

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA

VIVIANE MAGRINI

**Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e
cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum*
Benth para testes de potencial de cosmético
funcional**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Química

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani
COORIENTADORA: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara - SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

M212e Magrini, Viviane
Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth para testes de potencial cosmético funcional / Viviane Magrini – Araraquara - SP : [s.n], 2016
147 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Rubiaceae. 2. Fenóis. 3. Antioxidantes. 4. Espectrometria de massa. 5. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

VIVIANE MAGRINI

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

Araraquara, 18 de fevereiro de 2016.

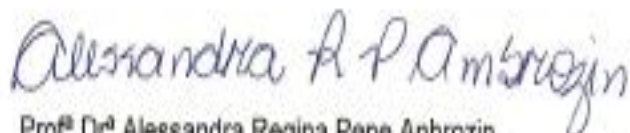
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Dr. Nivaldo Borallo
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Alessandra Regina Pepe Ambrozini
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFAL / Poços de Caldas - MG

DADOS CURRICULARES

Formação acadêmica

2014 – Atual

Mestrado em Química

Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp,
Araraquara, Brasil

Título: Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e
cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth
para testes de potencial de cosmético funcional

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani

Coorientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico (CNPq)

2009 – 2013

Graduação em Química.

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar,
São Carlos, Brasil

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Arthur
Bernardes (FUNARBE)

Formação acadêmica complementar

09/2012 – 12/2013

Estágio no setor de pesquisa na parte de Melhoramento
Genético

Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA
- Pecuária Sudeste, São Carlos, Brasil

Título: Melhoramento Genético de *Paspalum*

Orientador: Dr. Frederico de P. Matta e Dra. Alessandra
Fávero

Bolsista da: Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE)

03/2010 – 07/2012

Iniciação científica

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

Título: Obtenção de Formulação Inseticida à base de *Rauia* sp e *Stryphnodendron polyphyllum*

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Disciplinas cursadas durante o mestrado

1. Métodos Espectrométricos I (12 créditos), **conceito A**
2. Química Orgânica Avançada (12 créditos), **conceito A**
3. Teoria e Método de Separação, Isolamento e Purificação de Compostos Orgânicos (12 créditos), **conceito A**
4. Biossíntese de Produtos Naturais (06 créditos), **conceito A**

Total de créditos: 42 créditos

Participação em eventos científicos:

Apresentações de Trabalho

MAGRINI, V.; BOBEY, A. F.; FRAIGE, K.; SIQUEIRA, D. H.; BOLZANI, V. S. Phytochemical study of *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae) an Amazonian plant species traditionally used as skin protection, aiming at the identification of compounds useful for the cosmetic sector. 5th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP)/ XXXI RESEM, 2015, Atibaia - SP.

MAGRINI, V.; FRAIGE, K.; ZERAIK, M. L.; SIQUEIRA, D. H.; BOLZANI, V. S. Avaliação Biológica, Química e Cromatográfica de *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae). IX EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica Unicesumar, 2015, Maringá - PR.

MAGRINI, V.; BOBEY, A. F.; FRAIGE, K. ; SIQUEIRA, D. H.; BOLZANI, V. S. Identificação de flavonol diglicosilado em *Calycophyllum spruceanum* Benth visando o setor cosmético. IX EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica Unicesumar, 2015, Maringá - PR.

MAGRINI, V.; FERNANDES, J. B.; Bondancia, Tatiani M.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; VIEIRA, P. C.; BARBOSA, A. Atividade inseticida das frações de caule e folha de *Rauia* sp sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). XX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2013, São Carlos - SP.

MAGRINI, V.; DIAS, M.; COSTA, A. C. S.; SOUZA, G. B.; VIGNA, B. B. Z. ; FAVERO, A. P.; MATTA, F. P. A espectroscopia de refletância no infravermelho e a interação genótipo X ambiente. XVII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica - UniVap, 2013, São José dos Campos - SP.

MAGRINI, V.; DIAS, M.; SOUZA, G. B.; MATTA, F. P.; FAVERO, A. P. Uso da espectroscopia de refletância no infravermelho próximo visando uma análise discriminatória de diferentes cultivares do gênero *Paspalum*. V Jornada - Embrapa São Carlos, 2013, São Carlos - SP.

MAGRINI, V.; FERNANDES, J. B.; BONDANCIA, T. M.; FREITAS, T. G.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C. Atividade inseticida de ácidos graxos de *Rauia* sp. sobre formigas cortadeiras. XIX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2012, São Carlos - SP.

MAGRINI, V.; FERNANDES, J. B.; BONDANCIA, T. M.; FREITAS, T. G.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C. Atividade inseticida de extratos brutos de *Rauia* sp. (Rutaceae) sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). XIX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2011, São Carlos - SP.

MAGRINI, V.; FERNANDES, J. B.; BONDANCIA, T. M.; FREITAS, T. G.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C. Atividade inseticida de ácidos graxos de *Rauia* sp sobre

formigas cortadeiras. III Workshop sobre a avaliação de desempenho - CBIP, 2011, São Carlos - SP.

MAGRINI, V. FERNANDES, J. B.; BONDANCIA, T. M.; FREITAS, T. G.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C. Atividade inseticida de extratos brutos de *Rauia* sp. (Rutaceae) sobre operárias de *Atta Sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). II Workshop sobre a avaliação de desempenho - CBIP, 2010, São Carlos - SP.

MAGRINI, V.; FERNANDES, J. B.; BONDANCIA, T. M.; FREITAS, T. G.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C. Atividade inseticida de extratos brutos de *Rauia* sp. (Rutaceae) sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2010, São Carlos - SP.

*Dedico este trabalho a Deus por
mais essa oportunidade e vitória
em minha vida !*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, bênçãos, por mais essa oportunidade alcançada com êxito, pela sabedoria, força, luz, paz nos momentos em que eu mais necessitei, e também por ter colocado pessoas boas em meu caminho ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais Lirislene e Alexandre pelo amor, carinho, pelas orações, enorme dedicação, amizade, por me ensinarem os verdadeiros valores da vida e me apoiarem em todas as minhas escolhas, por terem investido nos meus estudos ao longo da minha vida e por me ampararem nos momentos mais difíceis que enfrentei ao longo de toda essa jornada.

À torcida de minhas queridas ‘Vó Beli’ e ‘Vó Maria’, pelas orações, preocupação, amor, carinho, cuidado, por todo incentivo que vocês sempre me dão, de alguma forma.

Ao meu amor e companheiro de todos os momentos Guilherme pelas inúmeras conversas quando eu mais precisei, pelo amor, carinho, apoio, dedicação, compreensão, orações, paciência, força, amizade, por acreditar na minha capacidade e que venceríamos mais essa etapa.

A professora Vanderlan pela oportunidade de fazer parte do seu time de “jovens pesquisadores”, orientação, pelos ensinamentos pessoais e profissionais durante todo o mestrado. Agradeço o incentivo e a confiança depositada para a execução deste trabalho. Essa etapa dentro do grupo NuBBE foi fundamental para o meu amadurecimento pessoal e crescimento profissional.

Aos membros da banca que aceitaram gentilmente avaliar esta dissertação, contribuindo bastante para o aprimoramento de meu trabalho e minha formação profissional.

Aos professores do NuBBE (IQ - Unesp) e do Departamento de Química Orgânica pelos ensinamentos de Química e a cerca do mundo científico, tanto em sala de aula quanto nos corredores.

Ao Programa de Pós - Graduação, pela oportunidade dada para realizar os estudos de mestrado.

Ao Prof. Dr Norberto Peporine Lopes e ao especialista em Laboratório José Carlos Thomaz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP Ribeirão Preto - SP), pelas análises CLAE-DAD-EM executadas em seu laboratório.

A Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni e a Dra. Bianca Ferreira, Laboratório NDCOM (Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (Unesp - Araraquara - SP), pelas análises CLAE-EM-EM e EM-IES realizadas em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre e ao técnico João Bronzel, Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química (Unesp - Araraquara - SP), pelos experimentos de EM-EM/ IES realizados em seu laboratório.

Aos técnicos Juliana, Bianca, João e Nivaldo pelas conversas, conselhos, amizade, por tornarem a rotina e as análises mais divertidas e leves, por todo ensinamento, enorme paciência e atenção em relação às minhas dúvidas/curiosidades sobre muitas questões deste trabalho de mestrado. Agradeço pelo auxílio, disposição e dedicação da melhoria das análises para colaborar na identificação estrutural das substâncias.

Aos colegas do Instituto de Química e do NuBBE pela convivência e conversas acadêmicas e informais nos corredores.

Aos amigos “Iluminados” Julia, Maiara, Gigi, Tony, Gustavo pela amizade que construímos, pelos momentos de descontração, apoio, força e paciência em todos os momentos que precisei de ajuda, tanto nos trabalhos científicos, quanto à amizade nos momentos alegres, tristes e tensos do dia a dia.

A Karina pela amizade, grande ajuda, atenção, paciência e conselhos durante a execução do meu trabalho.

A Paula, Bruninha e Lidiane pela amizade e conversas informais que me auxiliaram bastante no meu trabalho científico.

Aos estudantes de IC, MS, Dr. e aos pós-docs orientados pela minha orientadora Vanderlan, “*Bolzani Team*”, pelo convívio diário e pelo aprendizado vindo do trabalhar juntos.

A Vilma e às funcionárias da Seção Técnica de Pós - Graduação e Biblioteca pela atenção e ajuda indispensável.

A todos que estiveram comigo e contribuíram de forma direta ou indireta para a realização e finalização desta pesquisa no cronograma estabelecido com sucesso. Agradeço também pelas muitas lembranças agradáveis que ficaram deste período de Mestrado.

À CNPq pelo apoio financeiro e bolsas concedidos durante o mestrado.

Muito obrigada !!

“Toda mudança cobra um alto preço emocional.

Antes de se tomar uma decisão difícil,

e durante a tomada, chora-se muito,

os questionamentos são inúmeros,

a vida se desestabiliza.

Mas então, chega o depois, a coisa feita,

e aí a recompensa fica escancarada na face.

Mudanças fazem milagres por nossos olhos.”

(Autor desconhecido)

“Trabalhe por uma causa e não por aplausos.

Viva a vida para expressar e não para impressionar (...)”

(Autor desconhecido)

RESUMO

O gênero *Calycophyllum* pertence à família Rubiaceae, conhecida pela diversidade de metabólitos secundários, e pela variedade de atividades biológicas: antifúngica, bactericida, antiviral e inseticida. A espécie vegetal *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae) é muito utilizada pelas populações da América do Sul no combate a doenças dermatológicas, estomacais, diabetes, parasitoses, câncer, entre outras, despertando o interesse pela investigação química deste táxon. A presente pesquisa objetivou o estudo bio-guiado dos extratos obtidos das folhas, galhos e de cascas do caule de *C. spruceanum* visando à identificação das substâncias bioativas isoladas, incluindo as inativas. A meta é identificar nas substâncias isoladas aquelas com propriedades cosméticas associadas ao uso popular desta espécie, conhecida na região Amazônica por esta propriedade. Diferentes extratos foram preparados e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H), acompanhados por ensaios biológicos (ensaio de capacidade redutora dos radicais DPPH $^\cdot$ e ABTS $^{\cdot+}$) para determinação de atividade antioxidante. O direcionamento do estudo foi feito em função dos ensaios antioxidantes aplicados aos extratos, conduzindo o estudo experimental para o extrato hidroetanólico de folhas ao foco do estudo, por ter apresentado a maior atividade antioxidante. Por meio de métodos espectroscópicos e espectrométricos (CLAE-DAD, CLAE-EM, CLAE-EM/EM; RMN de ^1H e ^{13}C ; TOCSY 1D; HMBC; EM-IES) deste extrato e respectivas frações, pode-se identificar algumas substâncias antioxidantes potencialmente ativas, sendo estas: ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico; duas séries homólogas de proantocianidinas (tipo-B) com grau de polimerização de 1 a 4, e proantocianidinas monoglicosiladas (tipo-B *O*-glicosilada) com grau de polimerização de 1 a 3; ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico, quercetina 3-*O*- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo, ácido cafeoilquínico e canferol 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopiranosídeo. Espera-se que ao final deste estudo, as informações forneçam subsídios para uma possível aplicação dos resultados científicos sobre a espécie vegetal, visando um produto para a linha de cosmético funcional.

Palavras – chaves: *Calycophyllum spruceanum*; Rubiaceae; CLAE; EM-IES; RMN; Fenólicos; Antioxidantes.

ABSTRACT

The *Calycophyllum* genus belongs to the Rubiaceae's family, known for its high diversity of secondary metabolites, which have a wide range of biological activities (antifungal, antibacterial, antiviral and pesticide). It is widely used by the people of South America against skin diseases, stomach, diabetes, parasites, cancer, among others. It is therefore essential to study the chemical composition of these species used in folk medicine, aiming to validate the traditional use, with scientific data and thus contributing to the search for new bioproducts. This research aimed the bio-guided fractionation of the extracts from the leaves, branches and stem bark extracts of *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae), to identify the secondary metabolites in the extracts and fractions, including bioactive ones, for further evaluation of the cosmetic potential of this species, commonly known in the Amazon region. Different extracts were prepared and analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H NMR), and screened by biological assays (assay of reducing capability of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ and $\text{DPPH}^{\cdot}$ radicals) to determine the antioxidant activity. The chemical investigation was carried out based on the antioxidant activity of the extracts. The experimental study focused on the hydroethanolic extract of leaves, that presented the higher antioxidant activity, which would support the traditional uses of this specie as cosmetic. By means spectroscopic and spectrometric analysis (HPLC-DAD, HPLC-MS, HPLC-MS/MS; ^1H NMR and ^{13}C ; TOCSY 1D; HMBC, ESI-MS) of this extract and its fractions, some compounds were identified: the 3,5-di-*O-E*-caffeoylquinic acid; two homologous series of proanthocyanidins (B-type) with a degree of polymerization from 1 to 4 and monoglicosyl proanthocyanidins (B-type *O*-glycosylated) with degree of polymerization from 1 to 3; 1,4-di-*O-E*-caffeoylquinic acid, quercetin-3-*O*- α -arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopyranoside, caffeoylquinic acid and kaempferol 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopyranosil, which could be responsible for the activity. It is expected that the the complete study of this species provide chemical information, which will validate this plant specie as a potential source of antioxidant natural products that could be material for functional cosmetics.

Keywords: *Calycophyllum spruceanum*; Rubiaceae; HPLC; ESI-MS; NMR; Phenolics; Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama exemplificando a definição de cosmecêutico.....	29
Figura 2 - Fotos da árvore <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth.....	32
Figura 3 - Estrutura química geral de um flavonoide.....	42
Figura 4 - Esqueletos carbônicos bases das subclasses dos flavonoides	43
Figura 5 - Estruturas dos monômeros das proantocianidinas	44
Figura 6 - Exemplos de alguns dos representantes dos grupos de ACG	46
Figura 7 - Teste de potencial antioxidante de DPPH [·] das diferentes amostras em diferentes concentrações.	51
Figura 8 - Teste de potencial antioxidante de ABTS ^{·+} das diferentes amostras em diferentes concentrações.	52
Figura 9 - Esquema ilustrativo de mecanismo de reação entre o radical DPPH [·] e uma espécie antioxidante canferol (ilustrativo).....	59
Figura 10 - Mecanismo de formação de ABTS ^{·+} (a); Mecanismo de reação entre ABTS ^{·+} e agente antioxidante canferol (ilustrativo).	60
Figura 11 - Cromatogramas dos extratos metanólico e hidroetanólico das folhas de <i>C. spruceanum</i>	63
Figura 12 - Cromatogramas dos extratos metanólico e hidroetanólico de galhos de <i>C. spruceanum</i> . Condições de análise descritas na Fig. 11.	63
Figura 13 - Cromatogramas dos extratos metanólico, hidroetanólico e aquoso das cascas de caule de <i>C. spruceanum</i> . Condições de análise descritas na Fig. 11.	64
Figura 14 - Espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, dos extratos das folhas de <i>C. spruceanum</i> :a) CFEM; b) CFEHidr. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	65
Figura 15 - Espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, dos extratos de galhos de <i>C. spruceanum</i> :	65
a) CGEM; b) CGEHidr. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	65
Figura 16 - Espectros de RMN de ¹ H, com pressaturação, dos extratos de cascas do caule de <i>C. spruceanum</i> : a) CCEM; b) CCEHidr; c) CCEAq. (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).66	66
Figura 17 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de folhas. Condições de análise descritas na Fig. 11.	67
Figura 18 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de galhos. Condições de análise descritas na Fig. 11.	67
Figura 19 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de cascas do caule. Condições experimentais descritas na Fig. 11.	68
Figura 20 - Espectros de RMN de ¹ H, com dupla irradiação, das frações do extrato hidroetanólico das folhas a) CFEHidr – Fração B; b) CFEHidr – Fração C; c) CGEHidr – Fração C; d) CCEHidr – Fração B; e) CCEHidr – Fração C. (MeOD- <i>d</i> ₄ , supressão do sinal em 3,3 e 4,9 ppm, 600 MHz).	69
Figura 21 - Cromatograma da fração B do extrato hidroetanólico das folhas de <i>C. spruceanum</i>	70
Figura 22 - Cromatograma da fração C do extrato hidroetanólico das folhas de <i>C. spruceanum</i>	71
Figura 23 - Cromatograma da fração C do extrato hidroetanólico de galhos de <i>C. spruceanum</i>	71

Figura 24 - Cromatograma da fração B do extrato hidroetanólico de cascas do caule de <i>C. spruceanum</i> .	71
Figura 25 - Cromatograma da fração C do extrato hidroetanólico de cascas do caule de <i>C. spruceanum</i> .	72
Figura 26 - Cromatograma em $\lambda=254$ nm e cromatograma de íon totais (TIC) da fração B de CFEHidr no modo negativo, sendo a faixa de varredura de 50 a 1000 Da.	74
Figura 27 - Espectros de massas de primeira ordem, em infusão direta da fração B de CFEHidr no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	76
Figura 28 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 515. Faixa de íons 50 a 600 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	76
Figura 29 - Proposta de mecanismo de fragmentação do ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	77
Figura 30 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração B de CFEHidr via CLAE-analítico ($t_R = 41,34$ min).	77
Figura 31 - Espectros de massas de primeira ordem, em infusão direta da fração B de CFEHidr no modo negativo. Faixa de massa 250 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	78
Figura 32 - Espectros de massas de primeira ordem, em infusão direta da fração B de CFEHidr no modo negativo. Faixa de massa 1000 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	79
Figura 33 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 577. Faixa de massa 50 a 600 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	80
Figura 34 - Proposta de mecanismo de fragmentação do dímero de [epi]catequina (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels - Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).	81
Figura 35 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 865. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	82
Figura 36 A) e B) - Proposta de mecanismo de fragmentação do trímero de [epi]catequina (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels-Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).	83
Figura 37 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 739. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	85
Figura 38 A) e B) - Proposta de mecanismo de fragmentação do dímero de [epi]catequina monoglicosilado (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels-Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).	87

Figura 39 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 1027. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	89
Figuras 40 A) e B) - Proposta de mecanismo de fragmentação do trímero de [epi]catequina monoglicosilado (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels - Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).	90
Figura 41 - Cromatograma em $\lambda=254$ nm e cromatograma de íons totais (TIC) da fração C de CFEHidr, no modo negativo, sendo a faixa de varredura de 50 a 1000 Da.....	93
Figura 42 - Cromatograma da fração C, do extrato hidroetanólico de folhas, via CLAE-EM/EM (Seção 3.4.5).....	95
Figura 43 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 15,08 min, no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	96
Figura 44 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração C, no tempo de t_R 15,85 min, do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE- analítico.	97
Figura 45 - Cromatogramas das frações C e 3 do extrato hidroetanólico de folhas..	98
Figura 46 - Espectro de massas referente ao canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo (tempo de retenção 20,0 min), no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).....	99
Figura 47 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração C, no tempo de t_R 20,74 min, do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-analítico.	100
Figura 48 - Cromatogramas das frações C e 5 do extrato hidroetanólico de folhas.	100
Figura 49 - Espectro de massas do ácido 1,4-di-O-E-cafeoilquínico (tempo de retenção 21,6 min), no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	102
Figura 50 - Proposta de mecanismo de fragmentação do ácido 1,4-di-O-E-cafeoilquínico.	103
Figura 51 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração C, no tempo de t_R 22,78 min, do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE- analítico.	104
Figura 52 - Cromatograma do extrato hidroetanólico das folhas via CLAE-DAD em escala preparativa.	105
Figura 53 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE –preparativo.	106
Figura 54 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda da fração 3 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-preparativo.	107
Figura 55 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração 3 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE- preparativo.	107
Figura 56 - Estrutura química de quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.	108
Figura 57 - Espectros de RMN de 1H pressat. da fração 3 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , supressão do sinal em 4,9 ppm, 14,1 T).	109

Figura 58 - Expansão do espectro de RMN de ^1H pressat. da fração 3 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 e D_2O , supressão do sinal em 4,9 ppm, 14,1 T).	111
Figura 59 - Espectro de massas de primeira ordem, modo positivo <i>full scan</i> , da fração 3 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	112
Figura 60 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 597,1446 em modo positivo com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	113
Figura 61 - Proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(+) para quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.	114
Figura 62 - Espectro de massas de primeira ordem, modo negativo <i>full scan</i> , da quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo, presente na amostra fração 3 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	115
Figura 63 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 595,1241 em modo negativo com energia de colisão 30 eV para quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo (Seção 3.4.5).	115
Figura 64 - Proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(-) para quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.	116
Figura 65 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 353 em modo negativo com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	117
Figura 66 - Proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(-) para o ácido cafeoilquínico.	118
Figura 67 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda da fração 5 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE- preparativo.	119
Figura 68 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração 5 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - preparativo.	119
Figura 69 - Estrutura química de canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo.	120
Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H pressat. da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , 1,4 T).	121
Figura 71 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , 14,1 T).	123
Figura 72 - Expansão do espectro de TOCSY 1D da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , irradiação do sinal em 4,75 ppm, 14,1 T).	125
Figura 73 - Expansão do espectro de TOCSY 1D da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , irradiação do sinal em 5,36 ppm, 14,1 T).	125
Figura 74 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas MeOD- d_6 , 14,1 T).	126
Figura 75 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas MeOD- d_6 , 14,1 T).	126
Figura 76 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas MeOD- d_6 , 14,1 T).	127

Figura 77 - Espectros de massas de primeira ordem, modo negativo <i>full scan</i> , da fração 5 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).....	128
Figura 78 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 579 em modo negativo com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).	129
Figura 79 - Espectros de massas de primeira ordem, modo positivo <i>full scan</i> , da fração 5 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da (Seção 3.4.5).	130
Figura 80 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 581 em modo positivo com energia de colisão 30 eV. (Seção 3.4.5).....	130
Figura 81 - Proposta de fragmentação EM-IES(-) para canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo.....	131
Figura 82 - Proposta de fragmentação EM-IES(+) para canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias presentes na espécie <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth (ZULETA, 2002)	35
Tabela 2 - Massas dos extratos de <i>C. spruceanum</i> Benth.....	50
Tabela 3 - Massas das frações obtidas de CFEHidr via análise CLAE-DAD em escala preparativa.	53
Tabela 4 - Massas das frações obtidas dos extratos hidroetanólicos (CFEHidr, CGEHidr, CCEHidr).....	55
Tabela 5 - Teste da capacidade redutora do radical DPPH [•] e ABTS ^{•+} dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule.....	58
Tabela 6 - Teste preliminar da capacidade redutora do radical DPPH [•] das frações dos extratos hidroetanólicos de folhas, galhos e cascas do caule.	61
Tabela 7 - Teste preliminar da capacidade redutora do radical DPPH [•] das frações do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr).....	62
Tabela 8 - Compostos fenólicos identificados nas frações antioxidantes promissoras do extrato hidroetanólico de folhas de <i>C. spruceanum</i>	73
Tabela 9 - Seleção de íons da fração B, do extrato hidroetanólico de folhas de <i>C. spruceanum</i> , com <i>m/z</i> mais intensos e seus respectivos tempos de retenção (<i>t_R</i>)...	75
Tabela 10 - Seleção de íons da fração C com <i>m/z</i> mais intensos e seus respectivos tempos de retenção (<i>t_R</i>).....	94
Tabela 11 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da substância quercetina 3- <i>O</i> - α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.	110
Tabela 12 – Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura, da substância canferol 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β - <i>D</i> -xilopiranosídeo.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ABTS	Ácido 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin]-6-sulfônico
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
C-18	Octadesilsilano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-DAD-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas sequencial
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO – <i>d</i>6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC₅₀	Quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical em 50%
EM	Espectrometria de Massas
EM/ EM	Espectrometria de Massas sequencial
EM/ IES	Espectrometria de massas por ionização por elétron <i>spray</i>
eV	Elétronvolt
HMBC	Correlação Heteronucleae de Ligação Múltipla (<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
MeOD -<i>d</i>4	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
nm	Nanômetros
ppm	Partes por milhão
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
s	Singleto
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
T	Tesla
TOCSY	Correlação Total Espectroscópica (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
t_R	Tempo de retenção
UV/ Vis	Ultravioleta/ Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Cosméticos, um mercado crescente e inovador	26
1.2	Desenvolvimento tecnológico e algumas estratégias de mercado na Indústria de Cosméticos	26
1.3	Produtos naturais: Fonte de inspiração para o setor acadêmico de inovação para a indústria	30
1.4	A Família Rubiaceae	30
1.5	Gênero <i>Calycophyllum</i>	31
1.6	Espécie <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth e as pesquisas com produtos naturais	32
1.6.1	Substâncias identificadas e isoladas da espécie <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth.....	34
1.7	Processo de envelhecimento na pele	38
1.8	Substâncias antioxidantes	40
1.9	Compostos fenólicos.....	41
1.9.1	Flavonoides.....	42
1.9.2	Proantocianidinas.....	44
1.9.3	Derivados de ácidos clorogênicos.....	45
1.10	Métodos de determinação de atividade antioxidante	46
2	OBJETIVOS.....	48
3	PARTE EXPERIMENTAL	49
3.1	Materiais e Métodos.....	49
3.1.1	Material vegetal.....	49
3.1.2	Obtenção dos extratos brutos	49
3.2	Metodologias dos ensaios biológicos.....	50
3.2.1	Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH*	50
3.2.2	Ensaio da capacidade redutora do cátion radical ABTS**	51
3.3	Estudos dos extratos brutos de folhas, galhos e cascas do caule	53
3.3.1	Análises via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE–DAD)	53
3.3.2	Análises por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	54
3.4	Estudos das frações dos extratos brutos hidroetanólicos de folhas, galhos e cascas do caule	54
3.4.1	Microfracionamento dos extratos hidroetanólicos	54

3.4.2	Análise das frações dos extratos hidroetanólicos via CLAE–DAD	55
3.4.3	Análise das frações promissoras dos extratos hidroetanólicos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	55
3.4.4	Análise das frações B e C do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectômetro de Massas (CLAE-EM e CLAE-EM/EM)	56
3.4.5	Identificação dos constituintes químicos das frações B, 3 e 5 do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr) por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (EM - IES)	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Avaliação da capacidade antioxidante	58
4.1.1	Testes de atividade antioxidante dos extratos	58
4.1.2	Testes de atividade antioxidante das frações dos extratos hidroetanólicos ..	61
4.1.3	Testes de atividade antioxidante das frações dos extratos hidroetanólicos ..	62
4.2	Estudos dos perfis cromatográficos e químicos dos extratos brutos.....	63
4.2.1	Perfis cromatográficos dos extratos brutos	63
4.2.2	Perfil químico dos extratos brutos por RMN de ¹ H.....	64
4.3	Estudo dos perfis cromatográficos e químicos das frações	67
4.3.1	Perfil cromatográfico das frações dos extratos hidroetanólicos	67
4.3.2	Perfil químico por RMN de ¹ H das frações que responderam positivamente ao teste antioxidante.	68
4.4	Análise cromatográfica das frações com atividade antioxidante promissora ...	70
4.4.1	Otimização das condições de análise das frações promissoras do extrato hidroetanólico de folhas, galhos e cascas do caule via CLAE-DAD	70
4.5	Identificação de compostos fenólicos nas frações B e C do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr)	72
4.5.1	Análise da fração B do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM	74
4.5.2	Análise da fração B do extrato hidroetanólico de folhas via EM–IES.....	75
4.5.2.1	Identificação de derivado de ácido clorogênico.....	75
4.5.2.2	Identificação de proantocianidinas	78
4.5.2.2.1 ^a	Série homóloga de proantocianidinas.....	79
4.5.2.2.2 ^a	Série homóloga de proantocianidinas.....	85
4.5.3	Análise da fração C do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM.....	92
4.5.3.1	Análise da fração C do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM/ EM	95

4.5.3.1.1 Identificação de quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.....	95
4.5.3.1.2 Identificação de canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo	98
4.5.3.1.3 Identificação do ácido 1,4-di-O-E-cafeoilquínico	101
4.6 Fracionamento do extrato hidroetanólico de folhas de <i>C. spruceanum</i> e identificação de compostos fenólicos.....	104
4.6.1 Análise do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-DAD em escala preparativa	105
4.6.2 Análises da fração 3 do extrato hidroetanólico de folhas	106
4.6.2.1.1 Identificação da quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo por RMN	108
4.6.2.1.2 Identificação de quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo por EM-IES	112
4.6.2.2 Identificação de ácido cafeoilquínico.....	117
4.6.3 Análises da fração 5 do extrato hidroetanólico de folhas	118
4.6.3.1 Análises da fração 5 via CLAE-DAD	119
4.6.3.1.1 Identificação do canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo por RMN.....	120
4.6.3.1.2 Identificação de canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo por EM-IES	127
5 CONCLUSÕES.....	133
REFERÊNCIAS.....	135

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cosméticos, um mercado crescente e inovador

O mercado de cosméticos é dividido em quatro setores principais: Perfumes, Produtos para Cabelo, Maquiagem e Cosméticos Dermatológicos (corporais ou faciais). Este mercado é caracterizado pela alta competitividade, sendo um dos que mais crescem no mundo, mesmo com crises econômicas recorrentes, em todos os continentes. Através de pesquisas no setor econômico, nota-se que o Brasil vem se destacando substancialmente devido ao seu crescimento em relação à exportação de produtos de higiene e de beleza, com destaque para bioprodutos, e que há uma tendência de crescimento do mercado global “verde” (ABIHPEC, 2015; KLEIN, 2011).

O mercado consumidor de cosméticos cresce exponencialmente tanto para o gênero feminino como o masculino, que vem mudando de hábitos neste século e se destaca dia a dia (CERQUEIRA et al., 2013). Outro dado a considerar é a preocupação na utilização de cosméticos associados não só à beleza, mas também ao bem estar, utilizando os produtos desse segmento como forma de melhoria para as condições de qualidade de vida (CALLONI, 2014).

1.2 Desenvolvimento tecnológico e algumas estratégias de mercado na Indústria de Cosméticos

Atualmente, um setor econômico que vem ocupando a agenda Brasil é a bioeconomia, em parte devido às tendências mundiais, mas especialmente devido a sua grande biodiversidade, considerada como um fator econômico importante para gerar produtos de valor agregado e assim contribuir para a geração de riquezas do país. O Brasil, detendo cerca de 22% de todas as espécies de vegetais e animais do planeta, é um país com grande potencial para o desenvolvimento de uma bioeconomia competitiva e sustentável (CALIXTO, 2003; TAKAKI et al., 2007), sendo os produtos naturais um foco de pesquisa importante para inovação, mas principalmente de conhecimento científico e tecnológico novo sobre a biodiversidade tropical ainda pouco conhecida. Assim, as áreas acadêmica e industrial têm valorizado cada vez mais a biodiversidade como fonte de matéria-prima para diversas áreas e setores da indústria (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006).

O uso de produtos naturais como matéria prima para a produção de bioprodutos vem aumentando nos países desenvolvidos e a política econômica nacional vem estimulando este mercado. No entanto, políticas de preservação da biodiversidade e dos recursos disponíveis devem ser sustentáveis e a exploração econômica de produtos oriundos da biodiversidade se apresenta como estratégia de sustentabilidade para países emergentes.

Muitos grupos de pesquisa têm contribuído para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, a quimiotaxonomia, a farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas (YUNES et al., 2001). O quinto barômetro de biodiversidade da *Union Ethical BioTrade* (UEBT) (empresa sem fins lucrativos que monitora a relação entre consumo e biodiversidade) realizado com apoio de diversas instituições e empresas nacionais e multinacionais (Natura, L'Oréal, Bayer, Aldivia, entre outras), demonstrou que cerca de 62% dos consumidores mundiais são adeptos aos produtos oriundos de organismos da biodiversidade e que em nosso país, a população tem mais conhecimento e aceitação que nos países da América do Norte, Europa e Ásia envolvidos na pesquisa (FUNARI et al., 2013).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), no ano de 2014 o Brasil se destacou como o terceiro maior mercado de cosméticos, higiene pessoal e perfumaria do mundo. A indústria cosmética brasileira vem sendo avaliada em cerca de US \$ 43,5 bilhões, ficando atrás apenas dos EUA (\$ 76,3 bilhões) e China (\$ 47,8 bilhões) (ABIHPEC, 2015).

Uma das contribuições da área de produtos naturais para este setor é pesquisar e identificar compostos ativos da rica biodiversidade que possam ser utilizados em pesquisa de inovação tecnológica e posteriormente numa inovação em cosméticos. O mercado de cosméticos é dinâmico e caracterizado pela necessidade ininterrupta de mudanças, exigindo investimentos em pesquisas criativas voltadas para a busca de insumos inovadores visando alternância constante das linhas de produtos (GARCIA; FURTADO, 2002).

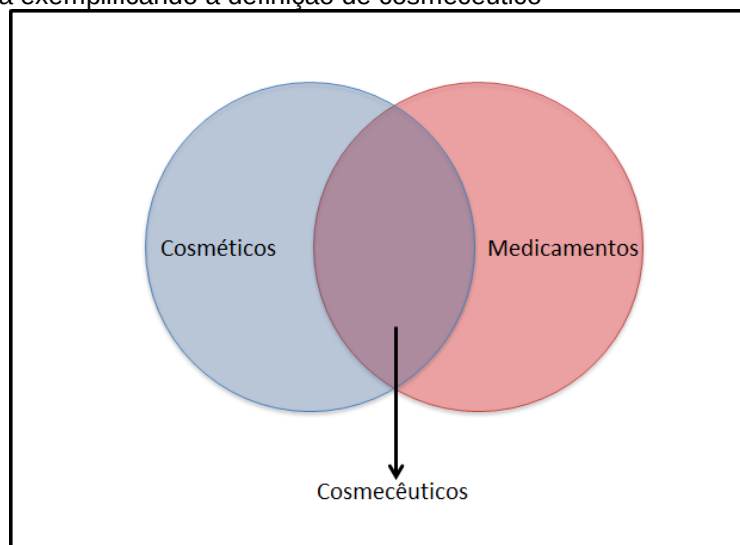
Assim, empresas internacionais e nacionais têm recorrido à flora brasileira para buscar e utilizar substâncias em suas linhas de produtos e de produção dos chamados bioprodutos, conhecidos como “*eco-friendly*”, como por exemplo: Natura, Boticário, Chamma da Amazônia, L'Oréal, entre outras. É de grande frequência a

utilização por parte das indústrias a palavra “natural” como uma forma de apelo ao consumidor, remetendo a ideia de um “marketing verde internacional” (CALLONI, 2014). Empresas como a L’Oréal mantiveram suas pesquisas científicas em síntese de compostos bioativos, mas já incorporaram em seus portfólios produtos oriundos de pesquisas científicas à base de produtos naturais, a fim de atender a um seguimento de consumidores que optam pelos produtos naturais. Este fato pode ser evidenciado pela compra recente da *The Body Shop*, indústria considerada símbolo 100% verde dentro da Europa. Com essa transação, a L’Oréal, maior multinacional de cosméticos do mundo, incorpora como estratégia financeira mais uma linha de produtos considerados ecológicos, ampliando sua competitividade no mercado verde de cosméticos (KLEIN, 2011; BARATA, 2012). Dessa forma, nota-se que tanto as empresas nacionais como as internacionais estão apostando no sucesso dos cosméticos com ativos naturais (SEBRAE, 2008; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

Em relação ao mercado de cosméticos, dois diferentes termos também foram inseridos: cosmético e cosmecêutico (SEBRAE, 2008). Cosméticos são produtos que promovem a limpeza, embelezamento e alteração da aparência devido à ação física e não fisiológica, agindo na camada mais externa da pele (epiderme) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005; SEBRAE, 2008). Caso o produto apresente um ação fisiológica que seja capaz de tratar uma enfermidade ou até mesmo alterar a estrutura e/ou função do organismo sadio, este é considerado fármaco ou medicamento (KLIGMAN, 2005).

Em 1984, o termo cosmecêutico, denominado também de dermocosmético, foi estabelecido pelo pesquisador Albert Kligman, para classificar o produto que age na camada mais profunda da pele (derme), levando a alguma alteração das funções da pele, causando benefícios ao organismo sem apresentar as desvantagens que os fármacos e/ou medicamentos possam causar (KLIGMAN, 2005). Apesar de não ser um termo aceito na comunidade científica e pelos órgãos governamentais, é um termo bastante utilizado na dermatologia e em campanhas de publicidade (MONTEIRO; BAUMANN, 2008). Estes produtos podem conter substâncias provenientes da biodiversidade e apresentar propriedades bioativas de cosméticos e também medicamentos (Figura 1) (ARRUDA, 2009).

Figura 1 - Diagrama exemplificando a definição de cosmecêutico



Fonte: baseada em Abenante, Contaldi e Boggian (2009).

Diversos relatos da literatura indicam um aumento no uso da biodiversidade para a produção de medicamentos, cosméticos, entre outros (BARREIRO; BOLZANI, 2009; ARRUDA, 2009; FUNARI; FERRO, 2005). Várias espécies vegetais apresentam grande potencial para estudos fitoquímicos e aplicação na área de cosméticos (MIGUEL, 2012; COSMÉTICOS, 2008).

Entre esses exemplos, destaca-se o extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Este extrato foi estudado por Souza, T. et al. (2007) para determinar a atividade bactericida mínima e avaliar a atividade antisséptica de um sabonete líquido formulado a partir deste extrato. Os resultados obtidos demonstraram que ao incorporar o extrato seco na formulação deste sabonete, houve atividade antisséptica eficiente e superior àquela verificada para o extrato de partida. De acordo com os autores, as propriedades antibacterianas e antissépticas do sabonete são devido à presença de metabólitos secundários da classe dos taninos (SOUZA, T. et al., 2007).

Outro exemplo a ser citado é o estudo do extrato aquoso de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sobre a avaliação da capacidade de incorporação deste extrato em três diferentes tipos de formulações (mistura coloidal tipo emulsão semi-sólida cremosa, forma de bastão e mistura coloidal tipo gel semi-sólida). A avaliação do perfil fitoquímico foi realizada e a presença de saponinas foi detectada, havendo a comprovação de seu potencial de afinidade com diferentes formas farmacêuticas, empregadas atualmente para o desenvolvimento fitocosmético e cosmetológico (FEDRIGO et al., 2012).

1.3 Produtos naturais: Fonte de inspiração para o setor acadêmico de inovação para a indústria

Sendo o mercado de cosmético muito promissor, o investimento em linhas de produtos a base de produtos da biodiversidade brasileira motivam cada dez mais as pesquisas em produtos naturais. Dessa forma, a indústria visa insumos para a cadeia produtiva e a utilização de metabólitos secundários em inovações radicais e incrementais para a obtenção de produtos mais eficazes e de maior sustentabilidade e valor agregado (GARCIA; FURTADO, 2002). Metabólitos secundários de várias classes com propriedades antioxidantes vêm despertando grande interesse industrial por serem matérias primas alternativas às de origem sintéticas, utilizadas na formulação de produtos farmacêuticos, alimentos, cosméticos, perfumes, etc (RE; JORGE, 2012; SARMENTO, 2007).

Sabe-se que existe um caminho relativamente extenso desde a descoberta e identificação de novos produtos naturais até a chegada dos mesmos ao mercado. Sabendo que as indústrias de cosméticos estão em constante busca por novas tecnologias, é necessária a maior colaboração entre pesquisadores acadêmicos e os de inovação para que haja maior interação e comunicação envolvendo pesquisas básicas associadas a descobertas de bioprodutos novos. Tanto o mercado como as ciências dos cosméticos se encontram em fases instigantes de desenvolvimento, um dado positivo em relação às pesquisas que exploram novos produtos (CALLONI, 2014).

O uso sustentável da biodiversidade demanda programas especiais com convergência de esforços tanto do setor acadêmico quanto do setor produtivo (indústrias), via capaz de transformar o conhecimento gerado em desenvolvimento (produtos) objetivando comercialização (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006).

Dessa forma, a flora brasileira pode gerar divisas cada vez mais inimagináveis, desde que haja pesquisa de excelência científica associada ao desenvolvimento tecnológico e posteriormente inovação, o caminho mais curto para alavancar a economia, trazer bem social e progresso para o nosso país.

1.4 A Família Rubiaceae

A família Rubiaceae abrange cerca por 13.000 espécies e 630 gêneros (KAROU et al., 2011), incluídos em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae,

Antirheoideae e Rubioideae) e cerca de 50 tribos (MONGRAND et al., 2005). Essa família vegetal é um dos maiores táxons de Angiospermas, dado ao grande número de espécies ainda sem qualquer estudo químico e biológico, a prospecção da família é de grande importância científica e tecnológica. A família é pantropical, de ampla distribuição geográfica e ocorrência nas regiões tropicais úmidas e subtropicais, sendo menos frequentes nas regiões próximas às zonas temperadas (ELST et al., 2013). As plantas desta família possuem grande diversidade de tamanho, tipos de vegetação, variação de hábito (ervas anuais, perenes, arbustos, árvores e lianas), e destacam-se por abranger diversas espécies com alto potencial econômico e terapêutico (DI STASI et al., 2002), sendo destaques em Angiospermas.

Na flora brasileira, há cerca de 2.000 espécies divididas em 120 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2005) que ocorrem nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado, predominando as árvores e semi-arbustos. Dados quimiosistemáticos demonstram que cada subfamília de Rubiaceae é caracterizada pela predominância de determinada classe de metabólitos secundários, particularmente os iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas e triterpenos que são os principais quimiomarcadores da família Rubiaceae (ZULETA, 2002).

1.5 Gênero *Calycophyllum*

Este gênero abrange espécies que ocorrem desde a América Central até a América do Sul, apresentam ampla semelhança morfológica entre si, como também em relação a outros gêneros da mesma tribo. As espécies pertencentes a este gênero são caracterizadas pela beleza e qualidade da madeira dos troncos muito longos e maciços, podendo atingir alturas de 40 m e diâmetros de até 90 cm. Reproduzem-se de forma sexuada e suas pequenas sementes são disseminadas pelo vento e pela água. São muito utilizadas pelos agricultores da Amazônia Peruana para a produção de madeira, lenha e carvão vegetal em sistemas agroflorestais (ZULETA et al., 2003).

1.6 Espécie *Calycophyllum spruceanum* Benth e as pesquisas com produtos naturais

Esta espécie é conhecida popularmente como mulateiro, pau-mulato, mulateiro da várzea, pau marfim e capirona, tendo como sinonímia botânica *Eukylista spruceana* Benth (ALMEIDA, 2004) (Figura 2). Apresenta hábito arbóreo, heliófila ou esciófila. Pode medir de 20 a 30 m de altura, com tronco retilíneo, e diâmetro de 30 a 40 cm. Seu local de ocorrência é a Região Amazônica (Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia) na mata de várzea periodicamente inundada à margem dos rios, por esse motivo o nome popular mulateiro da várzea. Possui madeira moderadamente pesada, resistente à degradação e, portanto, empregada em marcenaria para fabricação de compensados, entre outros usos, além de seu potencial ornamental (ALMEIDA, 2004; MARANHO et al., 2013).

Do ponto de vista popular, existem vários registros do uso como cicatrizante e antimicrobiano. Há vários relatos de estudos indicando atividades antimicótica, antibacteriana, antioxidante, antiparasitária, repelente e inseticida. No entanto, o uso como cosmético é o mais tradicional (ALMEIDA, 2004). Em diversos países da América do Sul, o mulateiro é utilizado em tratamento de diversas doenças como as dermatológicas, estomacais, diabetes, parasitoses, câncer, entre outras (ZULETA et al., 2003; COSTA et al., 2011).

Figura 2 - Fotos da árvore *Calycophyllum spruceanum* Benth.



Fonte: Bittencourt (2007) e Guedes (2015).

Na Amazônia, o tronco desta árvore é amplamente usado em tratamentos medicinais de infecções fúngicas e anti-inflamatórias. Em relação ao potencial cosmético, há registros de que a espécie era muito utilizada pelas comunidades indígenas para embelezamento, como cremes para pele e cabelo (ZULETA, 2002). É utilizada como xampu na forma de chá das cascas e/ou compressas com o pó da casca e unguento da resina, auxiliando no combate à queda de cabelo. E também é usado na forma de cremes e hidratantes, auxiliando no combate ao envelhecimento da pele, rugas, celulite, manchas na pele e cicatrizes (BECKER, ALVES; COSTA, 2007; MELO, 2015; PLANTAS, 2005).

Algumas partes da planta também são muito utilizadas na forma de fitoterápico dentro da medicina popular, sendo que a população local da Amazônia prepara infusão do material vegetal e consome na forma de chá para tratamento de doenças de estômago, intestino, inflamação da pele e mucosas, câncer no colo uterino, infecções oculares, diabetes, feridas infeccionadas, entre outros (ZULETA, 2002; ALMEIDA, 2004).

O mulateiro apresenta diversos metabólitos secundários, os quais foram estudados de forma ampla em diferentes extratos das cascas do caule (ZULETA, 2002). Entre estes foram isoladas diferentes substâncias: ácido acetilênico, que auxilia no combate de fungos e bactérias (poder antibiótico), compostos fenólicos, seco-iridoides e iridoides (Tabela 1), os quais podem conferir alto poder antioxidante, combatendo a ação dos radicais livres, os responsáveis pelo envelhecimento da pele (ZULETA, 2002).

O estudo anterior, sobre esta espécie vegetal, mostrou as atividades sobre *Saccharomyces cerevisiae* (linhagens RAD+, RAD 52 Y e 321N); antifúngica com as cepas *Candida krusei*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Tricophyllum rubrum* e *Tricophyllum mentagrophitis*, fungos do gênero *Cladosporium*; antiparasitária com *Trypanosoma cruzi*; antioxidante (Ensaio da capacidade redutora de DPPH^{*} e β -caroteno) e ainda com *Artemia salina*, objetivando verificação de citotoxicidade (ZULETA, 2002). O presente trabalho de mestrado trata do estudo da atividade antioxidante desta espécie vegetal e da identificação de substâncias bioativas, relato científico ainda não descrito na literatura.

1.6.1 Substâncias identificadas e isoladas da espécie *Calycophyllum spruceanum* Benth

Diversas consultas foram realizadas na literatura e até o momento, uma única tese foi encontrada sobre a identificação e isolamento de metabólitos secundários das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica desta espécie vegetal, sendo que o estudo focou no extrato etanólico obtido das cascas do caule (Tabela 1) (ZULETA, 2002). O referido trabalho trata da tese de doutorado de Luz Margarita Cardona Zuleta, sob a orientação da Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani no Instituto de Química - Unesp/Araraquara. Assim, os poucos dados encontrados na literatura a cerca do estudo fitoquímico da espécie vegetal, ressaltam a relevância da continuação desses estudos.

Tabela 1 - Substâncias presentes na espécie *Calycophyllum spruceanum* Benth (ZULETA, 2002)

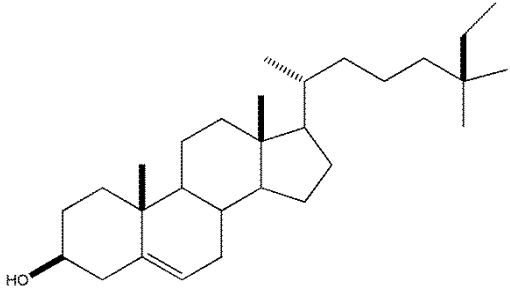
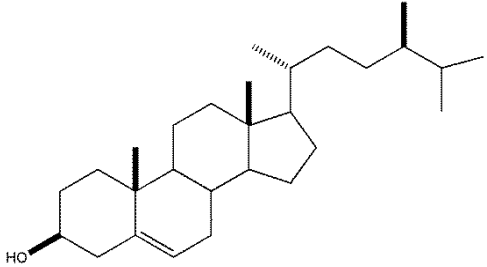
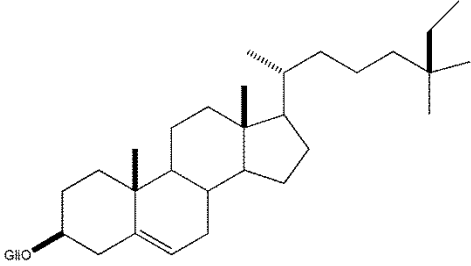
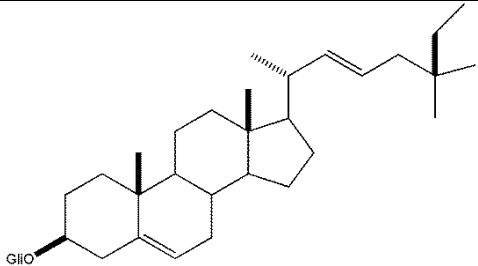
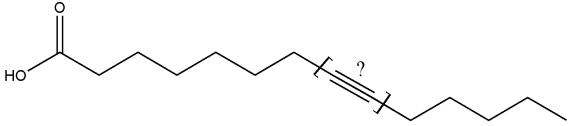
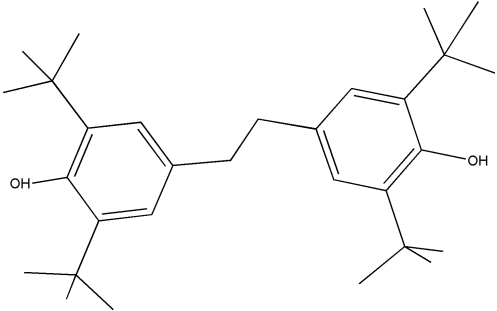
Substâncias	Natureza química	Nome trivial
	Esteróides	β -sitosterol
	Esteróides	campesterol
	Esteróides	3- β -O-(D-glicopiranosil) sitosterol
	Esteróides	3- β -O-(D-glicopiranosil) estigmasterol
	Ácido acetilênico	ácido hexadecínico
	Compostos fenólicos	1,2-bis-(3,5-di- <i>t</i> -butil-4 hidroxifenil) etano (dímero de BHT)

Tabela 1 - Substâncias presentes na espécie *Calycophyllum spruceanum* Benth (cont.) (Zuleta, 2002)

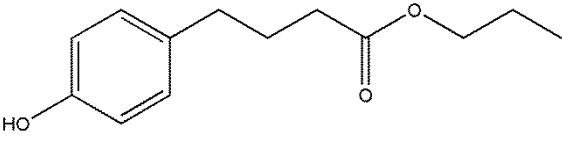
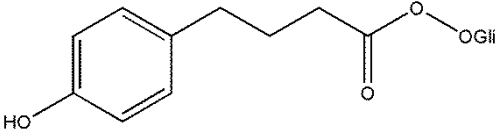
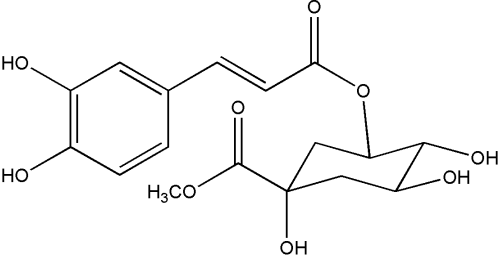
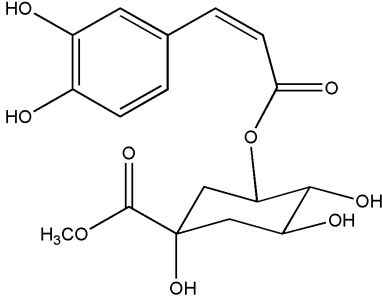
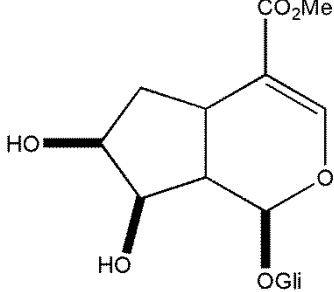
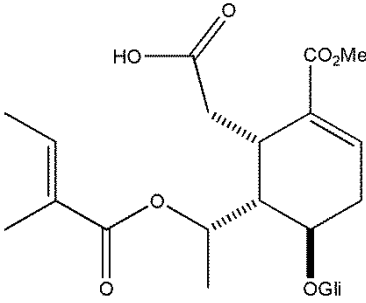
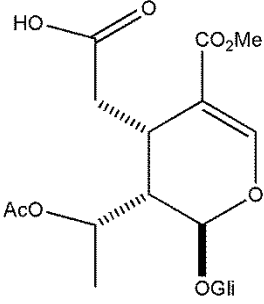
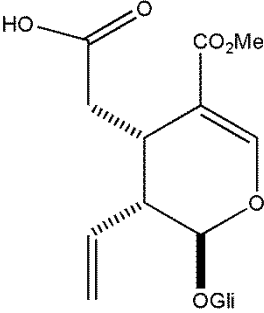
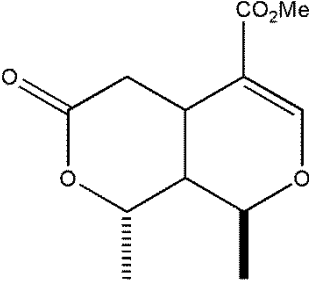
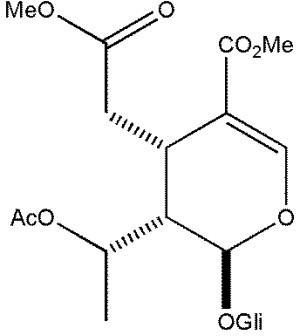
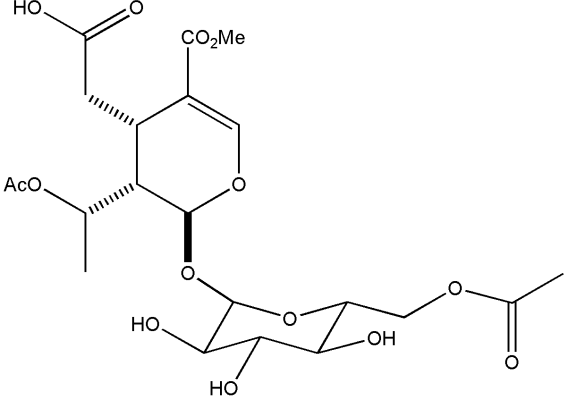
	Compostos fenólicos	éster do ácido <i>p</i> -hidroxifeniletil-9-O-butanóico
	Compostos fenólicos	1-β- <i>D</i> - <i>p</i> -coumaroil glicopiranosídeo
	Compostos fenólicos	ácido 7-metoxi-3- <i>O</i> - <i>trans</i> -cafeoilquínico
	Compostos fenólicos	ácido 7-metoxi-3- <i>O</i> - <i>cis</i> -cafeoilquínico
	Iridóides	Loganina
	Seco- iridóides	8- <i>O</i> -tigloildiderosídeo

Tabela 1 - Substâncias presentes na espécie *Calycophyllum spruceanum* Benth (cont.) (Zuleta, 2002)

	Seco- iridóides	diderrosídeo
	Seco- iridóides	secoxiloganina
	Seco- iridóides	kingisídeo
	Seco- iridóides	7-carbometoxi-metoxi- diderrosídeo
	Seco- iridóides	6'-acetoxil-diderrosídeo

1.7 Processo de envelhecimento na pele

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, abrangendo diversas funções, entre elas: excreção de produtos residuais metabólicos, regulação da temperatura corporal, receptores de dor, sensação tátil e pressão. É composta por três camadas (epiderme, derme e hipoderme) com composição e funções específicas (SOUZA, A. et al., 2015), sendo considerada a primeira barreira de proteção do organismo contra a ação de microorganismos e o primeiro órgão a demonstrar os primeiros sinais de envelhecimento (DECCACHE, 2006; TESTON, NARDINO; PIVATO, 2010).

A saúde e a aparência da pele estão relacionadas a diversos fatores, entre eles estilo de vida e hábitos alimentares, idade, e também o desequilíbrio hormonal que o ser humano apresenta ao longo de alguns períodos de vida (FARIA et al., 1995).

O envelhecimento da pele é um processo relacionado à perda de tecido fibroso, taxas reduzidas de renovação celular e também à redução da rede glandular e vascular. Este processo, classificado em intrínseco ou cronológico; ou extrínseco da pele, reflete tanto no fenótipo humano como também nas funções fisiológicas desse órgão e na saúde como um todo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA). Diversos fatores podem acelerar os processos de envelhecimento cutâneo, entre eles: radiação ultravioleta, poluição, tabagismo, excesso de consumo de álcool e gordura, e elevação do peso corporal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA; FARIA et al., 1995).

O processo de envelhecimento cronológico da pele leva à alteração do material genético por meio de ação enzimática, alterações proteicas e também devido à diminuição da proliferação celular dérmica e epidérmica (HIRATA et al., 2004).

Os processos oxidativos enzimáticos ou químicos presentes no organismo levam ao desenvolvimento de radicais livres (RL), levando à aceleração do envelhecimento cutâneo (HIRATA et al., 2004).

Os radicais livres são definidos como espécies químicas como átomos ou associações de átomos com um elétron desemparelhado na camada de valência, levando à instabilidade energética e cinética. Para que essas espécies se tornem estáveis, elas necessitam retirar ou doar um elétron à outra espécie química

(BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999; ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os radicais livres podem ser produzidos por reações metabólicas oxidativas pelo próprio organismo (origem endógena) ou por meio de fatores externos (origem exógena) como poluição, *stress*, fumo, uso prolongado de medicamentos, substâncias tóxicas em alimentos/bebidas, resíduos de pesticidas/agrotóxicos, consumo exagerado de gorduras saturadas e baixo teor de vegetais e cereais em dietas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SCHENEIDER; OLIVEIRA, 2004; HIRATA et al., 2004). O desenvolvimento desse tipo de espécie química leva ao processo de *stress* oxidativo no organismo, o qual permite a geração de uma cadeia de reações e, conseqüentemente, leva a alterações celulares, como também proteicas extracelulares, podendo acarretar na morte celular (HIRATA et al., 2004; BIANCHI; ANTUNES, 2009).

Assim, o excesso de radicais livres no organismo pode trazer inúmeras complicações ao sistema biológico, sendo as mais usuais ao dano da pele e envelhecimento, as quais se referem às alterações na produção de hormônios e danos das membranas celulares causados pelo desenvolvimento de células cancerígenas, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imunológico do organismo, entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NASCIMENTO et al., 2011).

A pele pode combater até certo ponto o processo de envelhecimento por meio da ação de captura dos radicais livres, utilizando enzimas específicas, vitaminas e agentes quelantes de íons metálicos presentes no organismo (sistemas de defesa enzimático e antioxidante de baixo peso molecular, respectivamente) (HIRATA et al., 2014). Todavia, esse processo pode não ser de total eficiência e a capacidade antioxidante natural pode diminuir com o passar do tempo, sendo, então, necessárias mudanças de hábitos para uma vida mais saudável, como também uma ajuda externa, que pode ser por meio de tratamentos estéticos, como também a utilização de produtos cosméticos específicos (TESTON; NARDINO; PIVATO, 2010; VIEIRA; ARAÚJO; NAKAMURA, 2008). De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia, a pele não precisa de uma quantidade grande de produtos para o combate ao envelhecimento e sim de certos “ingredientes” em qualidade específica, ou seja, alimentos ou insumos que contenham substâncias protetoras ao processo de envelhecimento, sendo estas de natureza enzimática, antioxidante ou fenólica.

1.8 Substâncias antioxidantes

De acordo com Halliwell (2000),

“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidado, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.”

A estrutura química de um composto antioxidante deve apresentar substituintes doadores de elétrons ou de átomos de hidrogênio e ter a capacidade de doar estes às espécies radicalares, devido ao seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do elétron desemparelhado, ou seja, do radical formado em sua estrutura, e, de quelar metais de transição envolvidos no processo de oxidação; capacidade de acessar o local de ação da espécie radicalar, dependendo de sua hidrofilia ou lipofilia e de seu coeficiente de partição (SUCUPIRA et al., 2012).

As espécies químicas antioxidantes têm como função capturar as espécies radicalares e assim neutralizá-las, inibindo ou retardando a ação destes radicais, e consequentemente, combatendo o processo oxidativo desordenado que dá origem a diversas doenças degenerativas, como também doenças crônicas como o câncer, derrame, doenças cardíacas, Mal de Alzheimer, entre outras. Os antioxidantes interferem no processo de oxidação, mas não podem atuar na eliminação de compostos oxidados já gerados (CAMPOS, 2005).

Há substâncias antioxidantes produzidas pelo corpo e outras que podem ser adquiridas por meio da ingestão de alimentos ou dos chamados suplementos alimentares (nutracêuticos). Os antioxidantes podem ser classificados como naturais, sendo exemplos mais comuns, os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos; e sintéticos, como polifenóis, butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são os mais utilizados na indústria de alimentos. Vários estudos demonstraram que tanto os antioxidantes naturais, assim como os sintéticos agem pelo mesmo processo químico (SUCUPIRA et al., 2012).

Segundo Oga (2003), os antioxidantes também podem ser classificados de acordo com o modo de ação no alvo biológico (sequestradores de radicais,

sequestradores de íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica, sequestradores de oxigênio) e subdivididos em:

- Primários: enzimas, quelantes e proteínas que sequestram ou impedem o desenvolvimento de espécies reativas, assim inibindo a etapa de iniciação radicalar;
- Secundários (antioxidantes preventivos): compostos fenólicos (tocoferóis, tocotrienóis, flavonoides) que bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar, permitindo o sequestro dos chamados radicais intermediários do tipo peroxila e alcóxila;
- Terciários: sistema de reparo do DNA por meio de enzimas como proteases e fosfolipases no reparo das lesões oxidativas recorrentes no DNA, proteínas e lipídeos.

Há uma relação entre substâncias de caráter polar com ação antioxidante e a característica de diminuir o envelhecimento das células, como também inibir ou atenuar o aparecimento de células cancerígenas (BARREIROS; DAVID; DAVID 2006).

Porém, os antioxidantes ficam comprometidos pelo *stress* oxidativo. O organismo deve estabelecer um equilíbrio entre as espécies radicalares produzidas e o sistema antioxidante. O *stress* oxidativo é um processo de desequilíbrio entre o sistema antioxidante e oxidante do organismo por meio da formação de radicais livres, induzindo a degeneração de importantes biomoléculas no organismo e agravando o envelhecimento cutâneo (MOUAD; PORTO, 2014). Assim, deve-se encontrar outras maneiras para proteger a pele, sendo uma delas, a utilização de produtos tópicos contendo em sua formulação compostos com propriedades antioxidantes, sendo os compostos fenólicos, em geral, de grande interesse na aplicação destes (ROLIM, PERREIRA; ESKELSEN, 2015).

1.9 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários que contêm pelo menos um anel aromático na estrutura molecular, e um ou mais grupos hidroxílicos como grupamento funcional, podendo ser biossintetizados pela via chiquimato ou acetato. Assim, podem ser substâncias estruturalmente simples ou complexas, tais como alguns compostos poliméricos, como taninos e ligninas (SILVA, M. et al., 2010; DEWICK, 2000; TIVERON, 2010).

Os compostos fenólicos podem ocorrer de forma ampla ou restrita na natureza e também de modo polimérico. Assim, podem ser classificados dentro das categorias usuais aos produtos naturais desta classe (RIBERÉAU-GAYON, 1968; SILVA, M. et al., 2010; TIVERON, 2010):

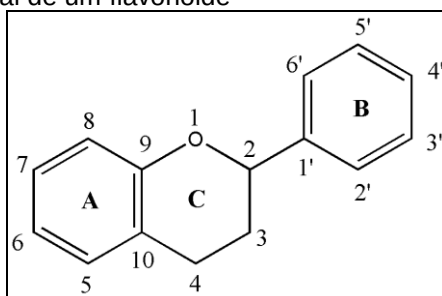
- Ocorrência restrita na natureza: Fenóis simples; hidroquinona; aldeídos derivados dos ácidos benzoicos; pirocatecol; resorcinol;
- Ocorrência ampla na natureza: Flavonoides; ácido benzoico, ácido cinâmico e derivados (ácidos fenólicos); cumarinas;
- Polímeros: Taninos (hidrolisáveis e condensados) e ligninas.

De uma forma geral, os compostos fenólicos pertencentes aos grupos dos derivados de ácido cinâmico, cumarinas, flavonoides, taninos e lignanas, apresentam ampla ocorrência no reino vegetal. Já os compostos fenólicos pertencentes aos grupos das antraquinonas, xantonas, naftoquinonas são mais restritos a determinados grupos taxonômicos, sendo, portanto, úteis como marcadores químicos. Os compostos fenólicos também podem ser classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal (anel benzênico e a cadeia substituinte), como também de acordo com sua origem biossintética (SIMÕES et al., 2004; SILVA, M. et al., 2010).

1.9.1 Flavonoides

A classe dos flavonoides é caracterizada por estrutura geral tipo benzo-γ-pirano C₆-C₃-C₆, com 15 átomos de carbono total, distribuídos em 2 anéis aromáticos: um formado da via do acetato (anel A) e um da via do chiquimato (anel B) interligados por três carbonos, sendo o anel C informativo de alguns tipos estruturais) (Figura 3) (SIMÕES et al., 2004; DEWICK, 2000).

Figura 3 - Estrutura química geral de um flavonoide



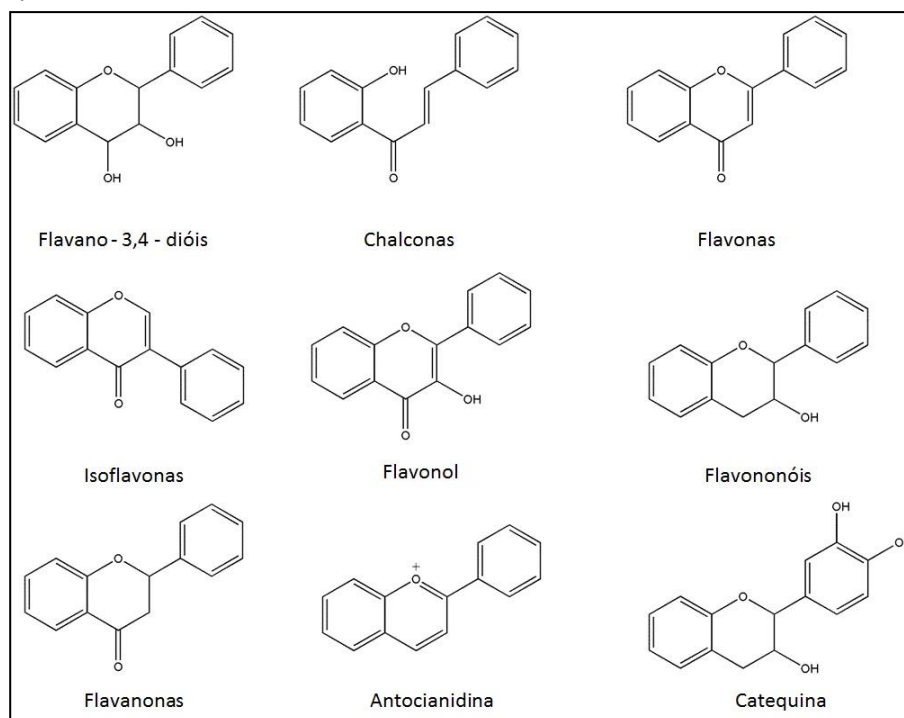
Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Os flavonoides podem ainda serem considerados como estruturas químicas de alta, média e baixa polaridade, assim devido a característica fenólica, de ácidos fracos (TIVERON, 2010).

A maioria dos flavonoides naturais contém em sua estrutura uma ou várias unidades de açúcares, nestes casos, são denominados de glicosídeos e ocorrem em praticamente todas as Angiospermas, principalmente nas folhas, por serem um filtro à radiação ultravioleta. A forma livre, também conhecida como aglicona é de ocorrência mais restrita e, dependendo do esqueleto base, é um importante quimiomarcador (MARKHAM, 1982; SILVA, A., 2007; GERSHENZON; MABRY, 1983).

Essa classe de metabólitos secundários é subdividida em diversas subclasses (Figura 4): chalconas, flavonas, isoflavonas, flavononóis (di-hidroflavonóis), flavanonas, flavonóis, antiocianidinas, flavano-3,4-dióis, catequinas (LOBO; LOURENÇO, 2007). Os flavonoides apresentam diversas funções na natureza: coparticipação na expressão de diversas enzimas; atração de agentes polinizadores (diversidade de cores e odores atrativos); atividade alelopática; antiestimulante alimentar; proteção a organismos patógenos, animais, insetos, radiação UV-B e visível, entre outras (SIMÕES et al., 2004).

Figura 4 - Esqueletos carbônicos bases das subclasses dos flavonoides



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

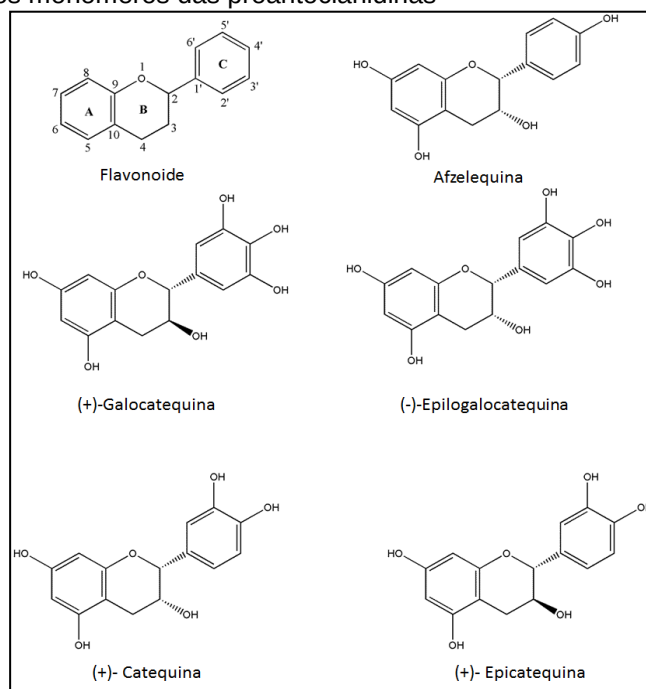
1.9.2 Proantocianidinas

Taninos condensados sob tratamento a quente em soluções alcoólicas acidificadas se auto-oxidam e levam a formação das antocianidinas, sendo também designadas como proantocianidinas (RUIVO, 2012; PUGLIESE, 2010). Tais substâncias apresentam ampla atividade biológica e diversidade estrutural devido aos padrões de substituição entre os monômeros e diversidade das posições de substituintes entre as ligações e estereoquímica (MONTEIRO et al., 2005).

Estruturalmente, as proantocianidinas são 3-flavonols (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina e (-)-epigalocatequina, ou raramente de outros monômeros, como por exemplo, a afzelequina (Figura 5) (ZIMMERMANN, 2005; PUGLIESE, 2010) e são isoladas na forma de oligômeros ou como polímeros destes. Quando as unidades monoméricas são apenas (+)-catequina e (-)-epicatequina, sendo a cianidina o produto da hidrólise, as proantocianidinas são denominadas de procianidinas (DIXON et al., 2004; PUGLIESE, 2010).

Dependendo do tipo de ligação entre as unidades monoméricas apresentadas, estas podem ser classificadas do tipo A (unidades de 3-flavonols C4-C8, duplamente ligadas por uma ligação éter C2-C7) ou tipo B (C4-C8, C4-C6) (PASSOS et al., 2007).

Figura 5 - Estruturas dos monômeros das proantocianidinas



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

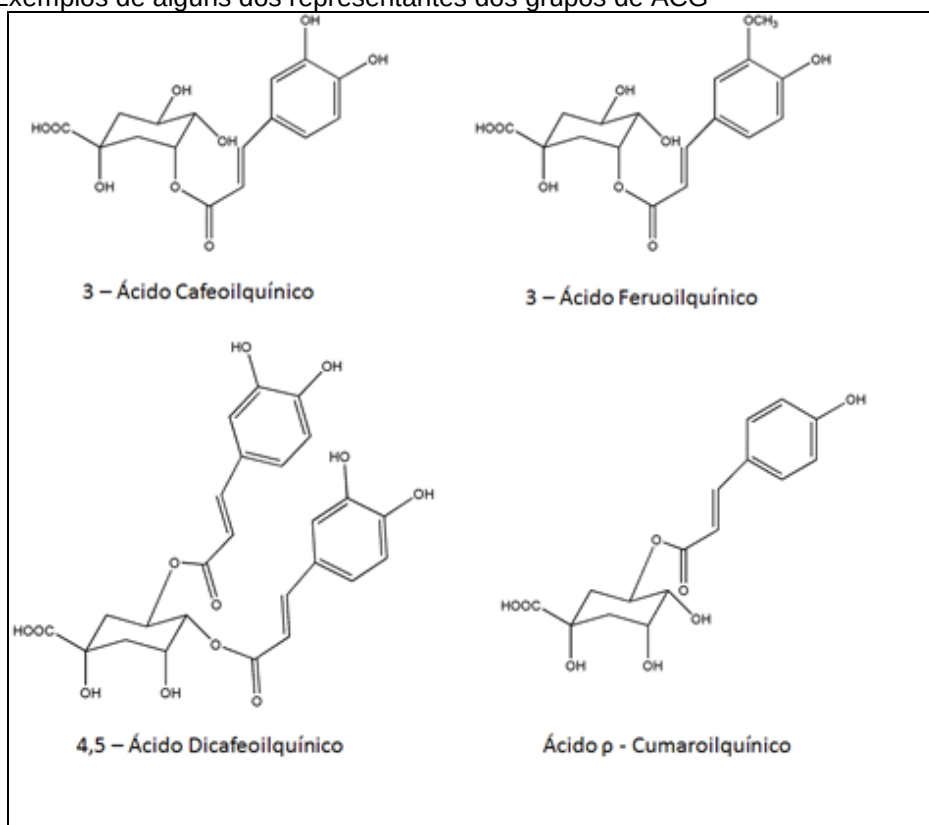
Esse grupo de metabólitos apresenta amplo potencial a ser aplicado como agentes preventivos, terapêuticos, antioxidantes, como também capacidade de complexar macromoléculas de natureza proteica (enzimas digestivas, proteínas fúngicas ou virais), modulador anti-inflamatório e plaquetário, analgésico, entre outros. De uma forma geral, os taninos podem ser utilizados em formulações cosméticas de uso tópico como adstringentes, exercendo efeito vasoconstritor e impermeabilizante (RUIVO, 2012).

1.9.3 Derivados de ácidos clorogênicos

A nomenclatura ácido clorogênico (ACG) é utilizada para abranger todos os ésteres provenientes da esterificação do ácido quínico com algum tipo de ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico, ferúlico, ou *p*-cumárico), constituindo um grupo de cinco principais compostos fenólicos e seus respectivos isômeros (CLIFFORD, 1999). Os grupos de ACG são: ácidos cafeoilquínicos (3,4,5); ácidos dicafeoilquínicos (3,4;3,5;4,5); ácidos feruoilquínicos (3,4,5); ácidos *p*-cumaroilquínicos; ácidos cafeoilferuloilquínicos (Figura 6) (SIMÕES et al., 2004; ROSSETTI, 2007), sendo a série de isômeros oriunda da reação de esterificação, diferindo apenas na posição do grupo hidroxílico (CLIFFORD, 1999; SIMÕES et al., 2004; BELINATI, 2010).

Esse grupo de metabólitos secundários é amplamente conhecido devido ao elevado potencial antioxidante, como também às demais atividades biológicas: anti-inflamatória; anti-diabética; efeito hipotensor; efeito terapêutico de fitoterápicos; hipoglicêmica; antiviral; hepatoprotetiva, entre outras (SANTOS, M. et al., 2006; ALONSO-CASTRO et al., 2008; CHU et al., 2009; BELINATI, 2010; MARRASSINI et al., 2010)

Figura 6 - Exemplos de alguns dos representantes dos grupos de ACG



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

1.10 Métodos de determinação de atividade antioxidante

Há diversos testes químicos e ensaios biológicos que podem ser utilizados experimentalmente para se determinar a capacidade e/ou atividade antioxidante de substâncias naturais, sintéticas, de um extrato ou formulação.

Ao testar a capacidade antioxidante de uma determinada substância ou amostra, pode-se expressá-la de acordo com vários parâmetros entre eles: ORAC (Oxygenal Radical Absorbance Capacity), o qual mede a remoção de um radical peroxila; FRAP (Ferric Reducing Antioxidante Power), que determina a capacidade de redução de um metal, assim como, o CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity); DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazil), que promove a remoção de radical orgânico; TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), o qual realiza a oxidação do LDL (Low Density Lipoprotein), co-oxidação do β -caroteno. (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2012; TOMEI; SILVA; SALVADOR, 2007).

Entre os métodos experimentais, há uma utilização mais frequente dos métodos de FRAP, ABTS, DPPH e ORAC, para determinar a capacidade *in vitro*, porém a escolha do teste a ser utilizado fica a critério do analista (SUCUPIRA et al.,

2012; NEGRETTO, 2014). Os resultados dos testes antioxidantes podem variar de metodologia para metodologia, sendo difícil a escolha de um método mais apropriado. Dessa forma, é preferível a realização de vários testes antioxidantes com a amostra em estudo e assim, analisar qual a metodologia mais apropriada. Ressalta-se que cada teste avalia meios distintos, ou seja, a natureza química dos compostos presentes a serem estudados. Assim, um teste pode ser mais pertinente em um meio químico em relação a outro meio, e também qual o tipo de radical livre a ser neutralizado, entre outros fatores (ANTIOXIDANTES, 2009).

Ensaio antioxidantes podem ser classificados em indiretos e diretos. São denominados indiretos quando se baseiam na transferência de elétrons e diretos em relação à cinética do processo reacional (HUANG; OU; PRIOR, 2005; TOMEI; SILVA; SALVADOR, 2007).

Estudos que visam a busca e o isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos apresentam procedimento padrão de fracionamento biomonitorado em que os extratos, frações e substâncias obtidas por técnicas cromatográficas são submetidos aos ensaios biológicos para detecção dos metabólitos secundários e/ou compostos responsáveis pela atividade.

Dessa forma, há o estudo simultâneo do perfil metabólico e diversos ensaios biológicos.

2 OBJETIVOS

- i) Obter os perfis cromatográficos e químicos dos extratos das folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae);
- ii) Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado do extrato hidroetanólico de folhas de *C. spruceanum* Benth (Rubiaceae) visando à identificação estrutural de substâncias ativas, uma vez que os extratos obtidos de espécies da família Rubiaceae mostraram atividade antioxidante e anti-inflamatória em estudos anteriores;
- iii) Reavaliar o potencial antioxidante dos extratos de *C. spruceanum* Benth (Rubiaceae);
- iv) Verificar se os extratos, frações e substâncias isoladas neste estudo tem potencial antioxidante.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Material vegetal

As folhas e galhos da espécie *C. spruceanum* Benth foram coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RJ - Brasil), latitude (-22° 96 68',01" S), longitude (-43° 2253',27" E) em abril de 2014, e as cascas do caule foram coletadas no mesmo local em agosto de 2014. O *voucher* da espécie vegetal foi identificado e depositado pelo herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número RB 283277.

3.1.2 Obtenção dos extratos brutos

Os extratos brutos das diferentes partes da planta foram preparados nos laboratórios do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) - Instituto de Química/Unesp - Araraquara. As partes vegetais (folhas, galhos e cascas do caule) foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C, durante aproximadamente 3 dias e, posteriormente, trituradas em moinho de facas. O material seco e moído (10,0 g) foi submetido às extrações em banho de ultrassom sob temperatura controlada, por três vezes consecutivas com cada solvente (150 mL), 40 min/ciclo de solvente, em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol, sendo filtrados, por gravidade, e concentrados em rotaevaporador. O extrato hidroetanólico foi obtido por meio da mesma metodologia descrita anteriormente, considerando que a solução utilizada corresponde à mistura de etanol: água (70:30 v/v). Os extratos aquosos foram obtidos por meio da técnica de extração a quente (decocção), com a mesma quantidade de massa do material vegetal, como descrito anteriormente. Posteriormente, foram submetidos à filtração, por gravidade, e a parte sobrenadante foi liofilizada. As massas obtidas para cada extrato são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Massas dos extratos de *C. spruceanum* Benth.

Material Vegetal	Código	Massa dos Extratos (g)
Folhas (10,0 g)	CFEH	0,3595
	CFEAc	0,1834
	CFEM	2,0793
	CFEHidr	2,8503
	CFEAq	2,3430
Galhos (10,0 g)	CGEH	0,0431
	CGEAc	0,0646
	CGEM	1,0015
	CGEHidr	1,4551
	CGEAq	1,0771
Cascas do caule (10,0 g)	CCEH	0,0793
	CCEAc	0,0454
	CCEM	0,9706
	CCEHidr	1,2939
	CCEAq	1,0092

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

C = *Calycophyllum spruceanum* Benth; F = Folha; G = Galho; C = Cascas do Caule; E: Extrato; H = Hexano; Ac = Acetato de Etila; M = Metanol; Hidr = Hidroetanólico; Aq = Aquoso.

3.2 Metodologias dos ensaios biológicos

Os testes iniciais para a determinação da atividade antioxidante (ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[•] e do cátion radical ABTS^{•+}) dos extratos obtidos, e as respectivas frações provenientes do microfracionamento, foram realizados com a supervisão e auxílio da Dra. Karina Fraige e Dra. Maria Luiza Zeraik (NuBBE - Instituto de Química/Unesp Araraquara).

3.2.1 Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[•]

Neste teste, o potencial antioxidante dos extratos e frações foi avaliado de acordo com a redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), por meio do monitoramento espectrofotométrico em 517 nm, utilizando rutina como padrão positivo. O teste foi realizado de acordo com o procedimento descrito na literatura (BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C, 1995), que se baseia na facilidade com que o radical livre estável difenil-picril-hidrazila captura um átomo de hidrogênio de uma espécie química com potencial antioxidante.

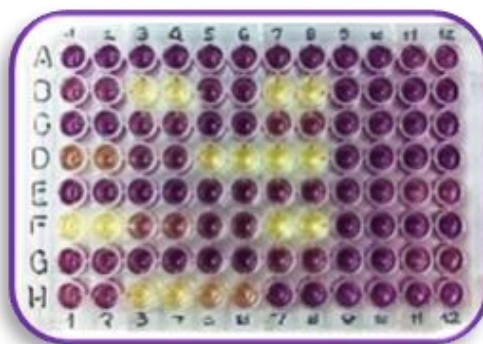
O procedimento foi realizado em triplicata, pela adição de uma alíquota de 215 µL da solução etanólica de DPPH[•] ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) a 35 µL dos compostos a serem estudados e do padrão ou referência, em diferentes concentrações. A

variação na absorbância da solução de DPPH com o controle e com as amostras foi medida em 517 nm após 30 min de reação, utilizando-se um espectrofotômetro de microplacas (Synergy2Multi-Mode, BioTek, EUA). O resultado positivo é baseado na observação de uma cor amarela com intensidade variada (Figura 7) de acordo com o poder antioxidante da amostra testada, ou seja, o grau de redução de DPPH[•] é medido por meio da diminuição da absorbância da mistura reacional em comparação com a leitura de DPPH em solução alcoólica.

Ao final do procedimento, a aptidão de redução do DPPH[•] pelo padrão e compostos estudados é expressa em termos da quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH[•] em 50% (EC₅₀), calculado a partir da equação de regressão linear das curvas analíticas construídas para cada amostra na faixa linear (concentração *versus* % DPPH[•] reduzido).

Os extratos e frações das diferentes partes do vegetal, que apresentaram resultados positivos no teste, foram submetidos às análises cromatográficas e espectroscópicas para exploração do perfil da natureza dos metabólitos secundários presentes.

Figura 7 - Teste de potencial antioxidante de DPPH[•] das diferentes amostras em diferentes concentrações.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

3.2.2 Ensaio da capacidade redutora do cátion radical ABTS^{•+}

Para corroborar a atividade antioxidante detectada, os extratos foram avaliados também por meio da redução do cátion ácido 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6 sulfônico (ABTS^{•+}), gerado por meio de reações químicas, enzimáticas ou eletrofílicas, sendo este solúvel em água e solvente orgânico. O cátion radical ABTS (ABTS^{•+}) é produzido por meio da reação de solução de ABTS estoque com persulfato de potássio, sendo este estável na ausência de espécies

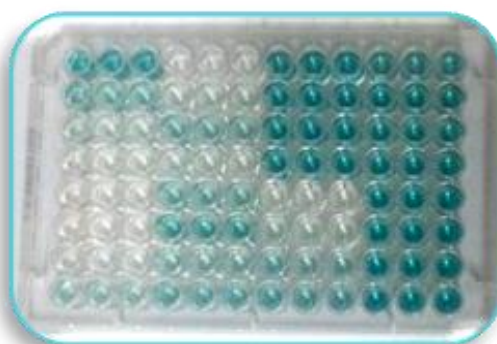
químicas antioxidantes (RE et al., 1999). A mistura formada é agitada e mantida no escuro à temperatura ambiente por cerca de 16 h, sendo esta solução diluída 60 vezes com água para a realização do ensaio. A solução formada é utilizada como solução padrão de leitura de absorbância.

Esse ensaio biológico foi realizado em triplicata pela adição de uma alíquota de 215 μL da solução aquosa de ABTS^{++} a 35 μL dos compostos a serem estudados e no padrão positivo rotina em diferentes concentrações. A variação na absorbância da solução de ABTS^{++} com o controle e com as amostras foi medida em 755 nm, após 30 min de reação, utilizando-se um espectrofotômetro de microplacas (Synergy2Multi-Mode, BioTek, EUA).

Ao final do procedimento, a aptidão de sequestrando ABTS^{++} é expressa em termos da quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de ABTS^{++} em 50% (EC_{50}), calculado também por meio da equação de regressão linear das curvas analíticas construídas para cada amostra, na faixa linear (concentração *versus* % ABTS^{++} reduzido).

O resultado positivo pode ser observado em relação à mudança de coloração do sistema de azul-esverdeado para incolor. A visualização de uma cor azul-esverdeada com intensidade variada de acordo com o poder antioxidante da amostra testada é um dado positivo para verificar potencial antioxidante, ou seja, traduzido numa diminuição da absorbância da mistura reacional em comparação com a leitura de ABTS^{++} em solução aquosa (Figura 8).

Figura 8 - Teste de potencial antioxidante de ABTS^{++} das diferentes amostras em diferentes concentrações.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

3.3 Estudos dos extratos brutos de folhas, galhos e cascas do caule

3.3.1 Análises via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (70:30 v/v) e submetidas a um *clean up* utilizando cartuchos de sílica octadesil silano (Chromabond C18ec 50 mg). Para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20A, e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando software LCsolution. Para análise em CLAE-DAD foi utilizada uma coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 µm; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 µL e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B), partindo de 15 % B a 70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹ e λ de monitoramento de 254 nm.

O extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr) (100,0 mg) foi analisado também por CLAE-DAD em escala preparativa, sendo o extrato solubilizado em MeOH:H₂O (15:70 v/v) e filtrado em filtros de porosidade de 0,22 µm. Para a análise em escala preparativa foi utilizada a coluna preparativa Luna Phenomenex C-18 (100Å) (5 µm; h x Φ = 150 x 21,20 mm), volume de injeção de 500,0 µL, fluxo de 10,0 mL min⁻¹ e eluição em gradiente. Verificada a repetibilidade das análises, realizou-se a coleta das frações de interesse (Tabela 3), que foram avaliadas por CLAE-DAD em escala analítica de acordo com as condições já descritas.

Tabela 3 - Massas das frações obtidas de CFEHidr via análise CLAE-DAD em escala preparativa.

Amostra	Código	Tempo de Retenção (min)	Massa das Frações (mg)
CFEHidr (100,0 mg)	Fração 1	0,0	32,7
	Fração 2	25,1	8,3
	Fração 3	34,4	1,8
	Fração 4	35,5	3,1
	Fração 5	38,5	2,3
	Fração 6	40,1	13,3

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As frações 3 e 5 também foram analisadas na condição cromatográfica descrita na Seção 4.4.1 para a fração C (CFEHidr) para uma comparação entre os perfis cromatográficos.

3.3.2 Análises por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Os experimentos de RMN ^1H , com pressaturação, dos extratos metanólicos e hidroetanólicos de folhas e galhos, assim como os extratos metanólicos, hidroetanólicos e aquosos de cascas de caule foram realizadas em um espectrômetro Bruker - Fourier 300. Para estas análises utilizou-se cerca de 10,0 mg do extrato bruto que foi solubilizado em solvente deuterado DMSO (Merck).

3.4 Estudos das frações dos extratos brutos hidroetanólicos de folhas, galhos e cascas do caule

3.4.1 Microfracionamento dos extratos hidroetanólicos

Os extratos brutos hidroetanólicos (100,0 mg) de folhas (CFEHidr), galhos (CGEHidr) e casca do caule (CCEHidr) foram submetidos ao microfracionamento em cartuchos de extração em fase sólida Chromabond C18ec 500mg, utilizando-se como fase móvel uma mistura de metanol e água em diferentes proporções, obtendo nove frações a partir de cada extrato estudado (Tabela 4). As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, utilizando 5 mL de eluente para cada sistema de fase móvel (% em v:v):, como segue abaixo:

- | | |
|--|--|
| a ₁) Metanol: Água (20:80) | a ₆) Metanol: Água (70:30) |
| a ₂) Metanol: Água (30:70) | a ₇) Metanol: Água (80:20) |
| a ₃) Metanol: Água (40:60) | a ₈) Metanol: Água (90:10) |
| a ₄) Metanol: Água (50:50) | a ₉) Metanol (100%) |
| a ₅) Metanol: Água (60:40) | |

Tabela 4 - Massas das frações obtidas dos extratos hidroetanólicos (CFEHidr, CGEHidr, CCEHidr).

Material Vegetal	Código	Massa das Frações (mg)	Material Vegetal	Código	Massa das Frações (mg)
Folhas	CFEHidr A (a ₁)	55,3	Galhos	CGEHidr A (a ₁)	51,4
	CFEHidr B (a ₂)	16,0		CGEHidr B (a ₂)	10,0
	CFEHidr C (a ₃)	12,5		CGEHidr C (a ₃)	7,4
	CFEHidr D (a ₄)	4,1		CGEHidr D (a ₄)	3,9
	CFEHidr E (a ₅)	1,6		CGEHidr E (a ₅)	6,0
	CFEHidr F (a ₆)	1,2		CGEHidr F (a ₆)	1,0
	CFEHidr G (a ₇)	7,0		CGEHidr G (a ₇)	1,0
	CFEHidr H (a ₈)	1,5		CGEHidr H (a ₈)	1,0
Cascas do caule	CCEHidr A (a ₁)	5,2			
	CCEHidr B (a ₂)	41,3			
	CCEHidr C (a ₃)	13,6			
	CCEHidr D (a ₄)	5,7			
	CCEHidr E (a ₅)	1,5			
	CCEHidr F (a ₆)	4,0			
	CCEHidr G (a ₇)	2,0			
	CCEHidr H (a ₈)	4,0			

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

As frações (A - F) foram analisadas via CLAE-DAD e, posteriormente, foram submetidas ao teste de atividade antioxidante de DPPH[•] seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

3.4.2 Análise das frações dos extratos hidroetanólicos via CLAE-DAD

O procedimento para uma análise preliminar das frações via CLAE-DAD em escala analítica foi feito nas condições anteriormente descritas para todos os extratos hidroetanólicos (Seção 3.3.1). Porém, um método de análise para cada fração antioxidante promissora foi posteriormente otimizado objetivando uma melhor separação dos componentes da mistura, utilizando como fases móveis água/ácido fórmico 0,1% (A) e MeOH (B), seguindo diferentes gradientes de eluição, como indicado na Seção 4.4.1, e fluxo de 0,8mL min⁻¹.

3.4.3 Análise das frações promissoras dos extratos hidroetanólicos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

Os experimentos de RMN de ¹H, com dupla pressaturação, e ¹³C das frações com atividade antioxidante obtidas dos extratos hidroetanólicos foram realizados em

um espectrômetro Bruker Avance 600 operando a 1,4 T com uma *crioprobe*. Para estas análises utilizou-se cerca de 2,0 mg das amostras que foram dissolvidas em solvente deuterado MeOD e/ou MeOD: D₂O (70:30) (Merck).

3.4.4 Análise das frações B e C do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE-EM e CLAE-EM/EM)

Para a realização da técnica hifenada CLAE-EM, para as frações B e C, foi utilizado um cromatógrafo líquido equipado com bombas LC-20AD, detector UV-DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20A acoplado a um Espectrômetro de Massa microTOF II-ESI-TOF de alta resolução, operando em modo negativo. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram: gás nitrogênio: 5,5 Bar, voltagem do capilar: 5500 V, temperatura: 220° C, potencial de agrupamento: 30,00 V, potencial de entrada: 5,00 V. Os espectros *full scan* foram registrados na faixa de 50 a 1000 Da. A calibração interna foi realizada com uma solução de Na-TFA (10mg/mL). As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas na Seção 4.4.1. Esta análise foi realizada em colaboração com o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPS) do Departamento de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP - Ribeirão Preto), sob supervisão do Prof. Dr. Noberto Peporine Lopes.

A fração C também foi analisada via CLAE-EM/EM sendo utilizado um cromatógrafo líquido Agilent 1200 series, acoplado a um espectrômetro de massas Applied Biosystems 3200 Q Trap, equipado com uma fonte de ionização *Turbo Ion Spray*, operando em modo negativo. Os parâmetros utilizados para o espectrômetro de massas foram: gás nitrogênio: temperatura da fonte de íons igual a 180 °C, voltagem no *Turbo Ion Spray* de - 4,5 kV, potencial de dessolvatação ajustado para - 35 V. Outros parâmetros utilizados foram: velocidade de varredura de 4000 uma s⁻¹, energia de colisão de 35 ± 10V e 50 ms para a captura de íon. Todos os experimentos foram realizados na faixa de 50 a 1500 Da com um potencial de entrada de 10 V. A amostra foi diluída a uma concentração de 2,5 ppm em MeOH: H₂O (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, sendo o volume de injeção de 20 µL. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas na Seção 4.4.1. Essas análises foram realizadas no laboratório NDCOM (Núcleo de

Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (Unesp - Araraquara), sob coordenação da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

3.4.5 Identificação dos constituintes químicos das frações B, 3 e 5 do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr) por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (EM-IES)

As análises de EM-IES para a fração B do extrato de CFEHidr foram realizadas no laboratório NDCOM (Núcleo de Desenvolvimento de Métodos de Análises de Combustíveis) do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (Unesp - Araraquara), sob coordenação da Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanon. As análises foram feitas por infusão direta em um Espectrômetro de Massas 3200 QTRAP (quadrupolo - *Ion Trap linear*), AB SCIex (Darmstadt, DE), com ionização por *electrospray* (IES - Turbo *Ion Spray*) operando em modo negativo, e os parâmetros utilizados foram: voltagem do capilar: 3500 V, *curtain gas*: 0,3 bar, temperatura: 180°C, potencial de entrada 10 V. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de 50 a 1000 Da. As amostras foram diluídas à uma concentração de 2,5 ppm em MeOH: H₂O (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, e inseridas a um fluxo de 10 µL min⁻¹.

As análises de EM-IES das frações 3 e 5 do extrato de CFEHidr foram realizadas pelo Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química (Unesp - Araraquara) por infusão direta em um Espectrômetro de Massas LCQ - Fleet Thermo Scientific (quadrupolo - *Ion Trap linear*), AB SCIex (Darmstadt, DE), com ionização por *electrospray* (ESI - Turbo *Ion Spray*) operando em modo positivo e/ou negativo, sob supervisão do Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre. Os parâmetros utilizados para o modo positivo foram: voltagem do capilar de eletrospray: 5 kV, temperatura do capilar de transferência: 275 °C, potencial do capilar 11 V, e os parâmetros para o modo negativo foram: voltagem do capilar de eletrospray: 4 kV, temperatura do capilar de transferência: 275 °C, potencial do capilar 11 V. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de 50 a 1000 Da. As amostras foram diluídas para uma concentração de 2,5 ppm em MeOH: H₂O (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, e inseridas a um fluxo de 5 µL min⁻¹.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da capacidade antioxidante

4.1.1 Testes de atividade antioxidante dos extratos

Os extratos brutos de folhas, galhos e cascas do caule de *C. spruceanum*, em concentrações na faixa de 1 a 100 µg/mL, foram analisados frente ao ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[•], para uma avaliação preliminar, e ABTS^{•+} no decorrer do trabalho, para uma maior exploração da atividade destes extratos. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

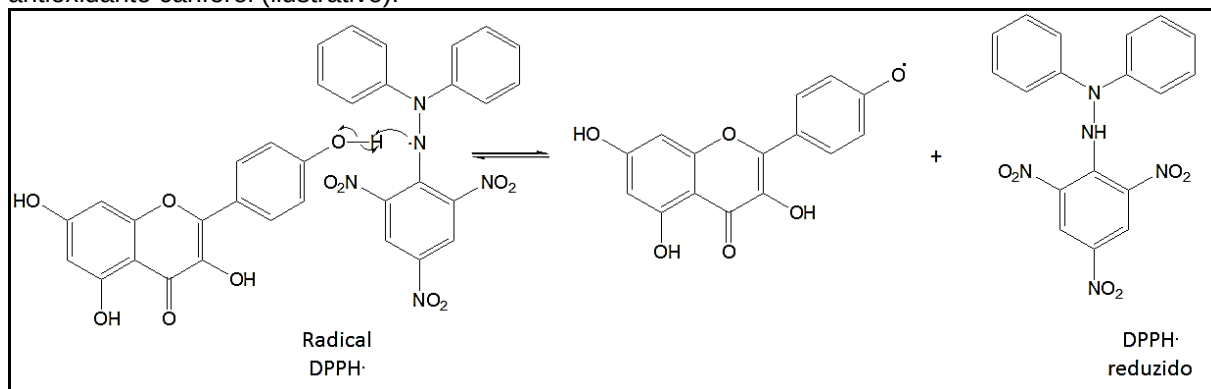
Tabela 5 - Teste da capacidade redutora do radical DPPH[•] e ABTS^{•+} dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule.

Amostra	Código	DPPH [•] / EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ^{•+} / EC ₅₀ (µg/mL)
Padrão	Rutina	6,34	10,05
Folhas	CFEAc	61,92	49,71
	CFEM	14,26	13,29
	CFEHidr	14,37	40,48
	CFEAq	>100	>100
Galhos	CGEAc	>100	47,50
	CGEM	22,61	23,50
	CGEHidr	17,48	41,89
	CGEAq	81,30	>100
Cascas do Caule	CCEAc	41,01	27,75
	CCEM	12,23	11,48
	CCEHidr	12,33	25,03
	CCEAq	16,28	16,10

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Como se pode observar na Tabela 5, os dados referentes ao teste do DPPH[•] demonstram que os extratos metanólicos e hidroetanólicos dos materiais vegetais, assim como o extrato aquoso das cascas do caule, apresentaram os menores valores de EC₅₀, indicando que os extratos testados apresentam substâncias com atividade antioxidante. Dos dados registrados para os mesmos extratos no teste de ABTS^{•+}, nota-se que os extratos mais promissores quanto à atividade antioxidante são os extratos metanólicos, corroborando os resultados obtidos no teste com DPPH[•]. O teste de DPPH[•] pode ser utilizado para uma avaliação da atividade de compostos específicos, ou de extratos, de forma rápida (Figura 9).

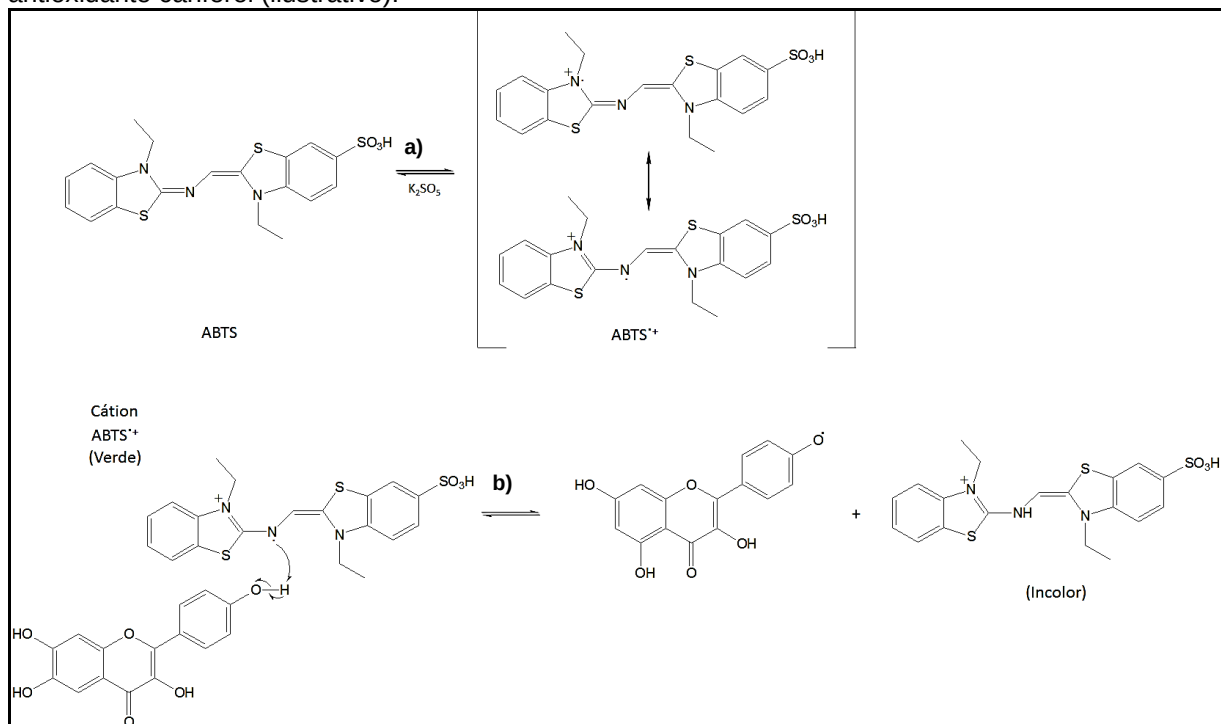
Figura 9 - Esquema ilustrativo de mecanismo de reação entre o radical DPPH[•] e uma espécie antioxidante canferol (ilustrativo).



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Os ensaios com ABTS^{•+} (Figura 10) mostraram que os extratos metanólicos foram os mais ativos. Esse teste antioxidante é indicado para uma avaliação preliminar ou detecção quanto à presença de espécies químicas de natureza tanto lipofílica como hidrofílica (SUCUPIRA et al., 2012). Porém, essa metodologia de avaliação biológica também indica que qualquer componente que apresente um potencial redox inferior ao do ABTS^{•+} faz com que ocorra uma reação química entre eles, levando a uma baixa seletividade do radical em relação às espécies químicas com átomos doadores de hidrogênio (DARONCHO et al., 2012).

Figura 10 - Mecanismo de formação de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ (a); Mecanismo de reação entre $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e agente antioxidante canferol (ilustrativo).



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Em comparação ao teste de $\text{DPPH}^{\cdot}$, o método de avaliação de atividade antioxidante $\text{ABTS}^{+\cdot}$ tem o radical gerado no experimento, o que torna menos viável a facilidade de sua utilização, mesmo que ele seja em solventes orgânicos e aquosos.

Os testes para avaliar a capacidade redutora de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e $\text{DPPH}^{\cdot}$ são conhecidos como métodos indiretos e podem ter seus resultados com variações (baixa reprodutibilidade em relação à aplicação da metodologia) devido à dependência das etapas de análises com a concentração da amostra e tempo de incubação. Porém, ambos são de fácil aplicabilidade e manipulação.

Apesar de cada teste apresentar metodologias distintas, nota-se que há uma boa correlação dos resultados obtidos em ambos os testes. Desta forma o teste do $\text{DPPH}^{\cdot}$ foi escolhido para dar continuidade aos estudos, devido à disponibilidade inicial dos reagentes em laboratório, como também a facilidade de execução do mesmo.

4.1.2 Testes de atividade antioxidante das frações dos extratos hidroetanólicos

Alíquotas das frações dos extratos hidroetanólicos de folhas (CFEHidr), galhos (CGEHidr) e cascas do caule (CCEHidr), em diferentes concentrações em uma faixa de 1 a 100 µg/mL foram analisadas frente ao ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[•] para uma avaliação antioxidante, e os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Teste preliminar da capacidade redutora do radical DPPH[•] das frações dos extratos hidroetanólicos de folhas, galhos e cascas do caule.

Amostra	Código	EC₅₀ (µg/mL)
Padrão	Rutina	6,34
CFEHidr	A	98,07
	B	16,01
	C	14,46
	D	92,92
	E	>100
	F	>100
CGEHidr	A	>100
	B	>100
	C	35,90
	D	99,52
	E	>100
	F	>100
CCEHidr	A	>100
	B	40,8
	C	30,0
	D	68,34
	E	---
	F	68,06

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

*Não houve massa suficiente para o teste da Fração E de CCEHidr

Observando os resultados da Tabela 6 referente ao teste de DPPH[•], as frações B e C dos extratos hidroetanólicos de folhas (CFEHidr) e cascas do caule (CCEHidr), e a fração C do extrato hidroetanólico de galhos (CGEHidr) apresentaram menores valores de EC₅₀, assim indicando que possuem um potencial antioxidante maior devido à presença de substâncias de caráter antioxidante nas frações estudadas. Desta forma, estas frações foram selecionadas para avaliação do perfil cromatográfico e identificação dos compostos presentes.

4.1.3 Testes de atividade antioxidante das frações dos extratos hidroetanólicos

Alíquotas das frações do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr), obtidas na análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala preparativa (Seção 3.3.1), em diferentes concentrações em uma faixa de 1 a 100 µg/mL foram também analisadas frente ao ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[•] para uma avaliação preliminar, e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Teste preliminar da capacidade redutora do radical DPPH[•] das frações do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr).

Amostra	Código	EC ₅₀ (µg/mL)
Padrão	Rutina	6,34
CFEHidr	Fração 1	>100
	Fração 2	23,10
	Fração 3	>100
	Fração 4	74,71
	Fração 5	>100
	Fração 6	>100

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Nessa análise de atividade antioxidante, pode-se notar que os resultados referente ao teste de DPPH[•], a Fração 2 apresentou menor valor de EC₅₀, assim indicando que possui um maior potencial antioxidante, em comparação com as demais amostras, devido à presença de substâncias de caráter antioxidante nas frações estudadas. As demais frações apresentaram valores muito elevados de EC₅₀, indicando a baixa potencialidade em inibir o radical DPPH[•].

Analizando os dados obtidos, verifica-se que o extrato hidroetanólico de folhas apresenta um potencial antioxidante maior quando comparado com suas respectivas frações obtidas, sugerindo que a atividade antioxidante (compostos fenólicos), do extrato hidroetanólico de folhas corresponde ao conjunto de substâncias presentes no extrato. Este fenômeno é conhecido como sinergismo, ou seja, a atividade é decorrente da sinergia entre as substâncias do sistema biológico, em geral muito comum em plantas com ação medicinal e que ao serem processadas para isolamento do princípio ativo, este em geral é perdido no isolamento (RAMALHO; JORGE, 2006). Também pode ocorrer outras espécies químicas numa matriz estudada e estas serem sinérgicas, o que, em concentração adequada,

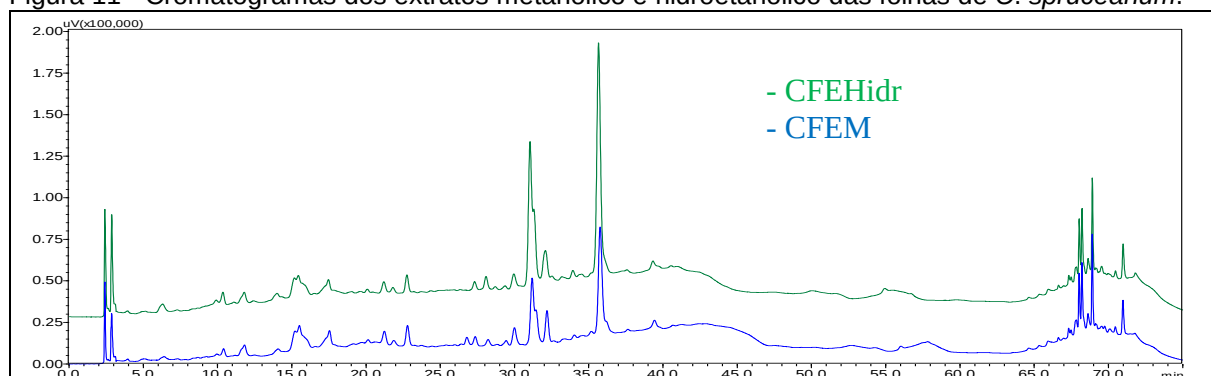
contribui para o aumento da atividade antioxidante dos antioxidantes primários no referido extrato (COSMÉTICOS, 2008).

4.2 Estudos dos perfis cromatográficos e químicos dos extratos brutos

4.2.1 Perfis cromatográficos dos extratos brutos

Os cromatogramas (Figuras 11, 12 e 13) dos extratos brutos com atividade antioxidante mais relevante das diferentes partes do vegetal foram submetidos às análises cromatográficas e foram observados picos com diferentes intensidades e tempos de retenção, característicos de compostos com distintas polaridades, variando de média a alta.

Figura 11 - Cromatogramas dos extratos metanólico e hidroetanólico das folhas de *C. spruceanum*.



Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μ m; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 μ L, fluxo 1,0 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B) (15-70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial). λ =254 nm.

Figura 12 - Cromatogramas dos extratos metanólico e hidroetanólico de galhos de *C. spruceanum*. Condições de análise descritas na Fig. 11.

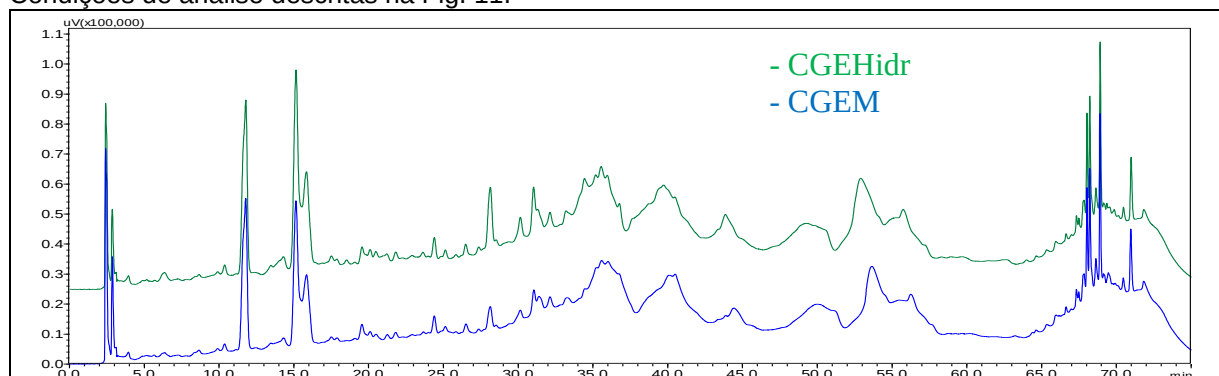
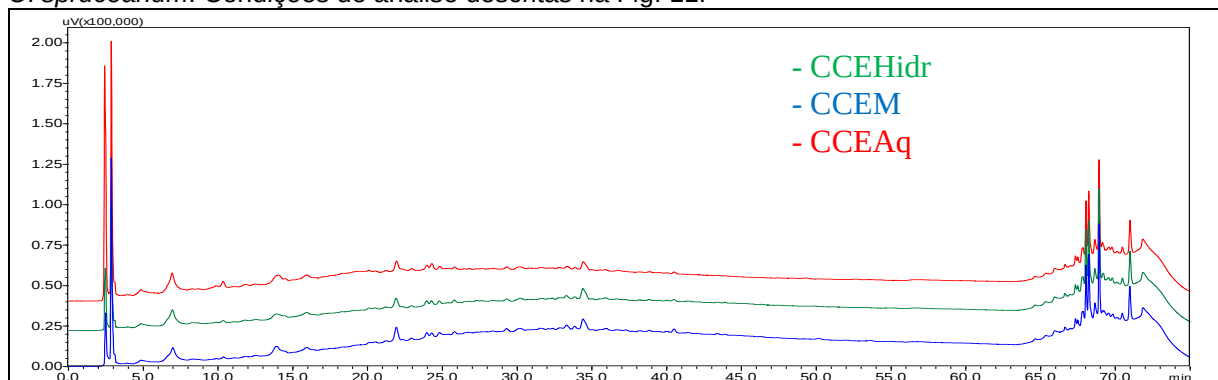


Figura 13 - Cromatogramas dos extratos metanólico, hidroetanólico e aquoso das cascas de caule de *C. spruceanum*. Condições de análise descritas na Fig. 11.



Comparando os cromatogramas dos extratos brutos, os quais tiveram resultados mais significativos frente aos testes antioxidantes empregados (Figuras 11, 12 e 13), observa-se uma semelhança entre os perfis cromatográficos, somente variando a intensidade dos picos. Nos cromatogramas dos extratos de folhas e galhos (Figuras 11 e 12), pode-se observar de forma mais clara a variabilidade dos compostos com maior concentração pela intensidade dos sinais, indicando uma maior quantidade de metabólitos que podem ser separados utilizando a metodologia mais adequada. Assim, há um indicativo que a extração hidroetanólica pode ter sido mais eficiente quando comparada à extração metanólica. Pode-se observar a variação metabólica dos diferentes extratos em 254 nm, com uma quantidade significativa de picos por todo o cromatograma. A absorção neste comprimento de onda indica a presença de uma ampla variedade de compostos com aromaticidade.

4.2.2 Perfil químico dos extratos brutos por RMN de ^1H

O uso dessa técnica como um *fingerprint* dentro dos estudos de fitoquímica ocorre de forma ampla e auxilia na identificação de certas classes de produtos naturais. Nas Figuras 14 a 16 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos com atividade antioxidante relevante de folhas, galhos e cascas do caule de *C. spruceanum*. Destaca-se que esta análise corroborou com os resultados observados em CLAE-DAD, demonstrando que os extratos apresentam perfil das espécies metabólicas majoritárias semelhantes. Nota-se que o sinal intenso observado em $\delta_{\text{H}} 2,5$ é atribuído ao solvente DMSO- d_6 utilizado para tal análise.

Figura 14 - Espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, dos extratos das folhas de *C. spruceanum*: a) CFEM; b) CFEHidr. (DMSO- d_6 , 300 MHz).

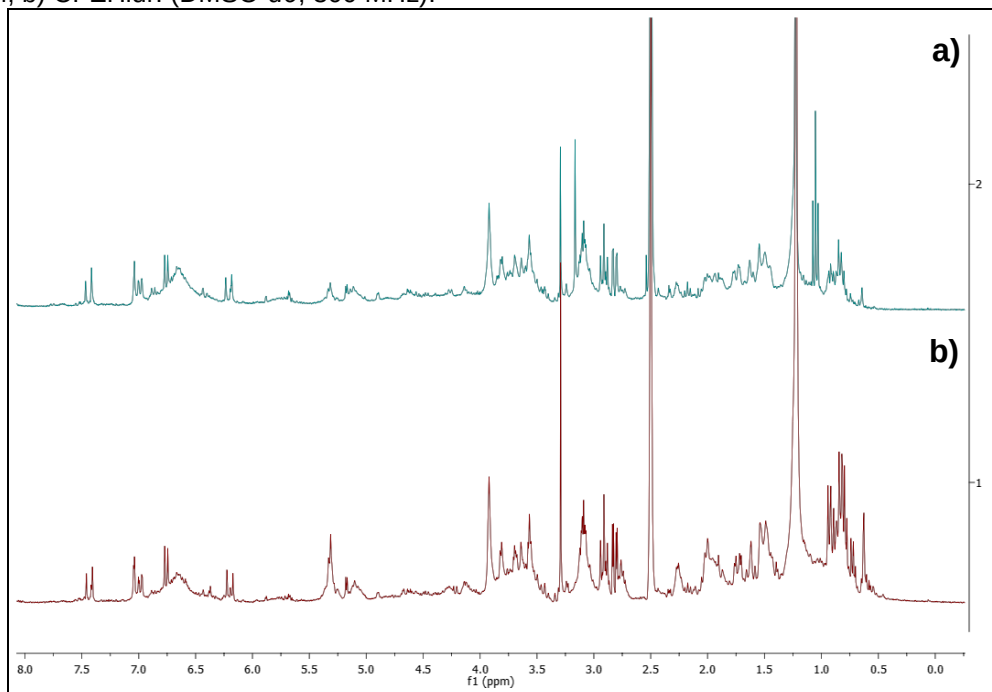


Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, dos extratos de galhos de *C. spruceanum*: a) CGEM; b) CGEHidr. (DMSO- d_6 , 300 MHz).

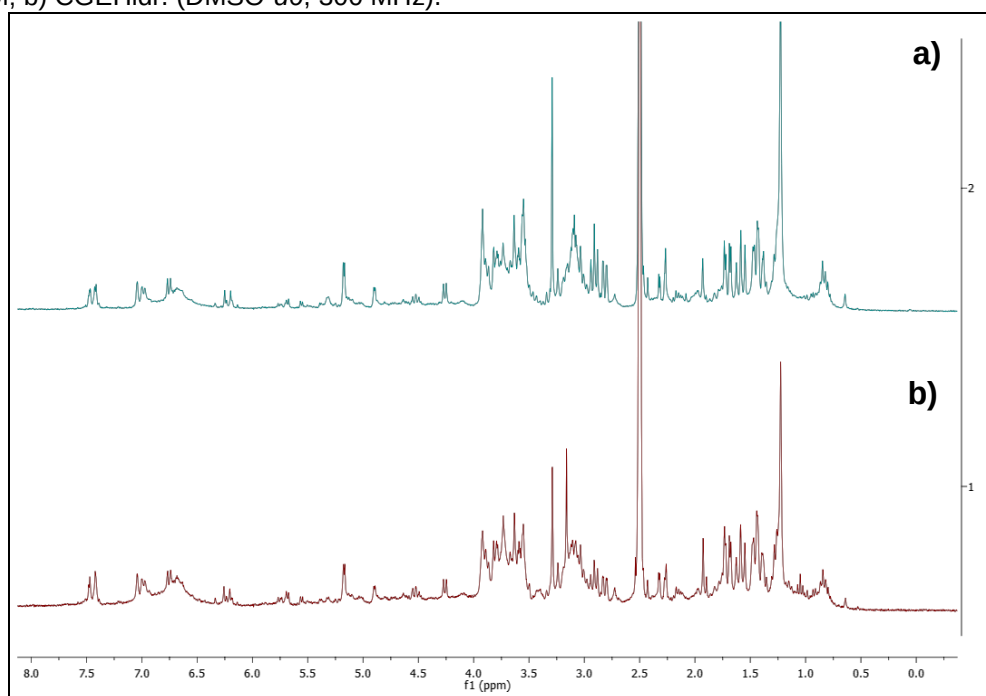
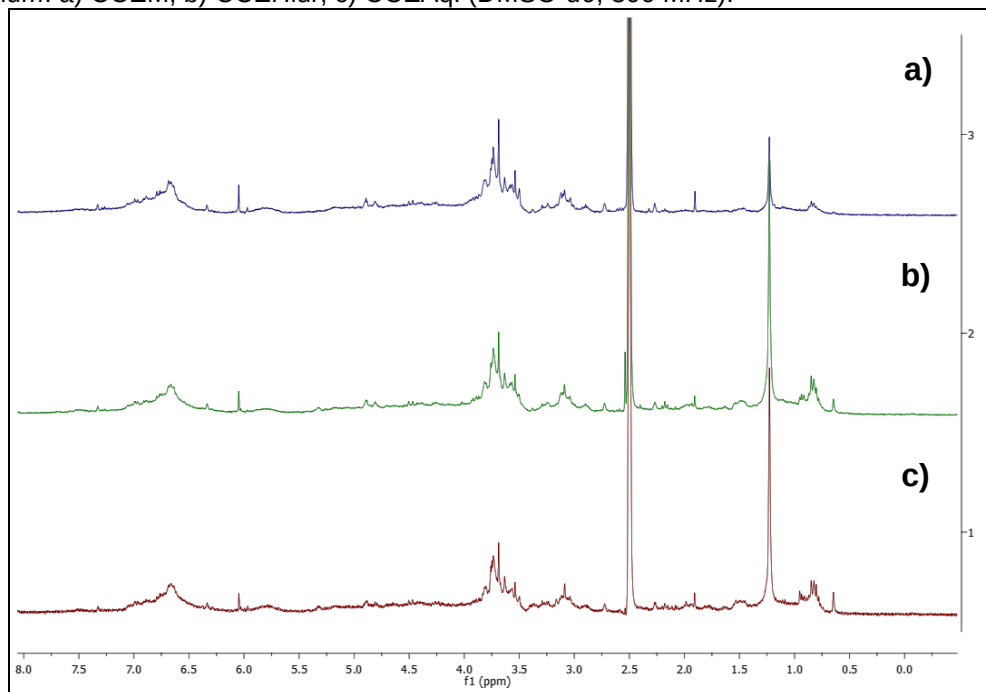


Figura 16 - Espectros de RMN de ^1H , com pressaturação, dos extratos de cascas do caule de *C. spruceanum*: a) CCEM; b) CCEHidr; c) CCEAq. (DMSO- d_6 , 300 MHz).



Analisando os resultados obtidos por meio da técnica de RMN de ^1H dos extratos brutos citados (Figuras 14 a 16), nota-se a semelhança entre os espectros dos diferentes extratos em comparação com cada respectiva parte vegetal estudada. Verificam-se, nestes espectros, sinais relevantes em δ_{H} 0,5 - 0,8 característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos (δ_{H} 0,7 - 3,0), como também sinais característicos de hidrogênios pertencentes às unidades glicosídicas (δ_{H} 2,0 - 5,0), hidrogênios carbinólicos (δ_{H} 3,0 - 4,0), hidrogênios olefínicos (δ_{H} 4,5 - 6,0), e uma região de aromáticos (δ_{H} 6,5 - 8,0).

Estes resultados indicam que os extratos brutos estudados apresentam evidências da presença de várias substâncias aromáticas, como também confirmam a diversidade metabólica presente nos extratos analisados.

Estes resultados, juntamente com os resultados dos testes antioxidantes, e cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, justificam de forma preliminar o fracionamento dos extratos hidroetanólicos de folhas, galhos e cascas de caule de *C. spruceanum* para a identificação dos metabólitos secundários presentes nos mesmos. Ressaltando que a utilização de extratos provenientes de plantas dentro da indústria de cosméticos está crescendo cada vez mais devido ao caráter “verde” dos mesmos, sendo assim menos tóxicos para as pessoas e gerando menos resíduos danosos ao meio ambiente. Assim, há a necessidade de pesquisas constantes para

a comprovação dos efeitos benéficos e eficácia dos extratos vegetais a serem aplicados como potenciais bioprodutos que atraem tanto o mercado consumidor (DAL'BELO, 2008; BALOGH, 2011).

4.3 Estudo dos perfis cromatográficos e químicos das frações

4.3.1 Perfil cromatográfico das frações dos extratos hidroetanólicos

Os cromatogramas (Figuras 17 a 19) das frações dos extratos hidroetanólicos, de A a F, das diferentes partes da planta foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais (CLAE-DAD) descritas anteriormente (Fig. 6).

Figura 17 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de folhas. Condições de análise descritas na Fig. 11.

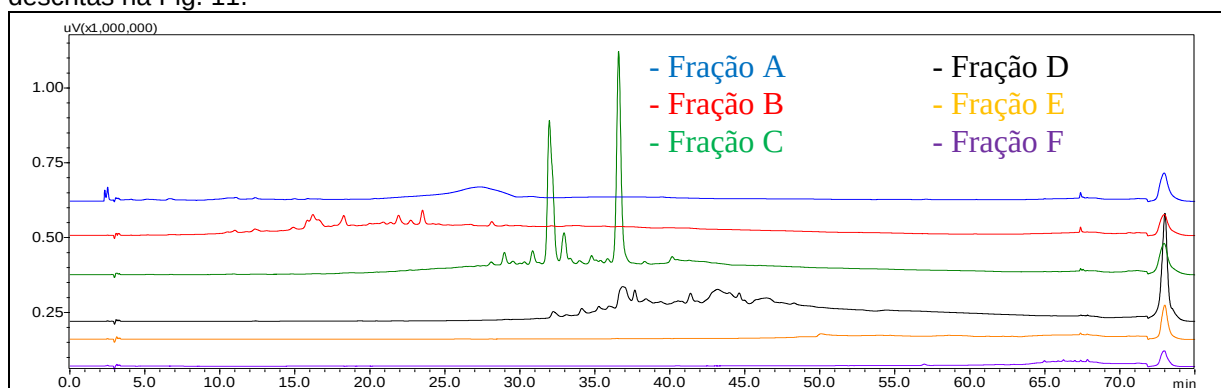


Figura 18 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de galhos. Condições de análise descritas na Fig. 11.

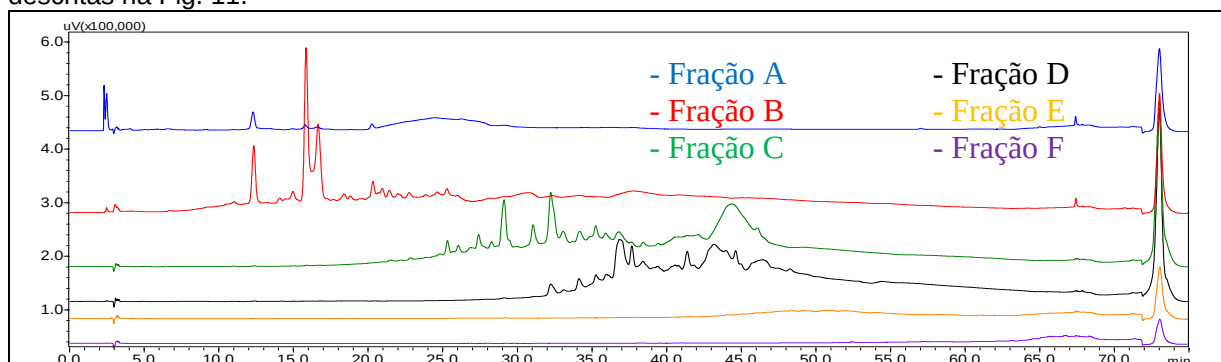
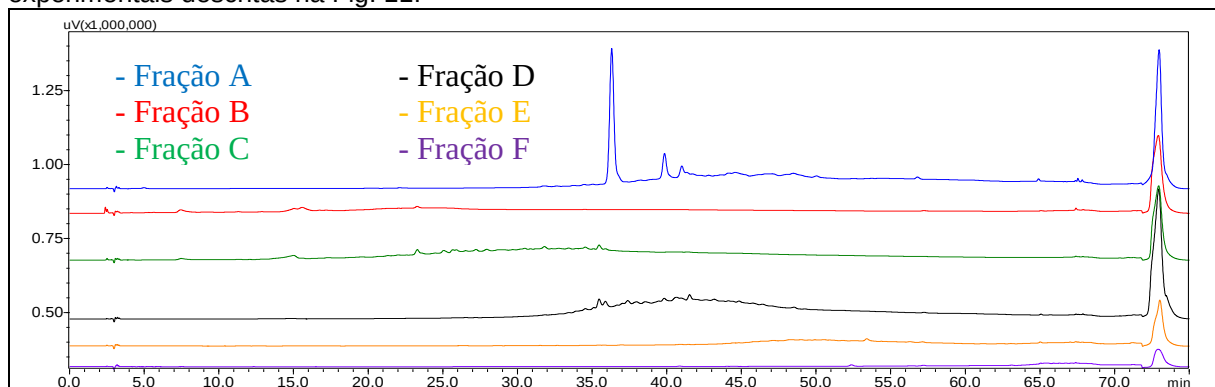


Figura 19 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de cascas do caule. Condições experimentais descritas na Fig. 11.

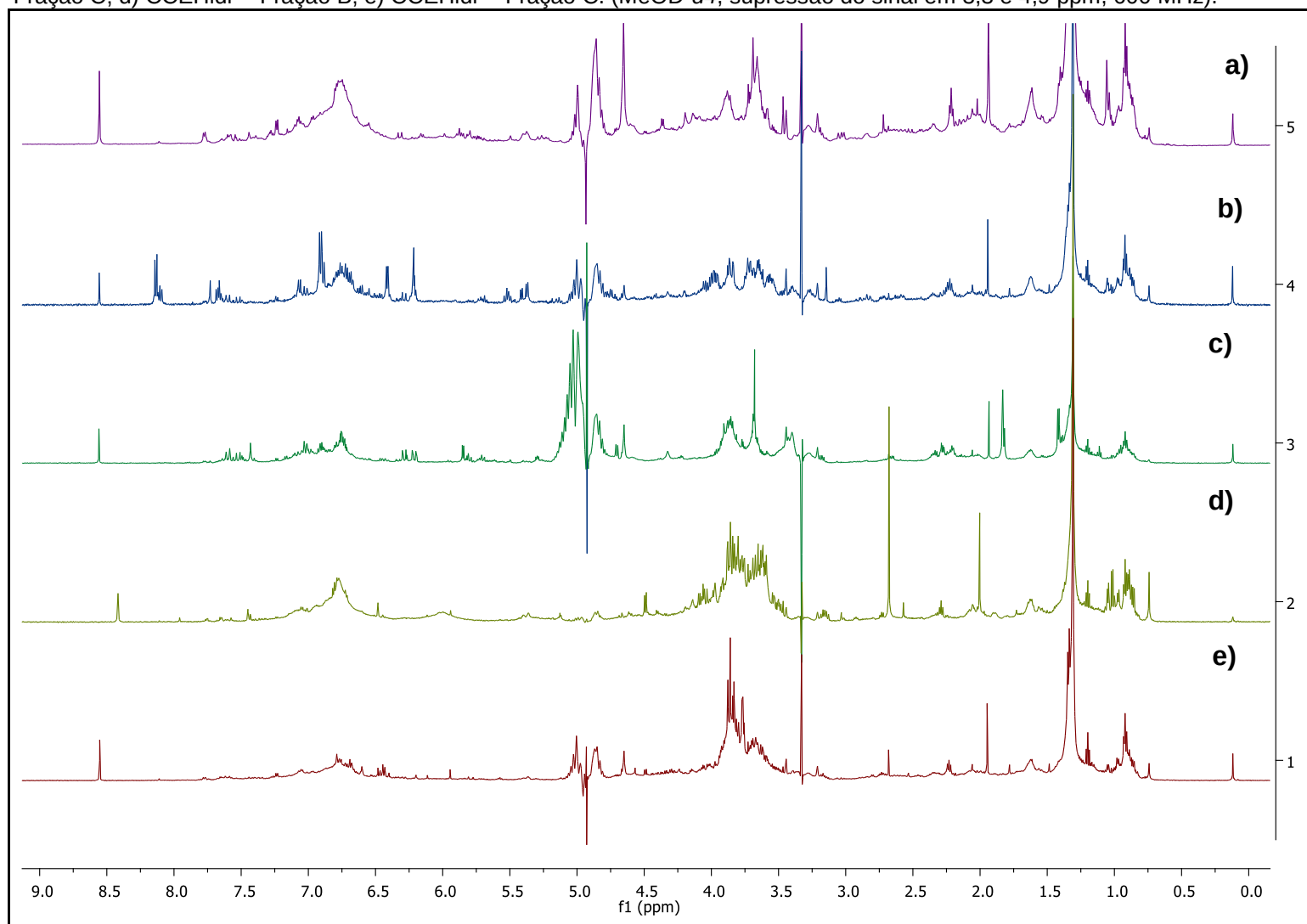


Pode-se observar, em 254 nm, a variação metabólica conforme a polaridade da fração obtida. Comparando os cromatogramas das frações obtidas de um mesmo extrato, verifica-se que estas apresentaram picos com diferentes intensidades em diferentes tempos de retenção, evidenciando a separação dos compostos de diferentes polaridades dos extratos de origem.

4.3.2 Perfil químico por RMN de ^1H das frações que responderam positivamente ao teste antioxidante.

Para uma análise preliminar do perfil químico das frações selecionadas dentro do estudo (Seção 4.1.2) foi utilizada a técnica de RMN de ^1H . Nota-se que nesses espectros (Figura 20) também há uma mistura de várias classes de compostos, assim como foi observado a partir dos extratos brutos, devido aos diversos sinais em diferentes deslocamentos químicos. De uma forma geral, observam-se sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (δ_{H} 0,8 - 3,0), hidrogênios típicos de grupos carbinólicos (δ_{H} 3,0 - 4,0), de açúcares (δ_{H} 3,0 e 5,0), hidrogênios olefínicos (δ_{H} 4,5 - 6,0), e uma região de certa complexidade de sinais correspondentes a sistemas aromáticos (δ_{H} 6,5 - 8,0).

Figura 20 - Espectros de RMN de ^1H , com dupla irradiação, das frações do extrato hidroetanólico das folhas a) CFEHidr – Fração B; b) CFEHidr – Fração C; c) CGEHidr – Fração C; d) CCEHidr – Fração B; e) CCEHidr – Fração C. (MeOD- d_4 , supressão do sinal em 3,3 e 4,9 ppm, 600 MHz).



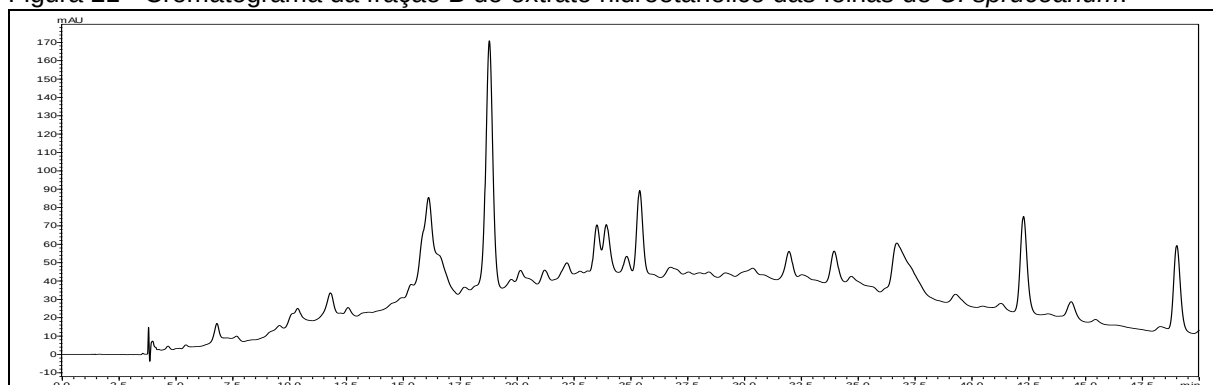
As regiões nos espectro correspondentes aos hidrogênios aromáticos e às unidades glicosídicas apresentam grande quantidade de sinais, indicativo de substâncias aromáticas glicosiladas. Mas de forma geral, o perfil químico de cada fração selecionada dos diferentes órgãos da planta apresenta semelhança, o que indica similaridade na classe de compostos a serem estudados, e que o fracionamento proposto, inicialmente, separou os constituintes dos extratos brutos de origem em faixas abrangentes de classes de compostos com polaridades semelhantes.

4.4 Análise cromatográfica das frações com atividade antioxidante promissora

4.4.1 Otimização das condições de análise das frações promissoras do extrato hidroetanólico de folhas, galhos e cascas do caule via CLAE-DAD

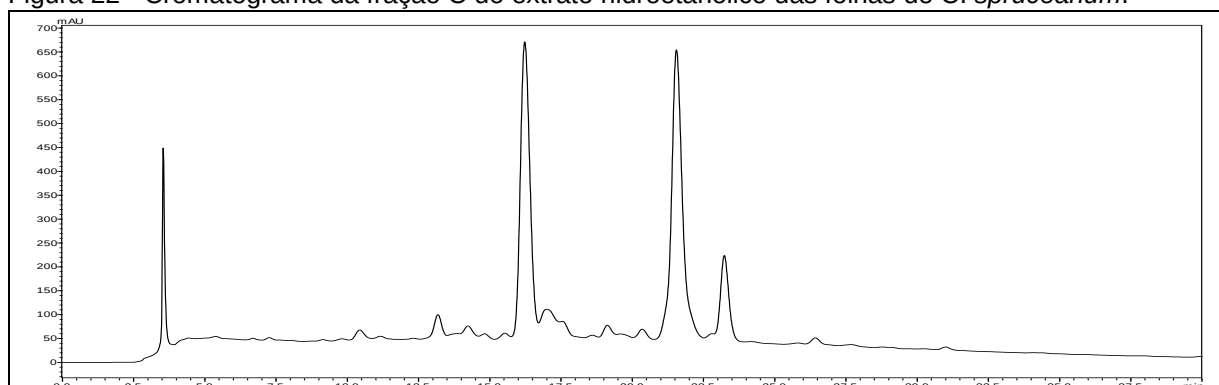
Para uma melhor separação, identificação e compreensão das classes de metabólitos secundários presentes nas amostras selecionadas de acordo com o teste antioxidante realizado, foram feitas diversas análises para otimização dos perfis cromatográficos. O sistema de solventes e gradiente de eluição utilizados para análise das amostras selecionadas estão descritos em cada figura apresentada (Figuras 21 a 25).

Figura 21 - Cromatograma da fração B do extrato hidroetanólico das folhas de *C. spruceanum*.



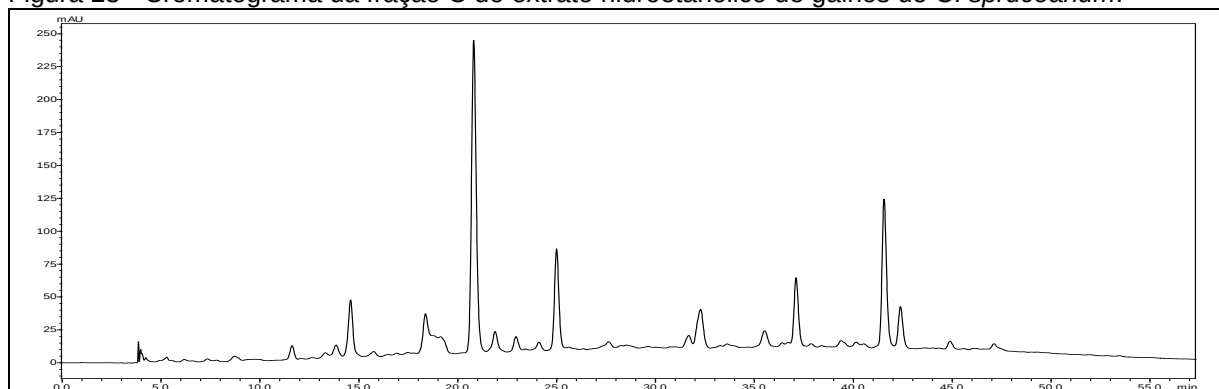
Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μ m; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 μ L, fluxo 0,8 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (20-50 % B em 50 min, 100% B em 55 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). λ =254 nm

Figura 22 - Cromatograma da fração C do extrato hidroetanólico das folhas de *C. spruceanum*.



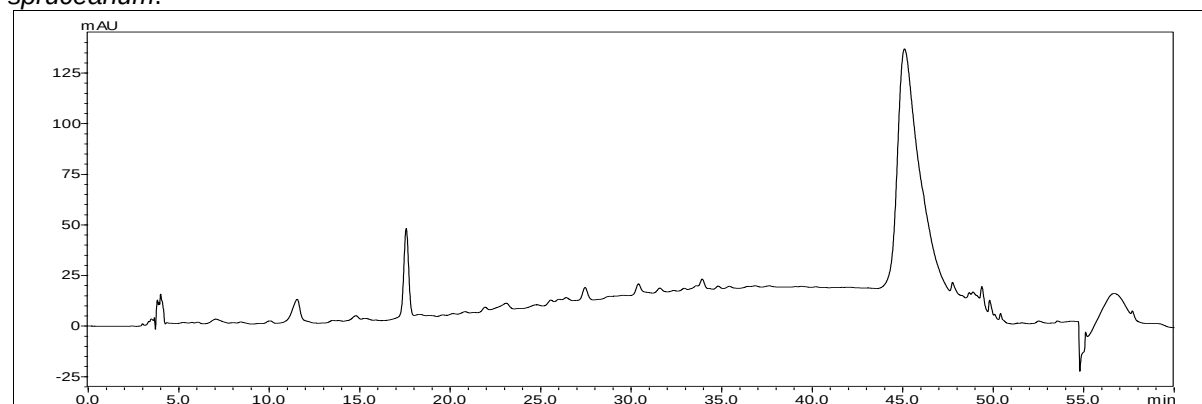
Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μ m; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 μ L, fluxo 0,8 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (36-60 % B em 40 min, 100% B em 45 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). λ =254 nm

Figura 23 - Cromatograma da fração C do extrato hidroetanólico de galhos de *C. spruceanum*.



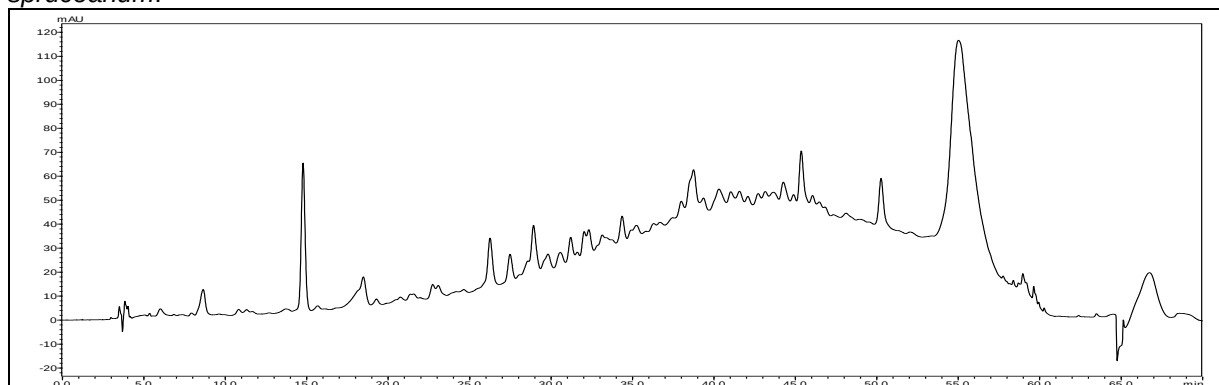
Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μ m; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 μ L, fluxo 0.8 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (36-60 % B em 40 min, 100% B em 45 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). λ =254 nm

Figura 24 - Cromatograma da fração B do extrato hidroetanólico de cascas do caule de *C. spruceanum*.



Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μ m; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 μ L, fluxo 0,8 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (10-40 % B em 50 min, 100% B em 55 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). λ =254 nm

Figura 25 - Cromatograma da fração C do extrato hidroetanólico de cascas do caule de *C. spruceanum*.



Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μm ; $h \times \Phi = 250 \times 4,6 \text{ mm}$), volume de injeção de 15,0 μL , fluxo 0,8 mL min^{-1} e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (15-50 % B em 50 min, 100% B em 55 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). $\lambda=254 \text{ nm}$

Em comparação com o gradiente de eluição inicialmente utilizado para as frações (Seção 4.3.1) pode-se observar que a otimização levou a uma melhor resolução dos compostos presentes, sendo possível visualizar o melhor formato e estreitamento dos picos devido à adição de ácido fórmico na fase móvel, o que auxilia nas análises por espectrometria de massas.

4.5 Identificação de compostos fenólicos nas frações B e C do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr)

As frações B e C do extrato hidroetanólico de folhas (CFEHidr) foram analisadas por meio de três técnicas diferentes e foi possível identificar diversos compostos fenólicos. A Tabela 8 apresenta as espécies químicas identificadas em cada fração, assim como os tempos de retenção (t_R); máximo de absorção no UV-vis (UV-vis ($\lambda_{\text{máx}}$)); íons detectados por CLAE-EM (íons CL-EM); íons detectados por EM-IES (EM-IES (-)) e o modo de identificação utilizado para o reconhecimento estrutural ao longo de todo o trabalho.

Tabela 8 - Compostos fenólicos identificados nas frações antioxidantes promissoras do extrato hidroetanólico de folhas de *C. spruceanum*.

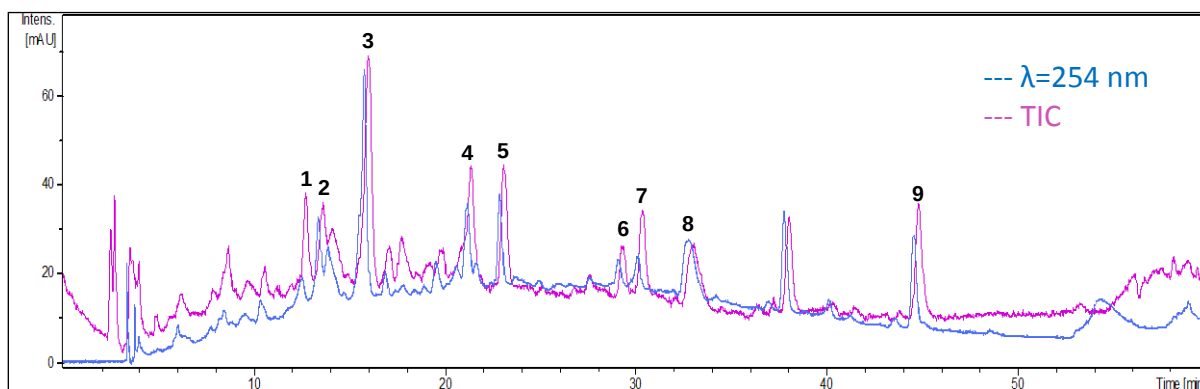
Fração B					
Substâncias	t _R (min)	UV-vis (λ _{máx})	Íons CL- EM	EM-IES (-)	Modo de identificação
ácido 3,5-dicafeoilquínico	41,34	239; 286; 327	---	515; 353; 191; 179; 173	UV; EM
monômero de [epi]catequina	---	---	---	289	EM
dímero de [epi]catequina	---	---	---	577; 425; 407; 289; 125	EM
trímero de [epi]catequina	---	---	---	865; 577; 451; 425; 413; 407; 289; 287	EM
tetrâmero de [epi]catequina	---	---	---	1153	EM
monômero de [epi]catequina glicosilado	---	---	---	451	EM
dímero de [epi]catequina Glicosilado	---	---	---	739; 577; 449; 289; 287	EM
trímero de [epi]catequina glicosilado	---	---	---	1027; 865; 577; 575; 449; 423; 289; 288	EM
Fração C					
Substâncias	t _R (min)	UV-vis (λ _{máx})	Íons CL- EM	EM-IES (-)	Modo de identificação
quercetina 3-O-α-arabinopiranosil (1→6) β-glucopiranosídeo	15,08	255; 366	595	595; 301; 300	UV; EM; RMN
canferol 3-O-β-D-glucopiranosil (1→2) β-D-xilopiranosídeo	20,09	285; 348	579	579; 285; 284	UV; EM; RMN
ácido 1,4-dicafeoilquínico	22,19	236; 300; 326	515	515; 353; 255; 299; 203; 191; 179; 173	UV; EM

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

4.5.1 Análise da fração B do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM

O cromatograma obtido por CLAE-DAD e o cromatograma de íons totais (TIC) da fração B do extrato hidroetanólico de folhas (Figuras 26) foram obtidos utilizando as condições experimentais descritas anteriormente (Seções 3.4.4 e 4.4.1). Nota-se que há uma similaridade entre os perfis dos cromatogramas, o que possibilita a identificação dos compostos por meio de duas metodologias robustas empregadas no estudo: CLAE-DAD e CLAE-EM. Observa-se a presença de compostos aromáticos, com predominância de derivados fenólicos e unidades com carbonos insaturados (comprimento de onda de 254 nm). A Tabela 9 apresenta os íons de maior intensidade e seus respectivos tempos de retenção. Em cada tempo de retenção foi verificado a presença de mais de um íon presente, o que indica que diversas substâncias estão co-eluído, dificultando a identificação de algumas das substâncias presentes na amostra. Ressalta-se que as análises por infusão direta para a fração B, utilizaram como parâmetro alguns dos dados dos íons pré-selecionados originados via análises de CLAE-EM (Seção 3.4.4).

Figura 26 - Cromatograma em $\lambda=254$ nm e cromatograma de íon totais (TIC) da fração B de CFEHidr no modo negativo, sendo a faixa de varredura de 50 a 1000 Da.



Assim, a partir dos resultados obtidos, dois dos picos com maiores intensidades no cromatograma de íons totais (TIC) foram selecionados para estudos preliminares de fragmentação e posterior identificação por meio de dados presentes na literatura e padrão de fragmentação.

Tabela 9 - Seleção de íons da fração B, do extrato hidroetanólico de folhas de *C. spruceanum*, com m/z mais intensos e seus respectivos tempos de retenção (t_R).

Pico	$t_R(\text{min})$	m/z
1	12,8	357,0620
		709,1580
2	13,6	515,1233
3	16,1	707,1862
4	21,4	927,2968
		849,3439
		431,1954
5	23,2	431,1958
		499,1830
6	29,6	377,1835
		553,1602
7	30,4	403,1270
		471,1126
		807,2609
8	33,1	451,1043
		577,2075
		645,1958
		605,0919
9	44,8	515,1233
		629,1157

Fonte: elaborada pela autora, 2016.

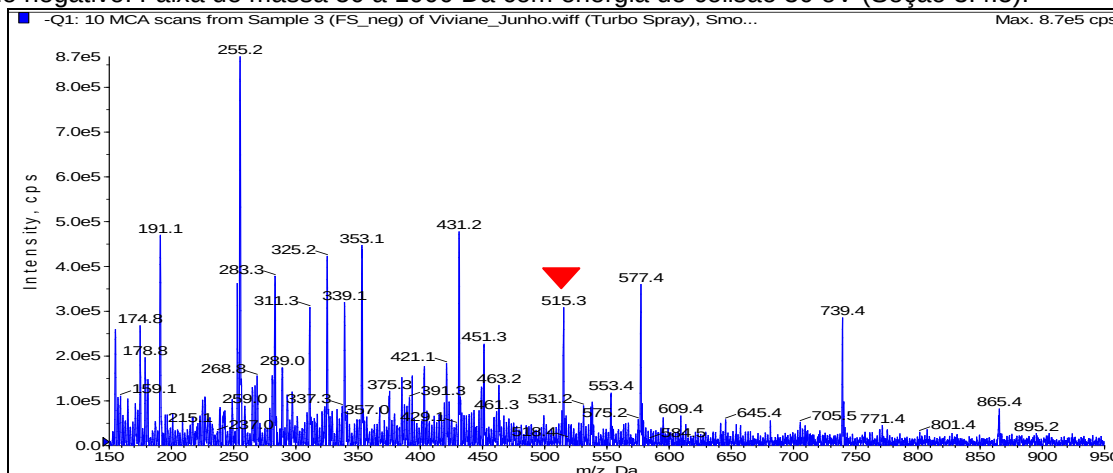
Poucos picos apresentaram apenas uma única substância. Assim, houve a necessidade da utilização de outras ferramentas além da técnica de espectrometria de massas para a identificação das demais substâncias presentes na mistura.

4.5.2 Análise da fração B do extrato hidroetanólico de folhas via EM-IES

4.5.2.1 Identificação de derivado de ácido clorogênico

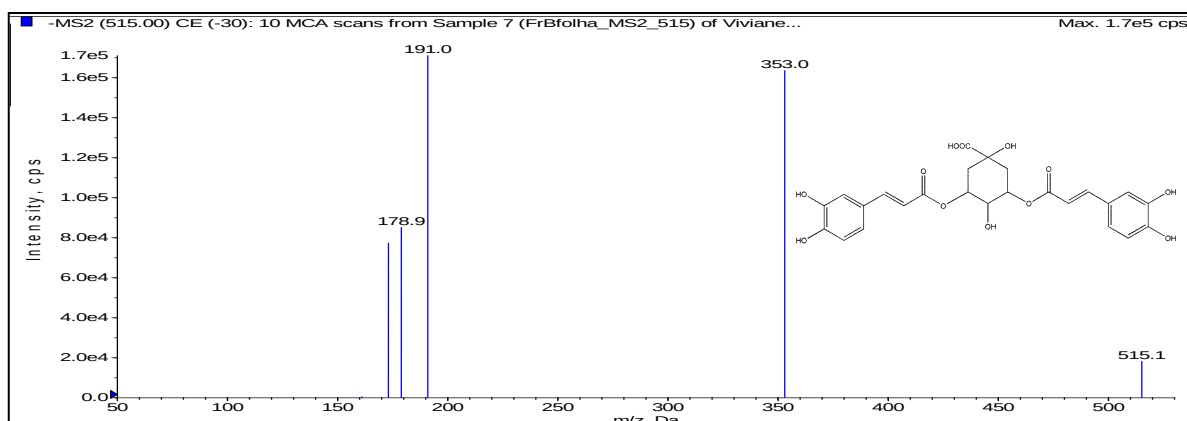
Após a verificação dos íons com maior intensidade, a fração B foi submetida a um estudo mais abrangente por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*, no modo de infusão direta, gerando o espectro de massas inicial, apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Espectros de massas de primeira ordem, em infusão direta da fração B de CFEHidr no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



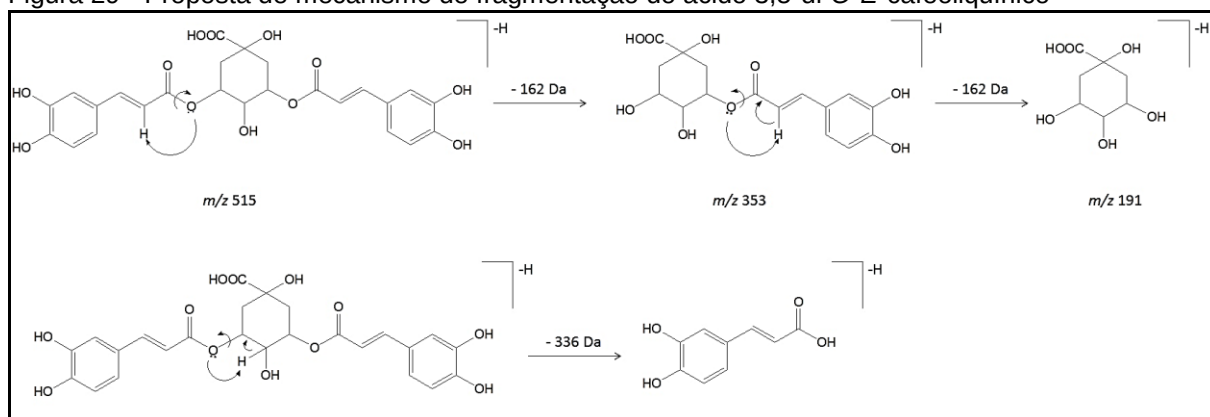
Inicialmente, com a seleção do íon m/z 515, pode-se identificar o ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, presente na mistura estudada, (M.M = 516 g/mol) por meio da comparação dos dados obtidos com o estudo de fragmentação realizado por Gobbo-Neto (2007), assim como o espectro de fragmentação do padrão cedido pela Dra. Paula Bueno. Analisando o espectro de massas do íon m/z 515 pré-selecionado (EM-IES(-)) (Figura 28), pode-se observar o padrão de fragmentação bem definido ($[M-H]^- = 515$; $[M-H-162]^- = 353$; $[M-H\text{-ácido cafeico}]^- = 179$; $[M-H\text{-ácido quínico}]^- = 191$), sendo os íons m/z 353, 191, 179 característicos de um derivado de ácido clorogênico.

Figura 28 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 515. Faixa de íons 50 a 600 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



Observando a proposta de mecanismo de fragmentação (Figura 29) dessa espécie química, sabe-se que ocorrem mecanismos de clivagem heterolítica para a formação dos íons m/z 353, 191 e 179.

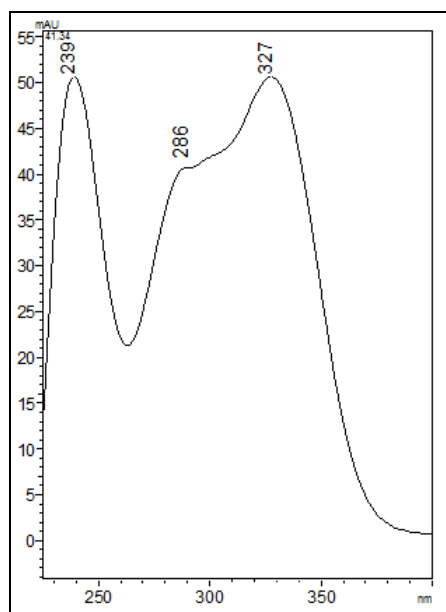
Figura 29 - Proposta de mecanismo de fragmentação do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Analizando o cromatograma da fração B, essa substância também pode ser identificada pelos valores máximos de absorção das bandas características presentes no espectro de absorção no ultravioleta-visível (UV-vis) (Figura 30). No tempo de retenção de 41,34 min (Figura 21) nota-se a presença de três bandas em 239 nm; 286 nm e 327 nm sendo dados característicos de derivados de ácido dicafeoilquínico (BRAVO, GOYA; LECUMBERRI, 2007; NOLEET; TOLDRÁ, 2012; GREGÓRIO, 2008).

Figura 30 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração B de CFEHidr via CLAE-analítico ($t_R = 41,34$ min).



A atividade antioxidante do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico é descrita na literatura, onde há estudos que mostram a aptidão desta substância no seqüestro de espécies radicalares livres (ABRAHÃO et al., 2008; FILIP et al., 2001).

4.5.2.2 Identificação de proantocianidinas

Observando e interpretando minuciosamente o *full scan* da fração B em outras faixas de massas (Figuras 31 e 32), verificou-se a presença de diversos valores de m/z , sendo estas identificadas e referentes a duas séries homólogas distintas de proantocianidinas (RODRIGUES et al., 2007).

Figura 31 - Espectros de massas de primeira ordem, em infusão direta da fração B de CFEHidr no modo negativo. Faixa de massa 250 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

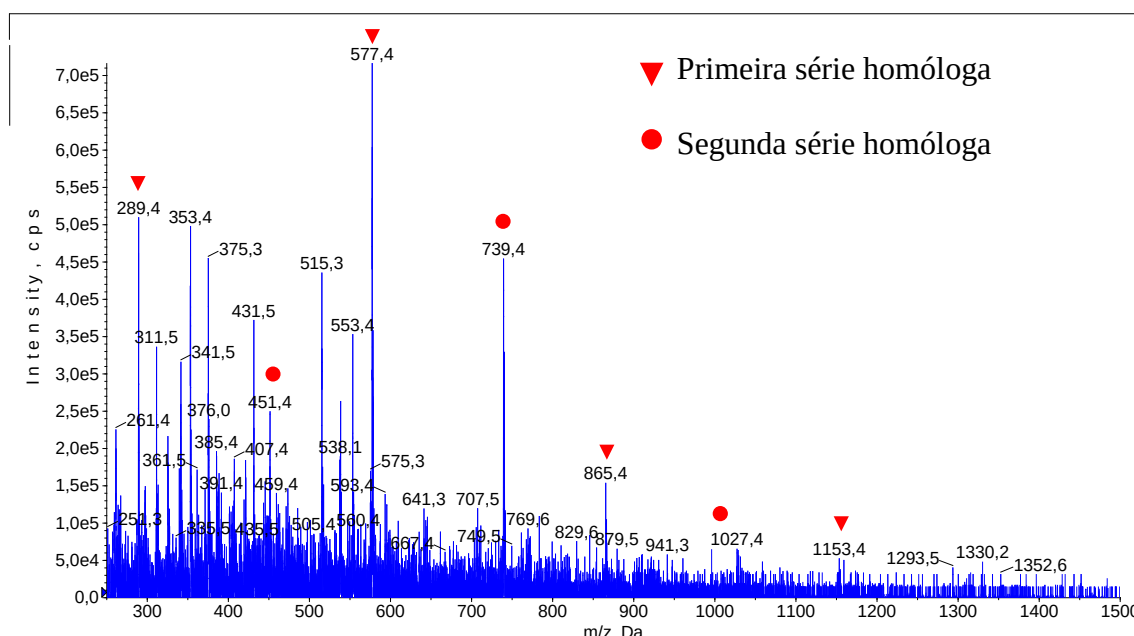
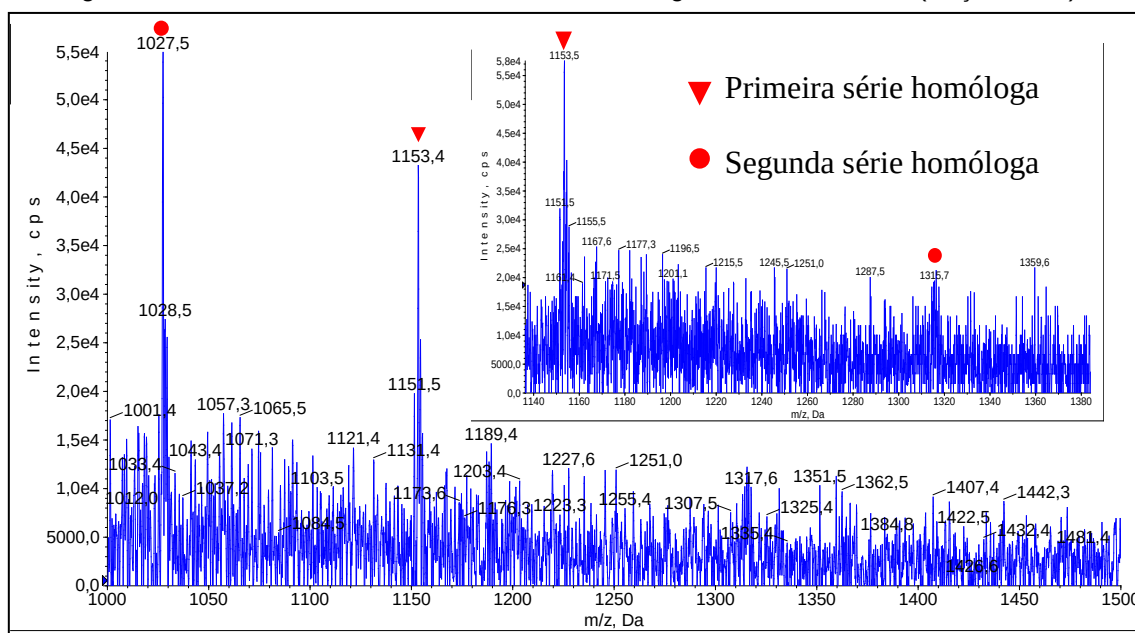


Figura 32 - Espectros de massas de primeira ordem, em infusão direta da fração B deCFEHidr no modo negativo. Faixa de massa 1000 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



Cada série homóloga de proantocianidinas identificadas está discutida de forma ampla nas seções 4.5.2.2.1 e 4.5.2.2.2.

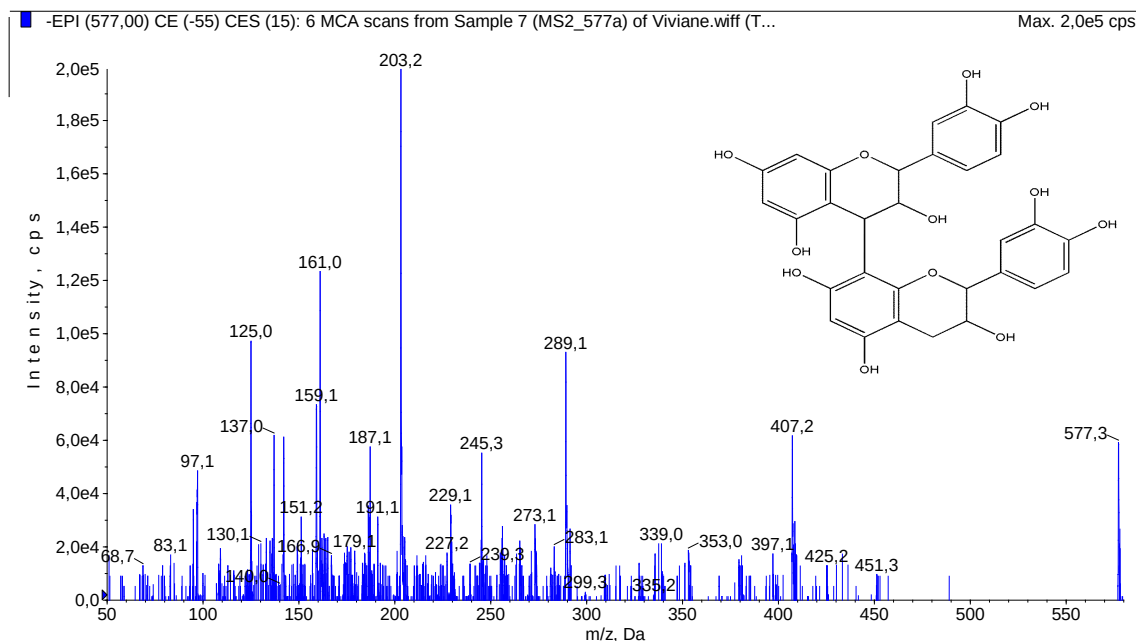
4.5.2.2.11^a Série homóloga de proantocianidinas

A primeira série homóloga de proantocianidinas (▼) pode ser identificada devido a presença de uma sequência de íons separados por 288 Da (Figuras 31 e 32), sendo o grau de polimerização com variação de uma a quatro unidades de monômeros, referente a [epi]catequina (m/z 289). A interpretação dos dados das frações e das substâncias identificadas mostrou íons correspondentes ao monômero (m/z 289); dímero (m/z 577); trímero (m/z 865); tetrâmero (m/z 1153) da [epi]catequina (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES, 2007). Foi possível realizar experimentos de fragmentação de alguns íons precursores selecionados desta primeira série homóloga, como descrito a seguir.

Inicialmente, o íon de m/z 577 $[M-H]^-$, em modo negativo, foi escolhido para estudo do padrão de fragmentação para a identificação da substância de M.M 578 g/mol (Figura 33). Analisando o espectro de massas gerado e consultando a literatura (PAMPÍN et al., 2007), o padrão de fragmentação (EM-ESI(-)) ($[M-H]^-$ = 577; $[M-H-152]^-$ = 425; $[M-H-152-H_2O]^-$ = 407; $[M-H-288]^-$ = 289; $[M-H-288-163]^-$ = 125) e a

massa molecular (M.M = 578 g/mol) da substância a ser identificada, confirma a presença de um dímero de [epi]catequina.

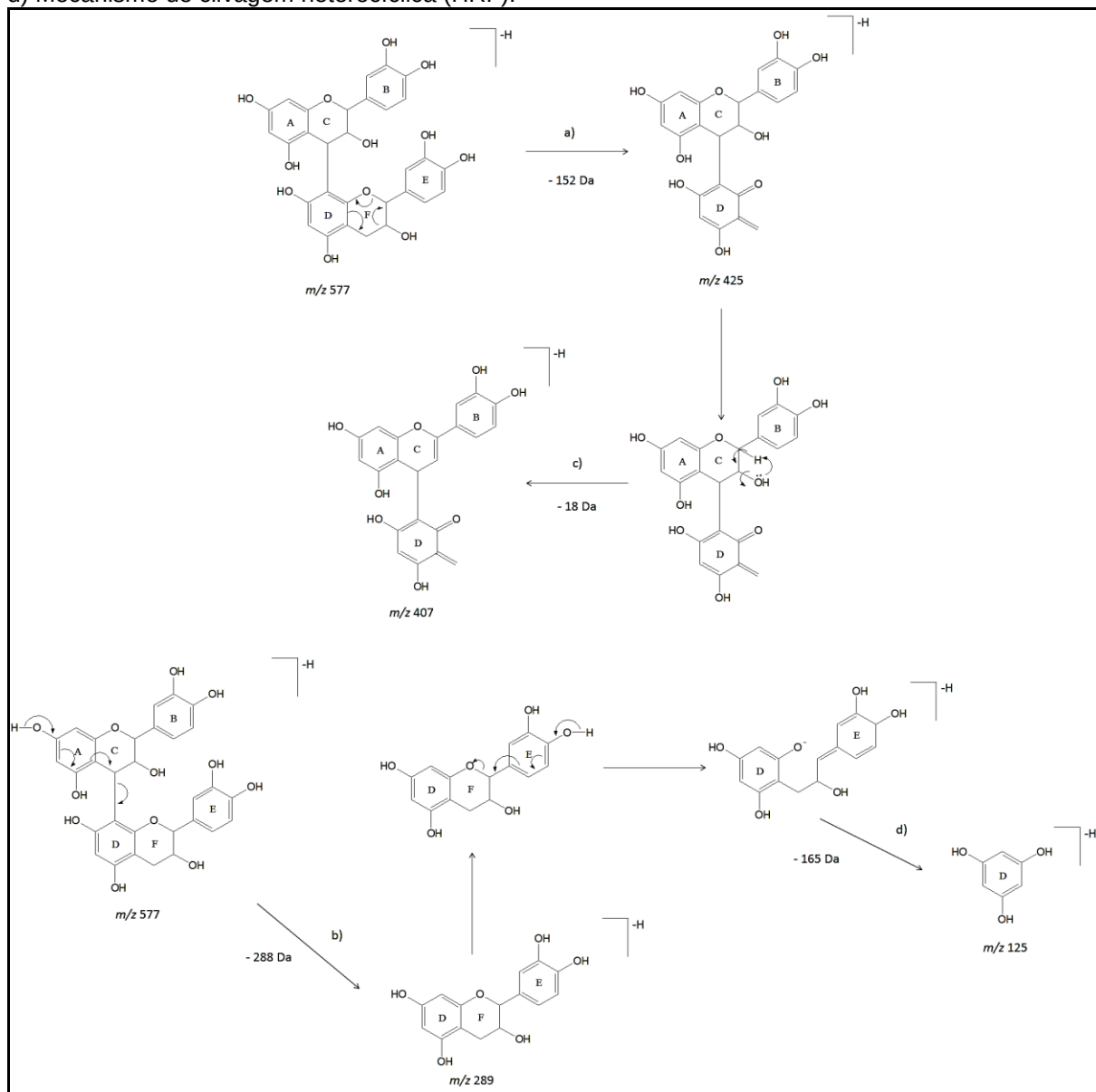
Figura 33 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 577. Faixa de massa 50 a 600 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



Analisando o espectro de fragmentação do íon m/z 577, verifica-se que ocorre a perda de uma unidade oligomérica, ou seja, a ligação C-C entre as duas unidades de flavonoide é rompida gerando o íon m/z 289 $[M-H-288]^-$, correspondente ao fragmento residual de [epi]catequina (PAMPÍN, et al. 2007; CABRAL, 2010). A maior parte da proposta de mecanismo de fragmentação sugerido (Figura 34) foi baseada em dados similares aos obtidos na literatura (PAMPÍN, et al. 2007; RODRIGUES et al., 2007; FRIEDRICH; EBERHARDT; GALENSA, 2000; KARCHESY et al., 1999).

Primeiramente, ocorre uma quebra por meio do mecanismo de Retro – Diels - Alder no núcleo dos flavonóides, levando ao fragmento neutro que corresponde a perda de 152 Da e formação do íon-fragmento m/z 425 $[M-H-152]^-$, devido a perda de molécula de água do anel C gerando o íon m/z 407 $[M-H-152-18]^-$. O íon fragmento m/z 125 é formado a partir do anel A da estrutura do flavonoide, por meio de uma clivagem heterocíclica.

Figura 34 - Proposta de mecanismo de fragmentação do dímero de [epi]catequina (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels - Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).

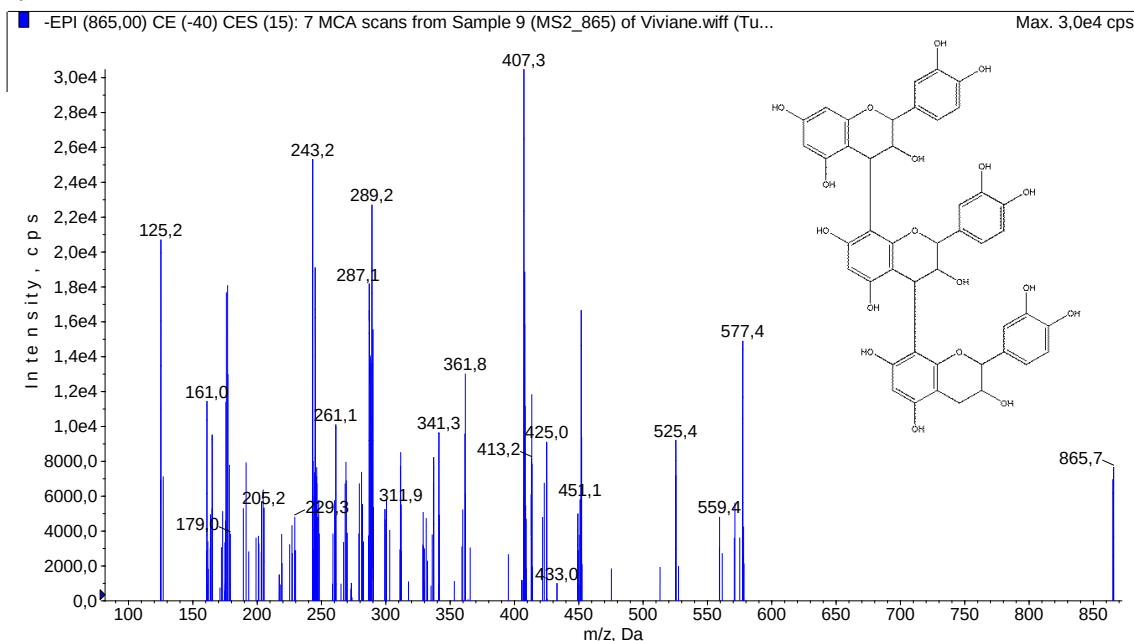


Fonte: Figura modificada de Pampím et al. 2007.

A substância identificada trata-se de um dímero de [epi]catequina, do tipo B, devido à ligação entre o C-4 (unidade superior) e o C-8 (unidade inferior) (PASSOS et al., 2007).

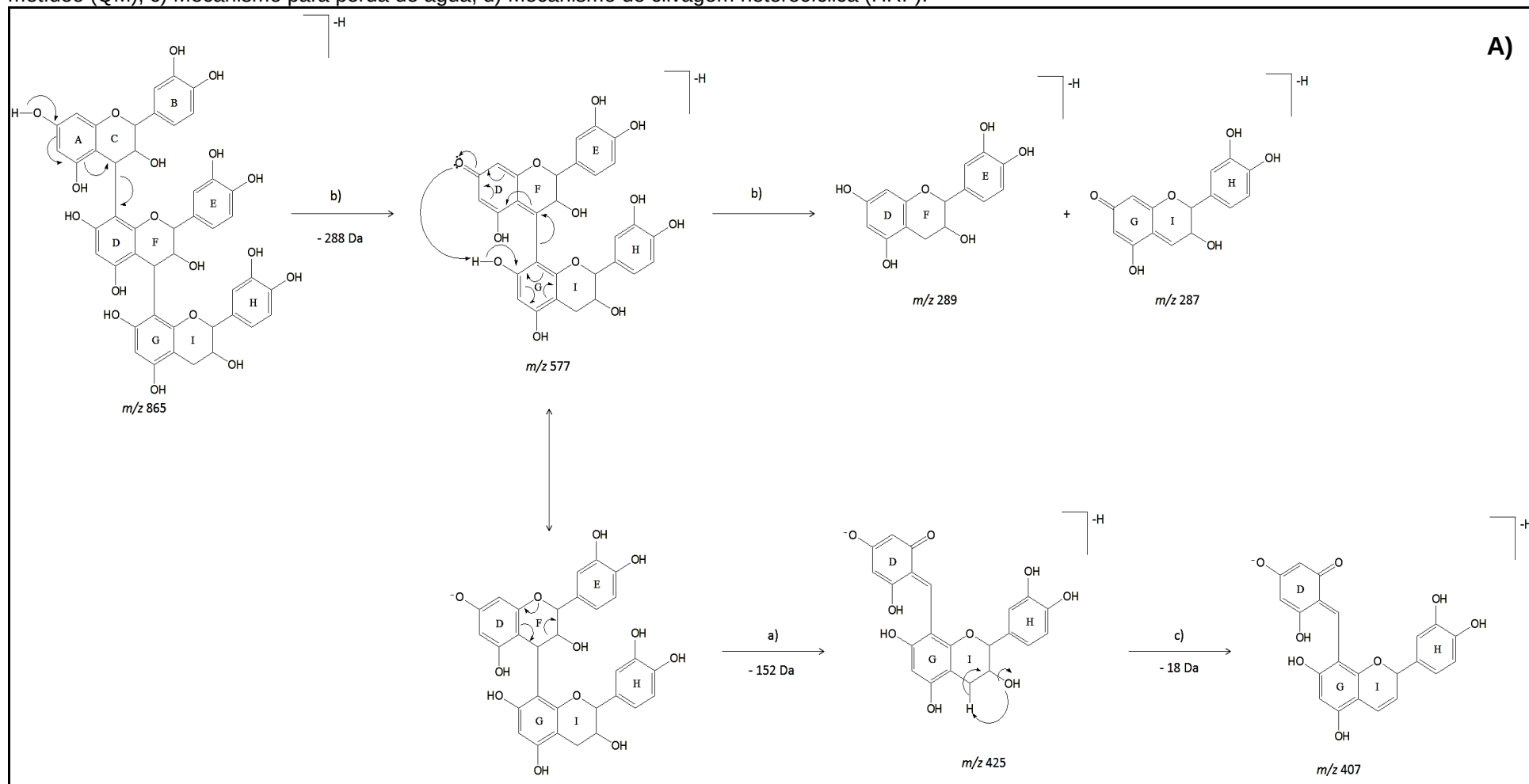
Por meio da seleção do íon m/z 865 $[M-H]^-$ para estudos mais detalhados da fragmentação ocorrida, verificou-se um padrão de fragmentação bem estabelecido (Figura 35) correspondente a massa molecular de 866 g/mol. Este dado associado aos reportados na literatura, indicam a presença de um trímero de [epi]catequina (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES, 2007).

Figura 35 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 865. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

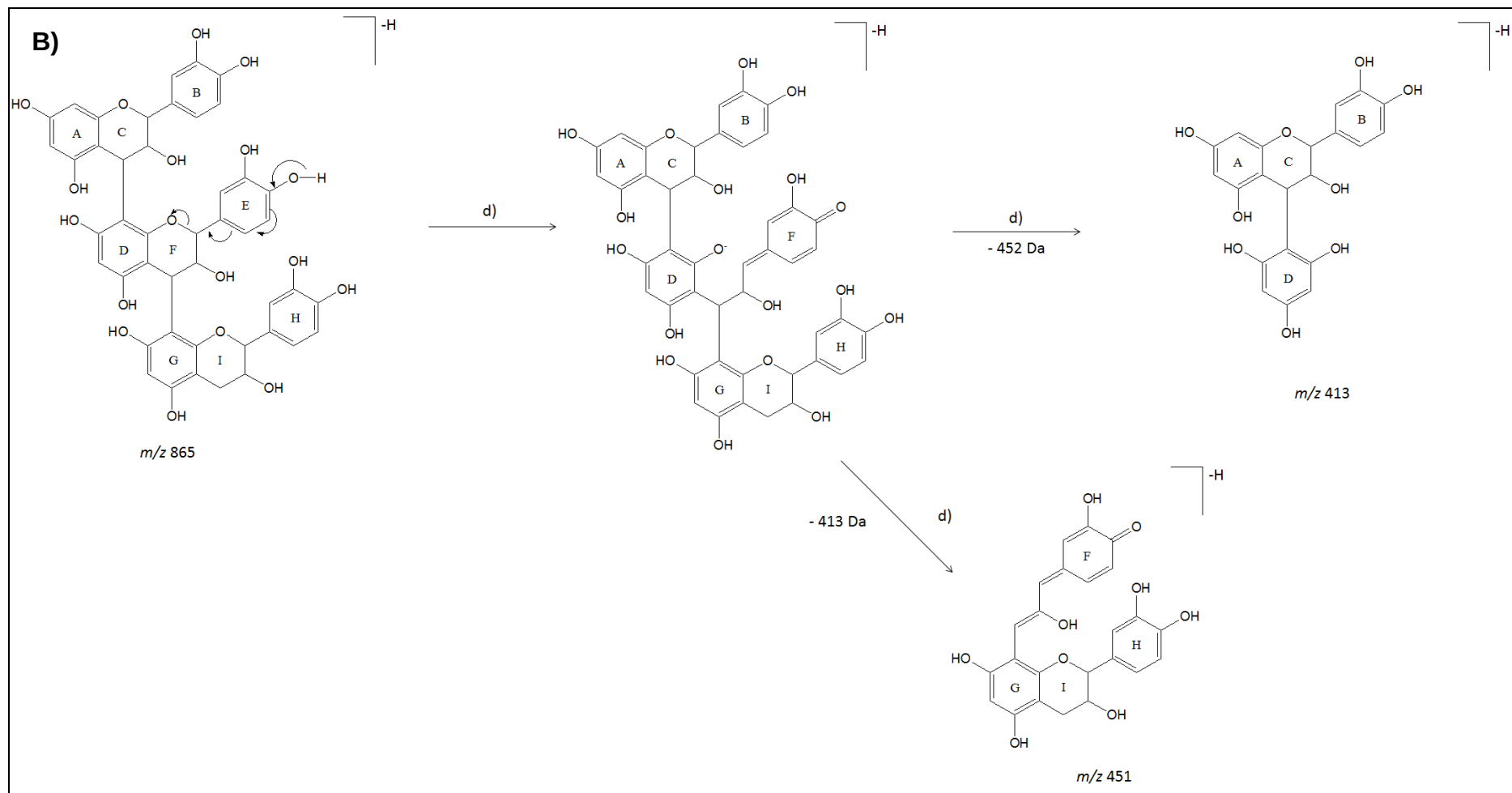


Por meio das análises do espectro de fragmentação do íon m/z 865, pode-se propor a fragmentação do trímero de [epi]catequina (3-flavonol) (Figura 36 A e B). Nota-se a perda de uma unidade oligomérica, explicado por meio do mecanismo de formação quinona metídeo, compatível com o íon m/z 577 $[M-288-H]^-$ no anel A e eliminação de uma unidade dimérica $[M-288-H]^-$ (anéis D-F e G-I). Por meio de uma clivagem do tipo Retro - Diels - Alder no anel F, a unidade dimérica correspondente ao fragmento m/z 577 leva a formação do íon de m/z 425 $[M-288-152-H]^-$, sendo este íon o provedor do íon m/z 407 $[M-288-152-18-H]^-$ por meio da perda sequencial de água no anel I. Já os íons m/z 289 ($[M-576-H]^-$) e 287 ($[M-576-H]^-$) são formados por meio de um mecanismo de quinona metídeo no anel D da unidade central do trímero de [epi]catequina. Os íons m/z 413 e 451 são formados por meio da clivagem heterocíclica no anel D do íon m/z 865, levando a perda de 452 Da e 414 Da, respectivamente (RODRIGUES, 2007).

Figura 36 A) e B) - Proposta de mecanismo de fragmentação do trímero de [epi]catequina (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels-Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).



Fonte: elaborada pela autora, 2016.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

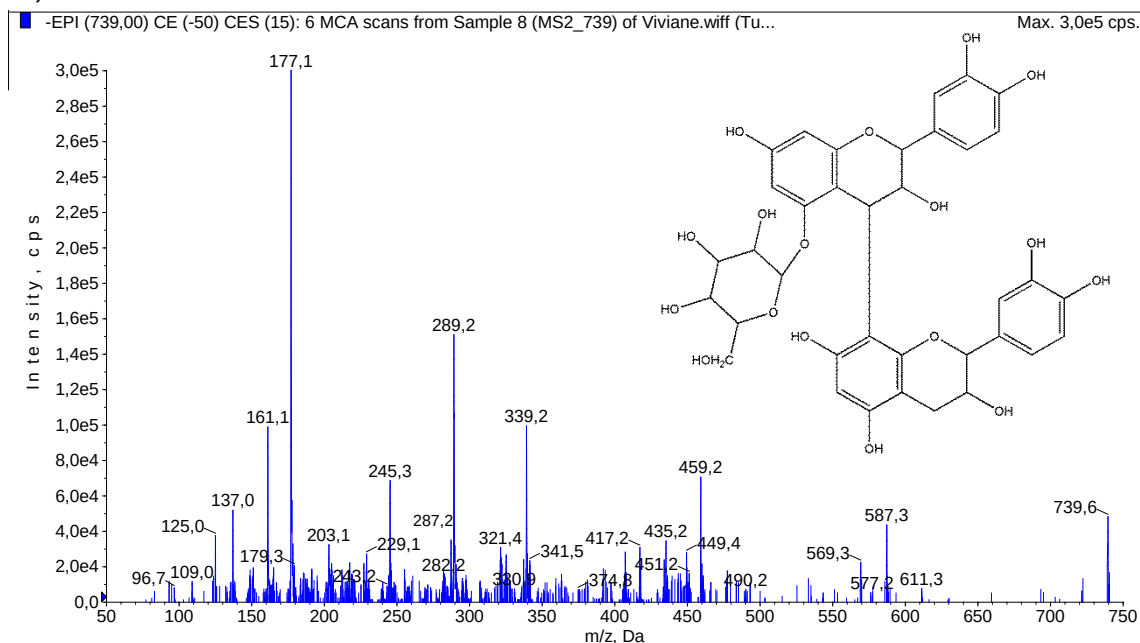
Ao final dessas análises de EM-IES (-), pode-se verificar a presença dos íons precursores m/z 289; 577; 865; 1153, indicativo da sequência de quatro proantocianidinas do tipo-B.

4.4.5.2.2 2ª Série homóloga de proantocianidinas

A segunda série homóloga de proantocianidinas (●) pode ser identificada devido a presença de uma sequência de íons, de moléculas desprotonadas, separados por 288 Da (Figuras 31 e 32). Ressaltando que há 162 Da superior à primeira série homóloga, discutida anteriormente, sendo esta nova sequência um indicativo de uma série homóloga de proantocianidinas monoglicosiladas: monômero (m/z 451); dímero (m/z 739); trímero (m/z 1027); tetrâmero (m/z 1315) (RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES, 2007).

Com a seleção do íon m/z 739 $[M-H]^-$ para os estudos de fragmentação, pode-se observar o padrão de fragmentação para a massa molecular de 740 g/mol (Figura 37) que em comparação com valores de m/z de íons similares encontrados na literatura, foi confirmada a presença de um dímero de [epi]catequina monoglicosilado (RODRIGUES et al., 2007).

Figura 37 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 739. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



Por meio dos dados dos íons fragmentos referentes ao espectro de fragmentação do íon m/z 739 $[M-H]^-$, pode-se propor a fragmentação do dímero de [epi]catequina monoglicosilado (Figura 38 A e B). Observou-se ainda que o íon m/z 739 leva a formação do íon m/z 577 $[M-H-162]^-$ que pode ser resultante de uma clivagem do tipo heterolítica, sendo este íon correspondente ao dímero de [epi]catequina sem a presença do monossacarídeo.

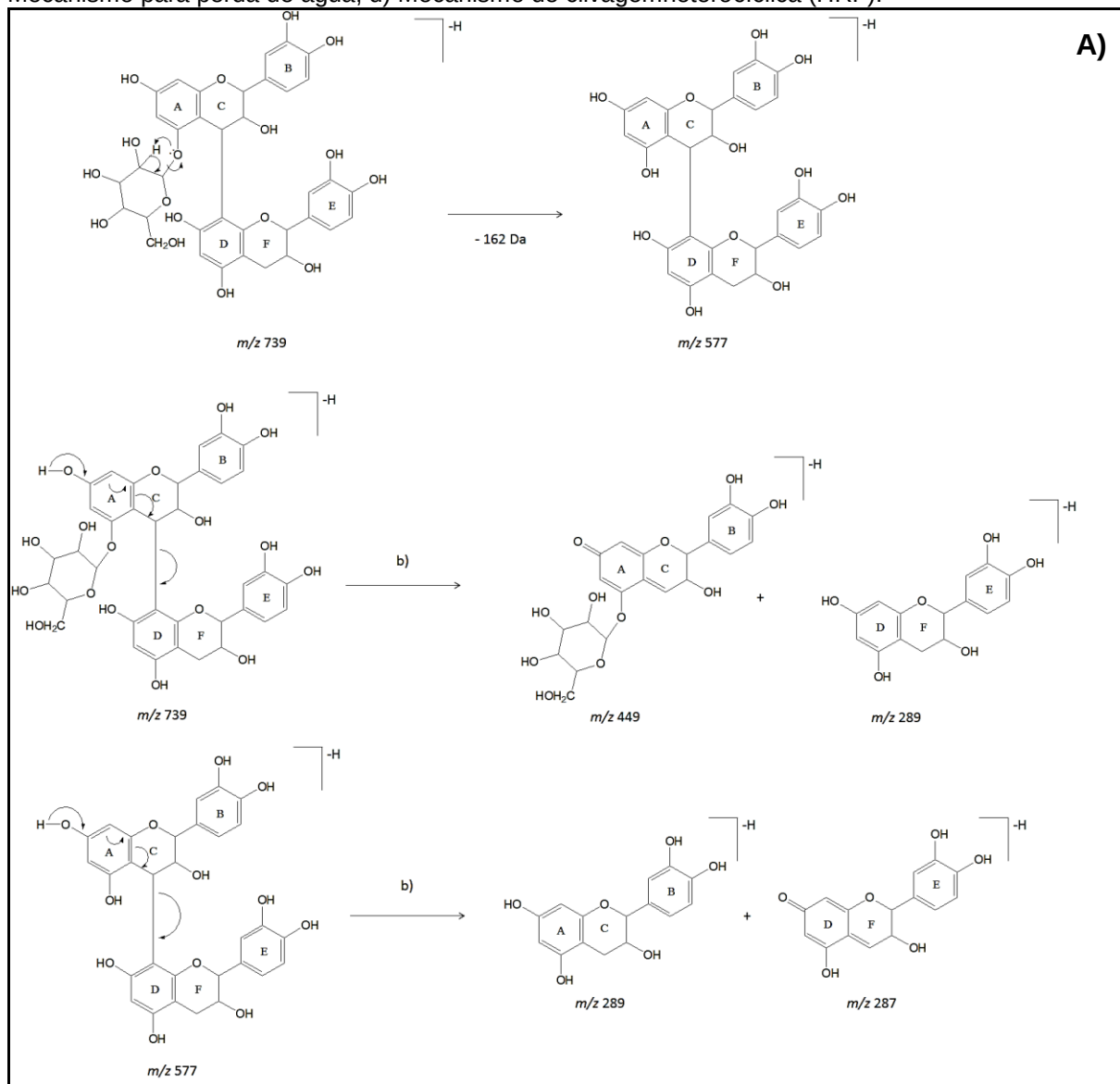
A presença do substituinte monossacarídeo nas espécies químicas pode ser notada devido às perdas características deste resíduo em relação aos íons gerados da aglicona. Assim, a técnica de espectrometria de massas possibilitou o conhecimento do tipo de ligação entre a aglicona e a unidade de açúcar e também a natureza do monossacarídeo por meio das clivagens e perdas características.

Desta forma, nota-se que há a presença de um composto fenólico do tipo O-glicosilado, devido à perda direta e intacta da unidade monossacarídea presente na aglicona. Sabe-se que compostos fenólicos do tipo C-glicosilados apresentam a quebra interna da unidade do açúcar e a geração de íons característicos, o que não foi observado nesta análise (RODRIGUES, 2007; CUYCKENS; CLAEYS, 2004; ESSAFI et al., 2005). Com base nos íons fragmentos observados e por meio da proposta de mecanismo de fragmentação, destaca-se que a posição do açúcar é uma sugestão proposta no trabalho, pois não foi possível confirmar a mesma por meio dos experimentos de espectrometria de massas.

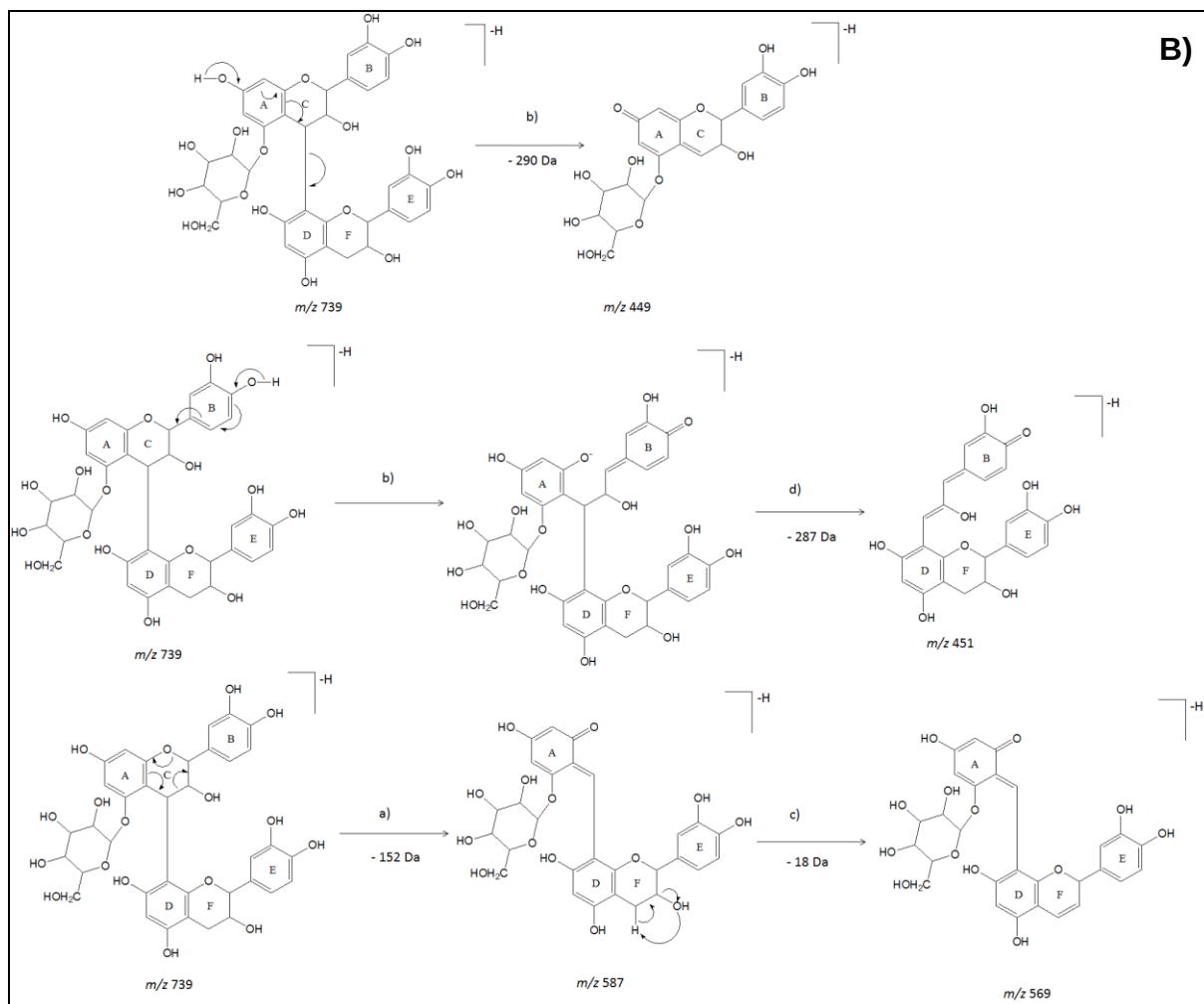
Analisando as informações presentes no espectro de massas e por meio dos mecanismos de fragmentação (Figura 38 A e B), nota-se a perda de 162 Da, indicativa da presença de uma hexose (GUIMARÃES et al., 2013) na estrutura molecular. Lembrando que, frequentemente, flavonóides glicosilados apresentam a D-glicose como resíduo de açúcar. Porém, outros resíduos de açúcar podem estar presentes, como D-galactose, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose, D-glucorônico (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

O mecanismo de quinona metídeo no anel A da espécie dimérica leva a formação dos íons m/z 449 $[M-H-290]^-$ e 289 $[M-H-450]^-$, sendo que este mecanismo no anel A do íon m/z 577 também leva a formação dos íons m/z 289 e 287. A clivagem heterolítica no anel B do íon m/z 739 $[M-H]^-$ promove a formação do íon m/z 451 $[M-H-287]^-$. A fragmentação de Retro - Diels - Alder no anel C de m/z 739 $[M-H]^-$ contribui para a formação do íon m/z 587 $[M-H-152]^-$, sendo que a desidratação em seu anel F gera o íon fragmento m/z 569 $[M-H-152-18]^-$.

Figura 38 A) e B) - Proposta de mecanismo de fragmentação do dîmero de [epi]catequina monoglicosilado (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels - Alder (RDA); b) Quinona metîdeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocîclica (HRF).



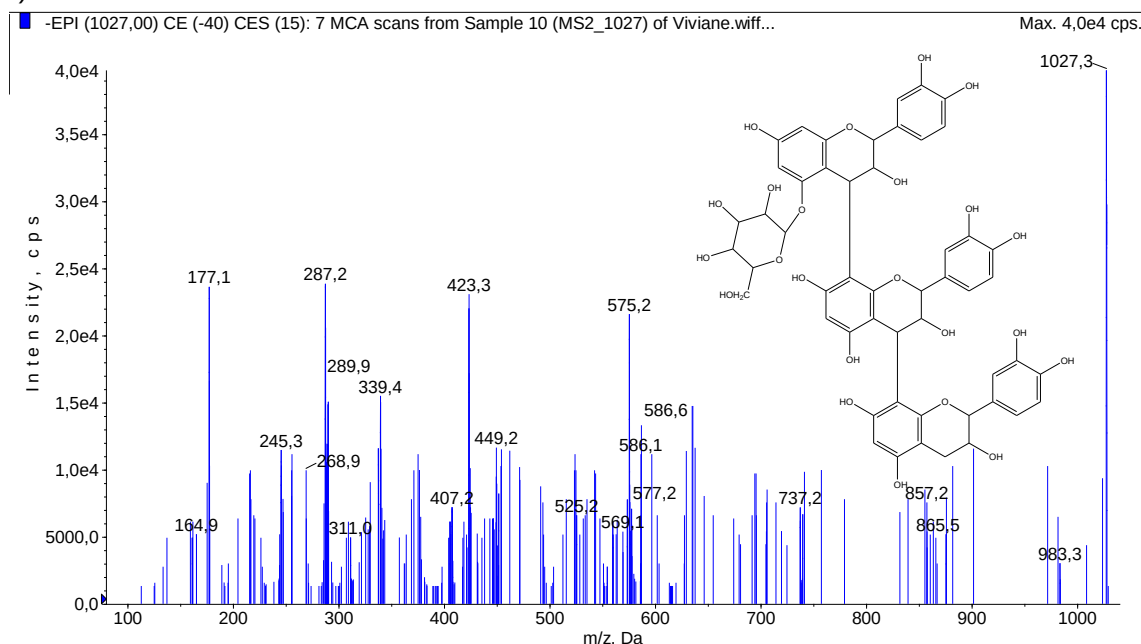
Fonte: elaborada pela autora, 2016.



Fonte: elaborada pela autora, 2016

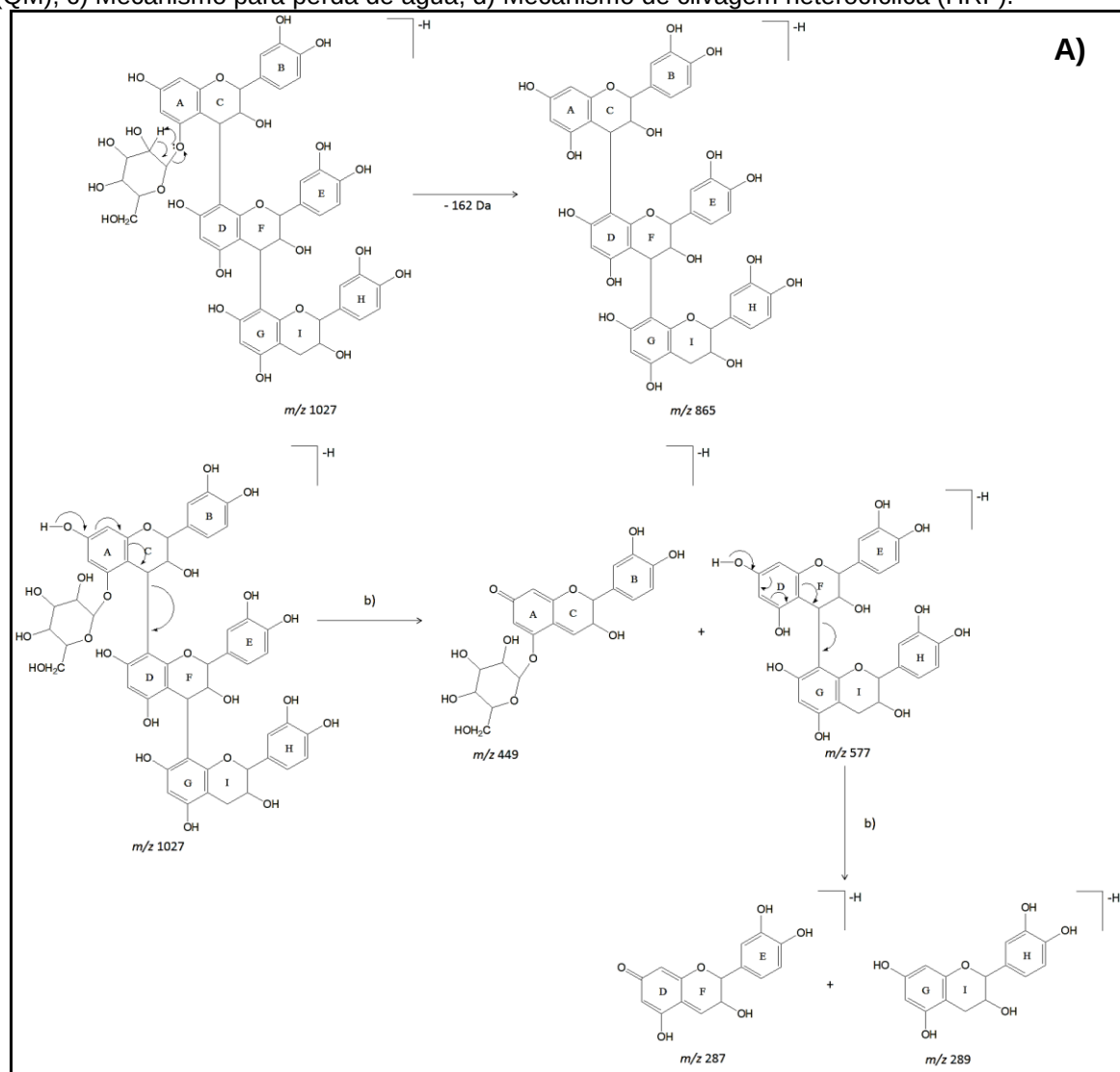
A seleção e fragmentação do íon m/z 1027 (Figura 39) levou a identificação da formação de íons chave para a identificação do trímero de [epi]catequina monoglicosilada (M.M = 1028 g/mol).

Figura 39 - Espectro de massas de segunda ordem, em modo negativo, da amostra da fração B de CFEHidr para o íon m/z 1027. Faixa de massa 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

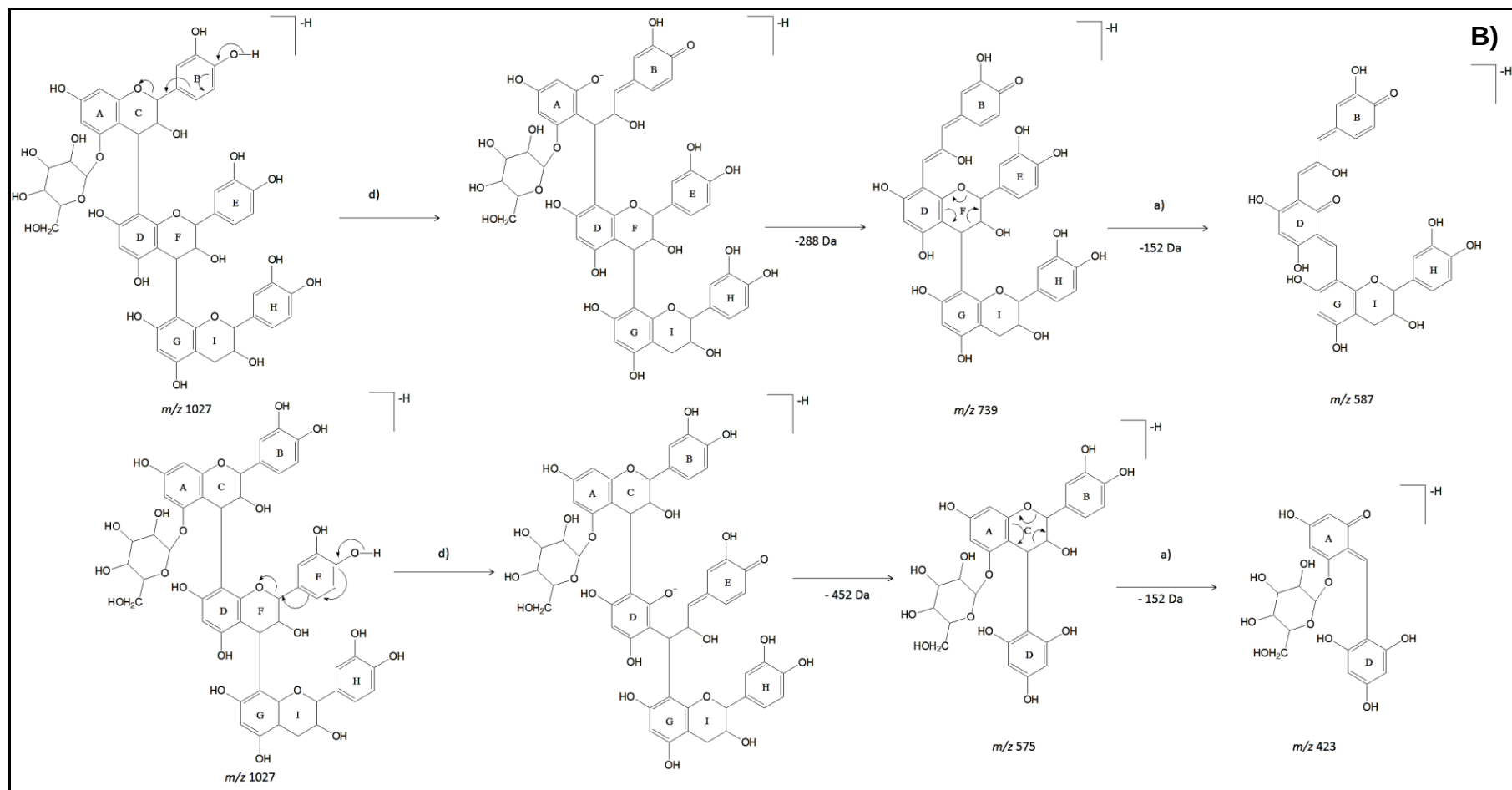


Por meio do mecanismo proposto foi possível identificar as principais fragmentações envolvidas (Figura 40 A e B). No mecanismo de clivagem heterolítica do íon m/z 1027, nota-se a perda de 162 Da levando à formação do íon m/z 865 $[M-H-162]^-$. Os íons m/z 449 e 577 são formados por meio de um mecanismo de quinona metídeo no anel A (unidade superior do trímero). O íon m/z 577 sofre uma fragmentação do tipo quinona metídeo (Anel D) para gerar os íons m/z 287 e 289. O trímero de [epi]catequina $[M-H]^-$ leva a formação do íon m/z 739 $[M-H-288]^-$ com a fragmentação quinona metídeo no anel B, e posteriormente, este íon leva a formação do íon m/z 587 $[M-H-288-152]^-$ pelo mecanismo de fragmentação Retro - Diels - Alder no anel F. Finalmente, o íon m/z 1027 $[M-H]^-$ por meio de um mecanismo de quinona metídeo no anel E permite a formação do íon m/z 575 $([M-H-452])^-$, levando a formação do íon m/z 423 $[M-H-452-152]^-$ (fragmentação Retro - Diels - Alder no anel C). A proposta de mecanismo de fragmentação do trímero de [epi]catequina foi baseada, em parte, no estudo de Rodrigues et al. (2007).

Figuras 40 A) e B): Proposta de mecanismo de fragmentação do trímero de [epi]catequina monoglicosilado (3-flavonol). a) Mecanismo Retro - Diels - Alder (RDA); b) Quinona metídeo (QM); c) Mecanismo para perda de água; d) Mecanismo de clivagem heterocíclica (HRF).



Fonte: elaborada pela autora, 2016.



Fonte: elaborada pela autora, 2016

Ressalta-se que as proantocianidinas são conhecidas pela sua atividade antioxidante, pois suas formas oxidadas apresentam uma estabilização devido a presença da unidade de catecol no anel B, o qual promove uma deslocalização eletrônica induzida pela carga negativa gerada pela perda do hidrogênio radicalar (PORTO et al., 2003).

Experimentos de RMN foram realizados para verificar a posição em que o açúcar estava ligado na porção da aglicona, porém não houve sucesso em tal análise devido à presença de várias substâncias nessa mesma fração, dificultando a obtenção das informações necessárias para o estabelecimento da correlação de sinais do hidrogênio anomérico com algum dos átomos de carbonos da aglicona. Normalmente, a glicosilação em flavonoides ocorre nas posições C-3, C-5, ou em menor frequência C-7, devido ao favorecimento da rota biossintética do processo da glicosilação (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2007; HARBORNE, 1996).

Dessa forma, foi possível caracterizar as substâncias da fração estudada, mas não foi possível diferenciar os estereoisômeros de [epi]catequina, e a estereoquímica das ligações entre as unidades monoméricas nas séries homólogas, assim como a posição da unidade glicosídica presente na segunda série homóloga.

A espectrometria de massas mostrou-se uma técnica muito robusta para as análises de proantocianidinas oligoméricas e poliméricas (POUPARD et al., 2011). De uma forma geral, os espectros de segunda ordem das duas sequências de proantocianidinas demonstraram que estas espécies apresentam três mecanismos de fragmentação principais, a saber: quinona metídeo (QM); Retro - Diels - Alder (RDA) e clivagem heterocíclica (HRF) (RODRIGUES, 2007; GU et al., 2003).

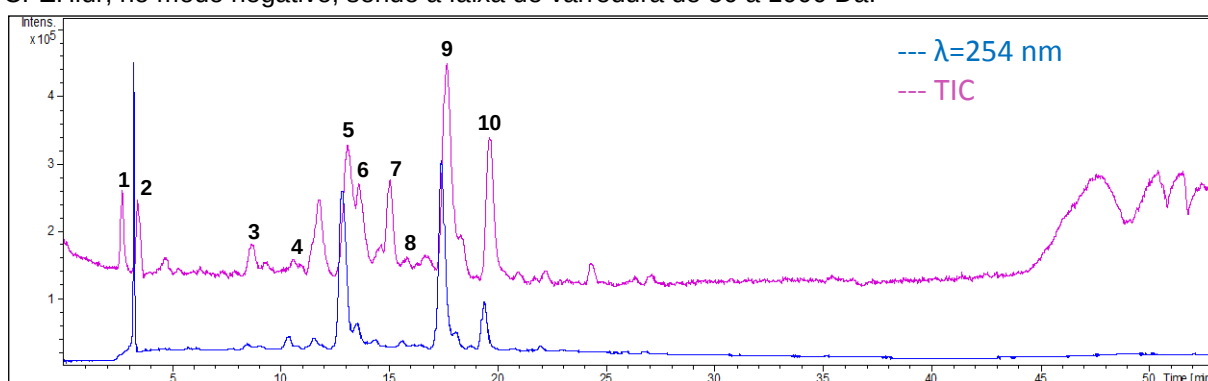
As análises via EM-IES permitiram a identificação rápida e eficiente de diversos compostos fenólicos com atividade antioxidante, em mistura. Esse estudo contribui para corroborar os dados obtidos em relação à atividade antioxidante mais potente observada na fração B do extrato hidroetanólico de folhas, o que foi verificado pelo teste antioxidante realizado no presente estudo.

4.5.3 Análise da fração C do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM

A fração C foi analisada em duas etapas: análise via CLAE-EM e análise via CLAE-EM/EM e em ambas, as análises foram feitas utilizando as mesmas condições

experimentais descritas anteriormente (Seções 3.4.4 e 4.4.1). A análise preliminar via CLAE-EM possibilitou o conhecimento do cromatograma de íons totais (TIC) e verificar a similaridade do mesmo com o perfil cromatográfico obtido por DAD. Destaca-se a possibilidade de utilizar as técnicas cromatográficas e da espectrometria de massas para a identificação dos compostos fenólicos presentes, os quais foram evidenciados por meio da presença de picos no cromatograma em $\lambda=254$ nm (Figura 41).

Figura 41 - Cromatograma em $\lambda=254$ nm e cromatograma de íons totais (TIC) da fração C de CFEHidr, no modo negativo, sendo a faixa de varredura de 50 a 1000 Da.



A Tabela 10 expõe os íons de maior intensidade em cada tempo de retenção, sendo verificada também a co-eluição de vários compostos em um mesmo tempo de retenção. Esta análise serviu como base para a seleção de alguns íons precursores para se identificar alguns compostos fenólicos, fazer o estudo de fragmentação dos mesmos, caracterizando assim, a composição das substâncias presentes e responsáveis pela propriedade antioxidante da fração.

Tabela 10 - Seleção de íons da fração C com m/z mais intensos e seus respectivos tempos de retenção (t_R).

Pico	$t_R(\text{min})$	m/z
1	2,8	492,5264
2	3,5	191,0577
		259,0420
		577,1324
3	8,7	431,1938
		483,1312
4	11,8	451,1048
		565,0973
		903,2145
5	13,2	595,1310
		663,1190
6	13,7	451,1045
		595,1313
		903,2212
7	15,1	381,1263
		595,1677
8	15,9	593,1519
		824,2426
9	17,7	579,1365
		693,1398
10	19,7	353,0879
		515,1203
		629,1128

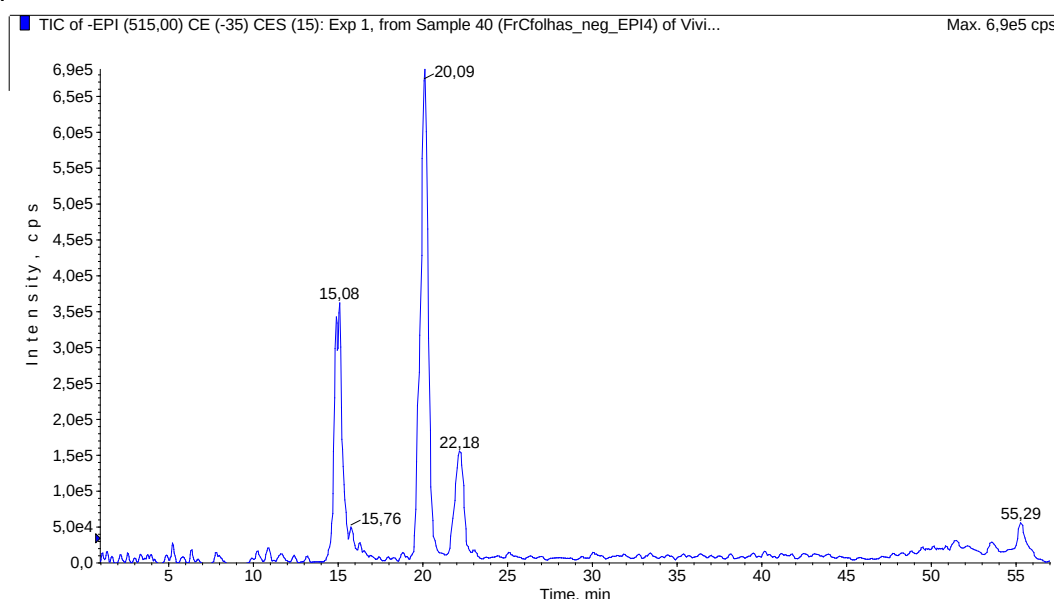
Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, três dos picos com maiores intensidades, no cromatograma de íons totais (TIC), foram selecionados para estudos de CLAE-EM/EM e, posterior identificação das substâncias da fração por meio de dados presentes na literatura, padrão de fragmentação e informações obtidas das outras análises realizadas ao longo da presente pesquisa.

4.5.3.1 Análise da fração C do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM/ EM

Para a análise da fração C do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-EM/EM utilizou-se o modo de “Enhanced Product Ion” (EPI) (Seção 3.4.4) (Figura 42).

Figura 42 - Cromatograma da fração C, do extrato hidroetanólico de folhas, via CLAE-EM/EM (Seção 3.4.5).

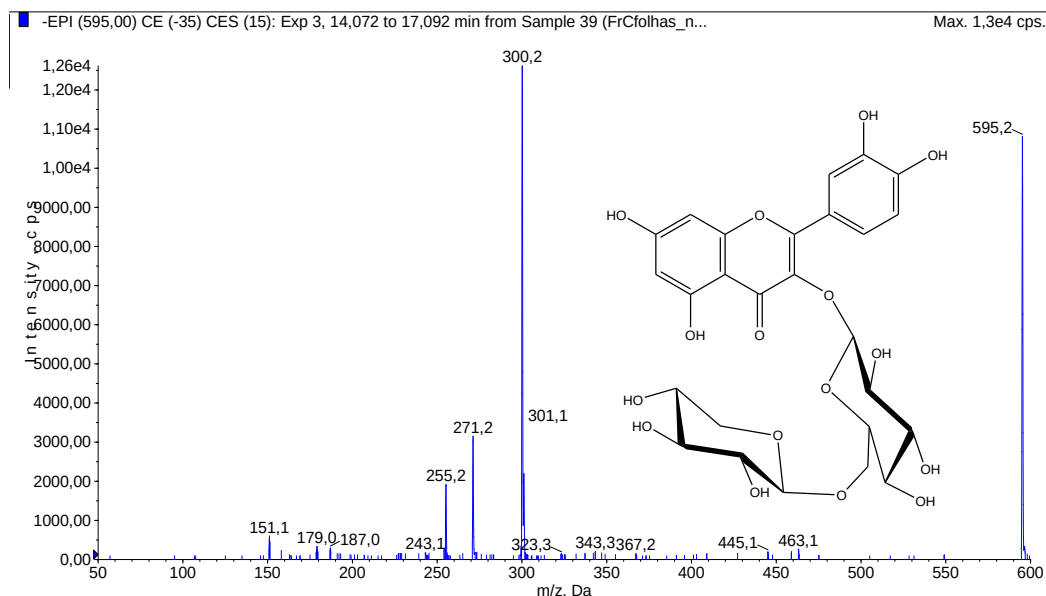


Essa análise permitiu a identificação de três compostos fenólicos presentes na mistura antioxidante. Nota-se que houve uma pequena variação nos tempos de retenção em comparação com o cromatograma inicial (Figura 22; Seção 4.4.1), pois para a execução da análise de CLAE-EM/EM foi utilizado um equipamento diferente daquele utilizado para as análises preliminares de CLAE-EM, mas nas mesmas condições cromatográficas otimizadas, anteriormente citadas.

4.5.3.1.1 Identificação de quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo

No tempo de retenção de 15,08 min observa-se a presença de um íon de m/z 595 com padrão de fragmentação m/z 463 [M-H-132]⁻; 445 [M-H-132-18]; 301 [M-H-132-162]⁻; 300 [M-132-162-2H]⁻ (Figura 43).

Figura 43 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 15,08 min, no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



Por meio das informações do espectro de massas de segunda ordem, nota-se que há uma perda de 132 Da entre os íons m/z 595 e 463, o que indica a perda de uma pentose. Observa-se também a perda de 162 Da entre os íons m/z 463 e 301, o que indica a presença de uma hexose, também pertencente à aglicona quercetina (TIBERTI et al., 2007; FELIPE et al., 2014), sendo que a perda das unidades glicosídicas é realizada por meio de clivagem heterolítica. Já o íon m/z 301 é referente ao íon radical da aglicona ($[M-H-132]^{\cdot-}$) oriundo da clivagem homolítica da ligação O-glicosídica, o que é proposto em diversos estudos a cerca de quercetinas glicosiladas (HVATTUM; EKEBERG, 2003; GOUVEA; CASTILHO, 2011; CUYCKENS; CLAEYS, 2014; FELIPE et al., 2014).

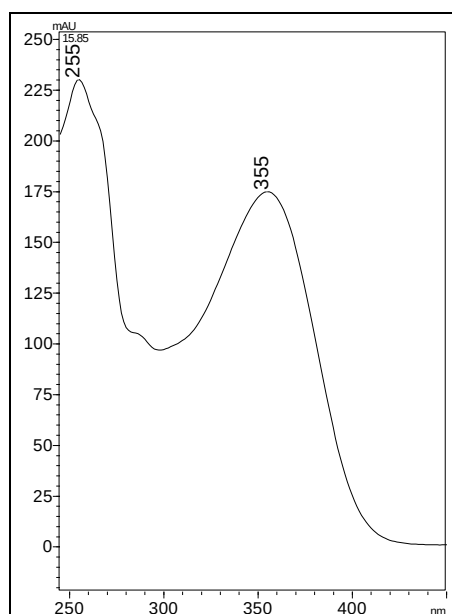
Sabe-se que flavonoides glicosilados podem sofrer dois tipos de clivagem na ligação O-glicosídica: colisão induzida homolítica e a clivagem heterolítica, levando a formação dos íons produtos referente ao radical aglicona desprotonado ($[Y_0-H]^{\cdot-}$) e da aglicona ($[Y_0]^-$). A estrutura do flavonoide, a natureza e a posição da substituição do açúcar podem influenciar o tipo de clivagem envolvida (HVATTUM; EKEBERG, 2003). O íon m/z 445 ($[M-H-132-18]^{\cdot-}$) é a ratificação de que há uma pentose terminal na estrutura da aglicona, assim confirmando a sequencia de monossacarídeos proposta pertencente à aglicona quercetina (VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Por meio destes dados espectrométricos não foi possível confirmar a estrutura da hexose e da pentose presentes. Porém, na literatura há relatos de que

as hexoses mais comuns são glicose ou galactose, que ocorrem com frequência em flavonóis glicosilados, assim como as unidades de pentose mais comuns são apiose, arabinose ou xilose (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; TIBERTI et al., 2007).

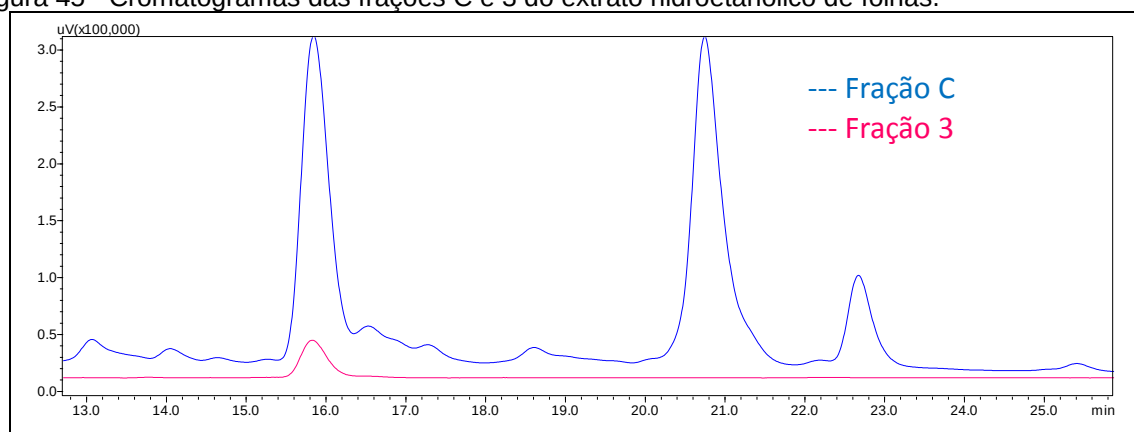
No referido tempo de retenção desta fração antioxidante, pode-se observar no espectro de absorção em ultravioleta-visível (UV-vis) duas bandas características (255 e 355 nm) de um flavonol 3-OH substituído (Figura 44) (HARBORNE, 1996; MARKHAM, 1982).

Figura 44 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração C, no tempo de t_R 15,85 min, do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE- analítico.



Verificando os valores atribuídos a essas duas bandas (255 e 355 nm), os dados de espectrometria de massas, e a comparação entre os cromatogramas da fração C e fração 3 (Figura 45), nas mesmas condições cromatográficas, nota-se que essas informações são coincidentes à substância quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo (M.M = 596 g/mol) (KREEN et al., 2003).

Figura 45 - Cromatogramas das frações C e 3 do extrato hidroetanólico de folhas.



Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μm ; $h \times \Phi = 250 \times 4,6 \text{ mm}$), volume de injeção de 15,0 μL , fluxo 0,8 mL min^{-1} e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (36-60 % B em 40 min, 100% B em 45 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). $\lambda=254 \text{ nm}$

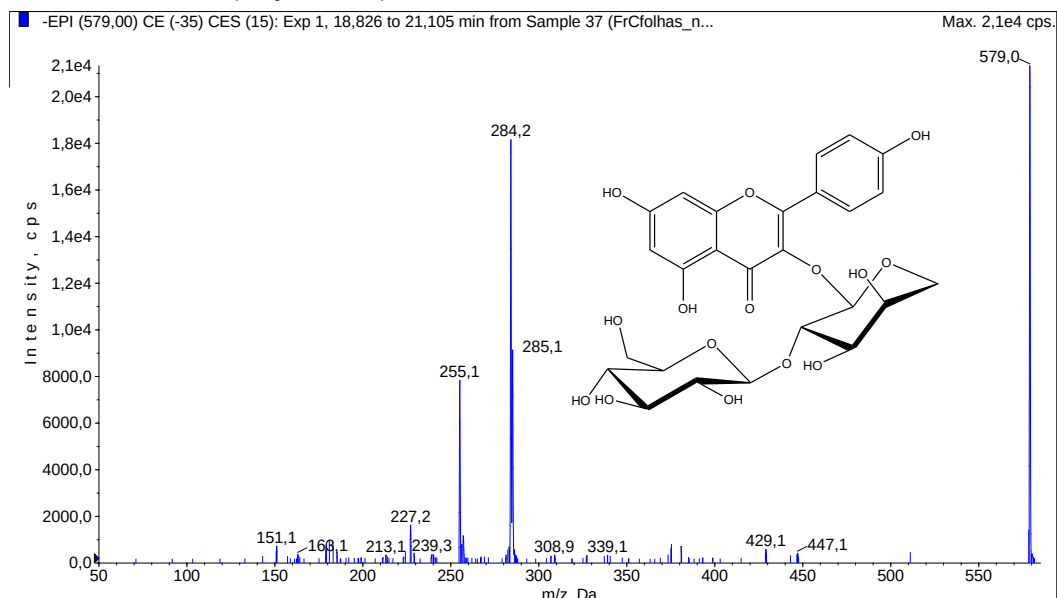
A quercetina diglicosilada isolada teve a sua identificação feita por meio dos experimentos de RMN e EM-IES (Seções 4.6.2.1.1 e 4.6.2.1.2). A proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(-) dos principais íons, e a discussão dos dados presentes no espectro de absorção deste flavonoide diglicosilado estão apresentados na Seção 4.6.2.1.2.

A quercetina e seus derivados glicosídicos apresentam potencial antioxidante comprovado em literatura. Há relatos de que quanto maior o número de unidades de açúcar presentes na aglicona, menor será a capacidade antioxidante quando comparado com aglicona de origem (GRANGEIRO, 2009; DIAS, 2005; PLUMB; PRINCE; WILLIAMS, 1999) e este dado por ser diagnóstico para a atividade das frações quando comparadas com as de cada fração em estudo, sem levar em consideração sinergismo, que é um fenômeno mais complexo e para confirmação, procedimentos experimentais mais criteriosos devem ser realizados, o que não foi feito no presente estudo.

4.5.3.1.2 Identificação de canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo

No tempo de retenção 20,09 min pode-se realizar a identificação da substância canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo (M.M 580 g/mol). Nota-se, no espectro de fragmentação, a presença do íon precursor m/z 579 e o padrão de fragmentação definido m/z 285; 284 (Figura 46).

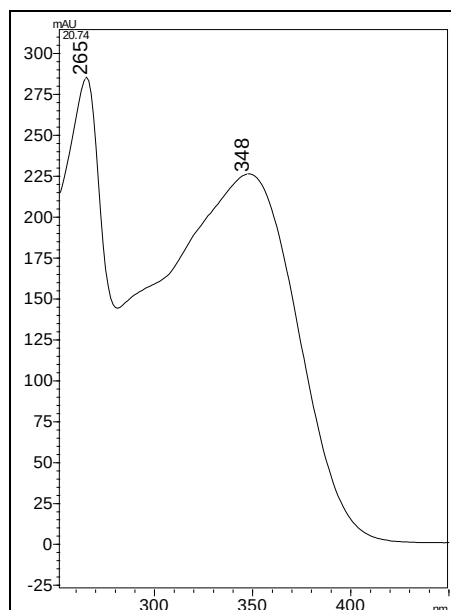
Figura 46 - Espectro de massas referente ao canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo (tempo de retenção 20,0 min), no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



Por meio dos íons produtos obtidos, nota-se que há uma clivagem heterolítica, promovendo a perda das duas unidades glicosídicas em relação a aglicona, levando a formação do íon m/z 285 $[M-H-294]^-$. O íon radical aglicona de m/z 284 $[M-2H-294]^\bullet$ é formado por meio de uma clivagem homolítica entre a porção de monossacarídeos e a aglicona.

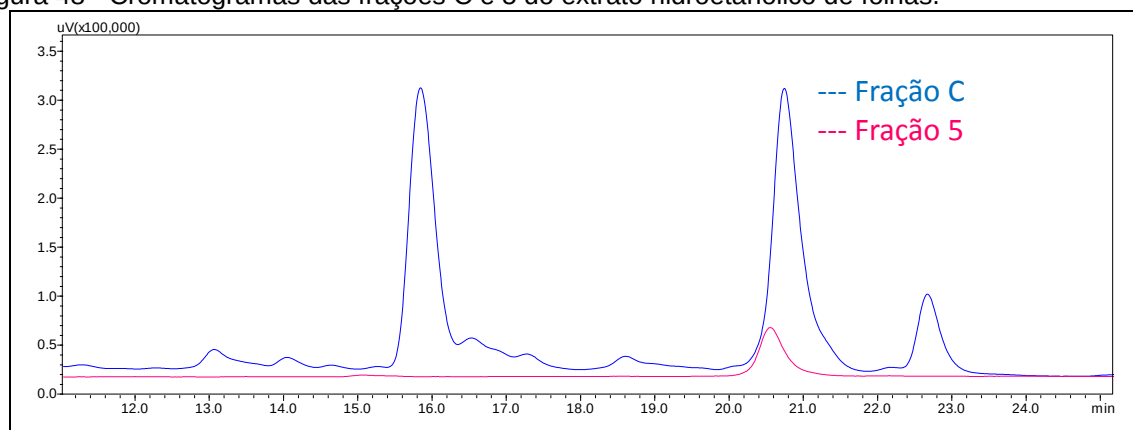
No tempo de retenção de 20,09 min (Figura 46), o espectro de absorção em ultravioleta-visível (UV-vis) apresenta duas bandas características (265 e 348 nm) de um flavonol 3-OH substituído (Figura 47) (HARBORNE, 1996; MARKHAM, 1982).

Figura 47 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração C, no tempo de t_R 20,74 min, do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - analítico.



Por meio da comparação entre os cromatogramas da fração C e fração 5 (Figura 48), realizados nas mesmas condições cromatográficas, houve a confirmação da presença da mesma substância nas duas frações.

Figura 48 - Cromatogramas das frações C e 5 do extrato hidroetanólico de folhas.



Condições de análise: coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 μ m; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 μ L, fluxo 0,8 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água/0,1% ácido fórmico (A) e MeOH (B) (36-60 % B em 40 min, 100% B em 45 min, permanecendo em 100 % B por 5 min e retornando à condição inicial). λ =254 nm

A identificação e confirmação estrutural deste canferol diglicosilado também foi possível devido a comparação dos dados obtidos nestas análises de EM-IES (-), assim como os valores referentes às bandas do espectro de absorção em

ultravioleta-visível (UV-vis), com as informações obtidas nas análises apropriadas da fração 5 (Seção 4.6.3.1).

A fração 5 foi submetida aos experimentos para a identificação da substância majoritária. O mecanismo de fragmentação, assim como a discussão mais ampla dos dados espectrométricos e espectrofotométricos, se encontram nas Seções 4.6.3.1.1 e 4.6.3.1.2.

Os derivados de canferol apresentam atividade antioxidante (MATSUBARA, 2006; VELLOSA et al., 2011), no entanto, a atividade antioxidante apresentada pela substância isolada é menor que a da amostra contendo a quercetina como aglicona, o que pode ser devido aos dois grupos hidroxílicos no anel B. É bastante descrito na literatura sobre a influência que os grupos hidroxílicos ligados ao anel aromático têm na atividade antioxidante (SANTOS, L. et al., 2003).

4.5.3.1.3 Identificação do ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico

No tempo de retenção 22,19 min foi identificado o ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico (M.M 516 g/mol), devido à presença do íon percussor m/z 515 e padrão de fragmentação bem estabelecido (Figura 49). Os dados de padrão de fragmentação foram comparados com a literatura apropriada para a confirmação da identificação da substância em estudo (CATARINO et al., 2015; GOBBO-NETO, 2007). A confirmação dessa substância e não outro isômero de ácido dicafeoilquínico (posições 1,3; 1,5; 3,4; 3,5 ou 4,5) se deu por meio da presença dos íons produtos m/z 203 e 299 (CLIFFORD et al., 2005).

O ácido 1,4-dicafeoilquínico é o único isômero do grupo que apresenta o íon fragmento m/z 203, assim como o íon m/z 299 (observados com baixa intensidade neste estudo) (CATARINO et al., 2015; CLIFFORD et al., 2005; GOBBO-NETO, 2007).

No espectro de massas do íon m/z 515 (Figura 49), pode-se observar um padrão de fragmentação bem definido (m/z 515; 353; 299; 255; 203; 191; 179; 173), sendo os íons m/z 353, 191, 179 e 173, característicos de derivado de ácido clorogênico (GOBBO-NETO, 2007).

Pela proposta de fragmentação típica de um derivado de ácido clorogênico (Figura 50), é possível ocorrer uma clivagem heterolítica para a formação dos íons m/z 353, 191; 179 e 173; e a formação do íon m/z 135 ocorre por meio da descarboxilação do íon m/z 179.

A proposta de mecanismo de fragmentação neste estudo é baseada no estudo de Clifford et al. (2005) (Figura 50). Há a formação de um íon m/z 497 por meio da desidratação do íon m/z 515 ($[M-H]^-$). Este íon não foi observado neste estudo, assim como no estudo de Clifford et al. (2005), porém foi proposto como tal. Posteriormente, o íon m/z 497 levou a formação do íon m/z 317 por meio da eliminação do grupo cafeoila, permitindo assim, que haja a aromatização do anel e desidratação subsequente e formação do íon m/z 299. O íon m/z 255 é formado por meio de um rearranjo molecular seguido da descarboxilação do anel.

De acordo com Clifford et al. (2005), há a proposta de formação do íon m/z 203, uma fragmentação incomum, resultante de um rearranjo molecular seguido de mecanismo do tipo Retro - Diels - Alder, levando a perda de um grupo C_4H_4 .

Figura 49 - Espectro de massas do ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico (tempo de retenção 21,6 min), no modo negativo. Faixa de massa 50 a 1500 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

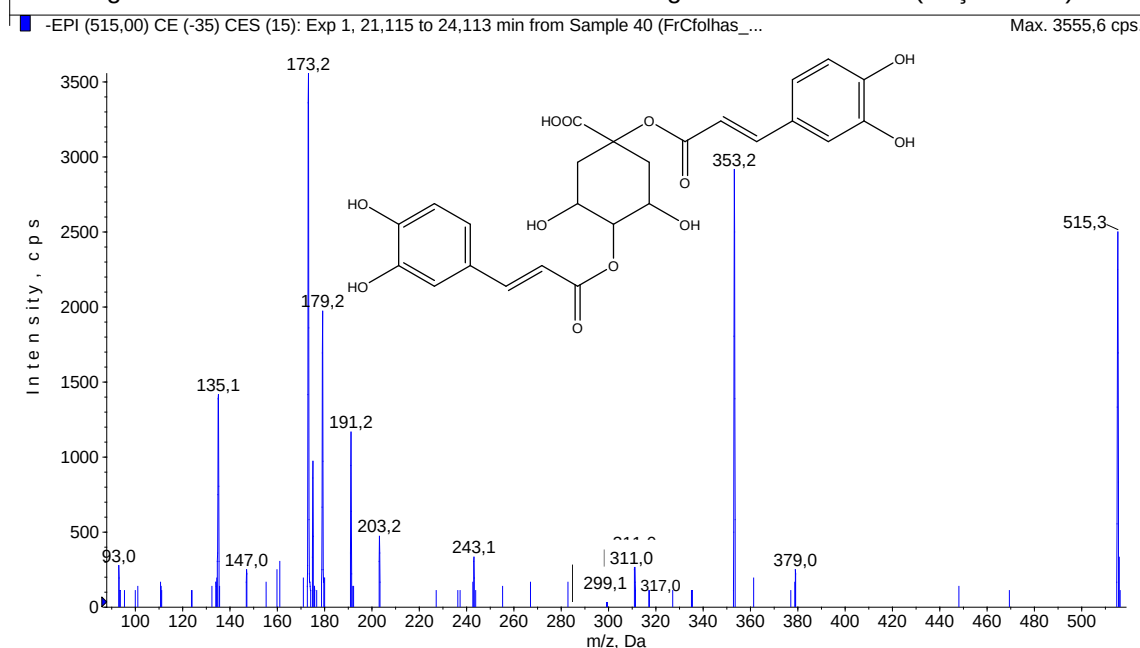
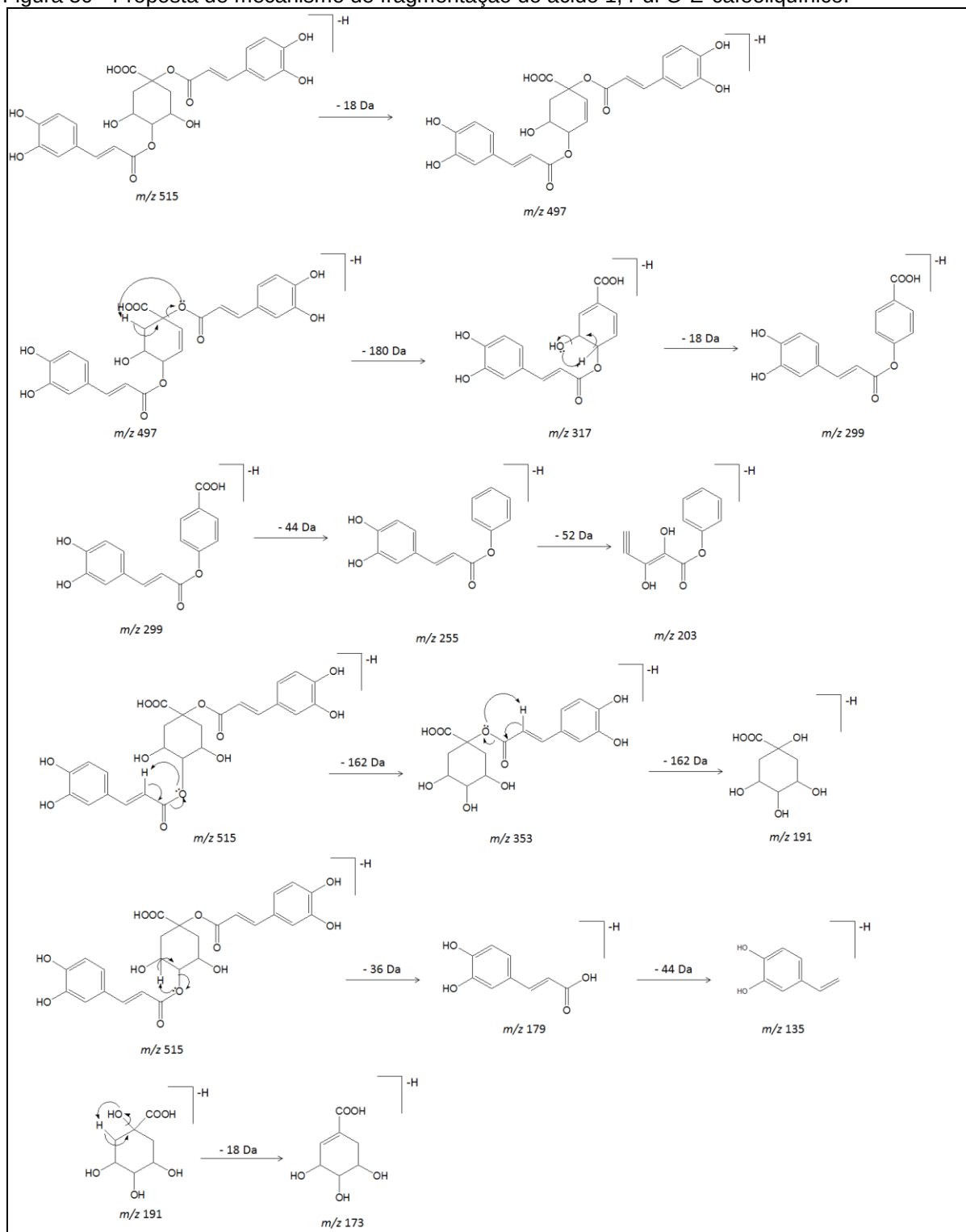


Figura 50 - Proposta de mecanismo de fragmentação do ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico.

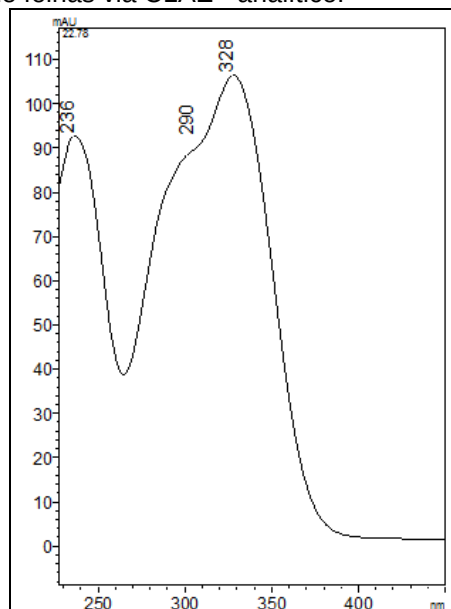


Fonte: elaborada pela autora, 2016.

No cromatograma da fração C ($t_R = 22, 78$ min) (Figura 22), esse isômero de ácido dicafeoilquínico também pode ser identificado, por meio da observação de seu espectro no UV-vis, que têm bandas características (Figura 51). Há a presença de

três bandas em 236 nm; 290 nm e 328 nm, características de derivados de ácido dicafeoilquínicos (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; NOLEET; TOLDRÁ, 2012).

Figura 51 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração C, no tempo de t_R 22,78 min, do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - analítico.



É de conhecimento que os compostos fenólicos, entre eles os isômeros e derivados de ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínicos apresentam potencial antioxidante comprovado em literatura (HUNG et al., 2006; NAKAJIMA et al., 2007; LIU et al., 2009; ABRAHÃO et al., 2010; CATARINO et al., 2015).

Ressalta-se, portanto, a importância das análises feitas por CLAE-EM/EM como uma forma eficiente e rápida para caracterização química da fração C. Como é bastante relatada na literatura a atividade antioxidante para o ácido clorogênico, derivados e compostos flavanoídicos, a identificação dessas substâncias no estudo corrobora e justifica o fato dessa fração ter dado resultado positivo no teste antioxidante executado.

4.6 Fracionamento do extrato hidroetanólico de folhas de *C. spruceanum* e identificação de compostos fenólicos

A ideia inicial do trabalho era realizar a caracterização de todas as frações antioxidantes promissoras dos extratos hidroetanólicos das diferentes partes da planta. Entretanto, analisando os resultados das amostras dos extratos hidroetanólicos, nota-se a importância de focar, primeiramente, no estudo do extrato

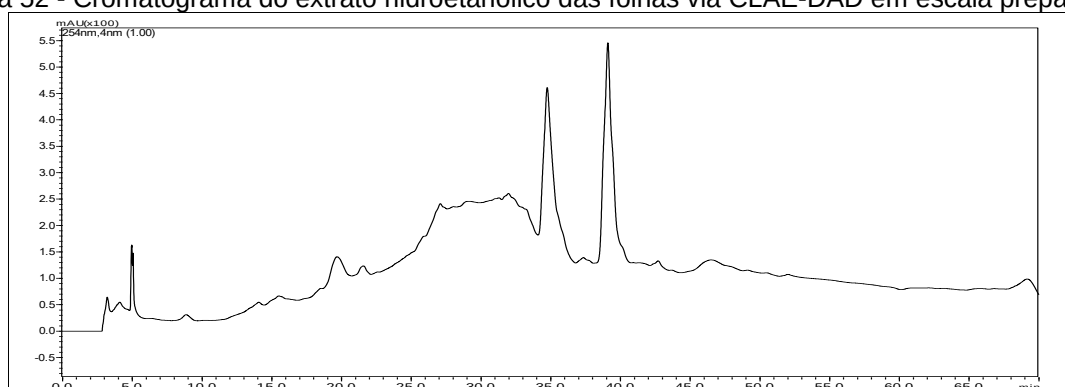
hidroetanólico de folhas, devido aos perfis cromatográficos e químicos apresentados, assim como os resultados referentes à atividade antioxidante obtida e também devido a inexistência de relatos na literatura.

Para continuidade do presente estudo, realizou-se análises em escala preparativa por CLAE-DAD do extrato hidroetanólico de folhas e também experimento de RMN e EM-IES das frações 3 e 5, para a identificação dos metabólitos secundários presentes.

4.6.1 Análise do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE-DAD em escala preparativa

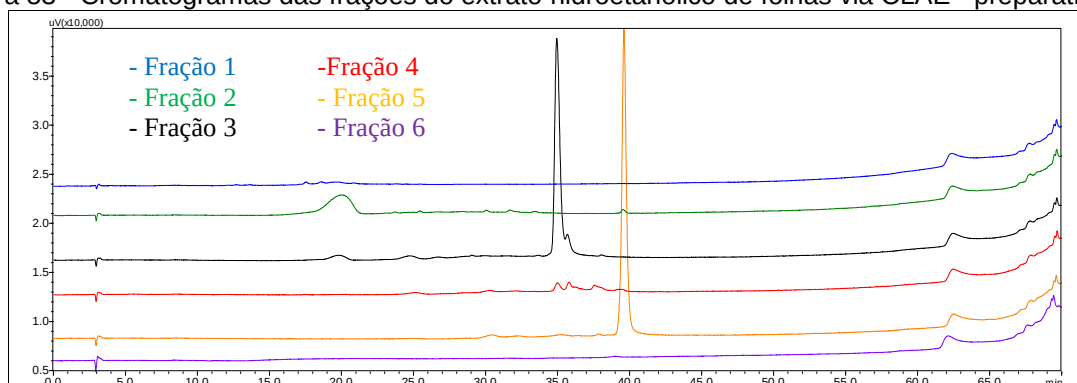
O sistema utilizado para análise do extrato CFEHidr em CLAE-DAD preparativa está descrito na Seção 3.3.1. O estudo teve por objetivo coletar frações semelhantes às frações obtidas no microfracionamento, para obter maior massa e assim, dar continuidade às análises de identificação dos compostos. No cromatograma de CFEHidr (Figura 52) em escala preparativa pode-se observar uma leve distorção em relação ao cromatograma obtido em escala analítica (Seção 4.2.1, Figura 11). As frações coletadas foram analisadas nas condições descritas na Seção 3.3.1 para verificar a eficiência da separação dos compostos de diferentes polaridades (Figura 53).

Figura 52 - Cromatograma do extrato hidroetanólico das folhas via CLAE-DAD em escala preparativa.



Condições de análise: coluna preparativa Luna Phenomenex C-18(100 Å) (5 µm; h x Φ = 150 x 21,20 mm), volume de injeção de 500,0 µL, fluxo 10,0 mL min⁻¹ e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B) (25 -70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial). λ=254 nm

Figura 53 - Cromatogramas das frações do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - preparativo.



A Fração 1 foi coletada de 0 a 25,0 min; Fração 2 de 25,1 a 34,3 min; Fração 3 de 34,4 a 35,4 min; Fração 4 de 35,5 a 38,4 min; Fração 5 de 38,5 a 40,0 min e Fração 6 de 40,1 min a 60,0 min.

Pode-se notar a eficiência da análise na separação dos metabólitos de distintas polaridades presentes devido à presença de picos em diferentes tempos de retenção. Em relação às massas obtidas (Tabela 2, Seção 3.3.1), observou-se um rendimento razoável (61,5%), e a análise contribuiu para o isolamento de algumas frações de interesse.

4.6.2 Análises da fração 3 do extrato hidroetanólico de folhas

Devido a observação de um pico majoritário nos cromatogramas obtidos em diferentes comprimentos de onda (220 nm, 254 nm, 365 nm) (Figura 54), a fração 3 do extrato hidroetanólico de folha também foi priorizada. Além disso, esta fração foi priorizada por apresentar atividade antioxidante nos testes iniciais feitos pelo microfracionamento do extrato de CFEHidr e foi submetida a diferentes técnicas de elucidação estrutural (CLAE-DAD; RMN; EM-IES) para a identificação das substâncias presentes.

4.5.2.1 Análises da fração 3 via CLAE-DAD

Comumente, flavonóis absorvem em uma faixa de 250 nm – 290 nm (banda II) e 352 nm - 385 nm (banda I), ressaltando que o padrão de oxigenação do esqueleto molecular influencia no comprimento de onda observado (HARBORNE, MABRY, MABRY 1975). O espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis), da fração 3 do extrato hidroetanólico de folhas, apresentou duas bandas características da classe dos flavonóis, sendo referente ao esqueleto de um flavonol 3-OH substituído (quercetina glicosilada) (HARBORNE, 1996; LIN; HARNLY, 2007; WAN et al., 2011). Assim, há duas bandas de absorção características: banda II em

255 nm, correlacionada ao anel A, e banda I em 356 nm, correlacionada aos anéis B e C (Figura 55) (HARBORNE, 1996; HARBORNE, MABRY; MABRY,1975).

Figura 54 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda da fração 3 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - preparativo.

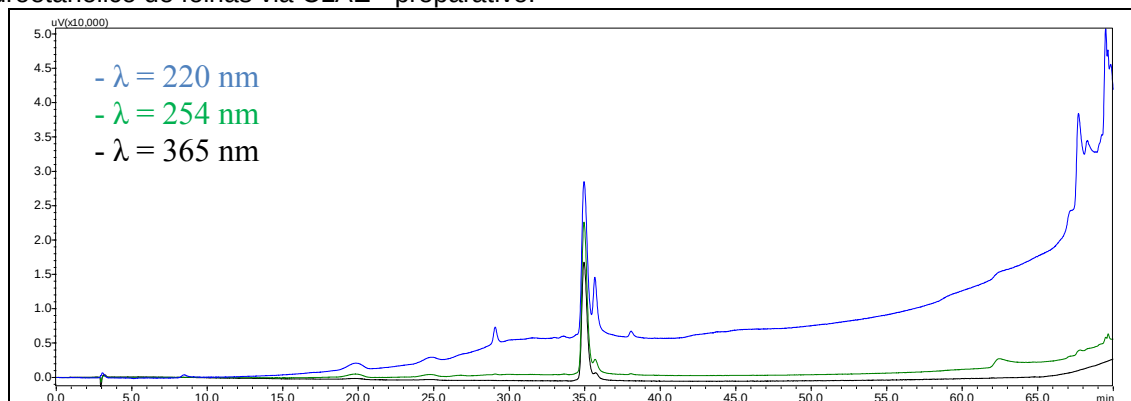
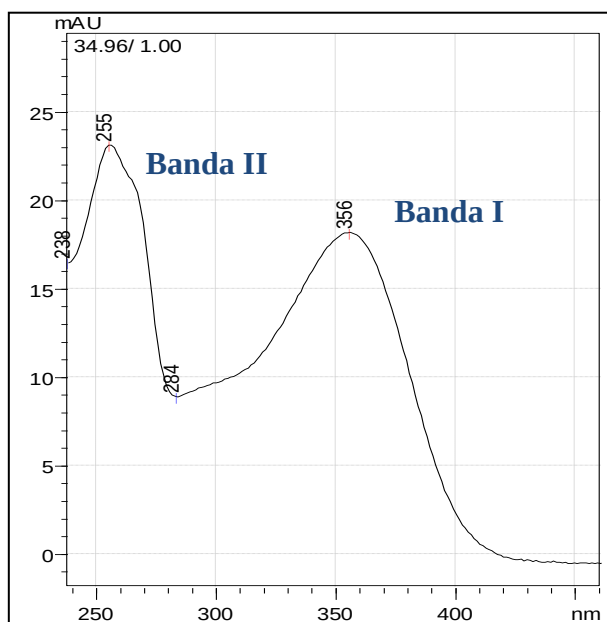


Figura 55 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração 3 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE- preparativo.

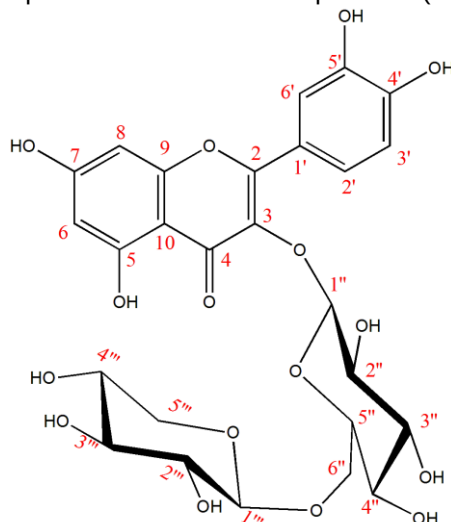


A fração 3 também foi submetida aos experimentos de RMN e de EM (Seções 4.5.2.1.1 e 4.5.2.1.2), sendo os dados comparados com a literatura apropriada, para a identificação estrutural deste derivado da classe dos flavonóis (composto majoritário), assim como da substância minoritária presente.

4.6.2.1.1 Identificação da quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo por RMN

Por meio dos dados obtidos nos experimentos de RMN, pode-se identificar a estrutura da substância quercetina-3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo (Figura 56).

Figura 56 - Estrutura química de quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.



No espectro de RMN de ^1H com pressaturação (Figura 57), nota-se presença de sinais na região dos hidrogênios aromáticos, sendo estes referentes a um flavonóide. Observa-se a presença de dupletos em δ_{H} 6,19 (H6, $J=2,1$ Hz) e δ_{H} 6,39 (H8, $J=2,1$ Hz), indicativo de acoplamento *meta* dos hidrogênios ligados ao anel A. Há um duplo duplete em δ_{H} 7,66 (H2' $J_{2',6'}=2,2\text{Hz}$ e $J_{2',3'}=8,4\text{Hz}$) com constantes de acoplamento referentes ao acoplamento *orto* entre os hidrogênios H2' e H3'; e acoplamento *para* entre os hidrogênio H2' e H6', respectivamente no anel B. Nota-se um duplo duplete em δ_{H} 6,87 (H3', $J_{2',3'}=8,4$ Hz) com indicativo de acoplamento *orto* com H2', assim como um duplo duplete em δ_{H} 7,71 (H6', $J_{2,6'}=2,2$ Hz) indicador de acoplamento *para* entre H2' e H6' (anel B). Estes sinais, pertencentes ao anel B, são referentes a um sistema de substituição em aromáticos do tipo ABX (PAVIA et al., 2012).

Estes acoplamentos foram confirmados pela análise do espectro de RMN de ^1H pressat. (Figura 57) e comparação com os dados obtidos na literatura (KRENN et al., 2003; HARBORNE, 1996), os quais seguem listados na Tabela 11. Assim,

demonstrou-se que a substância majoritária da mistura trata-se de um derivado de quercetina.

Figura 57 - Espectros de RMN de ^1H pressat. da fração 3 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , supressão do sinal em 4,9 ppm, 14,1 T).

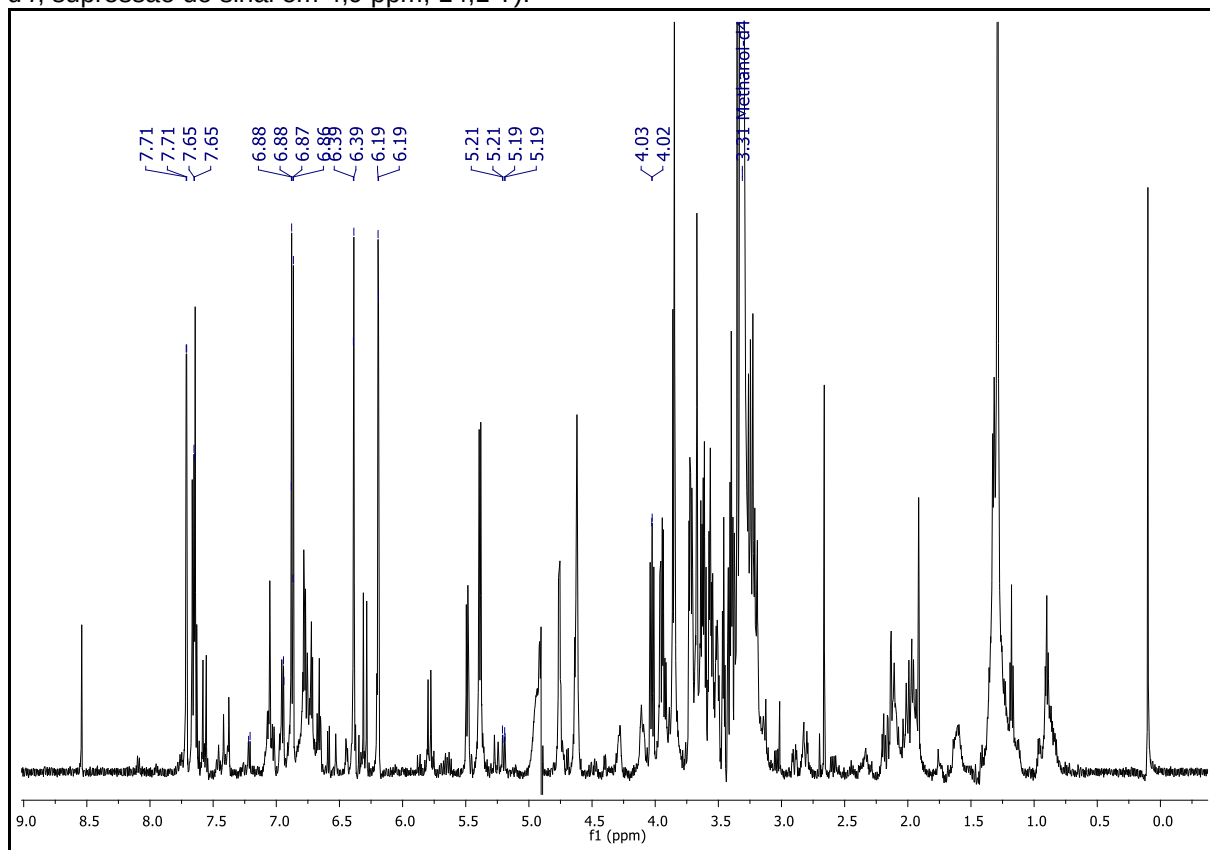


Tabela 11 - Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura da substância quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.

Posição	δ ^1H (ppm), M, J(Hz)	Literatura*	δ ^{13}C (ppm)	Literatura*
Aglicona				
2	-	-	-	158,5
3	-	-	-	135,7
4	-	-	-	179,5
5	-	-	-	163,1
6	6,19 / d (2,1)	6,20/ d (2,1)	-	99,6
7	-	-	-	166,1
8	6,39/ d (2,1)	6,40/ d (2,1)	-	94,8
9	-	-	-	158,7
10	-	-	-	105,8
1'	-	-	-	123,1
2'	7,66/ dd (2,2; 8,4)	7,67/ dd (2,0; 8,2)	-	117,4
3'	6,87/ dd (1,7; 8,4)	6,87/ d (8,2)	-	146,0
4'	-	-	-	149,9
5'	-	-	-	116,1
6'	7,71/ d (2,2)	7,70/ d (2,0)	-	123,5
Glicose				
1''	5,19/ d (7,54)	5,19/ d (7,5)	-	104,1
2''	-	3,50/ t	-	75,7
3''	-	3,40 – 3,42/ m	-	78,1
4''	-	3,30/ obs	-	71,5
5''	-	3,40 – 3,42/ m	-	78,2
6a''	-	3,60/ dd	-	69,2
6b''	-	3,89/ dd	-	69,2
Arabinose				
1'''	4,08/ d (6,48)	4,03/ d (7,0)	-	104,8
2'''	-	3,36/ t	-	72,4
3'''	-	3,19/ dd	-	74,0
4'''	-	3,63/ m	-	69,4
5'''	-	3,14/ dd	-	66,6

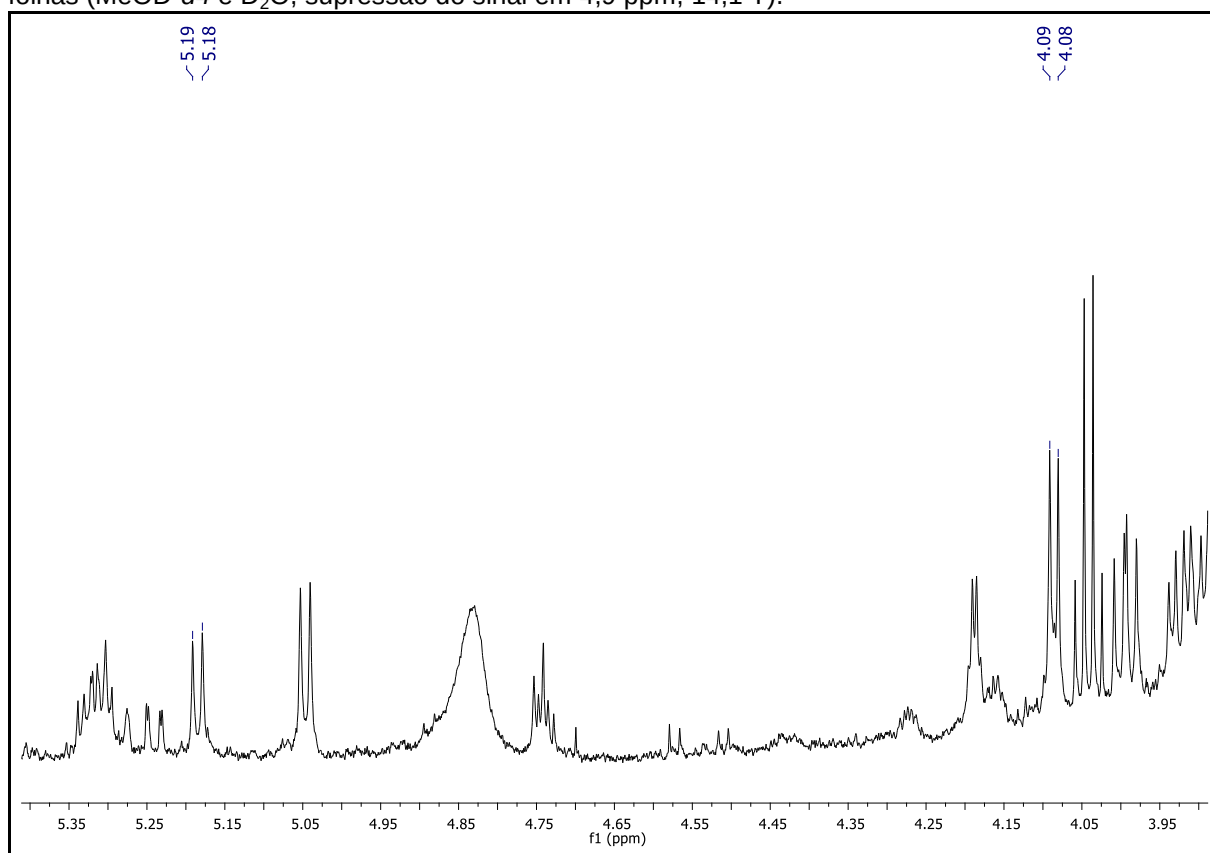
Fonte: elaborada pela autora, 2016.

*Dados disponíveis em Kreen et al. (2003) e Harborne (1996).

Diversos sinais na região de δ_{H} 3,0 – 5,0 são característicos de glicosídeos. Observando os dados do espectro de RMN ^1H pressat. (Figura 57) e por comparação com a literatura (KREEN et al., 2003), nota-se a presença dos sinais de hidrogênio na região de δ_{H} 4,08 e δ_{H} 5,19. Os referidos sinais indicam a presença de duas unidades de açúcar, ligadas à aglicona, identificadas como glicose e arabinose.

Os sinais dos hidrogênios anoméricos das unidades glicosídicas glicose e arabinose em δ_H 5,19 (*d*, *J* = 7,54 Hz) e δ_H 4,08 (*d*, *J* = 6,48 Hz), respectivamente é um dado que corrobora as unidades glicosídicas mencionadas. Os sinais dos hidrogênios anoméricos foram observados de forma mais clara por meio do experimento de RMN de 1H com a solubilização da amostra em MeOD: D₂O (Figura 58) o que ficou mais evidente a proposição feita.

Figura 58 - Expansão do espectro de RMN de 1H pressat. da fração 3 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD-*d*4 e D₂O, supressão do sinal em 4,9 ppm, 14,1 T).



Acomparação dos dados encontrados nos experimentos de RMN, com os descritos na literatura (Tabela 9), permitiu a confirmação da estrutura do flavonol diglicosilado quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.

4.6.2.1.2 Identificação de quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo por EM-IES

A amostra também foi analisada por meio da técnica de espectrometria de massas por infusão direta para a identificação do composto majoritário na mistura, cujos potenciais foram ajustados para os modos positivo e negativo (Figuras 58 e 61).

No modo positivo, o íon precursor de m/z 597,1451 $[M+H]^+$ é o pico base (Figura 59), e é referente ao flavonol de massa molar 596 g/mol, quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo. A fragmentação desse íon precursor gerou o íon produto m/z 465,1015 $[M-132+H]^+$ referente a perda da unidade da pentose (monossacarídeo externo); e m/z 303,0488 $[M-162+H]^+$ devido à perda de duas unidades de açúcares, sendo a primeira perda referente à pentose e a segunda à hexose (monossacarídeo mais interno), levando a formação do íon referente à aglicona quercetina (MARTUCCI et al., 2014; PENG; SHUI, 2004).

Figura 59 - Espectro de massas de primeira ordem, modo positivo *full-scan*, da fração 3 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

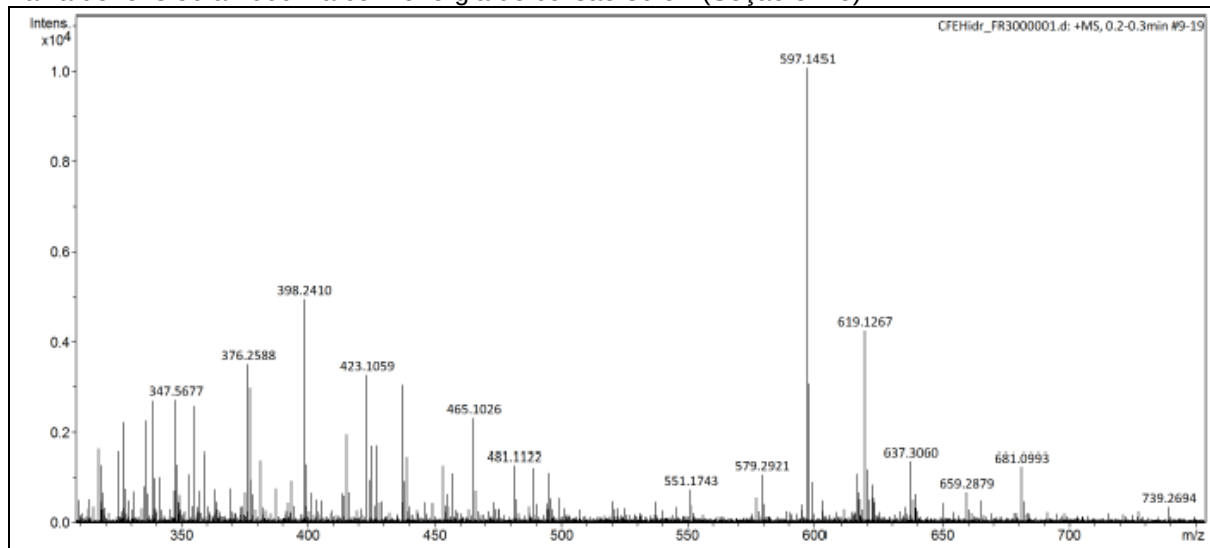
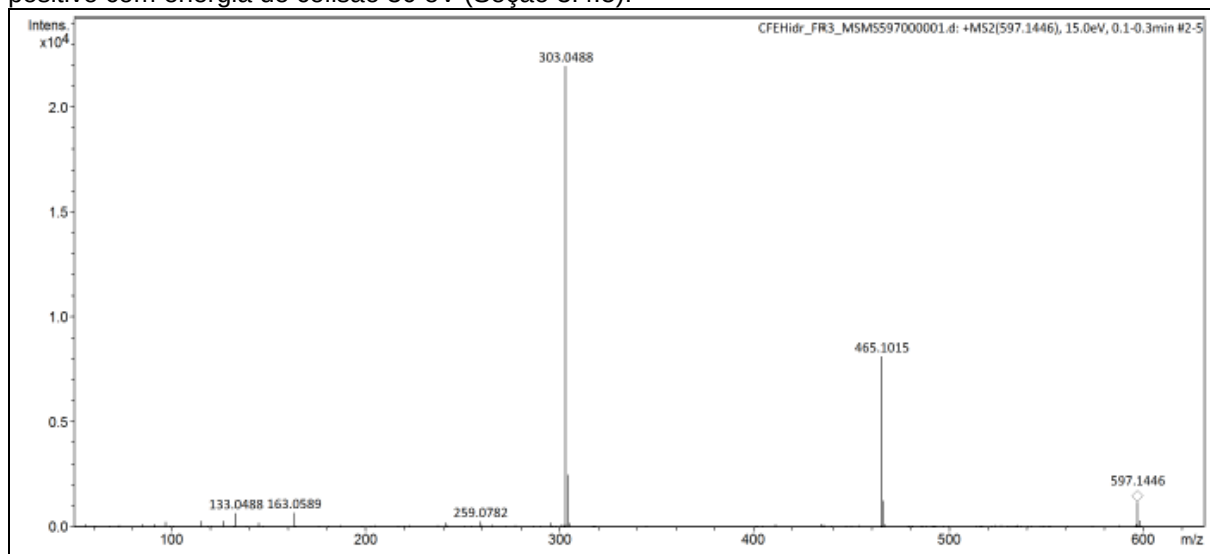
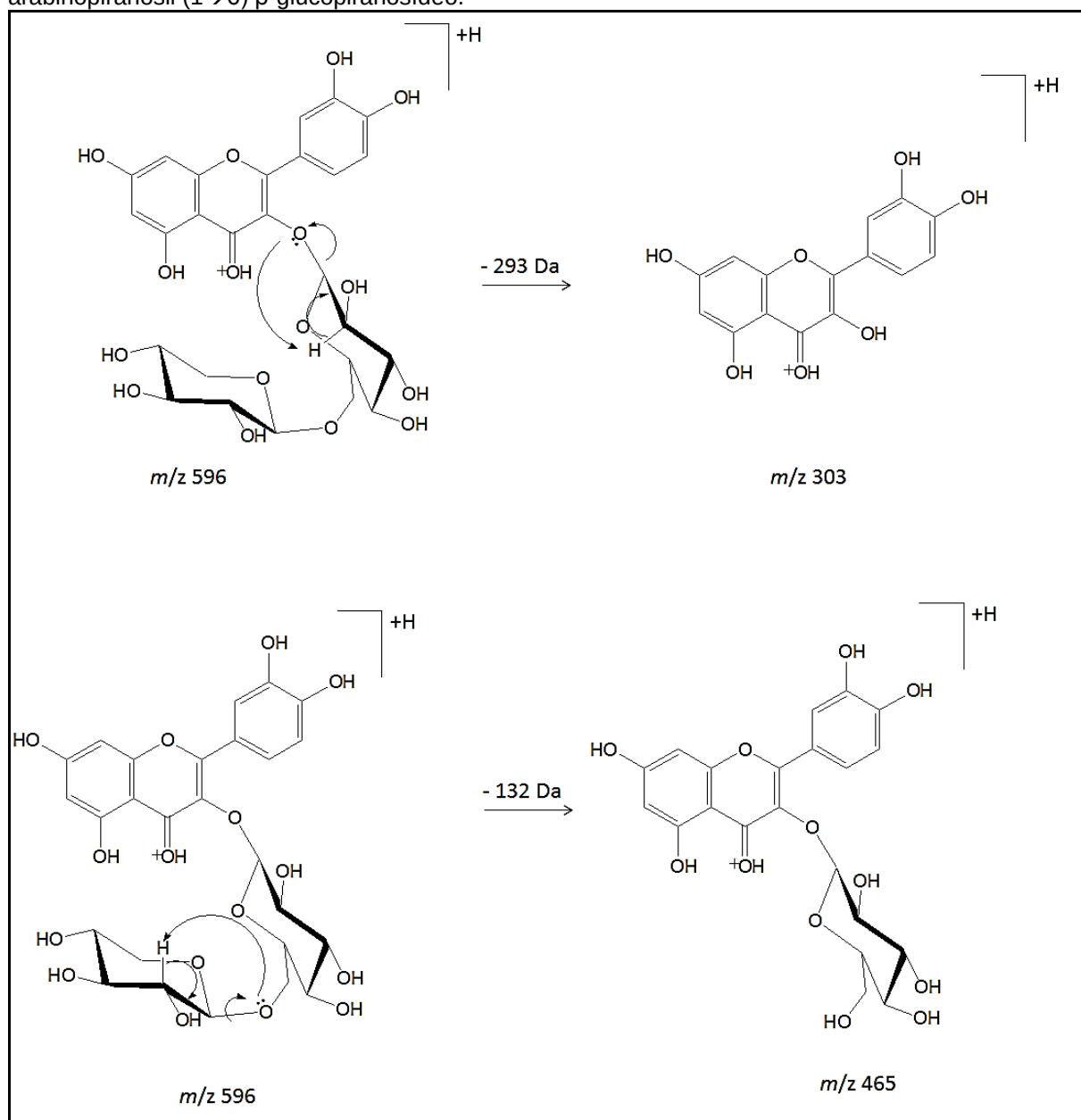


Figura 60 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 597,1446 em modo positivo com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



No esquema de fragmentação indicado na Figura 61, feito no modo positivo fica evidente a migração do próton para facilitar e permitir a clivagem entre as ligações das unidades glicosídicas e aglicona, assim como a quebra da ligação entre a pentose e a hexose (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; MA et al., 2000). Estas informações foram também informativas para estabelecer a estrutura química da quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo por EM, uma técnica analítica robusta para a elucidação estrutural de produtos naturais.

Figura 61 - Proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(+) para quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

No modo negativo, também pode ser verificado o íon precursor m/z 595,1272 $[M-H]^-$ (Figura 62) e os experimentos de fragmentação referentes a este íon geraram o íon produto m/z 301,0289 $[M-292-H]^-$ e m/z 300,0237 $[M-292-2H]^-$ (Figura 63), corroborando com parte das informações obtidas das análises em modo positivo (MARTUCCI et al., 2014; PENG; SHUI, 2004; KRENN et al., 2003; HAVATTUM; EKEBERG, 2003).

Figura 62 - Espectro de massas de primeira ordem, modo negativo *full scan*, da quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo, presente na amostra fração 3 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

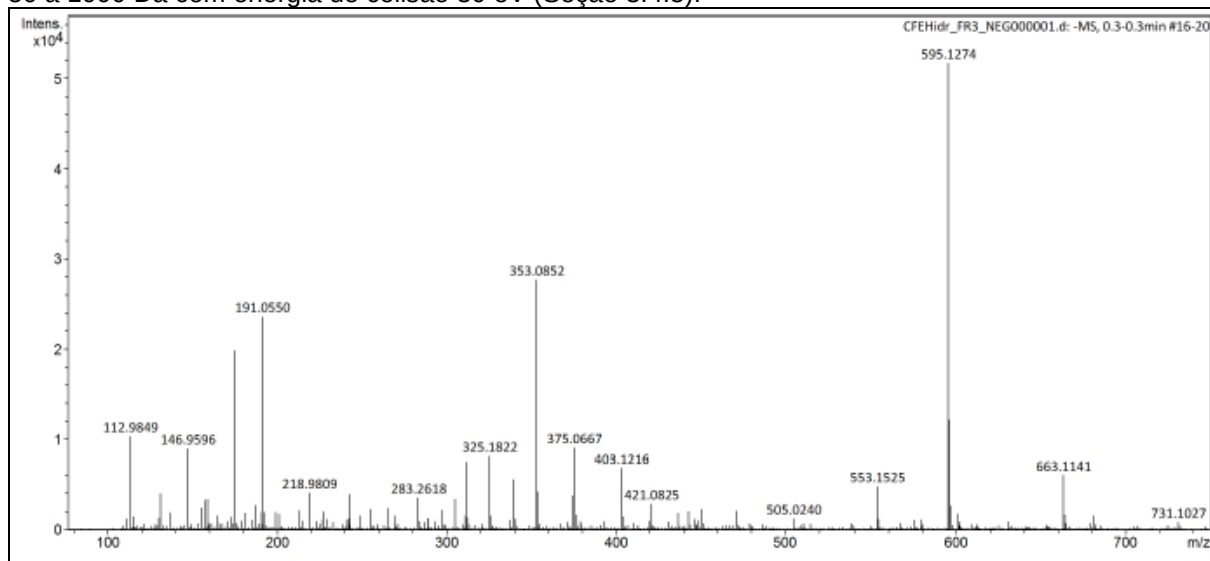
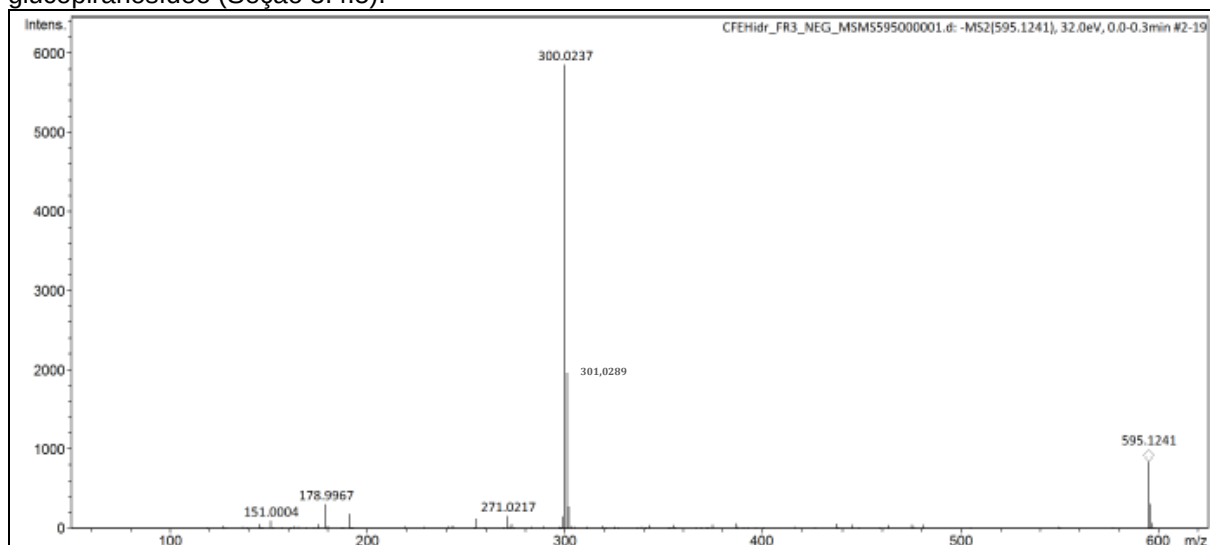


Figura 63 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 595,1241 em modo negativo com energia de colisão 30 eV para quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo (Seção 3.4.5).

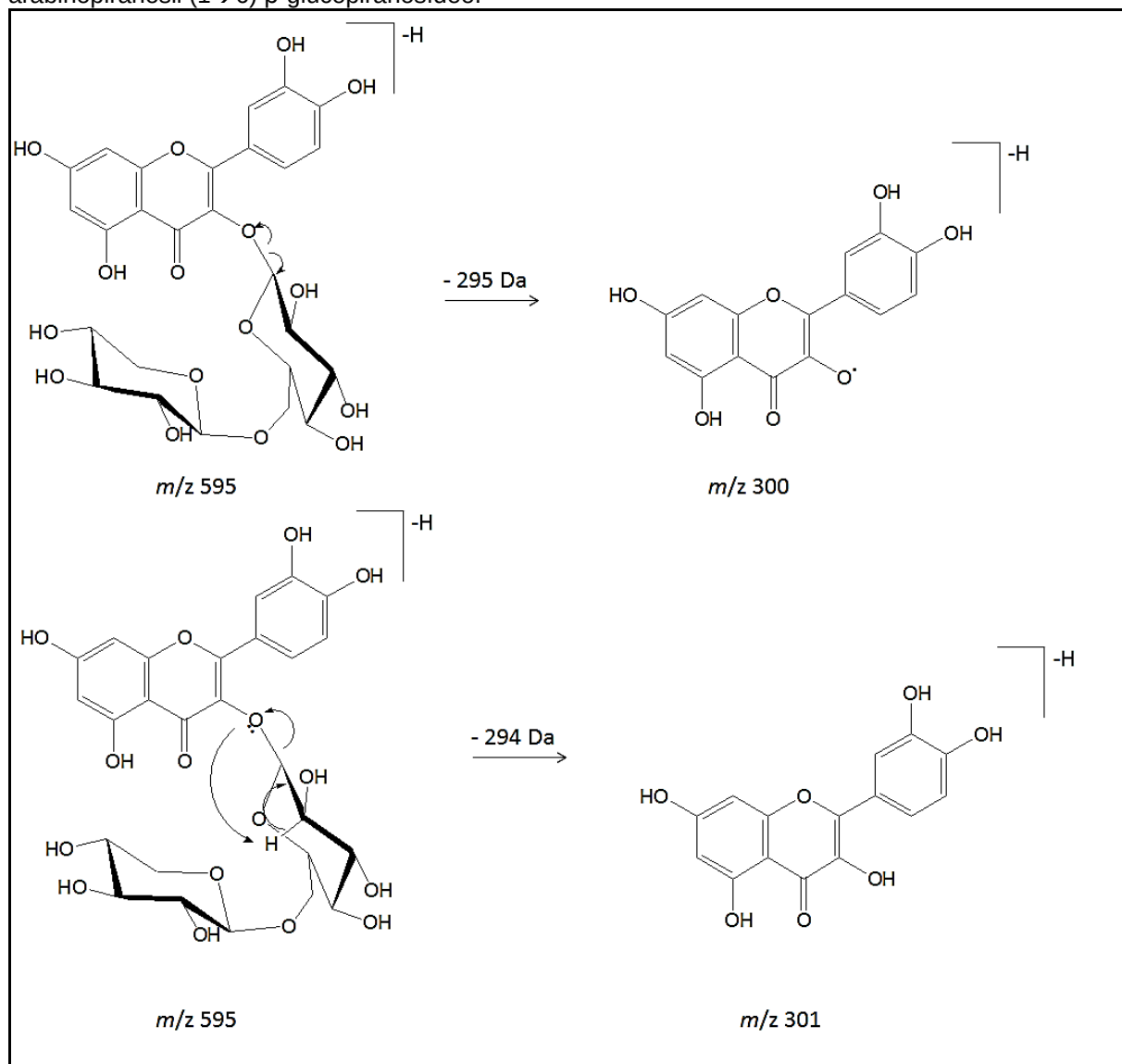


Pela via de fragmentação esquematizada para a quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo (Figura 64), nota-se que há dois tipos de clivagem ocorrendo: heterolítica para a formação do íon m/z 301,0289 (aglicona) e a homolítica levando a formação do íon m/z 300,0237 (íon radical aglicona).

Em modo negativo, flavonóides O-glicosilados tendem a uma clivagem tipo homolítica, caracterizada como radicalar, ocorrendo a formação do íon referente aaglicona radicalar (HAVATTUM; EKEBERG, 2003). A formação deste íon corrobora com a capacidade antioxidante de derivados de quercetina (HARBORNE, 1996). A

quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo também foi confirmada pela proposta de fragmentação de EM-IES(-) para substância em discussão (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Figura 64 - Proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(-) para quercetina 3-O- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

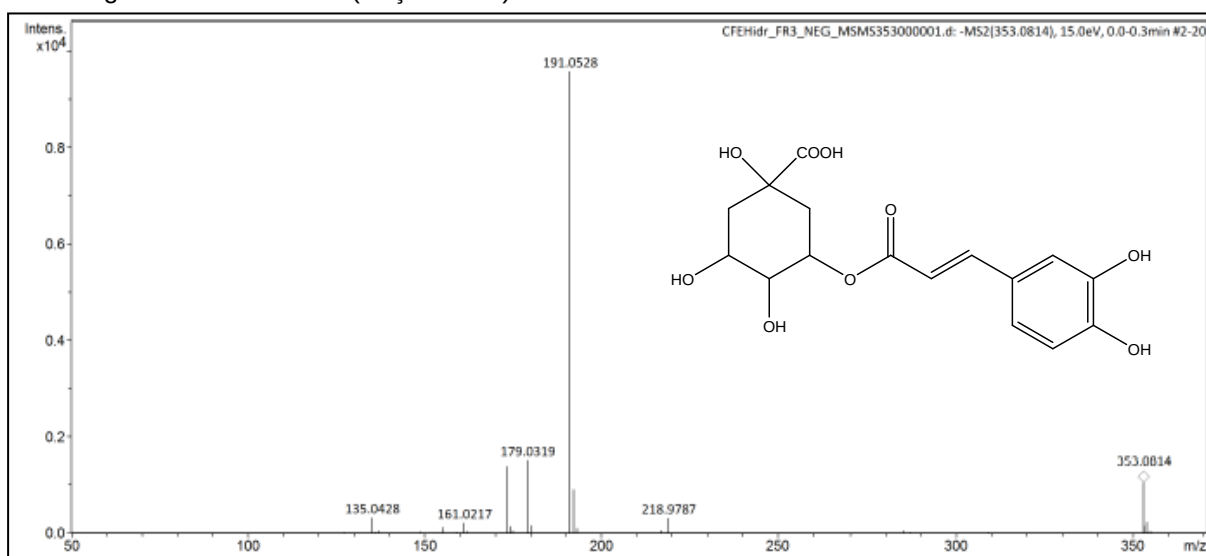
De acordo com Yang et al. (2013), os flavonóis 3-O-glicosilados sofrem fragmentação homolítica, promovendo a eliminação de resíduos de glicosídeos. A técnica de espectrometria de massas é muito utilizada para o reconhecimento de flavonoides diglicosilados, colaborando para o conhecimento da sequência de açúcares na estrutura da aglicona (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; HVATTUM; EKEBERG, 2003).

A classe de flavonoides é altamente conhecida devido a diversidade de atividades biológicas, sendo a atividade antioxidante a mais importante para esta classe de produtos naturais (DEWICK, 2000; HARBORNE, 1996). Sabe-se que a ação antioxidante de um flavonoide é dependente da estabilidade do radical flavonoídico formado, ou seja, depende da estabilização do elétron desemparelhado por meio da deslocalização eletrônica. Quercetinas são conhecidas por estabilizar o elétron desemparelhado devido a presença dos grupos hidroxílicos no anel B na posição 3 do anel C (COUTINHO et al., 2009; BEHLING et al., 2004). Porém, a presença de unidades glicosídicas acaba por interferir na planaridade do radical gerado e assim na deslocalização eletrônica, levando a uma menor disposição de transferência de elétrons para o radical DPPH[•] e diminuindo a atividade antioxidante (COUTINHO et al., 2009).

4.6.2.2 Identificação de ácido cafeoilquínico

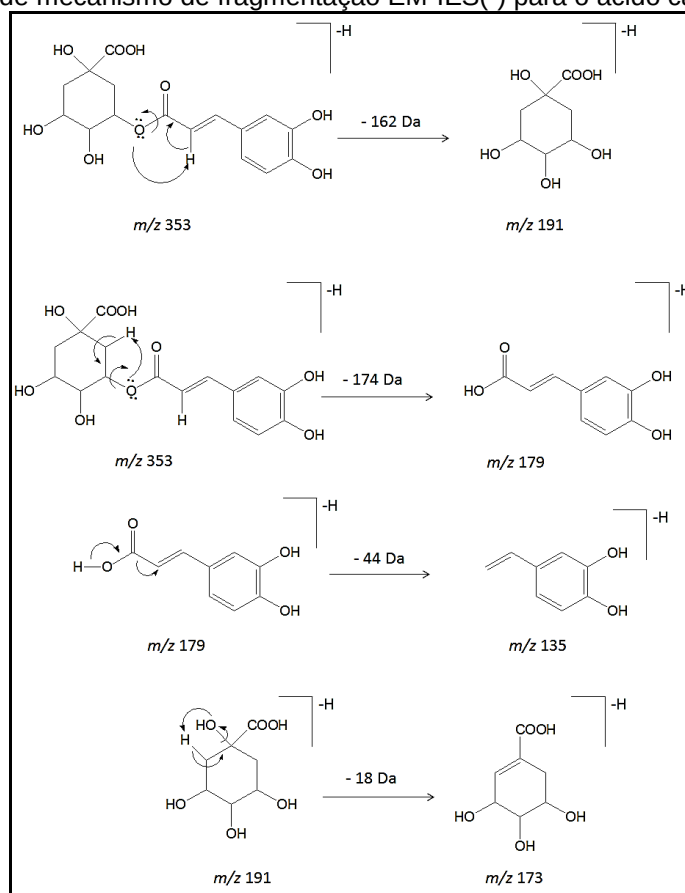
Em modo negativo, na fração 3 também foi identificado o ácido cafeoilquínico (M.M 354 g/mol) devido a presença do íon m/z 353,0824 [M-H]⁻ em modo *full scan* (Figura 65) compatível com dados da literatura (NOLLET; TOLDRA, 2012; GOBBONETO, 2010). As informações obtidas pela técnica de EM foram essenciais para confirmar a estrutura, especialmente os íons fragmentos m/z 191,0528 ([M-H-162]⁻); 179,0319 ([M-H-174]⁻); 173, 2831 ([M-H-162-18]⁻); 135, 0428 ([M-H-174-44]⁻).

Figura 65 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 353 em modo negativo com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



A maior parte dos mecanismos de fragmentação ocorre por meio de clivagem heterolítica para a formação dos íons, mas também há a ocorrência do mecanismo de descarboxilação para a formação do íon m/z 135 (Figura 65) (GOBBO-NETO, 2010; YUAN et al., 2015).

Figura 66 - Proposta de mecanismo de fragmentação EM-IES(-) para o ácido cafeoilquínico.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Como não houve separação cromatográfica das substâncias identificadas nesta fração, não foi possível a identificação do isômero de ácido cafeoilquínico presente na amostra estudada. Os isômeros e derivados de ácido cafeoilquínico apresentam atividade antioxidante citada em literatura (BASTOS et al., 2007; MORAIS et al., 2008; STALMACH et al., 2006).

4.6.3 Análises da fração 5 do extrato hidroetanólico de folhas

Foi realizado um estudo mais aprofundado da fração 5 coletada, devido à observação de um único pico em diferentes comprimentos de onda (220 nm, 254 nm, 365nm) (Figura 67), e também devido ao fato de pertencer a uma região das

frações que apresentaram atividade antioxidante nas análises iniciais feitas pelo microfracionamento de CFEHidr.

4.6.3.1 Análises da fração 5 via CLAE-DAD

O monitoramento do cromatograma da fração 5 em diversos comprimentos de onda (220 nm, 254 nm, 365 nm) (Figura 67) indica que há a presença de um pico majoritário. O espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis) deste pico apresentou duas bandas características para flavonóis 3-OH substituídos, ou seja, banda II em 265 nm, correlacionada ao anel A, e banda I em 348 nm, correlacionada aos anéis B e C (Figura 68) (HARBORNE, 1996).

Figura 67 - Cromatograma em diferentes comprimentos de onda da fração 5 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - preparativo.

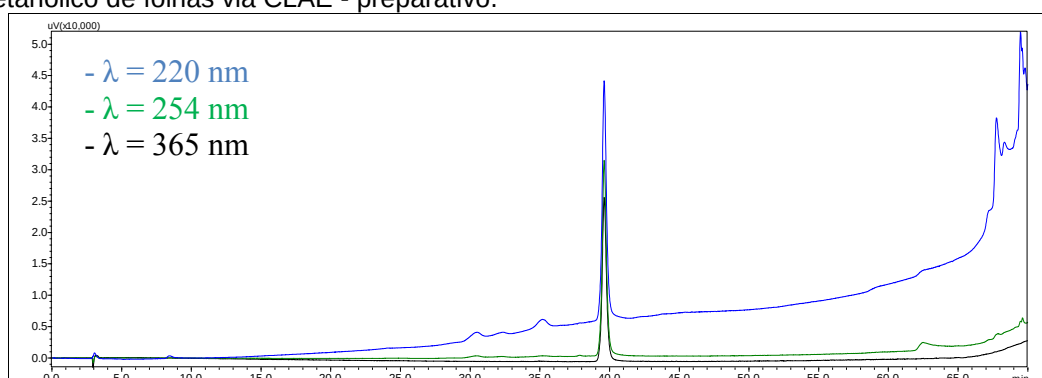
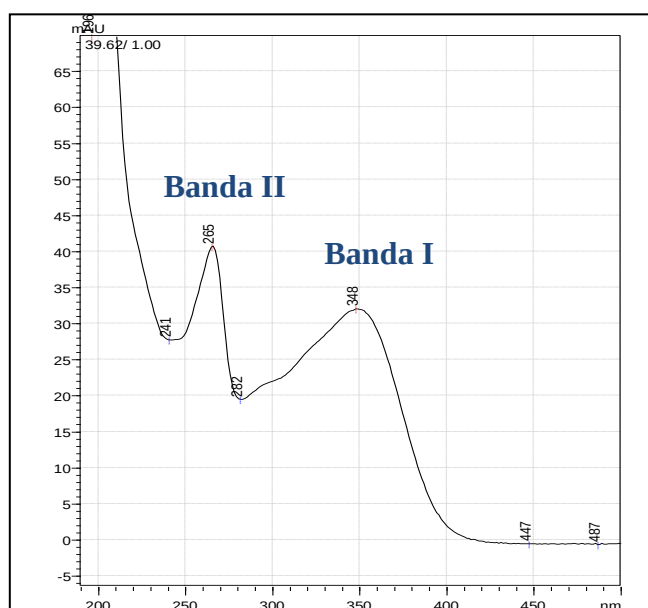


Figura 68 - Espectro de absorção em ultra violeta-visível (UV-vis) da fração 5 coletada do extrato hidroetanólico de folhas via CLAE - preparativo.



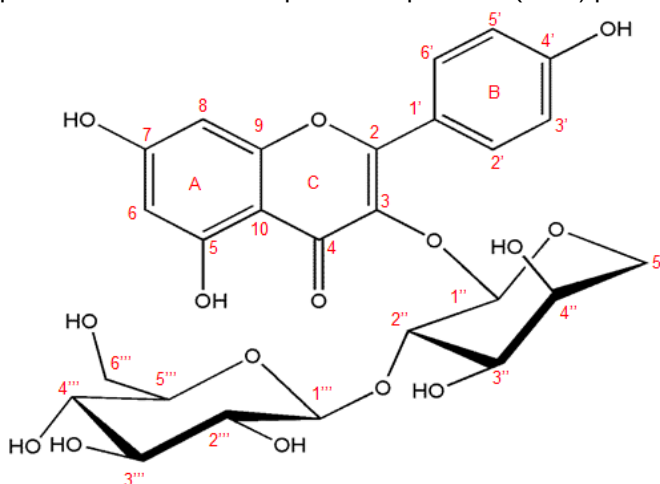
Nota-se que se não houvesse a presença de substituintes na posição 3, haveria um deslocamento batocrômico da banda I, levando a valores de absorção na faixa de 350 - 385 nm. Este dado é indicativo da presença de um grupo substituinte na posição C-3 da molécula (HARBORNE, 1996; MARKHAM, 1982).

A fração 5 foi estudada de forma mais minuciosa pelo uso de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , além de EM (Seções 4.5.3.1.1 e 4.5.3.1.2). Pela análise dos dados da amostra em estudo e comparação com dados da literatura foi determinada a estrutura da substância majoritária presente na fração 5, identificada como sendo o flavonoide diglicosilado canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo, descrita na literatura como um antioxidante moderado (SHAFEK; SHAFIK; MICHEL, 2012).

4.6.3.1.1 Identificação do canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo por RMN

A Figura 69 apresenta a estrutura do composto identificado como canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo.

Figura 69 - Estrutura química de canferol 3-O- β -D-Glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-Xilopiranosídeo.



A análise do espectro de RMN de ^1H pressat. demonstrou a presença de um esqueleto flavonoídico pelos sinais dos dupletos em δ_{H} 6,19 (H6, $J_{6,8}=2,0$ Hz) e 6,39 (H8, $J_{6,8}=2,0\text{Hz}$) indicativo de acoplamento *meta* dos hidrogênios ligados ao anel A; em 6,90 (H5', H3', $J_{5',6'/3',2'}=8,8\text{Hz}$) e 8,08 (2H, $J_{2',3'/6',5'}=8,8\text{Hz}$) referentes às posições H2'/ H6', indicativo de acoplamentos na posição *orto*, atribuídos ao anel B. Os hidrogênios pertencentes ao anel B são referentes a um sistema de substituição

em aromáticos do tipo AA'BB' (PAVIA et al., 2012). Estes acoplamentos foram confirmados por meio dos dados do espectro de RMN de ^1H pressat. (Figura 70), e comparação com os dados obtidos na literatura (HARBORNE, 1996; SHAFEK; SHAFIK; MICHEL, 2012), os quais seguem listados na Tabela 12. Dessa forma, conclui-se que a substância majoritária da fração 5 a ser identificada se trata de um derivado de canferol.

Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H pressat da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , 1,4 T).

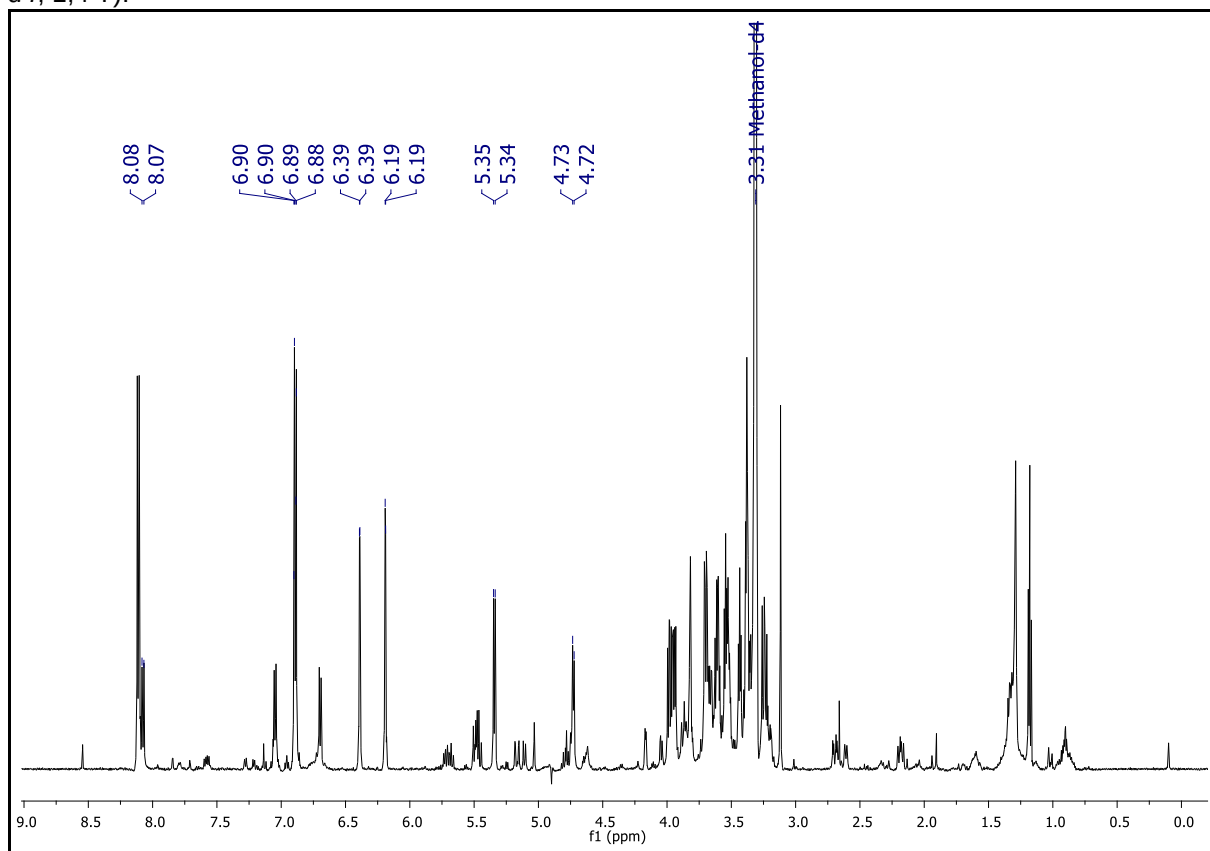


Tabela 12 - Comparação dos dados espectrométricos obtidos com os dados descritos na literatura, da substância canferol 3-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosídeo.

Posição	δ ^1H (ppm), M, J(Hz)	Literatura*	δ ^{13}C (ppm)	Literatura* *
Aglicona				
2	-	-	157,1	156,4
3	-	-	133,6	133,2
4	-	-	178,4	177,6
5	-	-	161,7	161,2
6	6,19/ <i>d</i> (2,0)	6,20/ <i>d</i> (2,5)	98,6	98,7
7	-	-	164,9	164,1
8	6,39/ <i>d</i> (2,0)	6,40/ <i>d</i> (2,5)	93,4	93,5
9	-	-	157,1	156,3
10	-	-	104,3	104,1
1'	-	-	121,3	121,2
2'	8,08/ <i>d</i> (8,8)	8,05/ <i>d</i> (8,0)	130,9	130,5
3'	6,90/ <i>d</i> (8,8)	6,91/ <i>d</i> (8,0)	114,9	115,5
4'	-	-	160,1	159,8
5'	6,90/ <i>d</i> (8,8)	6,91/ <i>d</i> (8,0)	114,9	115,2
6'	8,08/ <i>d</i> (8,8)	8,05/ <i>d</i> (8,0)	130,9	130,8
Glicose				
1'''	4,75/ <i>d</i> (6,9)	4,70/ <i>d</i> (7,5)	104,2	102,6
2'''	3,40/ <i>m</i>	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	73,7	74,2
3'''	3,40/ <i>m</i>	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	75,9	76,5
4'''	3,26/ <i>dd</i> (9,8; 11,5)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	69,7	69,7
5'''	3,96/ <i>dd</i> (5,0;11,5)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	75,9	76,5
6a'''	3,54/ <i>m</i>	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	60,5	60,7
6b'''	3,54/ <i>m</i>	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	60,5	60,7
Xilose				
1''	5,36/ <i>d</i> (7,6)	5,37/ <i>d</i> (8,0)	99,3	99,6
2''	4,00/ <i>dd</i> (7,76;9,44)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	77,0	76,5
3''	4,00/ <i>dd</i> (7,8;9,4)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	75,9	75,9
4''	3,72/ <i>dd</i> (9,8; 11,5)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	68,8	69,2
5a''	3,84/ <i>d</i> (5,0;11,5)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	65,4	65,6
5b''	3,84/ <i>d</i> (5,0;11,5)	3,0 – 3,88 (<i>m</i>)	65,4	65,6

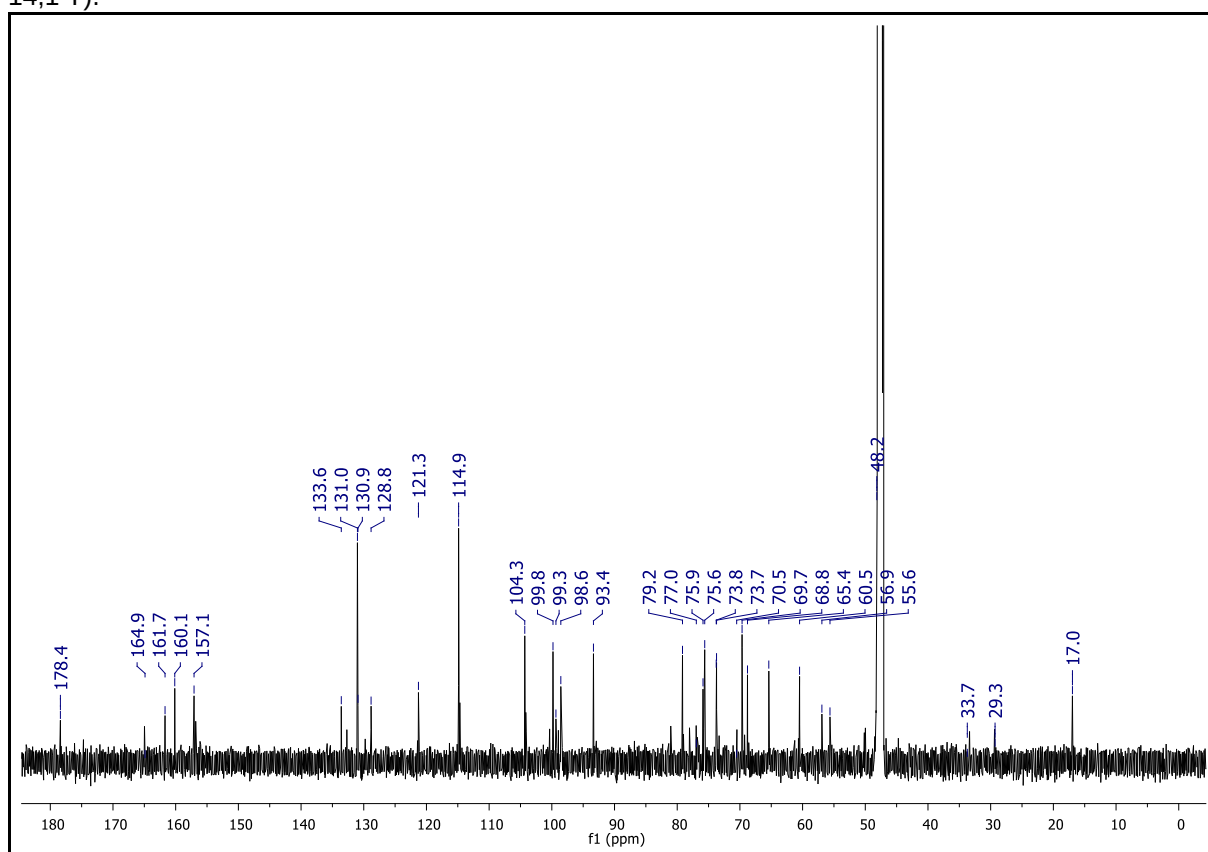
Fonte: elaborada pela autora, 2016.

*Dados disponíveis em Shafek; Shafik e Michel (2012).

**Dados disponíveis em Shafek; Shafik e Michel (2012) e Harborne (1996).

A partir dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C unidimensionais (Figura 71), pode-se comparar os mesmos com os dados encontrados na literatura (HARBORNE, 1996; SHAFER; SHAFIK; MICHEL, 2012) e verificar que ambos os dados foram concordantes com a estrutura do flavonoide canferol diglicosilado na posição 3.

Figura 71 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD- d_4 , 14,1 T).



No espectro de ^{13}C , foi possível observar sinais característicos de carbonila em δ_{C} 178,4, sendo que 157,1; 160,1; 161,7 e 164,9 são sinais característicos de carbonos aromáticos ligados ao átomo de oxigênio. Os sinais em 133,6 e 157,1 são referentes ao átomo de carbono carbinólico (sp^2) (C-2' e C-3). Foram observados sinais de carbonos aromáticos ligados ao hidrogênio em δ_{C} 99,3; 93,4; 114,9 (2C) e 130,9 (2C), assim como sinais de carbonos quaternários em δ_{C} 104,2 e 121,3, correspondendo a um total de quinze átomos de carbono, estrutura básica de um flavonoide. Os múltiplos sinais na região compreendida entre 3,24 a 5,36 ppm no espectro de RMN de ^1H indicam a presença de unidades de açúcares. As unidades glicosídicas, xilose e glicose, também foram confirmadas por meio da comparação

com os dados descritos na literatura (SHAFEK; SHAFIK; MICHEL, 2012). Os sinais dos hidrogênios anoméricos das unidades glicosídicas xilose e glicose são δ_H 5,36 (d, $J=7,6$ Hz) e δ_H 4,75 (d, $J=6,9$ Hz), respectivamente. A presença dos sinais de dois hidrogênios anoméricos foi observada tanto pelos experimentos de RMN de 1H , como pelos experimentos de TOCSY 1D (Figuras 72 e 73). O hidrogênio anomérico (H-1) de um açúcar diretamente ligado à outra unidade de açúcar terminal foi evidenciado devido às diferentes multiplicidades e deslocamentos químicos dos sinais observados no espectro. O espectro de ^{13}C (Figura 71) também evidenciou dois sinais de carbonos anoméricos em δ_C 99,3 e δ_C 104,2, pertencentes às unidades de monossacarídeos xilose e glicose, respectivamente. Analisando as estruturas de xilose e glicose, pode-se verificar a presença de carbonos do tipo oximetínicos referente às posições 2'' a 5'', e assim como em relação às posições 2''' a 5''', já o carbono oximetilênico é observado na posição 6'''.

O posicionamento dessas unidades em relação à estrutura da aglicona foi confirmado pelo mapa de contorno de HMBC (Figuras 74 e 75), devido às correlações heteronucleares observadas para os carbonos em δ_C 133,6 (C-3) com δ_H 5,36 (H-1'') e do carbono em δ_H 4,70 (H-1''') com δ_C 75,9 (C-3'') (Figura 75). Observou-se também as correlações entre δ_H 3,98 (H-3'') com δ_C 104,2 (C-1''') (Figura 76), confirmando a substituição do tipo O-glicosil na posição 3 (anel C) do flavonóide, sendo a xilose diretamente ligada à aglicona canferol. O hidrogênio anomérico (H-1'') de um açúcar diretamente ligado à outra unidade de açúcar terminal foi facilmente evidenciado.

Figura 72 – Expansão do espectro de TOCSY 1D da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD-*d*4, irradiação do sinal em 4,75 ppm, 14,1 T).

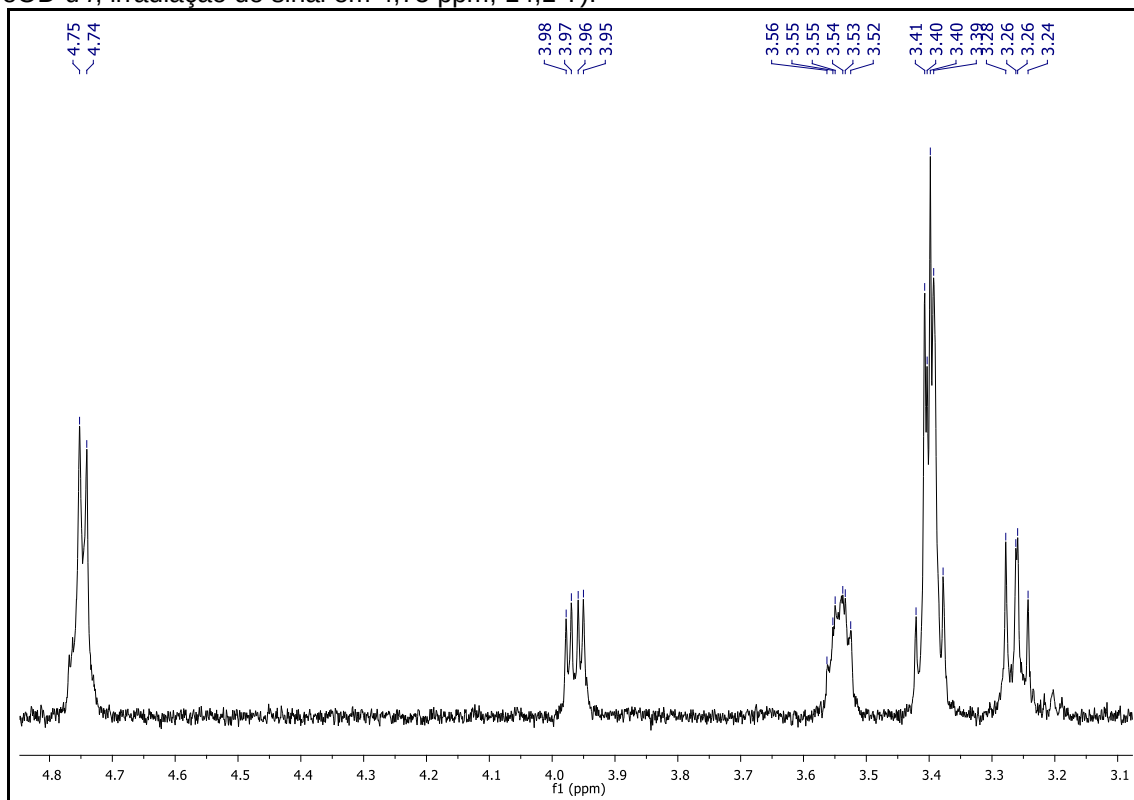


Figura 73 – Expansão do espectro de TOCSY 1D da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas (MeOD-*d*4, irradiação do sinal em 5,36 ppm, 14,1 T).

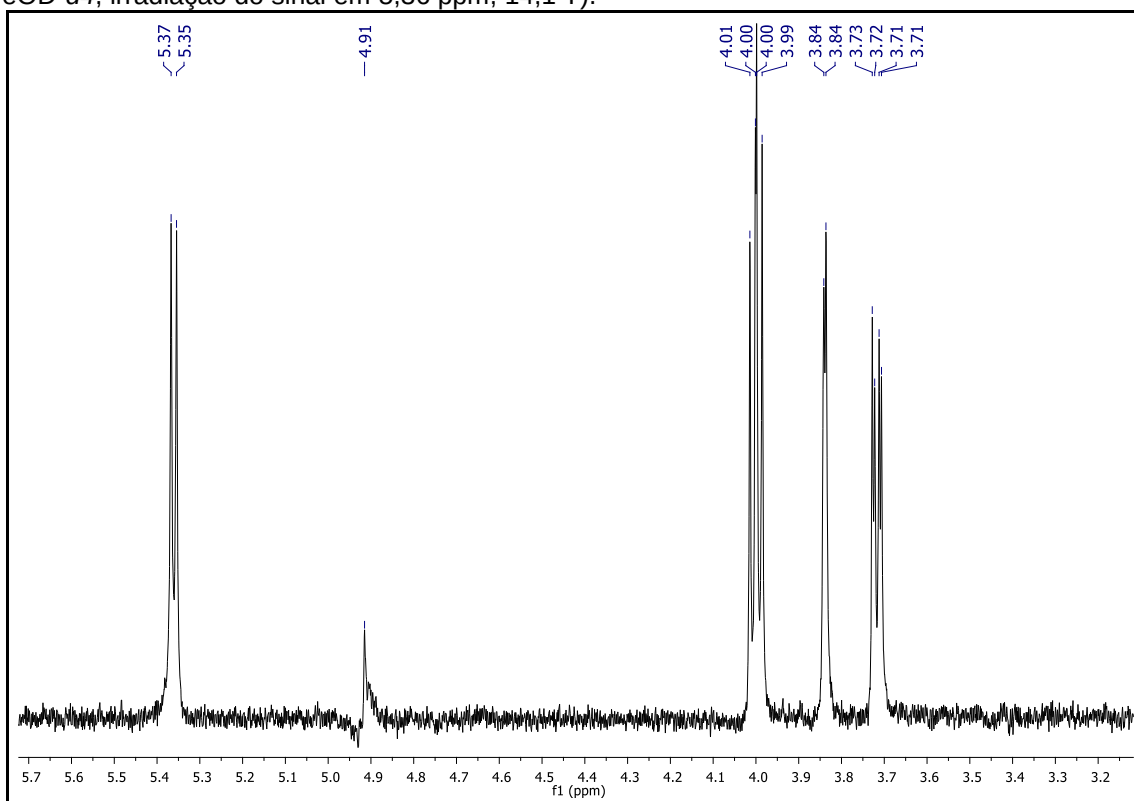


Figura 74 – Expansão do mapa de contorno de HMBC da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas MeOD-*d*4, 14,1 T).

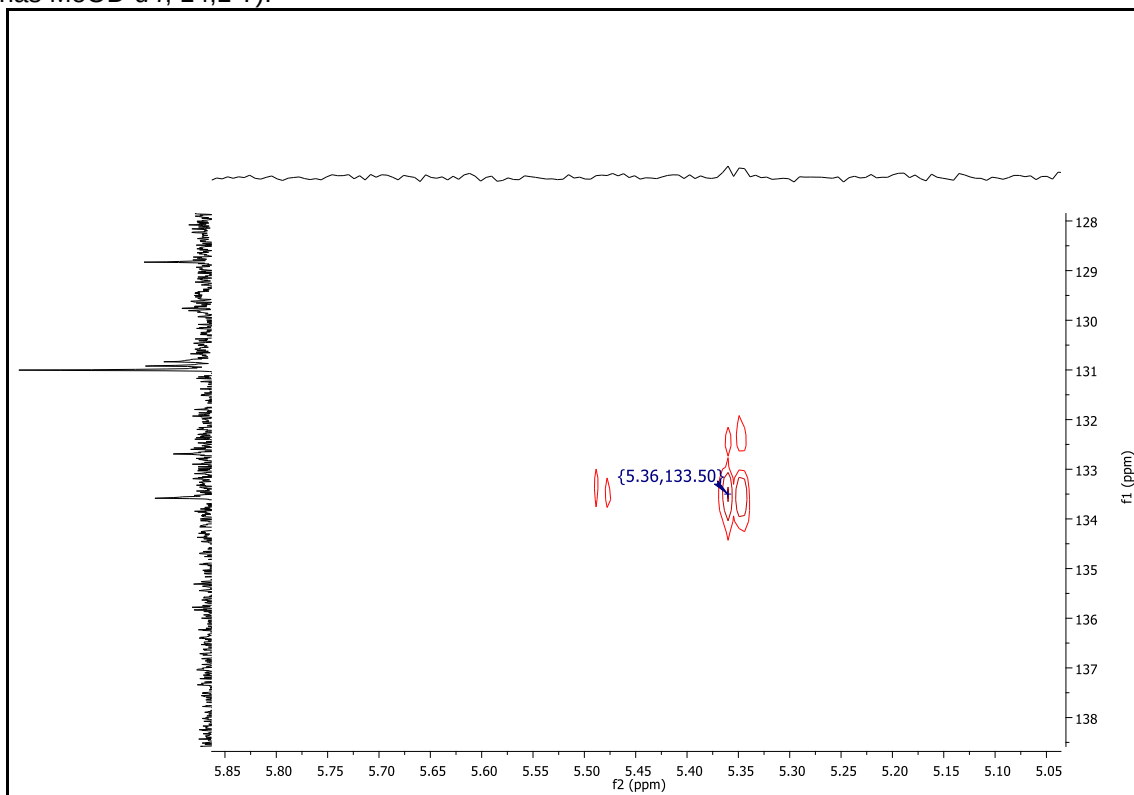


Figura 75 – Expansão do mapa de contorno de HMBC da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas MeOD-*d*4, 14,1 T).

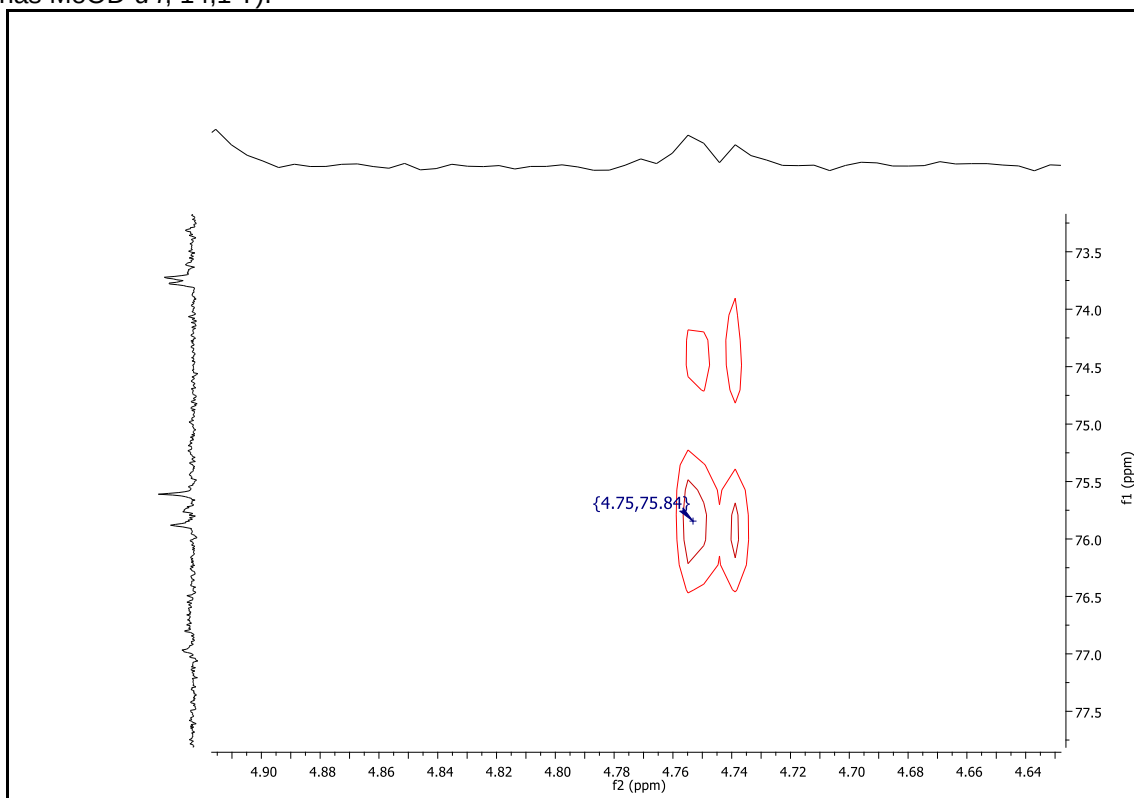
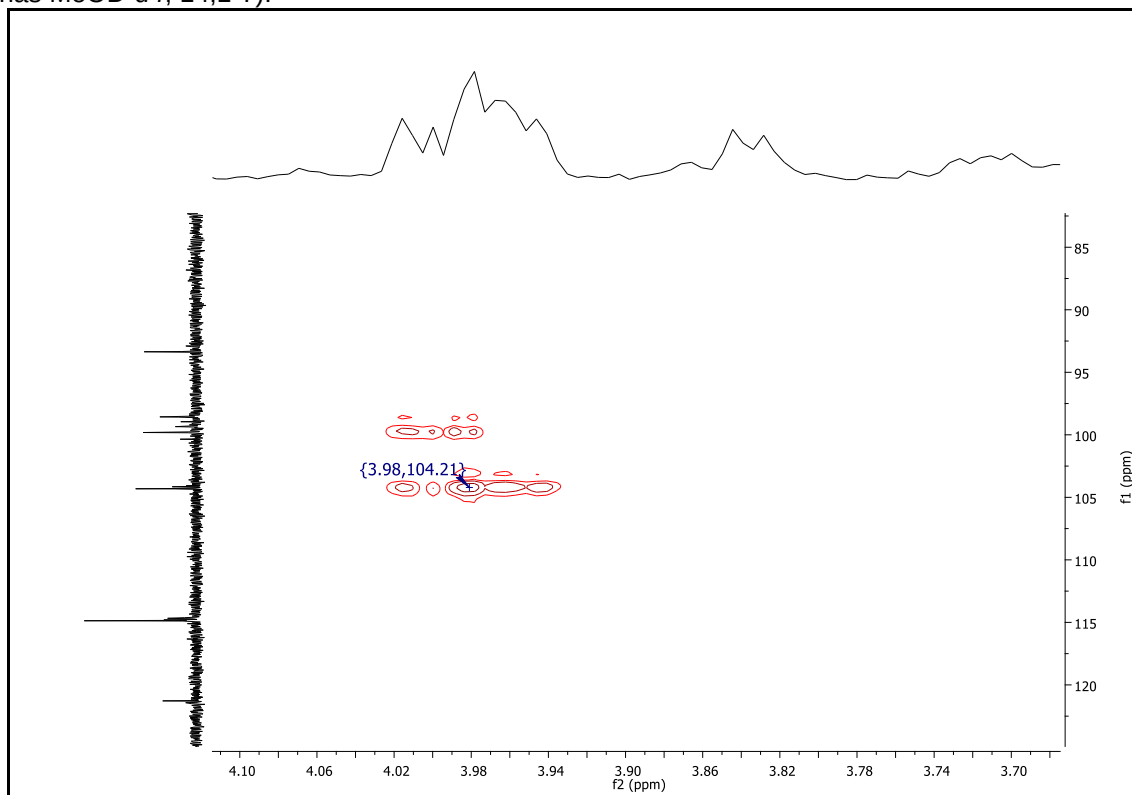


Figura 76 – Expansão do mapa de contorno de HMBC da fração 5 do extrato hidroetanólico das folhas MeOD-*d*4, 14,1 T).



Os dados dos experimentos de RMN comparados com os já descritos na literatura (Tabela 10), permitiram a confirmação da estrutura do flavonol diglicosilado canferol 3-*O*- β -*D*-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopiranosídeo. Os experimentos de EM-IES, tanto em modo positivo como negativo, auxiliaram na confirmação desta substância (Seção 4.6.3.1.2).

4.6.3.1.2 Identificação de canferol 3-*O*- β -*D*-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopiranosídeo por EM-IES

A amostra foi submetida à análise de espectrometria de massas por infusão direta para a identificação do composto majoritário na fração 5, sendo os potenciais ajustados para os modos positivo e negativo (Figuras 77 e 79).

No modo negativo, o íon precursor de m/z 579 $[M-H]^-$ foi previamente selecionado (Figura 78), e é referente ao flavonol de massa molar 580 g/mol, canferol 3-*O*- β -*D*-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopiranosídeo. A fragmentação desse íon precursor gerou o íon produto m/z 285 $[M-294-H]^-$ (Figura 78). Por meio das análises dos íons fragmentos gerados, pode-se propor o esquema de fragmentação apresentado na Figura 82. O íon m/z 285, referente à aglicona canferol, formou-se

devido à perda de duas unidades de açúcares, a xilose e a glicose. Na literatura é reportado que flavonoides 3-O-glicosilados sofrem fragmentação homolítica levando a eliminação dos resíduos glicosídicos. A clivagem homolítica pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles: energia de colisão; padrão de hidroxilação da aglicona; glicosilação nos carbonos C-6 e C-7; padrão de ligação entre a porção 3-O-glicosilada ($1 \rightarrow 2$; $1 \rightarrow 3$; $1 \rightarrow 6$) e acetilação do açúcar terminal (YANG et al., 2013).

Figura 77 - Espectros de massas de primeira ordem, modo negativo *full scan*, da fração 5 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).

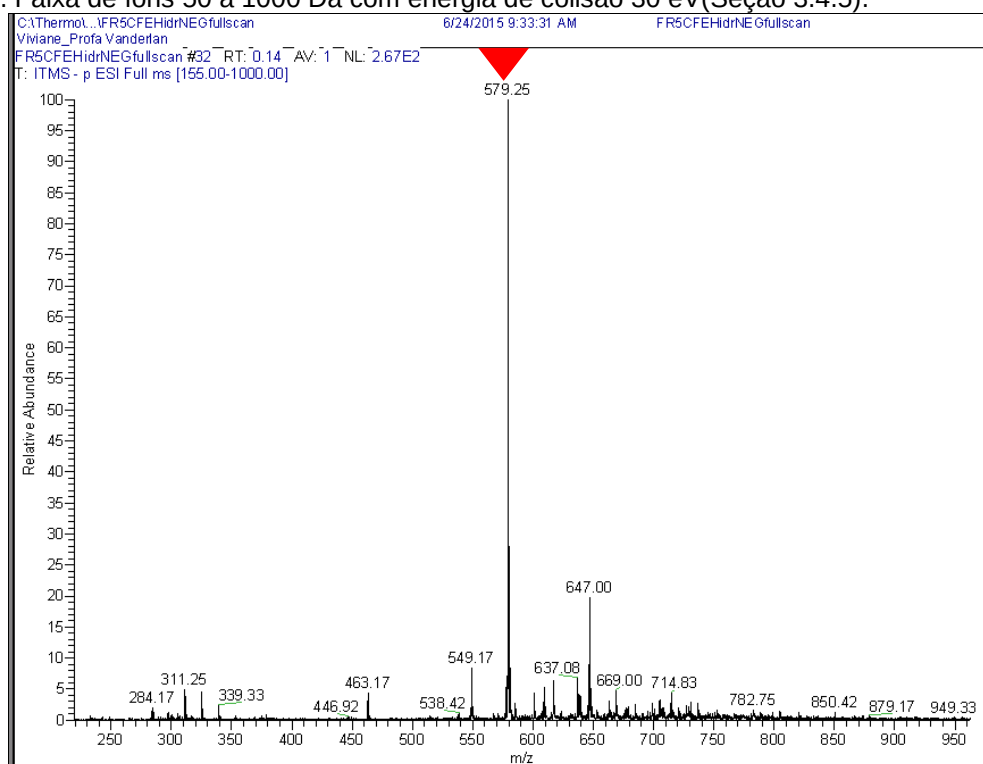
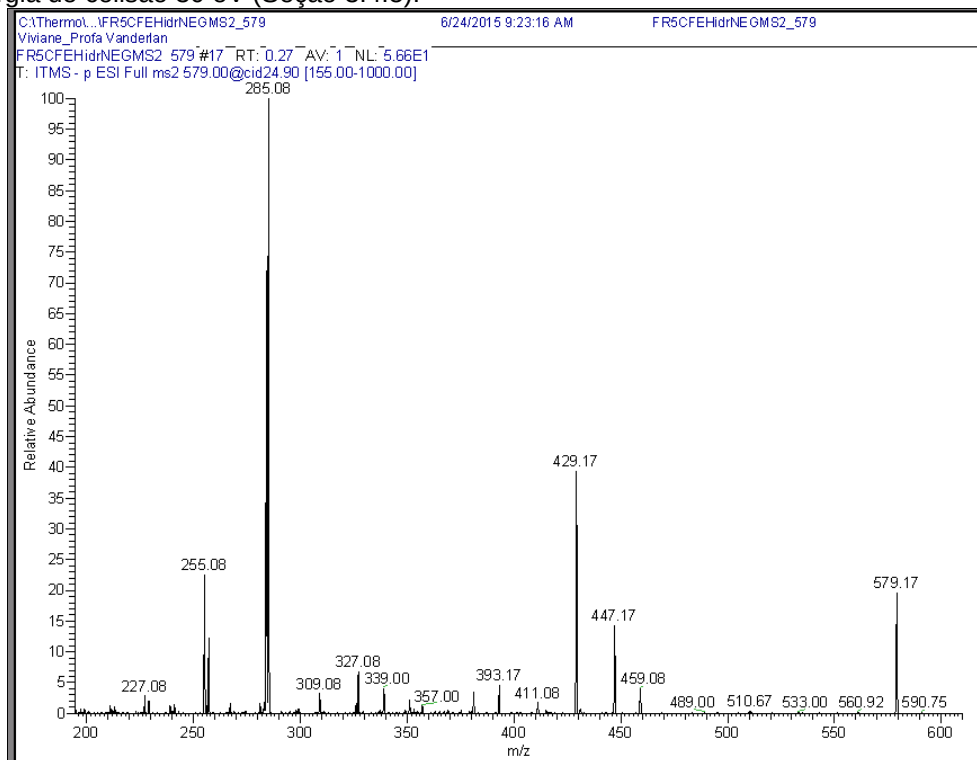


Figura 78 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 579 em modo negativo com energia de colisão 30 eV (Seção 3.4.5).



No modo positivo (Figura 79), o íon precursor de m/z 581 $[M+H]^+$ foi previamente selecionado (Figura 80) e a respectiva fragmentação levou à formação dos íons produtos m/z 449 $[M-132-H]^+$ e m/z 287 $[M-132-162-H]^+$. Por meio da proposta de fragmentação (Figura 81), o íon m/z 449 $[M-132-H]^+$ foi formado devido à perda de uma unidade xilose levando a formação da aglicona canferol ligada à glicose, e m/z 287 $[M-132-162-H]^+$, referente à aglicona devido a perda das duas unidades de açúcar, xilose e glicose. Assim, o íon m/z 449 é formado por meio de uma reação de rearranjo entre as unidades de açúcar. Esta se processa devido à protonação do oxigênio carbonílico da aglicona (C-4) para o monossacarídeo mais externo, devido à instabilidade da ligação entre o átomo de oxigênio e o hidrogênio, levando a perda residual do monossacarídeo interno e, posteriormente, do açúcar mais externo (CARNEVALE NETO, 2014). O íon m/z 287 é formado por meio de uma deslocalização eletrônica no anel C da aglicona canferol em direção ao átomo de oxigênio carbonílico protonado (C-4), e posterior rearranjo dos átomos de hidrogênios pertencentes aos grupos hidroxílicos devido à estereoquímica das ligações glicosídicas (MA et al., 2000)

Figura 79 - Espectros de massas de primeira ordem, modo positivo *full scan*, da fração 5 de CFEHidr. Faixa de íons 50 a 1000 Da (Seção 3.4.5).

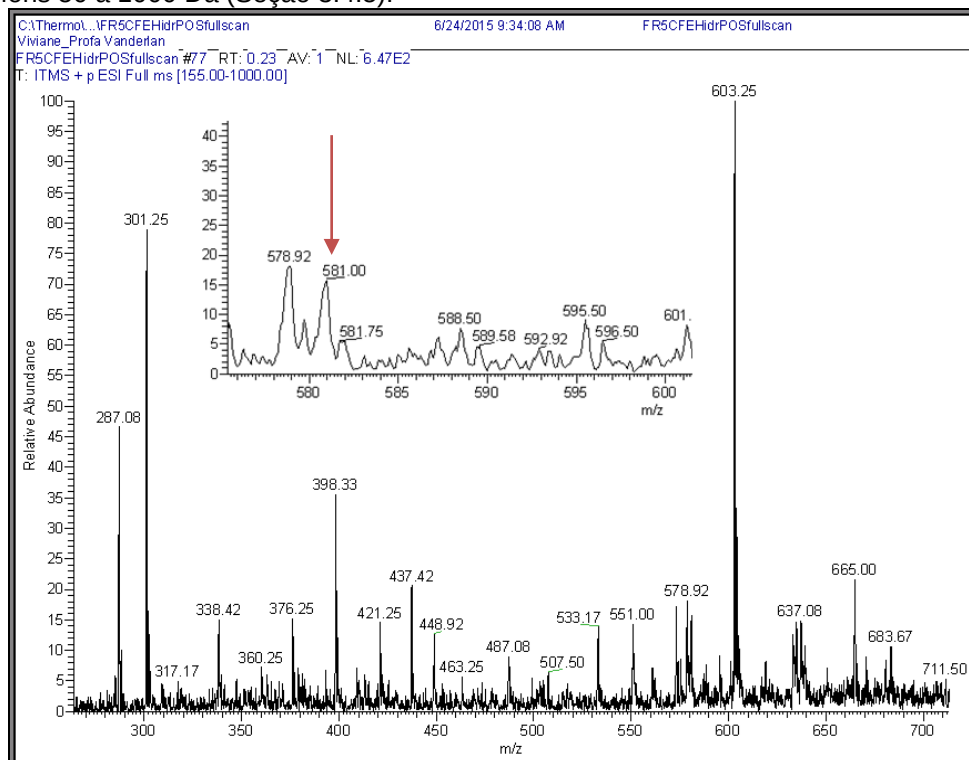
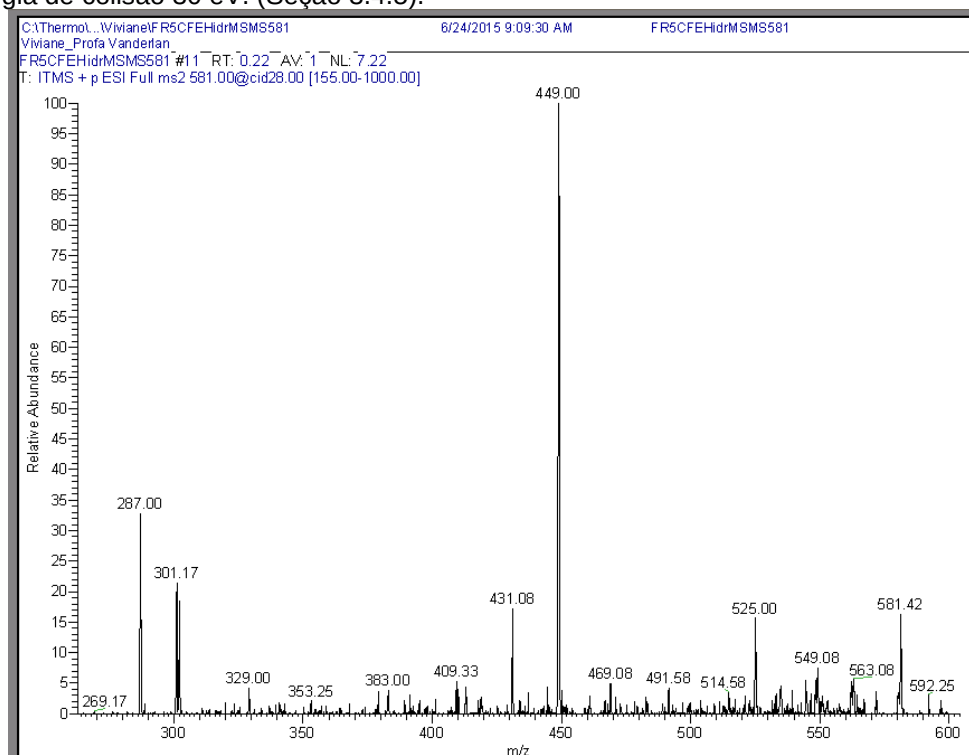


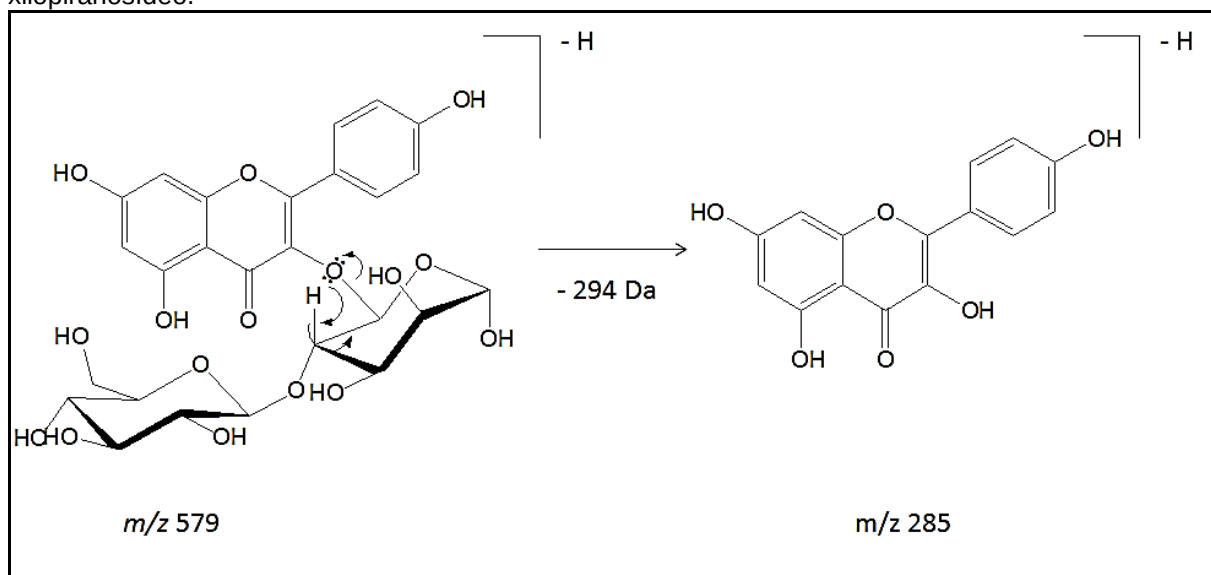
Figura 80 - Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 581 em modo positivo com energia de colisão 30 eV. (Seção 3.4.5).



Essa perda apresentada pelo flavonoide diglicosilado em modo positivo corrobora a proposta de um flavonol do tipo 3-*O*-glicosilado. Portanto, em flavonoides *O*-diglicosilados é comum verificar a perda do açúcar mais interno de início e, posteriormente, a perda do açúcar mais externo, ocorrendo o rearranjo das unidades glicosídicas, quando submetidos à fragmentação em modo positivo devido a baixa energia de colisão empregada, instabilidade da carga positiva em um átomo eletronegativo e mobilidade do hidrogênio, resultando na sequencia do íon $[M+H]^+$. Essa proposta de fragmentação é baseada em estudos da literatura sobre cálculos teóricos na construção de modelos moleculares (HARVEY et al., 2002; MA et al., 2000; CARNEVALE NETO, 2014).

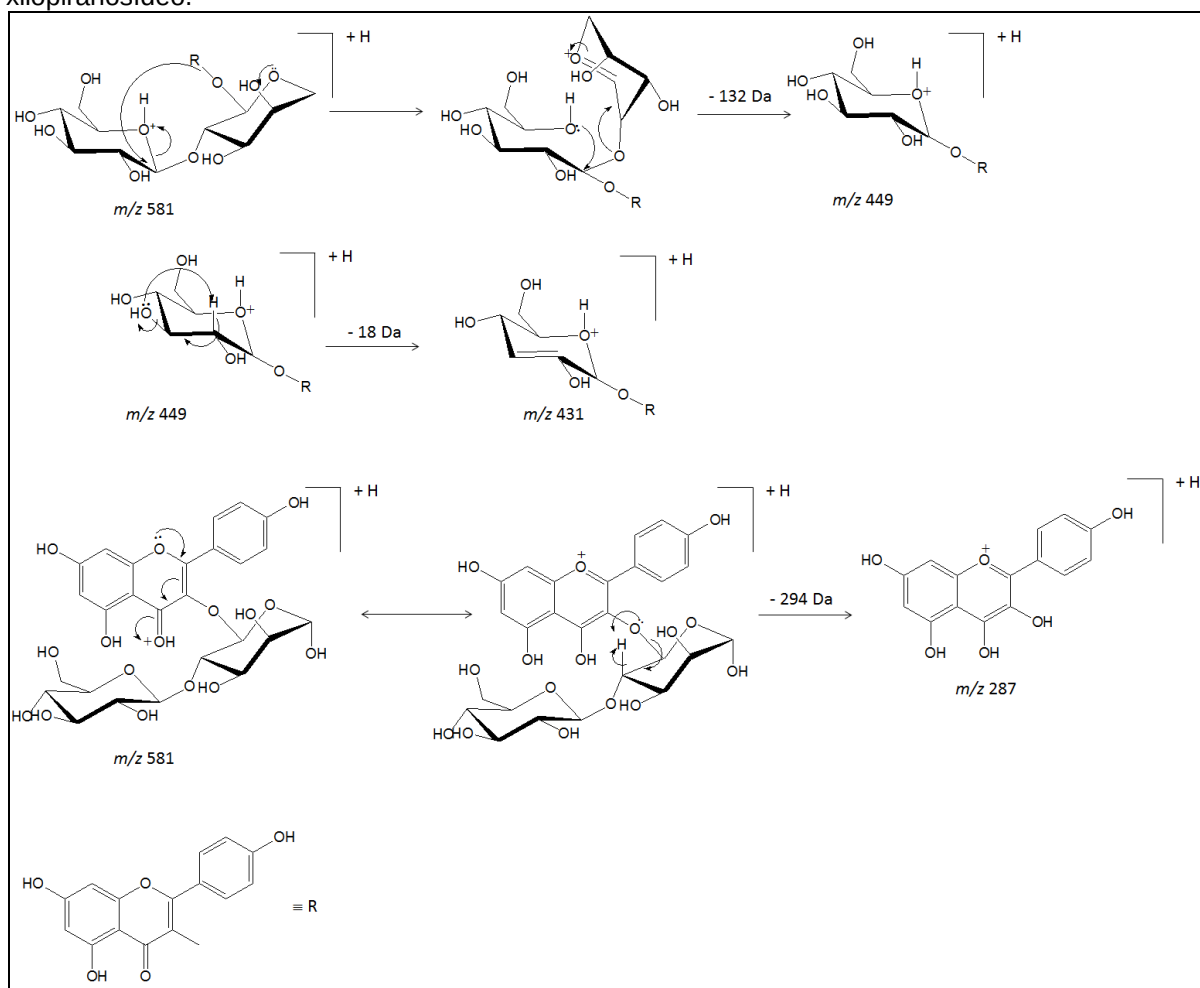
Em estudos de EM-IES deve ser considerado com atenção a presença dos íons gerados e da sequencia de açúcares pertencentes às moléculas, no caso de flavonoides *O*-glicosil-glicosídeos. O rearranjo dos açúcares ocorre e a informação resultante dos dados obtidos corresponde a uma sequencia de monossacarídeos que não pertence à molécula intacta (CUYCKENS et al., 2001; GROTEWOLD, 2006).

Figura 81 - Proposta de fragmentação EM-IES(-) para canferol 3-*O*-β-*D*-glucopiranosil (1→2) β-*D*-xilopiranosídeo.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

Figura 82 - Proposta de fragmentação EM-IES(+) para canferol 3-O-β-D-glucopiranosil (1→2) β-D-xilopiranosídeo.



Fonte: elaborada pela autora, 2016.

O flavonoide 3-O-glicosilado pode ser identificado de forma rápida por meio da técnica de EM-IES, permitindo a apresentação da proposta de fragmentação dessa substância, recentemente descoberta (SHAFEK; SHAFIK; MICHEL, 2012).

Dessa forma, os dados apresentados nos espectros de RMN e EM confirmam a identificação do composto majoritário canferol 3-O-β-D-glucopiranosil (1→2) β-D-xilopiranosídeo. A proposta de fragmentação para este composto está apresentada nas Figuras 81 e 82.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho de investigação científica teve como foco a avaliação das substâncias presentes nos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *C. spruceanum* Benth e da atividade antioxidante dos mesmos, assim como das substâncias encontradas.

Os testes de atividade antioxidante dos extratos demonstraram que os extratos metanólicos e hidroetanólicos de todas as partes selecionadas da planta são os mais ativos, portanto mais indicados para exploração dos dados químicos e biológicos. Os resultados do ensaio do teste de capacidade redutora do radical DPPH[•], em conjunto com as análises via CLAE-DAD e RMN de ¹H foram essenciais no direcionamento dos estudos com os extratos hidroetanólicos, assim como suas respectivas frações. O extrato hidroetanólico de folhas foi escolhido para o estudo de identificação das substâncias presentes devido ao potencial antioxidante apresentado.

As análises de espectrometria de massas contribuíram bastante por serem rápidas e eficientes e fornecerem grande conhecimento sobre a composição química das frações antioxidantes do extrato hidroetanólico de folhas.

Por meio da técnica EM-IES, foi possível identificar na fração B do extrato hidroetanólico de folhas, o ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, uma série homóloga de proantocianidinas (tipo-B) com grau de polimerização de 1 - 4, assim como uma segunda série homóloga de proantocianidinas monoglicosiladas (tipo-B *O*-glicosilada) com grau de polimerização de 1 - 3. As proantocianidinas destas duas séries classificadas foram como [epi]catequinas. Na fração C do extrato hidroetanólico de folhas, o emprego da técnica de CLAE-EM/EM, em conjunto com dados cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos obtidos ao longo da pesquisa, permitiram a identificação das substâncias: ácido 1,4-di-*O-E*-cafeoilquínico, quercetina 3-*O*- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo e canferol 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopiranosídeo.

A utilização das técnicas de RMN, EM-IES, CLAE-UV também permitiram a identificação de quercetina 3-*O*- α -arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6) β -glucopiranosídeo e ácido cafeoilquínico na fração 3, e o derivado de flavonol canferol 3-*O*- β -*D*-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) β -*D*-xilopiranosídeo na fração 5.

As substâncias identificadas pertencem à classe das substâncias fenólicas, as quais mostraram atividades antioxidantes similares às aquelas encontradas em literatura, o que corrobora e justifica a escolha das frações estudadas, assim como do extrato hidroetanólico das folhas que apresentaram atividade promissora no teste biológico executado.

Adicionalmente, as informações colhidas neste estudo fornecem subsídios para a inovação tecnológica visando à ampliação de cosméticos funcionais. Este setor cresce exponencialmente, e o mercado de substâncias antienvhecimento e outros problemas causados por vários fatores externos poderiam abrir uma alternativa no sentido dos estudos serem mais dirigidos às empresas que queiram contribuir para o estudo fitocosmético mais amplo dessa espécie vegetal, uma vez que a mesma foi descrita em relatos da literatura como rejuvenescedora (ZULETA, 2002).

As atividades propostas realizadas contribuíram de forma positiva para continuidade do estudo na busca e identificação das substâncias com potencial antioxidante de *C. spruceanum* Benth.

O presente estudo é de suma importância, uma vez que as substâncias presentes em misturas, e as que foram isoladas, não estão relatadas de forma ampla na literatura. Portanto, a avaliação química e biológica dos extratos das partes aéreas, assim como o estudo fitoquímico biomonitorado do extrato hidroetanólico de folhas de *C. spruceanum* Benth, são bastante úteis para a indústria de cosméticos, já que o desenvolvimento de um cosmético funcional leva em conta produção em larga escala de matéria prima para estudos posteriores visando um cosmético de uma planta comum na região amazônica podendo gerar potenciais bioprodutos cosméticos funcionais.

Os dados obtidos serão cruzados com os em desenvolvimento na L'Oréal Brasil, indústria que está desenvolvendo pesquisa com esta planta visando uma linha de cosméticos naturais. O trabalho experimental corresponde aos objetivos traçados para esta dissertação, mas muito estudo ainda precisa ser feito com a espécie já que os dados anteriores publicados demonstram uma espécie que acumula monoterpenos tipo iridoides e seco-iridoides, enquanto que a espécie desta pesquisa há predominância absoluta de substâncias fenólicas.

REFERÊNCIAS

ABENANTE, S.; CONTALDI, G.; ZAPPATERRA, M.; BOGGIAN, M. Cosmeceutico: cos'è esattamente? **Kosmetica**, p. 46-49, ott. 2009. Disponível em: <http://www.unipro.org/home/it/documenti/rassegna_stamp/2009/2009_1022_5.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2016.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; LIMA, A. R.; FERREIRA, E. B.; MALTA, R. M. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1799-1804, dez. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC no 211, de 14 de julho de 2005**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17882&word=>>>. Acesso em: 18 jan. 2016

ALMEIDA, M. C. Pau-mulato-da-várzea (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.). **Informativo Técnico de Sementes da Amazônia**, n. 6, 2004. Disponível em: <https://www.inpa.gov.br/sementes/iT/6_Pau-mulato-da-varzea.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2015.

ALONSO-CASTRO, A. J.; MIRANDA-TORRES, A. C.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. M.; SALAZAR-OLIVO, L. A. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 458-464, Dec. 2008.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.

ANDRADE JUNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 60-68, fev. 2005. Suppl. 1.

OS ANTIOXIDANTES. **Food Ingredients Brazil**, n. 6, p. 16-23, 2009.

ARRUDA, A. C. Rede de inovação de dermocosméticos na Amazônia: o uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiróba e copaíba. **Parcerias Estratégicas**, v. 14, n. 29, p. 145-172, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE. **Panorama do setor de HPPC**. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2015-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-11ago2015.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2016.

BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos**: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor. 2011. 244 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BARATA, L. E. S. A economia verde: Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 31-35, 2012.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, abr. 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-126, jan. 2006.

BASTOS, D.H; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A.; CUNHA, B. I.; CARVALHO, O. P.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, Mar. 2007.

BECKER, B. K.; ALVES, D.; COSTA, W. (Ed.). **Dimensões humanas da biosfera-atmosfera na Amazônia**. São Paulo: Edusp, 2007. 178 p.

BEHLING, E. V; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. D. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BELINATI, K. D. **Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos**: estudos *in vitro*. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

BERG, M. E. V. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento. Belém: Museu Paraense Emílio Doldi, 1993. 206 p.

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago.1999.

BITTENCOURT, H. von H. ***Calycophyllum spruceanum* no Jardim Botânico carioca**. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.panoramio.com/photo/2587214>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LTW – Food Science Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, June 1995.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393-405, Apr. 2007.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CABRAL, E. C. **Utilização da técnica de fingerprinting por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, set. 2003.

CALLONI, G. Ingredientes sustentáveis e inovações em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 26, n. 3, p. 66-74, maio/jun. 2014.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva *Cabernet sauvignon* (*Vitis vinífera*): parâmetros de processo e modelagem matemática.** 2005. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CARNEVALE NETO, F. **Estudo de espécies de *Chrysobalanaceae* com ação citotóxica: análise metabolômica visando ao entendimento de associações sinérgicas e da complexidade micromolecular.** 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CATARINO, M. D.; SILVA, A. M.; SARAIVA, S. C.; SOBRAL, A. J.; CARDOSO, S. M. Characterization of phenolic constituents and evaluation of antioxidant properties of leaves and stems of *Eriocephalus africanus*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015. In press. doi:10.1016/j.arabjc.2015.04.018.

CERQUEIRA, A. C. de; OLIVEIRA, R. C. R. de.; HONÓRIO, J. B.; MACEDO BERGAMO, F. V de. Comportamento do consumidor de cosméticos: um estudo exploratório. **Revista Formadores: Vivências e Estudos**, v. 6, n. 1, p. 128-157, nov. 2013.

CHU, Y. F.; BROWN, P. H.; LYLE, B. J.; CHEN, Y.; BLACK, R. M.; WILLIAMS, C. E.; CHENG, I. H. Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9801-9808, Oct. 2009.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362-372, May 1999.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821-3832, Apr. 2005.

COSMÉTICOS à base de produtos naturais. [S.l.]: SEBRAE, 2008. (Série mercado). Relatório completo. Disponível em: <http://www.funcex.org.br/material/redemercosul_bibliografia/biblioteca/ESTUDOS_BRASIL/BRA_167.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2016.

COSTA, L. M. da; SANTOS, V. A. dos; OHANA, D. T.; LIMA, E. S.; PEREIRA, M. de M.; SOUZA, T. P. de. Technological development of aqueous extracts from *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) using factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 181-186, Mar. 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, jun. 2009.

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

CUYCKENS, F.; MA, Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAEYSI, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analisis**, v. 28, n. 10, p. 888-895, Dec. 2000.

DAL'BELO, S. E. **Avaliação da eficácia protetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba***. 2008. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DARONCHO, M.; SOLDERA, C.; MARQUES, J.; FIORAVANTE, J. B. Quantificação da atividade antioxidante através de análises pelos métodos DPPH e ABTS. In: SEMINÁRIO DE NUTRIÇÃO DA UNIFRA, 6., 2012, Santa Maria. **Anais...**[S.l.:s.n.], 2012. Disponível em: <<http://www.unifra.br/eventos/seminarionutricao2012/Trabalhos/4392.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

DARTORA, N. **Avaliação dos polissacarídeos e metabolitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

DECCACHE, D. S. **Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea**. 2006. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. West Sussex: Wiley & Sons, 2002. 520 p.

DI STASI, L. C.; HIRUMA C. A. **Plantas medicinais da Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Ed. Unesp, 2002. 604 p.

DIAS, A. S. **O antioxidante quercetina diminui o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos**. 2005. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DIXON, R. A.; XIE, D. Y.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research ?**New Phytologist**, v. 165, n. 1, p. 9-28, Jan. 2005.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, Apr. 2005.

ELST, D. V.; NUYENS, S.; WYK, B. V.; VERSTRAETE, B.; DESSEIN, S.; PRINSEN, E. Distribution of the cardiotoxin pavettamine in the coffee family (Rubiaceae) and its significance for gousiekte, a fatal poisoning of ruminants. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 67, p. 15-19, 2013.

ES-SAFI, N.-E.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; DUCROT, P.-H. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-O-glucosyl- (1→2)-glucoside and luteolin 7-O-glucosyl-(1→2)-glucoside. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 247, n. 1/3, p. 93-100, Dec. 2005.

FARIA J. C. de; TUMA JÚNIOR, P.; COSTA, M. P.; QUAGLIANO, A. P.; FERREIRA M. C. Skin aging collagen. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 50, p. 39-43. 1995.

FEDRIGO, I. H.; BORGIO, A. P.; BAGGIO, F. R.; MUSIAL, D. C.; VALENTINI, S. A. Obtenção de formas cosméticas a partir do extrato aquoso de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 207-212, ago. 2010.

FELIPE, D. F.; BRAMBILLA, L. Z.; PORTO, C.; PILAU, E. J.; CORTEZ, D. A. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15720-15734, Sept. 2014.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997.

FERRO, A. F.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestao & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, Dez. 2006.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, Nov. 2001.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 1, p. 56-64, June 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, jun. 2005.

GARCIA, R.; FURTADO, J. **Estudo da competitividade de cadeias integradas no Brasil**: impactos das zonas de livre comércio. Campinas: UNICAMP-IE-NEIT, 2002. 91 p. Nota técnica final.

GERSHENZON, J.; MABRY, T. J. Secondary metabolites and the higher classification of angiosperms. **Nordic Journal of Botany**, v. 3, n. 1, p. 5-34, Feb. 1983.

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais**. 2007. 254 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI-MSn method. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 333-344, Nov. 2011.

GRANGEIRO, M. S. **Bioprospecção de ação antioxidante de flavonóides em culturas de células gliais tratadas com catecol**. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

GREGÓRIO, L. E. **Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero Mikania (Asteraceae)**. 2008. 233 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

GROTEWOLD, E. (Ed.). **The science of flavonoids**. New York: Springer, 2006. 274 p.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7513-7521, Dec. 2003.

GUEDES, M. O pau mulato é uma das espécies da floresta amazônica. In: FREITAS, D. **Embrapa Amapá desenvolve pesquisas para regeneração natural do pau mulato**.

Brasília, DF, 2015. Foto. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3162581/embrapa-amapa-desenvolve-pesquisas-para-regeneracao-natural-do-pau-mulato>>. Acesso em:

18 jan. 2016.

GUIMARÃES, R.; BARROS L.; DUENAS, M.; CALHELHA, R.C.; CARVALHO, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; QUEIROZ, R.P.M.J.; FERREIRA, I.C.F.R. Infusion and decoction of wild german chamomile: bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 947-954, Jan. 2013.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HARBORNE, J. B. (Ed.). **The flavonoids advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1996. 675 p.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (Ed.). **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. 1203 p.

HARVEY, D. J.; MATTU, T. S.; WORMALD, M. R.; ROYLE, L.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M. "Internal residue loss": rearrangements occurring during the fragmentation of carbohydrates derivatized at the reducing terminus. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 4, p. 734-740, Jan. 2002.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-424, jun. 2004

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

HUNG, T. M.; NA, M.; THUONG, P. T.; SU, N. D.; SOK, D.; SONG, K. S.; BAE, K. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 188-192, Nov. 2006.

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

JANIKUES, A. G. P. R.; LEAL, V. O.; MOREIRA, N. X.; SILVA, A. A. M.; MAFRA, D. Compostos fenólicos e DRC. **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 38, n. 3, p. 322-337, dez. 2013.

KARCHESY, J. J.; FOO, L. Y.; BAROFSKY, E.; ARBOGAST, B.; BAROFSKY, D. F. Negative-ion fast-atom-bombardment mass spectrometry of procyanidin oligomers. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 9, n. 3, p. 313-331, 1989.

KAROU, S. D.; TCHACONDO, T.; ILBOUDO, D. P.; SIMPORE, J. Sub-saharan Rubiaceae: a review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 3, p.149-169, Feb. 2011

KLEIN, C. P. **Mercado verde: as empresas de cosméticos amazônicos**. 2011. 333 f. Tese (Doutorado em Relações Internacionais) - Instituto de Relações Internacionais, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

- KLIGMAN, A. The future of cosmeceuticals: an interview with Albert Kligman. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 7, p. 890-891, Mar. 2005.
- KRENN, L.; MIRON, A.; PEMP, E.; PETR, U.; KOPP, B. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 1/2, p. 11-16, Feb. 2003.
- LI, Q. M.; CLAEYS, M. Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**, v. 23, n. 7, p. 406-416, July 1994.
- LIMA, O. F.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, Set. 2012.
- LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1084-1096, Jan. 2007.
- LIU, L.; SUN, Y.; LAURA, T.; LIANG, X.; YE, H.; ZENG, X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* CJ Tseng. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 35-41, Jan. 2009.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: Instituto Superior Técnico, 2007. 63 p.
- MA, Y. L.; VERDENIKOVA, I.; VAN den HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision induces dissociation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 2, p. 136-144, Feb. 2000.
- MARANHO, A. S.; PAIVA, A. V.; PAULA, S. R. de. Crescimento inicial de espécies nativas com potencial madeireiro na Amazônia, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 37, n. 5, p. 913-921, 2013.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.
- MARRASSINI, C.; ACEVEDO, C.; MIÑO, J.; GORZALCZANY, S. Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 12, p. 1807-1812, Dec. 2010.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.
- MARTUCCI, M. E.; DE VOS, R. C.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *vernonia* schreb. **PLoS One**, v. 9, n. 4, Apr. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0093149.
- MELO, N. C. de. **Avaliação da atividade protetora solar in vitro das espécies pau-mulato (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum) e ipê-amarelo (*Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore)**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2015.

MIGUEL, L. M. **A biodiversidade na indústria de cosméticos**: contexto internacional e mercado brasileiro. 2012. 259 f. Tese (Doutorado em Geografia) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MONGRAND, S.; BADO, A.; PATOUILLE, B.; LAMCOBLEZ, C.; CHAVENT, M.; BESSOULE, J. J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, v. 66, n.5, p. 549-559, Mar. 2005

MONTEIRO, E.; BAUMANN, L. S. A ciência do cosmeceutico: cosmético ou droga? **Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, p. 22-25, ago. 2008

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, out. 2005

MORAIS, S. A. L. D.; AQUINO, F. J. T. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; OLIVEIRA, G. S. D.; CHANG, R.; SANTOS, N. C. D.; ROSA, G. M. Bioactive compounds, acids groups and antioxidant activity analysis of arabic coffee (*Coffea arabica*) and its defective beans from the Brazilian savannah submitted to different roasting degrees. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 198-207, Dec. 2008.

MOUAD, A. M.; PORTO, A. L. M. Uma abordagem química sobre a pele e a biocatálise no desenvolvimento de moléculas antioxidantes de aplicação cosmética. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1642-1660, dez. 2014.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sciences**, v. 80, n. 4, p. 370-377, Sept. 2007.

NASCIMENTO, C. de M.; RIBEIRO, A. Q.; SANT'ANA, L. F. D. R.; OLIVEIRA, R. M. S.; FRANCESCHINI, S. D. C. C.; PRIORE, S. E. Estado nutricional e condições de saúde da população idosa brasileira: revisão da literatura. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 2, n. 2, p. 174-180, 2011.

NEGRETTO, C. M. U. **Transportadores lipídicos nanoestruturados contendo vitamina E**: validação de métodos analíticos e avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2014.

NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of analysis of active compounds in functional foods**. Boca Raton: CRC press, 2012. 956 p.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2: ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474 p.

PAMPÍN, R. M.; SÁEZ, G. V.; LORBER, K. E.; ROMEGIALLI, F. M. (Ed.). **Producción Limpia em la industria de curtiembre**. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela, 2007. 401 p.

PASSOS, C. P.; CARDOSO, S. M.; DOMINGUES, M. R. M.; DOMINGUES, P.; SILVA, C. M.; COIMBRA, M. A. Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. **Food Chemistry**, v. 105, n.4, p. 1457-1467, May 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PLANTAS da Amazônia para a produção cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não madeireiro da Amazônia. Brasília, DF: Universidade de Brasília, Instituto de Química, 2005. 244 p.

PLUMB, G. W.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. **Redox Report**, v. 4, n. 3, p. 123-127, June 1999.

PORTO, P. A. da S.; LARANJINHA, J. A.; FREITAS, V. A. de. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 947-954, Sept. 2003.

POUPARD, P.; SANONER, P.; BARON, A.; RENARD, C. M.; GUYOT, S. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 11, p. 1186-1197, Nov. 2011.

PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate**: composição e possíveis benefícios. 2010. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

QING, L. S.; XUE, Y.; ZHANG, J. G.; ZHANG, Z. F.; LIANG, J.; JIANG, Y.; LIAO, X. Identification of flavonoid glycosides in *Rosa chinensis* flowers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in combination with ^{13}C nuclear magnetic resonance. **Journal of Chromatography A**, v. 1249, p. 130-137, Aug. 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RE, P. V. de; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, abr. 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, N.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, Aug. 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod, 1968. 245 p.

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

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 12, p. 1907-1914, 2007.

ROLIM, M. E. S.; PEREIRA, M. A.; ESKELSEN, M. W. Envelhecimento cutâneo “versus” efeitos do Resveratrol: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 2, n. 1, p. 69-82, 2013.

ROSSETI, R. P. **Determinação total de fenóis em frutos do café**: avaliações em diferentes fases de maturação. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

RUIVO, J. S. P. **Fitocosmética**: aplicação de extratos vegetais em cosmética e dermatologia. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 67-74, nov. 2003.

SANTOS, M. D. dos; ALMEIDA, M. C.; LOPES, N. P.; SOUZA, G. E. P. de. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, Nov. 2006.

SARMENTO, L. A. V. **Obtenção e separação de polifenóis de sementes de cacau por extração supercrítica associada a membranas**. 2007. 103 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, ago. 2004.

SHAFEK, R. E.; SHAFIK, N. H.; MICHAEL, H. N. Antibacterial and antioxidant activities of two new kaempferol glycosides isolated from *Solenostemma Argel* stem extract. **Asian Journal of Plant Scienses**, v. 11, n. 3, p. 143-147, 2012.

SHUI, G.; PENG, L. L. An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, n. 1, p. 17-24, Sept. 2004.

SILVA, A. G. A importância de flavonóides na taxonomia de monocotiledôneas. **Natureza on line**, v. 5, p. 44-47, 2007.

SILVA, M. L.C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, set. 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. 1104 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Envelhecimento**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/doencas/envelhecimento/>>. Acesso em: 07 jan. 2016.

SOUZA, A. J. G.; AGUIAR, E. E.; BATISTA, L. P.; BARBALHO, G. F. **A contribuição da laserterapia de baixa potência (LBP) no tratamento de úlceras de pressão**: uma revisão literária. Disponível em: <<http://www.pergamum.univale.br/pergamum/tcc/Acontribuicaodalaserterapiadebaixapotenci albpnotratamentodeulcerasdepressaoumarevisaoliteraria.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2015.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 2, p. 221-226, dez. 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

STALMACH, A.; MULLE, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. Análise por HPLC "on-line" da atividade antioxidante de compostos fenólicos em café preparado por infusão e filtrado em papel. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 253-262, 2006.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. Envelhecimento cutâneo: teoria dos radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento. **UNINGÁ Review**, n. 1, p. 71-84, 2010.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.18, n. 1, p. 100-105, 2007.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TOMEI, R. R.; SILVA, N. S. da; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Revista UniVap**, v. 14, n. 25, p. 26-31, 2007.

VELLOSA, J. C. R.; REGASINI, L. O.; KHALIL, N. M.; BOLZANI, V. D. S.; KHALIL, O. A.; MANENTE, F. A.; OLIVEIRA, O. M. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, p. 7-20, 2011.

VIEIRA, M. A. S. P.; ARAÚJO, V. S.; NAKAMURA, E. Envelhecimento e fotoenvelhecimento, **Revista Eletrônica Uningá Enfermagem**, n. 1, p. 71-84, Jan. 2008.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010.

WAN, C.; YU, Y.; ZHOU, S.; TIAN, S.; CAO, S. Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynuradivariata* leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 26, p. 101-108, June 2011.

YANG, W. Z.; QUIAO, X.; BO, T.; WANG, Q.; GUO, D. A.; YE, M. Low energy induced hemolytic fragmentation of flavonol 3-O-glycosides by negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 4, p. 385-395, Feb. 2014.

YUAN, L.; ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, B.; LI, A.; GUO, X.; LI, Y. Rapid classification and identification of complex chemical compositions in traditional Chinese medicine based on UPLC-Q-TOF/MS coupled with data processing techniques using the KuDieZi injection as an example. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p. 5210-5217, May 2015.

ZIMMERMANN, B. F. **Proanthocyanidins in barley and malt analyzed by pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and HPLC**. 2005. 75 f. Dissertation (Doktorgrades der MathematikNaturwissenschaft) - Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn, Bonn, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. IN: SIMÕES, C. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTS, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. p. 577-614.

ZULETA, L. M. C. **Estudo químico e bioativo das cascas de *Calycophyllum spruceanum* Benth (Rubiaceae)**. 2002. 231 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

ZULETA, L. M.; CAVALHEIRO, A.; SILVA, D.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C.; ALBURQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 549-553, Sept. 2003.