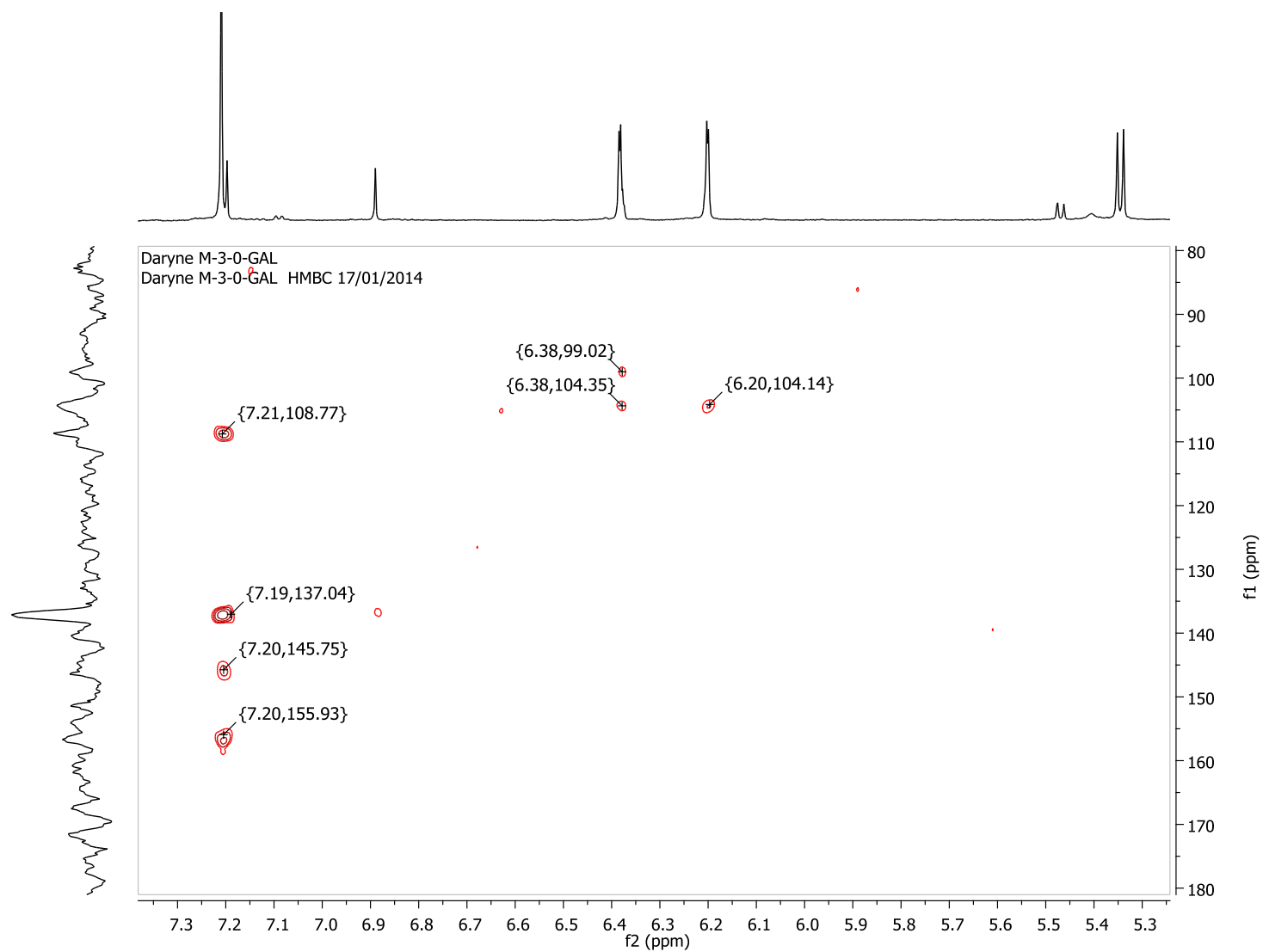


Figura 11. Mapa de contornos por *g*HMBC de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO- d_6).



Miricetina-3-O- α -arabinopiranosídeo (M-3-O-ARA)

Esta substância também se apresentou como um sólido amarelo. O espectro de RMN ^1H (Figura 12) apresentou-se semelhante ao de M-3-O-GAL. As diferenças significativas observadas foram na região do açúcar. Observou-se um duplete em δ 5,20 (1 H, $J = 5,4$ Hz).

O espectro TOCSY/1D (Figura 13) foi obtido irradiando seletivamente o sinal do hidrogênio em δ 5,20, o que levou a um sistema de spin típico da arabinose, pela correlação com somente três sinais (δ 3,78, 3,51 e δ 3,65), compatível com uma unidade de arabinose (PAWAN et al., 1992).

A configuração α -L-arabinopiranosídica foi deduzida mediante aos valores de constantes de acoplamento entre $J_{\text{H1-H2}}$ (5,4 Hz) (ISHII et al., 1991 e LEMIEUX et al., 1966) e segundo Servettaz et al. (1984) arabinopiranosose com constante de acoplamento de 7,0 Hz é típica de β -piranosídeo.

Segundo Agrawal (1989), a diferenciação entre furanose e piranose pode ser prontamente realizada observando-se os deslocamentos químicos dos carbonos 1", 2" e 4". Para a furanose estes valores apresentam deslocamentos químicos em campo mais baixo (4-14 ppm). Por exemplo, observa-se para o C1" (δ 109,1 e δ 104,7); para o C2" (δ 81,5 e δ 71,6) e para o C4" (δ 84,7 e δ 69,1) para α -furanose e α -piranosose respectivamente.

Através da análise do mapa de contornos por gHSQC (Figura 14) foi possível deduzir a forma piranosídica do açúcar. Os sinais em δ 102,3, δ 71,0, δ 72,2, δ 69,6 e δ 66,5 são correspondentes a uma unidade de α -L-arabinopiranosídeo. A Figura 15 apresenta o mapa de contornos por gHMBC para a substância.

Portanto os dados espectroscópicos confirmam que esta substância é a miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo.

Figura 12. Espectro RMN ^1H de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO-d_6).

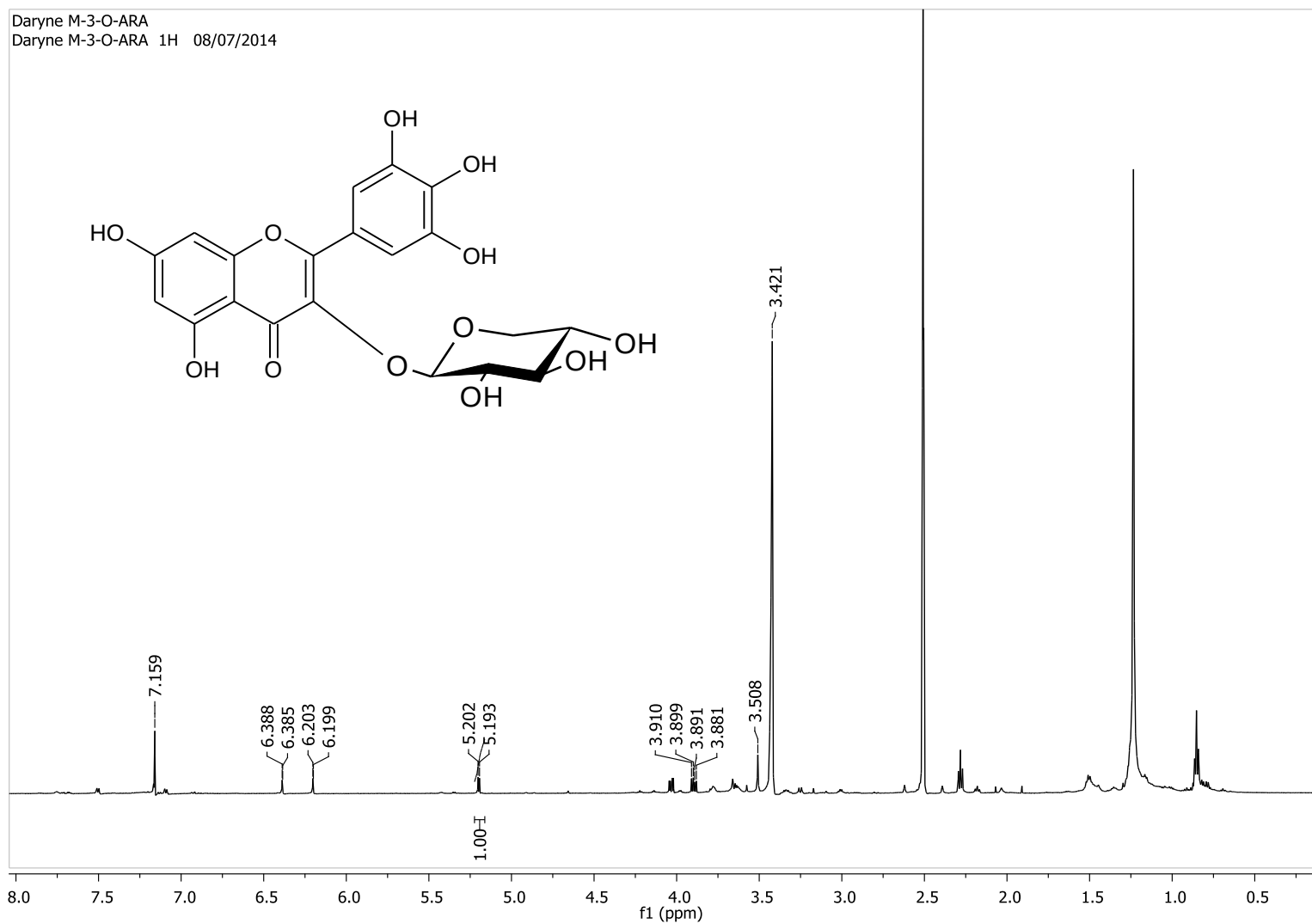


Figura 13. Espectro TOCSY/1D de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

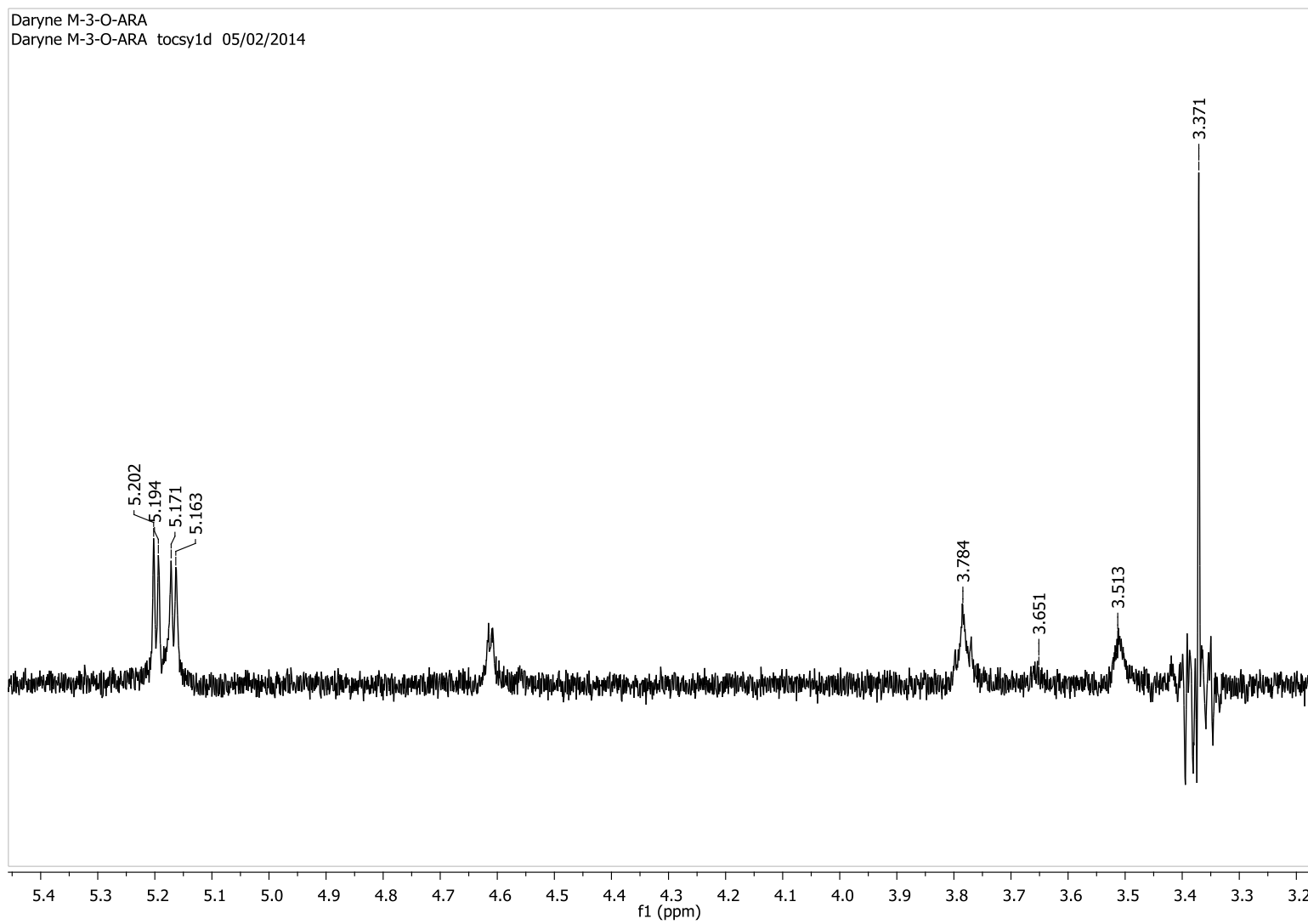


Figura 14. Mapa de contornos por *g*HSQC de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

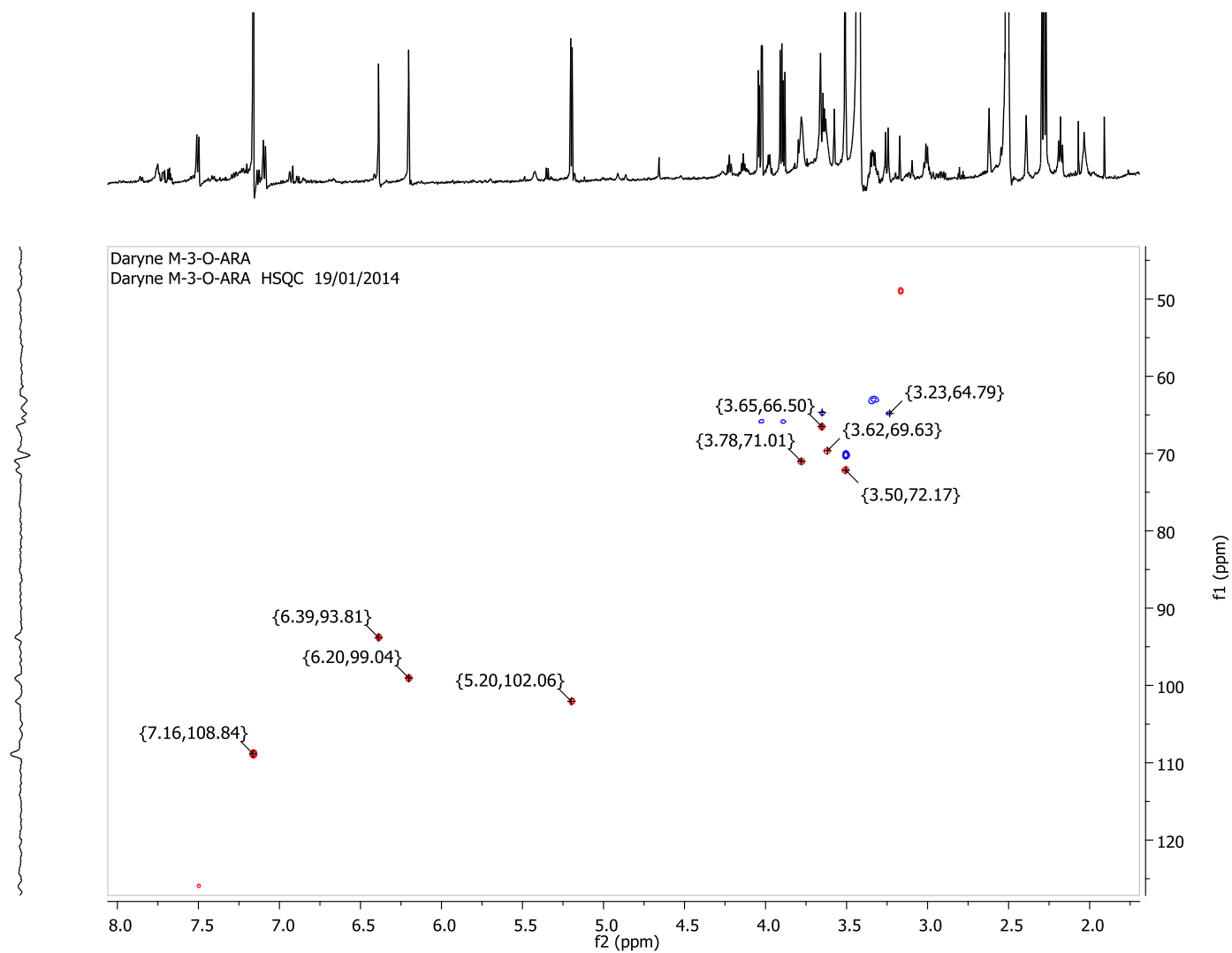
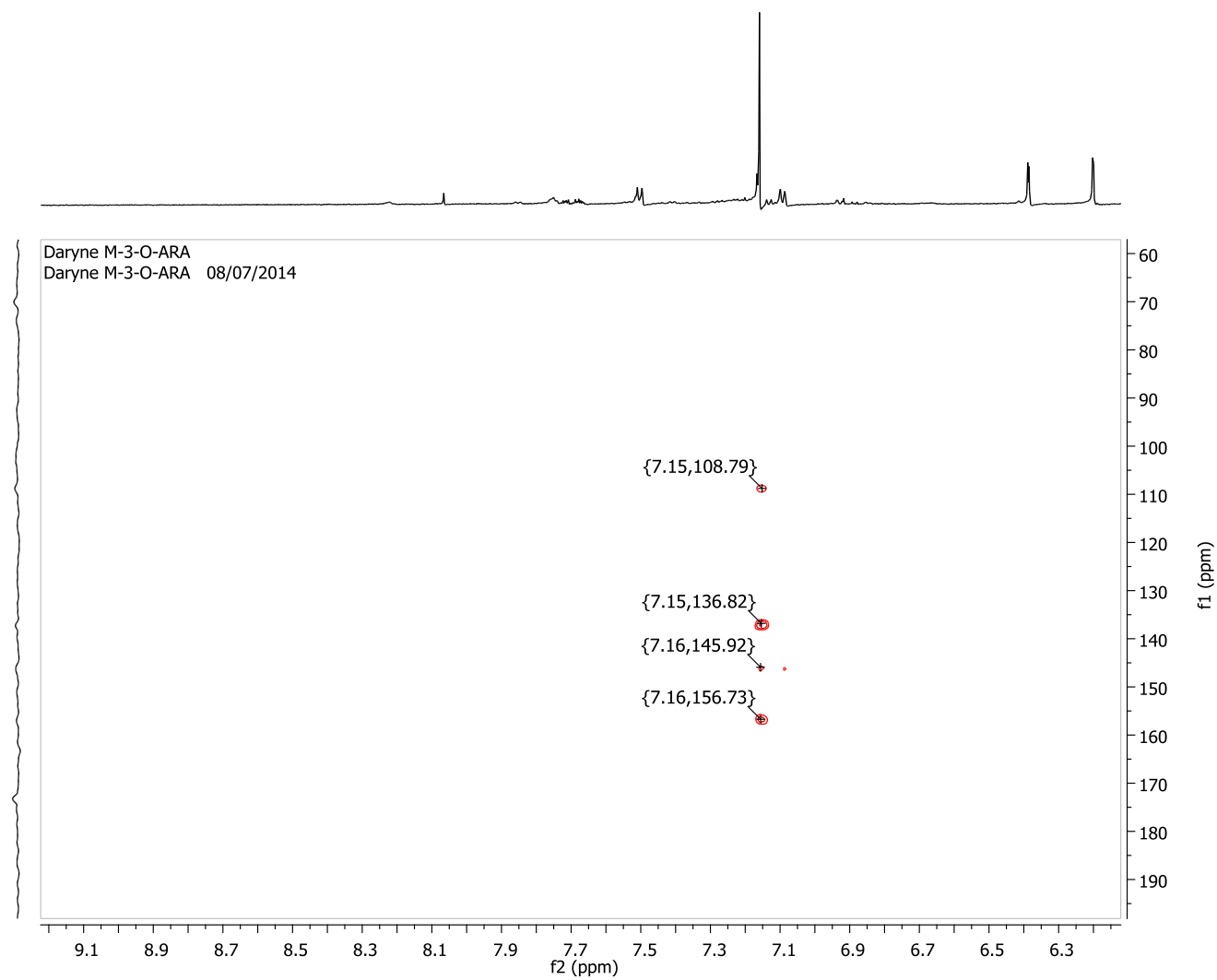


Figura 15. Mapa de contornos por *g*HMBC de miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).



Miricetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo (M-3-O-RHA)

O espectro de RMN desta substância (Figura 16), também um sólido de cor amarela, apresentou diferenças daqueles das substâncias anteriormente discutidas unicamente pelos sinais relativos à unidade de açúcar.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 16) exibiu o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,20 (*d*, $J = 1,2$ Hz). No espectro de RMN ^1H desta substância é evidente também um dubleto δ 0,85 (3H, $J = 6$ Hz), típico de um 6-deoxi-açúcar.

A completa sequência dos deslocamentos químicos da unidade de açúcar foi obtida através de experimentos 1D-TOCSY (Figura 17), iniciando pelo hidrogênio anomérico. A irradiação do sinal em δ 5,20 forneceu o sistema de spins do α -L-rhamnopyranosídeo, com correlação somente com o hidrogênio em δ 3,36 (H-2, *sL*). Dessa forma, a unidade sacarídica pôde ser identificada como sendo o α -L-rhamnopyranosídeo.

O mapa de contornos por *g*HSQC (Figura 18) forneceu os deslocamentos químicos necessários para a identificação da aglicona.

Os valores de ^1H e ^{13}C que foram atribuídos mediante experimentos *g*HSQC, *g*HMBC (Figura 29) e TOCSY/1D.

Portanto os dados espectroscópicos confirmam que esta substância é a miricetina-3-O- α -L-rhamnopyranosídeo.

Figura 16. Espectro RMN ^1H de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO-d_6).

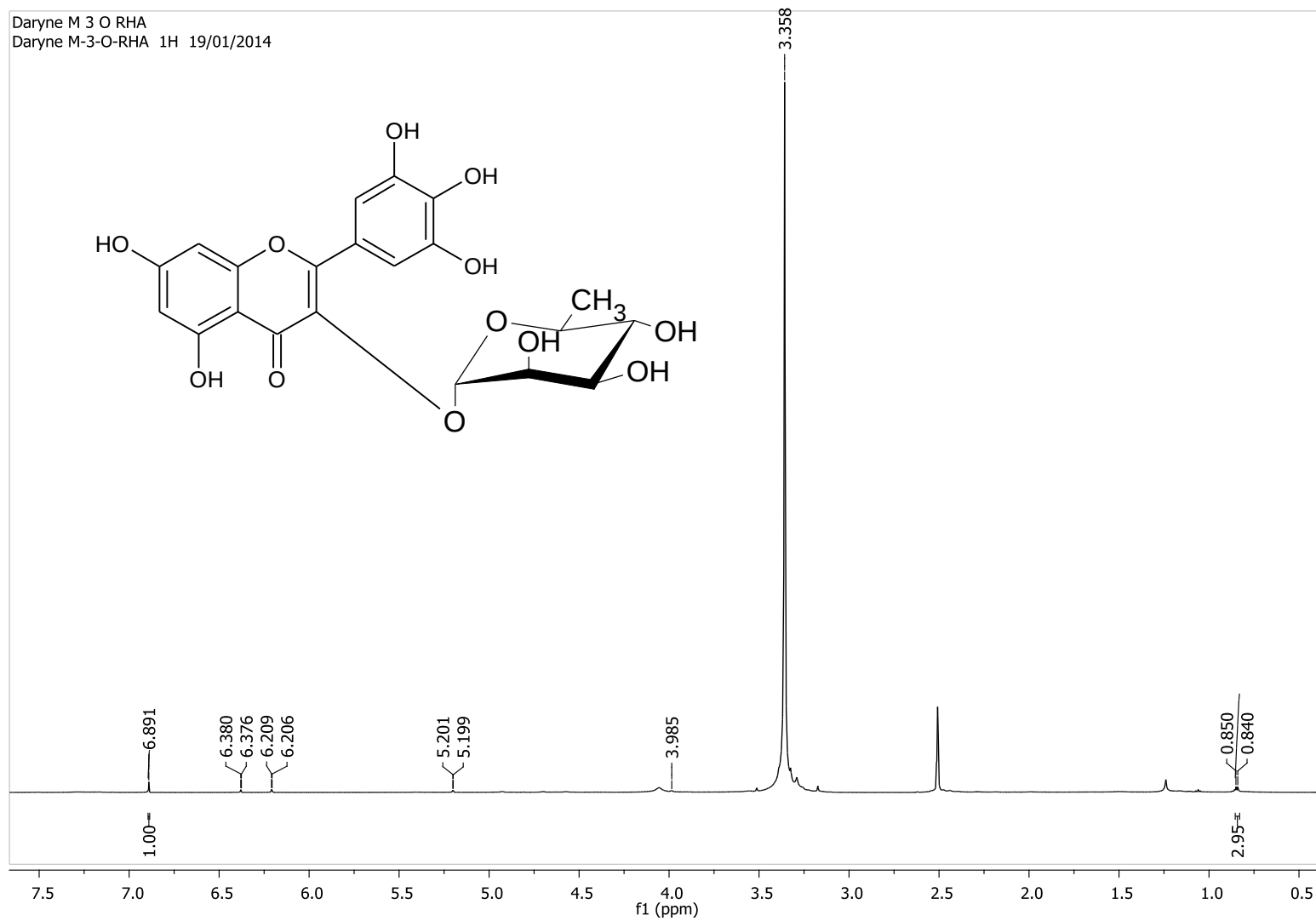


Figura 17. Espectro TOCSY/1D de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

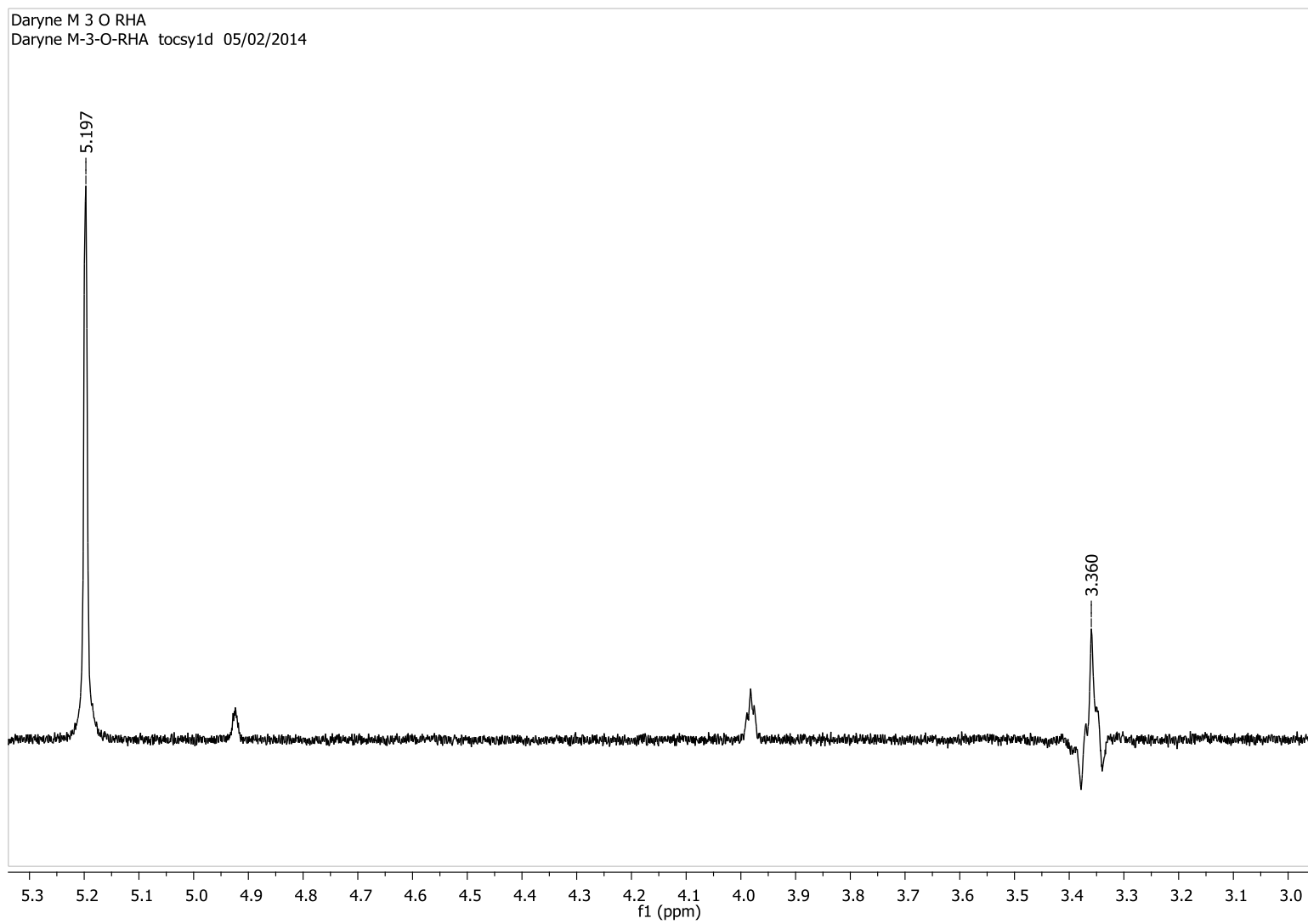


Figura 18. Mapa de contornos por *g*HSQC de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

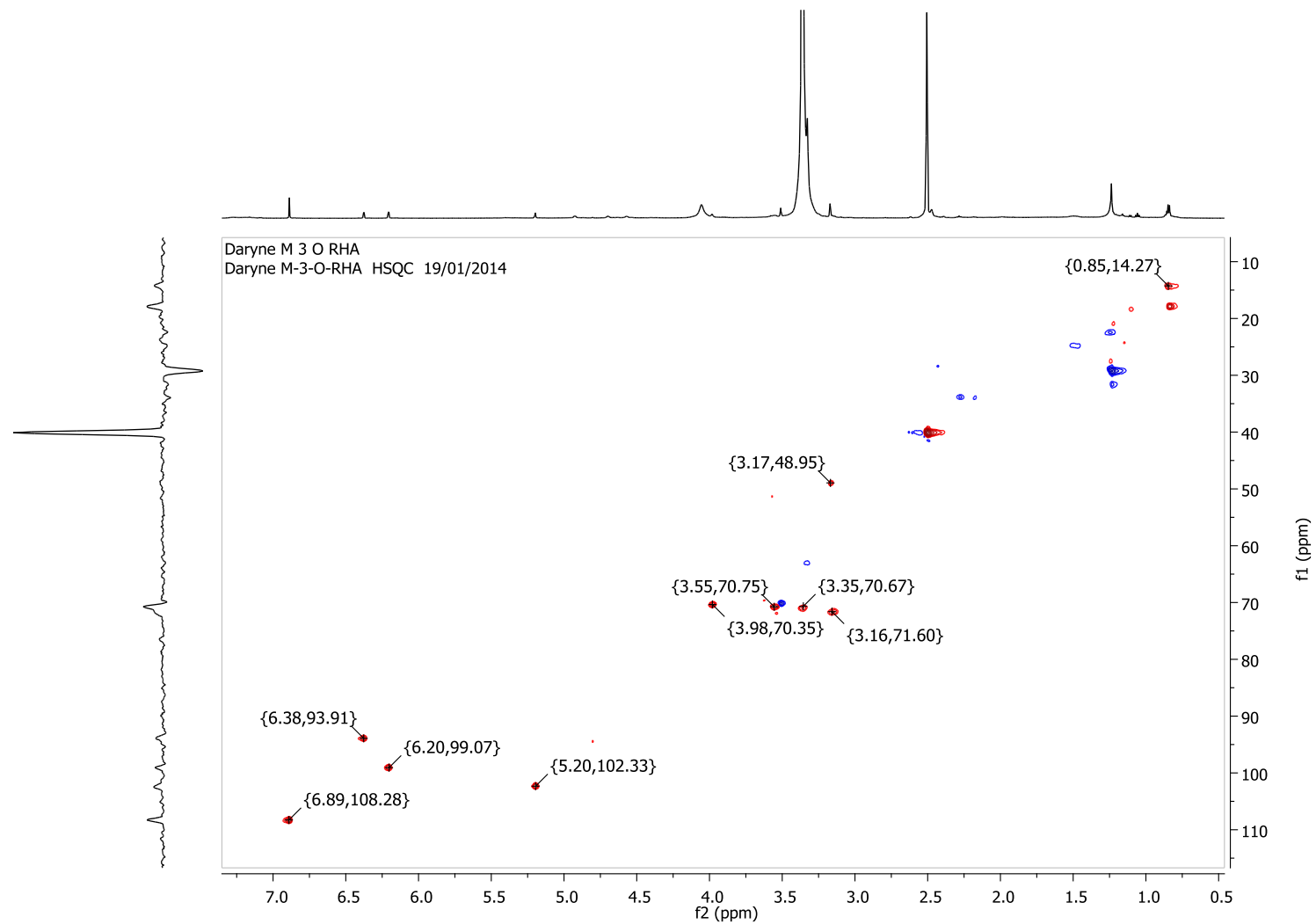
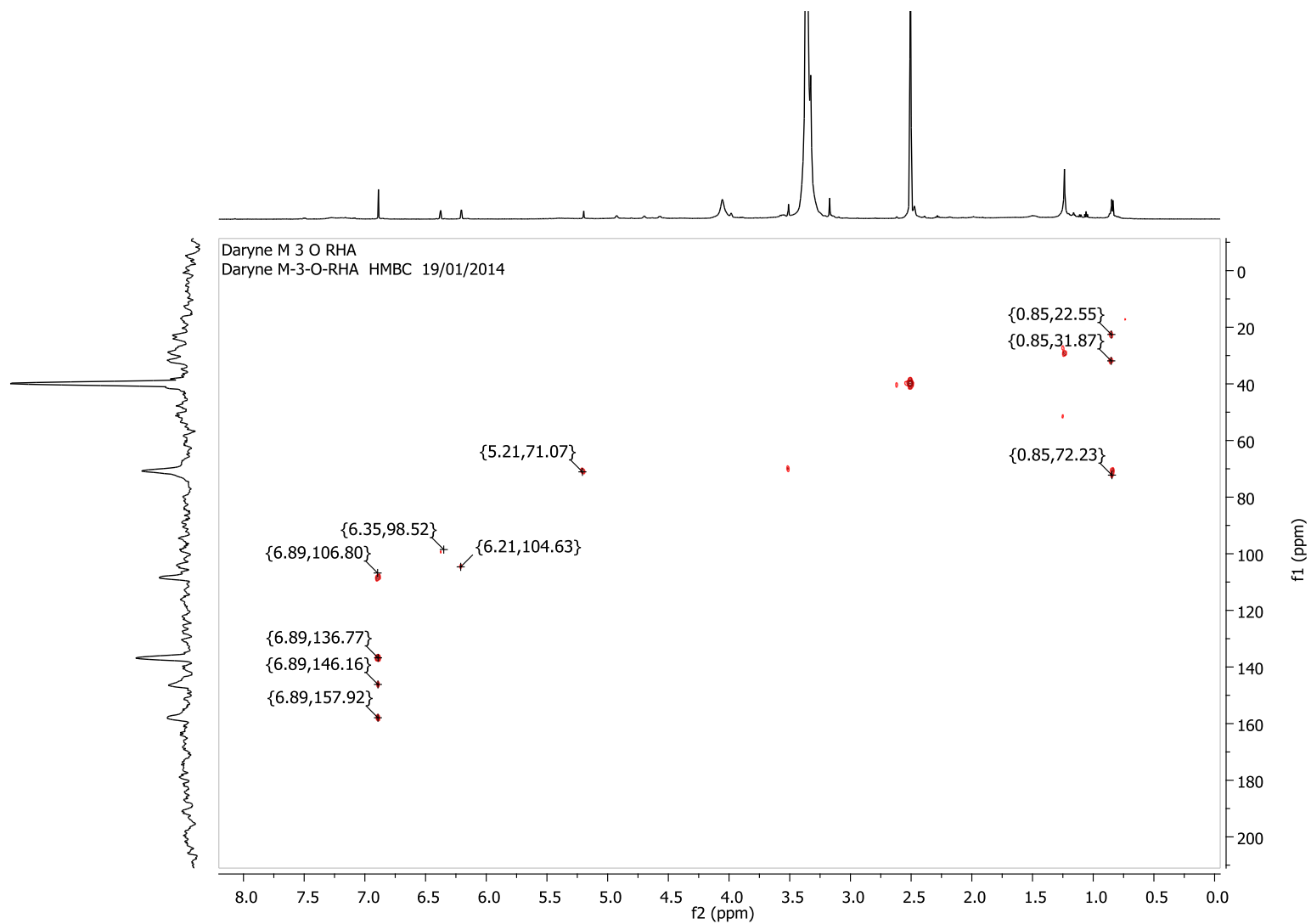


Figura 19. Mapa de contornos por *g*HMBC de miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).



Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo

O espectro de RMN ^1H (Figura 20, Tabela 2) possibilitou identificar um duplete em δ 7,67 ($J = 8,4$ Hz), um duplete a δ 7,53 ($J = 1,8$ Hz) e um duplete a δ 6,82 ($J = 8,4$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do anel B da aglicona. Dois outros hidrogênios acoplados em meta em δ 6,38 (d , $J = 1,2$ Hz) e δ 6,18, foram atribuídos aos H-8 e H-6 respectivamente (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

O sinal δ 5,36 ($J = 7,2$ Hz) foi atribuído a uma unidade de D-hexose com configuração- β . Os demais deslocamentos químicos do açúcar foram identificados entre δ 3,29 – 3,65.

O experimento TOCSY/1D (Figura 21) possibilitou identificar a unidade de açúcar. A irradiação do hidrogênio anomérico (δ 5,36) apresentou correlação com os hidrogênios em δ 3,65 (H-2''); 3,37 (H-3'') e 3,57 (H-4''), confirmando portanto que tratava-se de uma galactose.

Os experimentos $g\text{HSQC}$ (Figura 22) e $g\text{HMBC}$ (Figura 23) possibilitaram atribuir a correlação de cada hidrogênio com seu respectivo carbono a 1J e a 3J .

Com base nessas evidências, esta substância, foi determinada como sendo a quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo.

Figura 20. Espectro RMN ^1H de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO-d_6).

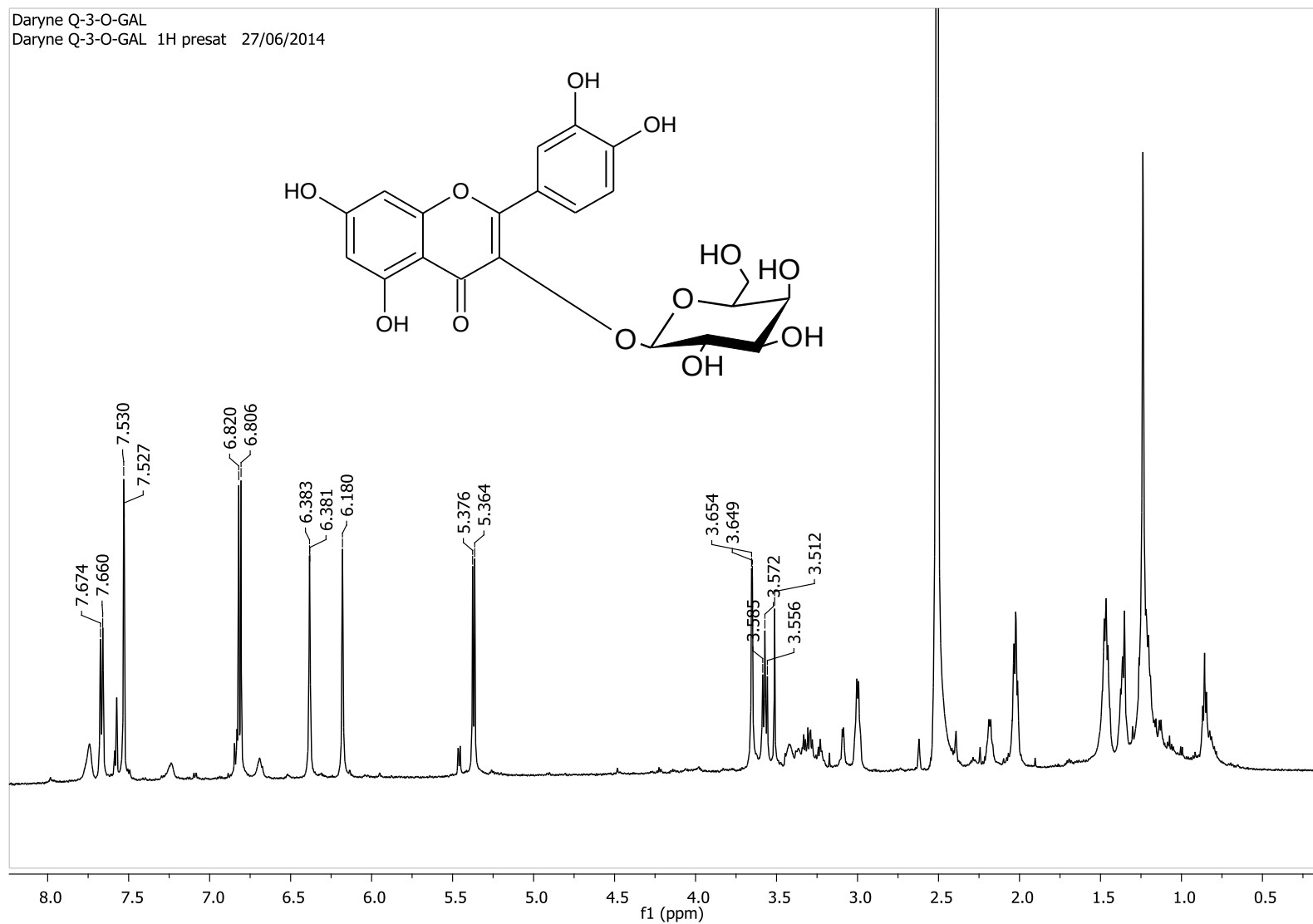


Figura 21. Espectro TOCSY/1D de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

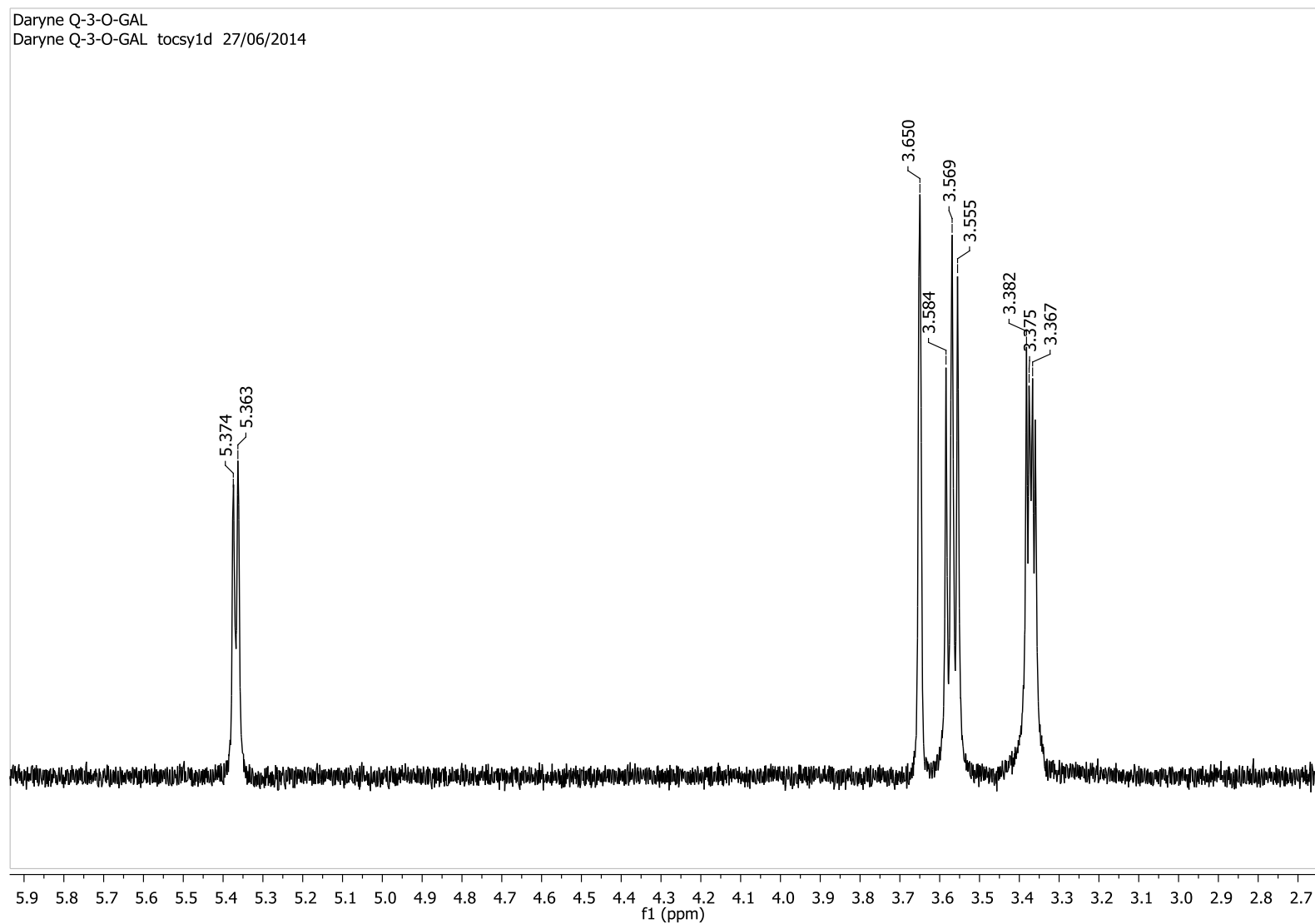


Figura 22. Mapa de contornos por gHSQC de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

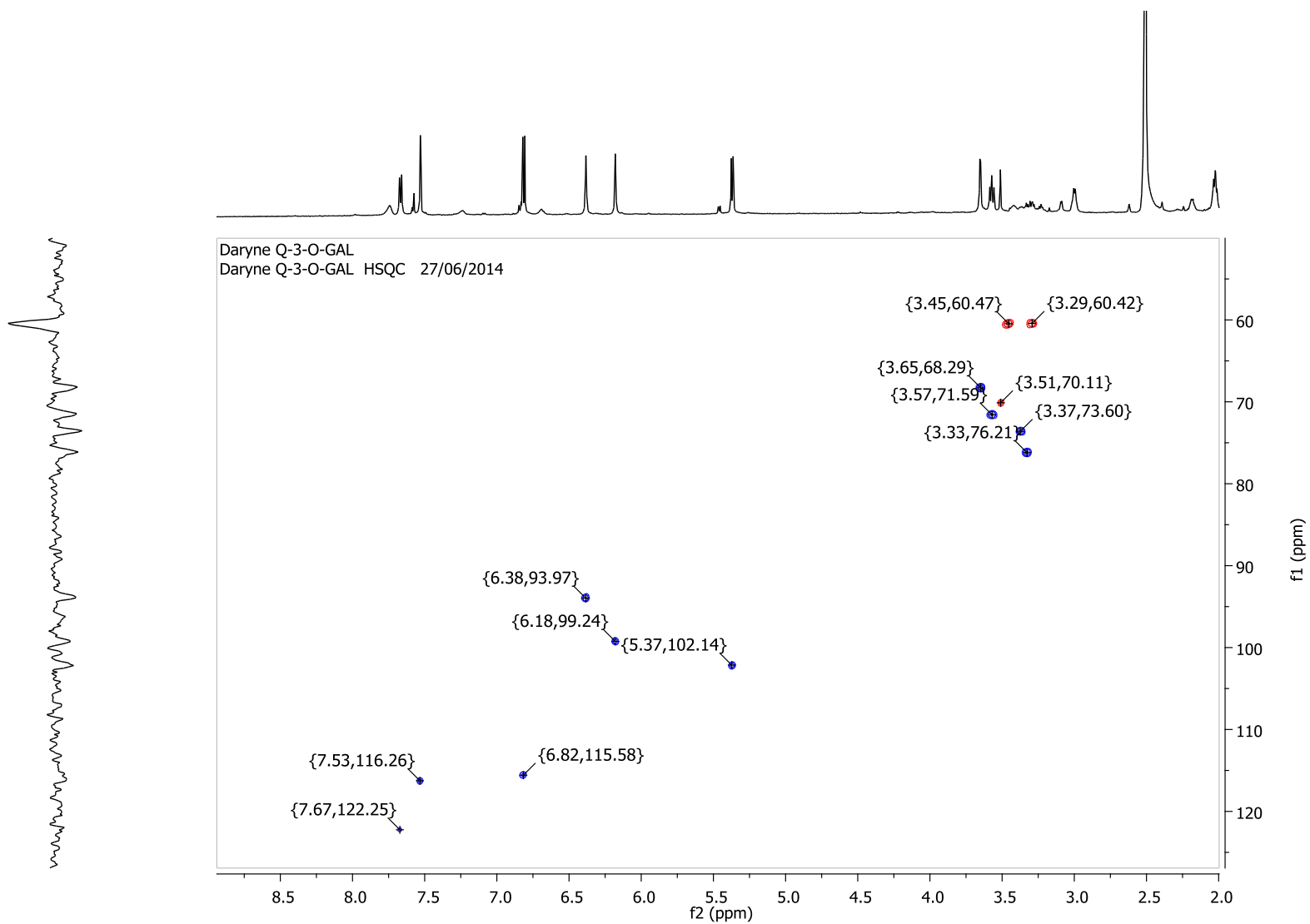


Figura 23. Mapa de contornos por *g*HMBC de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (600 MHz, DMSO_{d6}).

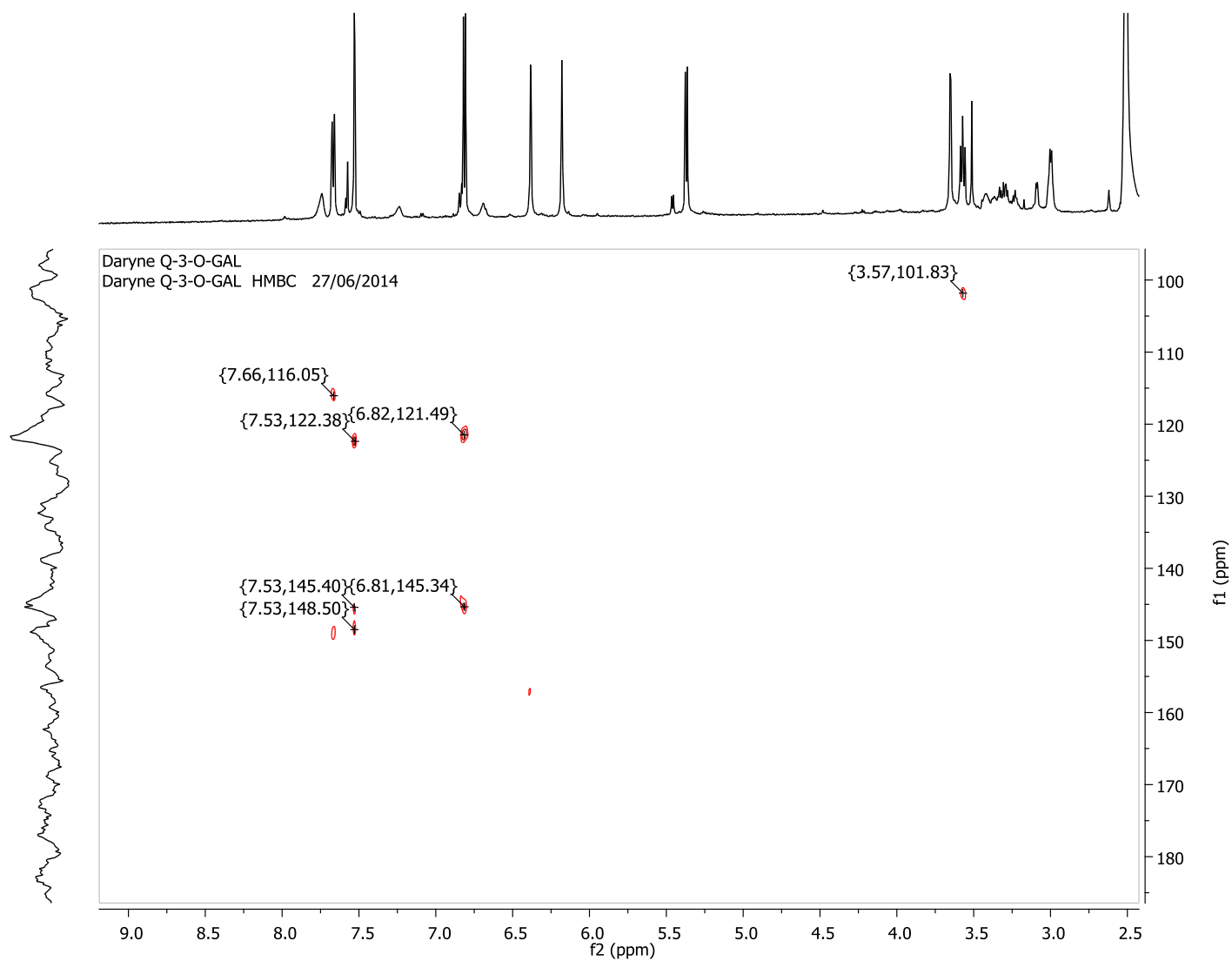


Tabela 2. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (150 MHz) de M-3-O-GAL, M-3-O-ARA, M-3-O-RHA e Q-3-O-GAL - 600 MHz (DMSO_{d6}).

H/C	M-3-O-GAL		M-3-O-ARA		M-3-O-RHA		Q-3-O-GAL	
2	155,9	-	156,7	-	157,9	-	155,9	-
3	n.d	-	n.d	-		-	n.d.	-
4	n.d	-	n.d	-		-	n.d.	-
5	n.d	-	n.d	-		-	n.d.	-
6	99,0	6,20 <i>d</i> (2,4)	99,0	6,20 <i>d</i> (2,4)	99,0	6,20 <i>d</i> (1,8)	99,0	6,20 <i>d</i> (2,4)
7	n.d	-	n.d	-		-	n.d.	-
8	93,7	6,38 <i>d</i> (2,4)	93,8	6,39 <i>d</i> (1,8)	93,9	6,38 <i>d</i> (2,4)	93,7	6,38 <i>d</i> (2,4)
9	n.d	-	n.d	-		-	n.d.	-
10	104,3	-		-	104,6	-	104,3	-
1'	n.d	-	n.d	-	n.d.	-	121,5	-
2'	108,9	7,20 <i>sl</i>	108,8	7,16 <i>sl</i>	108,3	6,89 <i>sl</i>	116,2	7,53 <i>d</i> (1,8)
3'	145,7	-	145,9	-	145,4	-	145,4	-
4'	137,0	-	136,8	-	136,8	-	148,5	-
5'	145,7	-	145,9	-	145,4	-	115,6	6,82 <i>d</i> (8,4)
6'	108,9	7,20 <i>sL</i>	108,8	7,16 <i>sL</i>	108,3	6,89 <i>sL</i>	122,2	7,67 <i>d</i> (8,4)
	Galactose		Arabinose		Rhamnose		Galactose	
1"	102,4	5,34 <i>d</i> (7,8)	102,0	5,20 <i>d</i> (5,4)	102,3	5,20 <i>d</i> (1,2)	102,1	5,37 <i>d</i> (7,2)
2"	71,5	3,61 <i>t</i> (7,8)	72,2	3,50	70,3	3,98	71,6	3,57

3"	73,7	3,36	71,0	3,78	70,8	3,55	73,6	3,37
4"	68,6	3,64 <i>dd</i> (1,2)	66,5	3,65	71,6	3,16	68,3	3,65
5"	76,3	3,32 <i>m</i>	64,7	3,65 3,23	70,7	3,35	76,2	3,33
6"	60,4	3,46 3,29	-	-	14,3	0,85 <i>d</i> (6,0)	60,4	3,45 3,29

Obs. *Valores obtidos através dos experimentos de HSQC e HMBC.

4.2 Fingerprint dos extratos hidroalcoólicos e infusões e coinjeção com padrões por HPLC-DAD

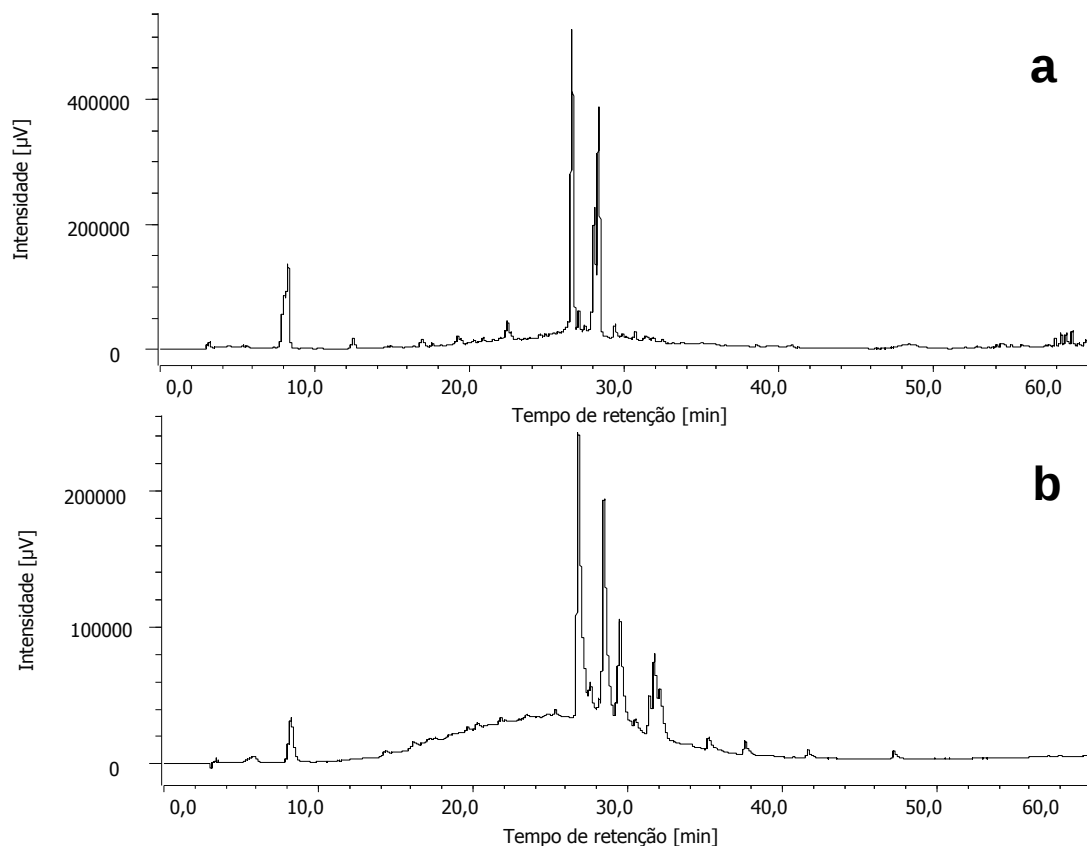
O perfil cromatográfico traçado por HPLC-DAD é de grande utilidade no estudo de extratos polares, pois com o espectro no UV é possível inferir a classe de substâncias, bem como identificar substâncias conhecidas através da comparação com o tempo de retenção (T_r) e espectro no UV de padrões autênticos (comerciais ou já isolados em laboratório) (RINALDO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2008).

Desta maneira, optou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia baseada em análises por HPLC-DAD na tentativa de realizar a identificação dos metabólitos secundários presentes nas matrizes estudadas empregando experimentos de coinjeção de padrões autênticos e/ou substâncias previamente isoladas e caracterizadas.

A etapa de *clean-up* utilizando cartuchos de RP18, anterior à análise por HPLC-DAD, é responsável pela eliminação de parte das substâncias apolares presente nos extratos, o que colabora para a concentração dos analitos de interesse da amostra (SNYDER et al., 1997). O sistema de eluição utilizado para esta etapa, MeOH:H₂O (95:5, v/v), foi escolhido pois concentrações maiores de metanol originam eluatos que representam melhor as condições dos extratos originais em cromatografia de fase reversa (RODRIGUES, 2007), uma condição muito importante para ensaios de quantificação por HPLC-DAD.

Inicialmente, foram obtidos cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* utilizando-se um gradiente exploratório onde a concentração de MeOH (solvente B) em H₂O (solvente A) variou de 5 a 100% (v/v) em 60 minutos (Figura 24).

Figura 24. Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (b). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5µm), 5 a 100% de B em 60 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: MeOH acidificado com 0,1% de TFA), 40°C, λ = 254 nm, vazão 1 mL min⁻¹.

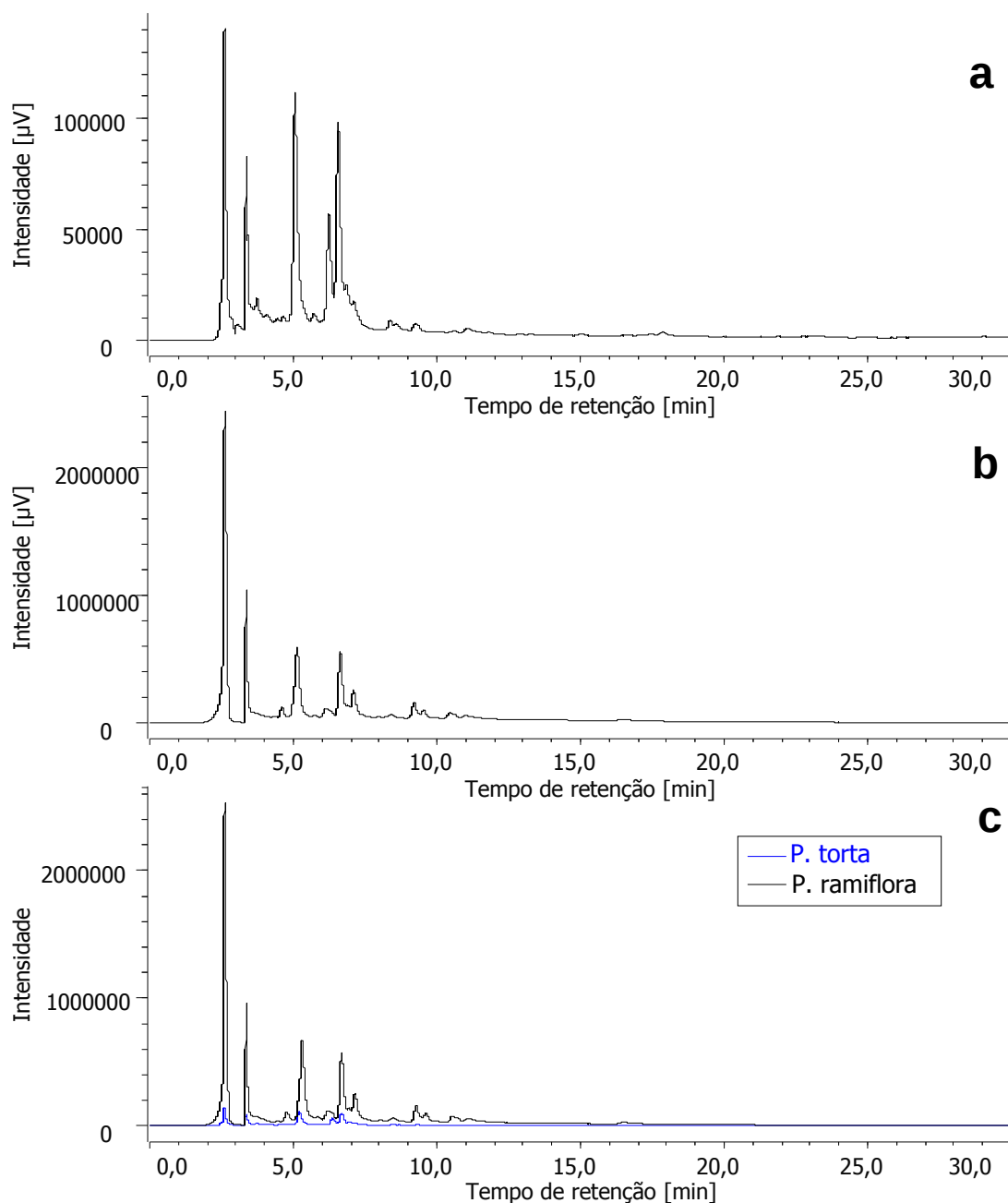


Os resultados obtidos nortearam as ações subsequentes para a melhoria da separação dos picos.

Várias condições foram testadas para que se obtivesse a melhor separação dos picos majoritários, sendo escolhida a seguinte condição: inicialmente a fase móvel consistiu de H₂O:ACN (80:20, v/v), levando 30 minutos para atingir H₂O:ACN (58:42, v/v). A fase móvel utilizada foi acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA).

A otimização do método cromatográfico foi realizada segundo abordagem sugerida por Snyder et al. (1997) para o delineamento de uma separação por gradiente de eluição, que envolve a estimativa da inclinação da curva do gradiente para melhora da resolução e variação do solvente B para melhora da seletividade.

Figura 25. Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (b). Cromatogramas sobrepostos (c). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5µm), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, λ = 254 nm, vazão 1 mL min⁻¹.



Sistemas compostos de MeOH/H₂O são mais viscosos, especialmente na região da proporção de MeOH/H₂O 1:1 v/v (SNYDER et al., 1997), o que justifica a escolha de ACN como solvente B no método cromatográfico otimizado (Figura 25).

Com base nas análises por HPLC-ESI-IT-MS² e ESI-IT-MS/MS realizadas nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* (Seção 4.3), bem como nas substâncias isoladas de extrato metanólico de folhas de *P. torta* por Silva et al.

(2009), foram realizados ensaios de coinjeção dos extratos com 10% de padrões (padrão:extrato, m/m) de ácido gálico, M-3-O-GAL, M-3-O-ARA, M-3-O-RHA e Q-3-O-GAL (Figuras 26 e 27).

Com os resultados obtidos, juntamente aos espectros no UV dos picos majoritários dos cromatogramas dos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*, pudemos atribuir a presença dos compostos fenólicos atribuídos aos picos identificados na Figura 28 e apresentados na Tabela 3.

Figura 26. Cromatogramas do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* (a) e de sua coínjeção com ácido gálico (b), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (c), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (d), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (e) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (f). Cromatogramas sobrepostos (c). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹.

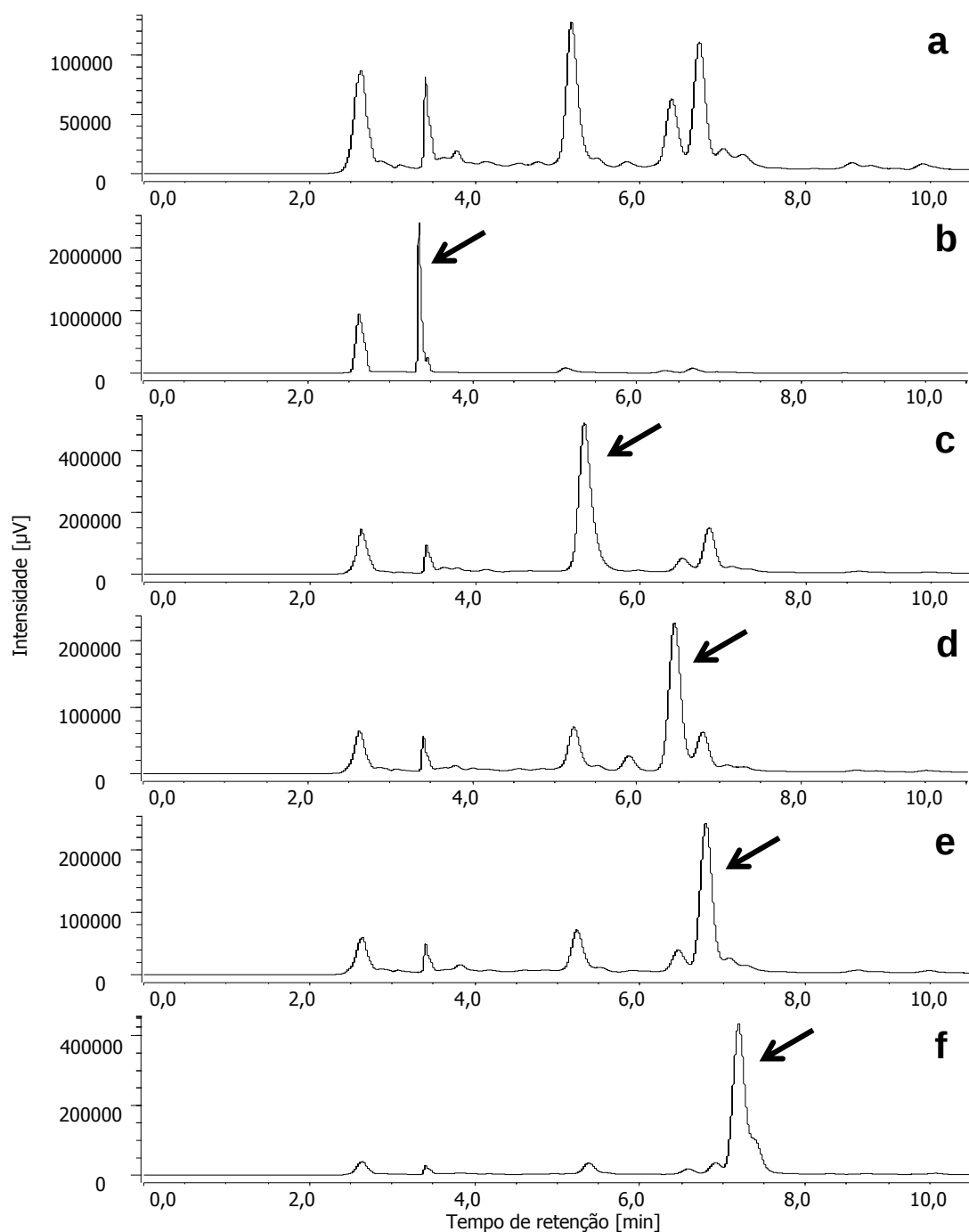


Figura 27. Cromatogramas do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. ramiflora* (a) e de sua coinjeção com ácido gálico (b), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (c), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (d), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (e) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (f). Cromatogramas sobrepostos (c). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹.

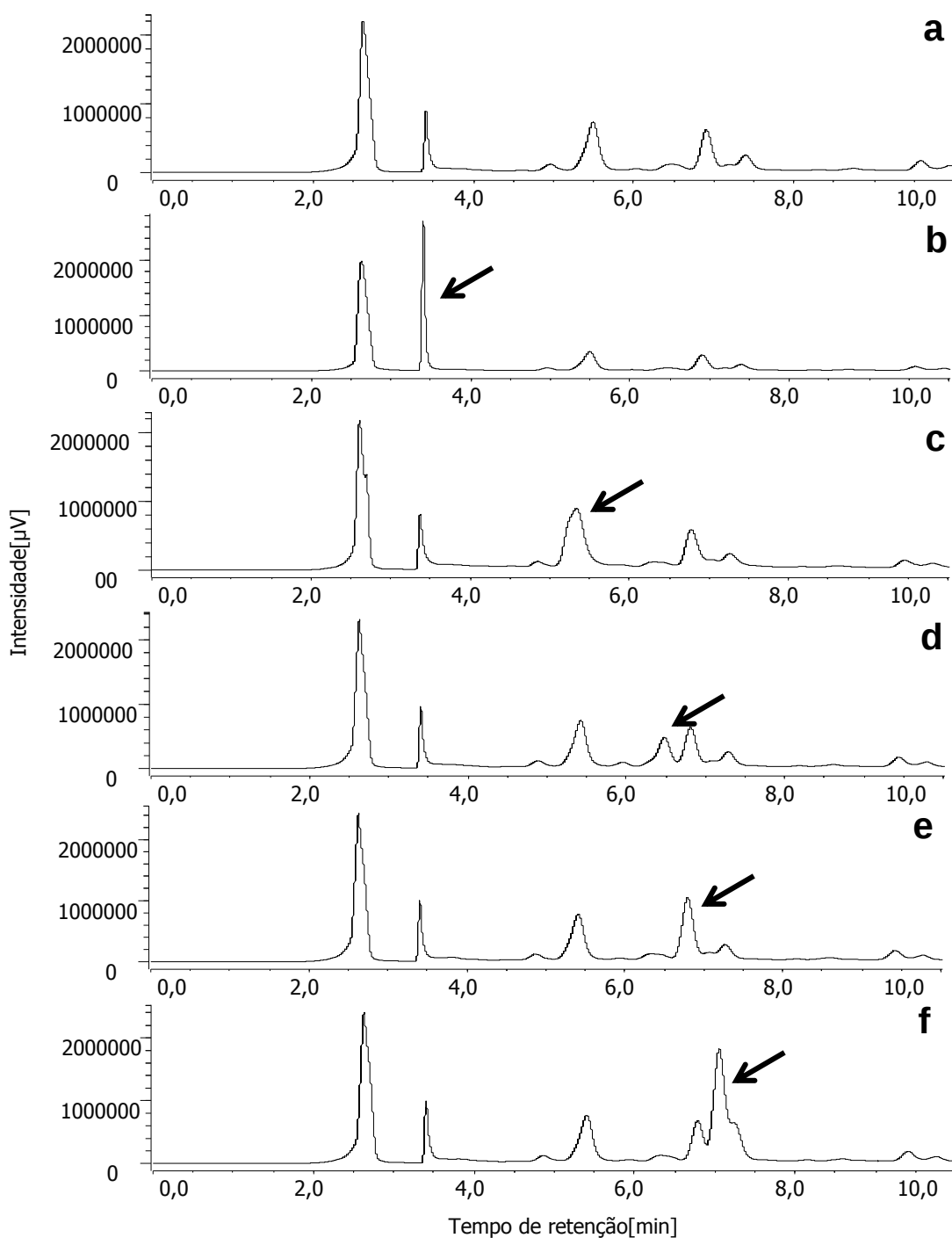


Figura 28. Cromatogramas HPLC-DAD dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (b). Picos identificados: ácido gálico (1), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (2), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (3), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (4) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (5). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5 μ m), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹.

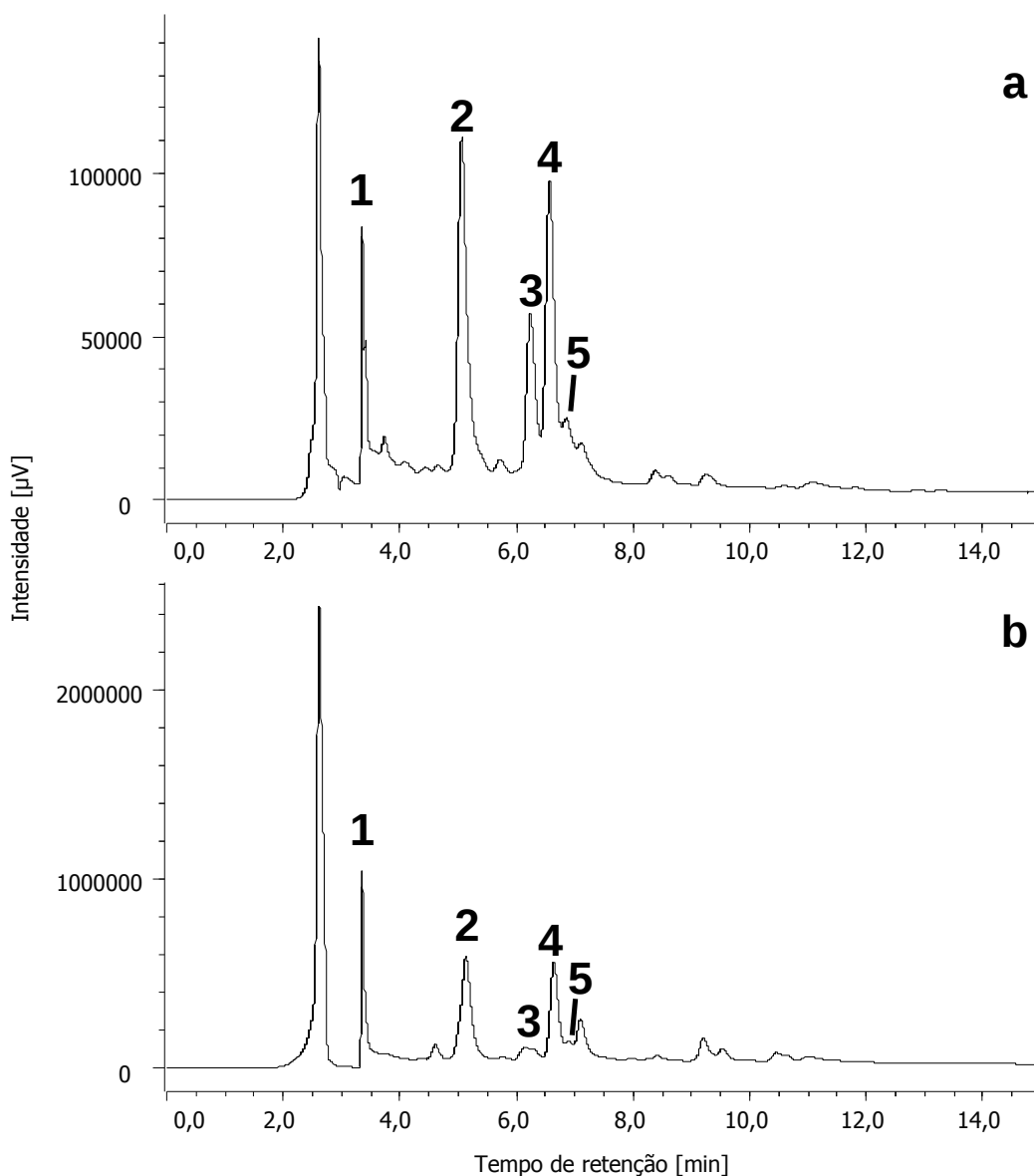


Tabela 3. Máximos de absorção no UV e tempos de retenção (t_R) dos picos identificados nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*.

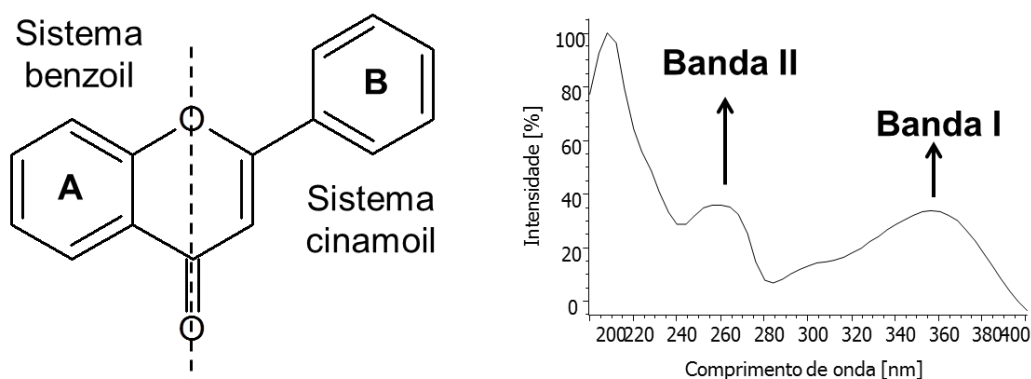
Substância	Pico	<i>P. torta</i>		<i>P. ramiflora</i>	
		λ_{max} (nm)	t_R (min)	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Ácido gálico	1	272	3,37	272	3,57
Miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	2	260, 357	5,05	259, 355	5,11
Miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo	3	263, 355	6,22	264, 354	6,22
Miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo	4	260, 350	6,57	261, 350	6,62
Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	5	254, 352	6,95	254, 352	6,95

Os dados obtidos dos espectros no UV dos picos 1-5, para ambos os extratos, corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de coíncisão.

Alguns valores encontrados na literatura para os máximos de absorção do ácido gálico foram de 272 nm (RINALDO et al., 2010) e 271 nm (RODRIGUES, 2007), já em flavonoides são encontradas duas bandas de absorção. A Banda I é associada a absorção do Anel B (sistema cinamoil) e a Banda II é atribuída ao Anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil (Figura 29).

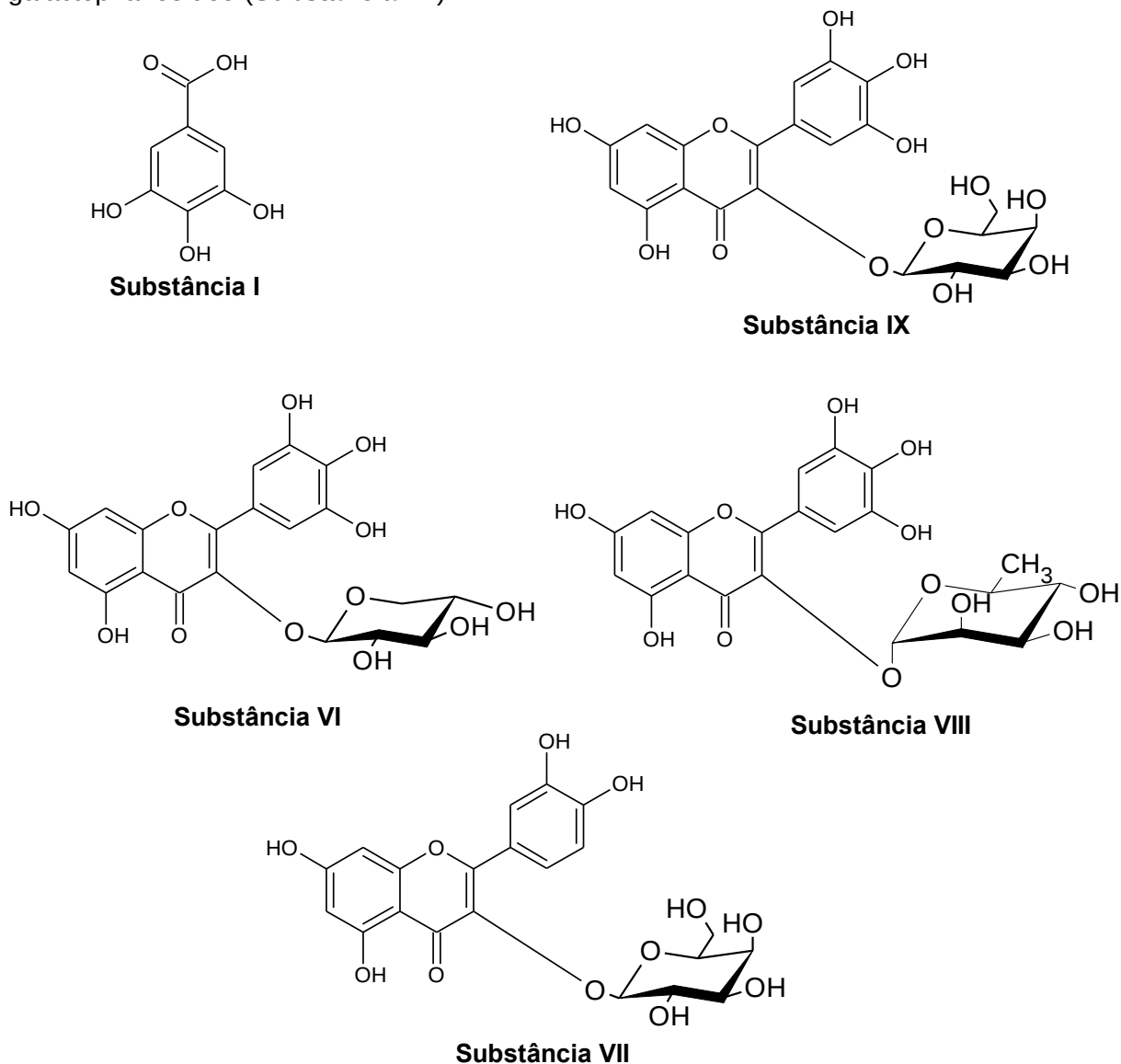
Segundo Markham. (1982) os máximos de absorção esperados para flavonóis 3-O-substituídos estão dentro da faixa de 250-280 nm para a banda II e 330-360 nm para a banda I, o que faz com que os máximos de absorção apresentados pelos picos 2, 3 e 4 apontem para a presença desta classe de flavonoides nos extratos estudados.

Figura 29. Representação dos sistemas benzoil e cinamoil em um núcleo flavonoídico e bandas I e II em um espectro no UV de flavonoide.



As estruturas das substâncias propostas para os picos 1-5 dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* são mostradas na Figura 30.

Figura 30. Estrutura dos compostos fenólicos identificados em extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*. Ácido gálico (**Substância I**), miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (**Substância IX**), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (**Substância VI**), miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (**Substância VIII**) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (**Substância VII**).



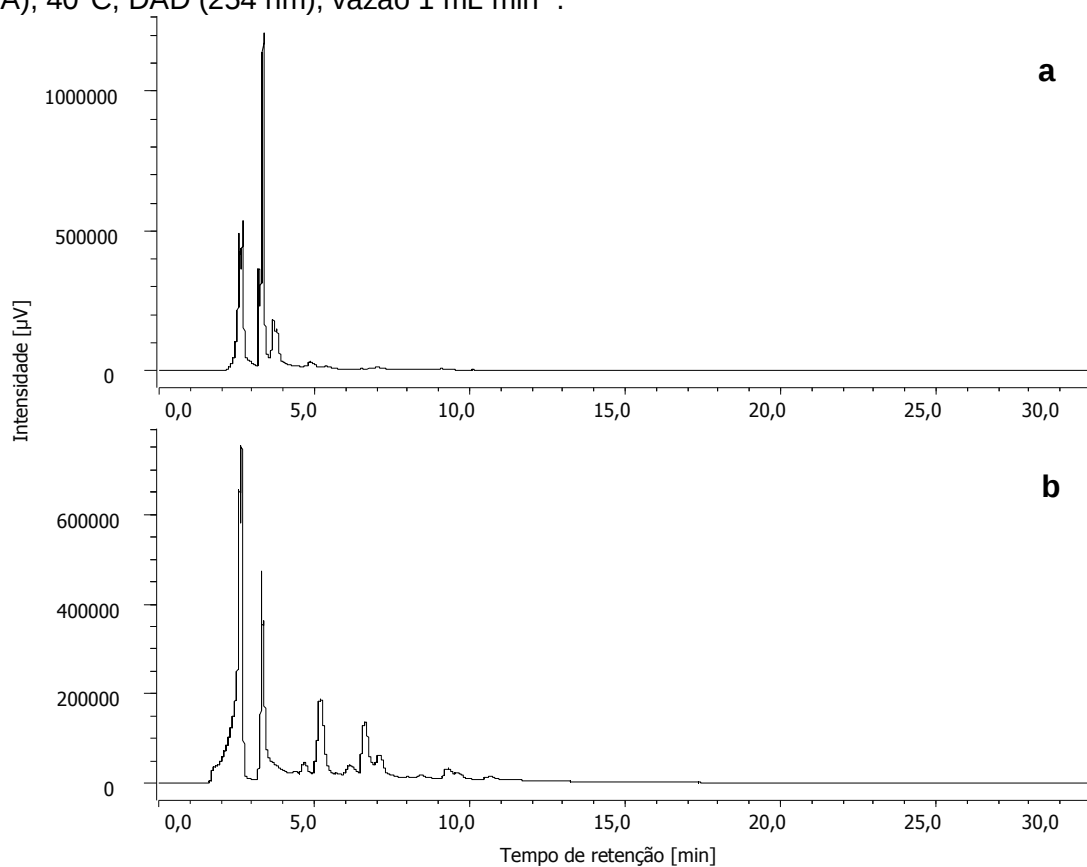
Os perfis cromatográficos das infusões das folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* também foram obtidos por HPLC-DAD (Figura 31).

Observou-se nesses cromatogramas a diminuição da intensidade dos picos atribuídos aos derivados glicosilados de miricetina e o aumento da intensidade do pico atribuído ao ácido gálico e daqueles com t_R próximos. No caso de *P. torta*, os picos de derivados glicosilados de miricetina foram imperceptíveis, enquanto o pico atribuído ao ácido gálico tem intensidade em torno de 33% maior que a observada para o pico correspondente no cromatograma da infusão de *P. ramiflora*. A

intensificação dos picos iniciais dos cromatogramas, atribuídos a substâncias mais polares é esperada, uma vez que as infusões são extratos aquosos, ou seja, mais polares que os extratos EtOH:H₂O (70:30, v/v).

As bandas apresentadas pelos espectros no UV dos picos entre 0 e 4 min, observadas entre 271-274 nm para as duas espécies, podem ser um indicativo de que estes picos possuem derivados do ácido gálico em sua composição.

Figura 31. Cromatogramas das infusões de folhas de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (b). Coluna Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 5µm), 20 a 42% de B em 30 min (Solvente A: H₂O acidificada com 0,1% de TFA; Solvente B: ACN acidificada com 0,1% de TFA), 40°C, DAD (254 nm), vazão 1 mL min⁻¹.



4.3 Análise dos extratos por HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTrap-MS/MS e ESI-IT-MS/MS

Além dos experimentos envolvendo as análises por HPLC-DAD, também foi realizada a investigação da composição química das espécies vegetais empregando a técnica de HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS e ESI-IT-MS/MS.

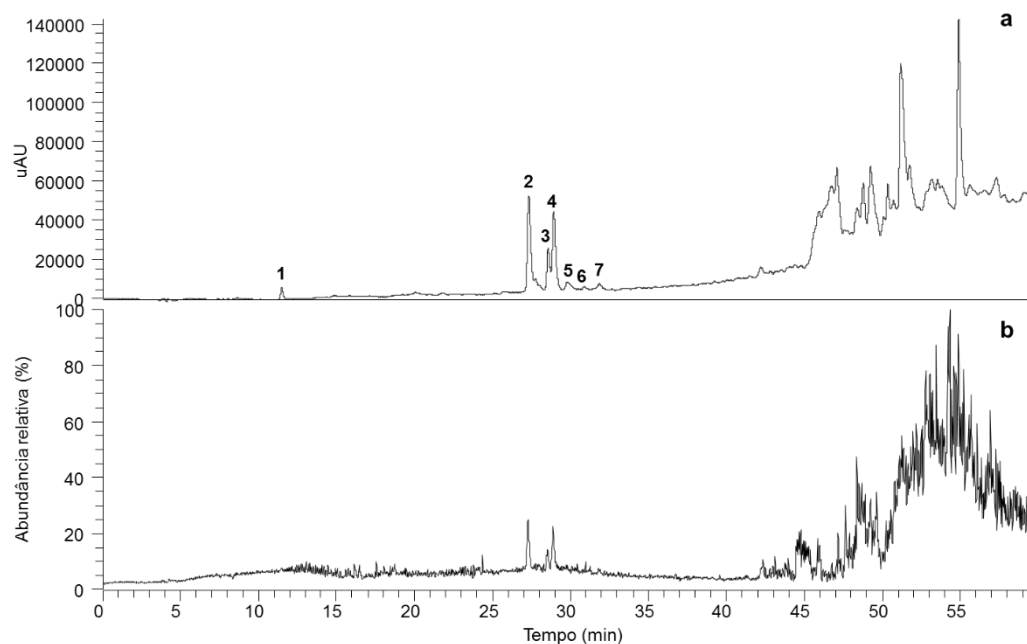
A fragmentação de moléculas obtida pela técnica de espectrometria de massas é bastante útil na elucidação estrutural de moléculas em matrizes complexas, como os extratos vegetais. Entretanto, devido à complexidade da matriz, uma etapa de purificação anterior à análise por espectrometria de massas pode ser requerida. Dessa forma, o acoplamento de um sistema de HPLC ao espectrômetro de massas auxilia ainda mais a determinação estrutural das moléculas nessas matrizes aumentando a seletividade da análise. Muitos trabalhos encontrados na literatura se beneficiam do acoplamento das técnicas HPLC-MS na determinação de compostos fenólicos em extrato vegetais, dentre os quais podemos citar Cuyckens e Claeys (2002), Chun et al. (2013) e Venuprasad et al. (2014).

O modo negativo de análise por espectrometria de massas foi escolhido tendo em vista o conhecimento prévio da composição flavonoídica destas espécies, verificada na Seção 4.1. Esta classe de metabólitos secundários ioniza facilmente pela desprotonação das hidroxilas fenólicas, sendo as moléculas desprotonadas dos flavonoides transferidas eficientemente para a fase gasosa como íons negativos (RODRIGUES, 2007).

4.3.1. HPLC-ESI-IT-MS/MS

Em um primeiro momento, o extrato hidroalcoólico de *P. torta* foi analisado por HPLC-ESI-IT-MS/MS (Figura 32).

Figura 32. Cromatogramas de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* avaliado em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Detector UV, $\lambda = 254$ nm (a) e cromatograma de íons totais ou TIC (b). Para condições cromatográficas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1).



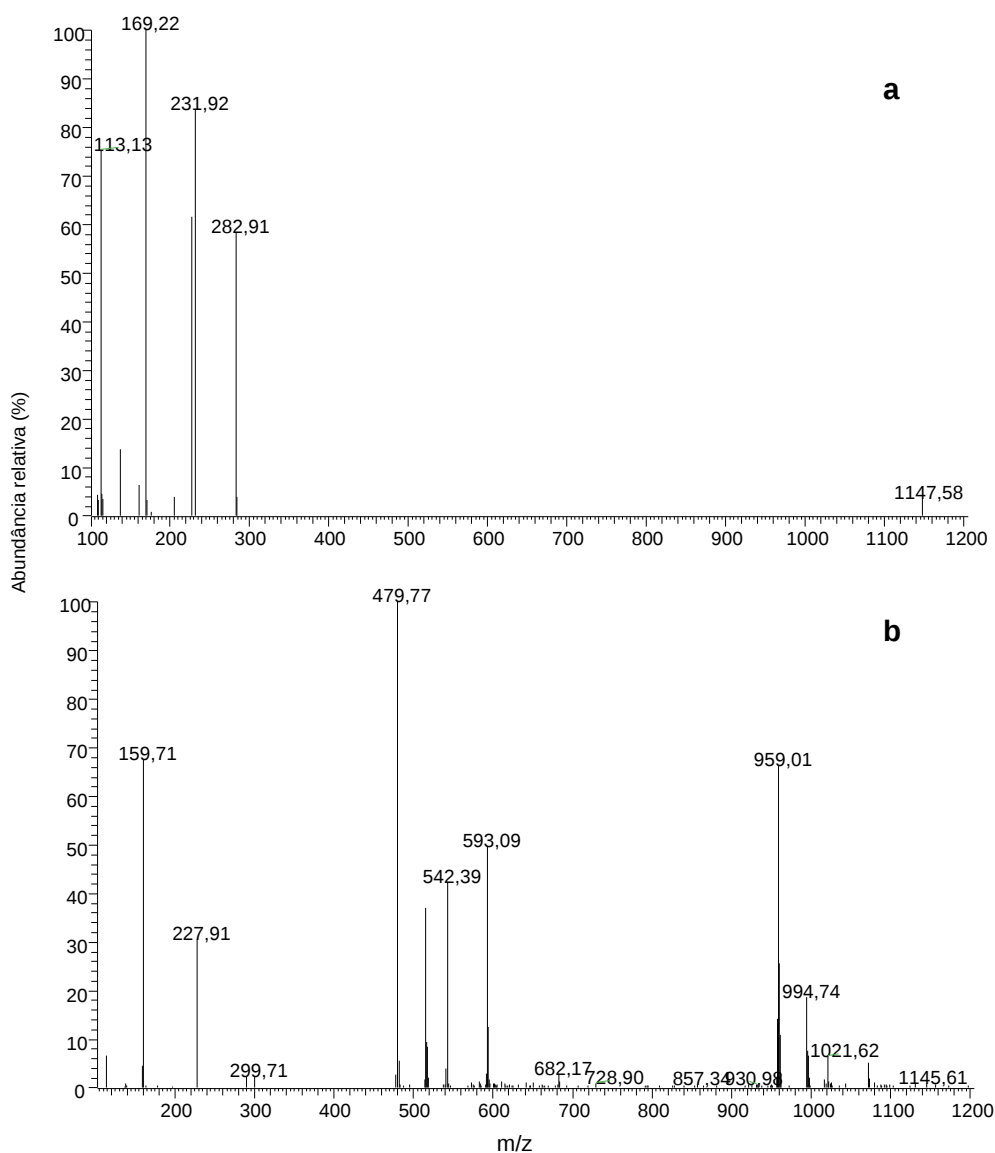
Os espectros de massa nos tempos de retenção correspondente aos picos indicados na Figura 32 podem ser observados na Figura 33 a 35.

Os íons de m/z 113, m/z 159 e m/z 227 são encontrados ao longo de toda a análise, sendo considerados íons de *background*. O íon de m/z 113 é atribuído a contaminação por ácido trifluoracético (TFA), sendo o de m/z 227 atribuído a esta substância dimerizada.

No pico **1**, observamos a presença do íon de m/z 169, que pode ser atribuído ao ácido gálico. Íons correspondentes a moléculas desprotonadas de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (m/z 479), miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (m/z 449) e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (m/z 463) foram encontrados nos picos **2**, **3** e **4**, respectivamente, da Figura 32.

O pico **2** apresentou ainda as moléculas desprotonadas com m/z 479, m/z 543, m/z 593 e m/z 959, podendo esta última ser resultado de dimerização na fonte de ionização do íon de m/z 479.

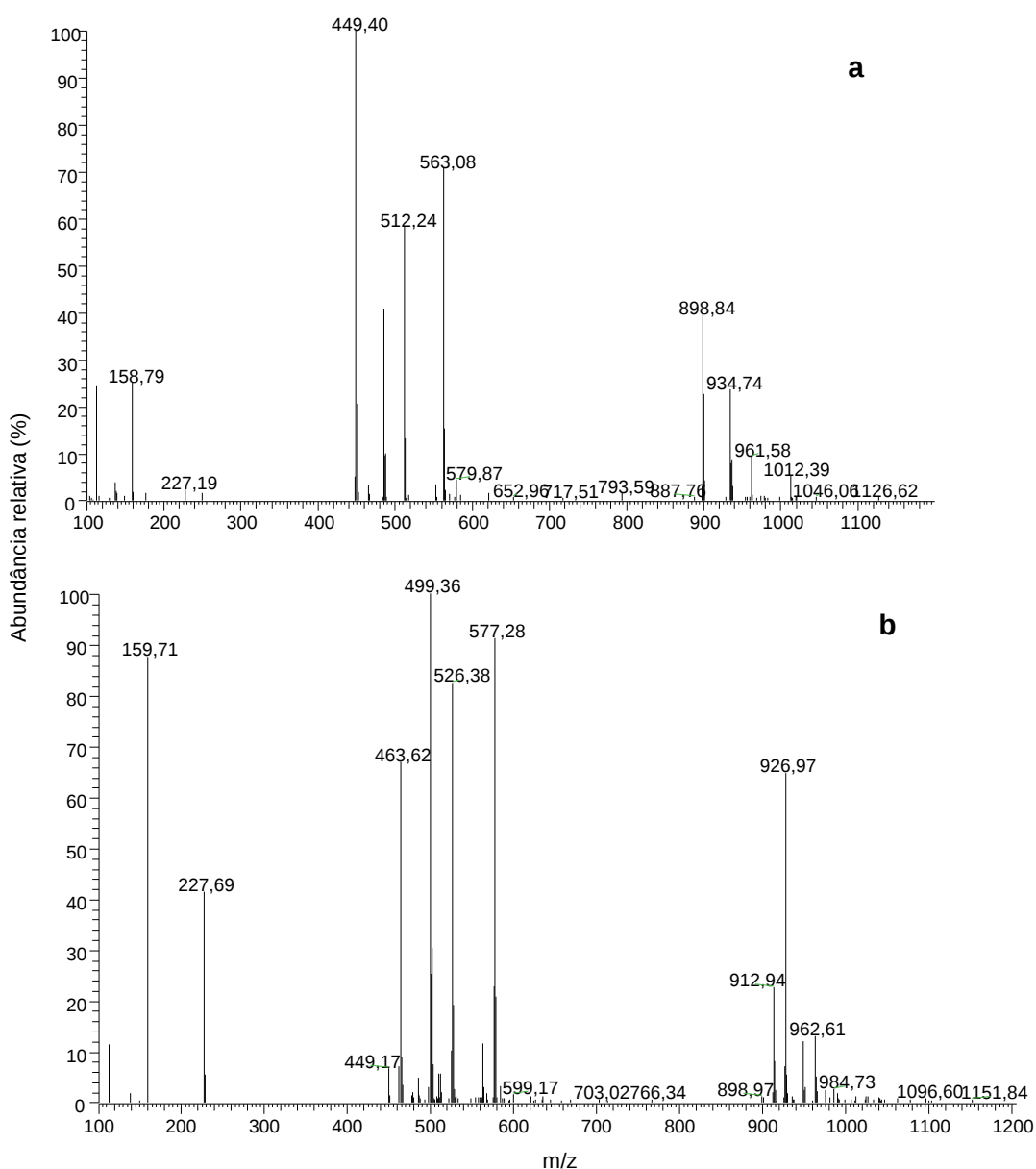
Figura 33. Espectros de massas dos picos obtidos pelo detector UV, em 254 nm, na análise de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Pico **1**, t_R = 11,47 min (**a**); pico **2**, t_R = 27,33 min (**b**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1).



O pico **3** apresentou os íons negativos com m/z 449, m/z 512, m/z 563 e m/z 899, podendo esta última ser resultado de dimerização na fonte de ionização do íon m/z 449.

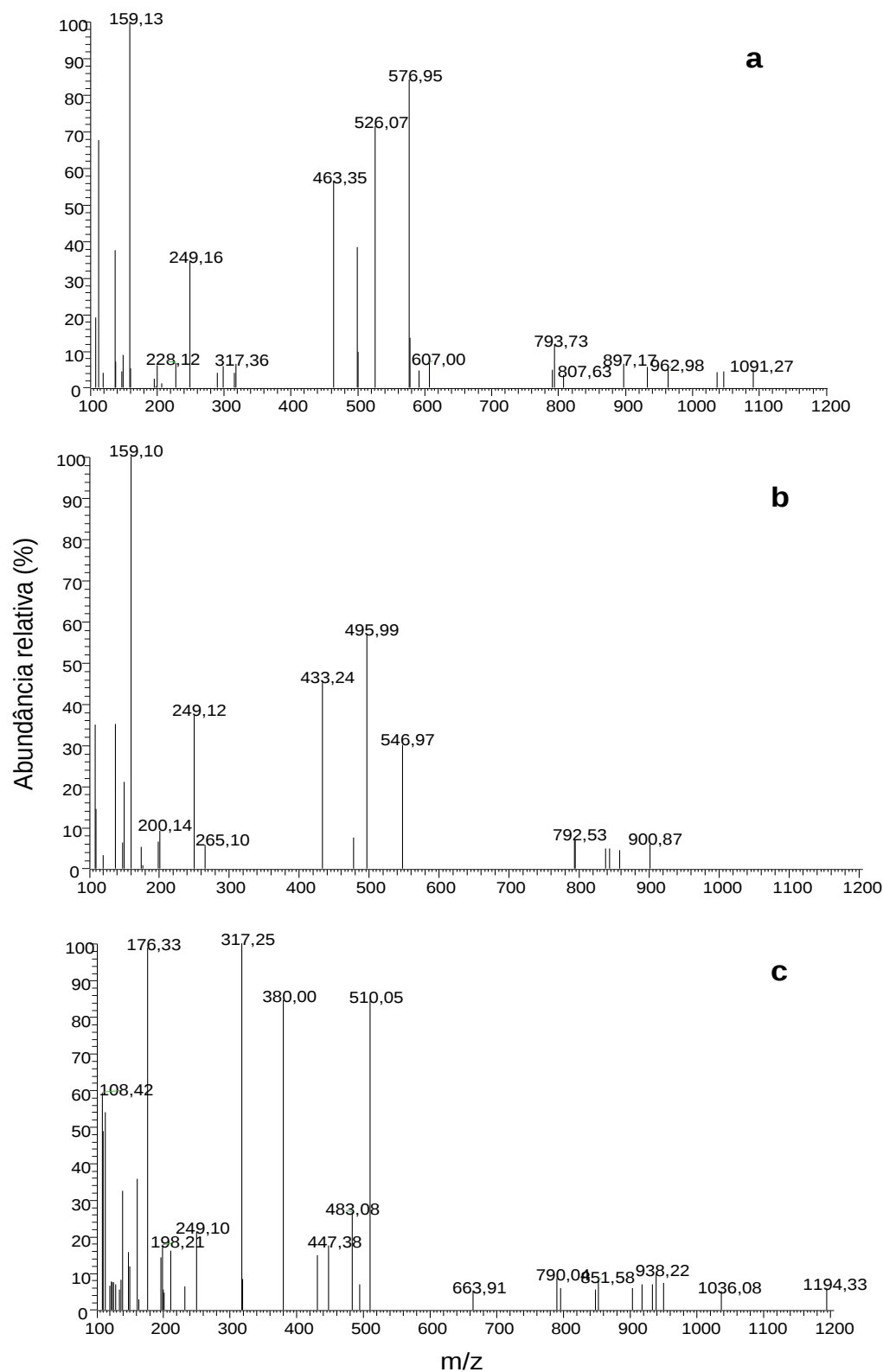
Os íons negativos com m/z 249, m/z 463, m/z 499, m/z 526, m/z 577 e m/z 926 foram encontrados no pico **4**, sendo o íon de m/z 926 possivelmente formado por dimerização na fonte do íon de m/z 463.

Figura 34. Espectros de massas dos picos obtidos pelo detector UV, em 254 nm, na análise de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Pico **3**, $t_R = 28,56$ min (**a**); pico **4**, $t_R = 28,91$ min (**b**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1).



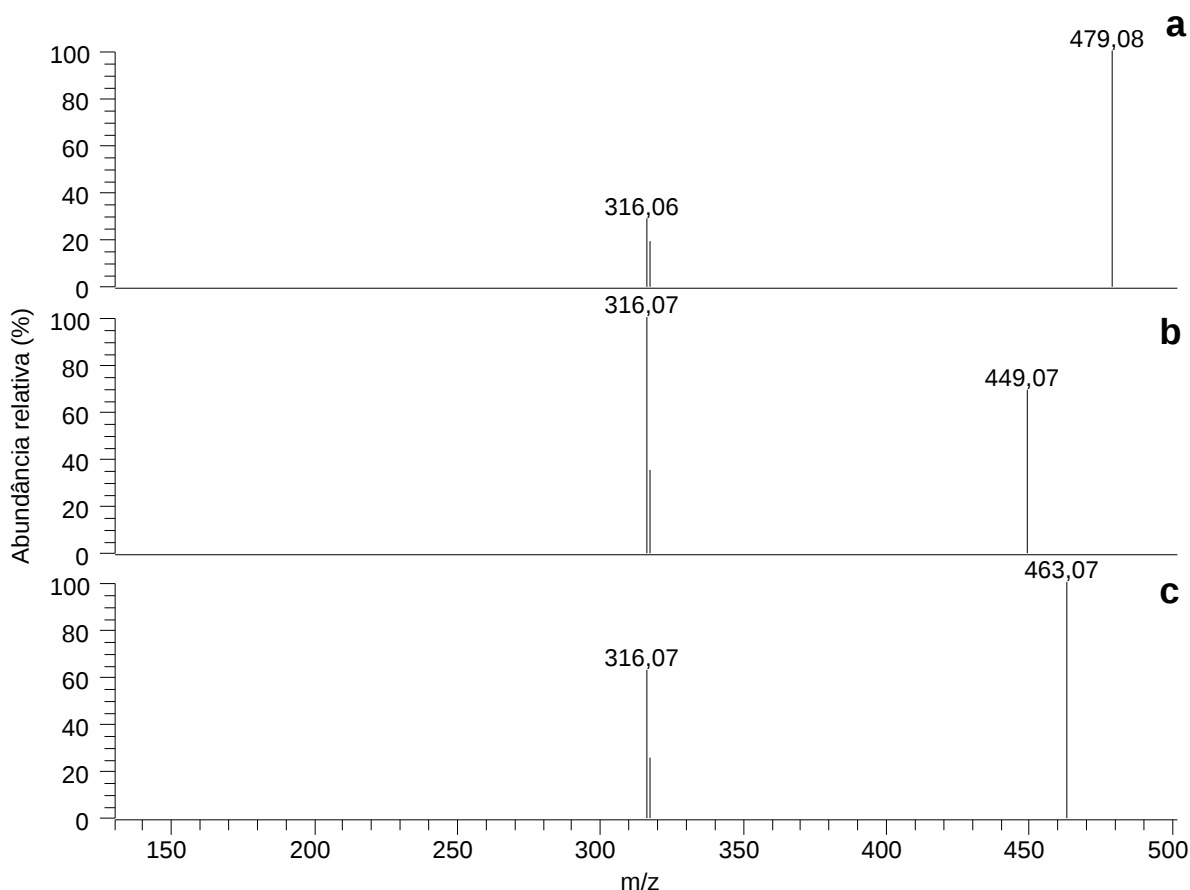
Foram encontrados no pico **5** os íons negativos com m/z 249, m/z 463, m/z 526 e m/z 577. No pico **6** os íons encontrados foram de m/z 249, m/z 433, m/z 496 e m/z 547. No pico **7** foram encontrados o íon de m/z 317, que pode ser atribuído à miricetina, além dos íons com m/z 176, m/z 380, m/z 447, m/z 483 e m/z 510.

Figura 35. Espectros de massas dos picos obtidos pelo detector UV, em 254 nm, na análise de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* em modo negativo por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Pico **5**, $t_R = 29,78$ min (**a**); pico **6**, $t_R = 30,86$ min (**b**); pico **7**, $t_R = 31,81$ min (**c**). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1).



Foram realizadas, ainda neste experimento, as fragmentações de segunda ordem dos íons atribuídos às miricetinas glicosiladas de *P. torta*, apresentadas nas Figuras 33 e 34.

Figura 36. Fragmentação de segunda ordem dos íons m/z 479 (a), m/z 449 (b) e m/z 463 (c). Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1).



Os dados espectrométricos obtidos para a fragmentação de segunda ordem (Figura 36) corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de coinjeção de padrões (Seção 4.1) para os flavonóis miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (m/z = 449), miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (m/z = 463) e miricetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (m/z = 479) nos extratos de *P. torta*.

Os flavonoides comumente ocorrem na forma glicosilada, quando um ou mais açúcares estão ligados ao seu núcleo flavonoídico. Essa ligação entre o açúcar e uma hidroxila (*O*-glicosídeos) ou diretamente ao núcleo benzênico por uma ligação carbono-carbono (*C*-glicosídeos). De acordo com Markham (1982), as ligações aos

açúcares podem ocorrer nas posições 3 e 7 em flavonóis *O*-glicosilados, enquanto que as ligações em flavonoides *C*-glicosilados sempre ocorrem nas posições 6 e 8.

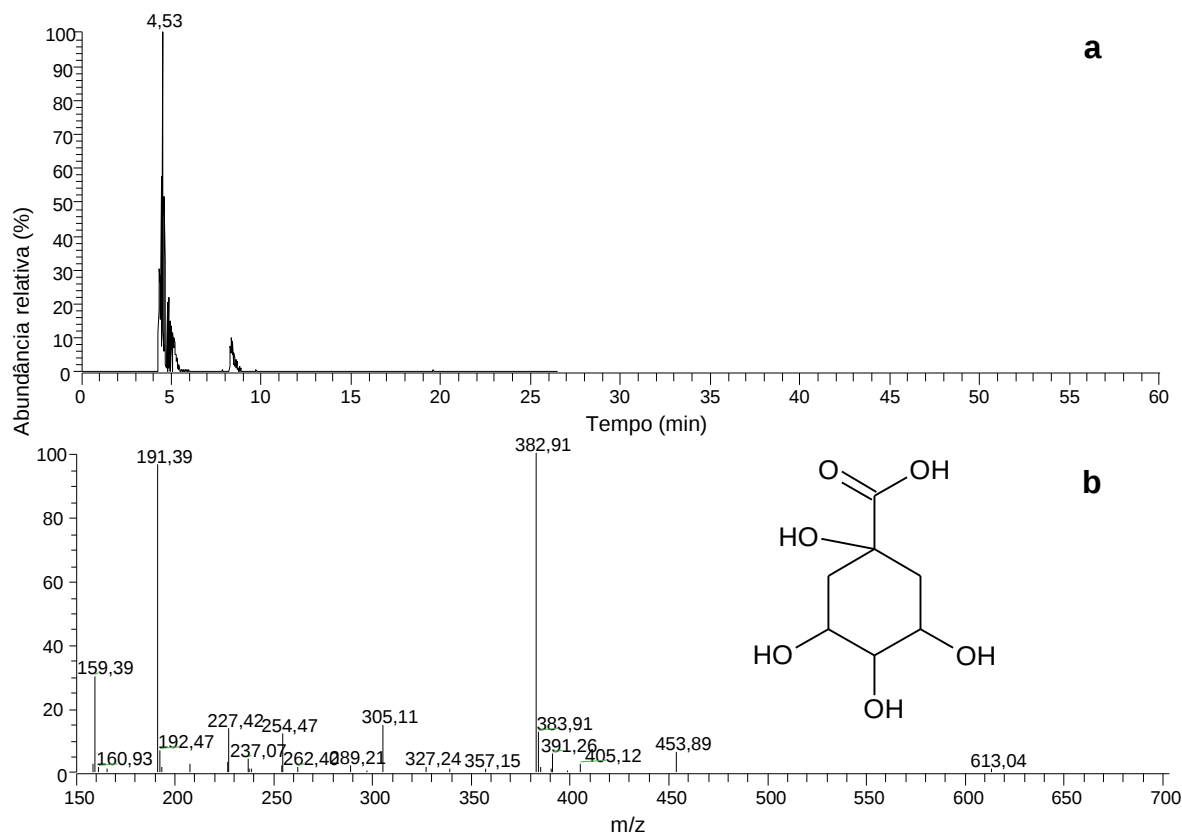
Na análise por espectrometria de massas de flavonoides glicosilados, a ligação do açúcar a um oxigênio de hidroxila ligada ao anel A ou C pode ser facilmente observada pela perda do resíduo do açúcar, como pode ser visto no espectro de massas de segunda ordem das miricetinas-*O*-glicosiladas apresentados na Figura 36. Para miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (m/z 449), foi verificada uma perda de 132 Da, equivalente a uma pentose, originando o íon da aglicona desprotonada $[M - H - 132]^-$ com m/z 317. Para miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (m/z 463), foi verificada uma perda de 146 Da, equivalente a uma deoxiexose, originando o íon da aglicona desprotonada $[M - H - 146]^-$ com m/z 317. E para miricetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (m/z 479), foi verificada uma perda de 162 Da, equivalente a uma hexose, originando o íon da aglicona desprotonada $[M - H - 162]^-$ com m/z 317.

Os espectros obtidos para as miricetinas-*O*-glicosiladas revelam a presença de um íon radicalar $[M - H]^\bullet$, com m/z 316, além dos íons $[M - H]^-$, com m/z 317, correspondentes às agliconas desprotonadas. A presença desses íons radicalares é explicada pela cisão homolítica da ligação glicosídica (CUYCKENS e CLAEYS, 2004). De acordo com os autores, a relação íon radicalar/íon alta sugere que a glicosilação se dá na hidroxila do carbono 3 em flavonóis.

Outro dado importante pôde ser observado nessa análise, que é a presença do íon de m/z 191 no extrato de *P. torta*, que pode ser atribuído ao ácido quínico. Esta informação pode ser confirmada pelo cromatograma do íon extraído para m/z 191 e o espectro de massas em 4,53 min, apresentados na Figura 37.

Cromatogramas de íons extraídos são criados pelo registro da intensidade do sinal observado para um determinado valor de m/z nos espectros de massas gravados em função do tempo de retenção.

Figura 37. Cromatograma do íon extraído para m/z 191 de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. torta* (a) e espectro de massas em 4,53 min (b) Dados obtidos por HPLC-ESI-IT-MS/MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.1).



Além do íon de m/z 191, atribuído ao ácido quínico, podemos observar também na Figura 37b a presença do íon de m/z 382, resultado da dimerização na fonte de ionização do íon m/z 191.

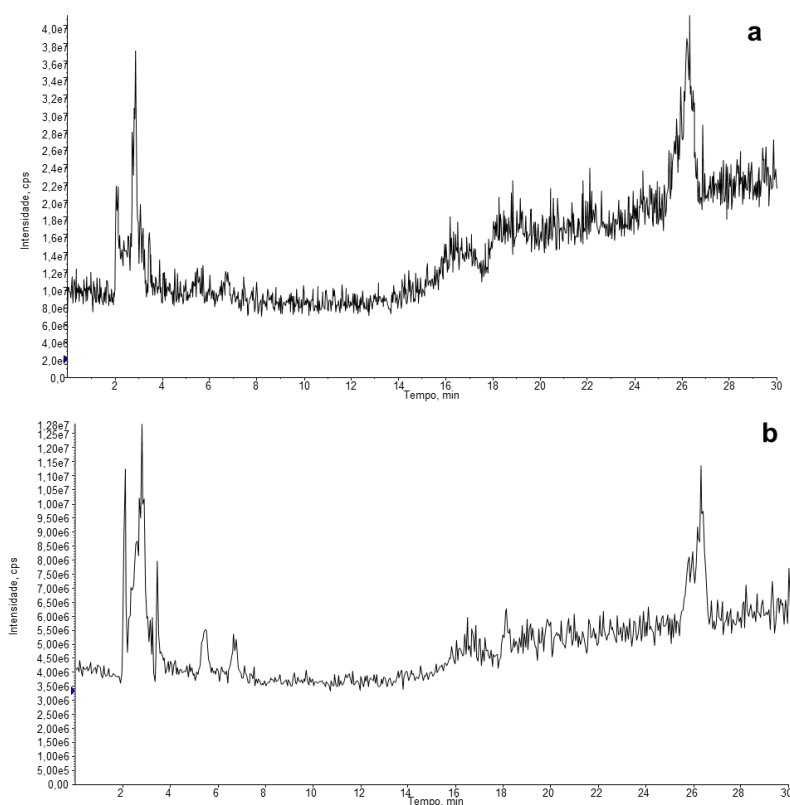
O estudo mais detalhado de alguns dos íons que se encontravam coeluído com as miricetinas glicosiladas (Figuras 33 a 35) no experimento de HPLC-ESI-IT-MS/MS será apresentado na seção 4.3.3. A análise da fragmentação sequencial desses íons por ESI-IT-MS/MS permite sugerir algumas propostas estruturais (Tabela 4) para os íons encontrados em ambos os extratos estudados.

4.3.2 HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS

Os extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* foram então submetidos à análise por HPLC-ESI-QTRAP-MS/MS, onde o método cromatográfico utilizou um gradiente de 20-42% de ACN:H₂O em 30 minutos, mesmo método utilizado para a padronização dos extratos. Devido à baixa concentração das amostras (5 ppm), não foi obtido cromatograma no detector UV para estes ensaios.

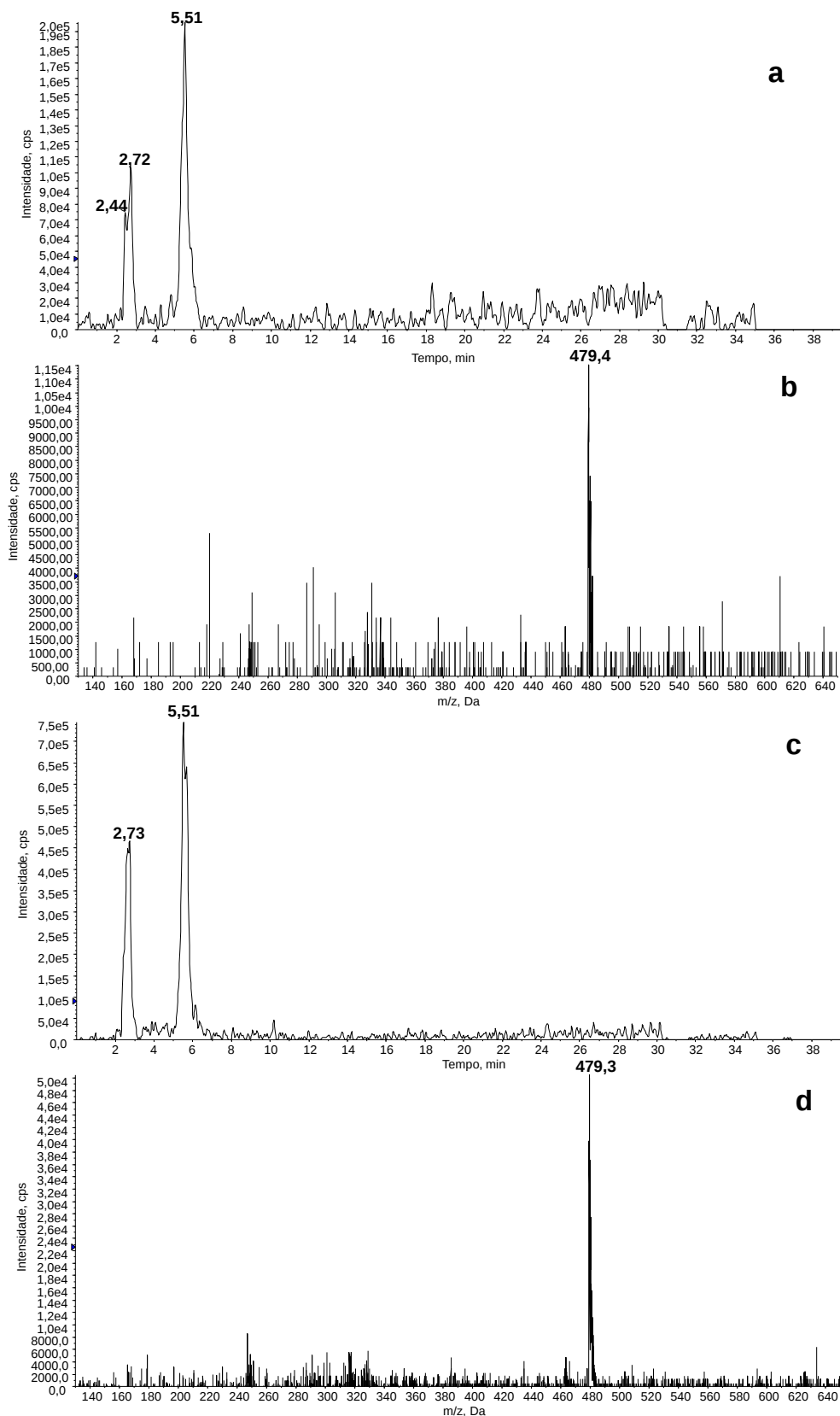
A Figura 38 apresenta os cromatogramas de íons totais para os dois extratos das espécies estudadas.

Figura 38. Cromatogramas de íons totais de extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (b) obtidos por HPLC-ESI-QTrap-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).



A presença das miricetinas-*O*-glicosiladas para os extratos de ambas espécies estudadas foi confirmada pelos cromatogramas de íons extraídos. Para cada banda atribuída às miricetinas-*O*-glicosiladas, cujos tempos de retenção foram próximos aos obtidos para estas substâncias por HPLC-DAD, utilizando mesmo gradiente de eluição (Seção 4.1), foram registrados os espectros de massas (Figuras 39, 40, 41 e 42).

Figura 39. Cromatogramas dos íons extraídos de m/z 479 de extratos de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (c); espectros de massas para os tempos de retenção 5,52 min para *P. torta* (b) e em 5,53 para *P. ramiflora* (c). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTRAP-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).



A Figura 39a, apresenta duas bandas com t_R diferentes (2.74 min e 5.53 min), Análise dos espectros de massas (*full scan*) das substâncias pertencentes a cada t_R evidenciou que a miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo com m/z 479 encontra-se majoritariamente no t_R 5.53 min. Análise do espectro de massas da banda em t_R 2.74 min evidenciou o íon com m/z 479 com intensidade menor que 1% (espectro não apresentado). Os espectros de massa de segunda ordem para o íon m/z 479 nos dois tempos de retenção e para as duas espécies apresentou o mesmo padrão de fragmentação (Figura 40).

Como pode ser observado nas Figuras 39, 41 e 42, para ambos os extratos, em t_R próximo a 2,8 min ocorre a eluição de uma pequena fração das miricetinas glicosiladas. As fragmentações de segunda ordem (aqui exemplificadas para o íon m/z 479 de *P. ramiflora*, Figura 40) demonstraram que as substâncias apresentam o mesmo padrão de fragmentação em ambos t_R .

Quanto à miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, observa-se que a em *P. torta* a coeluição com o íon m/z 209, enquanto em *P. ramiflora*, observamos a ocorrência dos íons de m/z 463 e m/z 610 coeluído no tempo de retenção onde a concentração de íons de m/z 449 é máxima nesse extrato.

Os espectros de segunda ordem para os íons m/z 209 e m/z 610 não puderam ser obtidos para que suas estruturas fossem propostas.

Com relação à miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, observa-se também boa separação nos tempos de retenção em ambos os extratos para o gradiente de eluição adotado (Figura 42) .

Vale ressaltar que a ordem de eluição das substâncias neste experimento obedece àquela observada nos ensaios por HPLC-DAD, para os extratos da duas espécies estudadas.

Figura 40. Espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 479 de extrato hidroalcoólico de *Pouteria ramiflora* em $t_R = 2,74$ min (a) e $t_R = 5,53$ min (b). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTrap-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).

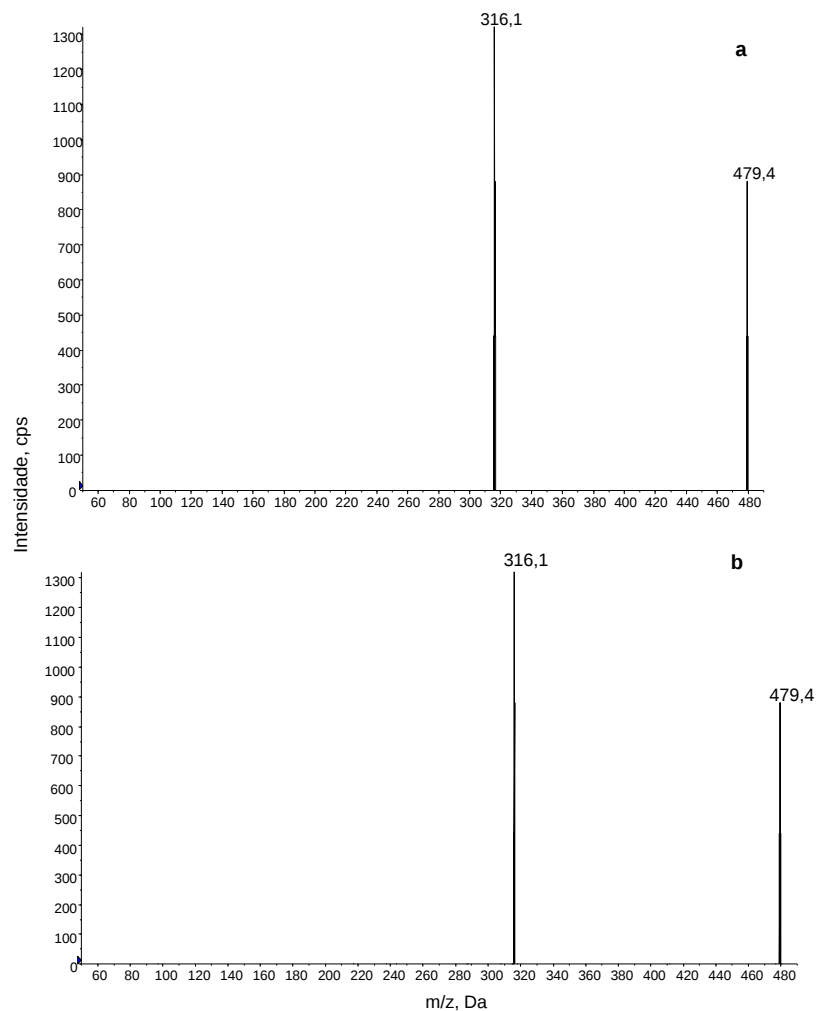


Figura 41. Cromatogramas dos íons extraídos de m/z 449 de extratos de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (c); espectros de massas para os tempos de retenção 6,74 min para *P. torta* (b) e em 6,74 para *P. ramiflora* (c). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTRAP-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).

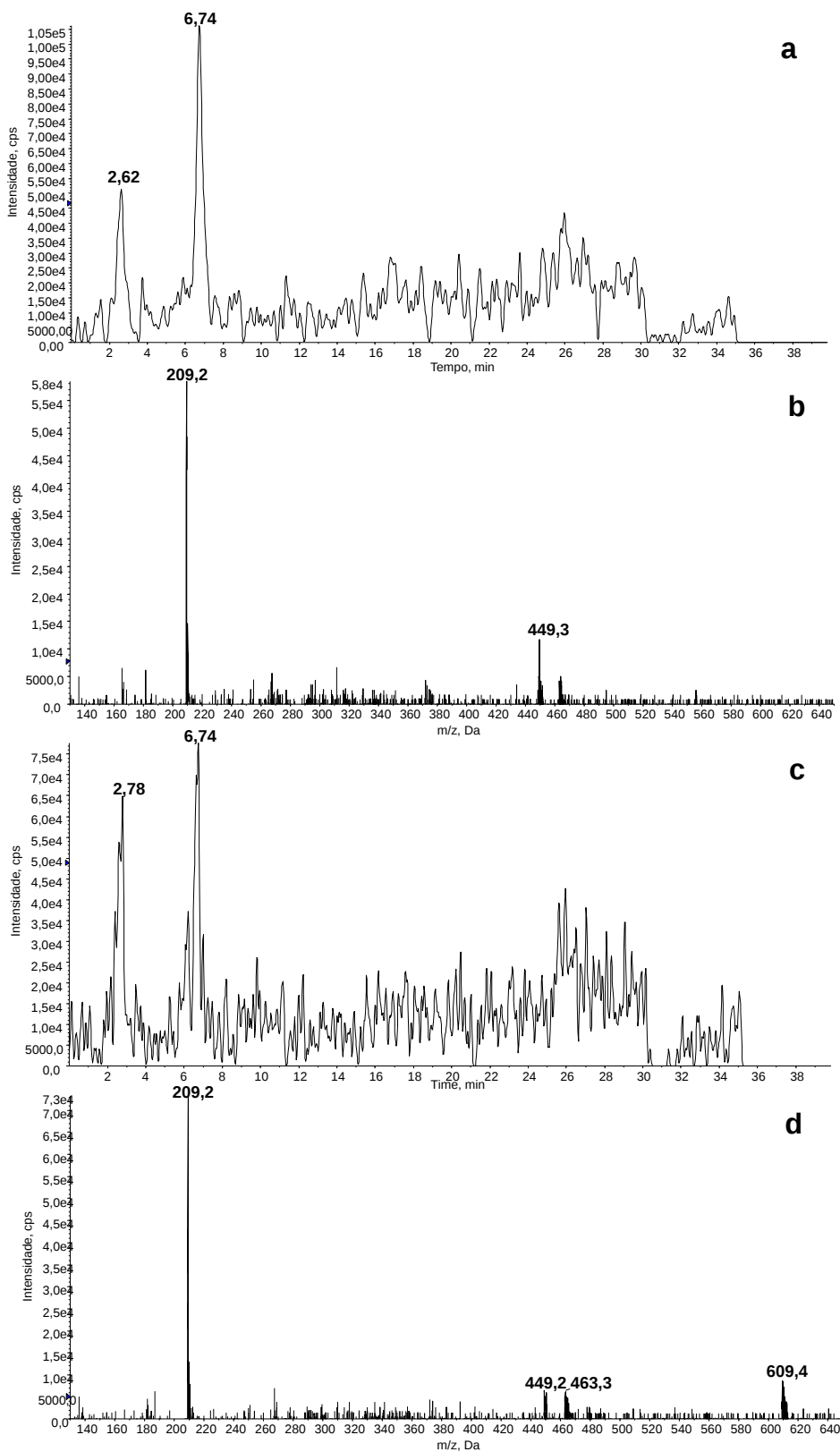
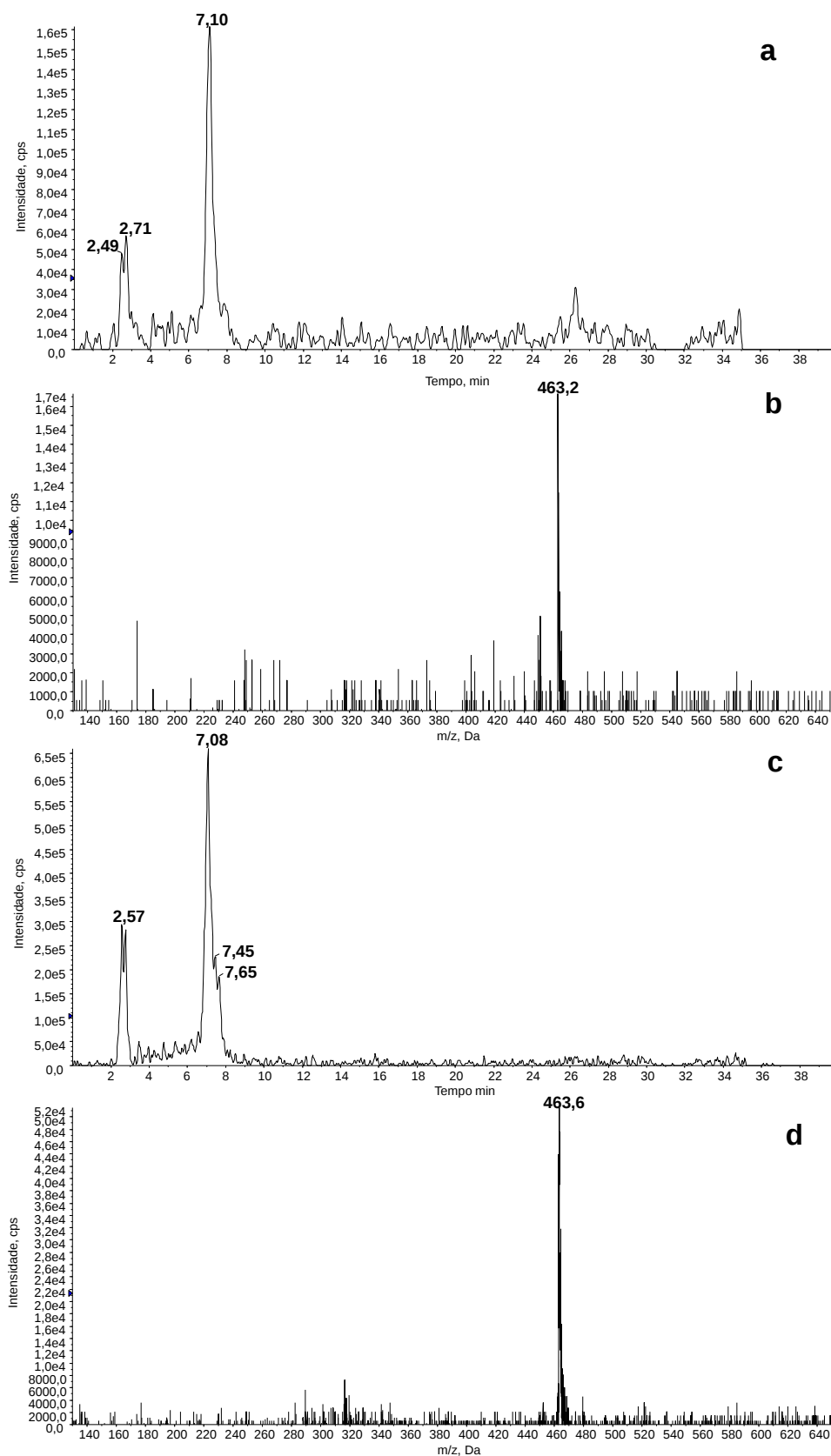


Figura 42. Cromatogramas dos íons extraídos de m/z 463 de extratos de *P. torta* (a) e *P. ramiflora* (c); espectros de massas para os tempos de retenção 6,73 min para *P. torta* (b) e em 6,77 para *P. ramiflora* (c). Dados obtidos por HPLC-ESI-QTrap-MS em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.2).



4.3.3 ESI-IT-MS/MS

A fragmentação de segunda ordem por ESI-IT-MS/MS de alguns íons encontrados nas análises anteriores possibilitou a identificação de alguns metabólitos secundários em ambas as espécies estudadas.

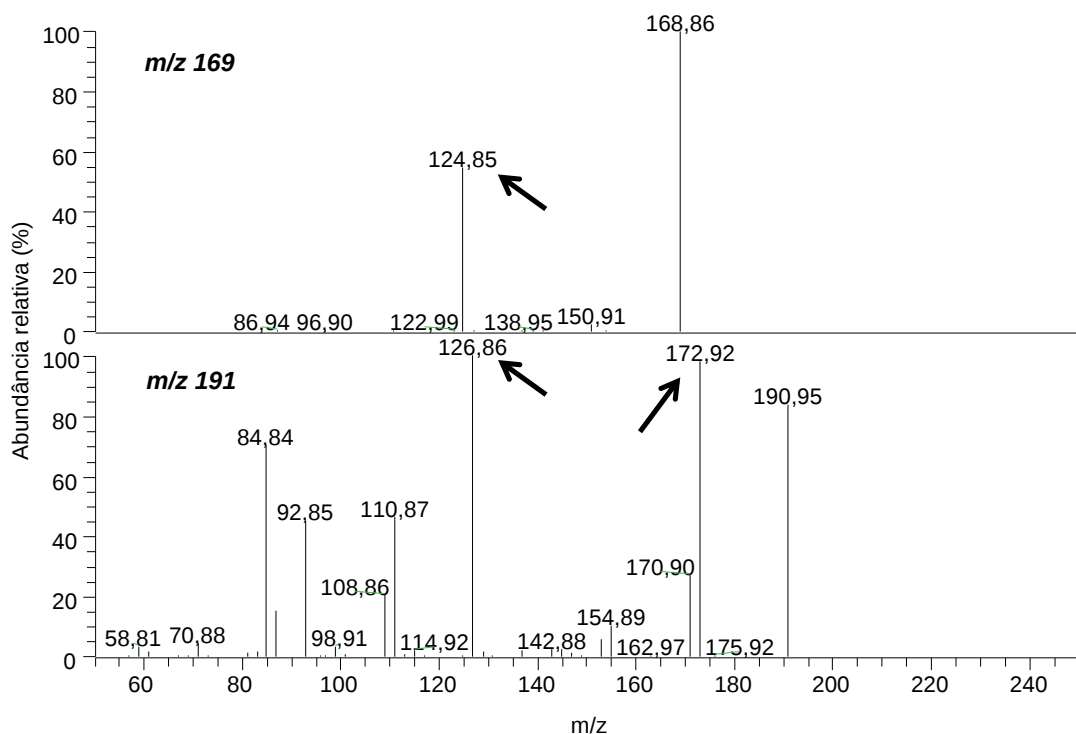
A Tabela 4 sumariza as substâncias encontradas nas análises por espectrometria de massas nos extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*.

Tabela 4. Substâncias encontradas em extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* em análises por HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTrap-MS e fragmentadas sequencialmente por ESI-IT-MS/MS.

Substância	Identificação parcial	[M – H] ⁻	Principais fragmentos
I	Ácido gálico	169	125 [M – H – 44] ⁻
II	Ácido quínico	191	173 [M – H – 18] ⁻ , 127 [M – H – 44 – 36] ⁻
III	Apigenina-C-hexosil	431	413 [M – H – 18] ⁻ , 341 [M – H – 90] ⁻
IV	Quercetina-O-pentosídeo	433	301 [M – H – 132] ⁻ , 300 [M – H – 132] ⁻ *
V	Quercetina-O-deoxiexosídeo	447	301 [M – H – 146] ⁻ , 300 [M – H – 146] ⁻ *
VI	Miricetina-O-pentosídeo	449	317 [M – H – 132] ⁻ , 316 [M – H – 132] ⁻ *
VII	Quercetina-O-hexosídeo	463	301 [M – H – 162] ⁻ , 300 [M – H – 162] ⁻ *
VIII	Miricetina-O-deoxiexosídeo	463	317 [M – H – 146] ⁻ , 316 [M – H – 146] ⁻ *
IX	Miricetina-O-hexosídeo	479	317 [M – H – 162] ⁻ , 316 [M – H – 162] ⁻ *
X	Apigenina-C-pentosil-C-deoxiexosídeo	547	529 [M – H – 18] ⁻ , 487 [M – H – 60] ⁻ , 473 [M – H – 74] ⁻ , 457 [M – H – 90] ⁻
XI	Apigenina-C-hexosil-C-pentosídeo	563	545 [M – H – 18] ⁻ , 503 [M – H – 60] ⁻ , 443 [M – H – 90] ⁻
XII	Apigenina-C-hexosil-C-deoxiexosídeo	577	559 [M – H – 18] ⁻ , 487 [M – H – 90] ⁻ , 473 [M – H – 104] ⁻ , 457 [M – H – 120] ⁻
XIII	Apigenina-di-C-hexosil	593	575 [M – H – 18] ⁻ , 503 [M – H – 90] ⁻ , 473 [M – H – 120] ⁻

As Figuras 43, 44 e 47 mostram os espectros de massas de segunda ordem obtidos somente do extrato de *P. ramiflora*, uma vez que as fragmentações foram muito semelhantes para os dois extratos.

Figura 43. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 169 e 191 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo (20 V) do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. ramiflora*. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).



Para a substância I, a estrutura proposta é a do ácido gálico, em concordância com a coinjeção de padrão realizada na etapa anterior do trabalho (Seção 4.1). Neste caso, o fragmento $[M - H - CO_2]^-$, com m/z 125, é amplamente observado na literatura para o ácido gálico em análises envolvendo ESI em modo negativo (CHANDRASEKARA e SHAHIDI, 2011; SWATSITANG et al., 2000; FANG et al., 2002; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003).

A substância II apresenta m/z 191, indicando a presença de ácido quínico nos extratos. A presença do fragmento $[M - H - CO_2 - 2H_2O]^-$, com m/z 127, e do fragmento $[M - H - H_2O]^-$, com m/z 173 é característica desse ácido (HAN et al., 2007; NUENGCHAMNONG et al., 2009; RODRÍGUEZ-MEDINA, 2009).

Os ensaios de coinjeção, em conjunto com os dados obtidos por espectrometria de massas, confirmam a presença de miricetina-3-O- β -D-

galactopiranosídeo, miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo, miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo nos extratos. Além dessas substâncias, pudemos observar pelas análises por espectrometria de massas a presença de algumas quercetinas-O-glicosiladas e de apigeninas-C-glicosiladas.

A Figura 44 traz os espectros de massa de segunda ordem dos flavonóis-O-glicosilados encontrados nos extratos das espécies estudadas.

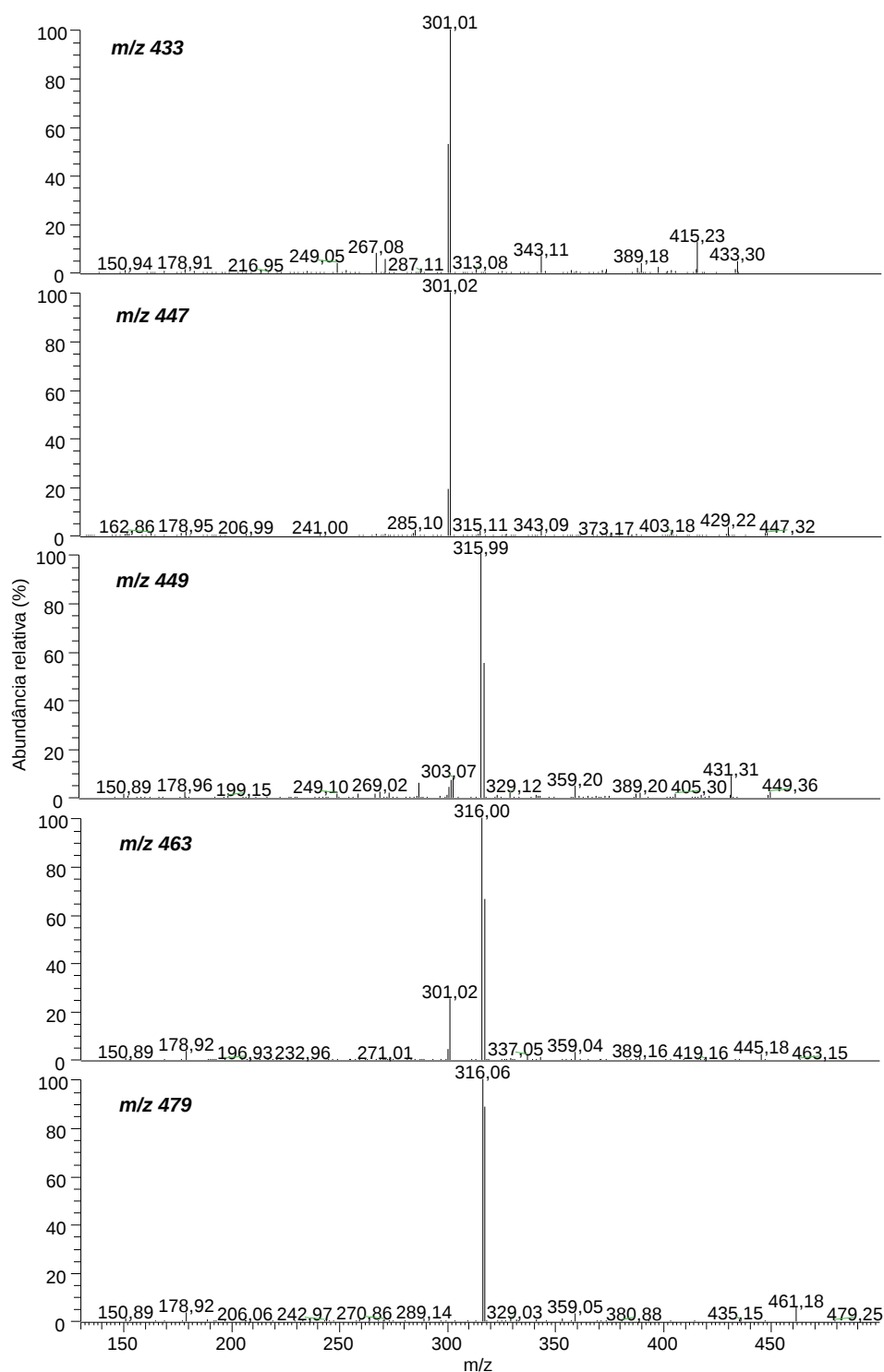
Além das miricetinas-O-glicosiladas já discutidas anteriormente, foram encontradas quercetinas-O-glicosiladas.

A substância **IV**, com m/z 433, foi parcialmente identificada como uma quercetina-O-pentosídeo, uma vez que se observa em seu espectro de massas de segunda ordem o íon $[M - H - 132]^+$, com m/z 301 (SCHIEBER, BERARDINI E CARLI, 2003).

A substância **V** foi parcialmente identificada como uma quercetina-O-deoxiexosídeo, com m/z 447. Observa-se em seu espectro de massas de segunda ordem o íon $[M - H - 146]^+$, com m/z 301 (RODRIGUES et al., 2008; SCHIEBER, BERARDINI E CARLI, 2003).

A substância **VII** foi identificada como quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo devido aos ensaios de coinjeção com esta substância padrão. Nestes ensaios, observa-se a eluição do pico referente a esta substância logo após a eluição da miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, que possui a mesma m/z , de 463. Devido ao fato de ambas as substâncias estarem presentes nos extratos, observam-se no espectro de massas de segunda ordem do íon m/z 463 o íon com m/z 317, referente à perda de uma rhamnose (146 Da) da molécula da miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (RODRIGUES et al., 2008), bem como o íon com m/z 301, resultado da perda de uma galactose da molécula de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (SCHIEBER, BERARDINI E CARLI, 2003).

Figura 44. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 433, 447, 449, 463 e 479 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo (20 V) do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. ramiflora*. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).

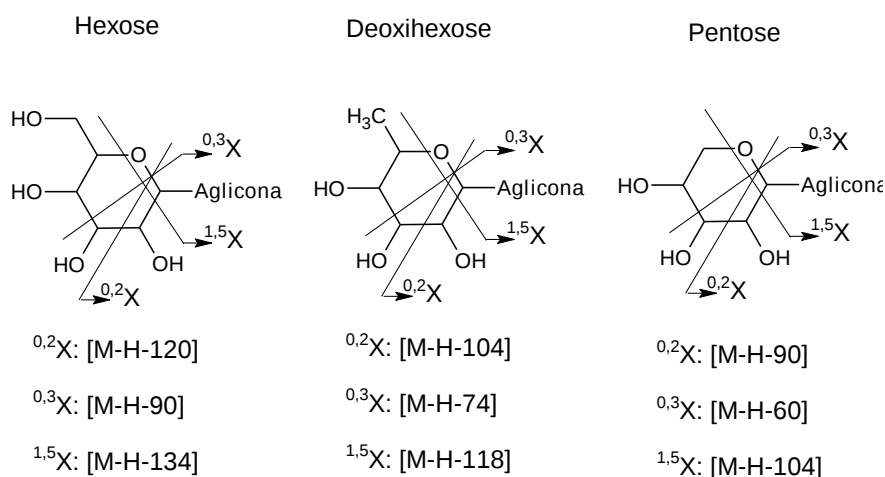


Outro dado em concordância com a literatura é que, nas quercetinas-O-glicosiladas a relação íon radicalar/íon da quercetina é inferior à observada para a miricetina. Segundo Hvattum e Ekeberg (2003), o aumento de hidroxilas no anel B

faz com que essa relação seja maior, o que pode ser comprovado quando se compara a abundância relativa dos íons radicalares $[M - H]^{-\bullet}$ das miricetinas e das quercetinas glicosiladas apresentadas na Figura 44.

Em flavonoides C-glicosilados, o açúcar está ligado diretamente a um carbono do núcleo flavonoídico na posição 6 ou 8. Nesse caso, a ligação entre o açúcar e o flavonóide é mais forte do que em O-glicosilados, sendo necessárias maiores energias de colisão para rompê-las. Ainda, a fragmentação ocorre no anel do açúcar, onde as ligações são mais fracas, como pode ser observado na Figura 45, adaptado de Cuyckens e Claeys (2004).

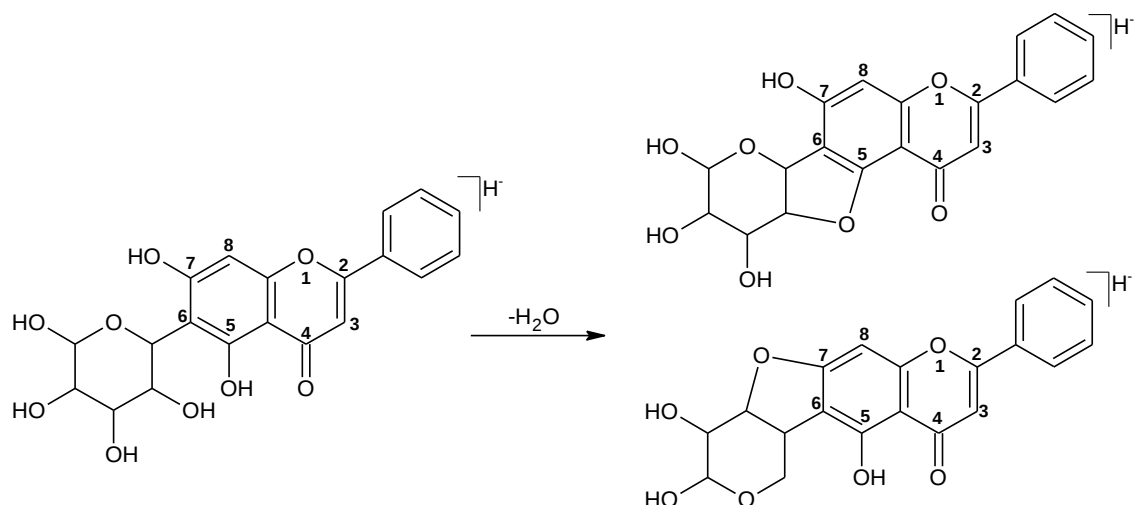
Figura 45. Íons produto característicos de clivagens de moléculas de açúcares em flavonoides C-glicosilados.



Fonte: Adaptado de Cuyckens e Claeys.

Outra informação importante é que a via de fragmentação de C-glicosilados prevê também a perda de moléculas de água. Essa perda da molécula de água é mais pronunciada em flavonoides 6-C-glicosilados, pois como pode ser visto na Figura 46, estes podem eliminar água por ligações de hidrogênio da hidroxila 2'' do açúcar com a hidroxila da posição 5 ou 7 do anel A, enquanto em 8-C-glicosilados essa eliminação se dá somente com a hidroxila da posição 7 do anel A (LI et al., 1992).

Figura 46. Perda de água observada em flavonoides 6-C-glicosilados (LI et al., 1992).

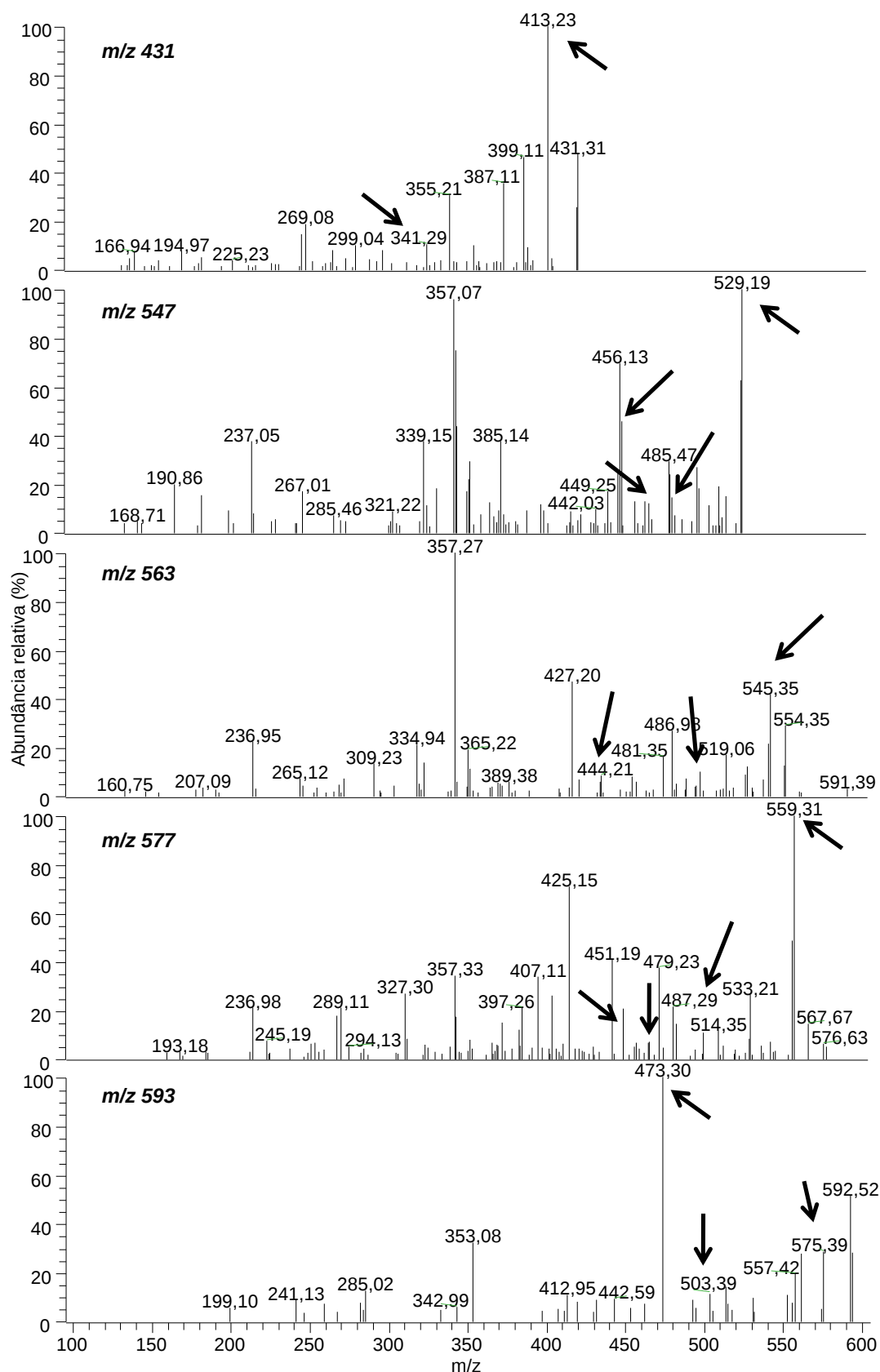


A Figura 47 mostra os espectros de massas de segunda ordem das apigeninas-C-glicosiladas detectadas nos extratos pelas análises anteriores.

A substância **III**, apresenta o íon da molécula desprotonada com perda de água $[M - H - 18]^-$ evidenciado em m/z 413. Outro fragmento característicos de flavonoides C-glicosilados foi identificado como a perda do fragmento $^{0,3}X$ em m/z 341 $[M - H - 90]^-$. A abundância relativa alta para o íon $[M - H - H_2O]^-$ (m/z 413) pode ser um indicativo de que a hexose esteja ligada na posição 6. Os fragmentos apresentados foram encontrados na literatura para isovitexina (apigenina-6-C-glucosil) (FERRERES et al., 2003; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003).

A perdas de 60 Da (m/z 487) e 90 Da (m/z 457) observados para a substância **X** (m/z 547), indicam a presença de uma pentose, enquanto a perda de 74 Da (m/z 473) indica a presença de uma deoxiexose ligadas a uma apigenina por ligações C-glicosiladas. A substância também apresenta o íon da molécula desprotonada com perda de água $[M - H - 18]^-$ evidenciado em m/z 529.

Figura 47. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 431, 547, 563, 577 e 593 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo (20 V) do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. ramiflora*. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).



Segundo a literatura, pode-se reconhecer o açúcar substituinte ligado na posição 6 da aglicona, porque este origina íons com perda dos fragmentos $^{0,2}X$, $^{0,3}X$ e $^{1,5}X$ mais intensos (BECCHI e FRAISSE, 1989; LI et al., 1991). Uma vez que o fragmento em m/z 457, gerado pela perda de 90 Da e correspondente ao fragmento $^{0,2}X$ da pentose, foi o mais intenso, podemos inferir que essa substância seja uma apigenina-6-C-pentosil-8-C-deoxiexosídeo (RIGHI, NEGRI e SALATINO, 2013).

Para a substância **XI** são observados os íons da molécula desprotonada em m/z 563 $[M - H]^-$ e a perda de água em m/z 545 $[M - H - 18]^-$. O espectro de MS/MS evidenciou também que esta substância possui uma pentose devido à perda de 60 Da ($^{0,3}X$), gerando o íon fragmento em m/z 503, atribuída à perda em uma pentose. O íon fragmento em m/z 443 pode ser atribuído à perda do fragmento $^{0,2}X$ de uma hexose (Figura 45). Os dados indicam a presença de apigenina-6-C-pentosil-8-C-hexosídeo ou apigenina-6-C-hexosil-8-C-pentosídeo (FERRERES et al., 2003).

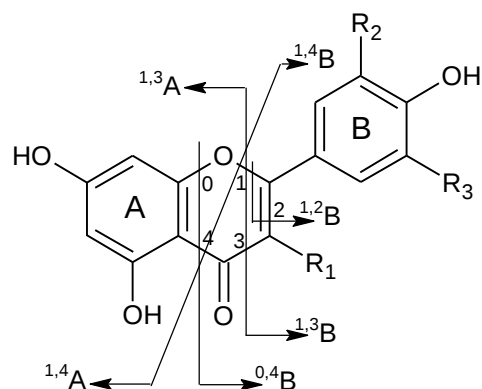
Para o íon da molécula desprotonada em m/z 577 foram observadas fragmentações características da presença de rhamnose e de hexose. A presença da rhamnose foi atribuída devido ao fragmento em m/z 473 $[M - H - 104]^-$ e a presença da hexose foi observada devido aos fragmentos em m/z 487 $[M - H - 90]^-$ e em m/z 457 $[M - 120]^-$. A maior intensidade dos picos referentes a perdas em uma hexose indica que a molécula atribuída à substância **XII** possui a estrutura de uma apigenina-6-C-hexosil-8-C-deoxiexosídeo (GOUVEIA E CASTILHO, 2013).

Finalmente, o espectro de MS/MS (Figura 47) forneceu o fragmento em m/z 575, atribuído à molécula desprotonada com perda de água $[M - H - 18]^-$. Também foram observadas perdas de 90 e 120 Da, levando aos íons de m/z 503 e m/z 473, confirmando, portanto, que a substância **XIII** possui duas hexoses. Portanto esta substância foi identificada como sendo a apigenina-6,8-di-C-hexosil (FERRERES et al., 2003).

Estudamos também as fragmentações de segunda ordem dos íons atribuídos às agliconas dos flavonoides apresentados anteriormente.

As Figuras 48 a 50 apresentam as possíveis vias de clivagem que podem ser observados nas agliconas de flavonóis e flavonas por mecanismos de retrociclização de acordo com Fabre et al. (2001) por ESI-IT-MS/MS em modo negativo.

Figura 48. Diferentes tipos de clivagens por retrociclicização para os flavonoides estudados e a nomenclatura adotada por Fabre et al. (2001).



Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃
Apigenina	H	H	H
Quercetina	OH	OH	H
Miricetina	OH	OH	OH

Figura 49. Fragmentação proposta para a molécula desprotonada de uma flavona, a luteolina (FABRE et al., 2001).

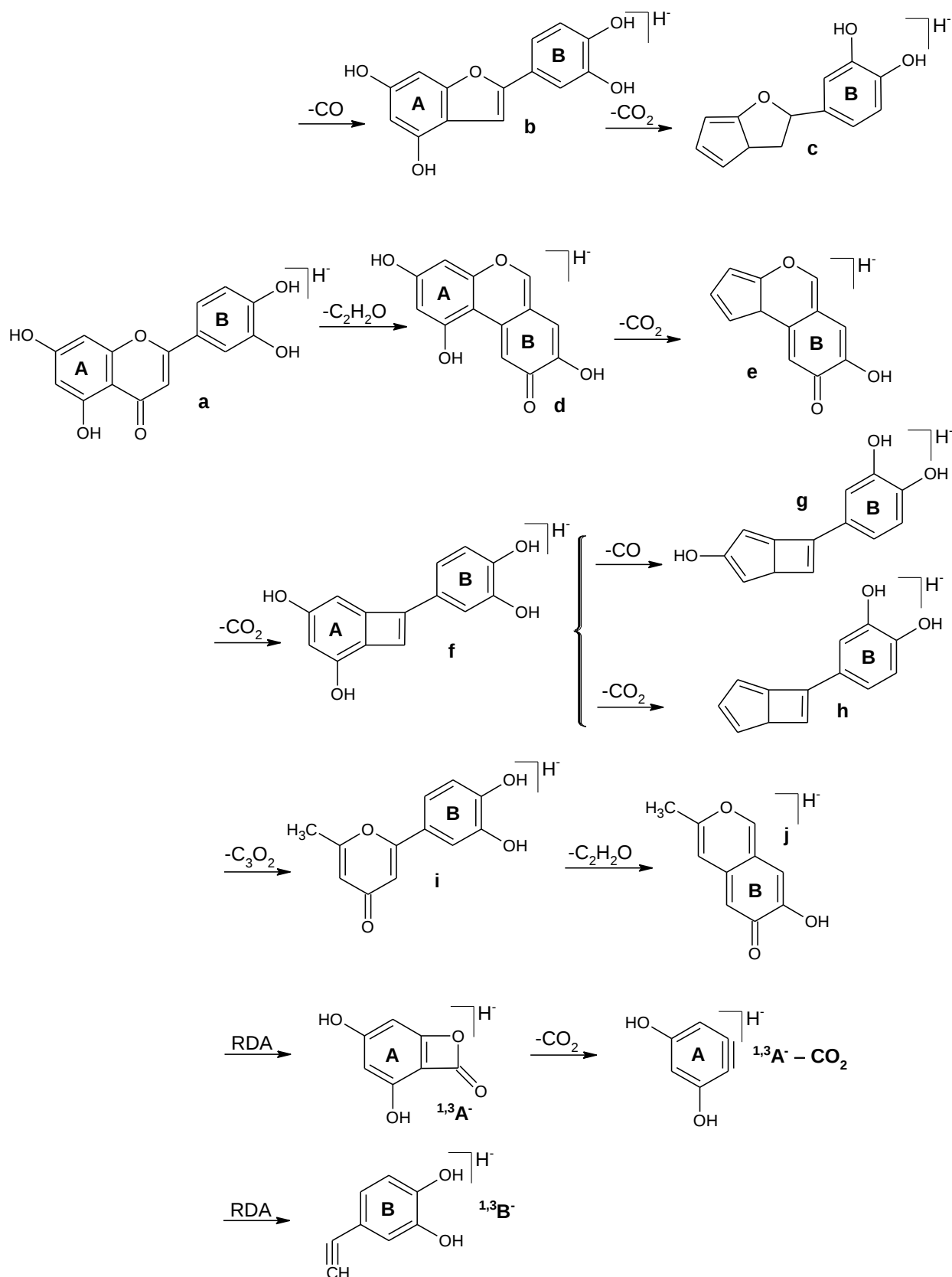
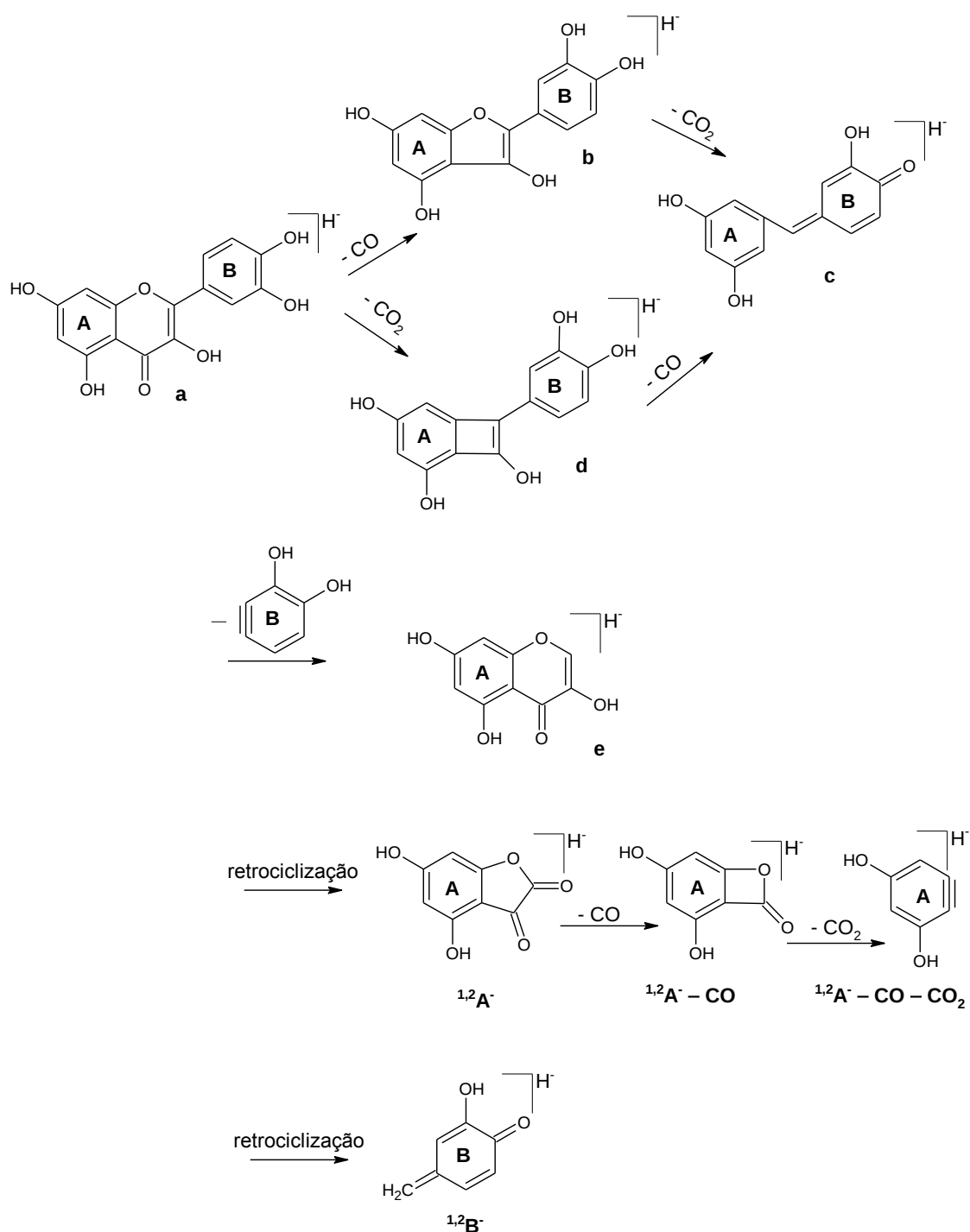


Figura 50. Fragmentação proposta para a molécula desprotonada de um flavonol, a quercetina (FABRE et al., 2001).



Levando-se em consideração os possíveis fragmentos para flavonas e flavonóis por ionização do tipo *eletrospray* em modo negativo apresentados nas Figuras 48 a 50, a Tabela 5 reúne os fragmentos que podem ser encontrados por espectrometria de massas sequencial das agliconas encontradas nos extratos.

Tabela 5. Fragmentos comumente encontrados em apigenina, quercetina e miricetina em ensaios de fragmentação de segunda ordem por ionização do tipo *electrospray* em modo negativo.

Fragmento	Apigenina	Quercetina	Miricetina
$[M - H - CO]^-$	241	273	289
$[M - H - CO_2]^-$	225	257	273
$[M - H - CO - CO_2]^-$	197	229	245
$[M - H - CO_2 - CO_2]^-$	181	-	-
$[M - H - C_2H_2O]^-$	227	-	-
$[M - H - C_2H_2O - CO_2]^-$	183	-	-
$[M - H - C_3O_2]^-$	201	-	-
$[M - H - C_3O_2 - C_2H_2O]^-$	159	-	-
$[M - H - \text{anel B}]^-$	-	193	193
$^{1,2}A^-$	-	179	179
$^{1,2}B^-$	-	121	137
$^{1,2}A^- - CO$	-	151	151
$^{1,2}A^- - CO - CO_2$	-	107	107
$^{1,3}A^-$	151	151	151
$^{1,3}B^-$	117	133	149

Fonte: Adaptado de FABRE et al., 2001.

Os resultados obtidos confirmam a presença de apigenina, quercetina e miricetina nos extratos conforme os fragmentos característicos discutidos por Fabre et al. (2001).

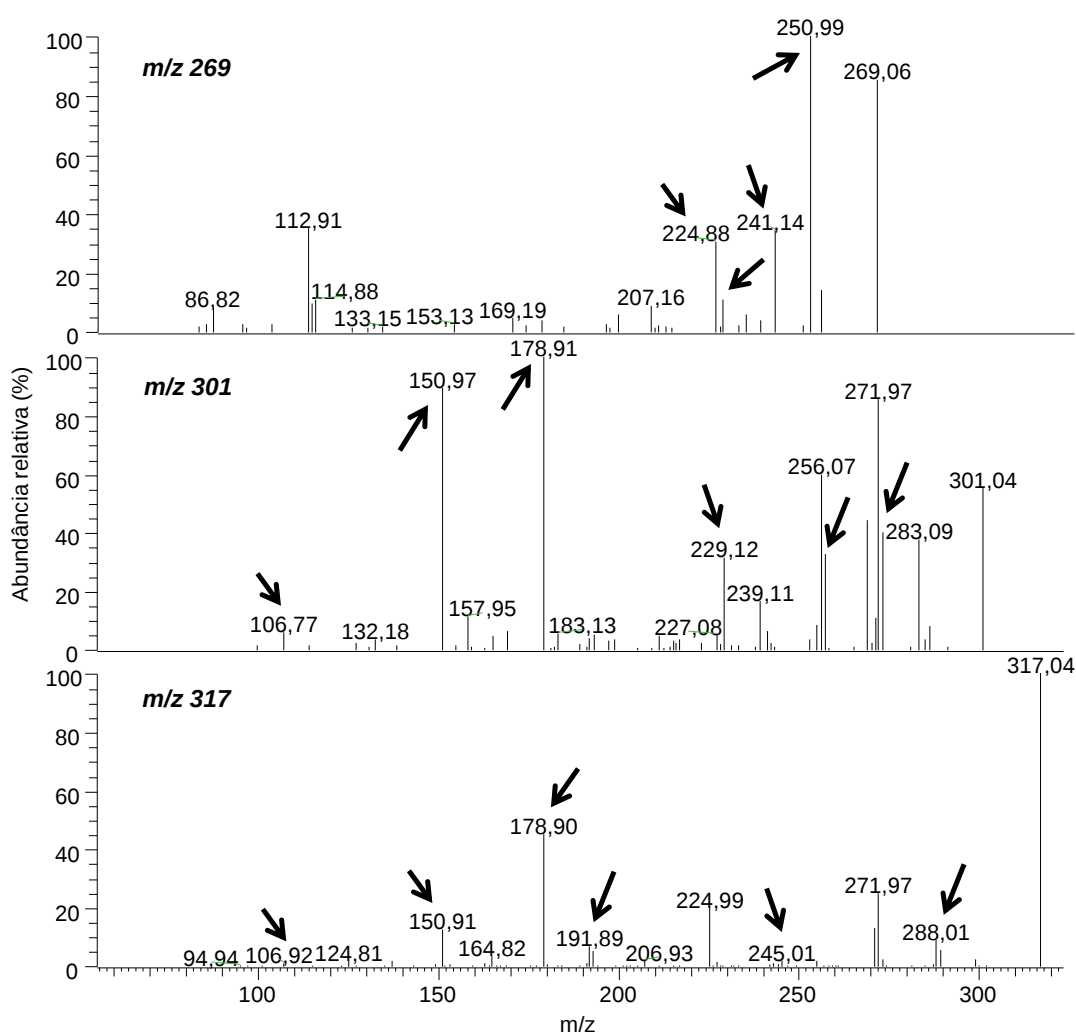
A Figura 51 traz os espectros de massas de segunda ordem dos íons negativos m/z 269, 301 e 317.

O íon m/z 269 apresentou o fragmento $[M - H - H_2O]^-$, com m/z 251, além dos seguintes fragmentos apresentados na Tabela 4.2 e Figura 4.2: $[M - H - CO]^-$, com m/z 241; $[M - H - CO_2]^-$, com m/z 225 e $[M - H - C_2H_2O]^-$, com m/z 227. Os fragmentos apresentados também foram encontrados por Fabre et al. (2001) para apigenina.

A molécula desprotonada com m/z 301, atribuída à quercetina apresentou os seguintes fragmentos: $[M - H - CO]^-$, com m/z 273; $[M - H - CO_2]^-$, com m/z 257; $[M - H - CO - CO_2]^-$, com m/z 229; $^{1,2}A^-$, com m/z 179; $^{1,2}A^- - CO$, com m/z 151; $^{1,2}A^- - CO - CO_2$, com m/z 107. Esses mesmos fragmentos também foram encontrados por Fabre et al. (2001) para quercetina, conforme Figura 48.

O íon negativo m/z 317, correspondente à miricetina apresentou os fragmentos: $[M - H - CO]^-$, com m/z 289; $[M - H - CO - CO_2]^-$, com m/z 245; $[M - H - \text{anel B}]^-$, com m/z 193; $^{1,2}A^-$, com m/z 179; $^{1,2}A^- - CO$, com m/z 151; $^{1,2}A^- - CO - CO_2$, com m/z 107. Os fragmentos m/z 151 e 179 foram obtidos da fragmentação sequencial de miricetina por Chandrasekara e Sahidi (2011). Rak et al. (2010) também encontraram o fragmentos m/z 151.

Figura 51. Espectro de massas de segunda ordem dos íons m/z 269, 301 e 317 obtidos por ESI-IT-MS/MS em modo negativo do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. ramiflora*. Para condições espectrométricas veja: Materiais e Métodos (Seção 3.6.3).



As Figuras 52 e 53 exemplificam os padrões de fragmentação encontrados para os flavonoides anteriormente discutidos, tomando como exemplo um flavonol O-glicosilado (miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo) e uma flavona C-glicosilada (apigenina-6-C-pentosil-8-C-deoxiexosídeo).

Figura 52. Fragmentação observada para miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo.

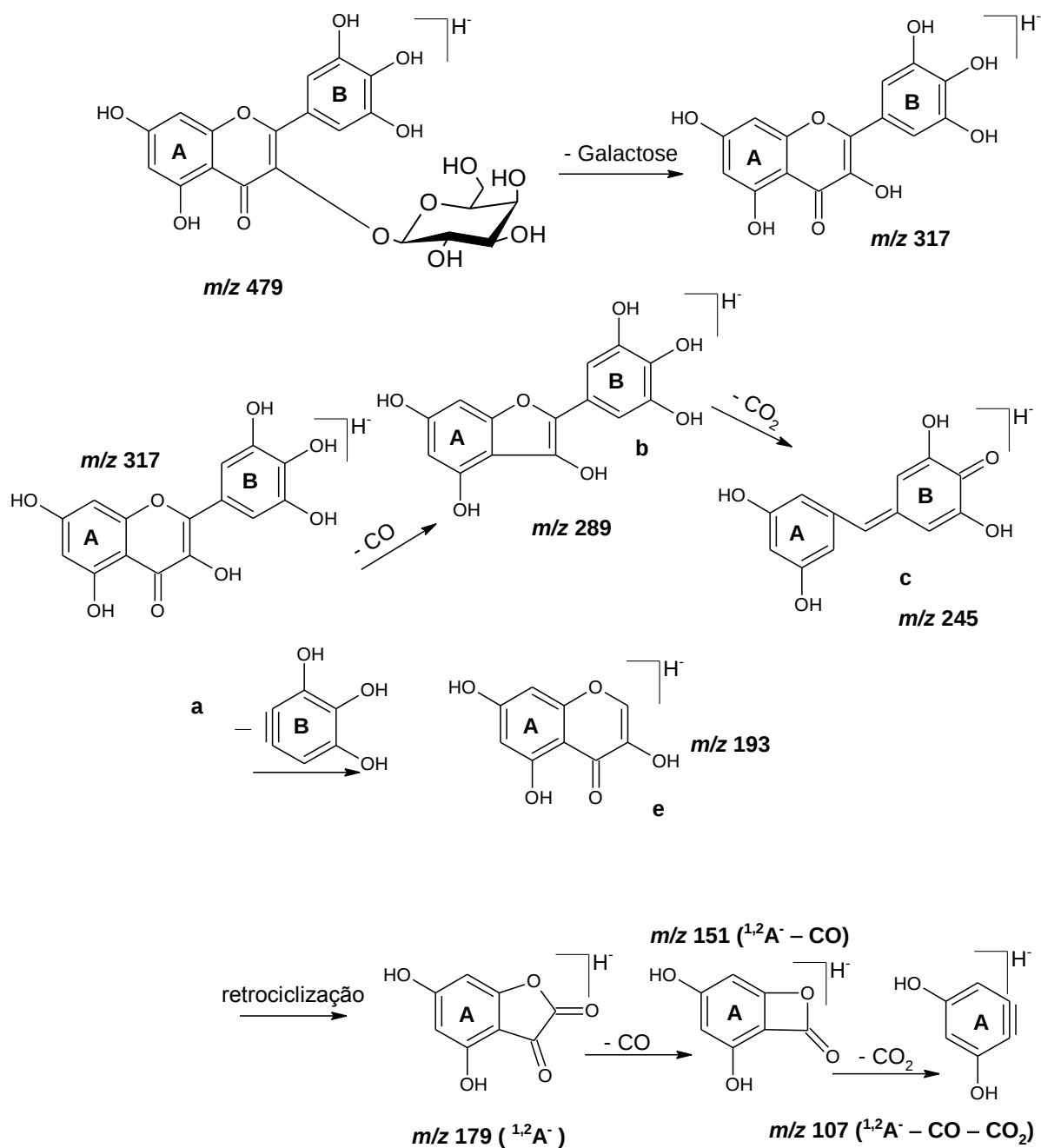
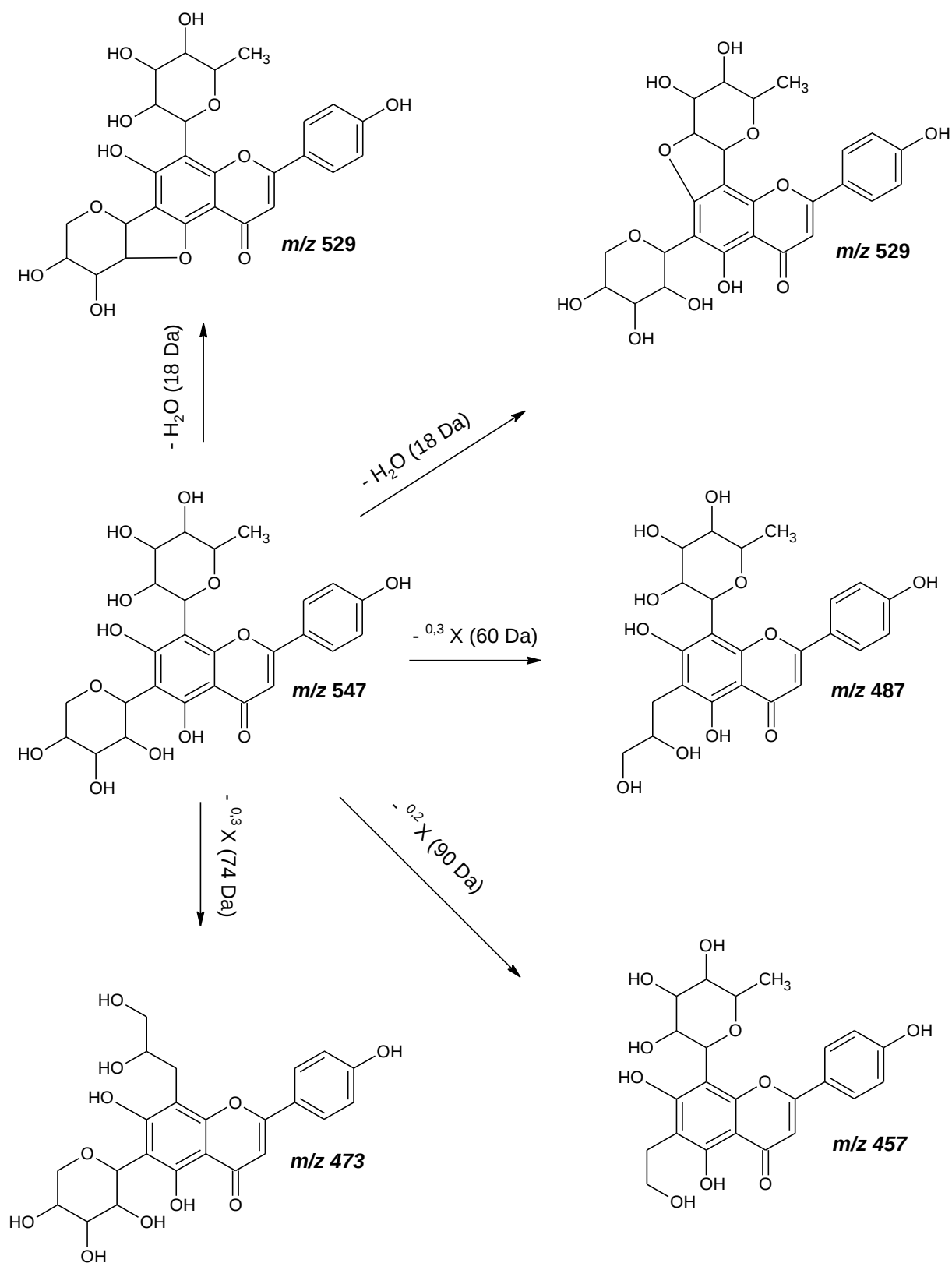
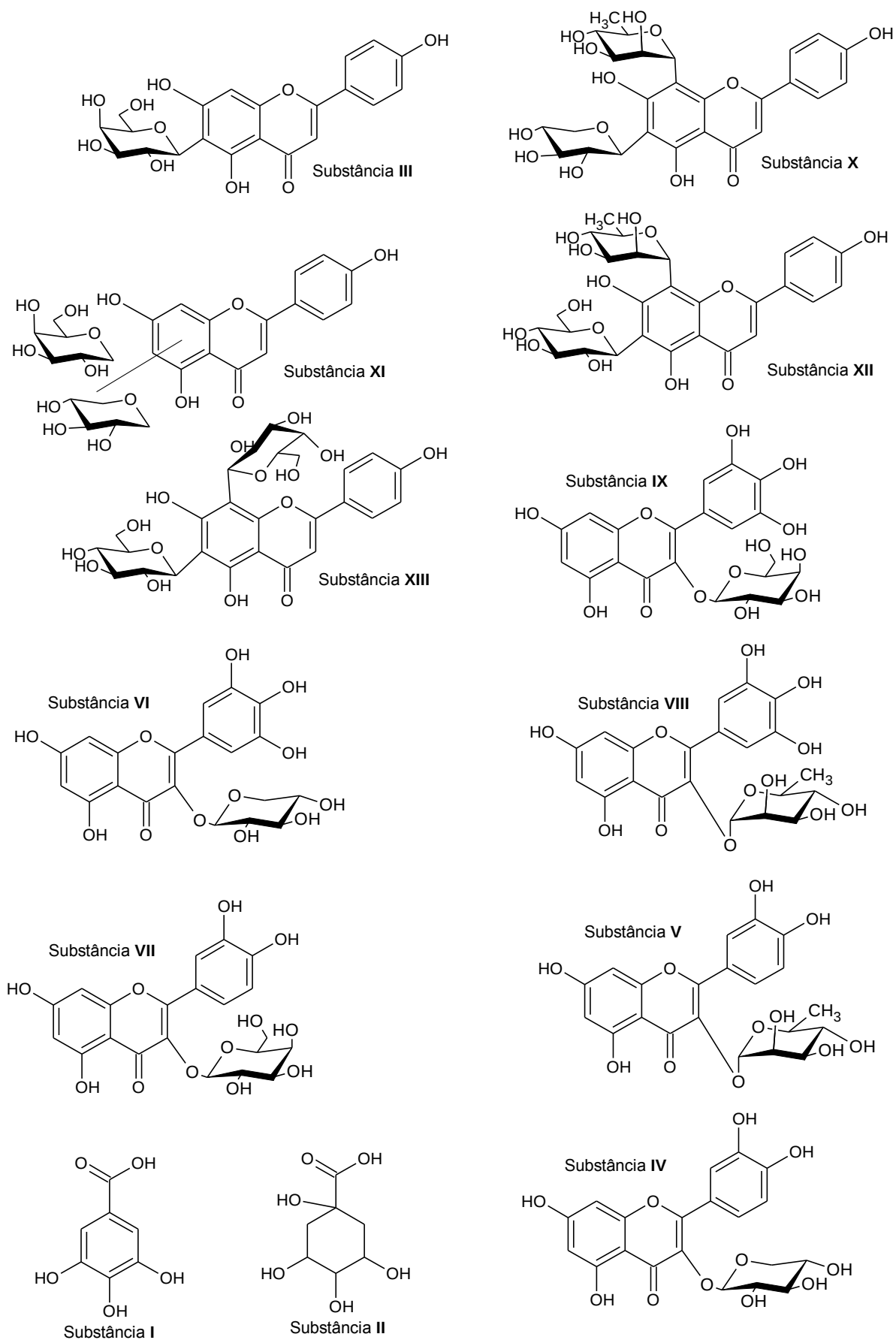


Figura 53. Fragmentação observada para apigenina-6-C-pentosil-8-C-deoxiexosídeo.



A Figura 54 apresenta as estruturas das moléculas parcialmente elucidadas por espectrometria de massas.

Figura 54. Estrutura das moléculas parcialmente elucidadas por ESI-IT-MS/MS.



4.4 Padronização dos extratos por HPLC-DAD e validação do método

A padronização dos extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora* se deu pela quantificação dos derivados de miricetina glicosilados isoladas de *P. torta* por Silva et al. (2009), cuja presença foi confirmada em ambos os extratos em ensaios de coinjeção de padrão por HPLC-DAD, ensaios de HPLC-ESI-IT-MS² e ESI-IT-MS/MS. Simultaneamente à quantificação, foi realizada a validação do método para determinação simultânea dos teores dos marcadores M-3-O-GAL, M-3-O-ARA e M-3-O-RHA em extratos hidroalcoólicos (70% de EtOH, v/v) de *P. torta* e M-3-O-GAL e M-3-O-RHA em extratos hidroalcoólicos (70% de EtOH, v/v) *P. ramiflora*.

Neste trabalho, a quantificação por HPLC-DAD foi feita pela construção de uma curva analítica baseada na variação de concentração de um padrão externo, a miricetina. Foram preparadas soluções de miricetina em diversas concentrações; obtiveram-se os cromatogramas correspondentes a cada uma delas e, em um gráfico, foram relacionadas as áreas dos picos de miricetina obtidas com as concentrações. Utilizando a equação da curva resultante, pôde-se calcular a concentração dos derivados de miricetina glicosilados nos extratos a partir das suas áreas, obtidas nos cromatogramas resultantes de injeções dos extratos.

A miricetina pode ser utilizada como padrão de quantificação para as três substâncias estudadas pelo fato desta aglicona conter os mesmos grupos cromóforos das substâncias, fazendo com que a resposta no detector para os derivados de miricetina glicosilados, ou área das substâncias no cromatograma, seja equivalente à do padrão a uma mesma concentração.

Para a quantificação, foi preparada uma solução estoque de miricetina com concentração de 1 mg.mL⁻¹, a partir da qual foi realizada diluição seriada para obtenção das soluções estoque (RIBANI et al., 2004). As injeções para construção da curva foram feitas em triplicata.

As injeções dos extratos foram feitas em 3 triplicatas, com intervalo de 24 horas entre cada uma das triplicatas, fornecendo 9 cromatogramas para cada extrato analisado, semelhantes ao da Figura 26.

A validação do método atendeu aos requisitos da RE N°899/03 da ANVISA (AGÊNCIA..., 2003), que define que a validação de um método tem como objetivo

demonstrar, por meio de ensaios experimentais, que este atenda às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados. Ainda, de acordo com a referida resolução, os testes quantitativos para a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas devem abranger ensaios de especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez, que serão apresentados a seguir para o método de quantificação desenvolvido.

Os resultados para o ensaio de quantificação encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Teores de derivados de miricetina em extratos hidroalcoólicos (70% EtOH, v/v) de *P. torta* e *P. ramiflora*.

	<i>P. torta</i>				<i>P. ramiflora</i>			
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	mg.g^{-1} de extrato	mg.g^{-1} de folhas	DPR (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ *	mg.g^{-1} de extrato	mg.g^{-1} de folhas	DPR (%)
M-3-O-GAL	30,34	2,53	0,77	3,51	162,59	13,55	2,04	2,23
M-3-O-ARA	16,01	1,33	0,40	4,41	NC	NC	NC	NC
M-3-O-RHA	26,40	2,20	0,67	4,32	115,37	9,61	1,44	2,33

* De extrato na concentração de 12 mg.mL^{-1} . NC: Não calculado.

Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006) encontraram teores de miricetina de $0,7 \text{ mg.g}^{-1}$ de folhas secas em chá verde (*Camellia sinensis*) e de $0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de folhas secas de chá preto (*Camellia sinensis*), que são considerados chás com alto teor de flavonóides. Miricetina não foi detectada por este estudo em erva doce (*Foeniculum vulgare*), camomila (*Matricaria chamomilla*), erva cideira (*Cymbopogon citratus*), hortelã (*Mentha piperita*), boldo (*Peumus boldus*), morango (*Fragaria vesca*), maçã (*Pyrus malus*) e mate (*Ilex paraguariensis*), sendo o limite de detecção de $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$, o que nos leva a concluir que as folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* possuem um importante teor de derivados de miricetina glicosilados, uma vez que a soma dos teores de derivados de miricetina quantificados neste trabalho foram de $1,84 \text{ mg.g}^{-1}$ de folhas de *P. torta* e $3,48 \text{ mg.g}^{-1}$ de folhas de *P. ramiflora*.

4.4.1 Especificidade

A especificidade, ou seletividade, de um método de separação é, segundo Ribani et al. (2004) a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação

em uma amostra complexa. Segundo estes autores, a especificidade pode ser comprovada pelo índice de similaridade entre o espectro de UV do padrão e o espectro de UV do pico atribuído à substância.

Em métodos cromatográficos, pode-se também avaliar a especificidade do método pela utilização de testes de pureza de pico e adição de padrão à amostra (AGÊNCIA..., 2003; BRESSOLE et al., 1996).

As Figuras 27 e 28 da seção 4.2 apresentam os cromatogramas obtidos pela coinjeção de padrões de M-3-O-GAL, M-3-O-ARA e M-3-O-RHA em extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*, enquanto a Tabela 7 apresenta os valores do coeficiente de correlação entre os espectros de UV dos padrões e dos picos atribuídos a estes padrões, assim como a pureza dos picos atribuídos aos padrões nos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*. Os resultados foram obtidos pelo tratamento dos dados cromatográficos pelo programa JASCO ChromNAV 1.18.03. Para condições cromatográficas veja: ítem 2.4.

Tabela 7. Pureza dos picos, tempos de retenção (t_R) e coeficiente de correlação entre os espectros de UV dos derivados de miricetina e seus respectivos padrões.

Padrão	<i>P. torta</i>			<i>P. ramiflora</i>			
	t_R (min)	Pureza	Coeficiente de correlação	t_R (min)	Pureza	Coeficiente de correlação	t_R (min)
M-3-O-GAL	5,11	95%	0,997	5,14	93%	0,989	5,48
M-3-O-ARA	6,42	98%	0,995	6,36		ND	6,46
M-3-O-RHA	6,74	98%	0,998	6,65	96%	0,984	6,89

ND: Não foi detectado na biblioteca de padrões espectro com similaridade ao do pico com t_R = 6,46 min para *P. ramiflora*.

Os dados apresentados na Tabela 7, em conjunto com os resultados dos ensaios de coinjeção de padrões (Seção 4.2), demonstram que o método cromatográfico desenvolvido para análise dos extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora* possuem a especificidade requerida para a validação do método de quantificação simultânea de M-3-O-GAL, M-3-O-ARA e M-3-O-RHA no extrato hidroalcoólico (70% EtOH, v/v) de *P. torta* e M-3-O-GAL e M-3-O-RHA no extrato hidroalcoólico (70% EtOH, v/v) de *P. ramiflora*.

Apesar do ensaio de coinjeção e as análises por HPLC-ESI-IT-MS² e ESI-IT-MS/MS indicarem a presença de M-3-O-ARA no extrato de *P. ramiflora* e, possivelmente, no pico com t_R = 6,46 min, não houve similaridade espectral suficiente

entre o espectro neste tempo de retenção e o espectro do padrão de M-3-O-ARA para que possamos atribuir este pico a esta substância.

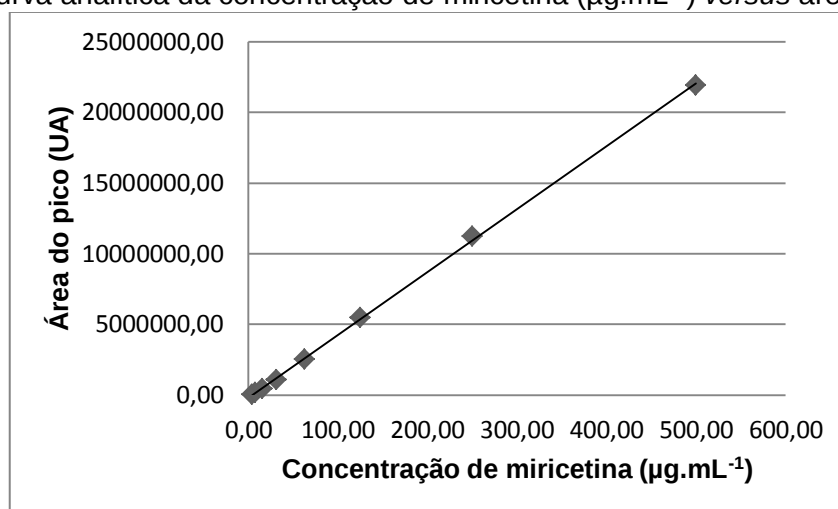
4.4.2 Linearidade e Intervalo

A ANVISA define linearidade como a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para a validação do método, a construção da curva analítica deve ser feita com, no mínimo, 5 pontos e o coeficiente de correlação (r) deve ser maior que 0,99 (AGÊNCIA..., 2003).

A Tabela 8 traz os dados obtidos para a construção da curva analítica, cuja faixa linear foi de 3,9 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a Figura 55 apresenta a curva analítica média da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) *versus* área do pico (UA).

Tabela 8. Dados para a construção da curva analítica da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) *versus* área do pico (UA).

Concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média das áreas dos picos (UA)	DPR (%)
3,91	55.122,48	0,80
7,81	162.605,89	0,96
15,63	431.825,78	0,27
31,25	1.087.833,14	1,05
62,50	2.517.874,95	0,50
125,00	5.480.962,88	0,45
250,00	11.234.029,73	1,05
500,00	21.906.138,63	0,10

Figura 55. Curva analítica da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) *versus* área do pico (UA).

A equação linear da curva analítica é dada pela Equação 1:

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde **a** é o coeficiente angular e **b** é a intersecção com o eixo Y. Pelo método dos mínimos quadrados, obtiveram-se os valores de **a** e **b** apresentados na Tabela 9, que também traz o coeficiente de correlação obtido da análise da regressão linear, cujo valor indica a linearidade do método.

Tabela 9. Parâmetros estatísticos da curva analítica da concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) *versus* área do pico (UA).

r	0,9996
b	-177474,17
a	44469,90

A faixa linear para a determinação quantitativa de analitos em matérias-primas ou em formas farmacêuticas deve estar compreendido entre 80 e 120% da concentração teórica de teste, segundo a ANVISA (AGÊNCIA..., 2003). Este pré-requisito foi atendido para a construção da curva, como pode ser verificado pelos resultados pelas Tabelas 8 e 9.

4.4.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de uma série de repetições da análise, e pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos resultados em um ensaio de repetibilidade, onde as repetições são realizadas em um mesmo laboratório, por um mesmo analista em um curto período de tempo (AGÊNCIA..., 2003).

A precisão pode também ser avaliada nos níveis de precisão intermediária (comparação dos resultados obtidos em um mesmo laboratório, em dias diferentes, por um analista e/ou equipamento diferente) e reprodutibilidade (comparação dos resultados obtidos em laboratórios diferentes). Entretanto, a RE N° 899/03 requer somente o ensaio de repetibilidade para avaliação da precisão quando da validação de métodos de quantificação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (AGÊNCIA..., 2003).

Para a quantificação das substâncias estudadas, foram realizadas 9 corridas cromatográficas, sendo 3 corridas a cada 24 horas. Os DPR intradias e interdias das áreas dos picos das substâncias estudadas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Desvio padrão relativo (%) das áreas calculadas para os picos dos derivados de miricetina glicosilados.

	<i>P. torta</i>				<i>P. ramiflora</i>			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Interdias	Dia1	Dia 2	Dia 3	Interdias
M-3-O-GAL	0,63	1,47	0,28	3,51	1,08	0,99	1,90	2,23
M-3-O-ARA	2,72	1,58	2,60	4,41	NC	NC	NC	NC
M-3-O-RHA	2,40	1,65	3,09	4,32	0,91	1,33	2,18	2,33

NC: Não calculado.

Os resultados obtidos se encontram dentro do limite estabelecido pela RE 899/03 para o DPR das medidas, que deve ser de, no máximo, 5% (AGÊNCIA..., 2003).

4.4.5 Limites de detecção e quantificação

A quantidade mínima de analito que pode ser detectada pelo método (limite de detecção, ou LD) e a quantidade mínima de analito que pode ser quantificada pelo método (limite de quantificação, ou LQ), foram calculados segundo as Equações 2 e 3 (AGÊNCIA..., 2003):

$$LD = 3 \times \frac{DP_b}{a} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \times \frac{DP_b}{a} \quad (3)$$

onde **DP_b** é o desvio padrão da intersecção com o eixo Y e **a** o coeficiente angular da curva analítica.

O valor de LD encontrado para o método foi de 1,43 µg.mL⁻¹ e o valor de LQ foi de 4,76 µg.mL⁻¹. Os teores calculados para os derivados de miricetina glicosilados nos extratos foram todos acima do LQ do método (Tabela 6).

4.4.6. Exatidão

O INMETRO define exatidão como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (INSTITUTO..., 2003).

Para a verificação da exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação, nos quais quantidades conhecidas de miricetina foram adicionadas aos extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora* e as áreas dos picos atribuídos às miricetinas foram calculados pela equação da curva analítica. A exatidão (porcentagem de recuperação) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$Exatidão = \frac{C_E - C_B}{C_T} \times 100 \quad (4)$$

onde **C_E** é a concentração calculada pelo método para miricetina no extrato dopado, **C_B** é a concentração calculada pelo método para miricetina no extrato não dopado (branco) e **C_T** a concentração teórica.

Segundo Ribani et al. (2004) a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Nesse sentido, a ANVISA (AGÊNCIA..., 2003) recomenda que o ensaio de exatidão seja feito para 3 concentrações diferentes.

Os ensaios de recuperação do método foram feitos para 5 concentrações diferentes, levando-se em consideração a faixa de valores mais adequada, ou que abrangesse valores menores, próximos e maiores aos encontrados para os teores de derivados de miricetina glicosilados para cada espécie. Os valores são apresentados na Tabela 11, sendo que o valor médio de exatidão para *P. torta* foi de 103,28 % e para *P. ramiflora* foi de 106,71 %.

Tabela 11. Resultados para a exatidão do método para os extratos de *P. torta* e *P. ramiflora* dopados com diferentes concentrações de miricetina.

Concentração de miricetina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão para <i>P. torta</i> (%)	Exatidão para <i>P. ramiflora</i> (%)
7,81	98,85 $\pm$ 0,82	NC
15,63	102,34 $\pm$ 1,09	NC
31,25	103,78 $\pm$ 0,24	119,40 $\pm$ 4,44
62,50	102,89 $\pm$ 0,63	106,28 $\pm$ 4,09
125,00	108,56 $\pm$ 0,39	107,96 $\pm$ 0,66
250,00	NC	98,45 $\pm$ 0,13
500,00	NC	101,47 $\pm$ 0,71

NC: não calculado. Exatidão expressa como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

De acordo com o guia para validação de métodos químicos em materiais botânicos da AOAC (2002), valores de recuperação devem estar dentro da faixa de 85 a 110% quando a concentração do analito for da ordem de 0,01% e na faixa entre 80 a 115% quando a concentração do analito for da ordem de ppm. De acordo com este guia, valores de recuperação maiores que 100% são estatisticamente esperados, pois em uma distribuição de resultados analíticos onde se espera valores de 100% como média geral, serão obtidos resultados acima e abaixo da média. Além disso, deve ser considerado o efeito da matriz, que pode ocasionar diferenças na absorvidade dos compostos no UV.

4.4.7. Robustez

A ANVISA define robustez de um método analítico como a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (AGÊNCIA..., 2003).

Este parâmetro deve ser avaliado durante o desenvolvimento da metodologia, pois se for constatada a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas rigorosamente e precauções devem ser incluídas no procedimento.

Para avaliação da robustez do método, foram realizadas 8 corridas cromatográficas para avaliar o efeito da variação de 7 parâmetros, de maneira aleatória, conforme sugerido pelo INMETRO (INSTITUTO..., 2003).

A Tabela 12 apresenta os parâmetros que sofreram variação.

Tabela 12. Parâmetros do método de quantificação alterados para avaliação da robustez.

Parâmetro	Nominal	Variação
Coluna	A) Phenomenex® Synergi® Hydro-RP (25 cm x 4.6 mm x 5 µm)	a) Thermo® Hipersyl Gold C-18 (25 cm x 4.6 mm x 5 µm)
Temperatura	B) 40°C	b) 35°C
Balança	C) Sartorius TE214S	c) Shimadzu AY220
Agitação da amostra	D) 5 min	d) 3 min
Acidificação	E) H ₂ O e ACN com 0,1% de TFA	e) Somente H ₂ O com 0,1% de TFA
Gradiente	F) 20-42% ACN em 30 min	f) 22-44% ACN em 30 min
Analista	G) Daryne	g) Carlos

Para a determinação da combinação dos parâmetros a serem utilizados em cada corrida, os fatores nominais foram denotados por letras maiúsculas, e as variações por letras minúsculas. A condição utilizada para as 8 corridas seguiram a Tabela 13.

Tabela 13. Ordem das variações no método adotadas para cada corrida para avaliação da robustez.

Parâmetro	Corrida							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g

Foi avaliado o tempo de retenção correspondente ao pico de M-3-O-GAL nos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora* para verificar a robustez do método, por meio do desvio padrão relativo (DPR). A Tabela 14 apresenta os dados para avaliação da robustez do método.

Tabela 14. Tempos de retenção (min) dos picos atribuídos à miricetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo obtidos por HPLC-DAD em extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* nas 8 corridas para avaliação da robustez.

Combinação	<i>P. torta</i>	<i>P. ramiflora</i>
1	5,67	5,72
2	6,12	6,14
3	4,93	4,98
4	7,66	7,85
5	4,77	4,81
6	5,82	5,16
7	4,36	4,41
8	6,08	5,34
DPR	18,15 %	19,30 %

Podemos observar dos resultados apresentados na Tabela 14 que as variações afetaram significativamente os resultados, levando a valores altos de DPR para ambas as espécies.

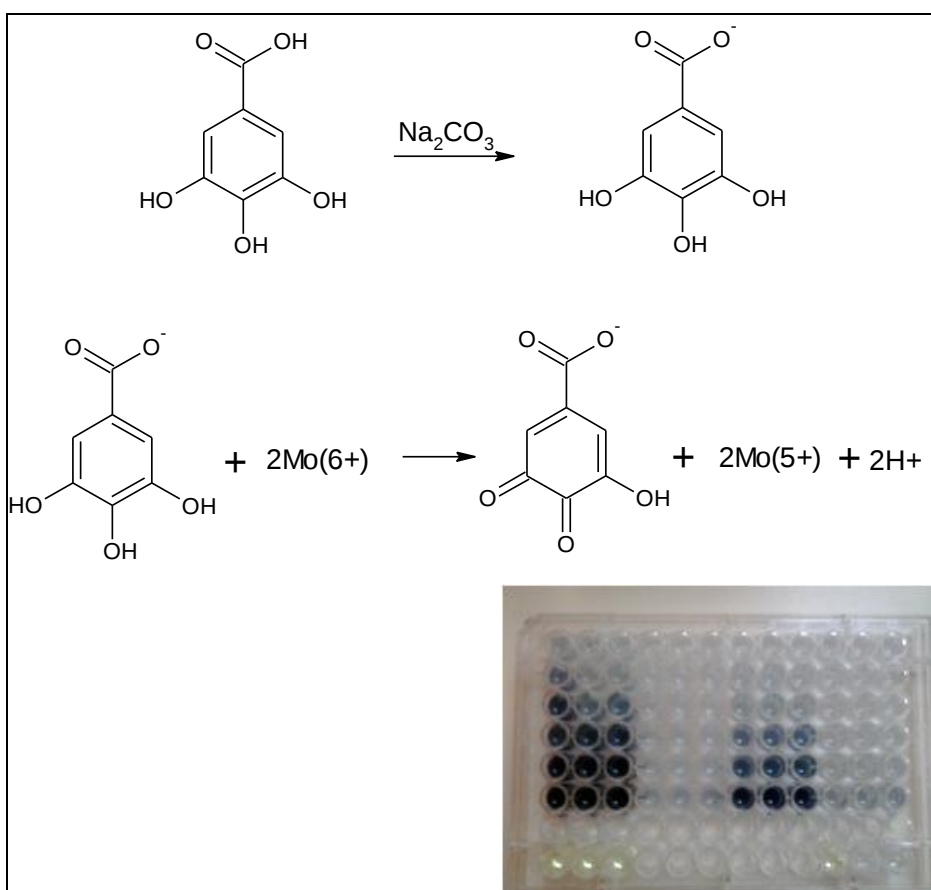
Portanto, o método desenvolvido deve obedecer rigorosamente as condições nominais para que os resultados sejam confiáveis.

4.5 Quantificação de fenóis totais

A quantificação de fenóis totais presentes nos extratos foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O método baseia-se na produção de complexos de coloração azul, que podem ser medidos em espectrofotômetro a 750 nm (LENORE et al., 2005).

Na primeira etapa de reação (Figura 56), ocorre desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos.

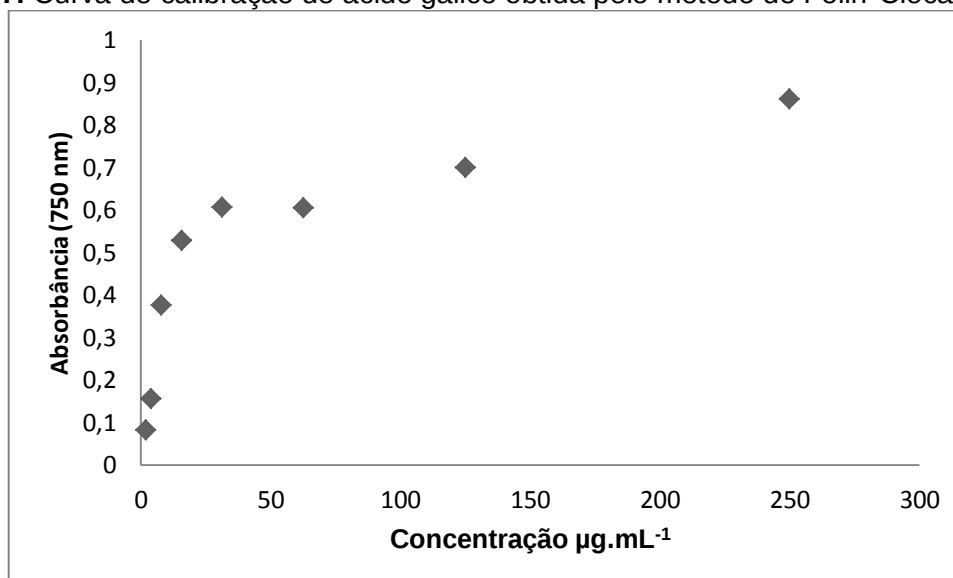
Figura 56. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, et al. 1999). No detalhe, placa de 96 poços contendo padrão de ácido gálico em várias diluições e amostras analisadas após a reação com o reagente Folin-Ciocalteu.



A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu, sofre redução e o meio reacional muda a coloração de amarela para azul (SINGLETON et al., 1999).

A curva de calibração (Figura 57) foi obtida utilizando 8 diluições das soluções de ácido gálico, substância utilizada como padrão de fenol. As leituras foram determinadas em triplicata através de absorbância registrada a 760 nm em função da concentração do padrão fenólico.

Figura 57. Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Folin-Ciocalteu.



Os valores de concentração de fenóis totais dos extratos hidroalcoólicos e infusões de *P. torta* e *P. ramiflora* foram obtidos por interpolação, e são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Teores de fenóis totais em extratos hidroalcoólicos e infusões de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*, acompanhados do desvio padrão relativo.

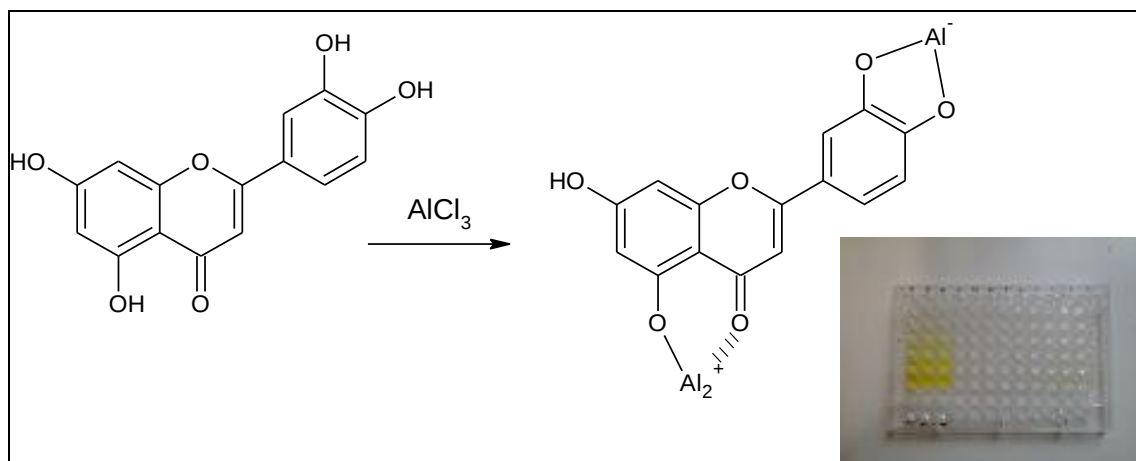
Espécie	mg.g ⁻¹ de extrato hidroalcoólico ±	mg.g ⁻¹ de infusão
	DPR (%)	± DPR (%)
<i>P. torta</i>	11,66 ± 5,44	90,83 ± 1,25
<i>P. ramiflora</i>	125,87 ± 2,78	55,85 ± 0,75

Os teores de fenóis totais encontrados nas amostras demonstram uma clara correlação com a intensidade dos picos iniciais (0-4 min) dos cromatogramas apresentados na seção 4.2 para essas amostras (Figuras 26 e 32), lembrando que o ácido gálico foi detectado entre 3,37 e 3,57 min nos extratos hidroalcoólicos por coinjeção de padrão.

4.6 Quantificação de flavonoides totais

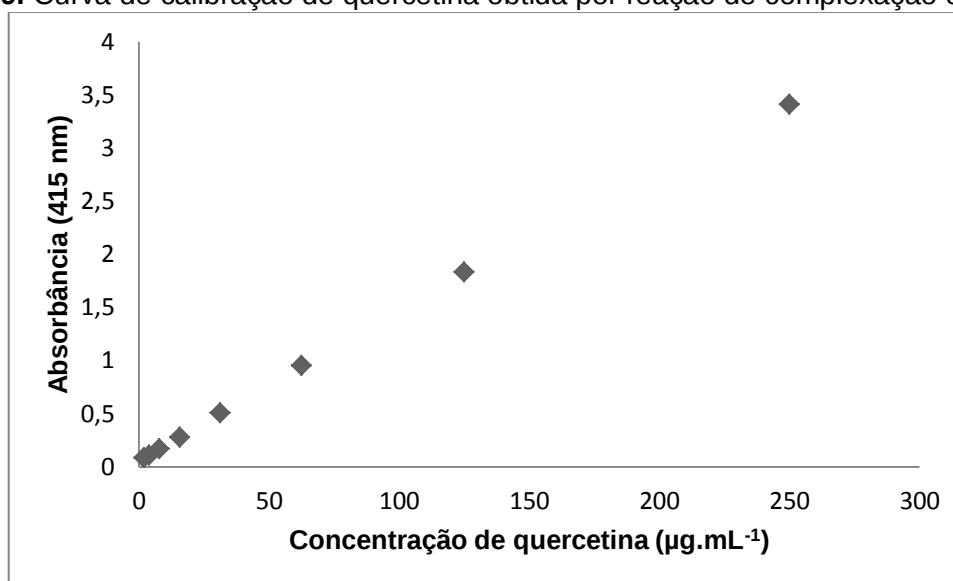
O teor de flavonoides foi verificado a partir do método colorimétrico no qual ocorre a complexação dos flavonoides com cloreto de alumínio (Figura 58).

Figura 58. Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (MARKHAM et al., 1982). No detalhe, placa de 96 poços contendo padrão de quercetina em várias diluições e amostras analisadas após a reação com AlCl_3 .



O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Deste modo, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas.

A curva de calibração (Figura 59) foi obtida utilizando 8 diluições das soluções de quercetina, substância utilizada como padrão de flavonoide. As leituras foram determinadas em triplicata através de absorbância registrada a 415 nm em função da concentração do padrão de flavonoide.

Figura 59. Curva de calibração de quercetina obtida por reação de complexação com AlCl_3 .

A curva apresentou tendência linear, com coeficiente de correlação R^2 igual a 0,999. Os teores de flavonoides totais nas amostras foram calculados pela equação da reta ($y = 0,0135x + 0,0762$).

Os teores de flavonoides encontrados nas amostras são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Teores de flavonoides totais em extratos hidroalcoólicos e infusões de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*, acompanhados do desvio padrão relativo.

Espécie	mg.g ⁻¹ de extrato hidroalcoólico	mg.g ⁻¹ de infusão
	± DPR (%)	± DPR (%)
<i>P. torta</i>	16,11 ± 3,60	5,56 ± 3,39
<i>P. ramiflora</i>	48,82 ± 3,11	27,84 ± 4,57

As infusões, devido ao seu caráter bastante polar, apresentaram menores teores de flavonoides do que os extratos correspondentes à mesma espécie. Ao compararmos as espécies, verifica-se pelos dados apresentados na Tabela 16 que o extrato hidroalcoólico e infusão de *P. ramiflora* apresentaram maiores teores de flavonoides do que os de *P. torta*.

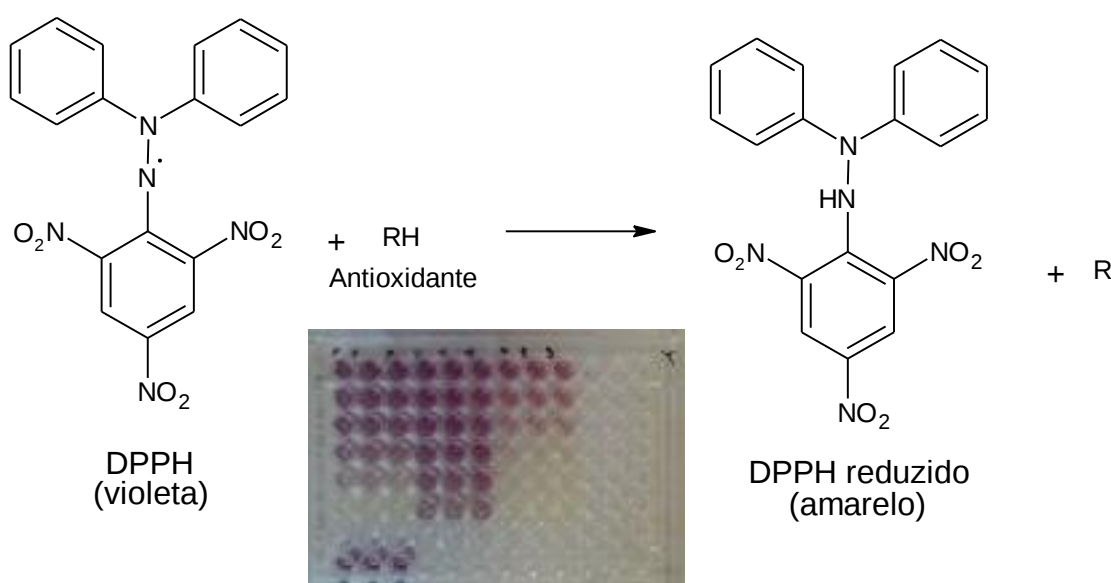
Mais uma vez os resultados apresentados tem correlação com os *fingerprints* por HPLC-DAD (Seção 4.2), mais especificamente, com a intensidade dos picos atribuídos às miricetinas glicosiladas dos extratos.

Percebe-se ainda pela quantificação das miricetinas glicosiladas dos extratos (Seção 4.4, Tabela 6), que a somatória das quantidades das miricetinas glicosiladas nos extratos hidroalcoólicos (6,06 mg.g⁻¹ de extrato de *P. torta* e 23,16 mg.g⁻¹ de extrato de *P. ramiflora*) correspondem a 37,62% e 47,44% dos flavonoides totais encontrados em *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente.

4.7. Determinação do potencial antirradicalar com DPPH

Este teste avalia a capacidade que uma substância tem de sequestrar o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está baseado na redução da solução de DPPH (cor violeta) quando ocorre a adição de substâncias que podem ceder uma espécie radicalar (hidrogênio radicalar), formando um complexo de coloração amarela (Figura 60) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Figura 60. Reação de redução de DPPH. No detalhe, imagem de uma placa que ilustra a coloração do DPPH antes (violeta) e após a redução (amarelo).



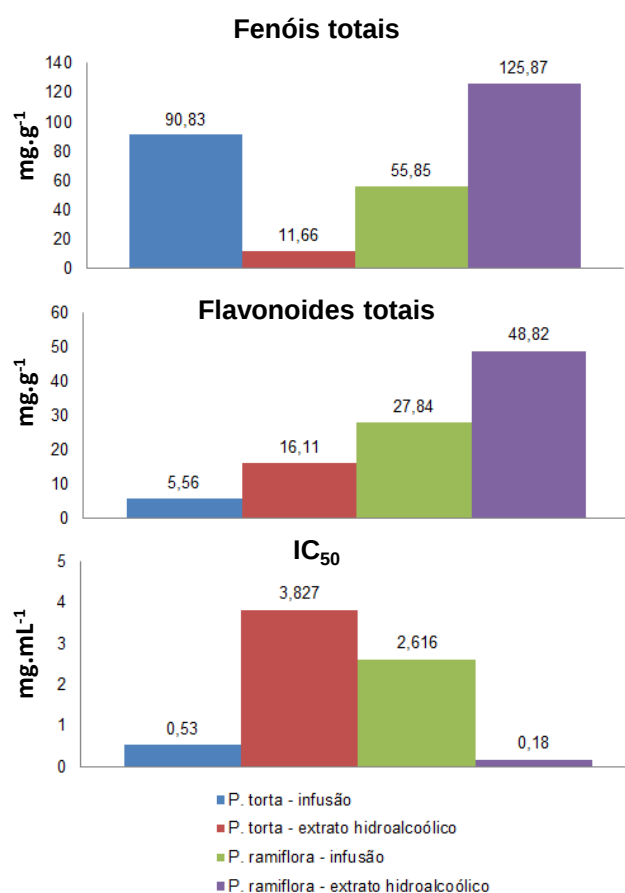
Com base nas curvas dos padrões, extratos e infusões, foram calculados os valores de IC₅₀, concentração de substância teste necessária para sequestrar 50% dos radicais livres presentes na solução de DPPH. Este valor é inversamente proporcional à atividade antirradicalar, pois quanto menor a concentração de substância teste necessária para atingir o IC₅₀, maior o potencial antirradicalar dessa substância.

Os valores de IC₅₀ foram calculados por interpolação, e são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores de IC₅₀ para os padrões, extratos hidroalcoólicos e infusões de folhas de *P. torta* e *P. ramiflora*, acompanhados do desvio padrão relativo.

Substância teste	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹) ± DPR (%)
Quercetina	0,028 ± 3,09
Ácido gálico	0,014 ± 0,42
<i>P. torta</i> – infusão	0,530 ± 1,11
<i>P. torta</i> – extrato hidroalcoólico	3,827 ± 0,51
<i>P. ramiflora</i> – infusão	2,616 ± 0,37
<i>P. ramiflora</i> – extrato hidroalcoólico	0,180 ± 9,01

Figura 61. Gráficos de colunas comparativos dos teores de fenóis totais, flavonoides totais e IC₅₀ de infusões e extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora*.



A Figura 61 apresenta os resultados dos ensaios de fenóis totais, flavonoides totais e potencial antirradicalar na forma de gráficos de colunas, o que permite a visualização de que a atividade antirradicalar do extrato ou infusão está diretamente relacionado ao seu teor de fenóis totais. Proestos et al. (2006) observaram em seus estudo que a atividade antioxidante de extratos de plantas é dependente do teor de fenóis totais da espécie.

Segundo Ou et al. (2001), as reações de oxidação envolvem várias etapas que incluem iniciação, propagação e terminação. O processo como um todo é denominado reação em cadeia. Os antioxidantes podem ser de dois tipos: aqueles que inibem ou retardam a formação de radicais livres a partir de seus precursores (iniciação), chamados de antioxidantes preventivos, ou aqueles que interrompem a reação em cadeia (propagação), chamados de terminadores de cadeia. Os compostos fenólicos são do tipo terminadores de cadeia (KANCHEVA, 2009; THIKONOV et al., 2008).

Os antioxidantes terminadores de cadeia tem a capacidade de doar um átomo de hidrogênio a um radical livre muito mais rapidamente do que um radical livre reage com seu substrato, estabilizando o radical livre (OU et al., 2001).

Rice-Evans et al. (1997) atribuem a atividade antioxidante de compostos fenólicos a quatro fatores: sua capacidade para doar hidrogênio; o destino do radical formado pelo composto fenólico, que é capaz de se estabilizar pela delocalização dos elétrons desemparelhados; sua reatividade com outros antioxidantes; seu potencial de quelar metais de transição. Dessa forma, os compostos fenólicos possuem a estrutura química ideal para exercer atividade antioxidante, demonstrando ser antioxidantes mais efetivos do que as Vitaminas E e C em ensaios *in vitro* (RICE-EVANS et al., 1996).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é dependente de sua estrutura.

A eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes depende de alguns fatores como número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, o sítio de ligação a posição dessas hidroxilas uma com relação às outras (SROKA e CISOWSKI, 2003). Por exemplo, Rice-Evans et al. (1996) descrevem que a presença de hidroxilas na posição *orto* no anel aromático de compostos fenólicos aumenta sua capacidade com antioxidante.

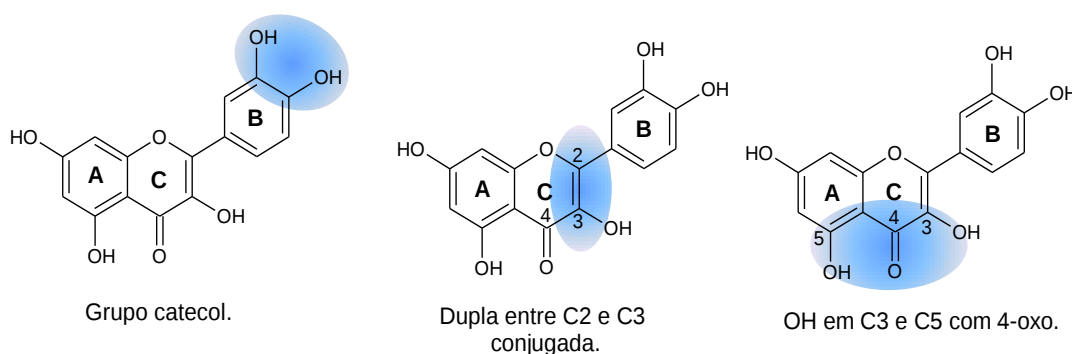
Em estudos sobre a atividade antioxidante com DPPH dos ácidos gálico, cafeico, protocatecuico, gentísico e clorogênico, entre outros, o ácido gálico apresentou o maior potencial antioxidante (SROKA e CISOWSKI, 2003). Estes pesquisadores afirmam que as altas atividades antioxidantes encontradas para

1,2,3-tri-hidroxibenzeno e ácido gálico estão relacionadas com os três grupos hidroxila ligados ao anel em posição *orto* um em relação aos demais, e concluem que o número e posição de hidroxilas no anel benzênico é o principal fator que justifica a atividade antioxidante em ácidos fenólicos.

Dessa forma, poderíamos esperar que a miricetina, flavonol contendo 3 hidroxilas ligadas ao anel B, possui atividade antioxidante mais pronunciada que a quercetina, flavonol contendo 2 hidroxilas ligadas ao anel B. Entretanto, dados da literatura demonstram que a presença de uma hidroxila adicional ao anel B de flavonóis não incrementa sua atividade antioxidante (HIDALGO et al., 2010; RICE-EVANS et al., 1996; RÖSCH et al., 2003).

Para flavonoides, o incremento da atividade antioxidante está relacionado com a presença de hidroxilas na posição *orto* em 3' e 4' no anel B, a presença das hidroxilas em *meta* nas posições 5 e 7 do anel A e a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, em combinação com a carbonila da posição 4 e a hidroxila na posição 3, favorecendo a delocalização dos elétrons, uma vez que haja o grupo catecólico no anel B (RICE-EVANS et al., 1997), o que faz da quercetina (Figura 62) um excelente antioxidante.

Figura 62. Principais características da quercetina para a captura de radicais livres.



Os flavonoides geralmente ocorrem na forma glicosilada, o que lhes confere menor atividade antioxidante e maior solubilidade em água (RICE-EVANS et al., 1997).

A glicosilação dos grupos hidroxila de uma aglicona, apesar de aumentar o número de hidroxilas da estrutura, diminui a atividade antioxidante, pois estas hidroxilas são cruciais para a estabilização da estrutura após a doação de um

elétron do hidrogênio ao radical livre (RICE-EVANS et al., 1997; FUKUMOTO E MAZZA, 2000; HAVSTEEN, 2002).

Rösch et al. (2003) estudaram a atividade antioxidante de 22 compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos, flavanóis, flavonóis e flavonóis glicosilados. Os maiores valores para a atividade antioxidante foram encontrados para ácido gálico, quercetina e miricetina. Os autores afirmam que a glicosilação de hidroxila na posição 3 de uma quercetina causou diminuição de 11 a 26% na atividade antioxidante da molécula, sem, no entanto, fazer com que a atividade antioxidante do flavonol glicosilado fosse considerada baixa dentre os flavonoides estudados. Para se ter uma ideia, a atividade antioxidante, em mols de sal de Fremy reduzido por mol de substância teste, foi de 8,0 para quercetina, para quercetina-3-O-galactosídeo 7,8 e para kaempferol 2,5.

Com base no discutido, podemos afirmar que a maior atividade antioxidante apresentada pelo extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora* se deve ao teor de ácido gálico e de derivados glicosilados de miricetina.

4.8 Atividade mutagênica

A Tabela 18 apresenta os resultados de atividade mutagênica avaliada pelo teste de Ames para o extrato hidroalcoólico de *P. torta*, que foi mutagênico às linhagens TA97a e TA98 sem ativação metabólica, induzindo um aumento significativo na frequência de revertentes por placa. Após a ativação metabólica com S9, não foi observada atividade mutagênica. Dessa forma, os resultados demonstram que o extrato apresenta compostos que ocasionam mutações do tipo *frameshift* e que atuam diretamente no DNA. Os dados da Tabela 3 indicam que, após a ativação metabólica, compostos que causam mutação nas linhagens TA98 e TA97a perderam sua atividade. Não foi observada atividade mutagênica nas linhagens TA100 e TA 102.

Para a linhagem TA 98, sem ativação metabólica, observa-se atividade mutagênica para a concentração de 5,0 mg de extrato por placa, mas não para a concentração de 7,5 mg de extrato por placa. Esse fato pode ser explicado, pois a concentração de 7,5 mg de extrato por placa foi a menor concentração que apresentou citotoxicidade em testes preliminares. Dessa forma, o número de revertentes menor pode ser atribuído à morte de colônias da linhagem.

Para o extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora* (Tabela 19), os resultados obtidos com as linhagens TA100, TA102 e TA98 em ausência de metabolização (-S9) foram considerados negativos porque o extrato não induziu aumento significativo do número de mutantes revertentes por placa e suas razões de mutagenicidade (RM) foram todos menores que 2. Com a linhagem TA97a o extrato apresentou mutagenicidade pois aumentou significativamente o número de revertentes por placa e a RM para a concentração de 10 µg por placa foi igual a 2. Em presença de metabolização os resultados foram todos negativos independentemente da linhagem utilizada.

Tabela 18. Atividade mutagênica expressa como a média e desvio padrão do número de revertentes por placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas ao extrato hidroalcoólico de *P. torta*, em várias concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Número de revertentes his+/placa em <i>Salmonella typhimurium</i>								
	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO	18 ± 7	30 ± 5	142 ± 6	201 ± 14	150 ± 6	170 ± 12	121 ± 13	241 ± 14
0.62	19 ± 2 (1.0)	24 ± 3 (0.8)	147 ± 7 (1.0)	197 ± 20 (0.9)	159 ± 25 (1.0)	155 ± 11 (0.9)	136 ± 18 (1.1)	266 ± 15 (1.1)
1.25	28 ± 4 (1.5)	28 ± 5 (0.9)	180 ± 26 (1.3)	193 ± 26 (0.9)	181 ± 12 (1.2)	181 ± 12 (1.0)	128 ± 8 (1.0)	261 ± 17 (1.0)
2.5	32 ± 5 (1.7)	22 ± 2 (0.7)	228 ± 37 (1.6)	201 ± 8 (1.0)	208 ± 14 (1.4)	153 ± 19 (0.9)	118 ± 15 (1.0)	258 ± 10 (1.0)
5.0	49 ± 1** (2.7)	22 ± 3 (0.7)	218 ± 14 (1.5)	198 ± 4 (0.9)	344 ± 30** (2.3)	193 ± 23 (1.1)	129 ± 6 (1.1)	247 ± 16 (1.0)
7.5	25 ± 4 (1.3)	22 ± 5 (0.7)	155 ± 26 (1.0)	176 ± 15 (0.8)	363 ± 30** (2.4)	199 ± 26 (1.1)	131 ± 7 (1.1)	232 ± 22 (0.9)
Controle +	492 ± 69 ^a	540 ± 51 ^b	1629 ± 332 ^c	2119 ± 413 ^b	1255 ± 291 ^a	1330 ± 70 ^b	835 ± 22 ^d	969 ± 57 ^e

DMSO – 75 µL/placa; Controle +: Controle positivo: ^a 4-nitro-o-fenilenodiamina (10.0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1.25 µg/placa); ^c Azida sódica (2.5 µg/placa); ^d Mitomicina (0.5 µg/placa); ^e 2-aminofluoreno (10.0 µg/placa). ** Mutagenicidade P ≤ 0.01 ANOVA.

Tabela 19. Atividade mutagênica expressa como a média e desvio padrão do número de revertentes por placa nas linhagens bacterianas TA98, TA100, TA97a e TA102 expostas ao extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora*, em várias concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Número de revertentes his+/placa em <i>Salmonella typhimurium</i>								
	TA98		TA100		TA97a		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO	24 ± 0	36 ± 12	171 ± 3	153 ± 15	154 ± 4	214 ± 26	289 ± 8	330 ± 3
1,25	25 ± 1 (1,0)	33 ± 6 (0,9)	167 ± 6 (1,0)	120 ± 11 (0,8)	154 ± 12 (1,0)	217 ± 11 (1,0)	341 ± 22 (1,2)	336 ± 27 (1,0)
2,5	28 ± 4 (1,2)	28 ± 10 (0,8)	160 ± 23 (0,9)	137 ± 15 (0,9)	163 ± 16 (1,1)	194 ± 14 (0,9)	323 ± 10 (1,1)	296 ± 16 (0,9)
5	36 ± 5 (1,5)	26 ± 4 (0,7)	171 ± 6 (1,0)	142 ± 3 (1,0)	238 ± 32 (1,5)	234 ± 6 (1,1)	390 ± 23 (1,3)	265 ± 3 (0,8)
7,5	40 ± 1 (1,7)	21 ± 7 (0,6)	202 ± 14 (1,2)	131 ± 19 (0,9)	269 ± 10 (1,8)	237 ± 4 (1,1)	418 ± 11 (1,5)	280 ± 20 (0,9)
10	35 ± 3 (1,5)	27 ± 8 (0,8)	230 ± 49 (1,4)	116 ± 13 (0,8)	314 ± 9 (2,0)**	228 ± 11 (1,1)	386 ± 33 (1,3)	255 ± 14 (0,8)
Controle +	3520 ± 579	2186 ± 444	1099 ± 102	1989 ± 39	2056 ± 186	2599 ± 194	2406 ± 229	1593 ± 12

DMSO – 75 µL/placa; Controle +: Controle positivo: ^a 4-nitro-o-fenilenodiamina (10.0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1.25 µg/placa); ^c Azida sódica (2.5 µg/placa); ^d Mitomicina (0.5 µg/placa); ^e 2-aminofluoreno (10.0 µg/placa). ** Mutagenicidade P ≤ 0.01 ANOVA.

É sabido que o ácido gálico, presente nos extratos estudados, não apresenta mutagenicidade pelo teste de Ames (CHEN e CHUNG, 2000) e, ainda, pode apresentar atividade antimutagênica (ABDELWAHED et al., 2007; STICH et al.,

1982). Entretanto, alguns compostos fenólicos, apesar de apresentar atividade antioxidante, apresentam atividade mutagênica em testes *in vitro*.

Bhattacharya (2011) cita a ocorrência de algumas substâncias que possuem efeito anti ou pro mutagênico de acordo com a dose testada. O autor denomina esses compostos Janus carcinógenos, uma alusão ao deus romano Janus, que possuía duas faces: uma voltada para frente e outra para trás.

A literatura comprova que flavonóis com atividade antioxidante como a quercetina, kaempferol, fisetina e miricetina também apresentam atividade mutagênica pelo teste de Ames (CZECZOT et al., 2000; ONG e KHOO, 1997; RESENDE, 2012).

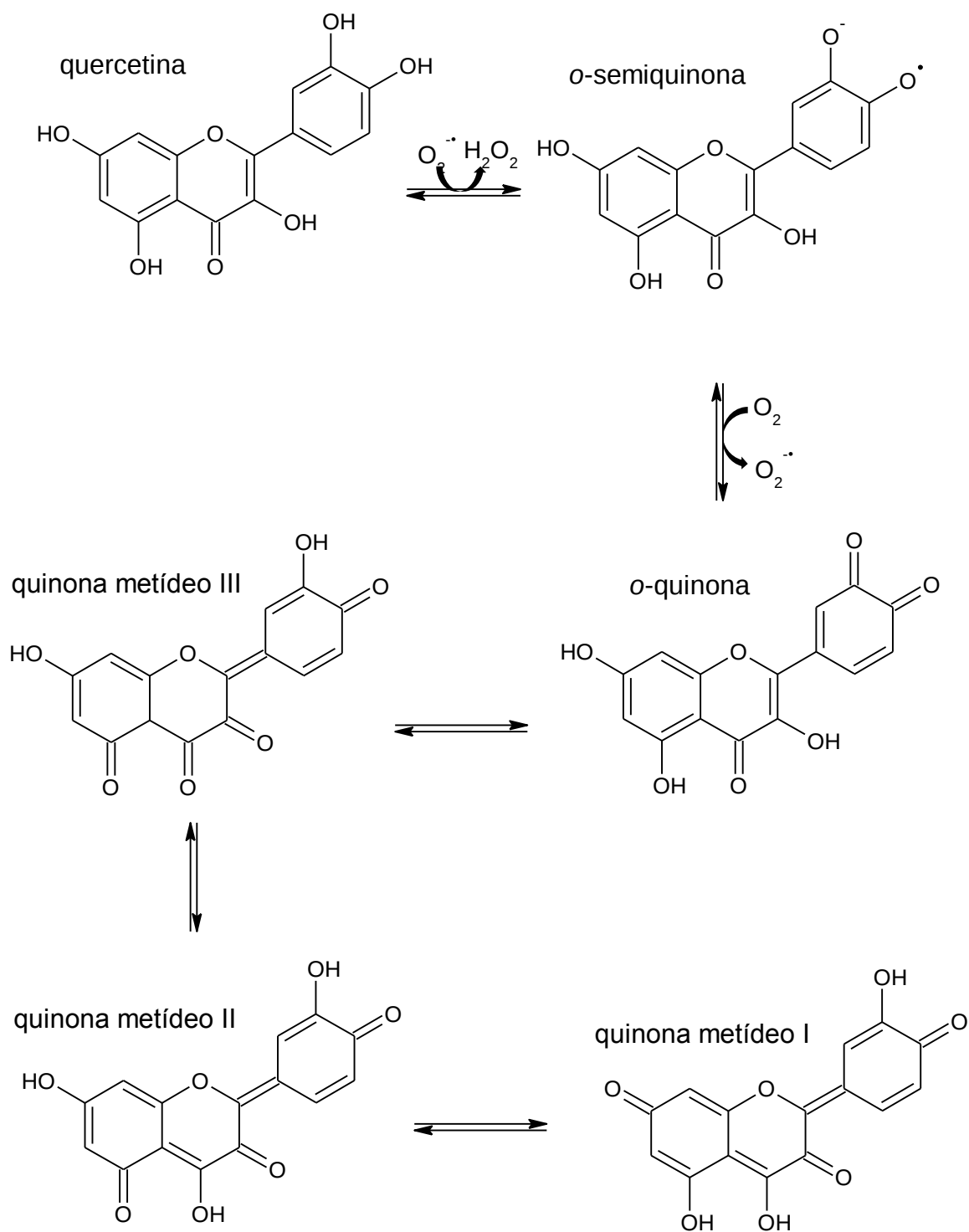
Embora o maior teor de flavonoides totais tenha sido encontrado no extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora*, o extrato de *P. torta* apresentou atividade mutagênica *in vitro* em menores concentrações. Se fizermos uma relação entre o teor de flavonoides totais e o teor de fenóis totais, encontraremos valores de 1,38 para *P. torta* e 0,39 para *P. ramiflora*, o que indica que em *P. torta* os flavonoides, alguns dos quais pode ser atribuída atividade mutagênica, se encontram em maior quantidade com relação aos compostos fenólicos, como o ácido gálico, com atividade antimutagência (ABDELWAHED et al., 2007). Assim sendo, a atividade mutagênica apresentada pelos extratos depende de uma matriz complexa, onde as substâncias podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos sobre as atividades químicas e biológicas umas das outras.

Segundo Yoshino et al. (1999), a miricetina apresenta atividade mutagênica mais pronunciada do que a observada para quercetina. Ela possui as mesmas características moleculares da quercetina, diferindo na presença de uma sexta hidroxila no carbono 5' do anel B, o que resulta em maior reatividade. A miricetina é um flavonol amplamente distribuído em plantas comestíveis e, embora seja comprovadamente genotóxico em bactérias e induza uma significativa degradação de DNA dependente da concentração, concorrente com a peroxidação lipídica, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos de genotoxicidade apresentados (SILVA et al., 1996).

Rietjens et al. (2005) relatam que a atividade mutagênica dos flavonóis se relaciona com sua estrutura quinona/quinona metídeo. Baseado nisso, uma via de ativação por flavonóis de espécies DNA-reativas foi proposta (Figura 63), que inclui oxidação química ou enzimática a *orto*-quinona, seguida pela isomerização de *orto*-quinona a quinona metídeos, sendo estes os potenciais intermediários ativos da alquilação de DNA-reativos. Dessa forma, pode-se inferir que os flavonóis presentes nas folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* contribuem para as mutações induzidas.

Eventos mutacionais podem representar sérios riscos à saúde humana. Mutações estão envolvidas nas etapas iniciais de doenças degenerativas, como câncer. Assim, os resultados apresentados reforçam os riscos do uso indiscriminado da fitoterapia e a importância da pesquisa sobre a mutagenicidade de compostos extraídos de plantas, especialmente daquelas utilizadas na medicina popular ou como alimento.

Figura 63. Via oxidativa da quercetina a *o*-semiquinona, *o*-quinona e quinona metídeo.



CONCLUSÕES

O estudo dos extratos hidroalcoólicos de *P. torta* e *P. ramiflora* neste trabalho possibilitou a identificação de metabólitos secundários e a padronização dos extratos pela quantificação de seus marcadores químicos: miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo e miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo.

A utilização das técnicas de HPLC-ESI-IT-MS/MS, HPLC-ESI-QTRAP-MS e ESI-IT-MS/MS possibilitou avaliar de maneira rápida a composição química dos extratos, com a identificação de treze substâncias presentes nos extratos.

As duas espécies, quando avaliadas por HPLC-DAD, exibiram o mesmo perfil flavonoídico, porém apresentaram diferenças significativas na concentração de seus marcadores químicos, flavonoides e fenóis totais.

Os teores de miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo encontrados foram de 2,53 e 13,55 mg.g⁻¹ de extrato para *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente. Para miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo foi encontrado 1,33 mg.g⁻¹ de extrato de *P. torta*. Os valores encontrados para miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo foram de 2,20 e 9,61 mg.g⁻¹ de extrato para *P. torta* e *P. ramiflora*, respectivamente.

O extrato hidroalcoólico *Pouteria torta* apresentou 11,66 mg.g⁻¹ de fenóis totais, 16,11 mg.g⁻¹ de flavonoides totais e IC₅₀ igual a 3,83 mg.mL⁻¹, enquanto a infusão das folhas apresentou 90,83 mg.g⁻¹ de infuso de fenóis totais e 5,56 mg.g⁻¹ de infuso de flavonoides totais, com IC₅₀ igual a 0,53 mg.mL⁻¹.

Pouteria ramiflora apresentou 125,87 mg.g⁻¹ de fenóis totais, 48,82 mg.g⁻¹ de flavonoides totais e IC₅₀ igual a 0,18 mg.mL⁻¹ para o extrato hidroalcoólico. O teor de fenóis totais na infusão folhas de *P. ramiflora* foi de 55,85 mg.g⁻¹ de infuso, enquanto o teor de flavonoides totais foi de 27,84 mg.g⁻¹ de infuso, que apresentou IC₅₀ igual a 2,62 mg.mL⁻¹.

Ambos os extratos apresentaram atividade mutagênica *in vitro* pelo Teste de Ames. O extrato hidroalcoólico de *P. torta* apresentou mutagenicidade às linhagens TA97a e TA98, enquanto o extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora* apresentou mutagenicidade à linhagem TA97a, em ausência de metabolização.

Os resultados apresentados para a atividade mutagênica *in vitro* apontam para a necessidade de investigações criteriosas da mutagenicidade *in vivo* destas espécies, que têm utilização comprovada na medicina popular.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, A. et al. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: confirmation by microarray expression profiling. **Chem.-Biol. Interact.**, v. 165, n. 1, p. 1-13, Jan. 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. 15 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 20 abr. 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004**: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2004. 7 p. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 39, de 5 de junho de 2008**: aprova o regulamento para a realização de pesquisa clínica e dá outras providências. Brasília, 2008. 14 p. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsssp/bibliote/informe_eletronico/2008/iels.junho.08/iels104/U_RS-ANVISA-RDC-39_050608.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2010. 6 p. Disponível em: <http://fcfrp.usp.br/dcf/download.php?file=arquivos/docentes/6/77.pdf&name_file=RD C%2014%20-2010.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 13, de 14 de março de 2013**: dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de produtos tradicionais e fitoterápicos. Brasília, 2013. 20 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0013_14_03_2013.html>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- AGRIPINO, D. G. et al. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest - ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotrop.**, v. 4, n. 2, p. 1-15, set. 2005.
- ALVES-ARAUJO, A. **Pouteria torta (Mart.) Radlk.** In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, c2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14518>>. Acesso em: 25 maio 2014.
- ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. (Ed.). **Flavonoids**: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press, 2006. 1237 p.

- BECCHI, M.; FRAISSE, D. Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. **Environ. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 2, p. 122-130, Feb. 1989.
- BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutat. Res.**, v. 97, n. 4, p. 267-281, Aug. 1982.
- BHATTACHARYA, S. Natural antimutagens: a review. **Res. J. Med. Plant**, v. 5, n. 2, p. 116-126, 2011.
- BOLETI, A. P. A. et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lecitin-like properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, Apr. 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci. Technol.**, v. 28, n. 1, p. 25-30, June 1995.
- BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia de assuntos jurídicos. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**: Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, 2006. Disponível em: < https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, v. 686, n. 1, p. 3-10, Nov. 1996.
- CARDOSO, C. A. L. et al. Quantification of flavonoids, naphthopyranones and xanthenes in *Euriocaulaceae* species by LC-PDA. **Am. J. Anal. Chem.**, v. 3, p. 138-146, Feb. 2012.
- CASTRO, C. F. de S. et al. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** Disponível em: < <https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T1446-2.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2012.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. **J. Funct. Foods**, v. 3, n. 3, p. 144-158, July 2001.
- CHE, C. T. et al. Triterpenes of *Pouteria torta*. **J. Nat. Prod.**, v. 43, n. 3, p. 420-421, May 1980.
- CHEN, S.; CHUNG, K. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, n. 1, p. 1-5, Jan. 2000.
- CHUN, J. et al. Isolation and identification of alkaloids and anthocyanins from flower and bulb of *Lycoris radiata* using HPLC and LC-ESI-MS. **J. Agric. Chem. Environ.**, v. 2, n. 1, p. 22-26, Feb. 2013.

COSTA, A. V. et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Metab. Brain Dis.**, v. 28, n. 3, p. 411-419, Sept. 2013.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **J. Mass Spectrom.**, v. 39, n. 1, p. 1-15, Jan. 2004.

CZECZOT, H. et al. Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. **Mutat. Res.**, v. 240, n. 3, p. 209-216, Mar. 1990.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, p. 71-76, set./out. 2004.

DRASARA, P.; MORAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **J. Chromatogr. B**, v. 812, n. 1-2, p. 3-21, Dec. 2004.

ELIAS, S. T. et al. Cytotoxic effect of *Pouteria torta* leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. **J. Can. Res. Ther.**, v. 9, n. 4, p. 601-606, Oct./Dec. 2013.

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **J. Am. Assoc. Mass Spectrom.**, v. 12, n. 6, p. 707-715, June 2001.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 12, p. 3579-3585, June 2002.

FERRERES, F. et al. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). **Phytochem. Anal.**, v. 14, n. 6, p. 352-359, Nov./Dec. 2003.

FONTES JUNIOR, E. A. et al. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 28, n. 6, p. 812-818, July 2009.

FRANSON, M. A. H. (Ed.). **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association: American Water Works Association: Water Environment Federation, 2005. 1325 p.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, July 2000.

GHASEMZADEH, A. et al. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, v. 15, p. 4324-4333, June 2010.

GOUVEIA, N. M. et al. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 85, n. 3, p. 1141-1148, set. 2013.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. *Artemisia annua* L.: essencial oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. **Ind. Crops Prod.**, v. 45, p. 170-181, Dec. 2013.

HAN, J. et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, n. 2, p. 430-438, June 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, n. 2/3, p. 67-202, Nov./Dec. 2002.

HIDALGO, M.; SANCHÉZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chem.**, v. 121, n. 3, p. 691-696, Aug. 2010.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 38, n. 1, p. 43-49, Jan. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, Brasília, 2003. 36 p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2013.

IRAKLI, M. N. et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. **J. Sep. Sci.**, v. 35, n. 13, p. 1603-1611, July 2012.

ISHII, K.; KOIKE, K.; OHMOTO, T. Javanicinosides D-H, quassinoids glucosides from *Pricasma javanica*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 4099-4103, 1991.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **J. Org. Chem.**, v. 21, n. 12, p. 1395-1401, Dec. 1956.

KÄHKÖNEN, M.P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, Sept. 1999.

KANCHEVA, V. D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: a comparative study. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 111, n. 11, p. 1072-1089, Nov. 2009.

KUHLMANN, M. **Frutos atrativos do cerrado**. 2014a. Disponível em: <<http://www.frutosatrativosdocerrado.bio.br/76-especies/32-frutos-grandes/192-curriola-b>>. Acesso em: 25 maio 2014.

KUHLMANN, M. **Frutos atrativos do cerrado**. 2014b. Disponível em: <<http://www.frutosatrativosdocerrado.bio.br/76-especies/32-frutos-grandes/191-curriola>>. Acesso em: 25 maio 2014.

LEMIEUX, R. U.; STEVENS, J. D. The proton magnetic resonance spectra and tautomeric equilibria of aldoses in deuterium oxide. **Can. J. Chem.**, v. 44, p. 249-262, 1966.

LI, Q. M. et al. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **J. Chromatogr. B**, v. 562, n. 1-2, p. 435-446, Jan. 1991.

LI, Q. M. et al. Differentiation of 6-C and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. **Biol. Mass Spectrom.**, v. 21, n. 4, p. 213-221, Apr. 1992.

LIU, M. et al. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix salviae* Miltiorrhizae. **J. Chromatogr. A**, v. 1157, n. 1/2, p. 51-55, July 2007.

LOPES, G. L. **Vista da espécie com folhas e frutos verdes**. Irati: Laboratório de Manejo Florestal, 2012. Foto 2. Disponível em:
<<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/6550-2/>>. Acesso em: 25 maio 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1992. 352 p.

MA, J. et al. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 19, p. 5873-5878, Sep. 2004.

MABRY, I. G.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MABRY, T. J.; ULUBELEN, A. Flavonoids and related plant phenolics. In : WALLER, G. R.; DERMER, O. C. (Ed.). **Biochemical applications of mass spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, 1980. cap. 35, p. 1132-1158.

MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A.; MANOSROI, J. In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 101, n. 1/3, p. 90-94, Oct. 2005.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, May 1983.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 380-385, abr./jun. 2006.

MESQUITA, M. L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 1232, n. 3, p. 439-445, June 2009.

MONTENEGRO, L.H.M. et al. Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvícida, anti-radicalar e anticolinesterástico de *Pouteria venosa* L (Sapotaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 611-617, dez. 2006.

NUENGCHAMNONG, N.; KRITTASILP, K.; INGKANINAN, K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC–ESI–MS coupled with DPPH assay. **Food Chem.**, v. 177, n. 4, p. 750-756, Dec. 2009.

ONG, K. C.; KHOO, H. Biological effects of myricetin. **Gen. Pharmac.**, v. 29, n. 2, p. 121-126, Aug. 1997.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, Oct. 2001.

PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthone from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, Oct. 2003.

PAWAN, K. A. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307-3330, Oct. 1992.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Quím. Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, jan. 2010.

PERFEITO, J. P. et al. Characterization na biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 183-186, set. 2005.

PRISTA, L. N. **Tecnologia farmaceutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 3., 786 p.

PROESTOS, C. et al. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chem.**, v. 95, n. 4, p. 664-671, Apr. 2006.

RAK, G.; FODOR, P.; ABRANKÓ, L. Three-step HPLC–ESI–MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 290, n. 1, p. 32-38, Feb. 2010.

RESENDE, F. A. et al. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5255-5268, May 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun. 2004.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, n. 4, p. 152-159, Apr. 1997.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of própolis from eight Brazilian localities. **J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.**, v. 2013, Mar. 2013. DOI <http://dx.doi.org/10.1155/2013/267878>.

RINALDO, D. et al. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, n. 8, p. 726-733, Aug. 2010.

RIETJENS, I. M. C. M. et al. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutat. Res.**, v. 574, n. 1-2, p. 124-178, July 2005.

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

RODRIGUES, C. M. et al. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochem. Anal.**, v. 19, p. 17-24, July 2008.

RODRÍGUEZ-MEDINA, I. C.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, n. 23, p. 4736-4744, June 2009.

RÖSCH, D. et al. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 15, p. 4233-4239, June 2003.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, July 2013.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **J. Mass Spectrom.**, v. 38, n. 1, p. 35-42, Jan. 2003.

SANTOS, F. V. et al. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, n. 9, p. 1585-1589, Sept. 2006.

SCHIEBER, A.; BERARDINI, N.; CARLE, R. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 17, p. 5006-5011, July 2003.

SILVA, A. C. Z. et al. Isolamento e identificação de flavonóides em *Pouteria torta*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Resumos...** Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_37991107809.pdf>. Acesso em: 25 out. 2010.

- SILVA, I. D. et al. Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: involvement of radicalar species. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, v. 16, n. 5, p. 253-268, 1996.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.
- SOUZA, P. M. et al. Plants from Brazilian cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **PLoS One**, v. 7, n. 11, Nov. 2012a. DOI 10.1371/journal.pone.0048589.
- SOUZA, P. M. et al. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta Med.**, v. 78, n. 4, p. 393-399, Mar. 2012b.
- SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, n. 6, p. 753-758, June 2003.
- STICH, H. F.; ROSIN, M. P.; BRYSON, L. Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. **Mutat. Res.**, v. 95, n. 2/3, p. 119-128, Aug. 1982.
- SWATSITANG, P. et al. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. **Anal. Chim. Acta**, v. 417, n. 2, p. 231-240, July 2000.
- SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, n. 2, p. 101-130, Apr. 2005.
- TIAN, G. et al. Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 886, n. 1/2, p. 309-312, July 2000.
- TIKHONOV, I.; ROGINSKY, V.; PLISS, E. The chain-breaking antioxidant activity of phenolic compounds with different numbers of O-H groups as determined during the oxidation of styrene. **Int. J. Chem. Kinet.**, v. 41, n. 2, p. 92-100, July 2008.
- TRIONO, T. et al. A phylogeny of *Pouteria* (Sapotaceae) from Malesia and Australasia. **Aust. Syst. Bot.**, v. 20, n. 2, p. 107-118, Apr. 2007.
- VENUPRASAD, M. P. et al. Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. **S. Afr. J. Bot.**, v. 92, p. 151-159, May 2014.
- WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 303 p.
- YOSHINO, M. et al. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Mol. Genet. Metab.**, v. 68, n. 4, p. 468-472, Dec. 1999.