

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

**Caracterização química dos diferentes órgãos de *Cryptocarya
moschata* por LC-DAD e LC-MS**

Gabriela Akemi Kosuji

ARARAQUARA

2017

Gabriela Akemi Kosuji

**Caracterização química dos diferentes órgãos de *Cryptocarya
moschata* por LC-DAD e LC-MS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Gabriela Akemi Kosuji
Graduanda

Prof. Dr. Alberto José Cavalleiro
Orientador

Lilian Cherubin Correia
Co-orientadora

Araraquara - SP
2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, e à doutoranda e co-orientadora Lilian Cherubin Correia, por aceitarem o desafio de orientar uma acadêmica numa temática limítrofe entre Farmácia e Química. A eles agradeço por tudo o que fizeram no tempo em que trabalhamos juntos.

Aos amigos e amigas que conheci na UNESP Araraquara, que me acompanharam nos desafios propostos durante a graduação. Obrigada por me acolherem e pela imensa companhia nas horas boas e também nas difíceis.

Por último e não menos importante, à minha família, meu pai Takashi, minha mãe Nelí e minha irmã Erika pelo apoio e amor incondicional em todas as fases pelas quais passei desde a mais tenra idade até a conclusão desta graduação. Não tenho e nunca terei como agradecer-los o suficiente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da família Lauraceae (esquerda) e do gênero <i>Cryptocarya</i> (direita).....	8
Figura 2. Distribuição geográfica da espécie <i>Cryptocarya moschata</i> Nees & Mart.	9
Figura 3. Tronco e folhas da <i>Cryptocarya moschata</i> Nees & Mart. A. Fazenda Barreiro Rico, Anhembi, SP; B. São Tomás de Aquino, MG; C-D. São Pedro, SP. ...	10
Figura 4. A. Núcleo fundamental de um flavonoide; B. Estrutura molecular da criptofoliona, como exemplo de uma estilpirona.	11
Figura 5. Estruturas moleculares das estilpironas isoladas da <i>C. moschata</i>	12
Figura 6. Estruturas de substâncias já identificadas de <i>C. moschata</i>	13
Figura 7. Esquema de um detector de arranjo de diodos.	16
Figura 8. Extração com água. Da esquerda para a direita: amostras de tronco, folha, semente e casca da semente.	20
Figura 9. (A) Amostras no liofilizador; (B) Extratos aquosos.	20
Figura 10. Fluxograma da obtenção dos extratos aquosos e etanólicos.	21
Figura 11. Regiões do cromatograma onde se encontram as classes metabólicas e espectro UV-vis característico.	25
Figura 12. Cromatograma do extrato aquoso do tronco de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	27
Figura 13. Cromatograma do extrato aquoso das folhas de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	27
Figura 14. Cromatograma do extrato aquoso das cascas das sementes de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	28
Figura 15. Cromatograma do extrato aquoso das sementes de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	28
Figura 16. Cromatograma do extrato etanólico do tronco de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	29
Figura 17. Cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	29
Figura 18. Cromatograma do extrato etanólico das cascas das sementes de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	30

Figura 19. Cromatograma do extrato etanólico das sementes de <i>Cryptocarya moschata</i> obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	30
Figura 20. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) do tronco de <i>C. moschata</i> , obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC). ...	31
Figura 21. Espectros MS para os picos G, H, I e J, dos extratos aquoso e etanólico do tronco de <i>C. moschata</i>	32
Figura 22. Estruturas dos alcaloides menisperina e xantoplatina.	33
Figura 23. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato de tronco etanólico, para os picos I e J (compostos 8 e 9, respectivamente, estirilpironas).	34
Figura 24. Estrutura das estirilpironas goniotalamina (8) e 6-estiril-2-pirona (9)	34
Figura 25. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) das folhas de <i>C. moschata</i> , obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC)...	35
Figura 26. Espectros MS para os picos A, B, K e L, dos extratos aquoso e etanólico das folhas de <i>C. moschata</i>	36
Figura 27. Espectro UV-vis em 254 nm, dos extratos de folha aquoso e etanólico, para os picos A, K e B (compostos 24 ou 25, alcaloides).	37
Figura 28. Espectros MS para os picos M e N, do extrato etanólico das folhas de <i>C. moschata</i>	38
Figura 29. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato de folha etanólico, para os picos M e N (compostos 8 e 9, estirilpironas).	39
Figura 30. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) das cascas das sementes de <i>C. moschata</i> , obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	40
Figura 31. Espectros MS para os picos O e P, do extrato etanólico das cascas das sementes de <i>C. moschata</i>	41
Figura 32. Espectros MS para os picos C, Q e R, dos extratos aquoso e etanólico das cascas das sementes de <i>C. moschata</i>	42
Figura 33. Espectro UV-vis em 254 nm, dos extratos de casca de semente aquoso e etanólico, para os picos C, Q e R (compostos 8 e 9, estirilpironas).....	43
Figura 34. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) das sementes de <i>C. moschata</i> , obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).	44
Figura 35. Espectros MS para os picos S, T, D e U, dos extratos aquoso e etanólico das sementes de <i>C. moschata</i>	45

Figura 36. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato aquoso das sementes, para o pico D (composto 13, estirilpirona).	46
Figura 37. Espectros MS para os picos E, V, F e W, dos extratos aquoso e etanólico das sementes de <i>C. moschata</i>	47
Figura 38. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato aquoso das sementes, para os picos E, V, F e W (compostos 8 e 9, estirilpironas).	48
Figura 39. Cromatograma do extrato aquoso do tronco, obtido por UHPLC-DAD.	55
Figura 40. Cromatograma do extrato aquoso da folha, obtido por UHPLC-DAD.	56
Figura 41. Cromatograma do extrato aquoso da casca da semente, obtido por UHPLC-DAD.	56
Figura 42. Cromatograma do extrato aquoso da semente, obtido por UHPLC-DAD.	57
Figura 43. Cromatograma do extrato etanólico do tronco, obtido por UHPLC-DAD.	57
Figura 44. Cromatograma do extrato etanólico da folha, obtido por UHPLC-DAD....	58
Figura 45. Cromatograma do extrato etanólico das cascas das sementes, obtido por UHPLC-DAD.	58
Figura 46. Cromatograma do extrato etanólico das sementes, obtido por UHPLC-DAD.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento dos extratos aquosos.	24
Tabela 2. Rendimento dos extratos etanólicos.....	24
Tabela 3. Relação de fórmula molecular e massa molecular das estilipironas identificadas para <i>C. moschata</i>	26
Tabela 4. Dados das substâncias que foram identificadas nos extratos aquosos e etanólicos de <i>Cryptocarya moschata</i>	49
Tabela 5. Distribuição das substâncias identificadas nos vários órgãos estudos de <i>Cryptocarya moschata</i>	50

SUMÁRIO

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	<i>Cryptocarya moschata</i>	8
1.2	Metabólitos secundários	10
1.3	Análise qualitativa.....	14
1.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	14
1.3.2	Detectores	15
2	OBJETIVO	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Coleta.....	19
3.2	Preparo dos extratos	19
3.3	Análise dos extratos por UHPLC-DAD	22
3.4	Análise dos extratos por HPLC-MS	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7	ANEXO I.....	55

RESUMO

A espécie *Cryptocarya moschata* Nees & Mart. pertence à família Lauraceae. Conhecida pelos nomes bataia, bataira, bataeira, batalha, batalheira, cajaty, canela-bastarda, canela-batalha, canela-batalheira, cabelabranca, canela-cega, canela-de-papagaio, canela-preta, farinha-seca, fruto-de-jacu, louro-precioso, pau-santo e tiriveiro (MORAES, 2007), é nativa do Brasil e pode ser encontrada nas cinco regiões do país. Seus metabólitos secundários típicos são estilipironas e flavonoides glicosilados (NEHME, 2005). Os metabólitos secundários são produtos e intermediários do metabolismo, que possuem função adaptativa. Eles não possuem distribuição universal, sendo restritos a certos grupos e diferenciando-se de outros, podendo ser utilizados em estudos taxonômicos. São fonte de exploração principalmente pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (TIWARI e RANA, 2015). O objetivo desse trabalho foi analisar qualitativamente extratos aquosos e etanólicos de *C. moschata*, para identificação e comparação dos metabólitos secundários presentes nesta espécie. O material vegetal em estudo é composto do tronco, das folhas, das sementes e das cascas das sementes da planta *Cryptocarya moschata* Nees & Mart., que fora coletado na cidade de Ibaté – SP, no Viveiro Camará. Para cada parte da planta foram feitos dois tipos de extratos: aquoso e etanólico, analisados por UHPLC-DAD e HPLC-MS em modo reverso. Identificou-se duas classes de metabólitos secundários: alcaloides e estilipironas. Nas quatro partes analisadas da *C. moschata* foram identificados os alcaloides menisperina (**24**) e xantoplatina (**25**) e também as estilipironas goniotalamina (**8**) e 6-estiril-2-pirona (**9**). Já as estilipironas desacetilcriptocarialactona (**4**) e 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (**13**) foram identificadas apenas nas sementes.

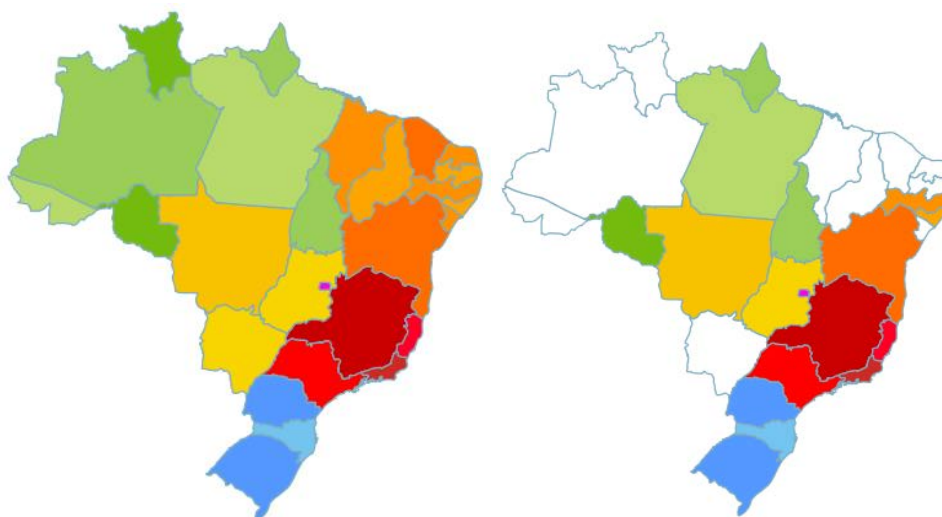
PALAVRAS-CHAVE: Lauraceae; *Cryptocarya moschata*; estilipironas; UHPLC-DAD; HPLC-MS

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptocarya moschata*

A família Lauraceae é tipicamente arbórea, contendo variedades que vão de arbustos até árvores de dossel, que são sobreposições de galhos e folhas, podendo chegar até 30 metros. É composta por cerca de 50 gêneros e 350 espécies, sendo o gênero *Cryptocarya* um dos maiores desta família, alcançando distribuição pantropical (MORAES, 2007). Tanto a família Lauraceae quanto o gênero *Cryptocarya* estão distribuídos pelas cinco regiões brasileiras: Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Na Figura 1, à esquerda, os estados que se encontram coloridos indicam a presença a família Lauraceae. Já à direita, os estados coloridos indicam a distribuição geográfica do gênero *Cryptocarya*, que é um pouco mais restrito quando comparada à família Lauraceae.

Figura 1. Distribuição geográfica da família Lauraceae (esquerda) e do gênero *Cryptocarya* (direita).



Fonte: Flora do Brasil.

Segundo o Flora do Brasil, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro¹, o gênero *Cryptocarya* possui 13 espécies em solo nacional: *Cryptocarya aschersoniana* Mez,

¹ < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> > Acesso em: 30 Set. 2017.

Cryptocarya botelhensis P.L.R.Moraes, *Cryptocarya citriformis* (Vell.) P.L.R.Moraes, *Cryptocarya guianensis* Meisn., *Cryptocarya mandioccana* Meisn., *Cryptocarya micranta* Meisn., *Cryptocarya moschata* Nees & Mart., *Cryptocarya riedeliana* P.L.R.Moraes, *Cryptocarya saligna* Mez, *Cryptocarya sellowiana* P.L.R.Moraes, *Cryptocarya subcorymbosa* Mez, *Cryptocarya velloziana* P.L.R.Moraes e *Cryptocarya wiedensis* P.L.R.Moraes.

A espécie *Cryptocarya moschata* Nees & Mart. é popularmente conhecida como bataia, bataira, bataeira, batalha, batalheira, cajaty, canela-bastarda, canela-batalha, canela-batalheira, cabelabranca, canela-cega, canela-de-papagaio, canela-preta, farinha-seca, fruto-de-jacu, louro-precioso, pau-santo, tiriveiro (MORAES, 2007). É nativa do Brasil e está presente em diversos estados do país, como mostra a Figura 2 (estados em destaque).

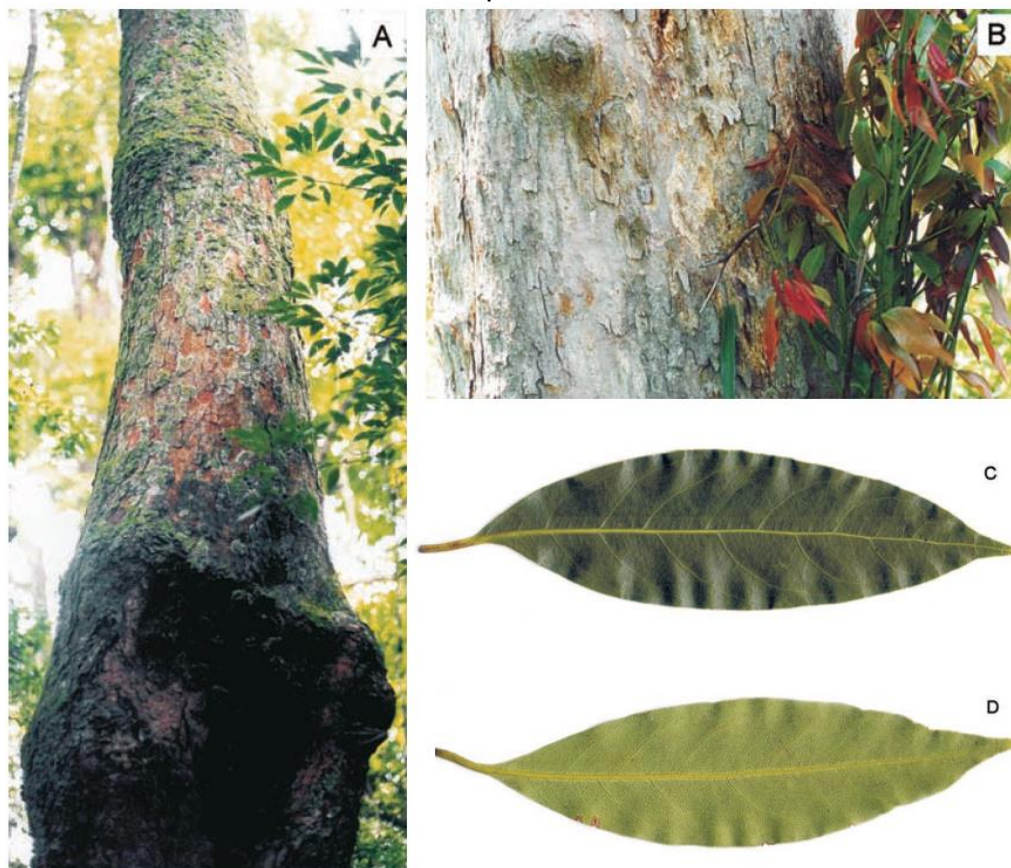
Figura 2. Distribuição geográfica da espécie *Cryptocarya moschata* Nees & Mart.



Fonte: Flora do Brasil.

É uma espécie arbórea (Figura 3) que pode atingir até 35 metros de altura. Floresce entre junho e outubro, e suas frutas ficam no estado maduro no período entre janeiro e maio. O plantio misto, envolvendo esta espécie, é indicado para restauração de áreas degradadas.

Figura 3. Tronco e folhas da *Cryptocarya moschata* Nees & Mart. A. Fazenda Barreiro Rico, Anhembi, SP; B. São Tomás de Aquino, MG; C-D. São Pedro, SP.



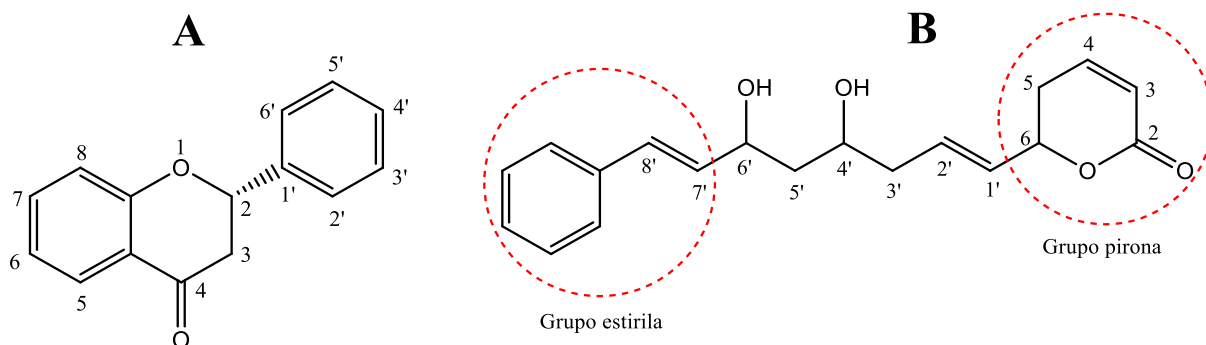
Fonte: MORAES, 2007.

1.2 Metabólitos secundários

Os metabólitos são produtos e intermediários do metabolismo. Os metabólitos primários possuem função essencial na planta, e são carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Já os metabólitos secundários são micromoléculas que podem ser de diferentes classes, tais como alcaloides, flavonoides, terpenos, entre outras, e possuem função adaptativa, garantindo a perpetuação da espécie em seu habitat e vantagem frente seus predadores. Esses metabólitos não possuem distribuição universal, ou seja, não estão presentes em todas as plantas, estando restritos a certos grupos e se diferenciando entre outros grupos, podendo ser utilizados em estudos taxonômicos. São fonte de exploração principalmente pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (TIWARI e RANA, 2015).

Os metabólitos secundários típicos da *Cryptocarya moschata* são estililpironas e flavonoides glicosilados (NEHME, 2005). A Figura 4 mostra o núcleo fundamental de um flavonoide e, a partir da molécula da criptofoliona (**1**), mostra os grupos fundamentais de uma estililpirona (5,6-diidro-2-pironas 6 substituídas).

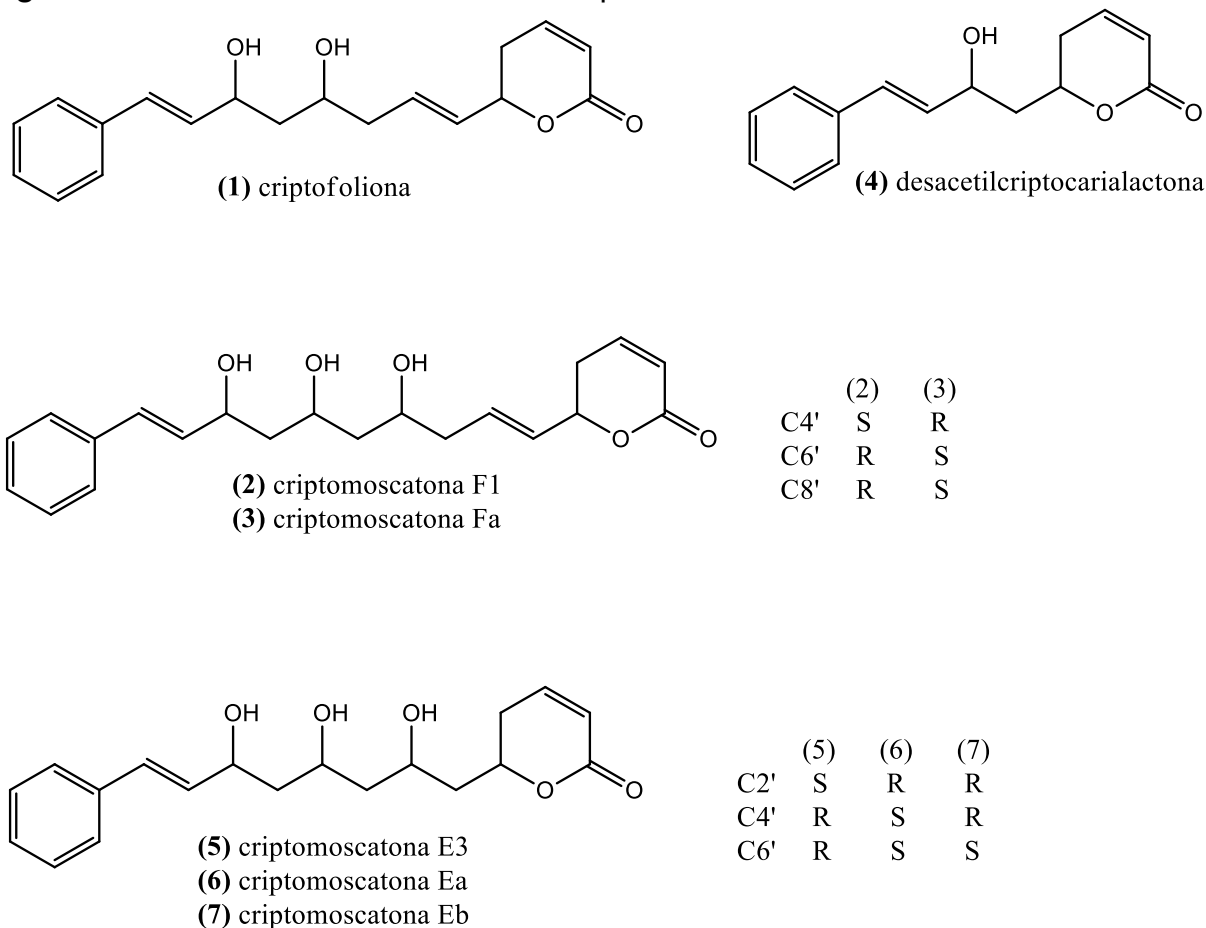
Figura 4. A. Núcleo fundamental de um flavonoide; B. Estrutura molecular da criptofoliona, como exemplo de uma estililpirona.



Fonte: elaborado pelo autor.

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, como proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos e microrganismos, atração de animais para polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas. Já as estililpironas possuem potencial como agentes citotóxicos frente ao câncer de mama na linhagem MCF-7 (CHIEN e PIHIE, 2003), leucemia nas células HL-60 (INAYAT-HUSSAIN et al., 2003) e células de carcinoma cervical nas linhagens HeLa, SiHa, C33A e MRC-5 (GIOCONDO, 2007). As estililpironas criptofoliona (**1**), criptomoscato F1 (**2**), criptomoscato Fa (**3**), desacetilcriptocarilactona (**4**), criptomoscato E3 (**5**), criptomoscato Ea (**6**) e criptomoscato Eb (**7**) (Figura 5), identificadas e purificadas a partir de um extrato de *C. moschata*, apresentaram potencial antifúngico frente aos fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries SPC140 e *C. sphaerospermum* (Pemzig) SPC491 (TELASCREA, 2005).

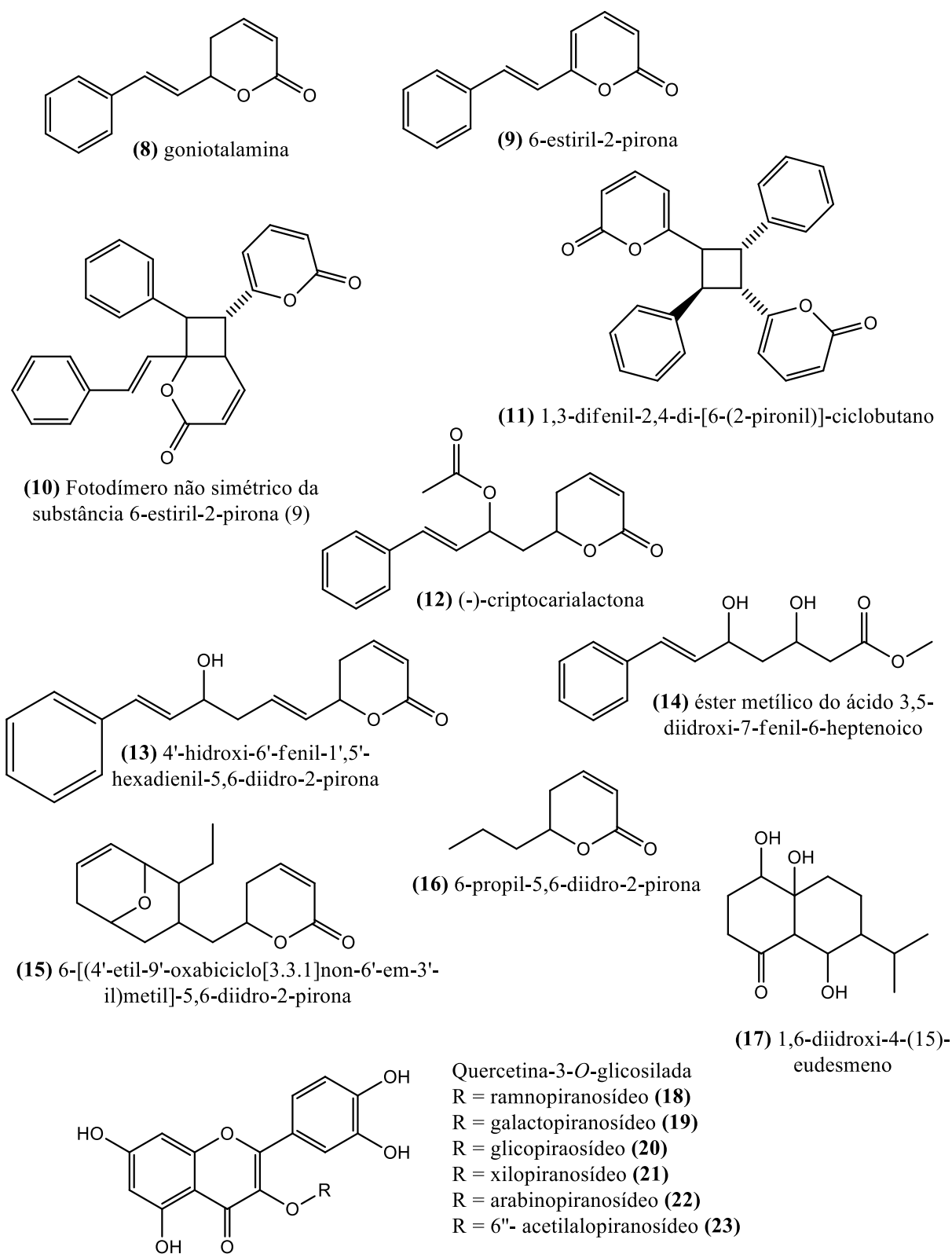
Figura 5. Estruturas moleculares das estilipironas isoladas da *C. moschata*.



Fonte: adaptado de Zonaro (2016).

Zonaro (2016) fez um levantamento de outras substâncias já identificadas em extratos de diferentes órgãos da *C. moschata* descritas na literatura, e são apresentadas desacetilcriptocarialactona **(4)**, goniotalamina **(8)**, 6-estiril-2-pirona **(9)**, fotodímero não simétrico da substância 6-estiril-2-pirona (9) **(10)**, 1,3-difenil-2,4-di-[6-(2-pironil)]-ciclobutano **(11)**, (-)-criptocarialactona **(12)**, 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona **(13)**, éster metílico do ácido 3,5-diidroxi-7-fenil-6-heptenoico **(14)**, 6-[(4'-etil-9'-oxabicyclo[3.3.1]non-6'-em-3'-il)metil]-5,6-diidro-2-pirona **(15)**, 6-propil-5,6-diidro-2-pirona **(16)**, 1,6-diidroxi-4-(15)-eudesmeno **(17)**, quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **(18)**, quercetina-3-O-galactopiranosídeo **(19)**, quercetina-3-O-glicopiranosídeo **(20)**, quercetina-3-O-xilopiranosídeo **(21)**, quercetina-3-O-arabinopiranosídeo **(22)** e quercetina-3-O-6''-acetilalopiranosídeo **(23)**. As estruturas mencionadas acima estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Estruturas de substâncias já identificadas de *C. moschata*.



Fonte: adaptado de Zonaro (2016), Passareli (2014), Camargo (2008) e Nehme (2005).

1.3 Análise qualitativa

Para a análise dos extratos foram usadas as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de espectrometria de massas (MS). Os subitens a seguir descrevem brevemente o princípio dessas técnicas.

1.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Segundo Collins (2006),

a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo (COLLINS, 2006, p. 17).

Seu princípio é baseado na interação de cada substância de uma mistura com duas fases imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel.

A cromatografia pode ser classificada, em relação ao tipo de fase móvel utilizada, em três principais grupos: cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e cromatografia com fluido supercrítico (SFC, do inglês *supercritical fluid chromatography*). Outra classificação baseia-se na polaridade relativa das fases. É dita modo normal quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, e modo reverso quando a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. Neste trabalho adotou-se a cromatografia líquida de modo reverso.

Na cromatografia líquida há uma coluna recheada, geralmente com material sólido, finamente dividido. A fase móvel, líquida, ocupa os espaços entre as partículas da fase estacionária, e tem passagem contínua durante todo o procedimento experimental. A amostra é aplicada no início da coluna e há a eluição, juntamente com a fase móvel. A interação de cada componente da mistura com a fase móvel e com a fase estacionária influencia no tempo de eluição deste componente. Quanto maior a interação do componente com a fase estacionária, maior será o tempo necessário para a eluição do mesmo. Analogamente, quanto menor for a interação do

componente com a fase estacionária, mais rápida será a eluição. Com essa propriedade é possível, com o estudo de parâmetros como polaridade e interação das substâncias, prever a ordem de eluição.

A eluição pode ser isocrática ou em gradiente. Quando é isocrática, a força de eluição se mantém constante durante toda a corrida, pois a fase móvel tem composição inalterada. Já em gradiente, há mudança da força de eluição durante a corrida, devido à mudança da composição da fase móvel.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*)² utiliza instrumentos totalmente automatizados. A coluna utilizada nesse método possui partículas com materiais sólidos muito finos, e necessita de uma bomba para ajudar na eluição da fase móvel, pois todo o sistema trabalha a alta pressão. O controle da vazão da fase móvel fica então facilmente controlável, aumentando a reprodutibilidade do experimento. Em equipamentos mais potentes, utiliza-se a sigla UHPLC (também do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*).

Diferentes tipos de detectores são usados, acoplados ao final da coluna e também a um computador, sendo possível, com o auxílio de um programa específico, a obtenção de um cromatograma. Neste trabalho, utilizaram-se dois equipamentos: UHPLC-DAD, em que DAD é o detector de arranjo de diodos, e o HPLC-MS, cujo detector é o espectrômetro de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*).

1.3.2 Detectores

1.3.2.1 Arranjo de diodos (DAD)

O detector de arranjo de diodos (DAD) é um método de detecção não destrutivo, que detecta a absorção na região ultravioleta-visível. Por isso, é capaz de detectar componentes que absorvem na região UV-vis, ou seja, as substâncias que possuem grupos cromóforos que absorvem radiação nesse faixa espectral.

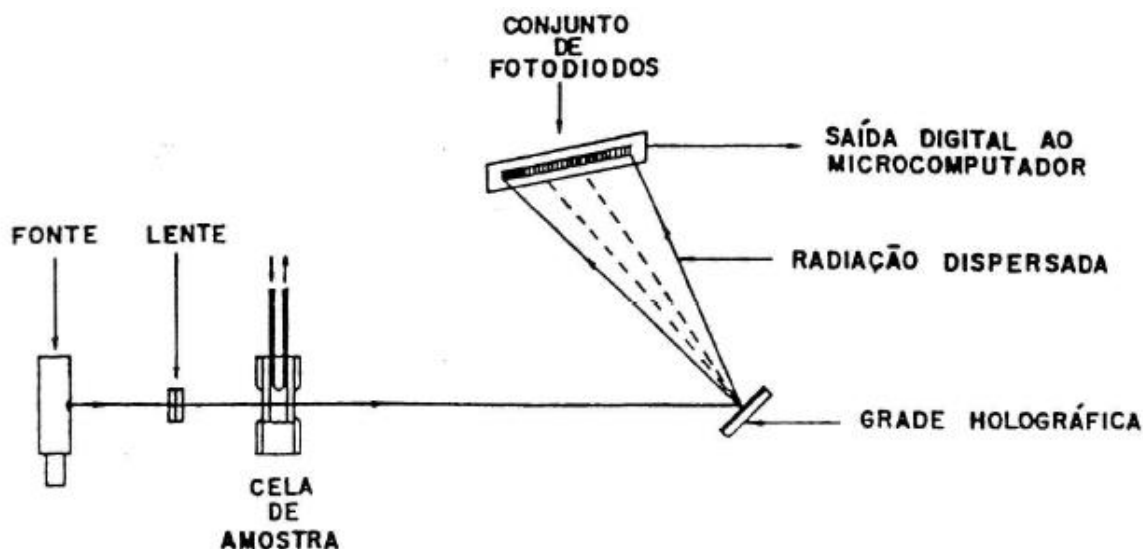
A maioria das aplicações da espectroscopia de absorção para compostos orgânicos baseiam-se nas transições de elétrons n ou π

² Alguns autores se referem à cromatografia líquida de alta eficiência como CLAE.

para o estado excitado π^* uma vez que as energias necessárias para esses processos levam as bandas de absorção para a região ultravioleta-visível (200 a 700 nm). Ambas as transições $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$ exigem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π . Moléculas que contêm esses grupos funcionais e que são capazes de absorver radiação ultravioleta-visível são chamadas cromóforas (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009, p. 383).

A fonte de luz, lâmpada de deutério para UV e de tungstênio para visível, emite luz focalizada que incide sobre a amostra. Parte é absorvida e a radiação que atravessou a amostra incide sobre uma grade de difração, que difrata a radiação, separando os comprimentos de onda em um dos diodos do arranjo. Deste modo, a absorbância é determinada em vários comprimentos de onda simultaneamente. Ao ser irradiado, o diodo produz corrente elétrica dependente da intensidade, gerando um espectro de absorção. A Figura 7 mostra um esquema do detector arranjo de diodos.

Figura 7. Esquema de um detector de arranjo de diodos.



Fonte: COLLINS, 2006.

1.3.2.2 Espectrometria de massas (MS)

O detector de massas é comumente utilizado para análise de dados de massa molar das moléculas, podendo caracterizar uma substância em particular, gerar informações estruturais de uma molécula ou, até, identificar uma ainda desconhecida principalmente quando associada a outros métodos de análise.

De forma geral, o espectrômetro de massas funciona em três etapas. A primeira é a fonte de ionização, que é encarregada de transformar o analito em íons. Se a fonte for de fase gasosa, como na ionização eletrônica (EI), a amostra é vaporizada e depois ionizada. Se a fonte for de dessorção, a amostra é ionizada e depois vaporizada. Se a ionização for em fase líquida e à pressão atmosférica, uma diferença de potencial aplicada à solução da amostra ioniza o solvente, que transfere carga para a amostra e em seguida passa pela câmara de nebulização, como na ionização por eletronspray (ESI). Na segunda parte, os íons são separados e analisados de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Por último, há a detecção desses íons e processamento dos dados com a ajuda de programas computacionais que guardam as informações na forma de gráficos denominados espectros de massa – intensidade *versus* relação massa-carga (m/z).

2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi analisar qualitativamente extratos aquosos e etanólicos de *Cryptocarya moschata*, para identificação e comparação da produção das principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas, no tronco, nas sementes e nas cascas das sementes dessa planta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta

O material vegetal em estudo é da planta *Cryptocarya moschata*. Sua colheita foi feita na cidade de Ibaté – SP, no Viveiro Camará, no dia 06 de junho de 2017. Foram coletadas folhas, camada externa do tronco, sementes e cascas das sementes, de uma árvore adulta.

3.2 Preparo dos extratos

Após a coleta, a planta foi deixada para secagem a 40°C durante 5 semanas. Depois de seca, sementes, cascas das sementes, folhas e tronco foram moídos separadamente. As duas primeiras foram trituradas utilizando-se um moinho analítico A11 BASIC (IKA®) e as outras duas um moinho de facas. Para cada parte da planta foi realizado o procedimento descrito adiante.

Em um Erlenmeyer de capacidade de 250 mL, pesou-se 10 g de amostra em uma balança Mettler Toledo® modelo AG245, de capacidade máxima de 210 g, para a obtenção dos extratos. Como solvente extrator foram utilizados água MilliQ e etanol grau HPLC marca J. T. Baker®.

A extração foi realizada inicialmente pela adição de 200 mL da água MilliQ (Figura 8). O material foi sonicado em ultrassom ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz, durante 30 minutos e filtrado. Houve grande dificuldade no processo de filtração, então fez-se o uso da centrifuga para auxiliar a decantação do material não solúvel de cada amostra. O filtrado foi levado para liofilização, dando origem ao extrato aquoso (Figura 9). A parte sólida foi separada para dar continuidade com a extração.

Figura 8. Extração com água. Da esquerda para a direita: amostras de tronco, folha, semente e casca da semente.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9. (A) Amostras no liofilizador; (B) Extratos aquosos.



(A)



(B)

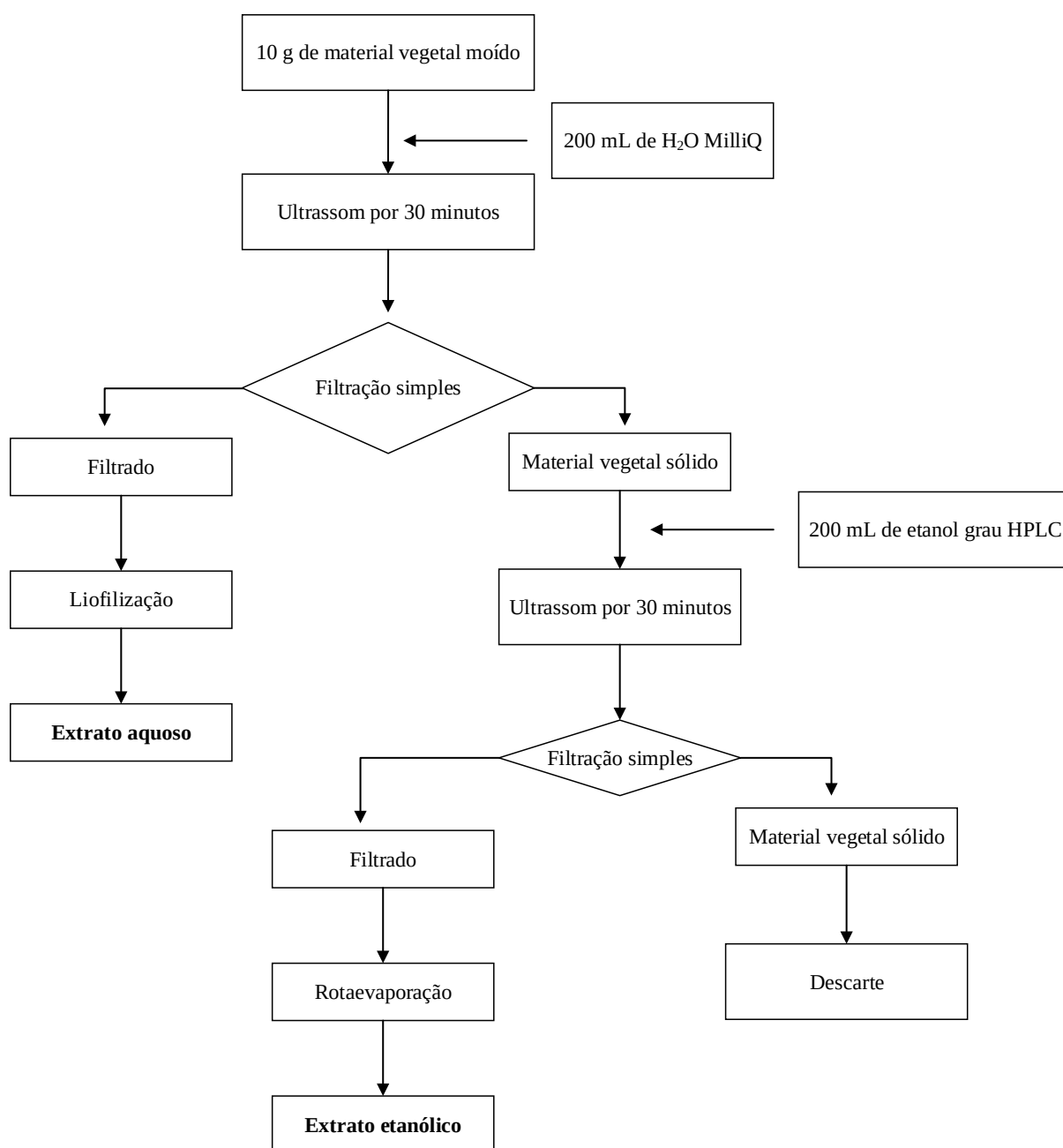
Fonte: elaborado pelo autor.

Na segunda parte da extração, adicionou-se 200 mL de etanol grau HPLC. O material passou pelo ultrassom ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz, durante 30 minutos e, em seguida, foi filtrado. Assim como na primeira etapa, também foi necessário o uso da centrífuga. O filtrado foi levado ao rotaevaporador,

para retirar o excesso de etanol, e então deu origem ao extrato etanólico. O material sólido foi descartado.

O procedimento experimental descrito está representado por meio de fluxograma na Figura 10.

Figura 10. Fluxograma da obtenção dos extratos aquosos e etanólicos.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.3 Análise dos extratos por UHPLC-DAD

Para cada extrato pesou-se 20 mg de cada parte da planta e o material foi solubilizado em 1 mL de solução 10% de etanol grau HPLC marca J.T.Baker® e 90% água MilliQ. Dos extratos etanólicos também se retirou 20 mg de cada amostra e foram solubilizados em solução 30% de água MilliQ e 70% de etanol grau HPCL marca J.T.Baker®. Posteriormente fez-se a filtração e então analisou-se por UHPLC-DAD.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) Ultimate3000, marca Dionex® (Sunnyvale, USA) equipado com uma bomba ternária modelo DGP-3600RS (2D), uma bomba quaternária LPG-16 3400M (1D), compartimento termostatzado de coluna TCC-3000RS, detector de arranjo de diodos modelo DAD-3000 (RS), amostrador automático modelo WPS-3000RS e software Chromeleon versão 6.80., segundo método previamente descrito por Zonaro (2016), que consiste em

- gradiente de 15 a 40% de B em 25 minutos;
- gradiente de 40 a 60% de B em 10 minutos;
- gradiente de 60 a 100% de B em 2 minutos;
- eluição isocrática com 100% de B durante 6 minutos;

em que as fases móveis são (A) água MilliQ com 0,1% de ácido fórmico e (B) etanol grau HPLC marca J.T.Baker® com 0,1% de ácido fórmico. A coluna usada foi de modo reverso marca Phenomenex Synergy 4 μ Hydro-RP 80Å (250 mm x 4,6 mm). A vazão, a temperatura da coluna e o tempo total de corrida cromatográfica foram, respectivamente, 0,8 mL.min⁻¹, 40°C e 43 minutos.

3.4 Análise dos extratos por HPLC-MS

Dos extratos aquosos retirou-se 1 mg de cada parte da planta, e o material foi solubilizado em 1 mL de solução 10% de etanol grau HPLC marca J.T.Baker® e 90% água MilliQ. Dos extratos etanólicos também se retirou 1 mg de cada amostra e foram

solubilizados em 1 mL de solução 30% água MilliQ e 70% etanol grau HPCL marca J.T.Baker®. Todas as amostras solubilizadas foram centrifugadas no equipamento da marca CELM®, modelo COMBATE, série 3294, por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de celulose regenerada de poros de 0,22 µm e, por fim, foi feita a análise em cromatógrafo líquido da marca Shimadzu®, contendo os módulos Bomba LC-20AD, autoinjeter SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A acoplado a um espectrômetro de massas Amazon SL, da marca Bruker®. Os espectros de massas foram adquiridos separadamente no modo negativo e positivo com m/z na faixa de 50-1200 e resolução unitária. Os parâmetros de operação foram: gás de arraste nitrogênio, voltagem da fonte 4500 V, temperatura do gás 300°C e fluxo do gás de secagem de 10 L.min⁻¹.

O método e a coluna utilizados foram os mesmos que o da análise de UHPLC-DAD, que consiste em

- gradiente de 15 a 40% de B em 25 minutos;
- gradiente de 40 a 60% de B em 10 minutos;
- gradiente de 60 a 100% de B em 2 minutos;
- eluição isocrática com 100% de B durante 6 minutos;

em que as fases móveis são (A) água MilliQ com 0,1% de ácido fórmico e (B) etanol grau HPLC marca J.T.Baker® com 0,1% de ácido fórmico. A coluna usada foi de modo reverso marca Phenomenex Synergy 4µ Hydro-RP 80Å (250 mm x 4,6 mm).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados dos rendimentos de cada parte da planta, referente aos extratos aquosos e etanólicos, respectivamente.

Tabela 1. Rendimento dos extratos aquosos.

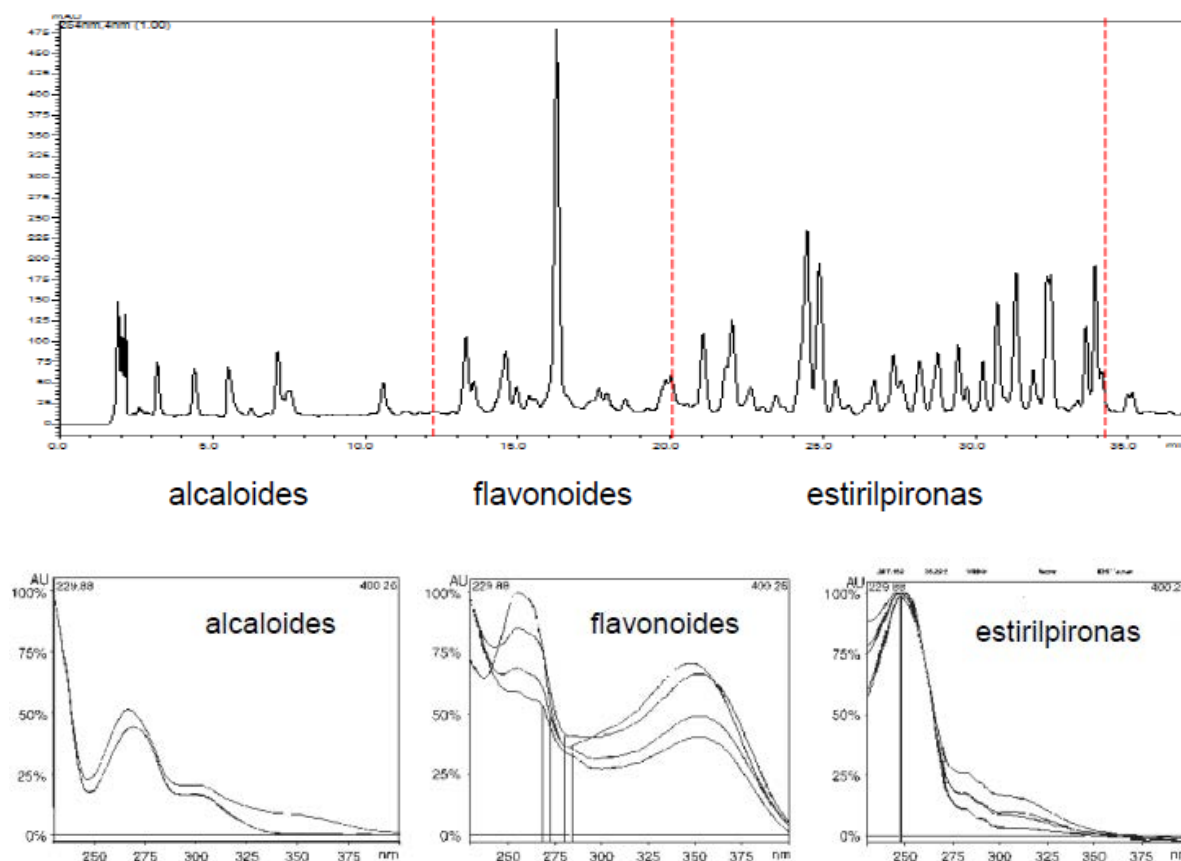
Parte da planta	Massa total inicial (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Tronco	10,0040	0,1667	1,67
Folha	10,0044	1,1373	11,37
Casca da semente	10,0022	0,1119	1,12
Semente	10,0072	1,5535	15,52

Tabela 2. Rendimento dos extratos etanólicos.

Parte da planta	Massa total inicial (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Tronco	10,0040	0,4508	4,51
Folha	10,0044	0,0730	7,30
Casca da semente	10,0022	0,0504	0,50
Semente	10,0072	0,7826	7,82

Todos os cromatogramas analisados por UHPLC-DAD estão apresentados no Anexo I, e, de forma geral, mostraram baixa complexidade da amostra. O cromatograma da Figura 11 mostra as regiões referentes às classes dos metabólitos secundários da *Cryptocarya mandioccana* (ZONARO, 2016). As regiões são determinadas pois seguem uma ordem de eluição baseada na polaridade característica de cada classe de metabólitos, além de espectros UV-vis de cada classe.

Figura 11. Regiões do cromatograma onde se encontram as classes metabólicas e espectro UV-vis característico.



Fonte: ZONARO, 2016.

A estratégia para identificação dos metabólitos foi primeiramente efetuar um levantamento das moléculas já relatadas na literatura para o gênero *Cryptocarya* e a criação de um banco de dados através da massa molecular, fórmula molecular e absorção máxima no UV-vis de cada classe de metabólitos secundários. Com a base de dados construída foi possível correlacionar os resultados obtidos através das análises a certos compostos já identificados pela literatura com alguns picos dos cromatogramas obtidos desse trabalho, referentes à planta *Cryptocarya moschata*.

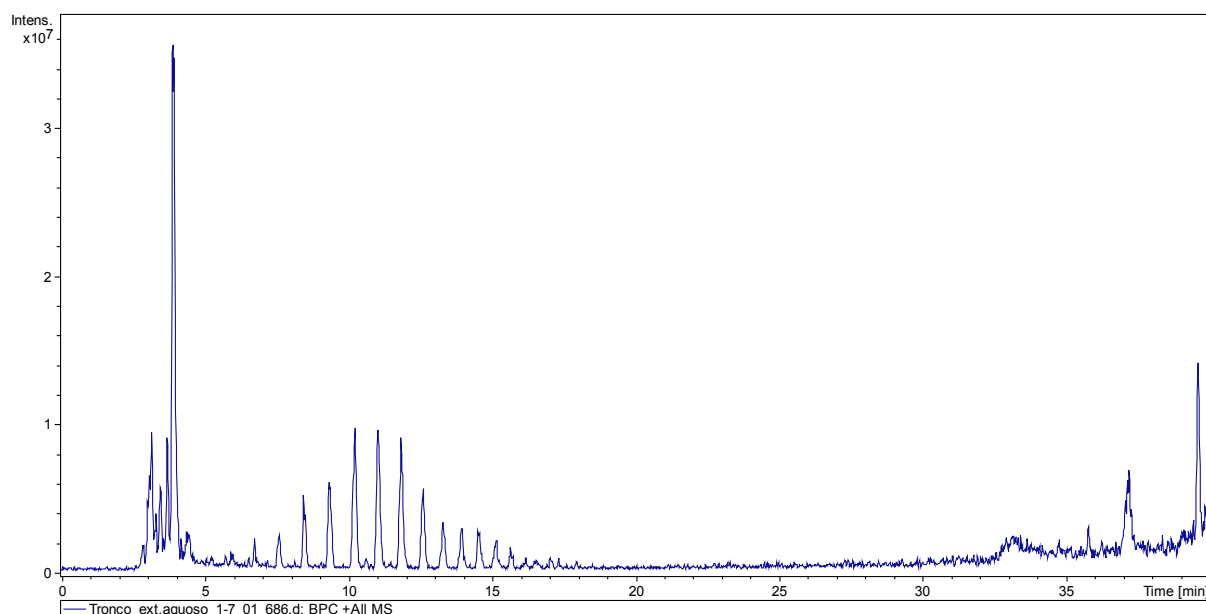
A Tabela 3 traz a relação de fórmula molecular e massa molecular dos compostos **(1)** a **(17)**, da classe estirilpironas, apresentados na seção 1.2.

Tabela 3. Relação de fórmula molecular e massa molecular das estirilpironas identificadas para *C. moschata*.

Nome	Número	Fórmula molecular	Massa molecular
criptofoliona	1	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	314,152
criptomoscatona F1	2	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	358,178
criptomoscatona Fa	3	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	358,178
desacetilcriptocarialactona	4	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244,110
criptomoscatona E3	5	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	332,162
criptomoscatona Ea	6	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	332,162
criptomoscatona Eb	7	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	332,162
goniotalamina	8	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	200,084
6-estiril-2-pirona	9	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	198,068
fotodímero não simétrico da substância 6-estiril-2-pirona	10	C ₂₆ H ₂₀ O ₄	396,162
1,3-difenil-2,4-di-[6-(2-pironil)]-ciclobutano	11	C ₂₆ H ₂₀ O ₄	396,136
(-)-desacetilcriptocarialactona	12	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	286,121
4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona	13	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	270,126
éster metílico do ácido 3,5-diidroxi-7-fenil-6-heptenoico	14	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	250,121
6-[(4'-etil-9'-oxabicyclo[3.3.1]non-6'-em-3'-il)metil]-5,6-diidro-2-pirona	15	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	262,157
6-propil-5,6-diidro-2-pirona	16	C ₇ H ₁₀ O ₂	126,068
1,6-diidroxi-4-(15)-eudesmeno	17	C ₁₃ H ₂₂ O ₄	242,152

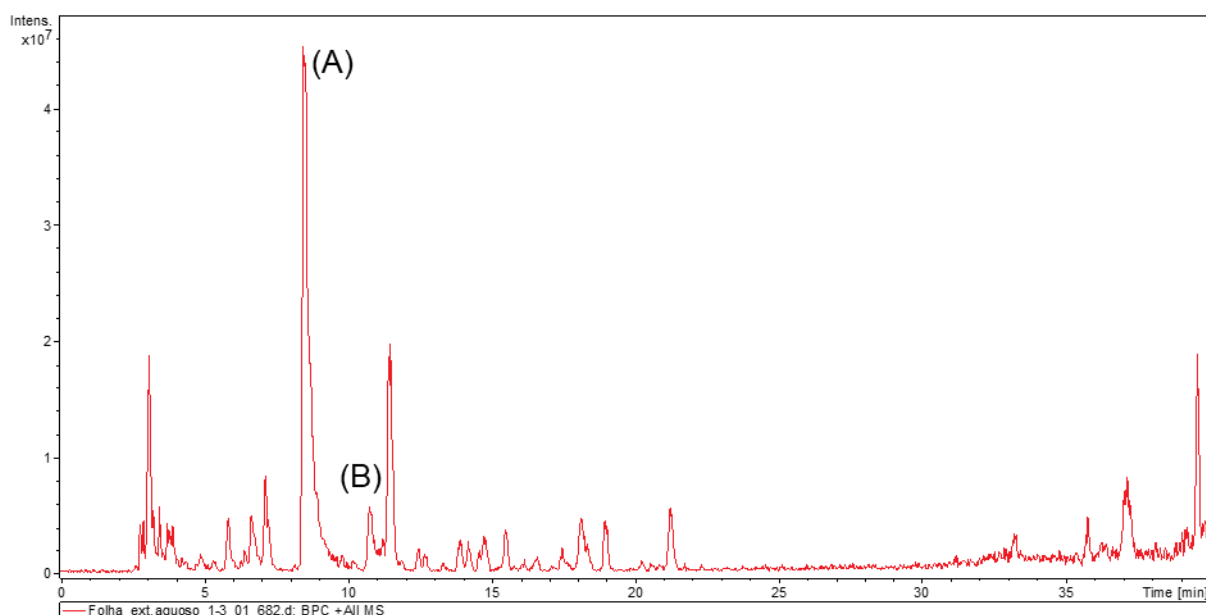
A seguir estão apresentados oito cromatogramas (Figuras 12 a 19), obtidos por HPLC-MS. São referentes aos extratos aquosos e etanólicos do tronco, das folhas, das cascas das sementes e das sementes. Nestes cromatogramas há picos identificados por letras, que serão discutidos adiante.

Figura 12. Cromatograma do extrato aquoso do tronco de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



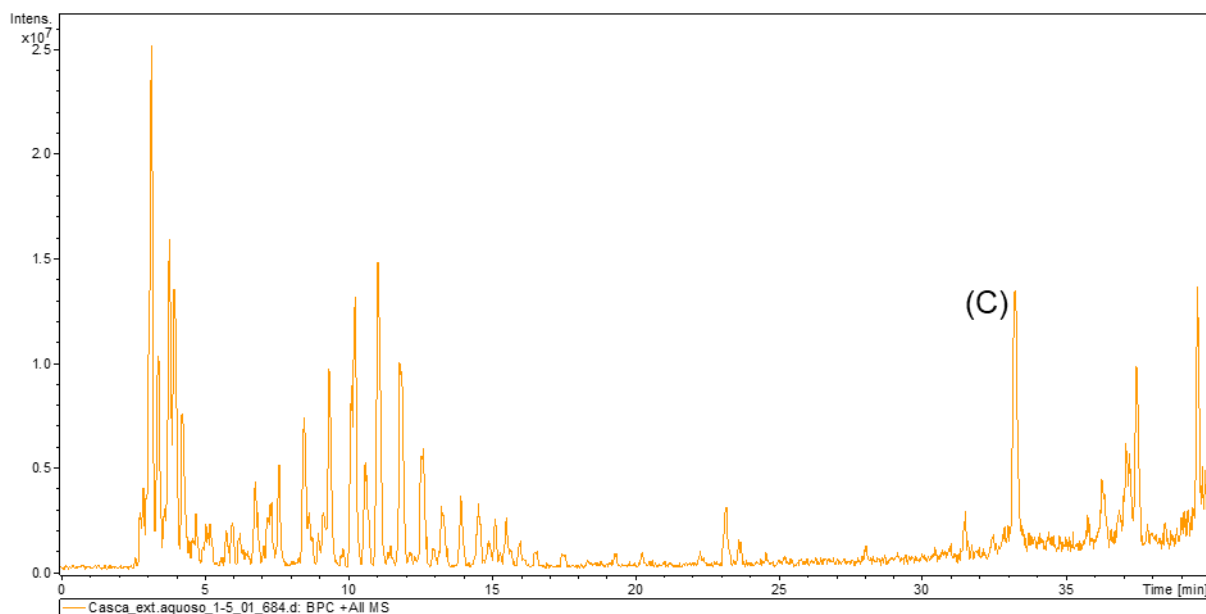
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13. Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



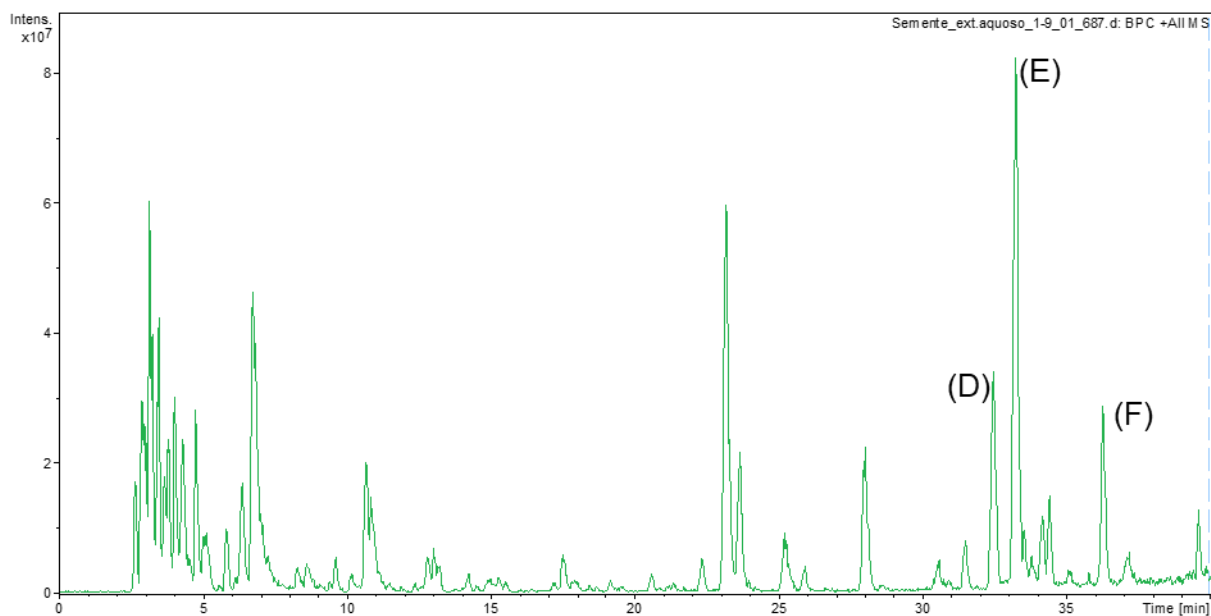
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14. Cromatograma do extrato aquoso das cascas das sementes de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



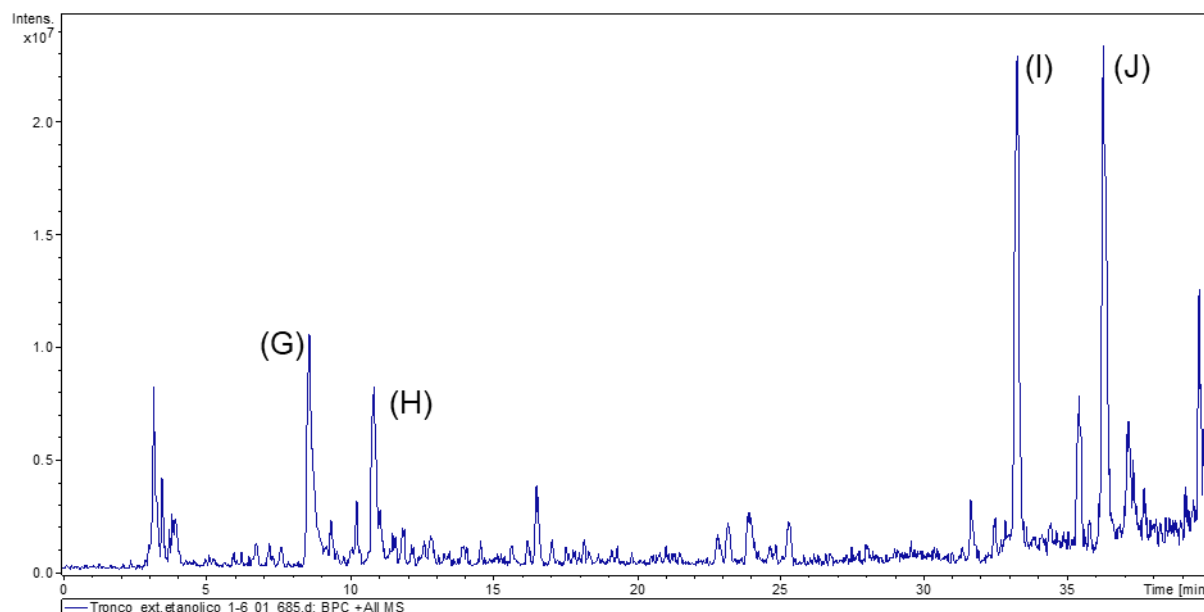
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15. Cromatograma do extrato aquoso das sementes de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



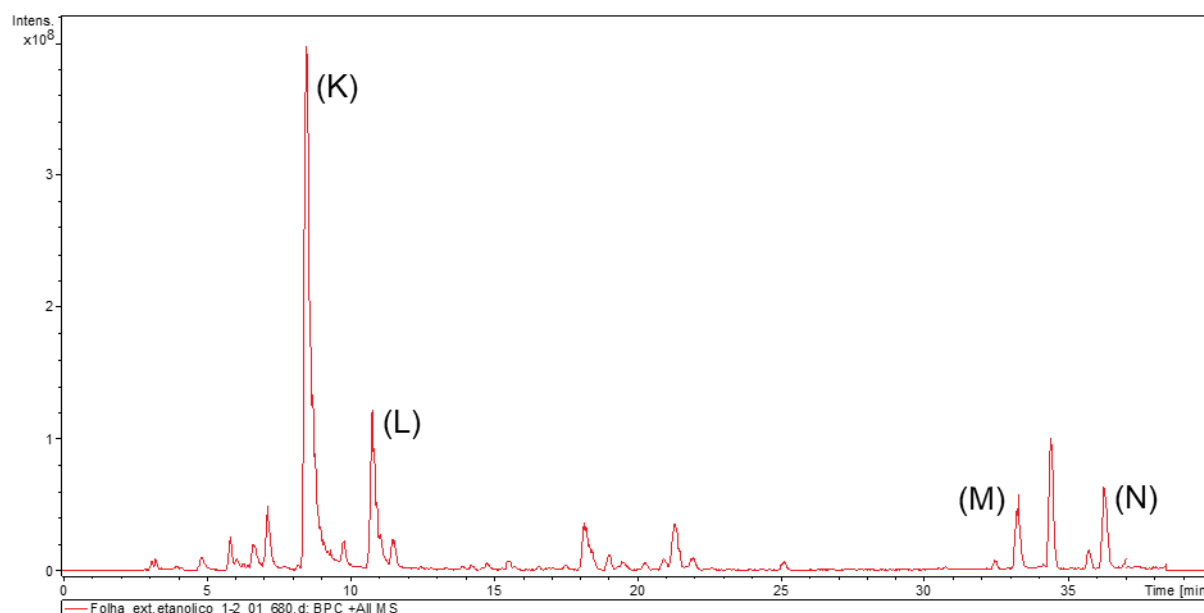
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16. Cromatograma do extrato etanólico do tronco de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



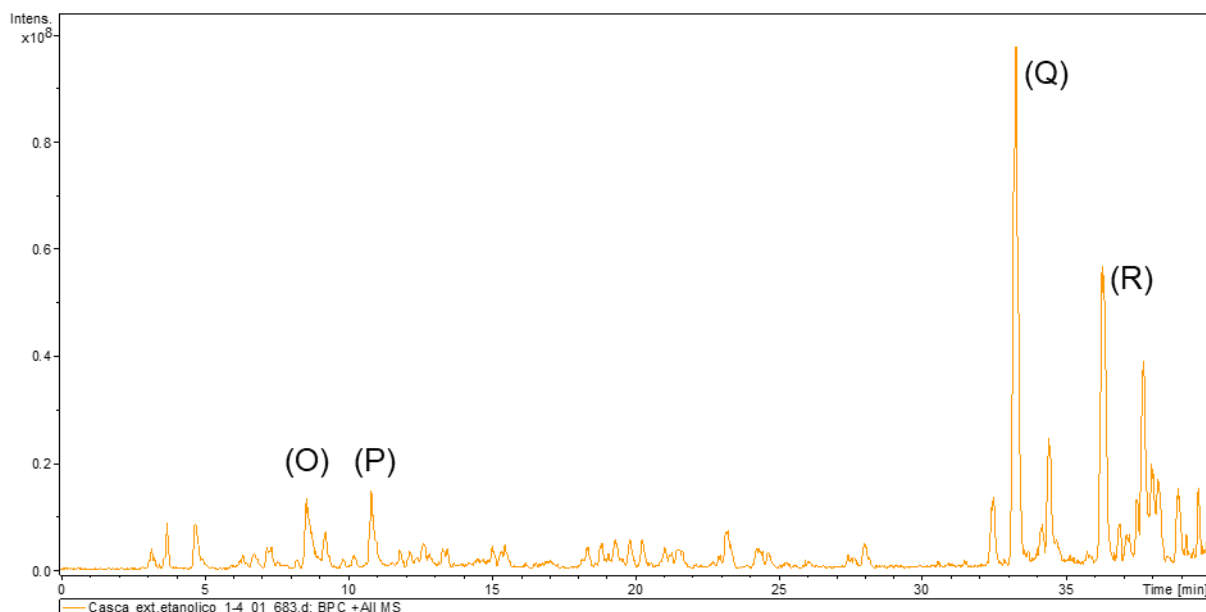
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17. Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



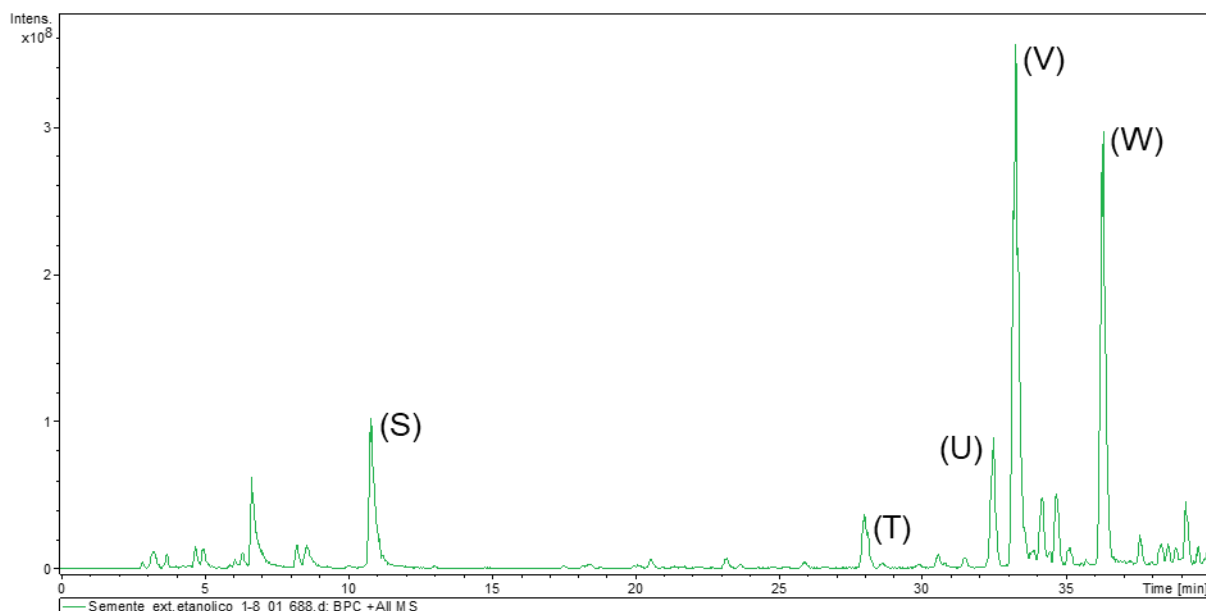
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18. Cromatograma do extrato etanólico das cascas das sementes de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19. Cromatograma do extrato etanólico das sementes de *Cryptocarya moschata* obtido por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).

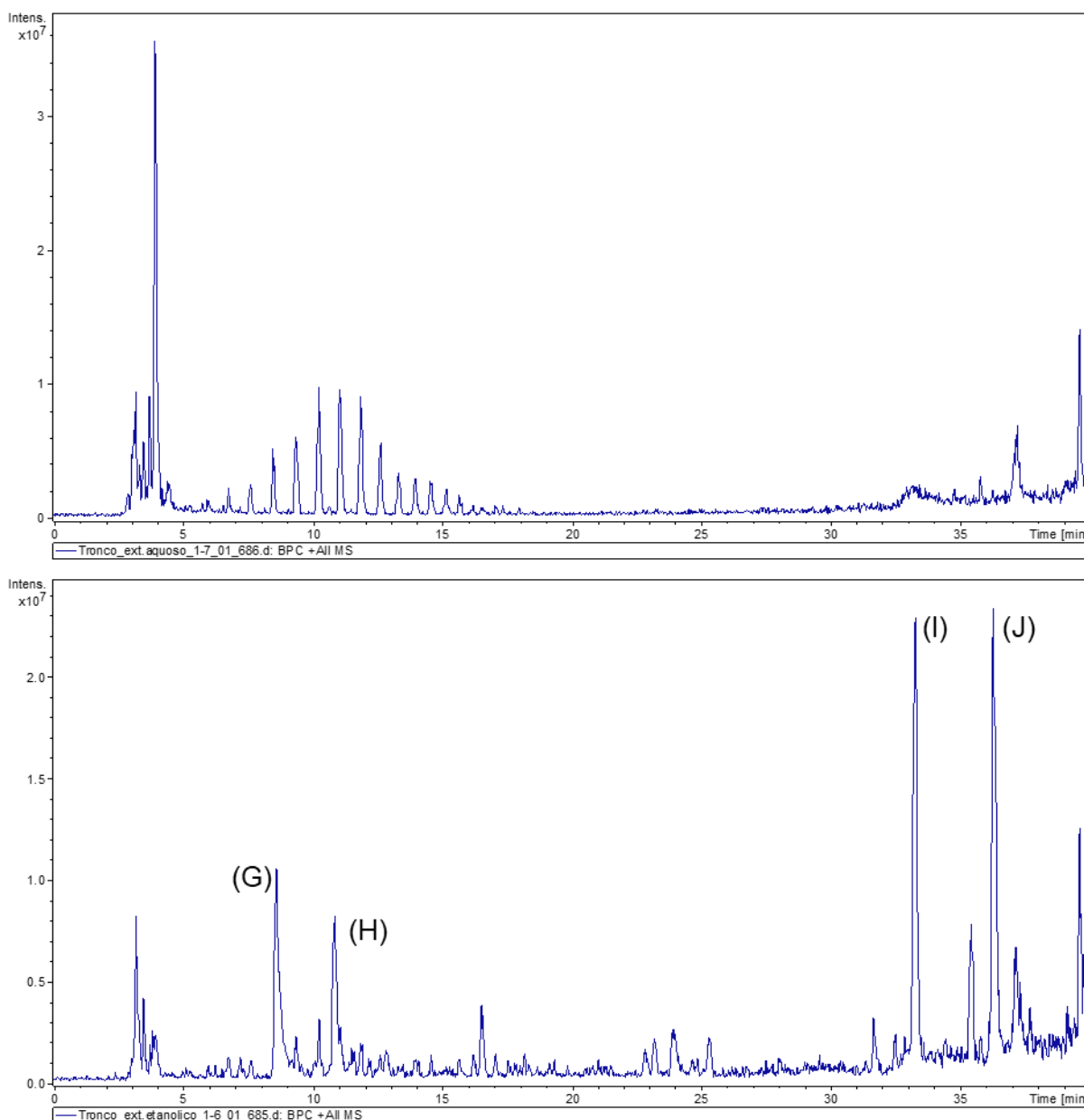


Fonte: elaborado pelo autor.

Agrupados de acordo com o órgão da planta, os cromatogramas serão analisados adiante a fim de discutir as substâncias identificadas.

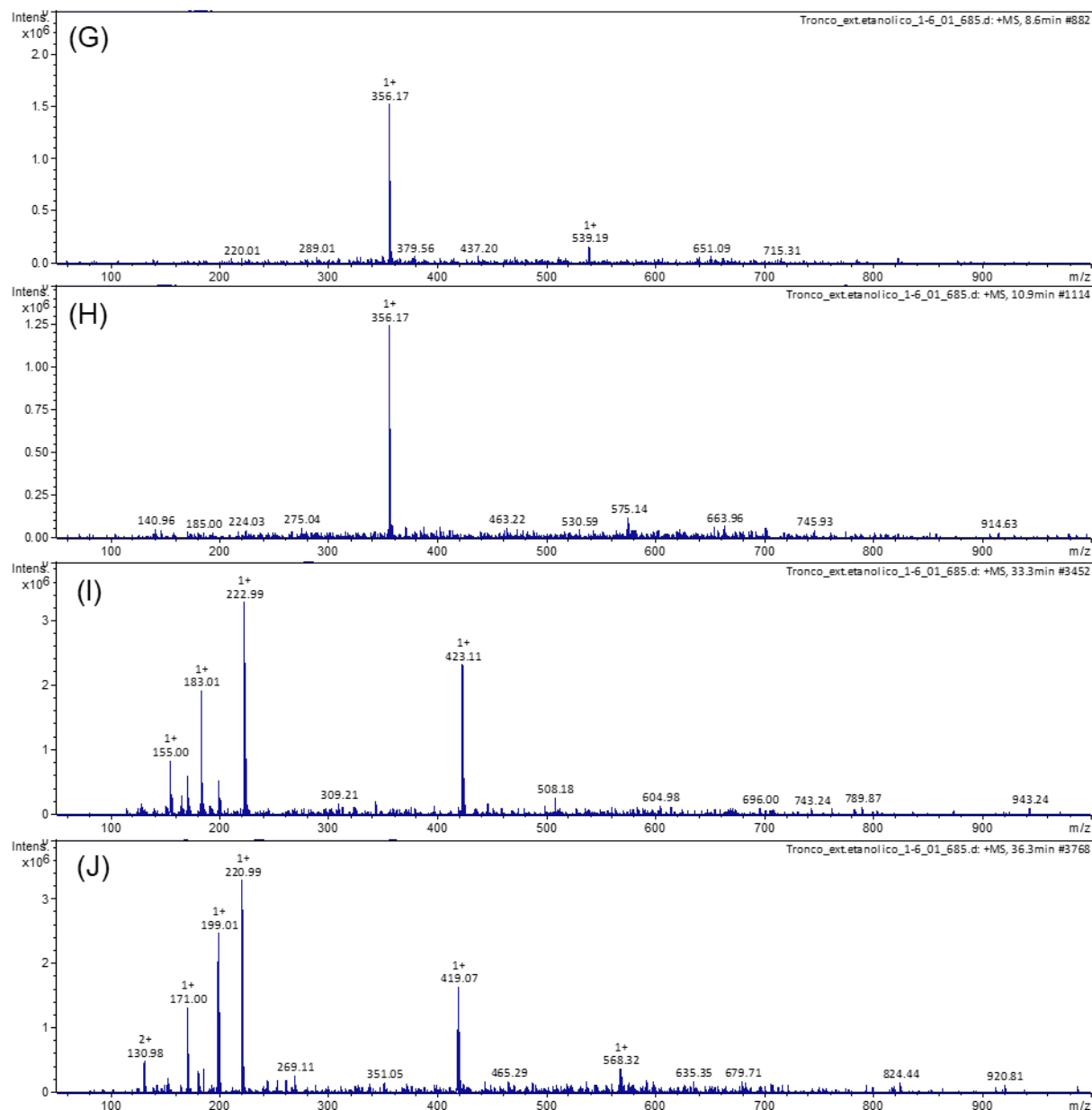
As Figuras 20, 21 e 22 mostram os dados obtidos referentes ao tronco da *Cryptocarya moschata*.

Figura 20. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) do tronco de *C. moschata*, obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21. Espectros MS para os picos G, H, I e J, dos extratos aquoso e etanólico do tronco de *C. moschata*.

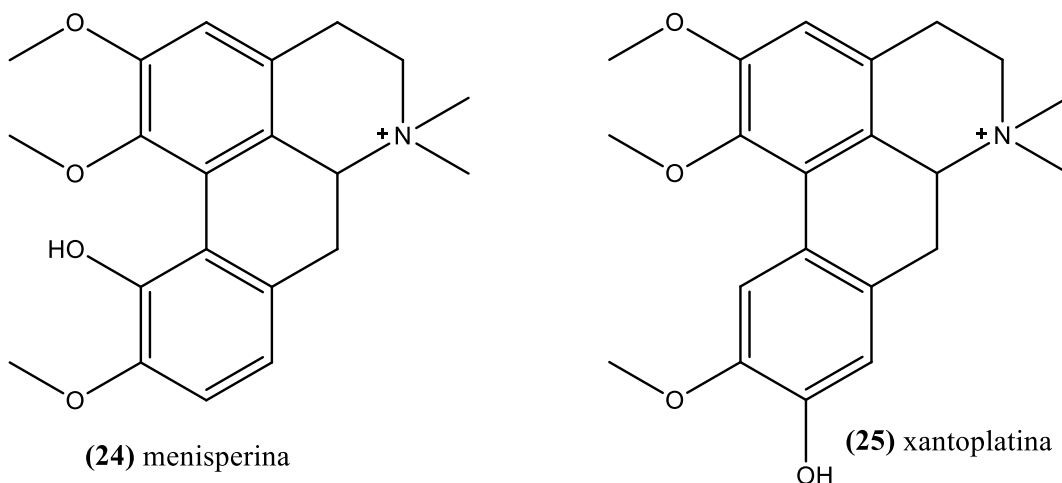


Fonte: elaborado pelo autor.

Os picos identificados como **(G)** e **(H)** possuem tempo de retenção 8,6 e 10,9 minutos, respectivamente. Apresentam um pico único em m/z 356. É possível que sejam as substâncias menisperina **(24)** e xantoplatina **(25)**, identificadas em *Cryptocarya mandioccana* (CAMARGO, 2008). Ambas são da classe dos alcaloides aporfirínicos e possuem fórmula molecular $C_{21}H_{26}NO_4^+$, diferindo apenas na posição da hidroxila (Figura 22). Os dados de UV-vis para esses picos não foram identificados,

uma vez que não houve aparição desses picos na análise por UHPLC-DAD (Anexo I, Figura 43).

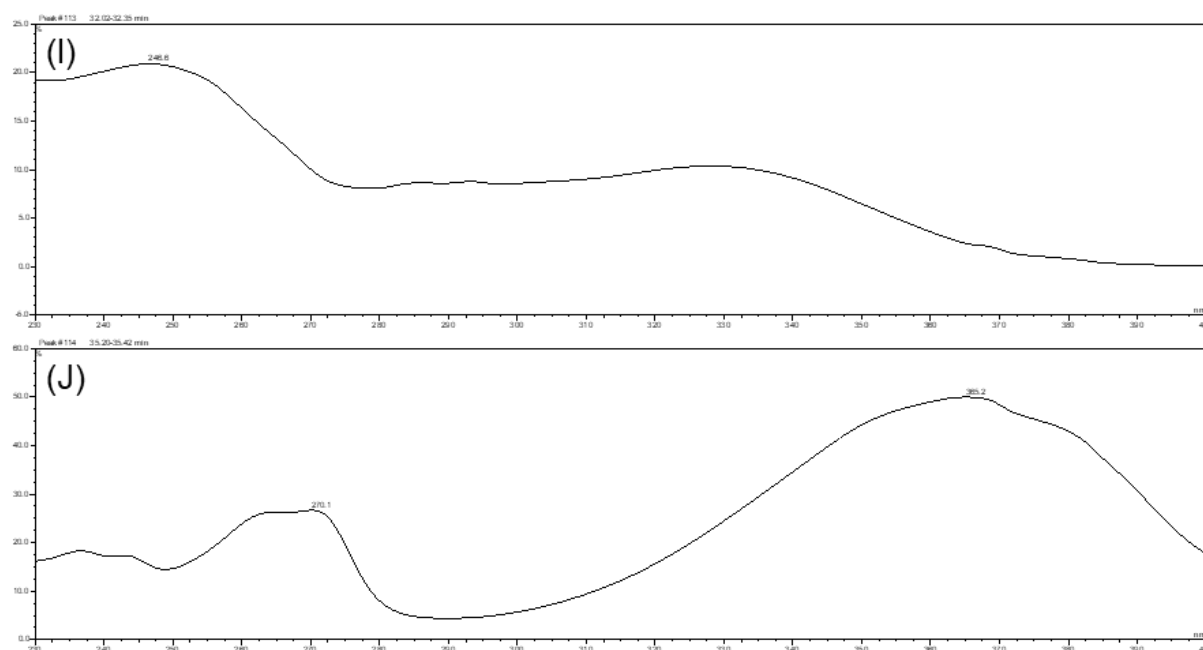
Figura 22. Estruturas dos alcaloides menisperina e xantoplatina.



Fonte: elaborado pelo autor.

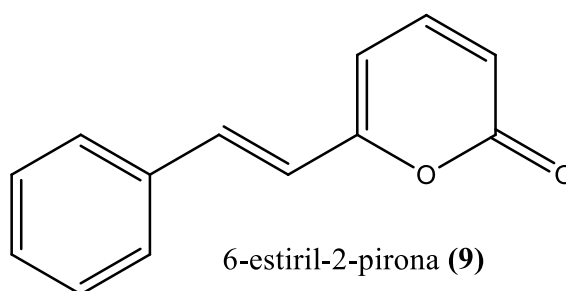
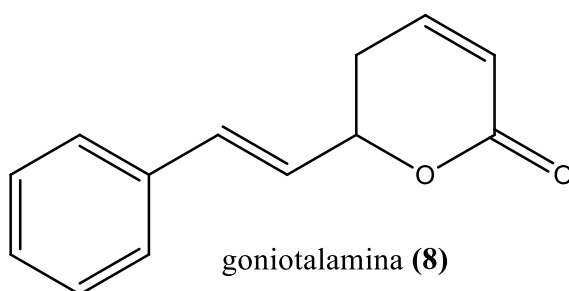
Sugere-se que, para o pico **(I)**, que possui m/z 423 e m/z 223, há os correspondentes $[2M+Na]^+$ e $[M+Na]^+$, sendo então identificado como goniotalamina **(8)**. Para o pico **(J)**, com m/z 419 e m/z 221, foi identificada a 6-estiril-2-pirona **(9)**, sendo correspondente a $[2M+Na]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. As estruturas dessas duas estirilpironas estão apresentadas na Figura 23. Os espectros de absorção em UV-vis estão apresentados na Figura 23. Para o pico **(I)**, há uma banda em 246 nm, próxima de 250 nm, que seria o esperado para uma estirilpirona. Já para o pico **(J)**, aparecem duas bandas, uma em 270 nm e outra em 365 nm. A primeira banda, em 270 nm, pode ser referente tanto à carbonila quanto ao anel benzênico; e a segunda, em 365 nm, se refere às ligações duplas conjugadas, que aparecem na molécula como um todo, como pode-se observar na Figura 24.

Figura 23. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato de tronco etanólico, para os picos I e J (compostos 8 e 9, respectivamente, estilipironas).



Fonte: elaborado pelo autor.

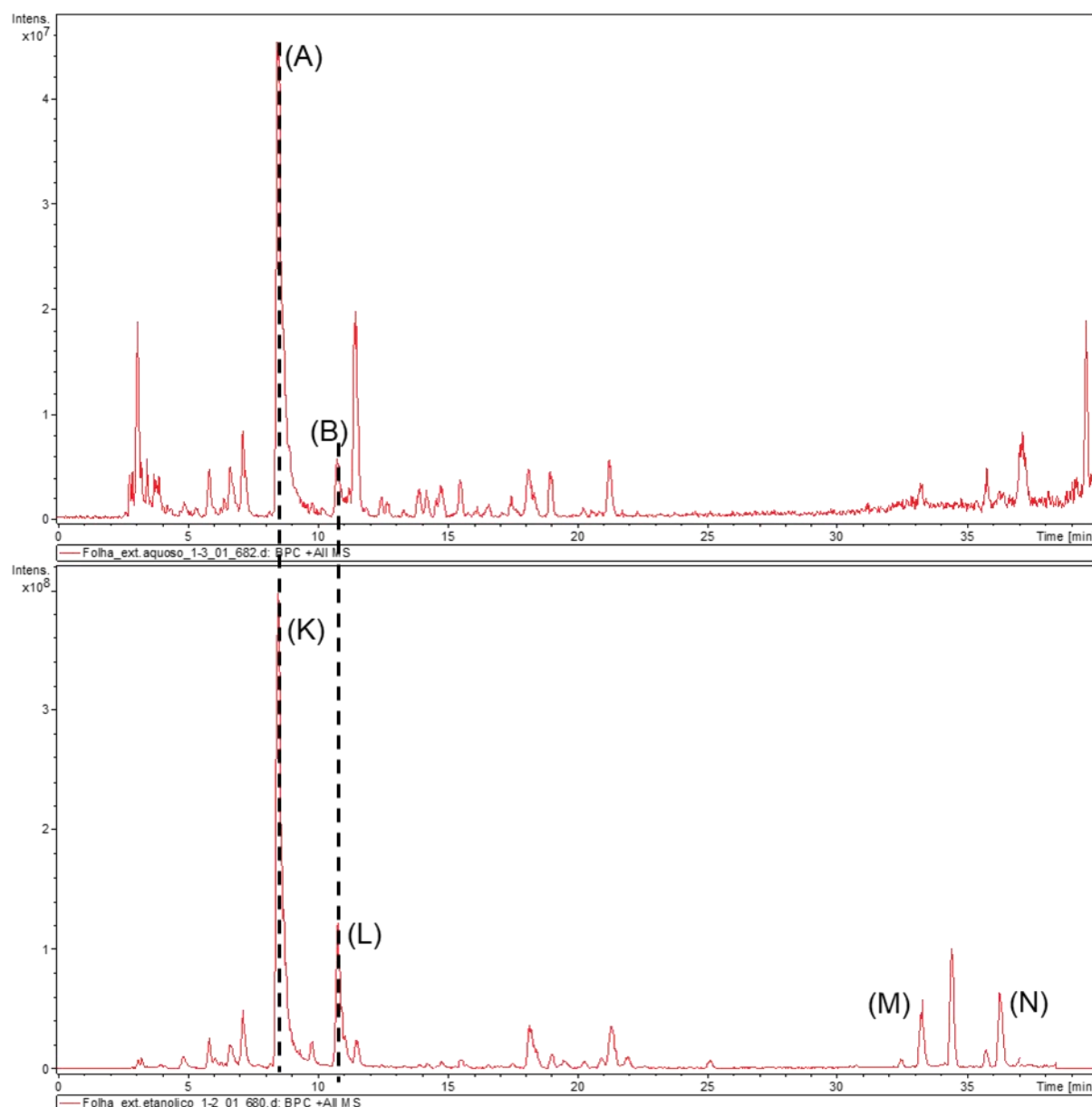
Figura 24. Estrutura das estilipironas goniotalamina (8) e 6-estiril-2-pirona (9)



Fonte: elaborado pelo autor.

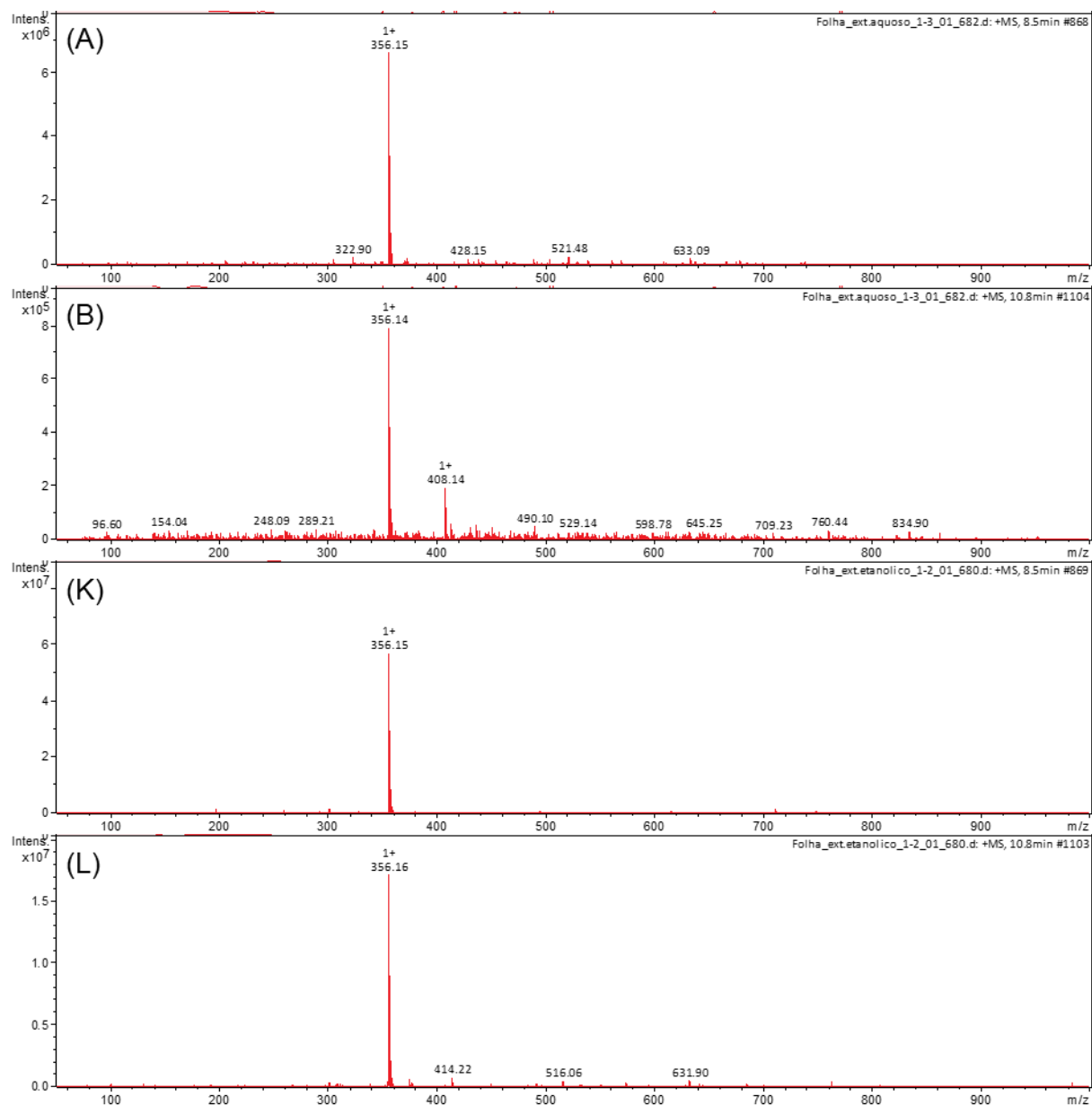
A seguir, Figuras 25, 26, 27, 28 e 29, estão os dados obtidos referentes às folhas da *Cryptocarya moschata*.

Figura 25. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) das folhas de *C. moschata*, obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



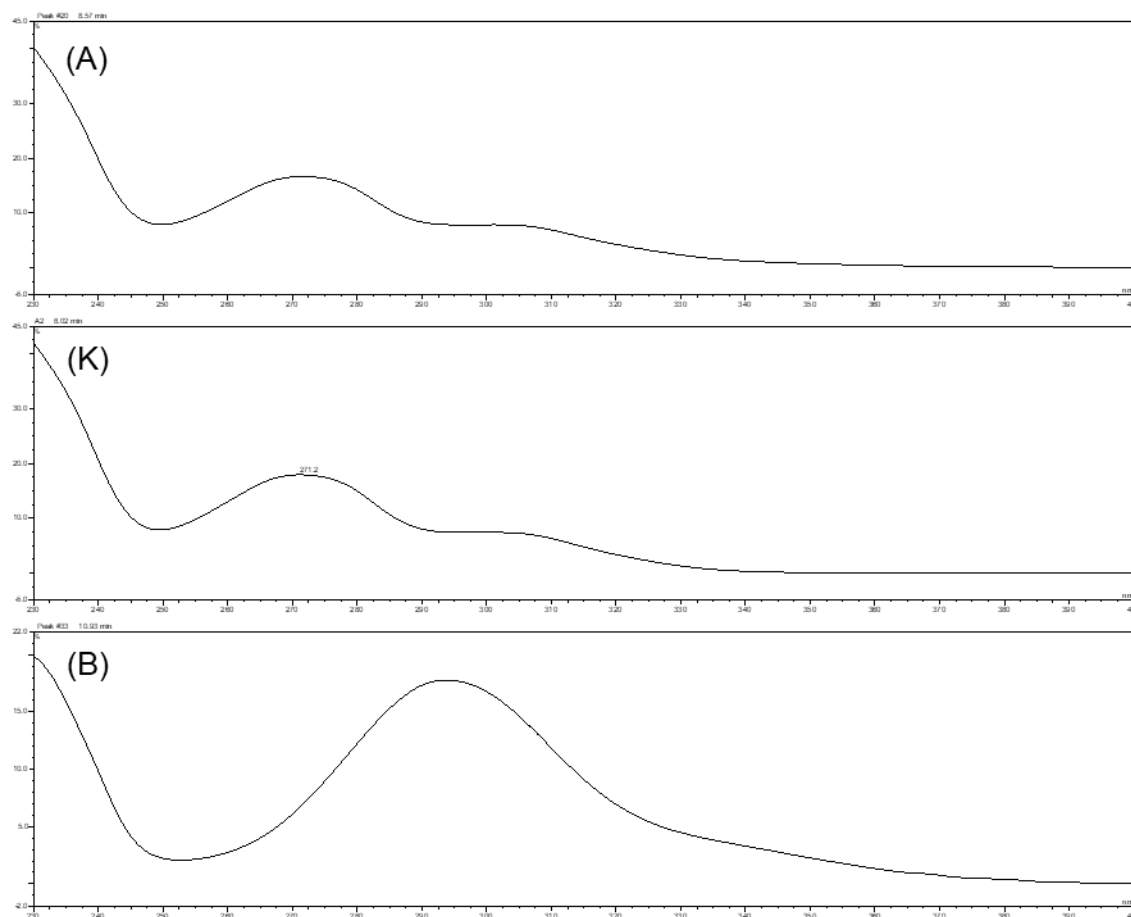
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 26. Espectros MS para os picos A, B, K e L, dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *C. moschata*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 27. Espectro UV-vis em 254 nm, dos extratos de folha aquoso e etanólico, para os picos A, K e B (compostos 24 ou 25, alcaloides).

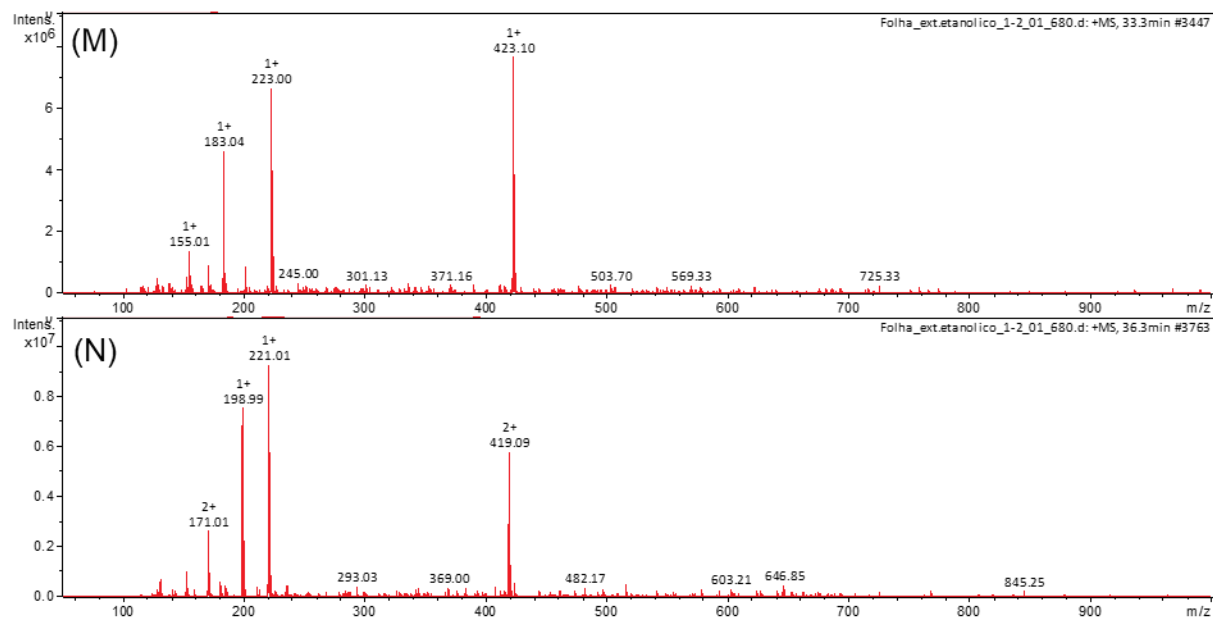


Fonte: elaborado pelo autor.

Comparando-se o cromatograma do extrato aquoso das folhas, o pico mais intenso **(A)** e o pico **(B)** de tempos de retenção 8,5 e 10,8 minutos, com o extrato etanólico das folhas, os picos **(K)** e **(L)**, de tempos de retenção 8,5 e 10,8 minutos, observa-se que todos possuem m/z 356 (Figura 26). Seguindo o mesmo raciocínio que os picos **(G)** e **(H)** do tronco, temos que esses quatro picos dos extratos das folhas podem ser os alcaloides aporfirínicos menisperina **(24)** e xantoplatina **(25)**. O UV-vis característico dessa classe está apresentado na Figura 12, e o obtido por HPLC-DAD está apresentado na Figura 27, que apresentou picos em 272, 271 e 294 nm, para os picos **(A)**, **(K)** e **(B)**, respectivamente. O pico **(L)** não se mostrou aparente na análise por UHPLC-DAD, não sendo possível a obtenção de seu espectro UV (Anexo I, Figura 44).

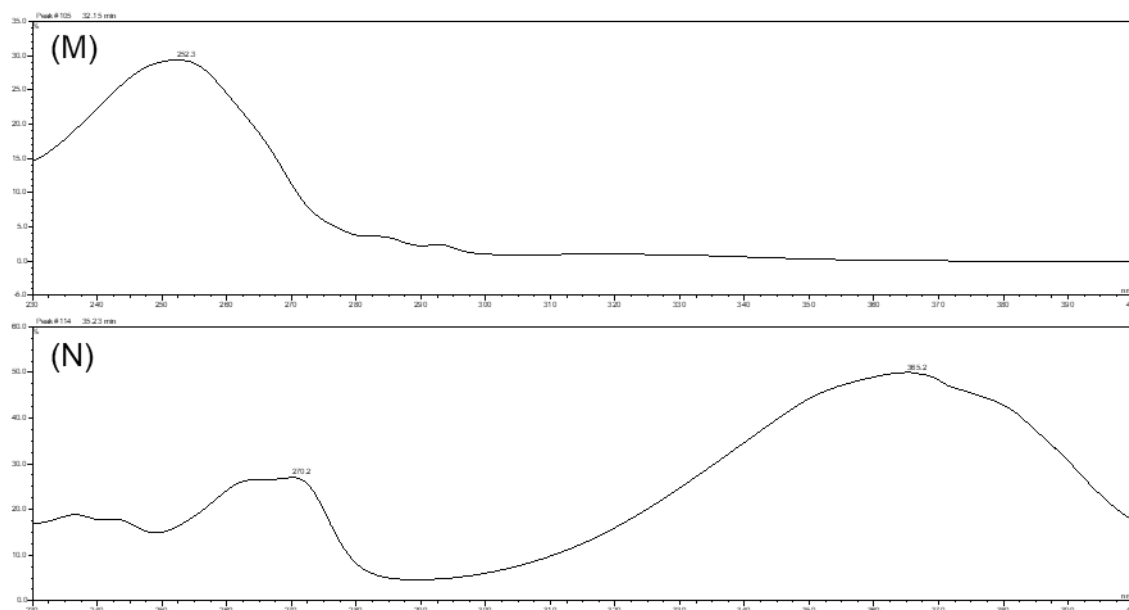
A Figura 25 mostra uma correspondência entre os picos **(A)** e **(K)** e também entre **(B)** e **(L)**, indicando que as substâncias identificadas para tais picos encontram-se em ambos os extratos para as folhas de *C. moschata*.

Figura 28. Espectros MS para os picos M e N, do extrato etanólico das folhas de *C. moschata*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 29. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato de folha etanólico, para os picos M e N (compostos 8 e 9, estirilpironas).

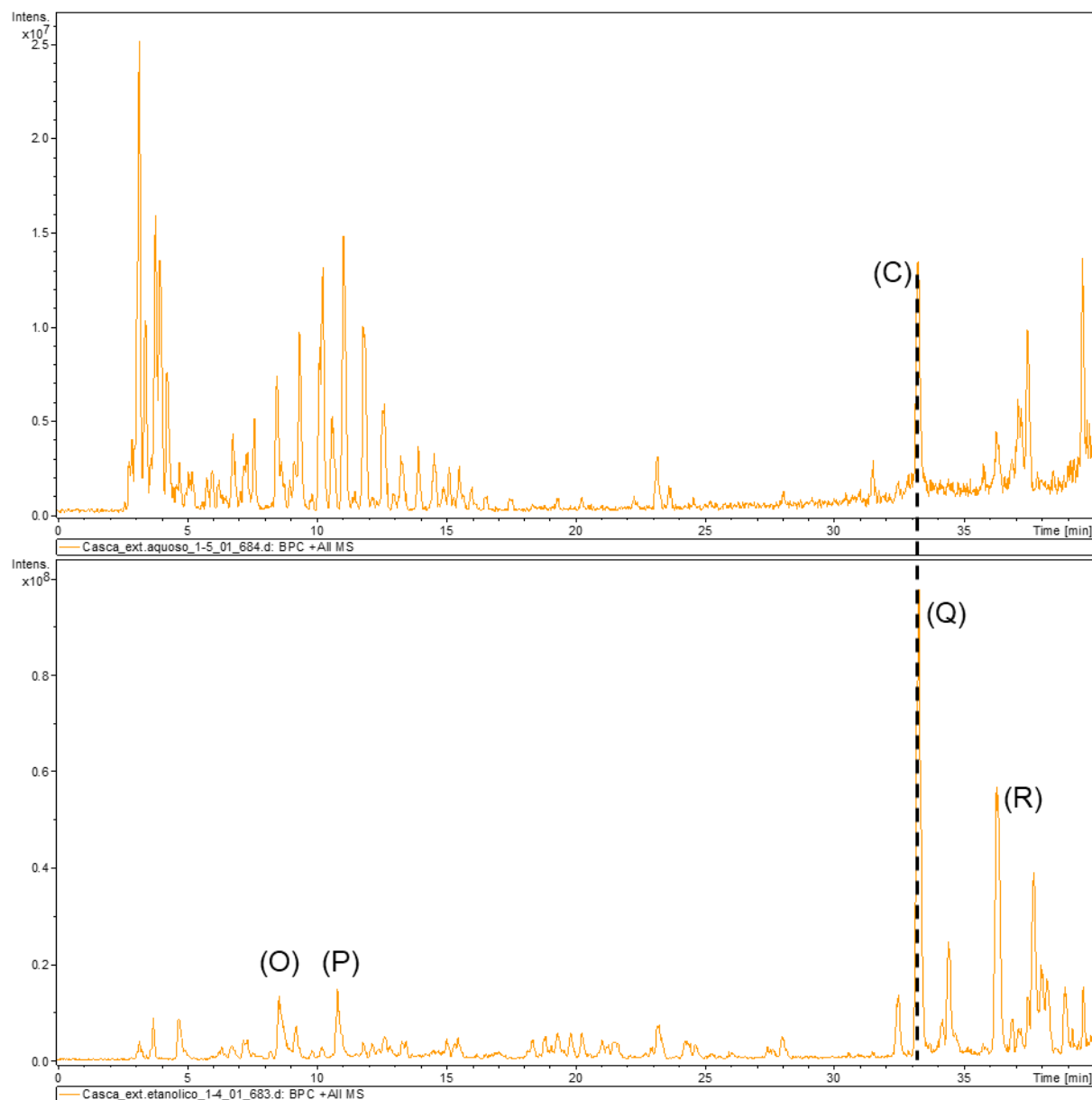


Fonte: elaborado pelo autor.

O pico **(M)**, assim como o pico **(I)** possui m/z 423 e m/z 223 e **(N)**, assim como **(J)**, apresentou m/z 419 e m/z 221. Os tempos de retenção de **(M)** e **(N)** são, respectivamente, 33,2 e 36,3 minutos. Assim, analogamente ao tronco, identificamos o pico **(M)** como goniotalamina **(8)** e o pico **(N)** como 6-estiril-2-pirona **(9)**. Essas estirilpironas mostram-se apenas no extrato etanólico das folhas, e não no extrato aquoso. O espectro de absorção UV-vis está apresentado na Figura 29, e pode ser comparado com o UV-vis característico para estirilpironas, na Figura 11. O espectro do pico **(N)** apresenta as mesmas características do com o pico **(J)**, já discutido anteriormente.

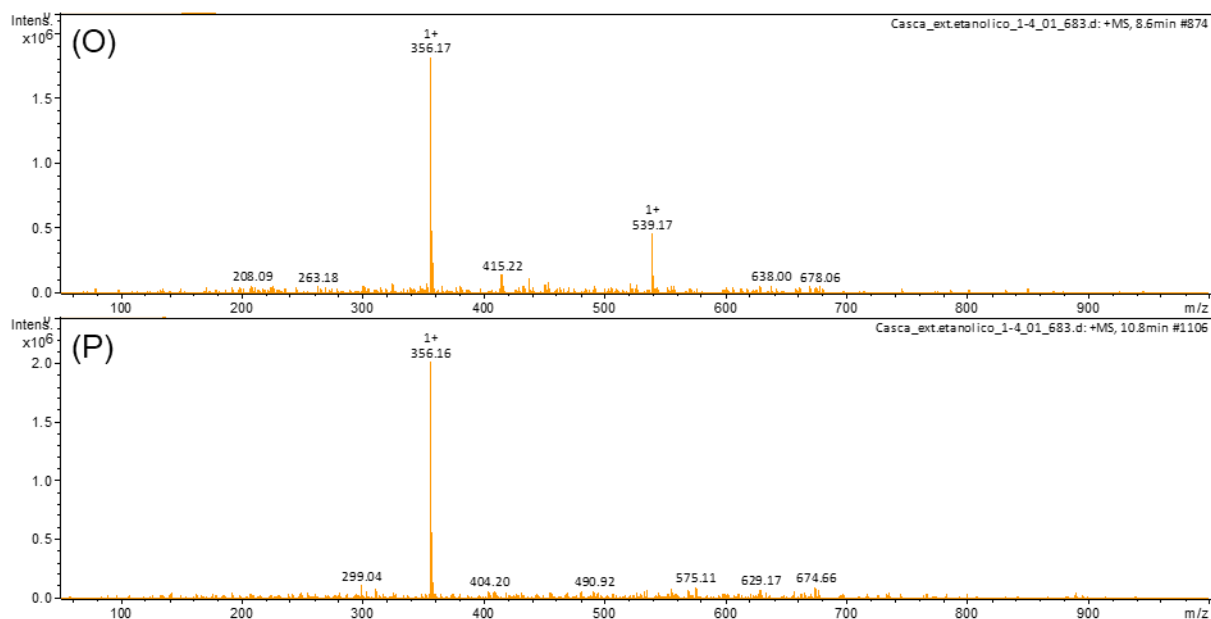
A seguir, Figuras 30, 31, 32 e 33 estão os dados obtidos referentes às cascas das sementes da *Cryptocarya moschata*.

Figura 30. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) das cascas das sementes de *C. moschata*, obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



Fonte: elaborado pelo autor.

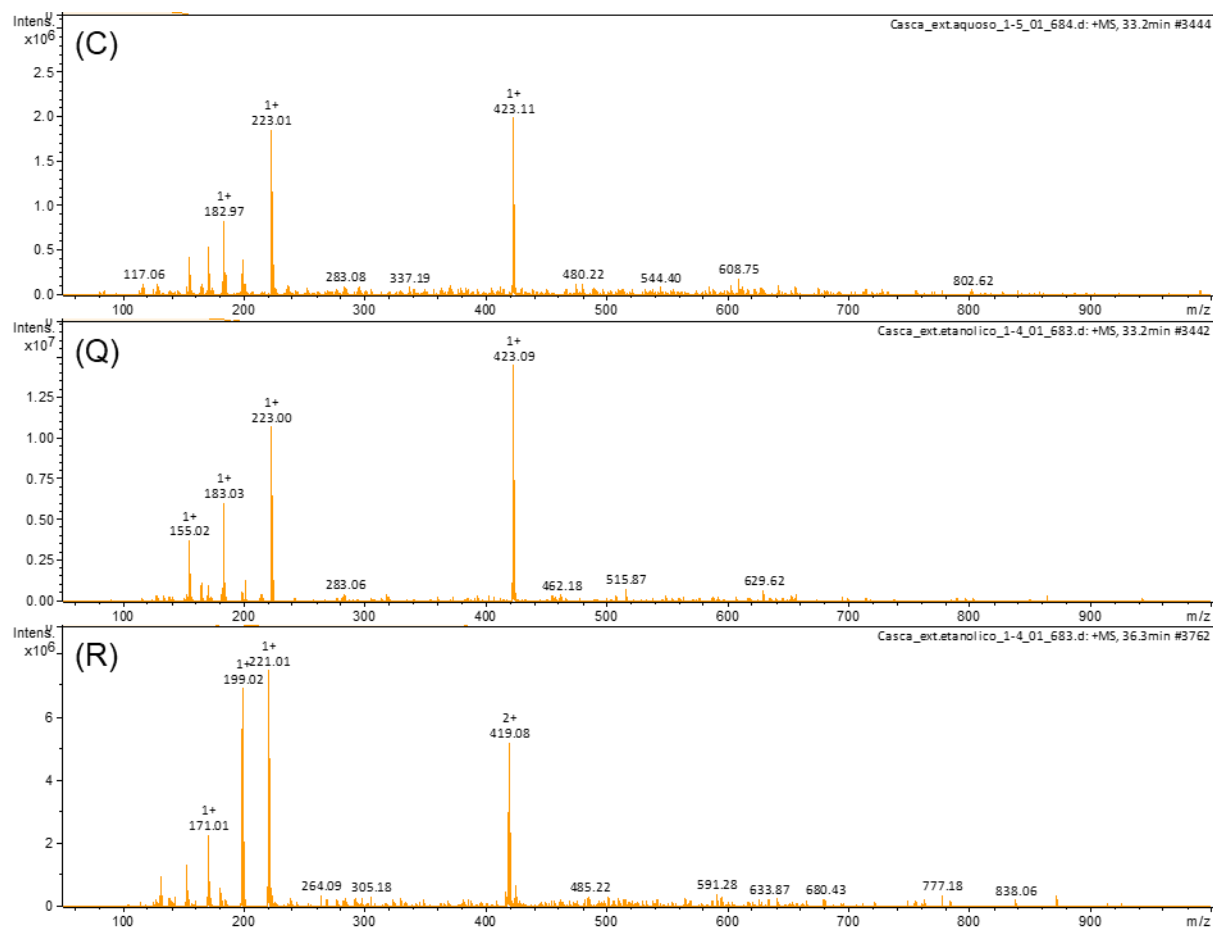
Figura 31. Espectros MS para os picos O e P, do extrato etanólico das cascas das sementes de *C. moschata*.



Fonte: elaborado pelo autor.

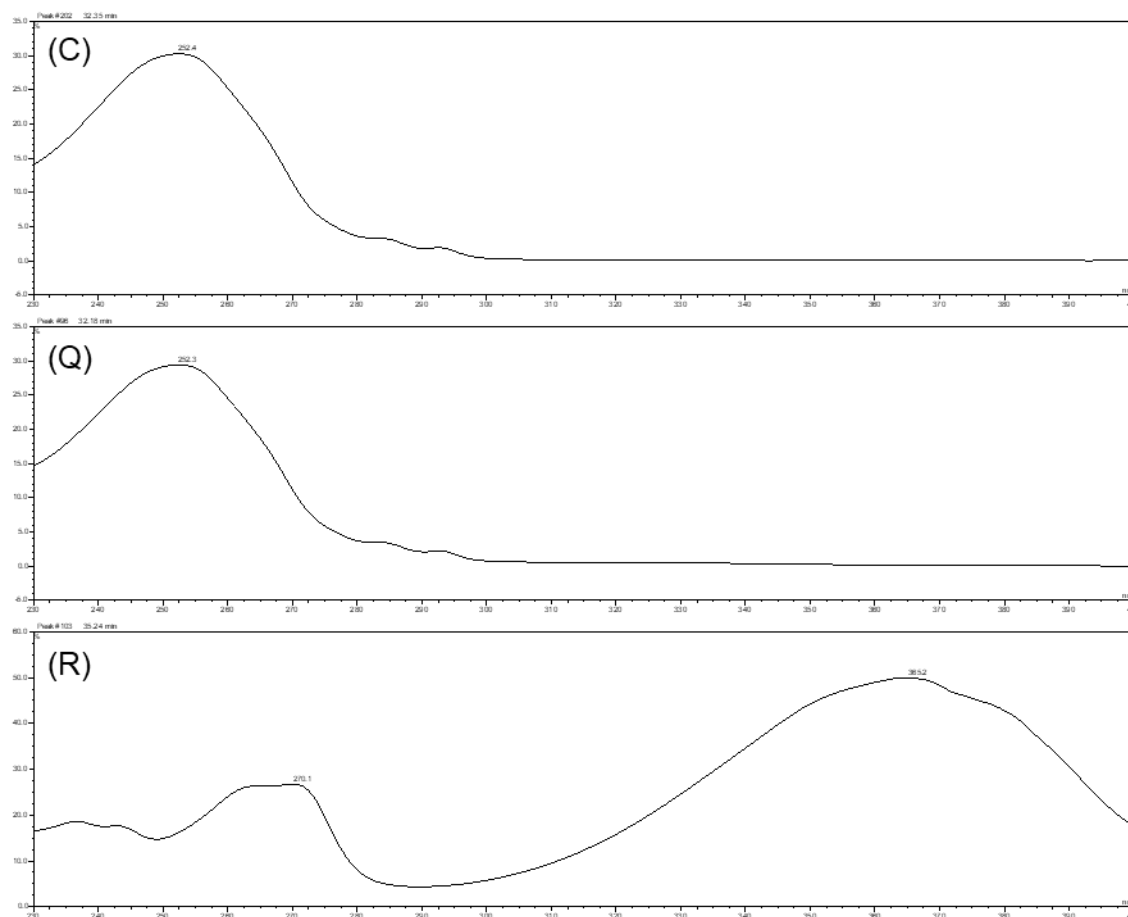
Os picos **(O)** e **(P)** foram identificados nesse trabalho como as substâncias menisperina **(24)** e xantoplatina **(25)**, como já vistas no extrato etanólico do tronco e nos extratos aquoso e etanólico das folhas. Esses picos tiveram tempo de retenção 8,6 e 10,8 minutos, respectivamente, e ambos mostraram pico único em m/z 356 (Figura 31). Esses alcaloides aparecem apenas no extrato etanólico das cascas das sementes. No Anexo I, Figura 45, é possível observar que os picos **(O)** e **(P)** não foram aparentes, impossibilitando a obtenção do espectro UV-vis.

Figura 32. Espectros MS para os picos C, Q e R, dos extratos aquoso e etanólico das cascas das sementes de *C. moschata*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 33. Espectro UV-vis em 254 nm, dos extratos de casca de semente aquoso e etanólico, para os picos C, Q e R (compostos 8 e 9, estirilpironas).

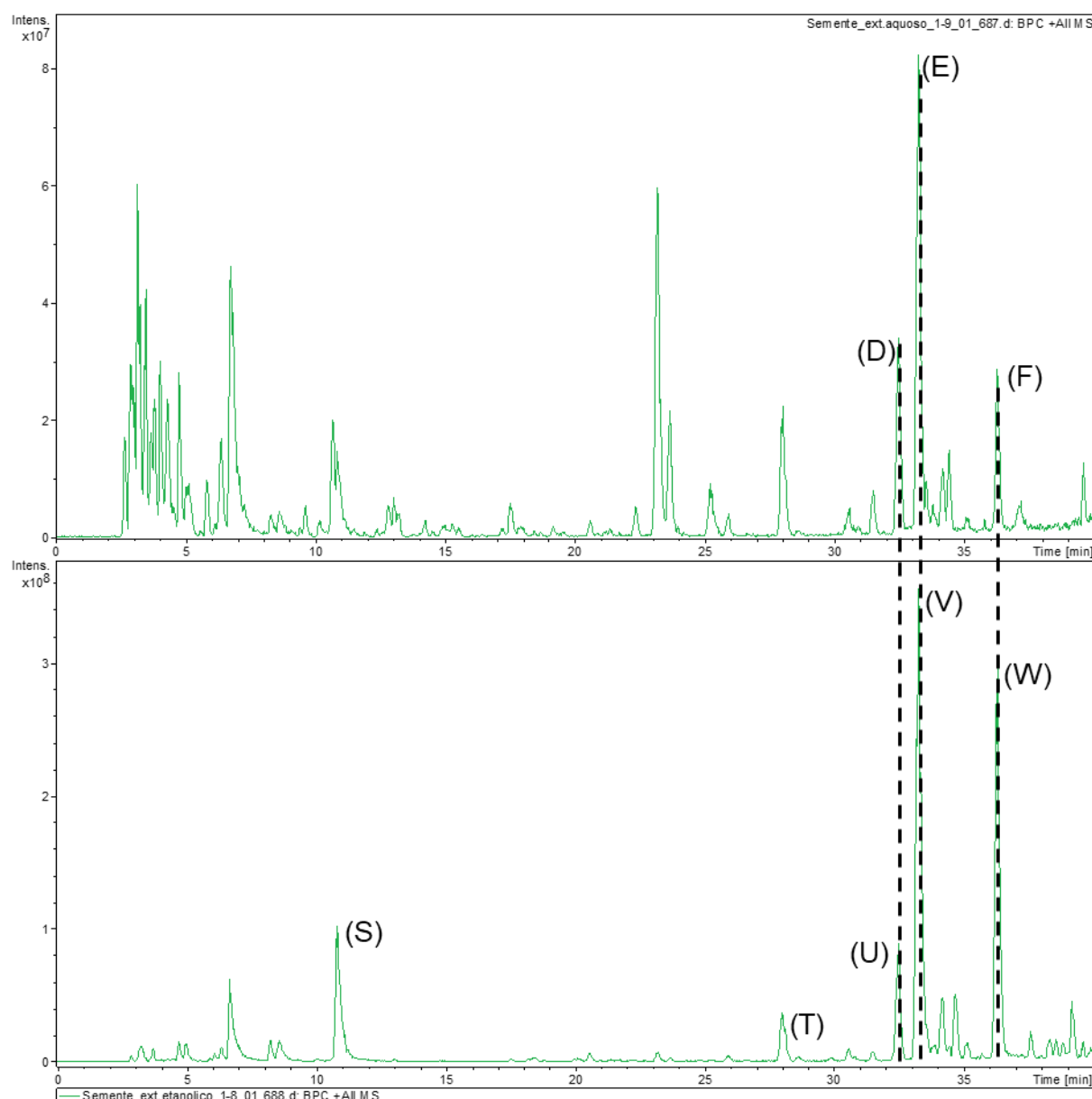


Fonte: elaborado pelo autor.

Os picos **(C)** e **(Q)** estão presentes em extratos diferentes, aquoso e etanólico, respectivamente, e possuem correspondência entre si, eluindo no mesmo tempo de retenção de 33,2 minutos. Com relação massa-carga de 423 e 223, foram identificados como a estirilpirona goniotalamina **(8)**. O pico **(R)**, com m/z 419 e m/z 221, eluiu em 36,3 minutos, e foi identificado como a estirilpirona 6-estiril-2-pirona **(9)**. O dado de UV-vis de **(C)** e **(Q)** está apresentado na Figura 33. O pico **(R)** apresenta mesmo padrão observado nos picos **(J)** e **(N)**.

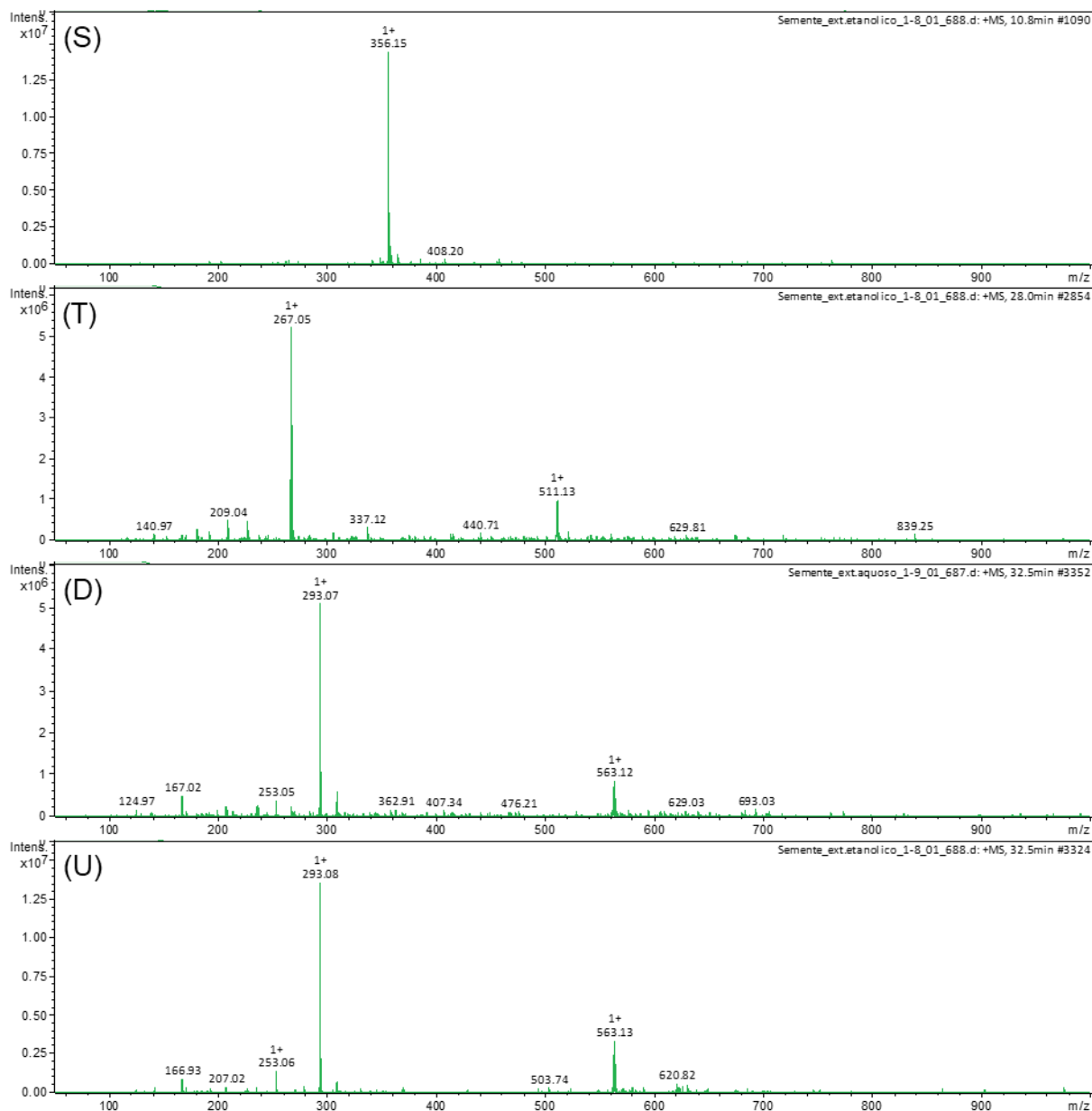
A seguir, as Figuras 34, 35, 36, 37 e 38 apresentam os dados obtidos referentes às sementes de *Cryptocarya moschata*.

Figura 34. Cromatograma do extrato aquoso (acima) e do extrato etanólico (abaixo) das sementes de *C. moschata*, obtidos por HPLC-MS (ESI-IT), modo positivo (BPC).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 35. Espectros MS para os picos S, T, D e U, dos extratos aquoso e etanólico das sementes de *C. moschata*.



Fonte: elaborado pelo autor.

O pico **(S)** possui tempo de retenção 10,8 minutos e um pico único em m/z 356, indicando que o extrato etanólico da semente possui os alcaloides aporfirínicos menisperina (**24**) e xantoplatina (**25**).

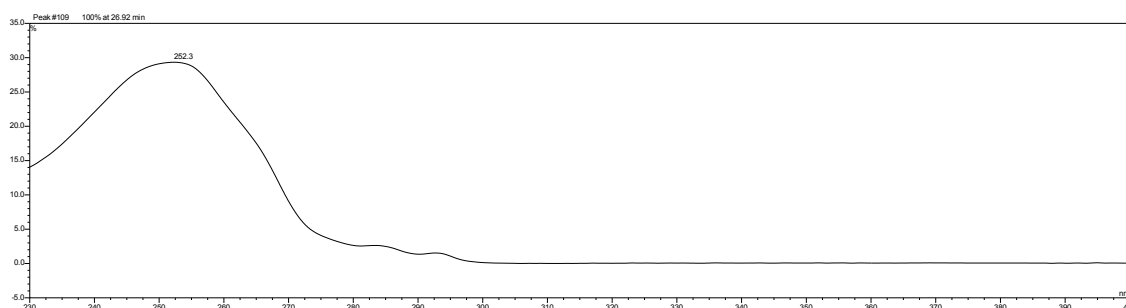
O pico **(T)** teve tempo de retenção 28,0 minutos e apresentou m/z 511 e m/z 267, que podem ser, respectivamente, $[2M+Na]^+$ e $[M+Na]^+$, para a substância desacetilcriptocarialactona (**4**). Esse pico também apresenta, em menor escala, os

picos m/z 227, m/z 209 e m/z 181 (Figura 35), que confirma a substância **(4)**, como proposto por Passareli (2014). Em sua proposta, m/z 227 é $[M+H-H_2O]^+$, m/z 209 é $[M+H-2H_2O]^+$ e m/z 181 é $[M+H-2H_2O-CO]^+$.

Os picos **(D)** e **(U)** estão nos extratos aquoso e etanólico, respectivamente. Apresentaram mesmo tempo de retenção de 32,5 minutos, e mesmo m/z de 563 e m/z 293, atribuídos a $[2M+Na]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente, que podem indicar 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona **(13)**.

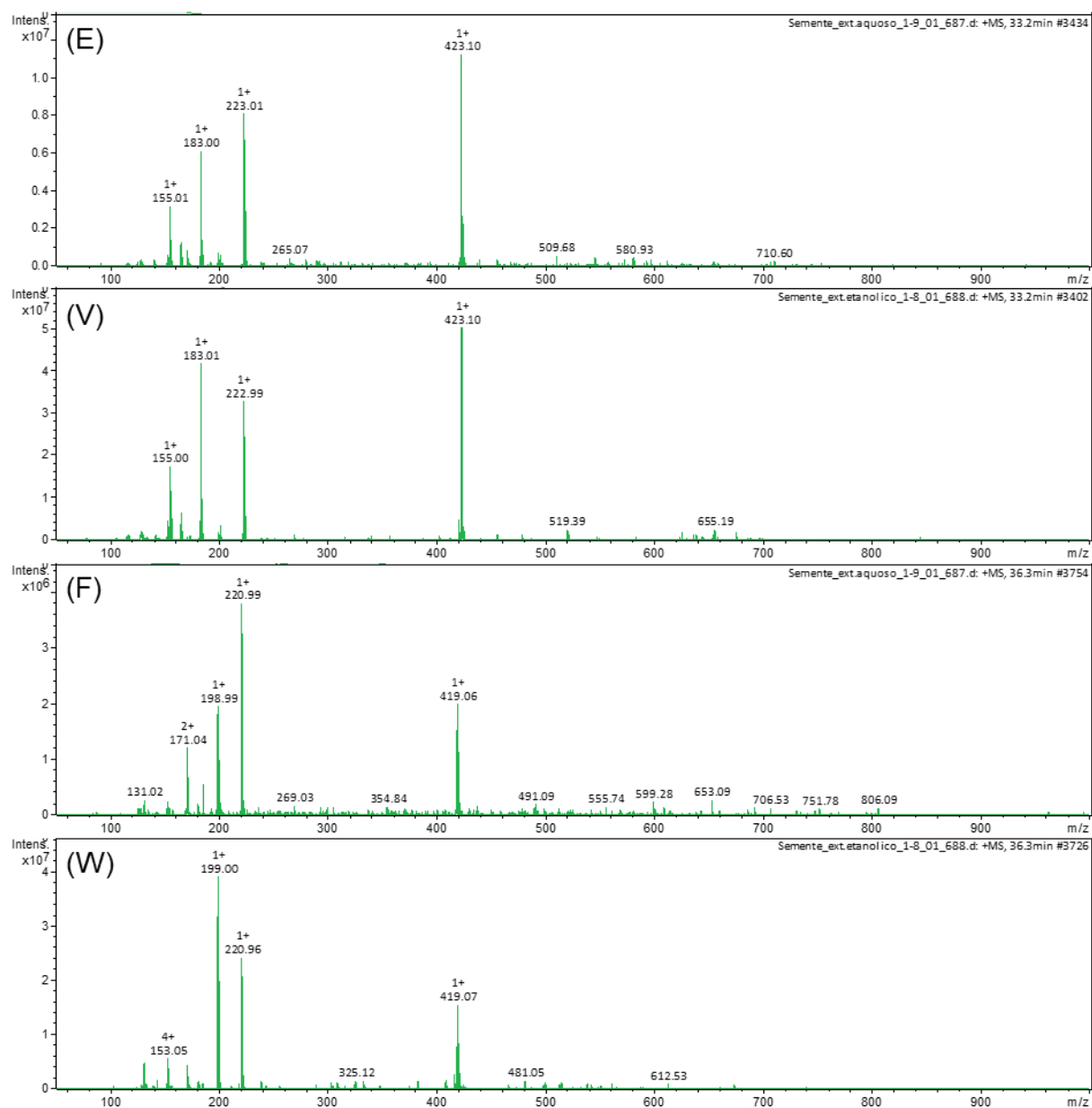
O espectro UV-vis referente à substância do pico **(D)** é mostrado na Figura 36. Os espectros de **(S)**, **(T)** e **(U)** não foram obtidos pois esses picos não se mostraram presentes na análise por UHPLC-DAD (Anexo I, Figura 46).

Figura 36. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato aquoso das sementes, para o pico D (composto 13, estirilpirona).



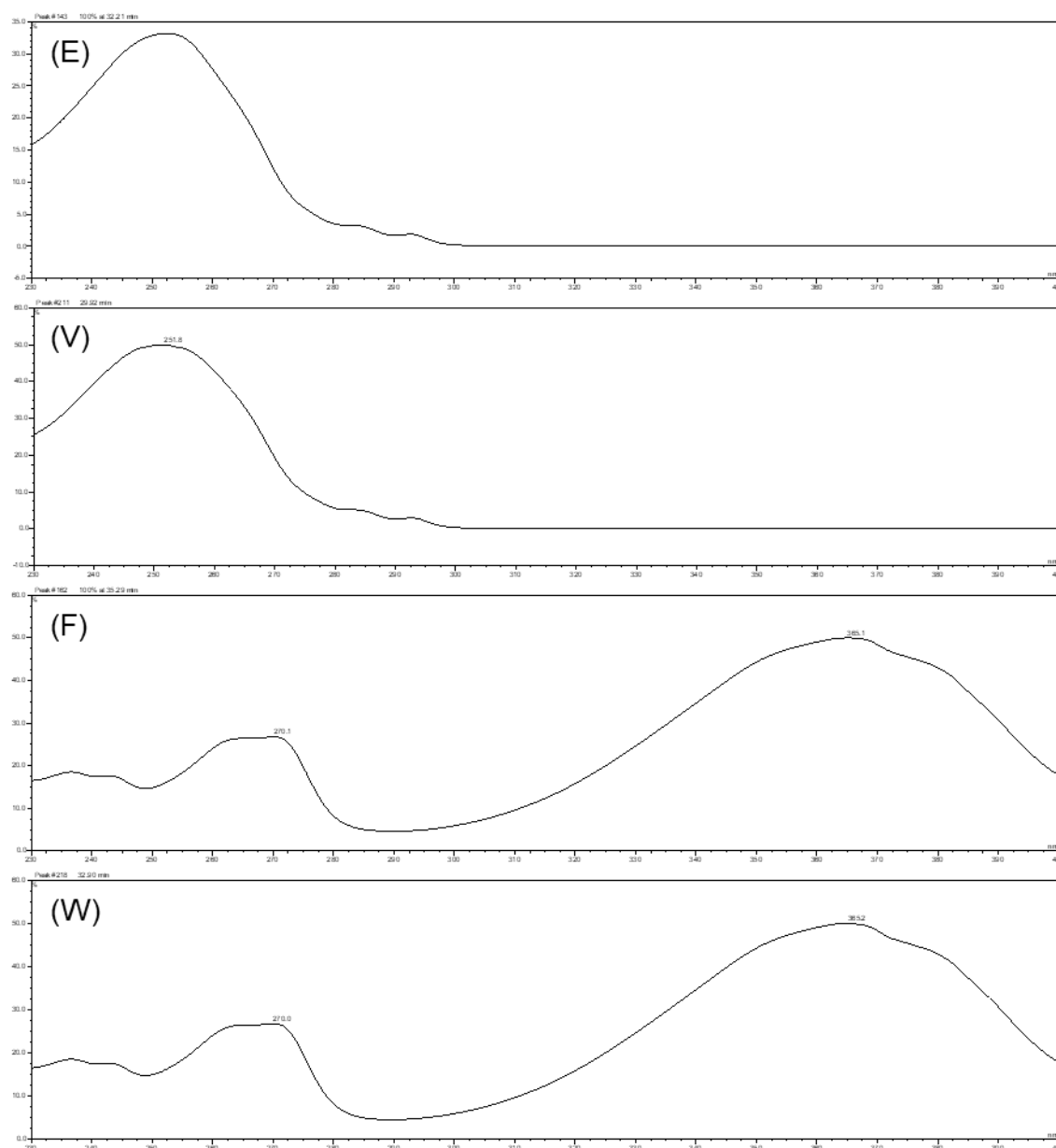
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 37. Espectros MS para os picos E, V, F e W, dos extratos aquoso e etanólico das sementes de *C. moschata*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 38. Espectro UV-vis em 254 nm, do extrato aquoso das sementes, para os picos E, V, F e W (compostos 8 e 9, estirilpironas).



Fonte: elaborado pelo autor.

Por último, é possível observar quatro picos **(E)**, **(V)**, **(F)** e **(W)**. Os dois primeiros e os dois últimos se correspondem entre si, apresentando mesmo tempo de retenção, de 33,2 e 36,3 minutos, respectivamente, e também mesma relação massa-carga, de 423 e 223 para **(E)** e **(V)** e de 419 e 221 para **(F)** e **(W)**. A hipótese é que **(E)** e **(V)** sejam a substância goniotalamina (**8**) e **(F)** e **(W)** a substância 6-estiril-2-pirona (**9**). Os dados referentes ao espectro UV-vis de **(E)** e **(F)** estão na Figura 38.

Mais uma vez apresenta-se um espectro característico em **(F)**, que é semelhante aos espectros dos picos **(J)**, **(N)** e **(R)**.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os dados condensados das substâncias identificadas e em quais órgãos da planta *C. moschata* apresentam-se esses compostos.

Tabela 4. Dados das substâncias que foram identificadas nos extratos aquosos e etanólicos de *Cryptocarya moschata*.

Nome	Tempo de retenção (min)	Massa molecular	Picos	m/z (HPLC-MS)
desacetilcriptocarialactona (4)	28,0	244,110	T	511 [2M+Na] ⁺ 267 [M+Na] ⁺ 227 [M+H-H ₂ O] ⁺ 209 [M+H-2H ₂ O] ⁺ 181 [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺
goniotalamina (8)	33,2	200,084	C, E, I, M, Q, V	423 [2M+Na] ⁺ 223 [M+Na] ⁺
6-estiril-2-pirona (9)	36,3	198,068	F, J, N, R, W	419 [2M+Na] ⁺ 221 [M+Na] ⁺
4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (13)	32,5	270,126	D, U	563 [2M+Na] ⁺ 293 [M+Na] ⁺
menisperina (24)	8,5 10,8	356,186	A, B, G, H, K, L, O, P, S	356 [M] ⁺
xantoplatina (25)	8,5 10,8	356,186	A, B, G, H, K, L, O, P, S	356 [M] ⁺

Tabela 5. Distribuição das substâncias identificadas nos vários órgãos estudados de *Cryptocarya moschata*.

Substância	Classe	Órgão da planta	Extrato
desacetilcriptocarialactona (4)	Estirilpirona	Sementes	Etanólico
		Tronco	Etanólico
		Folhas	Etanólico
goniotalamina (8)	Estirilpirona	Cascas das sementes	Aquoso e etanólico
		Sementes	Aquoso e etanólico
		Tronco	Etanólico
		Folhas	Etanólico
6-estiril-2-pirona (9)	Estirilpirona	Cascas das sementes	Aquoso e etanólico
		Sementes	Aquoso e etanólico
4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'- hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (13)	Estirilpirona	Sementes	Aquoso e etanólico
		Tronco	Etanólico
		Folhas	Aquoso e etanólico
menisperina (24)	Alcaloide	Cascas das sementes	Etanólico
		Sementes	Etanólico
		Tronco	Etanólico
		Folhas	Aquoso e etanólico
xantoplatina (25)	Alcaloide	Cascas das sementes	Etanólico
		Sementes	Etanólico

5 CONCLUSÃO

Os cromatogramas do tronco, folhas, cascas das sementes e sementes da *Cryptocarya moschata* mostraram-se de baixa complexidade. Apesar disso, foram encontradas substâncias com atividade biológica nesta espécie. Isso faz com que haja uma grande possibilidade e facilidade de obtenção dessas substâncias purificadas, podendo haver aplicação na indústria farmacêutica e/ou cosmética.

Analisando os dois detectores utilizados, DAD e MS, é possível concluir que o MS foi o mais adequado para este trabalho, visto que houve identificação mais picos quando comparado ao DAD. Porém as técnicas se complementam, de modo que é interessante a obtenção dos dois espectros, para uma identificação dos picos com maior confiabilidade.

Neste trabalho foram identificados dois alcaloides menisperina **(24)** e xantoplatina **(25)** e quatro estirilpironas desacetilcriptocarialactona **(4)**, goniotalamina **(8)**, 6-estiril-2-pirona **(9)** e 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona **(13)**, sendo que os dois alcaloides **(24)** e **(25)** e as estirilpironas **(8)** e **(9)** foram encontrados em todos os órgãos da planta estudados neste trabalho. Já os compostos **(4)** e **(13)** foram identificados apenas nas sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. J., BENDELL, D. J., GROUNDWATER, P. W. **Organic Spectroscopic Analysis**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004.

CAVALHEIRO, A. J., YOSHIDA, M. 6-[ω -arylalkenyl]-5,6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). **Phytochemistry**, vol. 53, p. 181-819, 2000.

CAMARGO, K. F. B. **Variabilidade intraespecífica de estirilpironas em quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana***: avaliação da produção em diferentes órgãos e em extratos enzimáticos. 2008. 245 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

CHIEN, A. L. T, PIHIE, A. H. L. Styrylpyrone Derivative Induces Apoptosis through the Up-Regulation of Bax in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. **BMB Reports**, vol. 36, Issue 3, p. 269-274, 2003.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 30 Set. 2017

GIOCONDO, Maísa Pasquotto. **Avaliação da atividade apoptótica de substância pura isolada de *Cryptocarya mandioccanna* em células de carcinoma cervical imortalizadas pelo papilomavirus humano (HPV)**. 61 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/89140>>. Acesso em: 02 Out. 2017.

HOLLER, F. J., SKOOG, D. A., CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2009.

INAYAT-HUSSAIN, S. H.; et al. Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniotalamin in HL-60 leukemia cells. **Toxicol In Vitro**. vol. 17, n. 4, p. 433-439, 2003.

MORAES, P. L. R. de. Taxonomy of *Cryptocarya* species of Brazil. **Abc Taxa**, vol. 3, p. 1-191, 2007.

NEHME, C. J., BASTOS, W. L., ARAÚJO, A. J., CAVALHEIRO, A. J. An HPLC-DAD method to analyse flavonoid glycoside and styrylpyrones from *Cryptocarya* species (Lauraceae). **Phytochemistry Analysis**, 16, p. 93–97, 2005.

SIMÕES, M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

PACHECO, S., et al. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, 2015, 7 (4), 1225-1271, 2015. Disponível em: < rvq.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=188&nomeArquivo=v7n4a13.pdf > Acesso em 04 Out. 2017

PASSARELI, F. **Estudo configuracional e espectrométrico de estilipironas de *Cryptocarya mandioccana* por RMN e ESI-MS/MS**. 108 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

TELASCREA, M. et al. **Fungitoxic substances isolated of *Cryptocarya moschata* and *C. aschersoniana* (Lauraceae) leaves.** In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY CHEMISTRY FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT AND SOCIAL INCLUSION, 28., 2005, Poços de Caldas.

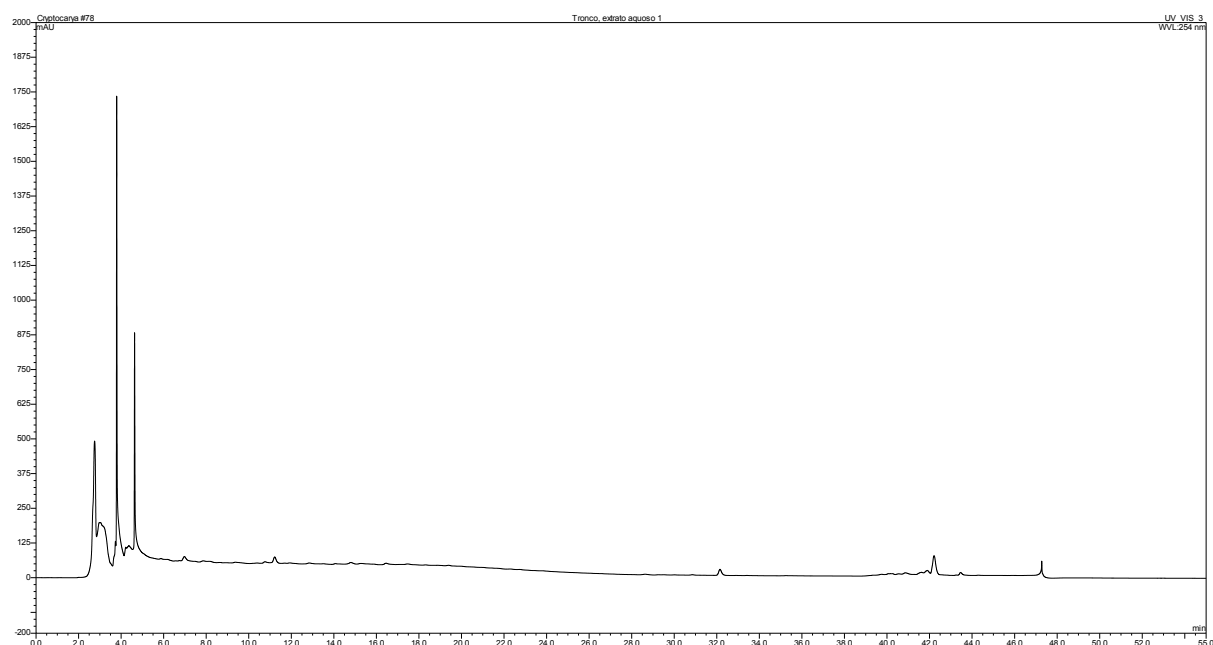
TIWARI, R., RANA, C. S. Plant secondary metabolites: review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, vol. 3, Issue 5, 2015. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/282733096_Plant_secondary_metabolites_a_review > Acesso em 04 Out. 2017.

ZONARO, V. A. **Análise de Estirilpironas de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-MS.** Tese (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

7 ANEXO I

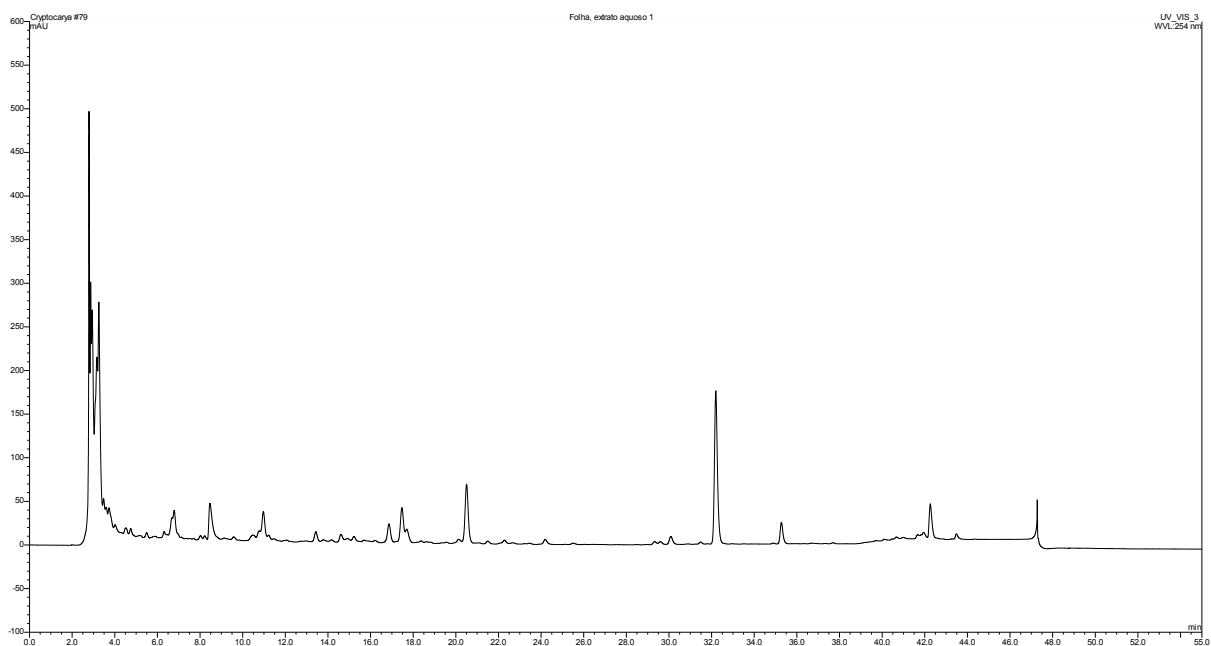
Neste anexo estão apresentados todos os cromatogramas obtidos a partir da análise de UHPLC-DAD das amostras da *Cryptocarya moschata*, sob as condições apresentadas na seção 3.3.

Figura 39. Cromatograma do extrato aquoso do tronco, obtido por UHPLC-DAD.



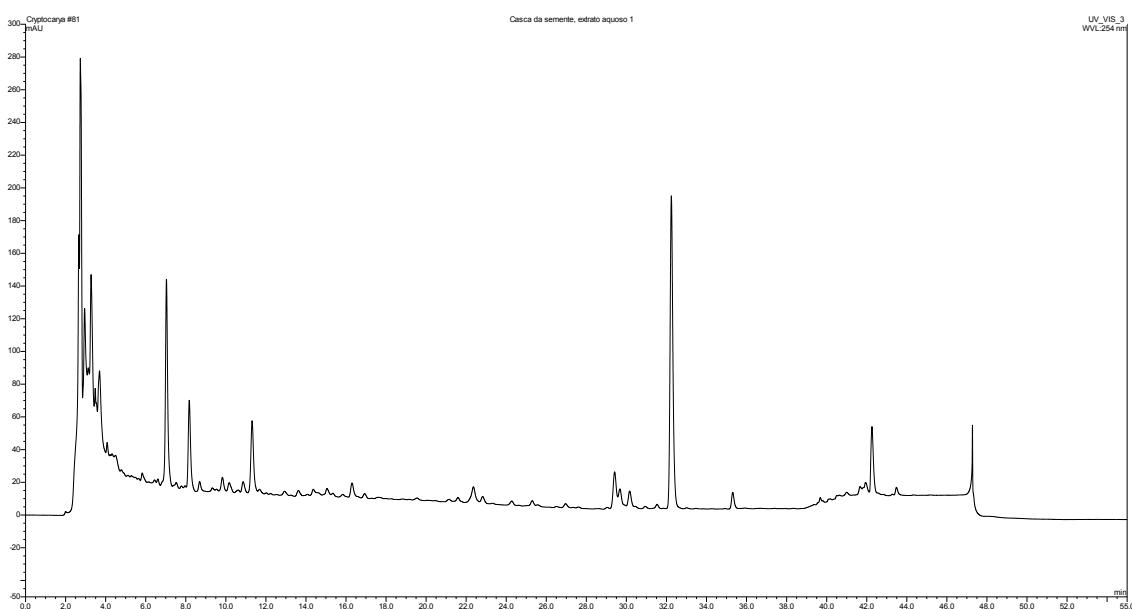
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 40. Cromatograma do extrato aquoso da folha, obtido por UHPLC-DAD.



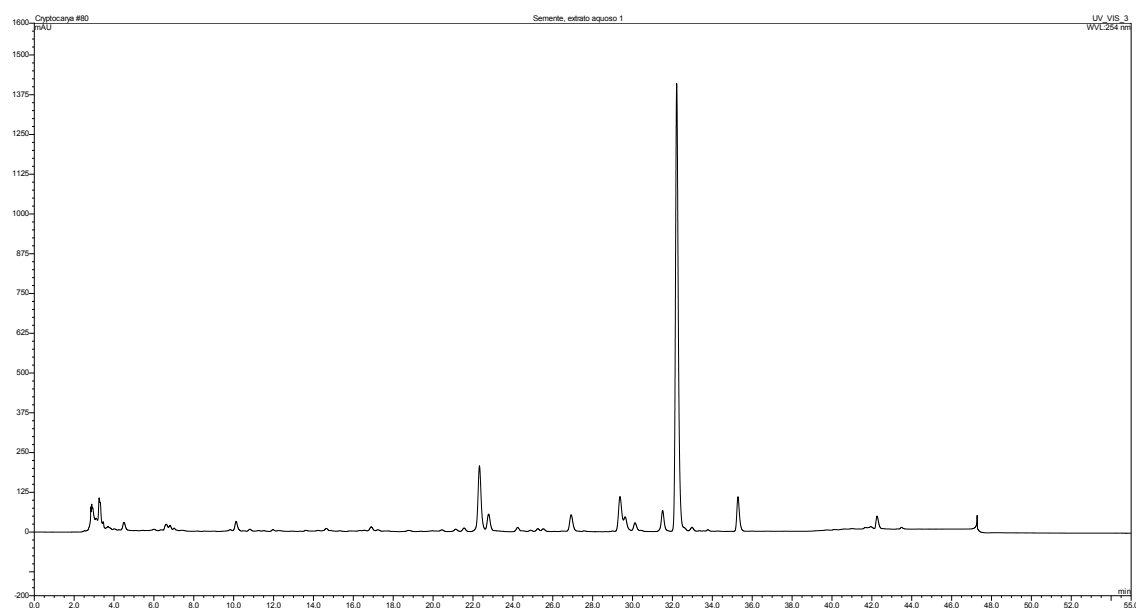
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 41. Cromatograma do extrato aquoso da casca da semente, obtido por UHPLC-DAD.



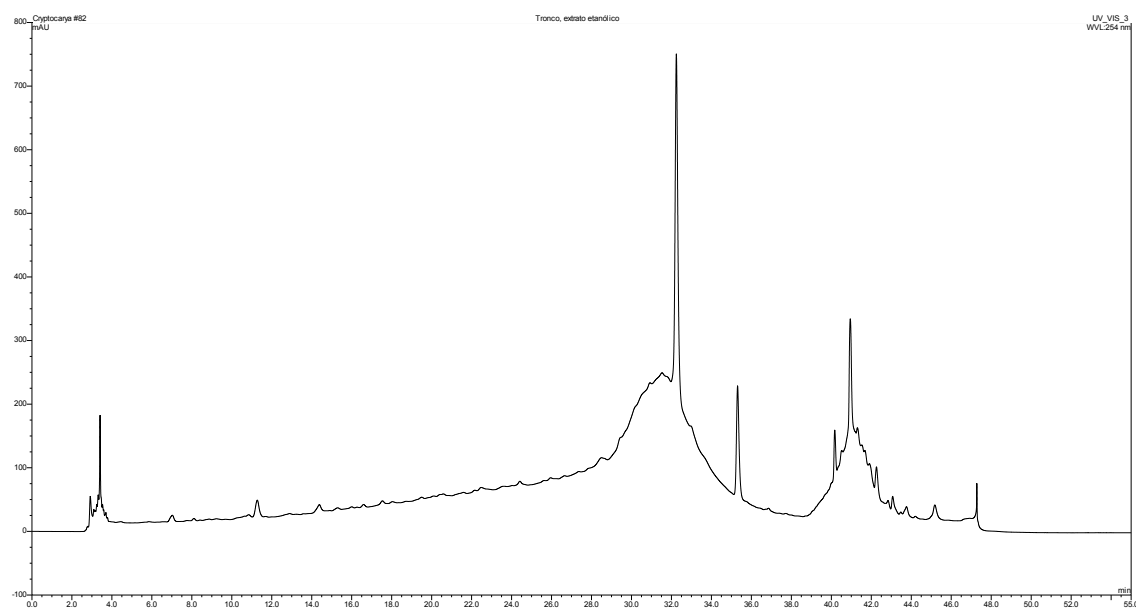
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 42. Cromatograma do extrato aquoso da semente, obtido por UHPLC-DAD.



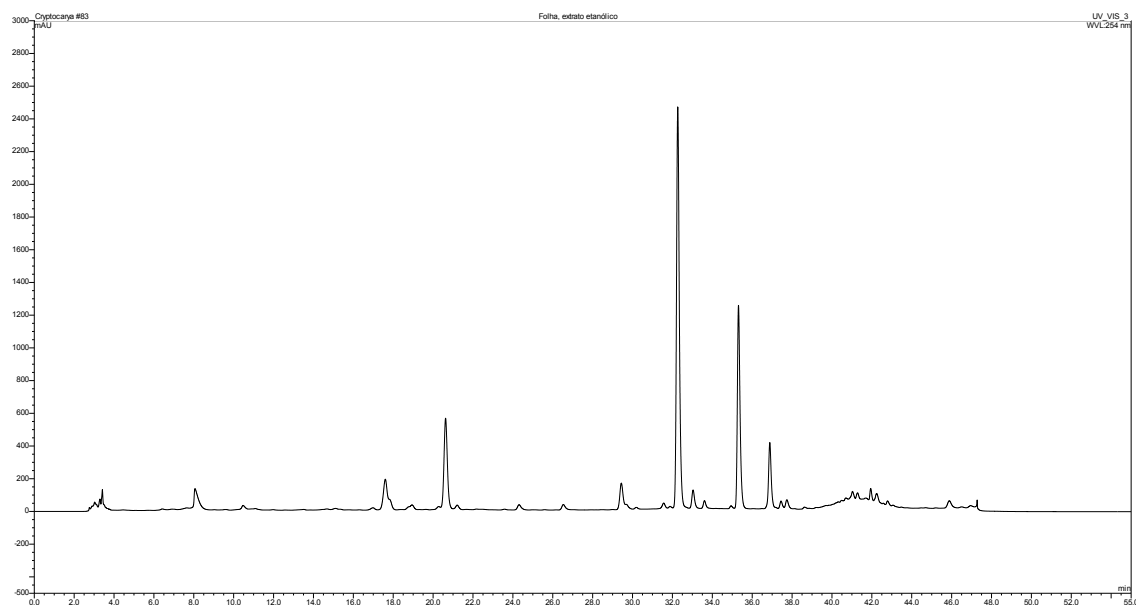
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 43. Cromatograma do extrato etanólico do tronco, obtido por UHPLC-DAD.



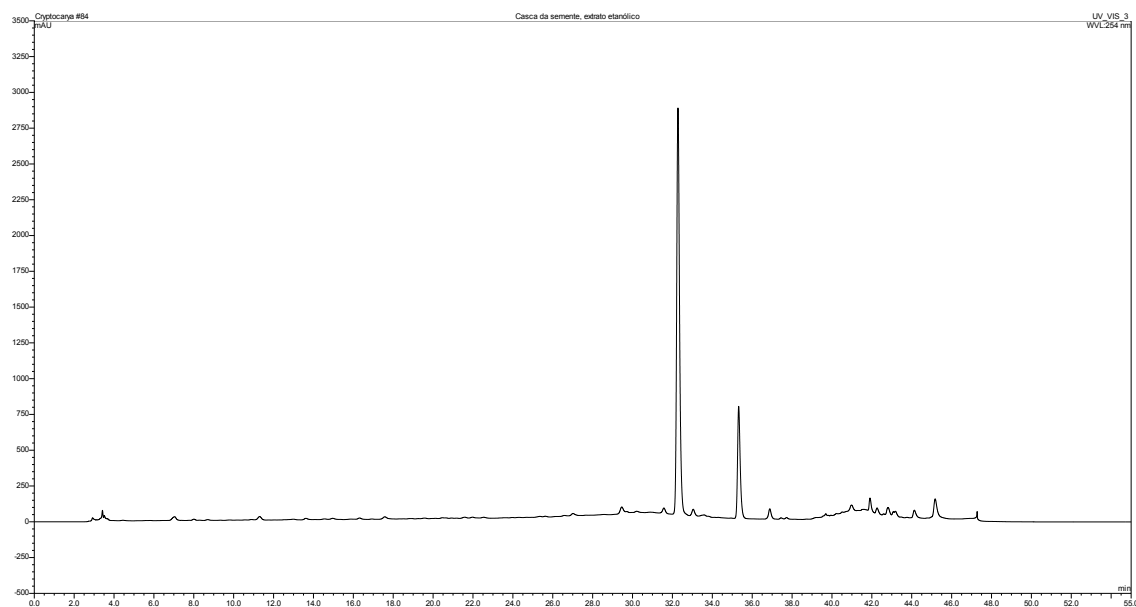
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 44. Cromatograma do extrato etanólico da folha, obtido por UHPLC-DAD.



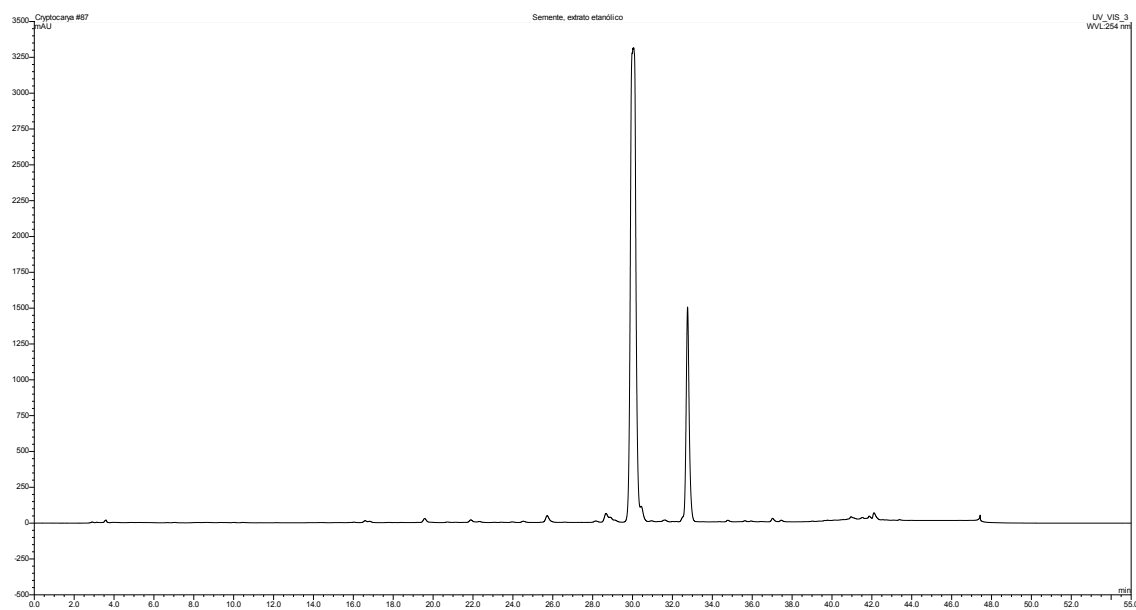
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 45. Cromatograma do extrato etanólico das cascas das sementes, obtido por UHPLC-DAD.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 46. Cromatograma do extrato etanólico das sementes, obtido por UHPLC-DAD.



Fonte: elaborado pelo autor.

Araraquara, de Janeiro de 2018.

Aluna

Gabriela Akemi Kosuji – RA 121110729

De acordo,

Orientador

Prof. Dr. Alberto José Cavalleiro

Departamento de Química Orgânica

Instituto de Química, UNESP, Araraquara