



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Química



Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antirradicalar de
Caesalpinia ferrea

CARLOS CÉSAR WYREPKOWSKI

Araraquara
2014

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Química

**Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antirradicalar de
*Caesalpinia ferrea***

CARLOS CÉSAR WYREPKOWSKI

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

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Adilson Paulo Senhorin

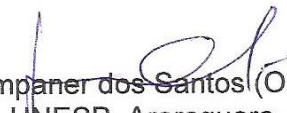
**Araraquara
2014**

CARLOS CÉSAR WYREPKOWSKI

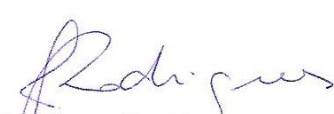
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, no âmbito do
Programa DINTER – CAPES com o Instituto
Federal do Mato Grosso, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Química.

Araraquara, 05 de setembro de 2014.

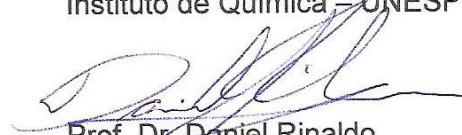
BANCA EXAMINADORA



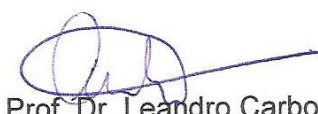
Prof^a Dr^a Lourdes Campaner dos Santos (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Dr^a Juliana Rodrigues
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru - SP



Prof. Dr. Leandro Carbo
Núcleo Avançado de Jaciara – IFMT, Campus São Vicente - MT



Prof^a Dr^a Cássia Regina Primila Cardoso
Instituto de Ciências da Saúde – UFMT, Sinop - MT

Súmula curricular

1. Dados pessoais

Nome: Carlos César Wyrepkowski

Filiação: Sergio Wyrepkowski e Tereza Lukasevich Wyrepkowski

Naturalidade: Santo Cristo RS

E-mail: carlos.wyrepkowski@iffarroupilha.edu.br

2. Formação acadêmica

Graduação

Instituição: UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Local: Santa Rosa RS.

Curso: Licenciatura em Ciências.

Período: 03/1999 – 02/2004.

Pós-graduação

Mestrado

Instituição: UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso.

Mestre em Física e Meio Ambiente – Área de concentração: Mudanças Climáticas Globais.

Título da dissertação: Avaliação das Propriedades Ópticas dos Aerossóis na Atmosfera de Cuiabá com base na Rede AERONET.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Jorge.

Bolsista: CAPES (período 03/2006 – 02/2008).

Local: Cuiabá MT.

Período: 03/2006 – 02/2008.

Doutorado

Instituição: UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto de Química.

Título da tese: Estudo Químico e Atividades Mutagênica e Antirradicalar de *Caesalpinia ferrea*.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Adilson Paulo Sinhorin.

Bolsista: CAPES (período 03/2013 – 01/2014).

Local: Araraquara SP.

Período: 08/2010 – 08/2014.

3. Atuação profissional

- Vínculo: SERVIDOR PUBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva. Instituto Federal Farroupilha. Início: Dezembro de 2013 à Atual.
- Vínculo: SERVIDOR PUBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva. Instituto Federal de Mato Grosso. Início: Janeiro de 2010 à Dezembro de 2013.
- Vínculo: SERVIDOR PUBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR SUBSTITUTO, Carga horária: 40, Regime: Contratado. Universidade do Federal de Mato Grosso. Início: Janeiro de 2008 à Dezembro de 2009.
- Vínculo: SERVIDOR PUBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 20, Regime: Contratado. Universidade do Estado de Mato Grosso. Início: Janeiro de 2009 à Dezembro de 2009.
- Vínculo: PROFESSOR VISITANTE, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 10, Regime: Contratado. Fasipe Centro Educacional. Início: Março de 2008 à Dezembro de 2009.
- Vínculo: SERVIDO PÚBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 30, Regime: 30 horas. Escola Estadual Osvaldo Paula Início: Agosto de 2007 à Dezembro de 2009.
- Bolsista Capes. Universidade Federal de Mato Grosso. Início: Março de 2006 à Fevereiro de 2008.
- Vínculo: CONTRATO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 11, Regime: Contratado. Colégio Jesus Maria José. Início: Fevereiro de 2005 à Dezembro de 2005.
- Vínculo: SERVIDOR PÚBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 24, Regime: Contratado. Secretaria do Estado de Mato Grosso. Início: Fevereiro de 2005 à Dezembro de 2005.
- Vínculo: CONTRATO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 10, Regime: Contratado. Escola de Educação Básica Rui Barbosa. Início: Fevereiro de 2004 à Dezembro de 2005.
- Vínculo: SERVIDOR PUBLICO, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 30, Regime: Contratado. Secretaria do Estado de Mato Grosso. Início: Fevereiro de 2004 à Dezembro de 2004.

4. Publicações

1. **Wyrepkowski, C. C.**; Almeida Filho, E. O. de; Jorge, A.; De Musis, C. R.; Nogueira, J. S. Composição multielementar e fontes de emissão de aerossóis atmosféricos em Cuiabá de 1992 à 1995. **Ciência e Natura**, v. 29, p. 27-42, 2007.
2. Silvino, A. N. O.; Silveira, A.; De Musis, C. R.; **Wyrepkowski, C. C.**; Conceição, F. T. Determinação de Vazões Extremas para Diversos Períodos de Retorno para o Rio Paraguai utilizando Métodos Estatísticos. **Geociências**, v. 26, p. 369-378, 2007.
3. Santana, A. O.; Gaio, D. C.; **Wyrepkowski, C. C.**; Campello Júnior, J. H.; Lobo, F. A.; Nogueira, J. S.; Sanches, L.; Palu, A. E. R.; Rodrigues, V. Eficiência de Utilização da Radiação Fotossinteticamente Ativa na Produção de Matéria Seca de uma Pastagem mista no Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 15, p. 299-303, 2007.

5. Trabalhos submetidos à publicação

1. **Carlos C. Wyrepkowski**, Daryne L. M. G. da Costa, Adilson P. Sinhorin, Wagner Vilegas, Rone A. De Grandis, Flavia A. Resende, Eliana A. Varanda e Lourdes Campaner dos Santos. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark, and Evaluation of Their Mutagenic Activity Autores. Molecules, 2014, submetido.

6. Trabalhos apresentados em Congressos

1. **Wyrepkowski, C. C.**; Sinhorin, A. P.; Santos, L. C. Quantificação do ácido elágico por HPLC-DAD no extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*. In: 37 RASBQ, 2014, Natal/RN. O papel da química no cenário econômico atual: competitividade com responsabilidade, 2014.
2. Kafer, G. A.; **Wyrepkowski, C. C.**; Quartieri, M. T.; Oliveira, E. C.; Marchi, M. I. Ambientes Virtuais de Aprendizagem: Uma Ferramenta para o Ensino de Química. In: 37 RASBQ, 2014, Natal/RN. O papel da química no cenário econômico atual: competitividade com responsabilidade, 2014.
3. De Grandis, R. A.; Muller, M. M.; **Wyrepkowski, C. C.**; Resende, F. A.; Sinhorin, A. P.; Rocha, C. Q.; Santos, L. C.; Varanda, E. A. Evaluation of the mutagenic activity of ethanolic

extract of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Caesalpinioideae) by Salmonella/Microsome assay (Ames test). In: 59º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia. Sessão de Painéis do 59º CBG, 2013.

4. **Wyrepkowski, C. C.**; Liberal, L. N.; Reis, F. S. Estudo das condições meteorológicas e concentração do material particulado das regiões Sul e Noroeste de Mato Grosso. In: II Fórum Mundial de Educação Profissional e Tecnológica, 2012, Florianópolis.

5. **Wyrepkowski, C. C.**; Kafer, G. A.; Freitas, T.; Bepalhuk, K. J. Aprendizagem sobre Propriedades Coligativas a partir de uma Metodologia Diferenciada. In: 9º Simpósio Brasileiro de Educação Química, Natal, 2011.

6. Kafer, G. A.; **Wyrepkowski, C. C.** Combustíveis Alternativos: um Tema para o Ensino de Química Utilizando Mapas Conceituais. In: 9º Simpósio Brasileiro de Educação Química, Natal, 2011.

7. Santos, P. F.; Fonseca, O. J. T.; Avelar, S.; Silveira, M. D.; **Wyrepkowski, C. C.** Ecossistemas nos Livros Didáticos: A Imagem como um Instrumento Mediador da Compreensão. In: 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010.

8. Kafer, G. A.; **Wyrepkowski, C. C.**; Castro, E. B. Derivados do Petróleo: Um tema para o ensino significativo. In: 16º Semiedu, Cuiabá, 2008.

7. Orientações

Orientações de monografia de conclusão de curso de especialização

1) Maria Cleuza Sebastião da Costa. O PROEJA como um meio viável para a ressocialização no Sistema Penitenciário do município de Juína-MT. 2012. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Educação Profissional Integrada a Educação Básica na Modalidade EJA) - Instituto Federal de Mato Grosso.

2) Neusimar Gonçalves da Rocha. Evasão escolar: uma realidade no PROEJA do IFMT-Campus Juína. 2012. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Educação Profissional Integrada a Educação Básica na Modalidade EJA) - Instituto Federal de Mato Grosso.

3) Gabriel Silveira Capobianco. Biodigestor como alternativa de ensino de ciências da natureza e da matemática para educação de jovens e adultos - PROEJA. 2012. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Educação Profissional Integrada a Educação Básica na Modalidade EJA) - Instituto Federal de Mato Grosso.

Orientações de alunos de Iniciação Científica no IFMT-Campus Juína

5 Orientações concluídas.

Orientações de Estágio do Curso Técnico em Meio Ambiente IFMT-Campus Juína

10 Orientações concluídas.

**As tarefas que nos propomos,
devem conter exigências que pareçam ir
além de nossas forças.
Caso contrário, não descobrimos nosso poder,
nem conhecemos nossas energias escondidas e
assim deixamos de crescer.**

Leonardo Boff

Ao meu pai, **Sergio Wyrepkowski**, que não pode estar comigo até o fim do doutorado, mas, onde quer que esteja, espero tê-lo feito orgulhoso. Penso as vezes que a vida é injusta, pois faz muita falta. Saudades...

Aos meus pais, **Sergio (in memoriam)** e **Tereza**, que sempre me apoiaram, me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los. Muito obrigado, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

A você **Giovana**, companheira no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis e compartilhou comigo as alegrias.

Aos meus filhos, **Arthur**, **Augusto** e **Ana Laura**, que tiveram que suportar minha ausência em diversos momentos, para que esse trabalho pudesse ser realizado. Amo muito vocês.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado, me dando força e guiando meus caminhos.

À Professora Dra. Lourdes Campaner dos Santos por me aceitar como seu aluno de Doutorado, mesmo depois de transcorridos dezesseis meses do ingresso na pós-graduação. Agradeço pela excelente orientação, ensinamentos, dedicação, generosidade, compreensão, paciência (e não foi pouca) e pelos exemplos de postura na ciência, na ética e na vida.

Ao professor Dr. Adilson Paulo Senhorin pela amizade, apoio, oportunidades, confiança e ensinamentos.

Aos professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito.

À minha esposa Giovana, pelo amor, companheirismo, dedicação, apoio, ajuda e compreensão pelos momentos ausentes.

Aos meus filhos Arthur, Augusto e Ana Laura. O amor por vocês me deu forças e coragem para encarar toda e qualquer atribulação. Pela compreensão da ausência em momentos importantes na vida de vocês (Primeira comunhão, apresentação do dia dos pais no CTG e outros).

À toda minha família, em especial meu pai (*in memoriam*) e minha mãe, por estarem sempre me apoiando e me ajudando.

Aos colegas do grupo de Fitoquímica, pelo apoio, amizade, discussões, ensinamentos e por toda ajuda prestada, em especial: Felipe Hilário, Ana Zanatta, Daryne Lu Maldonado, Cláudia Rocha, Marcelo Amorin, Francisco Mininel, Carlos Sergio e Cássia Cardoso.

A Edith Petrica pela amizade, apoio, companheirismo e por toda ajuda prestada.

Aos colegas dos Laboratórios de Fitoquímica da UFMT-Campus Sinop e do IQ da Unesp: Hocelayne, Luiz Rialto, Silvia, Lima Neto, Marcelo Farma, Weslei, Pedrinho, Samara, Maria do Socorro e Guilherme. Agradeço pela convivência e amizade.

Aos alunos de IC que orientei no IFMT-Campus Juína, pela ajuda prestada: Ketholyn, Lígia, Thaís, Fabiana, Rafael e José.

Aos professores: Assis, Sadao, Pilar, Alberto, Isabele, Dulce, Daniel e Angela, que de alguma forma influenciaram meu trabalho e vivência no Doutorado.

Ao Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT), especialmente aos Diretores Geral e de Ensino do Campus Juína e colegas professores pelo apoio e trocas de horários de aulas para viabilizar minha participação no curso de Doutorado.

Ao Instituto Federal Farroupilha, especialmente aos Professores Rodrigo Machado, Joseane, Rúbia, Giovana, Jussara, Graciela e aos demais colegas pelo apoio integral para viabilizar o término dos experimentos no Laboratório de Fitoquímica do IQ da Unesp e escrita da tese.

Aos amigos Célio, Fernanda, Francisco, Neiva, Leonir, Márcio Fonseca, Leandro, Ademária, que sempre me ouviram, me auxiliaram e me cederam a mão amiga.

A todos os colegas do DINTER e amigos da Pós-graduação em Química pela amizade e companheirismo, especialmente: Daryne, Marestoni, Demétrio, Oalas, Deiver, Christiann, Dayane e Eucarlos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela aprovação e suporte financeiro ao DINTER e pela bolsa de estudos concedida.

Pela parceria do DINTER entre o Instituto Federal de Mato Grosso e Unesp, Instituto de Química de Araraquara (Instituição com excelente corpo docente e infra-estrutura).

À Profa. Dra. Eliana Ap. Varanda, Rone De Grandis e Flávia Resende, da FCFAr-Unesp, pela realização dos ensaios de mutagenicidade.

Ao Professor Dr. Wagner Vilegas, pela realização dos experimentos de MS.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela realização dos espectros de RMN.

À Ana Livia, Marília e Alberto, pela realização dos experimentos de MS.

À Juliana Rodrigues, por contribuições e orientações prestadas com o HPLC.

À Bióloga Márcia Cleia Vilela dos Santos da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop, pela identificação da espécie *Caesalpinia ferrea*.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação, especialmente: Célia, Sandra, Wennia e Cíntia, pela dedicação aos assuntos relacionados à coordenação do curso de pós-graduação.

Às funcionárias da biblioteca pela ajuda e orientações prestadas.

À todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo o meu sincero reconhecimento.

RESUMO

Caesalpinia ferrea Mart. pertence à família Fabaceae (Caesalpinioideae), cresce em todo o território brasileiro, sendo largamente distribuída nas regiões norte e nordeste, conhecida vulgarmente como pau-ferro ou jucá. Neste trabalho, foi realizado o estudo fitoquímico, a determinação quantitativa de metabólitos secundários, a avaliação das atividades mutagênica e antirradicalar e a determinação dos teores de fenóis totais do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. Análises por HPLC-ESI-IT-MS (*High Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Ion Trap – Mass Spectrometry*) e FIA-ESI-IT-MSⁿ (*Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap – Mass Spectrometry*), modo negativo, permitiram identificar vinte substâncias pela análise dos padrões de fragmentações e comparação com dados da literatura (ácido gálico e derivados, ácido elágico e derivados, galotaninos, elagitaninos, catequina e uma procianidina). No estudo fitoquímico, foram utilizadas técnicas cromatográficas usuais, como Cromatografia em Coluna Clássica (sílica gel e sephadex LH-20), MPLC (*Medium Pressure Liquid Chromatography*) e HPLC, que forneceram um éster de ftalato, um açúcar, ácido gálico, dois derivados do ácido quínico e um derivado glicosilado do ácido elágico, que foram identificados por métodos espectroscópicos (Ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear) e espectrométricos (Espectrometria de Massas). Um método analítico foi desenvolvido utilizando a técnica de HPLC-PDA (*High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector*) que permitiu a quantificação de seis substâncias (ácido gálico, ácido galoil quínico, galato de etila, dilactona do ácido valoneico, ácido elágico e ácido 3-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-arabinopiranosídeo) no extrato. Nesta quantificação, o ácido elágico ($57,64 \pm 1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a dilactona do ácido valoneico ($63,00 \pm 0,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram as substâncias majoritárias pelo perfil HPLC-PDA. A atividade antirradicalar do extrato foi avaliada utilizando-se o ensaio DPPH (1,1-difenil-1-picril-hidrazila) e, como padrões, o ácido gálico e a quercetina. Este estudo revelou que a atividade antirradicalar do extrato ($\text{CE}_{50} = 55,43 \pm 0,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi muito próxima do padrão quercetina ($\text{CE}_{50} = 48,80 \pm 0,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e inferior ao padrão ácido gálico ($\text{CE}_{50} = 21,80 \pm 1,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O teor de fenóis totais (Equivalente ao Ácido Gálico) foi de 480,00 mg por g de extrato. Nos ensaios de mutagenicidade (teste de Ames), se observou que o extrato não apresentou mutagenicidade para nenhuma linhagem de *Salmonella thypimurium* testadas.

Palavras chaves: *Caesalpinia ferrea*, ácidos fenólicos, quantificação, mutagenicidade, antirradicalar.

ABSTRACT

Caesalpinia ferrea Mart. belongs to the family Fabaceae (Caesalpinioideae) grows throughout the Brazilian territory, being widely distributed in the northern and northeastern regions, known commonly as pau-ferro or jucá. In this research describes the phytochemical study, and the determination of the quantitative secondary metabolites, the mutagenic evaluation and antiradical activities and the total phenol levels determination of the ethanolic extract from the *C. ferrea* Martius stem bark. The analyses by the HPLC-ESI-IT-MS (High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Ion trap – Mass Spectrometry) and FIA – ESI-IT-MSⁿ (Flow Injection Analysis – Electrospray Ionization – Ion Trap – Mass Spectrometry), negative mode, it allowed to identify twenty substances by the standard analyses of the fragmentation and comparison with the data that are in the literature (gallic acid and derived, ellagic acid and derivatives, gallotannins, ellagitannis, catechin and proanthocyanidin). In the phytochemical study, it was used common chromatographic technical, like the Classical Column Chromatography (silica gel and sephadex LH-20), MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) and HPLC, that provided a phthalate ester, a sugar, a gallic acid, two quinic acid derived and a glycosylated ellagic acid derivative, that were identified by spectroscopic (Ultraviolet and Nuclear Magnetic Resonance) and spectrometric (Mass spectrometry). An analytical method was developed using the HPLC-PDA (High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector), which permitted quantification of six substances (gallic acid, galloyl quinic acid, ethyl gallate, valoneic acid dilactone, ellagic acid and 3-*O*-metilellagic acid-4'-*O*- β -D-arabinopyranoside) in the extract. In this quantification, ellagic acid ($57.64 \pm 1.22 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and the valoneic acid dilactone ($63.00 \pm 0.93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were the major compounds by HPLC-PDA profile. The antiradical activity of the extract was evaluated using the DPPH (1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and, as the standards, the gallic acid and the quercetin. This study revealed that the anti-radical extract activity ($\text{CE}_{50} = 55.43 \pm 0.34 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was very close to the quercetin ($\text{CE}_{50} = 48.80 \pm 0.82 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and lower than the standard gallic acid ($\text{CE}_{50} = 21.80 \pm 1.23 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The total phenol (Equivalent to the Gallic Acid) was 480.00 mg by the extract g. In the mutagenicity test (Ames test), it could be observed that the ethanolic extract from the *C. ferrea* stem bark didn't show mutagenicity to any *Salmonella thypimurium* tested.

Key words: *Caesalpinia ferrea*, phenolic acids, quantification, mutagenicity, antiradical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1. Árvore, folhas, frutos, flores e cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> . Fonte: arquivo pessoal.	29
Figura 1.2.2. Substâncias isoladas de <i>Caesalpinia ferrea</i> e parte da planta que foi encontrada.	32
Figura 3.5.1. Fluxograma representativo do principal fracionamento do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i>	36
Figura 3.5.2. CCDC das subfrações 64 a 82, obtida da CCC Sephadex LH-20 (agrupamento das frações 109-123).	37
Figura 3.6.1. Fluxograma representativo do fracionamento por MPLC do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i>	40
Figura 4.1.1. Perfil cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de <i>C. ferrea</i> obtido por HPLC-PDA. Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 60 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL.min ⁻¹ , λ = 254 nm.	49
Figura 4.1.2. Perfil cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de <i>C. ferrea</i> obtido por HPLC-PDA ₁ . Sistema de eluição gradiente: H ₂ O:MeOH:ACN em 80 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL.min ⁻¹ , λ = 254 nm.	51
Figura 4.1.3. Espectro de absorção no ultravioleta das substâncias majoritárias (principais picos no cromatograma) presentes no extrato etanólico das cascas do caule de <i>C. ferrea</i>	51
Figura 4.2.1. Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo negativo, do extrato etanólico das cascas do caule de <i>C. ferrea</i> . Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 75 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm ID, 5 µm), vazão 0,8 mL.min ⁻¹ , λ = 254 nm. (Para condições vide Parte Experimental 3.7.1 e 3.7.2).	53
Figura 4.2.2. Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato etanólico de <i>C. ferrea</i> avaliado em modo negativo. Faixa de íons com <i>m/z</i> de 50-2000 Da. (Para condições, vide Parte Experimental 3.7.1 e 3.7.2).	53
Figura 4.2.3. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 169 (Substância Pico 4).	61
Figura 4.2.4. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 197 (Substância Pico 16).	61
Figura 4.2.5. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 495 (Substância Pico 10).	62
Figura 4.2.6. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 343 (Substância Pico 5).	62
Figura 4.2.7. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 325 (Substância Pico 6).	63
Figura 4.2.8. Espectros de ESI-MS, modo negativo MS ² e MS ³ referente à <i>m/z</i> 477 (Substância Pico 23).	63
Figura 4.2.9. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 939 (Substância Pico 21).	64
Figura 4.2.10. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 787 (Substância Pico 14).	64
Figura 4.2.11. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 635 (Substância Pico 13).	65
Figura 4.2.12. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 483 (Substância Pico 8).	65

Figura 4.2.13. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 331 (Substância Pico 3).....	66
Figura 4.2.14. Proposta de fragmentação do pentagaloilglicose e derivados galoilglicose. Adaptado de Tan, Ling e Chuah (2011).	67
Figura 4.2.15. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo e MS ² e MS ³ referente à <i>m/z</i> 785 (Substância Pico 20) e sua fragmentação. Adaptado de Tan, Ling e Chuah (2011).	68
Figura 4.2.16. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² e MS ⁴ referente à <i>m/z</i> 801 (Substância Pico 12).	69
Figura 4.2.17. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² e MS ³ referente à <i>m/z</i> 965 (Substância Pico 17).....	70
Figura 4.2.18. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 301 (Substância Pico 24).....	71
Figura 4.2.19. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ³ referente à <i>m/z</i> 461 (Substância Pico 26).....	71
Figura 4.2.20. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 469 (Substância Pico 19).....	72
Figura 4.2.21. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 289 (Substância Pico 9). Adaptado de Hamed et al. (2014).	73
Figura 4.2.22. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo MS ² referente à <i>m/z</i> 865 (Substância Pico 22). Adaptado de Hamed et al. (2014).	74
Figura 4.3.1. Espectro ultravioleta da substância CF1.....	75
Figura 4.3.2. Espectros de ESI-MS, modo positivo <i>full scan</i> referente à <i>m/z</i> 279 (CF1).	77
Figura 4.3.3. Substância CF1.....	77
Figura 4.3.4. Espectro de RMN ¹ H de CF1 (7,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).	78
Figura 4.3.5. Espectro de RMN ¹³ C de CF1 (7,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).....	79
Figura 4.3.6. Espectro de DEPT 135 de CF1 (7,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).....	80
Figura 4.3.7. Espectro de gCOSY-2D de CF1 (7,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).....	81
Figura 4.3.8. Espectros de gHSQC-2D de CF1 (7,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).	82
Figura 4.3.9. Espectros de gHMBC-2D de CF1 (7,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).	83
Figura 4.3.10. Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ² referente à <i>m/z</i> 341 (CF2).	86
Figura 4.3.11. Substância CF2.....	86
Figura 4.3.12. Espectro de RMN ¹³ C de CF2 (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ). Com expansão δ (60-105).....	87
Figura 4.3.13. Espectro de DEPT 135 de CF2 (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	88
Figura 4.3.14. Espectro de RMN ¹ H de CF2, (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	89
Figura 4.3.15. Espectro de gCOSY-2D de CF2, (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	90
Figura 4.3.16. Espectro de gHSQC-2D de CF2, (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).....	91
Figura 4.3.17. Espectro de gHMBC-2D de CF2 (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ)	92
Figura 4.3.18. Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ² referente à <i>m/z</i> 169 (CF3).	93
Figura 4.3.19. Substância CF3.....	94
Figura 4.3.20. Espectro de RMN ¹ H de CF3 (7,0 T, D ₂ O, TMS, δ).....	95
Figura 4.3.21. Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ² referente à <i>m/z</i> 343 (CF4).	96
Figura 4.3.22. Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> e MS ² referente à <i>m/z</i> 343 (CF5).	98
Figura 4.3.23. Substâncias CF4 e CF5.	100
Figura 4.3.24. Espectro de RMN ¹ H de CF4 (14,1,0 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).....	101

Figura 4.3.25. Espectro de gCOSY-2D de CF4 , (14,1 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).	102
Figura 4.3.26. Espectro de gHSQC-2D de CF4 , (14,1 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).	103
Figura 4.3.27. Espectro de gHMBC-2D de CF4 , (14,1 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ).	104
Figura 4.3.28. Espectro de RMN ¹ H de CF5 (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	105
Figura 4.3.29. Espectro de gCOSY-2D de CF5 , (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	106
Figura 4.3.30. Espectro de HOMODEC de CF5 , (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	107
Figura 4.3.31. Espectro de gHSQC-2D de CF5 , (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	108
Figura 4.3.32. Espectro de gHMBC-2D de CF5 , (14,1 T, D ₂ O, TMS, δ).	109
Figura 4.3.33. Espectros de ESI-MS, modo negativo <i>full scan</i> , MS ² e MS ³ referente à <i>m/z</i> 447 (CF6).	111
Figura 4.3.34. Substância CF6 .	112
Figura 4.3.35. Espectro de RMN ¹ H de CF6 (14,1,0 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	113
Figura 4.3.36. Espectro de gHSQC-2D de CF6 (14,1,0 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	114
Figura 4.3.37. Espectro de gHMBC-2D de CF6 (14,1,0 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	115
Figura 4.3.38. Espectro de gCOSY-2D de CF6 (14,1,0 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ).	116
Figura 4.4.1. Perfil cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> obtido por HPLC-PDA ₂ . Sistema de eluição gradiente: H ₂ O:ACN em 70 min, coluna Phenomenex [®] Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm ID, 5 µm), HPLC (Jasco [®]), vazão 1,0 mL.min ⁻¹ , λ = 254 nm.	118
Figura 4.4.2. Espectro de absorção no ultravioleta das substâncias quantificadas no extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> .	119
Figura 4.4.3. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões do ácido gálico e ácido elágico.	119
Figura 4.5.1. Curva analítica de fenóis totais a 750 nm. Padrão – Ácido Gálico.	122
Figura 4.5.2. Porcentagem de inibição de DPPH do extrato etanólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> e dos padrões quercetina e ácido gálico.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.1. Atividade biológica e composição química de espécies pertencentes ao gênero <i>Caesalpinia</i> mais utilizadas para fins medicinais. Adaptado de GONZALEZ (2005).	25
Tabela 1.2.1. Classificação taxonômica de <i>Caesalpinia ferrea</i>	28
Tabela 1.2.2. Principais atividades biológicas e composição química de diversas partes de <i>Caesalpinia ferrea</i>	31
Tabela 3.6.1. Gradiente de eluição, para o extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> : A = água, B = metanol:acetonitrila (80:20, v/v), ambos com 0,05% de TFA. Vazão de 1 mL.min ⁻¹	38
Tabela 3.6.2. Gradiente de eluição cromatográfica: A = água, B = acetonitrila, C = metanol, ambos com 0.1% de TFA. Vazão 1 mL.min ⁻¹	39
Tabela 4.2.1. Dados de HPLC-ESI-MS e FIA-ESI-IT-MS ⁿ das substâncias detectadas no extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> (modo negativo).	60
Tabela 4.3.1. Deslocamentos químicos de RMN 1D (CD ₃ OD-d ₄ , 7,0 T) da substância CF1	76
Tabela 4.3.2. Deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D (D ₂ O, 14,1 T) da substância CF2	85
Tabela 4.3.3. Deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D de CF4 (CD ₃ OD-d ₄ , 14,1 T) e CF5 (D ₂ O, 14,1 T).	99
Tabela 4.3.4 – Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C (14,1 T) da substância CF6 (DMSO-d ₆).	112
Tabela 4.4.1. Resumo dos parâmetros de validação para o extrato etanólico da casca do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i>	120
Tabela 4.4.2. Estimativa da concentração dos derivados de ácidos fenólicos no extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> calculados com os dados de regressão linear e expressa pelos padrões do ácido gálico (AG) e ácido elágico (AE).	121
Tabela 4.5.1. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) em TA98, TA100, TA102 e TA97 de <i>Salmonella typhimurium</i> tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas do caule de <i>Caesalpinia ferrea</i> , com (+ S9) e sem (- S9) de ativação metabólica.	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCC	Cromatografia em coluna clássica
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CE ₅₀	Concentração Efetiva Média
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo duplete
d.i.	Diâmetro interno
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
EtOH	Etanol
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por electrospray)
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análise por injeção em fluxo ou análise por inserção direta da amostra)
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap – Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um íon-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra).
<i>g</i> COSY	<i>Gradient correlation spectroscopy</i>
<i>g</i> HMBC	<i>Gradient heteronuclear multiple bond correlation</i>
<i>g</i> HMQC	<i>Gradient heteronuclear multiple-quantum coherence</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
Hex	Hexano
HOMODEC	<i>HOMOnuclear DECoupling</i> (Desacoplamento homonuclear)
HRF	<i>Heterocyclic Ring Fission</i> (Clivagem Heterocíclica)
IT	<i>Ion Trap</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LOD	<i>Limit of detection</i> (Limite de Detecção)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (Limite de Quantificação)
[M – H] ⁻	Molécula desprotonada
[M + H] ⁺	Molécula protonada

<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa carga
MeOH	Metanol
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Média Pressão)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
NP/PEG	<i>Natural Products/Polyethylene glycol reagent</i>
PDA	<i>Photodiode Array Detector</i> (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
<i>q</i>	Quadruplete
QM	Quinone Methide (quinona metídeo)
RDA	retro-Diels-Alder
<i>R_f</i>	<i>Retention fator</i> (Fator de retenção)
RMN de ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RP₁₈	<i>Reversed Fase octadecylsilan</i> (Fase reversa octadecilsilano)
<i>s</i>	Singleto
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Extração em fase sólida)
<i>t</i>	Triplete
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_r</i>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
<i>v</i>	Volume

Sumário

1. Introdução	23
1.1. Gênero <i>Caesalpinia</i>	24
1.2. Espécie <i>Caesalpinia ferrea</i>	28
2. Objetivos.....	33
3. Materiais e métodos.....	34
3.1. Solventes e Reagentes	34
3.2. Coleta do material Vegetal e identificação da planta.....	34
3.3. Extração.....	34
3.4. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	34
3.5. Fracionamento do Extrato Etanólico.....	35
3.5.1. Cromatografia em Coluna Clássica – Sílica gel.....	35
3.5.2. Cromatografia em Coluna Clássica – Sephadex LH-20	35
3.5.3. MPLC	37
3.6. Análises por HPLC	37
3.6.1. Modo analítico	37
3.6.2. Modo semipreparativo	39
3.7. Análises por Espectrometria de Massas	40
3.7.1. Preparo das amostras para análises por HPLC-ESI-IT-MS ⁿ	40
3.7.2. Análises por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS ⁿ	41
3.8. Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear	41
3.9. Avaliação quantitativa.....	42
3.9.1. Preparação do extrato e padrões para análise por HPLC-PDA.....	42
3.9.2. Identificação dos picos.....	42
3.9.3. Linearidade, Precisão, Limite de Detecção e Quantificação.....	43
3.9.4. Exatidão e seletividade.....	44
3.10. Determinação do Teor de Fenóis Totais	44
3.11. Avaliação do Potencial Antirradicalar	45
3.12. Avaliação da atividade mutagênica (Teste de Ames)	45
3.12.1. Linhagens utilizadas.....	46
3.12.2. Manutenção e estoque das cepas, verificação das características genéticas	46
3.12.3. Preparo dos inóculos de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizados no ensaio	46
3.12.4. Meios de cultura.....	46

3.12.5. Preparo da mistura S9	47
3.12.6. Controles	47
3.12.7. Ensaio de mutagenicidade	47
3.12.8. Análise dos Dados.....	47
3.12.9. Análise Estatística	48
4. Resultados e Discussão.....	49
4.1. Identificação dos compostos por HPLC-PDA	49
4.2. Identificação dos metabólitos secundários por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS ⁿ ..	52
4.3. Determinação estrutural de substâncias isoladas de <i>Caesalpinia ferrea</i>	75
4.3.1. Determinação de CF1	75
4.3.2. Determinação de CF2.....	84
4.3.3. Determinação de CF3.....	93
4.3.4. Determinação de CF4.....	96
4.3.5. Determinação de CF5.....	97
4.3.6. Determinação de CF6.....	110
4.4. Avaliação quantitativa.....	117
4.5. Ensaio Químico e biológico	122
4.5.1. Fenóis Totais	122
4.5.2. Avaliação do Potencial Antirradicalar	123
4.5.3. Avaliação da Mutagenicidade	124
5. Conclusões.....	128
Referências	130

1. Introdução

As plantas medicinais alcançaram um papel significativo no sistema de saúde em todo o mundo como potencial fonte de recursos terapêuticos, tanto para seres humanos quanto para animais. Não só na condição de tratamento e cura, mas também na prevenção de doenças e manutenção da saúde (SINGH; RAGHAV, 2012). No entanto, é necessário conhecer quais os constituintes de ervas medicinais responsáveis para fins terapêuticos, pois muitas plantas medicinais contêm compostos farmacologicamente ativos e poucas delas têm sido estudadas cientificamente para assegurar sua qualidade, segurança e evitar que a planta seja usada equivocadamente (CALIXTO, 2005).

Nos últimos tempos, o foco em pesquisa de plantas tem aumentado em todo mundo e uma grande quantidade de evidências coletadas têm mostrado um potencial imenso em diversos sistemas tradicionais de medicamentos. Na medicina tradicional, há um grande interesse e uma crescente demanda por mais medicamentos a partir de fontes vegetais. Este renascimento do interesse em medicamentos derivados de plantas é principalmente devido à crença generalizada de que a "medicina verde" é segura e mais confiável do que as drogas sintéticas caras, muitas das quais produzem efeitos negativos. Medicamentos com base em plantas ou plantas medicinais, seus extratos e seus compostos isolados têm oferecido vantagens para várias atividades biológicas e têm sido utilizadas na medicina popular como tratamento alimentar para vários distúrbios. As plantas constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos empregados na terapia moderna (SINGH; RAGHAV, 2012).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permitiu aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem se constituir em modelos tanto para a síntese de fármacos quanto de outros produtos para aplicação agrícola ou florestal. Vários estudos com plantas medicinais do Brasil que tratam especialmente da extração, isolamento, identificação, quantificação e atividade biológica de metabólitos secundários de várias espécies têm sido realizados por nosso grupo (VILEGAS et al., 1998; SANTOS et al., 2001; SANNOMIYA et al., 2004; RINALDO et al., 2007; HIRUMA-LIMA et al., 2009; NWIDU et al., 2011; ZANUTTO et al., 2013; MININEL et al., 2014).

Dessa forma, enfatizamos a importância de continuarmos as pesquisas com os recursos naturais brasileiros e nesse sentido, estudos químicos para explorar a composição química de plantas e conhecer suas atividades biológicas são muito úteis. Este trabalho tem como um de

seus principais objetivos fornecer dados químicos e biológicos que contribuam com o estudo da espécie *Caesalpinia ferrea*.

1.1. Gênero *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia* pertence a família Fabaceae ou Leguminosae (leguminosas) que é de ampla ocorrência geográfica e está presente em quase todas as regiões do mundo. Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005). Baseado em dados moleculares e não-moleculares, Fabaceae é dividida nas subfamílias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (JUDD et al., 1999; SOLTIS et al., 2005).

A subfamília *Caesalpinioideae* é formada por 170 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies e está dividida em cinco tribos: *Cercideae*, *Caesalpinieae*, *Cassieae*, *Detarieae* e *Macrolobieae* (BRUNEAU et al., 2001). Na tribo *Caesalpinieae*, encontra-se *Caesalpinia* contendo cerca de 140 espécies. O gênero *Caesalpinia* está organizado em cinco grupos mais o subgênero *Guilandina*, os quais são: *Libidibia*, *Brasilettia*, *Caesalpinia*, *Russellodendron* e *Poincianella-Erythrostemon* (LEWIS, 1998).

Este gênero possui diversas espécies de importância medicinal. São plantas de distribuição em regiões tropicais e subtropicais. Seus troncos são lenhosos e as folhas são alternas, compostas, pari a imparipinadas ou bipinadas. As flores são vistosas, os frutos são geralmente do tipo legume e as plantas são facilmente propagadas por sementes (RIBEIRO et al., 1999). A madeira de várias espécies é muito usada na construção civil, além de possuir um intenso uso como espécie ornamental, especialmente de ruas e avenidas.

Sobre a composição química e atividades farmacológicas do gênero *Caesalpinia* muitos estudos já foram realizados. Na Tabela 1.1.1 se encontram listadas as espécies do gênero que são mais utilizadas para fins medicinais, sua composição química e suas respectivas atividades farmacológicas.

Tabela 1.1.1. Atividade biológica e composição química de espécies pertencentes ao gênero *Caesalpinia* mais utilizadas para fins medicinais. Adaptado de GONZALEZ (2005).

Espécies	Atividade Biológica	Composição Química	Referências
<i>C. bonduc</i>	Hemorragia cerebral, antihelmítico, anticâncer, antimalária, hipoglicêmico e antiinflamatório.	Flavonoides.	Bisky; Buokingham; Harbone, 1994; Novy, 1997; Chakrabarti et al., 2003; Gupta et al., 2004;
<i>C. bonducella</i>	Asma, antimalária, diabetes, anti-inflamatório, hipoglicêmico. Antipirética, antidiarreica, tratamento de hipertensão.	Furanoditerpenos, diterpenos, triterpenos e esteroides.	Pascoe; Burke; Chan, 1986; Kinoshita; Kaneko; Noguchi, 1996; Peter; Tinto; Maclean, 1997; Ahmad; Ali; Usmanghani, 1997; Sharma; Divedi; Sarup, 1997; Peter et al., 1998; Kannur; Hukkeri; Akki, 2006; Sarma; Das, 2009; Hukla et al., 2010.
<i>C. coriaria</i>	Aftas e Cânceres estomacais.	Aminoácidos, peptídeos e alcaloides.	Bisky; Buokingham; Harbone, 1994; Hebbar et al., 2004.
<i>C. crista</i>	Antidispéptico, antimalária, anti-inflamatório e reumatismo.	Aminoácidos e peptídeos.	Bisky; Buokingham; Harbone, 1994; Linn et al., 2005.
<i>C. decapetala</i>	Imunomoduladora, anti-inflamatória, doenças neurodegenerativas, infecções virais, úlcera gástrica e antioxidante.	Diterpenoides, lupeol, resveratrol, quercetina e ácido gálico.	Kiem et al., 2005; Bhadoriya; Sharma; Solanki, 2012.
<i>C. digyna</i>		Alcaloides, aminoácidos, peptídeos e taninos.	Mahato; Sahu; Luger, 1983; Bisky; Buokingham; Harbone, 1994.

Continua...

Tabela 1.1.1. Atividade biológica e composição química de espécies pertencentes ao gênero *Caesalpinia* mais utilizadas para fins medicinais. Adaptado de GONZALEZ (2005).

<i>C. ecchinata</i>	Antimicrobiano, antifúngico, anti-nociceptiva, antitumoral, anti-inflamatório, analgésico, antioxidante, antiangiogênico, adstringente. Tratamento de diarreia e disenteria e fortalecimento de gengivas.	Flavonoides, ligninas, taninos e cumarinas.	Xavier; Ramos; Xavier Filho, 1995; Silva, 2001; Oliveira et al., 2002; Balasundram; Sundram; Samman, 2006; Silva, 2006; Shen et al., 2007; Grangeiro, 2009; Yen et al., 2010; Gomes et al., 2014.
<i>C. japônica</i>	Neuralgia.	Chalconas, isoflavonoides, diterpenoides.	Namikoshi; Nakata.; Nuno, 1987; Ogawa; Aoki; Sashida, 1992.
<i>C. major</i>	Reumatismo, dores lombares, expectorante e antitussígena.	Diterpenos.	Kitagawa et al., 1994; Roengsumran, et al., 2000.
<i>C. minax</i>	Disenteria, antitérmico e resfriado.	Diterpenos	Jiang et al., 2001; Wu, et al., 2014.
<i>C. pluviosa</i>	Disenteria.	-----	De Lucca; Zalles, 1992.
<i>C. pulcherrima</i>	Pirexia, bronquite, diarreia, disenteria, antimalária e antitérmica. Tóxica (cascas).	homoisoflavonoides, peltoginóides, chalconas, diterpenos, quinonas, terpenóides, aminoácidos, flavonoides e ácidos fenólicos.	Wasthi, Misra, 1977; McPherson, et al., 1983; Che et al., 1986; Parmar; Singh; Jacobsen, 1987; Bisky; Buokingham; Harbone, 1994. Patil; Freyer; Webb, 1997; Ragasa et al., 2003; Srinivas et al., 2003.

Continua...

Tabela 1.1.1. Atividade biológica e composição química de espécies pertencentes ao gênero *Caesalpinia* mais utilizadas para fins medicinais. Adaptado de GONZALEZ (2005).

<i>C. pyramidalis</i>	Diurético, digestivo, antidiarréico, estomático e antitérmico.	Triterpenos, esteroides, flavonoides, biflavonoides e ácidos fenólicos.	Mendes et al., 2000; Bahia et al., 2005; Oliveira, 2010.
<i>C. sappan</i>	Antiinflamatório, reumatismo, tratamento de trombose ou de tumores, analgésico, hipolipidêmica, sedativa e depressora do Sistema Nervoso Central.	Esteroides, chalconas, diterpenos e flavonoides.	Namikoshi; Nakata; Saitoh, 1987; Kim; Baek; Oh, 1997; Oh et al., 1998.
<i>C. spinosa</i>	Apoptose	Ácido gálico e taninos.	Reategui; Nakasone, 1998; Garro Galves; Riedl; Conner, 1997.

1.2. Espécie *Caesalpinia ferrea*

Caesalpinia ferrea (Figura 1.2.1) é uma árvore que no Brasil é largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, sendo conhecida vulgarmente como Pau-ferro ou Jucá (PETERS et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009).

O Jucá, é uma planta arbórea, de ampla dispersão e baixa densidade populacional, formando copa arredondada, fechada e densa. Possui porte que varia de 10 a 15 m e tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro, com bifurcações quando isolada. Casca externamente acinzentada, lisa e fina, com manchas brancas irregulares, que se contrasta com partes mais escuras, as quais, se renovam anualmente. Suas folhas são compostas, bipinadas, apresenta flores amarelas e brilhantes, pequenas, reunidas em panícula terminal de até 20 cm de comprimento. Seu fruto é um legume, indeiscente, chato, que ao amadurecer torna-se negro e chocalhante, porque as sementes se soltam da vagem mais permanecem dentro do lóculo. Cada fruto contém 2 a 10 sementes elipsóides, amarelas ou marrons de consistência bastante dura (LORENZI, 2002). Além disso, o pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (NASCIMENTO et al., 2002). Sua taxonomia é apresentada na Tabela 1.2.1.

Tabela 1.2.1. Classificação taxonômica de *Caesalpinia ferrea*.

Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Ordem	Fabales
Família	Caesalpinaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae)
Espécie	<i>Caesalpinia ferrea</i> Martius ex Tulasne var.

Fonte: Banco de Espécies Arbóreas Brasileiras (http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm).

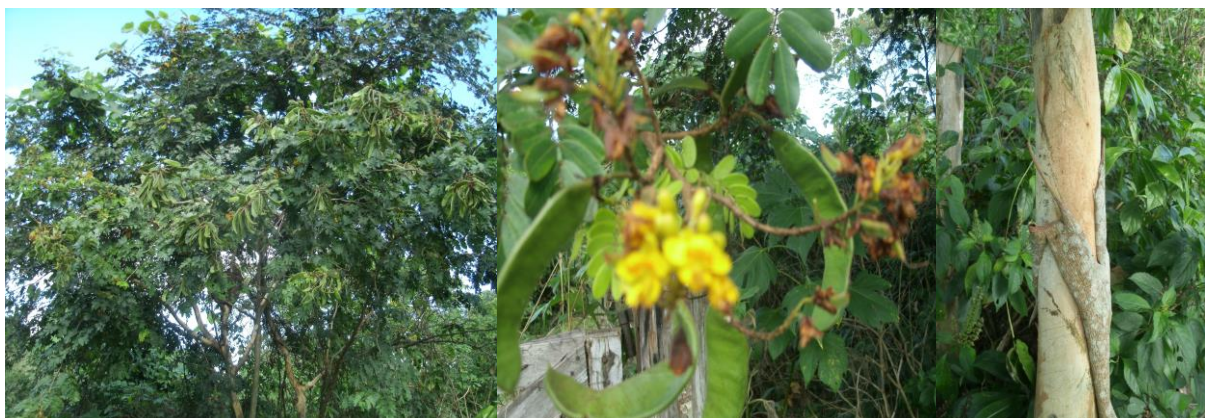
Caesalpinia ferrea Mart. passou por uma reclassificação em 2009, sendo agora conhecida como *Libidibia ferrea* (QUEIROZ, 2009). Porém, devido à literatura reportar dados químicos e farmacológicos de *C. ferrea*, não se fez necessário à mudança de nome neste trabalho.

A espécie é uma das plantas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) e está inserida também no Formulário Nacional de Fitoterápicos (FNF) (BRASIL, 2009).

Ferreira (2009) realizou estudo com residentes da comunidade costeira de Marudá, localizada no Estado do Pará, Brasil, que possuem o conhecimento de 229 plantas medicinais da região amazônica, distribuídos em 81 famílias botânicas e sabem como manipulá-las em uma variedade de formas, com especial atenção para assegurar que elas sejam usadas da maneira mais segura e mais eficiente. As indicações terapêuticas para estas plantas incluem

doença reconhecida no repertório da medicina ocidental, bem como doenças percebidas a partir de uma perspectiva cultural local. Uma das plantas medicinais classificadas pelos moradores foi a *C. ferrea*, sendo o fruto usado para curar cortes e feridas em forma de antiséptico; gripe, tosse, rouquidão (xarope); dores nas pernas (infusão); má digestão, rim, infecções do trato geniturinário, colesterol (chá); contusão espinhal (garrafada); fortalecer e limpar o sangue (maceração); acidente vascular cerebral, dor de cabeça, dor de dente e picada de inseto (garrafada).

Figura 1.2.1. Árvore, folhas, frutos, flores e cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*. Fonte: arquivo pessoal.



Vários estudos descrevem as ações farmacológicas de extratos e de substâncias isoladas de *C. ferrea*. Utilizada há anos, para o tratamento de várias desordens, tais como analgésicos e anti-inflamatórios (CARVALHO et al., 1996; PEREIRA et al., 2012), cicatrizante (OLIVEIRA et al., 2010), antiulcerogênica (FALCÃO et al., 2008; BACCHI; SERTIE, 1994), antimicrobiana (SAMPAIO et al., 2009) e quimiopreventiva do câncer (NAKAMURA et al., 2002). No Brasil, o chá da casca do caule de *C. ferrea* tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento da *diabetes mellitus* (BRAGANÇA, 1996).

Uma triagem fitoquímica, utilizando ensaios químicos do caule e das folhas demonstrou a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos (GONZALEZ, 2005). As propriedades hipoglicemiantes e químicas do extrato aquoso das cascas do caule de *C. ferrea* foram investigadas por VASCONCELOS e colaboradores (2011). Estes autores observaram o melhoramento no metabolismo da glicose em animais diabéticos tratados. Assim, o estudo indicou que é uma alternativa promissora no tratamento em condições diabéticas, reduzindo os níveis de glicose no sangue e melhorando o estado metabólico dos animais. No estudo fitoquímico identificaram a presença de ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido elágico.

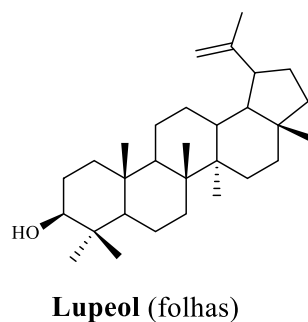
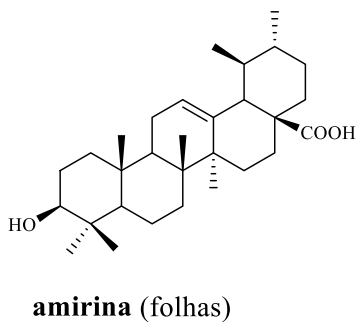
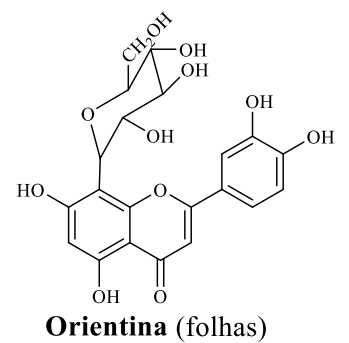
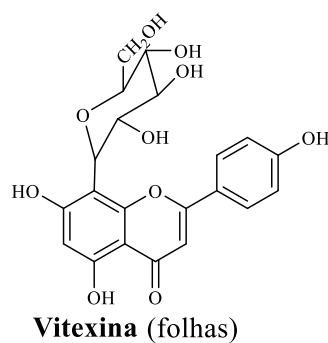
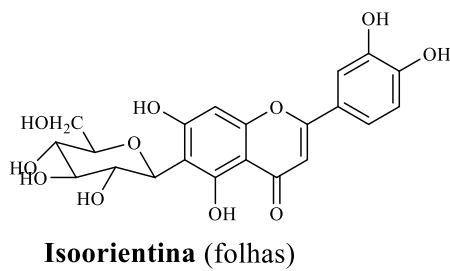
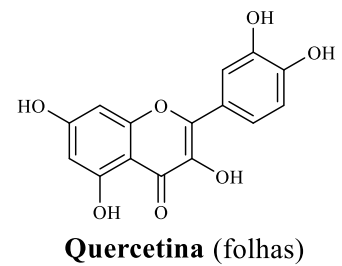
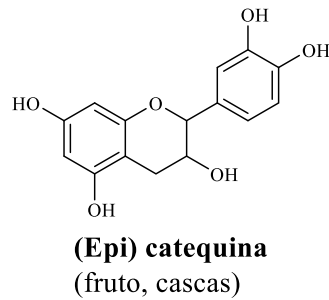
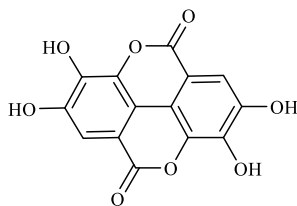
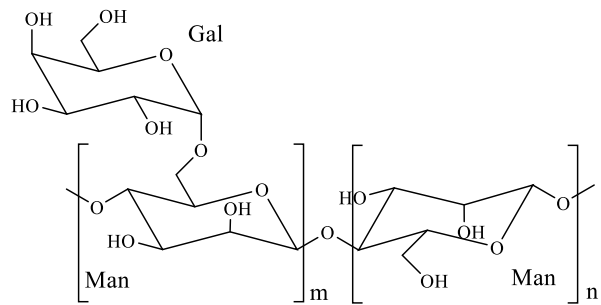
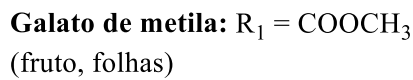
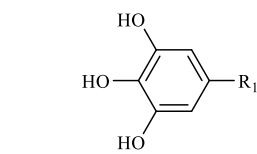
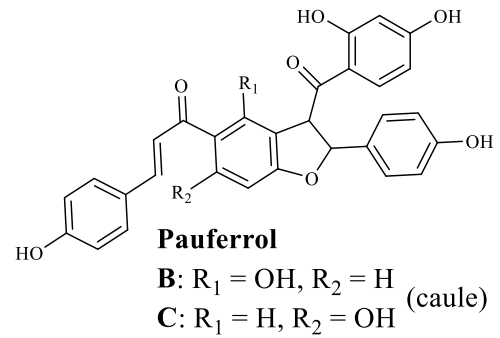
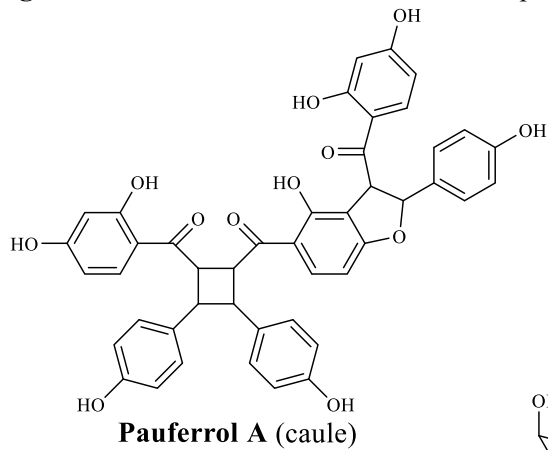
Na Tabela 1.2.2 estão demonstrados dados de estudos na literatura sobre a composição química e atividades biológicas de diversas partes de *C. ferrea*. E na Figura 1.2.2 estão

apresentadas as estruturas das substâncias isoladas de *C. ferrea* e as partes da planta de onde foram identificadas.

Tabela 1.2.2. Principais atividades biológicas e composição química de diversas partes de *Caesalpinia ferrea*.

Parte da Planta	Atividade Biológica	Composição Química	Referências
Caule/Lenho	Antiulcerogênica, antioxidante e inibitória da topoisomerase II humana.	Pauferrol A, B e C e ácido gálico.	Bacchi; Sertie, 1994; Bacchi et al., 1995; Gonzalez, 2005; Nozaki et al., 2007; Ohira et al., 2013.
Cascas	Cicatrizante, desobstruente, regula a absorção de glicose no fígado e músculos, propriedades hipoglicêmicas e induz a hipotensão e vasodilatação.	Taninos, ácido gálico, ácido elágico, catequina e epicatequina.	Corrêa, 1984; Menezes et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Vasconcelos et al., 2011.
Vagem	Anti-inflamatório, antimicrobiano e antitumoral.	Lectina.	Ximenes, 2004; Pereira et al., 2012; Freitas et al., 2012.
Fruto	Anticancerígena, anti-inflamatória, antibacteriana, analgésica, antioxidante, antimicrobiana e inibidor aldose redutase.	Ácido elágico, ácido gálico e galato de metila.	Carvalho et al., 1996; Ueda et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Sudhakar et al., 2006; Sampaio et al., 2009, Vasconcelos et al., 2011; Silva et al., 2011; Lima et al., 2012; Tomaz et al., 2013.
Folhas	Antiulcerogênica, antihistamínica, antialérgica, antimicrobiana e antioxidante.	Galato de metila, ácido gálico, lectina, lupeol, α -amirina e flavonoides (quercetina, isoorientina, vitexina e orientina).	Bacchi; Sertie, 1994; Bacchi et al., 1995; Coelho, 2004; Gonzalez, 2005; Ferreira, 2011; Port's, 2011.
Sementes	Antiviral e inibidor de tripsina.	Galactomanana (galactopirranose e manopirranose).	Souza et al., 2010; Bariani et al., 2012; Lopes et al., 2013; Gallão et al., 2013.

Figura 1.2.2. Substâncias isoladas de *Caesalpinia ferrea* e parte da planta que foi encontrada.



2. Objetivos

- √ Estudar a composição química do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*;
- √ Registrar o *fingerprint* por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea* e identificar os metabólitos secundários;
- √ Quantificar por HPLC-PDA os principais metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*;
- √ Avaliar as atividades mutagênica (Ensaio de Ames) e antirradicalar (DPPH) do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*;
- √ Determinar o teor de fenóis totais (*Folin-Ciocalteu*) do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*.

3. Materiais e métodos

3.1. Solventes e Reagentes

- Solventes grau PA: acetato de etila, ácido acético glacial, clorofórmio, etanol, metanol, *n*-propanol, *n*-butanol e *n*-hexano (Synth[®], Quemis[®], MERCK[®], Fmaia[®] e IMPEX[®]);
- Solventes grau HPLC: metanol, acetonitrila, ácido trifluoroacético, ácido acético (Tedia[®], MERCK[®]) e água purificada em sistema Milli-Q Progard 2 (Millipore[®]).
- Solventes deuterados: DMSO-_{d6}, CD₃OD-_{d4} e D₂O (Aldrich[®]).

3.2. Coleta do material Vegetal e identificação da planta

A planta foi coletada no município de Juína (11° 22' 40" S e 58° 44' 27" O), noroeste do estado de Mato Grosso, no mês de setembro de 2011, com autorização (número 33153-1) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A autorização foi concedida para coleta e estudos científicos sobre a espécie vegetal.

A identificação do material vegetal foi realizada pela Bióloga Márcia Cleia Vilela dos Santos. Sua exsicata está depositada na coleção do Herbário Centro-Norte-Mato-grossense (CNMT) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Universitário de Sinop, sob número 3021.

3.3. Extração

As cascas do caule de *C. ferrea* foram secas inicialmente numa sala com ar condicionado a temperatura de 16 °C e, após esta primeira secagem foram colocadas numa estufa de ar seco circulante, a temperatura de 50 °C. Em seguida, moídas em um liquidificador industrial Bermar[®] onde obteve-se 1610 g. A extração foi realizada por maceração com etanol PA (4x; 1 L; 48 h) a temperatura ambiente (25 °C). O extrato foi concentrado a pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 40 °C. A massa do extrato obtida por evaporação foi de 260,9 g. O rendimento do extrato foi de 16,20 %.

3.4. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Na análise dos extratos e frações obtidas do fracionamento por coluna de sílica e por sephadex LH-20, foram utilizadas placas de sílica gel, UV 254, marca Sorbent Technologies, base de alumínio 200 µm. Cada fração obtida do extrato MeOH da Sephadex LH-20 foi aplicada em uma placa de sílica de 20 x 5 cm. As placas foram eluídas com BAW (*n*-butanol:

ácido acético glacial: água, 4:1:5 v/v), quaternário (clorofórmio: metanol: *n*-propanol: água, 5:6:1:4 v/v) e ternário (clorofórmio: metanol: água, 43:37:20 v/v) e reveladas primeiro com a luz UV (254-366 nm) Chromatovue[®]. Após, borrifadas com uma solução de anisaldeído/H₂SO₄ (WAGNER; BLAT, 1995). A placa foi posteriormente levada a uma estufa a 130 C° até o aparecimento de cor. Para visualização das substâncias, foi utilizado o revelador NP-PEG (WAGNER; BLAT, 1995). Após revelação das cromatoplas, as frações que apresentaram mesmos R_fs (fatores de retenção) e coloração, foram reunidas e transferidas para o mesmo frasco.

3.5. Fracionamento do Extrato Etanólico

3.5.1. Cromatografia em Coluna Clássica – Sílica gel

A pesquisa foi iniciada na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), campus de Sinop, MT, no laboratório de Fitoquímica que é coordenado pelo professor Adilson Sinhorin. O primeiro procedimento na tentativa de separar os constituintes de *C. ferrea* foi a cromatografia em coluna clássica com sílica gel.

O extrato etanólico (90 g) foi fracionado em uma coluna de vidro (80 x 8,0 cm d.i.), empacotada com fase estacionária composta por sílica gel 60A (70-230 mesh; Merck[®]). O extrato foi eluído com os solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. O extrato que foi fracionado por cromatografia em coluna produziu 123 frações (125 mL). As eluições provenientes dos solventes hexano e clorofórmio não foram consideradas para este estudo. As frações obtidas com as fases móveis acetato de etila (fração 60 a 99 – 25,84 g) e metanol (fração 100 a 123 – 41,02 g) (Figura 3.5.1) mostraram perfis em CCDC interessantes para estudo e, portanto, as frações AcOEt e MeOH foram analisadas por HPLC-UV (item 3.6.1) para conhecimento de seus perfis cromatográficos.

3.5.2. Cromatografia em Coluna Clássica – Sephadex LH-20

As frações metanólicas foram agrupadas (107-108 e 109-123) com base em seus perfis cromatográficos (HPLC-UV; item 3.6.1). Estas frações agrupadas mais a fração 106 (metanólica) e a fração 67 (acetato de etila) foram subfracionadas em uma coluna de vidro (60 x 6,0 cm), empacotada com fase estacionária Sephadex LH-20 (Pharmacia[®]) e como fase móvel etanol (Fração 67) e metanol (demais frações) (Figura 3.5.1). Para o subfracionamento foi utilizado 500 mg das frações.

A CCC da fração 67 resultou em dezoito subfrações. Análise por CCDC (item 3.4) permitiu agrupar as subfrações semelhantes (R_f), restando no final seis subfrações majoritárias. A primeira delas, na forma de um óleo de coloração amarelada, foi obtida do agrupamento das subfrações 1, 2 e 3 que apresentou apenas um *spot* na CCDC, sendo designada **CF1** (25 mg).

O tratamento cromatográfico (CCC) da fração 106 resultou em 50 subfrações. A partir desse fracionamento foi possível observar que as subfrações 14, 15 e 16 apresentavam-se na forma de cristais brancos com algumas impurezas. As impurezas foram retiradas por recristalização em MeOH. Dessa forma foi possível isolar a substância denominada **CF2** (33 mg).

Avaliação por CCDC (item 3.4) das demais subfrações obtidas pela CCC sephadex LH-20 demonstraram uma mistura de coloração avermelhada em todas as subfrações como pode ser visualizado na Figura 3.5.2. Os componentes da mistura não foram possíveis de serem isolados por colunas cromatográficas clássicas.

Figura 3.5.1. Fluxograma representativo do principal fracionamento do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*.

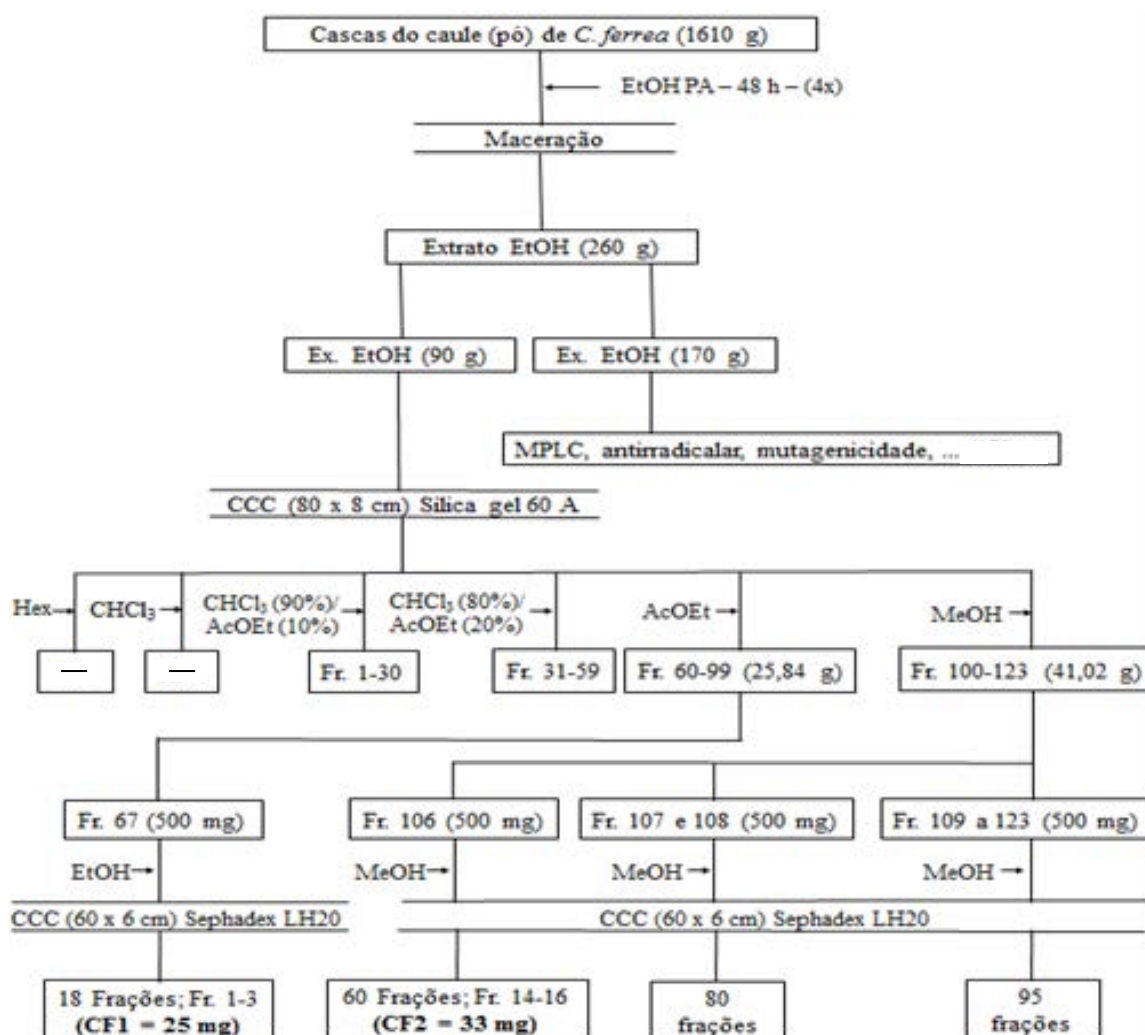
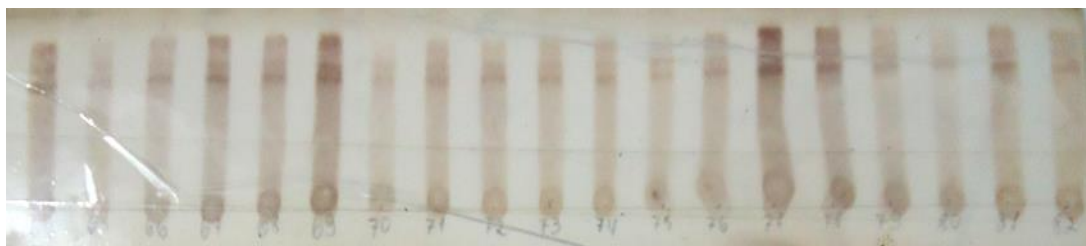


Figura 3.5.2. CCDC das subfrações 64 a 82, obtida da CCC Sephadex LH-20 (agrupamento das frações 109-123).



3.5.3. MPLC

O extrato etanólico (500 mg) foi redissolvido em MeOH:H₂O (2:8 v/v) e fracionado por um Sistema MPLC (Büchi®), constituído por um injetor C-615, com loop de 5 mL, bombas modelo C-601 (Büchi®), com capacidade de vazão de 2,5 a 50 mL.min⁻¹, utilizando uma coluna C18 (16 cm x 3,0 cm x 50 µm). Para o fracionamento utilizou-se uma vazão de 5,0 mL.min⁻¹ e a fase móvel consistiu de água (eluente A) e metanol (eluente B) em modo isocrático. Foram obtidas 6 frações com as seguintes porcentagens do eluente B e suas respectivas massas: 10 % (200 mg), 20 % (135 mg), 30 % (45 mg), 40 % (41 mg), 50 % (42 mg) e 100 % MeOH (21 mg) (Figura 3.6.1).

3.6. Análises por HPLC

3.6.1. Modo analítico

HPLC-UV: As análises cromatográficas do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*, realizadas inicialmente no laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), campus de Sinop, foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV). O equipamento foi utilizado no monitoramento do extrato etanólico bruto e das frações obtidas por coluna de sílica e Sephadex. Cromatógrafo Varian® Pro Star 325 UV/VIS equipado com detector UV-dual wavelength (254nm e 360nm) e interface GPIB. Com injetor Rheodyne – P/N 772Si com capacidade de 20 µL, operado por programa Galaxy. A separação cromatográfica foi efetuada utilizando uma coluna Gemini Phenomenex® C18 (250,0 x 4,6 mm d.i.; 5µm), equipada com pré coluna Gemini Phenomenex® C18 (4,0 x 3,0 mm d.i.).

As amostras foram eluídas utilizando como fase móvel água (eluente A) e metanol:acetonitrila (80:20 v/v – eluente B) ambos com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). O gradiente de eluição está representados na Tabela 3.6.1. A vazão de eluição foi de 1 mL.min⁻¹, com volume de injeção de 20 µL e temperatura de 20°C.

Tabela 3.6.1. Gradiente de eluição, para o extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*: A = água, B = metanol:acetonitrila (80:20, v/v), ambos com 0,05% de TFA. Vazão de 1 mL.min⁻¹.

Tempo (min)	A(%)	B (%)
0	92	8
8	85	15
60	55	50
70	30	70
80	0	100
90	0	100

O extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* foi analisado por HPLC-UV, cujos cromatogramas foram monitorados a 254 nm.

HPLC-PDA₁: Utilizado no monitoramento do extrato etanólico bruto, das frações obtidas por coluna de sílica e Sephadex, frações obtidas por MPLC e no registro dos perfis cromatográficos e análise comparativa dos compostos isolados. Cromatógrafo Jasco[®] (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba PU-2089, solvente quaternário, com injetor de amostra de 100 µL, acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 190-800 nm e intervalo mínimo de 1 nm. A coluna utilizada foi uma Synergi Hydro, Phenomenex[®] (Torrance, CA, EUA), RP-18 (250 x 4,6 mm d.i.; 4 µm) equipada com uma coluna de guarda Phenomenex (4,0 x 2,0 mm d.i.). O software EZChrom Elite 3.1.7 foi utilizado para o controle do sistema de análise, coleta de dados e processamento.

Inicialmente o extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*, (10 mg) foi dissolvido em MeOH:H₂O (8:2, v/v), submetido a ultra-som por 10 min, diluído para 2 mL e filtrado em membrana de PTFE com poro de 0,22 µm. Em seguida, feita a injeção de 20 µL em HPLC-PDA₁ analítico. Para obtenção do perfil cromatográfico foi empregada como fase móvel H₂O/MeOH. Durante a eluição dos componentes químicos presente no extrato, foi utilizado o gradiente exploratório de 5-100% de MeOH, por 60 minutos, com manutenção de 100% de MeOH por mais 5 minutos. O perfil cromatográfico para estas condições é apresentado na Figura 4.1.1.

Após várias tentativas para a otimização cromatográfica, com variações de colunas, fases móveis e gradientes de eluição, atingimos as melhores condições cromatográficas para análise deste extrato com boa resolução de linha de base (Figura 4.1.2). As condições foram: coluna Synergi Hydro RP18 (250 x 4,6 mm ID, de 4 mm), vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. A análise foi realizada em 22° C e monitorada a $\lambda = 200-400$ nm. A composição da fase móvel foi água (eluente A), acetonitrila (eluente B) e metanol (eluente C),

ambos contendo 0,1% de TFA. O gradiente de eluição do extrato etanólico está representada na Tabela 3.6.2.

Tabela 3.6.2. Gradiente de eluição cromatográfica: A = água, B = acetonitrila, C = metanol, ambos com 0.1% de TFA. Vazão 1 mL.min⁻¹.

Tempo (min)	A (%)	B(%)	C (%)
0	92	2	6
8	85	3	12
80	55	10	35

HPLC-PDA₂: Utilizado para a quantificação dos metabólitos no extrato etanólico. Cromatógrafo Jasco[®] 2010 (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba PU-2089S, sistema quaternário, com injetor de amostra de 100 µL AS-2055, acoplado a um detector de arranjo de foto diodos MD-2018 e forno de coluna (CO-2065 plus). A coluna utilizada foi uma Synergi Hydro, Phenomenex[®] (Torrance, CA, EUA), RP-18 (250 x 4,6 mm d.i.; 4 µm) equipada com uma coluna de guarda Phenomenex (4,0 x 2,0 mm d.i.). O software Chromnav 1.18.03 foi utilizado para o controle do sistema de análise, coleta de dados e processamento. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22 °C e monitoradas a $\lambda = 214, 279$ e 365 nm. A vazão foi de 1,0 mL.min⁻¹ e 20 µL foram injetados em cada análise. A fase móvel foi constituída por água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos contendo 0,1% de TFA. O seguinte gradiente de eluição foi aplicado: 0-15 min: 5-10% B, 15-65 min: 10-25% B, 65-70 min: 25-100% B.

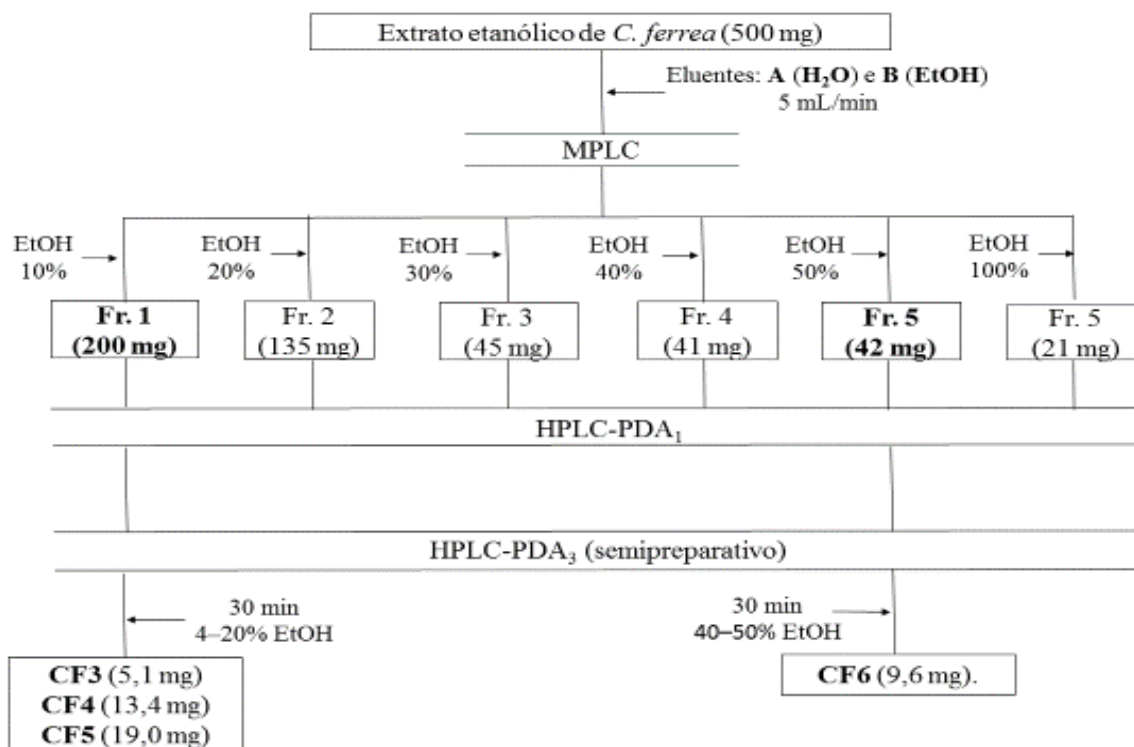
3.6.2. Modo semipreparativo

HPLC-PDA₃: Cromatógrafo Jasco[®] 2010 (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba PU-2089S, solvente binário, com injetor de amostra manual Rheodyne[®] com *loop* de 100 µL, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos MD-2018. A coluna utilizada foi uma Synergi Hydro, Phenomenex[®] RP-18 (250 x 10 mm d.i.; 10 µm), equipada com uma coluna de guarda Phenomenex (4,0 x 3,0 mm d.i.). O software Chromnav 1.18.03 foi utilizado para o controle do sistema de análise, coleta de dados e processamento. As análises cromatográficas foram monitoradas a $\lambda = 214, 279$ e 365 nm.

As frações obtidas por MPLC foram analisadas nas condições cromatográficas otimizadas no HPLC-PDA₁. Após análise, as frações 1 (10 % MeOH) e 5 (50 % MeOH) foram submetidas ao fracionamento no cromatógrafo semipreparativo. O volume das injeções foi de 100 µL e a vazão utilizada foi de 6,0 mL.min⁻¹. A fase móvel consistiu-se de água

(eluente A) e metanol (eluente B) contendo 0,1% de ácido acético. A eluição foi no modo gradiente sendo: 0–30 min: 4–20% B (Fr1) e 0–30 min: 40–50% B (Fr5). As análises cromatográficas foram monitoradas a $\lambda = 214, 279$ e 365 nm. A fração 1 resultou em 3 substâncias isoladas, denominadas **CF3** (5,1 mg), **CF4** (13,4 mg) e **CF5** (19,0 mg) e a fração 5 em uma substância, designada **CF6** (9,6 mg) (Figura 3.6.1).

Figura 3.6.1. Fluxograma representativo do fracionamento por MPLC do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*.



3.7. Análises por Espectrometria de Massas

3.7.1. Preparo das amostras para análises por HPLC-ESI-IT-MSⁿ

Para análise por HPLC-ESI-IT-MSⁿ, o extrato etanólico (5 mg cada) foi dissolvido em metanol (3 mL), filtrada primeiramente em cartucho Sep-pak RP-18 e, posteriormente, filtrado novamente em um disco de membrana de Nylon 0,22 μ m.

Para análise por FIA-ESI-IT-MSⁿ, o extrato etanólico e as substâncias isoladas (1 mg) foram dissolvidos em 1 mL de metanol:água (8:2 v/v) em uma membrana de PTFE com poro de 0,22 μ m. Em seguida as amostras foram diluídas em metanol:água, (8:2 v/v). As soluções do extrato etanólico (50 ppm) e das substâncias isoladas (10 – 30 ppm) foram introduzidas diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsionada por um sistema de bombeamento em vazão de 3 μ L min⁻¹.

3.7.2. Análises por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ

O extrato etanólico foi analisado separadamente, *on-line* por HPLC–ESI-IT-MSⁿ em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific[®]. As separações por HPLC foram realizadas utilizando uma coluna Synergi Hydro, Phenomenex[®] (Torrance, CA, EUA), RP-18 (250 x 4,6 mm d.i.; 4 µm) em uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹. Posteriormente cada íon, correspondente a cada pico do cromatograma LC-MS foi analisado no modo ESI-MS negativo.

Os espectros de massas (dos íons presentes no extrato etanólico e das substâncias isoladas) foram obtidos em um mesmo tipo de espectrômetro de massas (LCQ Fleet da Thermo Scientific[®]), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³, MSⁿ) foram realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ). Apenas uma substância isolada (CF1) foi analisada no modo positivo. As condições foram as seguintes: 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 *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 20 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific[®]) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

As análises por HPLC-ESI-IT-MS do extrato etanólico e FIA-ESI-IT-MSⁿ das substâncias isoladas foram realizadas no Instituto de Química da Unesp em Araraquara. Já o experimento FIA-ESI-IT-MSⁿ do extrato etanólico foi realizado no Campus Experimental da Unesp de São Vicente, no Laboratório coordenado pelo professor Wagner Vilegas.

3.8. Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetro Bruker[®] Fourier 300 equipado com probe de 5 mm e operando a 7,0 T e em espectrômetro Bruker[®] Ascend III 600 equipado com probe de 5 mm e operando a 14,1 T.

3.9. Avaliação quantitativa

O extrato etanólico obtido a partir das cascas do caule de *C. ferrea* e os padrões foram analisados num cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). Para quantificação do extrato etanólico foi utilizado o HPLC-PDA₂ (para condições experimentais veja item 3.6.1).

O método de padrão externo foi aplicado para quantificar cada substância. A quantificação dos constituintes individuais foi realizada por meio de uma curva analítica e em triplicata. As medições foram realizadas com banda de máximos de absorção em 254 nm.

3.9.1. Preparação do extrato e padrões para análise por HPLC-PDA

A massa do extrato etanólico (20 mg) foi medida num balão volumétrico de 2,0 mL. Foi dissolvido em 0,5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), completado o volume com metanol e colocado num banho de ultra-som (Unique[®] USC1850) durante 10 minutos.

O padrão de ácido elágico (1,0 mg) foi dissolvido em 3 mL de metanol:DMSO (1:1, v/v). Esta solução foi usada para preparar as demais concentrações de ácido elágico, que fazem parte da curva analítica. As amostras de ácido gálico padrão (0,5 mg) foram dissolvidos em 1 mL de metanol, separadamente. O metanol foi utilizado para as diluições subsequentes.

As soluções dos padrões e do extrato etanólico foram filtradas através de uma membrana de PTFE 0,22 (Millex[®]) antes da análise por HPLC-PDA₂.

3.9.2. Identificação dos picos

Para caracterização dos constituintes químicos a serem quantificados, foram analisados os tempos de retenção de cada pico no cromatograma HPLC-PDA juntamente com espectros de UV, padrões de fragmentação de massa e comparação com dados da literatura.

Para quantificação das seis substâncias por HPLC-PDA₂ comparou-se os tempos de retenção das substâncias identificados com as amostras dos padrões autênticos (ácido gálico, galato de etila e ácido elágico) ou compostos isolados (ácido galoil quínico e 3-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-arabinopiranosídeo) e comparando-se o espectro de UV de cada pico das seis substâncias no cromatograma de quantificação com os encontrados na análise HPLC hifenada a MS. Para identificação dos metabólitos secundários presente na matriz estudada também foi realizada co-injeção de padrões autênticos e/ou substâncias previamente isoladas e caracterizadas. O ácido valoneico dilactona, foi identificado baseado apenas em seu espectro de UV e padrões de fragmentações no espectro de ESI-MS.

Os padrões de referência para quantificação foram o ácido gálico (98%) (Merck®) e ácido elágico (95%) (Sigma Aldrich®). As demais substâncias quantificadas revelaram uma pureza entre 95 - 99%.

3.9.3. Linearidade, Precisão, Limite de Detecção e Quantificação

As curvas analíticas foram obtidas com oito (ácido elágico) e nove (ácido gálico) níveis de concentração dos padrões. As áreas dos picos do cromatograma (254 nm) foram comparadas com as concentrações conhecidas das soluções padrão para estabelecer as equações da curva analítica. As soluções estoque de ácido gálico (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido elágico (333 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram dissolvidas separadamente em metanol grau HPLC a fim de obter soluções que foram apropriadamente diluídas para cada uma das substâncias e que forneceram as seguintes concentrações: ácido gálico (1,95; 3,91; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido elágico (2,6; 5,2; 10,4; 20,81; 41,64; 83,25; 166,5; 333 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Cada solução foi analisada em triplicata.

A precisão do ensaio foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD) da repetibilidade e análise de precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada por análise de três amostras (10 mg.mL^{-1}) no mesmo dia. A precisão intermediária foi obtida a partir da avaliação de três amostras diferentes (10 mg.mL^{-1}) injetadas em triplicata, em três dias consecutivos. A estabilidade foi testada através da análise do extrato etanólico da casca do caule de *C. ferrea* e a área do pico do ácido gálico e ácido elágico no extrato foram registradas e comparadas.

Os padrões foram analisados por HPLC-PDA₂ e a área do pico cromatográfico para cada concentração foi calculado. Os valores foram interpolados em função da concentração usando regressão linear. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) de 0,99 foi observado (ANVISA, 2003). Os parâmetros da equação (inclinação e intercepção) de cada curva padrão foram usados para obter os valores de LOD (limite de detecção) e LOQ (limite de quantificação). O LOD foi determinado como o sinal equivalente a 3,3 vezes o valor entre a razão do desvio padrão do coeficiente linear (b) pelo coeficiente angular (a) ($3,3 \times a/b$) obtidos pela equação da reta da curva analítica. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta razão (RIBANI et al., 2004).

3.9.4. Exatidão e seletividade

A exatidão do método foi avaliada de acordo com um ensaio de recuperação (RIBANI et al., 2004). Quantidades conhecidas do padrão de ácido gálico (15,62; 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata) e ácido elágico (41,62; 166,5 e 333 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata) foram adicionadas em uma solução de concentração conhecida (10 mg.mL^{-1}) do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. As amostras fortificadas foram submetidas ao mesmo procedimento descrito na Seção 3.10.1. A quantidade total dos analitos foi determinada e comparada com os resultados obtidos através da análise de amostras testemunha e avaliou-se a percentagem de recuperação.

A seletividade foi avaliada por comparação do tempo de retenção das substâncias de referência (padrões e substâncias) com o tempo de retenção do pico obtido por análise do extrato de *C. ferrea*. A identidade do pico também foi realizada por comparação com os espectros UV.

3.10. Determinação do Teor de Fenóis Totais

O extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* foi analisado quanto ao teor de fenóis totais.

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

- 0,625 mg do extrato etanólico (dissolvidos em 10 mL de MeOH = [62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]);
- 10 mL solução de *Folin-Ciocalteu* (9,333 mL água destilada + 0,667 mL *Folin Ciocalteu*);
- 5 mL de solução de Na_2CO_3 saturada (200 g.L^{-1});
- 2,5 mg de Ácido Gálico (Merck®), utilizado como padrão (solubilizados em 10 mL de MeOH = [250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]).

Procedimento:

- Primeiramente procedeu-se às diluições para a curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125,0 e 250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- 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 (Thermo Plate®) a λ 750 nm.

Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.11. Avaliação do Potencial Antirradicalar

O extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* foi analisado quanto a sua capacidade de captura do radical livre por DPPH.

O potencial antirradicalar foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico, de acordo com metodologia descrita por Pauletti et al. (2003) com modificações. Utilizou-se uma solução de DPPH 0,004 % em metanol que foi misturado à solução da amostra em análise. Soluções estoque foram preparadas a partir de 2,5 mg da amostra teste (extrato e padrões) em 10 mL de metanol. Em seguida foram realizadas diluições até as concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. 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. Utilizou-se os padrões de ácido gálico (Merck®) e quercetina (Sigma Aldrich®), que foram submetidos ao mesmo procedimento experimental do extrato etanólico. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

A atividade antirradicalar (AA) foi determinada pela equação:

$$AA(\%) = ((Ac - Aa)/Ac) \times 100$$

Onde:

Aa = absorbância da amostra

Ac = Absorbância do controle negativo

A concentração eficiente do extrato etanólico, ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada usando o Programa Microsoft Office Excel, a partir de uma curva exponencial, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}).

3.12. Avaliação da atividade mutagênica (Teste de Ames)

O ensaio da atividade mutagênica do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara – Unesp, sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Aparecida

Varanda. A mutagenicidade foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Maron e Ames (1983).

3.12.1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene D (hisD3052), e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA. A cepa TA100 apresenta mutação his G46, e detecta agentes que causam substituições, principalmente em pares G-C. A cepa TA102 contém a mutação no gene hisG, detectando agentes químicos e radiações, além de agentes *cross-link*, como a mitomicina C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift*, apresentando mutação no gene hisD6610.

3.12.2. Manutenção e estoque das cepas, verificação das características genéticas

As cepas foram estocadas em tubos para congelamento (1,5 mL a -70°C), para serem mantidas as características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura, foram acrescidos 0,1 mL de DMSO, substância crio protetora. As características genéticas das cepas foram verificadas antes da estocagem.

3.12.3. Preparo dos inóculos de *Salmonella typhimurium* utilizados no ensaio

Com alça de inoculação, pequena quantidade de cultura estoque foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº2), incubado a 37°C por 12-16 horas, com agitação a 17,77 g, de modo a obter densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias.mL⁻¹.

3.12.4. Meios de cultura

Os meios foram preparados utilizando ágar mínimo glicosado (7,5 g de Bacto-ágar, 465 mL de água destilada), acrescido de 25 mL de glicose 40% (TA98, TA100 e TA102) ou 25 mL de glicose 8% (TA97a) acrescido de 10 mL meio Vogel Bonner (VB) “E” 50x concentrado (10 g de sulfato de Mg, 100g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico, 980 mL de água destilada), na proporção de 980/20 mL, respectivamente.

O ágar de superfície foi composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto-ágar e 100 mL de água destilada, acrescido de 10 mL de solução de L-histidina 0,096 g.mL⁻¹ (Sigma) e D-biotina 0,123 mg.mL⁻¹ (Sigma).

Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

3.12.5. Preparo da mistura S9

Utilizou-se a fração microsomal S9 de fígado de ratos induzidos com arocloror 1254, um indutor de enzimas (MOLTOX, USA). Esta fração revela se o agente em teste necessita ser metabolizado para se tornar mutagênico. À fração liofilizada, foram acrescidas soluções de cloreto de magnésio 0,4 M, cloreto de potássio 1,65 M, glicose-6-fosfato 1 M, NADP 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M e água milli-Q estéril (previamente autoclavada), todas mantidas em gelo durante o experimento.

3.12.6. Controles

O controle negativo foi feito com solvente utilizado para solubilizar os extratos vegetais (DMSO). 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 e TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno para TA102.

3.12.7. Ensaios de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações dos extratos vegetais foram misturadas a 0,1 mL 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, adiciona-se 2 mL de ágar superfície (“top-ágar”) suplementado com traços de histidina e biotina homogeneizou-se levemente e verteu-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do “top-ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.12.8. Análise dos Dados

Os dados foram analisados com o programa estatístico SALANAL. Este programa permite avaliar o efeito dose-resposta pelo cálculo da variância (ANOVA –Test F) entre as médias do controle negativo e os testes, seguindo uma regressão linear. Foram também calculadas as razões de mutagenicidade (RM), que é a média do número de revertentes do teste (espontâneos + induzidos) dividida pela média de revertentes do controle negativo. O

teste é considerado positivo quando a RM for maior ou igual a 2 em pelo menos duas concentrações e houver um efeito dose-resposta significativo. O teste é negativo quando não induzir aumento significativo de revertentes e suas RM forem menores que 2 (RESENDE et al., 2012).

3.12.9. Análise Estatística

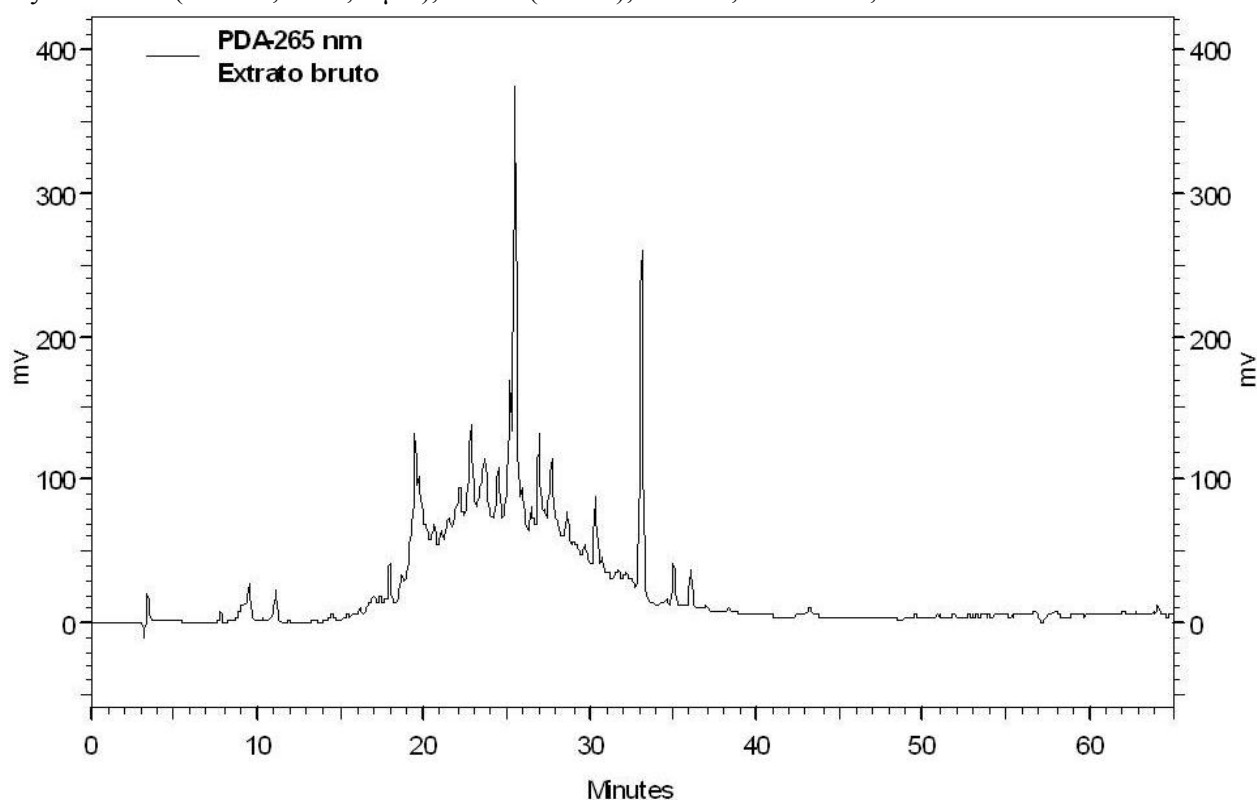
A avaliação estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SALANAL (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*). O modelo adotado para a análise foi o de Bernstein et al. (1982). Os dados de revertentes/placa foram analisados através da ANOVA (análise de variância), seguido de regressão linear.

4. Resultados e Discussão

4.1. Identificação dos compostos por HPLC-PDA

A avaliação do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* iniciou com a investigação dos metabólitos secundários por HPLC-PDA. O estudo consistiu na tentativa de identificação das substâncias ou das classes de substâncias presentes no extrato etanólico. A avaliação preliminar do perfil cromatográfico (Figura 4.1.1) mostrou claramente a complexidade desta matriz e a baixa resolução cromatográfica. Análises realizadas por RODRIGUES (2007) confirmam que perfis com características semelhantes ao da Figura 4.1.1 sugere a presença de taninos.

Figura 4.1.1. Perfil cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de *C. ferrea* obtido por HPLC-PDA. Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 60 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm.



Diante da baixa resolução do perfil cromatográfico observada no perfil da Figura 4.1.1, várias tentativas de otimização do método foram realizadas. O método foi otimizado apresentando boa resolução, seletividade e mostrou-se promissor para análise das substâncias, como pode ser verificado no cromatograma da Figura 4.1.2.

Com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos (PDA) acoplado ao sistema HPLC, pôde-se processar os dados cromatográficos e obter o cromatograma em comprimentos de

onda seletivos para uma determinada classe de metabólito secundário. A análise dos espectros de absorção no ultravioleta forneceu informações importantes para sinalizar quais substâncias constituem o extrato etanólico (Figura 4.1.3). Verificou-se a presença de bandas de absorção entre 270 – 280 nm de várias substâncias, permitindo sugerir a presença de derivados do ácido gálico. Derivados de ácido gálico apresentam uma única banda de absorção referente ao sistema benzílico, com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm (STICHER, 2008). A presença de bandas de absorção em 254 e 365 nm podem indicar a presença do ácido elágico ou seus derivados (SANTOS, et al., 2013).

Desta forma, a avaliação dos cromatogramas das Figuras 4.1.1 e 4.1.2 e dos espectros de UV obtidos, sugerem a presença, no extrato etanólico, de derivados de ácidos fenólicos de alta polaridade e taninos (FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011). Estudos anteriores realizados para determinação do teor de taninos totais nas cascas do caule de *C. ferrea*, revelaram altos teores desses fenólicos, cujas concentrações citadas variam de 9,0 % a 31 % (FRASSON; BITTENCOURT; HEINZMANN, 2003; COSTA, et al., 2011; VASCONCELOS, et al., 2011).

Os perfis cromatográficos das subfrações (CCC sephadex LH-20) revelaram que as amostras não seriam adequadas para serem purificadas por HPLC semipreparativo, pela sobreposição e pela falta de resolução dos picos cromatográficos. Estudo realizado por Andreo (2003) com o extrato metanólico de *Anacardium humile*, também evidenciou uma mistura complexa de substâncias, incluindo a presença de taninos que interferiram no fracionamento por HPLC, impossibilitando portanto o fracionamento do extrato diretamente por esta técnica.

Detectada a presença de taninos nas cascas do caule de *C. ferrea* (VASCONCELOS, et al., 2011), metodologias alternativas para eliminação dos taninos e isolamento de substâncias foram testadas com o extrato etanólico: partição líquido-líquido (ANDREO, 2008), eliminação de taninos por adsorção na poliamida (SU, et al., 2008) e polivinilpolipirrolidona (PVPP). Porém, os resultados das tentativas de purificação das substâncias por todas estas técnicas não foram promissores.

Portanto, diante da complexidade do extrato, outras técnicas de fracionamento para o isolamento das substâncias foram então realizadas como: CCC de sílica, sephadex, MPLC e HPLC-PDA₃ semipreparativo (descritos no capítulo 3). Com estas técnicas foi possível o isolamento de seis substâncias, sendo, duas delas com certo grau de impureza (CF4 e CF6). Tentativas de isolamento de outras substâncias foram realizadas, porém não foi possível

identificar as estruturas das substâncias por RMN ou MS, devido a quantidade de impureza ainda presentes.

Figura 4.1.2. Perfil cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de *C. ferrea* obtido por HPLC-PDA₁. Sistema de eluição gradiente: H₂O:MeOH:ACN em 80 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm.

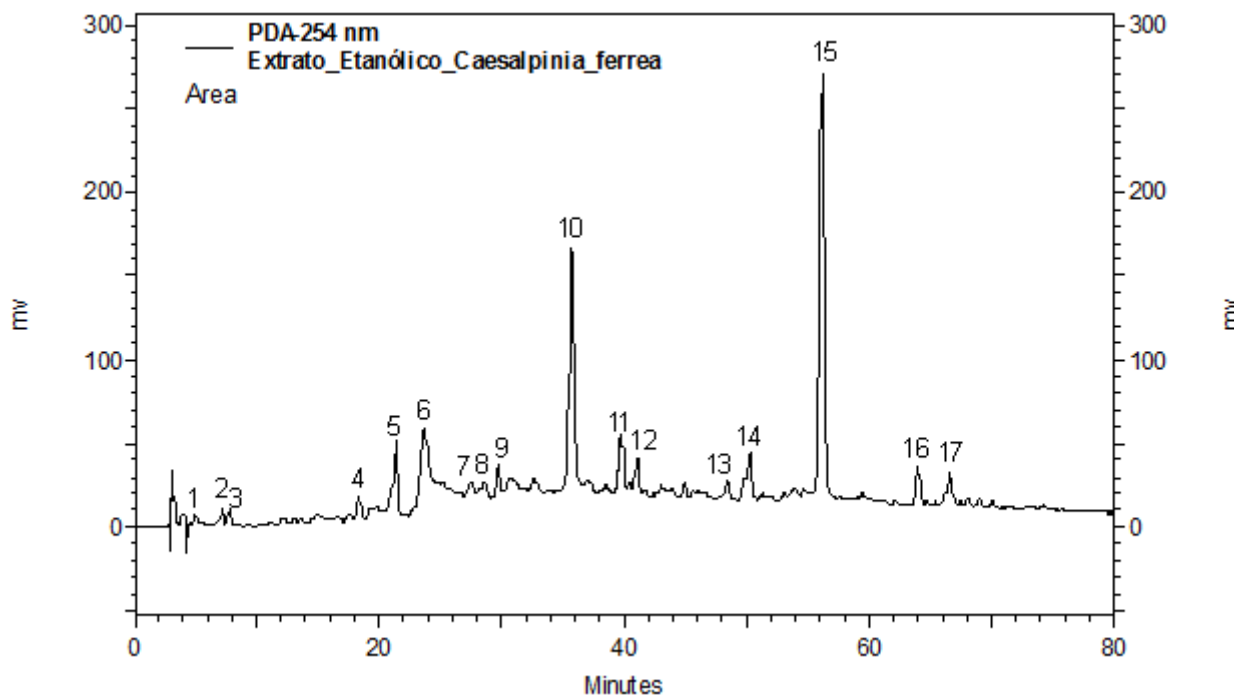
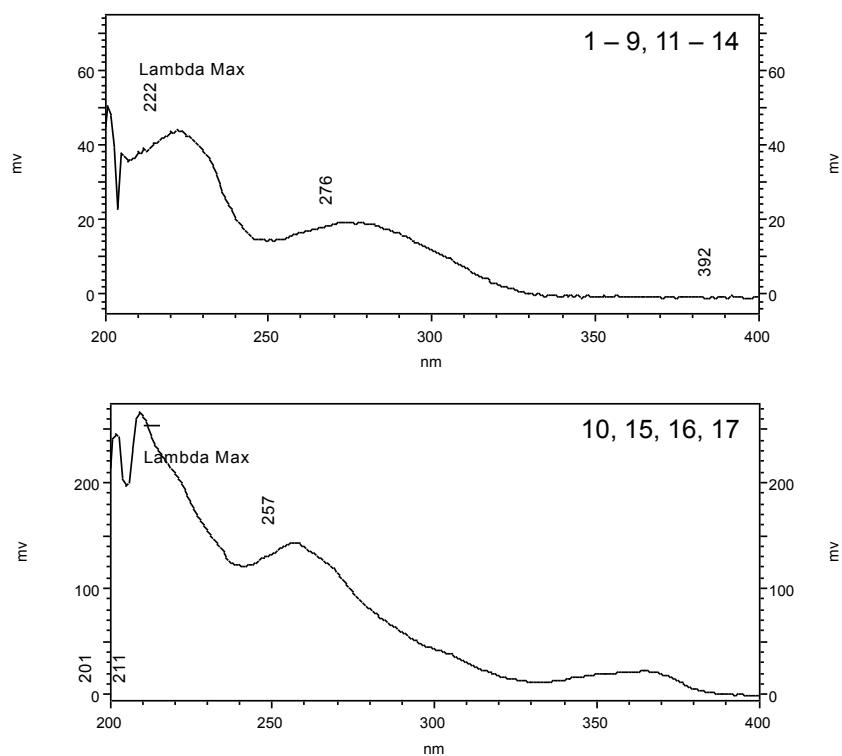


Figura 4.1.3. Espectro de absorção no ultravioleta das substâncias majoritárias (principais picos no crom



4.2. Identificação dos metabólitos secundários por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ

Diante das dificuldades de isolamento das substâncias dos extratos de *C. ferrea*, por técnicas cromatográficas clássicas, nesta etapa do estudo foi realizada a caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* com a técnica HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) hifenada com espectrometria de massas (MS), utilizando como fonte de ionização electrospray (ESI), permitem a análise direta e rápida de misturas polares complexas. Estruturas de diferentes tamanhos e tipos de moléculas polares tais como os ácidos fenólicos, flavonoides glicosilados ramificados e taninos podem ser separados por HPLC e ionizados por ESI-MS para investigação (SIMIRGIOTIS et al., 2012). Assim, o acoplamento direto, da cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas (HPLC-MSⁿ) pode facilitar a triagem informativa dos constituintes químicos, e tem sido uma ferramenta poderosa para a análise rápida de compostos conhecidos, bem como a identificação de estrutura de compostos desconhecidos em misturas complexas (WANG et al., 2011; JIAO et al., 2013).

A inserção ou infusão direta da amostra (FIA) no espectrômetro de massas é uma técnica que vem sendo utilizada como uma ferramenta promissora na detecção da composição química de uma determinada matriz. Além disso, é uma técnica rápida, sensível e reprodutível para realizar estudos de classificação de amostras, evitando a separação cromatográfica demorada (KOULMAN et al., 2007).

O cromatograma por HPLC-ESI-IT-MS do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* está apresentado na Figura 4.2.1. Cada íon, correspondente a cada pico do cromatograma HPLC-MSⁿ foi analisado posteriormente por FIA-ESI-IT-MSⁿ no modo negativo. O extrato etanólico foi dissolvido em metanol e injetado por infusão na fonte de ESI (veja parte experimental, ítem 3.7.2) para obtenção dos espectros ESI-MSⁿ.

A Figura 4.2.2 mostra o espectro de massas em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ($[M - H]^-$) presentes no extrato etanólico de *C. ferrea* (Faixa de íons com m/z de 50-2000 Da). Observa-se que no espectro os íons de maior intensidade são os com valores de m/z 169, 301, 469, 801, 865, 953, 1103 e 1133.

Os espectros no UV e as fragmentações existentes nos espectros de segunda-ordem (MS/MS) são apresentados na Tabela 4.2.1. Para substâncias detectadas e conhecidas foram comparados seus dados de fragmentação com os já existentes na literatura. A Tabela 4.2.1 e Figuras 4.2.1 e 4.2.2, quando comparados com dados da literatura (MULLEN et al., 2003;

MENDES et al., 2011; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013; SANTOS et al., 2013), demonstraram que as substâncias do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* são características de substâncias fenólicas, como as do ácido gálico, derivadas do ácido gálico, ácido elágico, derivados do ácido elágico, catequina e proantocianidina. As discussões para cada um dos íons identificados estão descritas conforme texto que segue:

Figura 4.2.1. Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo negativo, do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. Sistema de eluição gradiente: 5-100% MeOH em 75 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP 18 (250 x 4,6 mm ID, 5 µm), vazão 0,8 µL/min, λ = 254 nm. (Para condições

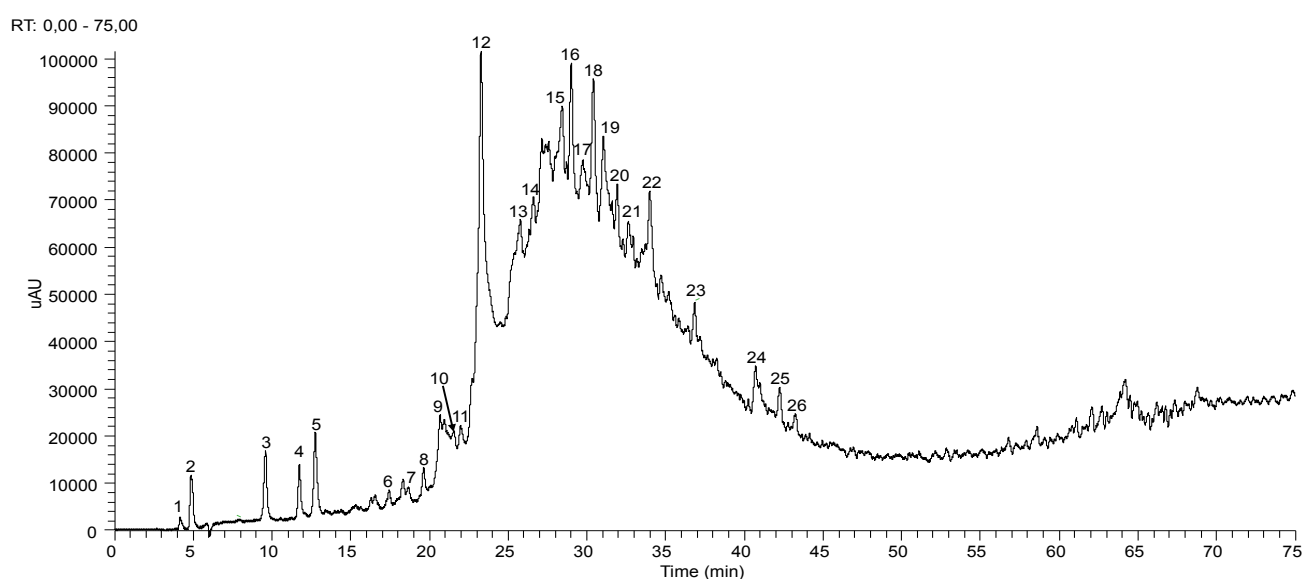
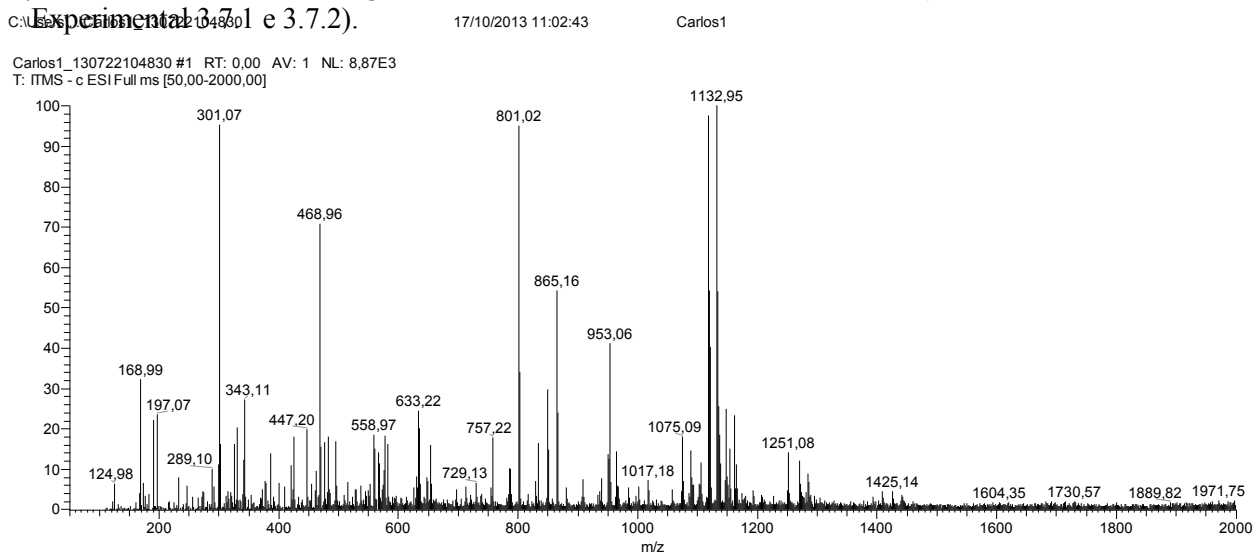


Figura 4.2.2. Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato etanólico de *C. ferrea* avaliado em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 50-2000 Da. (Para condições, vide Parte Experimental 3.7.1 e 3.7.2).



O ácido gálico e vários de seus derivados foram encontrados no extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. O pico 4 ($t_r = 11,72$) foi atribuído ao próprio ácido gálico. O espectro de UV com λ em 271 nm (MENDES et al., 2011; MENA et al., 2012) e o íon da molécula desprotonada em m/z 169 confirmaram a presença desta substância (Figura 4.2.3). Esta substância foi isolada das cascas de *C. ferrea*, e o estudo de sua fragmentação está descrita na seção 4.3.

A Figura 4.2.4, apresenta o espectro de segunda-ordem da molécula desprotonada em m/z 197, que foi identificado no extrato etanólico como pico 16 ($t_r = 29,01$). Esse espectro levou à formação do íon produto de m/z 169, referente à perda de $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ $[\text{M} - 28 - \text{H}]^-$. Também foi observado a formação do íon fragmento em m/z 125 $[\text{M} - 28 - 44 - \text{H}]^-$, que foi atribuído à perda de $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ e CO_2 respectivamente. Este padrão de fragmentação confirma, comparados com dados da literatura (SUN et al., 2007) e com co-injeção de padrão (item 4.4) que esta substância é o galato de etila (Figura 4.2.4).

Os picos 5 ($t_r = 12,75$) e 10 ($t_r = 21,52$) (Figura 4.2.1; Tabela 4.2.1) foram identificadas como derivados do ácido gálico ligados a uma unidade do ácido quínico. O íon da molécula desprotonada em m/z 495 foi identificado como sendo do ácido digaloil quínico. No espectro de segunda ordem (Figura 4.2.5) observou-se a perda de uma unidade galoila $[\text{M} - 152 - \text{H}]^-$ fornecendo o íon em m/z 343. Fragmentação do íon m/z 343 originou outros fragmentos: m/z 191, referente a eliminação do outro grupo galoila $[\text{M} - \text{H} - 152]^-$ e o íon fragmento m/z 169, correspondente a eliminação do ácido quínico com a formação do ácido gálico desprotonado (CLIFFORD; STOUPI; KUHNERT, 2007). Para o ácido monogaloil quínico, foram observados os mesmos fragmentos discutidos para o íon m/z 343 (Figura 4.2.6), descrito neste parágrafo.

As substâncias pertencentes aos picos 6 e 23 (Figura 4.2.1) foram identificadas como uma e duas unidades do ácido gálico ligado ao ácido chiquímico, respectivamente. Análise do espectro no UV, mostrou padrão característico de compostos fenólicos ($\lambda = 275$ nm) (GUIMARÃES et al., 2013).

Análise do pico 6, com $t_r = 17,48$ min, evidenciou o íon da molécula desprotonada em m/z 325 (Figura 4.2.7). Fragmentações de segunda ordem identificaram o íon produto em m/z 169 $[\text{M} - 156 - \text{H}]^-$, referente a perda do ácido chiquímico. Este padrão de fragmentação, comparado com dados da literatura, possibilitaram sugerir que esta substância é o ácido galoil chiquímico (PAWLOWSKA; LEO; BRACA, 2006; TAVARES et al., 2010; MENDES et al., 2011 e GUIMARÃES et al., 2013).

A substância presente no pico 23 apresentou $t_r = 36,86$ min e o íon da molécula desprotonada em m/z 477 (Figura 4.2.8). No espectro de segunda ordem observou-se a perda de uma unidade galoíla $[M - 152 - H]^-$ fornecendo o íon em m/z 325. Fragmentação do íon em m/z 325 originou os fragmentos descritos para a substância presente no pico 6. Comparação dos dados desta substância (UV e fragmentação) com os da literatura, (PAWLOWSKA; LEO; BRACA, 2006; TAVARES et al., 2010; MENDES et al., 2011 e GUIMARÃES et al., 2013) possibilitaram sugerir que esta substância é ácido digaloil chiquimico.

Os picos com $t_r = 32,60$ (21); 26,61 (14); 25,68 (13); 19,63 (8) e 9,58 (3) min, apresentaram espectros no UV com absorção máxima em $\lambda = 278-280$ nm, característico de derivados da galoil glicose (SIMIRGIOTIS et al., 2012).

Análise criteriosa dos íons (Figura 4.2.9 a 4.2.13) evidenciou a presença de uma série homóloga de galoilglicose intercalados por perdas consecutivas de 152 Da (Figura 4.2.14). Os picos observados desta série foram m/z 331, 483, 635, 787, 939, correspondente ao mono, di, tri, tetra e pentagaloilglicose, respectivamente.

Espectros de segunda ordem (Figura 4.2.9) realizado com o íon m/z 939, possibilitou verificar a perda de uma unidade galoil $[M - 152 - H]^-$, levando ao íon de m/z 787 e à perda de água $[M - 152 - 18 - H]^-$, levando ao íon m/z 769. Espectros de terceira ordem do íon de m/z 787 forneceu o pico de m/z 635 que foi atribuído à perda de outra unidade galoil $[M - (2 \times 152) - H]$ e ao íon m/z 617, novamente atribuído a perda de outra molécula de água $[M - (2 \times 152) - 18 - H]^-$. Estas fragmentações levaram à molécula da pentagaloilglicose que foi recentemente identificado em folhas de *Adesmia emarginata* (SIMIRGIOTIS et al., 2012 e em nozes (*Juglans regia*) (REGUEIRO et al., 2014).

Análise consecutiva dos demais derivados galoilglicose, também evidenciaram perdas consecutivas de 152 Da e 170 Da, como demonstrado na Figura 4.2.14. Portanto, no extrato etanólico da casca do caule de *C. Ferrea* foi possível identificar inequivocamente os derivados tetragaloil glicose (m/z 787), trigaloil glicose (m/z 635) e digaloilglicose (m/z 483).

A substância que gerou o íon precursor m/z 331 (Figura 4.2.13) foi identificada como monogaloil glicose (NUENGCHAMNONG; BOONPATHANASAK; TEPWITUKKIJ, 2011; SANTOS et al., 2013). Nos experimentos de MS² os fragmentos principais foram verificados pela perda de água em m/z 313 $[M - H - 18]^-$, pela remoção de um e de dois grupos formaldeído (CH₂O) respectivamente da glicose em m/z 271 $[M - H - 60]^-$ e m/z 211 $[M - H - 60 - 60]^-$, pela perda de outra molécula de água em m/z 193 $[M - H - 60 - 60 - 18]^-$ e ainda pela perda de uma glicose $[M - H - 162]^-$ originando o íon em m/z 169 (Figura 4.2.13). O

espectro de MS³ do íon m/z 169 evidenciou a formação do íon m/z 125, característico do ácido gálico, conforme anteriormente descrito.

A substância presente no pico 20 ($\lambda = 278$) apresentou $t_r = 31,94$ min e o íon da molécula desprotonada em m/z 785 (Figura 4.2.15). Espectros de segunda ordem possibilitaram verificar a formação do íon em m/z 633 $[M - 152 - H]^-$, indicando a eliminação de um grupo galoila, do íon m/z 615 $[M - 152 - 18 - H]^-$ pela eliminação de uma unidade de água, do íon em m/z 483 $[M - 301 - H]^-$, pela eliminação de HHDP e do íon em m/z 301 $[M - 483 - H]^-$ pela eliminação de digaloilglicose (LEE; JOHNSON; TALCOTT, 2005; HANHINEVA et al., 2008; SANDHU; GU, 2010). O esquema de fragmentação foi proposto e pode ser observado na Figura 4.2.15.

A substância presente no pico 12 ($\lambda = 273$) apresentou $t_r = 23,30$ min e o íon da molécula desprotonada em m/z 801 (Figura 4.2.16). O espectro de segunda ordem (Figura 4.2.16) evidenciou a perda de CO₂ $[M - 44 - H]^-$ fornecendo o íon fragmento em m/z 757. Espectros de terceira ordem (Figura 4.2.16) do íon de m/z 757 forneceram os picos de m/z 713 que foi atribuído à perda de outro CO₂ $[M - 88 - H]^-$, m/z em 631, referente a perda do ácido gálico $[M - 170 - H]^-$ e m/z 613 pela perda de uma molécula de ácido gálico e de água $[M - 170 - 18 - H]^-$. Estas fragmentações e íons levaram a sugerir que a molécula é um galotanino. Essa substância também foi encontrada no extrato aquoso de folhas verdes de *Myrtus communis* e identificada por Romani, Campo e Pinelli (2012), como sendo apenas um galotanino.

Análise do pico 17 ($\lambda = 279$ nm), com $t_r = 29,78$ min, evidenciou o íon da molécula desprotonada em m/z 965 (Figura 4.2.17). A fragmentação deste íon produziu o íon m/z 933 no MS². No MS³ apontou o fragmento típico de um elagitanino (m/z 301). Sugere-se que ocorre a lactonização com formação do ácido elágico, conforme demonstrado no esquema de fragmentação do íon m/z 785 (Figura 4.2.15). Também foram observados os fragmentos em m/z 915 obtidos a partir da perda de água e do íon em m/z 897, por desidratação. Além disso, o fragmento em m/z 613 resultou das perdas de ácido elágico e água. O fragmento em m/z 933 é típico para a castalagina. Com base nestes resultados e comparando-se com a literatura sugeriu-se a substância com um derivado da castalagina, principalmente pela presença dos íons em m/z 915 e 897 que indica a fragmentação desta molécula pela liberação de água (FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011).

O ácido elágico e seus derivados também foram identificados no extrato de *C. ferrea*. Estas substâncias apresentam espectros no UV característicos, com λ 254 e 365 nm (FRACASSETTI et al., 2013). As substâncias observadas no cromatograma da Figura 4.2.1 e

Tabela 4.2.1, com $t_r = 40,71$ (Pico 24); $42,27$ (Pico 25); $43,24$ (Pico 26) e $t_r = 31,06$ (Pico 19) mostraram os íons da molécula desprotonada em m/z 301; 447; 461 e 469, com padrões de fragmentações que segundo a literatura são característicos de derivados do ácido elágico (FRACASSETTI et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

O padrão de fragmentação do ácido elágico constitui-se basicamente das perdas no espectro de segunda ordem (Figura 4.2.18) de 44 Da (CO_2) e 28 Da (CO) (SANTOS et al., 2013). Estes íons foram detectados a partir do íon precursor m/z 301 (Figura 4.2.18), originando os íons m/z 257 $[\text{M} - \text{H} - \text{CO}_2]^-$, m/z 229 $[\text{M} - \text{H} - \text{CO}_2 - \text{CO}]^-$ e m/z 185 $[\text{M} - \text{H} - 2\text{CO}_2 - \text{CO}]^-$ respectivamente (MULLEN et al., 2003; SEERAM et al., 2006). Além dos experimentos de ESI-MS também foram realizados experimentos de co-injeção do ácido elágico (item 4.4) por HPLC-PDA₂. Por comparação do seu tempo de retenção e espectro de UV (Figuras 4.4.1 e 4.4.2), confirmou-se, portanto, que esta substância está presente nos extratos de *C. ferrea*.

O ácido elágico ou ácido 4,4',5,5',6,6'-hexaidroxidifênico-2,6,2',6'-dilactona é um composto fenólico muito importante. É uma molécula planar que contém quatro hidroxilas e duas lactonas e pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis (BARCH et al., 1994). É amplamente encontrado na dieta humana. Algumas variedades de frutas vermelhas são fontes importantes de ácido elágico, como por exemplo, morango, amora, framboesa e uva. É o principal constituinte presente em nozes e romã (PRIYADARSINI et al., 2002). É encontrado também em plantas medicinais como quebra-pedra (*Phyllanthus amarus*), (DHOOGHE et al., 2011). O ácido elágico pode ser encontrado em plantas na forma livre ou dentro de vacúolos formando os elagitaninos, sendo esta última, a maneira mais comum (HÄKKINEN; TÖRRÖNEN, 2000; ATKINSON et al., 2006).

Quanto as atividades biológicas existentes com o ácido elágico, a literatura descreve sua atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante *in vivo* e *in vitro* (TAKAGI et al., 1995; KHANDUJA et al., 1999; PRIYADARSINI et al., 2002). O ácido elágico é capaz de minimizar significativamente a indução de câncer de pulmão, fígado, pele e intestino. Além disso, possui efeito anticarcinogênico e antimutagênico contra uma variedade de carcinógenos, incluindo nitrosaminas, micotoxinas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SZAEPFER et al., 2003). Segundo Häkkinen et al. (1999) os derivados do ácido elágico representam em algumas espécies de plantas mais de 50% do teor total de fenólicos.

A partir da identificação do ácido elágico, foi possível verificar a existência de outros derivados glicosilados como discutido a seguir. A substância de pico 25 ($t_r = 42,27$)

apresentou o espectro do íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 447, o qual após a fragmentação produziu os íons em m/z 315 e 300, pela eliminação de uma pentose $[M - 132 - H]^-$ e de um grupo metila $[M - 132 - 15 - H]^-$. Outros íons observados apresentaram fragmentações características do ácido elágico. Esta substância foi isolada das cascas de *C. ferrea* e o estudo de sua fragmentação e identificação está descrito na seção 4.3.

A substância presente no pico 26 (Figura 4.2.1) também apresentou padrão de fragmentação que sugere ser um derivado do ácido elágico. O íon da molécula precursora foi identificado em m/z 461 $[M - H]^-$. Fragmentações de segunda ordem (Figura 4.2.19) levaram ao íon m/z 315 $[M - 146 - H]^-$ que foi atribuído a perda de uma ramnose. O íon fragmento m/z 300 foi atribuído a perda de uma metila $[M - 146 - 15 - H]^-$. Portanto, esta substância foi identificada como sendo ácido metilelágico ramnosídeo. Esta substância já foi identificada anteriormente nas cascas do caule de *Eucalyptus globulus* (KIM et al., 2001).

No cromatograma da Figura 4.2.1, observa-se também o pico da substância 19 ($t_r = 31,06$). Esta substância apresentou o espectro no UV ($\lambda = 257, 365$), considerado também um derivado do ácido elágico (SEERAM et al., 2006). O íon da molécula precursora foi identificado em m/z 469 e os espectros de segunda ordem evidenciaram a perda de CO_2 $[M - 44 - H]^-$ fornecendo o íon fragmento em m/z 425 (Figura 4.2.20). Esta substância já foi identificada também nas cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum* (SILVA et al., 2007) e no extrato de ervas de *Epilobium hirsutum* (BARAKAT et al., 1997) como dilactona do ácido valoneico.

Outra classe de substâncias identificada no extrato etanólico das cascas de *C. ferrea*, são as proantocianidinas, comum também em outras espécies de plantas (SANNOMIYA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2013). No caso especial das cascas do caule de *C. ferrea*, verificamos a existência do trímero e monômero da flavan-3-ol.

A verificação dessas evidências foi realizada com base na interpretação dos espectros de massas dos principais íons precursores observados. Espectros de segunda-ordem de proantocianidinas podem ser racionalizados em três principais mecanismos de fragmentação: retro-Diels-Alder (RDA), quinona metídeo (QM) e clivagem heterocíclica (HRF) (GU et al., 2003).

No experimento HPLC-ESI-IT-MS, a catequina foi identificada, presente no pico 9 (Figura 4.2.1), com $t_r = 20,62$ e $\lambda = 279$ nm, apresentando o íon precursor de m/z 289 que foi atribuído ao íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$. Experimento MS/MS deste íon (Figura 4.2.21) levou ao íon produto de m/z 271, referente à perda de uma molécula de água $[M - 18 - H]^-$ e aos fragmentos característicos de m/z 245 (perda de CO_2), 205 e 139 (ruptura do anel

A do composto flavan-3-ol) (SANDHU; GU, 2010), formado pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (GU et al., 2003).

Análise do espectro de massas ESI-MS (modo negativo) mostrou a presença do íon da molécula desprotonada em m/z 865 ($t_r = 34,01$). A fragmentação desta substância já foi descrita por Hamed e colaboradores (2014). Espectros de segunda ordem possibilitaram verificar a formação do íon em m/z 755 $[M - 110 - H]^-$ referente a fissão do furanobenzeno, da parte inferior do trímero, fornecendo a estrutura do diidroxibenzeno (anel B) como mostrado na Figura 4.2.22.

Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 865 (Figura 4.2.22) produziu também o íon fragmento de m/z 713. Esse íon foi gerado pela fragmentação RDA (anel C) da parte superior do trímero, com perda de 152 Da, com consequente eliminação da unidade dimérica.

Os íons produtos de m/z 847 e m/z 289 foram gerados à partir da fragmentação do íon da molécula precursora m/z 865, atribuídos à perda de água $[M - 18 - H]^-$ e à eliminação da molécula da [epi]catequina desprotonada através da formação do QM (quinoína metideo) no anel D da unidade central do trímero $[M - 576 - H]^-$ (Figura 4.2.22). Não foram observados no experimento HPLC-ESI-IT-MS a presença do dímero. Portanto o íon em m/z 577 refere-se ao fragmento do trímero.

O conjunto de dados fornecido pelo espectro de massas da Figura 4.2.21 e 4.2.22, corroboram para sugerir que estas substâncias são a [epi]catequina e uma procianidina.

Com os dados obtidos, foi possível descrever, neste trabalho, como a técnica HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ possibilitaram identificar os constituintes químicos majoritários do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. Foi possível identificar, sem necessidade de isolamento, vinte substâncias (ácido gálico e derivados, ácido elágico e derivados, galotaninos, elagitaninos, catequina e proantocianidina), considerando seus padrões de fragmentações e espectros no UV e comparando-os com os dados existentes na literatura.

Os resultados apresentados na Tabela 4.2.1 são úteis para um melhor entendimento das atividades farmacológicas da espécie e podem auxiliar na discussão taxonômica com espécies do gênero *Caesalpinia*, já que esta é primeira vez que são identificados esse quantitativo de substâncias nas cascas de *C. ferrea*.

Tabela 4.2.1. Dados de HPLC-ESI-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ das substâncias detectadas no extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea* (modo negativo).

Pico	Tr (min)	UV-vis (λ)	[M-H] ⁻	Principais fragmentos MS/MS	Substância Identificada
1	4,16	265	n. i. ¹	-	n. i.
2	4,87	--	347	-	n. i.
3	9,58	279	331	313, 271, 211, 193, 169, 125	Monogaloil glicose
4	11,72	271	169	125	Ácido gálico
5	12,75	274	343	191, 169, 125	Ácido galoil quínico
6	17,48	274	325	169, 125	Ácido galoil chiquímico
7	18,64	267	359	301, 239, 197, 169	n. i.
8	19,63	280	483	271, 211, 193, 169, 125	Digaloil glicose
9	20,62	279	289	271, 245, 205, 139	[epi]catequina
10	21,52	278	495	343	Ácido digaloil quínico
11	21,97	277	577	-	n. i.
12	23,30	273	801	757, 713, 633, 631, 613	Galoiltanino
13	25,68	278	635	483, 465, 423, 301	Trigaloil glicose
14	26,61	279	787	635, 617, 301	Tetragaloil glicose
15	28,43	278	849	-	n. i.
16	29,01	277	197	169, 125	Galato de etila
17	29,78	279	965	933, 301	Derivado da castalagina
18	30,42	278	953	909, 801, 757, 301	n. i.
19	31,06	257, 365	469	425	Dilactona do ácido valoneico
20	31,94	278	785	633, 301	Digaloil-HHDP-glicose
21	32,60	279	939	787, 769, 635, 617	Pentagaloil glicose
22	34,01	279	865	847, 755, 713, 697, 679, 577, 529, 289	Trímero da procianidina
23	36,86	276	477	325, 315, 169	Ácido digaloil chiquímico
24	40,71	254, 365	301	257, 229, 185	Ácido elágico
25	42,27	254, 366	447	315, 300	3-O-metilelágico-4'-O-β-D-arabinopiranosídeo
26	43,24	254, 363	461	315	Ácido metil elágico ramnosídeo

n. i. – não identificada.

HHDP – Hexa-hidroxi difenil.

Figura 4.2.3. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 169 (Substância Pico 4).

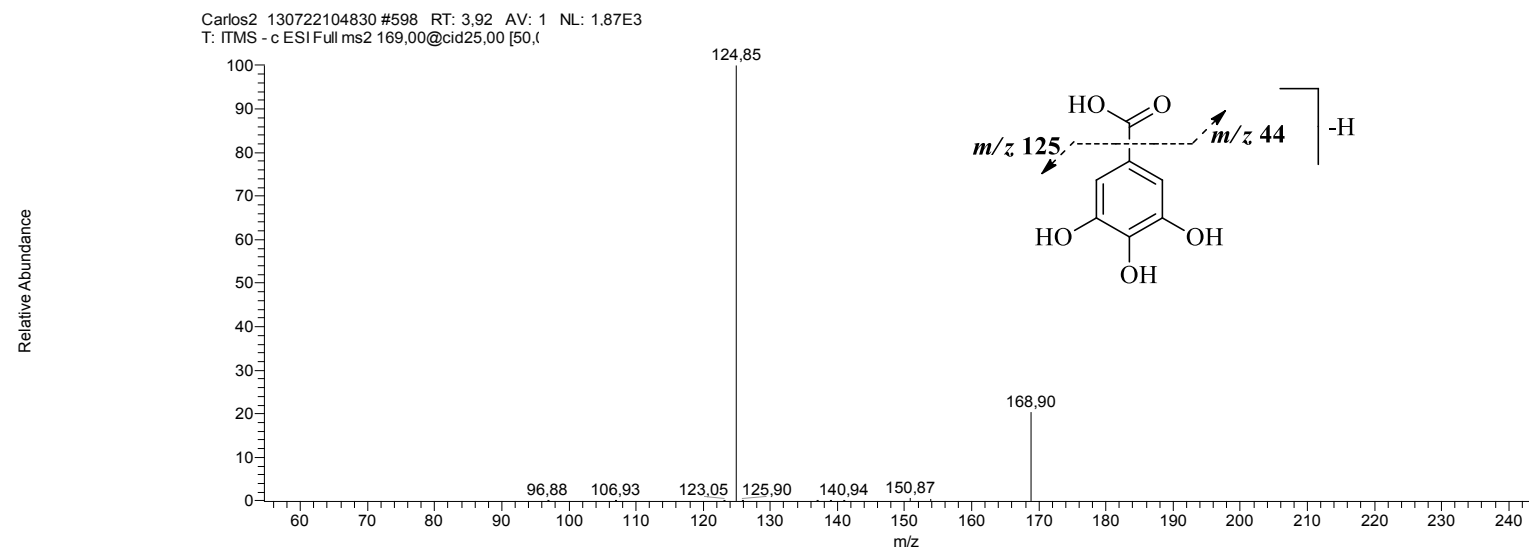


Figura 4.2.4. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 197 (Substância Pico 16).

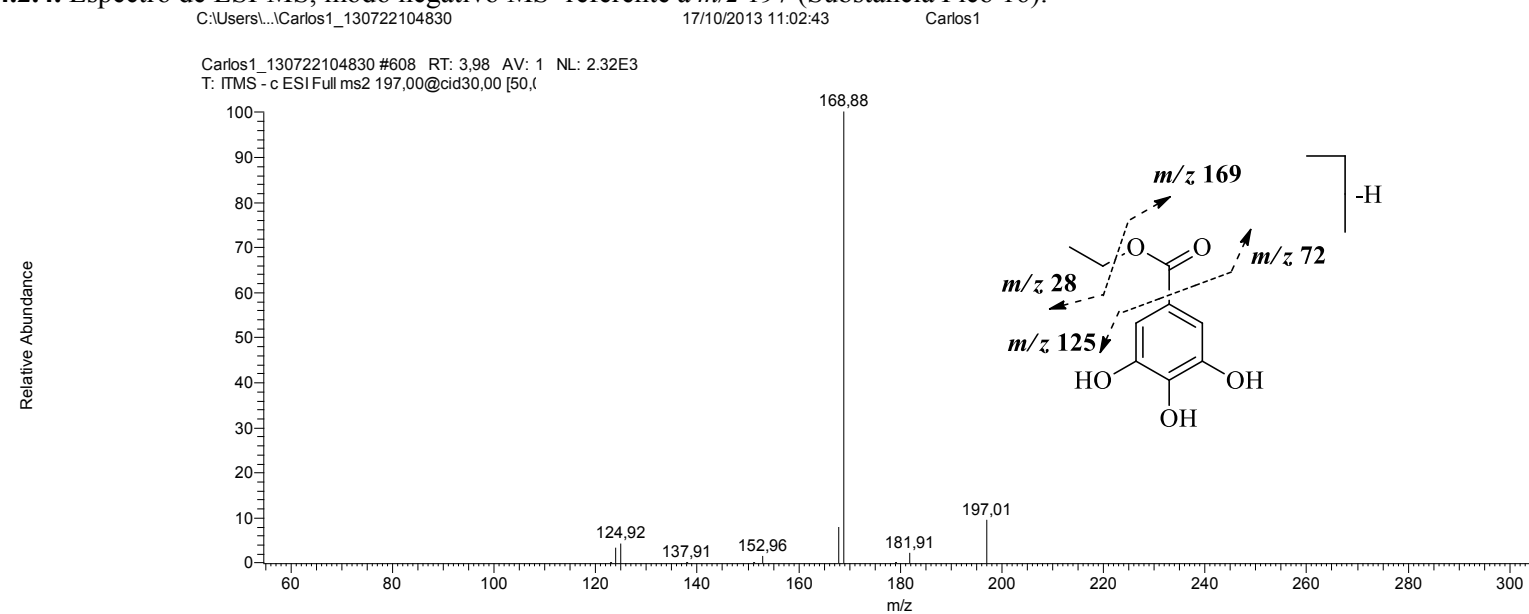


Figura 4.2.5. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 495 (Substância Pico 10).

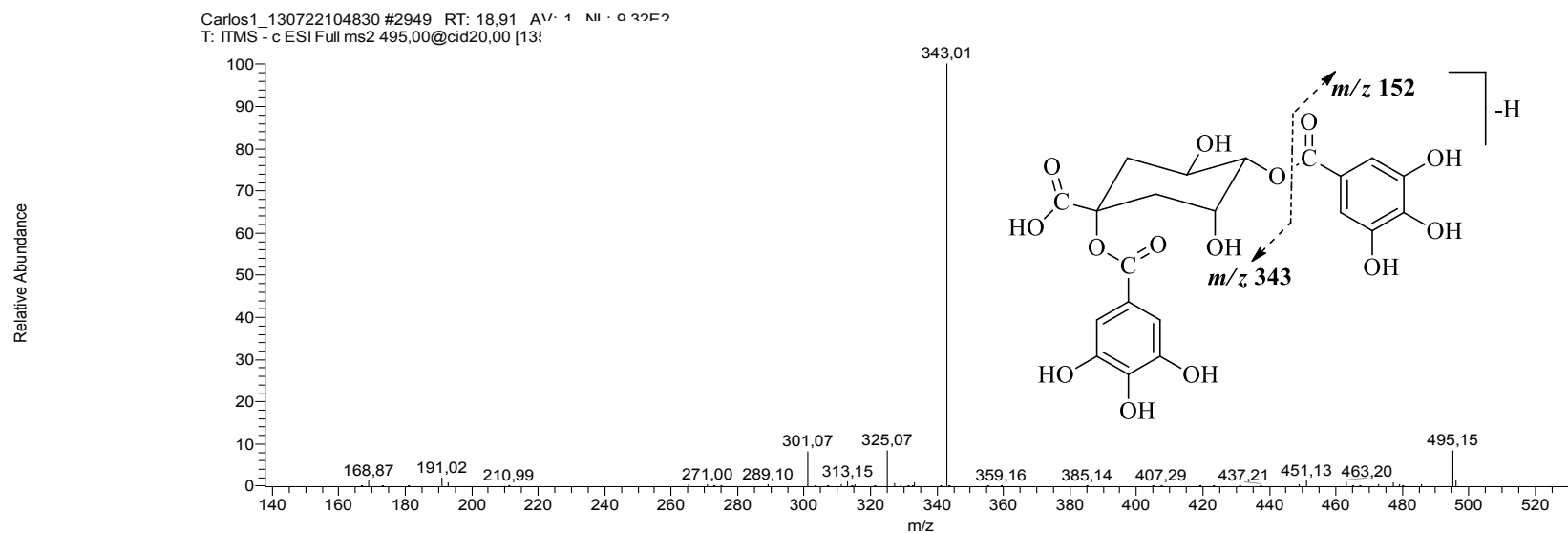


Figura 4.2.6. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 343 (Substância Pico 5).

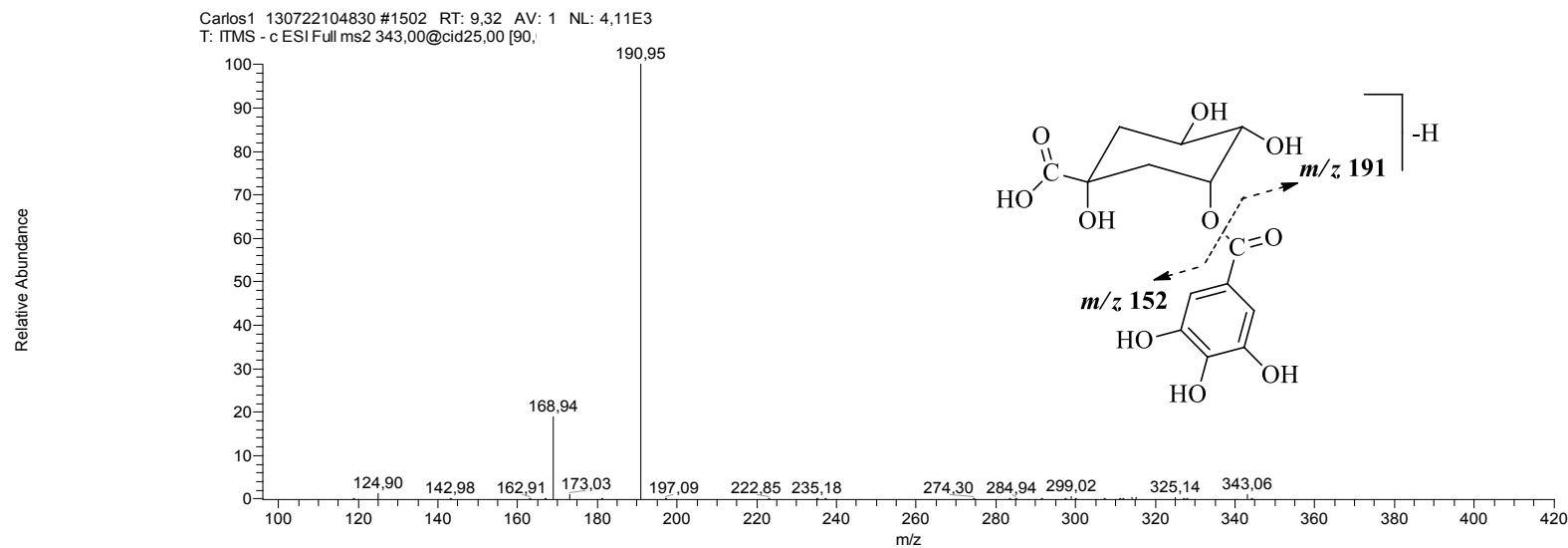


Figura 4.2.7. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 325 (Substância Pico 6).

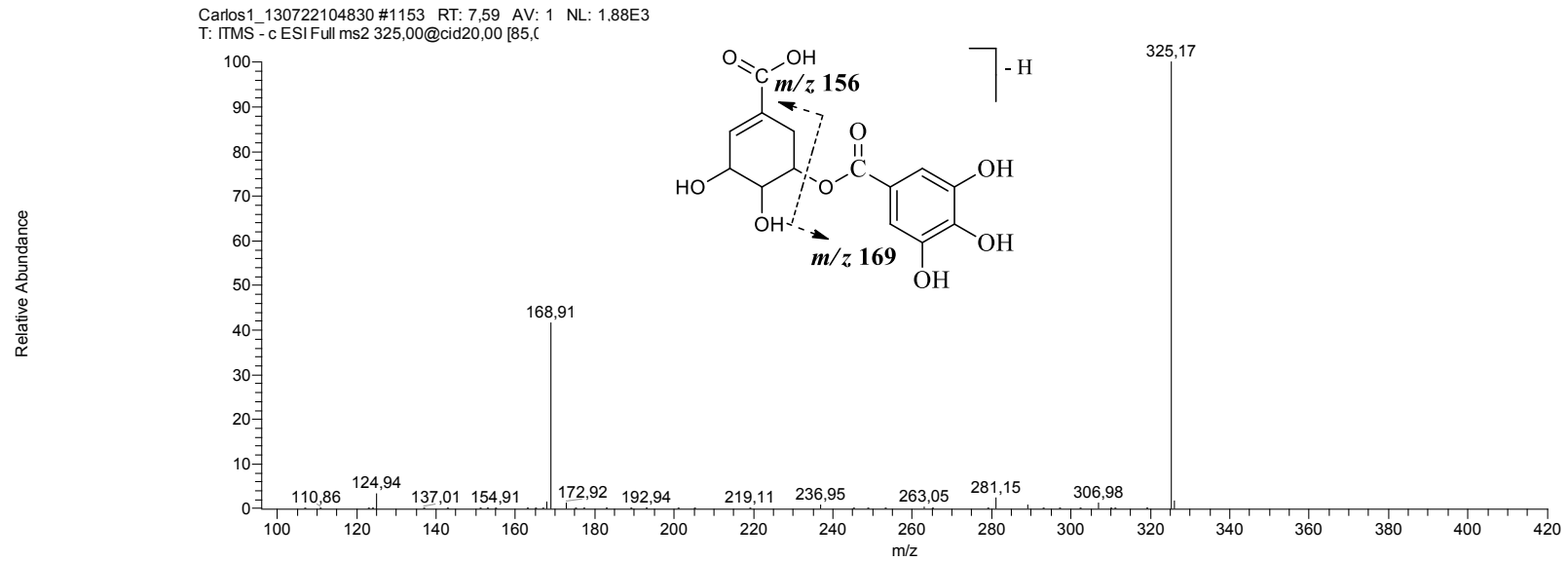


Figura 4.2.8. Espectros de ESI-MS, modo negativo MS² e MS³ referente à m/z 177 (Substância Pico 23).

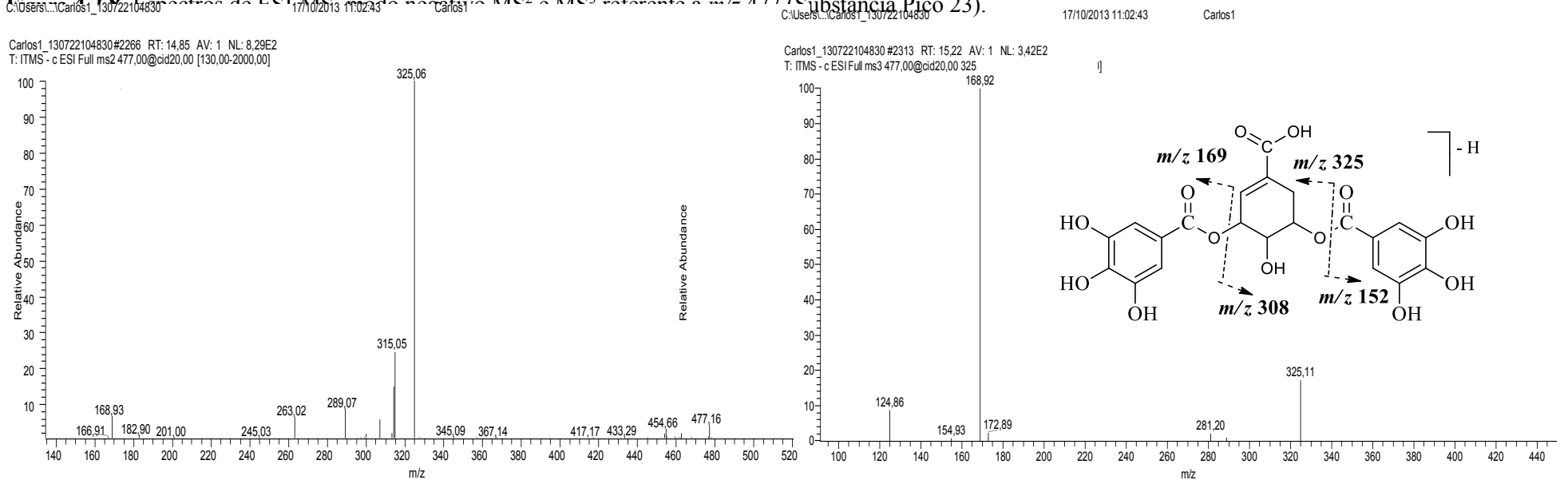


Figura 4.2.9. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 939 (Substância Pico 21).

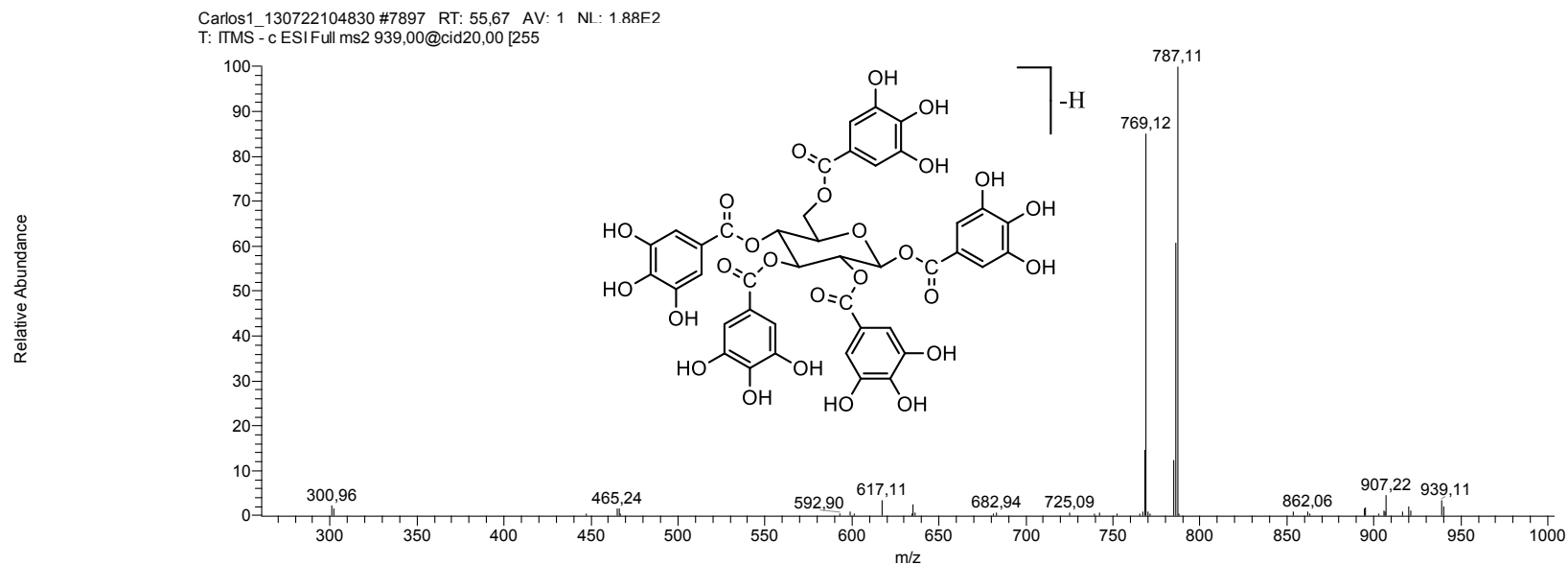


Figura 4.2.10. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 787 (Substância Pico 14).

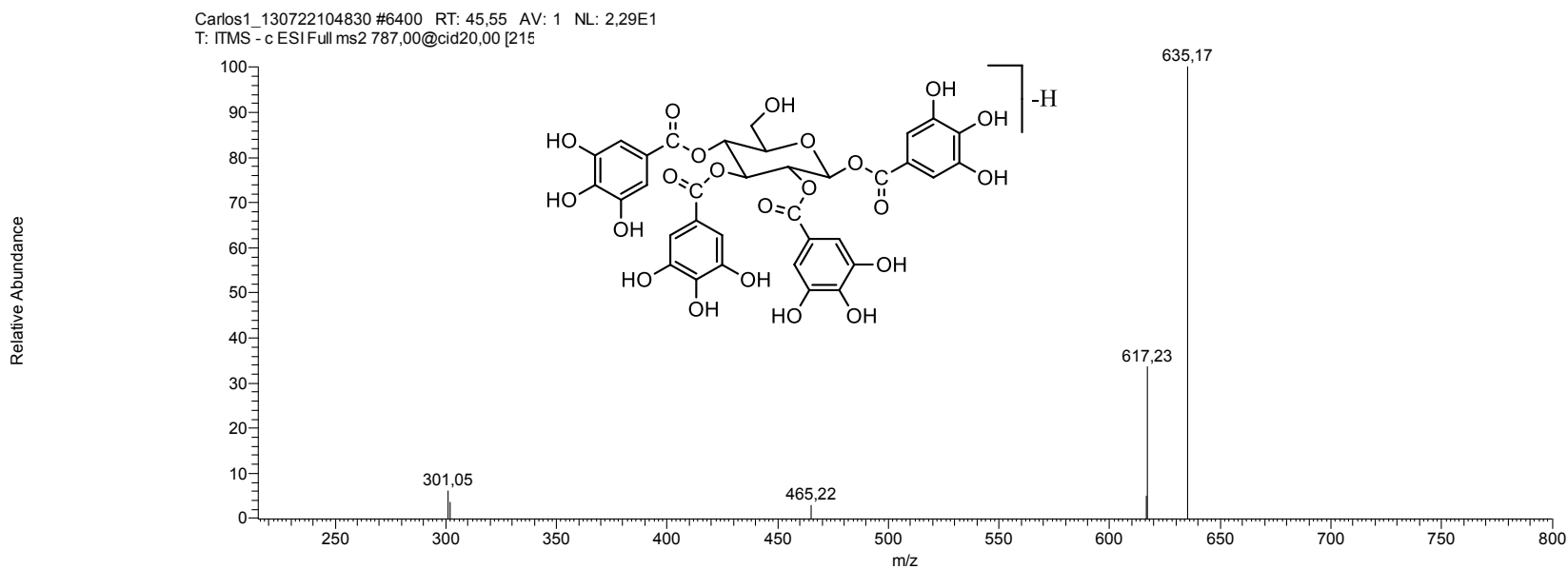


Figura 4.2.11. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente a m/z 483,10 (Substância Pic 13).

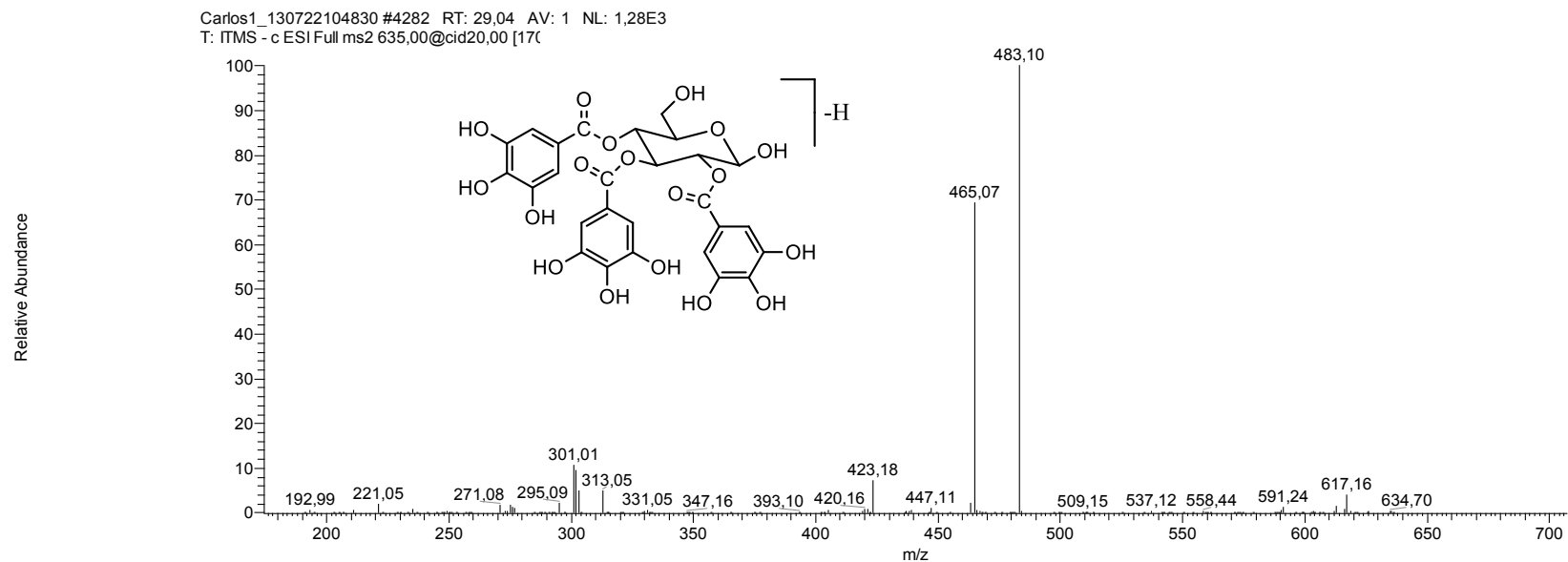


Figura 4.2.12. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente a m/z 483,19 (Substância Pic 8).

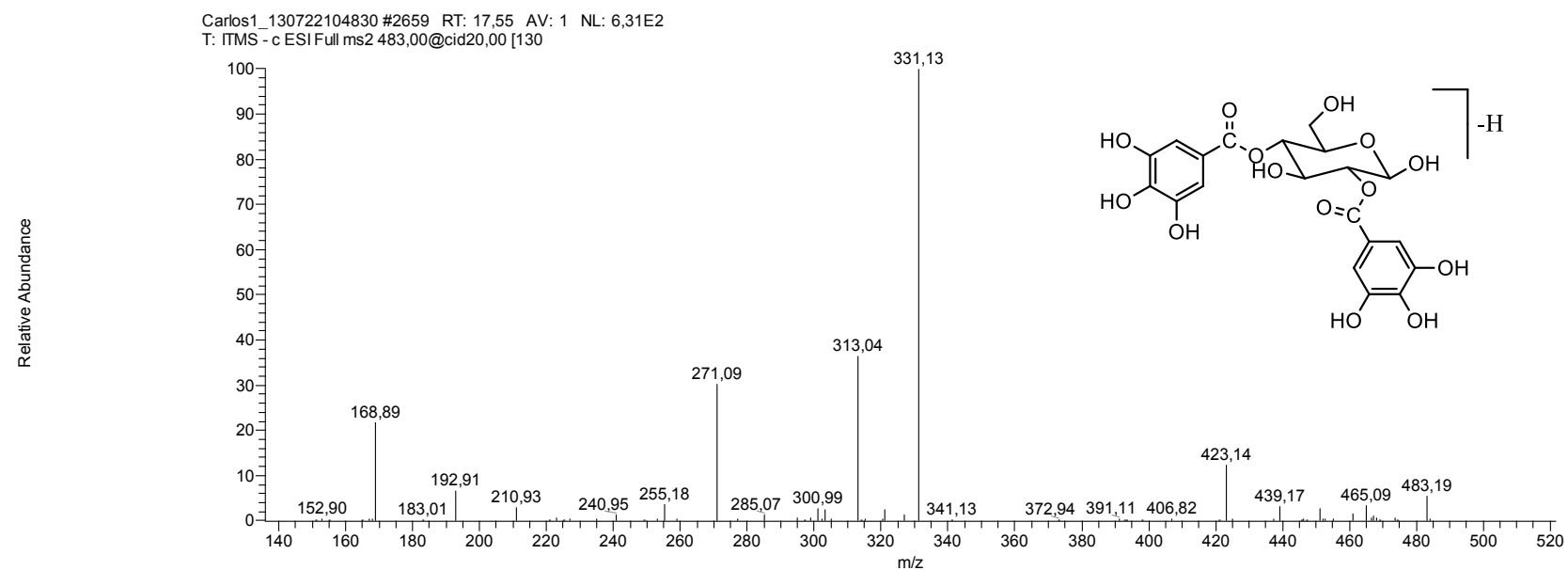


Figura 4.2.13. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 331 (Substância Pico 3).

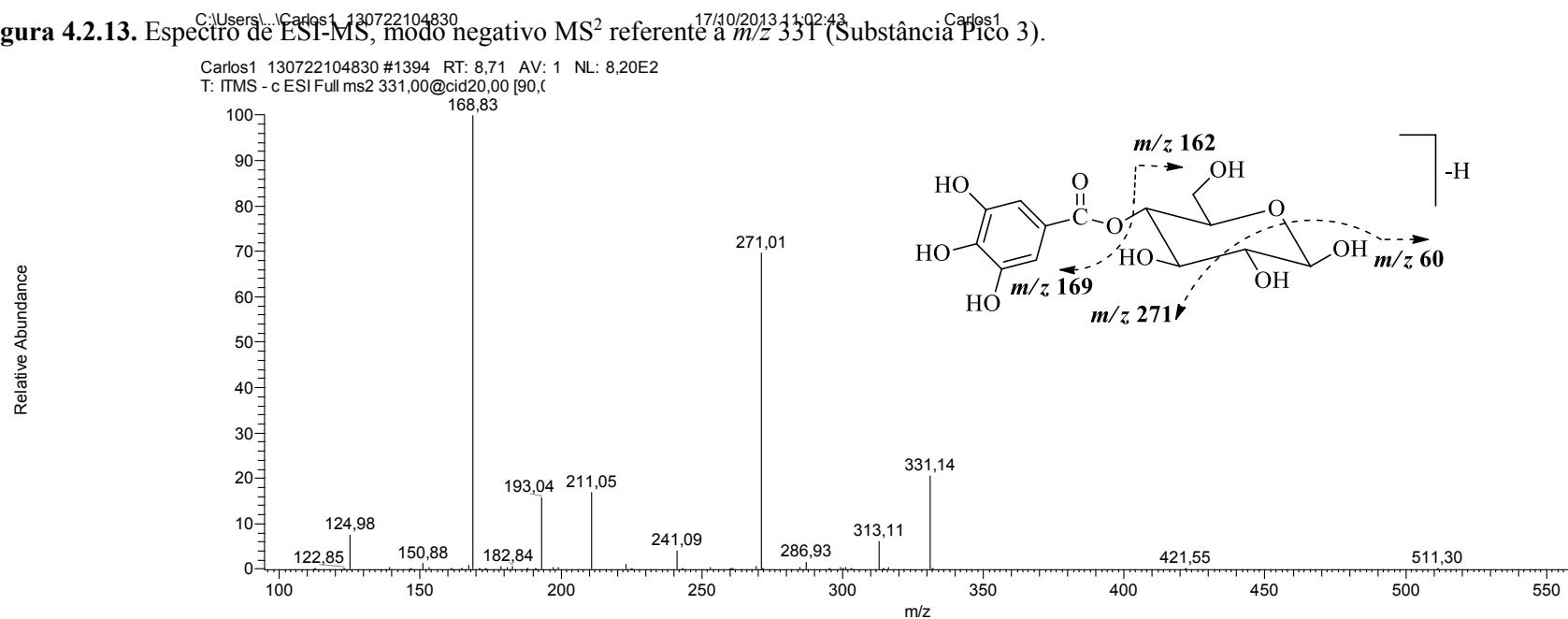


Figura 4.2.14. Proposta de fragmentação do pentagaloilglicose e derivados galoilglicose. Adaptado de Tan, Ling e Chuah (2011).

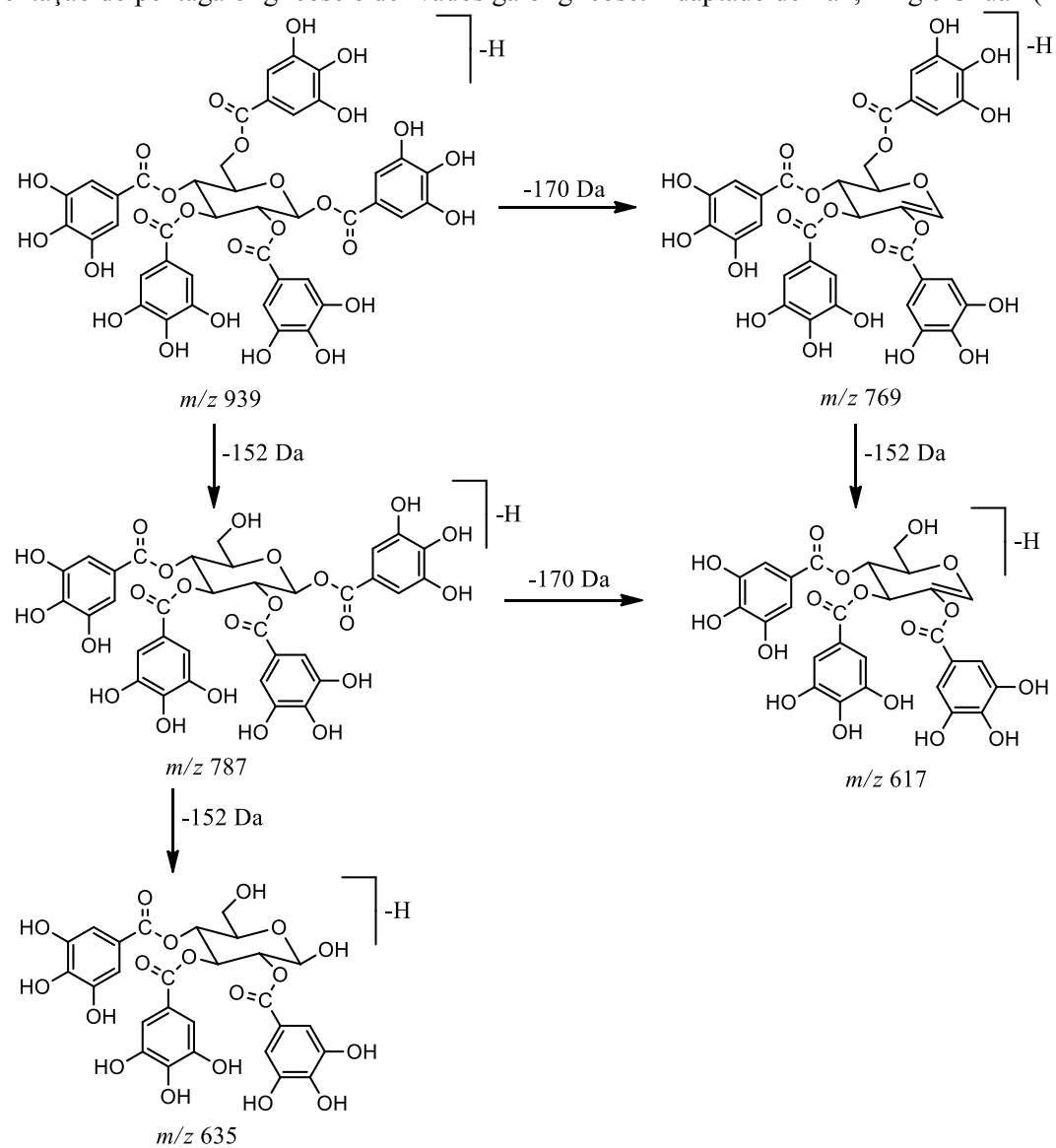
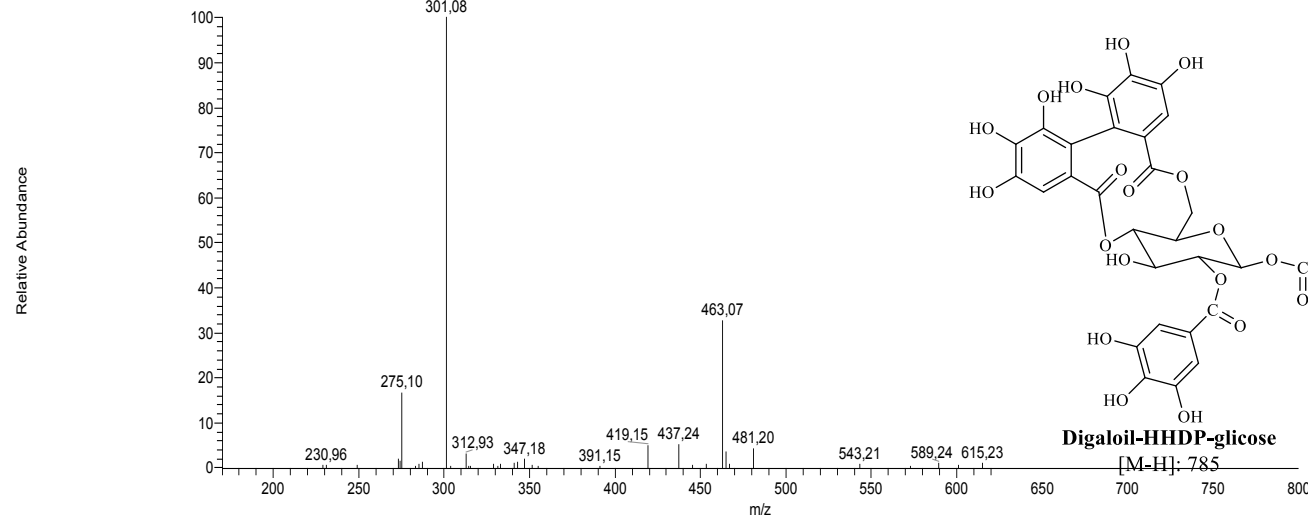


Figura 4.2.15. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo e MS² e MS³ referente à m/z 785 (Substância Pico 20) e sua fragmentação.

Adaptado de Tan, Ling e Chuah (2012).

Carlos1_130722104830 #6179 RT: 44,22 AV: 1 NL: 1,49E2
T: ITMS - c ESI Full ms3 785,00@cid20,00 633



C:\Users\...Carlos1_130722104830

17/10/2013 11:02:43

Carlos1

Carlos1_130722104830 #6141 RT: 43,99 AV: 1 NL: 4,01E2
T: ITMS - c ESI Full ms2 785,00@cid20,00 [215]

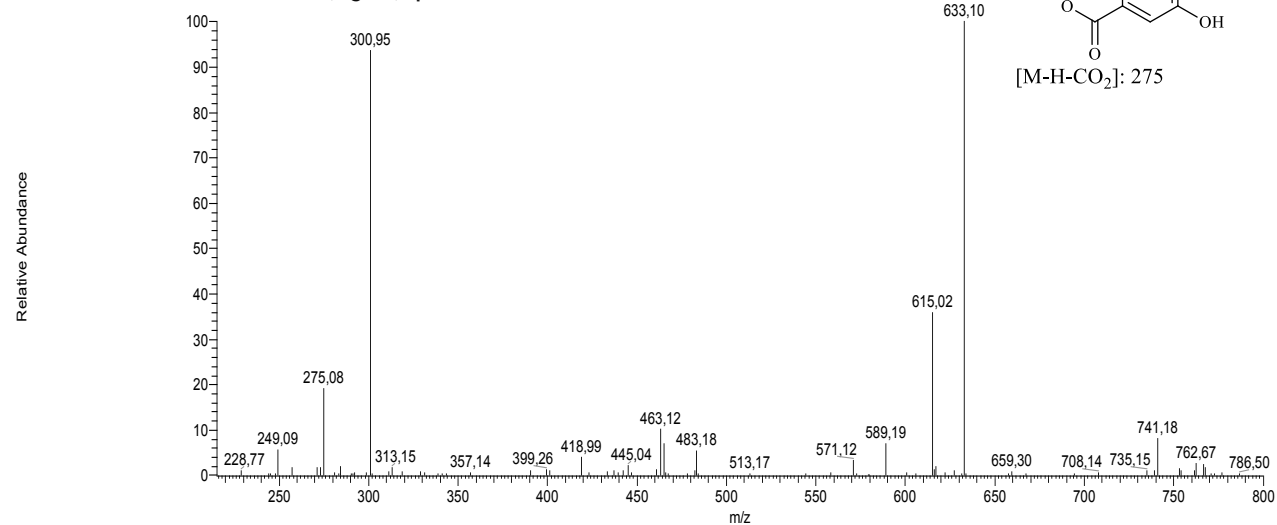
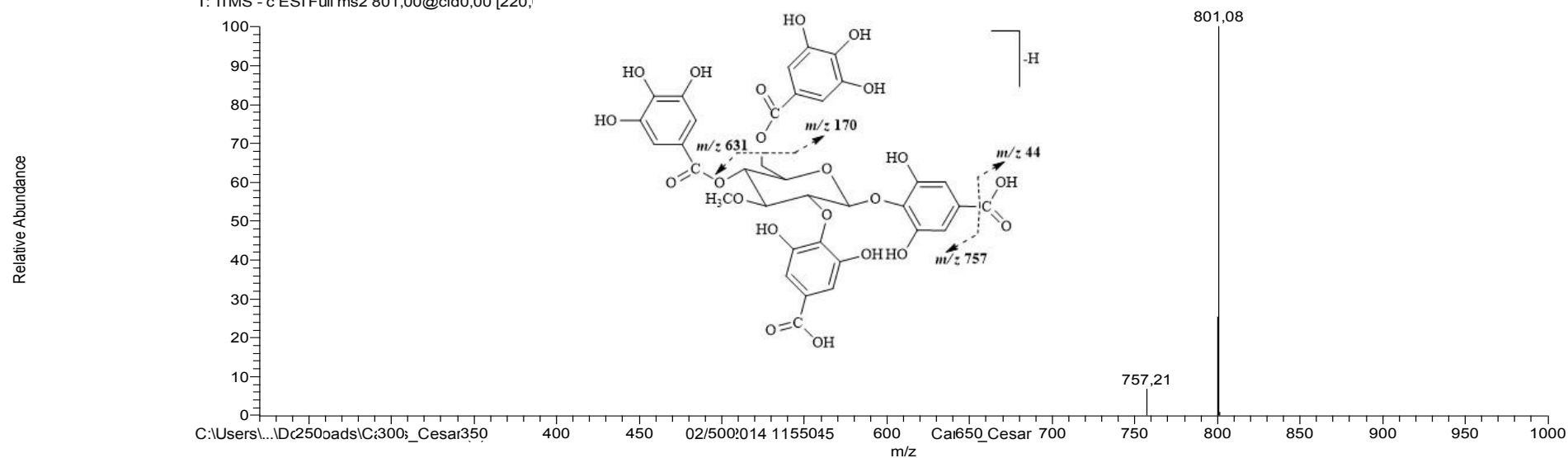


Figura 4.2.16: Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² e MS referente a *m/z* 801 (Substância Pico 12).

Carlos Cesar (6) #171 RT: 0,45 AV: 1 NL: 1,46E3
T: ITMS - c ESI Full ms2 801,00@cid0,00 [220,]



Carlos Cesar (6) #275 RT: 1,09 AV: 1 NL: 3,38E2
T: ITMS - c ESI Full ms4 801,00@cid0,00 801,0

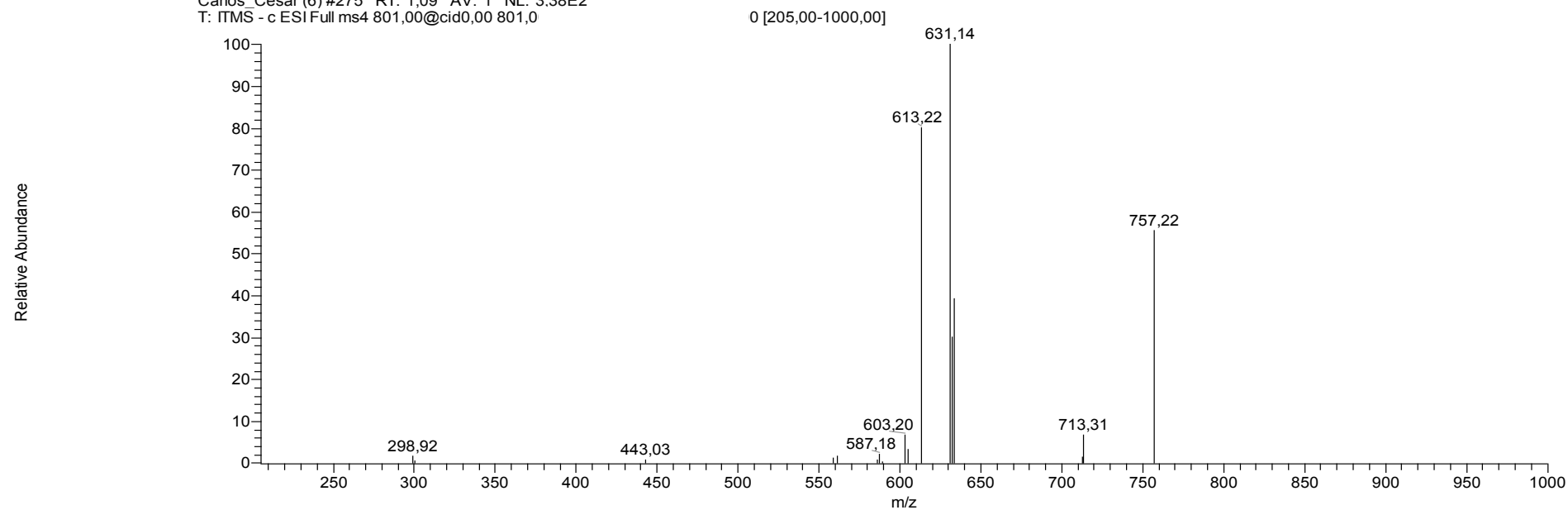


Figura 4.2.17. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo MS⁻ e MS⁻ referente à m/z 965 (Substância Pico 17).

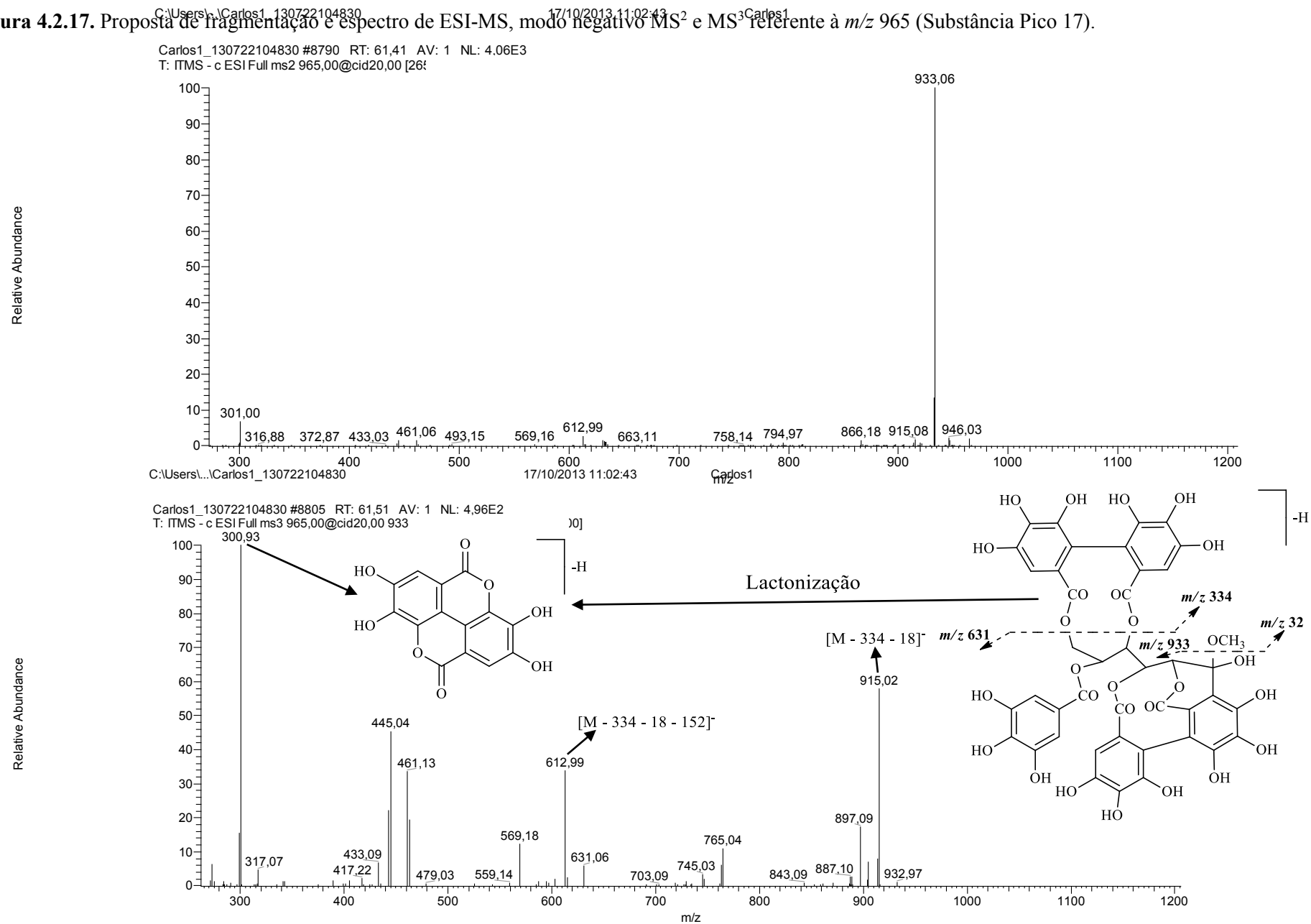


Figura 4.2.18. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 301 (Substância Pico 24).

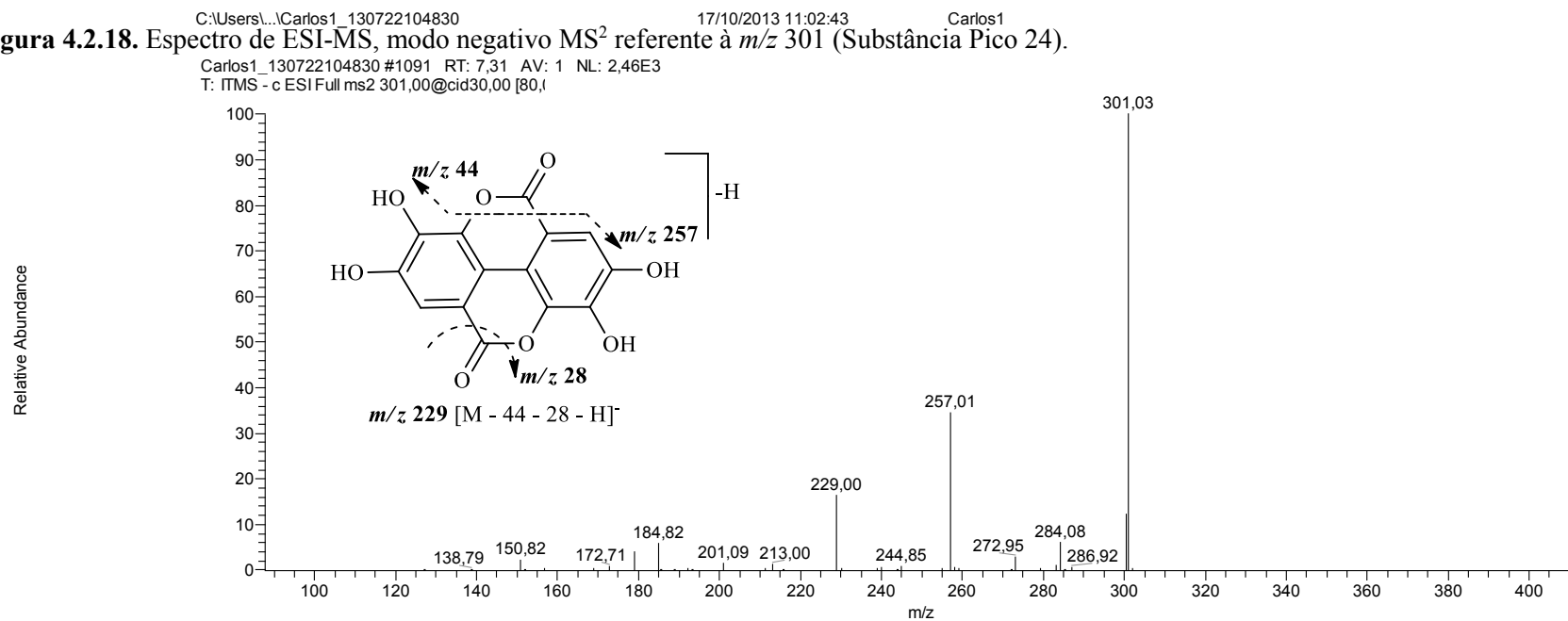


Figura 4.2.19. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS³ referente à m/z 461 (Substância Pico 26).

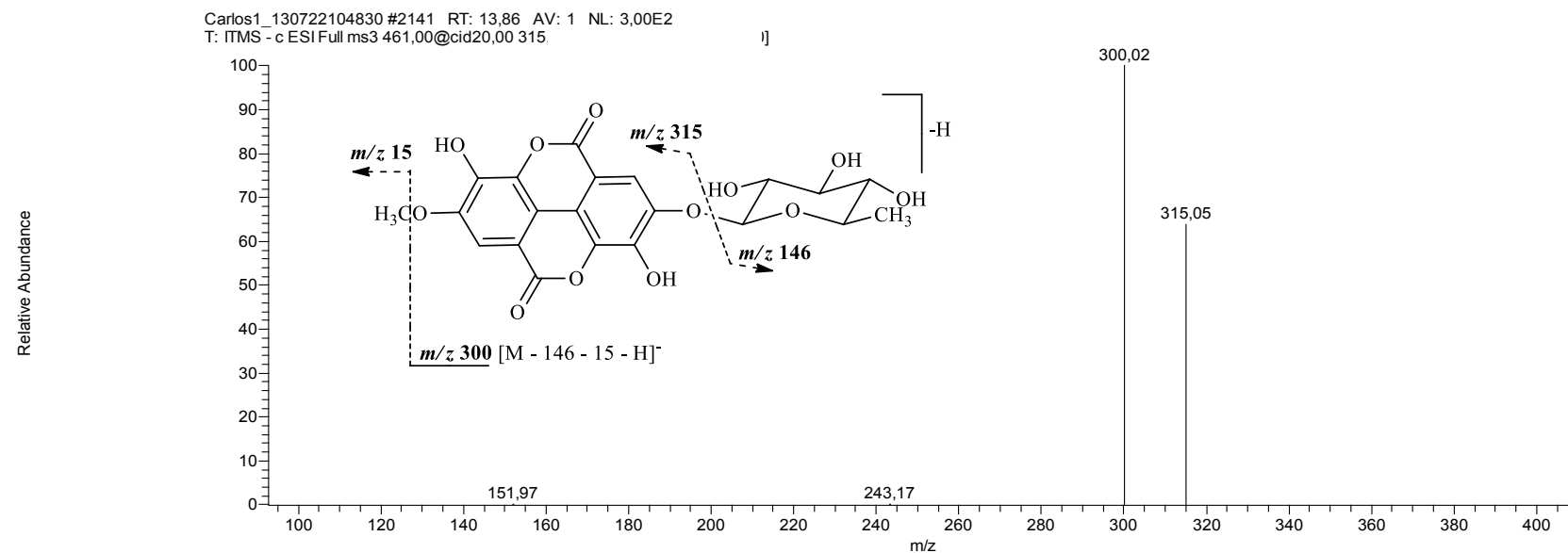


Figura 4.2.20. Espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente a m/z 469 (Substância Pico 19).

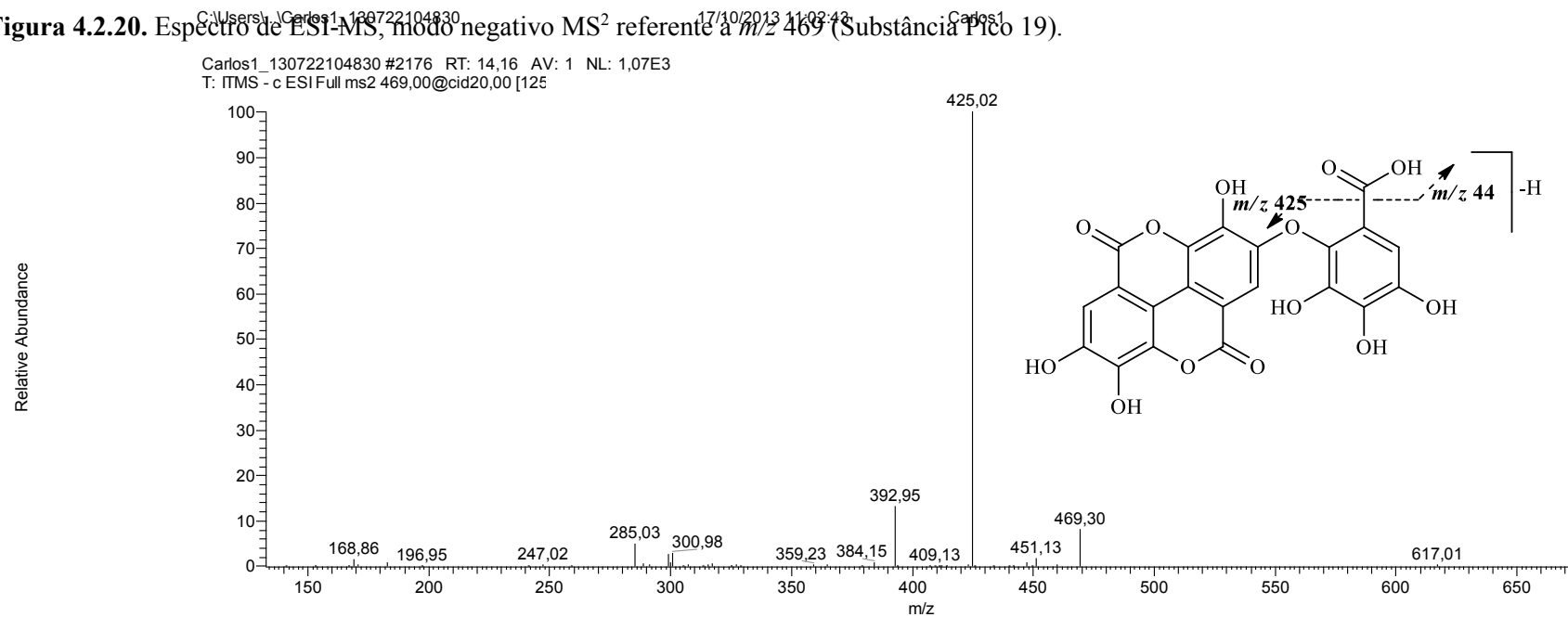
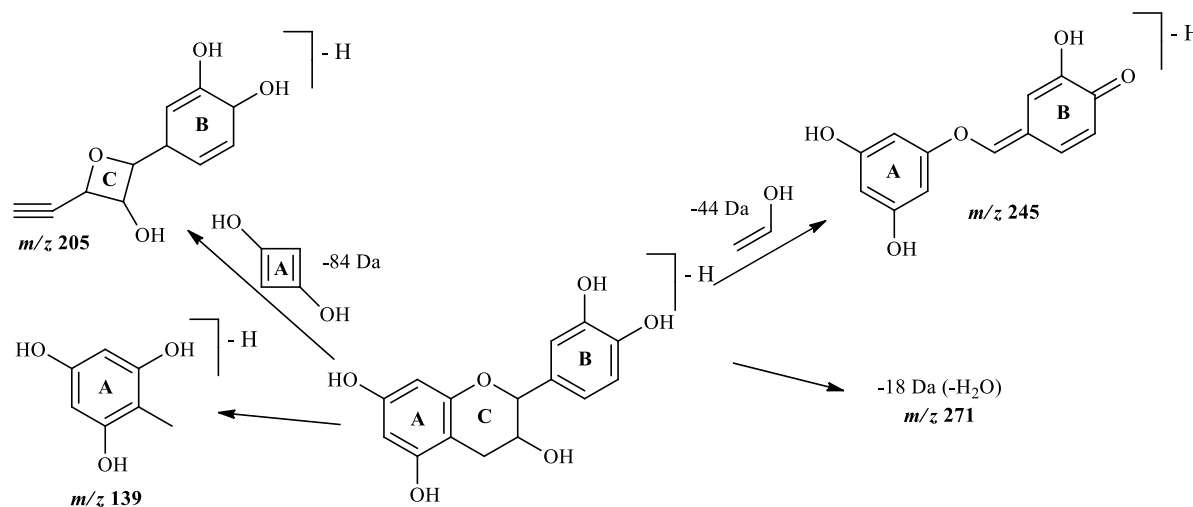


Figura 4.2.21. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à m/z 289 (Substância Pico 9). Adaptado de Hamed et al. (2014).



C:\Users\...\Carlos1_130722104830

17/10/2013 11:02:43

Carlos1

Carlos1_130722104830 #1057 RT: 7,10 AV: 1 NL: 2,91E2
T: ITMS - c ESI Full ms2 289,00@cid20,00 [75,(

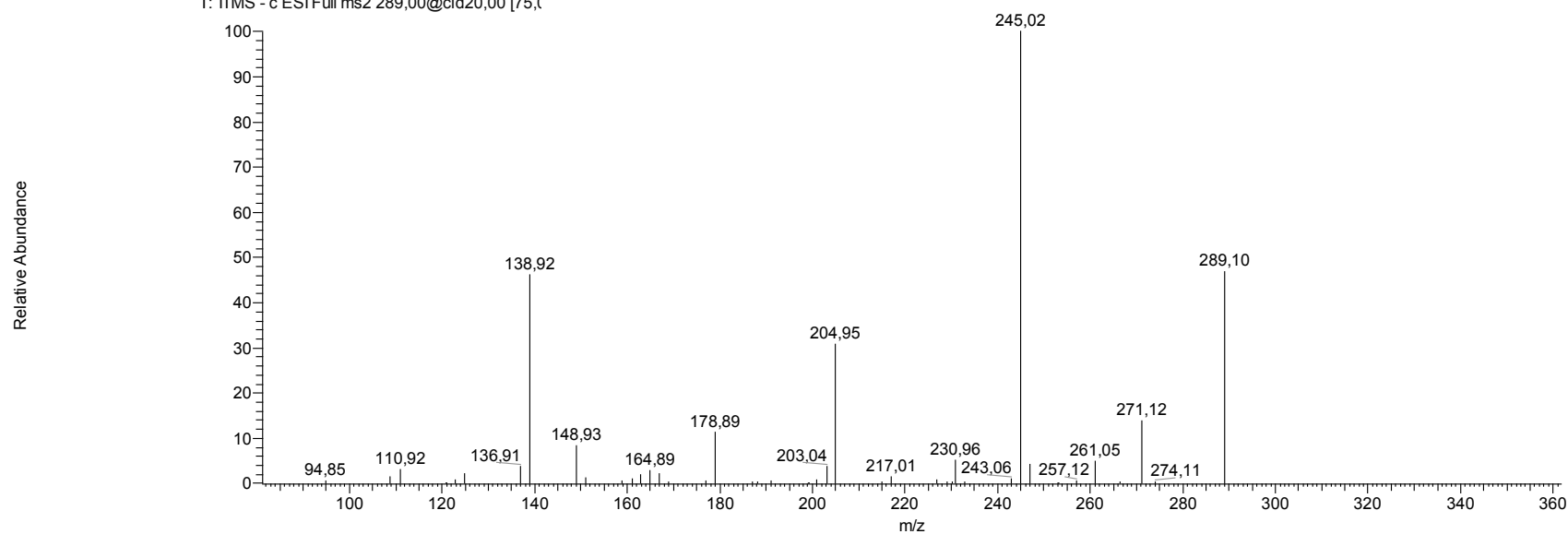
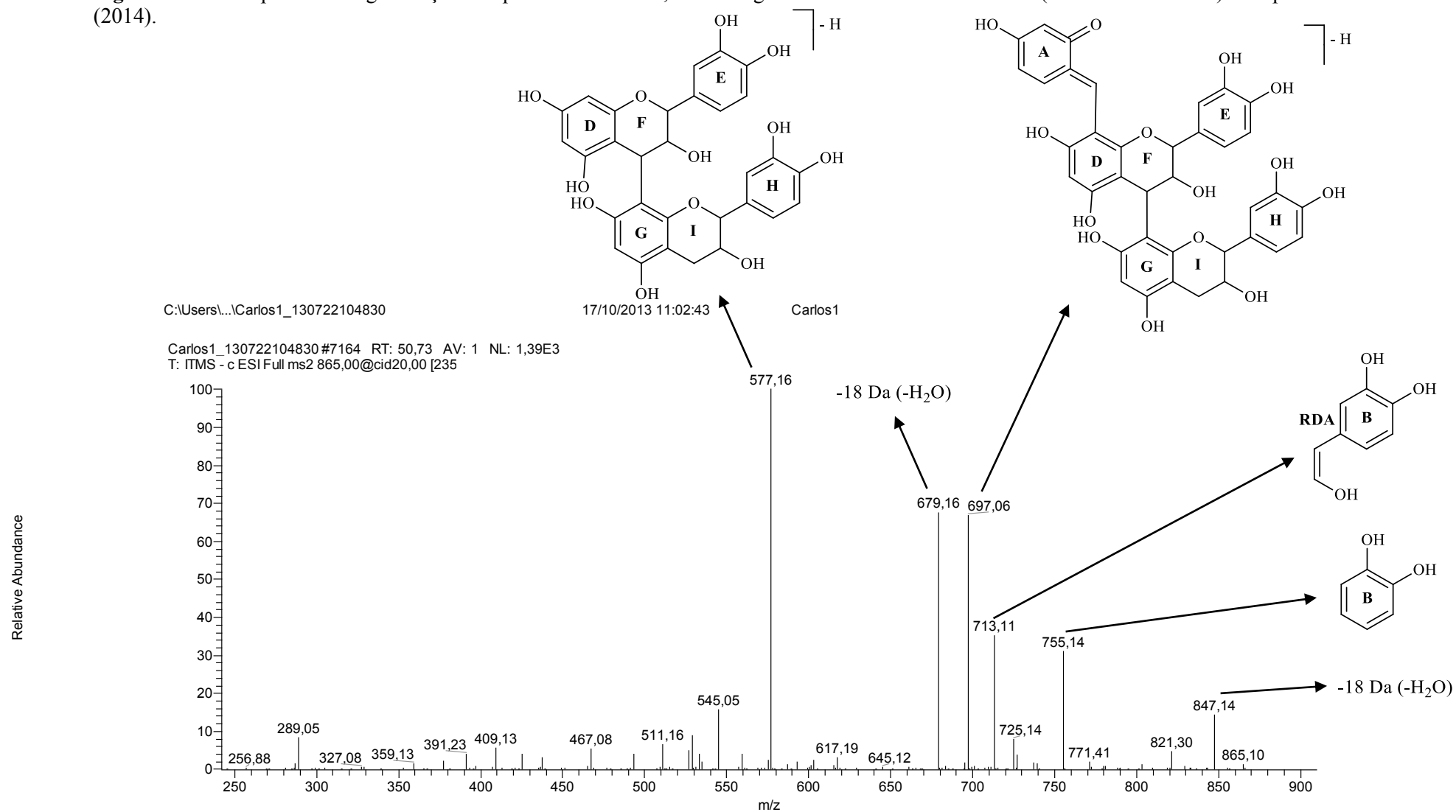


Figura 4.2.22. Proposta de fragmentação e espectro de ESI-MS, modo negativo MS² referente à *m/z* 865 (Substância Pico 22). Adaptado de Hamed et al. (2014).

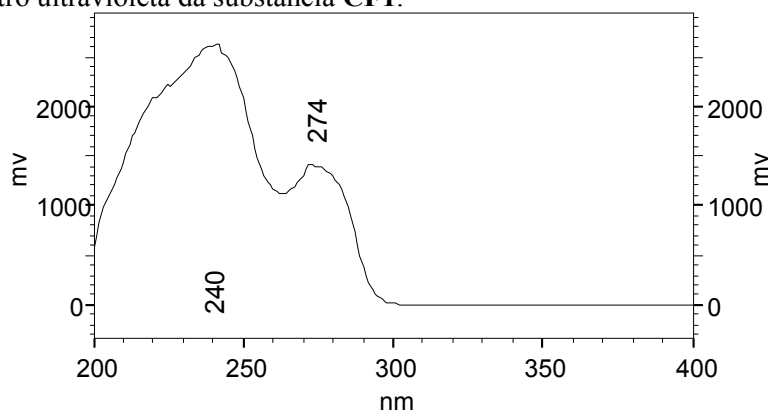


4.3. Determinação estrutural de substâncias isoladas de *Caesalpinia ferrea*

4.3.1. Determinação de CF1

A substância **CF1** foi obtida na forma de um óleo de cor amarela. O espectro no UV (λ , MeOH) (Figura 4.3.1) forneceu bandas em 240 nm e 274 nm. Martins et al., (2007) reporta que o espectro de absorção no ultravioleta na faixa entre 210 – 260 nm, além de bandas de menor intensidade próximos à 280 nm, correspondentes às transições $n \rightarrow \pi^*$ de grupo carbonila.

Figura 4.3.1. Espectro ultravioleta da substância **CF1**.



O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.3.4) da substância **CF1** apresentou um duplete com deslocamentos químicos em δ 0,98 (12H, $J = 6,7$ Hz), que foram atribuídos aos hidrogênios das metilas das posições C4', C4'', C5' e C5''. Um septeto em δ 2,02 (2H) foi observado e atribuído ao grupo metínico (C3' e 3''), evidenciando o sistema isopropila. O sinal de deslocamento químico observado em δ 4,06, correspondente a um duplete (2H), foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos dos C2' e C2''. Ainda foram observados no espectro e em sua expansão dois duplos dupletos na região de hidrogênios aromáticos, com deslocamentos químicos em δ 7,63 (2H, dd , $J = 9,0$ Hz; C2 e C5;) e em δ 7,74 (1H, dd , $J = 9,0$ Hz; C3 e C4).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.3.5) evidenciou a presença de sete carbonos, sendo um sinal de carbonila de um éster em (δ 167,8). O experimento DEPT 135 (Figura 4.3.6) evidenciou os deslocamentos químicos de carbonos na região aromática (CH), em δ 128,3 (C2 e C5) e em 130,8 (C3 e C4), um sinal de CH_2 em δ 71,3 (C2' e C2''), um sinal de um grupo metínico em 27,5 (C3' e 3'') e ainda sinal de um carbono correspondente às metilas em δ 18,0 (C4', C4'' C5' e C5'').

O experimento COSY (Figura 4.3.7) estabeleceu a correlação entre os hidrogênios de mesmo sistema de spins, possibilitando verificar a sequência dos hidrogênios como sendo δ (4,04 $\rightarrow$ 2,02 e 0,98).

O experimento de mapa de contorno gHSQC possibilitou atribuir a correlação direta de cada hidrogênio com seu respectivo carbono (Tabela 4.3.1). Neste experimento ficou evidente que os hidrogênios com deslocamentos químicos em δ 0,98; 2,02; 4,06; 7,63; 7,74 estão ligados à ^1J com os carbonos em δ 18,0; 27,5; 71,3; 130,8; 128,3, como pode ser observado na Figura 4.3.8. Neste experimento ainda ficou comprovado que o carbono que apresenta deslocamento químico em δ 132,1 não apresenta correlação com nenhum hidrogênio.

O experimento gHMBC (Figura 4.3.9) mostrou a correlação a ^2J dos átomos de carbono em δ 130,8 e δ 167,8 com o hidrogênio aromático em δ 7,74 e dos átomos de carbono em δ 128,3 e δ 132,1 com o hidrogênio aromático em δ 7,63, respectivamente a ^2J e ^3J . Observou-se também o acoplamento dos carbonos δ 167,8 (^3J), δ 27,5 (^2J) e δ 18,0 (^3J) com o hidrogênio em δ 4,06, enquanto que os carbonos em δ 18,0 e 71,3 fazem acoplamento a ^2J com o hidrogênio em δ 2,02. E finalmente, foi notada a correlação dos carbonos δ 27,5 e δ 71,3 com o hidrogênio δ 0,98.

Tabela 4.3.1. Deslocamentos químicos de RMN 1D (CD₃OD-_d4, 7,0 T) da substância CF1.

<i>Posições</i>	<i>^1H (δ, J em Hz)</i>	<i>^{13}C</i>
1 e 6	-	132,1
2 e 5	7,74 <i>dd</i> (3,3; 3,2)	128,3
3 e 4	7,63 <i>dd</i> (3,4; 3,4)	130,8
1' e 1''	-	167,8
2a', 2a'' e 2b' e 2b''	4,06 <i>d</i> (6,6)	71,3
3' e 3''	2,02 <i>septeto</i>	27,5
4' e 4''/5' e 5''	0,98 <i>d</i> (6,7)	18,0

Diante destas informações foi possível estabelecer que esta substância poderia ser um derivado de um éster de ftalato. Para confirmar a estrutura, procedemos com a interpretação do espectro ESI-MS (modo positivo), Figura 4.3.2.

O espectro de massas possibilitou confirmar a fórmula molecular desta substância, como sendo C₁₆H₂₂O₄. Com esta informação verificamos a possibilidade da existência de molécula que é simétrica. O espectro ESI-MS (modo positivo) confirmou o íon da molécula protonada em m/z 279 [M + H]⁺ e o sinal referente a molécula cationizada em m/z 301 [M + Na]⁺.

Com base nestes resultados chegou-se à conclusão de que a substância CF1 é um éster de ftalato, caracterizado como diisobutil ftalato (Figura 4.3.3).

Esta é a primeira vez que é relatada a presença um éster de ftalato para esta espécie. Entretanto, já foi identificado e isolado de outras plantas. Machado (2007) identificou por espectrometria de massas o diisobutil ftalato no extrato de *Euphorbia tirucalli*. Diisobutil ftalato foi isolado do fruto de pêra (*Pyrus bretschneideri*) e sua atividade antimicrobiana foi testada. O estudo demonstrou que a substância não apresenta atividade para *Staphylococcus aureus*, mas para *Escherichia coli* evidenciou possuir atividade antimicrobiana em concentração de 1 mg.mL⁻¹ (XIA et al., 2012). Khatiwora e colaboradores (2011) isolaram do caule de *Ipomoea carnea* o dibutil ftalato e o quantificaram no extrato por ter uma importante atividade biológica (antibacteriano), o mesmo grupo ainda isolou um outro dibutil ftalato substituído da mesma planta (KHATIWORA et al., 2013).

C:\Users\...Carlos_CF1_pos_fragt_10ppm 01/04/2014 08:27:04
Figura 4.3.2. Espectros de ESI-MS, modo positivo *full scan* referente à *m/z* 279 (CF1).

Carlos_CF1_pos_fragt_10ppm #269 RT: 3,63 AV: 1 NL: 2.81E4
 T: ITMS + p ESI Full ms [150,00-500,00]

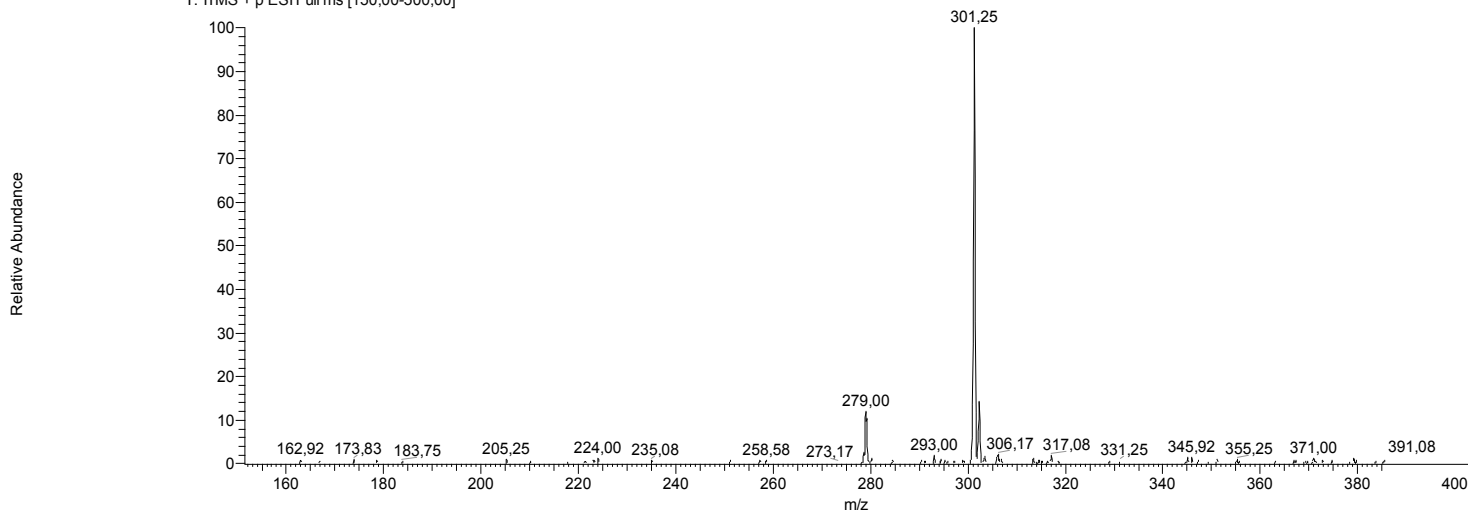


Figura 4.3.3. Substância CF1.

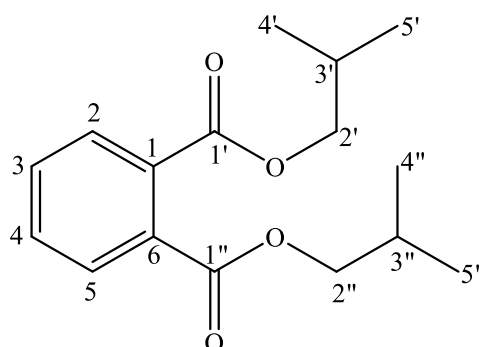


Figura 4.3.4. Espectro de RMN ^1H de CF1 (7,0 T, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, TMS, δ).

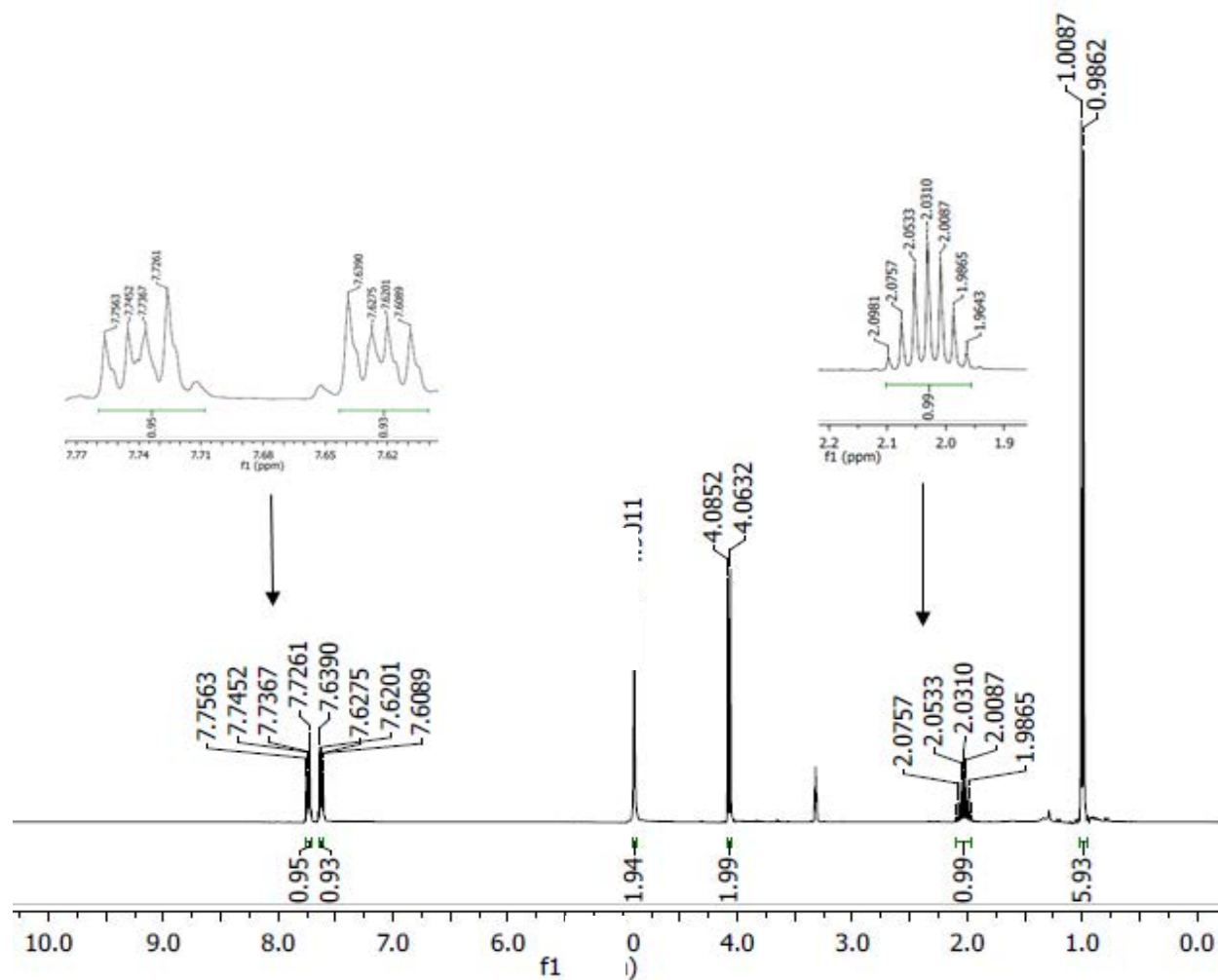


Figura 4.3.5. Espectro de RMN ^{13}C de **CF1** (7,0 T, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, TMS, δ).

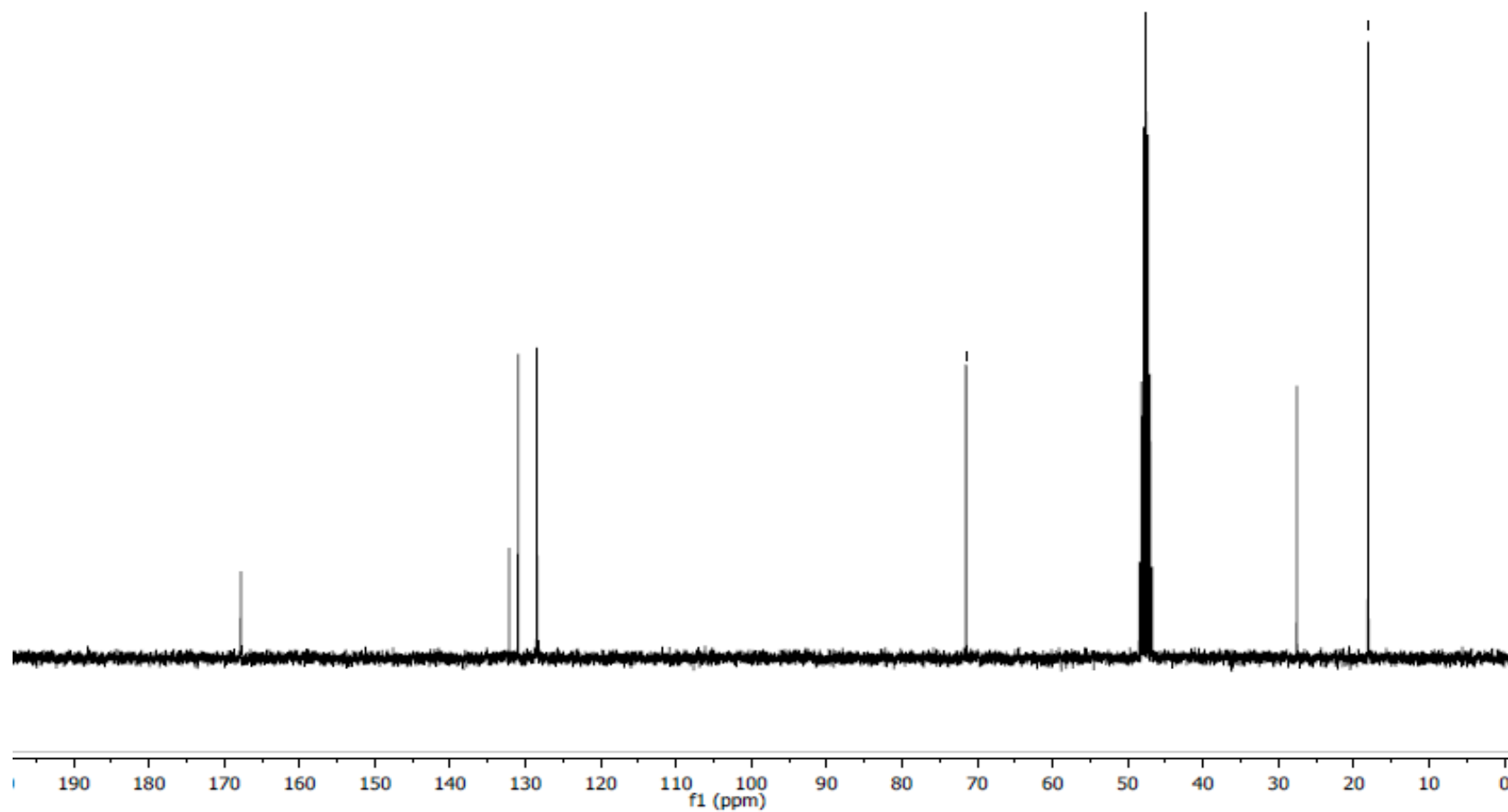


Figura 4.3.6. Espectro de DEPT 135 de **CF1** (7,0 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ).

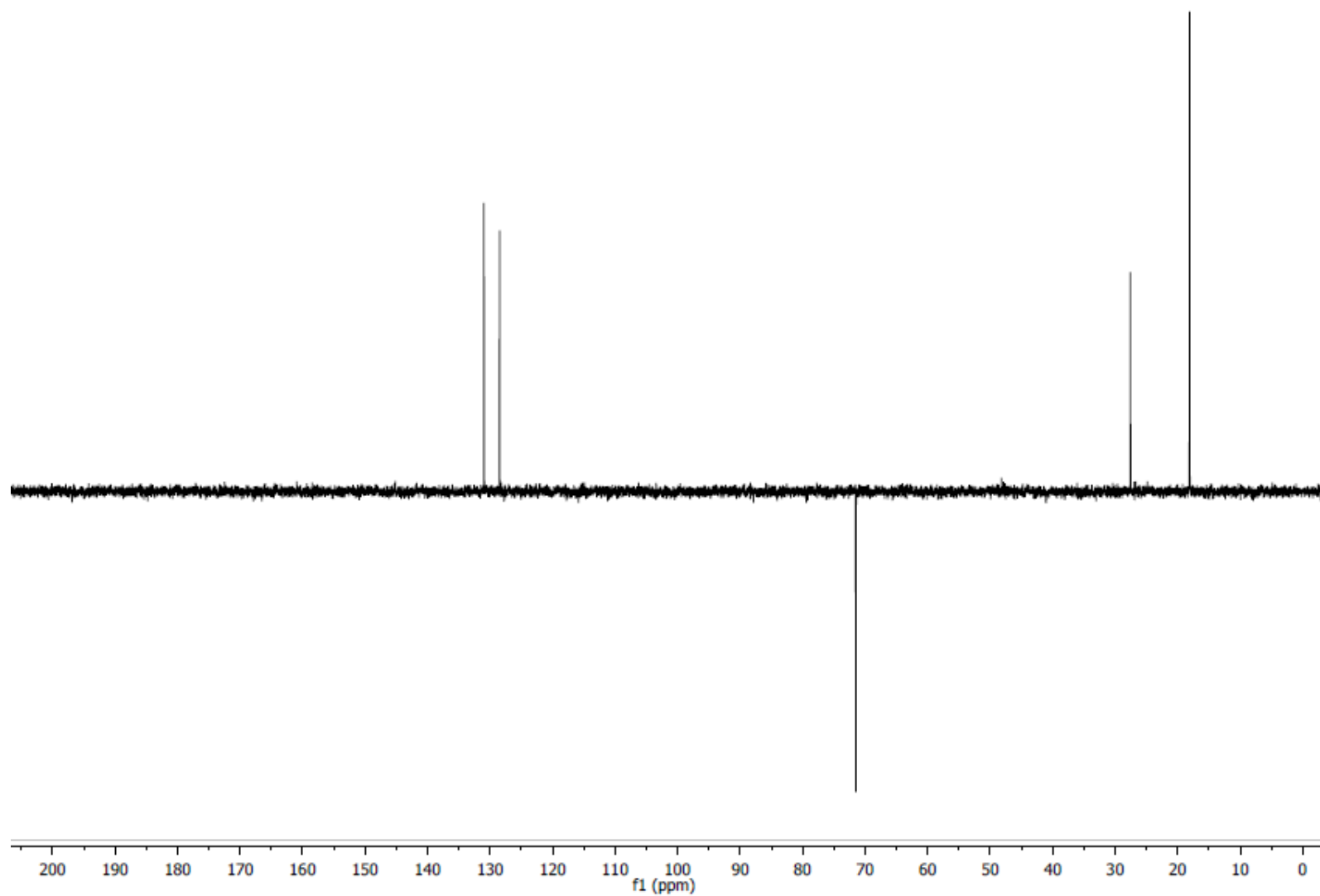


Figura 4.3.7. Espectro de gCOSY-2D de **CF1** (7,0 T, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, TMS, δ).

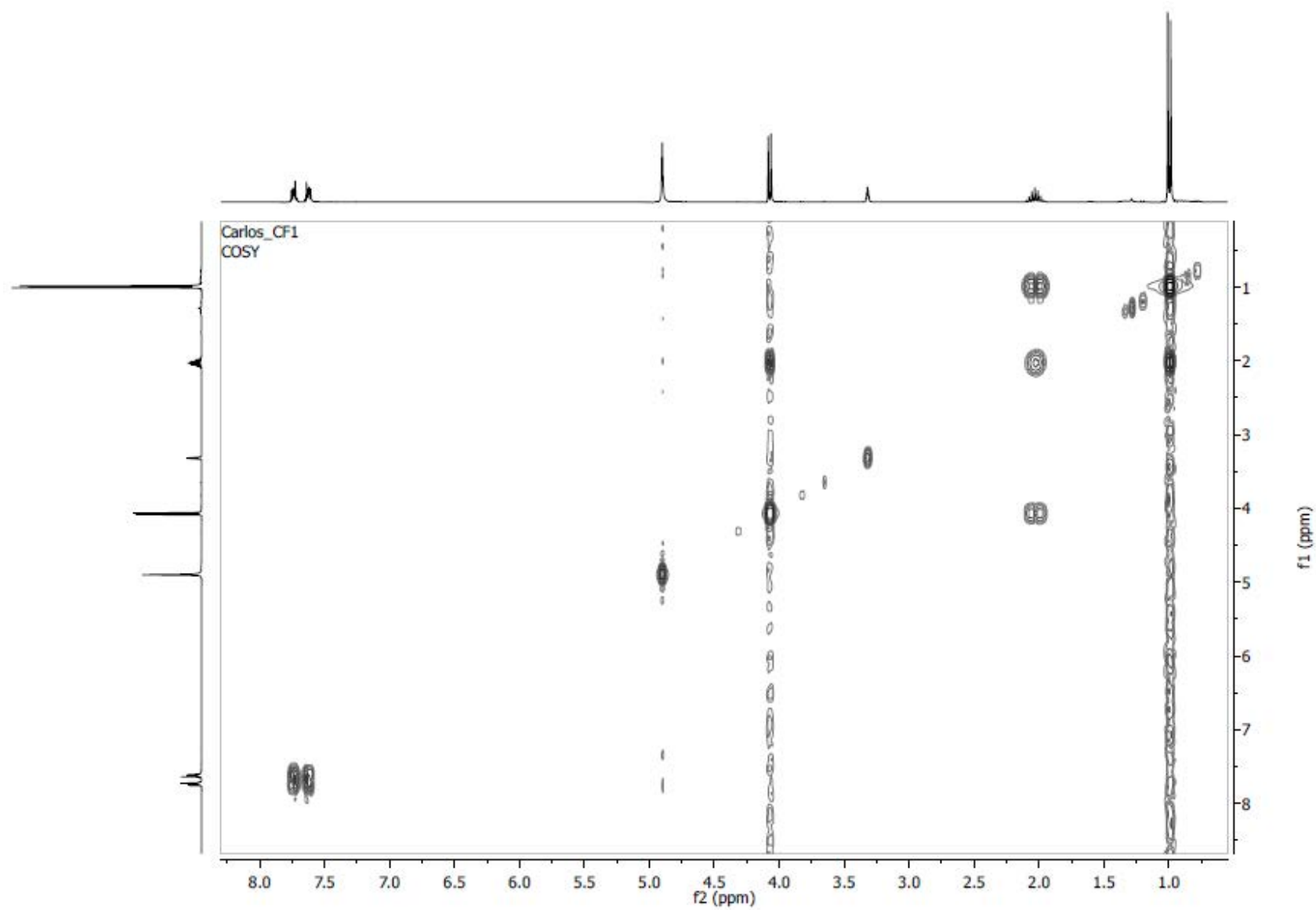


Figura 4.3.8. Espectros de gHSQC-2D de CF1 (7,0 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ).

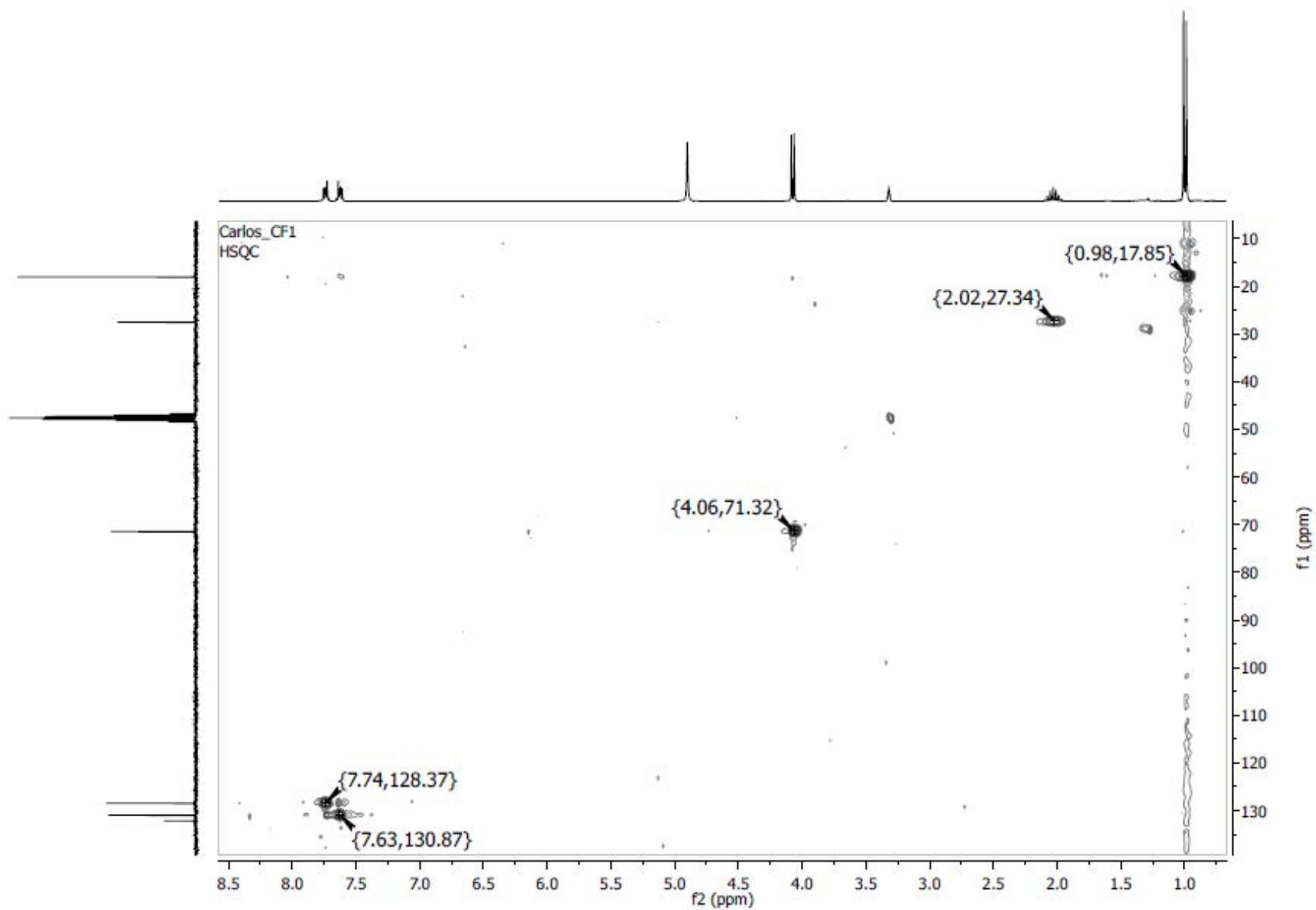
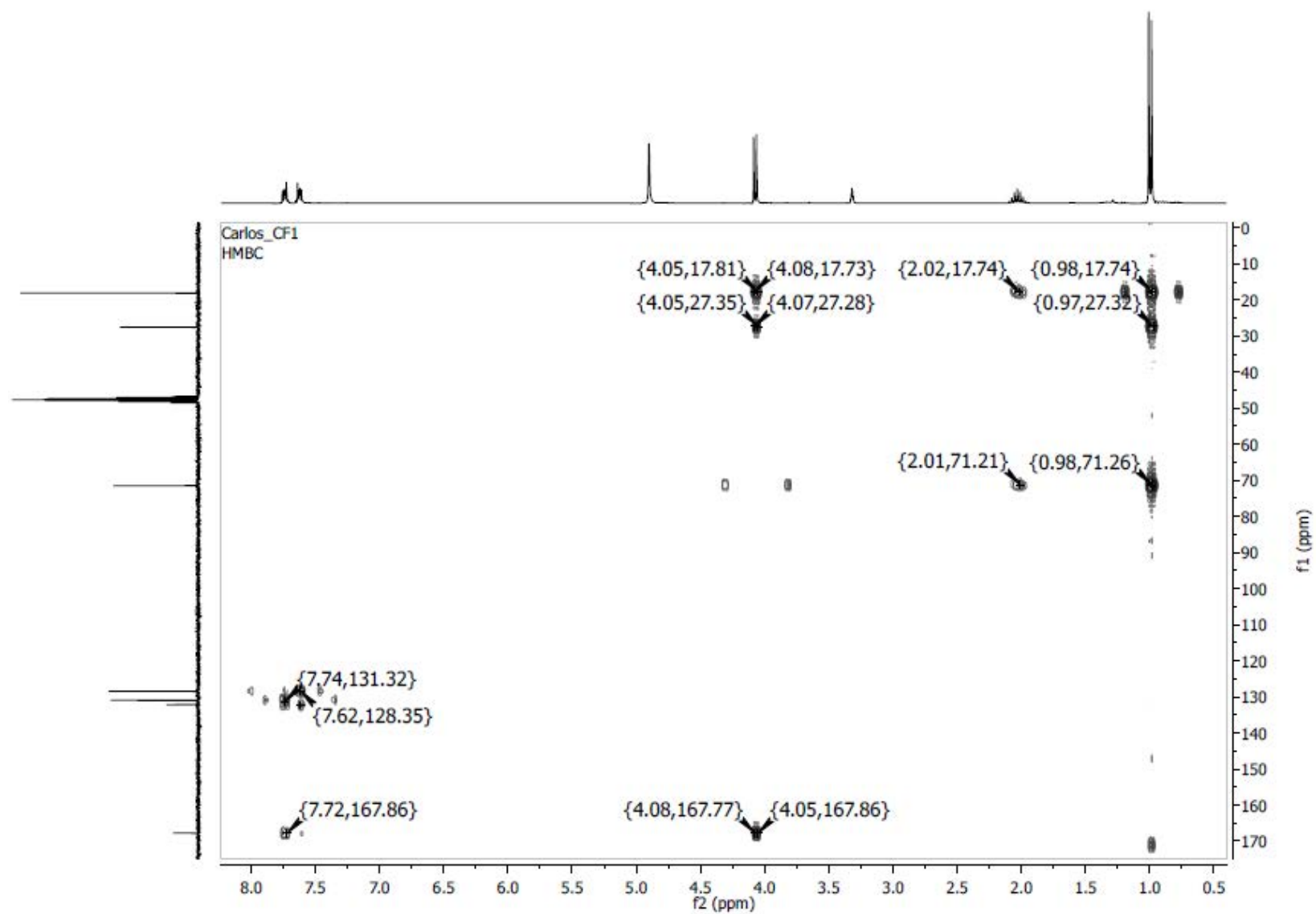


Figura 4.3.9. Espectros de gHMBC-2D de CF1 (7,0 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ).



4.3.2. Determinação de CF2

A substância **CF2** apresentou no espectro de RMN de ^{13}C , 12 sinais de deslocamentos químicos (Figura 4.3.12). Dentre eles, merecendo destaque um carbono quaternário em δ 103,3 e três carbonos metilênicos em δ 60,1; 61,3 e 62,3 respectivamente. O espectro DEPT 135 (Figura 4.3.13) comprovou a existência de carbonos ligados a três hidrogênios metilênicos e oito hidrogênios metínicos, evidenciando portanto que existe um carbono quaternário.

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.3.14) evidenciou o deslocamento químico de hidrogênios na região de δ 5,42 (*d*, $J = 3,6$) sugerindo a presença de hidrogênio anomérico com Figuração em α . Outros sinais de deslocamentos químicos foram ainda observados entre δ 3,40 - 4,30, corroborando com a presença de hidrogênios da região do açúcar.

O experimento COSY (Figura 4.3.15) estabeleceu a correlação entre os hidrogênios de mesmo sistema de spins, possibilitando verificar a sequência dos hidrogênios como sendo δ (5,42 $\rightarrow$ 3,56 $\rightarrow$ 3,76 $\rightarrow$ 3,48 $\rightarrow$ 3,84) e para o sistema δ (4,22 $\rightarrow$ 4,06 $\rightarrow$ 3,90). Portanto nesta molécula sugere-se a existência de dois sistemas de spins.

O experimento de mapa de contorno gHSQC (Figura 4.3.16) possibilitou atribuir a correlação direta de cada hidrogênio com seu respectivo carbono. Neste experimento ficou evidente que o hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,42 está ligado à ^1J com o carbono em δ 92,1. Neste experimento ainda ficou comprovado que o carbono que apresenta deslocamento químico em δ 103,6 é quaternário por não apresentar correlação com nenhum hidrogênio.

No experimento de mapa de contorno gHMBC (Figura 4.3.17) foram observadas correlações à ^2J e à ^3J que auxiliaram a atribuição do esqueleto da molécula. Com este experimento comprovou-se que o hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,42 (H-1) apresenta correlações com os carbonos em δ 72,4 (C-2) e com o carbono em δ 103,6 (C-2') confirmando a ligação entre as duas unidades dos açúcares.

A partir das observações das correlações existentes no mapa de contorno gHMBC (Tabela 4.3.2) entre os hidrogênios metilênicos em δ 3,83 com o carbono em (δ 69,2 – C-4) foi possível estabelecer a posição deste grupo CH_2 na unidade da glicose. No espectro gHSQC este hidrogênio apresenta correlação direta com o (C-6) em δ 60,1 (Figura 4.3.16). Quando a hidroxila da posição C-6_{glc} está substituída, este valor de C-6 apresenta-se mais desblindado ($\pm$ δ 67 – 69), confirmando, portanto que neste caso a glicose na posição C-6 encontra-se livre. Para os outros dois grupos metilênicos, a mesma observação foi realizada. Observou-se ainda as correlações no mapa de contorno gHSQC do hidrogênio em δ 3,68 (C-1') e no gHMBC

com os carbonos em δ 103,6 (C-2') e com o δ 76,4 (C-3'). Portanto diante dos dados apresentados de RMN, pode-se sugerir que esta substância é formada por uma glicose e uma frutose.

Tabela 4.3.2. Deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D (D₂O, 14,1 T) da substância **CF2**.

<i>Posições</i>	<i>¹H (δ, J em Hz)</i>	<i>¹³C</i>	<i>gHMBC</i>
1	5,42 <i>d</i> (3,6)	92,1	H-1/C-3; H-1/C-2'
2	3,56 <i>dd</i> (4,2; 3,6))	71,0	H-2/C3
3	3,76 <i>t</i> (9)	72,4	H-3/C2; H-3/C4
4	3,48 <i>t</i> (9)	69,2	H-4/C-3
5	3,84 <i>m</i>	72,5	
6a	3,68 <i>s</i>	60,0	
6b	3,83 <i>m</i>		H-6a'/C-4
1a'	3,68 <i>s</i>	61,3	H-1a'/C-2'; H-1a'/C-3'
1b'	3,83 <i>m</i>		
2'	-	103,6	
3'	4,21 <i>d</i> (9)	76,4	H-3'/C-4'
4'	4,06 <i>t</i> (9)	74,0	H-4'/C-3'
5'	3,90 <i>m</i>	81,3	
6a'	3,83 <i>m</i>	62,3	
6b'	3,86 <i>m</i>		

Para confirmar a estrutura desta substância, realizou-se o experimento ESI-MS/MS (modo negativo) que apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 341 (Figura 4.3.10), sugerindo a fórmula molecular C₁₂H₂₂O₁₁. O espectro MS/MS apresentou fragmentos significativos em m/z 179 referente à perda de um glicose [M – C₆H₁₁O₅ – H]⁻ e em m/z 161 à perda de água da glicose [M – C₆H₁₁O₅ – H₂O]⁻. Portanto esta molécula foi determinada como sendo a α -D-glucopiranosideo-(1 $\rightarrow$ 2')-O- β -D-frutofuranosil (Figura 4.3.11).

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose através de uma ligação O-glicosídica proveniente da reação entre a hidroxila de uma glicose com o carbono anomérico de outra, portanto um açúcar não redutor. Dependendo da forma de ciclização do hemiacetal o hidrogênio anomérico pode estabelecer a configuração α ou β na porção glicopiranosídica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Os dissacarídeos são amplamente encontrados em plantas. A sacarose é o maior açúcar translocado nas plantas e é deste modo a forma de carbono que muitos tecidos não fotossintéticos importam para sua manutenção (VOET; VOET; PRATT, 2008). Atua, por exemplo, como substrato respiratório, suplementando os açúcares naturais, que são rapidamente utilizados após o corte de uma planta (VAN DOORN, 2001).

Além da maior parte do carbono fixado em uma planta ser convertido em sacarose, ou seja, a principal forma de transporte dos açúcares, Cavalcanti et al. (2005) descrevem que

compostos secundários encontrados em extratos ou óleos essenciais de plantas medicinais, que podem apresentar na sua composição alto teor de sacarose, possuem atividades nematocida, inseticida, antiviral, bactericida e fungicida.

Figura 4.3.10. Espectros de ESI-MS, modo negativo full scan e MS² referente à m/z 341 (CF2).

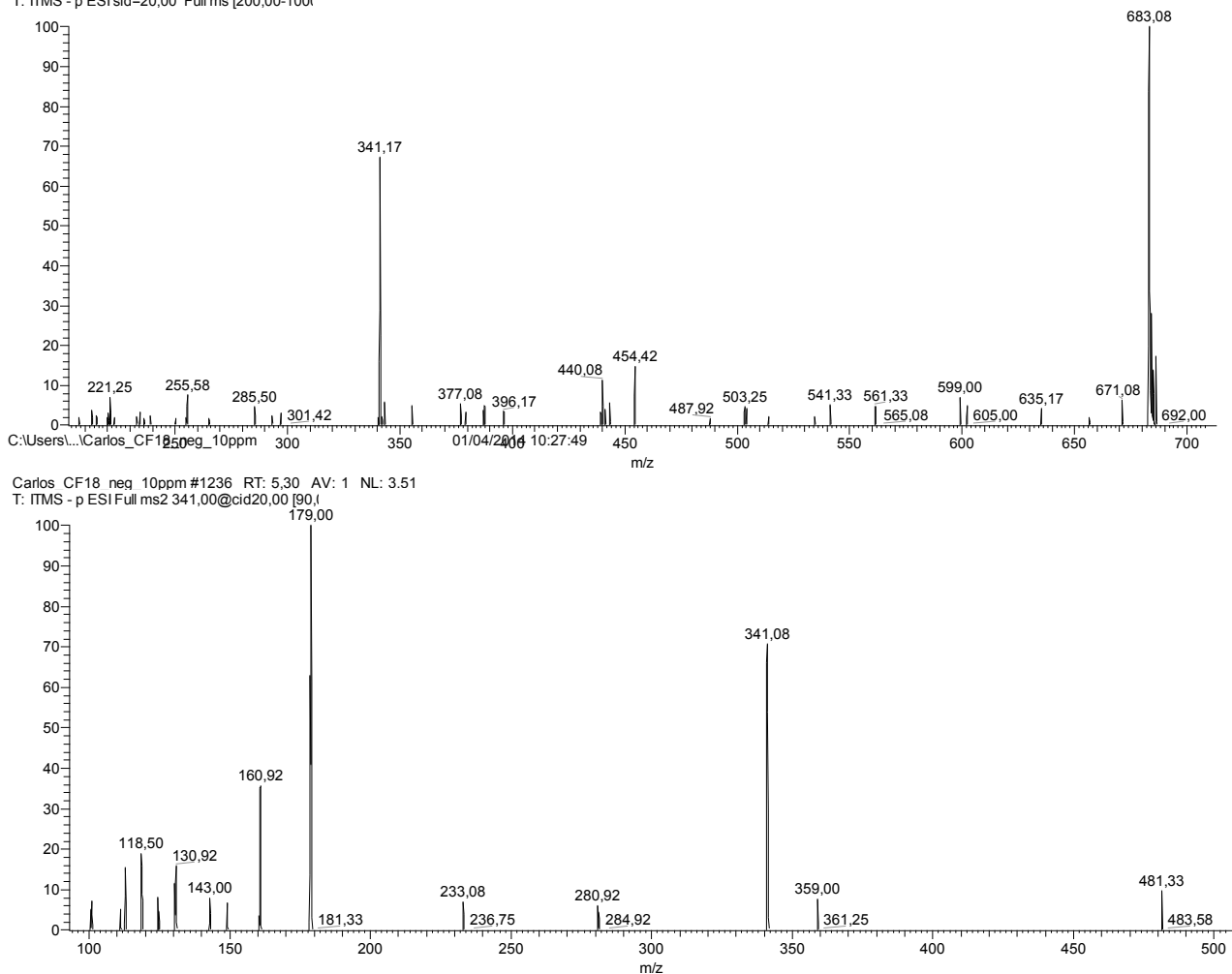


Figura 4.3.11. Substância CF2.

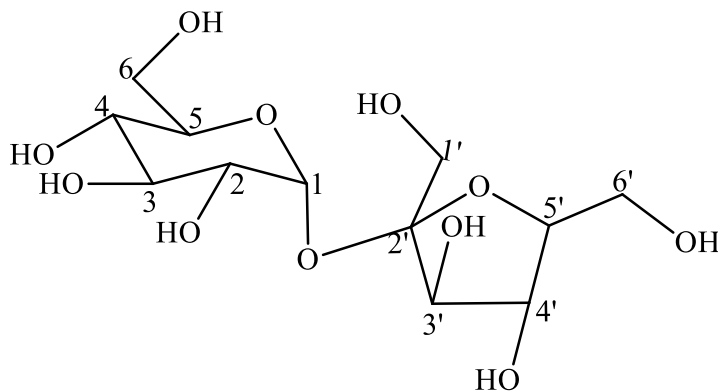


Figura 4.3.12. Espectro de RMN ^{13}C de **CF2** (14,1 T, D_2O , TMS, δ). Com expansão δ (60-105).

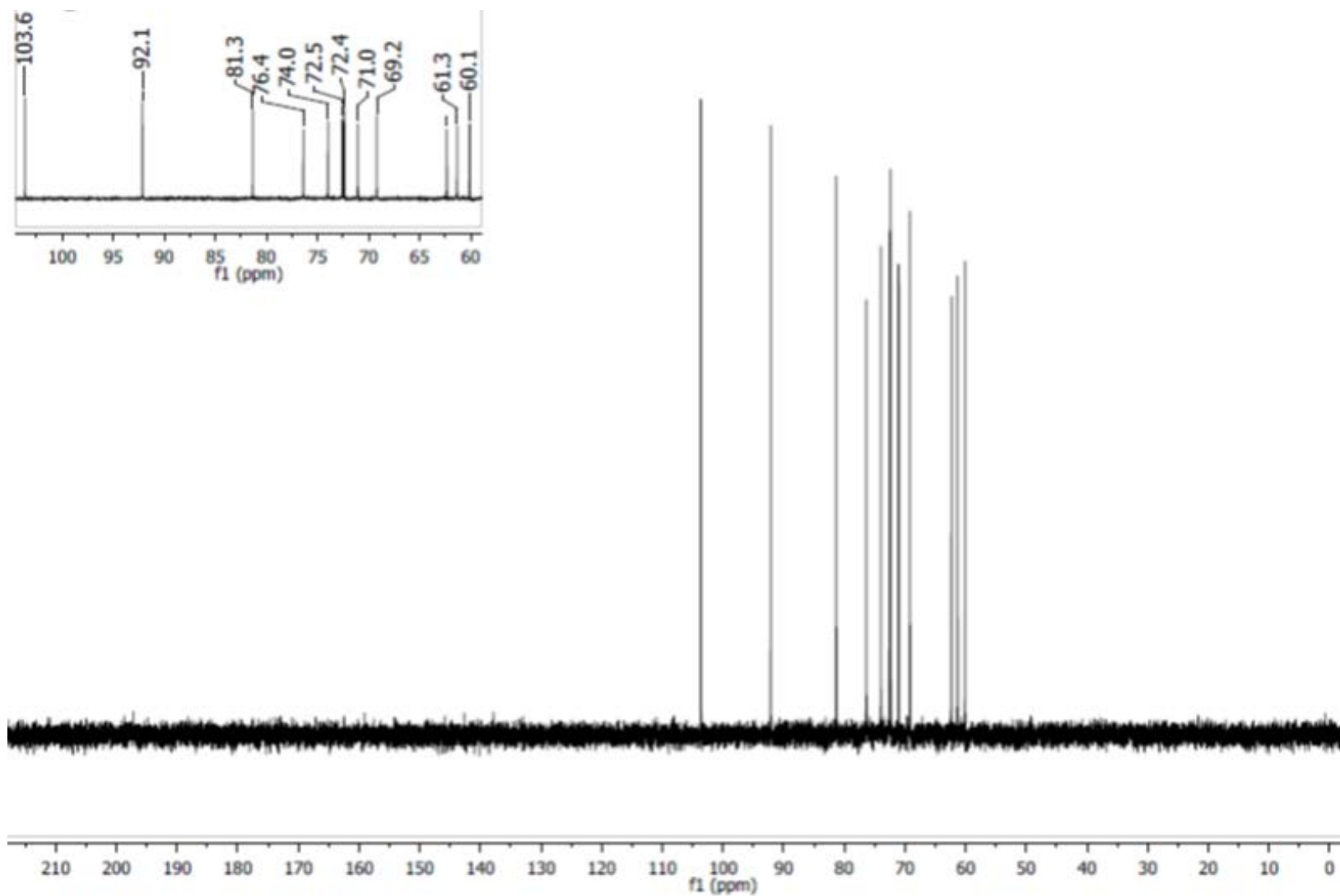


Figura 4.3.13. Espectro de DEPT 135 de **CF2** (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

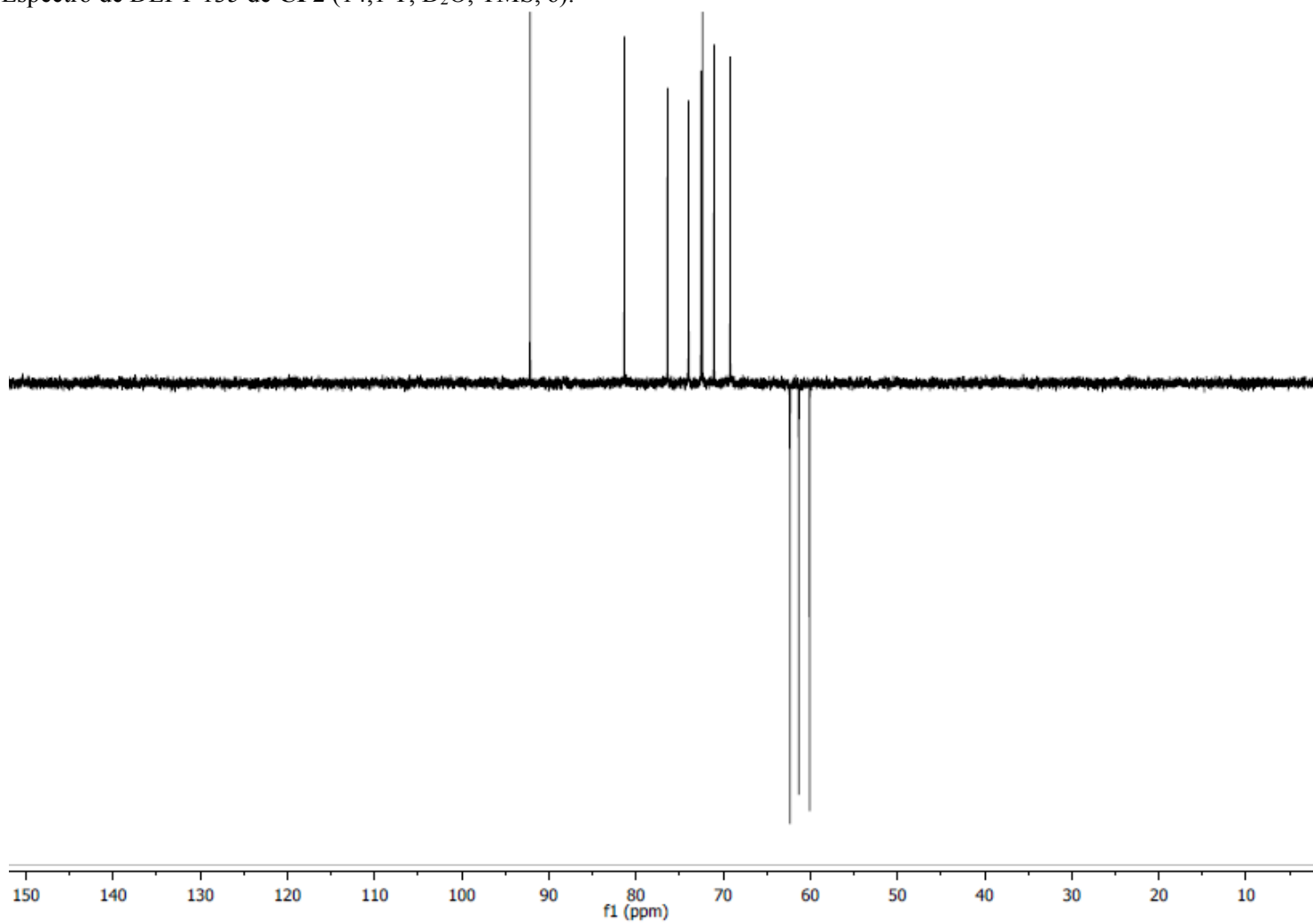


Figura 4.3.14. Espectro de RMN ^1H de CF₂, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

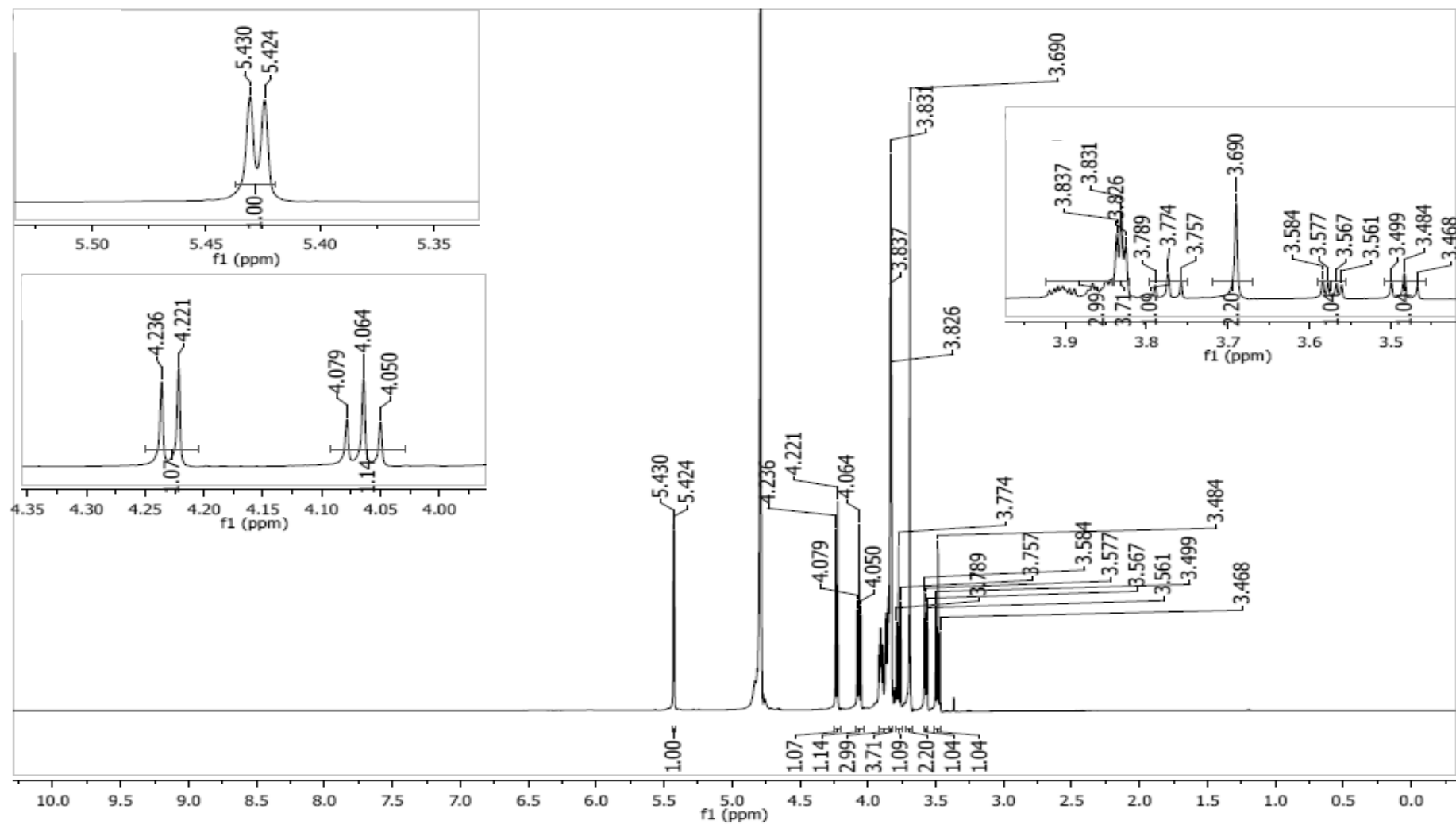


Figura 4.3.15. Espectro de gCOSY-2D de CF₂, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

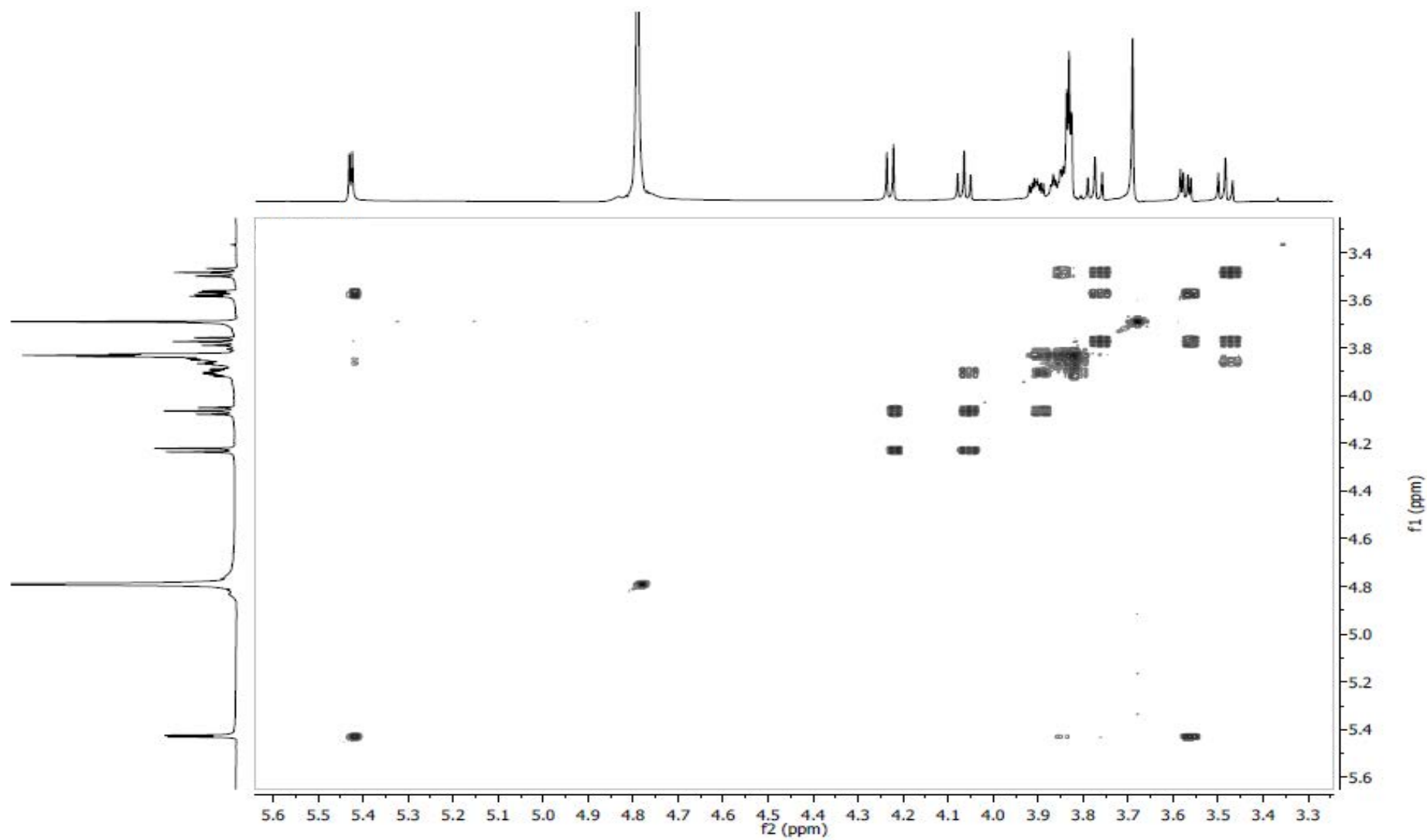


Figura 4.3.16. Espectro de gHSQC-2D de CF₂, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

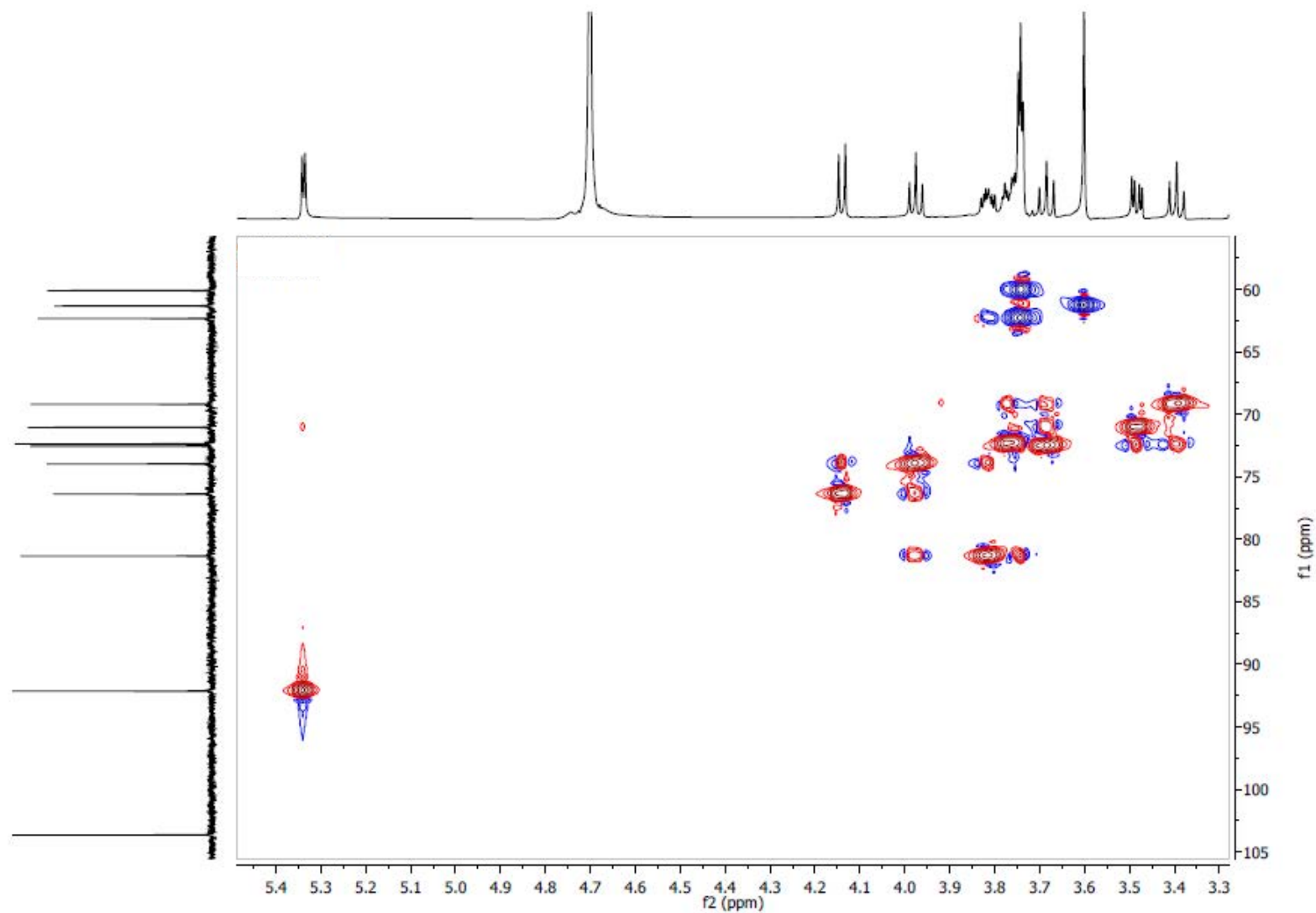
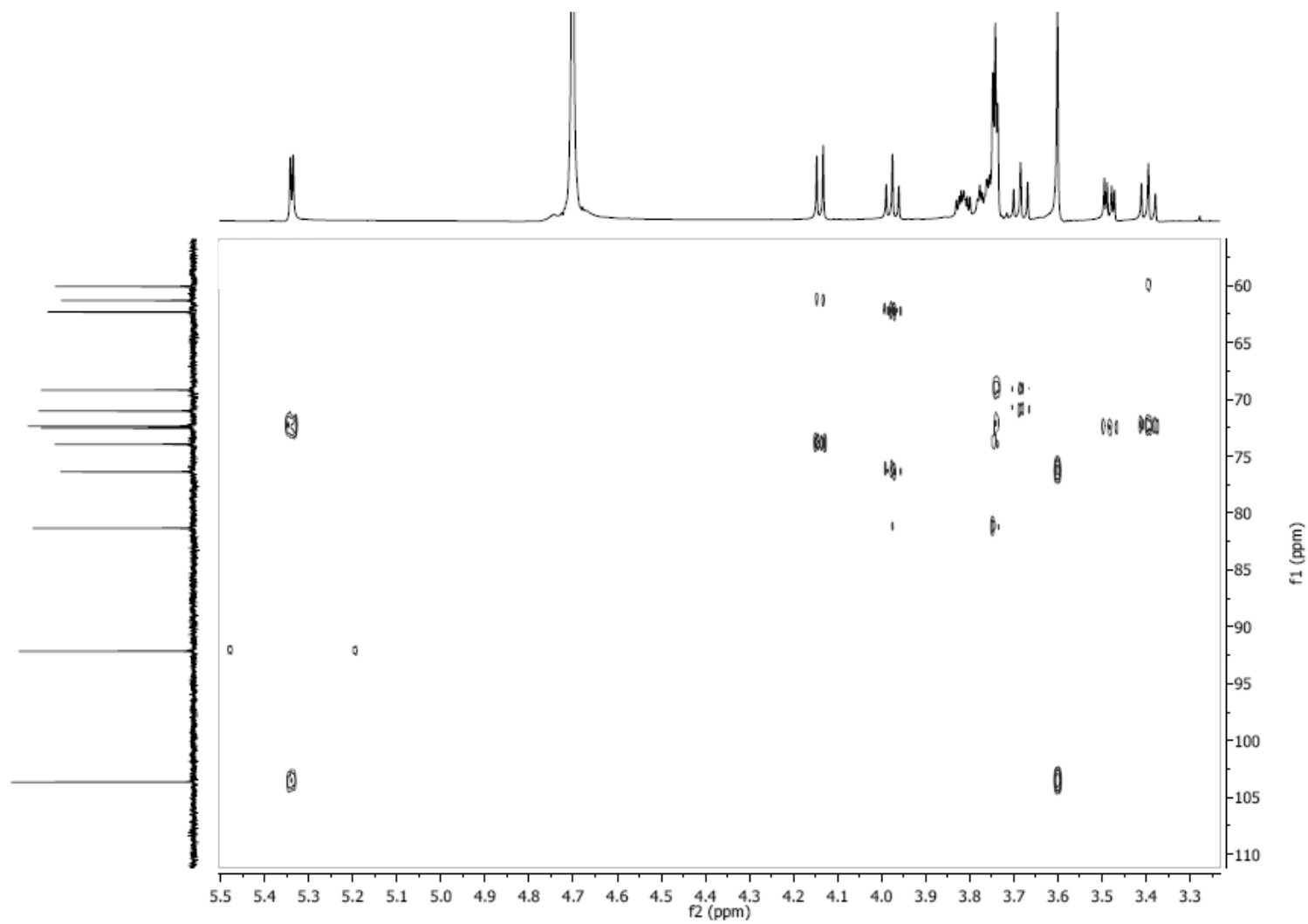
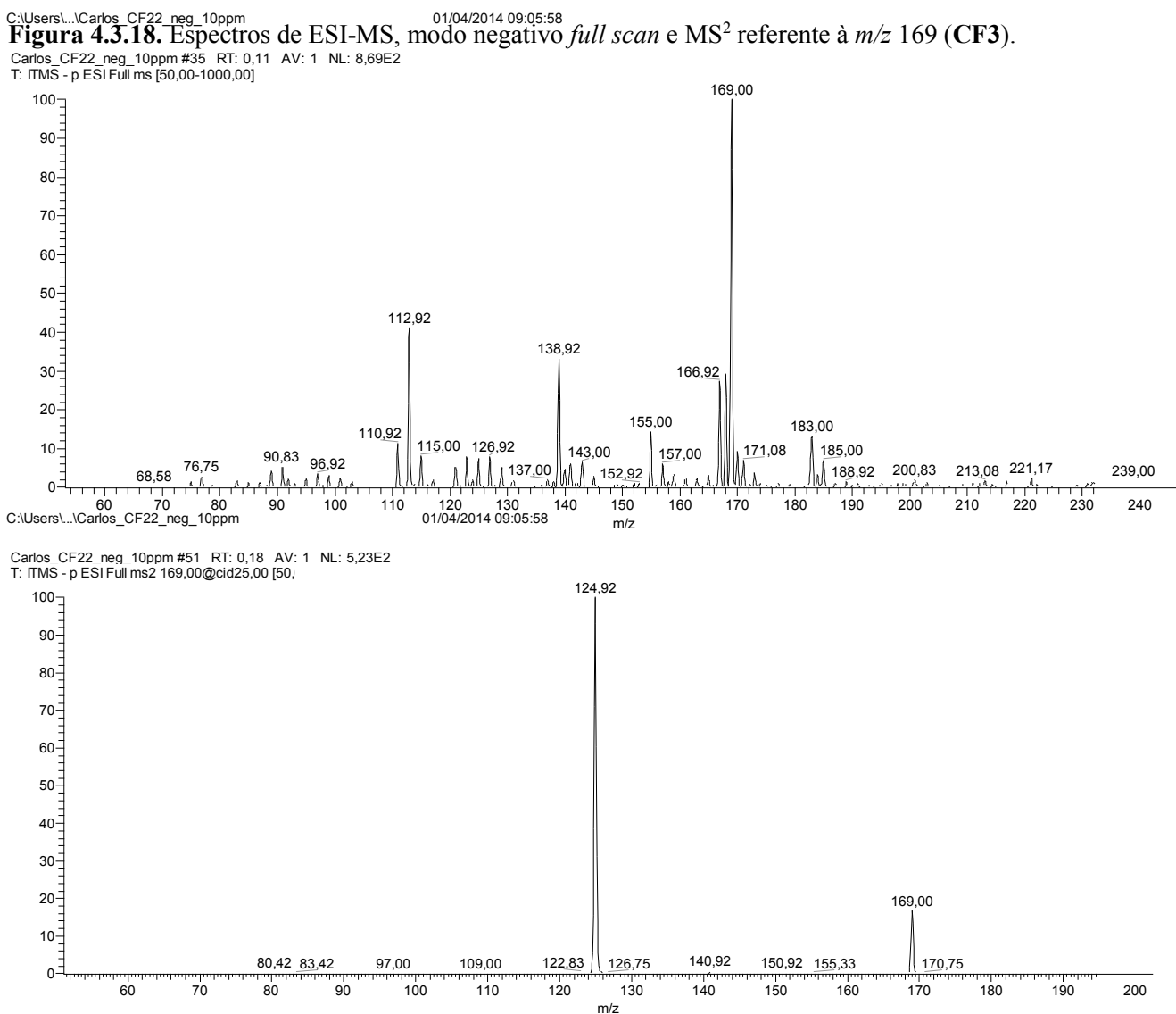


Figura 4.3.17. Espectro de gHMBC-2D de **CF2** (14,1 T, D₂O, TMS, δ)



4.3.3. Determinação de CF3

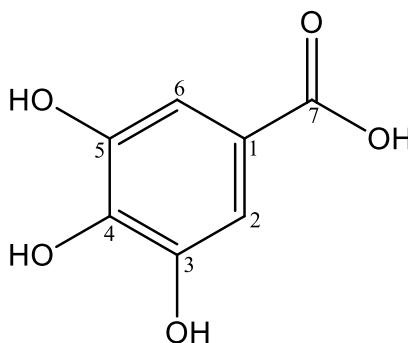
O espectro de ESI-MS (modo negativo), da substância **CF3** apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 169 (Figura 4.3.18). O padrão de fragmentação observado nos espectros de MS/MS possibilitou sugerir que esta molécula é o ácido gálico (MENDES et al., 2011; MENA, et al., 2012). Espectro de segunda-ordem do íon m/z 169 (Figura 4.3.18) levou a formação do íon produto em m/z 125 $[M - 44 - H]^-$ atribuída à perda (COO^-) (CHUA et al., 2011).



O espectro de RMN ^1H (Figura 4.3.20) apresentou na região de hidrogênios aromáticos um singlete em δ 6,99 (s, H-2 e H-6), que sugeriu tratar-se de um hidrogênio orto a carbonila em um anel aromático 1,3,4,5-tetrasubstituído. Moura, Vilegas e Santos (2011), em seus experimentos encontraram um deslocamento químico de um Singlete em δ 6,92 para o ácido gálico.

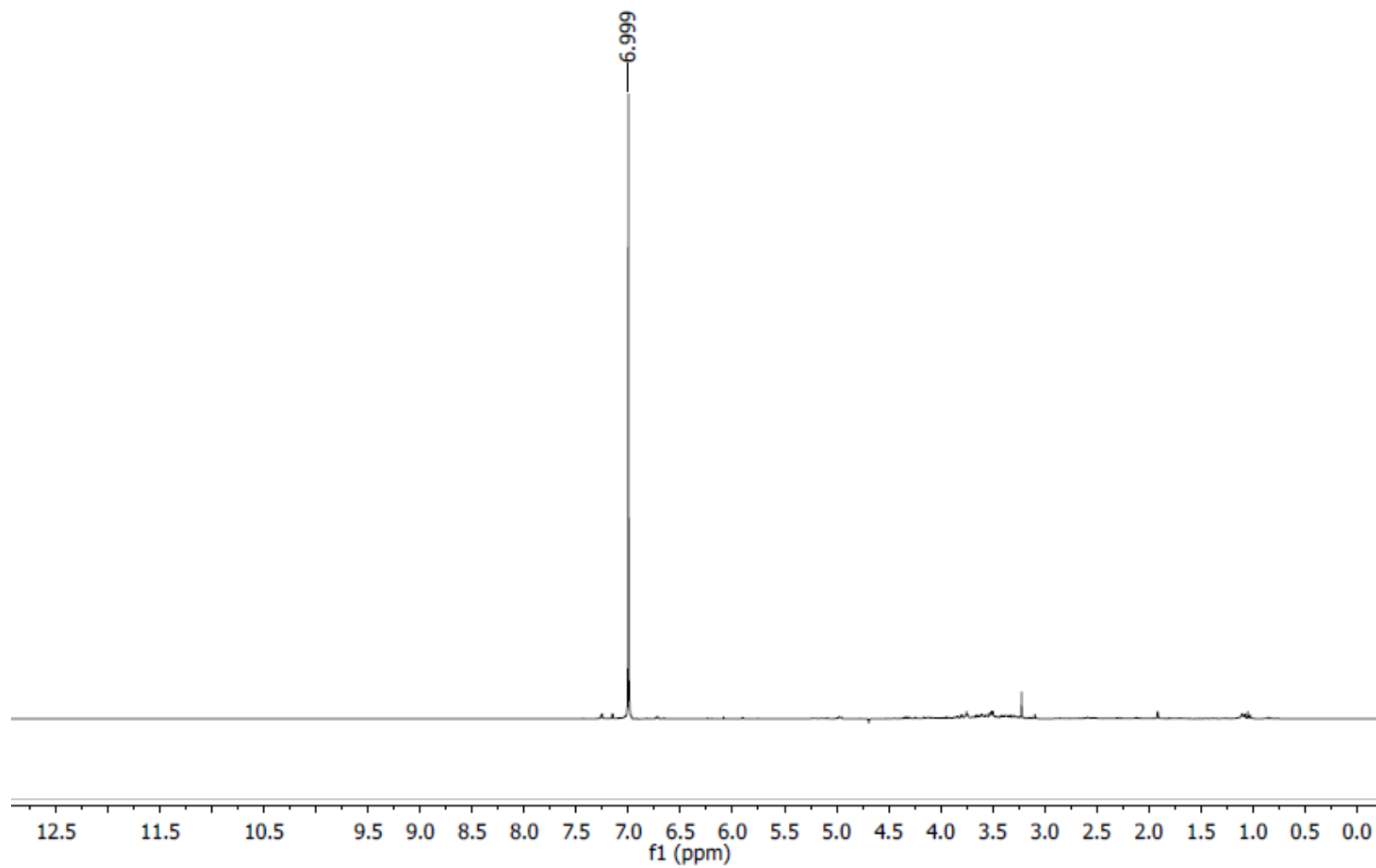
Os dados observados por ESI-MS, RMN ^1H e co-injeção de padrão em HPLC-DAD₂ (item 4.4), mostraram-se consistentes para identificar a substância como sendo o ácido gálico (Figura 4.3.19). Vasconcelos et al. (2011), já havia identificado esta substância nas cascas do caule de *C. ferrea*.

Figura 4.3.19. Substância CF3.



O ácido gálico é uma substância comum em várias espécies de plantas. Foi identificada em *Hancornia speciosa*, *Davilla nítida*, *Davilla elliptica*, *Byrsonima crassa* (RODRIGUES, 2007), *Labisia pumila* (CHUA et al., 2011), *Punica granatum* (MENA, et al., 2012), *Parkia biglobosa* (TALA et al., 2013), *Myrcia bela* (SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013). Na literatura são relatadas várias atividades farmacológicas desta substância. Yoshioka e colaboradores (2000) mostraram que o ácido gálico tem seletiva citotoxicidade contra uma variedade de tumores celulares, Kim (2007) descreveu que esta substância tem as funções antimelanogênico e agente antioxidante, propondo que estas duas funções fazem do ácido gálico um composto eficiente para a saúde da pele. Trabalhos realizados recentemente apontaram que o ácido gálico é antimicrobiano (GEHRKE et al., 2013; MANAYI et al., 2013).

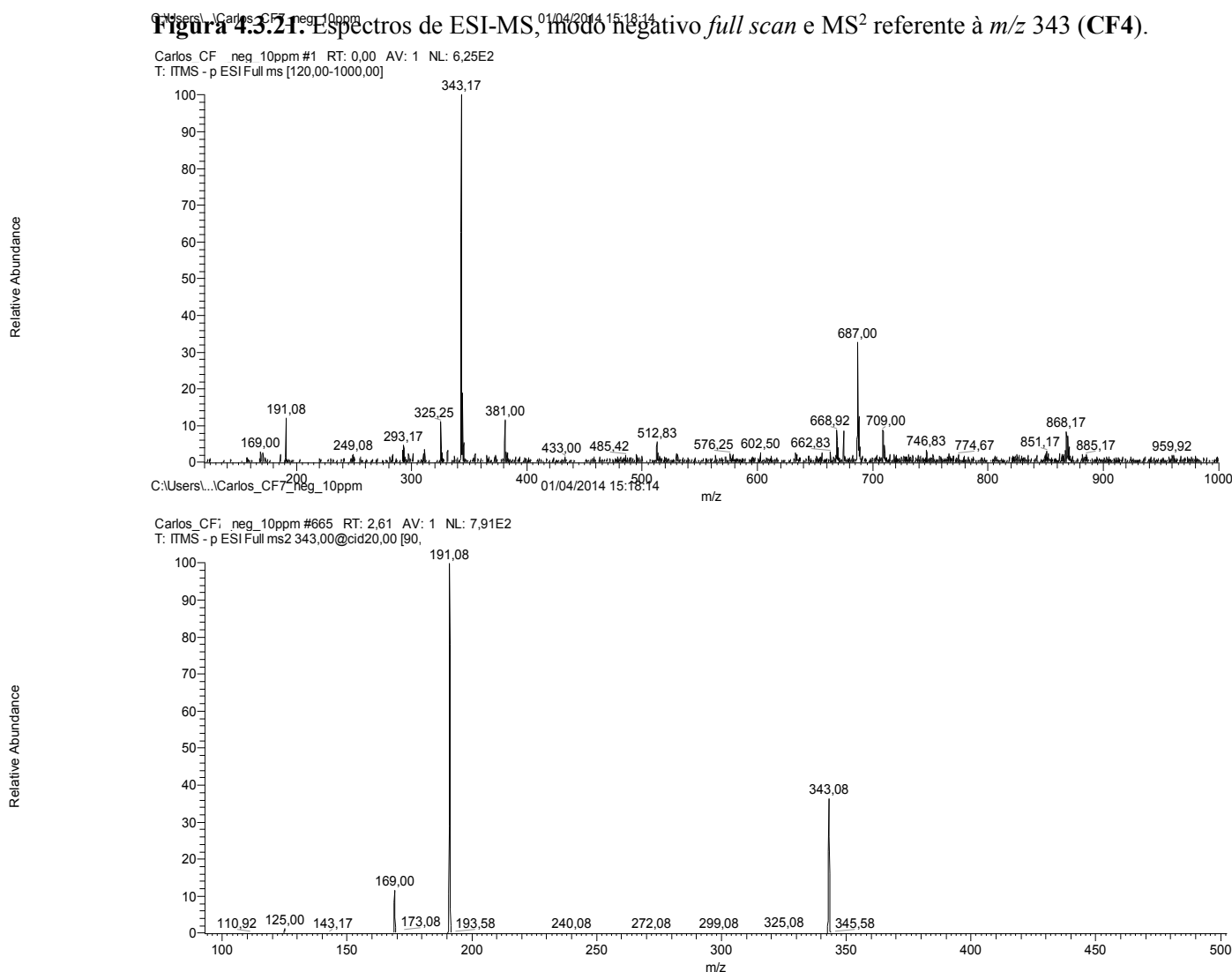
Figura 4.3.20. Espectro de RMN ^1H de **CF3** (7,0 T, D_2O , TMS, δ).



4.3.4. Determinação de CF4

O espectro ESI-MS (modo negativo) da Figura 4.3.21 apresentou o íon em m/z 343 que foi atribuído ao íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$, sugerindo a fórmula molecular $C_{14}H_{16}O_{10}$. Espectro de MS/MS (Figura 4.3.21) do íon em m/z 343 originou os fragmentos: m/z 191, sugerindo a eliminação de um grupo galoila $[M - H - 152]^-$ e o íon fragmento em m/z 169 correspondente a perda de uma unidade do ácido quínico com a formação do ácido gálico desprotonado.

Figura 4.3.21: Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS² referente à m/z 343 (CF4).



O espectro de RMN de ^1H de CF4 (Figura 4.3.24; Tabela 4.3.3), apresentou o sinal de deslocamento químico na região aromática, em δ 7,09 (2H, *s*) sugerindo a presença de um grupo galoila. Outros sinais de hidrogênios foram observados na região de δ 2,00-2,20, referentes a grupos metilênicos. Estes sinais aliados ao sinal de deslocamento químico do hidrogênio em δ 5,45 (*ddd*, 5,5; 4,14; 4,6 Hz) possibilitou sugerir que nesta molécula existe

também uma unidade do ácido quínico. Comparação com dados da literatura (NISHIMURA; NONAKA; NISHIOKA, 1984) indicam que quando o ácido quínico está substituído na posição C-5, o deslocamento químico deste carbono é de δ 70-71 Hz, confirmando, portanto que o ácido quínico está esterificado na posição C-5.

O experimento COSY (Figura 4.3.25), apresentou a sequência de hidrogênios δ (5,45 $\rightarrow$ 4,18 $\rightarrow$ δ 3,76) informando que estes hidrogênios pertencem ao mesmo sistema de spins. A correlação entre os hidrogênios em δ (2,09 $\rightarrow$ 2,17), atribuídos aos H – 6_a e 6_b respectivamente e δ (2,00 $\rightarrow$ 2,18), atribuídos finalmente aos H – 2_a e 2_b respectivamente, completou a atribuição dos hidrogênios pertencentes à unidade do ácido quínico.

O experimento de mapa de contorno gHSQC (Figura 4.3.26) mostrou a correlação de todos os hidrogênios com os respectivos carbonos à ^1J (Tabela 4.3.3).

Para estabelecer a ligação entre as duas unidades da molécula, observou-se o experimento de mapa de contorno gHMBC (Figura 4.3.27) que mostrou a correlação do hidrogênio em δ 5,45 com a carbonila do grupo galoila em δ 166,7 e com o carbono em δ 73,2 (C-3).

Portanto, os dados apresentados possibilitaram caracterizar esta substância como sendo o ácido 5-*O*-galoil quínico (Figura 4.3.23).

4.3.5. Determinação de CF5

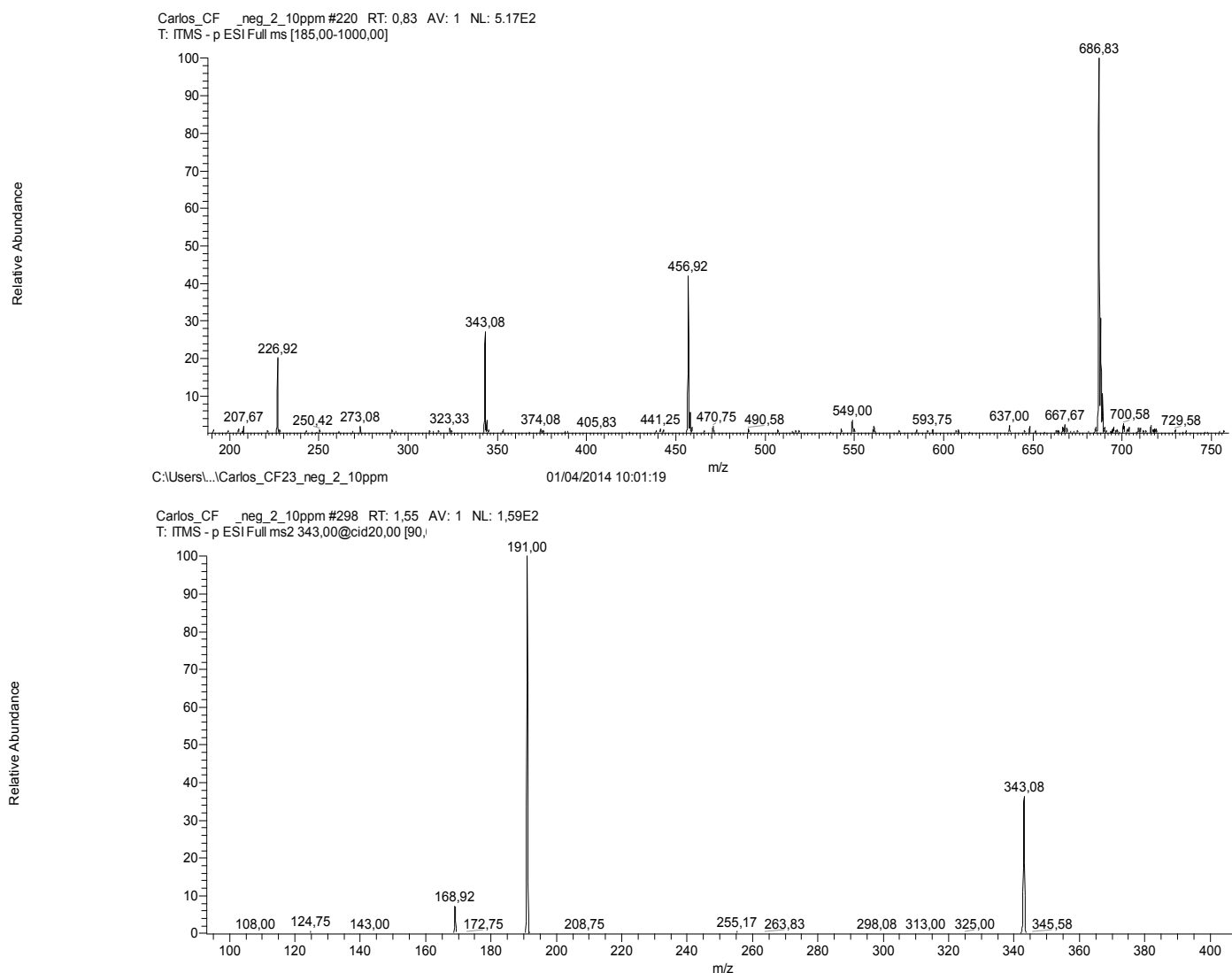
O espectro de ESI-MS (modo negativo) da substância **CF5** mostrou-se semelhante ao da substância **CF4**. Foram observados o íon da molécula desprotonada em m/z 343 e os íons fragmentos em m/z 191 e 169 (Figura 4.3.22). Os íons em m/z 457 e 227 não apresentaram fragmentos e sugere-se que sejam contaminantes da amostra.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.3.28) apresentou também semelhança com o da substância **CF4**. Porém, alguns deslocamentos químicos de hidrogênios apresentaram-se mais blindados e com constantes de acoplamentos diferentes aos da substância **CF4**, sugerindo que estas duas substâncias possam ser isômeros. Observou-se que o hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,20 (1 H, *ddd*) possui constante de acoplamento de 6,3; 7,5 e 6,2 Hz. Comparação com dados da literatura (NISHIMURA; NONAKA; NISHIOKA, 1984) indicam que quando o ácido quínico está substituído na posição C-3, a constante de acoplamento para o H-3 é de 7-8 Hz, confirmando, portanto que o ácido quínico está esterificado na posição C-3.

Os hidrogênios H-6_a,6_b e H-2_a,2_b, assim como os hidrogênios H-5 e H-4 foram observados no espectro de RMN ¹H em δ (1,90-2,20) e δ (3,80-4,20), respectivamente. O hidrogênio do grupo galoila apresentou deslocamento químico em δ 6,96 (2 H, s).

O experimento COSY (Figura 4.3.29) mostrou a sequência dos hidrogênios δ 2,12→4,14→3,83→5,20→2,12. O experimento HOMODEC (Figura 4.3.30) confirmou que quando o hidrogênio em δ 3,83 – H4 é irradiado, os deslocamentos químicos dos hidrogênios em δ 5,20 e δ 4,14 são alterados, comprovando a posição do H-4 vicinais aos hidrogênios dos carbonos C-5 e C-3 respectivamente. Os hidrogênios δ 2,13 e 5,20 também foram irradiados (Figura 4.3.30) e confirmaram a sequência dos hidrogênios observada no experimento COSY.

Figura 4.3.22. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan* e MS² referente à *m/z* 343 (CF5).



Diante desta observação, foram analisados os espectros de gHSQC (Figura 4.3.31) que mostrou todas as correlações à ¹J dos hidrogênios e carbonos (Tabela 4.3.3) e os espectros de gHMBC (Figura 4.3.32) que confirmou algumas correlações para identificação da estrutura.

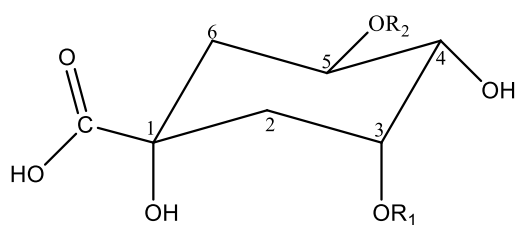
Neste espectro, observamos a correlação do hidrogênio em δ 5,20 com a carbonila do grupo galoila em δ 166,9 e com o carbono em δ 74,2 (C-1) do ácido quinico. Outras correlações também foram observadas (Tabela 4.3.3). O hidrogênio 6a (δ 1,92) mostrou correlações com os carbonos em δ 68,4; 74,2 e 176,5 (C-5, C-1 e COOH).

Tabela 4.3.3. Deslocamentos químicos de RMN 1D e 2D de **CF4** (CD₃OD-d₄, 14,1 T) e **CF5** (D₂O, 14,1 T).

Posições	¹ H (δ ; J em Hz)	¹³ C	gHSQC	gHMBC
Ácido 5-O-galoil quinico				
1	-			
2a	2,00 (m)	37,3	H-2a/C-2	
2b	2,18 (m)		H-2b/C-2	
3	3,76 (dd; 2,2; 2,2)	73,2	H-3/C-3	H-3/C-4
4	4,18 (m)	71,3	H-4/C-4	
5	5,45 (ddd; 5,5; 4,1; 4,6)	70,9	H-5/C-5	H-5/C-3; H-5/COO ⁻
6a	2,09 (m)	38,7	H-6a/C-6	H-6a/C-5
6b	2,17 (m)		H-6b/C-6	
COOH				
COO ⁻		166,9		
1'				
2'	7,09 (s)	108,8	H-2'/C-2'	H-2'/C-3'; H-2'/C-4'; H-2'/COO ⁻
3'		145,3		
4'		138,3		
5'		145,3		
6'	7,09 (s)	108,8	H-6'/C-6'	H-6'/C-5'; H-6'/C-4'; H-6'/COO ⁻
Ácido 3-O-galoil quinico				
1	-	74,2		
2a	2,12 (dd; 10,8 e 12,9)	35,8	H-2a/C-2	H-2a/C-1; H-2a/C-3; H-2a/COOH
2b	2,12 (dd; 10,8 e 12,9)		H-2b/C-2	
3	5,20 ddd (6,3; 7,5, 6,2)	71,1	H-3/C-3	H-3/C-1; H-3/COO ⁻
4	3,83 (dd; 3,3; 3,3)	70,4	H-4/C-4	
5	4,14 (m)	68,4	H-5/C-5	
6a	1,92 (dd; 14,1; 14,0)	35,8	H-6a/C-6	H-6a/C-1; H-6a/C-5; H-6a/COOH
6b	2,12 (dd; 10,8 e 12,9)		H-6b/C-6	
COOH		176,7		
COO ⁻		166,9		
1'		120,0		
2'	6,96 (s)	109,8	H-2'/C-2'	H-2'/C-1'; H-2'/C-3'; H-2'/C-4'; H-2'/COO ⁻
3'		144,4		
4'		138,1		
5'		144,4		
6'	6,96 (s)	109,8	H-6'/C-6'	H-6'/C-1'; H-6'/C-5'; H-6'/C-4'; H-6'/COO ⁻

Assim, esta substância foi identificada como sendo o ácido 3-*O*-galoil quínico (Figura 4.3.23).

Figura 4.3.23. Substâncias **CF4** e **CF5**.



CF4 = R1 = H; R2 = G
CF5 = R1 = G; R2 = H

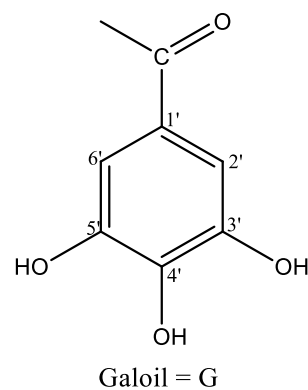


Figura 4.3.24. Espectro de RMN ^1H de CF4 (14,1,0 T, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, TMS, δ).

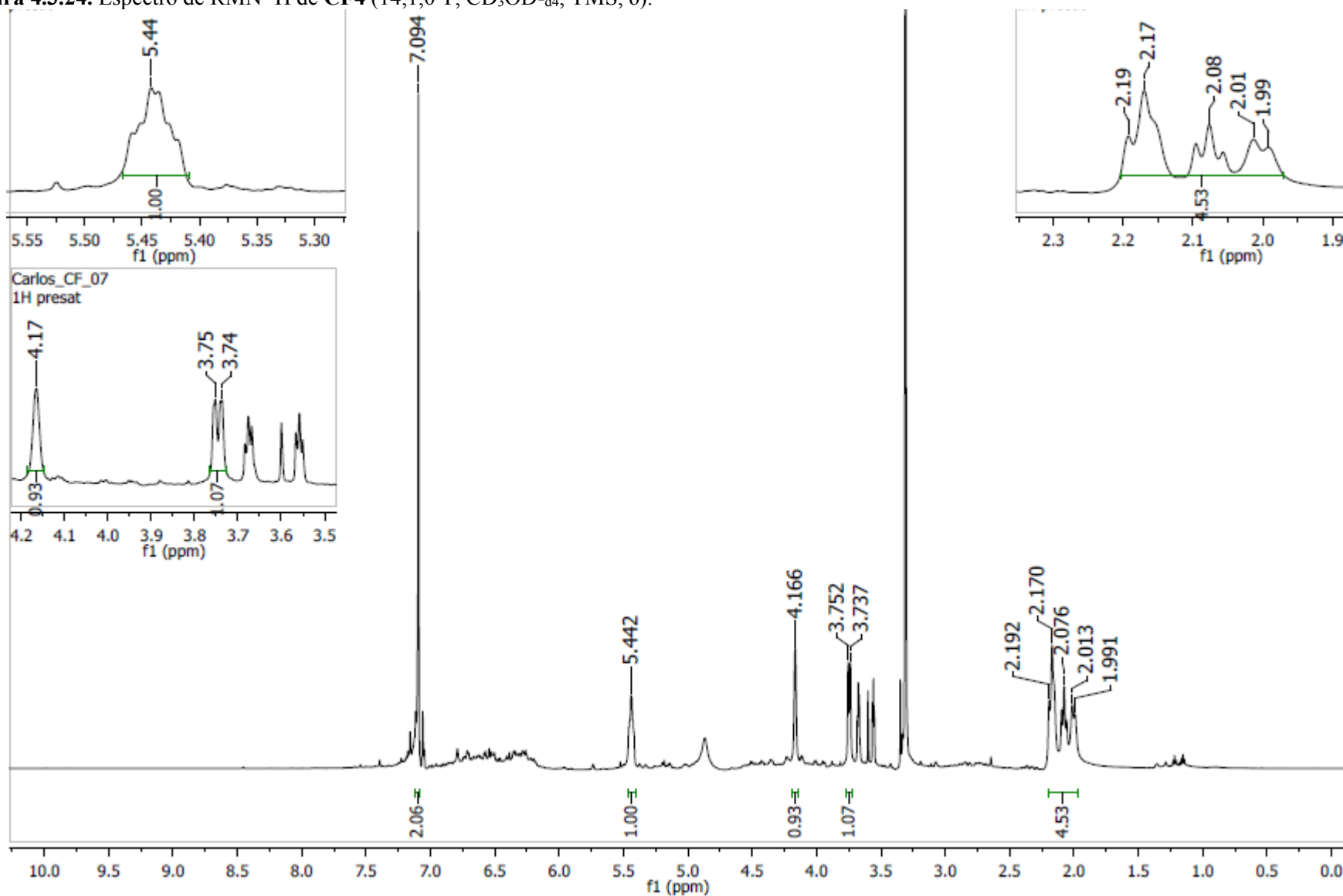


Figura 4.3.25. Espectro de gCOSY-2D de CF₄, (14,1 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ).

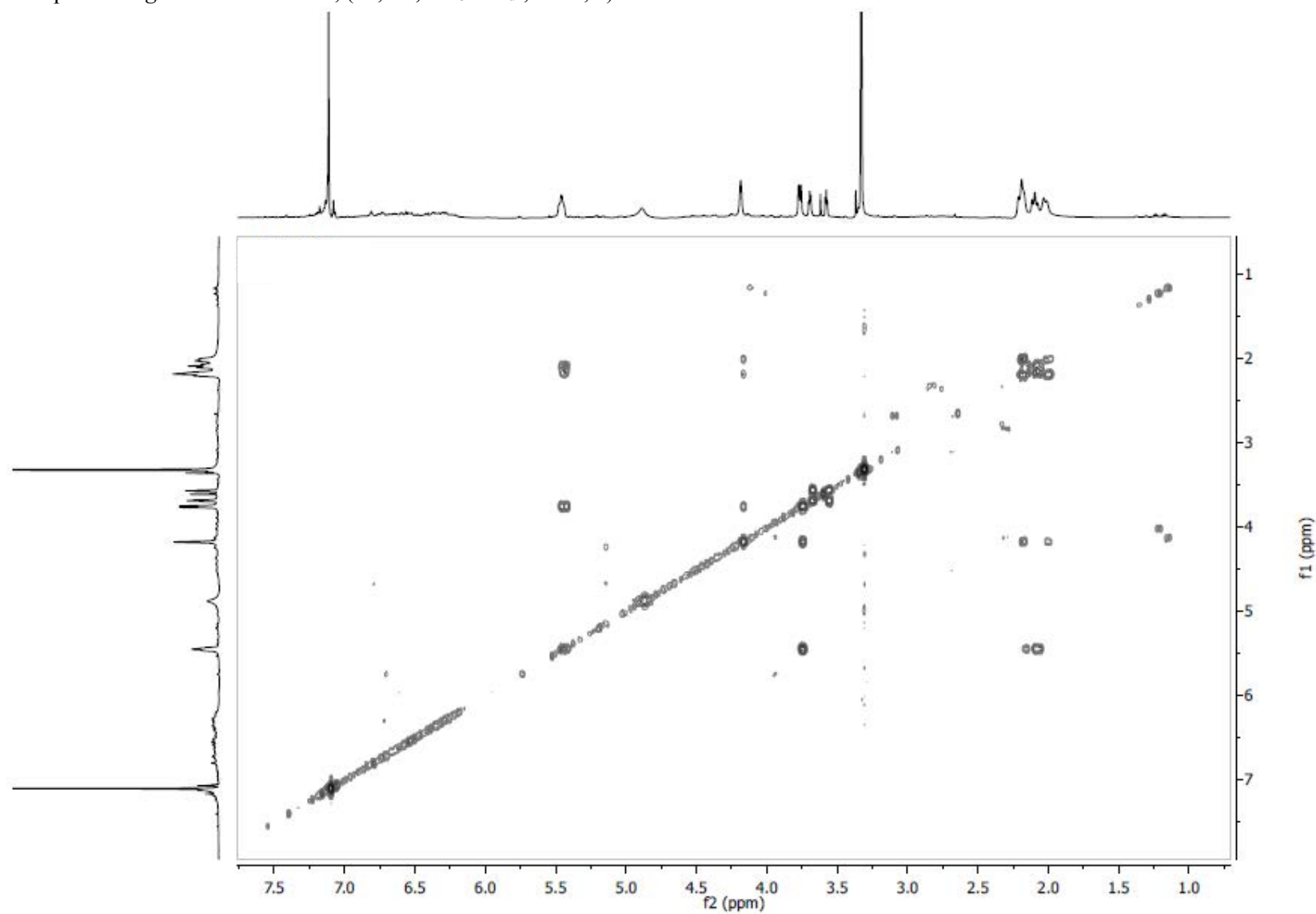


Figura 4.3.26. Espectro de gHSQC-2D de CF₄, (14,1 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ).

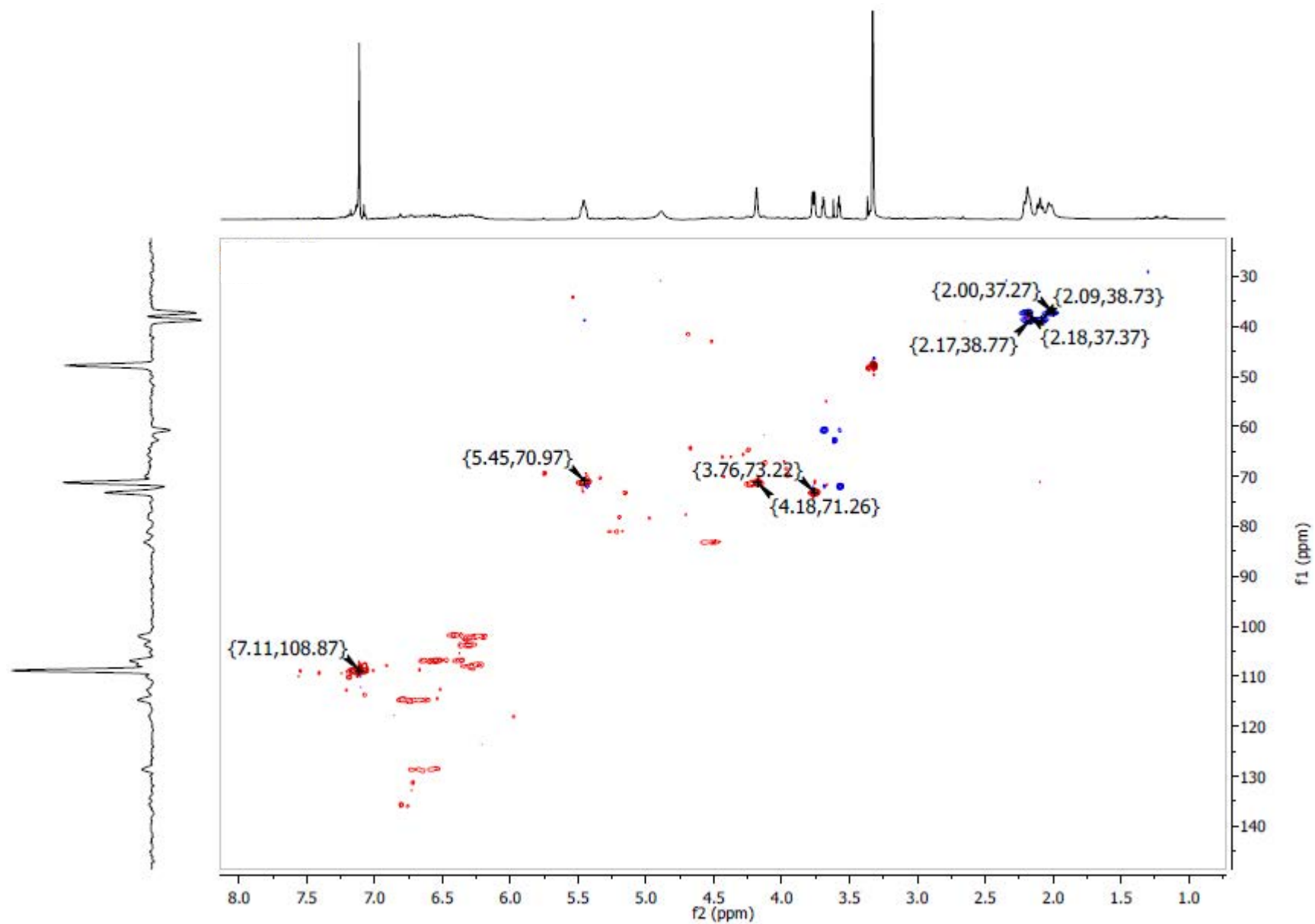


Figura 4.3.27. Espectro de gHMBC-2D de **CF4**, (14,1 T, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, TMS, δ).

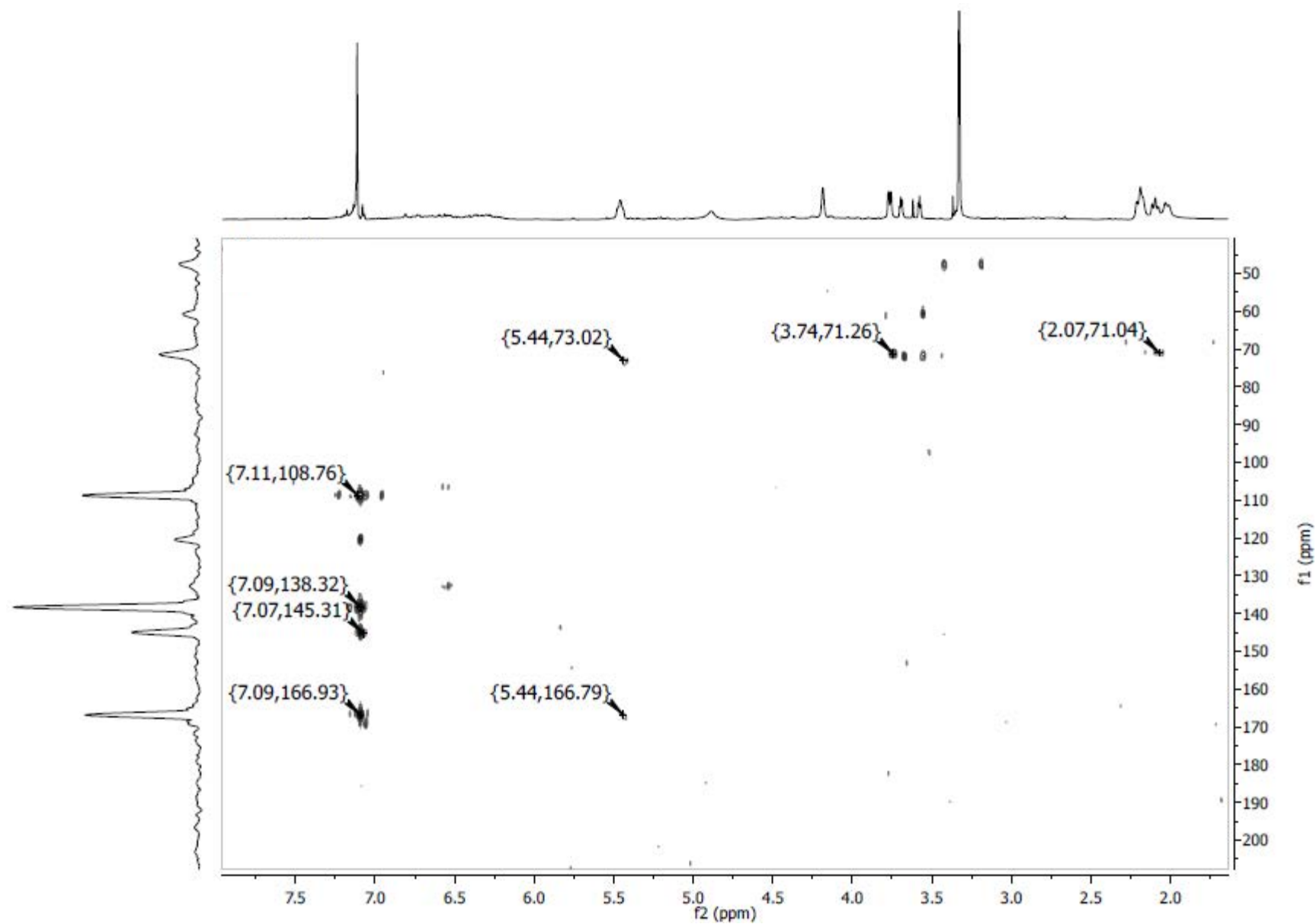


Figura 4.3.28. Espectro de RMN ^1H de CF5 (14,1 T, D_2O , TMS, δ).

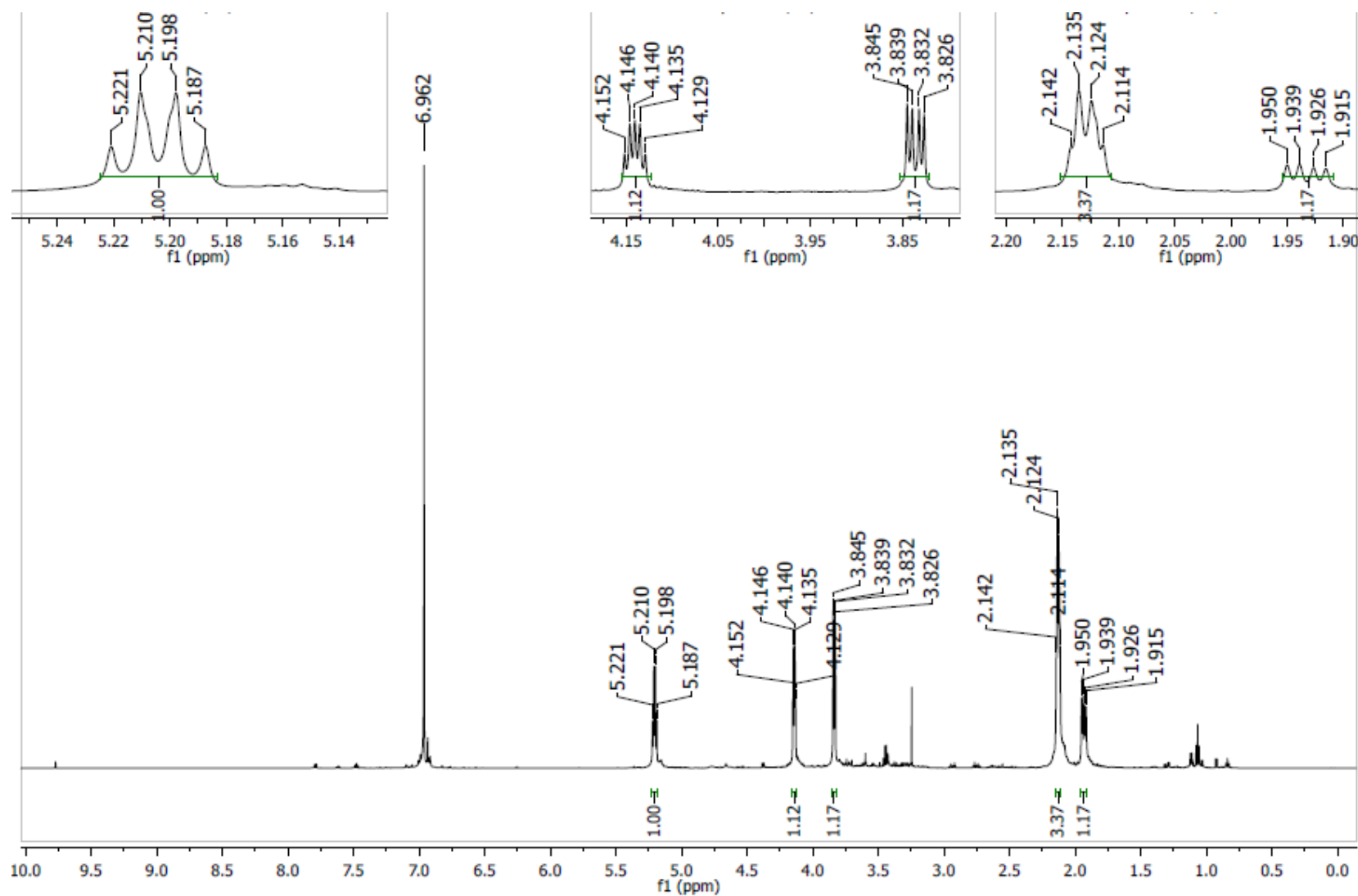


Figura 4.3.29. Espectro de gCOSY-2D de **CF5**, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

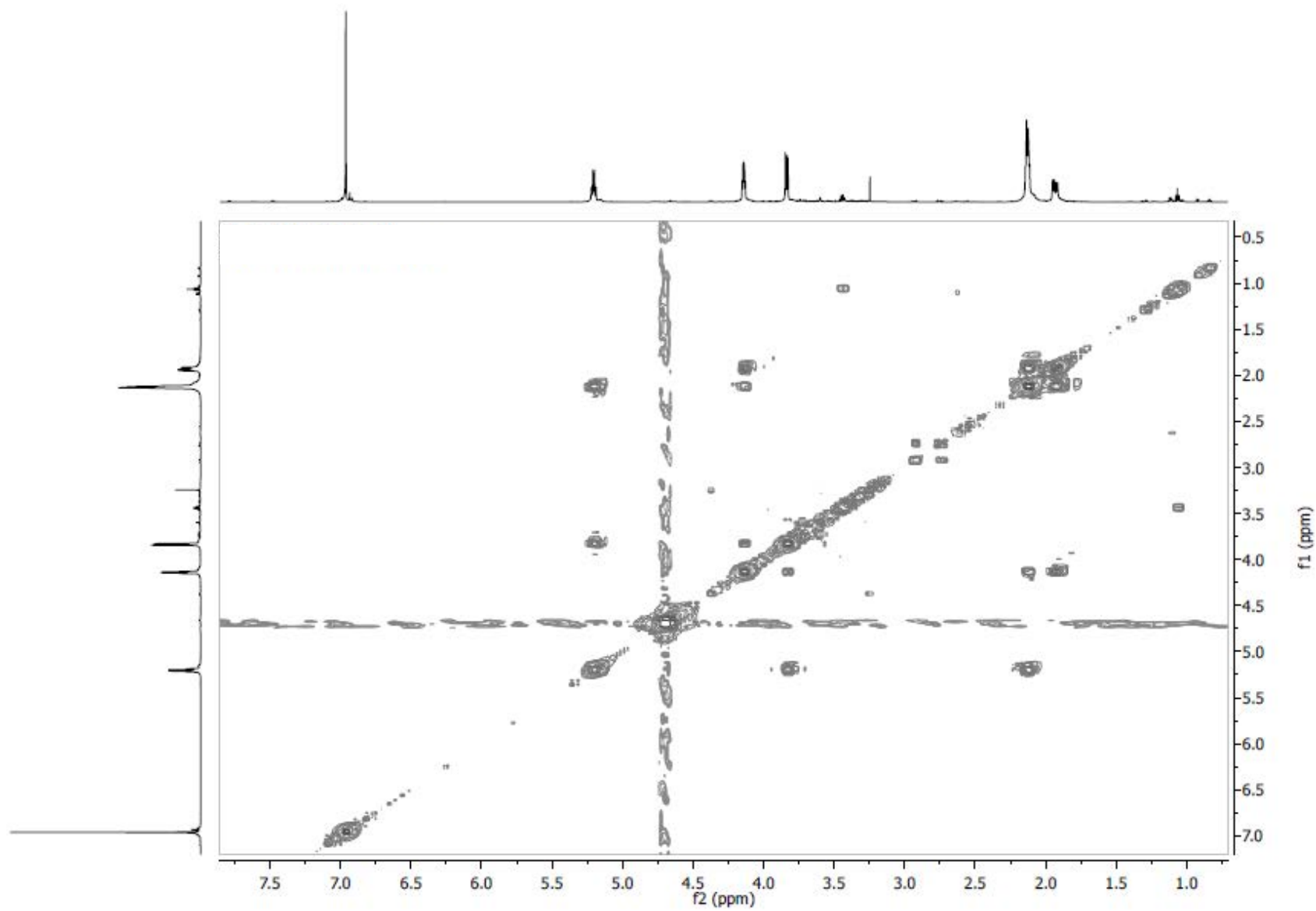


Figura 4.3.30. Espectro de HOMODEC de **CF5**, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

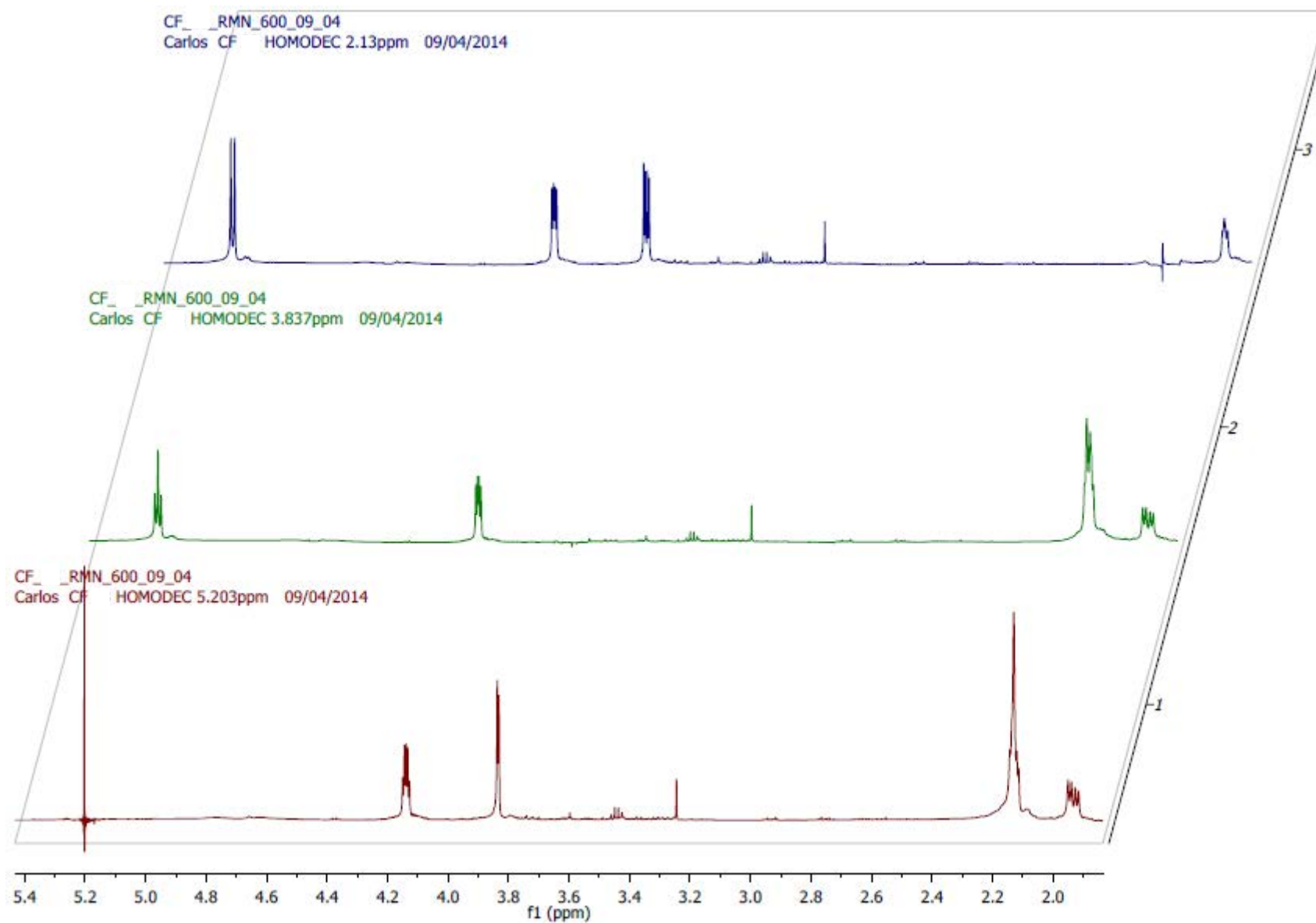


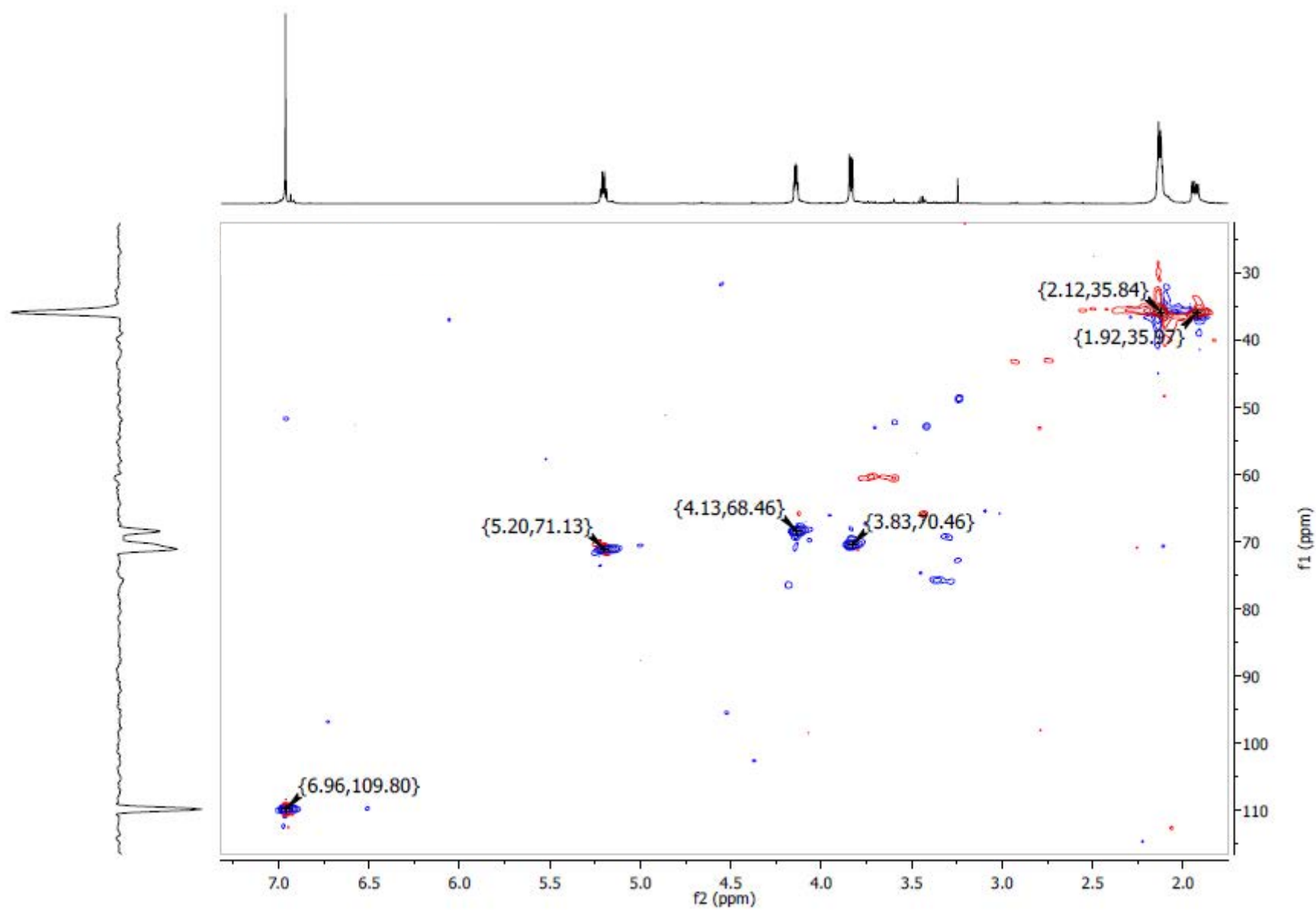
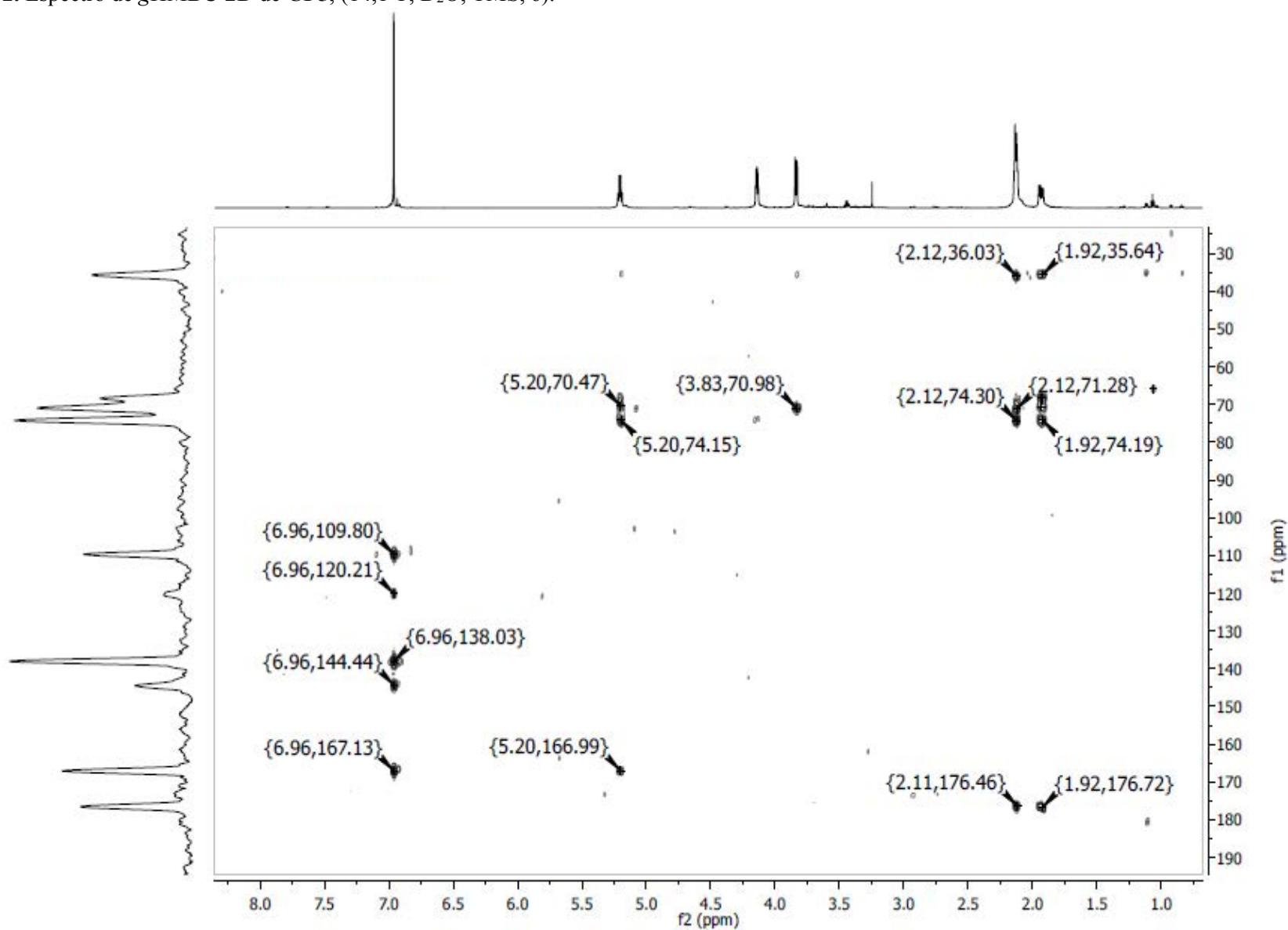
Figura 4.3.31. Espectro de gHSQC-2D de **CF5**, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).

Figura 4.3.32. Espectro de gHMBC-2D de **CF5**, (14,1 T, D₂O, TMS, δ).



4.3.6. Determinação de CF6

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.3.35) da substância **CF6** apresentou sinais na região aromática, característicos de um derivado do ácido elágico (NONO et al., 2014). O Singlete em δ 7,46 apresentou correlação à ^1J no espectro de gHSQC (Figura 4.3.36) com o carbono em 110,6. No experimento gHMBC (Figura 4.3.37) o hidrogênio δ 7,46 apresentou correlações à ^2J e ^3J com os carbonos em δ (140,2; 148,6; 112,6 e 159,8) (Tabela 4.3.4).

Observou-se ainda o sinal de hidrogênios de um grupo metoxila à δ 4,04 que no experimento gHMBC apresentou correlações à ^3J com o carbono em δ 140,2.

A unidade de açúcar foi sugerida devido à presença no espectro de RMN de ^1H do sinal em δ 4,98 com constante de acoplamento ($J = 7,8$ Hz).

Baseado nas informações obtidas e comparadas com os dados da literatura (FRAISSE et al., 2000; KIM et al., 2006), pôde-se sugerir que o açúcar da substância **CF6** é a arabinopiranosose. Segundo Servettaz et al., (1984), arabinopiranosose com constante de acoplamento de 7,0 Hz é típica de β -piranosídeo.

Análise do COSY (Figura 4.3.38) evidenciou a sequência dos hidrogênios como sendo δ 4,98 $\rightarrow$ 3,37 $\rightarrow$ 3,29 $\rightarrow$ 3,42 $\rightarrow$ 3,84.

Pelo espectro gHSQC (Figura 4.3.36) e gHMBC (Figura 4.3.37) observou-se sinais de carbonos referentes a açúcares (região δ 66-76) e de carbonos referentes à região aromática (δ 110-160) (Tabela 4.3.4).

A análise do experimento de mapa de contorno gHSQC (Figura 4.3.36) evidenciou as correlações à ^1J dos respectivos hidrogênios com os carbonos, comprovando com análises com dados da literatura as posições dos deslocamentos químicos dos carbonos 1", 2" e 4" como sendo (δ 103,3; 73,7 e 69,5) respectivamente, justificando a presença de uma piranose (AGRAWAL, 1989; NONO et al., 2014).

O espectro de massas ESI-MS/MS da substância **CF6** apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z 447 (Figura 4.3.33) sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_{12}$. Fragmentação do íon m/z 447 forneceu o íon fragmento em m/z 315 sugerindo a perda de uma pentose $[\text{M} - 132 - \text{H}]^-$. A perda de uma metila foi observada mediante análise do espectro de MS^2 de m/z 447 que também forneceu o íon fragmento em m/z 301 referente à perda de além uma pentose, de uma metila $[\text{M} - 132 - 15 - \text{H}]^-$ (Figura 4.3.33). Experimentos de MS^3 do íon m/z 301 comprovou os íons fragmentos referentes ao ácido elágico, mediante a presença dos íons em m/z 257, 229 e 185 (MULLEN et al., 2003).

O espectro no UV (Figura 4.4.2) forneceu bandas em 254 nm e 365 nm.

Portanto, mediante aos dados apresentados, sugerimos para esta substância a estrutura do ácido 3-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-arabinopiranosídeo (Figura 4.3.34). Recentemente o ácido 3-*O*-metilelágico-4'-*O*- β -D-arabinopiranosídeo foi isolado das raízes de *Dissotis thollonii* Cogn. (Melastomataceae) e revelou boa atividade antioxidante (NONO et al., 2014).

Figura 4.3.33. Espectros de ESI-MS, modo negativo *full scan*, MS² e MS³ referente à *m/z* 447 (CF6).

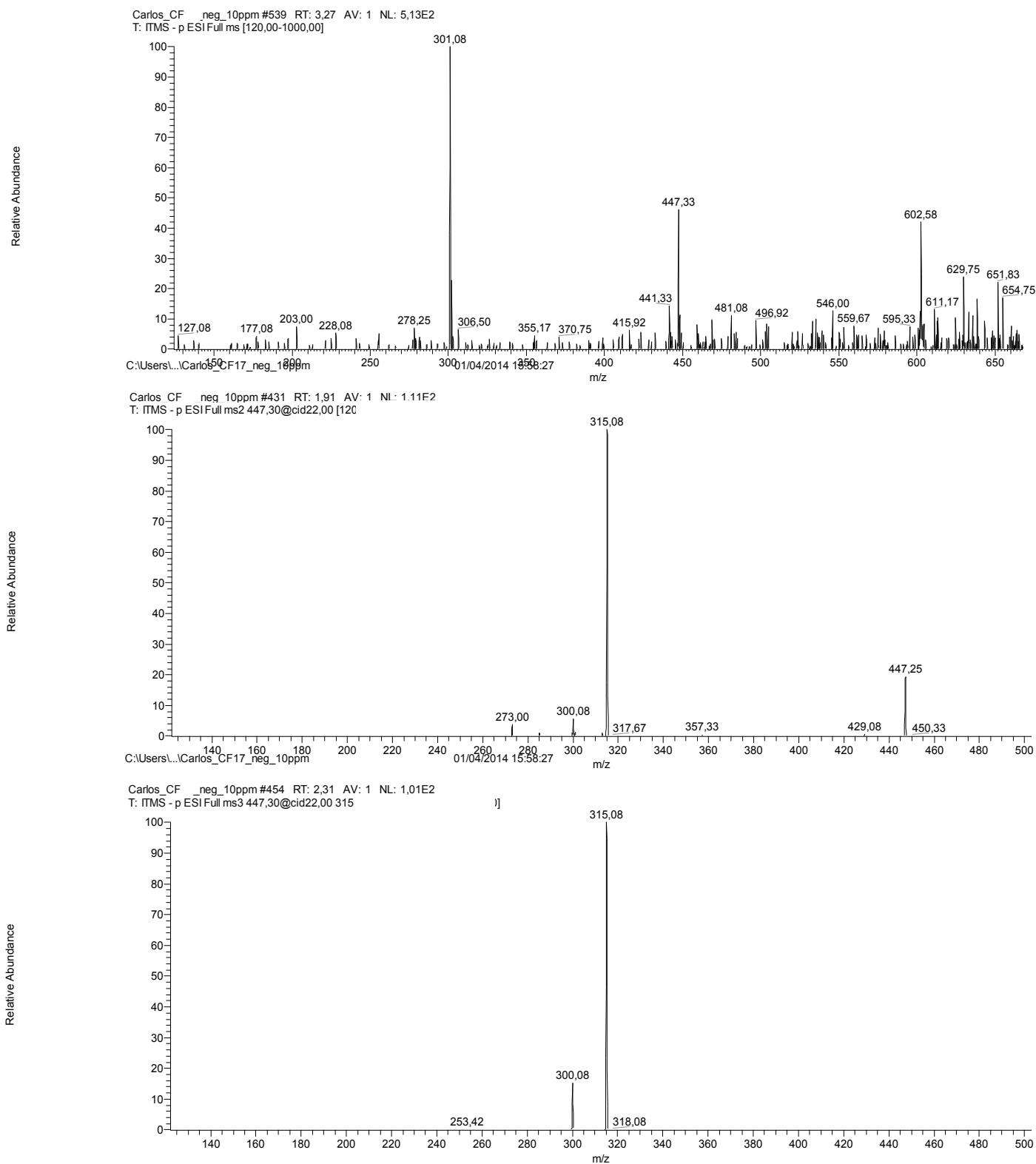


Tabela 4.3.4 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (14,1 T) da substância **CF6** (DMSO_{d6}).

<i>Posições</i>	^1H (δ , <i>J em Hz</i>)	^{13}C	<i>gHMBC</i>
1			
2			
3		140,2	
4		148,6	
5	7,46 <i>s</i>	110,6	H-5/C-3; H-5/C-4; H-5/C-6; H-5/C-7
6		112,6	
7		159,8	
1'			
2'			
3'		140,0	
4'		148,9	
5'	7,46 <i>s</i>	110,6	H-5'/C-3'; H-5'/C-4'; H-5'/C-6'; H-5'/C-7'
6'		112,6	
7'		159,3	
OCH_3	4,04 <i>s</i>	61,3	H- OCH_3 /C-3
Arabinopiranosídeo			
1''	4,98 <i>d</i> (7,8)	103,3	
2''	3,37 <i>m</i>	73,4	
3''	3,29 <i>m</i>	76,0	
4''	3,42 <i>m</i>	69,7	
5a''	3,84 <i>m</i>	66,3	
5b''	3,35 <i>m</i>		

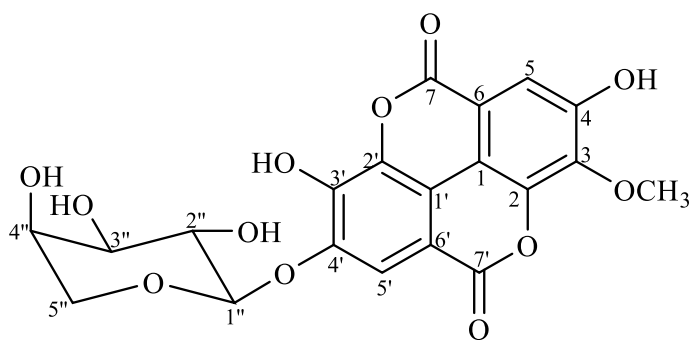
Figura 4.3.34. Substância **CF6**.

Figura 4.3.35. Espectro de RMN ^1H de CF6 (14,1,0 T, DMSO-d_6 , TMS, δ).

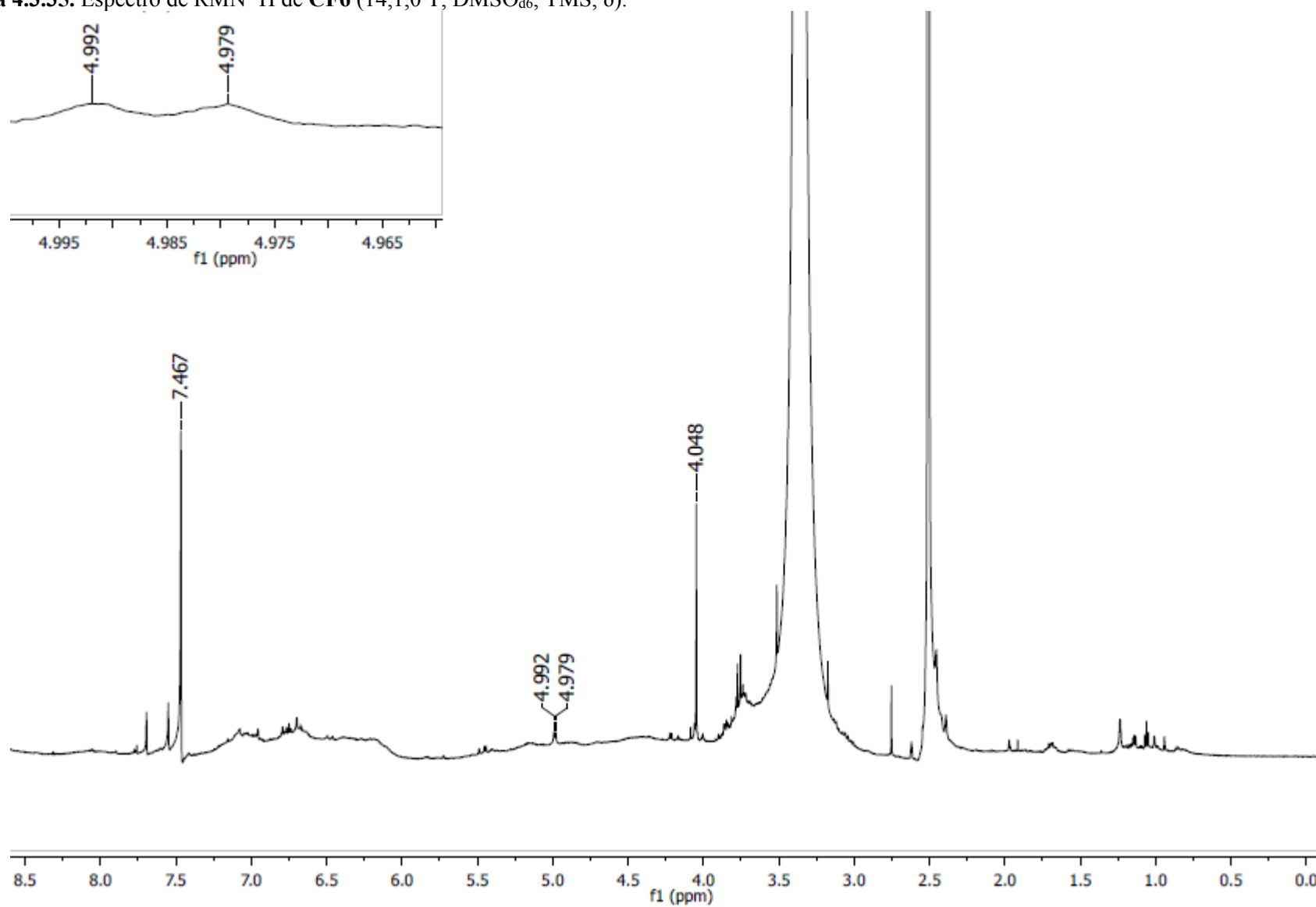


Figura 4.3.36. Espectro de gHSQC-2D de CF6 (14,1,0 T, DMSO_{d6}, TMS, δ).

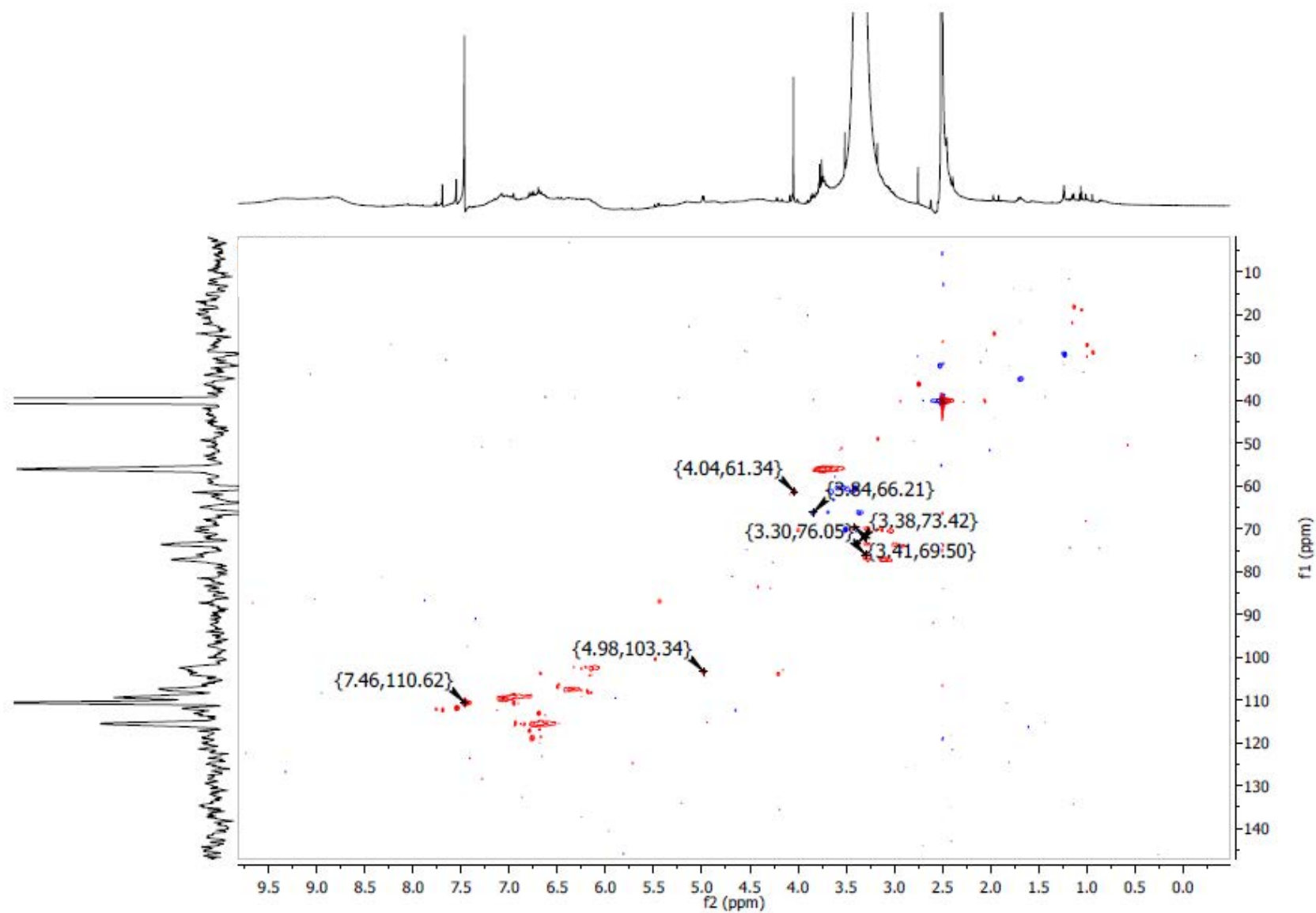


Figura 4.3.37. Espectro de gHMBC-2D de CF6 (14,1,0 T, DMSO_{d6}, TMS, δ).

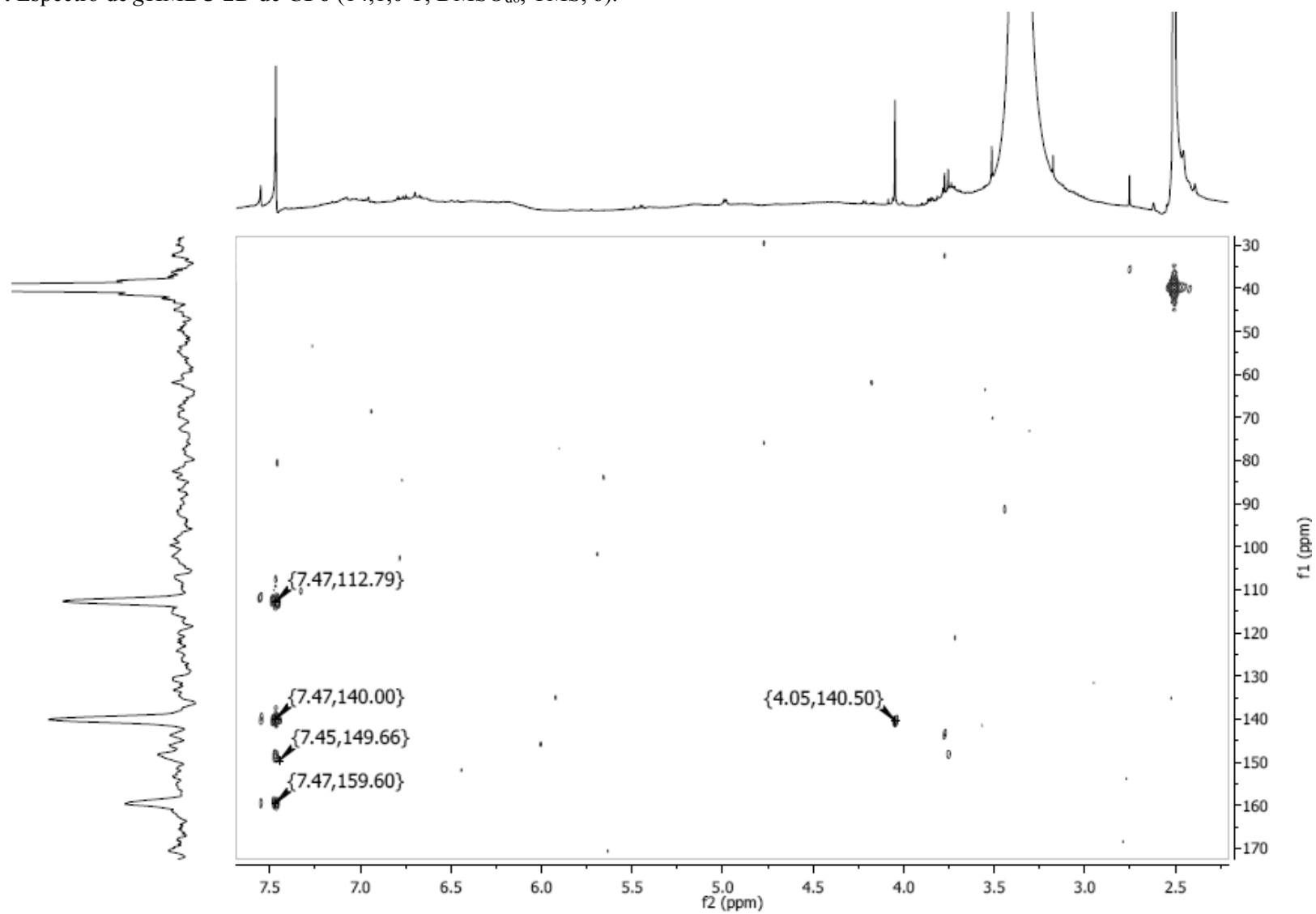
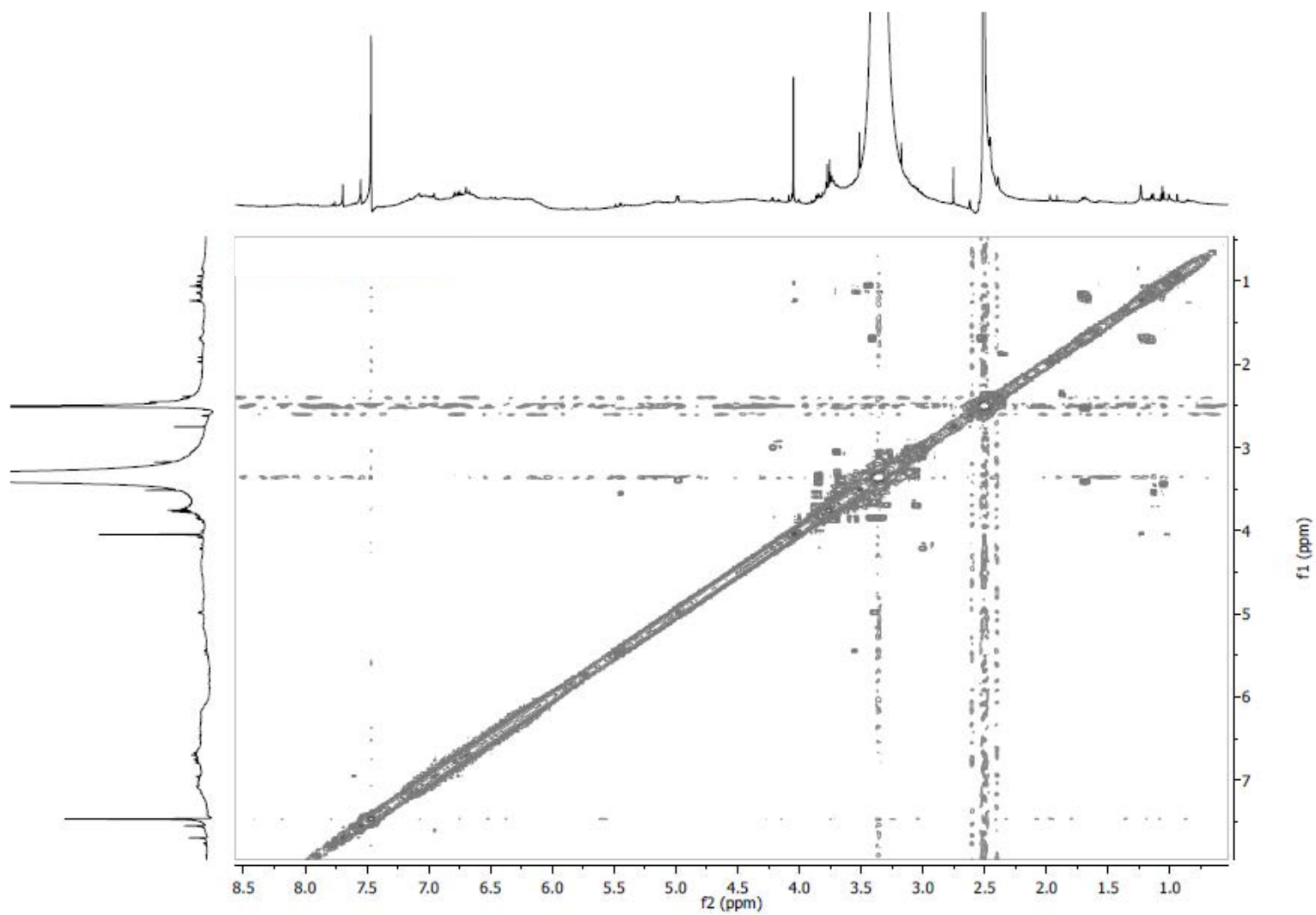


Figura 4.3.38. Espectro de gCOSY-2D de CF6 (14,1,0 T, DMSO_{d6}, TMS, δ).



4.4. Avaliação quantitativa

A padronização química de plantas medicinais envolve técnicas cromatográficas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permite análises qualitativas e quantitativas de misturas complexas com resolução e sensibilidade significativas. Quando é acoplada a esta técnica a detecção por varredura no espectro no ultravioleta, torna-se uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo simultaneamente quantificar os constituintes e identificar os principais grupos funcionais (PAIVA et al., 2002).

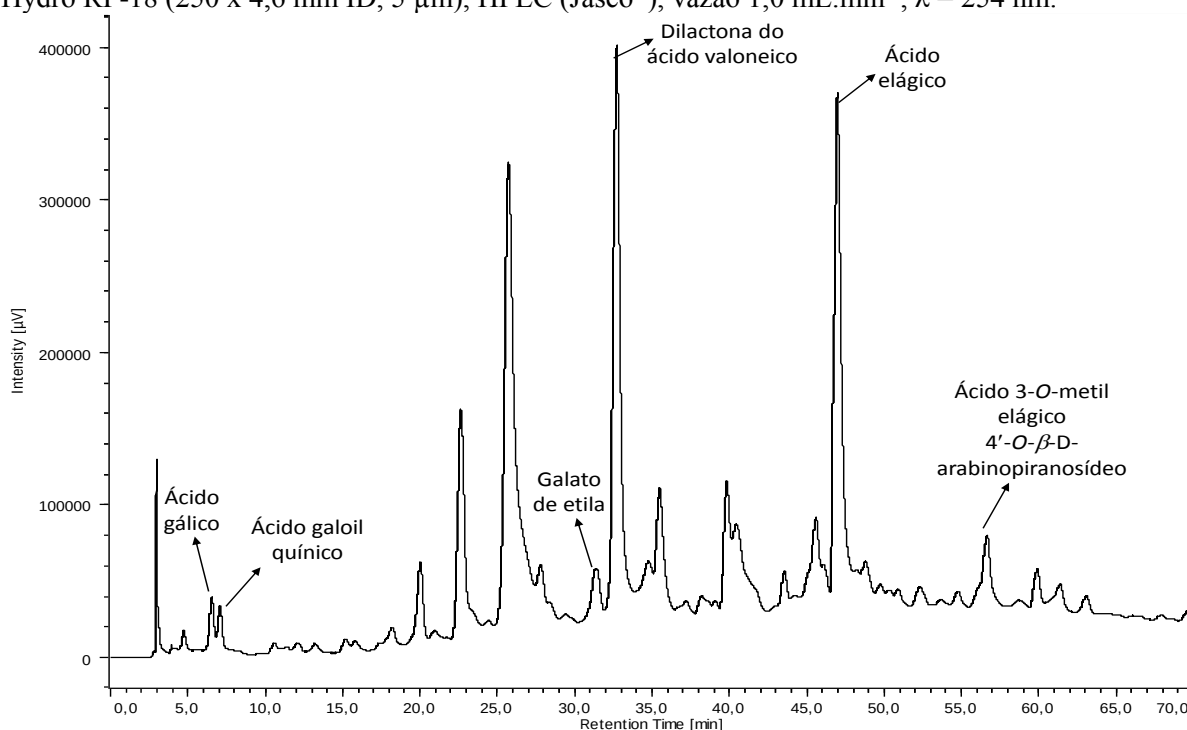
A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma ferramenta eficaz para a análise de compostos fenólicos em extratos de plantas medicinais (DOBES et al., 2013). Ela permite a sua separação, identificação e quantificação. A quantificação fornece uma indicação da variação do fenólico entre espécies diferentes (De BEER; JOUBERT, 2010), bem como avaliação consistente de substâncias em uma espécie (MONAGAS et al., 2005). Quando uma atividade biológica específica está ligada a uma concentração fixa de um composto (s) marcador, que foi comprovado representar a atividade, as quantificações destes compostos são necessárias para o controle de qualidade (NINFALI; GENNARI; BIAGIOTTI, 2009; ROSSI et al., 2012). No entanto, quando o composto marcador não pode ser estabelecido, e considerando a possibilidade de efeitos sinérgicos, a representação mais abrangente dos extratos é necessária (NINFALI; GENNARI; BIAGIOTTI, 2009).

A quantificação das substâncias em extratos de plantas pode ser feita com base na comparação de um padrão pertencente à classe do analito determinado (ROBARDS, 2003; RODRIGUES, 2007), e desta forma, os resultados são dados em termos desses padrões. Assim, as quantificações das substâncias neste trabalho foram realizadas basendo-se nas curvas analíticas dos ácidos gálico e elágico. A quantificação dos picos eluídos da amostra foi realizada de acordo com a identificação e/ou a similaridade espectral com aqueles dos padrões utilizados na calibração (Figura 4.4.1).

A caracterização química do extrato etanólico das cascas do caule *C. ferrea* foi realizada por HPLC-ESI-IT-MS (item 4.2). Porém a quantificação não foi realizada por esta técnica, pois a resolução do cromatograma apresentou baixa seletividade entre $t_r = 25$ min a 38 min (Figura 4.2.1), provavelmente devido ao elevado grau de polimerização dos constituintes do extrato etanólico, resultando em uma baixa resolução cromatográfica. Portanto, na análise por HPLC-PDA₂ (veja parte experimental item 3.6.1), um novo gradiente de eluição cromatográfico foi desenvolvido, para minimizar este efeito e melhorar a resolução de picos e, conseqüentemente, o cálculo da área dos picos.

Para melhorar a resolução cromatográfica, uma alternativa encontrada foi a substituição do solvente B, onde o metanol foi substituído por acetonitrila (Figura 4.4.1). A fase móvel foi composta por água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos contendo 0,1% de TFA. O seguinte gradiente de eluição foi aplicado: 0-15 min: 5-10% B, 15-65 min: 10-25% B, 65-70 min: 25-100% B. A taxa de vazão foi de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, e 20 mL foi injetada em cada análise. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22°C e monitorada a $\lambda = 214, 279$ e 365 nm (Figura 4.4.2).

Figura 4.4.1. Perfil cromatográfico do extrato EtOH das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea* obtido por HPLC-PDA₂. Sistema de eluição gradiente: $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ em 70 min, coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6 mm ID, 5 μm), HPLC (Jasco®), vazão $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$.



A análise do perfil no espectro no UV de cada pico do cromatograma da Figura 4.4.1. está representada no Figura 4.4.2.

As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação (r) com valores superiores a 0,99, o que indica que há uma boa correlação entre as áreas e as concentrações estudadas. Os seguintes valores de r foram obtidos: $r = 0,9999$ para o ácido gálico (curva de regressão linear: $y = 34178x - 105370$) e $r = 1,0$ para o ácido elágico (curva de regressão linear: $y = 169688x - 1.257,8$). LOD para o ácido gálico foi de $0,78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LOQ foi de $2,35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para o ácido elágico, LOD foi calculado como $0,46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LOQ foi de $2,60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabela 4.4.1).

Figura 4.4.2. Espectro de absorção no ultravioleta das substâncias quantificadas no extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*.

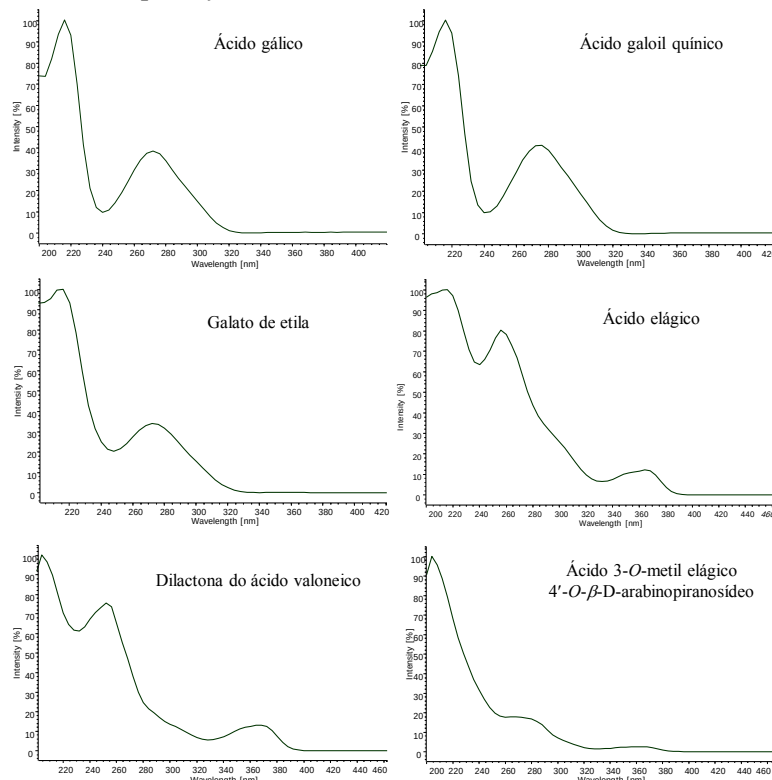
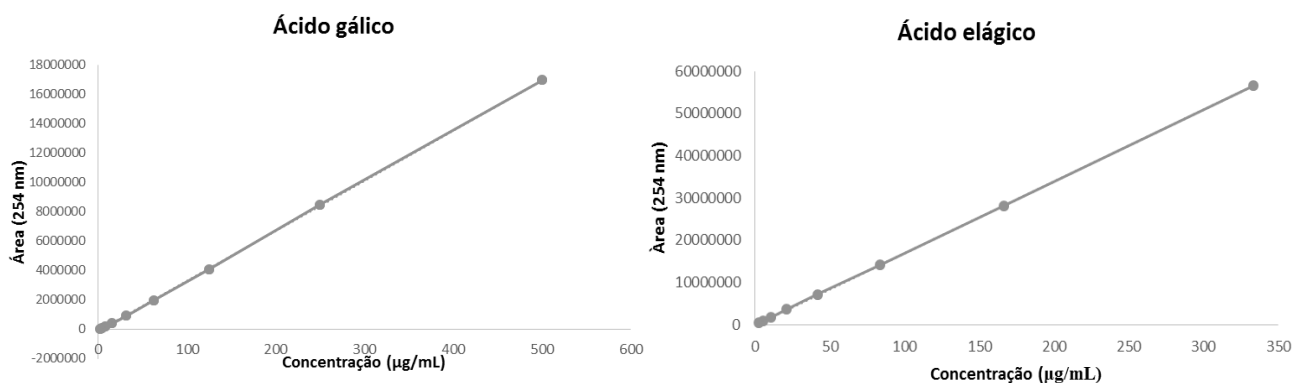


Figura 4.4.3. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões do ácido gálico e ácido elágico.



As variações intra-dia foram 0,59% para o ácido gálico e 0,76% para o ácido elágico e inter-dia variações foram 4,76% para o ácido gálico e 3,66% para o ácido elágico. Estes resultados indicam que o método teve boa reprodutibilidade e baixa variabilidade, e assim, uma boa precisão.

A exatidão do método foi avaliada de acordo com um ensaio de recuperação, que foi de 92,07 % para o ácido gálico e 81,06% para o ácido elágico (Tabela 4.4.1). A seletividade foi avaliada por comparação do tempo de retenção e espectros de UV de cada substância de

referência padrão com os picos no extrato *C. ferrea*. A resolução analítica dos picos, permitiu a quantificação no extrato.

Tabela 4.4.1. Resumo dos parâmetros de validação para o extrato etanólico da casca do caule de *Caesalpinia ferrea*.

Parâmetros	Extrato etanólico	
	Ácido gálico	Ácido elágico
Faixa linear ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,95 – 500	2,60 – 333
Equação	$y = 34178 x - 105370$	$y = 169688 x - 1257,8$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	1,0
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2,35	2,60
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,78	0,46
Exatidão (%)	$92,07 \pm 1,90$	$81,06 \pm 5,68$
Precisão inter-dia (%RSD)	4,76	3,66
Precisão intra-dia (%RSD)	0,59	0,76
Seletividade	Seletivo	Seletivo

RSD (%) = RSD: Desvio padrão relativo ($100 \times \text{D.P.}/\text{média}$).

Os resultados apresentados na Tabela 4.4.2 estão de acordo com os parâmetros de quantificação avaliados para o método. Para as seis substâncias quantificadas, as concentrações foram mais elevadas do que o LOQ e estão dentro dos limites de suas respectivas curvas analíticas. Portanto, os resultados mostram que o método é satisfatório para a determinação dos derivados de ácidos gálico e elágico identificados em *C. ferrea*.

Pela análise por HPLC-MS tornou-se evidente que os constituintes majoritários do extrato etanólico de *C. ferrea* são ácidos fenólicos e derivados. Alguns derivados do ácido gálico e outros derivados do ácido elágico. O espectro UV dos padrões são praticamente sobreponíveis com os das substâncias analisadas no comprimento de onda monitorados (Figura 4.4.2). Sendo assim, baseando-se na área dos picos cromatográficos das substâncias presentes no extrato, foram estimadas as concentrações de seis substâncias derivadas do ácido gálico e elágico e os resultados da análise quantitativa estão apresentados na Tabela 4.4.2.

A dilactona do ácido valoneico não foi isolada, porém foi identificada no experimento HPLC-ESI-IT-MS (item 4.2). Neste experimento quatro substâncias apresentaram absorção máxima no UV em 254 e 365 nm. Entretanto a dilactona do ácido valoneico apresentou t_r menor e encontra-se bem separada das demais substâncias, que incluem o ácido elágico e seus outros dois derivados. Assim, não causando dúvida quanto a sua identificação no cromatograma, podendo esta ser quantificada (Figura 4.4.1).

Tabela 4.4.2. Estimativa da concentração dos derivados de ácidos fenólicos no extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea* calculados com os dados de regressão linear e expressa pelos padrões do ácido gálico (AG) e ácido elágico (AE).

Substância	Concentração $\pm$ SD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração $\pm$ SD ($\mu\text{g.mg}^{-1}$)	Padrão
Ácido gálico	$17,68 \pm 0,10$	$1,77 \pm 0,01$	AG
Ácido galoil quínico	$13,26 \pm 0,28$	$1,33 \pm 0,03$	AG
Galato de etila	$28,26 \pm 0,81$	$2,83 \pm 0,08$	AG
Dilactona do ácido valoneico	$63,00 \pm 0,93$	$6,30 \pm 0,09$	AE
Ácido elágico	$57,64 \pm 1,22$	$5,76 \pm 0,12$	AE
Ácido 3-O-metil elágico 4'-O- β -D-arabinopiranosídeo	$4,98 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,01$	AE

A determinação da concentração de seis substâncias foi realizada diretamente no extrato etanólico de *C. ferrea*. Desta maneira tentou-se chegar a resultados mais representativos com relação a real composição de metabólitos secundários e assim evitar possíveis erros sistemáticos. A concentração individual do pico cromatográfico foi estabelecida a partir da curva analítica obtida dos padrões de ácido gálico e do ácido elágico. Com o auxílio de detector PDA o pico cromatográfico encontrado no extrato teve seu espectro UV e tempo de retenção comparados (Figura 4.4.1). As concentrações de ácido elágico ($57.64 \pm 1.22 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a dilactona do ácido valoneico ($63.00 \pm 0,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram bem maiores que as demais substâncias quantificadas no extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. Este resultado mostra que o ácido elágico e a dilactona do ácido valoneico apresentam uma participação considerável na composição química do extrato.

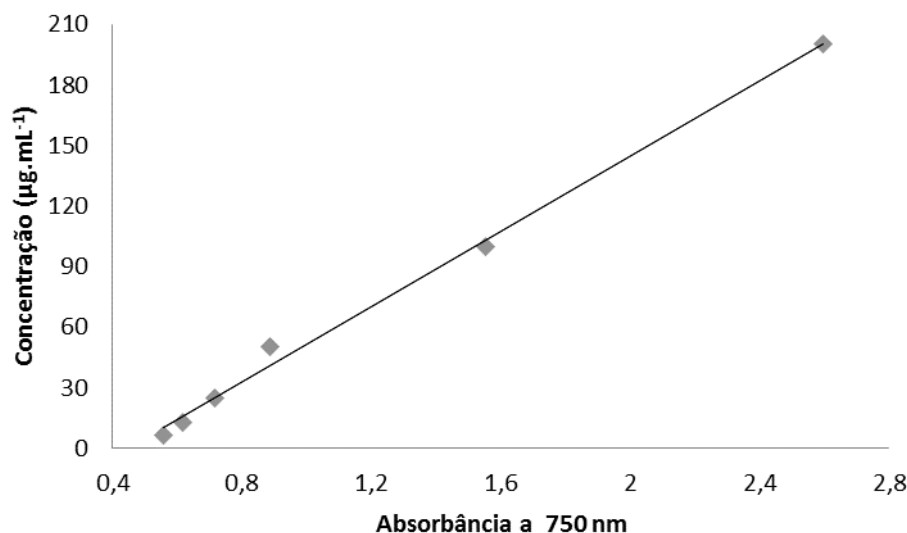
4.5. Ensaios Químicos e biológicos

4.5.1. Fenóis Totais

O princípio do procedimento da avaliação dos fenóis totais é a reação entre o reagente de *Folin-Ciocalteu* e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul (LENORE et al., 2005). Na primeira etapa de reação, ocorre desprotonação dos compostos fenólicos (por exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos. 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, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras da curva analítica construída com o padrão de ácido gálico ($7,81$ a $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A curva analítica foi construída a partir dos valores de absorbância a 750 nm e tendo como “branco” o metanol. A equação da curva analítica do ácido gálico foi $C = 93,118A - 41,834$, onde C é a concentração do ácido gálico e A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9956$ (Figura 4.5.1).

Figura 4.5.1. Curva analítica de fenóis totais a 750 nm . Padrão – Ácido Gálico.



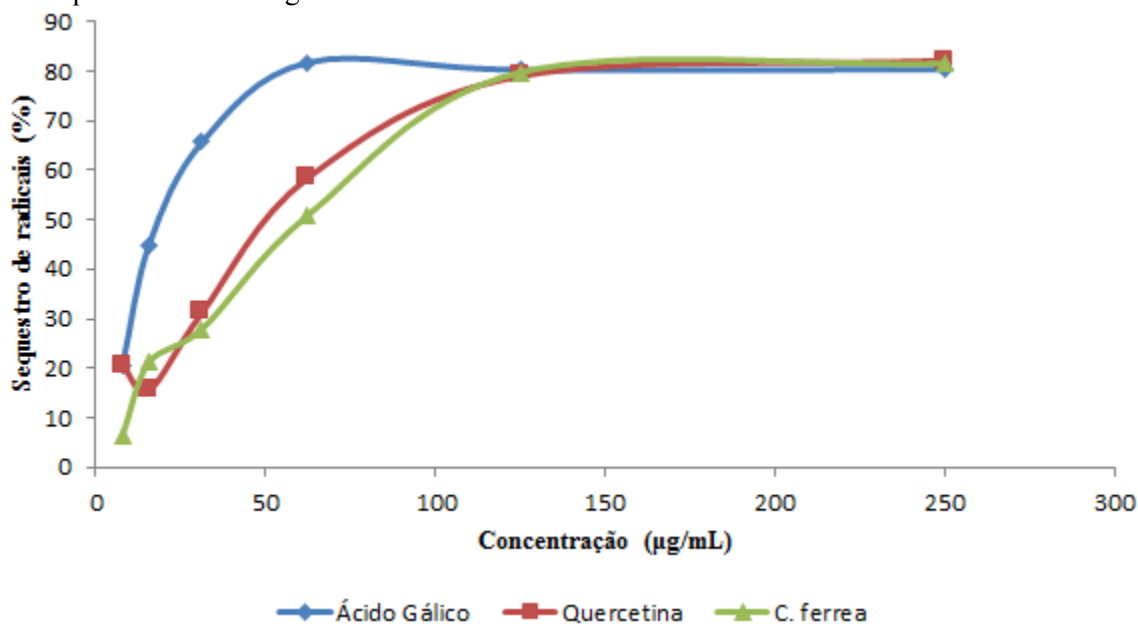
O resultado obtido do teor de fenóis totais foi de $480,00 \text{ mg EAG}$ para cada g do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. O extrato avaliado apresentou altos teores de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies descritos na literatura (ROBY et al., 2013).

4.5.2. Avaliação do Potencial Antirradicalar

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. O DPPH apresenta coloração violeta, tendo absorção em 517 nm e, quando reduzido, torna-se amarelo. Esta redução ocorre quando existem substâncias que podem ceder uma espécie radicalar (hidrogênio radicalar) ao DPPH dando origem a outro radical estável, a qual está associada à propriedade antirradicalar (HOSTETTSMANN; QUEIROS; VIEIRA, 2003).

Os resultados da atividade antirradicalar do extrato etanólico de *C. ferrea* e dos padrões ácido gálico e quercetina, obtidos com o ensaio antirradicalar por DPPH, estão reunidos na Figura 4.5.2.

Figura 4.5.2. Porcentagem de inibição de DPPH do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* e dos padrões quercetina e ácido gálico.



A quantidade de extrato necessário para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, CE_{50} , revelou valores de $CE_{50} = 55,43 \pm 0,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico e $CE_{50} = 48,80 \pm 0,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $CE_{50} = 21,80 \pm 1,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para padrões de quercetina e ácido gálico, respectivamente. Foi observado que o extrato, teve praticamente o mesmo potencial antirradicalar do padrão da quercetina.

As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos, deve-se, principalmente, as suas propriedades redutoras. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição,

agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Portanto, o efeito antirradicalar do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* deve-se, possivelmente ao grande conteúdo de fenóis totais, pois normalmente a atividade antirradicalar esta correlacionada com a presença de fenóis (SOUSA et al., 2007). De modo geral, os polifenóis e em particular os taninos possuem estrutura para o seqüestro de radicais indicando capacidade antioxidante (PESSUTO et al., 2009). Frutas e extratos de plantas ricas em ácido elágico, ácido gálico e taninos hidrolisáveis são relatadas na literatura por exercerem fortes efeitos antioxidantes (SERRANO et al., 2009; BASU; PENUGONDA, 2009).

4.5.3. Avaliação da Mutagenicidade

Atualmente, a mutagenicidade pode ser avaliada por diversas técnicas, entre elas, o Teste de Ames. Este teste, é uma das técnicas mais aceitas pelos órgãos regulamentadores para avaliar a atividade mutagênica. Trata-se um teste *in vitro* de “screening” capaz de identificar substâncias que causam mutações gênicas através do uso de cepas de *Salmonella typhimurium* geneticamente modificadas (ANVISA, 2009). As cepas mais comuns testadas são *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA102. As cepas TA97 e TA98 são usadas para detectar mutações do tipo *frameshift* e TA100 e TA102 para detectar agentes mutagênicos que causam substituições de pares de base no DNA (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Os resultados realizados com Teste de Ames com o extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* estão resumidos na Tabela 4.5.1, na presença e na ausência de ativação microsomal. As respostas são expressas como revertentes/placa e o índice mutagênico (entre parênteses) e é baseado nos valores observados no solvente controle. O extrato etanólico revelou ausência de mutagenicidade para todas as linhagens testadas (< 2).

Análise da mutagenicidade (linhagem TA98) do ácido gálico, ácido quínico e do ácido digaloilquínico isolados de *Byrsonima fagifolia*, evidenciaram que o ácido gálico não apresentou efeito mutagênico nas concentrações testadas, que variaram de 0,08 a 1,20 mg/placa. Na maior concentração, apresentou o índice de mutagenicidade 1,8 (sem metabolização). O ácido quínico e o derivado galoilquínico foram testados em concentrações que variaram entre 0,25 e 1,0 mg/placa. A atividade mutagênica foi negativa, exceto para a maior concentração de ácido quínico (1,0 mg/placa), na qual foi observado o indício de mutagenicidade (IM = 1,7) (CARDOSO, 2009). Outros estudos demonstraram que o ácido

gálico não é mutagênico em baixas concentrações (CHEN; CHUNG, 2000; ALVES et al., 2007).

Estudos do potencial mutagênico do ácido elágico, substância presente em *C. ferrea*, demonstraram que esta substância é antimutagênica (TAKAGI et al., 1995; CHEN; CHUNG, 2000; SZAEFER et al., 2003).

Em relação a mutagenicidade dos taninos há vários estudos na literatura que revelam suas propriedades antimutagênicas (KITO et al., 1995; KAUR et al., 1998, DEGUCHI et al., 2000).

A mutagenicidade pode levar a alterações genéticas graves e estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, tais como câncer e arteriosclerose (SEO; JELINSK; LOECHLER, 2000).

Muitos compostos que fazem parte da composição química das plantas utilizadas como medicinais, podem ser mutagênicos e até carcinogênicos, quando ingeridos de forma indiscriminada. Equivocadamente a cultura popular acredita que fazer o uso exagerado de determinada planta não causa mal algum, pelo simples fato deste ser de origem natural. Estudos de toxicidade com plantas medicinais também são pouco realizados, principalmente, avaliando sua ação em nível celular (PERON et al., 2008).

Medicamentos obtidos de plantas são baseados na premissa de que contêm substâncias que podem promover a saúde e aliviar as doenças. Dessa forma, conhecer o poder de cura dos extratos das plantas e das substâncias isoladas das espécies vegetais é uma exigência absoluta (KAUR et al., 2005). Na literatura encontramos a descrição de muitas espécies vegetais com agentes mutagênicos na sua constituição (SANTOS et al., 2008; CARDOSO et al., 2006; BISO et al., 2010).

Plantas medicinais têm contribuído para a saúde mundial da população, por este motivo, é importante avaliar sua segurança, analisando o potencial mutagênico dos seus compostos constituintes a curto e longo prazo. Testes de curto prazo que detectam danos genéticos têm fornecido informações que permitem a avaliação do risco carcinogênico dos vários produtos químicos para os seres humanos. O ensaio de Ames é recomendado para testar a mutagenicidade dos compostos químicos com potencial aplicação farmacológica (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

No Brasil, um grande número de extratos de plantas é utilizado na medicina popular para tratar vários tipos de doenças e *C. ferrea* é uma espécie medicinal com o uso extensivo. No presente estudo, os ensaios de atividade mutagênica com *Salmonella* demonstraram que o extrato etanólico de *C. ferrea* não é mutagênico. Esta análise é um passo positivo para comprovar o uso seguro da planta. A ausência de mutagenicidade pode ser justificada pela

presença majoritária de derivados do ácido gálico e ácido elágico, pois ambos são antimutagênicos (SZAEFER et al., 2003; CARDOSO, 2009).

Tabela 4.5.1. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) em TA98, TA100, TA102 e TA97 de *Salmonella typhimurium* tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*, com (+ S9) e sem (- S9) de ativação metabólica.

Tratamentos		Numero de revertentes (M ± SD) / placa e IM							
C. ferrea	mg/placa	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
	0.00 ^a	57 ± 3	39 ± 5	128 ± 39	104 ± 3	401 ± 27	369 ± 33	75 ± 5	110 ± 14
	0.26	68 ± 12 (1,2)	40 ± 3 (1,0)	130 ± 18 (1,0)	121 ± 8 (1,2)	434 ± 37 (1,1)	414 ± 6 (1,1)	109 ± 8 (1,5)	145 ± 9 (1,3)
	0.52	70 ± 7 (1,2)	38 ± 1 (1,0)	135 ± 2 (1,1)	116 ± 1 (1,1)	425 ± 42 (1,1)	414 ± 15 (1,1)	84 ± 18 (1,1)	166 ± 5 (1,5)
	1.04	65 ± 7 (1,1)	38 ± 6 (1,0)	159 ± 8 (1,2)	121 ± 13 (1,2)	394 ± 16 (1,0)	409 ± 17 (1,1)	93 ± 10 (1,2)	151 ± 7 (1,4)
	1.56	66 ± 14 (1,2)	38 ± 4 (1,0)	142 ± 13 (1,1)	118 ± 10 (1,1)	393 ± 20 (1,0)	407 ± 17 (1,1)	91 ± 9 (1,2)	165 ± 10 (1,5)
	2.08	61 ± 5 (1,1)	37 ± 3 (1,0)	152 ± 11 (1,2)	102 ± 2 (1,0)	392 ± 21 (1,0)	403 ± 8 (1,0)	81 ± 9 (1,1)	164 ± 29 (1,5)
	Controle Positivo	797 ± 79 ^b	2204 ± 255 ^c	1193 ± 39 ^c	1229 ± 94 ^c	1192 ± 49 ^d	1804 ± 43 ^c	716 ± 74 ^b	2636 ± 132 ^c

M±SD = média±desvio padrão do derivação do número de revertentes/placa. Control negativo: ^a Dimetil sulfoxido (100 µL/placa). Controles positive: ^b 4-nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/placa); ^c azida de sódio (2.5 µg/placa); ^d mitomicina (3 µg/placa), sem S9 e ^e 2-antramina (0.125 µg/placa) com S9.

5. Conclusões

A partir do perfil químico por HPLC-PDA, pode-se inferir, qualitativamente, que o extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* possui majoritariamente ácidos fenólicos, ácido elágico e seus derivados.

As análises por HPLC-ESI-IT-MS e o estudo dos padrões de fragmentações por FIA-ESI-IT-MSⁿ confirmaram o perfil do extrato etanólico, onde foram identificadas vinte substâncias (ácido gálico e derivados, ácido elágico e derivados, galotaninos, elagitaninos, catequina e uma procianidina).

O fracionamento por CCC (sílica gel e sephadex LH-20) e MPLC do extrato etanólico e posterior fracionamento por HPLC-PDA semipreparativo, forneceram seis substâncias isoladas (diisobutil ftalato, α -D-glicopiranosídeo-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-frutofuranosil, ácido gálico, ácido-3-O-galoil quínico, ácido-5-O-galoil quínico e 3-O-metilelágico-4'-O- β -D-arabinopiranosídeo) que foram identificados por UV, espectrometria de massas e RMN mono e bi-dimensionais. Com excessão do ácido gálico e do açúcar, esta é a primeira vez que são relatadas na literatura a presença das outras quatro substâncias para esta espécie.

O método analítico desenvolvido utilizando a técnica HPLC-PDA mostrou-se reprodutivo na análise do extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea*. Este mesmo método revelou-se eficiente, uma vez que permitiu, com precisão, a análise e quantificação de seis substâncias (ácido gálico, ácido galoil quínico, galato de etila, dilactona do ácido valoneico, ácido elágico e 3-O-metilelágico-4'-O- β -D-arabinopiranosídeo) no extrato. A avaliação quantitativa indicou que o ácido elágico ($57,64 \pm 1,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a dilactona do ácido valoneico ($63,00 \pm 0,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$) são as substâncias majoritárias na composição química do extrato.

O teor de fenóis totais (EAG) foi de 480,00 mg por g de extrato. Assim, constatamos que o extrato etanólico apresenta altos teores de fenóis totais.

O ensaio antirradicalar por DPPH evidenciou que o extrato etanólico das cascas do caule de *C. ferrea* ($\text{CE}_{50} = 55,43 \pm 0,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$) possui uma excelente atividade, muito próxima do padrão quercetina ($\text{CE}_{50} = 48,80 \pm 0,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e inferior ao ácido gálico ($\text{CE}_{50} = 21,80 \pm 1,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o que em tese justifica seu uso popular como antioxidante.

O alto teor de fenóis e a excelente atividade antirradicalar pode ser explicada pela grande quantidade de compostos fenólicos que foram identificados no extrato.

E finalmente, o extrato etanólico não apresentou mutagenicidade pelo ensaio de Ames para nenhuma linhagem de *Salmonella thypimurium* testadas.

A espécie *C. ferrea* é amplamente utilizada como planta medicinal pela população no Brasil e a ausência de mutagenicidade é importante para o sistema tradicional da medicina que suporta um crescente interesse na avaliação farmacológica de espécies vegetais. Esta análise também é um passo positivo para comprovar o uso seguro da planta.

Portanto, este trabalho representa uma importante contribuição para o conhecimento do perfil químico e farmacológico do extrato etanólico das cascas desta espécie possibilitando complementar, correlacionar e corroborar com alguns dados já existentes na literatura.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 12 abr. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Cartilha de proteção respiratória contra agentes biológicos para trabalhadores da saúde**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/48b0da00474588939240d63fbc4c6735/tecnovigilancia_cartilha_protecao_respiratoria.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 17 jun. 2014.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- AHMAD, V. U.; ALI, M. S.; USMANGHANI, K. Bondenolide, a new diterpenoid from the seeds of *Caesalpinia bonducella*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 52, n. 3, p. 410-412, 1997.
- ALVES, C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.
- ANDREO, M. A. **Estudo químico-farmacológico de *Ananas ananassoides* Baker L. B. Smith (Bromeliaceae) e *Mouriri pusa* Gard (Melastomataceae)**. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- ANDREO, M. A. **Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: estudo químico e atividade sobre o sistema gastrointestinal de *Mouriri pusa* Gardner e *Mouriri elliptica* Martius (Melastomataceae)**. 2008. 265 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- ATKINSON, C. J. et al. Effects of cultivar, fruit number and reflected photosynthetically active radiation on Frágaria x ananassa productivity and fruit ellagic acid and ascorbic acid concentration. **Annals of Botany**, v. 97, p. 429-441, 2006.
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 118-120, 1994.
- BACCHI, E. M. et al. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* e *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.
- BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1402-1405, 2005.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 91-203, 2006.

BARAKAT, H. H. et al. Polyphenolic metabolites of *Epilobium hirsutum*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 935-941, 1997.

BARCH, D. H. et al. Dietary ellagic acid inhibits the enzymatic activity of CYP1A1 without altering hepatic concentrations of CYP1A1 or CYP1A1 mRNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 3, p. 1477-1482, 1994.

BARIANI, A. et al. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 131-138, 2012.

BASU, A.; PENUGONDA, K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. 49-56, 2009.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.

BHADORIYA, U.; SHARMA, P.; SOLANKI, S. S. *In vitro* free radical scavenging activity of gallic acid isolated from *Caesalpinia Decapetala* wood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S833-S836, 2012.

BISKY, F. A.; BUOKINGHAM, J.; HARBONE, J. B. **Phytochemistry dictionary of the Leguminosae**. London: Chapman & Hall, 1994. 1180 p.

BISO, I. et al. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). **Mutation Research**, v. 702, p. 92-99, 2010.

BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Ed. UFF, 1996. 300 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **MS elabora relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2014.

BRUNEAU, A. et al. Phylogenetic relationships in the *Caesalpinioideae* (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. **Systematic Botany**, v. 26, p. 487-514, 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 131-134, 2005.

CARDOSO, C. R. P. **Avaliação do potencial biológico de plantas pertencentes ao cerrado brasileiro e seus compostos de interesse farmacológico**. 2009. 161 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

CARDOSO, C. R. P. et al. Evaluation of the mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55-63, 2006.

CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: EMPRAPA. Disponível em: <http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm>. Acesso em: 14 jun. 2014.

CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. 263 p.

CAVALHEIRO, M. G. et al. Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 586-591, 2009.

CHAKRABARTI, S. et al. Advanced studies on the hypoglycemic effect of *Caesalpinia bonducella* F. in type 1 and 2 diabetes in Long Evans rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 2003.

CHE, C. T. et al. Pulcherralpin, a new diterpene ester from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 561-569, 1986.

CHEN, S. C.; CHUNG, K. T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 1-5, 2000.

CHUA, L. S. et al. Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah). **Food Chemistry**, v. 127, p. 1186-1192, 2011.

CLIFFORD, M. N.; STOUPI, S.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the galloylquinic acids of green tea, tara tannin, and tannic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2797-2807, 2007.

COELHO, R. G. **Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae)**. 2004. 181 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v. 6. 747 p.

COSTA, L. M. et al. Influência de fatores edafoclimáticos sobre parâmetros de controle de qualidade da casca do caule de *Caesalpinia ferrea* (Martius) var. *ferrea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 51., 2011, São Luis. **Resumos...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, 2011.

DE BEER, D.; JOUBERT, E. Development of HPLC method for *Cyclopia subternata* phenolic compound analysis and application to other *Cyclopia* spp. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 289-297, 2010.

DE LUCCA, M.; ZALLES, J. **Flora medicinal boliviana: dicionário enciclopédico**. La Paz: Amigos del Libro, 1992. 498 p.

DEGUCHI, T. et al. Antimutagenicity of the purple pigment, hordeumin, from uncooked barley bran-fermented broth. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 414-416, 2000.

DHOOGHE, L. et al. The quantification of ellagic acid in the crude extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 361-366, 2011.

DOBES, J. et al. Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants. A review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 4520-4542, 2013.

FALCÃO, H. S. et al. Plants of the American continent with antiulcer activity. **Phytomedicine**, v. 15, p. 132-146, 2008.

FERREIRA, M. C. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 159-175, 2009.

FERREIRA, T. L. **Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 127, p. 807-821, 2011.

FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, p. 578-588, 2013.

FRAISSE, D. et al. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 463-464, 2000.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2003.

FREITAS, A. C. C. et al. Biological activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) LP queiroz pod preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. DOI: 10.1155/2012/514134.

GALLÃO, M. I. et al. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 58- 62, 2013.

GARRO GALVES, J. M.; RIEDL, B.; CONNER, A. H. Analytical studies on tara tannins. **Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**, v. 51, n. 3, p. 235-243, 1997.

GEHRKE, I. T. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

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, 2010.

GOMES, E. C. B. S. et al. Evaluation of antioxidant and antiangiogenic properties of *Caesalpinia echinata* extracts. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 2, p. 143-150, 2014.

GONZALEZ, F. G. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GRANGEIRO, A. R. S. **Avaliação biológica do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.** 2009. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

GU, L. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003.

GUIMARÃES, R. et al. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3721-3730, 2013.

GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. 2, p. 177-184, 2004.

HÄKKINEN, S. H.; TÖRRÖNEN, A. R. Content of flavonols and selected phenolics acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Research International**, v. 33, p. 517-524, 2000.

HÄKKINEN, S. et al. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Research International**, v. 32, p. 345-353, 1999.

HAMED, A. I. et al. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun*—an ancient Egyptian palm) by LC–ESI–MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, p. 306-315, 2014.

HANHINEVA, K. et al. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Frágaria x ananassa*) flowers. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2463-2481, 2008.

HEBBAR, S. S. et al. Ethnomedicine of Dharwad district in Karnataka, India-plants used in oral health care. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 261-266, 2004.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406-409, 2009.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROS, F. E.; VIEIRA, C. P. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003. 152 p.

HUKLA, S. et al. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 61-64, 2010.

JIANG, R. W. et al. New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1266-1272, 2001.

JIAO, J. et al. Comparison of main bioactive compounds in tea infusions with different seasonal *Forsythia suspensa* leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and evaluation of antioxidant activity. **Food Research International**, v. 53, p. 857-863, 2013.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464 p.

KANNUR, D. M.; HUKKERI, V. I.; AKKI, K. S. Antidiabetic activity of *Caesalpinia bonducella* seed extracts in rats. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7, p. 546-549, 2006.

KAUR, S. et al. Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from *Terminalia chebula* in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 419, n. 1, p. 169-179, 1998.

KAUR, S. et al. The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 15-20, 2005.

KHANDUJA, K. L. et al. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 313-318, 1999.

KHATIWORA, E. et al. Isolation and characterization of dibutyl phthalate from *Ipomoea carnea* stem and its quantification by HPTLC. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 3264-3265, 2011.

KHATIWORA, E. et al. Isolation and characterization of substituted dibutyl phthalate from *Ipomoea carnea* stem. **Der Pharma Chemica**, v. 5, n. 5, p. 5-10, 2013.

KIEM, P. V. et al. Cesaidecan, cassane diterpenoid from the leaves of *Caesalpinia decapetala*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 4, p. 428-430, 2005.

KIM, D. S.; BAEK, N. I.; OH, S. R. NMR assignment of Brasilein. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 177-178, 1997.

KIM, J. P. et al. Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 587-591, 2001.

KIM, J. Y. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, 2007.

- KIM, M. et al. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 8, p. 1299-1307, 2006.
- KINOSHITA, T.; KANEKO, M.; NOGUCHI, H. New cassane diterpene from *Caesalpinia bonducella* (Fabaceae). **Heterocycles**, v. 43, n. 2, p. 409-414, 1996.
- KITAGAWA, I. et al. Indonesian medicinal plants. XI. Chemical structures of caesaldekarins A and B, two new cassane-type furanoditerpenes from the roots of *Caesalpinia major* (Fabaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 9, p. 1798-1802, 1994.
- KITO, H. et al. The effect of bio-antimutagens on chlorambucil and methotrexate using the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. **Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 41, n. 6, p. 452-457, 1995.
- KOULMAN, A. et al. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 421-428, 2007.
- LEE, J. H.; JOHNSON, J. V.; TALCOTT, S. T. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6003-6010, 2005.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publishers, 2006.
- LENORE, S. et al. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- LEWIS, G. P. **Caesalpinia**: a revision of the *Poincianella* -*Erythrostemon* group. London: Royal Botanic Gardens, 1998. 233 p.
- LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. London: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.
- LIMA, S. M. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.
- LINN, T. Z. et al. Cassane and norcassane type diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their antimalarial activity against the growth of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 706-710, 2005.
- LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Platarum, 2002. 368 p.
- MACHADO, M. M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia Tirucalli***. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

- MAHATO, S. B.; SAHU, N. P.; LUGER, P. Structure of caesalpinine-A a novel spermidine alkaloid from *Caesalpinia digyna* Rottl. **Journal American Chemical Society**, v. 105, n. 13, p. 4441-4445, 1983.
- MANAYI, A. et al. A comparative study of anti-candida activity and phenolic contents of the calluses from *Lythrum salicaria* L. in different treatments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 176-184, 2013.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MARTINS, A. F. et al. Caracterização dos produtos líquidos do carvão da pirólise de serragem de eucalipto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 873-878, 2007.
- McPHERSON, D. D. et al. Peltogynoids and homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 12, p. 2835-2838, 1983.
- MENA, P. et al. Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSⁿ. **Molecules**, v. 17, p. 14821-14840, 2012.
- MENDES, C. C. et al. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 205-207, 2000.
- MENDES, L. et al. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2285-2291, 2011.
- MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p. 41-47, 2007.
- MININEL, F. J. et al. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014. DOI: 10.1155/2014/676902.
- MONAGAS, M. et al. Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. **Nutrition and Cancer**, v. 53, p. 244-254, 2005.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.
- MOURA, A. C. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* linn. (fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.
- MULLEN, W. et al. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. **Phytochemistry**, v. 64, p. 617-624, 2003.

NAKAMURA, E. S. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119-124, 2002.

NAMIKOSHI, M.; NAKATA, H.; NUNO, M. Homoisoflavonoids and related-compounds. Constituents of *Caesalpinia japonica* Sieb et zucc. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 9, p. 3568-3575, 1987.

NAMIKOSHI, M.; NAKATA, H.; SAITOH, T. Homoisoflavonoids and related-compounds. Homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1831-1933, 1987.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B. et al. Potencial forrageiro do pau-ferro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2002. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/65449/potencial-forrageiro-do-pau-ferro>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

NINFALI, P.; GENNARI, L.; BIAGIOTTI, E. Improvement in botanical standardization of commercial freeze-dried herbal extracts by using the combination of antioxidant capacity and constituent marker concentrations. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 797-805, 2009.

NISHIMURA, H.; NONAKA G. I.; NISHIOKA, I. Seven quinic acid gallates from *Quercus stenophylla*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2621-2623, 1984.

NONO, R. N. et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities and phytoconstituents of extracts from the roots of *Dissotis thollonii* Cogn. (Melastomataceae). **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 19-26, 2014.

NOVY, J. W. Medicinal plants of the eastern region of Madagascar. **Journal Ethnopharmacology**, v. 55, n. 2, p. 119-126, 1997.

NOZAKI, H. et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8290-8292, 2007.

NUENGCHAMNONG, N.; BOONPATHANASAK, S.; TEPWITUKKIJ, P. Rapid screening of antioxidant compounds in homemade fruit fermented juice using an on line LC-ESI-MS/MS and DPPH assay. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, n. 3, p. 430-438, 2011.

NWIDU, L. L. et al. Anti-nociceptive effects of *Carpolobia lutea* G. Don (Polygalaceae) leaf fractions in animal models. **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 215-225, 2011.

OGAWA, K.; AOKI, I.; SASHIDA, Y. Caesalpin, a cassane diterpenoid from *Caesalpinia decapetala* Var. *Japonica*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2897-2898, 1992.

OH, S. R. et al. Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 456-458, 1998.

OHIRA, S. et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 5052-5055, 2013.

OLIVEIRA, J. C. S. **Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae)**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

OLIVEIRA, L. F. C. et al. Vibrational spectroscopic, study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, p. 143-249, 2002.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

PAIVA, S. R. et al. Chromatographic profile of two plumbaginaceae species: *Plumbago scandens* L. and *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 717-721, 2002.

PARMAR, V. S.; SINGH, S.; JACOBSEN, J. P. Structure of a new homoisoflavanone from *Caesalpinia pulcherrima*. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 4, p. 267-270, 1987.

PASCOE, K. O.; BURKE, B. A.; CHAN, W. R. Caesalpin-F- a new furanoditerpene from *Caesalpinia bonducella*. **Journal Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 913-915, 1986.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; WEBB, R. L. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. **Tetrahedron**, v. 53, n. 5, p. 1583-1592, 1997.

PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthone from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.

PAWLOWSKA, A. M.; LEO, M.; BRACA, A. Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 10234-10238, 2006.

PEREIRA, L. P. et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 642-648, 2012.

PERON, A. P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

PESSUTO, M. B. et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

PETER, S. R.; TINTO, W. F.; MACLEAN, S. Bonducellpins A-D, new cassane furanoditerpenes of *Caesalpinia bonducella*. **Journal Natural Products**, v. 60, n. 12, p. 1219-1221, 1997.

PETER, S. R. et al. Cassane diterpenes from *Caesalpinia bonducella*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1153-1155, 1998.

PETERS, U. M. et al. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, n. 5, p. 268-272, 2008.

PORT'S, P. S. **Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira**. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

PRIYADARSINI, K. I. et al. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2200-2206, 2002.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 914 p.

RAGASA, C. Y. et al. A new furanoids diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 10, p. 1208-1210, 2003.

REATEGUI, G. R.; NAKASONE, R. H. Production of gallic acid from tannins extracted from *Caesalpinia spinosa* Kuntze (tara). **Boletín de la Sociedad Química del Perú**, v. 54, n. 1, p. 12-19, 1998.

REGUEIRO, J. et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 152, p. 340-348, 2014.

RESENDE, F. A. et al. Mutagenicity and antimutagenicity of (-)-hinokinin a trypanosomicidal compound measured by *Salmonella* microsome and comet assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, 2012. DOI: 10.1186/1472-6882-12-203.

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

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. **Flora da reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 816 p.

RINALDO, D. et al. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 1132-1135, 2007.

ROBARDS, K. Strategies for the determinations of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 657-691, 2003.

ROBY, M. H. H. et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827-831, 2013.

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.

ROENGSUMRAN, S. et al. Cassane diterpenoid from *Caesalpinia major*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 841-844, 2000.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, v. 130,

p. 214-221, 2012.

ROSSI, D. et al. Trans-resveratrol in nutraceuticals: issues in retail quality and effectiveness. **Molecules**, v. 17, p. 12393-12405, 2012.

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, p. 8402-8416, 2013.

SAMPAIO, F. C. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289-294, 2009.

SANDHU, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4681-4692, 2010.

SANNOMIYA, M. et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M. et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2244-2250, 2005.

SANTOS, L. C. et al. Xanthonenes and flavonoids from *Leiothrix cuvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 853-856, 2001.

SANTOS, F. V. et al. Mutagenicity of *Mouriri pusa* and *Mouriri elliptica* Martius. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2721-2727, 2008.

SANTOS, S. A. O. et al. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus wood*. **Journal of Chromatography B**, v. 938, p. 65-74, 2013.

SARMA, G.; DAS, S. Hypoglycemic action of seed kernel of *Caesalpinia bonducella* Fleming in normal and alloxan- induced diabetic albino rats. **Internet Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, 2009.

SEERAM, N. P. et al. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 1-11, 2006.

SEO, K. Y.; JELINSK, S. A.; LOECHLER, E. L. Factors that influence the mutagenic patterns of DNS adducts from chemical carcinogens. **Mutation Research**, v. 463, p. 217-246, 2000.

SERRANO, J. et al. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. S310-S329, 2009.

SERVETTAZ, O. et al. Flavonol glycosides from *Dryas octopetala*. **Journal Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 809-814, 1984.

SHARMA, S. R.; DIVEDI, S. K. SARUP, D. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypoglycaemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 1, p. 39-44, 1997.

SHEN, J. et al. Brazilein protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury correlating to inflammatory response suppression. **European Journal of Pharmacology**, v. 558, p. 88-95, 2007.

SILVA, R. C. **Plantas medicinais na saúde bucal**. Vitória: Artgraf, 2001. 136 p.

SILVA, E. C. B. **Avaliação biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae - *Caesalpinioideae* usos e riscos**. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Recife, 2006.

SILVA, H. R. et al. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SILVA, L. C. N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222-2228, 2011.

SIMIRGIOTIS M. J. et al. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 131, p. 318-327, 2012.

SINGH, V.; RAGHAV, P. K. Review on pharmacological properties of *Caesalpinia bonducella* L. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 3, p. 514-530, 2012.

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 in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOLTIS, D. E. et al. **Phylogeny and evolution of angiosperms**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 370 p.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, C. F. et al. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 641-647, 2010.

SRINIVAS, K. V. N. S. et al. Flavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 7, p. 789-793, 2003.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 517-554, 2008.

SU, H. et al. Technology of eliminating tannin with polyamide-adsorption for preparing Xinshao lyophilization. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 33, n. 6, p. 632-635, 2008.

SUDHAKAR, M. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 378-380, 2006.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2007.

SZAEFER, H. et al. Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine. **Toxicology**, v. 186, p. 67-77, 2003.

TAKAGI, A. et al. Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. **Cancer Letters**, v. 91, p. 139-144, 1995.

TALA, V. R. S. et al. Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by flow injection analysis - electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 18, p. 2803-2820, 2013.

TAN, H. P.; LING; S. K.; CHUAH, C. H. Characterisation of galloylated cyanogenic glucosides and hydrolysable tannins from leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 6, p. 516-525, 2011.

TAVARES, L. et al. Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2010.

TOMAZ, K. L. R. et al. Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadoras de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1143-1149, 2013.

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

VAN DOORN, W. G. Role of soluble carbohydrates in flower senescence: a survey. **Acta Horticulture**, v. 543, p. 179-183, 2001.

VASCONCELOS, C. F. B. et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533-1541, 2011.

VILEGAS, W. et al. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207-210, 1998.

VOET, D.; VOET, G. J.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1241 p.

WAGNER, H. M.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1995. 350 p.

WANG, Y. H. et al. Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula Sheng-MaiSan and rat plasma after oral administration by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 54, p. 1110-1127, 2011.

WASTHI, K. K.; MISRA, K. Chemical constituents of *Caesalpinia pulcherrima* stem bark and flowers. **Journal Indian Chemical Society**, v. 54, n. 6, p. 646-647, 1977.

WU, H. F. et al. Novel dinorcassane-and cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax*. **Fitoterapia**, v. 94, p. 172-176, 2014.

XAVIER, M. N.; RAMOS, I. N. C.; XAVIER FILHO, L. **A Fitoterapia no combate as afecções bucais**. Paraíba: Ideia, 1995. 212 p.

XIA, L. et al. Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3673-3679, 2012.

XIMENES, N. C. A. **Purificação e caracterização da lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL): aplicação biológica**. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

YEN, C. T. et al. Antitumor agents. 271: total synthesis and evaluation of brazilein and analogs as anti-inflammatory and cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 1037-1039, 2010.

YOSHIOKA, K. et al. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. **Oncology Reports**, v. 7, n. 6, p. 1221-1224, 2000.

ZANUTTO, F. V. et al. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSⁿ and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, p. 244-262, 2013.