

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO FITOQUÍMICO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
Byrsonima spp. (MALPIGHIACEAE).

JOSÉ DE SOUSA LIMA NETO

ORIENTADOR: Prof. Dr. WAGNER VILEGAS

ARARAQUARA - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO FITOQUÍMICO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
Byrsonima spp. (MALPIGHIACEAE).

JOSÉ DE SOUSA LIMA NETO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, comoparte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. WAGNER VILEGAS

ARARAQUARA - SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- 732e** Lima Neto, José de Sousa
Estudo fitoquímico de extratos hidroalcoólicos de *Byrsonima* spp.
(MALPICHACEAE) / José de Sousa Lima Neto – Araraquara, 2014
186 f.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Wagner Vilegas
1. Byrsonima. 2. UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS. 3. Análise Multivariada. 4. Ácidos galolquínicos. 5. Flavonóides. I. Vilegas, Wagner, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedico estes anos de trabalho à minha família por me
amar incondicionalmente e ao futuro, pois só ele pode me
contradizer se tudo isso valeu mesmo a pena.

Agradecimentos

A Deus, por ser ele e por fazer as pazes comigo. Desculpe-me qualquer coisa.

À minha mãe, minha amiga, meu amor, vida e pilar. À senhora sempre me guiou mostrando que a vida é tudo de mais precioso que tenho e o futuro que a senhora deseja para mim é algo belo e especial. Te amo.

Ao meu amado pai, que sempre me apoiou nessa jornada, nunca questionando ou pedindo algo em troca. Pai, sempre o amei muito e quero passar meus dias ao seu lado. Te amo.

Aos meus queridos padrinho e madrinha pelo carinho, atenção e ensinamentos.

Ao querido tio João pelo carinho e cuidados.

Às minhas irmãs pelo carinho, preocupação e companheirismo nesta vida acadêmica, vocês se mostraram mais importantes, mais que tudo nesses dias difíceis.

Aos meus parentes, especialmente, aos meus primos, Luis, Dan e a garota Global, Lia, por sempre se manterem por perto, apoiando-me.

À Cláudia, por sempre, sempre me apoiar, criticar, torcer e nunca desistir de mim. Você foi e é meu anjo da guarda, sempre cuidando da alma deste perdido. Te Amo e espero que o futuro seja abençoado para nós.

Ao Prof. Wagner Vilegas pela oportunidade de novos desafios e aprendizado

Ao Prof. Jean-Luc Wolfender pelo apreço, atenção e por permitir meu estágio em seu laboratório.

Ao Prof. Emerson Queiroz por me ensinar os difíceis caminhos da pesquisa em produtos naturais.

À Prof.^a Lourdes Campaner pela amizade e carinho.

Aos professores: Taís, Eliana, Luís Vitor, Hérica, Luís Octavio, Ian, Alberto, Vanderlan, Angela, Lúcia e Isabele que de alguma forma influenciaram meu trabalho e vivência no doutorado.

Ao Jardes, Marcão e Zé Rena, amigos queridos, espero que continuemos amigos sempre.

À Maria do Socorro por estar do lado e sempre me apoiando.

Ao querido amigo Juliano por sempre se preocupar. Cara, você sempre vai ser um irmão pra mim.

A todos os colegas do laboratório de Fitoquímica: Aline, Fabiana, Fabiano, Leonardo, Luisa, Marcelo Tangerina, Cássia, Maria do Socorro, Felipe, Samara, Carlos, Natália,

Magela, Cíntia, Silvia, Thiago, Raíssa, Cate Nogueira, Laís, Luiz Leonardo, Marcelo Dias, Leonice, Maiara, Marcelo Amorim, Vinícius Ferreira, Mírian, Vinícius Garcia, Guilherme e Carlos pela amizade e convivência.

Amigos da Suíça: Natalie, Soura, Quentin, Natalie, Emanuela, Antonio, Mark, Luis e Rosário. Vocês abrandaram muito a saudade do Brasil e foram grandes amigos.

Aos Alunos que orientei no laboratório: Samara, Mirian, Lílían, Naiara, Danilo, Cris, Wesley, Bruno e Yuri. Vocês me ensinaram a ser mais responsável e se pude contribuir com algo na vida de vocês, fica honrado por ter feito isso.

Aos amigos do Quartel, você mais que todos foram importantes para que eu pudesse ter novos amigos e não desistir antes do prazo.

Aos Amigos Xurupitenses: Monstro, Cavalo, Bola, Ralph, Cagão, Diva, Chupeta, Garibaldo, Husky, Marcelão, Buda, Gota e Shrek, vocês tornaram mais fácil meu retorno a Araraquara e nós curtimos muito! Sempre terão um amigo aqui em mim.

Aos amigos do Piauí, por não esquecerem de mim, nunca esqueci de vocês.

Às queridas Cláudia Molina (Sec. PGF) e Angela (Sec. DQO) por estarem sempre dispostas a ajudar e resolver os problemas causados por mim.

A todos os funcionários da Secretária da Pós-Graduação da Farmácia e Química, bem como todos os funcionários da FCFAR e IQ.

Ao Alberto e ao Ademir, especialmente a amiga Marília do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, pelas análises e companherismo.

Ao Dr. Nivaldo Borallo, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela acolhida e incentivo à vida acadêmica.

Ao Instituto de Química que apoiou plenamente todo meu trabalho e que contribuiu muito para minha formação.

A Capes, ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo suporte financeiro.

A todos que aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada!

Uma mente que suporta insultos, desastres e não teme corrigir o errado,
É uma mente que não está sujeita a corrupção,
Seja de ideias ou de ações.

(José de Sousa Lima Neto)

RESUMO

A fim de atender algumas necessidades da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, implantada visando o tratamento de doenças e minimizar impactos no seu financiamento, a busca de novas espécies de plantas medicinais que possam integrar esta política ao Sistema Único de Saúde, devendo estar aliada as necessidades das comunidades, aos conhecimentos populares e científicos. O gênero *Byrsonima* é amplamente distribuído nas regiões brasileiras, é empregado na medicina popular, principalmente no tratamento de problemas gastrointestinais e infecções, por possuir uma rica composição química, pautada principalmente em substâncias fenólicas, como ácidos derivados do ácido gálico e flavonoides. Este trabalho buscou a identificação e o isolamento destas substâncias em extratos hidroalcoólicos das folhas de seis espécies do gênero: *Byrsonima corneifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. fagifolia*, *B. intermedia*, *B. ligustrifolia* e *B. verbascifolia*, bem como a busca de novas substâncias pela técnica UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS e o uso de análises multivariadas para estabelecer possíveis similaridades entre as espécies com o estudo dos extratos por UHPLC-ESI-TOF-MS e das substâncias isoladas e identificadas. A partir de uma mistura dos extratos das seis espécies de *Byrsonima* escolhidas para este estudo, obtiveram-se nove substâncias, duas destas, ainda não isoladas e/ou identificadas no gênero: β -glucogalina (**BM-1**) e ácido 1,3-O-digaloil-quínico (**BM-5**) e outras sete já identificadas: ácido-5-O-galoil-quínico (**BM-2**), ácido-4-O-galoil-quínico (**BM-3**), ácido gálico (**BM-4**), ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico (**BM-6**), ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico (**BM-7**), quercetina-3-O-galactopiranosídeo (**BM-8**) e quercetina-3-O-ramnopiranosídeo, (**BM-9**). O estudo por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS possibilitou detectar sessenta e nove substâncias e destas, identificar quarenta e uma, evidenciando pela primeira vez a presença de metabólitos secundários nitrogenados no gênero *Byrsonima*, e outras seis novas substâncias no gênero: o ácido 3-(3, 4- diidroxifenil)-lactil-2-O-quínico (**P22**), a apigenina-8-C-hexosídeo (**P18**); a apigenina-6-C-hexosídeo (**P25**), apigenina-7-C-hexosídeo (**P28**), diidromaentoflavona (**P55**) e o tricalisiosídeo J (**P60**). A análise por UHPLC-ESI-TOF-MS possibilitou determinar as abundâncias relativas das substâncias isoladas em cada extrato, além disso, por esta mesma técnica, foi possível realizar a análise das componentes principais (PCA) e de agrupamento hierárquico (HCA). Esta análise evidenciou haver uma forte correlação da espécie *B. fagifolia* com substâncias derivadas dos ácidos-O-galoilquínicos, o que a diferencia das demais, enquanto que a espécie *B. coccolobifolia* correlacionou-se com quercetina-3-O-ramnopiranosídeo. Substâncias identificadas neste estudo, como o ácido quínico (**P1**), a catequina (**P10**) e a amentoflavona (**P52**) se mostraram como características de *B. verbascifolia*, enquanto que as demais espécies *B. corneifolia*, *B. intermedia* e *B. ligustrifolia* (as mais semelhantes das seis espécies estudadas) correlacionaram-se pela presença de substâncias derivadas da quercetina, como a quercetina-3-O-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo (**P33**) e quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo (**P38**) e outras substâncias como a proantocianidia-B-2'-O-galato (**P17**), o ácido 3,4,5-trigaloil-O-quínico e o tricalisiosídeo J (**P60**).

Palavras-chave: *Byrsonima*; UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS; UHPLC-ESI-TOF-MS; Malpighiaceae; Análise multivariada.

ABSTRACT

For serves some needs of the National Policy of Medicinal plants and Phytoterapcis, implanted it for treatment of chronic diseases and minimize the financial impact, the search for new species of the medicinal plants that can integrate the Sistema Único de Saúde (SUS), is a constant, and this search should be allied the communities needs, popular and scientific knowledge. *Byrsonima* genus is largely distributed in the Brazilian regions and used in popular medicine, particularly in gastrointestinal problems and infections, for having chemical composition rich in phenolic compounds as acids derived from gallic acid and flavonoids. This study describes the identification and isolation of these compounds in hydroalcoholic extracts of six species of the genus: *B. correifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. fagifolia*, *B. intermedia*, *B. ligustrifolia* and *B. verbascifolia* (Malpighiaceae) and search for news compounds by UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS technique combined with the use of multivariate analysis to determine the similarities between six species by study of extracts by UHPLC-ESI-TOF-MS and using also isolated and identified compounds data. From a mixture of six extracts studied, were isolated nine compounds, two not yet isolated in the genus *Byrsonima*: β -glucogallin (**BM-1**) and 1,3-O-digalloyl-quinic acid (**BM-5**) and others seven compounds already identified: acid-5-O-galloyl-quinic (**BM-2**), acid-4-O-galloyl-quinic (**BM-3**), gallic acid (**BM-4**), 3,4,5-O-trigalloil-quinic acid (**BM-6**), acid, 1,3,4,5-O-tetragalloyl-quinic (**BM-7**), quercetin-3-O-galactopyranoside (**BM-8**) and and quercetin-3-O-rhamnopyranoside (**BM-9**). The study by UHPLC-PDA-TOF-MS detected sixty nine compounds and identified forty-one compounds, showing for the first time the presence of nitrogenous secondary metabolites in *Byrsonima* genus, and six new compounds in the genus: 3-(3,4-diidroxifenil)-O-lactyl-2-quinic (**P22**), apigenin-8-C-hexoside (**P18**), apigenin-6-C-hexoside (**P25**), apigenin-7-C-hexoside e (**P28**) dihydroamentoflavone (**P55**) and tricalisioside J (**P60**). Analysis by UHPLC-TOF-MS determined the relative abundances of the isolated compounds in each extract, furthermore, by this same technique, was possible to perform the principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering (HCA). This analysis showed there is a strong correlation of the specie *B. fagifolia* with compounds derived from the acid-O-galloyll-quinic, distinguishes it from the other, while the specie *B. coccolobifolia* correlated with quercetin-3-O-rhamnopyranoside. The compounds identified in this study, as quinic acid (**P1**), catechin (**P10**) and amentoflavone (**P52**) were as characteristic of *B. verbascifolia*, while the other species, *B. correifolia*, *B. intermedia* and *B. ligustrifolia* are most similar of all six species, and these species correlated with compounds derived from quercetin such as quercetin-3-O-galactopyranoside, quercetin-3-O- α -arabinopyranosyl (**P33**) and quercetin-3-O-(2"-galloyl)- α -arabinopyranosyl (**P38**) and other compounds with proanthocyanidin-B-2'-O-gallate (**P17**), acid 3,4,5-O-trigalloyl-quinic and tricalisioside J.

Keywords: *Byrsonima*; UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS; UHPLC-ESI-TOF-MS; Malpighiaceae; Multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies de <i>Byrsonima</i> , leitura em $\lambda = 254$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2.).	48
2	Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies de <i>Byrsonima</i> , leitura em $\lambda = 280$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2.).	49
3	Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies de <i>Byrsonima</i> , leitura em $\lambda = 366$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2.).	50
4	Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de espécies de <i>Byrsonima correifolia</i> (A), <i>Byrsonima coccolobifolia</i> (B) e <i>Byrsonima fagifolia</i> (C), em $\lambda = 280$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2). ..	52
5	Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies <i>Byrsonima correifolia</i> (1), <i>Byrsonima coccolobifolia</i> (2) e <i>Byrsonima fagifolia</i> (3) e <i>Byrsonima ligustrifolia</i> (3), leitura realizada em $\lambda = 254$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2).	53
6	Perfil cromatográfico de BM após a otimização de separação das substâncias químicas em diferentes colunas cromatográficas utilizadas em CLAE-DAD. (vide condições cromatográficas: Tabela 1.	55
7	A) Gradiente utilizado na CLMP para separação dos constituintes químicos da mistura de extratos de <i>Byrsonima</i> . B – Perfil cromatográfico obtido na coluna de CLMP de acordo com gráfico 7A (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.7).	56
8	Distribuição das frações selecionadas para CLAES-UV no cromatograma obtido no fracionamento do extrato BM por CLMP.	56
9	Fluxograma da mistura dos extratos hidroalcoólicos de espécies de <i>Byrsonima</i> e frações obtidas por CLMP, com posterior isolamento por CLAES-UV.	57
10	Perfis cromatográficos das frações selecionadas para CLAES-UV. Leitura $\lambda = 254$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.8.).	57
11	A) Cromatograma de BM-1 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 6,93$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	59
12	Espectro de massas primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do íon precursor de m/z 331, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10)	60

Figura		Página
13	Estrutura química de BM-1.	61
14	A) Cromatograma de BM-2 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 3,58$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	63
15	Espectro de massas do íon precursor de m/z 343, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 343; (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10).	64
16	Estrutura química de BM-2.	65
17	A) Cromatograma de BM-3 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 10,86$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	66
18	Espectro de massas do íon precursor de m/z 343, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10).	66
19	Estrutura química de BM-3.	67
20	Estrutura química de BM-4.	69
21	A) Cromatograma de BM-5 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 19,54$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	71
22	Espectro de massas do íon precursor de m/z 495, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).	71
23	Estrutura química de BM-5.	72
24	A) Cromatograma de BM-6 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 19,11$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	73
25	Estrutura química de BM-6.	74
26	Espectro de massas do íon precursor de m/z 647, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor; D) quarta-ordem do íon precursor (MS^4). (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).	75
27	A) Cromatograma de BM-7 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 14,81$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	77

Figura		Página
28	Espectro de massas do íon precursor de m/z 799, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor; D) quarta-ordem do íon precursor (MS^4). (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).	78
29	Estrutura química de BM-7.	79
30	A) Cromatograma de BM-8 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 25,27\text{min.}$). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	82
31	Espectro de massas do íon precursor de m/z 463, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).	83
32	Estrutura química de BM-8.	84
33	A) Cromatograma de BM-9 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 29,59\text{ min.}$). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	86
34	Espectro de massas do íon precursor de m/z 447, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> ; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	87
35	Estrutura química de BM-9.	89
36	Espectro de massas de segunda ordem (MS^2) do íon percussor m/z 191, obtidos em modo negativo com energia de colisão de 30%.	99
37	A) Espectro de massas do íon precursor de m/z 169, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%; B) Espectro no UV do ácido gálico. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	99
38	Espectros de massas do íon precursor de m/z 197, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 197; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 169; C) Espectro no UV.	100
39	Espectro de massas do íon precursor de m/z 799, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 799; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 647; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 495; D) quinta-ordem (MS^5) do íon produto de m/z 343. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	101

Figura		Página
40	Espectro de massas do íon precursor de m/z 647, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 647; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 495; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 343. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	102
41	Espectro de íons totais da fragmentação da série de ácidos galoilquínicos: m/z 495 do $[M - H]^-$ do ácido digaloilquínico, seguido de duas perdas sucessivas de $[M - 152 - H]^-$ originando m/z 343 do ácido monogaloilquínico, e posteriormente o m/z 191 do ácido quínico. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.)......	103
42	Espectro de íons totais da fragmentação da série de ácidos galoilquínicos: m/z 343 do $[M - H]^-$ do ácido monogaloilquínico, seguido de duas perdas sucessivas de $[M - 152 - H]^-$ originando m/z 191 ácido quínico. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	103
43	A) Espectro no UV da catequina; Espectro de massas do íon precursor de m/z 289, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 289; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 245; (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	105
44	A) Espectro de massas do íon precursor de m/z 577, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%; B) Espectro no UV da proantocinidina. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	106
45	Espectro de massas do íon precursor de m/z 729, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 729; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 577; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 451; D) Espectro no UV. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	107
46	A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 463 ($T_R = 5,4$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	108
47	A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 615 ($T_R = 3,59$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	109

Figura		Página
48	Espectro de massas do íon precursor de m/z 615, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 615; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 463; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 301. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	109
49	A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 537 ($T_R = 11,5$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	110
50	A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 585 ($T_R = 6,52$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	111
51	Espectro de massas do íon precursor de m/z 585, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 585; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 433. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	111
52	Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 433 ($T_R = 6,02$ min.) e espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	112
53	Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 447 ($T_R = 6,40$ min.) e espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.	113
54	Espectro de massas do íon precursor de m/z 599, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 599; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 447. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	113
55	Espectro de massas do íon precursor de m/z 431, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 431; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 311; C) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 431; D) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 311. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	115
56	Espectro de massas do íon precursor de m/z 609, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%, espectro de segunda-ordem (MS^2). (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).	115
57	Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS das substâncias BM-1 a BM-9.	117
58	Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS das substâncias isoladas P10, P17, P23 e P38.	117

Figura		Página
59	Distribuição das substâncias isoladas e selecionadas, nas espécies de <i>Byrsonima</i> , de acordo com os percentuais da média relativa da área do pico.	119
60	Gráficos dos pesos das componentes principais referentes aos extratos das espécies estudadas: A – CP1 <i>versus</i> CP2; B - CP1 <i>versus</i> CP3; C – CP2 <i>versus</i> CP3.	125
61	Gráficos dos escores das componentes principais referentes às massas das substâncias presentes nos extratos das espécies estudadas: A – CP1 <i>versus</i> CP2; B - CP1 <i>versus</i> CP3; C – CP2 <i>versus</i> CP3.	126
62	Gráficos dos pesos das componentes principais referentes às substâncias da Tabela 10: A – CP1 <i>versus</i> CP2; B - CP1 <i>versus</i> CP3; C - CP1 <i>versus</i> CP4; D - CP1 <i>versus</i> CP5; E - CP1 <i>versus</i> CP6; F – CP3 <i>versus</i> CP6.	130
63	Gráficos dos escores das componentes principais referentes às substâncias da Tabela 10: A – CP1 <i>versus</i> CP2; B - CP1 <i>versus</i> CP3; C - CP1 <i>versus</i> CP4; D - CP1 <i>versus</i> CP5; E - CP1 <i>versus</i> CP6; F – CP3 <i>versus</i> CP6.	131
64	Dendograma da análise por agrupamento hierárquico dos valores de massas obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS, das seis espécies do gênero <i>Byrsonima</i>	134
65	Estruturas químicas das substâncias isoladas.	148
66	Substâncias identificadas por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS ou UHPLC-ESI-TOF-MS nos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de <i>Byrsonima</i> estudadas, utilizadas nas análises estatísticas multivariadas, conforme a Tabela 10.	149
67	Espectro de RMN DE ^1H de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	151
68	Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	152
69	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	152
70	Espectro de RMN de correlações entre HMBC de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	153
71	Espectro de RMN de correlações entre HSQC de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	153
72	Espectro de RMN DE ^1H de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	154
73	Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	155
74	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	155
75	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).	156

Figura		Página
76	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-2 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	156
77	Espectro de RMN DE ¹ H de BM-3 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	157
78	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-3 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	158
79	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-3 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	158
80	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-3 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	159
81	Espectro de RMN DE ¹ H de BM-4 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	159
82	Espectro de RMN de ¹³ C APT de BM-4 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	160
83	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-4 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	160
84	Espectro de RMN ¹ H de BM-5 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	161
85	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-5 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	162
86	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-5 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	162
87	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-5 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	163
88	Espectro de RMN DE ¹ H de BM-6 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	164
89	Espectro de RMN de ¹³ C APT de BM-6 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	165
90	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-6 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	165
91	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-6 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	166
92	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-6 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	166
93	Espectro de RMN de correlações NOESY de BM-6 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	167
94	Espectro de RMN DE ¹ H de BM-7 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	168
95	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-7 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	169
96	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-7 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	169
97	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-7 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	170

Figura		Página
98	Espectro de RMN de correlações NOESY de BM-7 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	170
99	Espectro de RMN de ¹ H de BM-8 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	171
100	Espectro de RMN de ¹³ C APT de BM-8 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	172
101	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-8 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	172
102	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-8 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	173
103	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-8 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	173
104	Espectro de RMN 1D – TOCSY da substância de BM-8, irradiado em δ5,32 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	174
105	Espectro de RMN de ¹ H de BM-9 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	175
106	Espectro de RMN de ¹³ C APT de BM-9 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	176
107	Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-9 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	176
108	Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-9 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	177
109	Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-9 (DMSO-d ₆ ; 11,7T).	177
110	Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Byrsonima correfolia</i> . (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).	178
111	Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> . (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).	179
112	Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Byrsonima fagifolia</i> . (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).	180
113	Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> . (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).	181
114	Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Byrsonima ligustrifolia</i> . (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).	182
115	Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Byrsonima verbascifolia</i> . (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).	183
116	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato hidroalcoólico de <i>B. correfolia</i> avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).	184

Figura		Página
117	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato hidroalcoólico de <i>B. coccolobifolia</i> avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).	184
118	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato hidroalcoólico de <i>B. fagifolia</i> avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).	185
119	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato hidroalcoólico de <i>B. intermedia</i> avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).	185
120	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato hidroalcoólico de <i>B. ligustrifolia</i> avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).	186
121	Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , do extrato hidroalcoólico de <i>B. verbascifolia</i> avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).	186

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Condições cromatográficas utilizadas na otimização da separação dos constituintes químicos da mistura de extratos hidroalcoólicos tratados em coluna de Poliamida-6, com respectiva transposição das condições para coluna utilizada na cromatografia líquida de media pressão (CLMP).	54
2 Substâncias isoladas por CLAES-UV, com respectivas frações de origem e massas obtidas de cada substância.	58
3 Dados de RMN ¹ H, APT (δ , DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T) e correlações COSY, HMBC e HSQC da substância BM-1.	62
4 Dados de RMN ¹ H, APT (δ , DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T) e correlações COSY, HMBC das substâncias BM-2 e BM-3.	68
5 Dados de RMN ¹ H, (δ , DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T) e correlações HMBC das substâncias BM-4.	70
6 Dados de RMN ¹ H e APT (δ , DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T) e correlações COSY e HMBC das substâncias BM-5 e BM-6.	76
7 Deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ¹ H e correlações HSQC e HMBC das substâncias BM-7 (δ – ppm, DMSO- <i>d</i> ₆).	80
8 Deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C APT, correlações HSQC e HMBC das substâncias BM-8 (δ – ppm, CD ₃ OD).	85
9 Deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C APT, correlações HSQC e HMBC das substâncias BM-9 (δ – ppm, CD ₃ OD).	88
10 Substâncias identificadas nos extratos de espécies de <i>Byrsonima</i> analisados por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS.	93
11 Valores de massas obtidas por UHPLC-ESI-TOF-MS das substâncias isoladas e selecionadas para determinação das abundâncias relativas de cada uma delas nas espécies de <i>Byrsonima</i>	118
12 Média dos pesos das variáveis nas componentes após rotação varimax (de MOURA, 2006).	121
13 Pesos das variáveis nas componentes após rotação varimax (DE MOURA, 2006).	126
14 Substâncias isoladas.	147
15 Substâncias identificadas UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS ou UHPLC-ESI-TOF-MS.	148

LISTA DE ABREVIATURAS

[M-H] ⁻	Molécula desprotonada
BC	Extrato hidroalcoólico de <i>Byrsonima correifolia</i>
BCCO	Extrato hidroalcoólico de <i>Byrsonima coccolobifolia</i>
BF	Extrato hidroalcoólico de <i>Byrsonima fagifolia</i>
BI	Extrato hidroalcoólico de <i>Byrsonima intermedia</i>
BL	Extrato hidroalcoólico de <i>Byrsonima ligustrifolia</i>
BM	<i>Byrsonima</i> mistura
BV	Extrato hidroalcoólico de <i>Byrsonima verbascifolia</i>
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos
CLAESP-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência semi preparativa com detector no UV.
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
COSY	Correlation Spectroscopy
CP	Componente principal
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
FIA-ESI-IT-MS ⁿ	Espectrometria de Massas acoplada a um <i>ion-trap</i> com interface de Ionização por Eletrospray e inserção direta da amostra)
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOD- <i>d</i> ₃	Metanol deuterado
Min.	Minutos
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PCA	Análise de Componentes Principais
PTFE	Politetrafluoroetileno
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RP18	Fase reversa octadecilsilano
EFS	Extração em fase sólida
TMS	Tetrametilsilano
T_R	Tempo de retenção
UHPLC-ESI-TOF-MS	Cromatografia líquida de Ultra Alta Performace acoplada ao Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo
UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS	Cromatografia líquida de Ultra Alta Performace acoplada a detector de Arranjo de Fotodiodos e Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Gênero <i>Byrsonima</i>	28
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivos gerais	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Materiais	36
3.2. Procedimentos experimentais	37
3.2.1. Coleta e preparo do material vegetal	37
3.2.2. Preparo dos extratos	38
3.2.3. Fracionamento dos extratos	38
3.2.3.1. Extração em Fase Sólida (EFS ou SPE) – Poliamida	38
3.2.3.2. Cromatografia líquida a Pressão Reduzida (CLPR)	39
3.2.4. Obtenção e Análise dos constituintes químicos	39
3.2.4.1. Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC) ..	39
3.2.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD)	39
3.2.4.3. Pré-tratamento dos extratos por EFS (SPE – C18)	40
3.2.4.4. Análise dos extratos hidroalcoólicos de <i>Byrsonima</i> por FIA-ESI-IT-MS ⁿ	41
3.2.4.5. Cromatografia líquida de Ultra Alta Performace acoplada a detector de Arranjo de Fotodiodos e Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo (UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS) ...	42
3.2.4.6. Otimização do método de separação dos constituintes das misturas dos extratos de <i>Byrsonima</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD)	43
3.2.4.7. Fracionamento por CLMP dos extratos provenientes da Extração em Fase Sólida (EFS) – Poliamida	43
3.2.4.8. Análise das frações obtidas por CLMP por CLAE-DAD	44
3.2.4.9. Isolamentos das substâncias por Cromatografia líquida de alta eficiência Semi-Preparativa com detector UV (CLAES- UV)	44

3.2.4.10. Análise das substâncias isoladas do fracionamento por CLAESp-UV) por HPLC-ESI-IT-MS ⁿ . Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	44
3.2.4.11. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	45
3.2.4.12. Cromatografia líquida de Ultra Alta Performace acoplado ao Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo (UHPLC-ESI-TOF-MS)	45
3.2.4.13. Análise Multivariada dos dados de UHPLC-ESI-TOF-MS dos extratos hidroalcoólicos e das substâncias isoladas de <i>Byrsonima</i> spp	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Análise por CLAE-DAD e extração dos taninos	47
4.2. Processo de separação dos constituintes dos extratos, otimização da separação por CLAE-DAD e transposição para coluna de CLMP	51
4.3. Identificações das substâncias isoladas	58
4.3.1. Identificação de BM-1	59
4.3.2. Identificação dos demais derivados galoil-quínicos	63
4.3.2.1. Identificação de BM-2	63
4.3.2.2. Identificação de BM-3	65
4.3.2.3. Identificação de BM-4	69
4.3.2.4. Identificação de BM-5	70
4.3.2.5. Identificação de BM-6	73
4.3.2.6. Identificação de BM-7	77
4.3.3. Identificação dos flavonoides	82
4.3.3.1. Identificação de BM-8	82
4.3.3.2. Identificação de BM-9	86
4.4. Identificação de substâncias químicas presentes nos extratos de espécies de <i>Byrsonima</i> por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS e FIA-ESI-IT-MS ⁿ	89
4.4.1. Identificação por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS	89
4.4.2. Identificação por FIA-ESI-IT-MS ⁿ	98
4.4.2.1. Ácidos e derivados	98
4.4.2.2. Catequina e seus derivados	104
4.4.2.3. Flavonoides	107

4.4.3. UHPLC-ESI-TOF-MS	116
4.4.3.1. Análise das substâncias isoladas: BM-1 a BM-9 e substâncias selecionadas	116
4.4.3.2. Análise estatística dos dados obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS dos extratos de <i>Byrsonima</i> spp. e das substâncias isoladas BM- 1 a BM-9	121
4.4.3.2.1. Análise dos componentes principais (PCA)	122
4.4.3.2.2. Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)	132
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	135

1. INTRODUÇÃO

A população brasileira passa por alterações epidemiológicas na prevalência de diversas doenças, as quais acometem grande parte do seu numerário. O recente crescimento e estabilidade econômica contribuíram diretamente para o aumento da expectativa de vida, para mudanças de hábitos alimentares, aumentando o sedentarismo e estresse interferindo na incidência de doenças parasitárias e infecciosas, permitindo grande aumento das doenças chamadas crônicas (IBGE, 2009).

As doenças crônicas – múltiplas, transmissíveis ou não – são consideradas de longa duração, e exigem acompanhamento multidisciplinar permanente com intervenções contínuas, o que gera grandes encargos financeiros ao sistema público social, correspondendo a cerca de 70% dos gastos em saúde no país (COELHO, BURINI, 2009). Para o tratamento destas doenças no Brasil, o Ministério da Saúde, através do Sistema Único de Saúde, possui uma gama de programas com ampla diversificação de serviços e de profissionais para a prevenção e o tratamento das enfermidades. Dentre os benefícios concedidos aos usuários do SUS, inclui-se o fornecimento de medicamentos gratuitos, iniciativa que provoca a sobrecarga aos cofres públicos, e que tem se tornado um problema real, em virtude do aumento de 222% nos custos para o governo, no período de 2002 a 2007, ultrapassando o valor de R\$10,7 bilhões de reais (VIEIRA, 2009). Vale destacar que, o índice geral de preços ao consumidor, a Fundação Getúlio Vargas (no tocante aos medicamentos) observou um aumento nos preços de 62% para o consumidor, entre 2003 e 2006 (PANIZ et al., 2008). Isso se torna mais dramático quando volta-se a atenção para as doenças crônicas, pois, sendo enfermidades de longa duração, o tratamento se torna cada vez mais inacessível financeiramente para a maior parte da população brasileira.

O Ministério da Saúde tem buscado soluções para financiar os custos dos medicamentos para o país, como por exemplo, a implantação dos medicamentos genéricos e a aquisição e/ou modernização dos laboratórios farmacêuticos oficiais (públicos) para a fabricação de medicamentos essenciais e de alto custo. Outra importante medida governamental, que surgiu a partir da demanda crescente pelo uso de plantas medicinais na Fitoterapia, foi a criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visam à melhoria da atenção à saúde através do uso de

plantas medicinais, favorecendo, assim, a diminuição nos custos com o tratamento de inúmeras doenças (BRASIL, 2009; BRASIL, 2006).

A utilização de plantas para o tratamento de doenças no Brasil é anterior ao período da colonização, sendo uma prática comum na medicina popular brasileira. Com boa aceitação e difusão em todas as camadas da sociedade, esta prática baseia-se no acúmulo de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos (BOCHNER et al., 2012), apoiada pela comunidade científica (VIEGAS JÚNIOR, BOLZANI, 2006; GRAGG, NEWMAN, 2013).

A Fitoterapia é uma opção para o tratamento medicamentoso, compatível com as necessidades de vários municípios brasileiros no tocante ao atendimento primário à saúde e, segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% da população mundial conhece e utiliza a fitoterapia (COSTA et al., 2012), prática apoiada no menor custo, na diminuição dos efeitos adversos apresentados por fármacos sintéticos, pela preferência dos consumidores por tratamentos alternativos e no desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos (MELO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012; BADKE et al., 2012).

Como parte da PNPMF, foi criada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Inicialmente, esta lista apresentava 237 espécies vegetais, já utilizadas em serviços públicos de saúde, com vasto conhecimento tradicional e popular, estudos químicos e farmacológicos disponíveis. Entretanto, atualmente, a RENISUS conta apenas com 71 plantas medicinais selecionadas através de critérios técnicos de saúde, como a priorização de espécies que atendessem às necessidades clínicas de todas as regiões brasileiras.

Todavia, a carência de estudos clínicos que comprovem a **eficácia** contra as inúmeras enfermidades é apontada por profissionais de saúde como a grande dificuldade no uso seguro de plantas medicinais. Essa falta de informação, aliada a ausência de **garantia de qualidade** dos produtos ofertados nas farmácias, drogarias e mercados populares, reflete diretamente na **segurança** do uso destes produtos (SOUZA-MOREIRA, SALGADO, PIETRO, 2010).

No Brasil, no período de 2004 a 2008, foram registrados mais de oito mil casos de intoxicações causadas por plantas e, destes, 12% estavam relacionados ao uso terapêutico das mesmas (BOCHNER et al., 2012). Legislações sanitárias buscam padronizar a fabricação de fitoterápicos no Brasil e no mundo, bem como, o uso seguro de plantas medicinais. No Brasil, a primeira tentativa de garantir a eficácia e a qualidade

de derivados de plantas para fins medicinais partiu da primeira edição da Farmacopeia Brasileira em 1929, que estabeleceu os primeiros critérios para a produção de formulações farmacêuticas derivadas de plantas medicinais, além de processos para a qualificação de constituintes químicos de drogas vegetais.

Existem várias normas sanitárias que norteiam a produção de fitoterápicos, atuando em toda sua cadeia produtiva, desde o cultivo da planta, passando pela fabricação, registro junto aos órgãos de vigilância sanitária, até a dispensação ao usuário. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.º 13 de 14 de Março de 2013 (RDC n.º 13/13), instituindo as boas práticas de fabricação de fitoterápicos, a fim de garantir a qualidade desses medicamentos no Brasil. Para tanto, a RDC n.º 13/13 condiciona a produção de medicamentos derivados de drogas vegetais à caracterização química e garantia na constância no teor dos princípios ativos. Entretanto, as plantas, apresentam variações em suas características genéticas e fenotípicas de acordo com as suas interações com o meio ou nicho geográfico ao qual pertence. Elementos como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, sazonalidade e fatores intrínsecos (idade e o ritmo circadiano), influenciam diretamente os teores e ocorrência dos princípios ativos, na droga vegetal e matéria prima utilizada na fabricação de medicamentos a base de plantas, influenciando a qualidade e o valor terapêutico dos preparados fitoterápicos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; GOODARZI, RUSSEL, HEYDEN, 2013).

Minimizar essas variáveis da matéria-prima de medicamentos à base de plantas é o maior desafio na produção de fitoterápicos. Por isso, a ANVISA, com a RDC n.º 899 de 29 de Maio de 2003, instituiu o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, determinando que todos os medicamentos produzidos no Brasil devem seguir os parâmetros definidos por essa Resolução, inclusive os fitoterápicos. Esta exigência foi fundamental para consolidar a caracterização quanti e qualitativa dos princípios ativos, fortalecendo assim, os parâmetros para qualidade, eficácia e segurança que, de acordo com Choudhary e Sekhon (2011), só podem ser obtidos pela padronização da droga vegetal.

A padronização de drogas vegetais pode ser definida como um conjunto de ações que assegurem a qualidade química, o efeito terapêutico e a quantidade dos princípios ativos de um produto a base de plantas medicinais, não podendo ser

considerado cientificamente válido se o(s) ativo(s) químico(s) não tiver(em) sido validado(s) e caracterizado(s) por meio de testes analíticos e bioanalíticos, a fim de garantir a reprodutibilidade na sua produção (CHOUDHARY, SEKHON, 2011).

Uma estratégia comumente utilizada em padronizações de extratos no Brasil são os dados de *fingerprints* obtidos com análises cromatográficas (CLAE-DAD, CLAE-UV, CLAE-EM) e aplicados no controle de qualidade de materiais vegetais (BOUDAH, PARIS, JUNOT, 2013; GOODARZI, RUSSELL, HEYDEN, 2013; XU et al., 2013; TAVEREIRA et al., 2013; BRASIL, 2010b; PATEL et al., 2010). Com esta abordagem, percebe-se que somente um número limitado de substâncias são consideradas nas análises, o que não fornece uma caracterização completa do extrato estudado.

Para melhorar a caracterização química de extratos de plantas pouco tradicionais ou que ainda carecem de estudos fitoquímicos, novas técnicas hífenadas como UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS vêm sendo cada vez mais utilizadas para a obtenção de *fingerprints* de extratos e, consideradas eficientes em estudos fitoquímicos (ZHOU et al., 2013). Tais técnicas possibilitam uma visão química bastante abrangente da planta de forma rápida e precisa (GIKA et al., 2014), com tempo de análise podendo ser inferior a cinco minutos, possibilitando estabelecer com exatidão uma fórmula molecular de uma substância em minutos (WOLFENDER, MARTI, QUEIROZ, 2010; MARTI, et al., 2014). Outra técnica hífenada que busca otimizar tempo e eficiência é a que acopla a cromatografia líquida de alta eficiência à extração em fase sólida e à ressonância magnética nuclear (HPLC-PDA-SPE-RMN), permitindo a separação (ou extração) e a identificação de forma *on-line* dos picos cromatográficos por RMN (JOHANSEN et al., 2012; SIMMLER et al., 2014).

Estas análises atualmente estão aliadas a testes estatísticos multivariados, como análises hierárquicas e de componentes principais (GIKA et al., 2014; MEHL et al., 2014; ZHOU et al., 2013), possibilitando analisar inúmeras variáveis de estudo, como por exemplo, a diferenciação de inúmeros extratos de uma mesma planta ou de outras plantas, permitindo ao analista definir que variável, dentre inúmeras, é a mais importante para o estudo, sendo melhor visualizado em gráficos bidimensionais, como os dendrogramas, úteis para agrupar as semelhanças entre amostras (similaridades entre extratos) representadas por pontos em espaço com dimensão maior do que três (GOODARZI, RUSSELL, HEYDEN, 2013; MARTI, 2014; FARAG, PORZEL, WESSJOHANN, 2012).

Na flora brasileira ainda existem inúmeras espécies vegetais promissoras, não incluídas na RENISUS, com constituição química e ações farmacológicas semelhantes às plantas constantes na lista, como por exemplo, *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (erva-cidreira) *Cymbopogon citratus* DC. Stapf. (capim-santo), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira), *Qualea grandiflora* Mart. (pau-terra), que apresentam uso disseminado na sociedade brasileira (OLIVEIRA, BARROS, MOITA NETO, 2010; ROQUE, ROCHA, LOIOLA, 2010; MELO et al., 2007). Estas plantas, bem como outras espécies vegetais, além de favorecerem o uso sustentável da biodiversidade brasileira, fortalecem a agricultura familiar – gerando emprego e renda – e são apresentadas como novas fontes terapêuticas.

Dentro deste contexto, as espécies de *Byrsonima* apresentam um grande potencial químico e biológico a ser explorado, destacando-se especialmente as espécies *Byrsonima crassifolia* e *Byrsonima fagifolia*, que apresentam um maior número de estudos quanto as suas ações farmacológicas e terapêuticas (GUILLON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011).

1.1 Gênero *Byrsonima*

O gênero *Byrsonima* pertence à família Malpighiaceae que compreende 77 gêneros e 1300 espécies, sendo que 60 destes gêneros encontram-se no continente americano (DAVIS, ANDERSON, 2010). Caracteristicamente, Malpighiaceae apresenta folhas simples, pecioladas ou sésseis, opostas, com ampla diversidade de flores e frutos. Os indivíduos desta família podem ser caracterizados como árvores, arbustos, lianas e são encontrados nas regiões tropicais e subtropicais no Brasil, o que torna Malpighiaceae uma das famílias botânicas mais frequentes no Cerrado (TAKASHI, 2007). Muitas espécies desta família são usadas como medicinais em diversos países latino-americanos como algumas dos gêneros *Banisteriopsis*, *Diplopterys*, *Galphimia*, *Heteropteris* e *Byrsonima*. (GUILLHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011; HEYWOOD, 1993).

O gênero *Byrsonima* é constituído por 130 espécies, concentradas em sua totalidade, na América Tropical; deste total, 50% são encontradas no Brasil em fisionomias campestres de cerrado (PEIXOTO, 2002; DAVIS, ANDERSON, 2010; GONÇALVES-ESTEVES, SOARES JÚNIOR, FERREIRA, 2007). As espécies de

Byrsonima, popularmente conhecidas como murici, apresentam espécimes nas formas de arbustos, árvores e subarbustos, não sendo identificado o tipo liana como em outros gêneros da família Malpighiaceae. Possuem inflorescências terminais pseudoracemosas, com duas ou três flores nas axilas de uma única bráctea; corolas com simetria bilateral e pétalas brancas, amarelo, rosas ou vermelhas, glabras na maioria das espécies e os frutos drupáceos; em algumas espécies a polpa é succulenta, normalmente de cor amarela quando maduro (ANDERSON, 1981). O murici é usado também na construção civil, na indústria têxtil, na produção de doces e para uso medicinal popular, sendo o uso das folhas na forma de infusão para o tratamento de úlceras gástricas e diarreia bastante comum em *Byrsonima* (AGUIAR; DAVID; DAVID, 2005; HEINRICH; RIMPLER; BARRERA, 1992; CÁCERES et al., 1993).

Vários trabalhos científicos clássicos relatam os estudos botânicos, relações ecológicas, o uso medicinal popular, constituição química e atividades farmacológicas das espécies de *Byrsonima*. Entretanto, apenas um número reduzido de espécies foi estudado recentemente, no que se refere à fitoquímica e farmacologia, sendo grande parte dos trabalhos concentrados nas espécies: *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, *Byrsonima crassa* Nied., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Byrsonima fagifolia* Nied., *Byrsonima intermedia* A.Juss., e *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (HIRUMA-LIMA, et al., 2008; LIRA, et al., 2008; MALDINI, et al., 2009; RODRIGUES, 2007; SANTOS, et al., 2012; SANNOMIYA, M. et al., 2007a; SANNOMIYA, M. et al., 2007b).

Byrsonima verbascifolia, é um arbusto ou pequena árvore, com fruto drupáceo e globoso, a madeira tortuosa é amarelada ou avermelhada e se apresenta como uma planta exclusiva de cerrado (ARAÚJO, 2009; ANDERSON, 2001), é usada popularmente como laxante suave e no tratamento de febre e diarreia (CECÍLIO et al., 2012), apresentando características farmacológicas não mutagênicas e não genotóxicas, (MALTA et al., 2012), antioxidante e antiproliferativa (MALTA et al., 2013) no que se refere a extratos dos frutos. Já o uso de extratos das folhas, demonstraram não possuir efeitos teratogênicos, mutagênicos ou de imunoestimulação quando administrados em ratos durante a gestação (GONÇALVES et al., 2013) e a infusão preparadas a partir das folhas mostrou que a mesma é capaz de reduzir os danos causados no DNA induzidos por doxorrubicina de células somáticas de *Drosophila melanogaster* (MEDANHA et al., 2010). Já o extrato metabólico das folhas e raiz, mostraram atividades antiviral (para

o vírus da herpes simples) e antibacteriana para *Streptococcus faecalis*; *Mycobacterium phlei*; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*. (LOPEZ, HUDSON, TOWERS, 2001).

Segundo Batalha, Aragaki e Mantovani (1998), a diferença fenotípica entre *Byrsonima verbascifolia* em relação às espécies *Byrsonima coccolobifolia* e *Byrsonima intermedia* reside nas características entre suas folhas. *Byrsonima verbascifolia* apresenta folhas do tipo pilosas sésseis, congestas nos ápices dos ramos, *Byrsonima coccolobifolia* apresenta folhas ovais a orbiculares, com ápice obtuso e *Byrsonima intermedia* apresenta folhas oblongo-lanceoladas, com ápice agudo. Estas três espécies são utilizadas para o tratamento de doenças gastro intestinais, sendo utilizadas principalmente para o tratamento de diarreias e úlceras gástricas (GUILLHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011).

As folhas *Byrsonima intermedia* são usadas popularmente para tratamento de pedra nos rins e na vesícula biliar, inflamação da próstata, má digestão, verminoses (ALMEIDA et al., 2005), diarreias, úlceras gástricas, febre, infecções da pele, dor de estômago, diurético e anti-asmático (SANNOMIYA et al., 2007b; RINALDO et al., 2010). As atividades farmacológicas das folhas são amplas nesta espécie, havendo relatos de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (o mesmo sendo apontando para as raízes) (ORLANDIA et al., 2011), além disso, em estudo recente em roedores, o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* apresetaram capacidade gastroprotetora por inibir e reduzir lesões gástricas, duodenais, curando e prevenindo os efeitos da diarreia quando administrado por via oral a roedores por até 14 dias (SANTOS et al., 2012). Foram observadas ainda atividades antimicrobiana (MICHELIN et al., 2008) e mutagênica *in vitro*, porém não sendo observada mutagenicidade *in vivo* (SANNOMIYA, 2007b).

Poucos são os trabalhos disponíveis relacionando os constituintes químicos sobre *Byrsonima coccolobifolia*. Porém, recentemente, Rinaldo (2010) demonstrou a presença da catequina e epicatequina em extratos metanólicos das folhas. Outro trabalho bastante relevante, demonstrou atividade leishmanicida de substâncias isoladas e identificadas nas folhas desta espécie, como isoquercetrina, quercetrina, (+) - siringaresinol e trigonostemona (SOUZA et al., 2014).

Sem dúvida, as três espécies mais estudadas no gênero *Byrsonima* são *Byrsonima crassa* Nied., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, *Byrsonima fagifolia* Nied, apresentando diversos trabalhos de identificação, isolamento e quantificação de substâncias químicas, bem como, de ações farmacológicas e uso medicinal popular.

Discorrer sobre as características químicas, botânicas, medicinais de *Byrsonima crassifolia* é de certa forma descrever as demais espécies citadas, por apresentar características botânicas, farmacologia e fitoquímica semelhantes e também por ser a espécie com maior número de trabalhos científicos publicados segundo Scifinder®.

Byrsonima crassifolia é um arbusto ou árvore de até 5 m de altura com ramos não lenticelados, com folhas persistentes, opostas dísticas, discolores, coriáceas, ovaladas a elípticas, inflorescências racemosas. Também apresentado flores na forma de inflorescência, as pétalas podem ser amarelas, unguiculadas, margem fimbriada, estandarte e glandular, com fruto nukulânio, globoso, rugoso, carnosos, glabro, não alado, ápice arredondado, amplamente distribuída nas Américas central e do sul. (ALEXANDRINO, DE SOUSA, BASTOS, 2011).

Na medicina popular, as folhas e cascas desta planta são os mais utilizados, sendo aplicados no tratamento de vaginites, diarreia, asma, dor de dente (PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007), distúrbios gastrointestinais e inflamações ginecológicas (HEINRICH et al., 1998) e no tratamento de feridas (LEONTI et al., 2001).

Estudos farmacológicos com extratos hidroalcoólicos das cascas de *B. crassifolia* relatam atividades antioxidantes (SILVA et al., 2007), espasmogênicas (BEJAR et al., 1995), bactericida (PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007), fungicida, leishmanicida e anti-inflamatória tópica (MALDINI et al., 2009), enquanto que o extrato das raízes obtidos com acetato de etila mostrou ser antimicrobiano para as cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Micrococcus luteus*. (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 1999).

Ainda na parte farmacologia, nos frutos de *Byrsonima crassifolia* foram identificados diversos ácidos graxos e carotenoides, demonstrando uma alta atividade antioxidante dependente da presença dessas substâncias e compostos fenólicos (MARIUTTI, RODRIGUES, MERCADANTE, 2013; RIBEIRO, 2013). Já o estudo de Perez-Gutierrez (2010), evidenciou a ação antilipêmica, antiglicêmica e antiglicação dos extratos das folhas e sementes, além de ação anti-inflamatória do extrato hexânico das sementes em animais pelo mecanismo de inibição da ação do óxido nítrico. (PEREZ-GUTIERREZ, 2013).

O extrato hidroalcoólico das folhas atividade antioxidante, antiulcerogênico, citotóxica, antinociceptivo, anti-inflamatória ((POMPEU et al., 2012)

enquanto que o extrato metanólico exibiu atividades antidepressivas (HERRERA-RUIZ et al., 2011) e diversas ações neurológicas no sistema nervoso central. (MORALES et al., 2001).

Trabalhos científicos relacionados a estas espécies, demonstram que a fitoquímicas dessas espécies revelaram a presença de catequinas e seus derivados, ácido gálico e seus derivados, derivados do ácido quínico e derivados, além de quercetina, mono, di, ou tri O-glicosilados ou conjugadas com o ácido gálico, amentoflavona, triterpenos simples, esteroidais e saponinas, ácidos graxos, carotenos e aminoácidos (SANNOMIYA et al., 2007a; AGUIAR, DAVID, DAVID, 2005, SANNOMIYA et al., 2005a; LIRA et al., 2008; SANNOMIYA et al., 2005b).

Guilhon-Simplicio e Pereira (2011) publicaram uma revisão bibliográfica sobre as atividades biológicas de várias espécies de *Byrsonima*, relacionando as partes das plantas usadas para a identificação de substâncias químicas, atividades farmacológicas, bem como, o uso destas plantas na medicina popular. Entretanto, o trabalho destes autores não considerou algumas espécies, por isso, através do Quadro 1, relacionaram-se as substâncias identificadas no gênero *Byrsonima*, destacando-se as espécies citadas anteriormente no texto. Os estudos fitoquímicos do gênero, foram propositalmente pouco explorados no texto, com o intuito de facilitar a leitura e evitar repetições demasiadas, uma vez que muitas substâncias identificadas são relatadas em várias espécies do gênero *Byrsonima*.

O Quadro 1, baseado no trabalho de Guilhon-Simplicio e Pereira (2011), foi atualizado por referências mais recentes, e também estão dispostas as atividades farmacológicas e os usos populares das folhas de *Byrsonima* spp.

Quadro 1: Usos populares, propriedades farmacológicas, substâncias identificadas nas folhas de espécies do gênero *Byrsonima* (continuação).

Espécies de <i>Byrsonima</i>	Usos na medicina popular	Substâncias identificadas	Atividades farmacológicas	Referências bibliográficas
<i>B. crassifolia</i>	asma, abortivo, diarreia, malária, inflamação, diurético, febrífugo, laxativo, indigestão, infecções na pele e mucosas,	β -sitosterol, 1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(β -D-glicopiranosil)-glicerol, 1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol, 1,2-di-O-hexadecanoil-3-O-(β -D-glicopiranosil)-glicerol, 1,2-di-O-tetradecanoil-3-O-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol, 1,2-di-O-hexadecanoil-3-O-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol, 2- β -hidróxi-lupeol, ácido aspártico, ácido betulínico, ácido 2- α -hidróxi-oleanólico, ácido 2- β -hidróxi-oleanólico, ácido 5-hidróxi-pipecólico, ácido oleanólico, ácido pipecólico, betulina, betulinaldeído, D-alanina, daucosterol, galato de metila, lupeol, quercetina, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina), quercetina-3-O- β -D-6''-galoilgalactopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (hiperina), quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetina), prolina, ursenaldeído, valina, quercetina-3-O-xyloside, rutina,	Antioxidante, Antiprotzoária, Espasmogênica, Antidepressivo; Ansiolítico, Sedativo, Anticonvulsivante	Guillon-Simplicio, Pereira, 2011; Herrera-Ruiz et al., 2011;
<i>B. fagifolia</i>	diarreia, vômito, diurético, gastrite e úlceras gástricas e pépticas	acetato de α -amirina, ácido báltico, ácido gálico, ácido 3-O-galoil-quinico, ácido 3,4-O-digaloil-quinico, ácido 3,4,5-O-trigaloil-quinico, ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quinico, dotriacontano, galato de metila, lupeol, quercetina-3-O- β -D-2''-galoilgalactopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-2''-galoilglicopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetina), quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo.	Antibacteriana, Antidiarreica, Antifúngica, Antioxidante, Antiulcerogênica, Antimicobacteriana	Guillon-Simplicio, Pereira, 2011.
<i>B. verbascifolia</i>	diarreia, febre, cicatrizante, laxante, infecções na pele e mucosas e doença de Chagas	α -amirina, ácido oleanólico, ácido ursólico, quercetina, quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina), quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetina).	Antibacteriana, Antimicobacteriana, Antiviral, Molsuscida	Guillon-Simplicio, Pereira, 2011

Considerando que algumas espécies de *Byrsonima* possuem um grande potencial biológico, e estão incluídas no Projeto Biota-Fapesp número 2009/52237-9, foram selecionadas as espécies *Byrsonima correifolia* A.Juss, *Byrsonima coocolobifolia* Kunth, *Byrsonima fagifolia* Nied., *Byrsonima intermedia* A. Juss., *Byrsonima ligustrifolia* Mart. e *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC., para o estudo dos extratos polares por técnicas hifenadas, particularmente UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS e UHPLC-ESI-TOF-MS.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

Aprofundar o conhecimento sobre a constituição química das folhas de espécies do gênero *Byrsonima*.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Preparar extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies: *Byrsonima correifolia*, *Byrsonima coocolobifolia*, *Byrsonima fagifolia*, *Byrsonima intermedia*, *Byrsonima ligustrifolia* e *Byrsonima verbascifolia* ;

- ✓ Isolar por métodos cromatográficos e identificar por métodos espectroscópicos e espectrométricos as substâncias dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de *Byrsonima* selecionadas neste trabalho;

- ✓ Obter os *fingerprints* por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Byrsonima* selecionadas neste estudo.

- ✓ Identificar por UHPLC-ESI-TOF-MS as substâncias existentes nos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de *Byrsonima* selecionadas neste trabalho ;

- ✓ Realizar análise multivariada dos dados obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS, dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de *Byrsonima* selecionadas neste trabalho a fim de verificar as diferenças químicas entre as espécies e selecionar possíveis marcadores químicos de cada espécie.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- ✓ Percolador de aço inox com capacidade de 20 L.
- ✓ Rotaevaporador modelo Laborota 4001 – efficient, marca Heidolph[®]
- ✓ Bomba a vácuo modelo Rotavac valve control Heidolph[®]
- ✓ Estufa de secagem de vidrarias Quimis[®]
- ✓ Estufa de secagem de material vegetal
- ✓ Liofilizador da marca Savant Instruments INC., modelo Micro Modulo
- ✓ Estufa de secagem de material vegetal
- ✓ Estufa de secagem de vidraria
- ✓ Resina Poliamida 6[®] (Fluka)
- ✓ Metanol P.A
- ✓ Metanol grau CLAE
- ✓ Ácido Fórmico grau CLAE (Fluka[®]).
- ✓ Água destilada
- ✓ Água Mili-Q[®] (Millipore Corporation)
- ✓ Diclorometano P.A
- ✓ Coluna filtrante - VLC
- ✓ HPLC HP-1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipado com bomba binária de solventes com detector DAD e injetor automático e HP1090 serie II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) com bomba quaternária de solventes, detector DAD e injetor automático, ambos os equipamentos controlados pelo software Agilent ChemStation 8.01.
- ✓ Coluna XBrigedTM C18 (250 x 4.6 mm, 5µm)
- ✓ Quercetina, Rutina e Ácido gálico (Sigma Aldrich[®]).
- ✓ Coluna Zeoprep 60 Å sílice C18 irreguliere, (250 x 4,6 mm, 15-25 µm).
- ✓ Cartuchos fase reversa a base de octadecilsilano com 100 mg.mL⁻¹ (50 µm, Finésterre[®], tamanho do poro de 60A),
- ✓ Membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, Teflon[®], Millipore[®]) com poro de 0,45 ou 0,20 µm.
- ✓ Espectrômetro de massas utilizado foi o LCQ Fleet da Thermo Analitica, com software Xcalibur 2.1 Thermo Scientific Foundation 1.0.1.
- ✓ Coluna de vidro da Buchi nas dimensões de 460 x 49 mm

- ✓ Bombas LC-9A Shimadzu, acoplada a um gradiente Buchi Gradiente former B-687.
- ✓ Fase estacionária Zeoprep 60A sílice C18 irreguliere, 15-25 μm i.d.
- ✓ Espectrômetro de massas Micromass-LCT Premier Time of Flight da Waters (Mildford, MA, USA) com Eletrospray (ESI) acoplado com sistema Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acquity UPLC system da Waters com uma bomba de cromatográfica líquida da Shimadzu LC-ADvp.
- ✓ Coluna Acquity BEH C18 UPLC (Waters) (150 mm x 2,1 mm i.d., 1.7 μm)
- ✓ Cromatógrafo líquido com bomba binária Shimadzu LC-8A equipada com detector SPD-10A VP Shimadzu UV-Vis (Kyoto, Japão) em um fluxo de 10mL.min⁻¹ com uma coluna XBrigedTM C18 (150 x 19 mm, 5 μm).
- ✓ Espectrômetro Varian Inova 500 MHz (Palo Alto, CA, USA) sendo controlado pelo software Varian VNMR da Sun Workstation (Santa Clara, CA, USA).
- ✓ Solventes deuterados, MeOD e DMSO-*d*₆ (Dr Glaser, Basel, Suíça) a 25°C, os deslocamentos dos sinais obtidos foram indicados em ppm relativos ao tetrametilsilano (TMS).
- ✓ Placas de Alumínio de gel de sílica 20 x 20 cm para CCDC

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Coleta e preparo do material vegetal

As folhas de *Byrsonima fagifolia* e *B. verbascifolia* foram coletadas no município de Porto Nacional – TO (10°09'41" S e 48° 14' 11"W). A identificação foi feita pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos e as exsiccatas n°. 743 e 481 devidamente depositadas no Herbário da Universidade Federal do Tocantins.

As folhas da espécie *B. ligustrifolia* foram coletadas no município de Pratânia-SP (22°15' 54" S e 47°47' 49" W), pelo Dr. Luiz Fernando R. de Almeida, e exsiccata do espécime coletado está depositada no Herbário da UNESP Botucatu, sob o número 24164. A espécie *B. coccolobifolia* foi coletada no município de Itirapina-SP, na localidade de Cerrado de Graúna (22°15' 54" S e 47°47' 49" W), e as folhas de *B. intermedia* foram coletadas no município de Pratânia-SP, na fazenda Palmeira da Serra (22° 49' 03" S 48°44' 39" W), sendo a identificação realizada pelo Prof. Dr. Jorge

Tamashiro (IB-UNICAMP), com as exsicatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob os números 1397 e 1426, respectivamente. As folhas de *B. correifolia* foram coletadas por José de Sousa Lima Neto, no município de José de Freitas (PI), Eco Resort Nazareth (04°48' 4,8" S e 42°37'59,1" W), identificada por Andréia Maria de Sousa Silva, sendo sua exsicata depositada no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob o número 27151.

As folhas coletadas das espécies selecionadas foram separadas de outras partes aéreas das plantas, secas em estufa a 40° C, até que as mesmas apresentassem massa constante. Posteriormente, foram trituradas em moinho de facas e armazenadas em ambiente ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

3.2.2. Preparo dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos das folhas de espécies de *Byrsonima* selecionadas para este estudo foram preparados com folhas secas e moídas em moinho de facas. Os pós foram separadamente intumescidos com 2 litros de etanol/água (7:3, v/v) pelo período de 2 horas. Em seguida, foram levados aos percoladores de aço inox (20L), seguindo a proporção solvente: pó vegetal de 5:1 (v/v), com fluxo de 2 mL.min⁻¹. Kg (PRISTA, 1995).

O solvente foi eliminado em rotaevaporador modelo Laborota 4001 – efficient, marca Heidolph[®], equipado com bomba de pressão reduzida modelo Rotavac valve control Heidolph[®]. O resíduo de água do extrato foi eliminado com uso de liofilizador da marca Savant Instruments INC., modelo Micro Modulo. Os extratos secos foram triturados em almofariz e armazenados em frascos âmbar a 4°C.

3.2.3. Fracionamento dos extratos

3.2.3.1. Extração em Fase Sólida (EFS ou SPE) – Poliamida

Os extratos hidroalcoólicos de *Byrsonima* foram submetidos à extração em fase sólida em Poliamida-6[®] (Fluka). Esta resina é utilizada para retirar taninos que comumente interferem na avaliação dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Fotodiodos (HOSTETTMANN, K., MARSTON,

HOSTETTMANN, M., 1997). Para isso, foi necessário uma otimização quanto ao processo de extração, em relação ao solvente extrator e à quantidade de extrato a ser utilizada no cartucho de EFS. Os cartuchos apresentavam volumes de 6 mL e foram preparados com 500 mg de poliamida, utilizando 65 mg de extrato para a extração.

3.2.3.2. Cromatografia líquida a Pressão Reduzida (CLPR)

Uma vez determinada à otimização na EFS com poliamida em cartucho e avaliados os eluatos obtidos por CLAE-DAD, passou-se a utilizar a Cromatografia Líquida a Pressão Reduzida (CLPR) para a extração em maior escala dos extratos, respeitando-se a proporção extrato/poliamida e o solvente extrator selecionado. A fim de obter-se quantidade significativa para todas as análises, principalmente CLMP (Cromatografia Líquida de Média Pressão), foram utilizados 7 g de cada extrato nesta etapa; como fase estacionária utilizou-se a poliamida (100 g), e como fase móvel MeOH (5 x 250 mL).

3.2.4. Obtenção e Análise dos constituintes químicos

3.2.4.1. Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Os extratos obtidos pelo processo de percolação e pela EFS com poliamida foram analisados em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC). Várias fases móveis foram utilizadas, porém, a que apresentou melhor resolução foi a Metanol/Diclorometano (8:2, v/v), como eluente, com o revelador de Godin (vanilina: ácido sulfúrico a 5% 1:1), para verificar a presença de algumas classes específicas de metabólitos secundários (WAGNER; BLADT, 1996). Também foram utilizados os padrões quercetina, rutina e ácido gálico (Sigma Aldrich®).

3.2.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD)

A Cromatografia líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD) foi usada para analisar qualitativamente os extratos e frações, para otimizar e auxiliar nos processos de separação e isolamento de compostos químicos, bem como para verificar a pureza destes compostos. Também foi

utilizada para otimizar as condições cromatográficas na Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) e na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala Semi-Preparativa com detector no UV (CLAESP-UV). Os equipamentos utilizados foram: HPLC HP-1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipado com bomba binária de solventes com detector DAD e injetor automático; e HP1090 serie II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), com bomba quaternária de solventes, detector DAD e injetor automático. Ambos os equipamentos foram controlados pelo software Agilent ChemStation 8.01. Todas as frações obtidas na CLMP, foram analisados usando uma coluna XBrigedTM C18 (250 x 4.6 mm, 5µm), com o seguinte sistema de solventes: A) água + ácido fórmico 0,1%; B) metanol + ácido fórmico 0,1%, eluídos em gradiente linear: 5% B mantido por 2 minutos, 100% B em 60 minutos com fluxo de 1mL.min⁻¹; detecção UV nos seguintes comprimentos de onda: 210, 254, 280 e 366 nm. Foi utilizada ainda uma coluna Zeoprep 60Å sílice C18 irreguliere, (250 x 4,6 mm, 15-25µm), para as otimizações na separação dos constituintes na CLMP. Para as análises dos compostos isolados na CLAESp-UV, as condições foram às mesmas dos extratos e frações, porém o gradiente linear foi desenvolvido em 30 minutos de análise.

3.2.4.3. Pré-tratamento dos extratos por EFS (SPE – C18)

Os extratos hidroalcoólicos e os extratos tratados em poliamida foram submetidos à análise qualitativa em CLAE-DAD. Nessa etapa foram utilizados apenas solventes grau CLAE e Água Milli-Q (Milipore[®]). Na etapa preliminar, do *clean up* dos extratos, foram utilizados cartuchos fase reversa a base de octadecilsilano com 100 mg e 1 mL (50 µm, Finésterre[®], tamanho do poro de 60 Å), sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*[®], Millipore[®]) com poro de 0,45 ou 0,20 µm.

Utilizaram-se 20 mg do material de estudo, sendo solubilizados em 0,5 mL de água:metanol na proporção de 15:85 (v/v), com auxílio de ultrassom, e aplicados em cartuchos com fase estacionária reversa. O cartucho foi previamente ativado com 5 mL de MeOH, 5 mL de H₂O e ambientado com 5mL do eluente selecionado (água:metanol (85:15, v/v). Por fim, o material foi eluído com 15 mL de água:metanol (85:15, v/v), filtrado em membrana PTFE (Millex[®]) 0,22 µm e, posteriormente, seco em evaporador rotativo.

No preparo das amostras para análise em CLAE-DAD, o material seco obtido no *clean-up* foi dissolvido em no máximo 2 mL de água:metanol (15:85, v/v), mantendo-se, com isso, a concentração final de análise de 10 mg.mL⁻¹. Em seguida, foi armazenado em vial para análise subsequente em CLAE-DAD.

3.2.4.4. Análise dos extratos hidroalcólicos de *Byrsonima* por FIA-ESI-IT-MSⁿ

Os extratos hidroalcoólicos das folhas de *Byrsonima* spp. foram analisados separadamente, por ESI-IT-MSⁿ, em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific., equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). As amostras foram ionizadas 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 a análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-1000, 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 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo Scientific[®]) foi utilizado durante a aquisição e o processamento dos dados espectrométricos.

3.2.4.5. Cromatografia líquida de Ultra Alta Performace acoplada a detector de Arranjo de Fotodiodos e Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo (UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS)

Análises dos extratos por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS foram realizadas no equipamento Espectrômetro de massas Micromass-LCT PremierTime of Flight da Waters (Mildford, MA, USA) com eletrospray (ESI) acoplado com sistema Cromatografia líquida de Ultra eficiência Acquity UPLC system da Waters. A detecção foi feita nos modos negativo e positivo com *range* de m/z 100-1000 e tempo de scaneamento de 0.2 s. As condições do eletrospray, para os dois modos de ionização: Voltagem do capilar de 2800 V e 40 V para voltagem do cone, temperatura da fonte de 120 °C, temperatura de desolvatação de 250°C, fluxo de gás no cone de 20L/h e fluxo de gás de 800L/h para desolvatação. A calibração interna do aparelho foi feita com uma solução de leucina encefalina Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) na concentração de $5\mu\text{m.L}^{-1}$ infundida no fluxo de $5\mu\text{L.min}^{-1}$, através do uso de uma bomba de cromatográfica líquida da Shimadzu LC-ADvp. A separação foi realizada em coluna Acquity BEH C18 UPLC (Waters) (150 mm x 2,1mm i.d., 1,7 μm); eluição em modo gradiente com fluxo de $0,3\text{ ml.min}^{-1}$ com o seguinte sistema de solventes: A) água + ácido fórmico 0,1%; B) acetonitrila + ácido fórmico 0,1%; 2 – 98% B em 7 minutos e 2-98% em 40 min, com volume injetado de amostra de 5 μl . Utilizou-se ácido fórmico para melhor ionização das moléculas (QUEIROZ, HOSTETTMANN, WOLFENDER, 2012). Os dados obtidos foram processados por software MassLynx versão 4.1. A comparação de todos os cromatogramas obtidos foi realizada pelo tempo de retenção de cada pico com uma tolerância de $\pm 0,05$ minutos e tolerância de massa de $\pm 0,05$ Da, e pela ferramenta *elemental composition* do software, com vistas à obtenção da fórmula molecular do íon precursor (elementos utilizados: C, H, O e N com tolerância menor que 5 ppm). Uma vez identificada(s) a(s) fórmula(s) molecular(es), adicionada(s) a ela(s), fez-se necessário o uso de bibliotecas e base de dados, como por exemplo, Scifinder[®], Sciencedirect[®], Web of science[®], Pubmed[®], Chemspider[®], PubChem[®], Dictionary of Natural Products[®] e, em alguns casos, as “*Sete regras de ouro da espectrometria de massas de Kind e Fiehn*” (Seven Golden Rules of Kind and Fiehn em uma planilha Microsoft Excel[®]).

3.2.4.6. Otimização do método de separação dos constituintes das misturas dos extratos de *Byrsonima* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD)

Os extratos provenientes das análises descritas no item 3.2.3.2 de cada espécie estudada (1,2 g) foram misturados, solubilizados em água/metanol (85:15, v/v) e filtrados em filtro 0,22 μ m; uma alíquota (10 mg.mL⁻¹) foi analisada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Agilent, utilizando as condições otimizadas em uma coluna XBrigedTM C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), com o seguinte sistema de solventes: A) água + ácido fórmico 0,1%; B) metanol + ácido fórmico 0,1%, eluídos em gradiente linear: 5% B mantido por 2 minutos, 100% B em 60 minutos. O método de separação dos constituintes desta análise foi checado através da utilização de uma coluna Zeoprep 60A sílice C18 irreguliere, (250 x 4,6 mm, 15-25 μ m). O método desenvolvido foi: gradiente linear água-metanol com fluxo de 1 mL.min⁻¹, 5% B por 2 minutos; 68% B até 210 minutos; 100% B em 230 minutos e, posteriormente, mantido por 20 minutos. A Tabela 1 apresenta os dados de transposição “*scale up*” para coluna de CLMP.

3.2.4.7. Fracionamento por CLMP dos extratos provenientes da Extração em Fase Sólida (EFS) – Poliamida

Uma vez definidas as condições de otimização da separação dos constituintes dos extratos tratados em poliamida (item 3.2.4.6), realizada em coluna analítica Zeoprep 60A sílice C18 irregular, (250 x 4.6 mm, 15-25 μ m), foi necessário realizar a transposição das condições encontradas em CLAE-UV-DAD para a coluna utilizada na CLMP. O equipamento utilizado consistia em duas bombas LC-9A Shimadzu, acopladas a um gradiente Buchi Gradiente former B-687, detector modelo UV detector K-2001, operando um comprimento de onda de 254 nm, e PicoLog 1000 series, como registrador. A coluna de vidro da Buchi, com dimensões de 460 x 49 mm, foi preenchida pela fase estacionária Zeoprep 60Å Silice C18 irreguliere, 15-25 μ m i.d, com volume morto em 406 mL e dwell volume de 16,5 mL; devido ao controle da pressão interna do sistema, foi usado o fluxo de 3,5 mL.min⁻¹ e frações coletadas em volume de 50 mL cada (GUILLARME et al., 2007).

3.2.4.8. Análise das frações obtidas por CLMP por CLAE-DAD

As frações obtidas do fracionamento por CLMP (item 3.2.4.7) foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência HP1090 serie II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), com bomba quaternária de solventes, detector DAD e injetor automático, ambos os equipamentos controlados pelo software Agilent ChemStation 8.01, com uma coluna XBriged™ C18 (250 x 4.6 mm, 5µm), com o seguinte sistema de solventes: A) água + ácido fórmico 0,1%; B) metanol + ácido fórmico 0,1%, eluídos em gradiente linear: 5% B mantido por 2 minutos, 100% B em 60 minutos, com fluxo de 1 mL.min⁻¹; detecção UV nos seguintes comprimentos de onda de 210, 254, 280 e 366 nm.

3.2.4.9. Isolamentos das substâncias por Cromatografia líquida de alta eficiência Semi-Preparativa com detector UV (CLAESP-UV)

Para o isolamento das substâncias provenientes das frações obtidas por CLMP (item 3.2.4.8), foi utilizado um cromatógrafo líquido com bomba binária Shimadzu LC-8A, equipada com detector SPD-10A VP Shimadzu UV-Vis (Kyoto, Japão), em um fluxo de 10 mL.min⁻¹, com uma coluna XBriged™ C18 (150 x 19 mm, 5µm). O sistema de solventes empregado foi: A) água + 0,1% de ácido fórmico e B) MeOH +0,1% ácido fórmico em um fluxo de 10 mL.min⁻¹.

O modo isocrático de eluição com 2%B foi aplicado para a fração BM-10-12 e BM-26-27; para a fração BM-33-37, utilizou-se 5%B, no mesmo modo de eluição. As frações BM- 171-177 e BM-179-184 foram eluídas por modo isocrático, com 16% B; de modo semelhante, porém com 30% do solvente B, foram eluídas as frações BM 386-388 e BM-437-439. Por fim, a fração BM-64-95 foi a única em que foi empregado o modo gradiente de 6 a 12% B para o isolamento de substâncias.

3.2.4.10. Análise das substâncias isoladas do fracionamento por CLAESP-UV) por HPLC-ESI-IT-MSⁿ.

As substâncias isoladas por CLAESP-UV (item 3.2.4.9) foram analisadas separadamente, *on-line* por HPLC–ESI-IT-MSⁿ, em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific. As separações por HPLC foram realizadas utilizando-se as

mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.2.4.6, com diferença no tempo de eluição: A) água + ácido fórmico 0,1%; B) metanol + ácido fórmico 0,1%, eluídos em gradiente linear: 5% B mantido por 2 minutos, 100% B em 30 minutos com fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; detecção UV nos seguintes comprimentos de onda: 210, 254, 280 e 366 nm.

As análises dos espectros de massas das substâncias foram realizadas conforme dados descritos no item 3.2.4.4.

3.2.4.11. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As determinações estruturais das substâncias isoladas dos extratos hidroalcoólicos das espécies estudadas foram feitas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C a 11,7 T foram obtidos no espectrômetro Varian Inova 500 MHz, por sua vez, controlado pelo software Varian VNMR da Sun Workstation. Todos os experimentos de RMN foram realizados utilizando solventes deuterados, DMSO- d_6 e CD_3OD a 25°C , e os deslocamentos dos sinais obtidos foram indicados em ppm (δ) relativos ao tetrametilsilano (TMS).

3.2.4.12. Cromatografia líquida de Ultra Alta Performace acoplado ao Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo (UHPLC-ESI-TOF-MS).

A fim de obter os valores das massas em alta resolução e sua diferenciação no cromatograma, as substâncias identificadas no item 3.2.4.11, foram encaminhadas para análise por UHPLC-ESI-TOF-MS. Foram realizadas no equipamento Espectrômetro de massas Micromass-LCT PremierTime of Flight da Waters (Mildford, MA, USA), com eletrospray (ESI) acoplado, com sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acquity UPLC system da Waters. A detecção foi feita no modo negativo com range de m/z 100-1000 e tempo de scaneamento de 0,3 s. As condições do eletrospray para modo negativo: Voltagem do capilar de 2800 V e 40 V para voltagem do cone, temperatura da fonte de 120°C , temperatura de desolvatação de 350°C , fluxo de gás no cone de 20L/h e fluxo de gás de 800L/h para desolvatação. A calibração interna do aparelho foi feita com uma solução de leucina encefalina Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) na concentração de $2\mu\text{m}\cdot\text{mL}^{-1}$ infundida no fluxo de $10\mu\text{L}/\text{min}$,

usando uma segunda bomba de cromatográfica líquida da Shimadzu LC-10ADvp (Duisburg, Alemanha).

A separação foi realizada em coluna curta Acquity BEH C18 UPLC (Waters) (150 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 μ m), mantida a 60°C, com eluição em modo gradiente com fluxo de 0,3 ml.min⁻¹ e com os seguintes solventes empregados: A) água + ácido fórmico 0,1%; B) acetonitrila + ácido fórmico 0,1%. O gradiente linear iniciou com 2% B, passou para 98% B, em 6 minutos, e foi mantido por mais 0,80 minutos. A condição inicial foi reestabelecida para 2%B em 6,80 minutos e foi mantida durante 1,2 minutos. Os dados obtidos foram processados pelo software MassLynx versão 4.1. O espectro de UV foi obtido entre 200 e 450nm, com resolução de 1,2 nm. A comparação de todos os cromatogramas obtidos foi realizada pelo tempo de retenção de cada pico com uma tolerância de $\pm 0,05$ minutos e tolerância de massa de $\pm 0,05$ Da, e ainda pela ferramenta *elemental composition* do software, com o propósito de obter a fórmula molecular do íon precursor (elementos utilizados: C, H, O e N com tolerância menor que 5 ppm).

3.2.4.13. Análise Multivariada dos dados de UHPLC-ESI-TOF-MS dos extratos hidroalcoólicos e das substâncias isoladas de *Byrsonima* spp.

A Análise multivariada de componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico (HCA) das massas obtidas na análise por UHPLC-ESI-TOF-MS dos extratos *Byrsonima* spp. foram realizadas utilizando-se software IBM® SPSS versão 21.0. Foi analisado um conjunto de dados com 902 variáveis, referentes massas dos íons moleculares encontradas na análise das injeções de cada extrato (em quintuplicata), gerando uma matriz de dados de 30 x 902. Para a obtenção do agrupamento hierárquico das espécies utilizou-se o Método de Ward e a distância Euclidiana quadrada das médias, com pré-tratamento de dados através da análise de variação das médias obtidas corrigidos pelo erro padrão médio.

Para a análise dos componentes principais, os extratos foram analisados na mesma matriz, utilizando a rotação varimax para facilitar visualização da contribuição das variáveis em cada componente principal (DE MOURA et al., 2006) na obtenção dos *pesos* e *escores*, das variâncias de cada componente principal e obtenção dos gráficos ortogonais, IBM SPSS statistics® versão 21.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise por CLAE-DAD e extração dos taninos

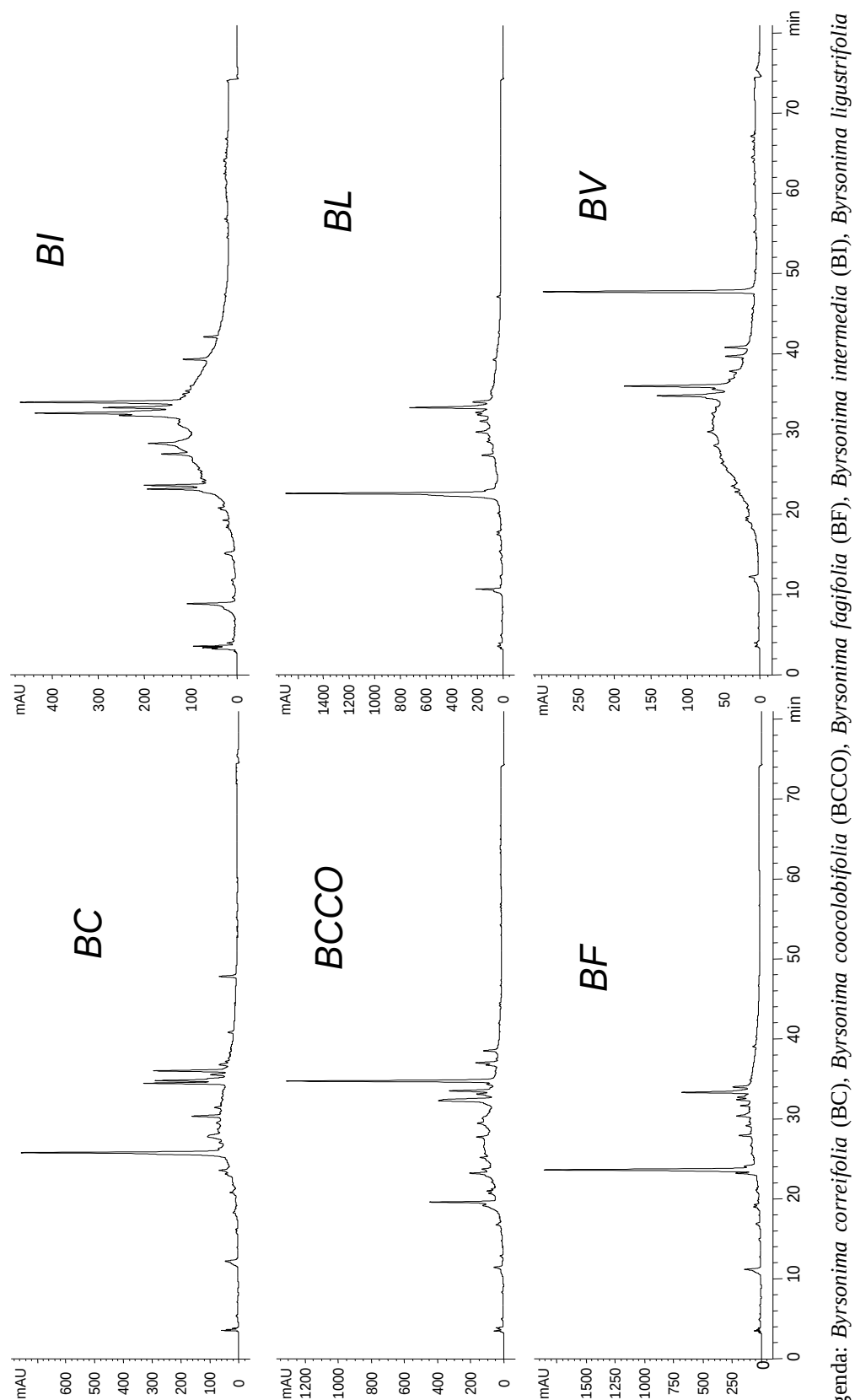
Inicialmente, os extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies estudadas do gênero de *Byrsonima* foram fracionados por cromatografia em permeação em gel, usando sephadex LH-20. Apenas com esta separação inicial, não foi possível obter uma boa separação das substâncias de interesse, devido à complexidade da matriz e à presença de taninos condensados e hidrolisáveis (STRINGANO et. al., 2011). Segundo COLLINS (1998), os taninos pertencem à classe de substâncias que afetam diretamente a resolução e, conseqüentemente, a qualidade da análise por CLAE-DAD e UHPLC-MS (MOTILVA, SERRA, MACIÀ, 2013).

Deste modo, foi necessária uma nova avaliação dos extratos por CLAE-DAD, a fim de comprovar a presença dos taninos e, em decorrência, traçar uma nova estratégia de isolamento dos metabólitos secundários dos extratos. As Figuras 1 a 3 mostram os perfis cromatográficos por CLAE-DAD da avaliação dos extratos em gradiente linear de 5 a 100 de metanol em 60 minutos, comprovando a existência dos taninos, ($T_R = 20$ a 40 minutos) e espectro no UV (banda com $\lambda_{m\acute{a}x} = 280$ nm e 270 nm) (ZHANG et al., 2011).

Portanto, para melhorar a resolução dos cromatogramas apresentados, foi necessário otimizar as condições de extração. Para tanto, utilizou-se cartuchos de extração de fase sólida, preenchidos com Poliamida-6 (P6), um método simples e eficaz na retirada de taninos (IOSET et al., 2010). Primeiramente, avaliou-se a quantidade de poliamida e de amostra e os eluentes empregados, sendo o resultado mensurado pelo rendimento da extração e pelos perfis cromatográficos dos extratos obtidos pós-extração por CLAE-DAD. Uma vez analisada a proporção da quantidade de extrato/resina de 65 mg de extrato para 500 mg de resina (IOSET et al., 2010), avaliou-se inicialmente a eficiência dos solventes extratores (etanol e metanol P.A), como mostrado na Figura 4. O solvente acetato de etila P.A também foi utilizado, entretanto, apresentou poucos sinais no cromatograma e teve rendimento de massa inferior a 10%, não sendo, assim, considerado satisfatório para o prosseguimento dos estudos.

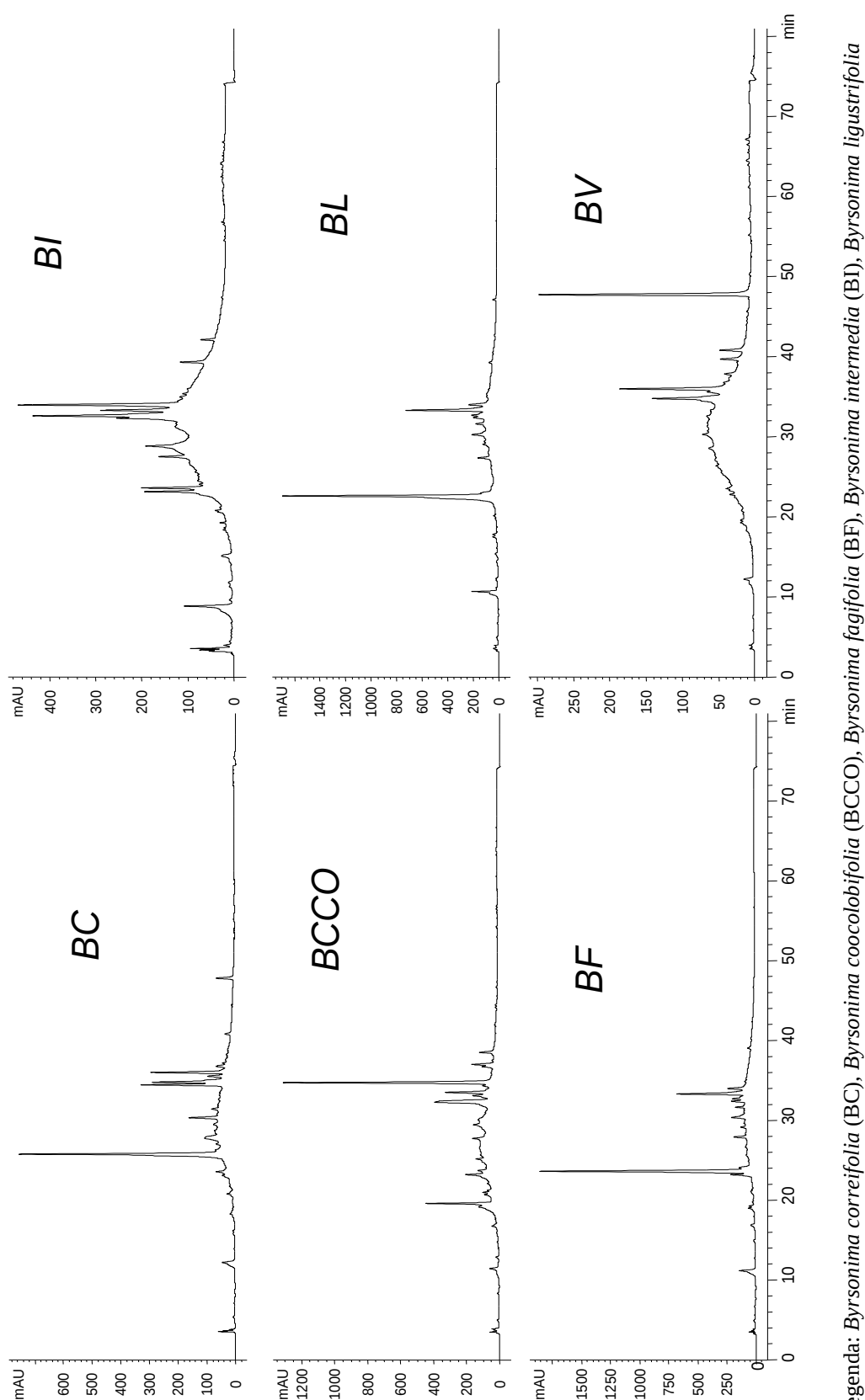
Os cromatogramas da Figura 4 mostram os perfis das extrações com metanol P.A para as espécies de *Byrsonima* (*B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. fagifolia*).

Figura 1 – Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies de *Byrsonima*, leitura em $\lambda = 254$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2.).



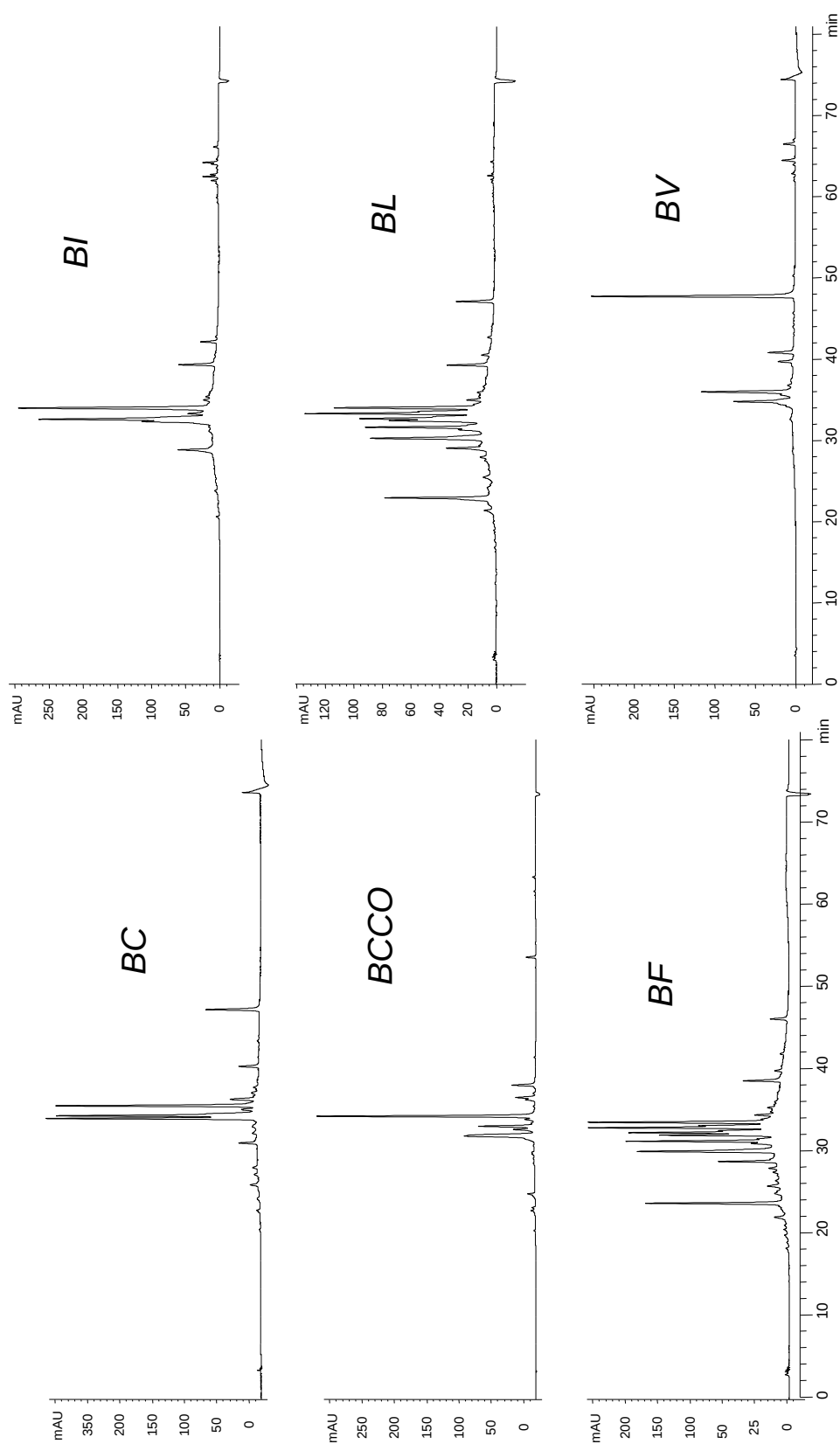
Legenda: *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima coocolobifolia* (BCCO), *Byrsonima fagifolia* (BF), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Figura 2 – Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies de *Byrsonima*, leitura em $\lambda = 280$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2.).



. Legenda: *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima coocolobifolia* (BCCO), *Byrsonima fagifolia* (BF), *Byrsonima intermedia* (BI), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Figura 3 – Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies de *Byrsonima*, leitura em $\lambda = 366$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2.).



Legenda: *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima cooccolobifolia* (BCCO), *Byrsonima fagifolia* (BF), *Byrsonima intermedia* (BI), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Observa-se que ainda há a presença de picos característicos de taninos ($T_R = 20 - 40$ minutos), contudo, com uma melhor visualização dos picos cromatográficos.

Já na Figura 5, os perfis das extrações em Poliamida-6 com etanol P.A. das mesmas espécies (*B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. fagifolia*) evidenciaram a eliminação dos taninos, tendo ocorrido, todavia, a perda de picos cromatográficos, quando comparados com extrato bruto hidroalcoólico e com a extração realizada com metanol P.A.

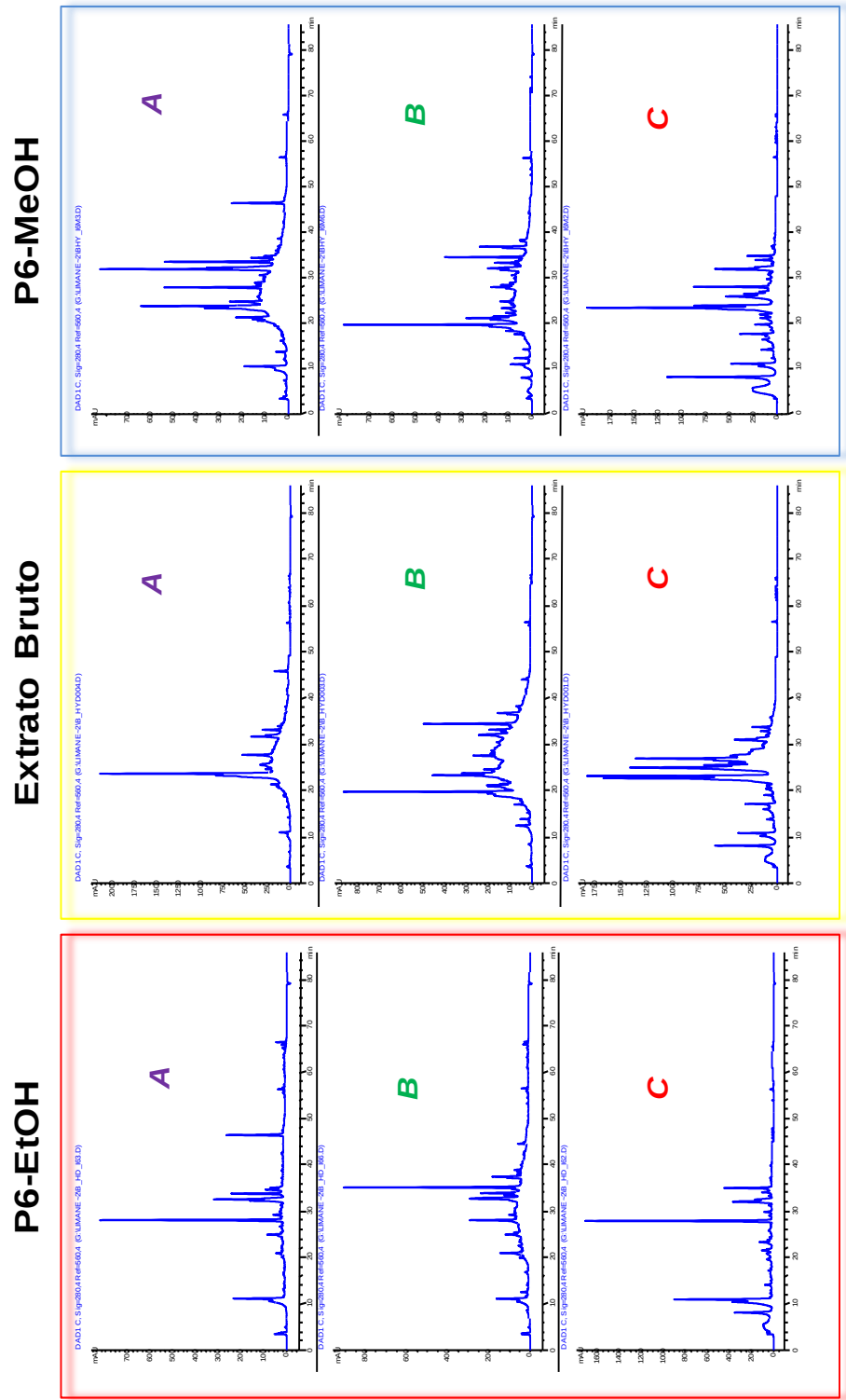
Com isto, optou-se por realizar as extrações com metanol P.A., pois, apesar de não eliminar completamente os taninos do extrato, houve a melhora da resolução dos cromatogramas sem a perda significativa de picos cromatográficos, quando comparados ao extrato hidroalcoólico (Figuras 4 e 5).

4.2. Processo de separação dos constituintes dos extratos, otimização da separação por CLAE-DAD e transposição para coluna de CLMP.

A fim de realizar a identificação dos constituintes químicos dos extratos estudados, misturou-se os seis extratos de *Byrsonima* tratados em poliamida para o isolamento dos constituintes majoritários por Cromatografia Líquida em Média Pressão (CLMP). Para isso, foram otimizadas as condições de isolamento da mistura dos extratos denominada BM (*Byrsonima* mistura), conforme mostrado na Tabela 1. A transposição dos dados da coluna analítica de CLAE para a coluna de CLMP foi realizada pelo programa HPLC calculator (version 3) dos grupos de pesquisa em Química Analítica e Produtos Naturais da Universidade de Genebra - UNIGE (GUILLARME, 2007).

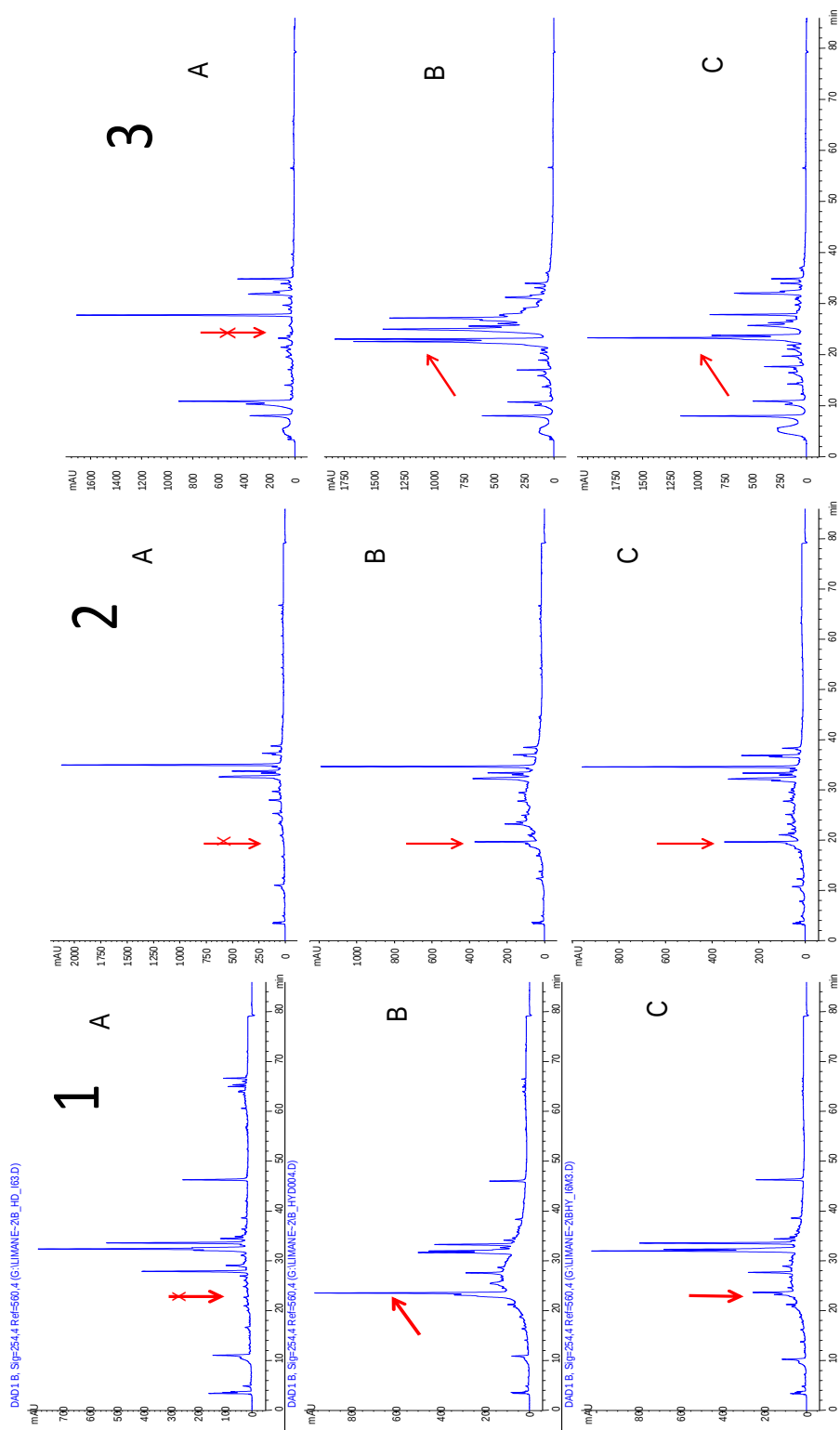
Nas Figuras 6A e 6B, pode-se visualizar os perfis cromatográficos de BM em coluna analítica de alta resolução, Xbrigid® (250 x 4,6 mm, 5 µm) e em coluna Zeoprep (250 x 4,6 mm, 25µm). A fase móvel utilizada foi otimizada, conforme o gradiente linear: início com 5% do solvente B (metanol) por 37 minutos, elevando a 68% de B até 210 minutos, e finalizando em 100% B em 230 minutos. Ao compararmos os cromatogramas obtidos com a análise realizada nas duas colunas, Xbrigid (Figura 6A) e coluna Zeoprep (Figura 6B), podemos observar que a Figura 6B apresenta um cromatograma de baixa resolução. Essa baixa resolução pode ser explicada devido à irregularidade superficial e ao tamanho das partículas presentes na

Figura 4 – Comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de espécies de *Byrsonima correifolia* (A), *Byrsonima coccolobifolia* (B) e *Byrsonima fagifolia* (C), em $\lambda= 280$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2).



Legenda: **P6-EtOH:** Extratos hidroalcoolicos filtrados em Poliamida com Etanol; **P6-MeOH:** Extratos hidroalcoolicos filtrados em Poliamida com Metanol

Figura 5 - Perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos de espécies *Byrsonima correifolia* (1), *Byrsonima coccolobifolia* (2) e *Byrsonima fagifolia* (3) e *Byrsonima ligustrifolia* (3), leitura realizada em $\lambda = 254$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.2).



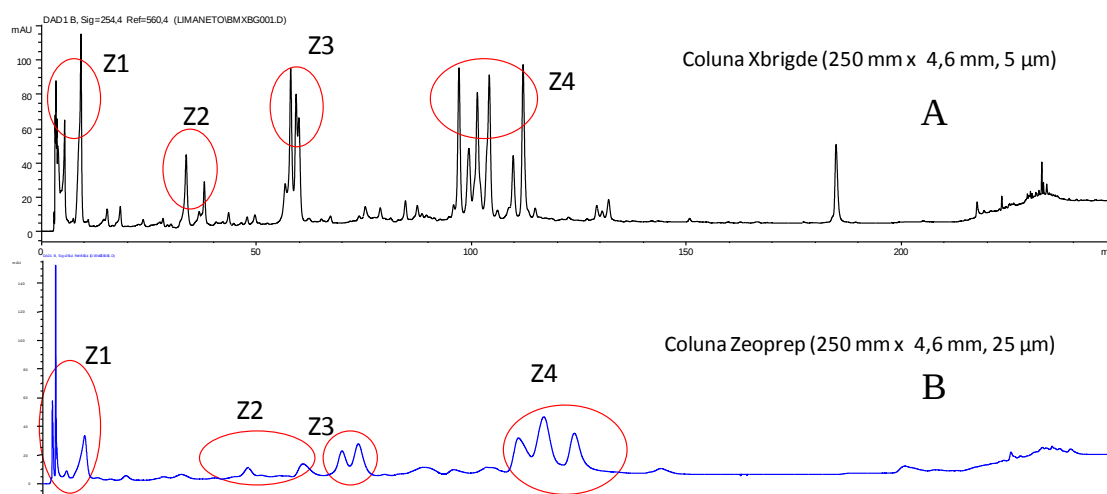
Legenda: A - extrato tratado com Poliamida-6 com solvente extrator Etanol; B - extrato bruto sem uso da Poliamida; C - extrato tratado com Poliamida-6 com solvente extrator Metanol.

fase estacionária da coluna Zeoprep (250 x 4,6 mm, 15-25 μm). Entretanto, partículas maiores e irregulares aumentam os espaços intersticiais em colunas maiores, como as utilizadas em separações por CLMP (460 x 49 mm, 15-25 μm). Portanto, estas características podem compensar a pressão interna na coluna, fator crítico e limitante na separação cromatográfica, por CLPM.

Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas na otimização da separação dos constituintes químicos da mistura de extratos hidroalcoólicos tratados em coluna de Poliamida-6, com respectiva transposição das condições para coluna utilizada na cromatografia líquida de media pressão (CLMP).

CLAE				CLMP			
Comprimento da coluna		250 mm		Comprimento da coluna		460 mm	
Diâmetro da coluna		4,6 mm		Diâmetro da coluna		49 mm	
Tamanho da partícula		5 μm		Tamanho da partícula		25 μm	
Volume morto		2,64 mL		Volume morto		406 mL	
Dwell volume		0,95 mL		Dwell volume		16,5 mL	
Fluxo		1mL.min ⁻¹		Fluxo		3,5mL.min-1	
Programação	Tempo (minutos)	A%	%B	Programação	Tempo (minutos)	A%	%B
Condições iniciais	0,00	95	5	Condições iniciais	0,00	95	5
Início	2,00	95	5	Início	37,03	95	5
3	210,00	32	68	3	9264,30	32	68
4	230,00	0	100	4	10143,09	0	100
5	250,00	0	100	5	11021,98	0	100

Figura 6 – Perfil cromatográfico de BM após a otimização de separação das substâncias químicas em diferentes colunas cromatográficas utilizadas em CLAE-DAD. (vide condições cromatográficas: Tabela 1.



Legenda: A – análise realizada em coluna a Xbrigde 250 x 4,6 mm, 5μm; B – análise realizada em coluna a Zeoprep, 250 x 4,6 mm, 25μm; Z – zonas de interesse para a separação dos constituintes químicos.

Nas Figuras 7A e 7B, é mostrado o processo de separação e o perfil cromatográfico obtido em coluna de CLMP, respectivamente. Como mostrado no gráfico, foram necessárias 182 horas para a finalização do fracionamento do extrato de BM, perfazendo um total 776 frações. A partir da fração 658, não foi possível a detecção de novas frações, utilizando-se detector no UV. Frações posteriores a estas foram reunidas pelas características cromatográficas exibidas em CCDC (Rf e revelação sob luz UV). As frações anteriores foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos em CLAE-DAD, sendo reagrupadas em 293 novas frações. Foram selecionadas oito frações (Figuras 8 e 9) obtidas da separação em CLMP em fase reversa de acordo com a massa de cada fração e complexidade do perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (Figura 10). Os isolamentos das substâncias destas frações selecionadas feitas por CLAESP-UV encontram-se descritos no item 3.2.4.9 da parte experimental, sendo isoladas e/ou identificadas nove substâncias por RMN ^1H e ^{13}C , HPLC-ESI-IT-MSⁿ e UHPLC-ESI-TOF-MS.

Figura 7 – A) Gradiente utilizado na CLMP para separação dos constituintes químicos da mistura de extratos de *Byrsonima*. B – Perfil cromatográfico obtido na coluna de CLMP de acordo com gráfico 7A (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.7).

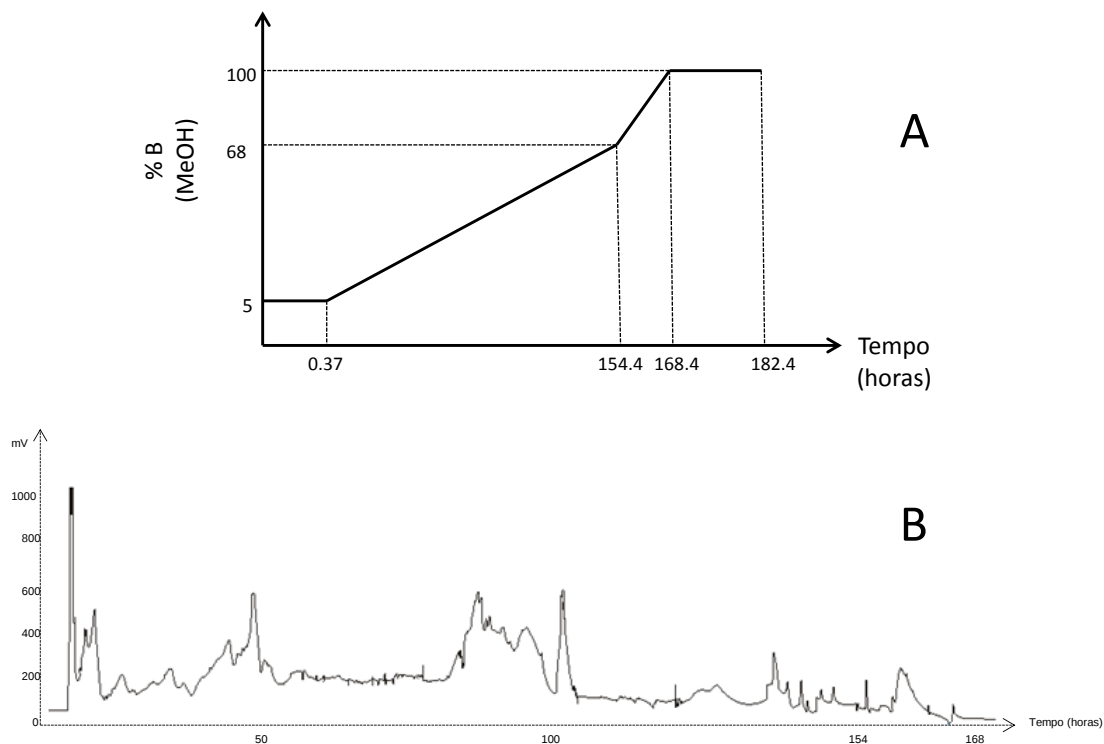


Figura 8 – Distribuição das frações selecionadas para CLAESP-UV no cromatograma obtido no fracionamento do extrato BM por CLMP.

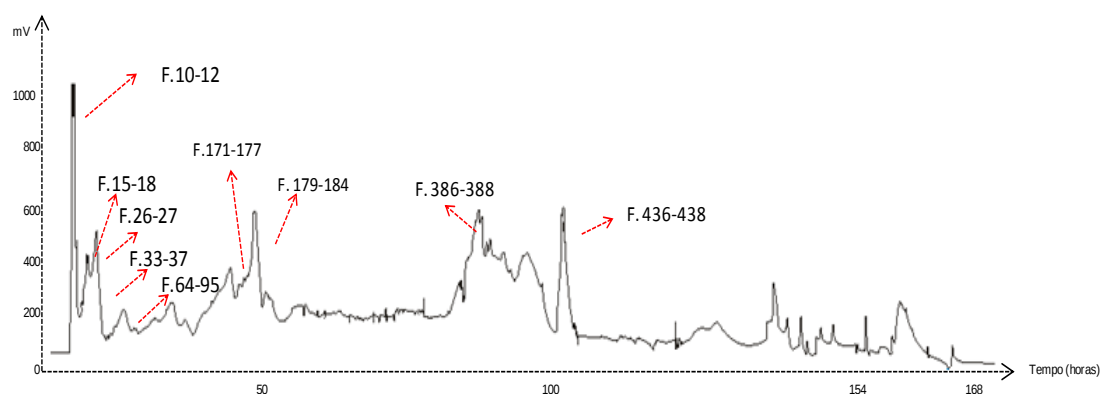


Figura 9 - Fluxograma Mistura dos extratos hidroalcoólicos de espécies de *Byrsonima* e frações obtidas por CLMP, com posterior isolamento por CLAESP-UV.

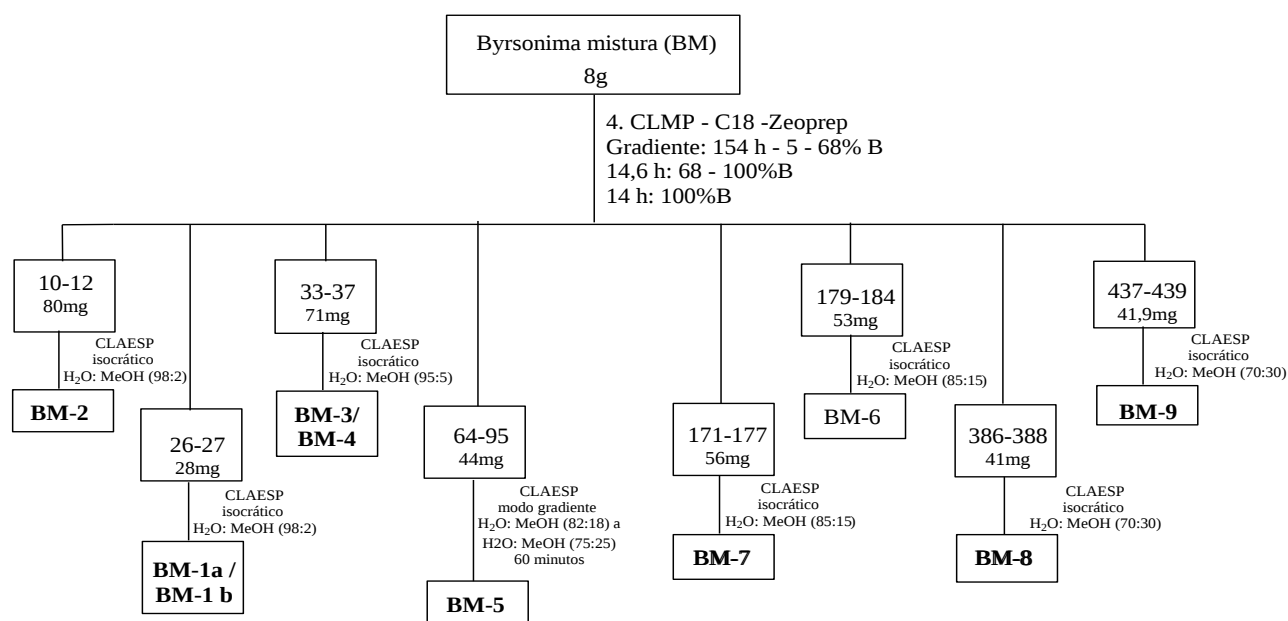
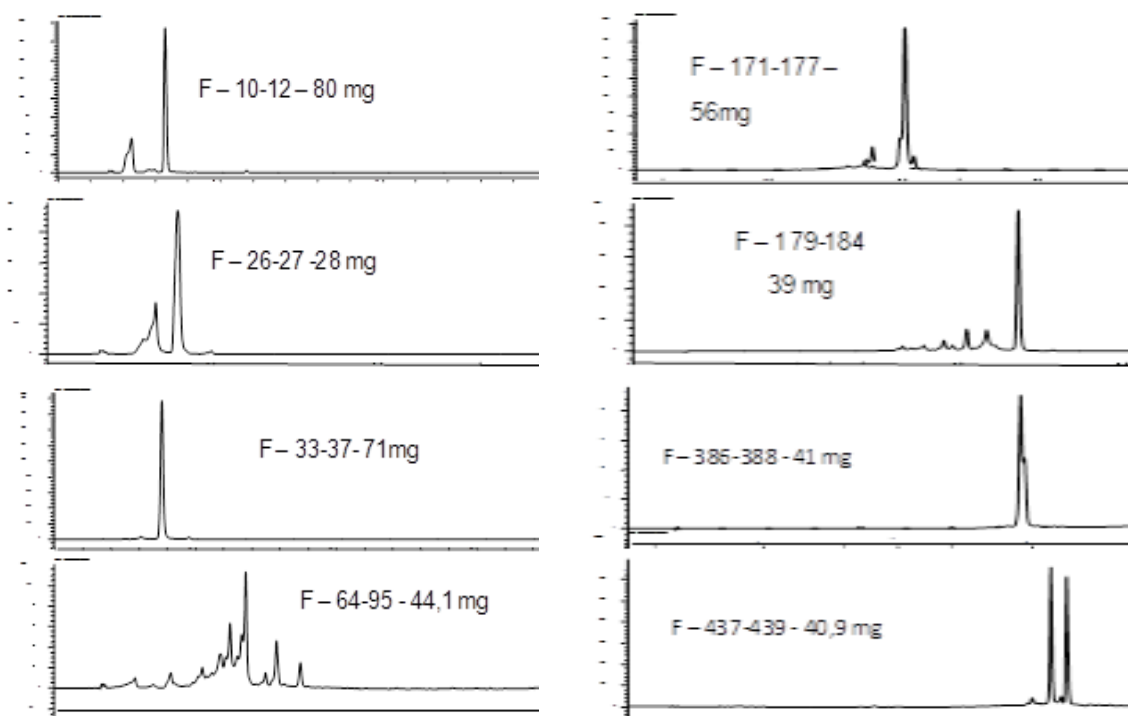


Figura 10 – Perfis cromatográficos das frações selecionadas para CLAESP-UV. Leitura $\lambda = 254$ nm. (vide condições cromatográficas: item 3.2.4.8.).



4.3. Identificações das substâncias isoladas

Todas as frações indicadas na Figura 10 foram para o isolamento dos seus constituintes químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semi Preparativa resultando no isolamento de nove substâncias, estando elas relacionadas na Tabela 2.

Todas as substâncias isoladas foram analisadas por HPLC-ESI-IT-MS e também por UHPLC-ESI-TOF-MS ambos em modo negativo (conforme itens 3.2.4.10 e 3.2.4.12).

Por meio das análises de RMN ^1H e APT, correlações entre prótons (COSY e NOESY) e carbono-proton (HMBC e HMQC) e por HPLC-ESI-IT-MSⁿ pôde-se determinar as estruturas químicas.

Tabela 2 – Substâncias isoladas por CLAESP-UV, com respectivas frações de origem e massas obtidas de cada substância.

Substâncias isoladas	Fração do CLMP	Massa obtida da substância isolada (mg)
BM-1a	F.26-27-1	13
BM-2	F.10-12-5	26
BM-3	F.33-37-1	4
BM-4	F.33-37-2	4
BM-5	F.64-95-1	5
BM-6	F.179-184-1	5
BM-7	F.171-177-2	4
BM-8	F.386-388	8
BM-9	F.437-439	6

4.3.1. Identificação de BM-1

A Fração 26-27, obtida no fracionamento do extrato por CLMP, foi analisada por CLAE-DAD, apresentando dois picos cromatográficos ($T_R = 6,4$ e $8,0$ min.). A substância referente ao pico com $T_R = 6,93$ minutos foi purificada em CLAESP-UV, utilizando como fase móvel o modo isocrático e iniciando com 2% de metanol, sendo denominada BM-1. Por HPLC-ESI-IT-MSⁿ (modo negativo), pode-se identificar o íon de m/z 331, referente ao íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$. O espectro no UV mostrou duas bandas de absorção máxima em 272 nm, características de derivados de ácidos fenólicos, como o ácido gálico (WANG, HELLIWELL, YOU, 2000). Observa-se ainda o íon de m/z 662, que pôde ser atribuído a formação do dímero $[2 M - H]^-$.

Figura 11 – A) Cromatograma de BM-1 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 6,93$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

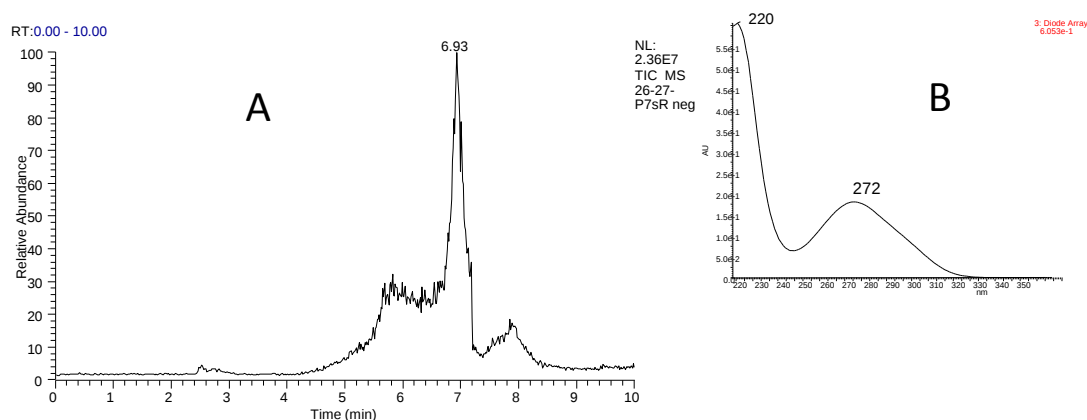
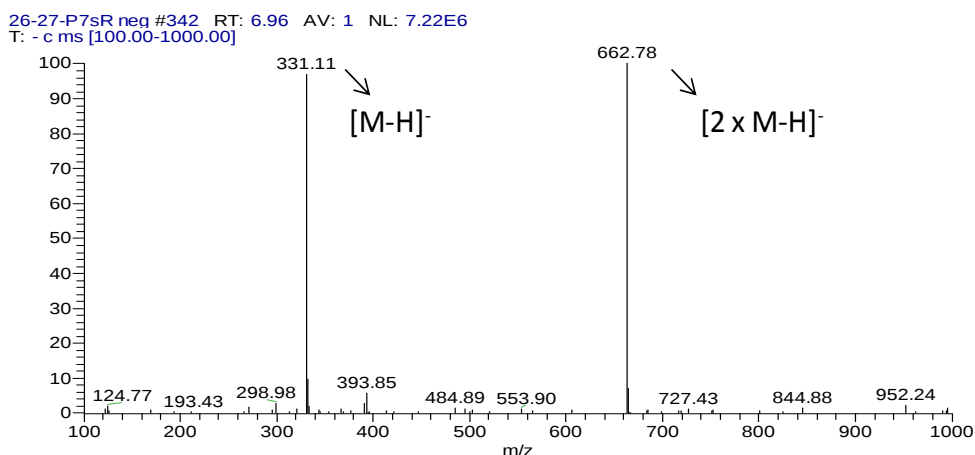


Figura 12 - Espectro de massas primeira-ordem, em modo *full-scan*, do íon precursor de m/z 331, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10).



O espectro de ^{13}C APT (Figura 68) foram observados 14 sinais de carbonos característicos ao ácido gálico (RODRIGUES, 2011; REGASINI, 2008). Entretanto, os sinais referentes aos deslocamentos químicos dos C-2' e C-6' (δ_{H} 108,9 e δ_{H} 108,7), aliados à presença de dois sinais de carbonos de carbonila em (δ_{C} 167,8 e δ_{C} 164,6) e dos sinais no espectro de RMN de ^1H , referentes a dois singletos de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,01 e δ_{H} 6,92 (Tabela 3 e Figura 67), sugerem a presença de mistura de duas unidades de ácido gálico.

O espectro HMBC (Figura 70) evidenciou a presença de dois sistemas de acoplamentos hidrogênio/carbonos. O sinal do hidrogênio em δ_{H} 7,01 apresenta correlação 3J com o carbono em δ 164,6, enquanto que o hidrogênio com deslocamento químico em δ_{H} 6,92 apresenta correlação com o carbono em δ_{C} 167,8 (Tabela 3). O espectro de ^{13}C APT (Figura 68) apresenta sinais de deslocamentos químicos na região entre δ_{C} 60 e 95, que foram atribuídos a carbonos da porção glicosídica. A presença do hidrogênio anomérico δ_{H} 5,50 (H-1, *d*, $J = 7,8\text{Hz}$), assim como a identidade e a configuração do glicosídeo, foram confirmados, como sendo a β -glicose.

Para estabelecer a ligação interglicosídica, observou-se no espectro HMBC (Figura 71) a correlação a 3J do H-1' da glicose δ_{H} 5,5 *d* ($J = 7,8$) com o carbono da carbonila (δ_{C} 164,8) do grupo galoíla, evidenciando que a hidroxila do ácido gálico está substituída pela glicose. O espectro de correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (Figura

69) possibilitou indicar as correlações entre os hidrogênios H-1/H-5, H-3/H-4, H-4/H-3, H-5/H-1, H-5/H-6_b, H-6_a/H-6_b, H-6_a/H6_b, H-6_a/H-5.

Portanto, esta substância foi determinada como sendo uma mistura de do ácido gálico e a **β-glucogalina**, sendo esta, nomeada por BM-1 (Tabela 3).

Segundo Puppala (2012), a β-glucogalina é o constituinte majoritário nos frutos de *Emblica officinalis*, uma planta utilizada a centenas de anos pela medicina tradicional indiana – a Ayurveda –, para controle da diabetes humana e da catarata, sendo capaz de inibir a acumulação de sorbitol – responsável pela surgimento da catarata –, pela supressão da enzima aldose redutase.

Figura 13 – Estrutura química de BM-1

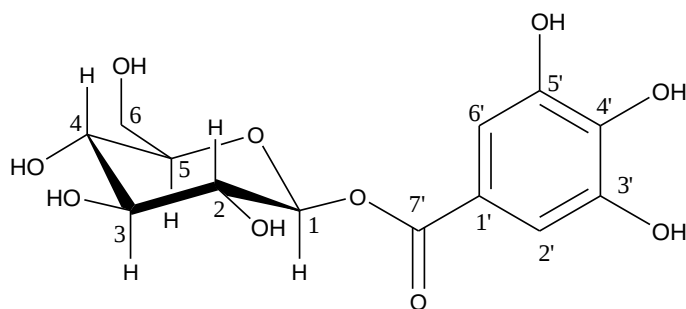


Tabela 3 – Dados de RMN ^1H , APT (δ , DMSO- d_6 , 11,7 T) e correlações COSY, HMBC e HSQC da substância **BM-1**

Posição	BM-1				
	$\delta_{\text{H}}/$ Multipl. (J -Hz)	δC	COSY	HSQC	HMBC
1'	-	118,6	-		
2'	7,01 s	108,7	-	H-2'/C-2'	H-2'/C-1' H-2'/C-3' H-2'/C-4' H-2'/C-7'
3'	-	145,3	-	-	
4'	-	137,8	-	-	
5'	-	145,3	-		
6'	7,01 s	108,7	-	H-6'/C-6'	H-6'/C-1' H-6'/C-5' H-6'/C-4' H-6'/C-7'
7'	-	164,6	-	-	
1	5,50 d (7,8)	94,4	H-1/H-5	H-1/C-1	H-1/C-1 H-1/C-7'
2	3,26 d (6,0)	72,9	-	H-2/C-2	
3	3,27 dd (9,1; 2,2)	76,6	H-3/H-4	H-3/C-3	H-3/C-2 H-3/C-4 H-3/C-5
4	3,17 dd (14,5; 3,3)	69,5	H-4/H-3	H-4/C-4	H-4/C-5 H-4/C-6
5	3,23 dd (8,8; 2,8)	77,8	H-5/H1 H-5/H6 _b	H-5/C-5	H-5/C-1
6 _a	3,65 dd (12,0; 1,0)	60,5	H-6 _a /H-6 _b	H-6 _a /C-6	H6 _a /C-4
6 _b	3,47 dd (12,0; 5,0)		H-6 _b / H-6 _a H-6 _b /H-5	H-6 _b /C-6	*

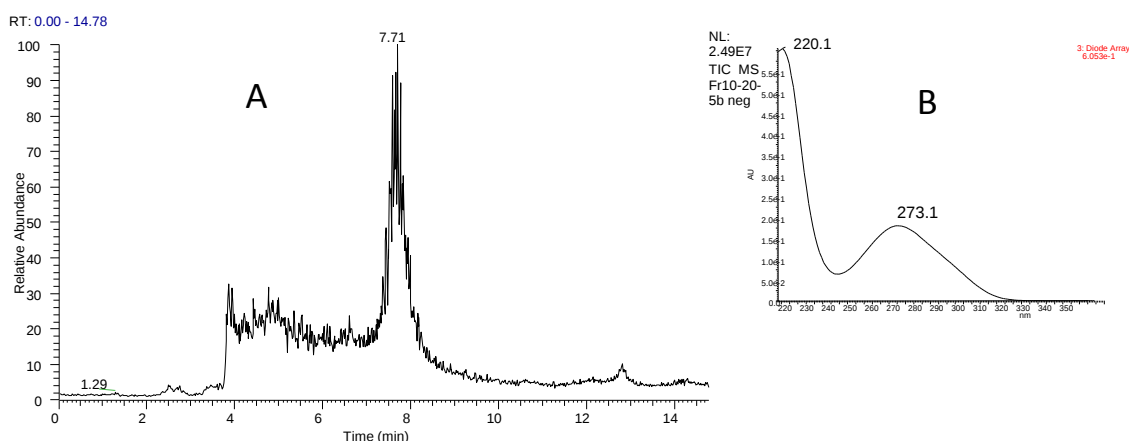
Legenda: * - Não observado

4.3.2. Identificação dos demais derivados galoíl-quínicos

4.3.2.1. Identificação de BM-2

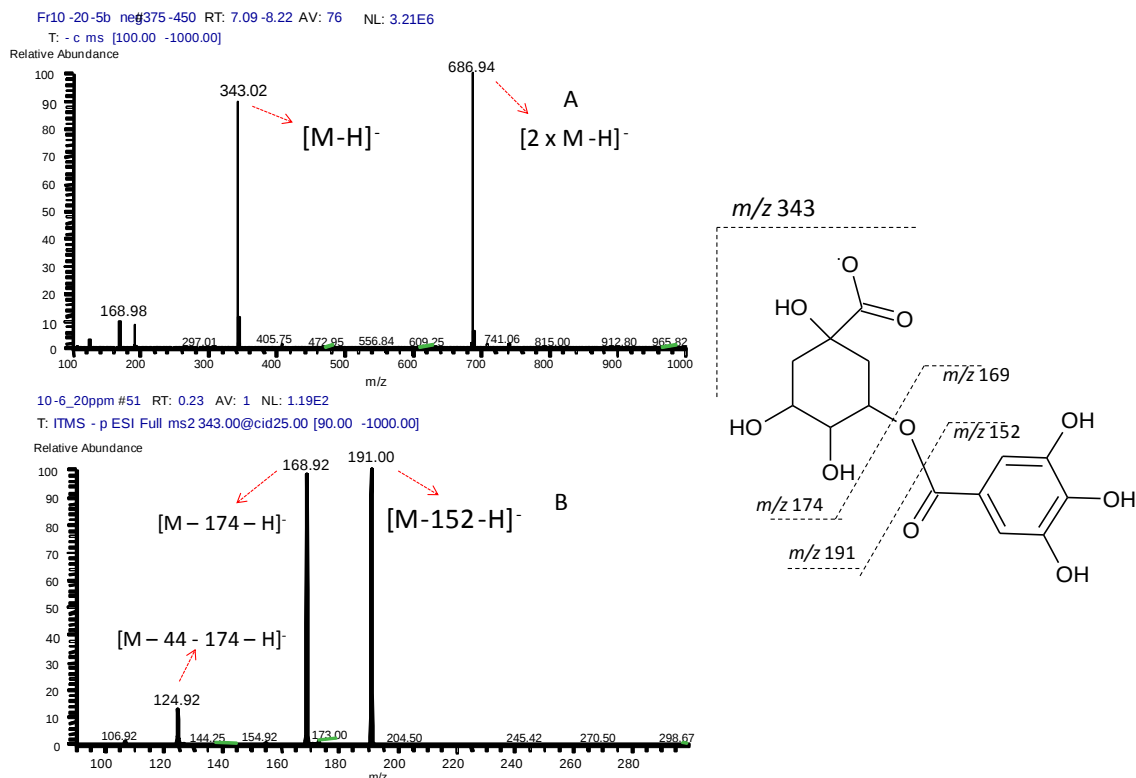
A fração 10-12, obtida por CLMP, foi avaliada por CLAE-DAD e seu cromatograma (Figura 10) apresentou dois picos, que, após purificação por CLAES-UV (item 3.2.4.9), foi isolada uma substância, sendo esta, nomeada como BM-2. Para confirmar a identidade desta molécula, realizou-se a análise por HPLC-ESI-IT-MSⁿ (modo negativo, Figura 14). Observou-se no cromatograma ($T_R = 7,31$ min., Figura 14) o íon da molécula desprotonada de m/z 343 $[M - H]^-$ (Figura 15). O espectro de MS² originou dois fragmentos: um íon em m/z 191, referente à perda de um grupamento galoíla $[M - 152 - H]^-$, e outro de m/z 169, correspondente à formação do ácido gálico desprotonado $[M - 191 - H]^-$, indicando ser um derivado do ácido galoil-quínico. O espectro no UV apresentou duas bandas de absorção, uma em 220 nm e outra em 273 nm, referentes aos derivados do ácido gálico (RODRIGUES, 2007).

Figura 14 – A) Cromatograma de BM-2 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 7,71$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.



O espectro de 1H (Figura 72, anexo B) mostrou a presença de sinais aromáticos em δ_H 6,99, referentes aos dois hidrogênios idênticos (H-6' e H-2'). O espectro de RMN de ^{13}C APT (Figura 73, anexo B) apresentou os sinais de ^{13}C em δ_C 120,5; 138,0; 145,3 e 108,9 referentes a carbonos aromáticos quaternários. O carbono em δ 165,5 foi menos desblindado, quando comparado com o carbono da carboxila do ácido gálico (δ 169,0), é justificado pela presença da esterificação do ácido quínico.

Figura 15 – Espectro de massas do íon precursor de m/z 343, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 343; (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10).



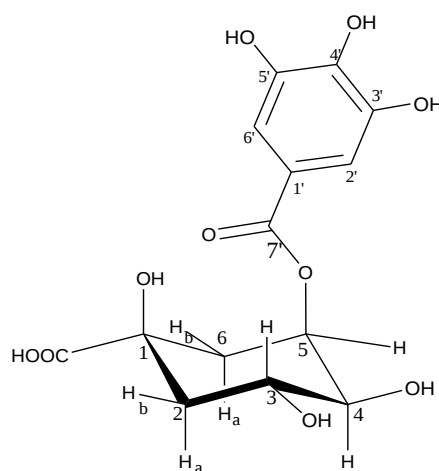
A ligação entre as duas unidades (ácido quínico e grupo galoíla) foram estabelecidas, considerando-se a correlação existente no espectro HMBC (Figura 76, anexo B) entre o hidrogênio δ_H 5,24 (H-5) e o carbono da carbonila do grupo galoíla em δ 165,5.

No espectro de hidrogênio, observou-se ainda a existência três sinais: um em δ_H 9,14, o segundo em δ_H 8,81 e o terceiro em δ_H 8,12. Estes sinais foram atribuídos a hidrogênios de hidroxilas fenólicas (Figura 72, anexo B), comprovando que as mesmas não se encontravam esterificadas.

No experimento COSY (Figura 74, anexo B) foram observados sinais com deslocamentos químicos em δ_H 1,80 e δ_H 1,83 que foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-2_a e H-2_b. A multiplicidade destes sinais, duplo-dupeto, e as constantes de acoplamentos observadas ($J= 7,0$ Hz e $13,0$ Hz), possibilitou verificar que estes hidrogênios encontram-se em posição geminal entre si e em vicinal com ao hidrogênio em δ_H 3,50 (H-3).

Os sinais dos hidrogênios em δ_H 1,95 e 2,00 foram atribuídos aos (H-6_a H-6_b) respectivamente. Estes apresentam comportamento semelhantes aos hidrogênios H-2_a e H-2_b), ($J = 7,0$ Hz e 13,0 Hz), porém a correlação observada foi com o δ_H 5,24 (H-5). Os sinais em δ_H 3,54 e δ_H 3,93 (ambos duplos dupletos) foram atribuídos aos H-3 e H-4 respectivamente. Portanto, BM-2 foi identificado como sendo o **ácido 5-O-galoil-quínico**.

Figura 16 - Estrutura química de BM-2



4.3.2.2. Identificação de BM-3

A Cromatografia Líquida Semi Preparativa da fração 33-37, em modo isocrático com 5% de metanol em água, mostrou-se eficiente para o isolamento de BM-3. O espectro de massas mostrado na Figura 18, BM-3 apresentou o íon da molécula desprotonada em m/z de 343 para $[M - H]^-$, enquanto que o espectro de massas de segunda ordem mostrou os fragmentos de m/z 169 e 191 formados pelas perdas $[M - 174 - H]^-$ e $[M - 152 - H]^-$ referentes ao ácido quínico e grupo galoíla respectivamente.

Figura 17 – A) Cromatograma de BM-3 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 9,81$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

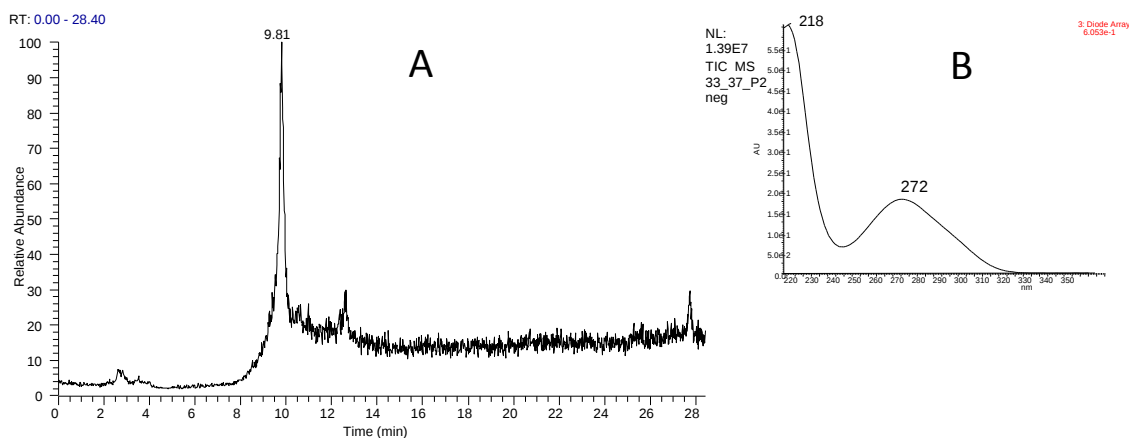
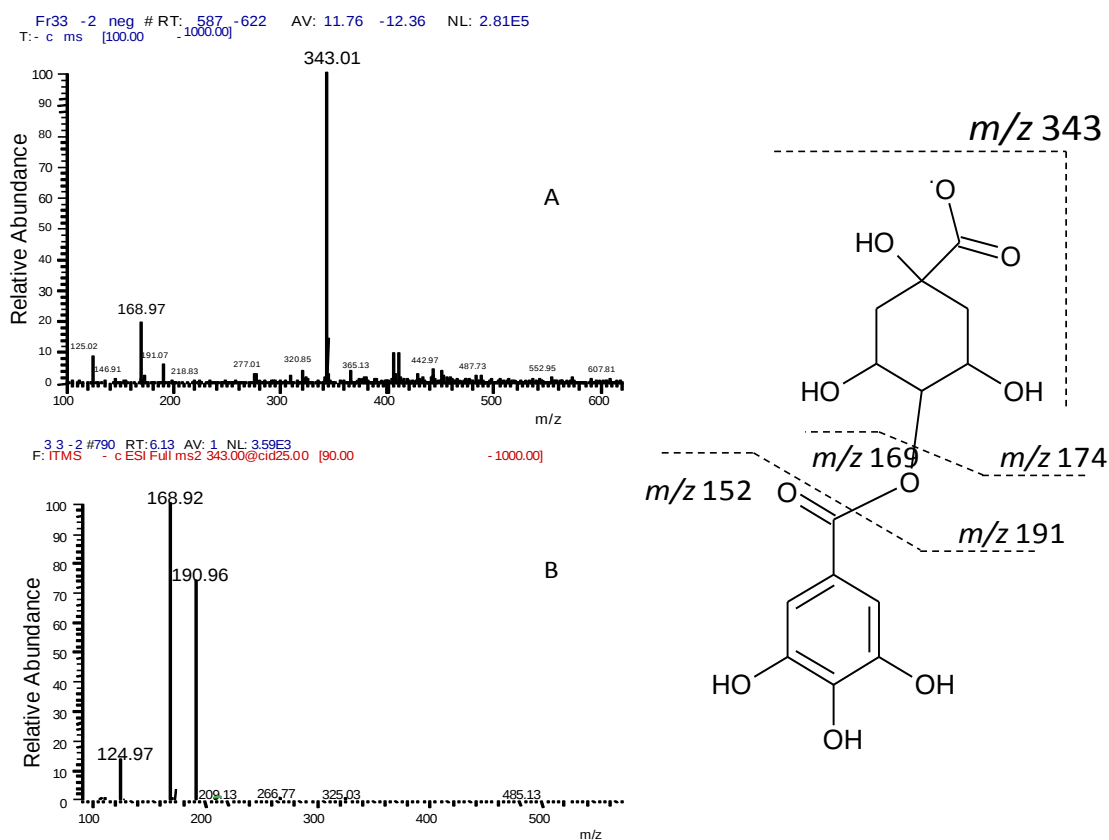


Figura 18 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 343, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10).



Em virtude do valor obtido para o íon precursor desta substância $[M - H]^-$ m/z igual ao de BM-2, a análise dos sinais apresentados no espectro de RMN 1H e ^{13}C de BM-3 foi realizada de forma comparativa com a substância anterior. A Tabela 4 apresenta os sinais equivalentes e os sinais com deslocamentos químicos diferentes para a substância BM-3.

O deslocamento químico do H-4 apresentou-se mais desblindado (δ_H 4,86 dd, $J = 8,0$ e $4,0$ Hz), quando comparado com o deslocamento químico de H-4 da substância BM-2 (δ_H 3,90), sugerindo que a posição em BM-4 esteja substituída para esta substância. Para estabelecimento da ligação entre as duas unidades (ácido quínico e grupo galoíla), novamente o espectro de HMBC (Figura 80, anexo B) foi analisado, evidenciando o acoplamento entre o hidrogênio em δ_H 4,86 (H-4) e a carbonila do grupo galoíla em δ_C 165,5. Observou-se, ainda, que o deslocamento químico do carbono (C-4, δ_C 75,3) encontra-se mais desblindado, quando comparado com (C-4, δ_C 72,4) BM-2. A análise dos espectros de RMN corrobora a identificação de BM-3 como **ácido 4-O-galoil-quínico**.

Figura 19 - Estrutura química de BM-3

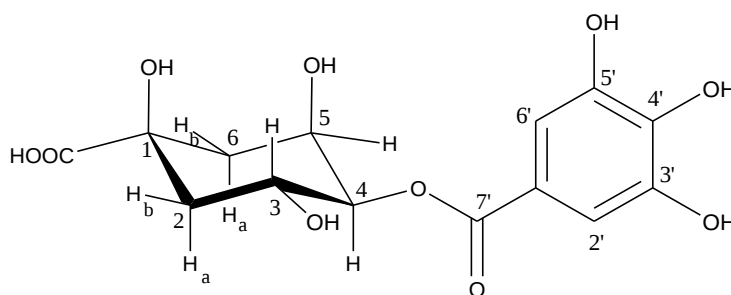


Tabela 4 - Dados de RMN ^1H , APT (δ , DMSO- d_6 , 11,7 T) e correlações COSY, HMBC das substâncias **BM-2** e **BM-3**.

Posição	BM-2				BM-3			
	δ_{H} Multipl. (J -Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC	δ_{H} Multipl. (J -Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC
1	-	73,1			-	*		
2 _a	1,80 <i>dd</i> (14,0; 4,0)	28,8	H-2 _b /H-4	H-2/C-1 H-2/C-3 H-2/C-5	1,69 <i>dd</i> (11;2)	28,7**	H-2/ H-4	
2 _b	1,83 <i>dd</i> (13,0; 8,0)				1,80 <i>m</i>			
3	3,54 <i>dd</i> (7,0; 3,0)	67,1	*	H-3/C-1 H-3/C-3	3,74 <i>dd</i> (8;5)	65,2**	H-3/H-2 _a H-3/H-2 _b H-3/H-5	
4	3,93 <i>m</i>	71,7	H-4/H-3 H-4/H-2	H-4/C-1 H-4/C-3 H-4/C-4	4,86 <i>dd</i> (8,0;4,0)	75,3**	H-4/ H-3 H-4/ H-5	H-4 / C-7'
5	5,24 <i>m</i>	71,2	H-5/H-3 H-5/H-6 _a	H-5/C-1 H-5/C-3 H-5/C-7'	4,20 <i>dd</i> (5,2; 2,0)	64,1**	H-5/ H-6 _b H-5/ H-4	
6 _a	1,95 <i>dd</i> (13,0; 7,0)	35,3	H-6 _a /H-5 H-6 _b /H-5	H-6/C-1 H-6/C-5	1,75 <i>dd</i> (13,0; 2,0)	39,7**	H-6 _a / H-3	
6 _b	2,00 <i>dd</i> (13,0; 7,0)				1,83 <i>dd</i> (12,0; 2),0		H-6 _b /H-6 _a H-6 _b /H-4	
7	-	176,2	-	-	-	*	-	-
1'	-	120,5	-	-	-	120,2**	-	-
2'	6,99 <i>s</i>	108,9		H-2'/C-1' H-2'/ C-2' H-2'/ C-3' H-2'/ C-4' H-2'/ C-7'	7,00 <i>s</i>	108,7**		H-2'/C-1' H-2'/ C-2' H-2'/ C-3' H-2'/ C-4' H-2'/ C-7'
3'	-	145,3	-	-		145,4**		-
4'	-	138,0	-	-		138,2**		-
5'	-	145,3	-	-		145,4**		-
6'	6,99 <i>s</i>	108,9	-	-	7,00 <i>s</i>	108,7**		Idem H-2'
7'	-	165,5	-	-		165,5		-

Legenda: * - Não observado; ** - dados obtidos por HMBC e HSQC

4.3.2.3. Identificação de BM-4

A substância denominada BM-4 foi obtida através da fração 33-37, conforme descrito no item 3.2.4.9. Por meio da análise de espectroscopia de RMN de ^1H (Figura 81, anexo B), foi observado apenas um único sinal de hidrogênio aromático, um singleto em δ_{H} 6,90, equivalente a dois hidrogênios. No espectro de ^{13}C APT e HMBC (Figuras 82 e 83, anexo B) foram visualizados cinco sinais, todos referentes aos carbonos aromáticos, sendo o sinal em δ_{C} 167,9 referente à carbonila, δ_{C} 108,7 aos carbonos aromáticos hidrogenados e δ 121,0; 145,5 e 138,0 os demais carbonos aromáticos do sistema. Esses dados permitiram concluir que a substância BM-4 se tratava do ácido gálico, uma vez que seus deslocamentos químicos são semelhantes aos descritos por Regasini (2008). O mesmo havia sido identificado em mistura na fração 26-27, entretanto, optou-se pela descrição desta substância separadamente, em virtude de encontrar-se pura na fração 33-37, conforme demonstrado na Tabela 4.

Figura 20 - Estrutura química de BM-4

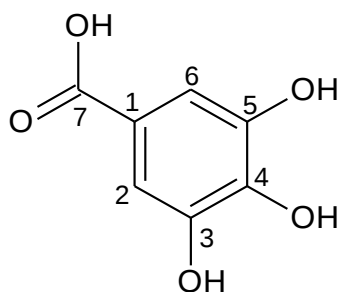


Tabela 5 - Dados de RMN ^1H , (δ , DMSO- d_6 , 11,7 T) e correlações HMBC das substâncias **BM-4**.

Posição	BM-4			REGASINI, 2008	
	$\delta_{\text{H}}/$ <i>Multipl.</i> (J -Hz)	δ_{C}	HMBC	$\delta_{\text{H}}/$ <i>Multipl.</i> (J -Hz)	δ_{C}
1	-	121,0*	-	-	120,5
2	6,90 s	108,7	H-2/ C-1 H-2/ C-2/C-6 H-2/ C-3/C-5 H-2/ C-4 H-2/ C-7	6,91 s	108,7
3	-	145,5	-	-	145,4
4	-	138,0*	-	-	138,0
5	-	145,5	-	-	145,4
6	6,90 s	108,7	H-6/ C-1 H-6/ C-2/C-6 H-6/ C-3/C-5 H-6/ C-4 H-6/ C-7	6,91 s	108,7
7	-	167,9*	-	-	167,4

Legenda: * - confirmado pelo HMBC

4.3.2.4. Identificação de BM-5

Da fração 64-95 foi obtido BM-5, isolado em modo gradiente de 6 a 12% de metanol em água, em CLAES-UV. A análise de HPLC-ESI-IT-MSⁿ (modo negativo) apresentou o íon da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 495. Os espectros de MS² e MS³ na Figura 22 evidenciaram os fragmentos em: m/z 343, 191 e 169.

O íon fragmento de m/z 495 foi descrito por Maldini, Montoro, Pizza (2009) como sendo do ácido digaloílaquínico, que apresenta como fragmentações características m/z 343 $[\text{M} - 152 - \text{H}]^-$ e m/z 191, referentes à eliminação de um outro grupamento galoíla $[\text{M} - 2 \times 152 - \text{H}]^-$, e o íon formando m/z 169, que corresponde à eliminação do ácido quínico $[\text{M} - 191 - \text{H}]^-$, com subsequente formação do ácido gálico desprotonado.

Figura 21 – A) Cromatograma de BM-5 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 19,54$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

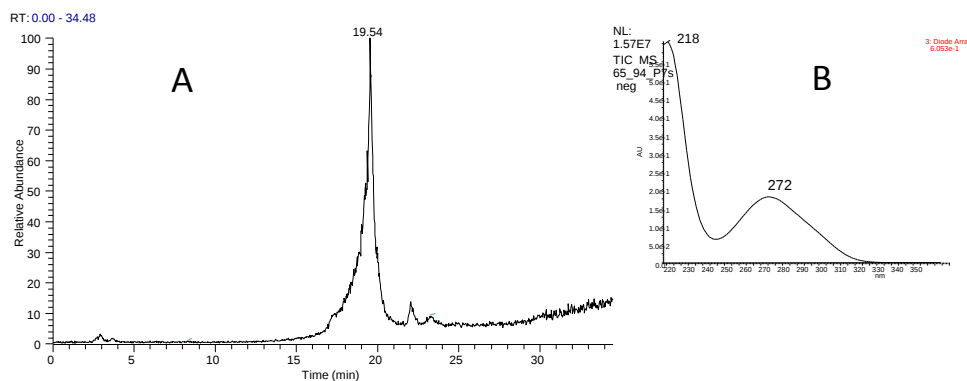
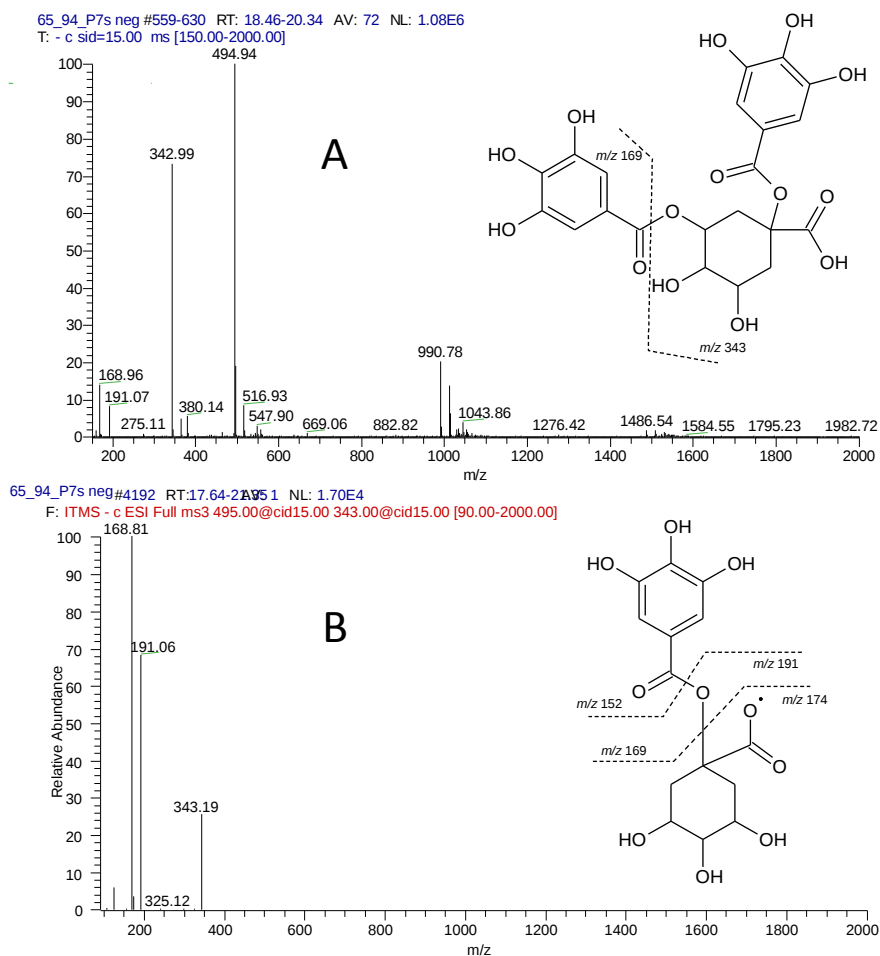


Figura 22 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 495, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).

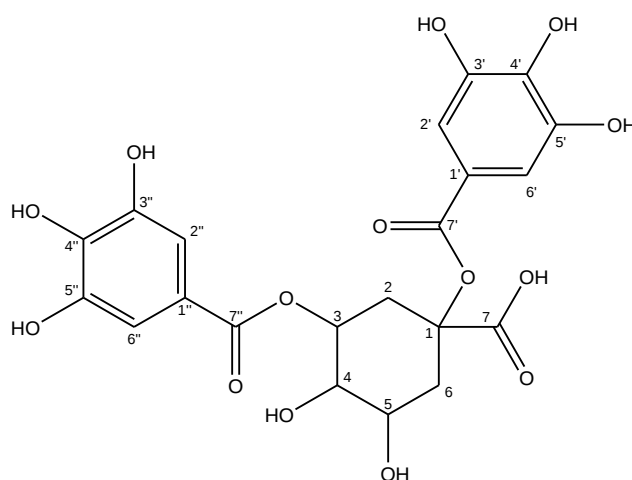


O espectro de RMN de ^1H (Figura 84, anexo B) apresentou sinais de deslocamentos químicos, evidenciando tratar-se de uma mistura de substâncias. Foram observados sinais referentes ao grupo galoíla duplicados (Tabela 6), com sinais em δ_{H} 7,09 e δ_{H} 7,10, referente aos hidrogênios aromáticos, além de outros sinais de deslocamentos químicos de uma substância minoritária na região (δ 7,20 a δ 8,00). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes ao ácido quínico foram observados na região entre δ_{H} 1,50 a δ_{H} 5,50.

No mapa de contorno HSQC (Figura 86, anexo B), observa-se as correlações a 1J entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos, sendo entre: δ_{H} 5,44 e δ_{C} 71,4; δ_{H} 3,69 e δ_{C} 69,1; δ_{H} 1,85 e δ_{C} 36,2; δ_{H} 1,62 e δ_{C} 36,4.

O mapa de contornos HMBC (Figura 87, anexo B) mostrou a interação a 3J entre δ_{H} 5,50 (H-3) e os carbonos 36,4 (C-2), 69,1 (C-4) e 76,4 (C-1); Já o δ_{H} 1,63 (H-2), correlacionou-se com os carbonos δ_{C} 71,4 (C-3) e δ_{C} 175,6 (COOH). Observou-se ainda o δ_{H} 1,85 (H-6) com a carbonila em δ_{C} 175,6 do ácido quínico. O deslocamento químico do C-1 em δ_{C} 76,4 mais desblindado sugere que esta posição esteja esterificada. A Tabela 6 apresenta todos os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , baseados nas correlações dos mapas de contorno HSQC e HMBC. Portanto a substância majoritária existente na fração 65-69, denominada BM-5 foi identificada como sendo o **ácido 1,3-O-digaloil-quínico**.

Figura 23 – Estrutura química de BM-5

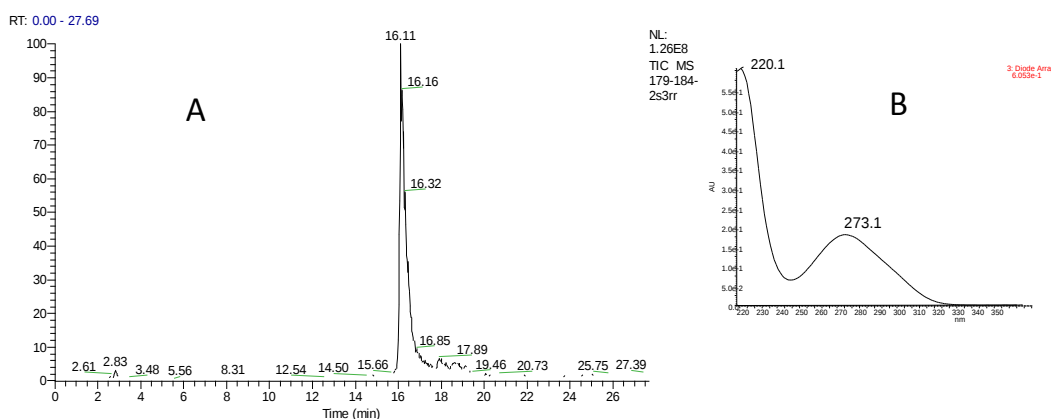


4.3.2.5. Identificação de BM-6

A fração 179-184 obtida na extração por CLMP foi submetida a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semi Preparativa, modo isocrático com 16% de metanol em água, levando ao isolamento de BM-6.

A análise por HPLC-ESI-IT-MSⁿ (Figura 24), em modo negativo, possibilitou a identificação do íon da molécula desprotonada em m/z de 647 $[M - H]^-$ (Figura 25). Estudos anteriores, realizados por Sannomiya et al., (2007a), com espécies de *Byrsonima fagifolia* e HPLC-ESI-IT-MSⁿ, identificaram esse íon como sendo o pertencente ao da molécula do ácido *O*-trigaloíl-quínico. Os espectros de MS² a MS⁴ confirmam a formação dos íons m/z 495, 343, associada às perdas sucessivas das unidades de galoíla até à formação do íon em m/z 191 $[M - 3 \times 152 - H]^-$, correspondente à molécula do ácido quínico desprotonada (Figura 26). O íon de m/z 169 é justificado pela perda consecutiva de duas unidades galoíla e uma unidade de ácido quínico com a perda de uma molécula de água ($M - 152 - 152 - 174 - H$), levando ao íon de uma molécula de ácido gálico desprotonado. Estes dados, comparados aos da literatura (SANNOMIYA et al., 2007a), sugerem a estrutura do ácido-*O*-trigaloil-quínico.

Figura 24 - A) Cromatograma de BM-6 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 16,11$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.



O espectro de RMN de 1H (Figura 88, anexo B) de BM-6 apresentou três sinais na região dos hidrogênios aromáticos, δ_H 6,79, δ_H 6,87 e δ_H 7,04. O espectro de RMN ^{13}C APT (Figura 89, anexo B) evidenciou também os deslocamentos químicos referentes às carbonilas das porções galoílas e sinais referentes a porção quínica. As demais atribuições dos demais deslocamentos químicos RMN de ^{13}C foram realizadas

conforme os mapas de contornos HMBC (Figura 91, anexo B) e HSQC (Figura 92, anexo B), demonstrados na Tabela 6. Os deslocamentos químicos dos carbonos nas posições C-3, C-4 e C-5, aliados às informações existentes no mapa de contorno HMBC, confirmam as esterificações do ácido quínico nestas posições. O experimento NOESY (Figura 93, anexo B) apresentou as correlações do hidrogênio do ácido quínico em δ 5,75 (H-5) com os hidrogênios dos grupos galoílas (δ 6,87 e 7,04), já os hidrogênios δ 5,53 (H-3) e δ 5,23 (H-4) apresentaram correlações com os hidrogênios δ 6,79 e δ 6,87 respectivamente. Estas interações demonstram que os hidrogênios das porções galoíla encontram-se relativamente próximos aos hidrogênios 3, 4 e 5 da porção quínica da molécula. Portanto, os dados apresentados de massas e de RMN confirmam a estrutura do **ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico** (ROMANI et al., 2002), já identificado anteriormente em *Byrsonima fagifolia* (SANNOMIYA et al., 2007 a).

Figura 25 - Estrutura química de BM-6

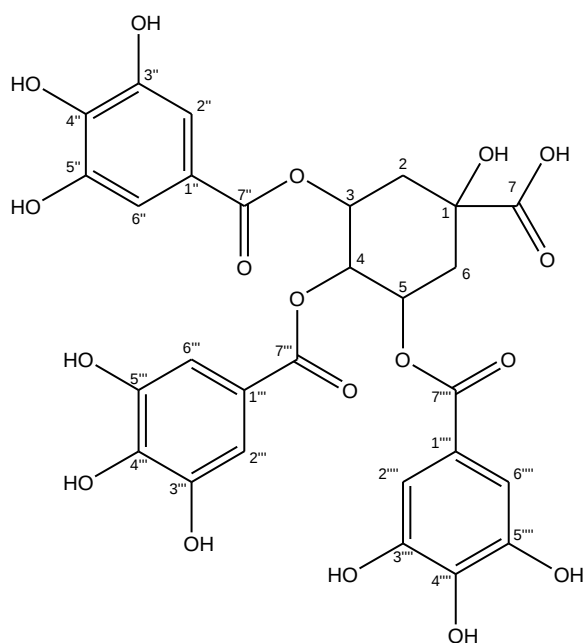


Figura 26 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 647, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor; D) quarta-ordem do íon precursor (MS^4). (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).

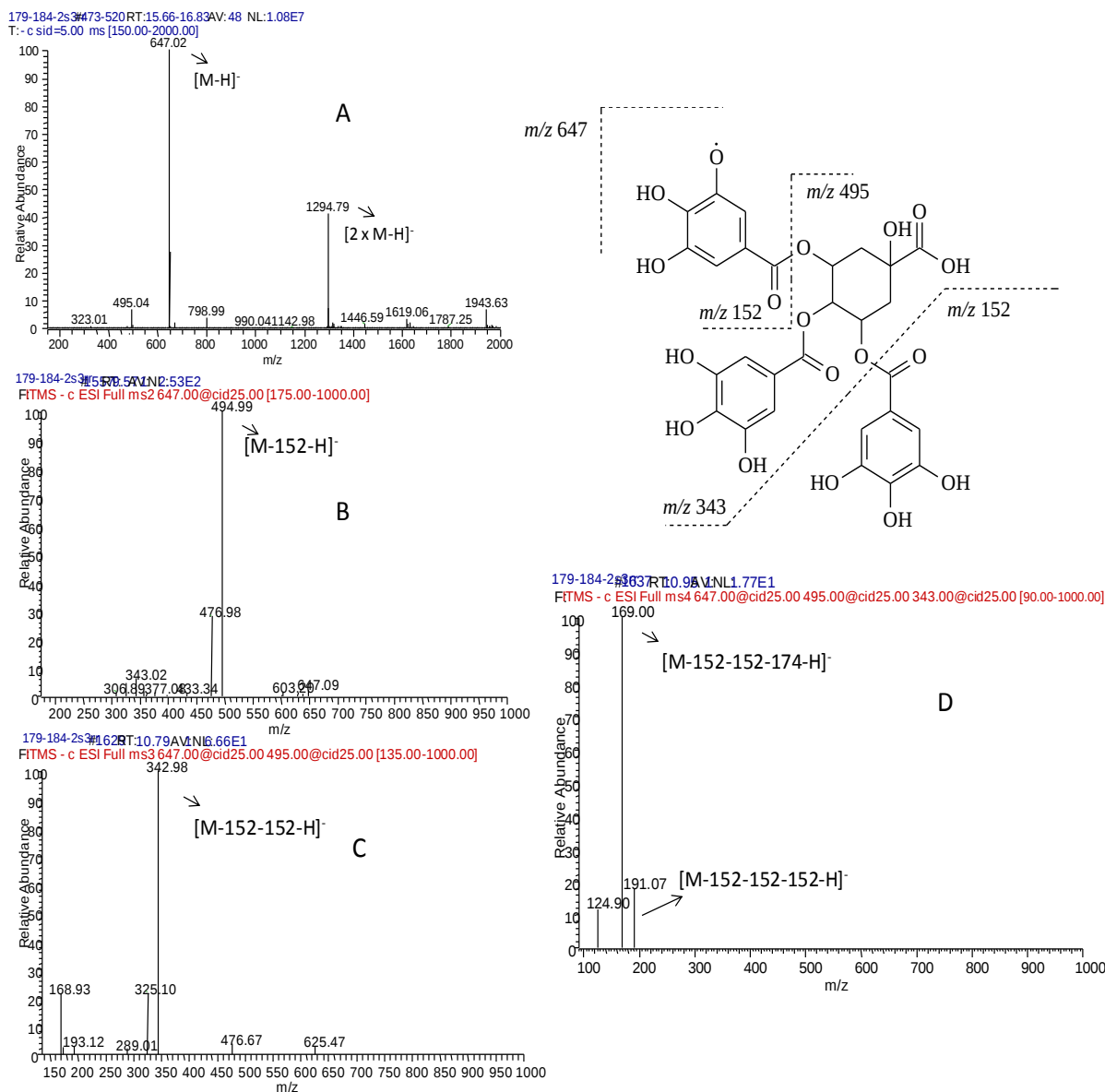


Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e APT (δ , DMSO- d_6 , 11,7 T) e correlações COSY e HMBC das substâncias BM-5 e BM-6.

Posição	BM-5					BM-6			
	$\delta_{\text{H}}/\text{Multipl. (J -Hz)}$	δ_{C}	COSY	$g\text{HMBC}$		$\delta_{\text{H}}/\text{Multipl. (J -Hz)}$	δ_{C}	COSY	$g\text{HMBC}$
1		76,4	-	-		-	77,9	-	
2 _a	2,00 <i>dd</i> (12,0;7,0)	36,0*	H-2/H-3	H-2/ C-7/C-5/C-6		2,28 <i>t</i> (12,3)	35,1	H-2a/ H-3	-
2 _b	1,62 <i>dd</i> (9,5;4,5)					1,78 <i>dd</i> (15,0; 3,5)	-	H-2b/ H-3	-
3	5,50 <i>dd</i> (12,0; 4,6)	71,4*	H-3/H-2 H-3/H-5	H3/C-1/C-4/C-2/ C-7'		5,53 <i>q</i> (4,0)	69,6	H-3/H-2a H-3/H-2e; H-3/H-4	H-3/C-7'
4	3,69 <i>dd</i> (11,0; 5,0)	69,1*	H4/H3 H4/H5	H-4/C-1		5,23 <i>dd</i> (10,0; 3,3)	72,9	H-4/ H-3 H-4/ H-5	H-4/C-7''
5	3,66 <i>dd</i> (10,0; 4,0)	70,4*	H5/H4 H5/H6	H-5/C-1/C-3		5,75 <i>ddd</i> (13,0; 8,5; 4,0)	68,2	H-5/ H-4 H-5/ H-6a/ H-5/H-6b	H-5/C-7'''
6 _a	1,80 <i>dd</i> (9,5; 4,5)	36,2*	H6/H3	H-6/C-7/C1 /C4/C6		1,94 <i>m</i> (9,5)	41,8	H-6a/ H-5	-
6 _b	1,52 <i>m</i>	-	-	-		2,11 <i>dt</i> (12,5 5,5)	-	H-6b/H-5	-
7	-	175,6*	-	-		-	178,8	-	-
1'	-	119,6*	-	-		-	119,2	-	-
2'	7,09 <i>s</i>	109,4*	H-2'/C-1'; H-2'/C-4'; H-2'/C-2'/C-6'; H-2'/C-3'/C-5' H-2'/COO-			6,79/ <i>s</i>	108,5	H-2'/C-1'; H-2'/C-4'; H-2'/C-2'/C-6'; H-2'/C-3'/C-5' H-2'/COO-	
3'	-	147,1*	-	-		-	145,2	-	-
4'	-	140,3*	-	-		-	138,7	-	-
5'	-	147,1*	-	-		-	145,2	-	-
6'	7,09 <i>s</i>	109,4*	H-6'/C-1'; H-6'/C-4'; H-6'/C-2'/C-6'; H-6'/C-3'/C-5' H-6'/COO-			6,79/ <i>s</i>	108,5	H-6'/C-1'; H-6'/C-4'; H-6'/C-2'/C-6'; H-6'/C-3'/C-5' H-6'/COO-	
7'	-	164,7*	-	-		-	165,3	-	-
1''	-	118,0*	-	-		-	119,2	-	-
2''	7,10/ <i>s</i>	110,3*	-	-		6,87 <i>s</i>	108,5	-	-
3''	-	147,2*	-	-		-	146,1	-	-
4''	-	140,5*	-	-		-	138,5	-	-
5''	-	147,2*	-	-		-	145,3	-	-
6''	7,10 <i>s</i>	110,3*	-	-		6,87 <i>s</i>	108,5	-	-
7''	-	166,2*	-	-		-	165,1	-	-
1'''	-	-	-	-		-	119,7	-	-
2'''	-	-	-	-		7,04 <i>s</i>	108,6	-	-
3'''	-	-	-	-		-	145,3	-	-
4'''	-	-	-	-		-	138,4	-	-
5'''	-	-	-	-		-	145,3	-	-
6'''	-	-	-	-		7,04 <i>s</i>	108,6	-	-
7'''	-	-	-	-		-	166,5	-	-

Legenda: * - valores obtidos por HMBC e HSQC

4.3.2.6. Identificação de BM-7

A substância BM-7, proveniente da fração 171-177, (56 mg), foi isolada nas mesmas condições daquelas usadas para BM-6. O espectro de massas por HPLC-ESI-IT-MSⁿ (modo negativo) e T_R = 14,81 minutos (Figura 27) mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 799, sugerindo que esta molécula é um derivado do ácido quínico, com quatro unidades galoílas ligadas. No estudo com a infusão das folhas de *Byrsonima fagifolia* identificou duas séries do íon em m/z 799 como sendo duas séries do ácido tetra-O-galoílquínico. Estas séries do ácido-O-tetragoíl-quínico foram identificadas, segundo estudos de fragmentações e tempos de retenção por HPLC-ESI-IT-MSⁿ, como sendo as quatro unidades galoílas ligadas nas hidroxilas de posições (1, 3, 4 e 5) do ácido quínico (SANNOMIYA et al., 2007a). Para a outra série, os autores sugerem que existe pelo menos uma hidroxila livre no ácido quínico e que, portanto, uma unidade galoíla pode estar ligada a outra unidade galoíla. Os espectros de MS² a MS⁴ por HPLC-ESI-IT-MSⁿ de BM-7, demonstraram as perdas sucessivas de 152 Da., formando os íons em m/z 647, 495 e 343 e, com isso, comprovando que esta molécula possui quatro unidades galoílas (Figura 28). Para confirmação das interligações entre as unidades galoílas com o ácido quínico, foi necessária a análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais.

Figura 27 – A) Cromatograma de BM-7 obtido por HPLC-ESI-IT-MS (T_R = 14,81 min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

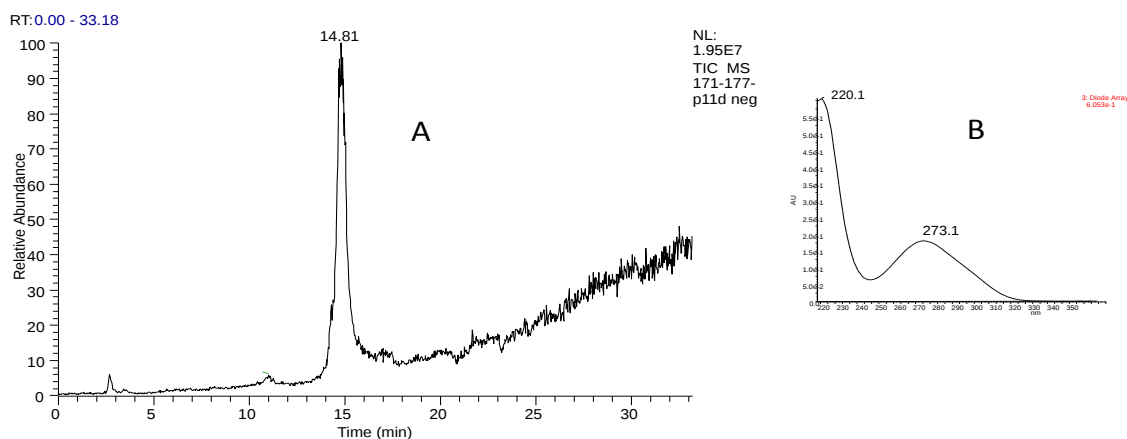
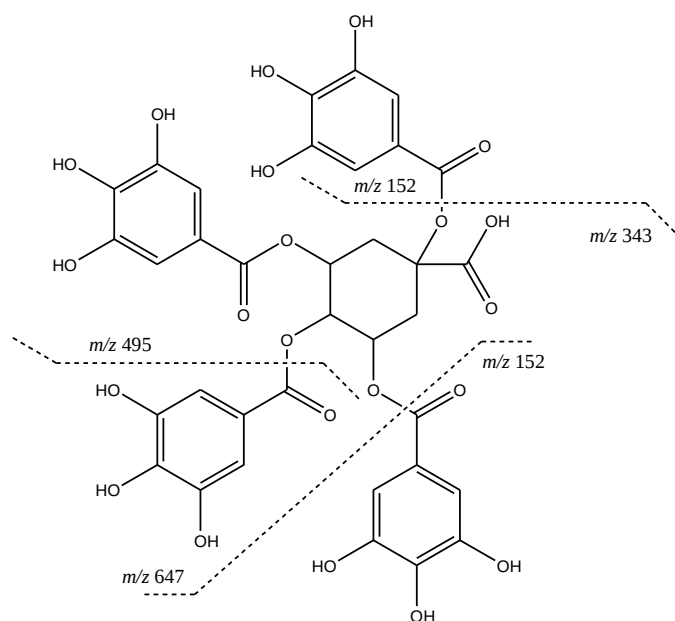
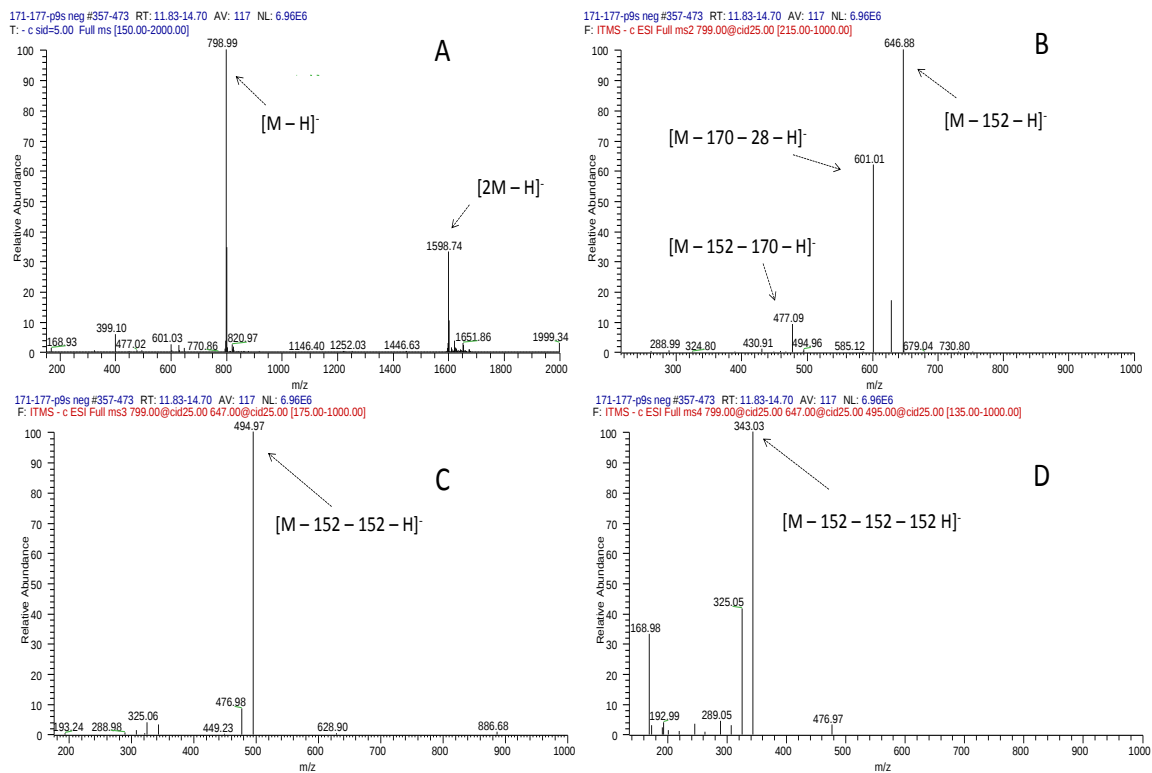


Figura 28 – Espectro de massas do íon precursor de m/z 799, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor; D) quarta-ordem do íon precursor (MS^4). (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).



O espectro de RMN de ^1H (Figura 94, anexo B) de BM-7 comprovou a existência dos singletos em δ_{H} 6,80, δ_{H} 6,85, δ_{H} 6,93, δ_{H} 6,94 referentes aos hidrogênios aromáticos presentes nas quatro unidades galoíla.

A atribuição de todos os hidrogênios e ^{13}C foi realizada segundo as informações existentes nos espectros de HMBC e HSQC (Figura 96 e 97, anexo B) descritos na Tabela 7.

A análise do mapa de contorno HMBC (Figura 96) mostra a correlação do δ_{H} 6,80, δ_{H} 6,85, δ_{H} 6,93, δ_{H} 6,94 com o conjunto de carbonos aromáticos referentes as diferentes unidades galoíla.

A análise de correlações espaciais de hidrogênios, obtida pelo experimento NOESY (Figura 98, anexo B) demonstrou existir correlações entre os hidrogênios δ_{H} 5,66, δ_{H} 5,45 e δ_{H} 5,76 com os demais hidrogênios da porção quínica da molécula e com todos os hidrogênios aromáticos (6,80, δ_{H} 6,85, δ_{H} 6,93, δ_{H} 6,94) dos substituintes dos seus respectivos carbonos, além de apresentar correlação entre estes hidrogênios com o H-6 (δ_{H} 2,84) com os referidos hidrogênios aromáticos. Isto evidencia a proximidade entre tais hidrogênios, sugerindo a esterificação das hidroxilas em C-1, C-3, C-4 e C-5 por ácidos gálicos. Esta substância foi, portanto, determinada como o ácido **1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico**. Outros isômeros do ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico foram identificados por técnicas acopladas, como mencionado anteriormente, porém, neste trabalho, isolou-se somente um dos isômeros do ácido tetragaloil-quínico.

Figura 29 - Estrutura química de BM-7

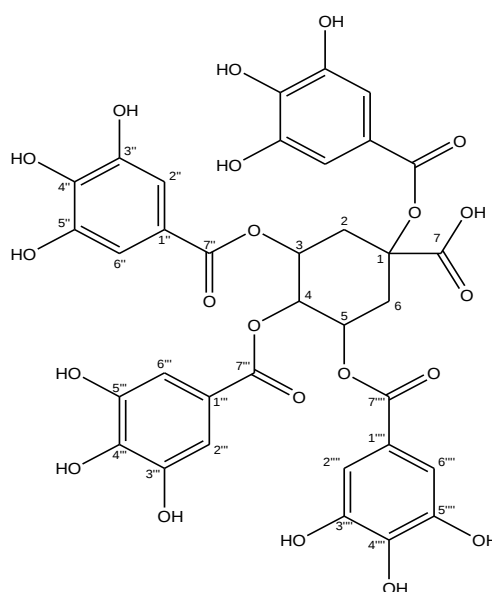


Tabela 7 - Deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ^1H e correlações HSQC e HMBC das substâncias BM-7 (δ – ppm, DMSO- d_6).

Posição	BM-7				
	$\delta_{\text{H}}/$ Multipl. (J -Hz)	δ_{C}^*	COSY	HMBC	
1	-	*	-	-	
2 _a	2,53 <i>d</i> (10,0)	48,0	H-2 _a /H-2 _b ;	-	
2 _b	2,35 <i>m</i>		H-2 _b /H-2 _a	-	
3	5,66 <i>q</i> (8,3)	67,4*	H-3/H-2 _b H-3/H-4	H-3/C7''	
4	5,45 <i>dd</i> (8,0; 3,0)	67,7*	H-4/H-3 H-4/H-5	H-4/C7'''	
5	5,76 <i>q</i> (6,0)	68,5*	H-5/H-6 _a H-5/H-6 _b H-5/H-4	H-5/C7''''	
6 _a	2,83 <i>d</i> (12,5)	47,8	H-6 _a /H-6 _b H-6 _a /H-5	-	
6 _b	2,63 <i>m</i>		H-6 _b /H-6 _a H-6 _b /H-5	-	
7	-	172,5	-	-	
Posição	$\delta_{\text{H}}/$ Multipl. (J -Hz)	δ_{C}^*	COSY	HMBC	
1'		118,0	-		1'''
2'	6,93 <i>s</i>	108,8	-		2'''
3'		145,2	-		3'''
4'		138,3	-		4'''
5'		145,2	-		5'''
6'	6,93 <i>s</i>	108,8	-		6'''
7'		165,6	-		7'''
1''		118,6	-		1''''
2''	6,80 <i>s</i>	108,4	-		2''''
3''	-	145,4	-		3''''
4''	-	138,1	-		4''''
5''	-	145,4	-		5''''
6''	6,80 <i>s</i>	108,4	-		6''''
7''	-	164,8	-		7''''
Posição	$\delta_{\text{H}}/$ Multipl. (J -Hz)	δ_{C}^*	COSY	HMBC	
1'''	-	118,0			
2'''	6,94 <i>s</i>	108,8			
3'''		145,2			
4'''		138,3			
5'''		145,2			
6'''	6,94 <i>s</i>	108,8			
7'''	-	165,6			
1''''		120,1			
2''''	6,85 <i>s</i>	108,4			
3''''	-	145,4			
4''''	-	138,6			
5''''	-	145,4			
6''''	6,85 <i>s</i>	108,4			
7''''		164,8			

*valores atribuídos segundo correlações HMBC e HSQC

Os ácidos galoíl-quínicos isolados e identificados neste estudo são classificados como taninos hidrolisáveis e foram previamente descritos em diversas famílias e gêneros botânicos, especialmente em *Byrsonima* nos estudos de dereplicação de chás e demais tipos de extratos das folhas (SANNOMIYA et al., 2005c; MALDINI, MONTORO, PIZZA, 2011).

Muitos estudos atribuem aos taninos diversas funções na natureza, como a proteção da planta, quanto à exposição à radiação UV e ao ataque de herbívoros (ANDERSEN, MARKHAM, 2006). Também existem trabalhos relacionando tais ácidos às diversas atividades farmacológicas. Kamng'ona (2011), demonstrou que o ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico apresentou atividade inibitória viral sobre as enzimas transcriptase reversa do vírus HIV e do vírus M-MLV (retrovírus causador de câncer em camundongos). Além disso, Kashiwada (1992) relaciona uma série de taninos capazes de apresentar atividade citotóxica e antitumoral, além de o ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico promover a inibição da enzima DNA polimerase e que o mesmo pode ser usado como modelo para identificar e caracterizar novos fármacos antitumorais (PARKER et al., 1989).

O ácido 3,5-O-digaloil-quínico apresenta a capacidade de inibir a peroxidação lipídica induzida por H_2O_2 (antigenotóxica) e aumentar a capacidade antioxidante e reparação enzimática do DNA (INES et al., 2011; MOORE et al., 2005).

Outro estudo mostrou que tanto os derivados de ácidos galoílaquínicos quanto outros derivados quínicos e gálicos isolados de *Sloanea rhodantha* (Baker) *Capuron* var. *rhodantha* (*Elaeocarpaceae*) apresentaram atividade antimalárica em cepas de *Plasmodium falciparum* (CAO, 2006), enquanto outros derivados do ácido gálico isolados de *Pistacia weinmannifolia* apresentaram a atividade antihistamínica (MINAMI, et al., 2005).

4.3.3. Identificação dos flavonoides

4.3.3.1. Identificação de BM-8

A substância BM-8 foi obtida da fração BM-386-388, por meio de eluição isocrática em CLAESP-UV com 30% de metanol. A fragmentação em HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 25,27$ min) no modo negativo (*full scan*) e mostrou um padrão de fragmentação nos espectros de massas MS^2 e MS^3 , característico para substância flavonoídica. O íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ m/z 463, sugere a presença de uma unidade de hexose. O espectro de MS^2 apresentou fragmento m/z 300 da quercetina, formado pela perda de $[M - 162 - H]^-$, confirmando a hexose. No espectro de absorção de BM-8 na região UV, foram observadas bandas em 256 nm e em 356 nm, características de quercetina com a hidroxila do C-3 substituída.

Figura 30 – A) Cromatograma de BM-8 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 25,27$ min.). B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

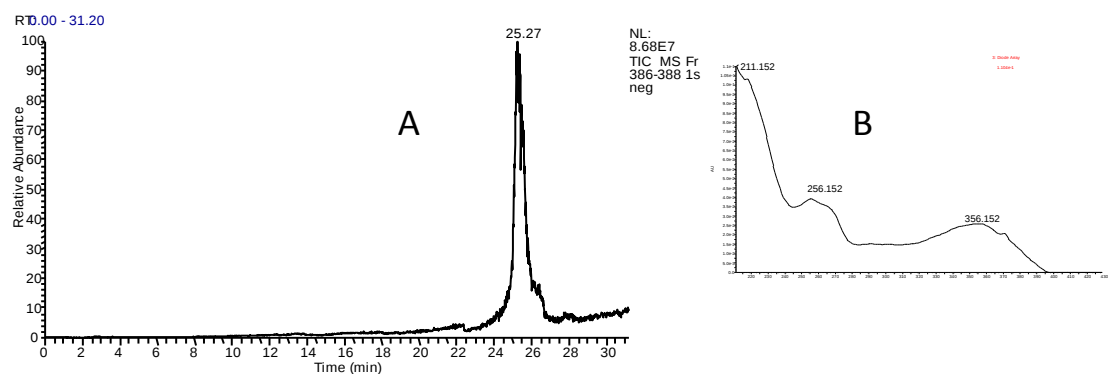
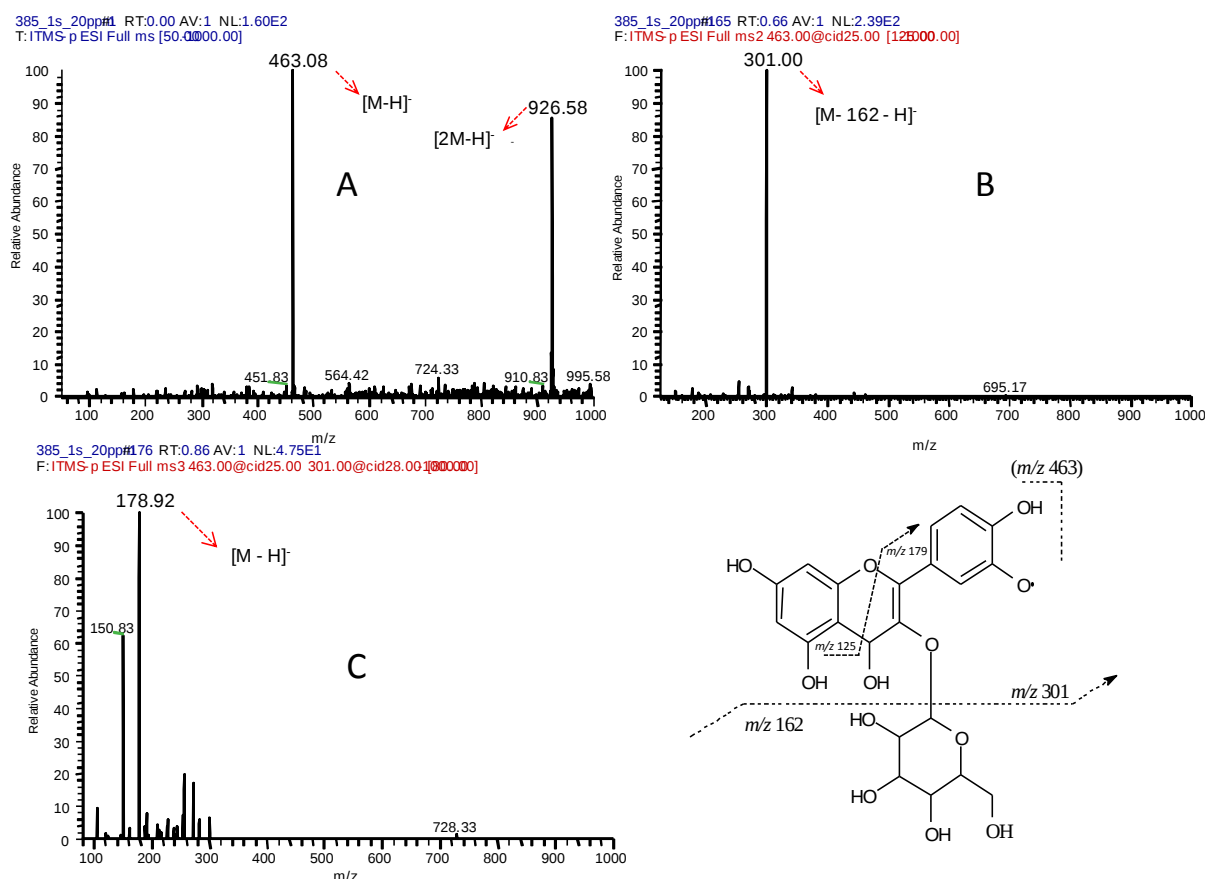


Figura 31 – Espectro de massas do íon precursor de m/z 463, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.10.).



A análise de RMN 1H (Figura 99, anexo B) desta substância apresentou dupletos em δ_H 7,84 (H-2', $J = 2,0$ Hz); δ_H 7,61 (H-6', $J = 2,0$ e 8,0 Hz), δ_H 6,90 (H-5', $J = 8$ Hz), δ_H 6,43 *d* (H-8, $J=2,0$) e δ_H 6,21 *d* (H-6, $J=2,1$), evidenciando, com isso, a presença de grupamento flavonoídico di-oxigenado da quercetina. A presença de um hidrogênio anomérico de δ 5,20 *d* ($J= 7,7$ Hz) sugere a existência de uma hexose com configuração em β . A posição de ligação desta hexose foi determina pelo experimento HMBC (Figura 102, anexo B), onde o hidrogênio H-1" da hexose (δ_H 5,20) correlacionou-se com o carbono C-3 da quercetina (δ_C 135,7). As atribuições dos deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos foram baseadas nos experimentos

APT (Figura 100, anexo B) e HSQC (Figura 103, anexo B), além de comparada com dados da literatura (ANDERSEN, MARKHAM, 2006).

Experimentos TOCSY (Figura 104, anexo B), comparados com dados da literatura (RODRIGUES, 2011), confirmaram a existência de uma galactose, pois irradiação no hidrogênio em δ_H 5,20 mostrou correlações com os hidrogênios em δ_H 3,82; 3,57 e 3,85 (Figura 94, Tabela 8). Sendo assim, esta substância foi identificada como sendo **quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo**.

Figura 32 – Estrutura química de BM-8

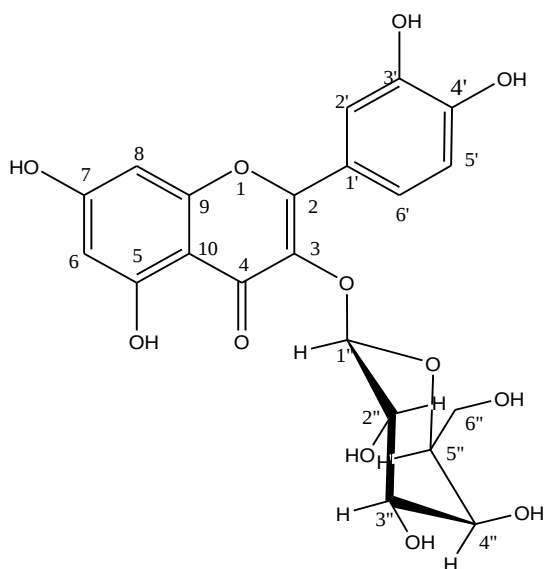


Tabela 8 - Deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C APT, correlações HSQC e HMBC das substâncias BM-8 (δ – ppm, CD_3OD).

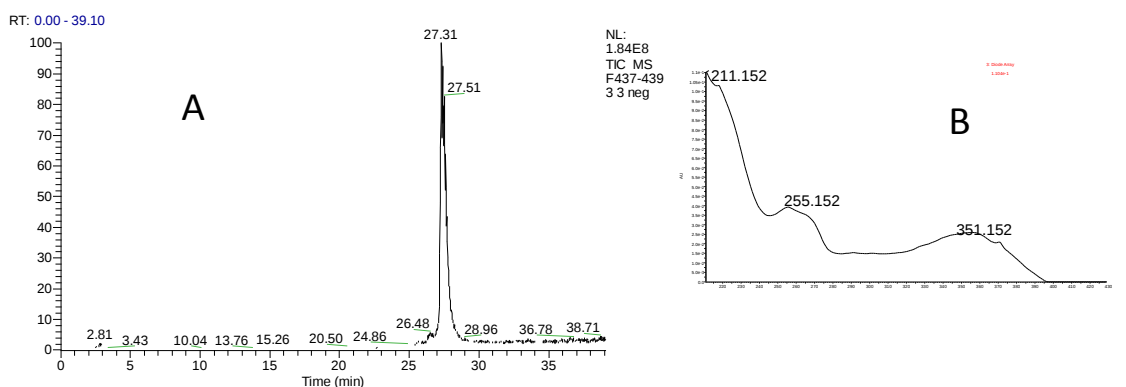
Posição	BM-8				ANDERSEN, MARKHAM, (2006)	
	δ_{H} / <i>Multipl.</i> (J -Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC	δ_{H} / <i>Multipl.</i> (J -Hz)	δ_{C}
Quercetina						
2	-	149,5	-	-		148,0
3	-	135,7	-	-		137,2
4	-	177,9	-	-		177,3
5	-	163,3	-	-		162,5
6	6,21 <i>d</i> (2,0)	99,8*	H-6/H-8	H-6/C-5; H-6/C-8	6,27	99,2
7	-	165,1	-	-		165,3
8	6,43 <i>d</i> (2,0)	94,7*	H-8/H-6	H-8/C-6; H-8/C-7; H-8/C-9; H-8/C-10	6,47	94,4
9	-	158,4				158,2
10	-	105,5				104,5
1'	-	122,9				124,1
2'	7,84 <i>d</i> (2,2)	117,7	H-2'/H-6'	H-2'/C-1'; H-2'/C-3'; H-2'/C-4'	7,82	115,9
3'	-	149,9				148,7
4'	-	145,8				146,2
5'	6,90 <i>d</i> (8,5)	116,1*	H-5'/H-6'	H-5'/C-1'; H-5'/C-3'; H-5'/C-4'	6,97	116,2
6'	7,61 <i>dd</i> (8,5; 2,1)	123,1*	H-6'/H-2'; H-6'/H-5'	H-6'/C-2'; H-6'/C-3'	7,72	121,6
Galactose						
1''	5,20 <i>d</i> (7,8)	105,4*	H-1''/H-2'';	H-1''/C-3	5,36 <i>d</i> 7,8	104,6
2''	3,82 <i>d</i> (3,0)	73,1*	H-2''/H-1'' H-2''/H-3''	H-2''/C-1''; H-2''/C-3''	4,11 <i>dd</i> 7,8; 9,7	72,1
3''	3,57 <i>dd</i> (6,5; 3,0)	74,9*	H-3''/H-2''; H-3''/H-4'';	H-3/C-5''; H-3''/C-4''	3,78	74,8
4''	3,85 <i>d</i> (3,3)	69,5*	H-4''/H-3''; H-4''/H-5''	H-4''/C-2''	4,05 <i>d</i> 3,7	70,1
5''	3,47 <i>t</i> (5,9)	77,1*	H-5''/H-6 _a '' H-5''/H-6 _b ''	H-5''/C-4'' H-5''/C-6''	3,85 <i>m</i>	77,8
6 _a ''	3,66 <i>dd</i> (11,2; 6,0)		H-6 _a ''/H-5'' H-6 _a ''/H-6 _b ''	H-6 _a ''/C-5''	3,86 <i>m</i>	62,3
6 _b ''	3,59 <i>dd</i> (8,0; 3,5)	61,7	H-6 _b ''/H-5'' H-6 _b ''/H-6 _a ''	H-6 _b ''/C-5''		

Legenda: *- Observado através do HSQC

4.3.3.2. Identificação de BM-9

Obtida da fração BM-437-439 por CLAESP-UV de forma semelhante a BM-8, a substância denominada BM-9 apresentou na análise por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 27, 31$ min.) e espectro de absorção no UV (Figura 33), com bandas em 255 e 351 nm características de flavonoides com hidroxila substituída no C-3 da aglicona (ANDERSEN, MARKHAM, 2006). Os espectros massas mostrados na Figura 34, evidenciaram o fragmento m/z 447 ($[M - H]^-$) como sendo do íon da molécula desprotonada. Já os espectros de segunda e terceira ordem mostram a perda de uma ramnose formando o íon m/z 301 $[M - 146 - H]^-$. Os fragmentos m/z 179 $[M - 268 - H]^-$ e m/z 151 $[M - 296 - H]^-$, são característicos da fragmentação Retro-Diels-Alder dos derivados da quercetina.

Figura 33 - A) Cromatograma de BM-9 obtido por HPLC-ESI-IT-MS ($T_R = 27,31$ min.). B) Espectro de UV obtido no respectivo pico cromatográfico.



A análise de RMN de 1H (Figura 105, anexo B) apresentou sinais referentes à região aromática: duplete em δ_H 7,35 (H-2', $J = 2,0$ Hz); duplo duplete em δ 7,31 (H-6', $J = 2,0$ e 8,0 Hz) e um duplete em δ 6,91 ($J = 8$ Hz), característico do anel B do núcleo flavonoídico di-oxigenado. O espectro de RMN de ^{13}C APT (Figura 106, anexo B) confirmou os sinais δ_C 159,3 e 136,2 referentes aos carbonos C-2 e C-3 de flavonol glicosilado e δ_C 179,6 (C-4) da ligação C=O do flavonol (HARBONE, 1996). A presença de açúcar na estrutura foi evidenciada pela presença do sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,30 (H-1'') e dos hidrogênios da metila (C-6) em 0,94 (H-6'') no espectro de RMN de 1H . A configuração em α da ramnose foi determinada considerando-se a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J = 1,4$ Hz). O mapa de contorno HMBC (Figura 109) evidenciou a correlação entre o H-1'' da ramnose com o C-3 da aglicona, comprovando a ligação interglicosídica. Os demais sinais

referentes aos carbonos da moléculas foram determinados tanto pelo espectro de RMN de ^{13}C APT quanto pelo mapa de contornos HSQC (Figura 108, anexo B) e comparados a dados da literatura (MIRANDA, 2012). Portanto BM-9 foi identificada como a **Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo**.

Figura 34 – Espectro de massas do íon precursor de m/z 447, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*; B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor; C) terceira-ordem (MS^3) do íon precursor. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).

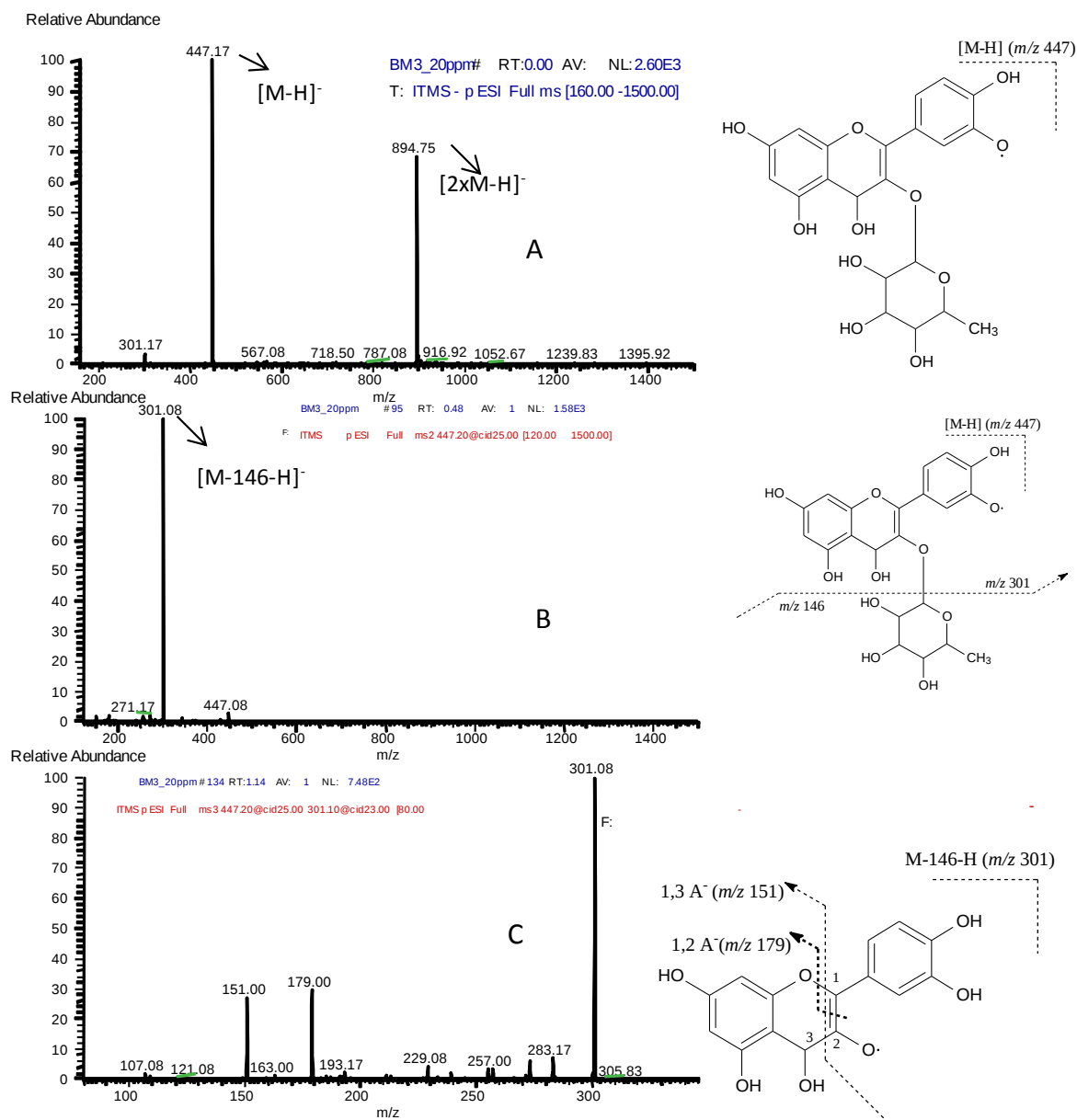
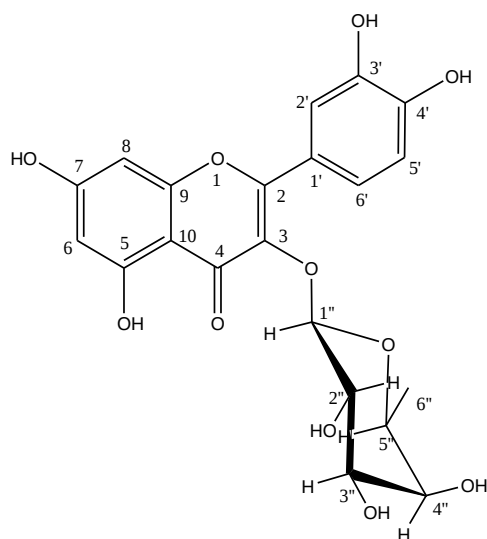


Tabela 9 - Deslocamentos químicos baseados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C APT, correlações HSQC e HMBC das substâncias BM-9 (δ – ppm, CD_3OD).

Posição	BM-9				MIRANDA et al., 2012	
	$\delta_{\text{H}}/$ <i>Multipl.</i> (J -Hz)	δ_{C}	COSY	HMBC	$\delta_{\text{H}}/$ <i>Multipl.</i> (J -Hz)	δ_{C}
Quercetina						
2	-	159,3				159,2
3	-	136,2				136,2
4	-	179,6				179,6
5	-	163,2				163,1
6	6,22 <i>d</i> (2,1)	99,7	H-6/H-8	H-6/C-8; H-6/C-10	6,16	99,8
7	-	165,8				165,9
8	6,39 <i>d</i> (2,1)	94,7	H-8/H-6	H-8/C-6; H-8/C-7; H-8/C-9; H-8/C-10	6,33	94,7
9	-	158,5				158,4
10	-	105,9				105,8
1'	-	122,9		H-1'/C-2'		122,9
2'	7,31 <i>dd</i> (8,3)	116,9	H-2'/H-5'	H-2'/C-1'; H-2'/C-3'; H-2'/C-4'; H-2'/C-2'	7,26	116,3
3'		146,4				146,3
4'	-	149,8				149,7
5'	6,91 <i>d</i> (8,3)	116,3	H-5'/H-6'	H-5'/C-6'	6,90	116,5
6'	7,35 <i>d</i> (2,1)	122,8	H-6'/H-5'	H-6'/C-5'; H-6'/C-1'	7,31	122,8
Ramnose						
1''	5,36 <i>d</i> (1,4)	103,5	H-1''/H-2''	H-1''/C-2''; H-1''/C-3	5,32	103,5
2''	4,24 <i>dd</i> (3,2; 1,6)	71,9	H-2''/H-1'' H-2''/H-3''	H-2''/C-3''	4,20	71,8
3''	3,75 <i>dd</i> (9,4; 3,3)	72,1	H-3''/H-2'' H-3''/H-4''	-	3,74	72,0
4''	3,33 <i>d</i> (9,4)	73,1	H-4''/H-3''	H-4''/C-3''; H-4''/C-2''	3,31	73,2
5''	3,42 <i>dd</i> (9,5; 3,3)	71,9	H-5''/H-6''	H-5''/C-3''	3,41	72,0
6''	0,94 <i>d</i> (6,1)	17,5	H-6''/H-5''	H-6''/C-2; H-6''/C-5''	0,93	17,6

Figura 35 – Estrutura química de BM-9

4.4. Identificação de substâncias químicas presentes nos extratos de espécies de *Byrsonima* por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ

4.4.1. Identificação por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS

A análise por Cromatografia líquida de Ultra Alta Performance acoplada a detector de Arranjo de Fotodiodos e Espectrômetro de Massas com alta resolução com ionização em eletrospray e analisador de tempo de voo (UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS) dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de *Byrsonima* foi realizada com o intuito de utilizar uma técnica moderna e eficiente para a identificação de compostos orgânicos, e ainda, auxiliar em uma escolha de um extrato para fracionamento futuro. A técnica está baseada no uso de colunas cromatográficas curtas (o que diminui o tempo de análise) e na separação dos constituintes químicos, através de fase estacionária com partículas menores que 2 μm e vazão máxima de fase móvel, aumentando a resolução cromatográfica da análise. O analisador empregado, *Time of Flight* (TOF), permite a aquisição de dados em uma ampla faixa de massas, sem comprometer a sensibilidade. Além disso, o espectrômetro de massas de alta resolução permite obter a massa da substância analisada pela massa isotópica dos elementos químicos da molécula, possibilitando estabelecer a fórmula molecular da substância, considerando a diferença entre a massa calculada (massa elementar). O cálculo é feito considerando-se a diferença entre a (massa

encontrada no cromatograma - a massa calculada pela biblioteca do equipamento dividido pelo valor da massa calculada no equipamento multiplicada pelo fator 10^6 . Este cálculo é considerado correto quando o valor encontrado for menor que 5 ppm.

Considerando-se então estes critérios rigorosos para a identificação de um constituinte químico, Funari (2010), realizou a dereplicação dos extratos de espécies do gênero *Lippia*, utilizando UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS. Esta técnica mostrou-se também apropriada para as análises das espécies de *Byrsonima*, uma vez que foram muitas espécies estudadas neste trabalho.

As análises por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS foram realizadas no modo negativo, para obtenção das fórmulas moleculares e para comparação com dados existentes das substâncias já identificadas na literatura do gênero *Byrsonima*.

Os cromatogramas encontram-se exibidos nas Figuras 110 a 115 (anexo B). A Tabela 10, a seguir, mostra as substâncias químicas identificadas pela técnica UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS, que, por si só, é suficiente para caracterizar quimicamente os extratos analisados. Mesmo assim, optou-se por aliar esta análise por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS com a técnica FIA-ESI-IT-MSⁿ, a fim de apontar, por fragmentação de massas em multiestágios, um estudo químico mais apurado.

A avaliação da presença das substâncias identificadas foi baseada na porcentagem relativa dos picos cromatográficos nos respectivos cromatogramas sendo classificados na seguinte forma: 3 a 10% (+); de 10 a 40% (++) e maior que 40% (+++). A presença das substâncias dos extratos estimadas dessa forma favorece uma melhor interpretação dos resultados, servindo também de parâmetro para a avaliação estatística de similaridade dos extratos estudados através das massas em alta resolução das substâncias identificadas na dereplicação, assim como, das substâncias isoladas nesse estudo, como mostrado no item 4.4.3.1.

Os cromatogramas das seis espécies (Figuras 110 a 115, anexo B) mostraram similaridade, considerando-se principalmente os tempos de retenção (abaixo de dez minutos), além de apresentarem uma gama de classes de metabólitos secundários como: ácidos fenólicos, flavonoides derivados da quercetina e apigenina, além das proantocianidinas. Entretanto, a presença e a intensidade relativa dos picos cromatográficos não foram homogêneas, como por exemplo, os derivados galoil-quínicos mais evidentes em *B. fagifolia* e as proantocianidinas e catequinas no extrato de *B. verbascifolia*. Outra diferenciação observada foi quanto à presença de um variado número de flavonoides derivados da quercetina em todas as espécies, com exceção de *B. fagifolia*.

Observou-se que o número de substâncias nomeadas como *desconhecidas* aumenta drasticamente após 10 minutos de eluição nos cromatogramas. Mesmo com a utilização de critérios de busca rigorosos para se determinar a fórmula molecular de cada substância, e correlacionado-as com estudos químicos das espécies do gênero *Byrsonima* ou da família Malpighiaceae existentes na literatura, algumas massas dos íons percussores não puderam ser correlacionadas com substâncias químicas. Dentre as substâncias não identificadas, encontram-se os picos cromatográficos das substâncias 34, 36, 39, 48, 62, 63, 65 e 69 (Tabela 10), que pelas suas fórmulas moleculares são referentes a compostos nitrogenados, que não são comuns no gênero *Byrsonima*.

Outra classe de substâncias classificadas como desconhecidas se refere aos terpenos (picos cromatográficos 46, 49 a 51, 54, 53, 56 a 59, 61, 66 a 68), onde alguns apresentaram correlação com valores de massa molecular na literatura, entretanto, por apresentarem um grande número de isômeros constitucionais, não foi possível nomeá-los na Tabela 10.

Esta técnica possibilitou também sugerir a existência de substâncias inéditas no gênero *Byrsonima*. O pico 60 (P60, $T_R = 17,11$ min.) apresentou como massa do seu íon precursor m/z 555,2800 ($C_{28}H_{43}O_{11}$), sendo identificado como o tricalisiosídeo J (P60), um diterpeno tipo caurânico isolado de *Tricalysia dubia* por He (2005). Este íon está presente em todas as espécies do gênero *Byrsonima*, apresentando como valor de massa para o íon de m/z 555, 2786, e massa calculada de m/z 555, 2805 referentes a $[M - H]^+$ valores semelhantes ao exposto na Tabela 10.

Outra substância ainda não relatada em espécies do gênero *Byrsonima* é o ácido 3-(3,4- diidroxifenil)-lactil-2-O-quínico (P22, $T_R = 4,68$ minutos). Esta substância apresentou como massa m/z 371,0980, e a fórmula molecular $C_{16}H_{19}O_{10}$ correlacionada a sua massa calculada m/z 371,0978. Inicialmente esta fórmula molecular foi identificada a partir do estudo realizado com *Hymenocrater calycinus* (Lamiaceae) (GOHARI et al., 2010).

As demais substâncias inéditas sugeridas ao gênero *Byrsonima*, encontravam-se como minoritárias, e foram identificadas como derivadas C-glicosilados da apigenina: apigenina-8-C-hexosídeo (P18, $T_R = 4,28$ minutos); a apigenina-6-C-hexosídeo (P25, $T_R = 5,25$ minutos) e apigenina-7-C-hexosídeo (P28, $T_R = 5,44$ minutos) (ANDERSEN, MARKHAM, 2006) e estão expostas na Tabela 10. Porém, para confirmação de suas estruturas faz-se necessário o estudo de isolamento por técnicas

cromatográficas clássicas e identificação por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

Até o presente momento, apenas um único biflavonóide havia sido identificado no gênero *Byrsonima*, a amentoflavona. Em nosso estudo por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS foi possível identificar o derivado hidrogenado desse biflavonoide, a diidroamentoflavona (P55) com tempo de retenção de 11,97 minutos (superior a da amentoflavona, 11,5 min.) e massa de alta resolução de m/z 539,0978, semelhante a da amentoflavona, mas com dois hidrogênio a mais e fórmula molecular de $C_{30}H_{19}O_{10}$.

Uma vez identificada esta massa molecular em todos os extratos de *Byrsonima* estudadas, foi realizado também o estudo por FIA-ESI-IT-MSⁿ.

Tabela 10 – Substâncias identificadas nos extratos de espécies de *Byrsonima* analisados por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS.

Pico	T _R (min)	M.E	M.C	ppm	BC	BCO	BF	BI	BL	BV	Formula [M – H] ⁻	Nome da substâncias	UV λ máx (nm)
1	0,80	191,0550	191,0556	0,00	++	+	-	++	++	+++	C ₇ H ₁₁ O ₆	ácido quínico	
2	0,85	343,0670	343,0665	1,50	-	-	+++	-	-	-	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	ácido mono-O-galoil-quinico	220, 273
3	1,06	343,0670	343,0665	1,50	-	+	+++	-	+	-	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	ácido mono-O-galoil-quinico	214/ 273
4	1,35	169,0140	169,0137	1,80	+	+	++	++	+	+	C ₇ H ₅ O ₅	ácido gálico	215 / 272
5	2,12	495,0790	495,0775	3,00	-	-	++	-	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	ácido di-O-galoil-quinico	218 /272
6	2,17	495,0790	495,0775	3,00	-	-	++	-	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	ácido di-O-galoil-quinico	218/ 272
7	2,47	495,0770	495,0775	-1,00	-	+++	+	+	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	ácido di-O-galoil-quinico	218 / 275
8	2,65	577,1340	577,1346	1,00	-	+	-	-	-	++	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	catequina-(4,8')-catequina	211 / 279
9	2,71	495,0880	495,0770	1,00	-	-	++	+	++	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	ácido di-O-galoil-quinico	218/275
10	3,06	289,0710	289,0712	-0,70	++	++	-	+	-	+++	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	catequina	211 /279
11	3,21	183,0296	183,0293	1,3	+	-	+	-	-	-	C ₈ H ₇ O ₅	galato de metila	218/272
12	3,39	577,1330	577,1346	-2,80	-	+	-	-	-	-	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	catequina-(4,8')-catequina	213/ 279
13	3,52	577,1330	577,1346	-2,80	-	-	-	-	-	+	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	catequina-(4,8')-catequina	215 / 279
14	3,64	647,0880	647,0884	-0,60	++	+	+++	+	++	-	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₈	ácido tri-O-galoil-quinico	218/ 277
15	3,82	799,1020	799,0994	3,00	+++	-	+++	-	+++	-	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₂	ácido tetra-O-galoil-quinico	218 / 275

Legenda: * - Não visualizado; porcentagem relativa: : 3 a 10% (+); de 10 a 40% (++) e maior que 40% (+++); T_R – tempo de retenção M.E – massa encontrada; M.C – massa calculada; ppm – erro em partes por milhão; *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima coecolobifolia* (BCO), *Byrsonima fagifolia* (BF), *Byrsonima intermedia* (BI), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Tabela 10 – Substâncias identificadas nos extratos de espécies de *Byrsonima* analisados por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS.

Pico	T _R (min)	M.E	M.C	ppm	BC	BCO	BF	BI	BL	BV	Formula [M – H] ⁻	Nome da substâncias	UV λ máx (nm)
16	3,94	289,0710	289,0712	-0,70	++	++	-	+	-	++	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	epicatequina	211 / 279
17	4,00	729,1460	729,1456	0,50	++	+	-	-	-	-	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆	proantocianidina B-2'-O-galato	211 / 279
18	4,28	431,1910	431,1917	-1,60	-	+	+	-	-	++	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	apigenina-8-C-hexosídeo	218 / 280
19	4,48	799,1020	799,0994	3,3	+	-	++	-	-	-	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₂	ácido tetra-O-galoil-quínico	218 / 273
20	4,58	755,2050	755,2035	2,00	+	-	-	++	+	-	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀	quercetina- 3-O-(2,6-di-ramnosil)-hexosídeo	216/255/356
21	4,63	799,1030	799,0994	4,5	-	-	+++	-	-	-	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₂	ácido tetra-O-galoil-quínico	218/273
22	4,68	371,0980	371,0978	0,50	++	+	-	-	+	++	C ₁₆ H ₁₉ O ₁₀	ácido 3-(3, 4-diidroxifenil)-lactil-2-O-quínico	218/280
23	4,98	197,0400	197,0450	0,00	++	++	++	++	++	+	C ₉ H ₉ O ₅	galato de etila	218 / 270
24	5,22	609,1440	609,1456	-2,60	-	++	++	-	-	-	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	quercetina-3-O-rutinosídeo	218/254/357
25	5,25	431,1900	431,1917	-3,90	-	++	-	-	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	apigenina -6-C-hexosídeo	268/341
26	5,34	609,1460	609,1456	0,70	-	++	-	+	-	-	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	quercetina-3-O-rutinosídeo	218/253/357
27	5,44	463,0870	463,0877	-1,50	+++	++	+	+++	-	+++	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	quercetina-3-O- hexosídeo	211/256/356
28	5,44	431,0970	431,0978	-1,9	-	-	-	-	++	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	apigenina-7-C-hexosídeo	268/341
29	5,53	761,1550	761,1538	-0,30	-	-	++	-	-	-	C ₃₁ H ₂₅ N ₁₀ O ₁₄	desconhecido	-
30	5,57	463,0870	463,0877	-1,50	-	++	-	-	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	quercetina-3-O-hexosídeo	255/ 355

Legenda: * - Não visualizado; porcentagem relativa: : 3 a 10% (+); de 10 a 40% (++) e maior que 40% (+++); T_R – tempo de retenção M.E – massa encontrada; M.C – massa calculada; ppm – erro em partes por milhão; *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima coocobifolia* (BCO), *Byrsonima lagifolia* (BF), *Byrsonima intermedia* (BI), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Tabela 10 – Substâncias identificadas nos extratos de espécies de *Byrsonima* analisados por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS.

Pico	T _R (min)	M.E	M.C	ppm	BC	BCO	BF	BI	BL	BV	Formula [M – H] ⁺	Nome da substâncias	UV λ máx (nm)
31	5,60	615,0990	615,0986	0,70	+++	-	++	++	++	-	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	quercetina-O-galoil-hexosídeo	213/265/358
32	5,71	615,0990	615,0986	0,70	++	-	++	+	-	-	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	quercetina-O-galoil-hexosídeo	218/270/356
33	6,02	433,0780	433,0771	2,10	+	++	-	+++	++	+++	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	quercetina-3-O-pentósídeo	214/ 255/ 356
34	6,20	610,4180	610,4180	0,00	+	-	+	-	-	++	C ₃₁ H ₃₆ N ₅ O ₇	desconhecido	-
35	6,30	599,1080	599,1096	-2,70	+	-	-	-	-	-	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅	quercetina-O-(2"-O-galoil)-ramnosídeo	218 / 270
36	6,34	326,1030	326,1028	0,60	-	-	-	-	+	-	C ₁₈ H ₁₆ NO ₅	desconhecido	-
37	6,40	447,0920	447,0927	-1,60	-	+++	-	+	-	-	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	quercetina-3-O-α-ramnosídeo	211 / 256 /348
38	6,54	585,0880	585,0880	0,00	++	-	++	++	+	+	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₅	quercetina-3-O-(2"-O-galoil)-pentósídeo	218 / 268/ 355
39	6,89	723,5050	723,5047	0,40	+++	-	++	++	++	++	C ₄₀ H ₆₅ N ₇ O ₅	desconhecido	-
40	7,07	417,2130	417,2125	1,20	-	-	-	-	-	+	C ₂₀ H ₃₃ O ₉	desconhecido	220/280
41	7,75	349,0550	349,0560	-2,90	++	-	++	-	-	-	C ₁₆ H ₁₃ O ₉	desconhecido	218 / 272
42	7,94	599,1040	599,1037	0,50	-	++	-	-	-	-	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₅	quercetina-O-(2"-O-galoil)-ramnosídeo	218/265 /354
43	8,00	609,1230	609,1244	-2,30	-	-	-	-	-	++	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	rutina	*
44	8,05	599,1090	599,1096	-1,00	-	+	-	-	-	++	C ₂₁ H ₂₇ O ₂₀	desconhecido	*
45	8,23	435,1080	435,1080	0,00	-	-	-	-	-	+	C ₂₄ H ₁₉ O ₈	desconhecido	220 /287

Legenda: * - Não visualizado; porcentagem relativa: : 3 a 10% (+); de 10 a 40% (++) e maior que 40% (+++); T_R – tempo de retenção M.E – massa encontrada; M.C – massa calculada; ppm – erro em partes por milhão; *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima coecolobifolia* (BCO), *Byrsonima coriifolia* (BCO), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Tabela 10 – Substâncias identificadas nos extratos de espécies de *Byrsonima* analisados por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS.

Pico	T _R (min)	M.E	M.C	ppm	BC	BCO	BF	BI	BL	BV	Formula [M – H] ⁺	Nome da substâncias	UV λ máx (nm)
46	8,25	711,3970	711,3956	2,00	-	+	-	+	++	-	C ₃₇ H ₅₉ O ₁₃	desconhecido	-
47	8,40	301,0350	301,0348	0,70	+	+	+	+	++	+	C ₁₅ H ₉ O ₇	quercetina	-
48	8,89	683,1850	683,1850	0,0	-	-	+	+	-	-	C ₃₂ H ₂₇ N ₈ O ₁₀	desconhecido	-
49	9,26	507,2080	507,2078	0,40	-	+	-	-	-	-	C ₂₂ H ₃₅ O ₁₃	desconhecido	-
50	10,88	629,1070	629,1049	3,30	-	-	+	-	-	-	C ₁₈ H ₂₉ O ₂₄	desconhecido	-
51	11,00	695,4010	695,4007	0,40	++	+	-	+	-	-	C ₃₇ H ₅₉ O ₁₂	desconhecido	-
52	11,50	537,0820	537,0822	-0,40	++	-	+	-	+	++	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	amentoflavona	221 / 270 / 338
53	11,87	287,2200	287,2222	0,70	-	-	+	++	-	-	C ₁₆ H ₃₁ O ₄	desconhecido	-
54	11,95	287,2220	287,2222	-0,70	-	-	+	+	-	-	C ₁₆ H ₃₁ O ₄	desconhecido	-
55	11,97	539,0980	539,0978	0,40	+	-	-	-	-	+	C ₃₀ H ₁₉ O ₁₀	diidroamentoflavona	216/280
56	13,12	663,3750	663,3744	0,90	-	++	-	-	-	-	C ₃₆ H ₅₅ O ₁₁	desconhecido	-
57	15,02	533,3470	533,3478	-1,50	++	++	-	++	+	-	C ₃₁ H ₄₉ O ₇	desconhecido	-
58	15,35	533,3480	533,3478	0,40	++	++	-	+	+	-	C ₃₁ H ₄₉ O ₇	desconhecido	-
59	15,54	533,3480	533,3478	0,40	++	+	-	++	+	-	C ₃₁ H ₄₉ O ₇	desconhecido	-
60	17,11	555,2800	555,2805	-0,90	+++	++	++	+++	+++	++	C ₂₈ H ₄₃ O ₁₁	tricalisiosídeo J	-

Legenda: * - Não visualizado; porcentagem relativa: : 3 a 10% (+); de 10 a 40% (++) e maior que 40% (+++); T_R – tempo de retenção M.E – massa encontrada; M.C – massa calculada; ppm – erro em partes por milhão; *Byrsonima coriifolia* (BC), *Byrsonima coccolobifolia* (BCO), *Byrsonima fagifolia* (BF), *Byrsonima intermedia* (BI), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

Legenda: * - Não visualizado; porcentagem relativa : 3 a 10% (+); de 10 a 40% (++) e maior que 40% (+++); T_R – tempo de retenção M.E – massa encontrada; M.C – massa calculada; ppm – erro em partes por milhão; *Byrsonima correfolia* (BC), *Byrsonima jagifolia* (BF), *Byrsonima intermedia* (BI), *Byrsonima ligustrifolia* (BL) e *Byrsonima verbascifolia* (BV).

4.4.2. Identificação por FIA-ESI-IT-MSⁿ

As plantas do gênero *Byrsonima*, como revelam diversos estudos realizados (SANNOMIYA et al., 2005c; MALDINI, MONTORO, PIZZA, 2011; GUILLHON-SIMPLICIO et al., 2011), apresentam em sua composição química compostos fenólicos que são de grande interesse para a pesquisa biológica, por apresentarem elevada atividade antioxidante e por estarem relacionados à prevenção de inúmeras doenças cardiovasculares e do câncer (ZHANG et al., 2011).

Ácidos fenólicos, como o gálico, foram identificados no gênero *Byrsonima* na forma de taninos hidrolisáveis, derivados glicosilados e conjugados a outras classes de compostos fenólicos. Uma dessas classes são as proantocianidinas, oligômeros e polímeros dos flavan-3-ol (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2012), também classificados com taninos condensados e são formados pela mistura dos monômeros: catequina, epicatequina, epigallocatequina e galocatequina galato (DELCLAMBRE, SAUCIER, 2012).

Outra classe encontrada são os flavonóides (GUILLHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011) e de acordo com a literatura, os flavonoides encontrados no gênero *Byrsonima* são basicamente derivados da quercetina, sendo comum sua conjugação com glicosídeos, grupos metoxilas e outros grupamentos fenólicos (CUYCHENS, CLAEYS, 2004; ANDRESEN, MARKHAM, 2006).

A fim de contribuir com as análises realizadas por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies estudadas e ampliar os estudos espectrométricos do gênero *Byrsonima*, realizou-se um estudo por FIA-ESI-IT-MSⁿ dos mesmos extratos, estando os espectros de íons totais de cada extrato dispostos nas Figuras 111 a 116 no anexo B.

4.4.2.1. Ácidos e derivados

Os cromatogramas obtidos, através da técnica UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS possibilitaram observar a presença dessas substâncias, principalmente na região abaixo de 10 minutos no cromatograma. Os cromatogramas evidenciaram no tempo de retenção (T_R) em 0,80 minutos, no modo negativo, o íon da molécula precursora, $[M - H]^-$ de m/z 191 (GOUVEIA, CASTILHO, 2011). Através da análise de UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS, foi atribuído que este pico cromatográfico se refere ao ácido quínico,

sendo confirmado no espectro de segunda ordem (Figura 36) obtido por FIA-ESI-IT-MS. Fragmentos significativos foram também observados, referente à perda da carboxila e água (GOUVEIA, CASTLHO, 2011), em m/z 173 e m/z 127.

Outra substância identificada nas espécies estudadas de *Byrsonima* é o ácido gálico. Esta substância foi confirmada pelo íon da molécula precursora de m/z 169 $[M - H]^-$, com $T_R = 1,35$ min., com bandas no espectro no UV em 213 e 272 nm. O espectro de massas de segunda ordem por FIA-ESI-IT-MS, evidenciou ainda o íon de m/z 125, que foi atribuído a perda de COO^- do ácido gálico $[M - 44 - H]^-$ (Figura 37).

Figura 36 – Espectro de massas de segunda ordem (MS^2) do íon precursor m/z 191 obtidos em modo negativo com energia de colisão de 30%.

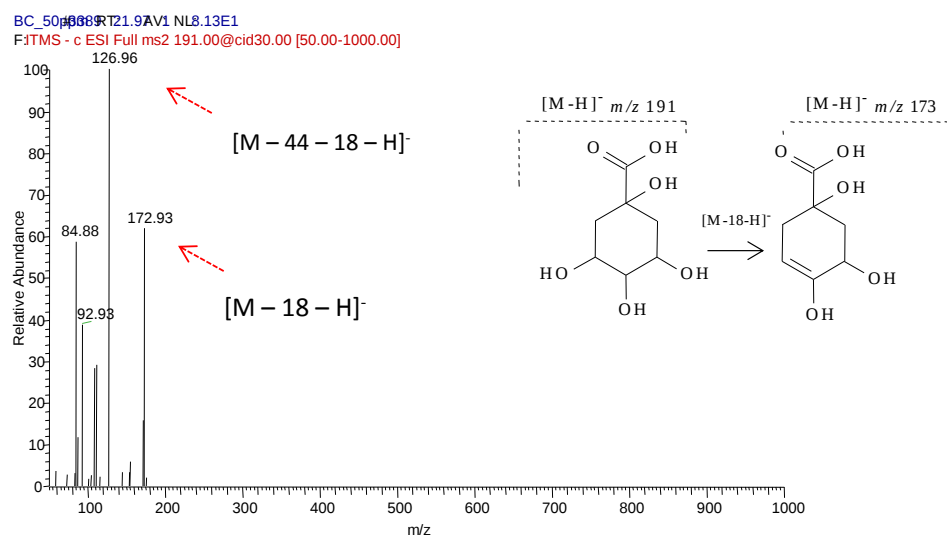
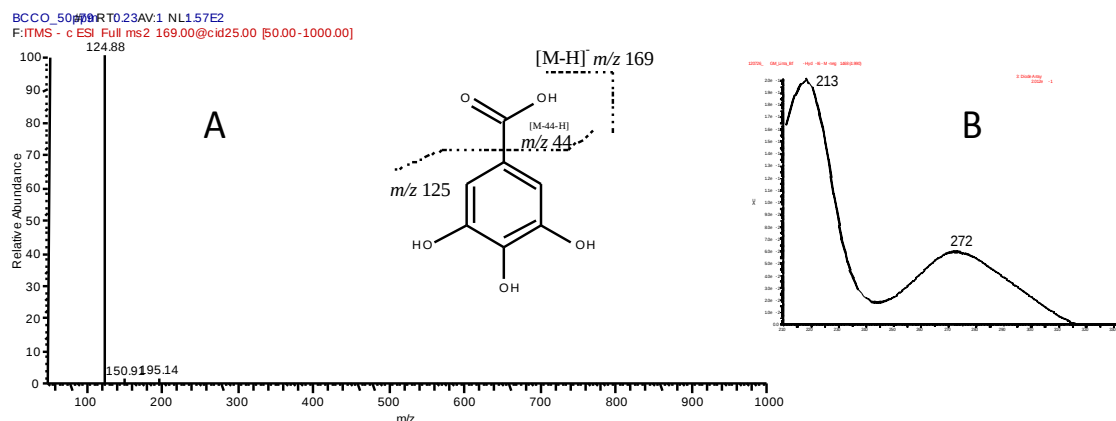
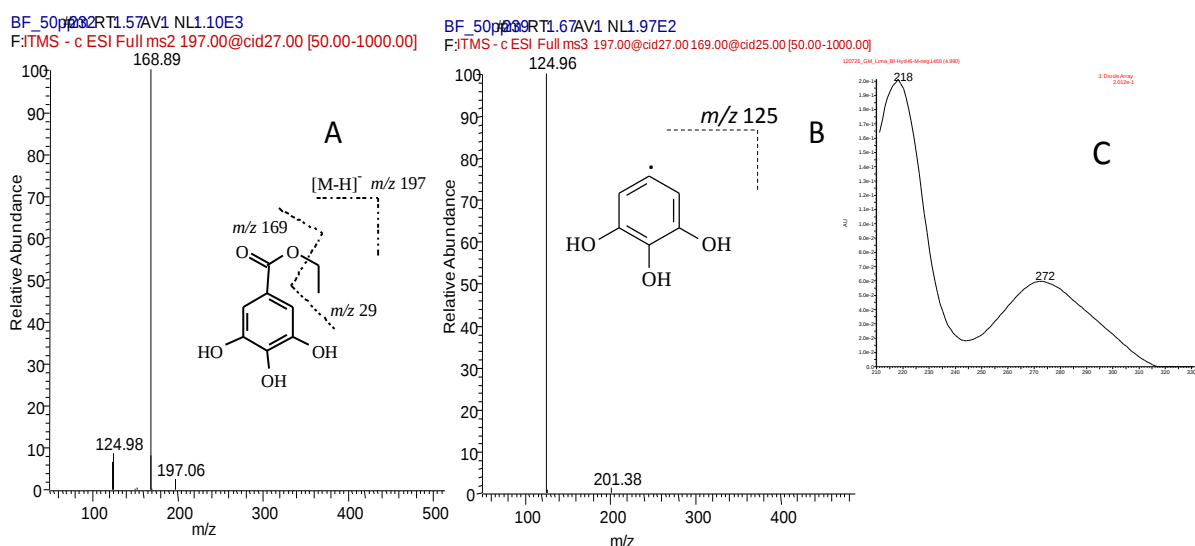


Figura 37 - A) Espectro de massas do íon precursor de m/z 169, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%; B) Espectro no UV do ácido gálico. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



Outro derivado do ácido gálico pôde ser identificado no cromatograma $T_R = 4,98$ min. O espectro de massas desta substância evidenciou o íon da molécula precursora em m/z 197. Os íons fragmentos observados mostraram m/z em 169 e 125 que foram atribuídos às perdas de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ e CO_2 , respectivamente: $[\text{M} - 28 - \text{H}]^-$ e $[\text{M} - 28 - 44 - \text{H}]^-$. Com tais informações pôde-se identificar esta substância como sendo galato de etila. (GUILHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011).

Figura 38 – Espectros de massas do íon precursor de m/z 197, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 197; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 169; C) Espectro no UV.

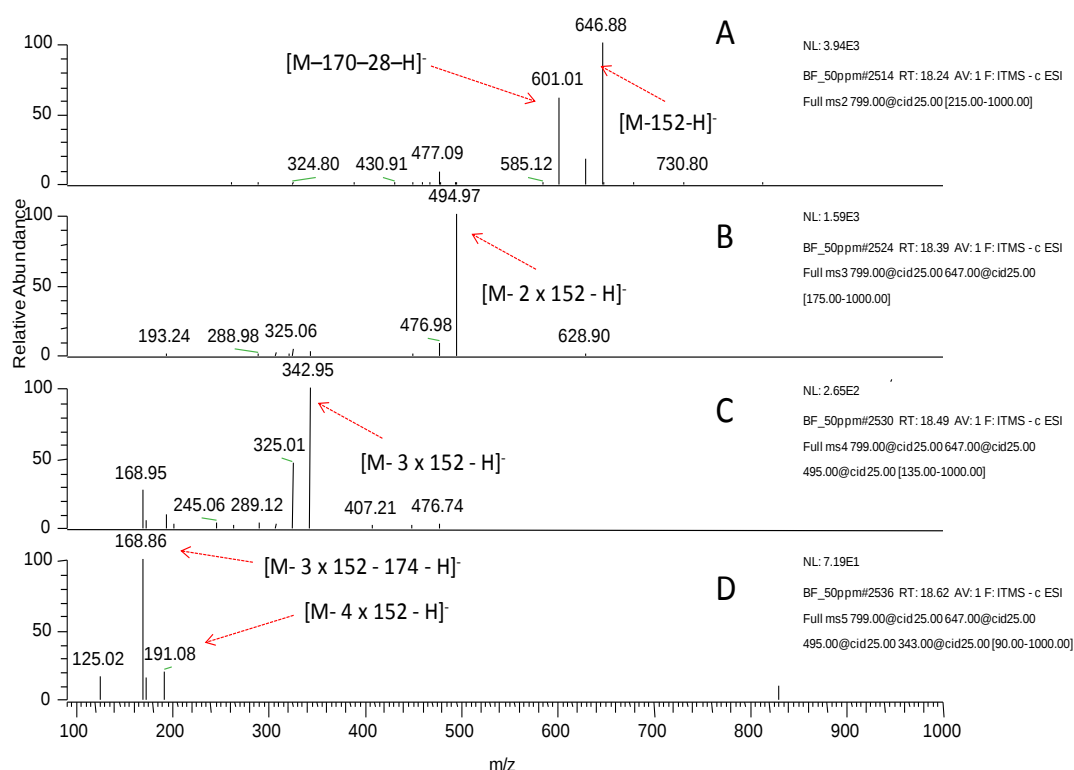


Derivados do ácido tetragaloil-quínico foram identificados também no extrato hidroalcoólico das folhas das espécies de *B. correifolia*, *B. fagifolia* e *B. ligustrifolia* (Tabela 10). O espectro de massas de segunda ordem da molécula precursora apresentou os íons de m/z 799 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (Figura 39). Foram observados ainda íons significativos de m/z 647, referente à perda de uma unidade galoil $[\text{M} - 152 - \text{H}]^-$. O íon de m/z 495 foi atribuído à perda de duas unidades galoilas $[\text{M} - 152 - 152 - \text{H}]^-$, enquanto que o íon m/z 343 refere-se à perda da terceira unidade galoila $[\text{M} - 3 \times 152 - \text{H}]^-$. No espectro de quinta-ordem (MS^5) do íon produto de m/z 343 observou-se a formação do íon mais intenso de m/z 169 referente a perda do ácido quínico $[\text{M} - 3 \times$

152 – 174 – H], sugerindo-se, assim, que esta molécula é um tetrâmero do ácido galoil-quínico.

Sannomiya (2007a), estudando a infusão das folhas de *B. fagifolia* por HPLC-ESI-ITMSⁿ, também identificou esta mesma substância. A autora identificou um total de quatro derivados do tetragaloil-quínico, o que justifica a presença de três substâncias com o mesmo íon precursor, sendo a diferença entre estas substâncias, as posições em que os grupos galoílas esterificam o ácido quínico. Observou-se neste estudo apenas uma das séries de substâncias descritas pela autora, onde o tetragaloil-quínico apresenta obrigatoriamente eliminação do ácido gálico seguida da perda de – CO. Esta afirmação, pode ser explicada pela formação do íon m/z 601, $[M - 170 - 28 - H]^-$ (Figura 39A), que corrobora para identificação do ácido 1,3,4,5-tetragaloil-quínico.

Figura 39 – Espectro de massas do íon precursor de m/z 799, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 799; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 647; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 495; D) quinta-ordem (MS^5) do íon produto de m/z 343. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



Os outros ácidos galoil-quínicos que foram identificados (Figuras 111 e 116, anexo B), referem-se ao tri, di e mono galoil-quínico. Estes ácidos foram encontrados nos extratos das folhas de quase todas as *Byrsonimas* estudadas neste trabalho, com exceção de *B. correfolia* e *B. verbascifolia* (Tabela 10). Analisando os espectros de massas de segunda ordem (MS^2) dos íons m/z 647 (Figura 40A), 495 (Figura 41A) e 343 (Figura 42A), referente aos íons precursores dos ácidos tri-, di- e monogaloil-quínico, observou-se a formação de íons referentes às perdas sucessivas de unidades de galoil, além da formação dos íons m/z 191 e m/z 125. O íon de m/z 191 $[M - 152 - H]^-$ é formado pela perda da última unidade de galoila e o íon de m/z 125 $[M - 152 - 44 - H]^-$ é procedente da descarboxilação do ácido gálico. Estas fragmentações também foram descritas por Sannomiya (2007a e 2005a) e Maldini, Montoro, Pizza, (2011).

Figura 40 – Espectro de massas do íon precursor de m/z 647, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 647; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 495; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 343. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).

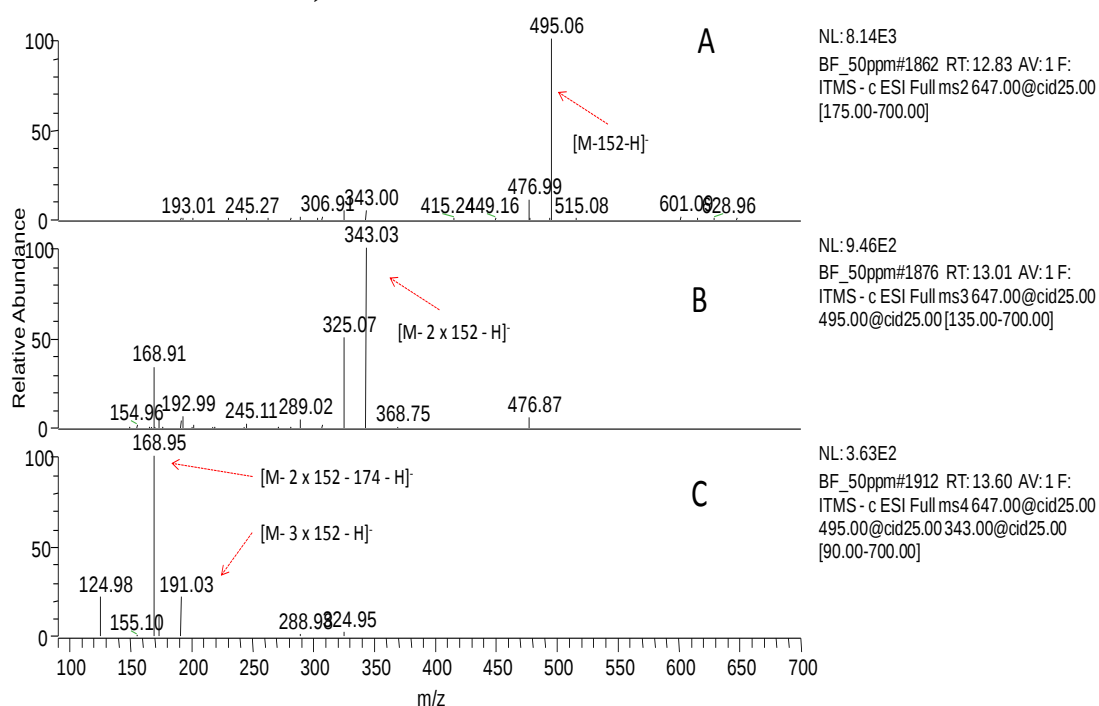


Figura 41 – Espectro de íons totais da fragmentação da série de ácidos galoilquínicos: m/z 495 do $[M - H]^-$ do ácido digaloilquínico, seguido de duas perdas sucessivas de $[M - 152 - H]^-$ originando m/z 343 do ácido monogaloilquínico, e posteriormente o m/z 191 do ácido quínico. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).

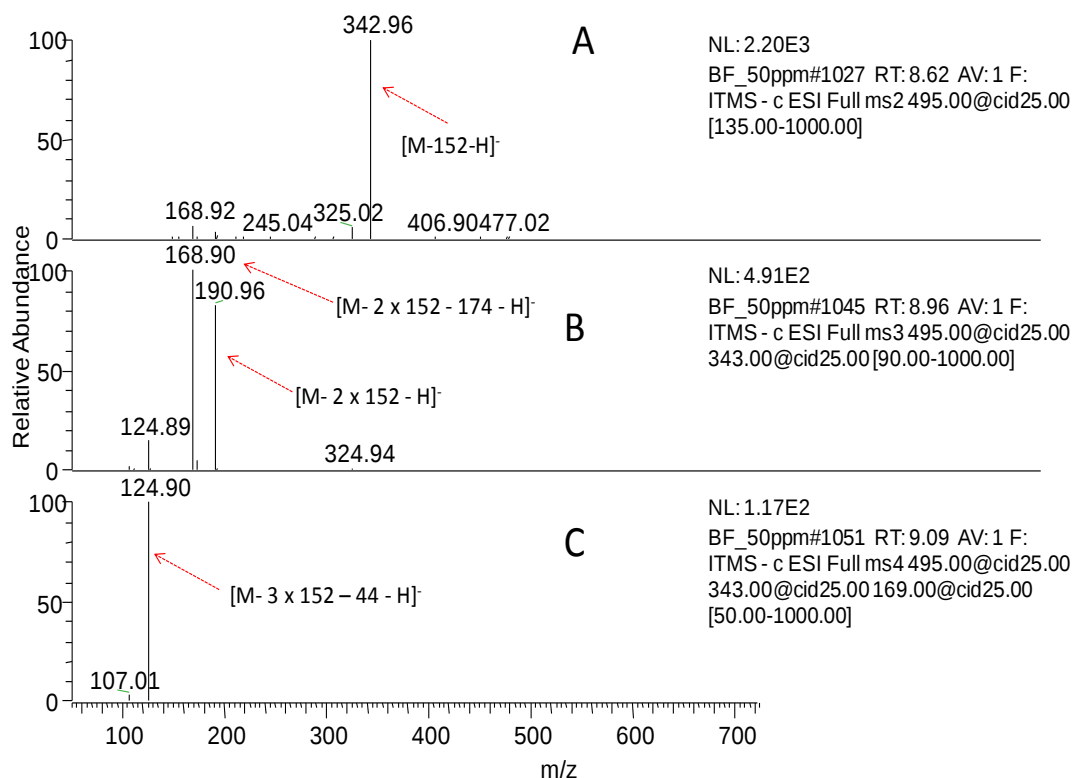
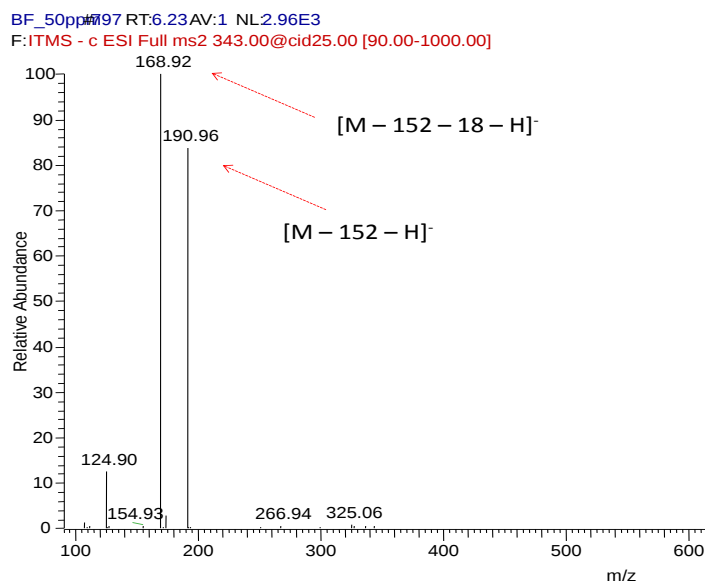


Figura 42 – Espectro de íons totais da fragmentação da série de ácidos galoilquínicos: m/z 343 do $[M - H]^-$ do ácido monogaloilquínico, seguido de duas perdas sucessivas de $[M - 152 - H]^-$ originando m/z 191 ácido quínico. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



4.4.2.2. Catequina e seus derivados

Outra classe de substâncias identificadas por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS, nos extratos hidroalcoólicos de *Byrsonima*, foram os monômeros e oligômeros de proantocianidinas. Dentre as espécies estudadas neste trabalho, somente o cromatograma (Figura 112) e o espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* (Figura 118), da espécie *B. fagifolia* não apresentou sinais referentes ao íon m/z 289. Estes íons, como expõe a literatura científica, são característicos da catequina e ou proantocinidinas (JAISWAL, JAYASINGHE e KUHNERT, 2011).

A análise dos espectros no UV destes picos evidenciam bandas de absorção em 229 e 279 nm (RODRIGUES, 2007), conforme mostrado na Figura 43.

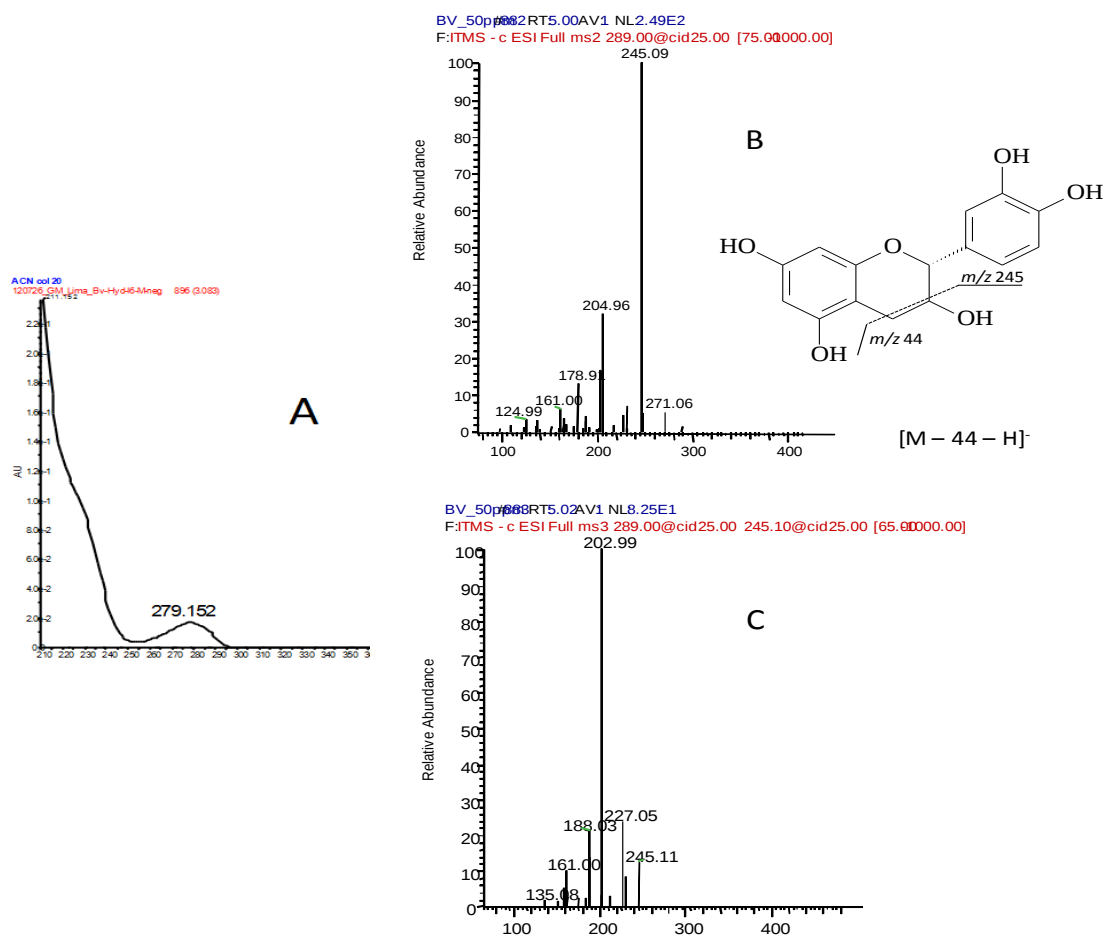
Estudos feitos por Jaiswal, Jayasinghe e Kuhnert (2011), verificaram que a catequina possui o menor tempo de retenção (pico 10, $T_R = 3,06$ minutos), seguida pelo seu epímero (pico 16, $T_R = 3,94$). Outros fragmentos foram observados no espectro de massas (Figura 43) que confirmaram a identificação desta molécula, como íon m/z 245 (MS^2) e de m/z 203 (MS^3) (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2011).

Três moléculas com íons referentes à m/z 577 ($T_R = 2,65; 3,39; 3,52$ min.), foram encontradas nos cromatogramas (Figuras 112 e 116) das espécies de *Byrsonima coccolobifolia* e *B. verbascifolia*. Estudos realizados por (SANNOMIYA et al., 2005c; JAISWAL, JAYASINGHE e KUHNERT, 2011) propõem estes íons como sendo o dímero formado por duas unidades de catequinas, conhecidos por proantocianidinas. A literatura informa que são possíveis 16 isômeros para este tipo de substância, entretanto apenas oito isômeros (estereoisômero 3,4 *trans*) ocorrem de forma natural (JAISWAL, JAYASINGHE e KUHNERT, 2011).

Foram observados a formação dos íons m/z de 407, m/z 289 e m/z 451 (Figura 44). O espectro de segunda ordem (MS^2) do íon de m/z 407 é proveniente do íon da molécula precursora de m/z 577, que perde um fragmento Retro Diels-Alder (152 Da), seguido da perda de água (18 Da), $[M - H - 170]^-$. Outro íon observado, m/z 289, é formado pelo tipo de fragmentação quinonametúdeo, sendo justificado pela perda de uma das unidades de catequina $[M - 288 - H]^-$. Finalmente o íon de m/z 451 é justificado pelo tipo de fragmentação conhecido como HRF (fissão heterocíclica do anel). Neste tipo de fragmentação observou-se a perda de 126 Da., referente à fissão

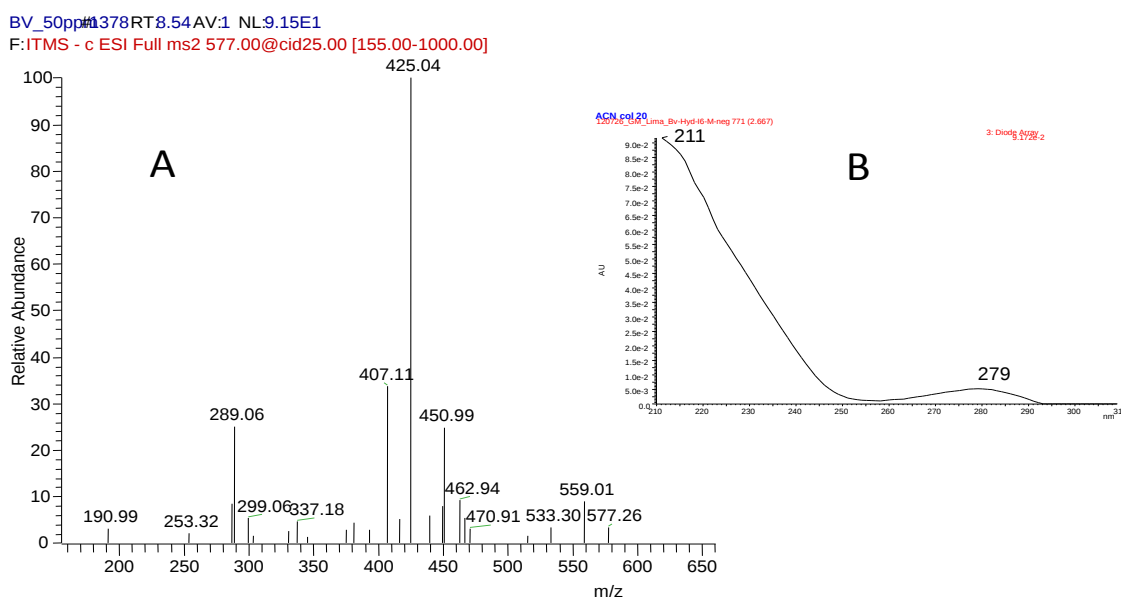
heterocíclica do anel C da catequina $[M - 126 - H]^-$ (TALA et al., 2012; JAISWAL, JAYASINGHE e KUHNERT, 2011).

Figura 43 - A) Espectro no UV da catequina; Espectro de massas do íon precursor de m/z 289, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. B) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 289; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 245; (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



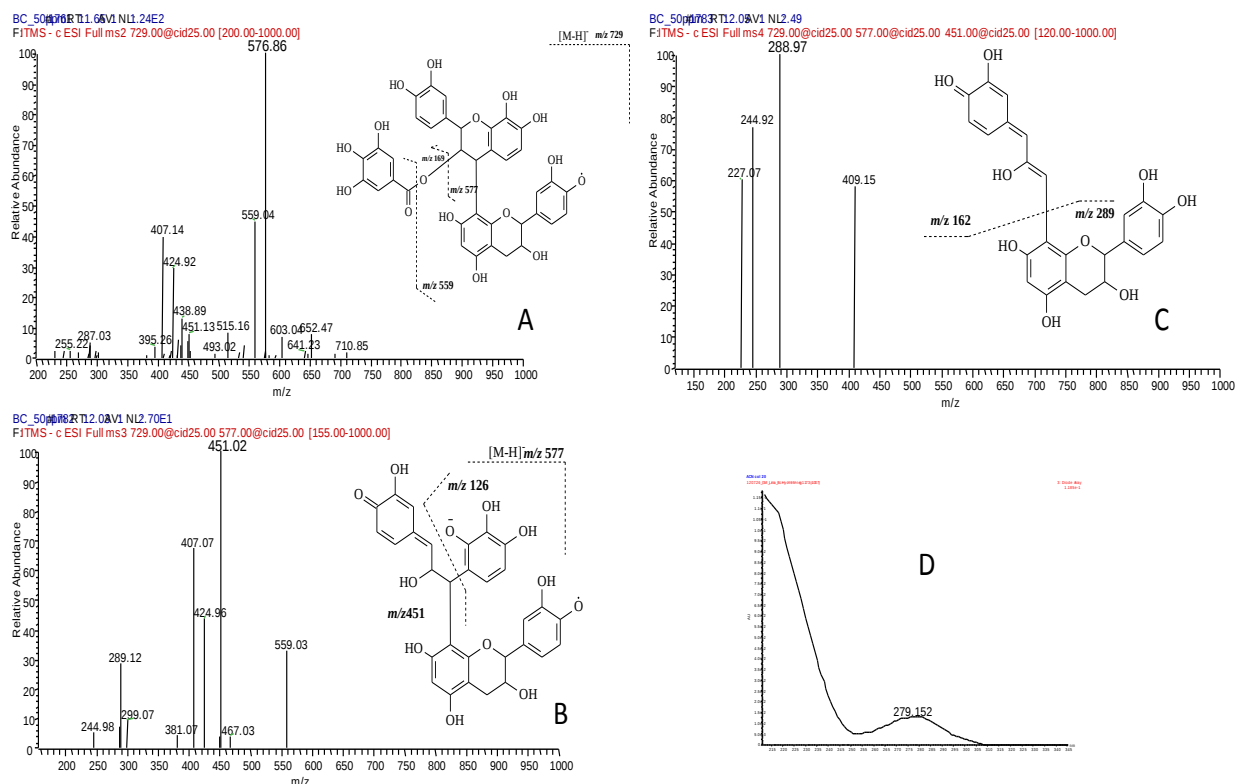
Diversos isômeros das proantocianidinas podem ser formados com íon precursor m/z 577, diferenciando-se pelos tempos de retenção de cada molécula e isso, permite especular que os três íons m/z 577 encontrados referem-se as proantocianidinas B1 e B2, que diferem apenas na conformação da hidroxila na posição C-3.

Figura 44 – A) Espectro de massas do íon precursor de m/z 577, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%; B) Espectro no UV da proantocinidina. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



No espectro de segunda ordem (MS^2 , Figura 45) observou-se o íon de m/z 729 ($T_R = 4,0$ minutos, Tabela 10). A formação deste íon é justificada pela perda do fragmento referente a uma unidade galóila [$M - 152 - H$] $^+$, produzindo o íon de m/z 577. Como mostrado anteriormente, este, refere-se a proantocianidina tipo B. Os espectros de quarta (MS^4) e quinta (MS^5) ordem demonstram as fragmentações relacionadas à molécula descrita anteriormente (Figura 45), evidenciando que o íon precursor de m/z 729 refere-se ao Proantocianidina B-2'-O-galato. (SANNOMIYA et al., 2005c; JAISWAL, JAYASINGHE e KUHNERT, 2011).

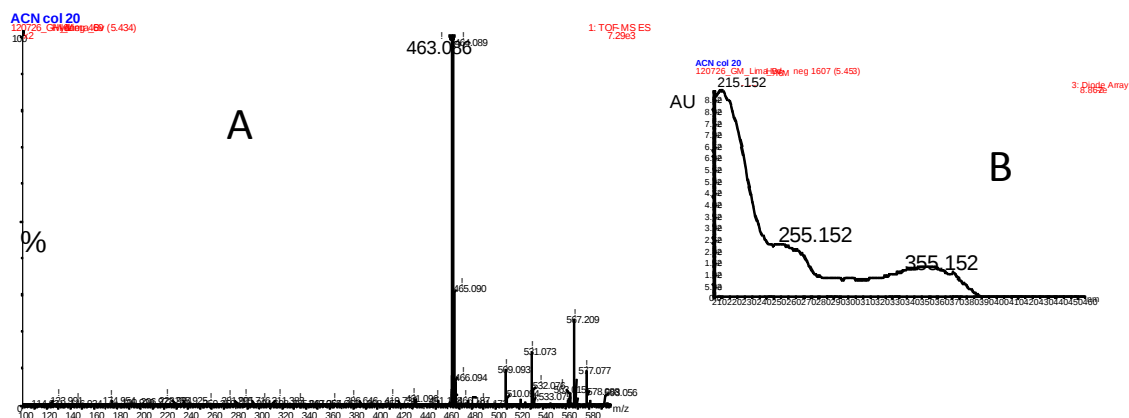
Figura 45 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 729, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 729; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 577; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 451; D) Espectro no UV. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



4.4.2.3. Flavonóides

No estudo sobre infusões das folhas de *Byrsonima crassa* (SANNOMIYA et al., 2004), o fragmento de m/z 463 ($T_R = 5,44$ min.) é comum ao extrato hidroalcoólico e se refere a quercetina *O*-glicosilada (Figura 46), isolada e identificada neste trabalho como sendo a quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo. O referido fragmento apresentou espectro no UV com absorções em 255 e 355 nm (Figura 46), comportamento semelhante ao demonstrado no isolamento de BM-8 - vide item 4.3.3.1) (SANNOMIYA et al., 2004).

Figura 46 – A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 463 ($T_R = 5,4$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.



O espectro de massas obtido para o pico com $T_R = 3,59$ minutos tem como íon precursor $[M - H]^-$ o íon m/z 615, que apresentou perda de grupamento galoil $[M - 152 - H]^-$ no seu espectro de segunda ordem, gerando o íon de m/z 463, por sua vez, derivado da quercetina monoglicosilada, com fragmentação subsequente da hexose ($[M - 152 - 162 - H]^-$), possuindo a fragmentação característica da quercetina no seu espectro de quarta ordem ($^{1,3}A_0/^{1,3}B_0$), sendo identificado por quercetina-3-O- β -2"-galoil-galactopiranosídeo (SANNOMIYA et al., 2005c), com espectro no UV exibindo três bandas em 211, 256 e 356 nm (Figura 47).

Figura 47 – A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 615 ($T_R = 3,59$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

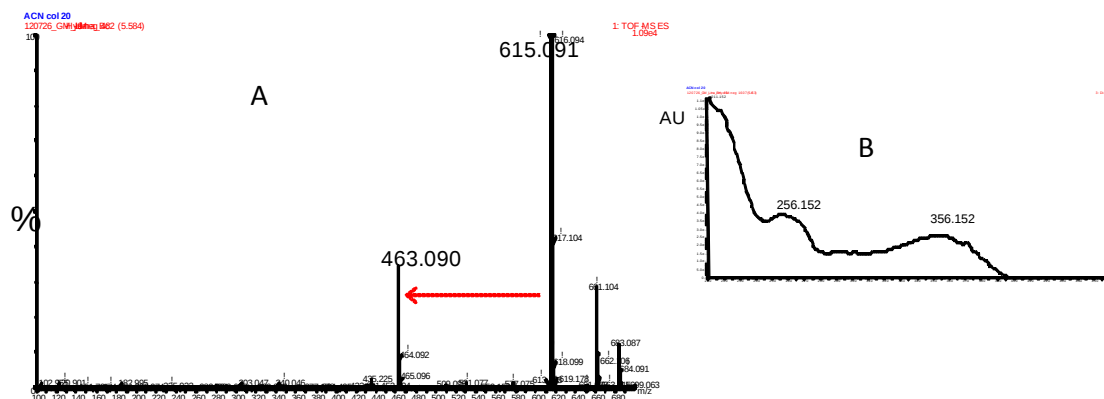
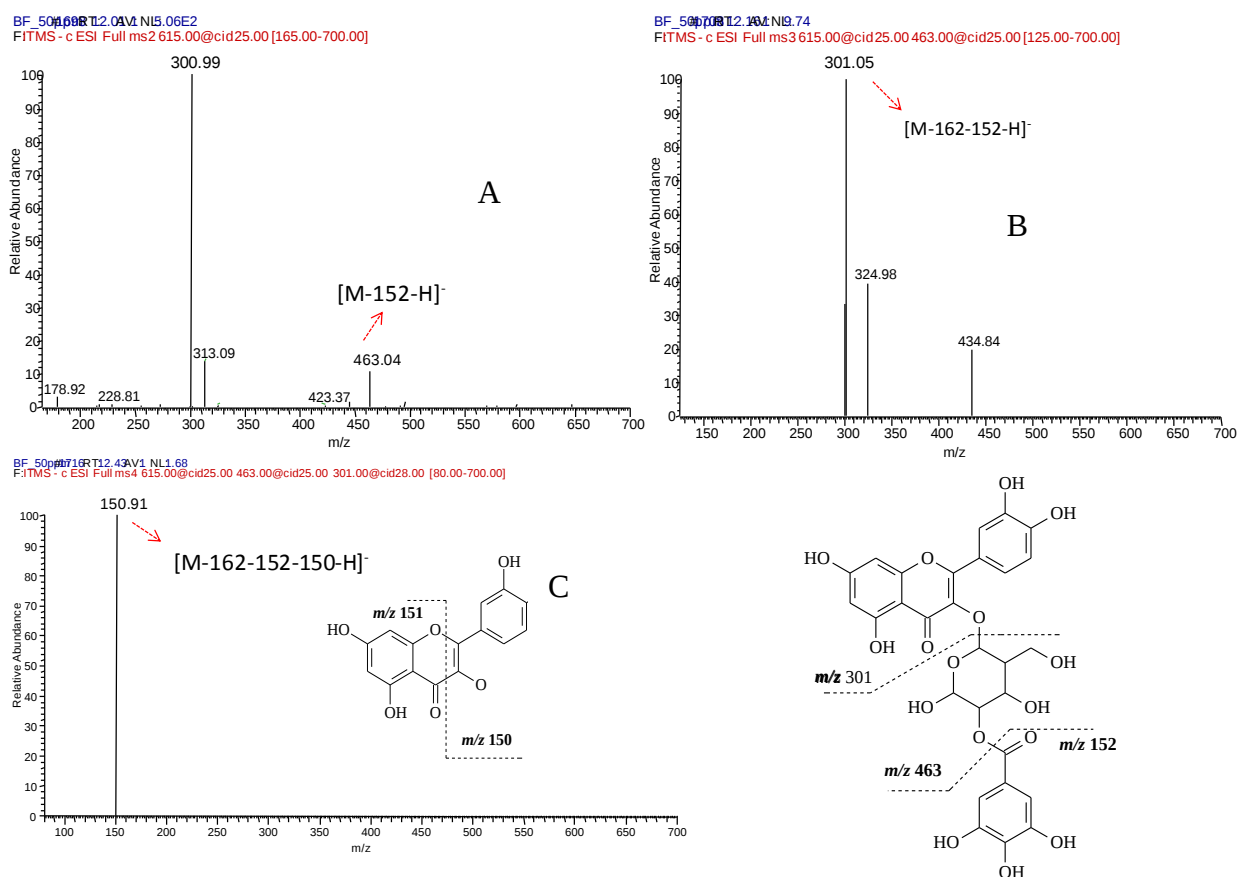
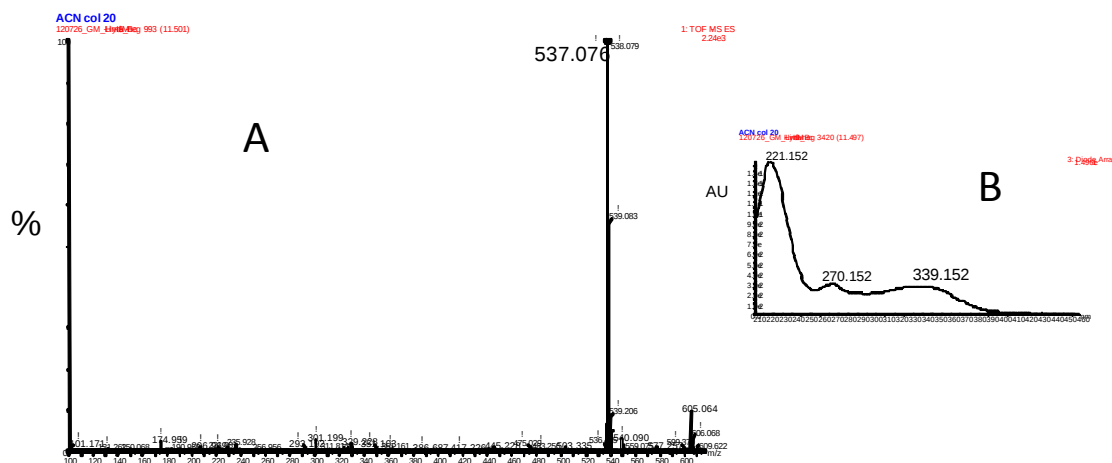


Figura 48 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 615, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 615; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 463; C) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 301. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



O sinal referente ao $T_R = 11,5$ min. apresentou espectro de absorção no UV com três bandas 221, 270, 339 nm (RODRIGUES, 2007) e espectro de massas com íon precursor $[M - H]^-$ m/z 537 (RODRIGUES, 2007; SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005c) que descrevem esse íon precursor como sendo do biflavonóide amentoflavona (Figura 49).

Figura 49 - A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 537 ($T_R = 11,5$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.



Os íons m/z 433 e m/z 585 ($T_R = 6,02$ e $6,52$ min.) encontram-se relacionados pelo fragmento m/z 301, referente ao aglicona desprotonada da quercetina. No entanto, o íon $[M - H]^-$ m/z 585 possui como uma de suas fragmentações o íon de m/z 433 (Figura 51), que foi atribuído a perda de um grupo galoil, $[M - 152 - H]^-$. Estudos realizados por Sannomiya (2005c), identificam estes dois compostos como: quercetina-3-*O*- α -L-2''-galoil-arabinopiranoside e quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, respectivamente

Figura 50 – A) Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 585 ($T_R = 6,52$ min.); B) Espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

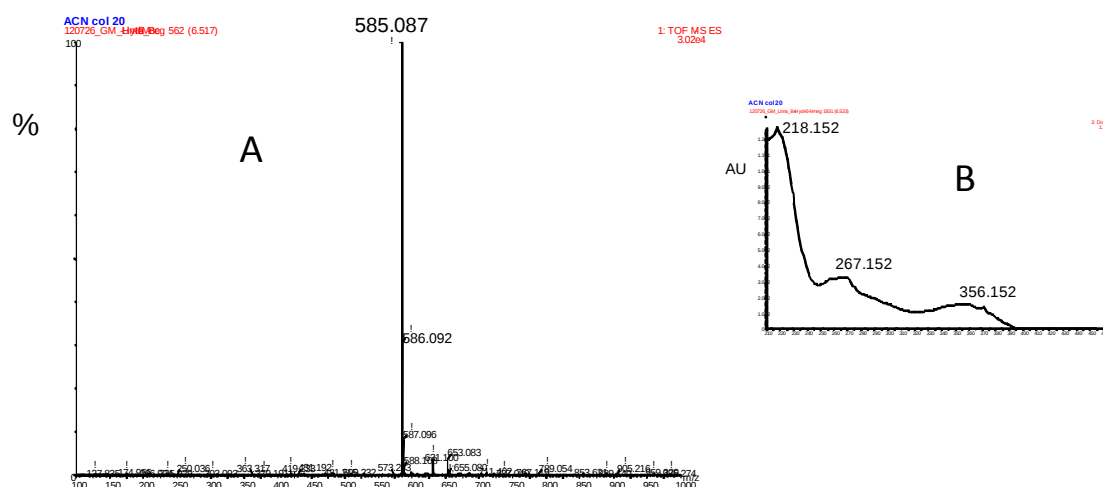
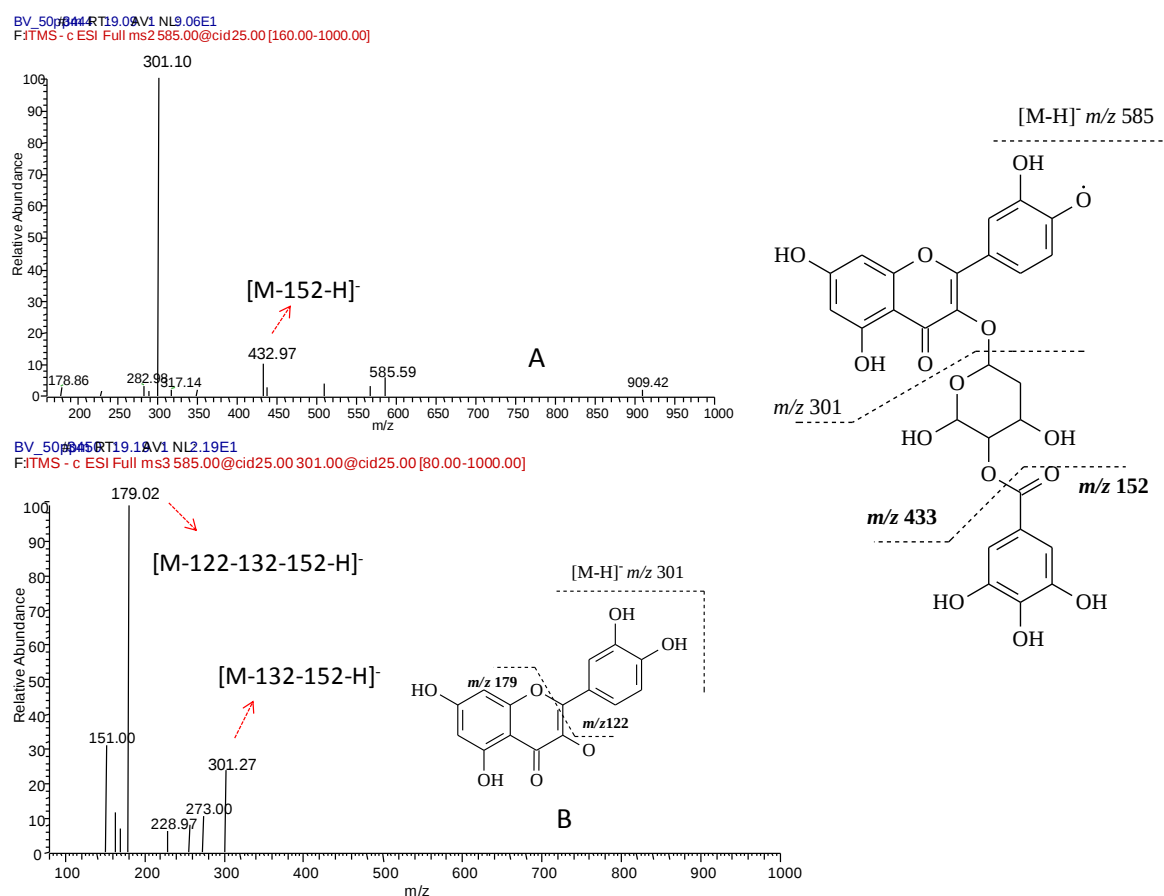


Figura 51 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 585, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 585; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 433. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



Outro flavonoide derivado da quercetina, também foi identificado no extrato hidroalcoólico de *B. coccolobifolia* e *B. intermedia*. A Figura 53 apresenta o íon de m/z 447, característico da perda de uma unidade de ramnose $[M - 146 - H]^-$.

Esta substância também foi isolada neste trabalho do extrato hidroalcoólico de *B. coccolobifolia* e *B. intermedia*, (vide item 4.3.3.2) e, em decorrência, identificada como sendo como quercetina-3-*O*- α -ramnopiranosídeo.

No espectro de segunda ordem (MS^2 , Figura 54) observou-se também o íon de m/z 599 ($T_R = 6,30$ minutos, Tabela 10). A formação deste íon é justificada pela perda do fragmento referente a uma unidade galoíla $[M - 152 - H]^-$, produzindo o íon de m/z 477. Este íon produto, refere-se a quercetina-3-*O*- α -ramnopiranosídeo. O espectro de terceira ordem (MS^3) demonstra a fragmentação relacionada a formação do íon m/z 300, evidenciando que o íon precursor refere-se a substância quercetina-*O*-(2"-*O*-galoil)- α -ramnopiranosídeo. (ANDERSEN, MARKHAM, 2006)

Figura 52 – Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 433 ($T_R = 6,02$ min.) e espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

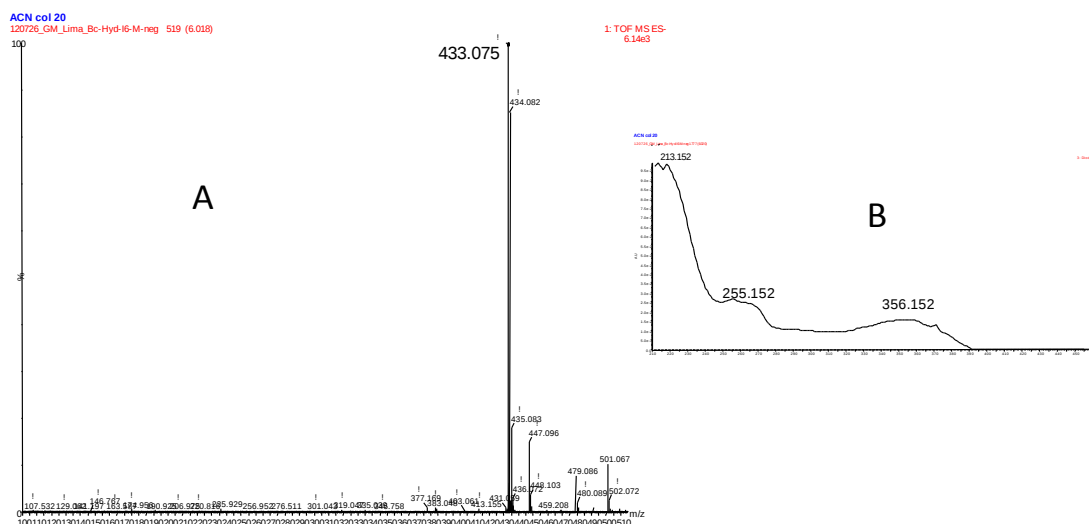


Figura 53 - Espectro de íons totais obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS no modo negativo de ionização, do íon m/z 447 ($T_R = 6,40$ min.) e espectro no UV obtido no respectivo pico cromatográfico.

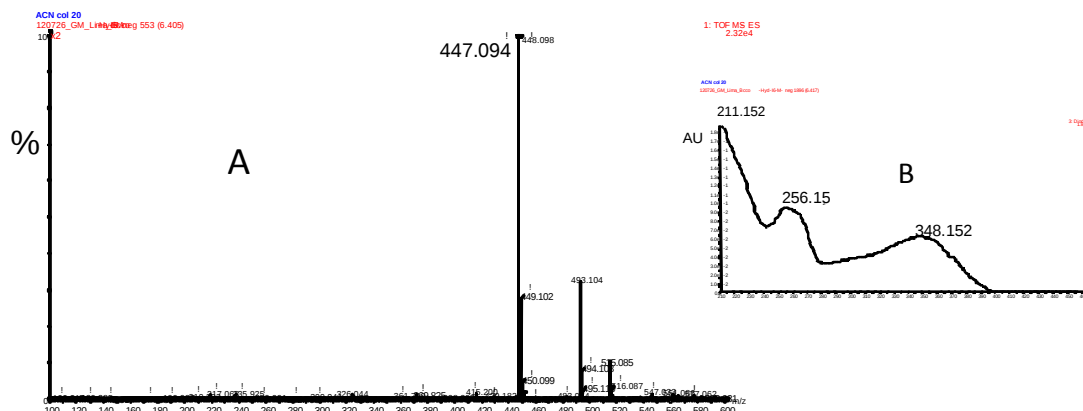
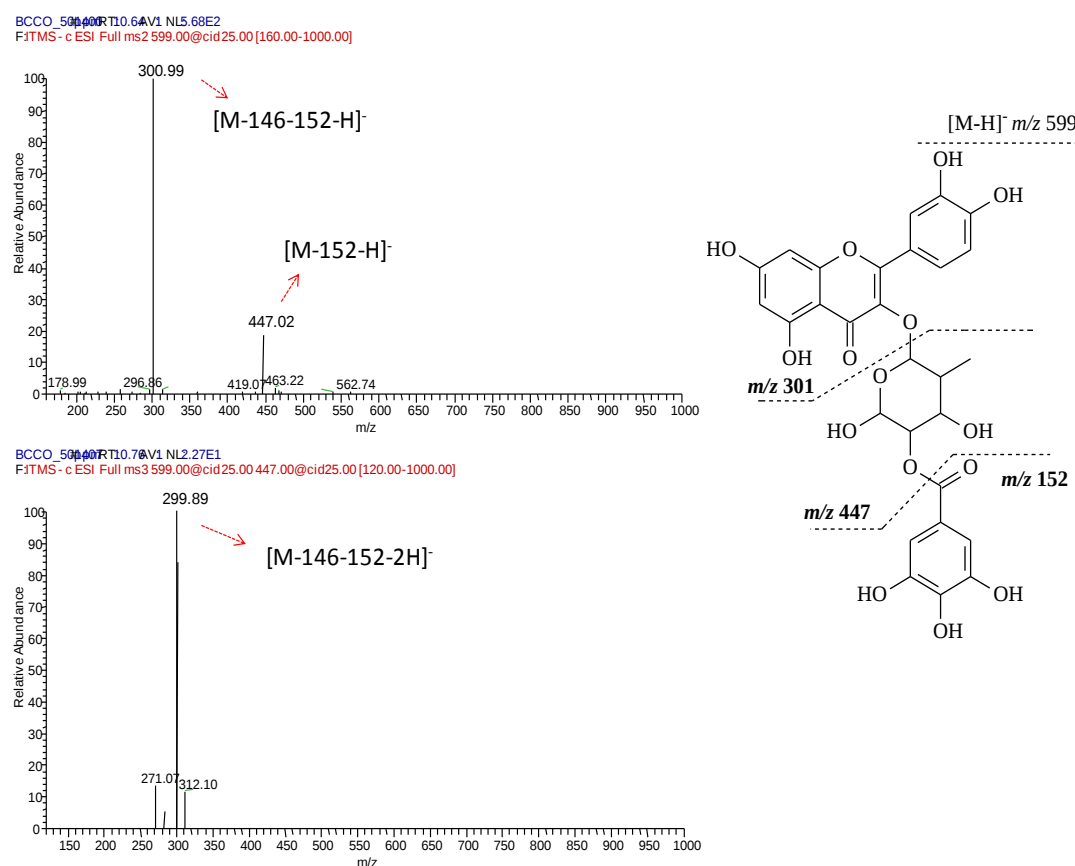


Figura 54 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 599, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 599; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 447. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



Flavonoides derivados da apigenina, também foram identificados nos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de *Byrsonima* estudados. O espectro de massas da Figura 55 mostra o íon da molécula desprotonada m/z 431. Espectros de segunda ordem do íon em m/z 431 evidenciaram perdas, que segundo a literatura, são características de flavonoides C-glicosilados, $[M - 120 - H]^-$ gerando o íon m/z 311 e $[M - H - 90]^-$, fornecendo o íon em m/z 341 (ANDERSEN, MARKHAM, 2006). Estes sinais são referentes as perdas característica de C-hexoses. A formação do íon m/z 323, evidencia a perda de uma molécula de H_2O (CUYCKENS, CLAEYS, 2004). De acordo com Prasain et al., (2003), flavonoides C-glicosilados formam a partir do íon m/z 311 o íon m/z 283 ($[M - 28 - H]^-$) originando o íon m/z 269 referente a aglicona da apigenina. Portanto, os sinais referentes ao íon precursor m/z 431 são referentes ao flavonoide derivado da apigenina C-glicosilada ($T_R = 4,28$ minutos) e seu isômero ($T_R = 5,25$ minutos). Os espectros no UV destas substâncias apresentam bandas de absorção em 268 e 341 nm

E por fim, foi identificada a Rutina e isômeros ($T_R = 5,22$; 5,34 e 8,00 minutos, Tabela 10), com íon precursor $[M - H]^-$ m/z 609, que sofre uma fragmentação característica de perda de uma hexose $[M - 162 - H]$, com formação do íon m/z 463 e fragmentação de terceira ordem, subsequente, com perda de $[M - 146 - 162 - H]^-$ pela perda de mais uma hexose, neste caso, uma ramnose, formando o íon m/z 301 ou a quercetina desprotonada, como mostrado na Figura 56.

Figura 55 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 431, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%. A) segunda-ordem (MS^2) do íon precursor de m/z 431; B) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 311; C) terceira-ordem (MS^3) do íon produto de m/z 431; D) quarta-ordem (MS^4) do íon produto de m/z 311. (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).

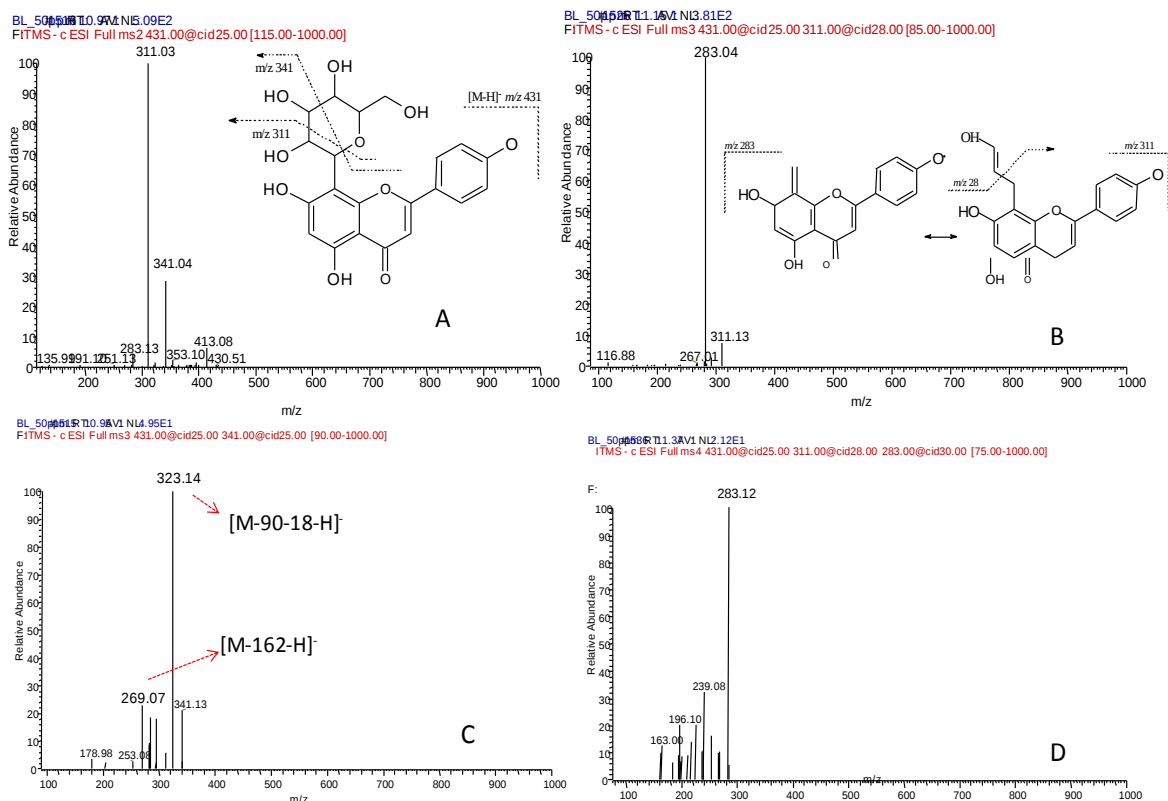
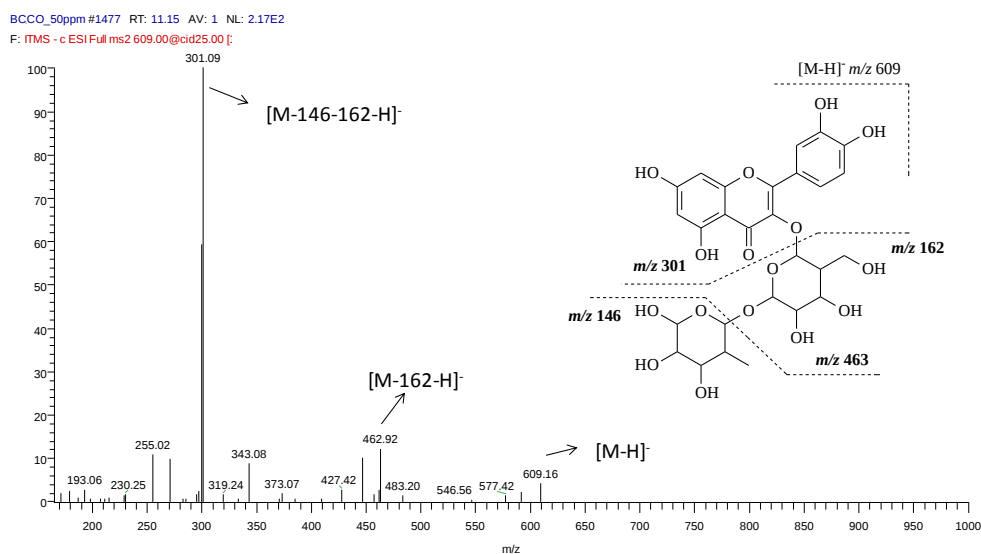


Figura 56 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 609, obtido em modo negativo com energia de colisão de 25%, espectro de segunda-ordem (MS^2). (vide condições espectrométricas item 3.2.4.4.).



4.4.3. UHPLC-ESI-TOF-MS

4.4.3.1. Análise das substâncias isoladas: BM-1 a BM-9 e substâncias selecionadas.

A caracterização detalhada dos extratos hidroalcoólicos de espécies do gênero *Byrsonima* é de grande importância, tendo em vista seu uso efetivo na medicina popular brasileira. Além da referida caracterização, o presente estudo descreve também uma abordagem metabolômica baseado em UHPLC-ESI-TOF-MS, utilizando os perfis de massas para destacar as diferenças de metabólitos nas espécies investigadas (*B. correifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. fagifolia*, *B. Intermedia*, *B. ligustrifolia* e *B. verbascifolia*).

Com este propósito, utilizou-se um conjunto de dados de massas de cada extrato, detectadas por UHPLC-ESI-TOF-MS, que originou uma matriz de dados com 30 amostras (seis espécies analisadas em quintuplicata) e 902 variáveis ou sinais de íon precursor, detectados em alta resolução das substâncias presentes nos extratos.

Uma vez identificadas as substâncias majoritárias e as mais frequentes em todos os extratos analisados, como mostrado na Tabela 10, e uma vez obtidas as massas de alta resolução das substâncias isoladas, foi possível selecionar as referidas substâncias dentro da matriz de dados, obtida para determinar a distribuição das substâncias selecionadas dentro de cada extrato, pelo percentual da média relativa da área de cada pico obtido por UHPLC-ESI-TOF-MS.

A análise foi realizada conforme o item 3.2.4.12, com as substâncias sendo misturadas de modo que o mesmo cromatograma apresentasse duas ou mais substâncias em tempos de retenção distintos. A mistura foi feita de acordo com os tempos de retenção apresentados na Figura 10, o que possibilitou a confirmação da fórmula molecular de cada uma das substâncias e de suas massas em alta resolução, como mostrado na Figura 57 e Tabela 11.

Outras substâncias foram isoladas, entretanto, em virtude da pouca quantidade e/ou por estarem em misturas, não foi possível a identificação das mesmas através dos métodos espectroscópicos.

A Figura 58 mostra os demais cromatogramas de outras quatro substâncias, identificadas por UHPLC-ESI-TOF-MS, em análise similar a empregada às substâncias BM-1 a BM-9. Identificou-se as substâncias catequina, proantocianidina B-2'-O-galato, galato de etila e quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo), sendo

estas nomeadas de P10, P17, P23 e P38, respectivamente, com numeração referente aos picos da Tabela 10.

Figura 57 – Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS das substâncias BM-1 a BM-9.

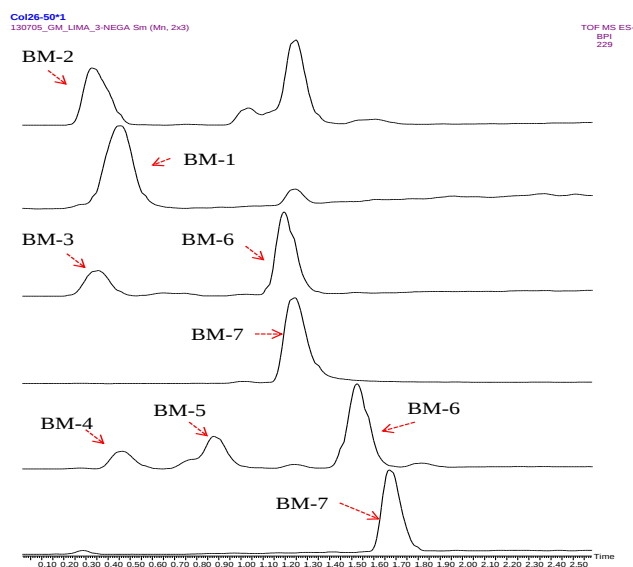
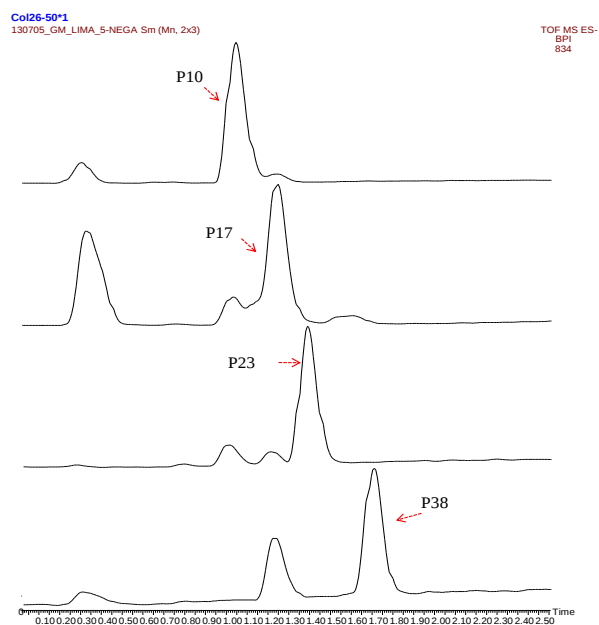


Figura 58 - Cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS das substâncias isoladas P10, P17, P23 e P38.



Selecionou-se ainda substâncias com maiores frequências nas seis espécies ou que apresentaram abundância relativa maior que 40% nos cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS (Figuras 105 a 110), sendo: (I) ácido quínico (P1), pela abundância relativa na espécie *B. verbascifolia*, (II) Quercetina 3-O-β-D-arabinopiranosídeo (P33), por sua presença em cinco das seis espécies estudadas, com abundância relativa importante e já descrita na literatura (SANNOMIYA et al., 2004) e (III) o tricalisiosídeo J (P60), um terpeno do tipo caurânico glicosilado, com ampla distribuição nas seis espécies, identificado por He (2005), nas folhas de *Tricalysia dubia*, que apresentou altas abundâncias relativas nas espécies de *Byrsonima*. Os valores de massas em alta resolução e fórmulas moleculares estão expostos na Tabela 11.

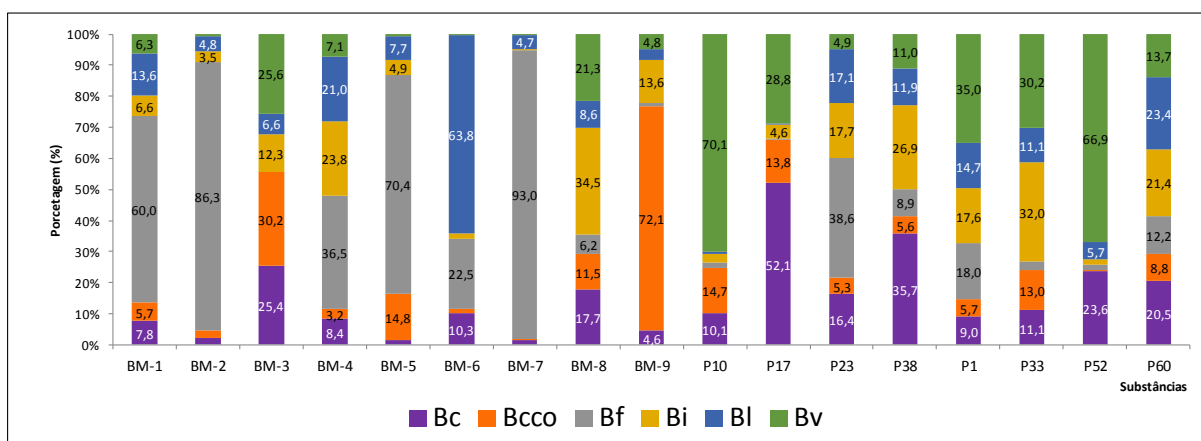
Tabela 11 - Valores de massas obtidas por UHPLC-ESI-TOF-MS das substâncias isoladas e selecionadas para determinação das abundâncias relativas de cada uma delas nas espécies de *Byrsonima*.

Pico	T _R (min)	M.E	M.C	Formula [M – H] ⁻	Nome
BM-1	0,44	331,0715	331,0759	C ₁₃ H ₁₃ O ₁₀	β-glucogalina
BM-2	0,32	343,0674	343,0665	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	ácido 5-O-galoil-quínico
BM-3	0,36	343,0674	343,0665	C ₁₄ H ₁₅ O ₁₀	ácido 4-O-galoil-quínico
BM-4	0,47	169,0141	169,0137	C ₇ H ₅ O ₅	ácido gálico
BM-5	0,87	495,0754	495,0775	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₄	ácido 1,3-O-digaloil-quínico
BM-6	1,18	647,0879	647,0884	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₈	ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico
BM-7	1,22	799,0981	799,0994	C ₃₅ H ₂₇ O ₂₂	ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico
BM-8	1,52	463,0884	463,0877	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo
BM-9	1,66	447,1001	447,0927	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	quercetina-3-O-α-L-ramninopiranosídeo
Demais substâncias isoladas					
P10	1,09	289,0710	289,0712	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	catequina
P17	1,24	729,1392	729,1464	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆	proantocianidina B-2'-O-galato
P23	1,38	197,0436	197,0450	C ₉ H ₉ O ₅	galato de etila
P38	1,72	585,0957	585,0880	C ₂₈ H ₄₃ O ₁₁	quercetina-3-O-(2"-galoil-α-arabinopiranosídeo)
Substâncias selecionadas					
P1	0,29	191,0585	191,0556*	C ₇ H ₁₁ O ₆	ácido quínico
P33	1,57	433,0801	433,0771*	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	quercetina 3-O-β-D-arabinopiranosídeo
P52	2,58	537,0827	537,0822*	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	amentoflavona
P60	4,25	555,2829	555,2805*	C ₂₈ H ₄₃ O ₄	tricalisiosídeo J

Legenda: * - valores obtidos da Tabela 9.

Uma vez selecionadas as substâncias pelas massas de seus íon precursores, as mesmas foram separadas do restante da matriz de dados gerados por UHPLC-ESI-TOF-MS, respeitando uma tolerância de $\pm 0,05$ minutos e tolerância de massa de $\pm 0,05$ Da. Com isso, foi possível determinar as abundâncias relativas em cada espécie, como mostrado no gráfico da Figura 59.

Figura 59 – Distribuição das substâncias isoladas e selecionadas, nas espécies de *Byrsonima*, de acordo com os percentuais da média relativa da área do pico.



Legenda: BM1- β -Glucogalina; BM2 - Ácido 5-O-galoil-quínico; BM3 - Ácido 4-O-galoil-quínico; BM4 - Ácido gálico; BM5 - Ácido 1,3-O-digaloil-quínico; BM6 - Ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico; BM7 - Ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico; BM8 - Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo; BM9 - Quercetina-3-O- α -L-ramninosídeo; P1 - Ácido quínico; P10 - Catequina; P17 - Proantocianidina B-2'-O-galato; P23 - Galato de etila; P33 - Quercetina 3-O- β -D-arabinopiranosídeo; P38 - Quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo); P52 - Amentoflavona; P60 - Tricalisiosídeo J.

Analisando o gráfico da Figura 59, observou-se que cada uma das espécies de *Byrsonima* possui uma determinada porcentagem das substâncias analisadas (BM1 a BM9, P10, P17, P23, P38, P1, P33, P52 e P60). As substâncias isoladas e selecionadas para este estudo se constituíram de cinco classes químicas principais: (a) derivados do ácido quínico e ácidos fenólicos derivados de ácido gálico; (b) catequina e proantocianidinas; (c) flavonoides O-glicosilados, podendo apresentar também esterificação com ácido gálico; (d) amentoflavona e (e) o terpenoide, no caso, o tricalisiosídeo J, que apresentou distribuição significativa em todas as espécies.

Os derivados do ácido gálico apresentaram suas maiores abundâncias relativas na espécie *B.fagifolia*, como por exemplo, a β -glucogalina (60,1%), ácido 5-O-galoil-quínico (86,3%), ácido gálico (36,5%), ácido 1,3-O-digaloil-quínico (70,4%), ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico (93%) e o galato de etila (38,6%). As exceções

encontram-se apenas no ácido 4-O-galoil-quínico, que se distribuiu de forma quase uniforme nas espécies *B. correifolia*, *B. coccolobifolia* e *B. verbascifolia*. (25,4; 30,2 e 25,6% respectivamente), e no ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico (BM6), que é predominante em *B. ligustrofolia* (63,8%).

A catequina e a proantocianidina B-2'-O-galato mostram-se predominantes em duas espécies: *B. correifolia* (10,1 e 52,1%) e *B. verbascifolia* (70,1 e 28,8%). O diterpeno tricalisiosídeo J (P60) foi selecionado de acordo com os dados da Tabela 10, por ser uma substância inédita no gênero *Byrsonima* e por se distribuir quase uniformemente em todas as espécies. Esta distribuição foi confirmada pela análise dos percentuais da abundância desta substância nas espécies, tendo como menor percentual em *B. coccolobifolia* (8,8%) e maior em *B. ligustrifolia* (23,4%); as demais espécies apresentaram percentuais dentro desta faixa.

A amentoflavona (biflavonoide – P52) foi selecionada por ser o único biflavonoide identificado e isolado em outros estudos químicos e biológicos do gênero *Byrsonima* (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA et al., 2007a; SANNOMIYA et al., 2004), os quais, por sua vez, corroboram os dados da Tabela 10, onde a substância encontra-se presente nas espécies *B. correifolia* e *B. verbascifolia*, com os percentuais de abundância: 23,6 e 66,9%, respectivamente.

Três flavonoides, um isolado, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (BM-8) e dois selecionados, quercetina 3-O- β -D-arabinopiranosídeo (P33) e quercetina-3-O-(2"-galoil)- α -arabinopiranosídeo (P38) apresentaram altos valores de abundância nas espécies *B. intermedia*, a saber: 34,5%, 32,0% e 26,6% respectivamente. A literatura descreve estas espécies como uma fonte de flavonoides dentro do gênero *Byrsonima*, correlacionando estas substâncias com atividade mutagênica (CARDOSO, 2006). Entretanto, o maior percentual para a quercetina-3-O-(2"-galoil)- α -arabinopiranosídeo foi obtido na espécie *B. correifolia*. Por fim, a quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo (BM-9) apresentou maior percentual em *B. coccolobifolia* (72,1%), seguido de 13,6% de abundância na espécie *B. intermedia*. Esta substância, isolada pela primeira vez no estudo químico do gênero, foi identificada por FIA-ESI-IT-MS/MS no estudo das folhas de diversas espécies do gênero *Byrsonima* (RODRIGUES, 2007).

4.4.3.2. Análise estatística dos dados obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS dos extratos de *Byrsonima* spp. e das substâncias isoladas BM- 1 a BM-9.

Os métodos estatísticos multivariados vêm sendo amplamente empregados em estudos metabolômicos, para extrair informações complementares a estudos fitoquímicos clássicos, que não conseguem demonstrar quando existe uma grande quantidade de variáveis estudadas (DE MOURA et al., 2006). Tais métodos estatísticos são aplicados, a fim de organizar os dados destas variáveis e reduzi-los a uma representação dimensional com visualização satisfatória (MARTI et al., 2014).

A Análise das componentes principais (PCA) é uma técnica baseada na combinação linear das variáveis originais, gerando um novo conjunto de variáveis ortogonais, denominadas de componentes principais, sendo que as primeiras componentes geradas, comumente, apresentam um valor significativo de toda a variância dos dados. A PCA é um método exploratório, pois contribui para elaboração de hipóteses a partir de dados coletados. Neste tipo de análise multivariada, determina-se o *peso* componente principal gerada sobre uma ou mais variáveis estudadas, sendo considerado significativo quando um *peso* apresenta valores superiores a 0,5 ou inferiores a -0,5. A matriz de dados ainda é decomposta pelos *escores* da correlação das componentes pelas amostras estudadas. O estudo conjunto de pesos e escores permite estimar a influência de cada componente nas variáveis analisadas ou em cada amostra estudada (MOITA NETO, MOITA, 1998).

Já agrupamento hierárquico (HCA) é uma análise multivariada que interliga as amostras, pelo conjunto de variáveis utilizadas, de acordo com suas associações, de modo que, quanto menor a distância entre os pontos, maior será a semelhança entre as amostras (TORRES, GARBELOTTI, MOITA NETO, 2006; DE MOURA et al., 2006).

4.4.3.2.1. Análise dos componentes principais (PCA)

Neste estudo, a PCA foi realizada sobre o conjunto de dados de massas em cada extrato, detectadas por UHPLC-ESI-TOF-MS, em uma matriz de dados com 30 amostras (seis espécies analisadas em triplicata) e 902 variáveis ou sinais m/z detectados, a fim correlacionar e/ou diferenciar as substâncias com as respectivas espécies (WILKS, 2011a; DE MOURA et al., 2006).

Foram geradas trinta componentes principais (CP), onde duas continham 70,9% da variância total dos dados. A análise de duas ou mais componentes fica condicionada à distribuição da variância dos dados. Neste caso, seguindo o princípio da parcimônia, seria suficiente analisar os dados de CP1 e CP2, contudo, como PCA é um estudo não supervisionado ou padronizado, fica a critério do analisador determinar o número de componentes principais (CP) que devem ser estudadas. Devido aos pesos apresentados nas componentes geradas, como mostrado na Tabela 12, tornou-se necessário analisar também a CP3, aumentando para 81,7% a variância dos dados e tornando mais significativo o estudo e os dados obtidos.

Vale ressaltar que a apresentação por parte de uma CP de maior influência sobre uma variável significa que sua correlação com tal variável é forte ou significativa, o que pode ser observado no gráfico de dispersão de pontos destas variáveis, quando os pontos tendem ao valor máximo de correlação, ou seja, quando variam de 1 a -1.

A primeira componente principal (56,3% da variância dos dados) influenciou positivamente e significativamente *B. verbascifolia* (Bv), *B. correifolia* (Bc), *B. intermedia* (Bi) e *B. ligustrofolia* (Bl), sendo que a primeira espécie apresentou maior peso para CP1. A segunda componente tem maior influência sobre *B. coccolobifolia* (Bcco), possuindo 14,6% da variação, enquanto que a CP3 apresentou como variável com maior peso a *B. fagifolia* (10, 8% da variação dos dados).

Os gráficos ortogonais obtidos (Figuras 60 e 61) mostraram a influência de cada CP nos dados obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS, quando rotulados por espécies ou pelos íons moleculares $[M - H]^-$ das substâncias presentes nos extratos. Três destas espécies, *B. correifolia*, *B. intermedia* e *B. ligustrifolia*, apresentam forte correlação entre si, independentemente da componente analisada, sendo pouco afetadas pelas componentes principais analisadas. Isso demonstra que as mesmas possuem características químicas semelhantes, refletindo o resultado obtido na Tabela 10.

Confrontando as outras três espécies, *B. coccolobifolia* (Bcco), *B. fagifolia* (Bf) e *B. verbascifolia* (Bv), observou-se que cada uma delas apresentou alta correlação com uma determinada componente principal. Isto pode ser interpretado pela diferenciação química entre estas espécies, ao compararmos a dispersão dos pontos referentes a elas (Figura 60), com a dispersão dos pontos referentes aos íons moleculares das substâncias presentes nos extratos (Figura 61).

Analisando-se CP2 no gráfico da Figura 60A e 60C, observou-se que esta componente apresenta alto valor de correlação com a espécie *B. coccolobifolia* (Bcco); enquanto que na Figura 60B, que não apresenta a CP2, os pontos referentes aos dados da espécie Bcco praticamente não se deslocam da origem. Comparando com a dispersão dos dados da matriz, ou seja, das massas dos íons moleculares das substâncias presentes nos extratos (Figuras 61A e 61C), o íon m/z 447, referente a $[M - H]^-$ identifica-se com a mesma dispersão da espécie *B. coccolobifolia* no gráfico anteriormente citado. Tal aspecto também é evidenciado pela Tabela 10, pelo cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS da Figura 111 e pelo gráfico dos percentuais de cada substância isolada (Figura 59), que demonstram a presença significativa da quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo nesta espécie.

De forma semelhante, analisando CP3, a dispersão dos pontos referentes aos fragmentos m/z 343, 647 e 799 (Figura 61B e 61C), já identificados como ácidos – mono, tri e tetra-*O*-galoilquínicos, respectivamente –, seguem dispersão dos pontos referentes à espécie *B. fagifolia* (Bf), nas Figuras 60B e 60C, revelando tratarem-se também de substâncias que contribuem diretamente para a diferenciação química da espécie.

A componente principal CP1 possui uma correlação com quatro das seis espécies estudadas e, por isso, apresenta um percentual de variância maior que as outras componentes. Todavia, a análise dos dados da Tabela 12 e dos gráficos das Figuras 60A e 60B revela que a CP1 apresenta pesos maiores para a espécie *B. verbascifolia*. Apesar do grande número de substâncias correlacionadas com a CP1, verificou-se que *B. verbascifolia*, no gráfico de dispersão das massas dos íons moleculares das substâncias presentes (Figura 61A e 61B), apresenta correlação com substâncias da classe de flavonóides, como a quercetina 3-*O*- β -D-arabinopiranosídeo, a quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo e a amentoflavona.

Tabela 12 – Média dos pesos das variáveis nas componentes após rotação varimax (de MOURA, 2006).

Componentes Principais (CP)	Espécies					
	BC	BCCO	BF	BI	BL	BV
CP1	0,87	0,64	0,48	0,83	0,79	0,69
CP2	-0,02	0,6	0,01	-0,16	0,2	-0,34
CP3	-0,17	-0,3	0,79	0,07	0,07	-0,51

Legenda: BC – *B. correifolia*; BCCO – *B. coccolobifolia*; BF – *B. fagifolia*;
BI – *B. intermedia*; BL – *B. ligustrifolia*; BV – *B. verbascifolia*

A fim de confirmar a correlação entre as espécies e as substâncias identificadas – descritas anteriormente –, a análise de componentes principais foi limitada para as substâncias isoladas e identificadas por UHPLC-ESI-TOF-MS, assim como, para as substâncias que apresentaram abundâncias relativas elevadas e/ou que se mostraram comuns as espécies (Tabela 11).

Foram geradas seis componentes principais relacionadas com cada substância. As duas primeiras componentes continham 60,9% da variância total dos dados, entretanto, para se estabelecer a correlação entre as substâncias isoladas e suas respectivas espécies, foi necessário avaliar as seis componentes. As três últimas componentes reunidas, todavia, apresentaram uma porcentagem de variância dos dados de 21,4%, impossibilitando, assim, o estabelecimento de uma relação confiável entre elas. Sendo assim, todas as componentes foram avaliadas em função da CP1 (40,1% da variância), conforme mostrado na Tabela 13 e Figura 62.

Figura 60 - Gráficos dos pesos das componentes principais referentes aos extratos das espécies estudadas: A – CP1 versus CP2; B - CP1 versus CP3; C – CP2 versus CP3.

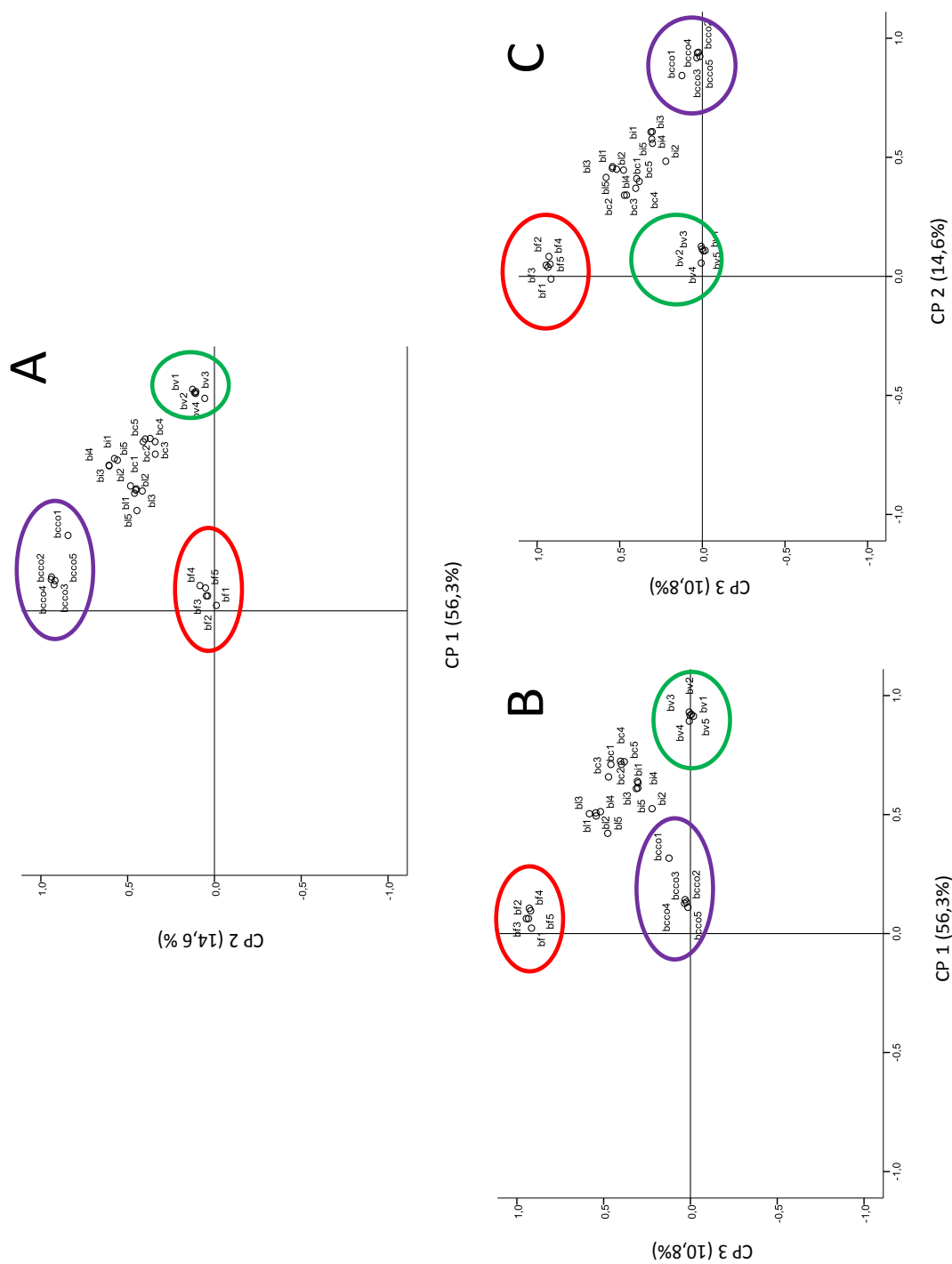


Figura 61 - Gráficos dos escores das componentes principais referentes às massas das substâncias presentes nos extratos das espécies estudadas: A – CP1 versus CP2; B - CP1 versus CP3; C – CP2 versus CP3.

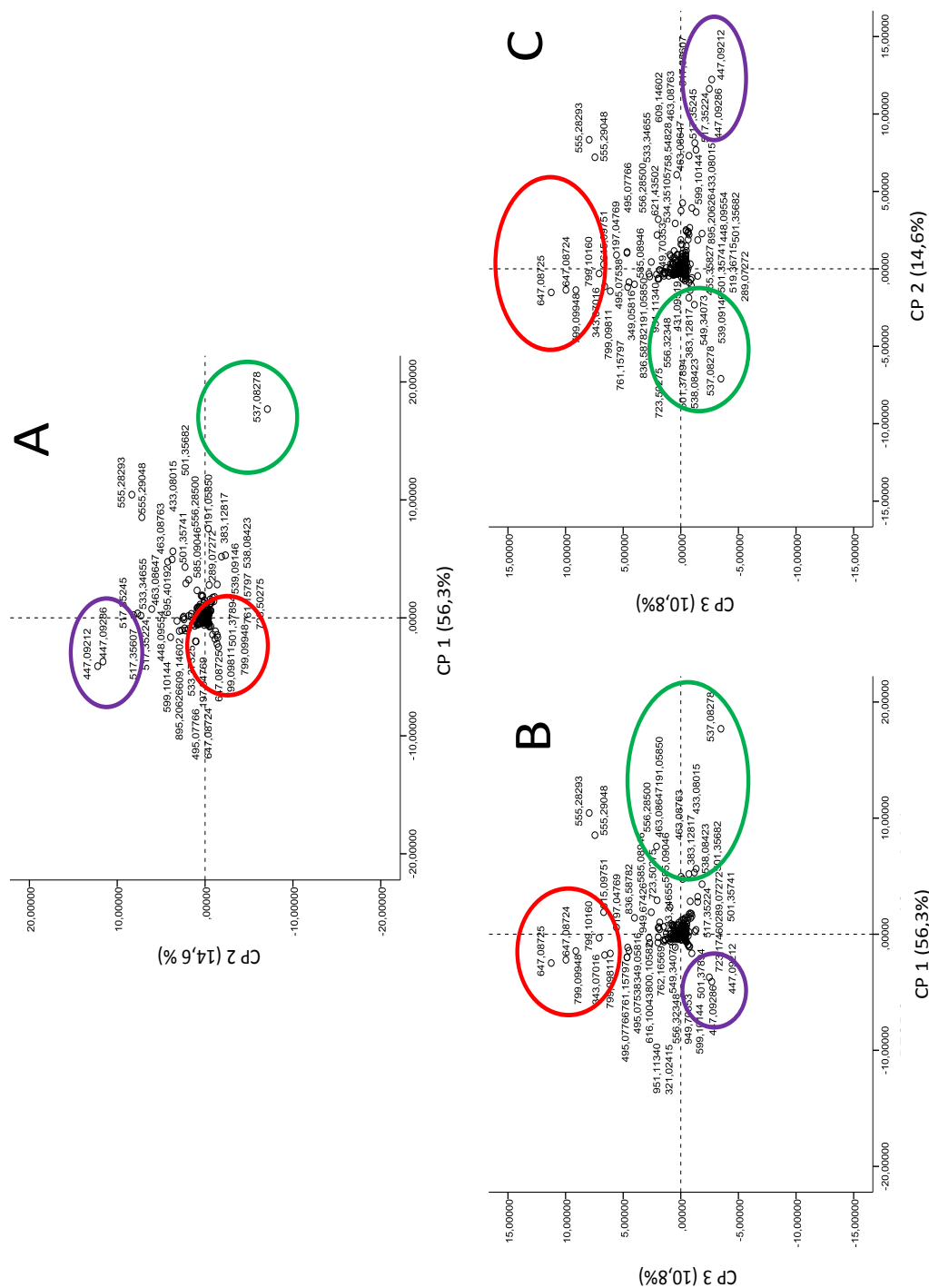


Tabela 13 – Pesos das variáveis nas componentes após rotação varimax (DE MOURA, 2006).

Substâncias	Componentes Principais (CP)					
	CP1	CP 2	CP 3	CP 4	CP 5	CP 6
BM1	0,968	0,010	-0,054	-0,156	0,093	-0,043
BM2	0,968	-0,040	-0,123	-0,174	-0,051	-0,081
BM3	-0,255	0,317	0,676	0,141	-0,053	0,555
BM4	0,841	-0,120	-0,079	0,292	0,366	-0,163
BM5	0,953	-0,090	-0,159	-0,189	-0,041	0,086
BM6	0,197	-0,101	-0,097	-0,248	0,903	-0,091
BM7	0,941	-0,047	-0,137	-0,218	-0,075	-0,124
BM8	-0,140	0,137	0,326	0,912	-0,045	0,011
BM9	-0,176	-0,196	-0,026	-0,003	-0,195	0,927
P1	0,209	0,873	-0,021	0,380	0,112	-0,128
P10	-0,207	0,934	0,113	0,095	-0,185	0,121
P17	-0,110	0,305	0,929	0,043	-0,008	0,070
P23	0,908	-0,204	0,162	0,064	0,231	-0,190
P33	-0,315	0,439	0,058	0,829	-0,030	0,076
P38	-0,018	-0,146	0,823	0,424	0,148	-0,220
P52	-0,246	0,902	0,231	0,012	-0,116	-0,187
P60	-0,061	-0,084	0,334	0,403	0,705	-0,208

Legenda: BM1- β -Glucogalina; BM2 - Ácido 5-O-galoil-quínico; BM3 - Ácido 4-O-galoil-quínico; BM4 - Ácido gálico; BM5 - Ácido 1,3-O-digaloil-quínico; BM6 - Ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico; BM7 - Ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico; BM8 - Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo; BM9 - Quercetina-3-O- α -L-ramninoipiranosídeo; P1 - Ácido quínico; P10 - Catequina; P17 - Proantocianidina B-2'-O-galato; P23 - Galato de etila; P33 - Quercetina 3-O- β -D-arabinopiranosídeo; P38 - Quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo); P52 - Amentoflavona; P60 - Tricallsiosídeo J.

A primeira componente principal influenciou significamente as substâncias BM-1 (β -glucogalina), BM-2 (ácido 5-O-galoil-quínico), BM-4 (ácido gálico), BM-5 (ácido 1,3-O-digaloil-quínico), BM-7 (ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico) e P23 (galato de etila), substâncias derivadas do ácido gálico (Figura 62), demonstrando existir uma forte correlação entre as substâncias.

A segunda componente principal (CP2) apresentou 20,8% das variância dos dados e com peso significativo nas substâncias P1 (ácido quínico), P10 (catequina) e P52 (amentoflavona).

Os gráficos mostrados nas Figuras 62A e 63A representam as duas componentes principais: o primeiro com os pesos da componente principal 1 *versus* a componente 2 e o segundo representando os escores das duas componentes, ambos com um total de 60,9% da variância total. A CP1 apresentou maiores escores com a espécie *B. fagifolia*, indicando, deste modo, que essa espécie apresenta maiores correlações com as substâncias derivadas do ácido gálico do que qualquer outra. Devido aos altos e positivos pesos dessa componente com estas substâncias e, simultaneamente, pesos negativos em outras componentes, não apresentando variações importantes nos demais gráficos ortogonais de escores (mesmo alterando as componentes no eixo das ordenadas), pode-se afirmar que as substâncias BM-1, BM-2, BM-4, BM-5 e BM-7

foram isoladas na espécie *B. fagifolia* e que o outro derivado, o galato de etila (P23), possui correlação mais relevante com esta espécie, mesmo estando presente em todas as outras; esta forte relação foi demonstrada pelo percentual relativo de 38,6% de P23, no gráfico da Figura 59.

A mesma afirmação pode ser feita para as substâncias com altos pesos na componente principal 2 (P1, P10 e P52), razão pela qual, o gráfico de escores da Figura 63A mostrou que esta componente e, por conseguinte, as substâncias, correlacionaram-se com a espécie *B. verbascifolia*, sendo que, para este estudo, nenhuma substância isolada, com exceção de BM-3 (ácido 4-O-galoil-quínico), adveio da espécie mencionada. O gráfico de percentuais da Figura 59 mostra que BM-3 está presente nesta espécie, com 25,6% de sua abundância relativa. Para a caracterização química das espécies por PCA, entretanto, a contribuição desta espécie para o isolamento do ácido 4-O-galoil-quínico não foi significativa, tornando, em decorrência, o ácido quínico, a catequina e a amentoflavona, as substâncias que melhor caracterizam a espécie.

A substância BM-3 (ácido 4-O-galoil-quínico) apresentou na Tabela 13 pesos significativos nas componentes CP3 e CP6. O gráfico dos pesos componentes principais CP3 *versus* CP6 (Figura 62F, com 18,7% da variância dos dados) mostrou que as duas componentes correlacionam-se de forma positiva e significativa, deixando BM-3 no centro do quadrante positivo entre as duas componentes, ou seja, as duas componentes compartilham significativamente BM-3. Além disso, cada componente apresentou pesos significativos para outras substâncias: P17 (proantocianidina B-2'-O-galato) e P38 (quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo) para CP3 e BM-9, ou quercetina-3-O- α -L-ramninopiranosídeo para CP6. Com isso, verificando os gráficos dos escores destas duas componentes (Figuras 63B, 63C e 63F), pôde-se correlacionar tais componentes com as espécies *B. correifolia* e *B. coccolobifolia*, sendo o ácido 4-O-galoil-quínico uma substância comum às duas espécies, mas tendo a proantocianidina B-2'-O-galato (P17) e a quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo) (P38) como as substâncias que melhor caracterizam a espécie *B. correifolia*.

Já a quercetina-3-O- α -L-ramninopiranosídeo (BM-9) foi à substância que diferenciou *B. coccolobifolia* das demais espécies, aspecto já observado na análise de UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS (Tabela 10), bem como na Figura 59, onde esta substância apresenta 72% de abundância relativa na espécie em questão.

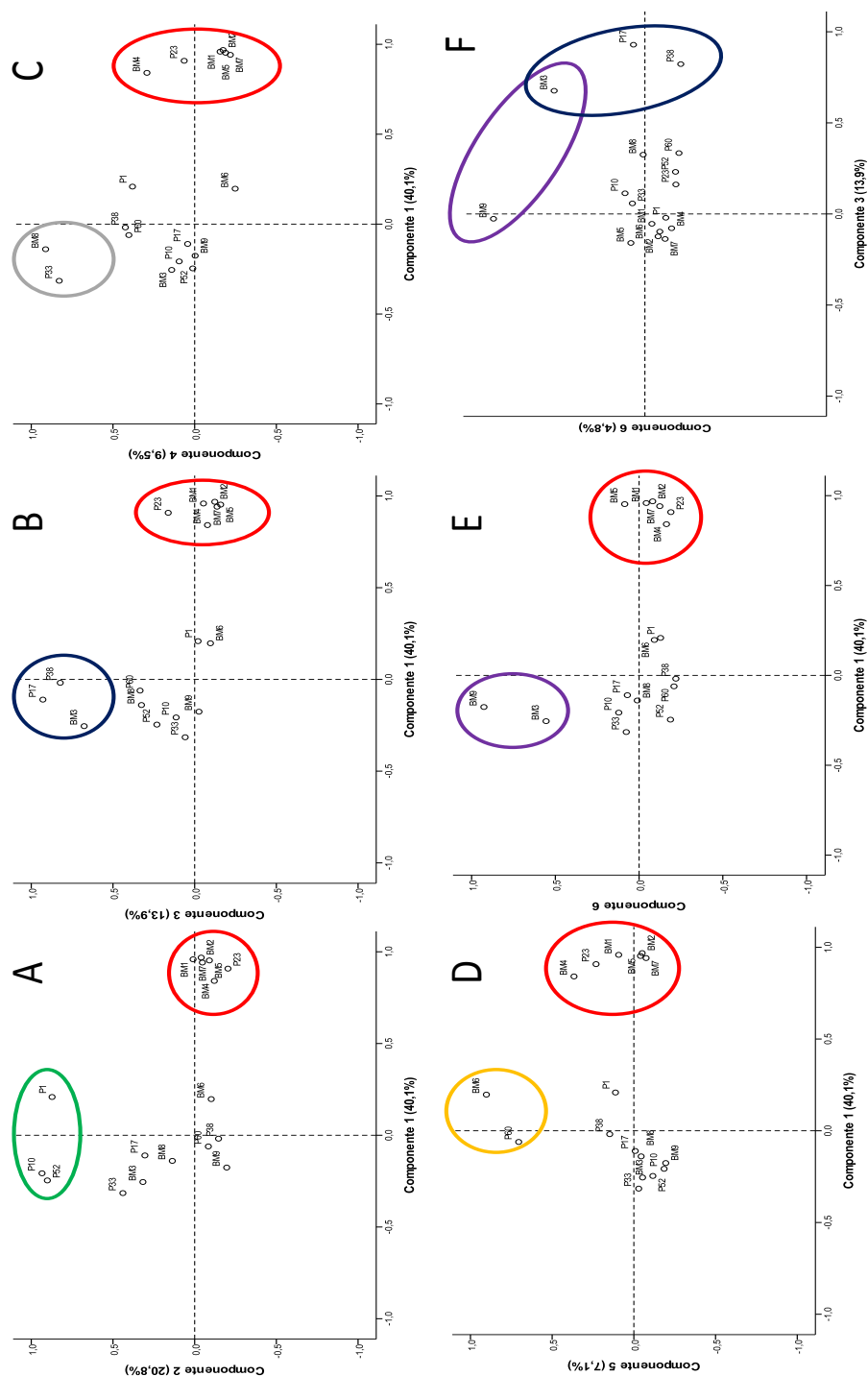
A quarta componente principal (9,5% de variância) refere-se a seus pesos sobre as substâncias BM-8 (Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo) e P33 (Quercetina

3-O- β -D-arabinopiranosídeo), ambas flavonoides O-glicosilados, justificando o porquê do CP4 se correlacionar de forma significativa com tais substâncias (Figura 62C). O gráfico de escores da componente principal 1 *versus* componente principal 4, com 49,6% da variância (Figura 63C), se mostrou satisfatório para interpretar essa componente e, como consequência, correlacionar as substâncias com a espécie *B. intermedia*. A literatura científica válida esse dado, uma vez que Sannomiya (2007a) confirma que o extrato metanólico dessa espécie apresenta essas duas substâncias como responsáveis por 58% do teor total de flavonoides do extrato. O gráfico da Figura 59 também caracteriza *B. intermedia* como a espécie que apresenta os maiores teores de quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo e quercetina 3-O- β -D-arabinopiranosídeo, 34,5% e 32%, respectivamente.

A razão de CP4 apresentar altos pesos nas substâncias BM-8 e P33 foi devido ao fato de duas substâncias pertencerem à mesma classe. Há de se mencionar, todavia, que BM-9, apesar de ser da mesma classe, não apresentou correlação com CP4, diferença, justificada pela premissa de que BM-9 ou quercetina-3-O- α -L-ramnino- β -D-galactopiranosídeo ser uma característica química da espécie *B. coccolobifolia*. Tal assertiva tem em mente o estudo desenvolvido por Rodrigues (2007), que, ao caracterizar as infusões de folhas de várias espécies de *Byrsonima* por FIA-ESI-IT-MS/MS, encontrou essa substância apenas em *B. coccolobifolia*. Além disso, ficou constatado, no gráfico da Figura 59, que BM-9 está presente em *B. coccolobifolia* com abundância relativa de 93%, percentual elevado, que não foi apresentado por nenhuma substância isolada.

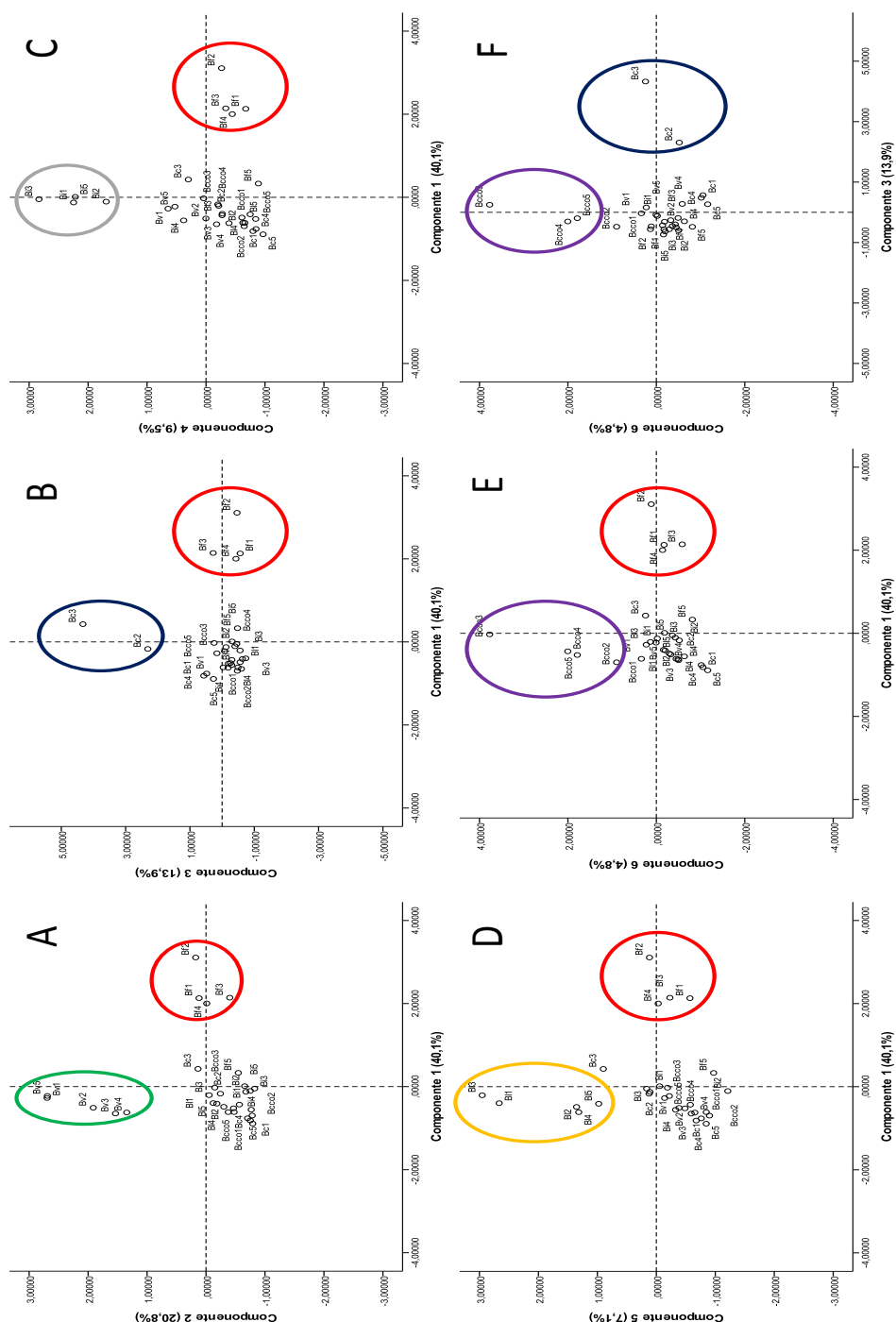
A quinta componente (CP5) apresentou uma variância de 7,1% e, mesmo com baixa porcentagem de variância dos dados, possuiu pesos significativos para duas substâncias, BM-6 (ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico) e P60 (tricalisiosídeo J). Avaliando as correlações entre os escores obtidos para CP5 *versus* CP1, verificou-se que a espécie *B. ligustrifolia* apresenta forte correlação com as substâncias BM-6 e P60. O gráfico de percentuais relativos à abundância (Figura 59) destas substâncias mostrou que 63,8% de BM-6 encontra-se na espécie *B. ligustrifolia*, enquanto que P60 está distribuída nesta espécie com 23,4% e em outras duas espécies (*B. correifolia* e *B. intermedia*) com 20,5 e 21,3%, respectivamente. Como essas duas outras espécies correlacionaram-se com outras duas componentes (CP4 e CP6) e consequentemente apresentaram maiores escores para outras substâncias, a CP5 correlacionou-se mais com o tricalisiosídeo J(P60).

Figura 62 – Gráficos dos pesos das componentes principais referentes às substâncias da Tabela 10: A – CP1 versus CP2; B – CP1 versus CP3; C – CP1 versus CP4; D – CP1 versus CP5; E – CP1 versus CP6; F – CP3 versus CP6.



Legenda: BM1- β -Glucogalina; BM2 - Ácido 5-O-galoil-quínico; BM3 - Ácido 4-O-galoil-quínico; BM4 - Ácido gálico; BM5 - Ácido 1,3-O-digaloil-quínico; BM6 - Ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico; BM7 - Ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico; BM8 - Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo; BM9 - Quercetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo; P1 - Ácido quínico; P10 - Catequina; P17 - Proantocianidina B-2'-O-galato; P23 - Galato de etila; P33 - Quercetina 3-O- β -D-arabinopiranosídeo; P38 - Quercetina-3-O-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo); P52 - Amentoflavona; P60 - Tricálicisídeo J; bc - *B.cocclobifolia*; bcco - *B. cocclobifolia*; bf - *B. fagifolia*; bi - *B. intermedia*; bl - *B. ligustrifolia*; bv - *B. verbascifolia*.

Figura 63 – Gráficos dos escores das componentes principais referentes às substâncias da Tabela 10: A – CP1 versus CP2; B - CP1 versus CP3; C - CP1 versus CP4; D - CP1 versus CP5; E - CP1 versus CP6; F – CP3 versus CP6.



Legenda: bc – *B. correifolia*; bco – *B. coccolobifolia*; bf – *B. fagifolia*; bi – *B. ligustrifolia*; bv – *B. verbascifolia*.

4.4.3.2.2. Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)

O HCA pode ser representado na forma de dendrograma ou como um conjunto de diagramas de similaridade entre pares. As variáveis aqui utilizadas foram às mesmas empregadas anteriormente na caracterização da análise de componentes principais, através dos extratos estudados e das massas das substâncias presentes em cada extrato, por sua vez, detectadas por UHPLC-ESI-TOF-MS. Para a construção do dendrograma, foi necessário realizar o agrupamento Z das amostras, o que significa padronizar os dados obtidos pelo erro padrão da média. Utilizou-se como medida de similaridade a distância euclidiana quadrada, e o Método de Ward para a delimitação dos grupos (TORRES, GARBELOTTI, MOITA NETO, 2006).

O Método de Ward é mais um método estatístico usado para gerar o agrupamento dos dados, consistindo, em síntese, no agrupamento de dois ou mais grupos de dados pelo mínimo da soma do quadrado das distâncias de dois pontos, em função da média de cada grupo gerado pela matriz, minimizando, assim, erros no agrupamento. (WILKS, 2011b, MARTI et al., 2014; MEHL et al., 2014). Nesta pesquisa ora apresentada, os agrupamentos foram categorizados em quatro grupos (G1, G2, G3 e G4). Na análise de componentes principais dos seis extratos, ficou evidente a diferenciação entre as espécies estudadas.

Os grupos que mostraram maiores distâncias entre si, ou seja, com menor similaridade na análise hierárquica dos dados da matriz foram G1 e G4, onde G1 agrupou os dados ou as massas das substâncias presentes nos extratos em função da espécie *B. coccolobifolia*, e o outro grupo, G4, agrupando as substâncias pela espécie *B. fagifolia*. Em contrapartida, o grupo G3 apresentou um agrupamento de três espécies, *B. correifolia*, *B. intermedia* e *B. ligustrifolia*, que se mostram similaridades. Finalmente, o G2 mostrou uma distância intermediária próxima de G1 (Figura 64).

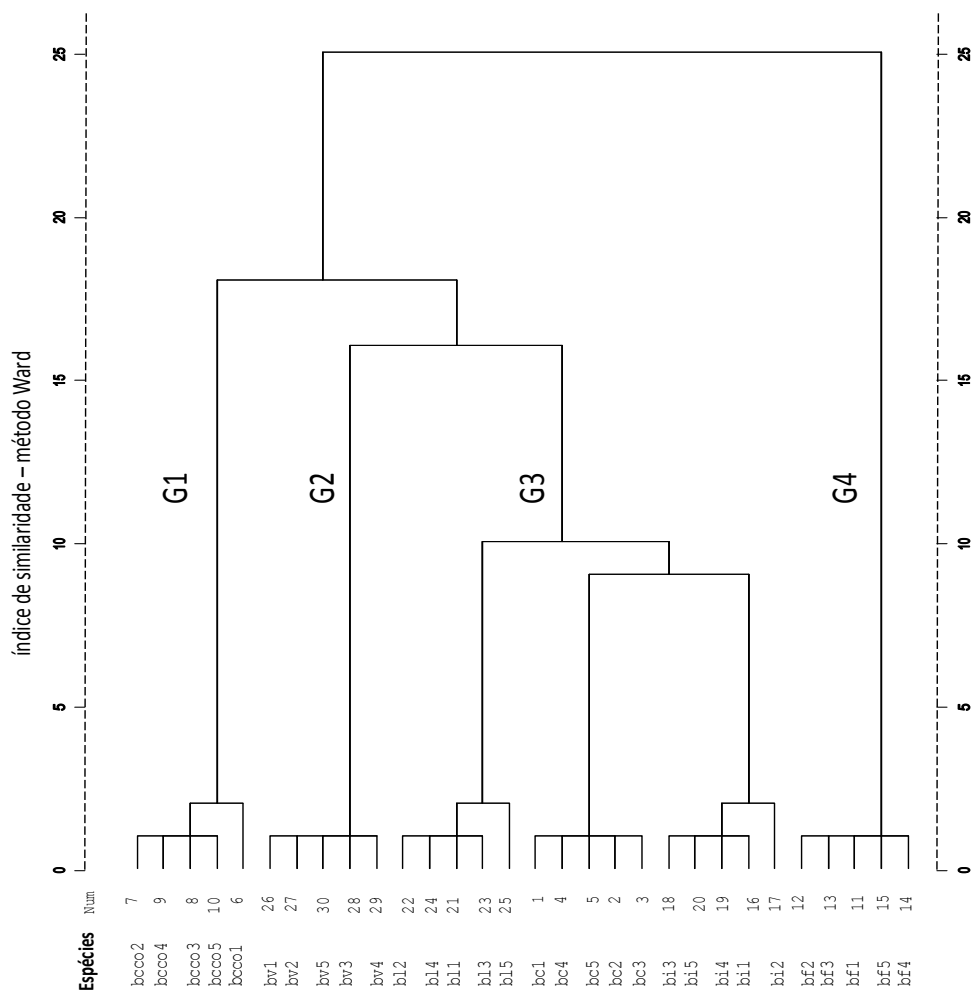
Explicar esses agrupamentos é explicar a similaridade química entre os grupos, o que reflete nas similaridades entre as espécies. Utilizando como parâmetros a análise de componentes principais do item 4.4.2.2.1 e os dados obtidos por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS (Tabela 10), observa-se que todas as componentes principais se relacionavam a uma determinada espécie, o que pode ser notado nos gráficos da Figura 60, em que se tem *B. correifolia*, *B. intermedia* e *B. ligustrifolia* estão sempre agrupadas, independentemente da componente principal analisada. Esta observação é comprovada pela presença nas espécies de moléculas como ácido quínico, ácido-O-

galoil-quínico, galato de etila, uma série de flavonoides todos derivados da quercetina (picos 31, 33, 38 e 47, da Tabela 10), e terpenos (picos de 57 a 60, da mesma tabela).

No outro extremo, tem-se o grupamento referente a *B. fagifolia*. Este grupo se distingue dos demais pela variada constituição química de derivados do ácido gálico, particularmente dos ácidos galoil-quínicos (picos 2 a 21, com presença confirmada na Tabela 10), o que não foi apresentado por nenhuma outra espécie.

Os dois últimos grupos, G1 e G2, referentes às espécies *B. coccolobifolia* e *B. verbascifolia*, se assemelham em função da presença de substâncias derivadas da catequina (picos 8, 10, 16 e 22) e flavonoides derivados da quercetina, como quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo, quercetina 3-*O*- β -D-arabinopiranosídeo, quercetina 3-(2"-galoil- α -arabinopiranosídeo), quercetina-3-*O*- α -(*O*-galoil)-ramnopiranosídeo e diterpeno Tricalisiosídeo J. Apesar disso, a *B. coccolobifolia* se diferencia pela presença quase exclusiva da quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e pelos derivados galoil-quínicos, como os ácidos mono, di e trigaloil-quínico, inexistentes na espécie *B. verbascifolia*. Esta também é uma razão para que esta espécie se diferencie das demais, bem como, para a forte correlação da última espécie com a substância amentoflavona, como demonstrado no PCA e no gráfico da abundância relativa das substâncias (Figura 59).

Figura 64 - Dendograma da análise por agrupamento hierárquico dos valores de massas obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS, das seis espécies do gênero *Byrsonima*.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos das espécies de *Byrsonima*, (*B. correifolia*, *B. coccolobifolia*, *B. fagifolia*, *B. intermedia*, *B. ligustrifolia* e *B. verbascifolia*) possibilitou o isolamento de nove substâncias: β -Glucogalina (**BM-1**), ácido-5-*O*-galoilquínico (**BM-2**), ácido-4-*O*-galoilquínico (**BM-3**), ácido gálico (**BM-4**), ácido 1,3-*O*-digaloil-quínico (**BM-5**), ácido 3,4,5-*O*-trigaloil-quínico (**BM-6**), ácido 1,3,4,5-*O*-tetragaloilquínico (**BM-7**), quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo (**BM-8**) e quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo, (**BM-9**).

As substâncias **BM-1**- **BM-5** e **BM-9** foram isoladas pela primeira vez nas espécies de *Byrsonima* estudadas.

A técnica UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS, permitiu sugerir a presença de 69 substâncias das quais 41 foram identificadas utilizando o método de dereplicação. Com isso, foi possível indicar pela primeira vez a presença de substâncias nitrogenadas no gênero *Byrsonima*, além de possibilitar a identificação de oito novas substâncias: ácido 3-(3, 4- diidroxifenil)-lactil-2-*O*-quínico (P22), a apigenina-8-*C*-glucosídeo (P18); a apigenina-6-*C*-glucosídeo (P25), apigenina-7-*O*-glucosídeo (P28), diidromaentoflavona (P55) e tricalisiosídeo J (P60).

Além disso, com os dados de massas obtidos por UHPLC-ESI-TOF-MS foi possível determinar a abundância relativa das substâncias isoladas e identificadas em cada extrato, demonstrando que, no extrato hidroalcoólico das folhas de *B. correifolia*, a proantocianidia B-2'-*O*-galato foi ;à substância com maior percentual relativo. Em *B. coccolobifolia* destacou-se pela presença da quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo, enquanto que *B. fagifolia* mostrou-se rica em substâncias derivadas do ácido gálico (ácidos galoil-quínicos e galato de etila). A espécie *B. intermedia* apresentou as substâncias derivadas da quercetina (quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo e a quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo) como majoritárias. Já em *B. ligustrifolia* o ácido 1,3,4,5-*O*-tetragaloilquínico e o tricalisiosídeo J mostram-se predominantes enquanto que a catequina e amentoflavona foram majoritárias em *B. verbascifolia*.

Através de análise estatística multivariada de componentes principais, foi possível estabelecer a relação química entre as espécies estudadas, mostrando existir uma diferença entre as espécies *B. fagifolia*, *B. verbascifolia* e *B. coccolobifolia*. Pela análise de componentes principais, *B. fagifolia* tem como identidade química os ácidos

galoil-quínicos (ácido-5-*O*-galoilquínico, ácido 1,3-*O*-digaloil-quínico, ácido 1,3,4,5-*O*-tetragaloilquínico) além dos compostos fenólicos (glugogalina, ácido gálico e galato de etila). Em *B. coccolobifolia* apresentou como característica química a substância quercetina-3-*O*-ramnopiranosídeo e *B. verbascifolia* as substâncias ácido quínico, catequina e amentoflavona, estando as demais espécies estão relacionadas a substâncias derivadas da quercetina, como a quercetina-3-*O*-galactopiranosídeo e a quercetina -3-*O*- α -arabinopiranosídeo (para *B.intermedia*) e o ácido 3,4,5-trigaloil-*O*-quínico e o tricalisiosídeo J (para *B. ligustrifolia*). A análise de agrupamento hierárquico refletiu os resultados da análise de componentes principais, mostrando *B. fagifolia* como a mais distinta entre as espécies estudadas, e um segundo grupo de espécies similares, tendo *B.coccolobifolia*, como a mais distinta desse grupo, seguida de *B.verbascifolia*, estando as demais espécies agrupadas entre si.

Análise multivariada se mostrou um método estatístico importante para verificar semelhanças e diferenças entre espécies de *Byrsonima* e definir a identidade química de cada espécie.

Referências

- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2388-2392, 2005.
- ALEXANDRINO, V. H. D., DE SOUSA, J. S., BASTOS, M. N. C. Estudo taxonômico da família Malpighiaceae Juss. das restingas de Algodoal/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paranaense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 6, n. 3, p. 335-347, 2011.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127-142, 2005.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Taron: FL CRC PRESS, 2006.
- ANDERSON, W. R. **Malpighiaceae**. The botany of the Guayana Highland. Memoirs of The New York Botanical Garden, part. XI, cap. 32, p. 21-305, 1981. Disponível em: <<http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh/MALPpdf/NYM32-Byr.pdf>> . Acesso em: 01 abr. 2014.
- ANDERSON, W. R. **Malpighiaceae**. In: BERRY, P. E., YATSKIEVYCH, B. K., HOLST, B. K. (Ed.). Flora of the Venezuelan Guayana, New York, 2001. vol. 6, p. 82 – 185. Disponível em: <<http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh/MALPpdf/FVG2001.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2014.
- ARAÚJO, R. R. **Fenologia e morfologia de plantas e biometria de frutos e sementes de muricizeiro (*Byrsonima verbascifolia* L. Dc.) do Tabuleiro Costeiro de Alagoas**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.
- BADKE, M. R. et al. Popular knowledge and practices regarding healthcare using medicinal plants. **Text & Context Nursing**, v. 21, n.2, p. 363 – 370, 2012.
- BATALHA M.A., ARAGAKI, S., MANTOVANI W. Chave de identificação das espécies vasculares do cerrado em Emas (Pirassununga, SP) baseada em caracteres vegetativos. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 85-108, 1998.
- BEJAR, E. et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 33, n. 1, p. 25-32, 1995.
- BOCHNER, R. et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializados no mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 537 – 547, 2012.
- BOUDAH, S., PARIS, A., JUNOT, C. Chapter Four - Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry-Based Metabolomics and the Concept of Biomarker. **Advances in Botanical Research**, v. 67, p. 159-218, 2013.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 92 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Decreto nº. 5.813 de 22 de junho de 2006. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/decreto_5813_fito.pdf>. Acesso de 12 nov. 2009.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010a. 546 p.

BRASIL. – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº. 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos, 2010b.

BRITO, A.R.M.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Editora Unicamp, v.1, p. 15–31, 1994.

CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, n. 3, p. 207 – 213, 1993.

CAO, S. et al. Antiplasmodial activity of compounds from *Sloanea rhodantha* (Baker) Capuron var. *rhodantha* from the Madagascar rain forest. **Planta Medica**, v. 72, n. 15, p. 1438-1440, 2006.

CARDOSO, et al. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 55-63, 2006.

CECÍLIO, A. B. et al., Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 975–981, 2012.

CHOUHDHARY, N., SEKHON, B. S. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 2, n. 2, December, p. 55 – 70, 2011.

COELHO, C. F., BURINI, R. C. Atividade física para a prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis e da incapacidade funcional. **Revista de Nutrição**, v.26, n.6, p. 937-946, 2009.

COLLINS, R. A. et al. Removal of Polyphenolic compounds from aqueous plant extract using polyamide minicolumns. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 45, n. 4, 1998.

COSTA, K. C. S. et al. Medicinal plants with teratogenic potencial: current considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n.3, jul./ set., 2012.

CUYCKENS, F., CLAEYS, M. Mass Spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DAVIS, C. C., ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 12, p. 2031 – 2048, 2010.

DE MOURA, M. C. S. et al. Estudo Multivariado de solos urbanos da cidade de Teresina. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 429 – 435, 2006.

DELCLAMBRE, A., SAUCIER, C. Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UPLC-ESI-Q-TOF in grape and wine. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 727-736, 2012.

FARAG, M. A., PORZEL, A., WESSJOHANN, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC–MS, LC–MS and 1D NMR techniques. **Phytochemistry**, v. 76, p. 60 – 72, 2012.

FUNARI, C. S. et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167- 178, 2010.

GIKA, H. G. et al. Current Practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 12 – 25, 2014.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOHARI, A. R. et al. Isolation of a new quinic acid derivative and its antibacterial modulating activity. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18. n. 1, p. 69 – 73, 2010.

GONÇALVES, C. A. et al. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 843–850, 2013.

GONÇALVES-ESTEVEZ, V., SOARES JUNIOR, E. F., FERREIRA, C. B. Palinologia de espécies de Malpighiaceae Juss. ocorrentes nas restingas do Estado do Rio de Janeiro. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 519-529, 2007

GOODARZI, M., RUSSELL, P. J., HEYDEN, Y. V. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 803, p. 16 – 28, 2013.

GOUVEIA, S., CASTILHO, P. C. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconium* by RP-HPLC-DAD-(-)-ESI-MSn method. **Food Chemistry**, v. 129, p. 333-344, 2011.

GRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural Products: A continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670 – 3695, 2013

GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T.-T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns

packed with small particle. Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 66, p. 475-482, 2007

GUILLARME, D., SCHAPPLER, J., RUDAZ, VEUTHEY, J.L. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v.29, n.1, p. 15 – 27, 2010

GUILLHON-SIMPLICIO, F., PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (MALPIGHIACEAE). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032 – 1041, 2011.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1994. 676 p.

HE, D. et al. Tricalysiosides H – O: Ent-kaurene glucosides from leaves of *Tricalysia dubia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2857 – 2864, 2005.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, A., N. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 63-80, 1992.

HEINRICH, M. et al. Medical plants in Mexico: healers consensus and cultural importance. **Social Science and Medicine**, v. 47, p. 1863 – 1875, 1998.

HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, n. 14, p. 1255-1261, 2001.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. 335 p.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 146-160, 2008.

HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN, M., MARSTON, A. Preparative **Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation**. 2 ed. Springer. 1997. 244 p.

IBGE, 2009 – Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/default.shtm>.

INES, S. et al. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of 3,5-O-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H₂O₂. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 333-341, 2011.

IOSET, K. N. et al. Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by ¹H NMR spectroscopy. **Phytochemical Analysis**, v. 22, p.158-165, 2011.

JAISWAL, R., JAYASINGHE, L., KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by Tadem LC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 502-515, 2012.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, CA: Freeman, 1962.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill, 1940.

JOHANSEN, K. T. et al. Alkaloid analysis by high-performance liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance: New strategies going beyond the standard. **Journal of Chromatography A**, v 1270, p. 171-177, 2012.

KAMNG'ONA, A. et al. Inhibition of HIV-1 and M-MLV reverse transcriptases by a major polyphenol (3,4,5 tri-O galloylquinic acid) present in the leaves of the South African resurrection plant, *Myrothamnus flabellifolia*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, n.6, p.843-853, 2011.

KASHIWADA, Y. Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 8, p. 1033-1043, 1992.

LEONTI, M. et al. Ethnopharmacology of the Popolucan, Mexico: an evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1653-1669, 2001.

LIRA, W. M. et al. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LOPEZ, A., HUDSON, J. B., TOWERS, G. H. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2-3, p. 189-196, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008.544 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da Cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology** v. 122, p. 430 – 433, 2009.

MALDINI, M., MONTORO, P., PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2011.

MALTA, L. G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, p. 417–425, 2013.

- MALTA, L. G. et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, p. 604–611, 2012.
- MARIUTTI, L. R. B., RODRIGUES, E., MERCADANTE, A. Z. Carotenoids from *Byrsonima crassifolia*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxyl radicals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p. 155-160, 2013.
- MARTI, G. et al. Comprehensive profiling and marker identification in non-volatile citrus oil residues by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. **Food Chemistry**, v. 150, p. 235 – 245, 2014.
- MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 79–82, 1999.
- MEDANHA, D. M. et al. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 69 – 77, 2010.
- MEHL, F. et al. Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach. **Food Chemistry**, v. 143, p. 325 – 335, 2014.
- MELO, J.G et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p.27-36, 2007.
- MICHELIN, D. C. et al. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (supl.), p. 690-695, 2008.
- MINAMI, et al. Isolation and identification of histamine-release inhibitors from *Pistacia weinmannifolia* J. Pisson ex. Franch. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p. 138-140, 2006.
- MIRANDA, M. L. D. et al., Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (Leguminosae). **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1306-1311, 2012.
- MOITA NETO, J. M., MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467 - 469, 1998.
- MOORE, J.P. et al. The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. **Biochemical Journal**, v. 385, p. 301-308, 2005.
- MORALES, C. C. et al. Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 223-228, 2001.

MOTILVA, M. J., SERRA, A., MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 66 – 82, 2013.

MOULS, L., FULCRAND, H., UPLC-ESI-MS study of oxidation markers released from tannin depolymerization: toward a better characterization of the tannin evolution over food and beverage processing. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 1450-1457, 2012.

OLIVEIRA, F. C. S., BARROS, R. F. M., MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 282 - 301, 2010.

OLIVEIRA, S. G. D. et al., An ethnomedicinal survey on phytherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified, Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 428 – 437, 2012.

ORLANDIA, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1469 – 1476, 2011.

PANIZ, V. M. V et al. Acesso a medicamentos de uso contínuo em adultos e idosos nas regiões Sul e Nordeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública [online]**, v. 24, n. 2, p. 267-280, 2008.

PARKER, W.B. et al. Characterization of novel inhibitor of human DNA polymerases: 3,4,5-tri-O-galloylquinic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 21, p. 3759-3765, 1989.

PATEL, K. N. et al. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. **Pharmaceutical Methods**, v. 2, n. 1, 2010.

PEIXOTO, A. M. **Enciclopédia agrícola brasileira**. São Paulo: Ed. USP, 2002. v. 4.

PERAZA-SÁNCHEZ, S.R. et al. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v. 78, p. 315–318, 2007.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M. et al. Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antiglycation Effects of *Byrsonima crassifolia* Fruit and Seed in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 350-357, 2010.

POMPEU, D. R. et al. Antioxidant capacity and pharmacologic screening of crude extracts of *Byrsonima crassifolia* and *Inga edulis* leaves. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 1, p. 165-172, 2012.

PRASAIN, J. K. et al. Profiling and Quantification of Isoflavonoids in Kudzu Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and food chemistry**, V. 51, p. 4213-4218, 2003.

PRISTA, L.N. **Tecnologia farmacêutica**. v. I e II, 5º ed. 1995.

PUPPALA, M.E. et al. β -glucogallin: A novel aldose reductase inhibitor from *E. officinalis* used in traditional ayurveda to treat diabetes. **Planta Medica**, v. 78, PI181. 2012.

QUEIROZ, F., HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J.-L. **Modern Approaches in the Search for New Active Compounds from Crude Extracts of Natural Sources**. In: CECHINEL-FILHO, V. (Ed.) *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*, Hoboken:Wiley, 2012, cap. 2, p. 43-80.

REGASINI, L. O. **Estudo químico de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcalóides guanidínicos e análogos**. 2008, 232 f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

RIBEIRO, A. B. et al. Antioxidant capacity, total phenolic content, fatty acids and correlation by principal component analysis of exotic and native fruits from Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 797-804, 2013.

RINALDO, D. et al. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, 2010.

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

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos**. 2011, 140 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

ROMANI, A. et al. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. **Phytochemical Analysis**, v. 13 p. 79 – 86, 2002.

ROQUE, A. A., ROCHA, R. M., LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Lagoinhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n.º1, p. 31 – 42, 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. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005a.

SANNOMIYA, M. et al. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Journal of Basic Application and Applied Pharmaceutical Science**, v. 26, n. 1, p. 71-75, 2005b.

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, 2005c.

SANNOMIYA, M. et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling of compounds from the infusion of *Byrsonima fagifolia* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1393-1400, 2007a.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 319 - 326, 2007b.

SANTOS, R. C. et al. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 203-212, 2012.

SHAIK, N. M. et al. Functional characterization, homology modeling and docking studies of β -glucosidase responsible for bioactivation of cyanogenic hydroxynitrile glucosides from *Leucaena leucocephala* (subabul). **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1351-1363, 2013.

SILVA, E. M. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012 – 1018, 2007.

SILVA, M. A. et al. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 610 – 615, 2012.

SIMMLER, C. et al. G. F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 51 – 59, 2014.

SOUZA, F. et al. Isolation of Arginase Inhibitors from the Bioactivity-Guided fractionation of *Byrsonima coccolobifolia* leaves and stems. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 2, p. 392-396, 2014.

SOUZA-MOREIRA, T. M., SALGADO, H. R. N., PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435 – 440, 2010.

STRINGANO, E. et al. Simple solution for a complex problem: Proanthocyanidins, galloyl glucoses and ellagitannins fit on a single calibration curve in high performance-gel permeation chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7804 – 7812, 2011.

TAKASHI, H. C. *Byrsonima* spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

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.

TAVEIRA, M. et al. Fast determination of bioactive compounds from *Lycopersicon esculentum* Mill. Leaves. **Food Chemistry**, v. 135, p. 748 – 755, 2012.

TORRES, E. A. F. S., GARBELOTTI, M. L., MOITA NETO, J. M. The application of hierarchical clusters analysis to the study of the composition of foods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 622 – 629, 2006.

VIEGAS JÚNIOR., C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n.º. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, F. S. Gastos do Mistério da Saúde com medicamentos: tendência dos programas de 2002 a 2007. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 4, p. 674-681, 2009.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: Springer, 1996.

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, n.1, p. 155-121, 2000.

WARIDEL, P. et al. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoids isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29 – 41, 2001.

WILKS, D. S. Chapter 12 – Principal Component (EOF) Analysis. **Statistical Methods in the International Geophysics**, v. 100, p. 519 - 562, 2011a

WILKS, D. S. Chapter 15 – Cluster Analysis. **Statistical Methods in the International Geophysics**, v. 100, p. 603-676, 2011b.

WOLFENDER, J.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p. 1808-1832, 2010.

XU, C. et al., Infrared macro-fingerprint analysis-through-separation for holographic chemical characterization of herbal medicine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 298 – 307, 2013.

ZHANG, L. et al.. Comparison of the Chemical Constituents of Aged Pu-erh Tea, Ripened Pu-erh Tea, and other teas using HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 59, p. 8754 – 8760, 2011.

ZHOU, H. et al., Characterization of phenolics of *Sarcandra glabra* by non-targeted high-performance liquid chromatography fingerprinting and following targeted electrospray ionisation tandem mass spectrometry/time-of-flight mass spectrometry analyses. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2390 – 2398, 2013.

ANEXO A

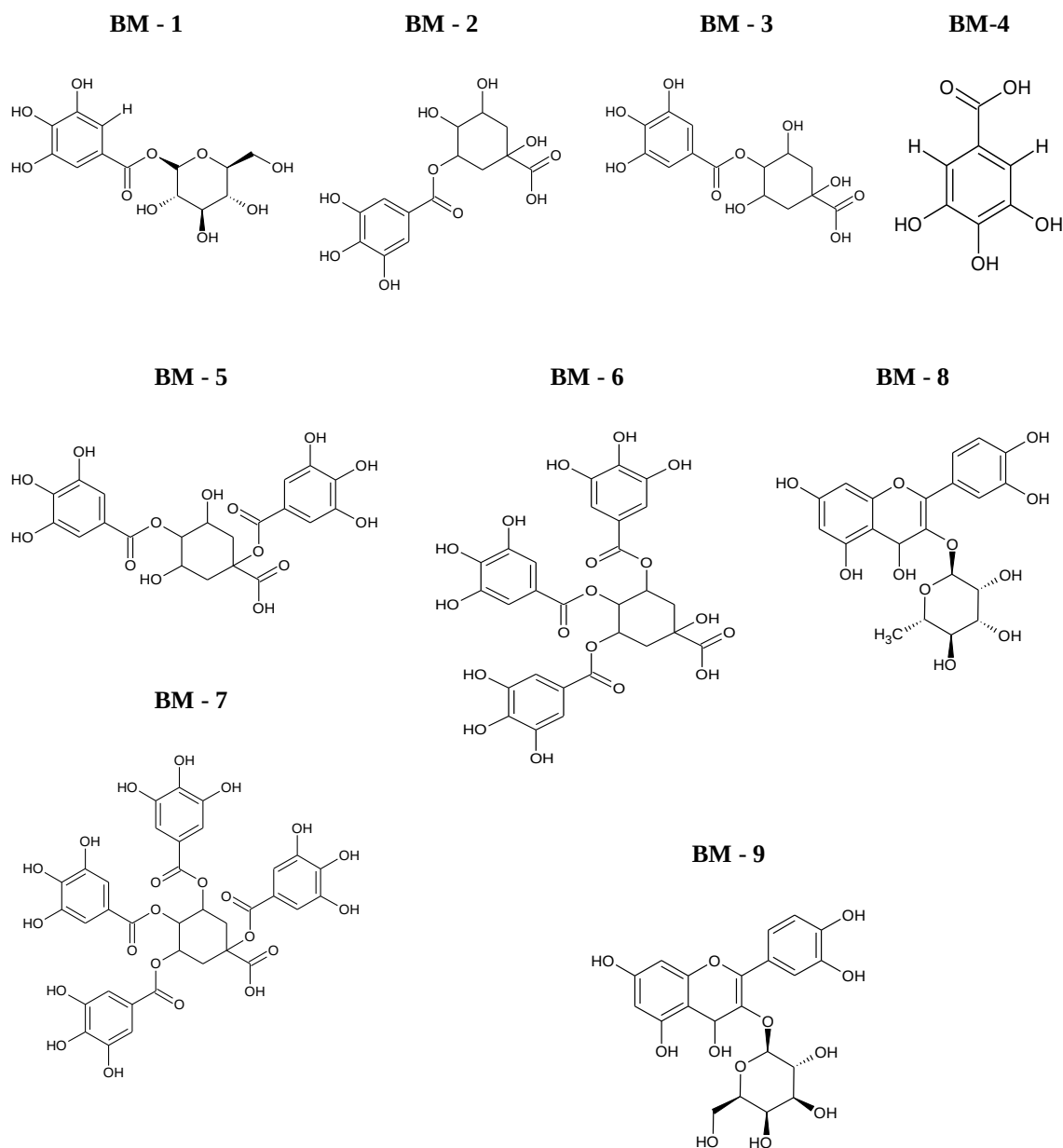


Tabela 14 - Substâncias isoladas.

Subs.	Nome da substância
BM-1	β -glucogalina
BM-2	ácido 5-O-galoil-quínico
BM-3	ácido 4-O-galoil-quínico
BM-4	ácido gálico
BM-5	ácido 1,3-O-digaloil-quínico
BM-6	ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico
BM-7	ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico
BM-8	quercetina-3-O-galactopiranosídeo
BM-9	quercetina-3-O-ramnopiranosídeo

Figura 66 - Substâncias identificadas por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS ou UHPLC-ESI-TOF-MS nos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies de *Byrsonima* estudadas, utilizadas nas análises estatísticas multivariadas, conforme a Tabela 10.

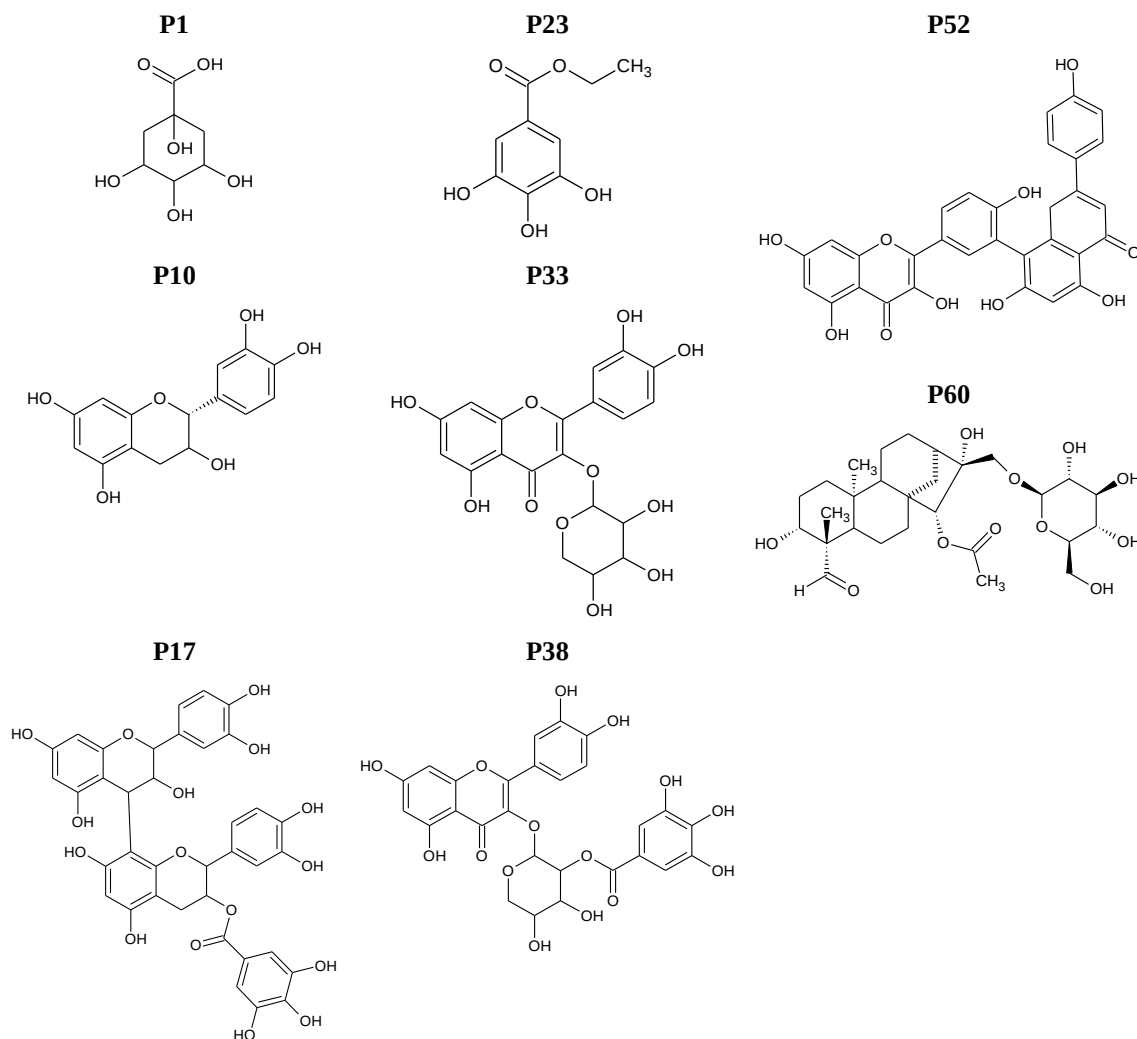


Tabela 15 - Substâncias identificadas UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS ou UHPLC-ESI-TOF-MS

Subs.	Nome da substância
P1	Ácido quínico
P10	Catequina
P17	Proantocianidina-B-2'-O-galato
P23	galato de etila
P33	Quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo
P38	Quercetina-3-O-(2''-galoil)- α -arabinopiranosídeo
P52	amentoflavona
P60	Tricalisiosídeo J

ANEXO B

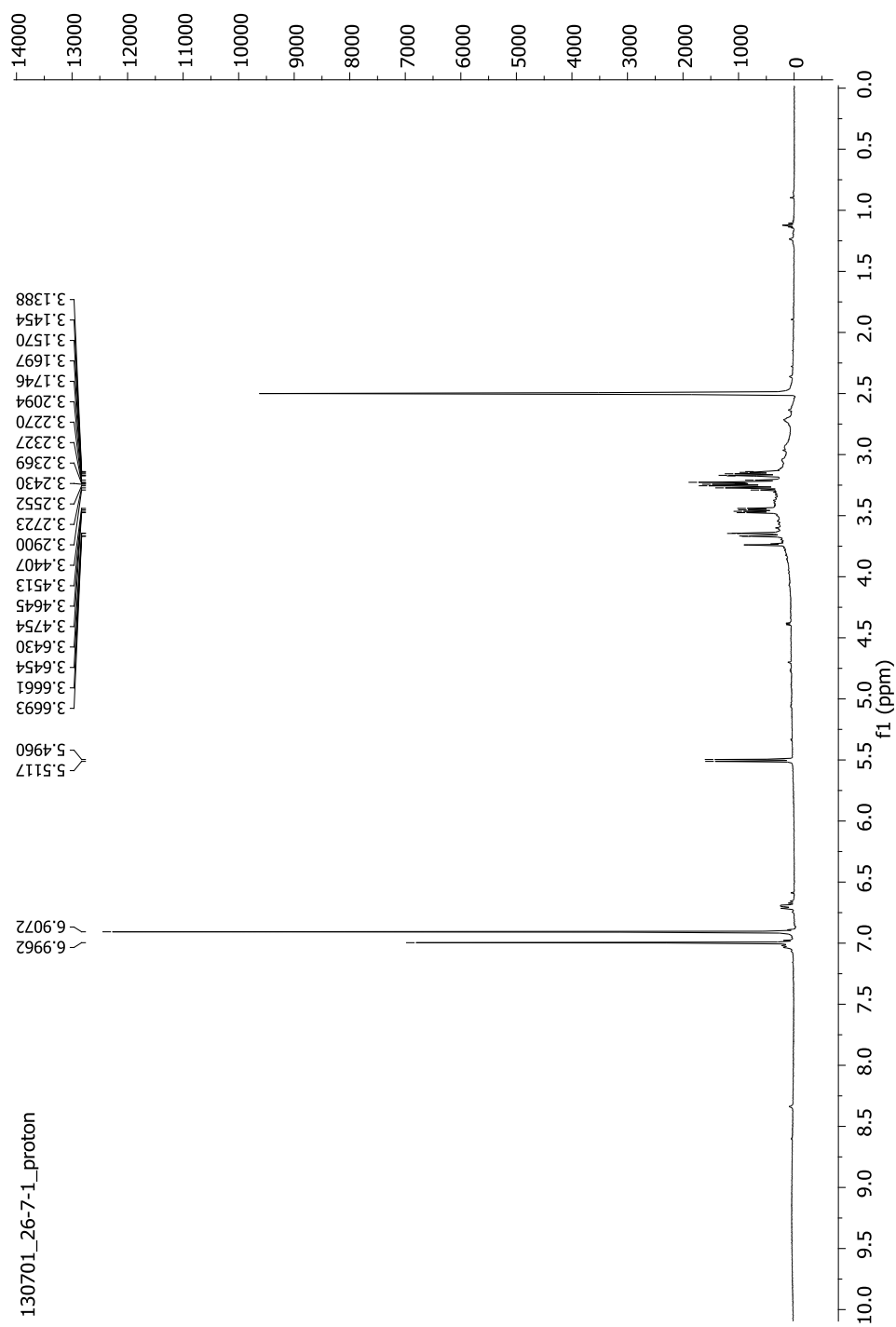
Figura 67 - Espectro de RMN DE ^1H de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

Figura 68 - Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

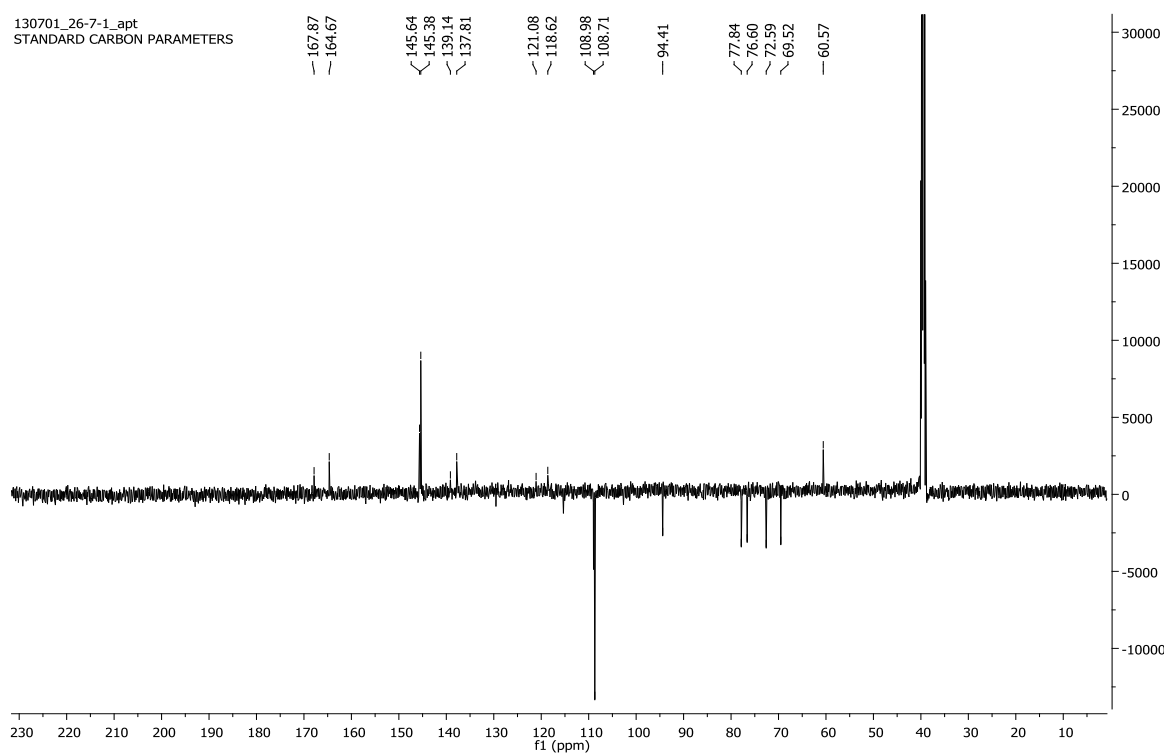


Figura 69 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-1 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

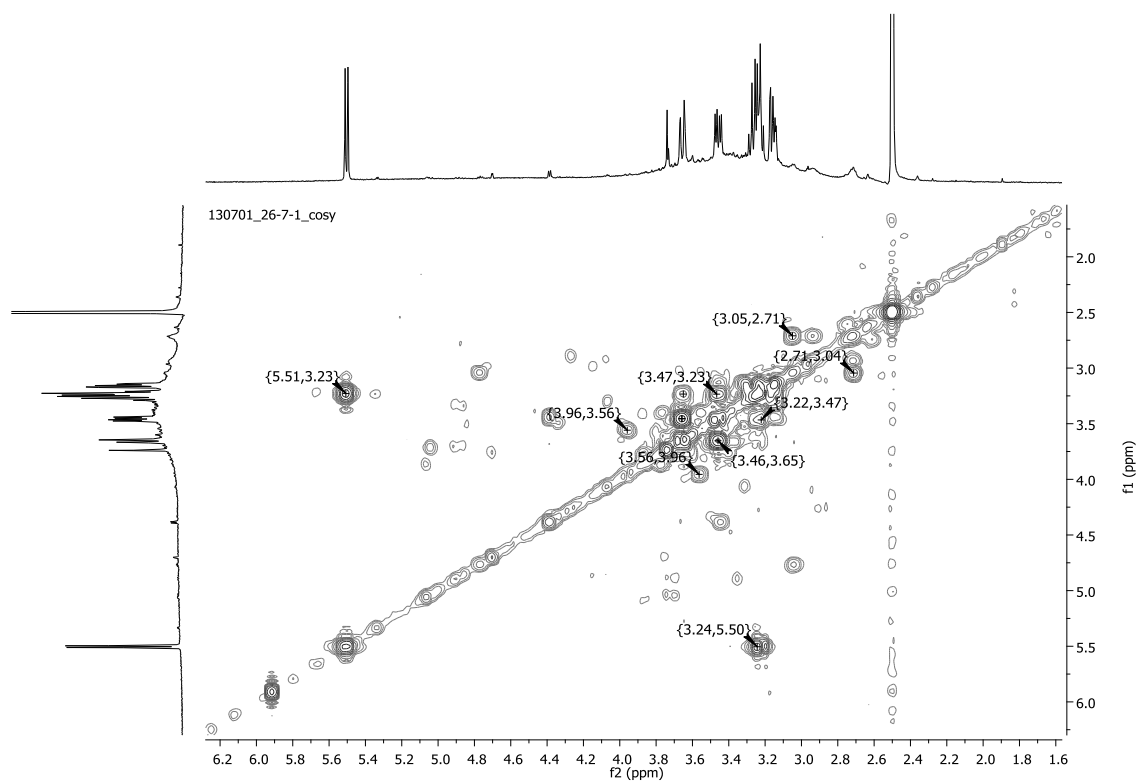


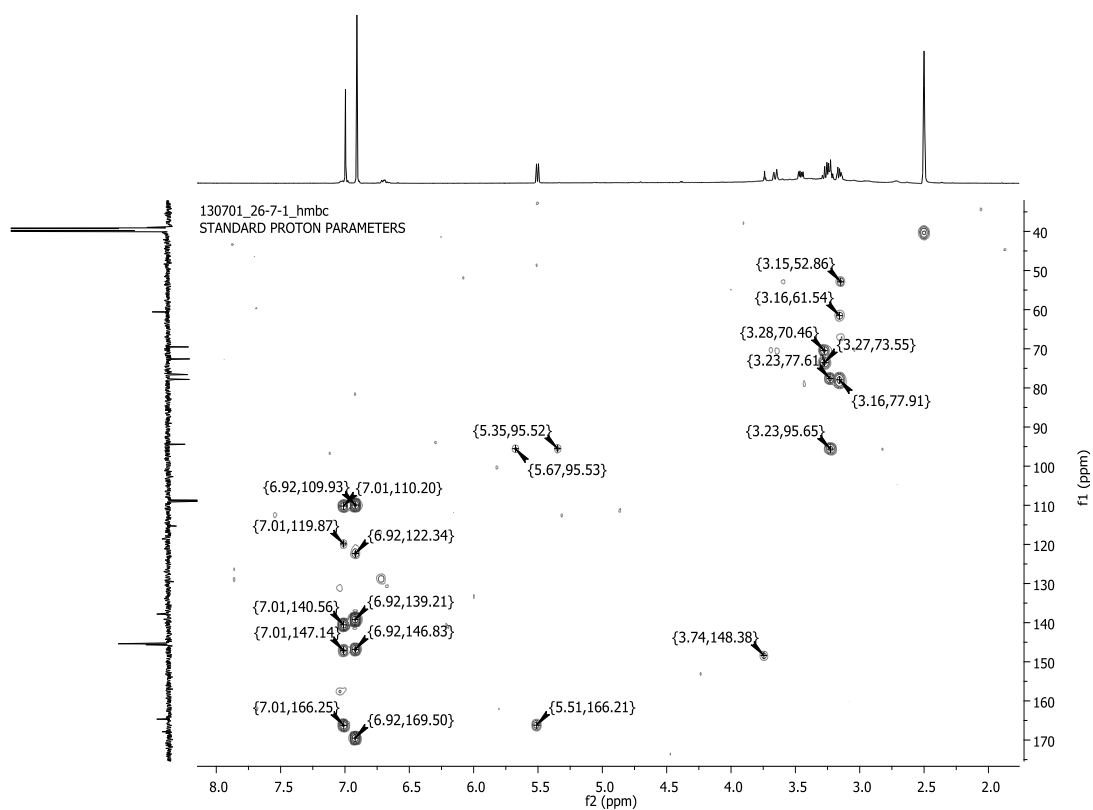
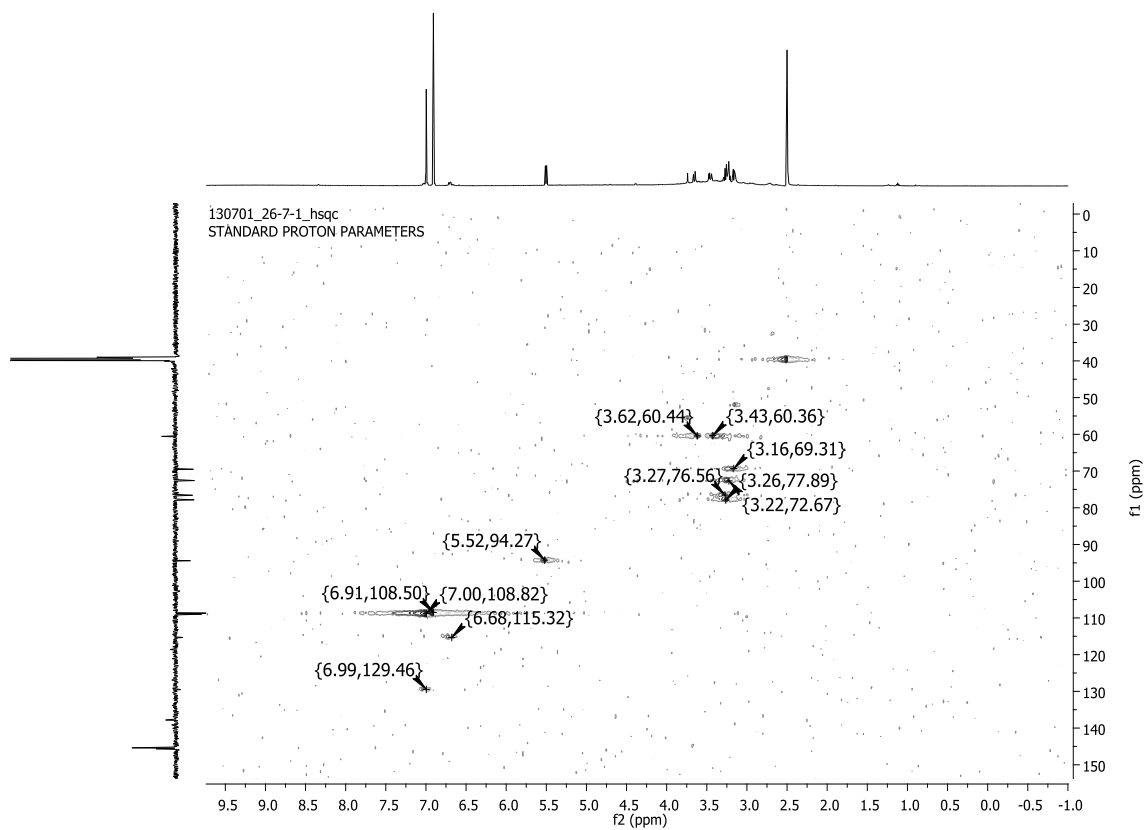
Figura 70- Espectro de RMN de correlações entre HMBC de BM-1 (DMSO-d₆; 11,7T).**Figura 71-** Espectro de RMN de correlações entre HSQC de BM-1 (DMSO-d₆; 11,7T)

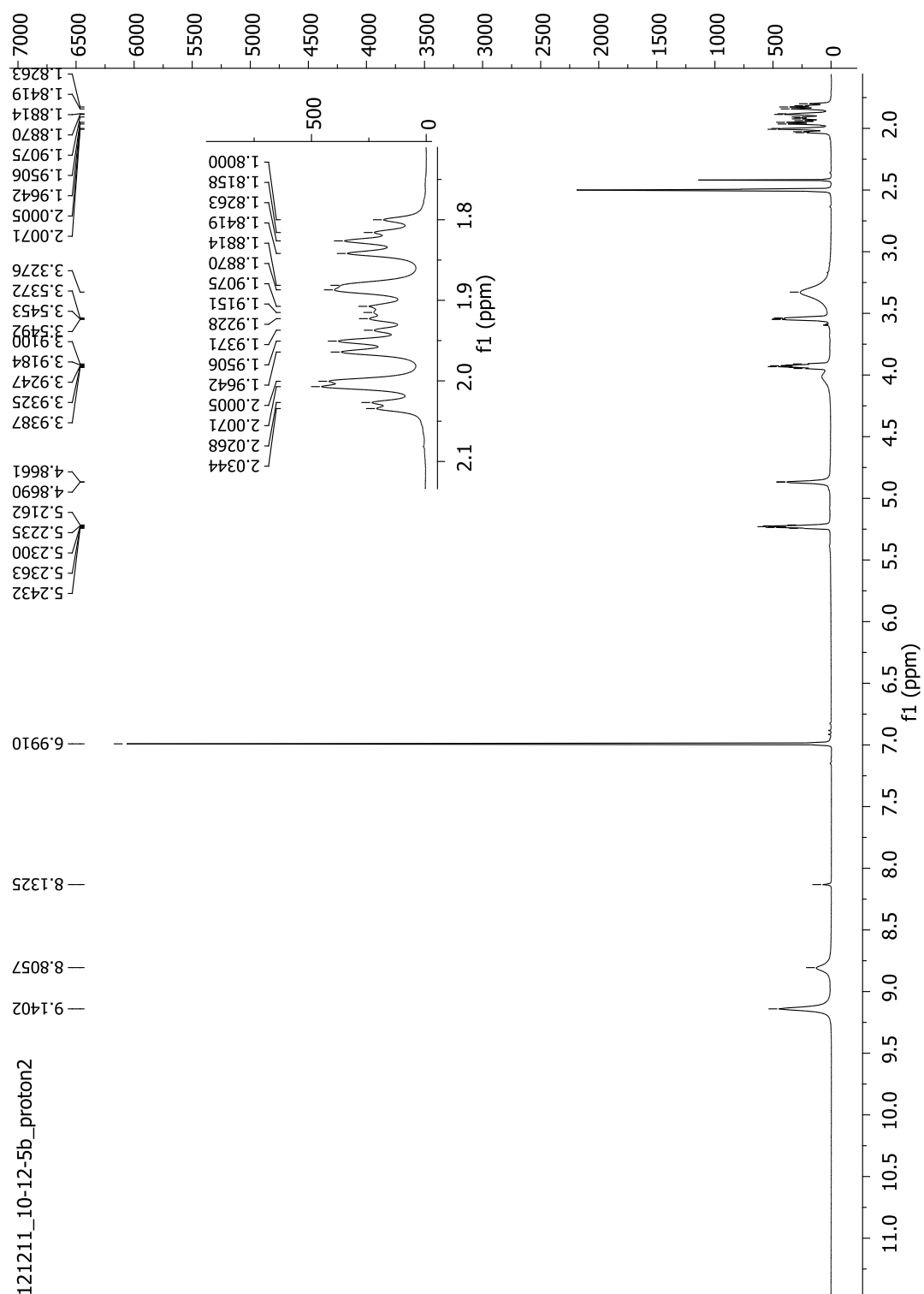
Figura 72 - Espectro de RMN de ^1H de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

Figura 73 - Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

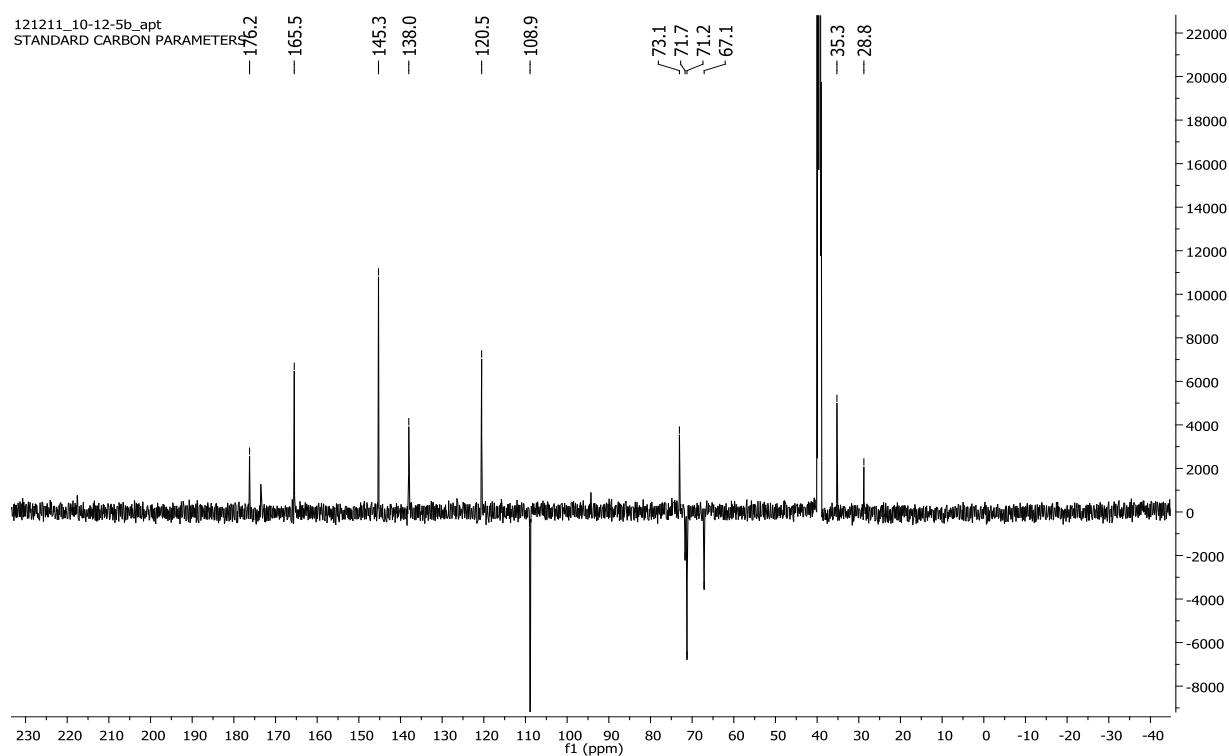


Figura 74 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-2 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

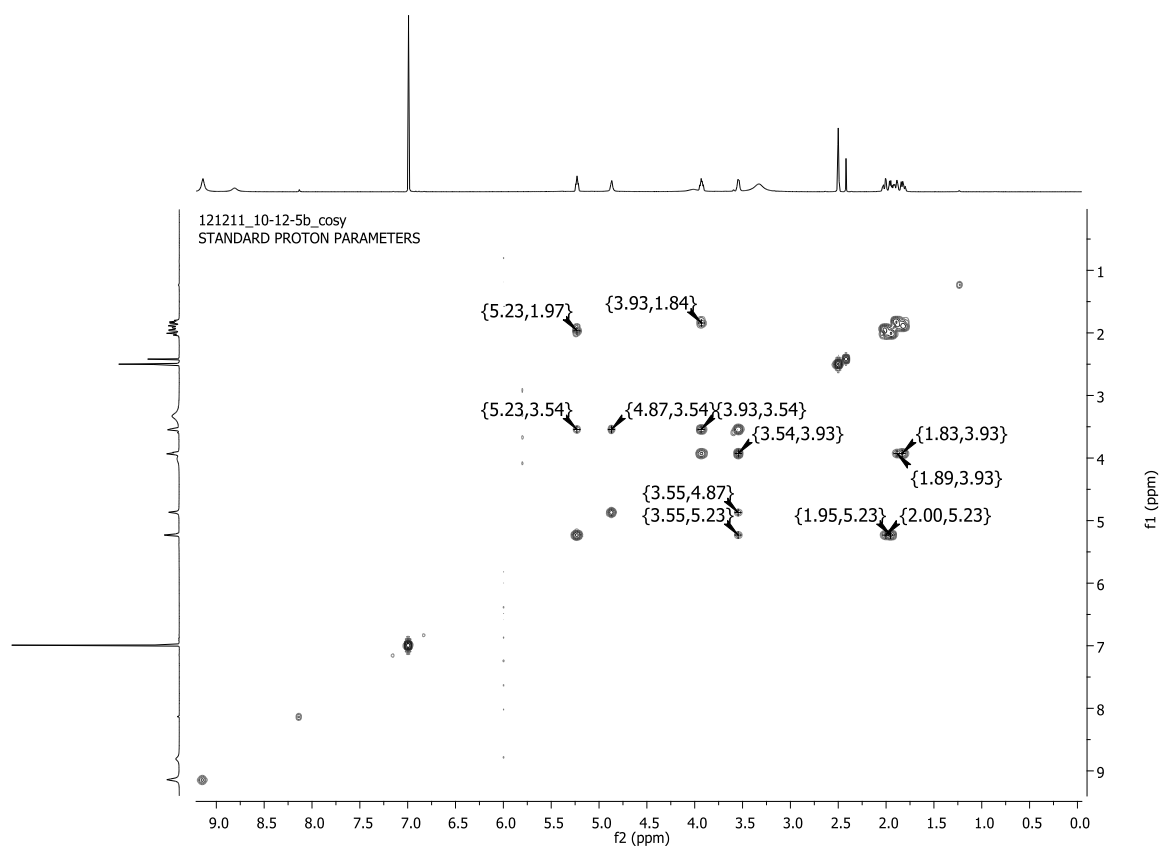


Figura 75- Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-2 (DMSO-d₆; 11,7T).

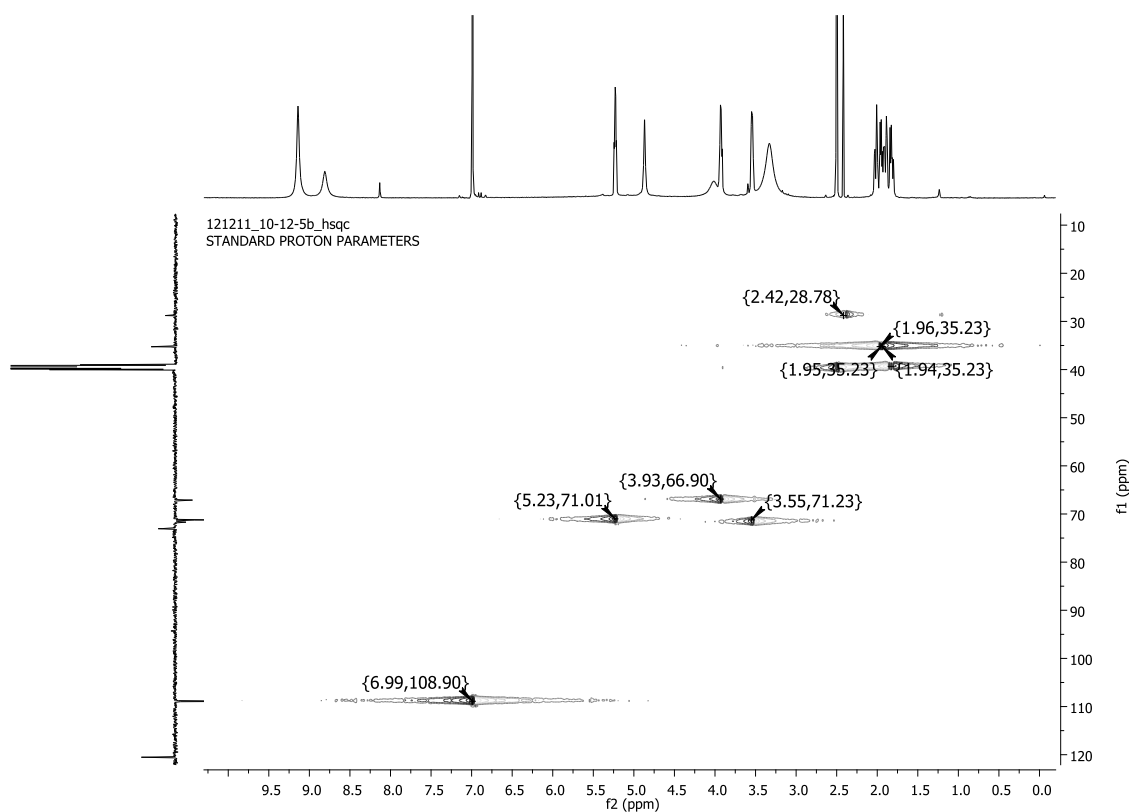


Figura 76- Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-2 (DMSO-d₆; 11,7T).

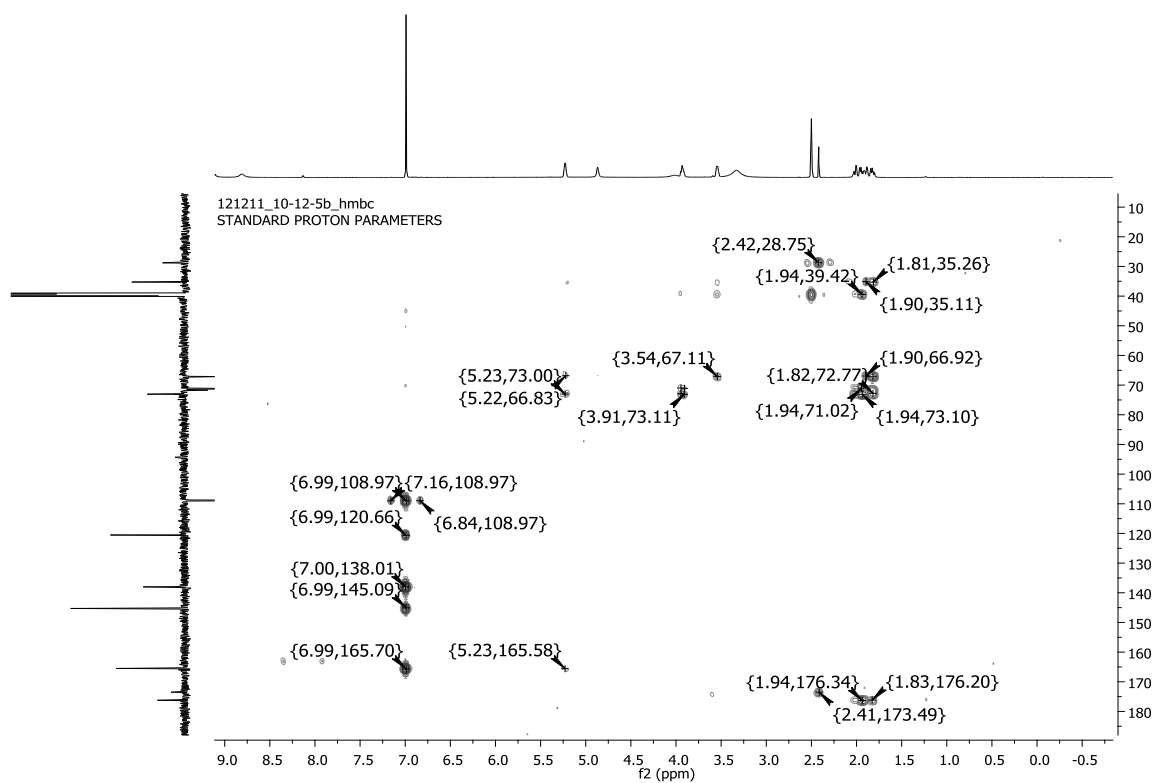


Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H de BM-3 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

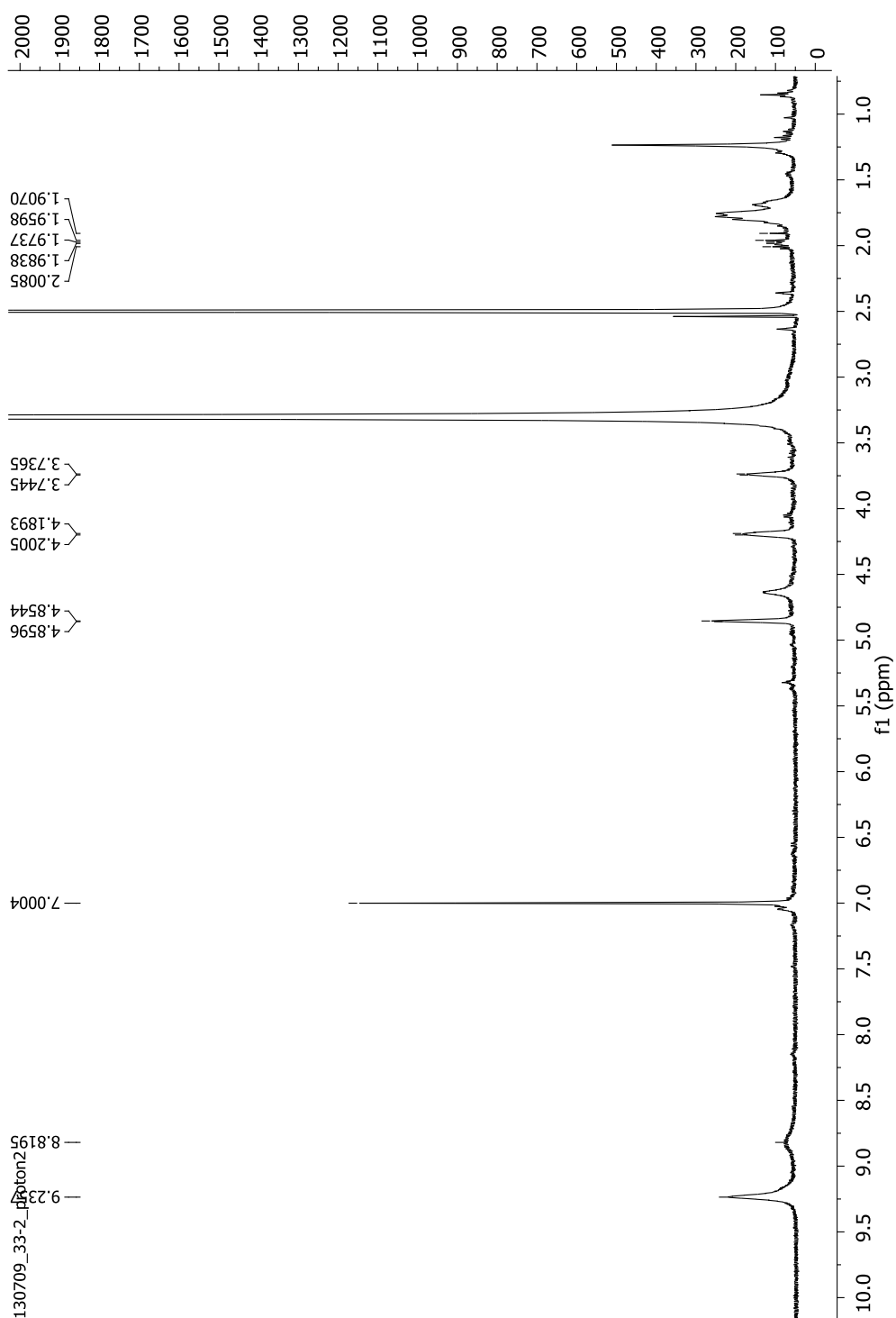


Figura 78 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-3 (DMSO-d₆; 11,7T).

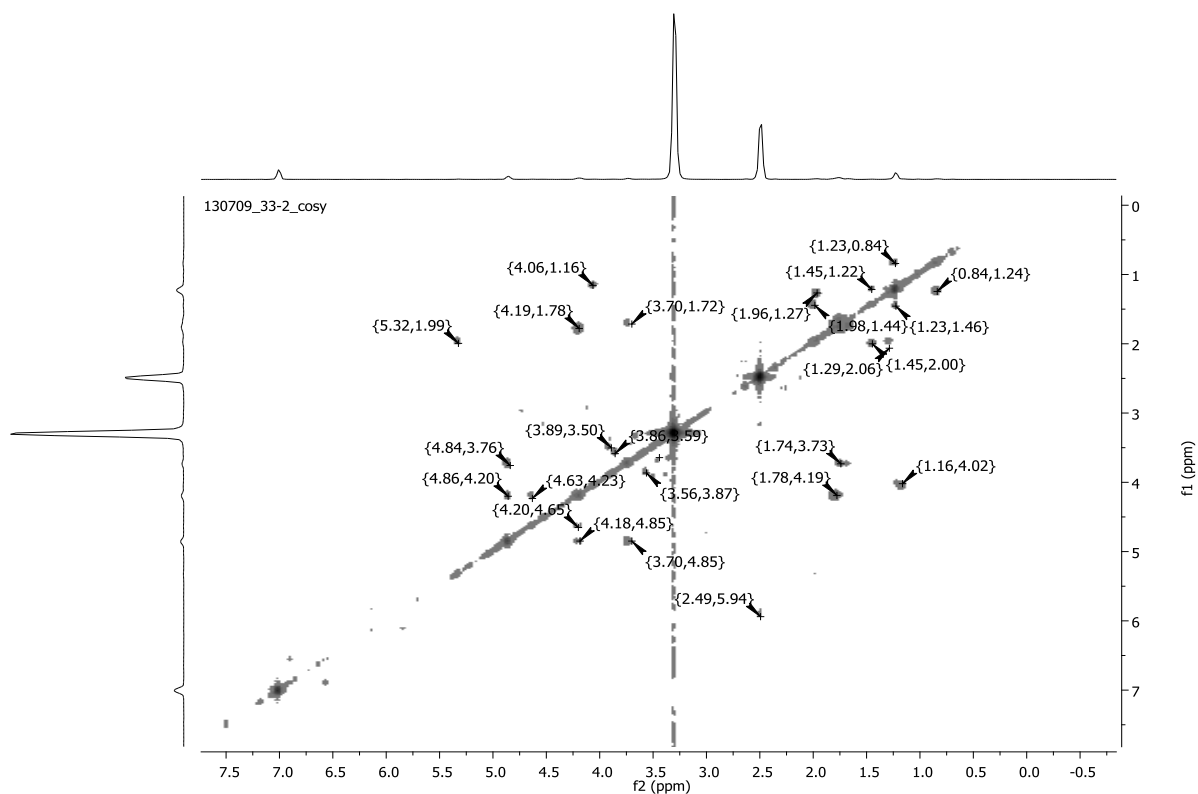


Figura 79- Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-3 (DMSO-d₆; 11,7T).

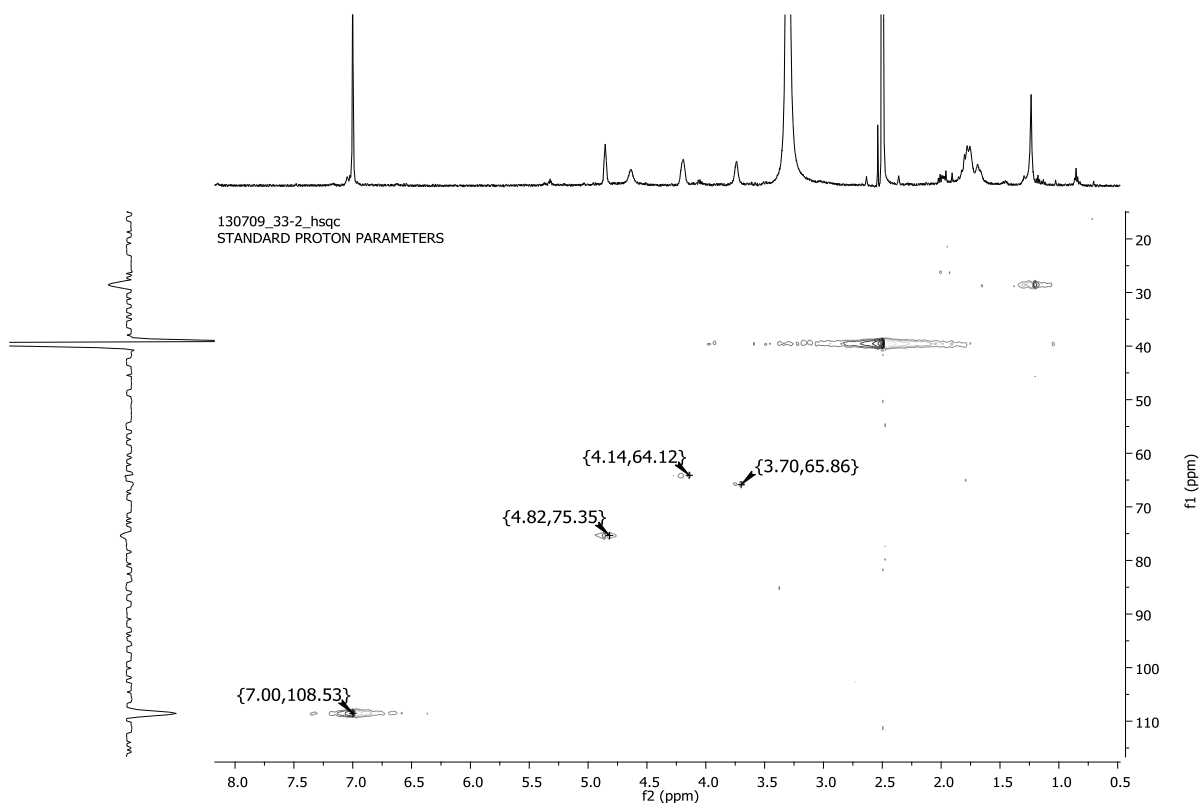


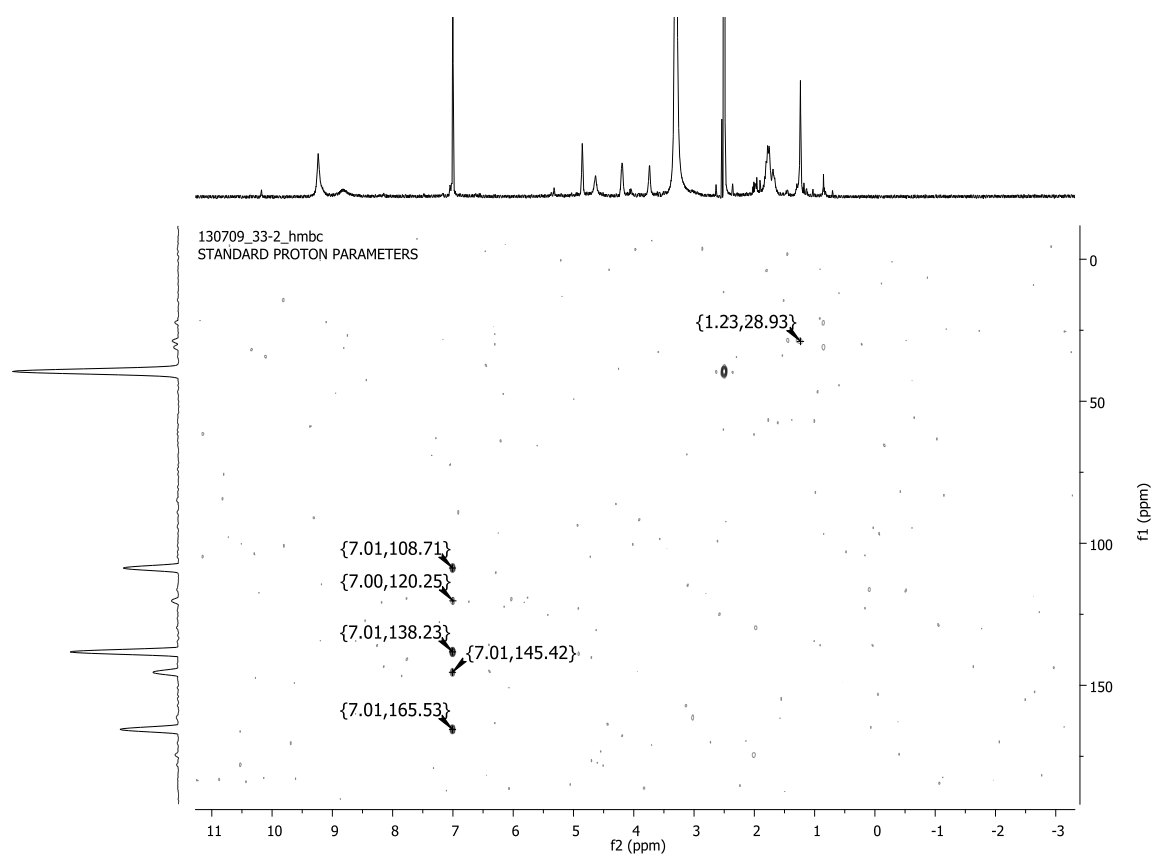
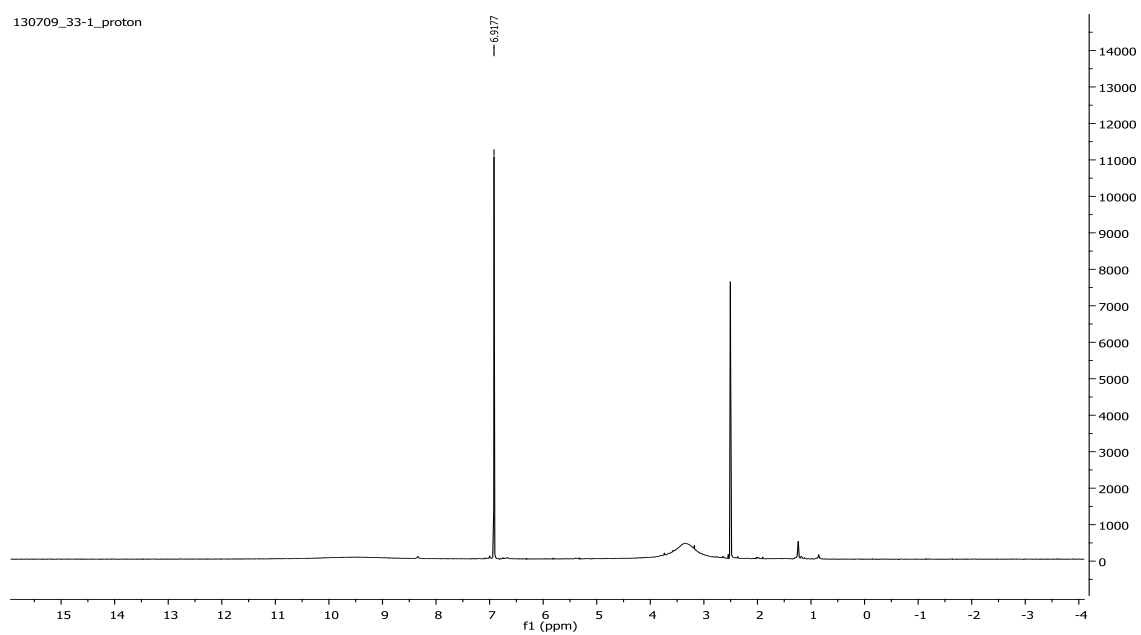
Figura 80- Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-3 (DMSO-d₆; 11,7T).**Figura 81 -** Espectro de RMN de ¹H de BM-4 (DMSO-d₆; 11,7T).

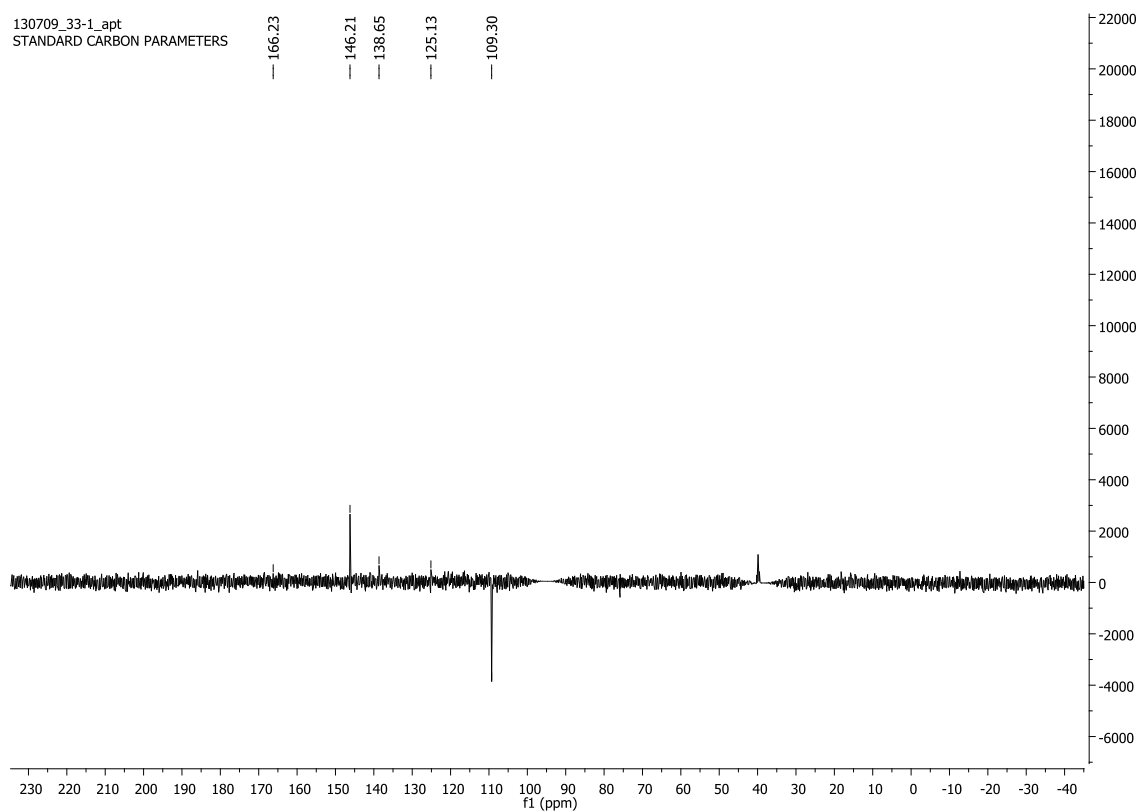
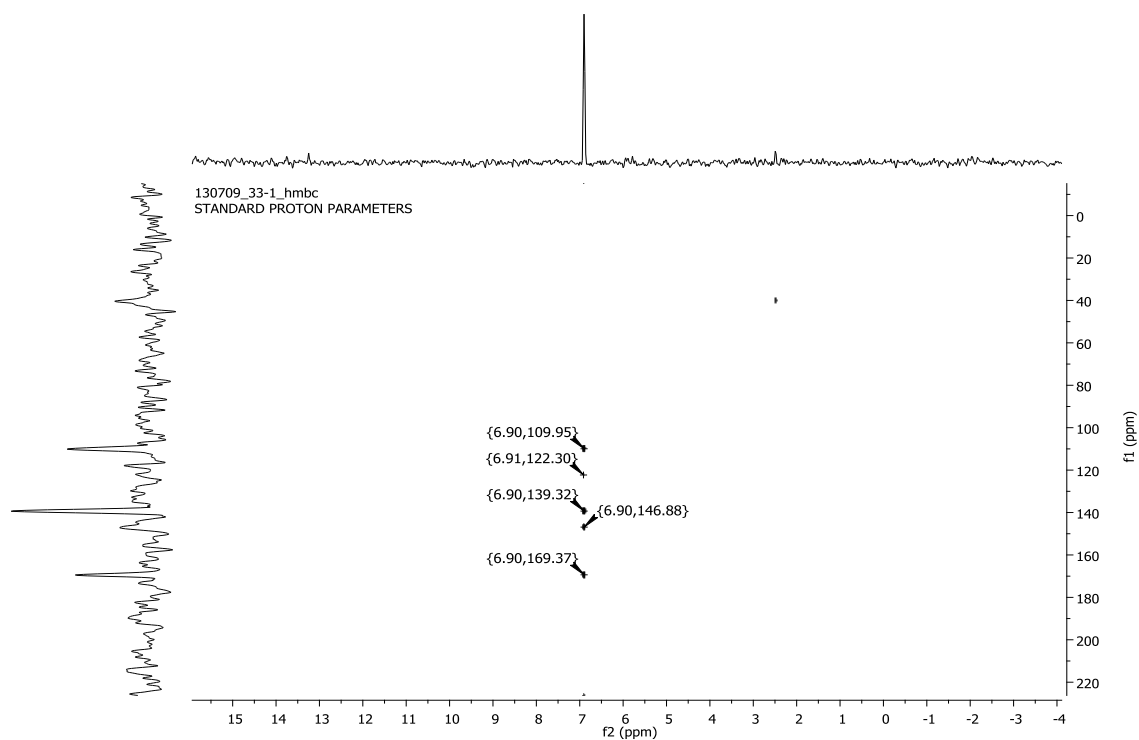
Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-4 (DMSO- d_6 ; 11,7T).**Figura 83** - Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-4 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

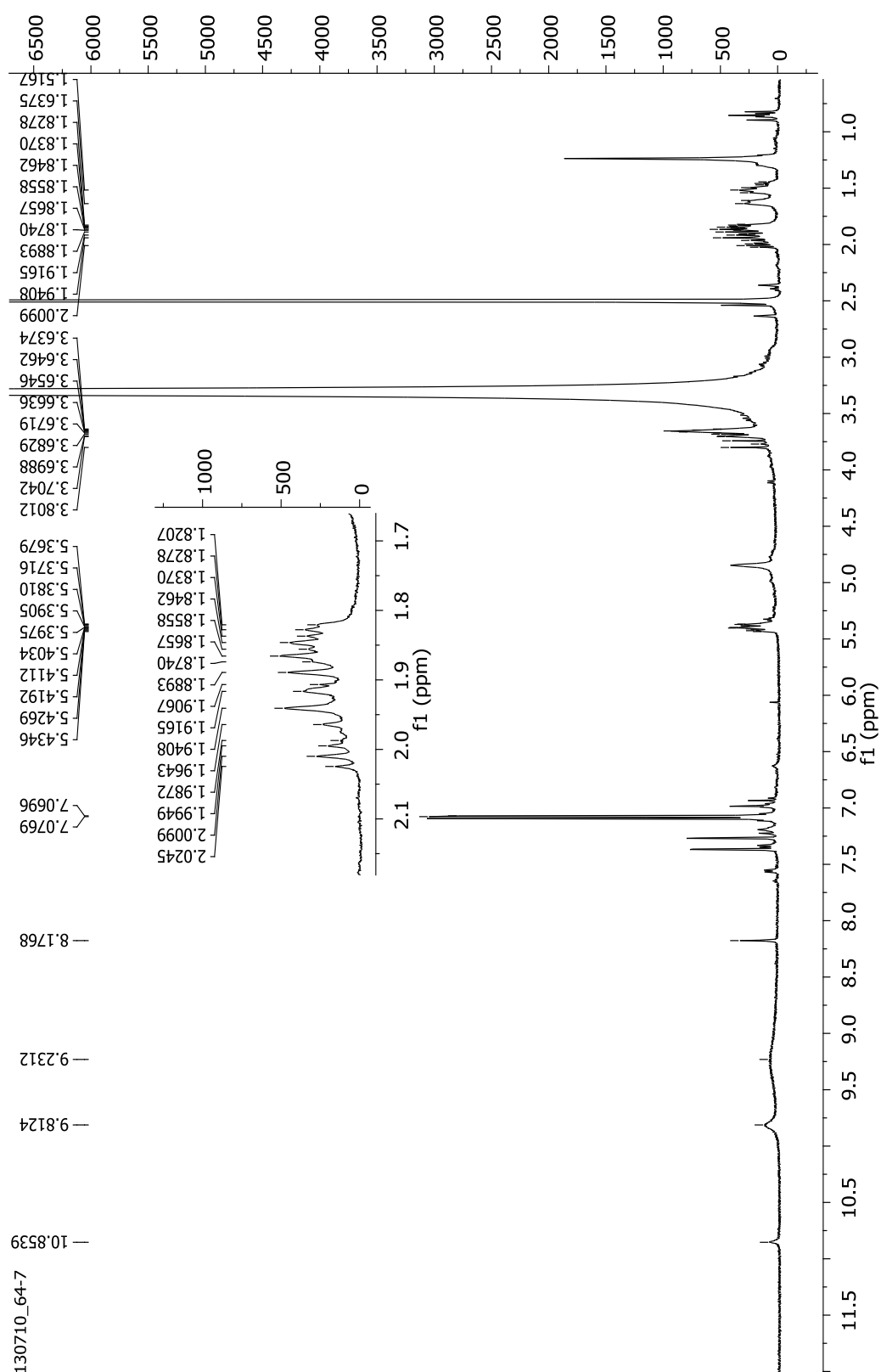
Figura 84 - Espectro de RMN ^1H de BM-5 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

Figura 85 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-5 (DMSO-d₆; 11,7T).

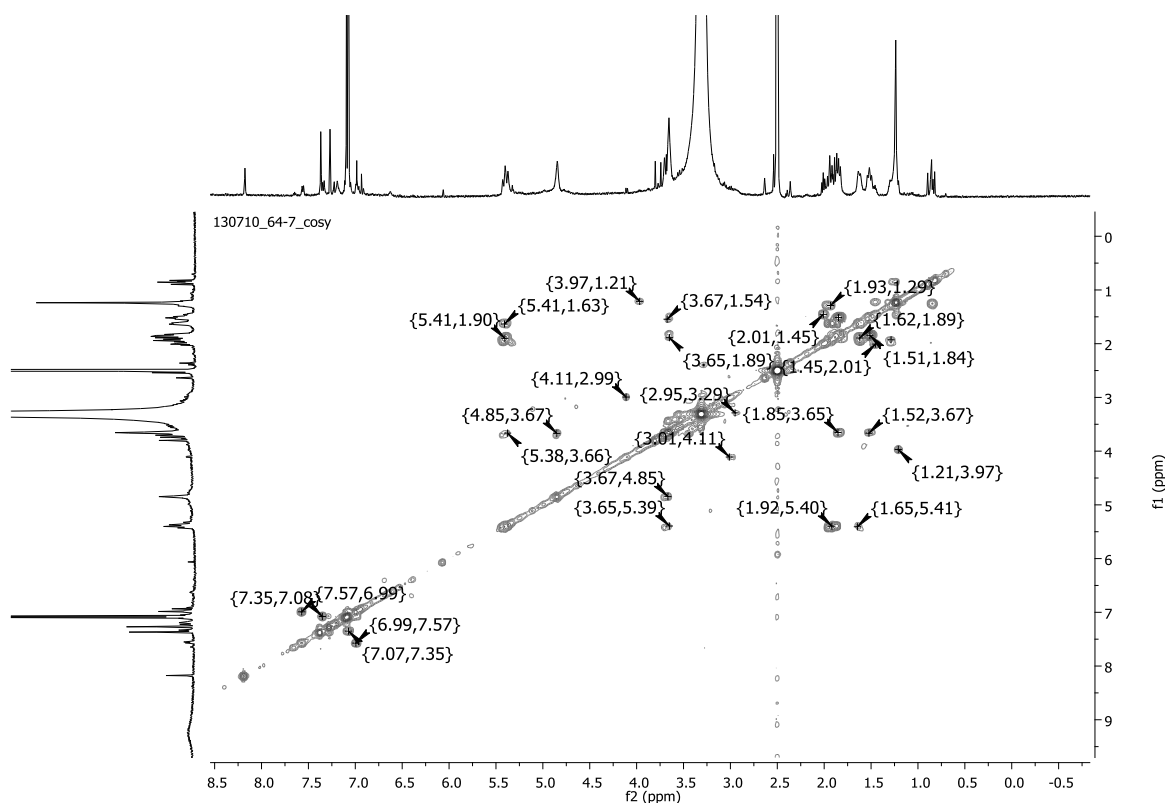


Figura 86 - Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-5 (DMSO-d₆; 11,7T).

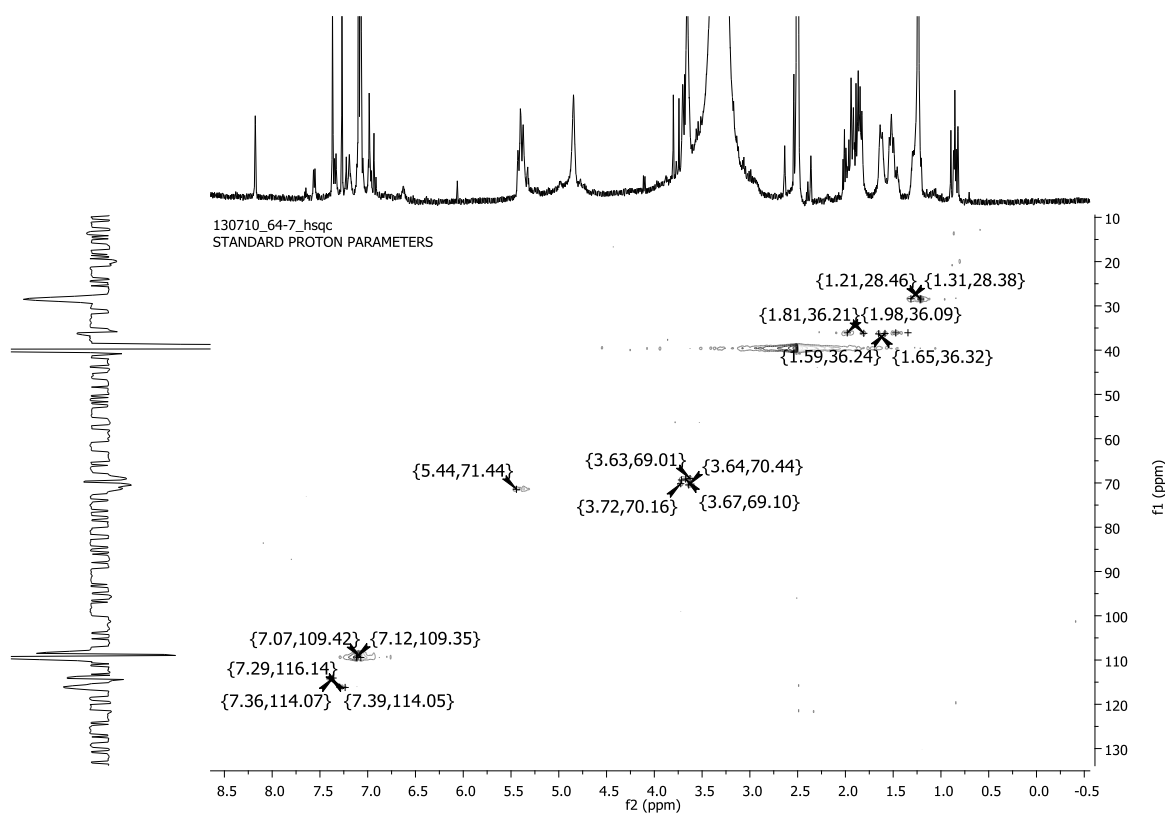


Figura 87 - Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-5 (DMSO-d₆; 11,7T).

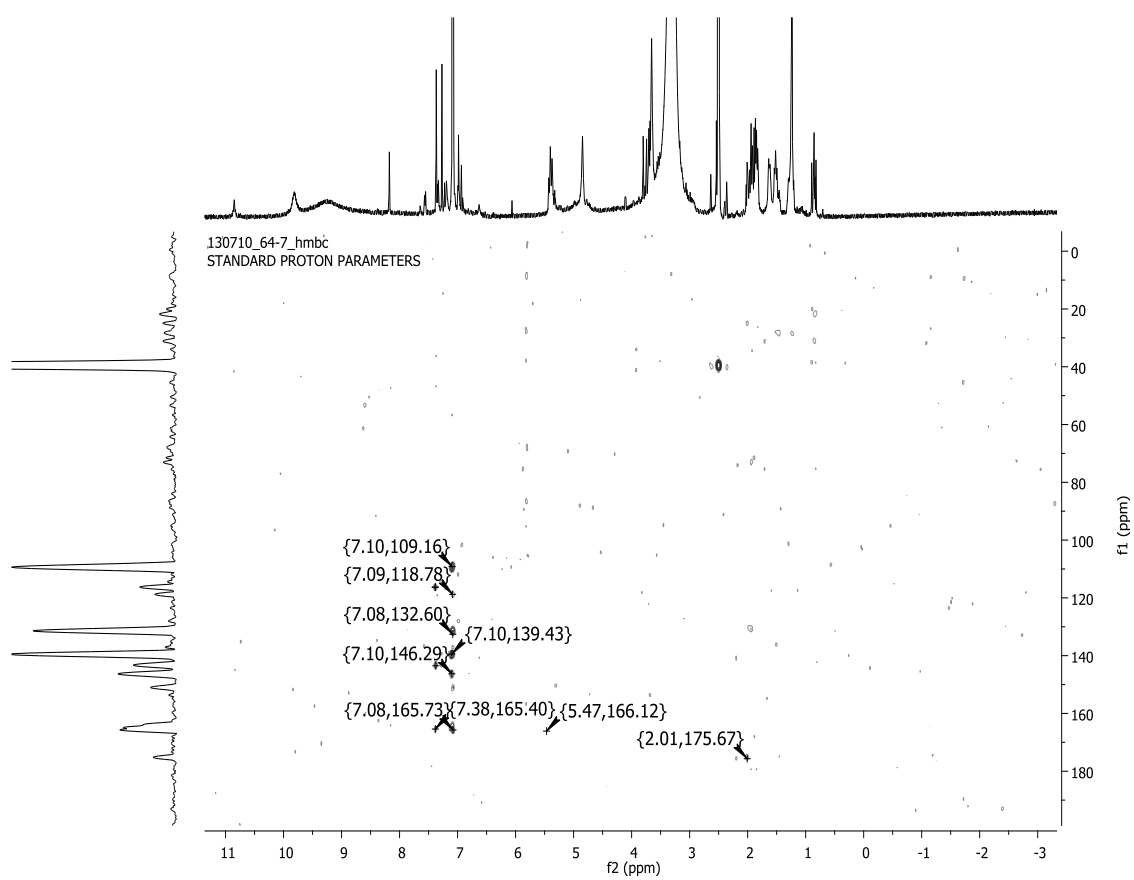


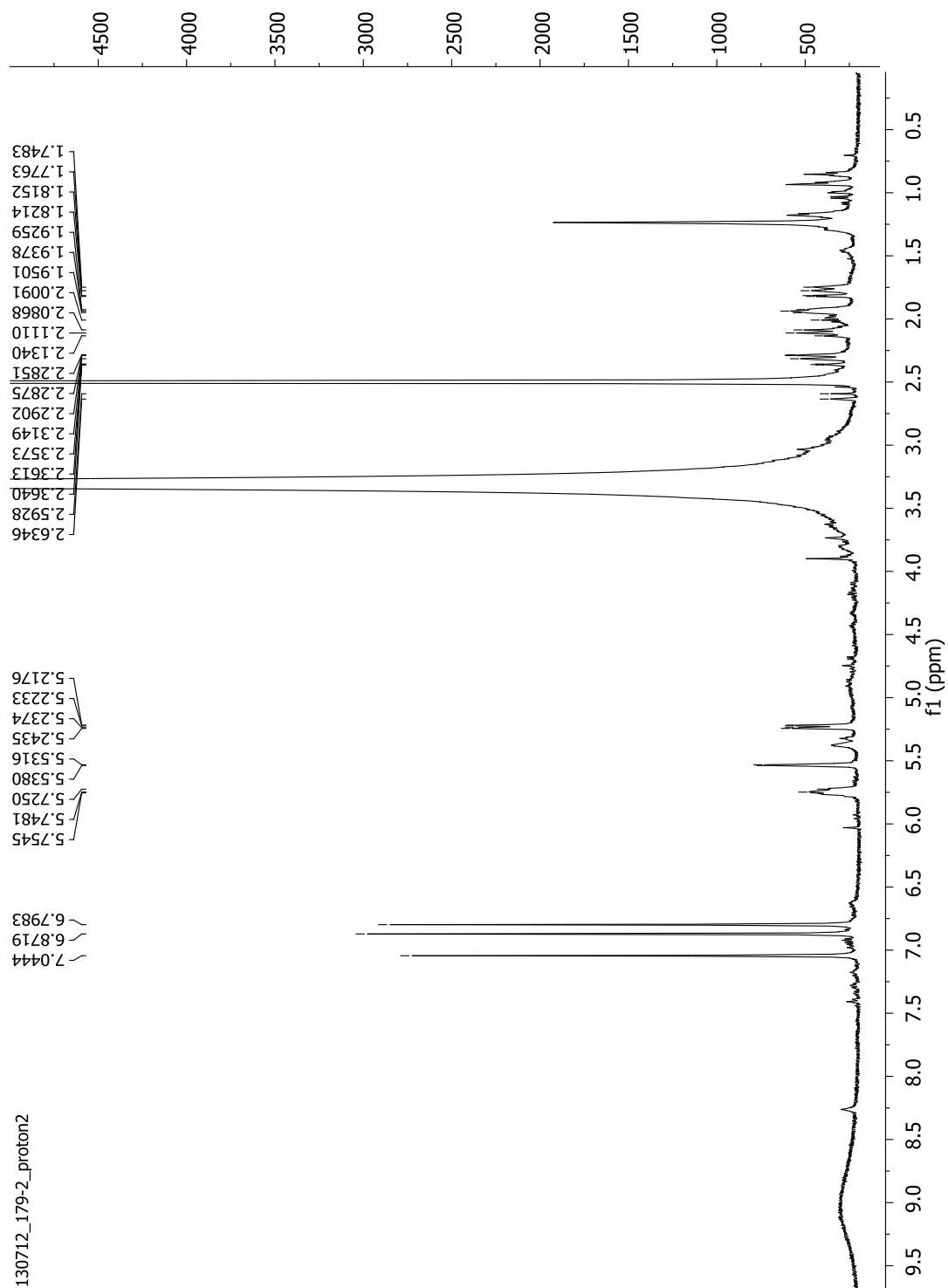
Figura 88 - Espectro de RMN DE ^1H de BM-6 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

Figura 89 - Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-6 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

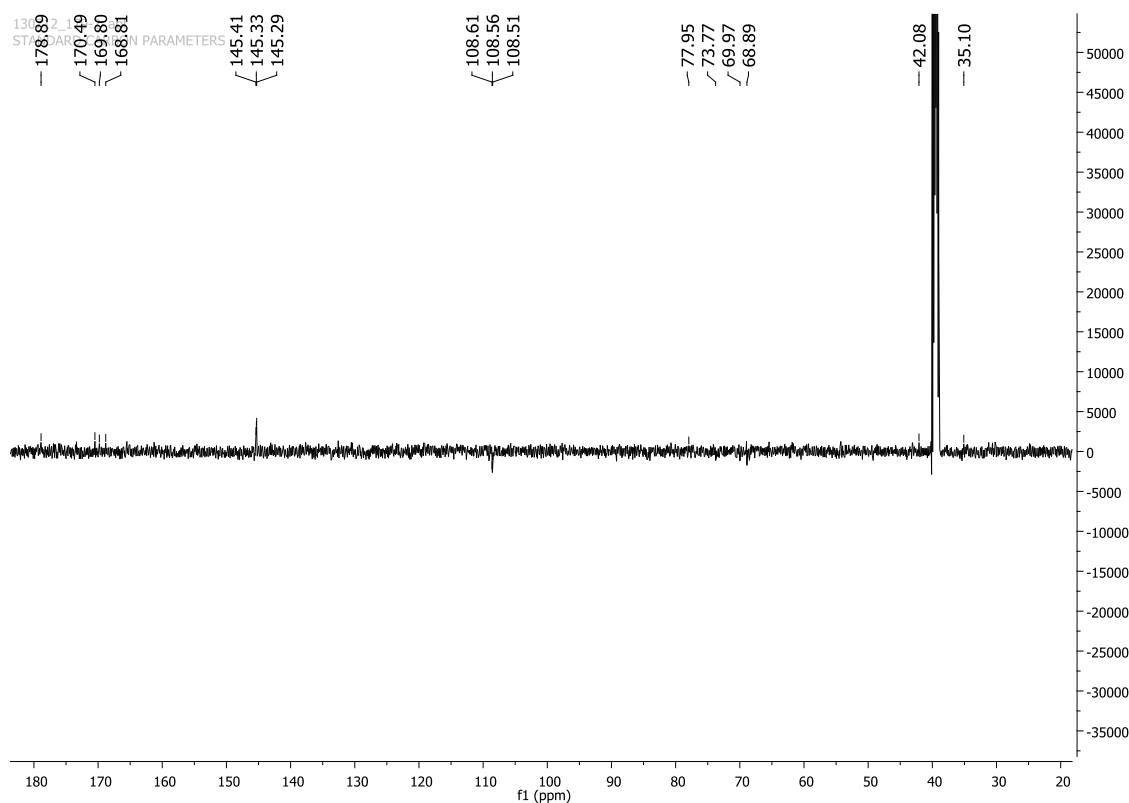


Figura 90 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-6 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

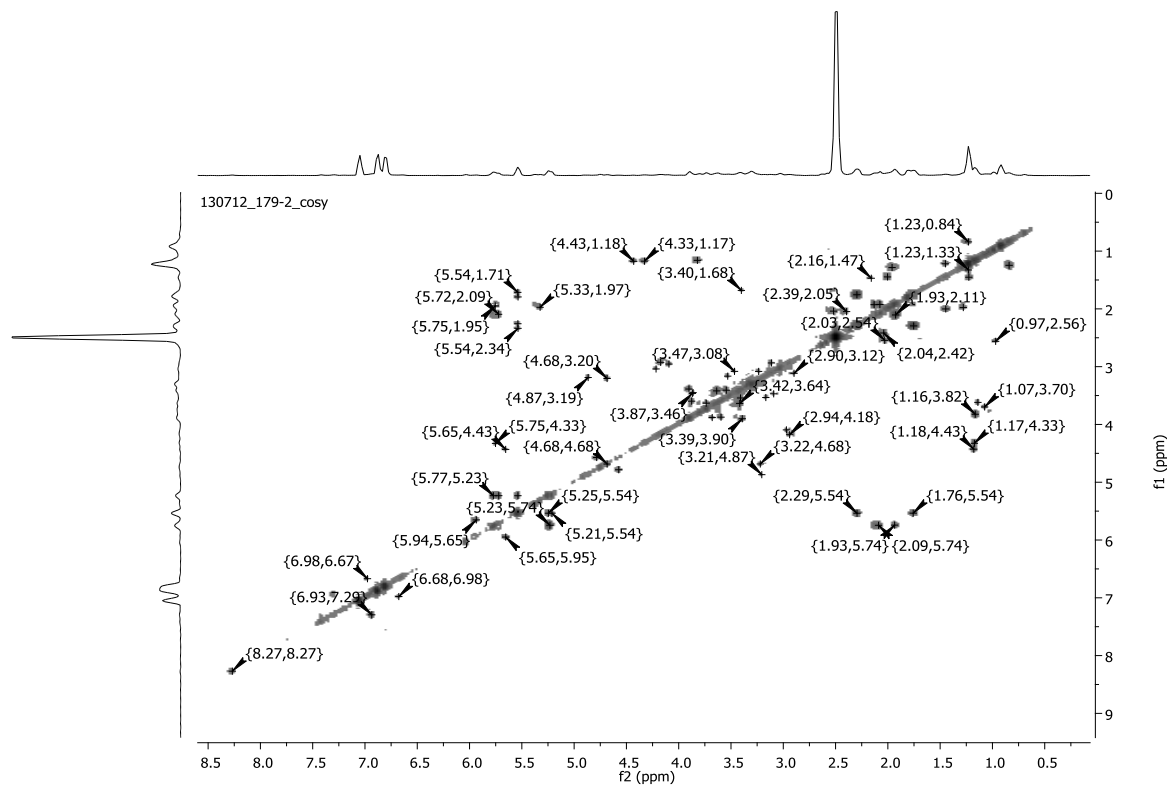


Figura 91 - Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-6 (DMSO-d₆; 11,7T).

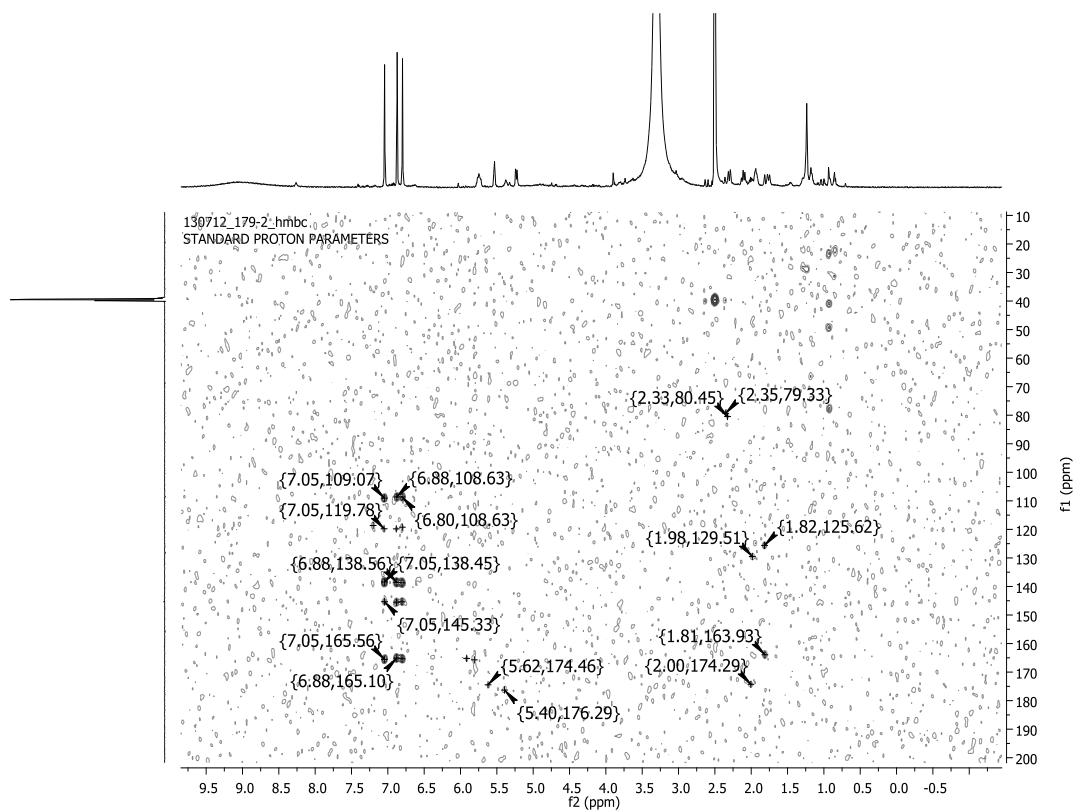


Figura 92 - Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-6 (DMSO-d₆; 11,7T).

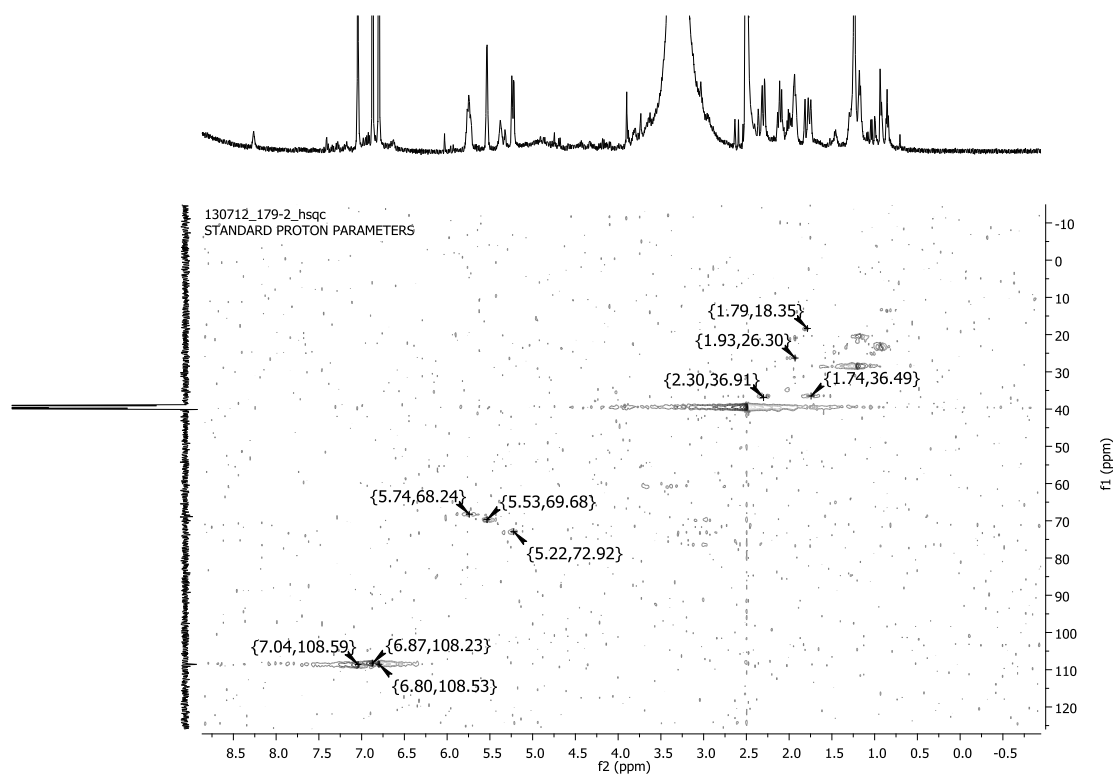


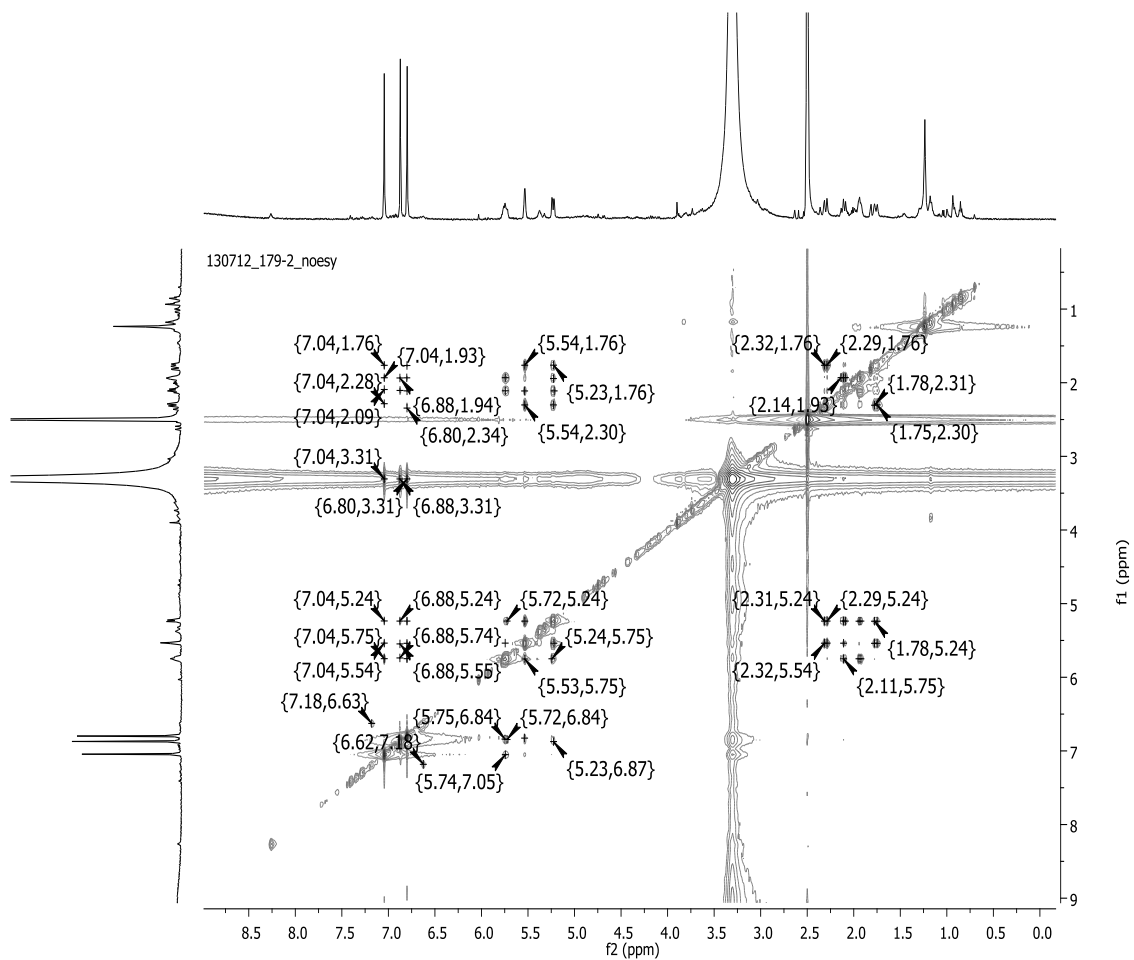
Figura 93 - Espectro de RMN de correlações NOESY de BM-6 (DMSO-d₆; 11,7T).

Figura 94- Espectro de RMN DE ^1H de BM-7 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

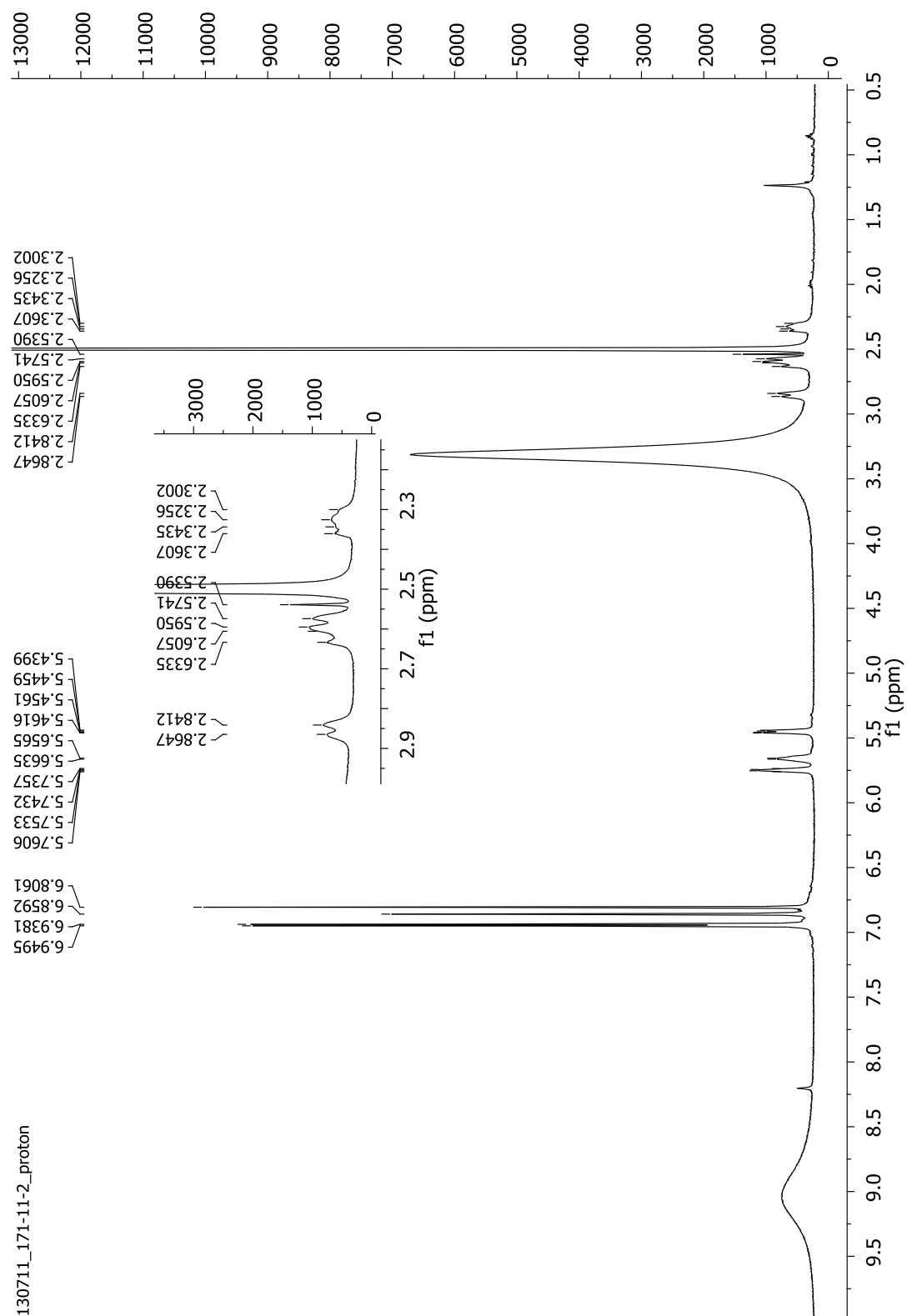


Figura 95- Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-7 (DMSO-d₆; 11,7T).

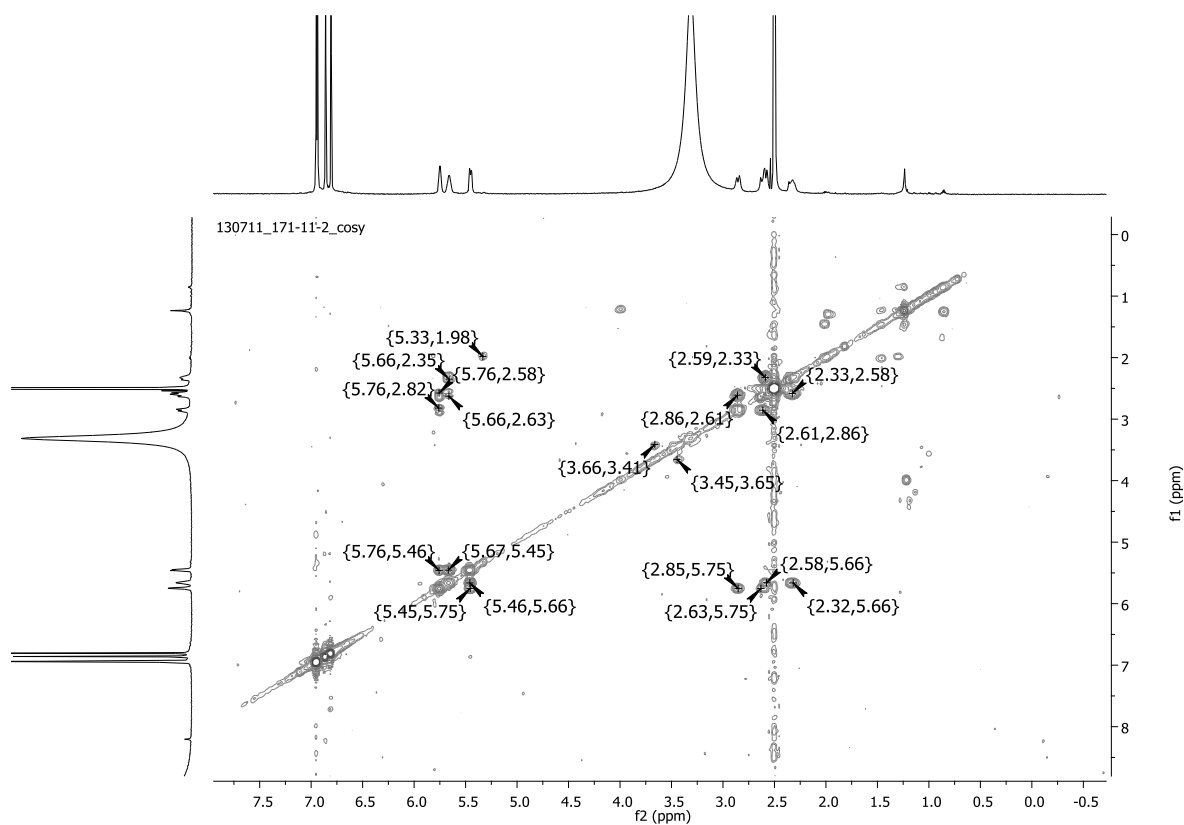


Figura 96 - Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-7 (DMSO-d₆; 11,7T).

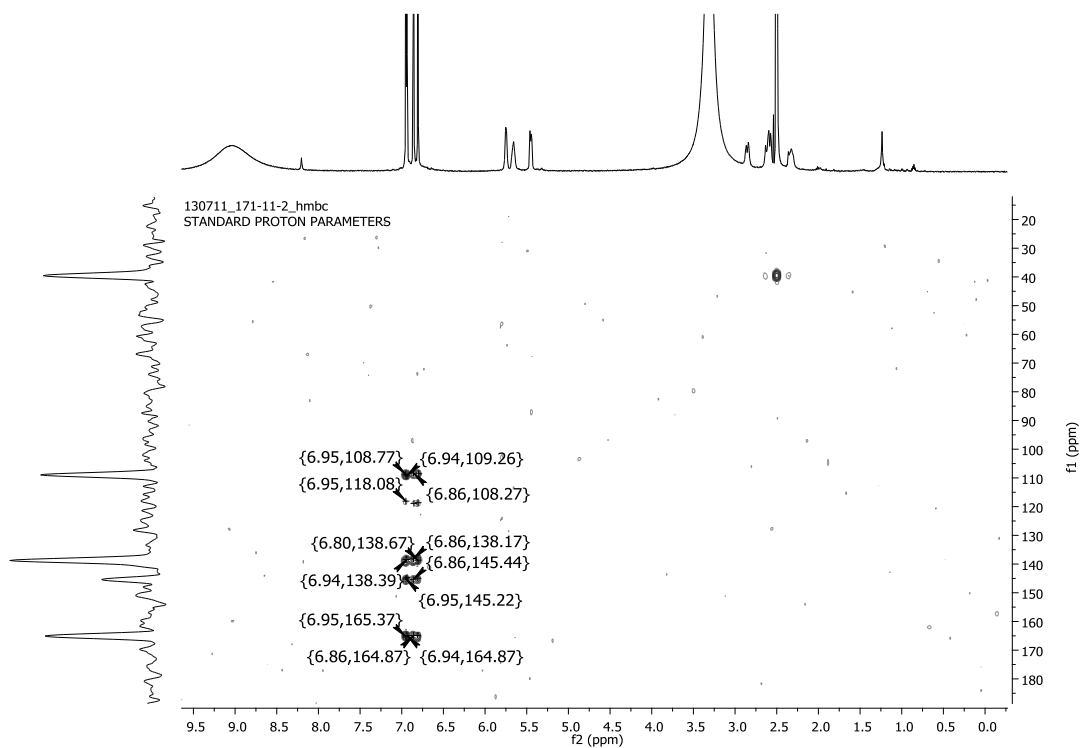


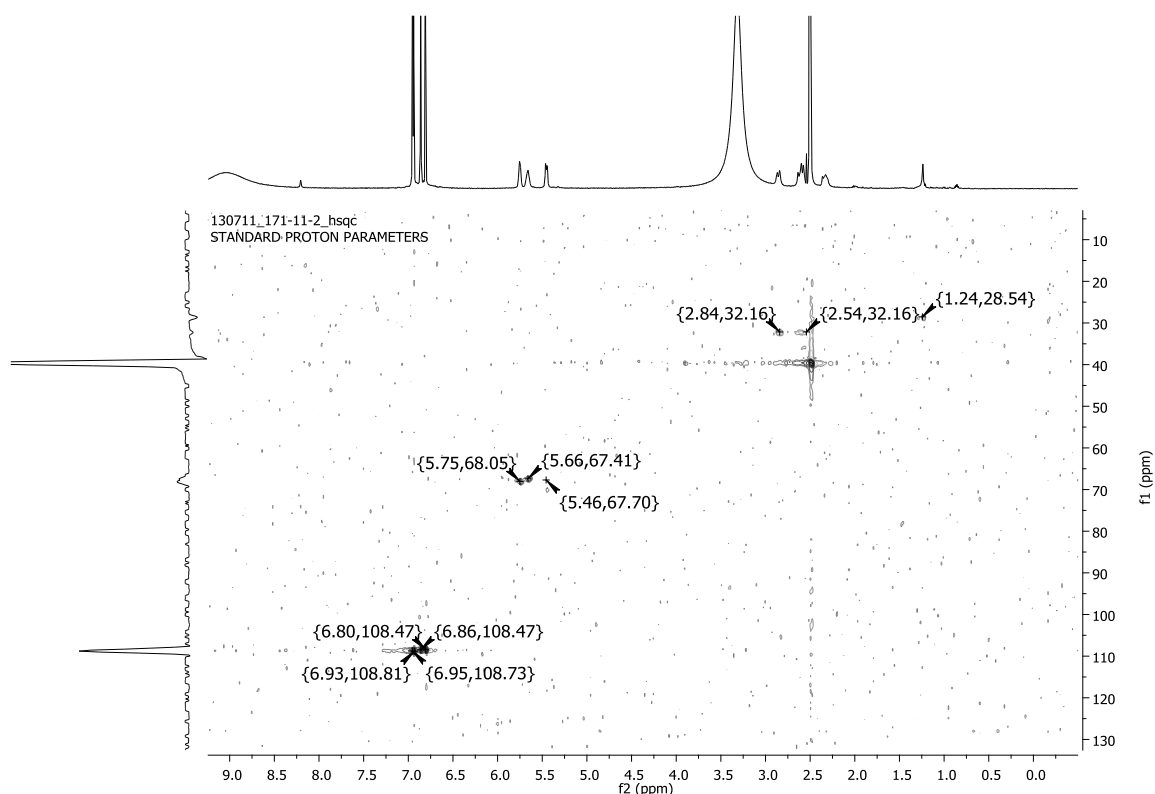
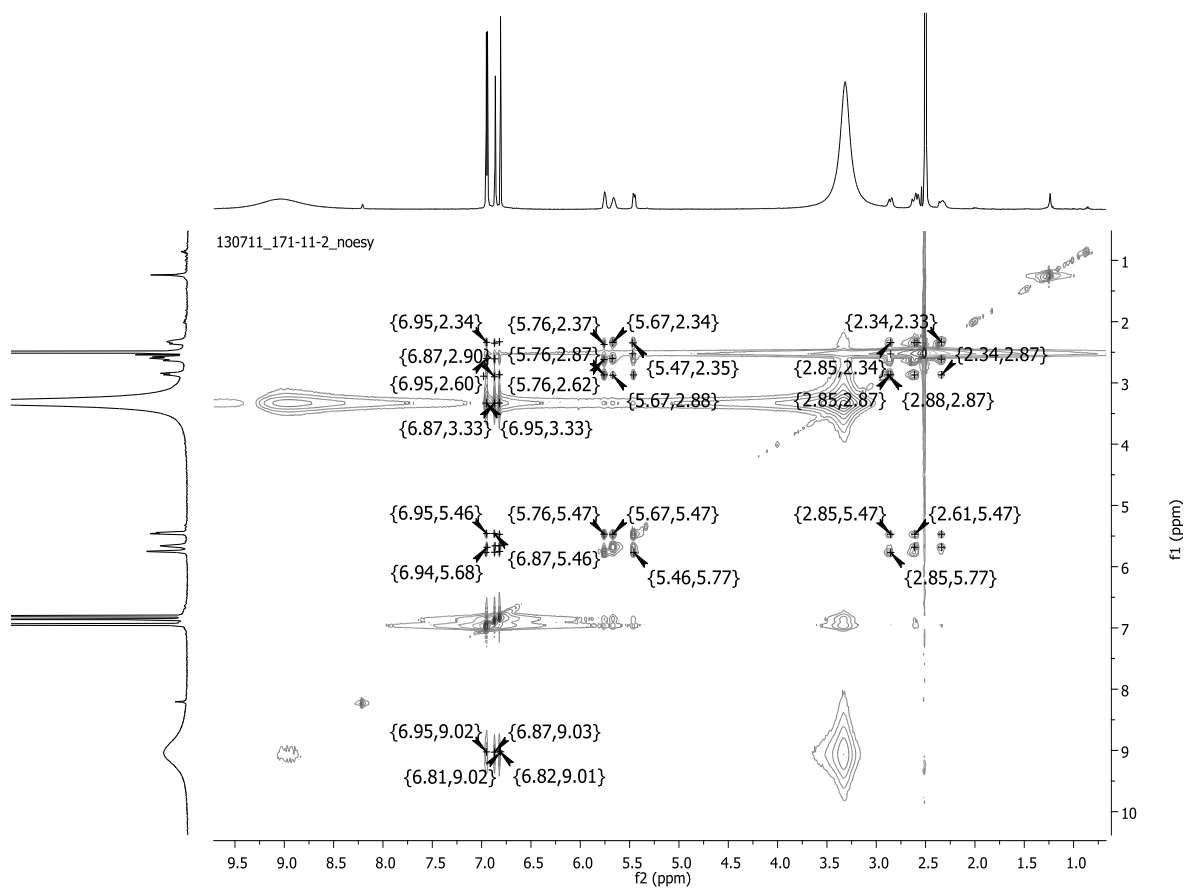
Figura 97 - Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-7 (DMSO-d₆; 11,7T).**Figura 98** - Espectro de RMN de correlações NOESY de BM-7 (DMSO-d₆; 11,7T).

Figura 99 - Espectro de RMN de ^1H de BM-8 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

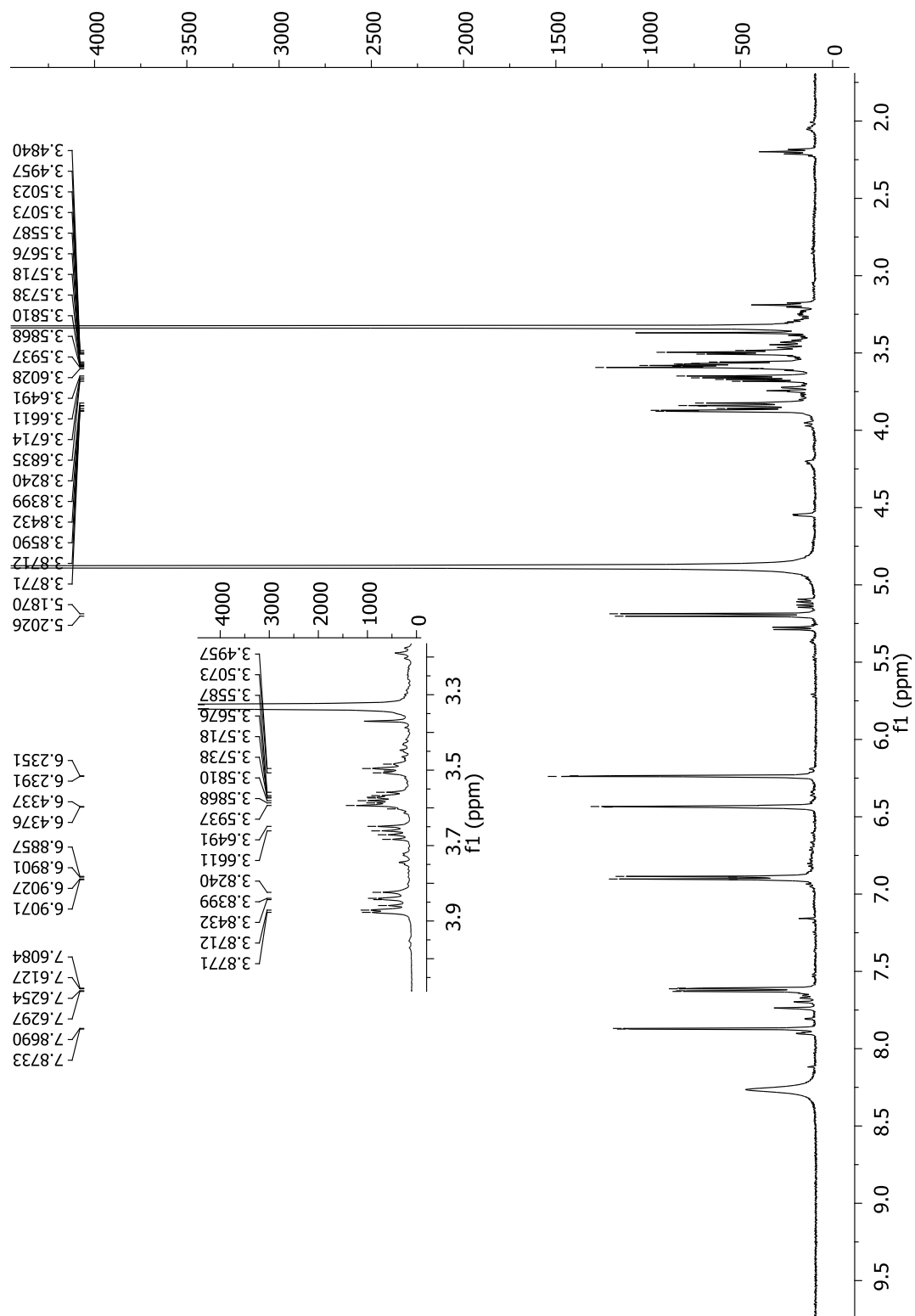


Figura 100 - Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-8 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

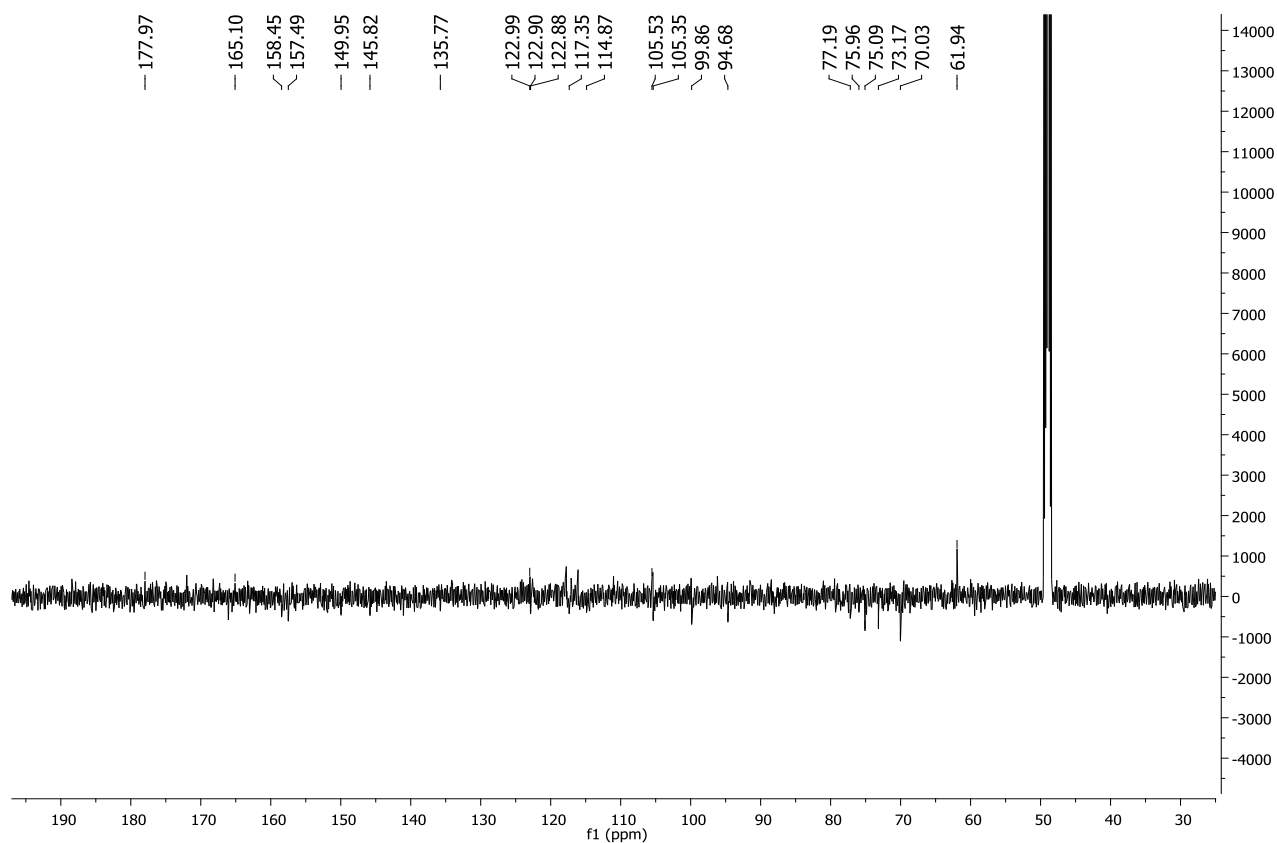


Figura 101 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-8 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

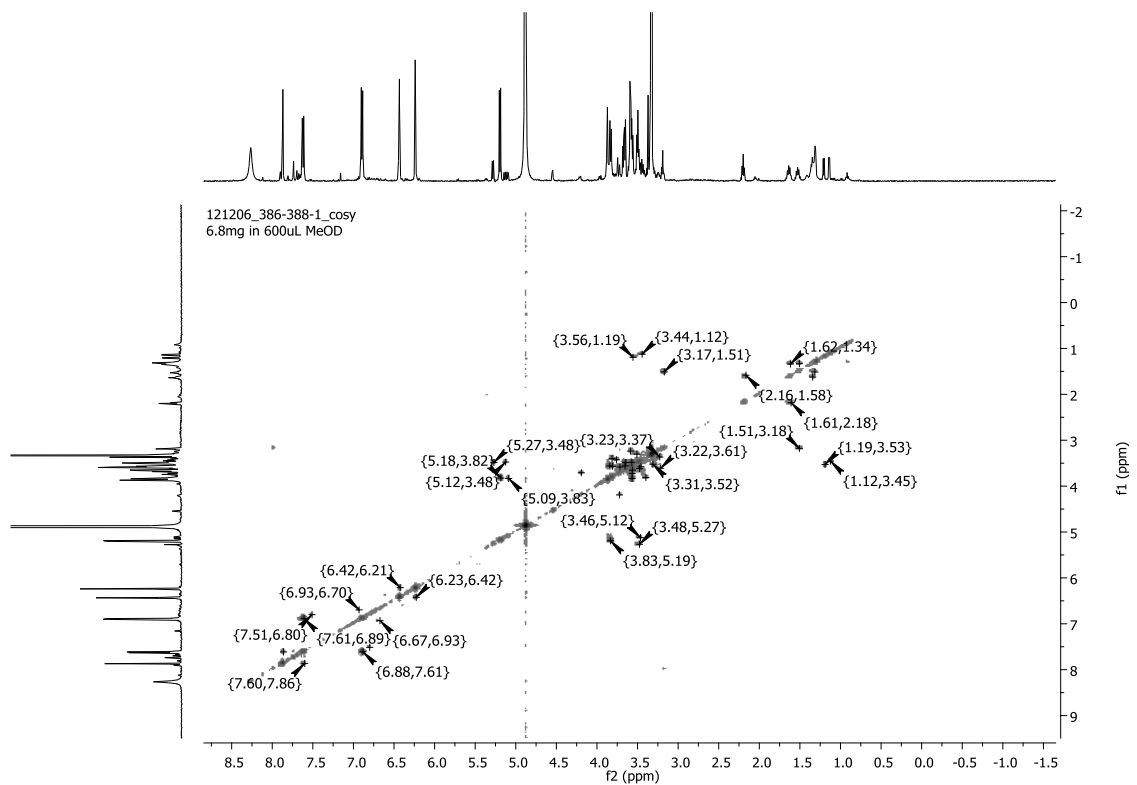


Figura 102 - Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-8 (DMSO-d₆; 11,7T).

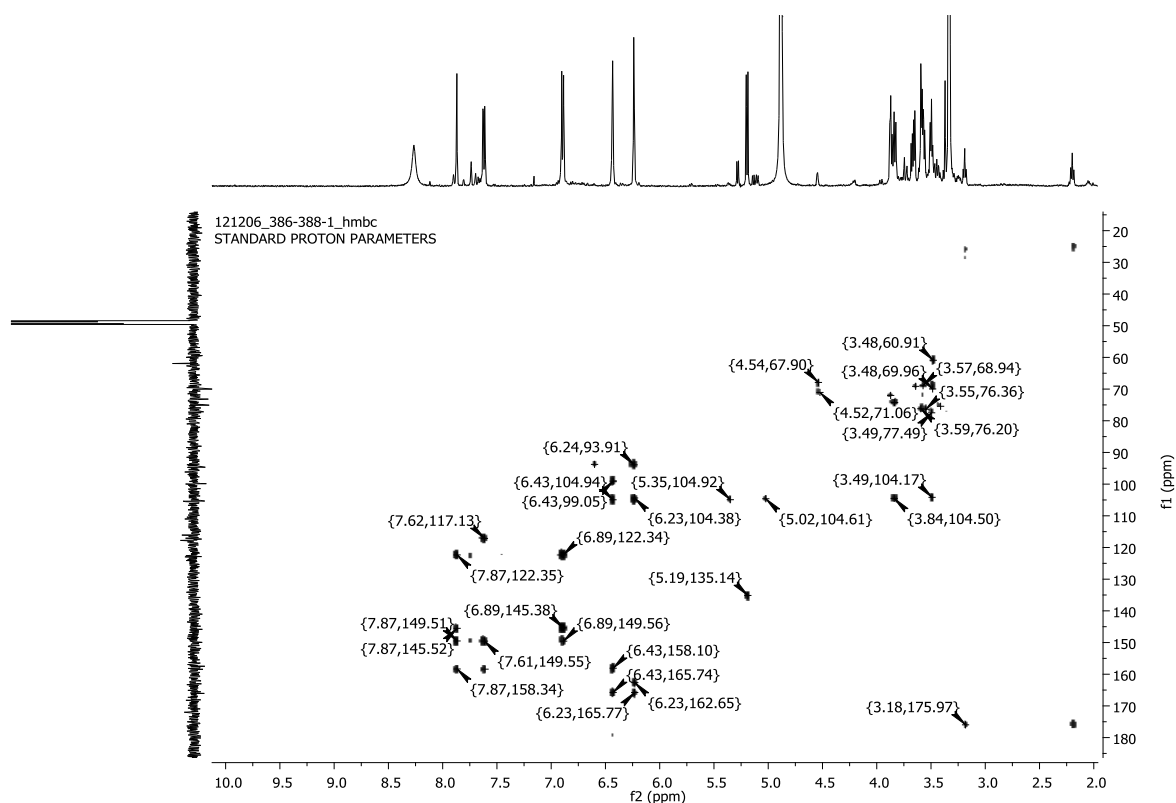


Figura 103 - Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-8 (DMSO-d₆; 11,7T).

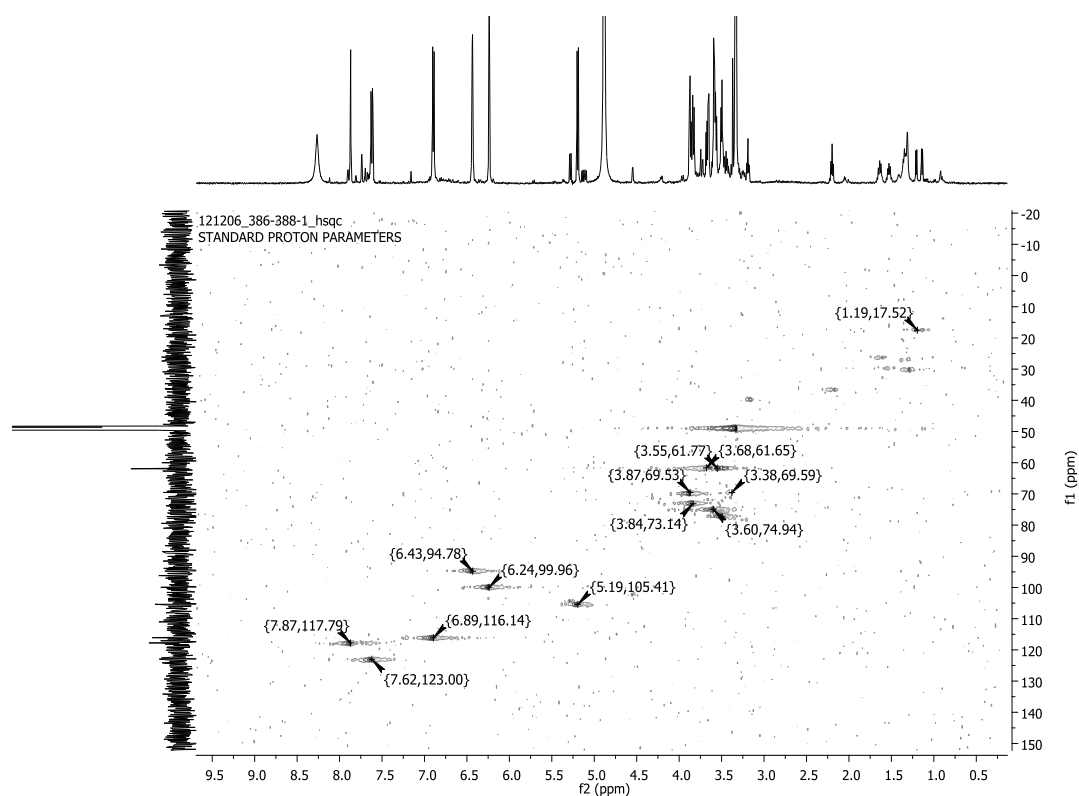


Figura 104 - Espectro de RMN 1D – TOCSY da substância de BM-8, irradiado em $\delta 5,32$ (DMSO- d_6 ; 11,7T).

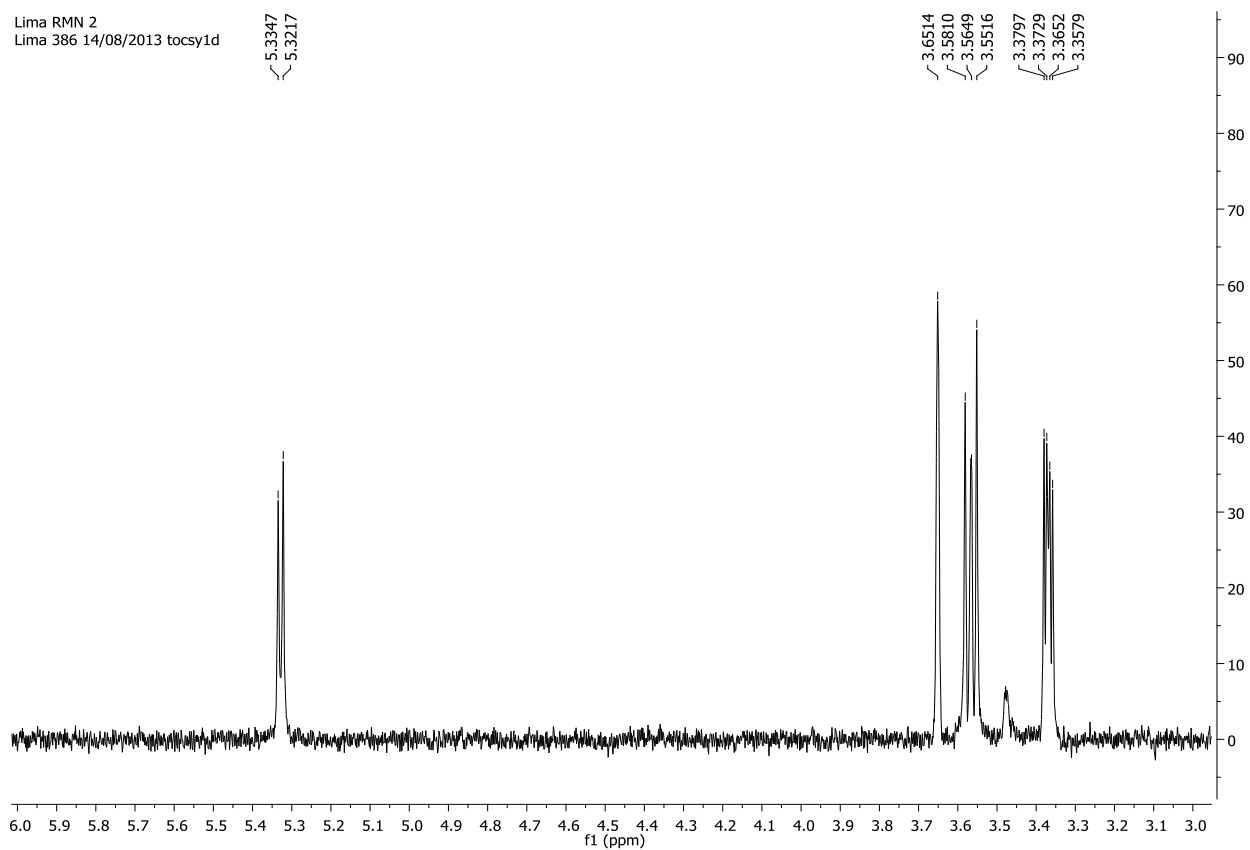


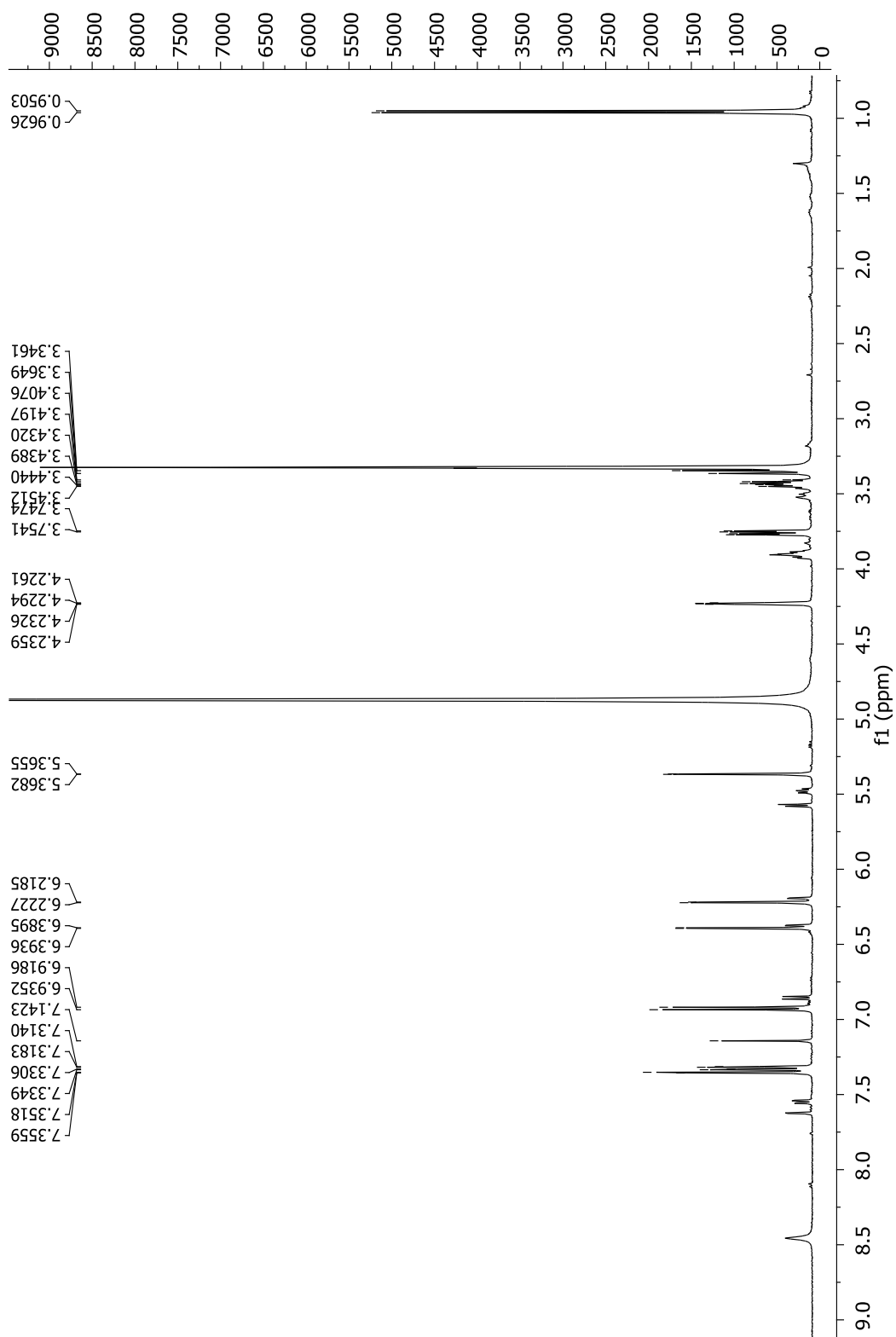
Figura 105 - Espectro de RMN de ^1H de BM-9 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

Figura 106 - Espectro de RMN de ^{13}C APT de BM-9 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

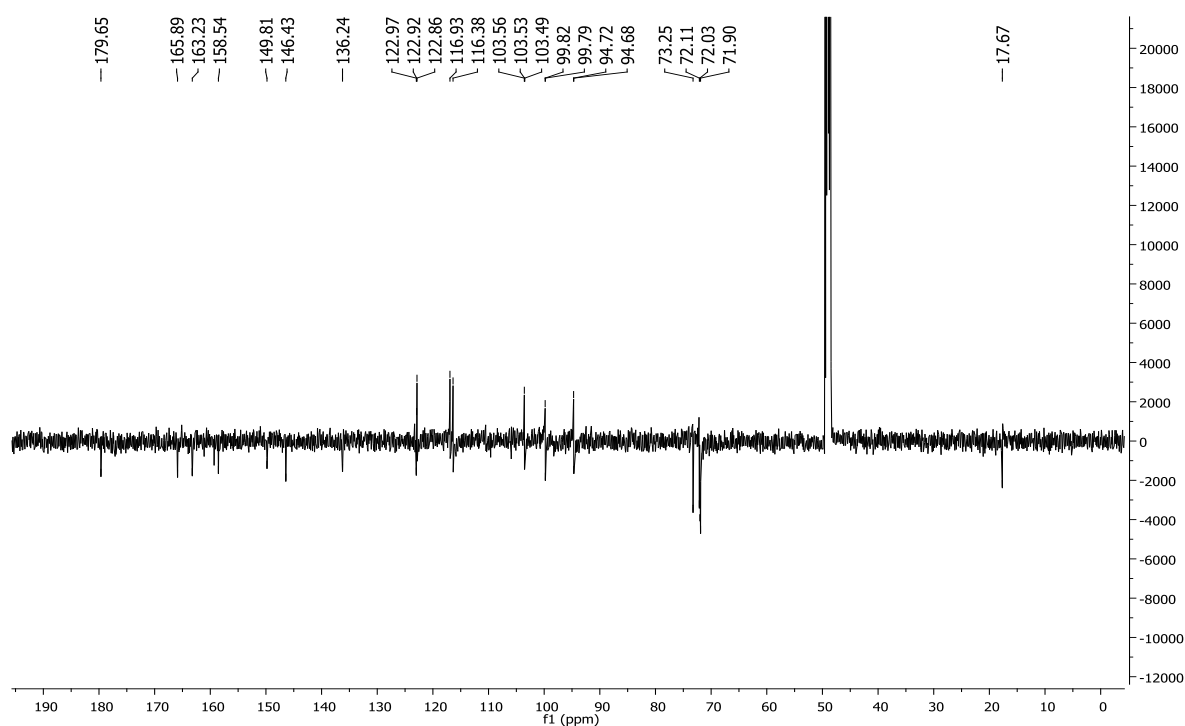


Figura 107 - Espectro de RMN de correlações entre H-H (COSY) de BM-9 (DMSO- d_6 ; 11,7T).

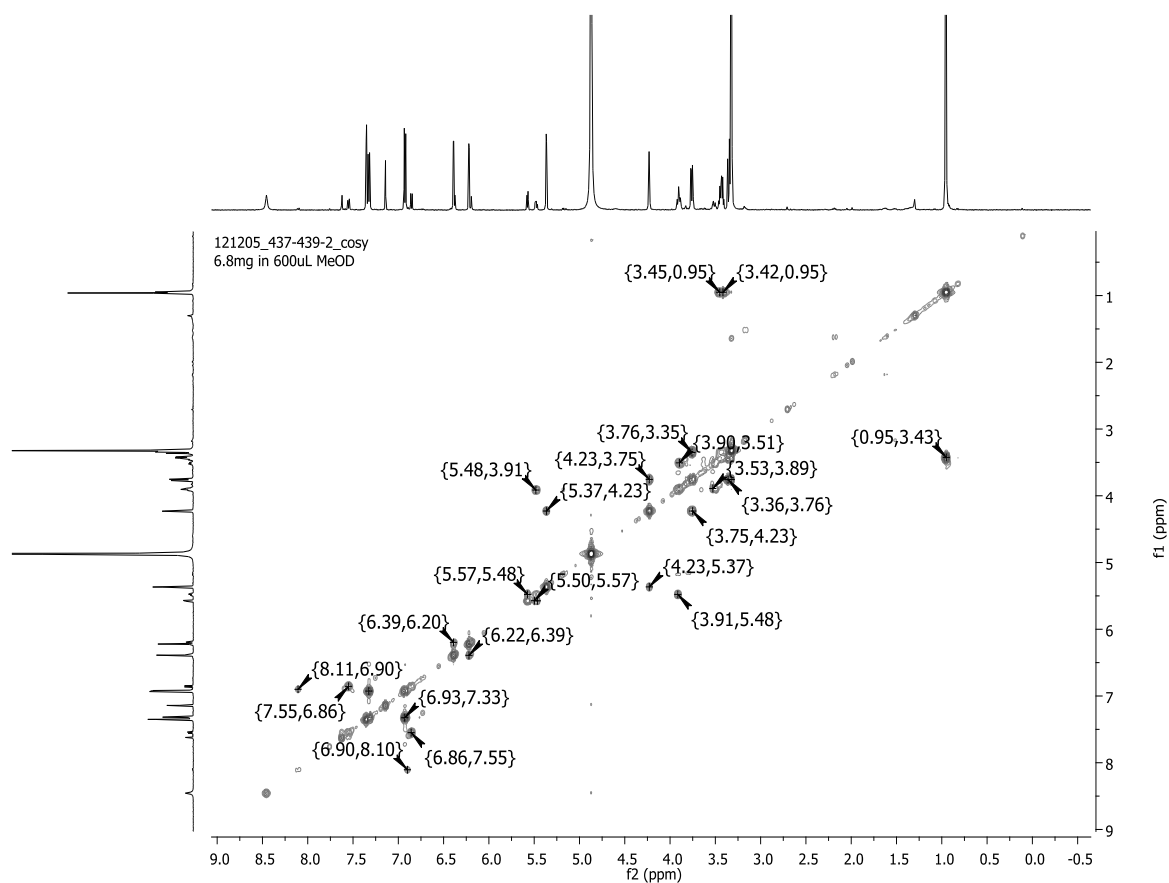


Figura 108 - Espectro de RMN de correlações HSQC de BM-9 (DMSO-d₆; 11,7T).

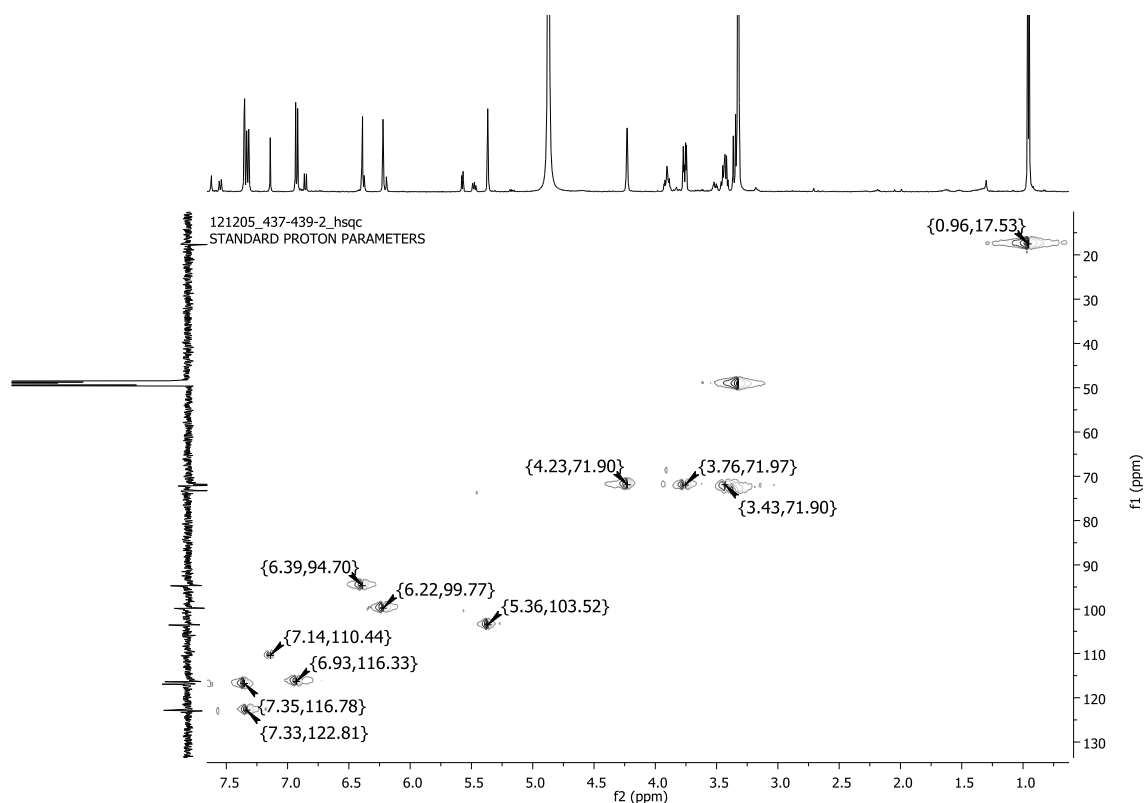


Figura 109 - Espectro de RMN de correlações HMBC de BM-9 (DMSO-d₆; 11,7T).

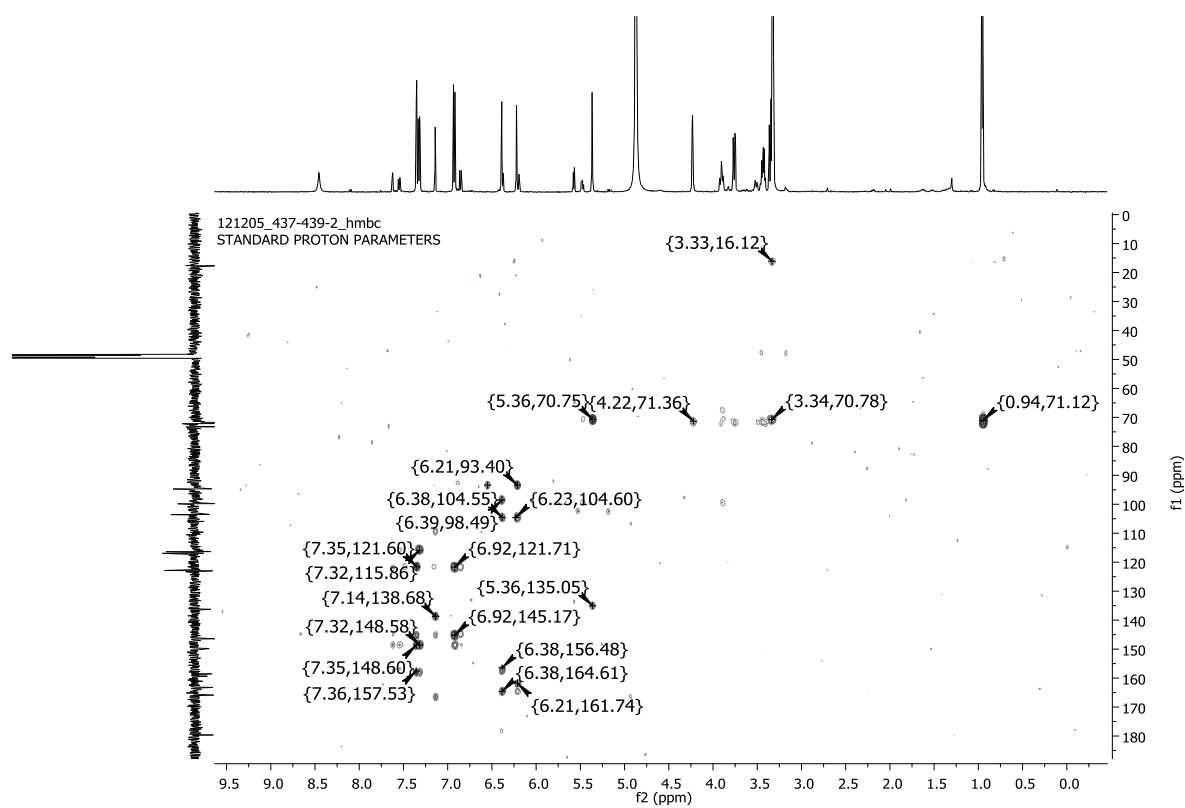


Figura 110 – Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Byrsonima correifolia*. (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).

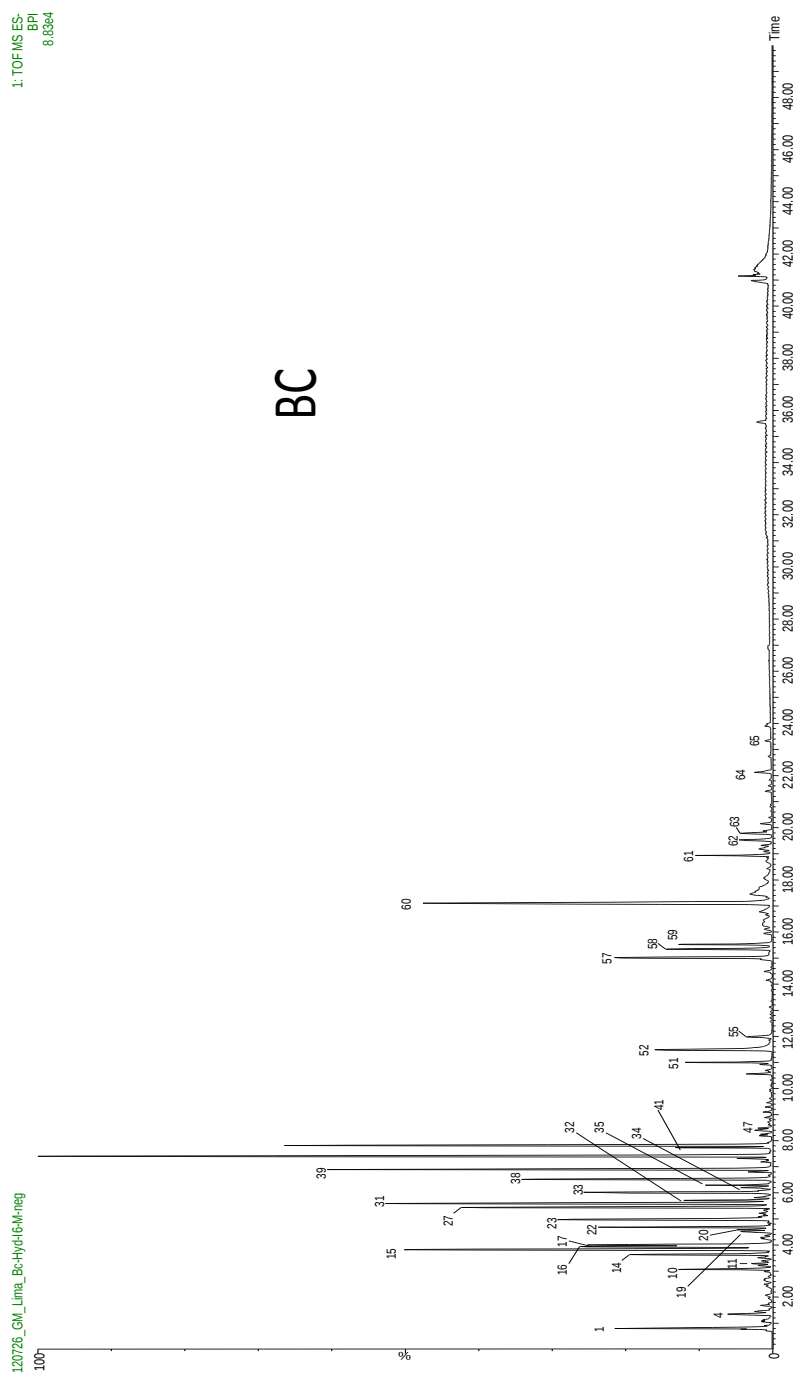


Figura 111 - Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Byrsonima coccolobifolia*. (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).

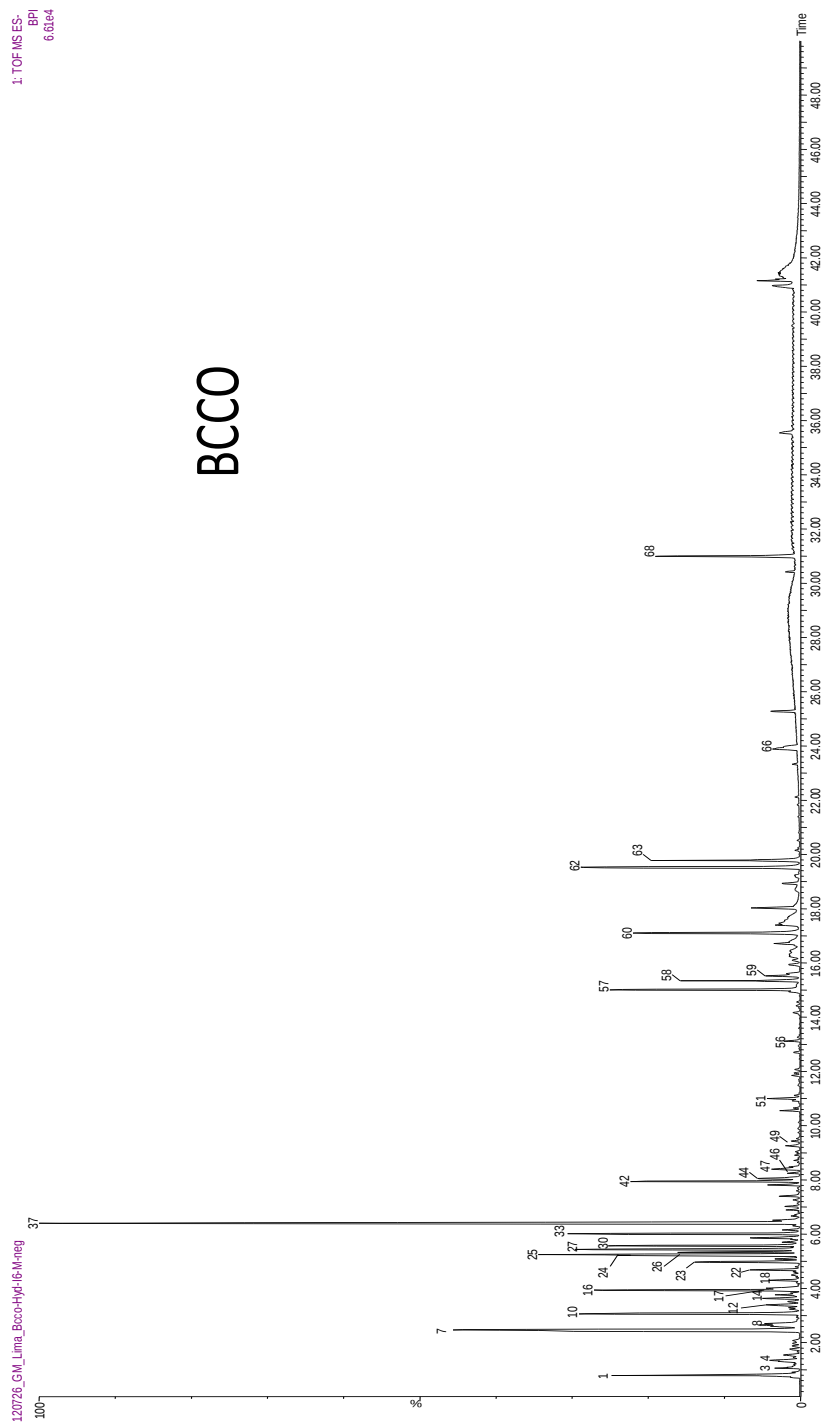


Figura 112 – Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Byrsonima fagifolia*. (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).

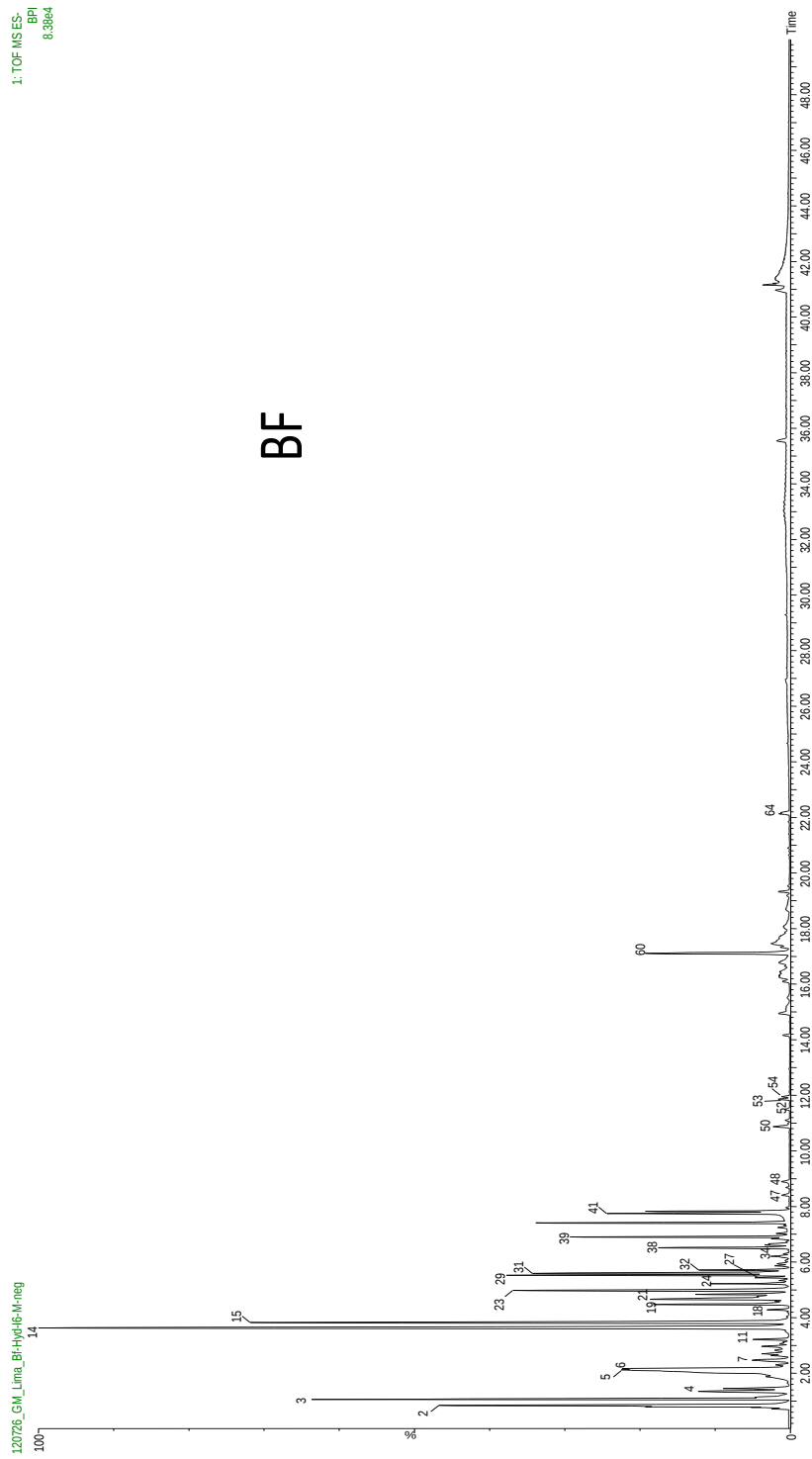


Figura 113 - Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Byrsonima intermedia*. (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).

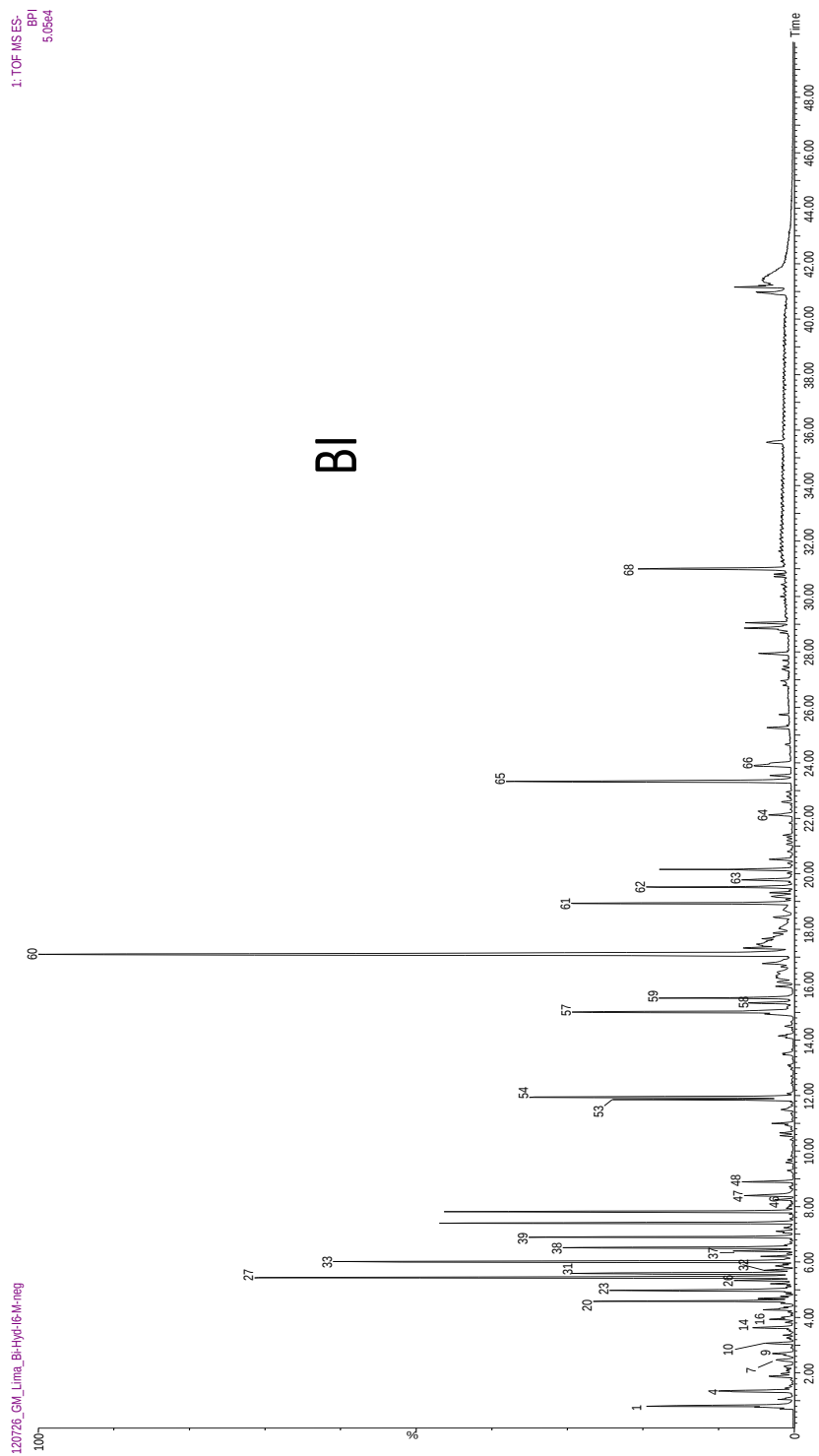


Figura 114 – Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Byrsonima ligustrifolia*. (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).

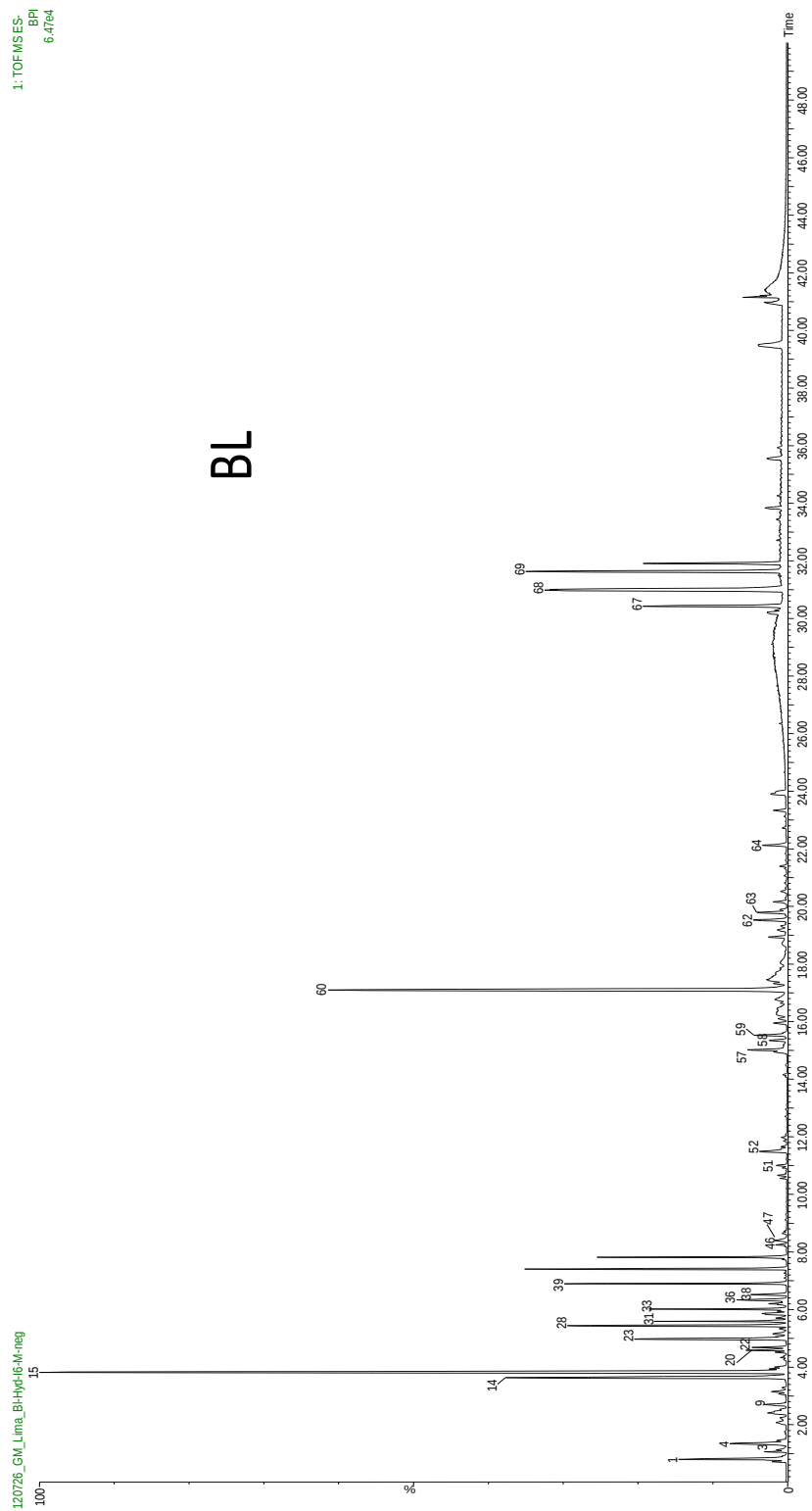


Figura 115 – Cromatograma obtido por UHPLC-PDA-ESI-TOF-MS do extrato hidroalcoólico das folhas de *Byrsonima verbascifolia*. (vide condições experimentais: item 3.2.4.12.).

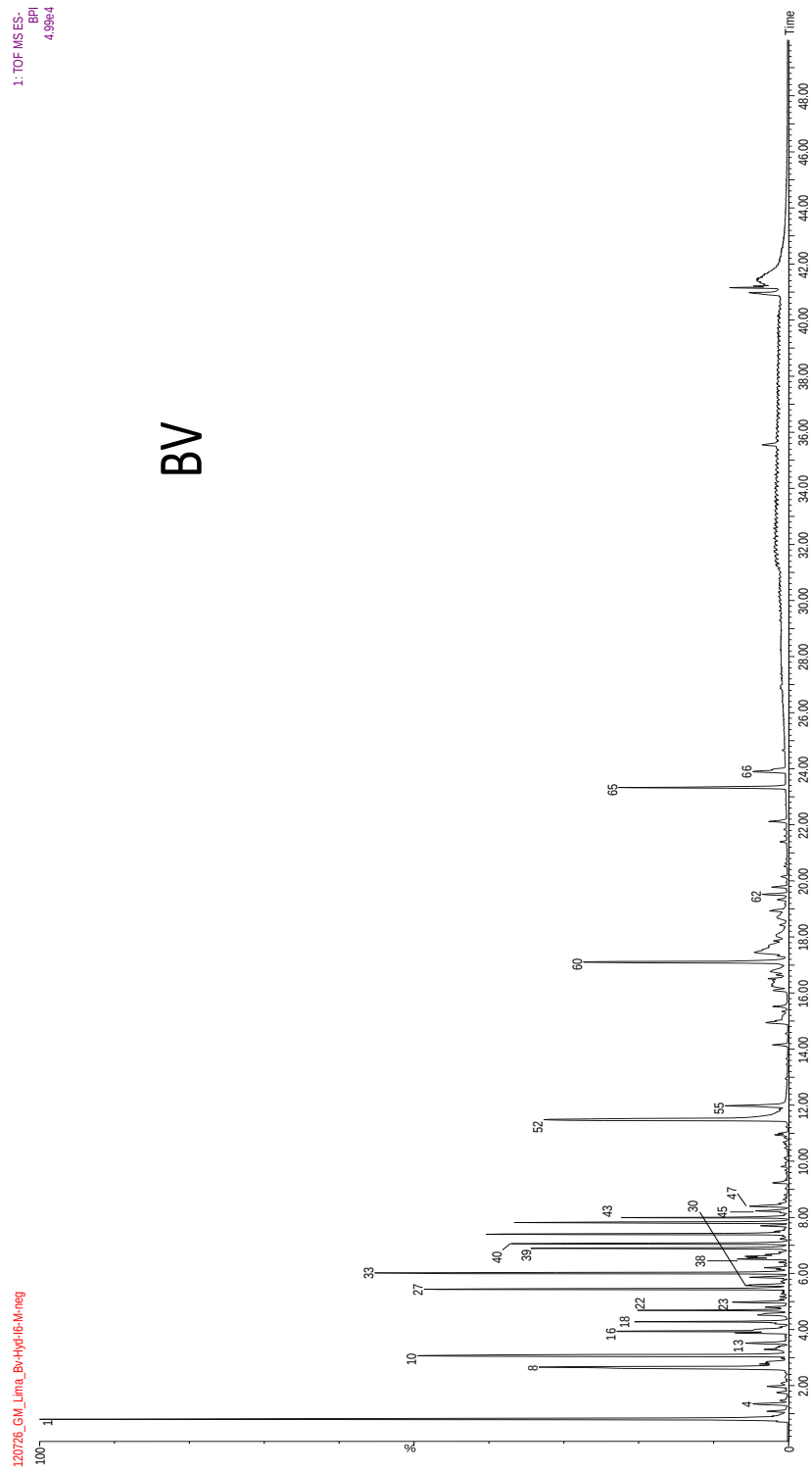


Figura 116 – Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato hidroalcoólico de *B. correifolia* avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).

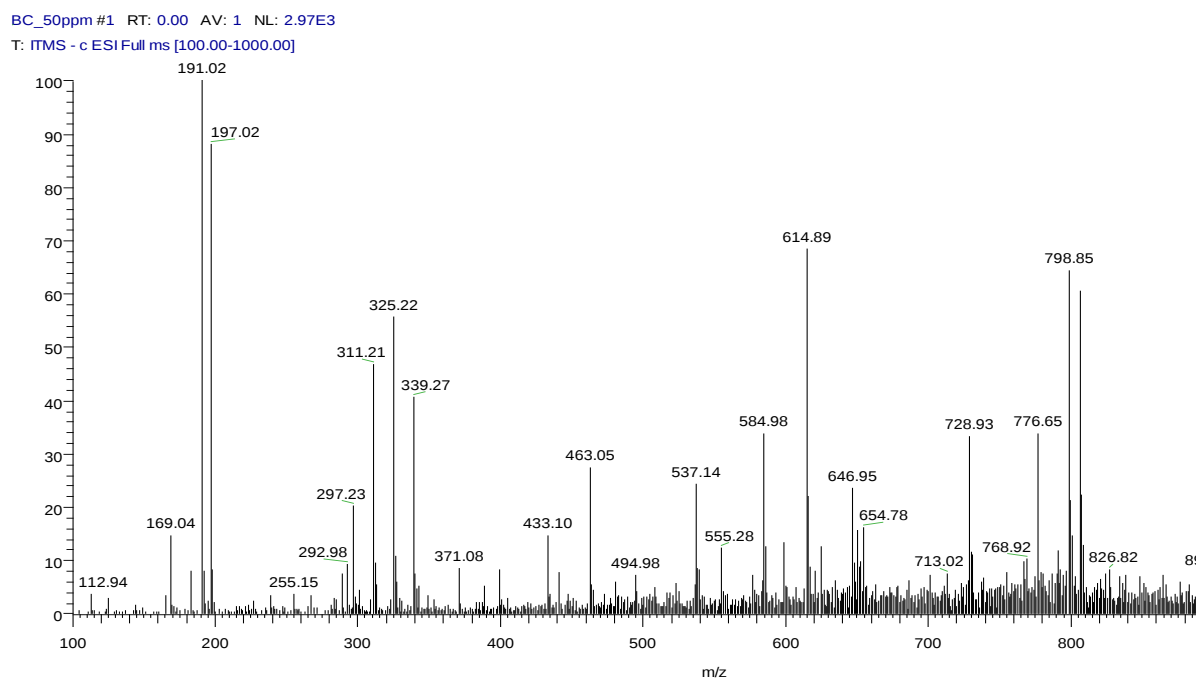


Figura 117– Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato hidroalcoólico de *B. coccolobifolia* avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).

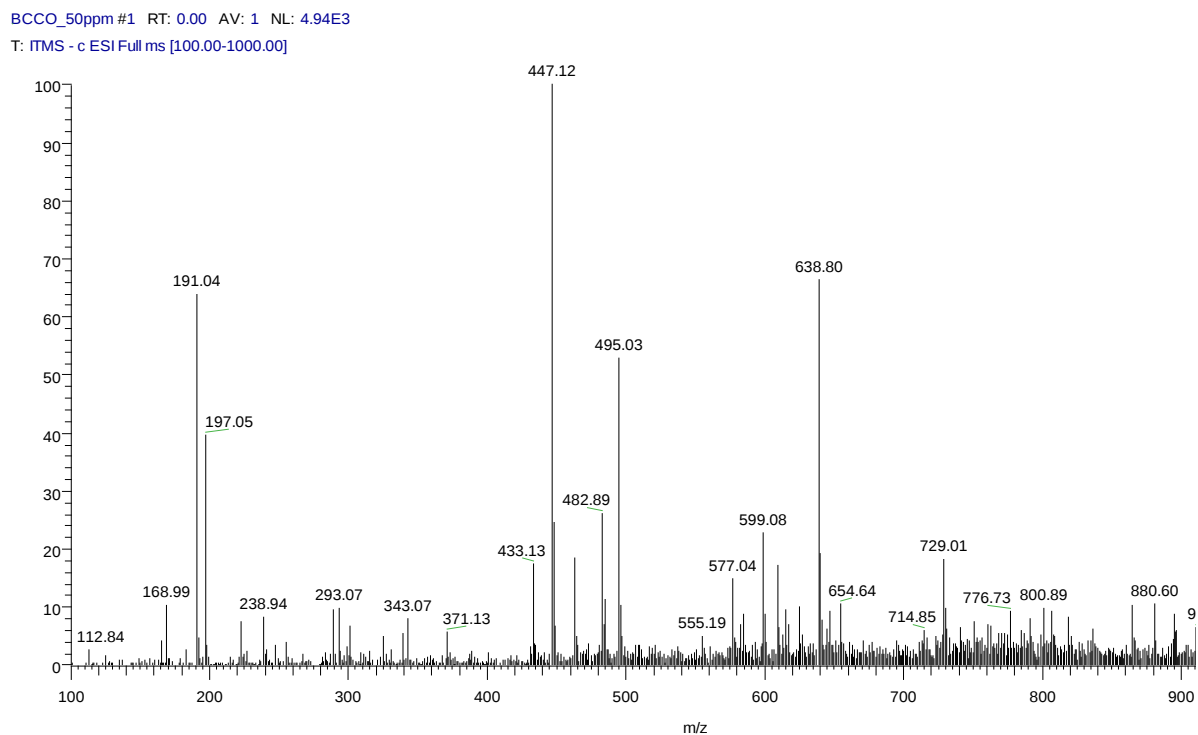


Figura 118 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato hidroalcoólico de *B. fagifolia* avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).

BF_50ppm #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.31E4
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

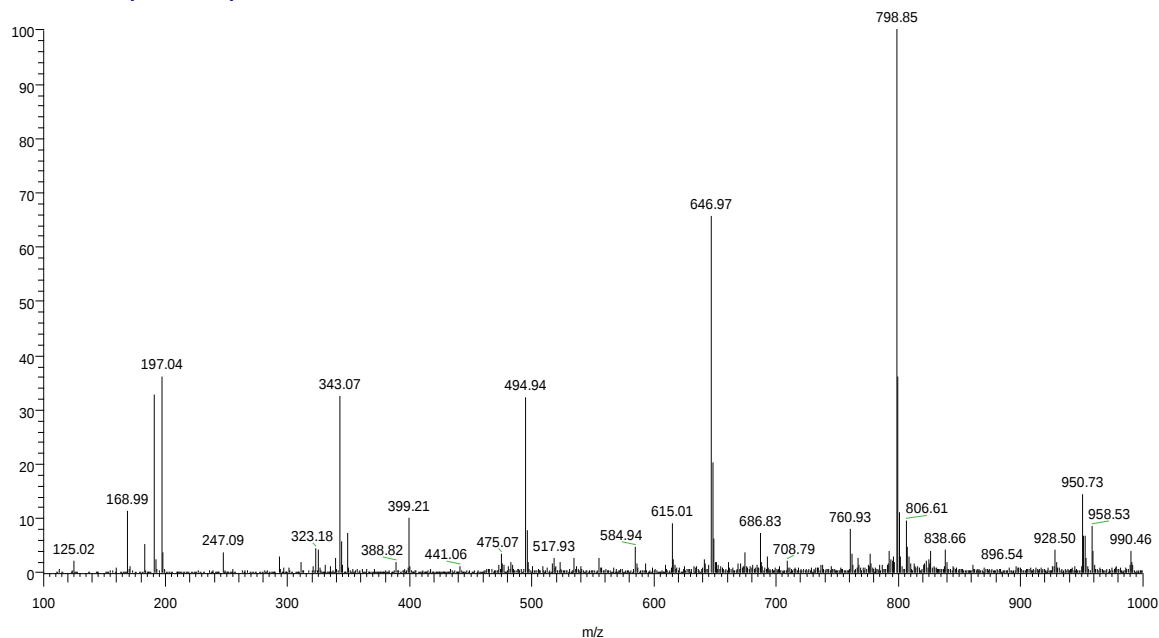


Figura 119 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato hidroalcoólico de *B. intermedia* avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).

BI_50ppm #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.51E3
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

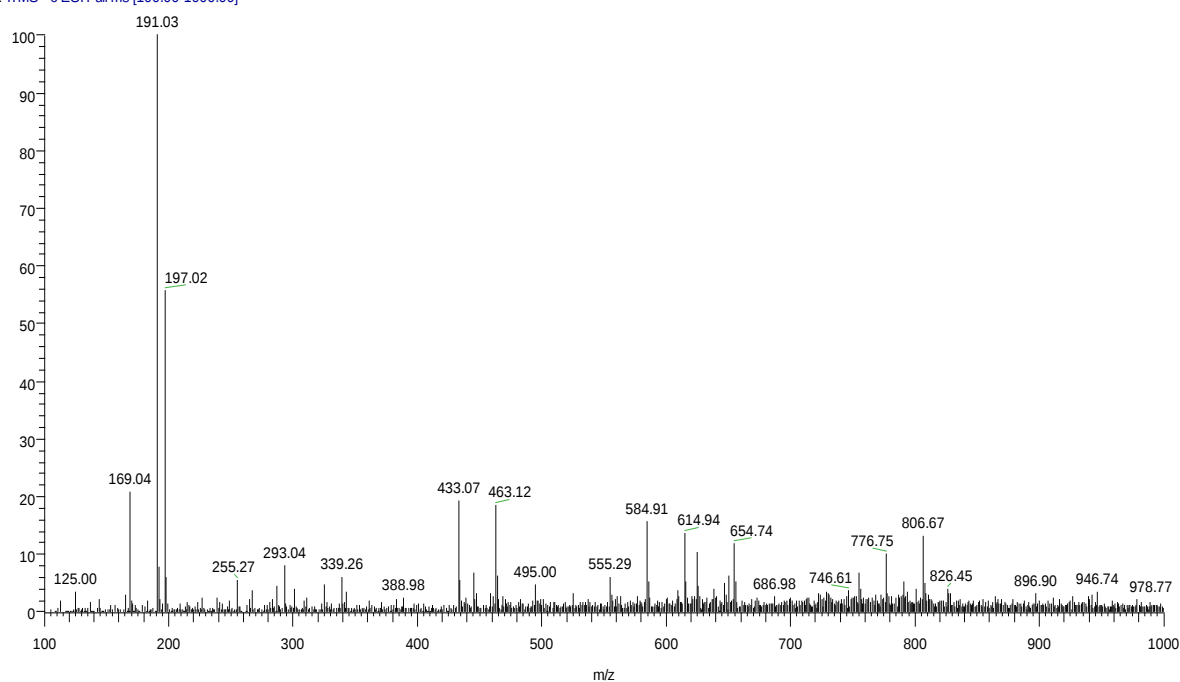


Figura 120 – Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato hidroalcoólico de *B. ligustrifolia* avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).

BL_50ppm #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.02E3
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

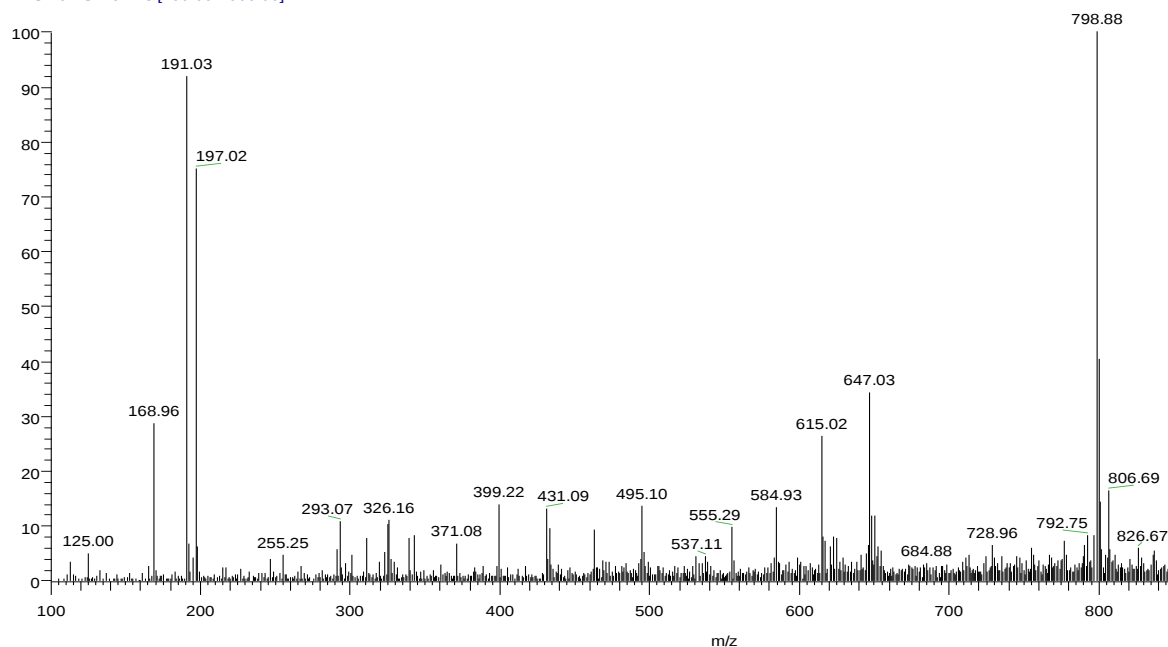


Figura 121 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, do extrato hidroalcoólico de *B. verbascifolia* avaliado em modo negativo. (vide condições espectrométricas: item 3.2.4.4.).

BV_50ppm #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.24E4
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]

