

VICTOR ALEXANDRE ZONARO

Análise de Estirilpironas de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-MS

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Zonaro, Victor Alexandre
Z87a Análise de estilipironas de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-
MS / Victor Alexandre Zonaro. – Araraquara : [s.n.], 2016
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Alberto José Cavalcheiro

1. Produtos naturais. 2. Cromatografia líquida.
3. Espectrometria de massa. 4. Metabólitos. 5. Etanol.
I. Título.

VICTOR ALEXANDRE ZONARO

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

Araraquara, 20 de dezembro de 2016.

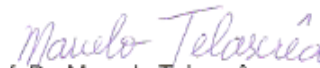
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Cintia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Marcelo Telascrêa
Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas – USC, Bauru

DADOS CURRICULARES

Nome: Victor Alexandre Zonaro

Formação acadêmica

2014 - Atual	Mestrado em Química Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, Brasil. Título: Análise de esterilpironas de <i>Cryptocarya</i> por LC-DAD e LC-MS Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro Bolsista CAPES
2009 - 2014	Bacharelado em Química Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, Brasil. Título: Análise comparativa de açúcares mascavos por LC-DAD, CG-FID e RMN 1H Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

Apresentação de trabalho

Victor Alexandre Zonaro, Alberto José Cavaleiro. Comparative study of secondary metabolites in *Cryptocarya* species by HPLC-DAD.5th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP)/ XXXI RESEM, 2015, Atibaia - SP.

Participação em eventos científicos

1st UNESP NMR Symposium Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research, 2014, Araraquara - SP.

Primeiro encontro online sobre sistemas bioinspirados: Bioinspiration of new technologies, organizado pela The Royal Society, 2015, Araraquara-SP.

5th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP)/ XXXI RESEM, 2015, Atibaia - SP.

Organização de eventos

43° Semana da Química do Instituto de Química da UNESP, 2013.

Outros

Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - Preparação de Amostra. Ministrado pela Allcrom em parceria com Phenomenex, 2015, Araraquara - SP.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e ajuda nos momentos difíceis, pelas comidas gostosas que sempre me esperavam quando voltava para casa, e pelos inúmeros conselhos que valerão para toda a vida.

Aos meus irmãos, que sempre me perguntavam se eu já sabia fazer bombas e coisas do tipo.

À minha namorada, parceira de estudos sempre ao meu lado, me ajudando com longas conversas, não me deixando abalar em situações difíceis e sempre vibrando com minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro pela orientação, amizade, e os puxões de orelha quando necessários.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química, sempre prontos para auxiliar e tirar dúvidas.

Aos alunos do grupo CryCa, sempre ajudando com sugestões e críticas para que o trabalho avançasse.

Ao Mestre João Luiz Bronzel Junior e à Dra. Juliana Rodrigues por todo o auxílio necessário nos laboratórios do NuBBE.

A todos os amigos que ajudaram de variadas formas, sendo com sugestões nas análises dos dados ou com churrascos nos finais de semana.

À CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

RESUMO

As 5,6-diidro-2-pironas 6-substituídas, também conhecidas como estirilpironas, são uma importante classe de metabólitos secundários presentes em plantas. São substâncias biologicamente ativas, apresentando como, por exemplo, atividade anticâncer, antioxidante, antifúngica e antiviral. O gênero *Cryptocarya*, pertence à família Lauraceae e apresenta diversas estirilpironas em suas mais diversas partes: folhas, cascas, sementes e raízes. Foram selecionadas para análise as espécies *C. mandioccana*, *C. moschata* e *C. botelhensis*. Foram utilizadas apenas as folhas, por apresentarem facilidade para coleta e abundância. Este trabalho tem como objetivo a identificação das estirilpironas presentes em três espécies brasileiras de *Cryptocarya* com o uso das técnicas HPLC-DAD-MS. Foi desenvolvido método cromatográfico para análise do extrato hidroalcoólico das folhas de espécies de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-MS utilizando etanol como fase orgânica na fase móvel. Com os espectros no UV foi possível identificar que as classes de metabólitos presentes nas amostras eram alcaloides, flavonoides e estirilpironas. Utilizando os dados de MS e MS/MS, foi possível a caracterização de estirilpironas presentes nos extratos, assim como a sugestão de suas fragmentações por espectrometria de massas, além da identificação dos íons m/z 163 e m/z 189 característicos da fragmentação das estirilpironas. Foi detectado o íon m/z 423 no extrato de *C. moschata*, referente a um possível dímero da goniotalamina, sem relato anterior para as espécies de *Cryptocarya*. Com o auxílio de pironas purificadas obtidas pelo grupo, foi possível a comparação de seus tempos de retenção com os dados obtidos a partir dos extratos de folhas das espécies de *Cryptocarya* ajudando na identificação das substâncias presentes. Além das estirilpironas, foram identificados os alcalóides menisperina e xantoplanina nas três espécies estudadas. Nota-se uma grande diferença na quantidade de metabólitos entre as espécies analisadas, sendo que a *C. mandioccana* é a mais rica em estirilpironas.

Palavras-chave: Lauraceae. HPLC-DAD. HPLC-MS. Etanol. Espectrometria de massas. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The 6-substituted 5,6-dihydro-2-pyrones, also known as styrylpyrones, are an important class of secondary metabolites present in plants. They are biologically active substances, presenting, for example, anticancer, antioxidant, antifungal and antiviral activity. The genus *Cryptocarya* belongs to the family Lauraceae and presents several styrylpyrones in its most diverse parts: leaves, barks, seeds and roots. The species *C. mandioccana*, *C. moschata* and *C. botelhensis* were selected for analysis. We chose to use only leaves, because they are easy to collect and abundant. The objective of this work is to identify the styrylpyrones present in three Brazilian *Cryptocarya* species using the HPLC-DAD-MS techniques. A chromatographic method was developed to analyze the hydroalcoholic extract from leaves *Cryptocarya* species by HPLC-DAD-MS using ethanol as the organic solvent in the mobile phase. With the UV spectra were possible to identify the classes of metabolites present in the samples as alkaloids, flavonoids and styrylpyrones. Additionally, with the MS and MS² data, was possible to characterize the styrylpyrones present in the extracts, as well as the suggestion of their fragments by mass spectrometry, in addition to the identification of ions m/z 163 and m/z 189 characteristics of the fragmentation of styrylpyrones. The m/z 423 ion detected in *C. moschata* extract was tentatively attributed to a goniotalamine dimer, with no previous reports for *Cryptocarya* species. With the help of purified pyrones obtained by the group, it was possible to compare their retention times with the data obtained from leaf extracts of the *Cryptocarya* species, helping to identify the substances present. Besides the styrylpyrones, the alkaloids menisperin and xantoplanin were also identified in the three species studied. There is a great difference in the amount of metabolites among the analyzed species, with *C. mandioccana* being the richest in styrylpyrones.

Key-words: Lauraceae. HPLC-DAD. HPLC-MS. Ethanol. Mass spectrometry. Secondary metabolite.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 LAURACEAE	9
1.2 CRYPTOCARYA	10
1.2.1 <i>CRYPTOCARYA MANDIOCCANA</i>	12
1.2.2 <i>CRYPTOCARYA MOSCHATA</i>	16
1.2.3 <i>CRYPTOCARYA BOTELHENSIS</i>	19
1.3 ESTIRILPIRONAS DE CRYPTOCARYA	21
1.4 BIOSÍNTESE DE ESTIRILPIRONAS	25
2 OBJETIVOS	29
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
3.1 COLETA	30
3.2 PRODUÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>C. MANDIOCCANA</i>	30
3.3 PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS	31
3.5 PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR HPLC-DAD	33
3.6 AJUSTES NO GRADIENTE CROMATOGRÁFICO	34
3.7 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR HPLC-MS E HPLC-MS/MS	35
3.8 ANÁLISE DE PADRÕES DE PIRONA	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 ANÁLISES PRELIMINARES POR HPLC-DAD E ESTUDO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS USANDO PLANEJAMENTO MULTIFATORIAL	37
4.2 AJUSTES DO GRADIENTE CROMATOGRÁFICO	47
4.3 ANÁLISE DOS ESPECTROS NO ULTRAVIOLETA OBTIDOS POR HPLC-DAD	52
4.4 ANÁLISE POR HPLC-MS	55
4.5 ANÁLISE DE PADRÕES DE PIRONA	75
5 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	82
ANEXO	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lauraceae

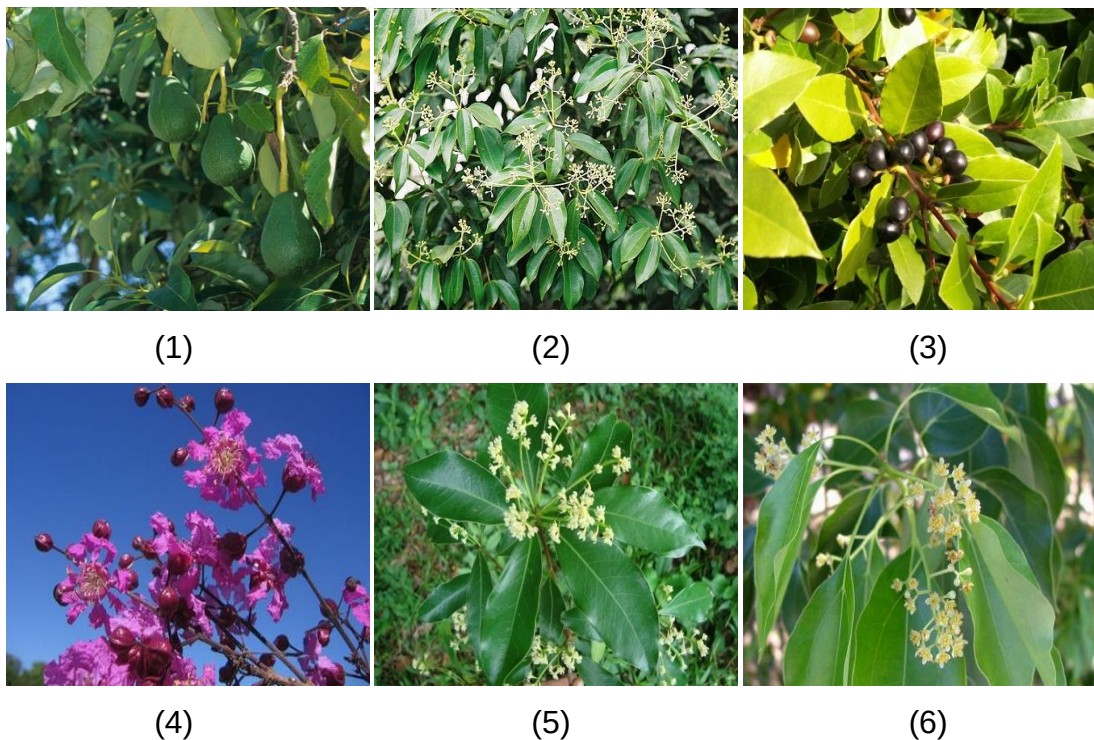
A família Lauraceae, distribuída em 52 gêneros com 2500 - 3500 espécies é predominantemente composta por árvores e arbustos (MORAES, 2007). Apresenta distribuição pantropical, apesar de certas espécies serem restritas a regiões subtropicais e outras encontradas em clima temperado. Famosa por sua difícil identificação, que deve ser realizada apenas por especialistas (MADRINÁN, 2004).

A dificuldade referente a identificação e classificação das Lauraceae apresenta como um fator a baixa quantidade de trabalhos e dissertações sobre genética de populações de espécies brasileiras da família, sendo encontrados apenas trabalhos desenvolvidos através de isoenzimas para espécies de *Cryptocarya*, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Ocotea porosa* (Ness & Mart.) Barroso e *Ocotea catharinensis* Mez (SILVA, 2014)

O número estimado de espécies neotropicais encontra-se entre 700 e 800, divididas em 31 gêneros (van der Werff, 1988, 1991), dos quais 24 são encontrados no Brasil (439 espécies) (QUINET et al., 2014), fazendo parte da composição da Mata Atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica (MORAES, 2007).

As Lauraceae apresentam importância econômica em todo o mundo, como exemplo o abacate, a canela e o louro, (*Persea americana* Mill., *Cinnamomum verum* Presl. e *Laurus nobilis* L. respectivamente), que são utilizados amplamente na alimentação. As cascas e frutos de algumas espécies são utilizadas para o preparo de condimentos ou chás. Do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) e da canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.)) são extraídas substâncias aromáticas para o uso em perfumaria, além do uso da cânfora (*Cinnamomum camphora* L.), tanto na medicina popular, quanto na industrial (RIBEIRO et al., 1999). Essas espécies são apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Espécies de Lauraceae economicamente importantes: (1) abacate (*Persea americana*), (2) canela (*Cinnamomum verum*), (3) louro (*Laurus nobilis*), (4) pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), (5) canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*), (6) cânfora (*Cinnamomum camphora*).



Fontes: (1) ROBERTSON (2016), (2) SCAMPERDELE(2009), (3) PLANTS RESCUE (2016), (4) PEDROSO (2011), (5) VERDI (2010), (6) NAVIE (2016).

No Brasil, espécies de Lauraceae conhecidas pelos nomes vulgares de canelas, louros, pau-rosa, imbuías e itaúbas são destacadas por diversos autores por apresentarem as mais diversas formas de uso, como por exemplo: fornecimento de madeira para variados fins, extração de óleos essenciais, uso por populações indígenas, reflorestamento, repelentes de insetos, alimentação de aves e mamíferos e arborização urbana (BARBOSA; BAITELLO; MORAES., 2012).

1.2 *Cryptocarya*

O gênero *Cryptocarya* é um dos maiores pertencentes a família Lauraceae. Apresenta distribuição pantropical, sendo encontrado na América do Sul, África do Sul, Madagascar, Ásia e Oceania. O gênero é composto por aproximadamente 350 espécies, sendo que por volta de 18 são neotropicais, com sua maioria presente no

Brasil, principalmente na região sul (Figura 2), mas encontradas também no Chile, Floresta Amazônica, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Bolívia, Venezuela, Equador, Costa Rica e Peru (MORAES, 2007).

Figura 2 - Distribuição das espécies de *Cryptocarya* encontradas no Brasil.



Fonte: Moraes (2007).

Em revisão do gênero *Cryptocarya* realizada por Moraes (2007), são descritas 13 espécies presentes no Brasil: *Cryptocarya aschersoniana* Mez, *Cryptocarya botelhensis* P. L. R. de Moraes sp. nov., *Cryptocarya citrifomis* (Vellozo) P. L. R. de Moraes, *Cryptocarya guianensis* Meissner, *Cryptocarya mandioccana* Meissner, *Cryptocarya micrantha* Meissner, *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees, *Cryptocarya riedeliana* P. L. R. de Moraes, sp. nov., *Cryptocarya saligna* Mez, *Cryptocarya sellowiana* P. L. R. de Moraes sp. nov., *Cryptocarya subcorymbosa* Mez, *Cryptocarya velloziana* P. L. R. de Moraes sp. nov. e *Cryptocarya wiedensis* P. L. R. de Moraes sp. nov.

Após publicação da revisão taxonômica das espécies de *Cryptocarya* presentes no Brasil produzida por Moraes (2005), os nomes *Cryptocarya moschata* Ness & Mart e *Cryptocarya aschersoniana* Mez, previamente utilizados por Cavalheiro e Yoshida (2000), Pascoli (2001), Nehme (2001), Nehme, Moraes e

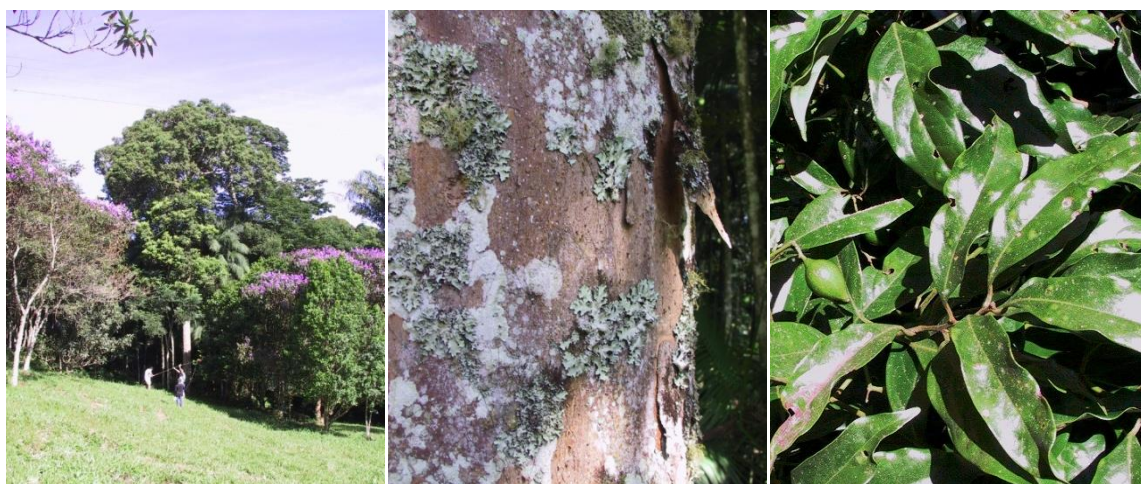
Cavalheiro (2002), Bastos (2003), Mantovani (2004), Nehme e colaboradores (2005), foram alterados para *Cryptocarya mandioccana* Meisn. e *Cryptocarya moschata* Ness & Mart respectivamente (CAMARGO, 2008).

Variadas espécies de *Cryptocarya* têm sido estudadas com foco em sua fitoquímica e farmacologia, contudo, levantamento realizado com as 13 espécies presentes no Brasil indicou que existem estudos químicos de apenas quatro delas: *C. botelhensis*, *C. mandioccana*, *C. moschata* e *C. saligna*.

1.2.1 *Cryptocarya mandioccana*

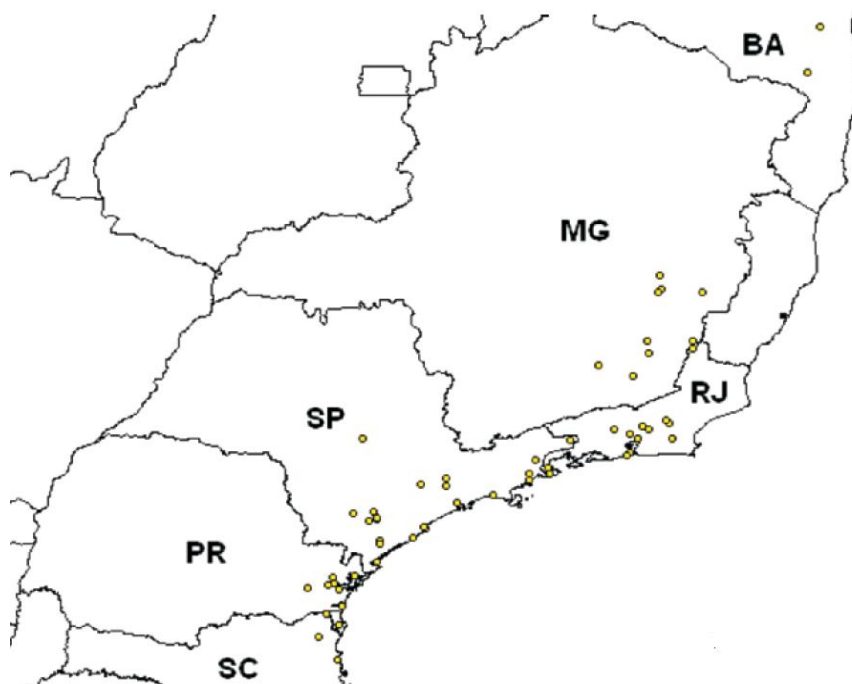
A *C. mandioccana*, espécie arbórea que atinge até 35 metros de altura, apresenta variados nomes populares, entre eles noz-moscada-brasileira, cajati, canela-de-porco e canela-fogo (Figura 3). A espécie é encontrada no Brasil nos estados da Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Figura 4). Seu fruto apresenta sabor e aroma característico, sendo carminativo e ajudando na digestão, além de poder ser usado como um substituto da noz-moscada. As cascas podem ser usadas contra cólicas e diarreia. O chá de suas sementes é utilizado pelos caiçaras contra dor de estomago, além de folhas esmagadas misturadas com água contra dores e cólicas (MORAES, 2007).

Figura 3: *Cryptocarya mandioccana* encontrada no Parque Estadual Carlos Botelho.



Fonte: Acervo pessoal Prof. Dr. Alberto J. Cavalheiro.

Figura 4 - Distribuição da *C. mandioccana* no Brasil.



Fonte: Moraes (2007).

Cavalheiro e Yoshida (2000) relataram o isolamento e identificação de 13 estilipironas dos extratos de galhos e cascas do tronco de *C. mandioccana*: goniotalamina **(1)**, criptofoliona **(2)**, criptomoscatoana D1 **(3)**, criptomoscatoana D2 **(4)**, criptomoscatoana E1 **(5)**, criptomoscatoana E3 **(6)**, criptomoscatoana F1 **(7)**, criptopiranomoscatoana A1 **(8)**, criptopiranomoscatoana A2 **(9)**, criptopiranomoscatoana A3 **(10)**, criptopiranomoscatoana B1 **(11)**, criptopiranomoscatoana B2 **(12)**, e criptopiranomoscatoana B4 **(13)**.

Análises realizadas utilizando a polpa de frutos verdes possibilitaram o isolamento do flavonol 5-hidróxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol **(14)**, além de duas estilipironas inéditas: (+)-(6*R*)-[(2'*R**)-6'-fenil-2'-hidroxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona **(15)** e (+)-(6*R*)-[(2'*S**)-6'-fenil-2'-hidroxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona **(16)**, além de quatro outras estilipironas já relatadas, criptofoliona **(2)**, criptomoscatoana D1 **(3)**, criptomoscatoana E3 **(6)** e criptomoscatoana F1 **(7)**. Dentre os metabólitos isolados, a estilipirona (+)-(6*R*)-[(2'*S**)-6'-fenil-2'-hidroxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona **(16)** apresentou atividade fraca, mas seletiva, quando submetida a bioensaio específico com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, inibindo as linhagens Rad 6, Rad 52Y e RS 321N (PASCOLI, 2001). Ainda dos frutos, foi isolado o ácido moscático **(17)** (MANTOVANI, 2004).

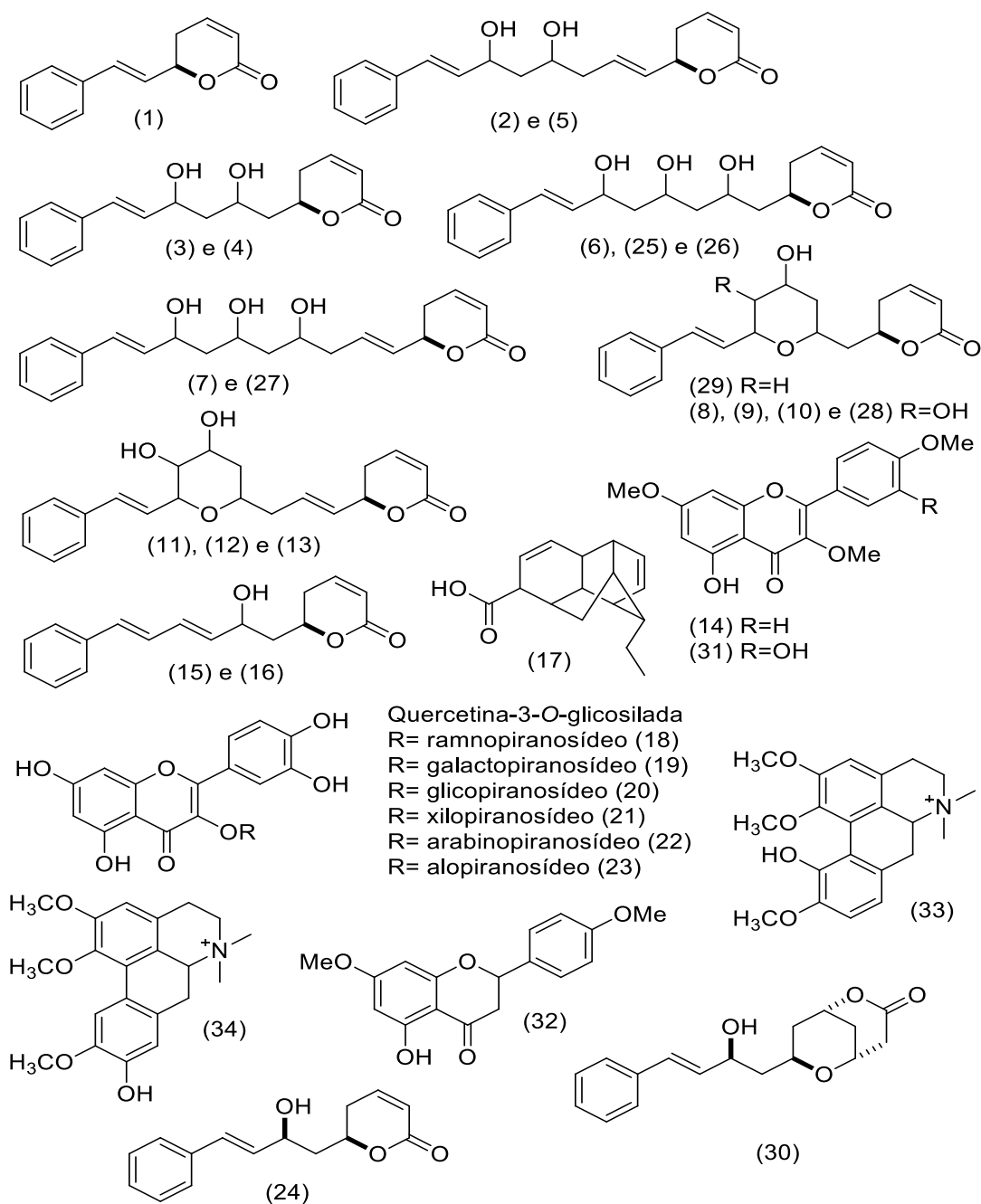
Nehme e colaboradores (2002) identificaram como principais constituintes de extratos das folhas de *C. mandioccana* o flavonóide quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **(18)**, e as estilipironas criptomoscatoa D2 **(4)** e criptofoliona **(2)**. Com novas análises ainda com as folhas, Nehme e colaboradores (2005) isolaram os flavonóides glicosilados quercetina-3-O-galactopiranosídeo **(19)**, quercetina-3-O-glicopiranosídeo **(20)**, quercetina-3-O-xilopiranosídeo **(21)**, quercetina-3-O-arabinopiranosídeo **(22)** e quercetina-3-O-alopiranosídeo **(23)**, além das estilipironas criptomoscatoa E3 **(6)**, criptomoscatoa D1 **(3)**, criptomoscatoa D2 **(4)**, criptomoscatoa F1 **(7)**, desacetilcriptocarialactona **(24)**, criptomoscatoa E1 **(5)**, criptofaliona **(2)** e goniotalamina **(1)**.

Continuando os estudos das folhas de *C. mandioccana*, Telascrêa (2006) isolou as estilipironas criptofoliona **(2)**, criptomoscatoa D2 **(4)**, desacetilcriptocarialactona **(24)**, criptomoscatoa Ea **(25)**, criptomoscatoa Eb **(26)**, criptomoscatoa Fa **(27)**, criptopiranomoscatoa A3 **(10)**, criptopiranomoscatoa Ax **(28)**, criptopiranomoscatoa B2 **(12)**, criptopiranomoscatoa B4 **(13)**, criptopiranomoscatoa X **(29)**, MT2 **(30)** e os flavonóides quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **(18)**, 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol **(14)**, 5,3'-diidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavonol **(31)** e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona **(32)**. As substâncias **(2)**, **(24)**, **(25)**, **(26)** e **(27)** apresentaram atividade contra os fungos fitopatógenos dos tipos *Cladosporium cladoporioides* e *C. sphaerospermum*. Nos testes de atividade antiproliferativa (*in vitro*) em linhagens celulares cancerígenas, a substância **(4)** apresentou atividade significativa contra a linhagem 786-0 (renal), a substância **(24)** contra as linhagens UACC-62 (melanoma) e NCI-ADR/RES (mama resistente) e a substância **(30)** contra a linhagem UACC-62 (melanoma) (TELASCREÂ, 2006).

A partir das folhas de *C. mandioccana*, Camargo (2008) isolou menisperina **(33)**, xantoplanina **(34)**, quercetina-3-O-galactopiranosídeo **(19)**, quercetina-3-O-glicopiranosídeo **(20)**, quercetina-3-O-xilopiranosídeo **(21)**, quercetina-3-O-arabinopiranosídeo **(22)**, quercetina-3-O-alopiranosídeo **(23)**, quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **(18)**, criptomoscatoa E3 **(6)**, criptomoscatoa D1 **(3)**, criptomoscatoa F1 **(7)**, desacetilcriptocarialactona **(24)** e criptomoscatoa E1 **(5)** (CAMARGO, 2008).

Todas as substâncias isoladas da *C. mandioccana* são apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Substâncias isoladas das folhas, galhos, cascas do tronco e frutos verdes de *C. mandioccana*, * indica configuração relativa.



	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	16	25	26	27	28
C2'	-	R*	S*	-	S*	-	S*	S*	S*	-	-	-	R*	S*	R*	R*	-	R*
C4'	S*	R*	R*	R*	R*	S*	R*	S*	R*	S*	S*	S*	-	-	S*	R*	R*	S*
C5'	-	-	-	-	-	-	S*	S*	R*	-	-	-	-	-	-	-	-	R*
C6'	R*	-	-	R*	R*	R*	R*	R*	R*	R*	S*	R*	-	-	S*	S*	S*	R*
C7'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S*	S*	R*	-	-	-	-	-	-
C8'	-	-	-	-	-	R*	-	-	-	R*	R*	S*	-	-	-	-	S*	-

Fonte: Autor.

1.2.2 *Cryptocarya moschata*

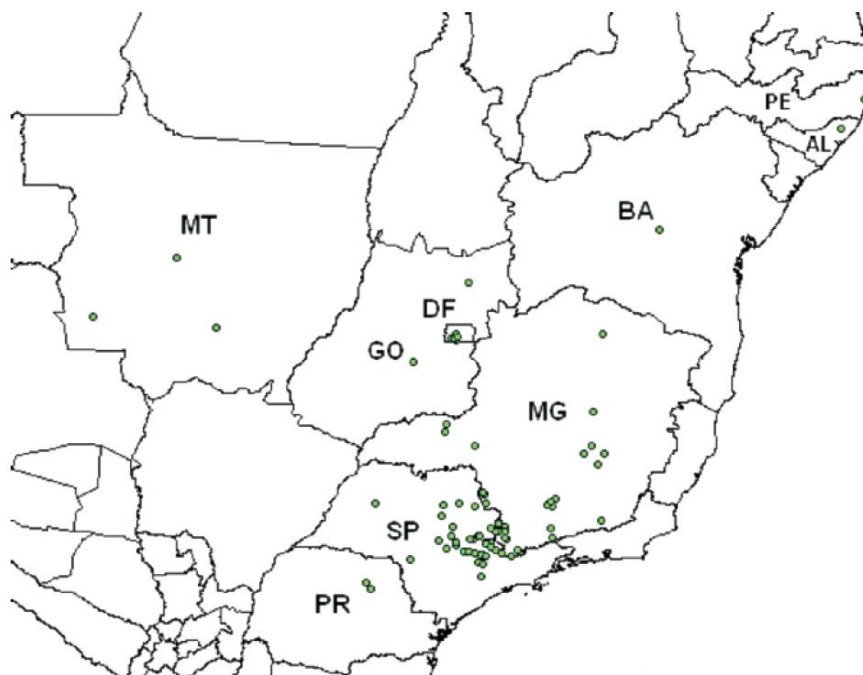
Espécie arbórea que atinge até 35 metros, a *C. moschata* apresenta diversos nomes populares, como canela-batalha, louro-precioso e canela-de-papagaio (Figura 6). A espécie é encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, São Paulo (Figura 7). O extrato bruto de suas folhas e caules apresentaram atividade antiproliferativa. A espécie também é indicada para plantios mistos em recuperação de áreas degradadas e na recuperação das margens de reservatórios de hidrelétricas (MORAES, 2007).

Figura 6: *Cryptocarya moschata* encontrada na Mata "Mariana", em Ibaté-SP.



Fonte: Telascêa (2006).

Figura 7 - Distribuição da *C. moschata* no Brasil.



Fonte: Moraes (2007).

Spencer, England e Wolf (1984) isolaram das sementes de *Cryptocarya moschata* as estirilpironas (-)-criptocarialactona **(35)** e (-)-desacetilcriptocarialactona **(24)**.

Das folhas de *C. moschata*, Bastos (2003) isolou seis flavonóides e duas estirilpironas: quercetina-3-O-ramnopiranosídeo **(18)**, quercetina-3-O-galactopiranosídeo **(19)**, quercetina-3-O-glicopiranosídeo **(20)**, quercetina-3-O-xilopiranosídeo **(21)**, quercetina-3-O-arabinofuranosídeo **(36)**, quercetina-3-O-6"-acetilalopiranosídeo **(37)**, goniotalamina **(1)** e 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona **(43)** (BASTOS, 2003).

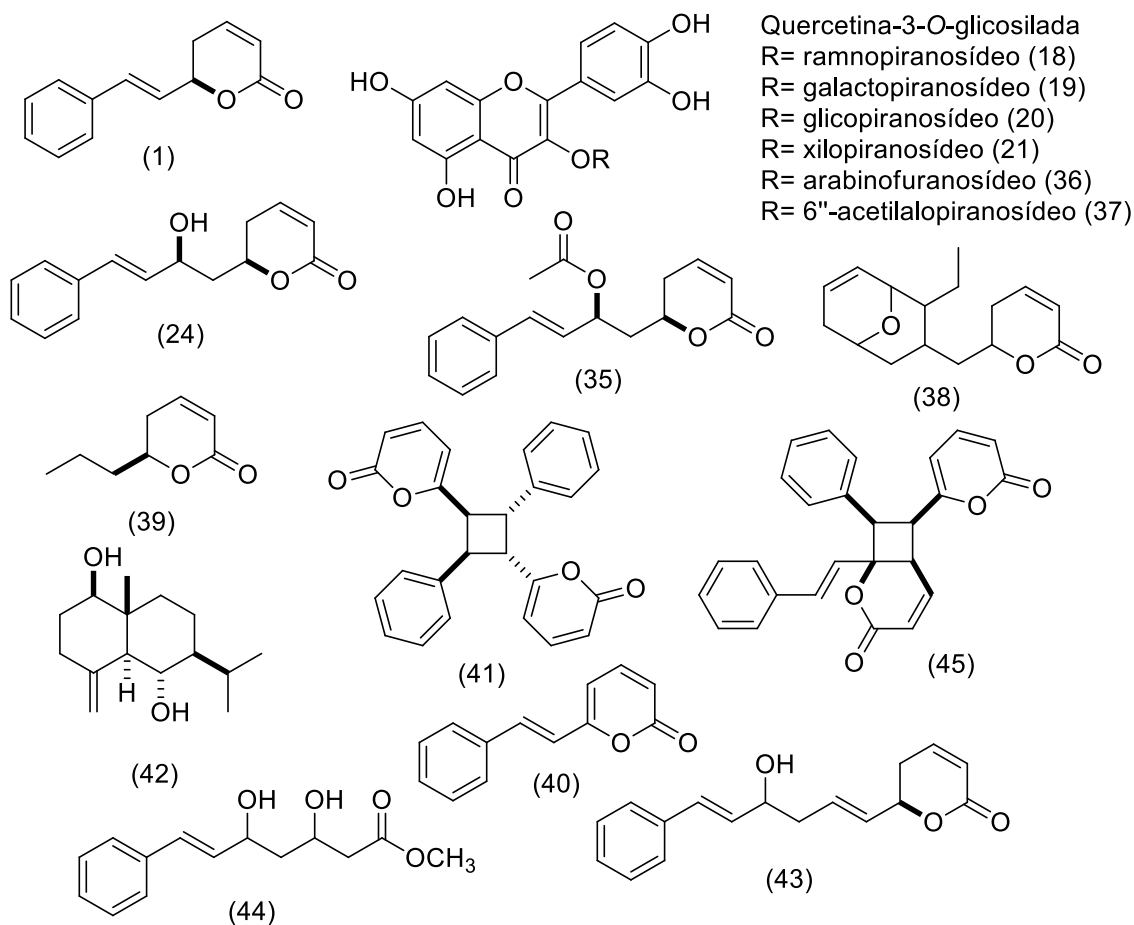
Com fracionamento biomonitorado do extrato etanólico das folhas de plântulas de *C. moschata*, Ricardo e colaboradores (2004) isolaram os flavonoides quercetina-3-O-galactopiranosídeo **(19)** e quercetina-3-O-glicopiranosídeo **(20)**. Estudos com o extrato etanólico da raiz e do caule de plântulas de *C. moschata* levaram ao isolamento de goniotalamina **(1)**, 6-[(4'-etil-9'-oxabicyclo[3.3.1]non-6'-en-3'-il)metil]-5,6-diidro-2-pirona **(38)** e 6-propil-5,6-diidro-2-pirona **(39)**. Os flavonóides **(19)** e **(20)** apresentaram atividade antioxidante, enquanto a estirilpirona **(1)** apresentou atividade contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (RICARDO et al., 2004).

Outro estudo com as folhas de *C. moschata* levou ao isolamento de 6-estiril-2-pirona **(40)**, seu fotodímero simétrico 1,3-difenil-2,4-di-[6-(2-pironil)]-ciclobutano **(41)**, o sesquiterpeno 1,6-diidróxi-4-(15)-eudesmeno **(42)** e a goniotalamina **(1)**. As substâncias **(1)**, **(40)** e **(42)** apresentaram atividade contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladoporioides* e *C. sphaerospermum*, além disso, nos testes de atividade antiproliferativa (*in vitro*) em linhagens celulares cancerígenas, a substância **(1)** apresentou atividades contra as linhagens PC3 (próstata), MCF-7 (mama), HT-29 (cólon), UACC-62 (melanoma) e 786-0 (renal). (TELASCRÊA, 2006).

As substâncias 4'-hidróxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona **(43)**, éster metílico do ácido 3,5-diidróxi-7-fenil-6-heptenóico **(44)**, fotodímero não simétrico **(45)** da substância 6-estiril-2-pirona **(40)** e goniotalamina **(1)** foram isoladas das folhas de *C. moschata* por Martinelli (dados não publicados). As quatro substâncias **(43,44,45 e 1)** apresentaram atividade contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladoporioides* e *C. sphaerospermum*, sendo que as substâncias **(1)** e **(43)** apresentaram também atividade contra os fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* e a substância **(45)** apresentou atividade contra os fungos *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (MARTINELLI, dados não publicados).

As substâncias isoladas de *C. moschata* são apresentadas na Figura 8.

Figura 8 - Substâncias isoladas das sementes, folhas, raiz e caule de plântulas de *C. moschata*



Fonte: Autor.

1.2.3 *Cryptocarya botelhensis*

Conhecida popularmente como canela-de-jacu, a *C. botelhensis* é uma espécie arbórea que apresenta altura de até 20 metros (Figura 9). Apresenta distribuição bem restrita no Brasil, sendo encontrada apenas no estado de São Paulo. É relativamente abundante no Parque Estadual Carlos Botelho e Parque Estadual Serra do Mar - Núcleo Cunha-Indaiá, sendo encontrada também na Estação Biológica de Paranapiacaba (Figura 10). Apesar de não serem descritos usos populares, é conhecido que muriquis, macacos encontrados no Parque Estadual Carlos Botelho consomem o fruto da espécie, contribuindo para sua dispersão (MORAES, 2007).

Figura 9: *Cryptocarya botelhensis* encontrada no Parque Estadual Carlos Botelho.



Fonte: Acervo pessoal Prof. Dr. Alberto J. Cavalheiro.

Figura 10 - Distribuição da *C. botelhensis* no Brasil.



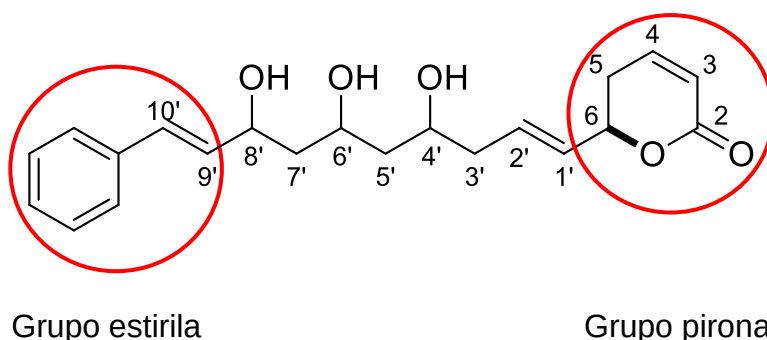
Fonte: Moraes (2007).

A espécie apresenta apenas estudos realizados com o óleo essencial de suas folhas (TELASCREÂ et al., 2008). No total foram identificados 42 constituintes do óleo essencial, sendo que os monoterpenos pinanos eram predominantes: α -pineno (22,7%), β -pineno (9,2%), *trans*-verbenol (8,4%), *trans*-pinocarveol (5,5%), e mirtenal (5,4%).

1.3 Estirilpironas de *Cryptocarya*

Estirilpirona é o nome dado às 5,6-diidro-2-pironas 6 substituídas, que um grupo estirila é encontrado no fim da cadeia lateral ligada ao carbono 6 (Figura 11) (CAVALHEIRO; YOSHIDA, 2000).

Figura 11 - Exemplo de estirilpirona apresentando a contagem dos carbonos, os círculos vermelhos indicam os grupos estirila e pirona.



Fonte: Autor.

Elas podem ser encontradas em espécies das famílias Lauraceae (*Cryptocarya*, *Aniba*), Piperaceae (*Piper*), Psilotaceae (*Psilotum*, *Tmesipteris*) (CAVALHEIRO; YOSHIDA, 2000), Annonaceae (*Ophrypetalum*, *Sanrafaelia*) (Malebo et al., 2014), Asteraceae (*Helichrysum*) (D'ABROSCA et al., 2013), entre outras, podendo ser encontradas também em algumas espécies de fungo, como *Penicillium glabrum* (HAMMERSCHMIDT et al., 2013) e variadas espécies dos gêneros *Phellinus* e *Inonotus* (LEE; YUN, 2011).

Em *Cryptocaryas* já foram isoladas variadas estirilpironas, sendo que a primeira foi a goniotalamina (**1**) isolada das cascas da *C. caloneura* por Hlubucek e Robertson (1967).

Das raízes da *C. bourdillonii* foi isolado a substância criptocarialactona (**35**) por Govindachari e Pathasarathy (1971) e a goniotalamina (**1**) por Govindachari, Parthasarathy e Modi (1972).

Das sementes de *C. moschata*, Spencer, England e Wolf (1984) isolaram criptocarialactona (**35**) e desacetilcriptocarialactona (**24**). Das folhas foram isoladas goniotalamina (**1**) e 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (**43**) (BASTOS, 2003), 6-estiril-2-pirona (**40**), seu fotodímero simétrico 1,3-difenil-2,4-di-[6-(2-pironil)]-ciclobutano (**41**). (TELASCREÂ, 2006), o fotodímero não simétrico (**45**) da

substância 6-estiril-2-pirona **(40)** (MARTINELLI, dados não publicados). Estudos com o extrato etanólico da raiz e do caule de plântulas de *C. moschata* levaram ao isolamento de goniotalamina **(1)** e 6-[(4'-etil-9'-oxabicyclo[3.3.1]non-6'-en-3'-il)metil]-5,6-diidro-2-pirona **(38)** (RICARDO et al., 2004).

Fu e colaboradores (1993) isolaram das folhas de *C. kurzii* uma nova δ -lactona- α,β -insaturada, a kurzilactona **(46)**.

Das cascas de *C. liebertiana*, foram isoladas criptocarialactona **(35)**, desacetilcriptocarialactona **(24)**, criptofoliona **(2)** e (+)-6-(4'-hidroxi-8'-feniloct-1',5',7'-trienil)-5,6-diidro-2H-piran-2-ona **(47)**, das cascas de um exemplar imaturo, foi isolado o derivado acetil da criptocarialactona **(35)**, a (+)-6-(6'-acetoxi-4'-hidroxi-8'-feniloct-1',7'-dienil)-5,6-diidro-2H-piran-2-ona **(48)** (DREWES; HORN; MAVI, 1997).

A substância criptofoliona **(2)** foi isolada das cascas do tronco das espécies *C. latifolia* e *C. myrtifolia* por Sehlapelo, Drewes e Schott-Shaw (1994). Das cascas do caule de *C. myrtifolia*, Drewes, Horn e Scott-Shaw (1995) isolaram a criptofoliona **(2)** e sua cetona **(49)**, das cascas do caule de *C. wyliei* isolaram goniotalamina **(1)**, criptofoliona **(2)**, criptocarialactona **(35)**, desacetilcriptocarialactona **(24)**, e o composto biciclico 7-estiril-2,6-dioxabicyclo[3.3.1]nonan-3-ona **(50)**, e da *C. woodii* isolaram a criptofoliona **(2)**.

Em seu trabalho de doutorado, DiGeorgio (1999) isolou a goniotalamina **(1)** das cascas de *C. massoy*.

Treze estirilpironas foram isoladas de galhos e cascas do tronco de *C. mandioccana*: goniotalamina **(1)**, criptofoliona **(2)**, criptomoscatona D1 **(3)**, criptomoscatona D2 **(4)**, criptomoscatona E1 **(5)**, criptomoscatona E3 **(6)**, criptomoscatona F1 **(7)**, criptopiranomoscatona A1 **(8)**, criptopiranomoscatona A2 **(9)**, criptopiranomoscatona A3 **(10)**, criptopiranomoscatona B1 **(11)**, criptopiranomoscatona B2 **(12)**, e criptopiranomoscatona B4 **(13)** (CAVALHEIRO; YOSHIDA, 2000). Análises realizadas utilizando a polpa de frutos verdes de *C. mandioccana* levaram ao isolamento das estirilpironas (+)-(6*R*)-[(2'*R**)-6'-fenil-2'-hidroxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona **(15)**, (+)-(6*R*)-[(2'*S**)-6'-fenil-2'-hidroxi-3',5'-hexadienil]-5,6-diidro-2-pirona **(16)**, criptofoliona **(2)**, criptomoscatona D1 **(3)**, criptomoscatona E3 **(6)** e criptomoscatona F1 **(7)** (PASCOLI, 2001). Das folhas de *C. mandioccana*, foram isolados criptomoscatona D2 **(4)**, criptofoliona **(2)** (NEHME et al., 2002) criptomoscatona E3 **(6)**, criptomoscatona D1 **(3)**, criptomoscatona F1 **(7)**, desacetilcriptocarialactona **(24)**, criptomoscatona E1 **(5)**, goniotalamina **(1)** (NEHME

et al., 2005), criptomoscatoa Ea **(25)**, criptomoscatoa Eb **(26)**, criptomoscatoa Fa **(27)**, criptopiranomoscatoa A3 **(10)**, criptopiranomoscatoa Ax **(28)**, criptopiranomoscatoa B2 **(12)**, criptopiranomoscatoa B4 **(13)**, criptopiranomoscatoa X **(29)**, MT2 **(30)** (TELASCREÂ, 2006) e criptomoscatoa E3 **(6)** (BANDEIRA; CAVALHEIRO, 2009).

Das cascas do tronco de *C. strictifolia*, Juliawaty e colaboradores (2000) isolaram a pirona *strictifolia* **(51)**.

Schmeda-Hirschmann e colaboradores (2001) isolaram dos frutos de *C. alba* a criptofoliona **(2)** e seu derivado 6-(4,6-dimetoxi-8-fenil-octa-1,7-dienil)-4-hidroxi-tetrahidro-piran-2-ona **(52)**.

O composto 6-({4-oxo-6-[(1*E*)-2-fenilvinil]-2*H*-3,5,6-trihidropiran-2-il}-metil)-5*H*-6-hidropiran-2-ona **(53)** foi isolado das sementes de *C. wightiana* por Deschamps e colaboradores (2001).

Do extrato das cascas do tronco de *C. obovata*, Dumontet e colaboradores (2004) isolaram a obolactona **(54)**. Do extrato das folhas de *C. obovara* foi isolada a estirilpirona 7'-8'-diidroobolactona **(55)** (DAVIS et al., 2010).

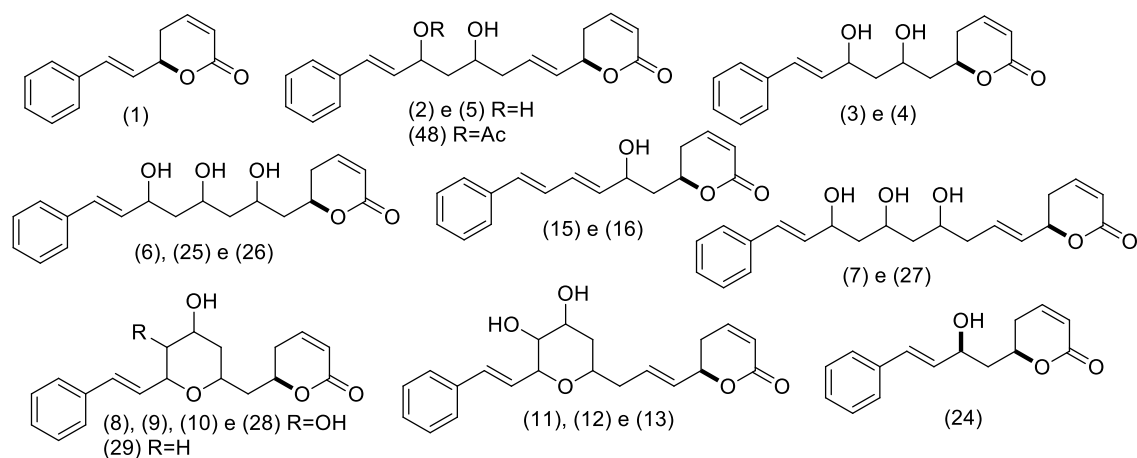
Meragelman e colaboradores (2009) isolaram de folhas e galhos de *C. rugulosa* a pirona rugulactona **(56)**.

O fracionamento guiado do extrato bruto de *C. concinna* levou a identificação das estirilpironas criptomoscatoa D2 **(4)**, Z-criptofoliona **(57)**, Z-criptomoscatoa **(58)**, criptofoliona **(2)**, a cetona da criptofoliona **(49)** e o composto **(59)** (STURGEON et al., 2008). Das folhas e galhos da *C. concinna*, foram isolados 8 estirilpironas: criptoconcatona A **(60)**, criptoconcatona B **(61)**, criptoconcatona C **(62)**, criptoconcatona D **(63)**, criptoconcatona E **(64)**, criptoconcatona F **(65)**, criptoconcatona G **(66)** e criptoconcatona H **(29)** (YANG et al., 2016).

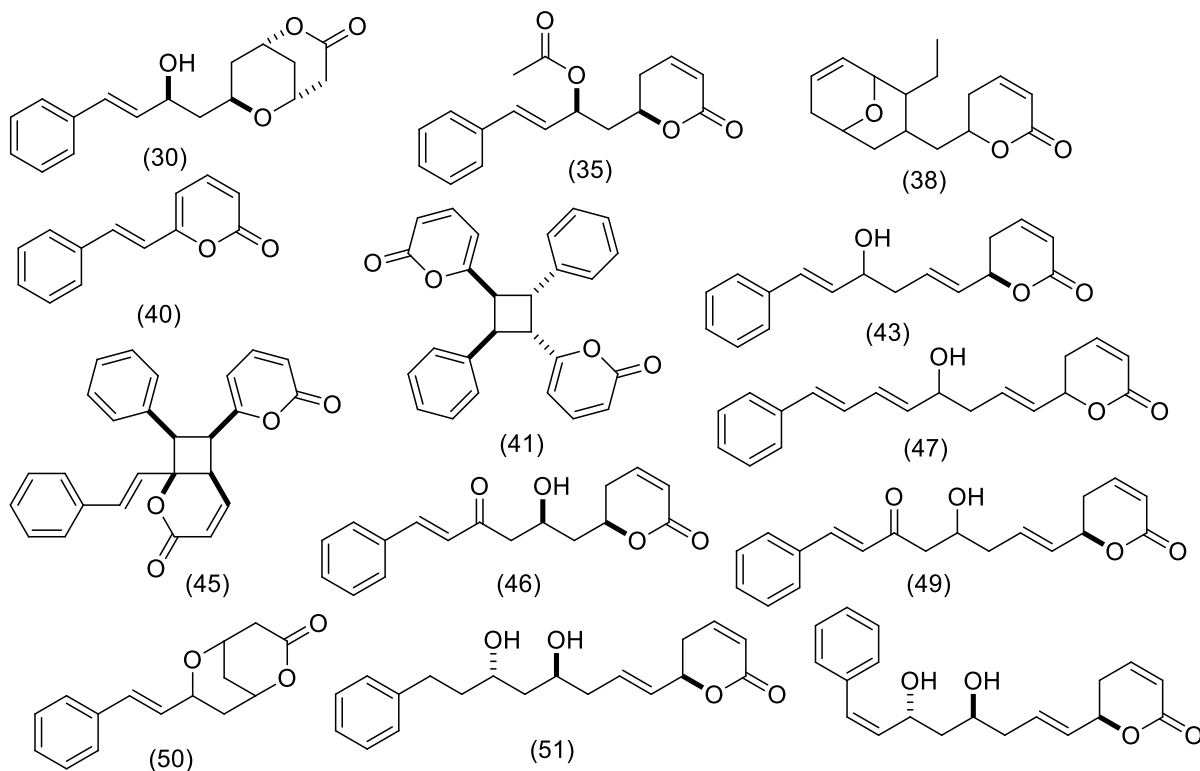
Das cascas do caule de *C. aschersoniana*, Campos e colaboradores (2016) isolaram a 6-esteril-2-pirona **(40)** e a goniotalamina **(1)**.

Todas as estirilpironas isoladas das espécies de *Cryptocarya* estão representadas na Figura 12.

Figura 12 - Estirilpironas isoladas de folhas, sementes, galhos, casca do tronco, frutos e raízes de diversas espécies de *Cryptocarya*, * indica configuração relativa.

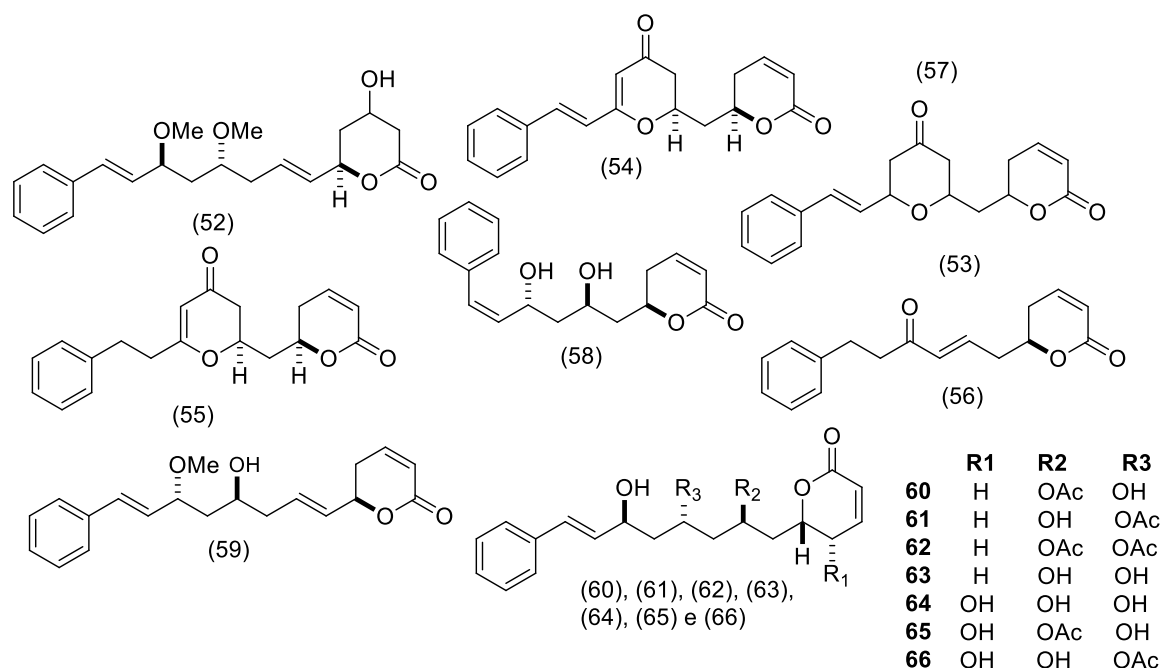


	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	16	25	26	27	28
C2'	-	R*	S*	-	S*	-	S*	S*	S*	-	-	-	R*	S*	R*	R*	-	R*
C4'	S*	R*	R*	R*	R*	S*	R*	S*	R*	S*	S*	S*	-	-	S*	R*	R*	S*
C5'	-	-	-	-	-	-	S*	S*	R*	-	-	-	-	-	-	-	-	R*
C6'	R*	-	-	R*	R*	R*	R*	R*	R*	R*	S*	R*	-	-	S*	S*	S*	R*
C7'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S*	S*	R*	-	-	-	-	-	-
C8'	-	-	-	-	-	R*	-	-	-	R*	R*	S*	-	-	-	-	S*	-



Fonte: Autor

Figura 12 (continuação) - Estirilpironas isoladas de folhas, sementes, galhos, casca do tronco, frutos e raízes de diversas espécies de *Cryptocarya*.



Fonte: Autor

As estilipironas de *Cryptocarya* são importantes por apresentarem atividade biológica. Já foram descritas na literatura atividades antifúngica (MARTINELLI, dados não publicados; PASCOLI, 2001; RICARDO et al., 2004; TELASCRÊA, 2006; REDDY et al., 2010) citotóxica em linhagens celulares cancerígenas (DUMONTET et al., 2004; TELASCRÊA, 2006; STURGEON et al., 2008; GIOCONDO et al., 2009), antiparasitária (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2001), inibidora do fator nuclear κB (NF- κB) (MEREGELMAN et al., 2009), antibacteriana (REDDY et al., 2010), e tripanocida (DAVIS et al., 2010).

1.4 Biossíntese de estilipironas

Uma característica constante nas estilipironas encontradas no gênero *Cryptocarya* é a configuração absoluta *R* para o carbono 6 do anel pirônico, já os carbonos hidroxilados da cadeia lateral apresentam configurações variadas. A análise da biossíntese dessa classe de metabólitos pode auxiliar na compreensão dessa variedade estrutural encontrada (PASSARELI, 2014).

A biossíntese dessa classe de substâncias pode ocorrer por uma rota mista, com a condensação de uma unidade $C_6.C_3$ (cinamoila iniciadora) proveniente da via do chiquitado e unidades C_2 provenientes da via do acetato, ocasionando a extensão da cadeia carbônica, dando origem a diversos policetídeos (DEWICK, 1997).

Os policetídeos pertencem a uma classe de metabólitos secundários que apresentam uma ampla diversidade, tanto funcional, quanto estrutural. Na farmacologia apresentam atividades variadas, entre elas: antiparasitária, antifúngica, antitumoral e propriedades imunossupressoras (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

As policetídeos sintases (PKS) são os grupos de enzimas responsáveis por biossintetizar os policetídios, e são divididos em três grupos: Tipo I (multifuncional: apenas uma enzima, mas vários sítios ativos), Tipo II (multienzimas: varias enzimas, cada uma possuindo um sítio ativo) e Tipo III ("sítio ativo multifuncional": uma única enzima com apenas um sítio ativo). Diferentemente das PKS dos Tipos I e II que utilizam a proteína acil carregadora (ACP) para ativar os substratos da acil SCoA, as PKS do Tipo III são independentes da ACP, podendo agir diretamente nos tio ésteres de CoA dos ácidos carboxílicos. Outro fator que difere as PKS do Tipo III dos outros dois grupos, é que com apenas um sítio ativo elas podem realizar uma série de reações de aromatização, descarboxilação, condensação e ciclização (STAUNTON; WEISSMAN, 2001, SHEN, 2003).

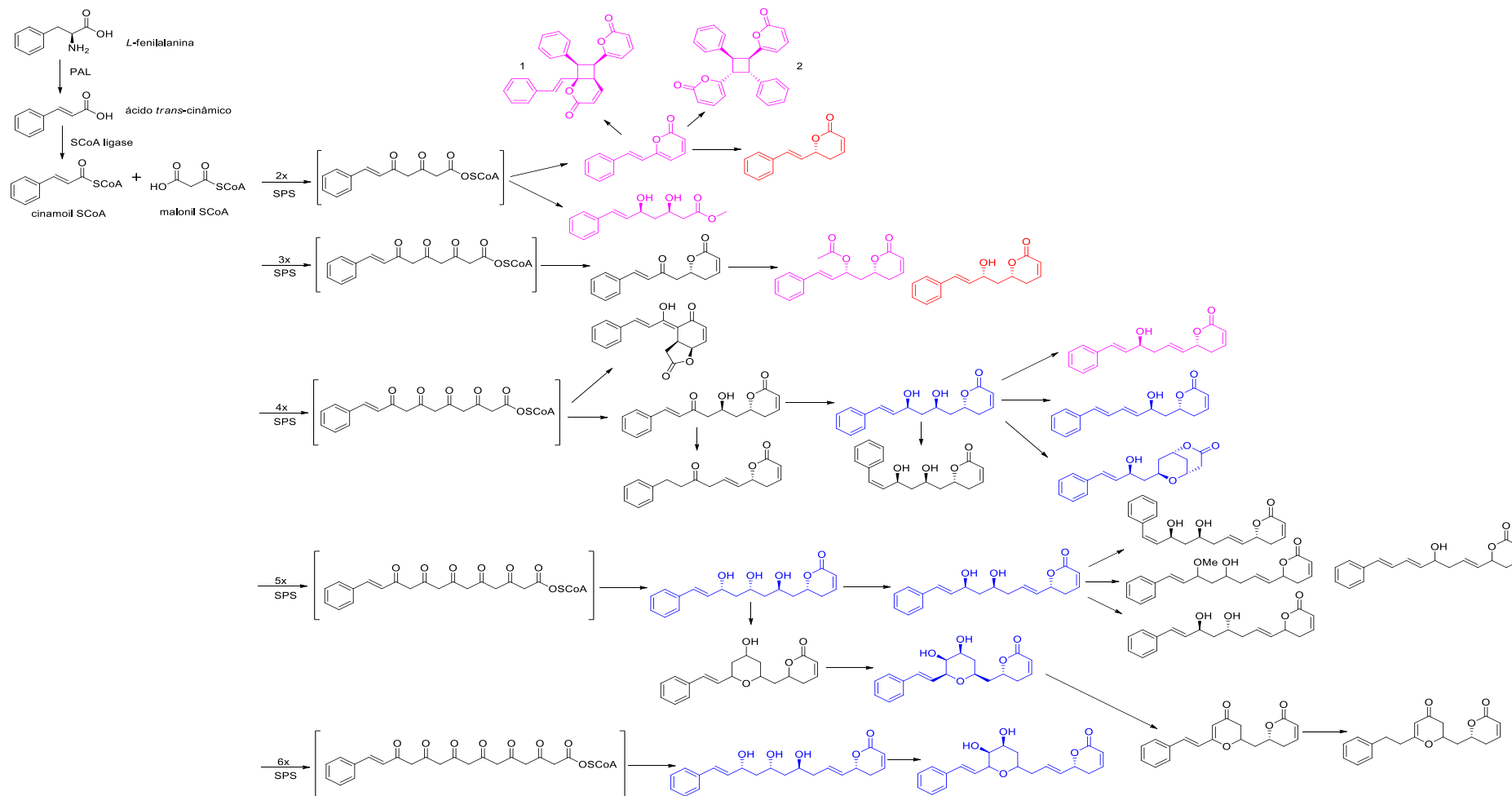
A mais conhecida PKS do Tipo III é a chalcona sintase (CHS), que está envolvida na biossíntese dos flavonoides (AUSTIN; NOEL, 2003). A estilipirona sintase (SPS), também uma PKS do Tipo III, pode estar envolvida na biossíntese de estilipironas, porém, como estilipironas foram observadas como produtos liberados em ensaios *in vitro* com CHS, Beckert e colaboradores (1997) decidiram investigar a ocorrência da SPS sem a interferência da CHS. A espécie *Equisetum arvense* foi escolhida para o estudo por acumular estilipironas e flavonoides em órgãos distintos (gametófitos e rizomas do esporófito possuíam como constituintes majoritários estilipironas enquanto os brotos verdes do esporófito apresentava flavonoides). Com os experimentos foram observadas duas estilipironas como produtos liberados *in vitro*, possibilitando, com esse estudo, a identificação da estilipirona sintase como uma policetídio sintase presente na planta (BECKERT et al., 1997, HERDERICH, BECKERT; VEIT, 1997).

Em *C. mandioccana* foram descritas estilipironas resultantes de cadeias policetílicas com vários carbonos, incluindo desde tricetideos até hexacetídeos

(Figura 13). Estas estilipironas podem ser resultado de estilipironas sintases pouco específicas, com controle pouco preciso da extensão da cadeia policetídica ou policetídeos com cadeias de comprimentos diferentes estarem relacionados com isoenzimas específicas. Em resumo, a chalcona sintase (CHS) estaria envolvida com a biossíntese de flavonoides das folhas de *C. mandioccana*, enquanto a estilipirona sintase (SPS) poderia estar envolvida na biossíntese das estilipironas (CAMARGO, 2008).

A biogênese das estilipironas tem início com a *trans*-desaminação da *L*-fenilalanina catalisada pela fenilalanina amônia-liase (PAL), dando origem ao ácido *trans*-cinâmico. Essa reação é de grande importância, uma vez que o ácido *trans*-cinâmico é responsável pela formação de uma grande quantidade de metabólitos secundários, estando diretamente envolvido com a biossíntese de substância acumuladas nas plantas, como as estilipironas, alcaloides e flavonoides (DEWICK, 1997). Partindo da biossíntese dos precursores fenilpropanóicos, ocorre a esterificação para tioésteres de CoA pelas SCoA ligases, que através de condensações com unidades de malonil SCoA e catalisadas por SPS seriam os responsáveis pela formação de variados esqueletos carbônicos de estilipironas de *Cryptocarya* (CAMARGO, 2008), como apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Quadro de biogênese das estilipironas de *Cryptocarya*. Em **rosa**, identificado de *C. moschata*, em **vermelho**, identificado de *C. moschata* e *C. mandioccana*, em **azul**, identificado de *C. mandioccana*. [] indica a suposta cadeia policetílica inicial. As substâncias 1 e 2 são formadas por fotodimerização.



Adaptado de: Passareli (2014).

2 OBJETIVOS

- Desenvolvimento de método cromatográfico para análise de extratos hidroalcoólicos de folhas das espécies de *Cryptocarya* utilizando como solvente orgânico o etanol;
- Identificação das estirilpironas presentes nos extratos de folhas das espécies de *Cryptocarya* estudadas utilizando as técnicas de HPLC-DAD e HPLC-MS.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Coleta

As folhas de dois indivíduos de *Cryptocarya mandioccana* (voucher CM353 e CM354) e de *Cryptocarya botelhensis* (voucher Moraes 1243) foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho em São Miguel Arcanjo - SP. As folhas de *Cryptocarya moschata* (voucher P. L. R. de Moraes 2347) foram coletadas no Viveiro Camará em Ibaté - SP. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Pedro L. R. de Moraes.

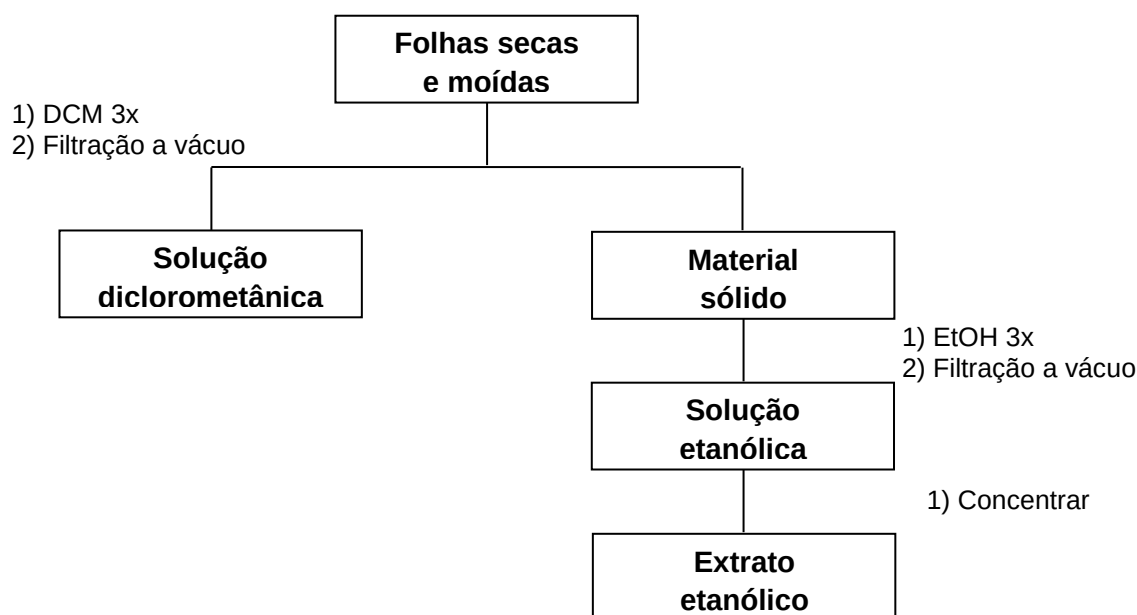
As folhas foram secas (à temperatura ambiente para *C. mandioccana* e *C. botelhensis* e em estufa à 40 °C durante dois dias para *C. moschata*), e pulverizadas em moinho de facas.

3.2 Produção do extrato etanólico de *C. mandioccana*

Diferente da *C. moschata* e *C. botelhensis* em que foram usadas as folhas secas e moídas para as análises, no caso da *C. mandioccana* foi utilizado o extrato etanólico produzido por Telascrêa (2006).

A extração foi realizada inicialmente com diclorometano por três vezes (DCM 3x) utilizando a relação amostra/solvente 1:3 (m/v) e filtrado em funil de Bücher. O material sólido passou novamente por extração seguindo o mesmo procedimento utilizando etanol como solvente (EtOH 3x). Ambos os extratos foram obtidos em banho de ultrassom (Transonic 700 - Elma) por 15 minutos em cada etapa. A solução etanólica foi concentrada em rotaevaporador Büch (R-114) sob pressão reduzida e banho de aquecimento (40 °C) até a eliminação completa do solvente. Os solventes utilizados foram da marca Synth (reagente analítico, São Paulo, Brasil). O esquema genérico da obtenção do extrato etanólico é apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Esquema genérico da produção do extrato etanólico.

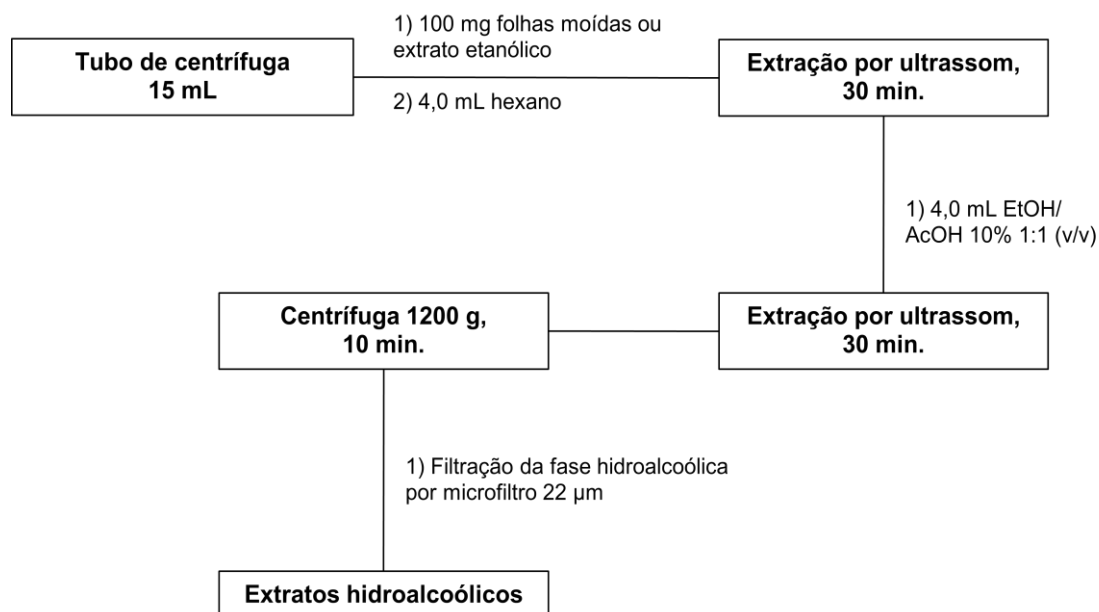


Adaptado de: Telascrêa (2006).

3.3 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos das três espécies estudadas foram preparados seguindo um protocolo de extração e pré-tratamento desenvolvido por Nehme e colaboradores (2005), modificado por Bandeira (2009) e adaptado para este trabalho. Em tubo de centrifuga de 15 mL, foram adicionados 100 mg de folhas moídas ou do extrato etenólico, juntamente com 4,0 mL de hexano grau HPLC da marca J. T. Baker, e submetido a extração por ultrassom por 30 minutos, seguido por adição de 4,0 mL etanol grau HPLC da marca J. T. Baker e ácido acético 10% 1:1 (v/v) e submetido novamente a extração por ultrassom por 30 minutos. O tubo foi então centrifugado a 1200 g por 10 minutos, após isso, a fase hidroalcoólica foi filtrada por microfiltro de 22 μ m e submetida aos experimentos. Na figura 15 é apresentado o fluxograma referente ao procedimento.

Figura 15 - Preparo dos extratos hidroalcoólicos.



Fonte: Autor.

3.4 Análises preliminares por HPLC-DAD

As análises iniciais foram realizadas com o extrato hidroalcoólico da espécie *C. mandioccana*, por ser a espécie que apresenta maior quantidade de metabólitos conhecidos (alcaloides, estirilpironas e flavonoides), como apresentado na seção 1.2.1.

Para todas as análises por HPLC-DAD, o equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20, degaseificador DGU-20A, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A, detector de arranjo de diodos UV-VIS SPD-M20A. A eluição foi feita em coluna de fase reversa Phenomenex Synergy 4µ Hydro-RP 80Å (150 mm x 4,6 mm) em modo gradiente 95:05 - 0:100 (A:B) em 50 minutos, seguido de eluição em modo isocrático 0:100 (A:B) por 10 minutos, a fase móvel foi composta por água ultra pura (A) e etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (B), vazão de 0,8 mL.min⁻¹, volume de injeção 10 µL e temperatura da coluna 30 °C.

3.5 Planejamento multifatorial para desenvolvimento de método por HPLC-DAD

Para reduzir a quantidade de análises necessárias para o desenvolvimento do método cromatográfico, foi realizado um planejamento multifatorial que consiste na escolha de fatores e suas variações isoladas ou simultâneas seguida pela análise dos dados obtidos.

Foi utilizado o planejamento fatorial com ponto central, que consiste em 2^k análises, em que k representa a quantidade de variáveis analisadas, além de uma análise em triplicata do valor médio dos fatores. Como foram escolhidas 3 variáveis, o planejamento apresenta onze análises. A seguir é apresentada uma tabela genérica relacionada a esse planejamento (Tabela 1), sendo que, (-1) representa o valor mais baixo da variável, (+1) o valor mais alto, 0 o ponto central e V_x a variável.

Tabela 1 - Tabela genérica de planejamento fatorial com ponto central utilizando três variáveis.

Nº experimento	V_1	V_2	V_3
1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1
3	+1	-1	+1
4	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1
6	-1	+1	-1
7	+1	-1	-1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

A variáveis escolhidas foram: temperatura, vazão e porcentagem de ácido fórmico na água (%HCO₂H). A seguir é apresentada a tabela preenchida com os parâmetros utilizados (Tabela 2).

Tabela 2 - Planejamento fatorial com ponto central com as variáveis escolhidas e seus valores.

Nº experimento	Temperatura (°C)	Vazão (mL.min ⁻¹)	%HCO ₂ H
1	40	0,8	1,0
2	25	0,8	1,0
3	40	0,6	1,0
4	25	0,6	1,0
5	40	0,8	0,1
6	25	0,8	0,1
7	40	0,6	0,1
8	25	0,6	0,1
9	33	0,7	0,55
10	33	0,7	0,55
11	33	0,7	0,55

Foi utilizada uma coluna Phenomenex Synergy 4 μ Hydro-RP 80Å (150 mm x 4,6 mm). A eluição foi feita em modo gradiente linear 95:5 - 0:100 (A:B) em 50 minutos seguido por uma eluição isocrática 0:100 (A:B) durante 10 minutos, a fase móvel foi composta por água ultra pura acidificada (HCO₂H) (A) e etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (B). Vazão, temperatura e %HCO₂H na água variaram dependendo do experimento conforme apresentado na Tabela 2. O volume de injeção foi de 10 μ L.

Foi considerada a quantidade de picos (variável dependente) em cada cromatograma para que fossem definidos os melhores parâmetros para análises posteriores.

3.6 Ajustes no gradiente cromatográfico

Após a definição das melhores condições cromatográficas com o planejamento multifatorial, realizou-se algumas mudanças no gradiente para uma melhor distribuição de picos no cromatograma. Os ajustes levaram ao seguinte gradiente: 83:13 - 30:70 (A:B) em 50 minutos, 30:70 - 0:100 (A:B) em 5 minutos e eluição isocrática 0:100 (A:B) por 5 minutos com a fase móvel composta por água

ultra pura 0,1% HCO₂H (A) e etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (B), temperatura da coluna 40 °C, vazão 0,8 mL.min⁻¹ e volume de injeção 10 µL.

Como as alterações não foram adequadas, foram realizadas novas modificações que nos levaram ao seguinte gradiente: 85:15 - 60:40 (A:B) em 40 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 5 minutos, seguido por eluição isocrática 0:100 (A:B) por 5 minutos. Fase móvel, temperatura da coluna, vazão e volume de injeção não foram alterados.

Definidas as melhores condições e o melhor gradiente, foram realizadas análises para as espécies *C. moschata* e *C. botelhensis*.

3.7 Análise dos extratos por HPLC-MS e HPLC-MS/MS

As análises por HPLC-MS e HPLC-MS/MS foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bombas LC-20AD, detector UV-DAD SPD-M20A, injetor automático SIL-20A, controlador CBM-20A acoplado a um espectrômetro de massa Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA) modelo amaZon SL-ESI-IT de baixa resolução, operando nos modos negativo e positivo. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram: gás nitrogênio, pressão do nebulizador: 60 psi, fluxo do gás de secagem: 10 L.min⁻¹, temperatura do gás: 320 °C, voltagem do capilar: 3500 V, End Plate: 500 V. Os espectros foram registrados na faixa de 50 a 1000 Da. A condição cromatográfica utilizada foi um gradiente segmentado: 85:15 - 60:40 (A:B) em 25 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 2 minutos, seguido por 6 minutos em eluição isocrática 0:100 (A:B) por 6 minutos. A fase móvel foi composta por água ultra pura 0,1% HCO₂H (A) e etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (B), temperatura da coluna 40 °C e vazão 0,8 mL.min⁻¹, coluna de fase reversa Phenomenex Synergy 4µ Hydro-RP 80Å (150 mm x 4,6 mm).

3.8 Análise de padrões de pirona

Utilizando quatro pironas purificadas a partir do extrato etanólico das folhas de *C. mandioccana* produzidas por Passareli (2014), foram realizadas análises por HPLC-DAD para obtenção de seus tempos de retenção e comparação com os

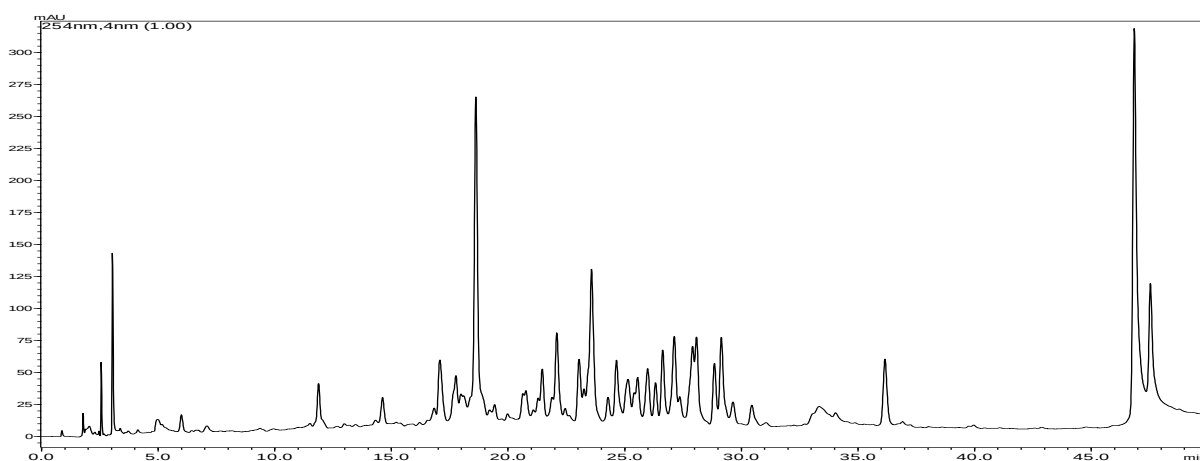
dados obtidos por HPLC-MS e HPLC-MS/MS para auxiliar na identificação das substâncias. As pironas encontravam-se estabilizadas e armazenadas em frascos na geladeira. O conteúdo foi solubilizado com etanol grau HPLC da marca J. T. Baker e foram preparadas soluções com concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. As condições cromatográficas utilizadas nas análises foram as mesmas descritas na seção 3.7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises preliminares por HPLC-DAD e estudo das condições cromatográficas usando planejamento multifatorial

Primeiramente foi realizada a análise do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* para a obtenção de seu perfil cromatográfico, o resultado é apresentado na Figura 16, os picos presentes no final do cromatograma são referentes ao solvente. As condições da análise foram apresentadas na seção 3.4.

Figura 16 - Análise preliminar do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana*, $\lambda=254$ nm.

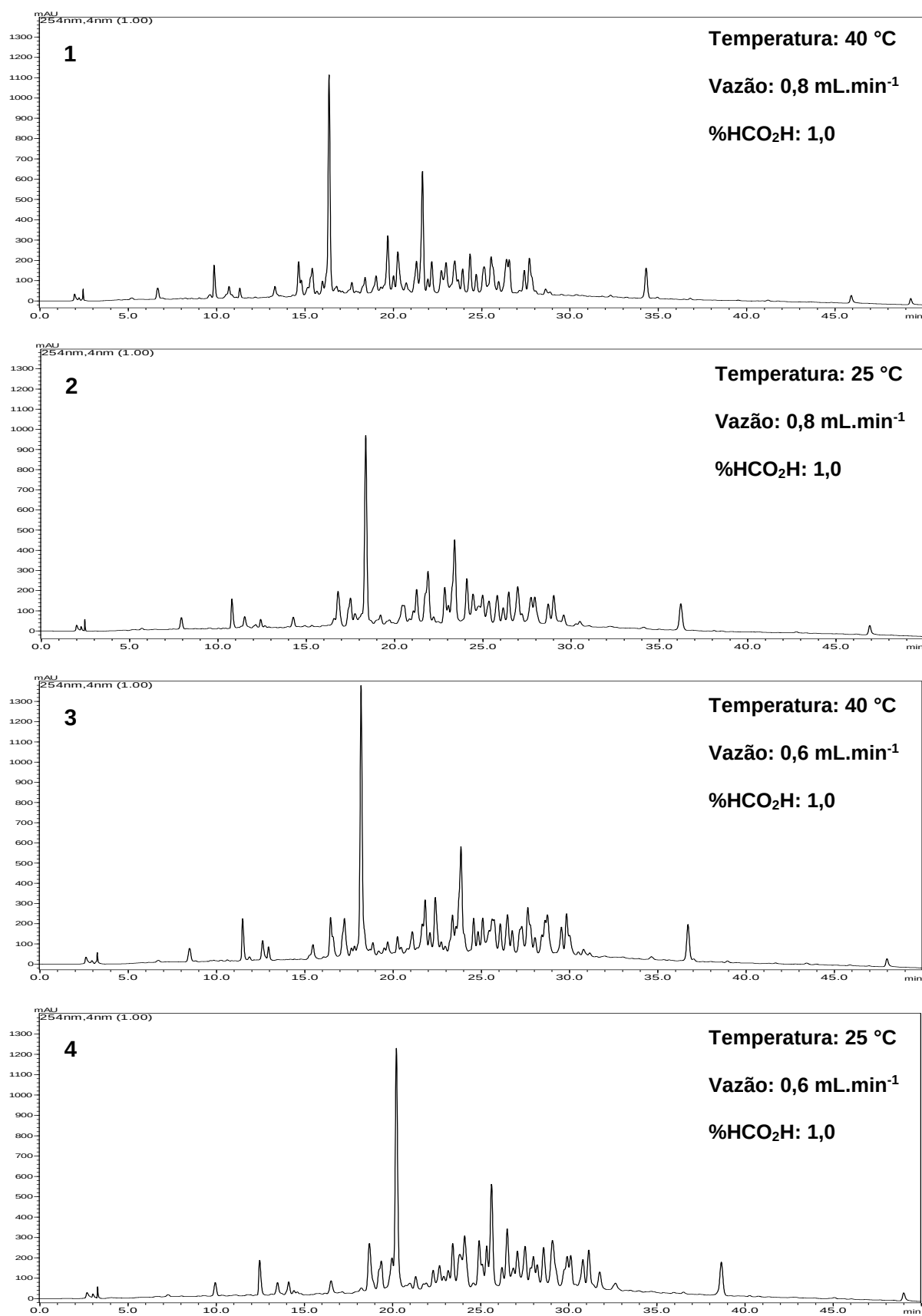


Fonte: Autor.

Nota-se que os picos obtidos se concentram na região central do cromatograma, indicando que a maioria dos compostos presentes possuem média polaridade. Por ser uma análise preliminar, era de se esperar a baixa resolução entre os picos, por isso foi utilizado o planejamento multifatorial para otimização das variáveis envolvidas além de ajustes no gradiente para uma melhora dos resultados.

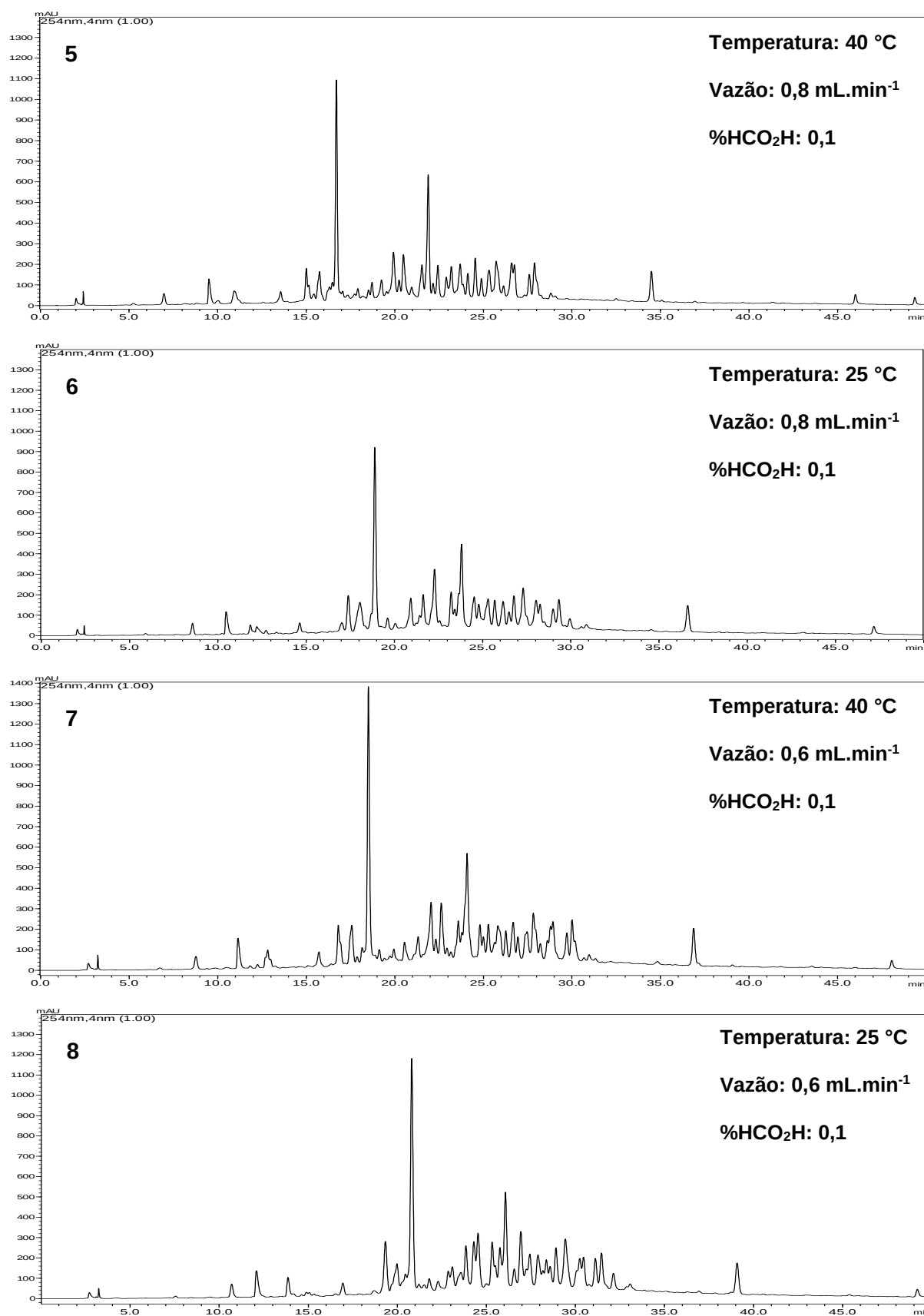
As análises multifatoriais foram realizadas com variações na temperatura, vazão e porcentagem de ácido fórmico na água, assim como foi demonstrado na Tabela 2. Na Figura 17, são demonstrados os cromatogramas obtidos com as análises, a numeração indica o número do experimento seguindo o que foi demonstrado na Tabela 2. As condições cromatográficas estão demonstradas nos cromatogramas.

Figura 17 - Cromatogramas obtidos a partir da análise multivariável do extrato hidroalcoólico da *C. mandioccana*, $\lambda=254$ nm.



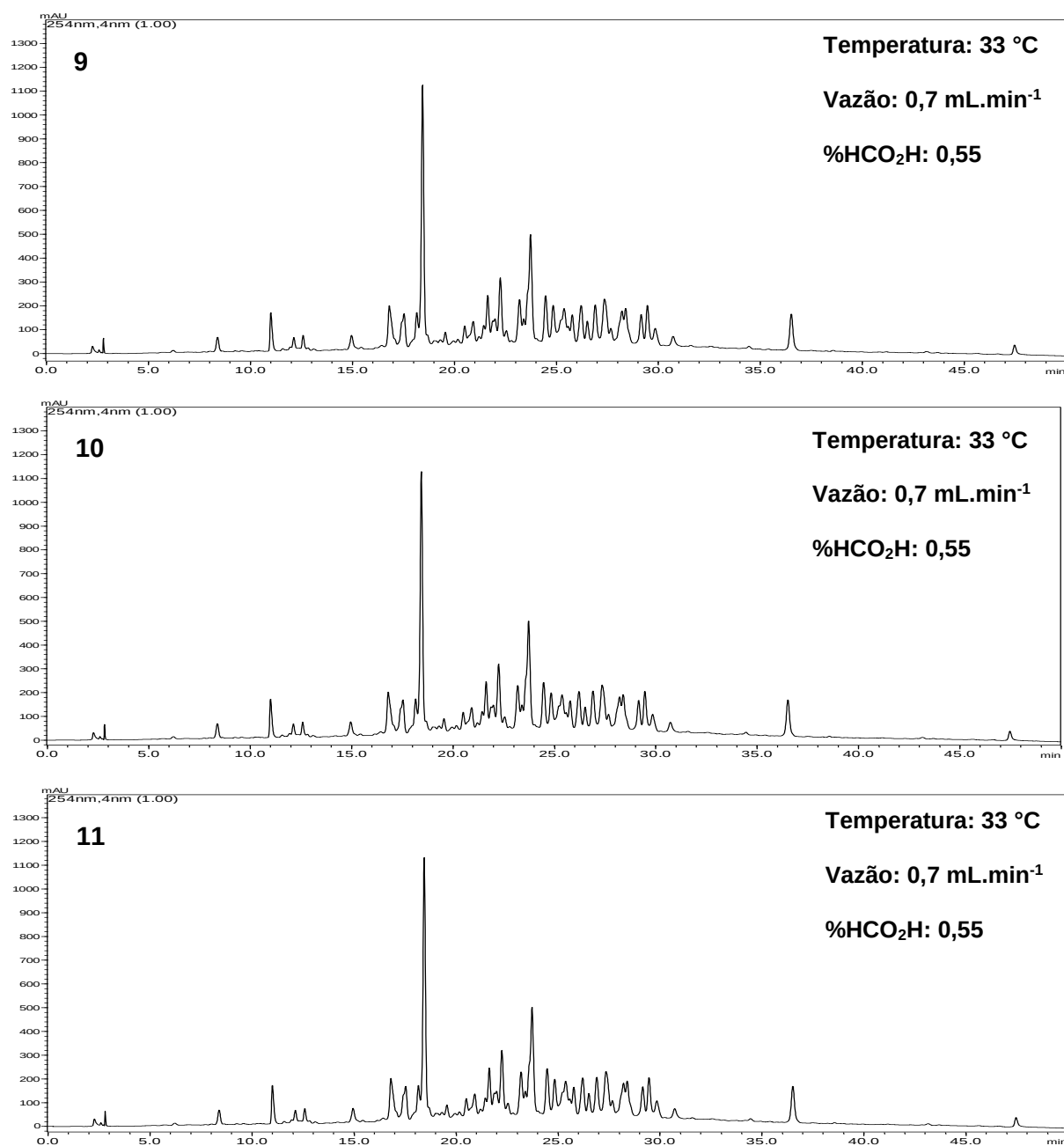
Fonte: Autor.

Figura 17 (continuação) - Cromatogramas obtidos a partir da análise multivariável do extrato hidroalcoólico da *C. mandioccana*, $\lambda=254$ nm.



Fonte: Autor.

Figura 17 (continuação) - Cromatogramas obtidos a partir da análise multivariável do extrato hidroalcoólico da *C. mandioccana*, $\lambda=254$ nm.



Fonte: Autor.

Analizando os cromatogramas aos pares, em que apenas um dos fatores é alterado, como por exemplo os cromatogramas 1 e 3 (Figura 17), em que apenas a vazão foi alterada, podemos destacar três relações:

- Aumento da vazão causa diminuição do tempo de retenção.
- Aumento da temperatura causa diminuição do tempo de retenção.

- Aumento da porcentagem de ácido fórmico na água causa pequena redução no tempo de retenção.

A variação da vazão em uma análise cromatográfica é responsável pela alteração de diversos parâmetros, como exemplo, pode-se citar o tempo morto, calculado a partir da Equação 1 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

$$t_0 = \frac{V_m}{F} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo que:

t_0 é o tempo morto da coluna

V_m é o volume morto da coluna

F é a vazão utilizada.

Sabendo que V_m é constante para a coluna usada no trabalho e podendo ser calculado pela Equação 2 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010) para colunas com diâmetro interno entre 4 e 5 mm, o único parâmetro que podemos modificar é a vazão (F).

$$V_m \approx 0,01L \quad \text{Equação 2}$$

Sendo que:

V_m é o volume morto da coluna (em mililitros)

L é o comprimento da coluna (em milímetros)

Como a vazão é o denominador da fração, qualquer acréscimo em seu valor causará o decréscimo do valor do tempo morto, e vice-versa. Subtraindo o tempo morto do tempo de retenção do pico A dos cromatogramas da Figura 18, notamos que o aumento do fluxo causou a diminuição do tempo de retenção da substância (Equações 3 e 4).

$$t_{r1} - t_{01} = 16,2 - 1,875 = 14,325 \text{ min} \quad \text{vazão } 0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \quad \text{Equação 3}$$

$$t_{r3} - t_{03} = 18,2 - 2,5 = 15,7 \text{ min} \quad \text{vazão } 0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

Sendo que:

t_{r1} é o tempo de retenção do pico A no experimento 1

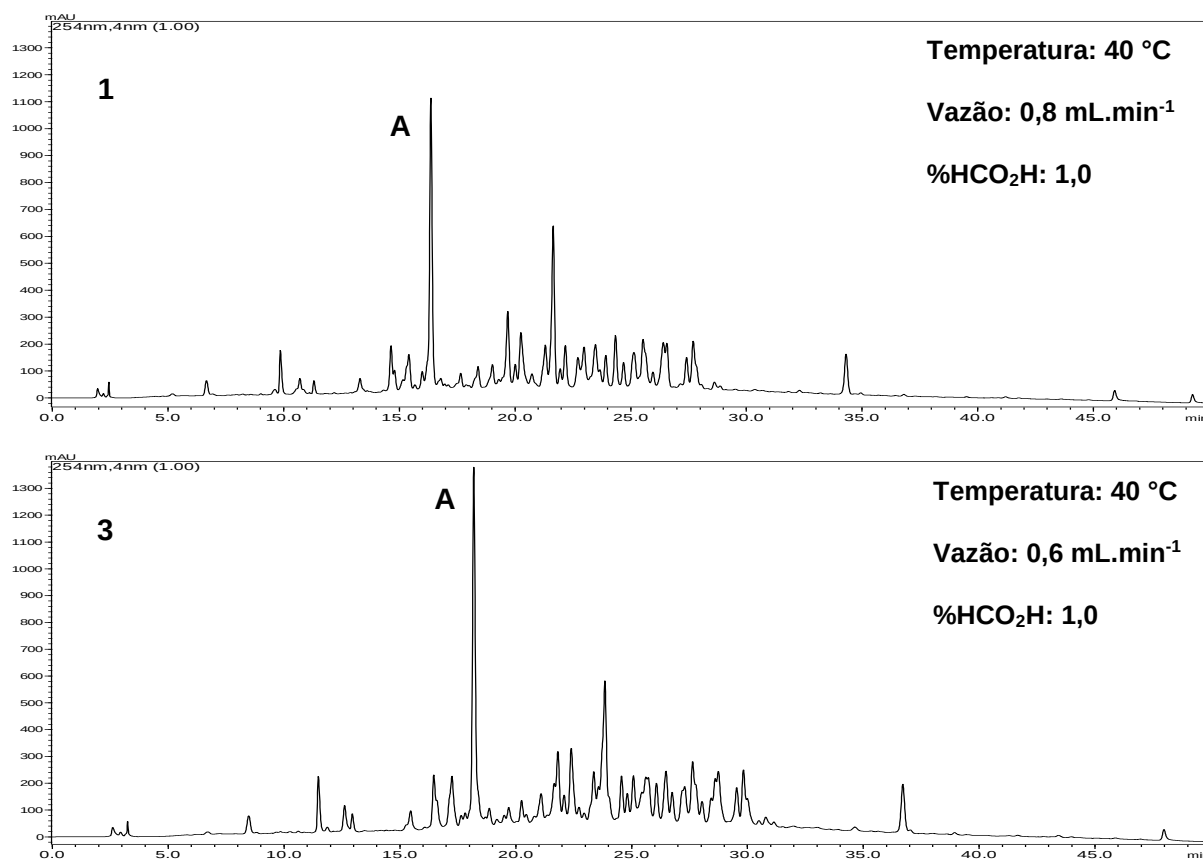
t_{r2} é o tempo de retenção do pico A no experimento 3

t_{01} é o tempo zero no experimento 1

t_{03} é o tempo zero no experimento 3

Outra mudança que ocorre com o aumento da vazão é a diminuição da intensidade dos picos (SNYDER; DOLAN, 2007), como pode-se ver na Figura 14, em que o cromatograma 1 (vazão $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) apresenta intensidade para o pico A de aproximadamente 1100 mAU, enquanto no cromatograma 3 (vazão $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) a intensidade é de aproximadamente 1400 mAu (unidade de absorbância).

Figura 18 - Cromatogramas dos experimentos 1 e 3 para análise da variação do tempo de retenção da substância com relação a variação do fluxo empregado, $\lambda=254 \text{ nm}$.



Fonte: Autor.

A variação da vazão interfere também sobre a pressão (Equação 5) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010) e resolução (Equação 6) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), em que em ambas as situações, o aumento da vazão causa o aumento do parâmetro. Como a vazão se encontra como numerador no cálculo da pressão, mantendo os outros fatores fixos, seu aumento causará o aumento da pressão.

$$P \approx \frac{2500.L.\eta.F}{d_p^2.d_c^2} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo que:

P é a pressão

L é o comprimento da coluna (em milímetros)

η é a viscosidade da fase móvel (em cP (centipoise))

F é a vazão

d_p^2 é o diâmetro da partícula (em μm)

d_c^2 é o diâmetro interno da coluna

No caso da resolução, o efeito da modificação do fluxo é indireto, mas, apesar de não estar presente na formula, a vazão é utilizada para o cálculo do fator de retenção (Equação 7) e do fator de separação (Equação 8) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) \cdot \left[\frac{k}{(1+k)}\right] \cdot \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \cdot N^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo que:

R_s é a resolução

N é o número de pratos teóricos (eficiência da coluna).

k é o fator de retenção, calculado como mostra a Equação 7:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 7}$$

Sendo que

t_r é o tempo de retenção do pico

t_0 é o tempo morto.

α é o fator de separação (seletividade) calculado como mostra a Equação 8:

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo que:

k_1 e k_2 são os valores de k para dois picos adjacentes.

O aumento da temperatura causa diminuição do tempo de retenção (Figura 19), sendo sua influência no fator de retenção comumente expressa pela equação de Van't Hoff (Equação 9) (LANÇAS, 2012).

$$\ln k = -\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT}\right) + \left(\frac{\Delta S^\circ}{R}\right) + \ln \emptyset \quad \text{Equação 9}$$

Sendo que:

ΔH° é a entalpia do sistema

ΔS° é a entropia do sistema

T é a temperatura (em Kelvin)

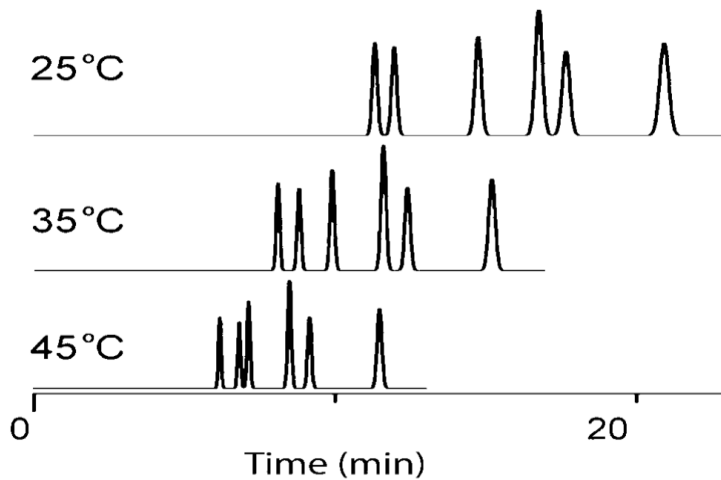
R é a constante universal dos gases ($8,31441 \text{ J.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

k é o fator de retenção

$\emptyset$ é a razão do volume entre a fase estacionária e a móvel (também representado por β)

Esta relação mostra que para uma mesma mudança na temperatura, o fator de retenção para solutos com maior ΔH é mais afetado do que para solutos com ΔH menor, fazendo com que diferentes solutos tenham comportamento de retenção diferentes com a variação da temperatura. Dessa forma, a variação da temperatura pode auxiliar na separação dos solutos (LANÇAS, 2012).

Figura 19 - Exemplo da diminuição do tempo de retenção com aumento da temperatura



Fonte: DOLAN (2016).

A variação da temperatura também afeta o número de pratos teóricos da coluna (N) (Equação 10) (LANÇAS, 2012). Em temperaturas menores, o tempo de transferência de massa da equação de van Deemter determina a altura do prato (H), enquanto que em temperaturas mais altas, o termo referente a difusão longitudinal determina a altura do prato. Ou seja, sob velocidade linear constante, o aumento da temperatura ocasiona a diminuição da altura do prato, número de pratos muda com relação a temperatura de forma diferente em temperaturas altas e baixas. Em temperaturas baixas, o aumento da temperatura faz o número de pratos diminuir, já em temperaturas elevadas, o aumento da temperatura causa o aumento da quantidade de pratos (LANÇAS, 2012). Portanto, como a temperatura altera todos os parâmetros presentes no cálculo da resolução (Equação 6) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), sua variação causa a variação da resolução.

$$N = \left(\frac{L}{H} \right)$$

Equação 10

Sendo que:

N é o número de pratos teóricos (eficiência da coluna)

L é o comprimento da coluna

H é a altura do prato teórico.

Analisando os cromatogramas dos experimentos 1 e 5 (Figura 20), podemos notar uma pequena diminuição no tempo de retenção do pico A com o aumento da quantidade de ácido fórmico na água sem modificação da intensidade dos picos. Subtraindo o tempo morto do tempo de retenção do pico A, a redução do tempo de retenção fica evidente (Equações 11 e 12).

$$t_{r1} - t_0 = 16,5 - 1,875 = 14,625 \text{ min} \quad \% \text{HCO}_2\text{H}: 1,0 \quad \text{Equação 11}$$

$$t_{r5} - t_0 = 16,8 - 1,875 = 14,925 \text{ min} \quad \% \text{HCO}_2\text{H}: 0,1 \quad \text{Equação 12}$$

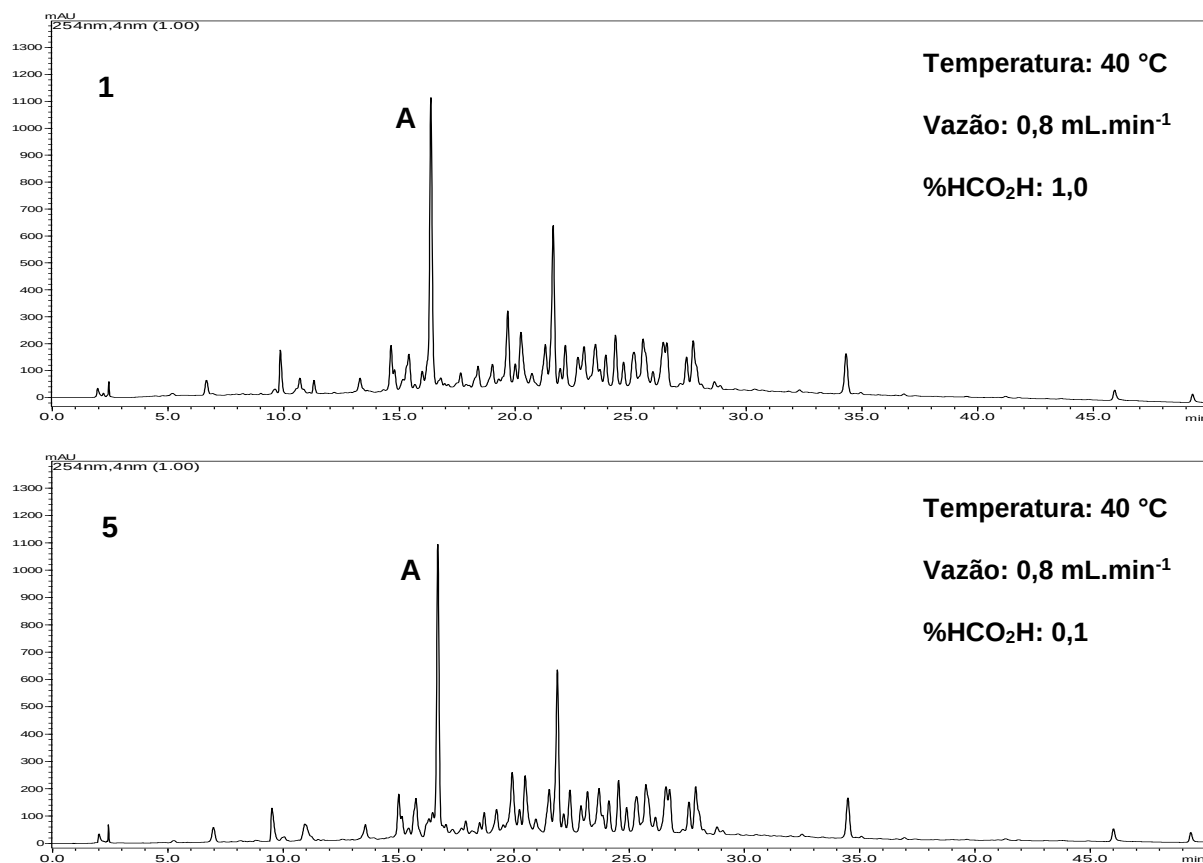
Sendo que:

t_{r1} é o tempo de retenção do pico A no experimento 1

t_{r5} é o tempo de retenção do pico A no experimento 5

t_0 é o tempo morto da coluna com fluxo: $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Figura 20 - Cromatogramas dos experimentos 1 e 5 para análise da variação do tempo de retenção da substância com relação a variação da porcentagem de ácido fórmico na água, $\lambda=254 \text{ nm}$.



Fonte: Autor.

O foco da análise multifatorial realizada foi encontrar as condições em que fosse obtido a maior quantidade possível de picos. Para isso, utilizou-se o software do próprio cromatógrafo para realizar a contagem e reduzir o erro humano. A seguir é apresentada a tabela com a quantidade de picos obtida em cada experimento (Tabela 3)

Tabela 3 - Contagem de picos obtidos nos experimentos do planejamento multivariável.

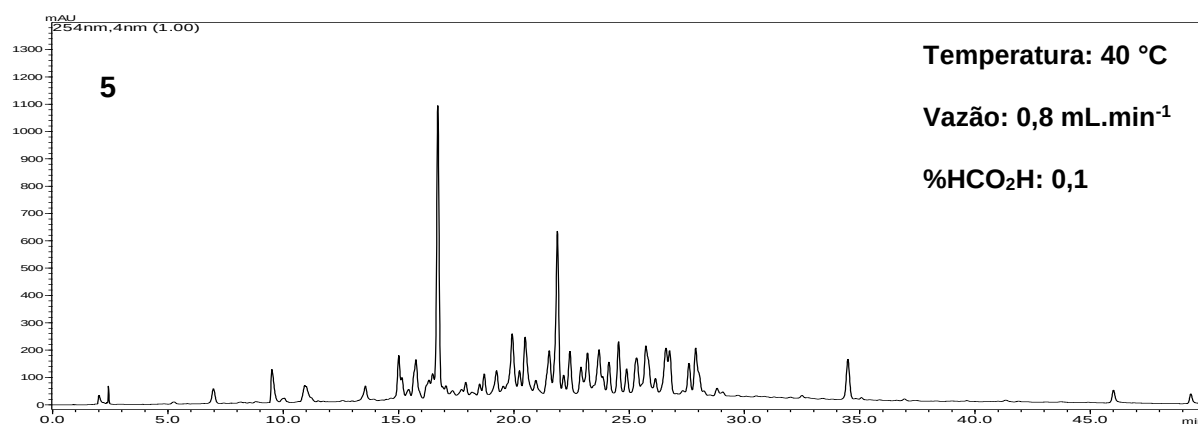
Experimento	Nº de picos
1	117
2	97
3	109
4	95
5	124
6	97
7	104
8	104
9	110
10	111
11	109

A condição que nos forneceu a maior quantidade de picos foi a do experimento 5 (40 °C, vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e 0,1% de HCO₂H na água). Partindo desta condição, foram realizados ajustes do gradiente para melhorar a resolução entre as substâncias.

4.2 Ajustes do gradiente cromatográfico

Utilizando como ponto de partida o cromatograma do experimento 5 (Figura 21), foram realizadas as modificações com foco na melhoria da resolução.

Figura 21 - Cromatograma do experimento 5 que obteve a maior quantidade de picos, $\lambda=254$ nm.



Fonte: Autor.

Como os picos de interesse estão na região entre 6,97 e 49,35 minutos, foram realizados cálculos utilizando a Equação 13 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010) para determinar a concentração de fase orgânica (%B) em cada um desses tempos.

$$\phi = \phi_0 + \left(\frac{\Delta\phi}{t_G} \right) \cdot t \quad \text{Equação 13}$$

Sendo que:

ϕ é a porcentagem de solvente orgânico na fase móvel em um determinado tempo

ϕ_0 é a porcentagem de solvente orgânico na fase móvel no início do gradiente

$\Delta\phi$ é a variação da porcentagem de fase orgânica na fase móvel

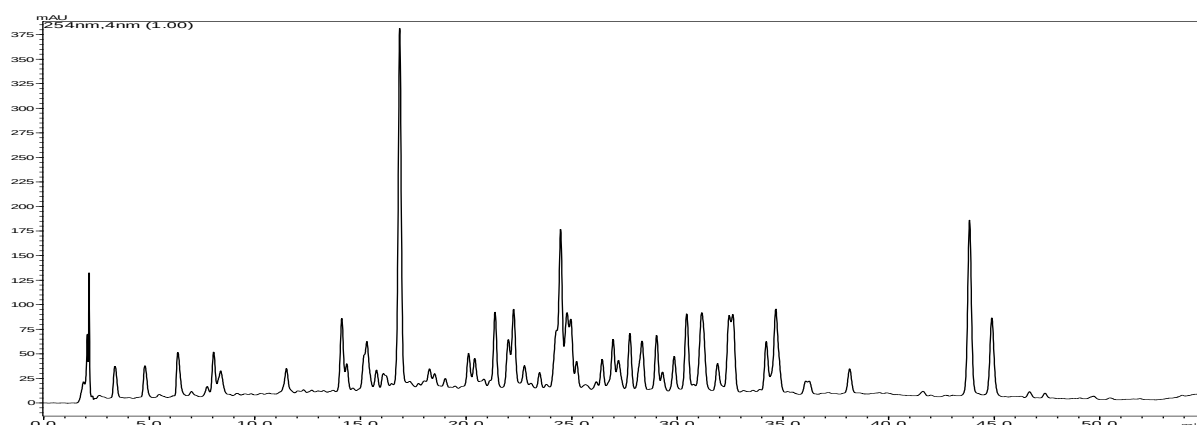
t_G é o tempo total do gradiente

t é o tempo de interesse

Com o cálculo, determinou-se que nos tempos de 6,97 e 49,35 minutos, a porcentagem de solvente orgânico é de 18,243 e 98,765% respectivamente. Portanto, decidiu-se iniciar o gradiente com 13% de etanol, aproximadamente 5% menos do que o necessário para a saída da substância, para que ela não ficasse muito próximo ao tempo morto e fosse possível a detecção de alguma substância de interesse nessa faixa entre 13% e 18% de etanol. Como na faixa de tempo entre 30 e 50 minutos a quantidade de picos é muito baixa, foi realizado um gradiente com uma maior inclinação para que os picos ficassem mais próximos. Levando esses

pontos em consideração, chegou-se ao seguinte gradiente segmentado: 87:13 - 30:70 (A:B) em 50 minutos, 30:70 - 00:100 (A/B) em 5 minutos, seguido por eluição isocrática 0:100 (A:B) por 5 minutos, a fase móvel foi composta por água ultra pura 0,1% ácido fórmico/etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (A:B). Esse gradiente forneceu o cromatograma apresentado na Figura 22.

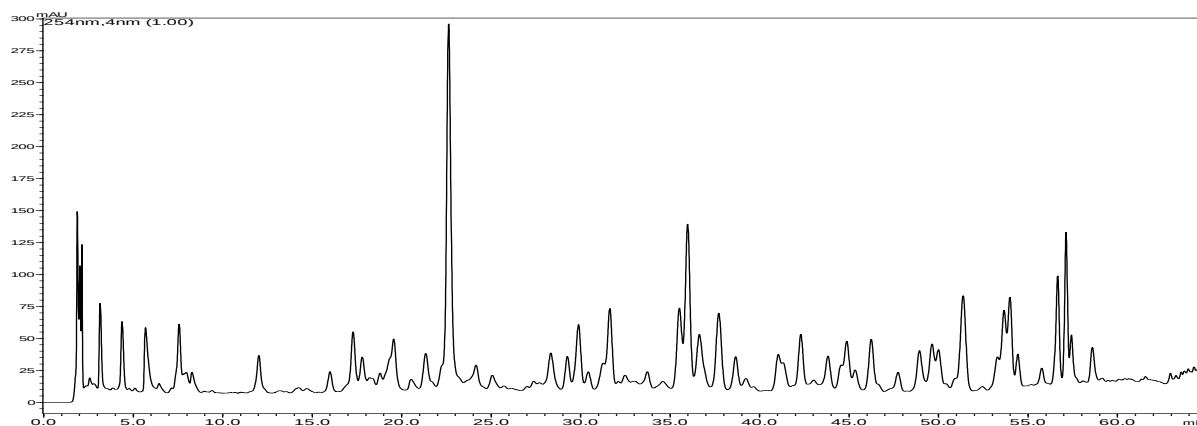
Figura 22 - Cromatograma obtido após ajustes iniciais do gradiente, temperatura: 40 °C, vazão 0,8 mL.min⁻¹, λ =254 nm.



Fonte: Autor.

Nota-se uma melhora significativa na resolução, porém, como a maioria das substâncias apresentavam um tempo de retenção inferior aos 30 minutos (concentração de fase orgânica inferior a aproximadamente 40%), a inclinação do gradiente foi modificada nessa região para que a resolução aumentasse. O restante das substâncias apresentavam tempo de retenção entre aproximadamente 30 e 45 minutos (concentração da fase orgânica entre 40 e 56% aproximadamente), porém como a quantidade de picos era baixa, aumentou-se a inclinação da rampa do gradiente na região para aproximar os picos. A % de B inicial também foi aumentada para que a primeira substância obtivesse tempo de retenção menor. Com isso, chegamos ao seguinte gradiente: 85:15 - 60:40 (A:B) em 50 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 5 minutos, seguido por eluição isocrática 0:100 por 5 minutos, a fase móvel foi composta por água ultra pura 0,1% ácido fórmico/etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (A:B). O cromatograma obtido com este gradiente é apresentado na Figura 23.

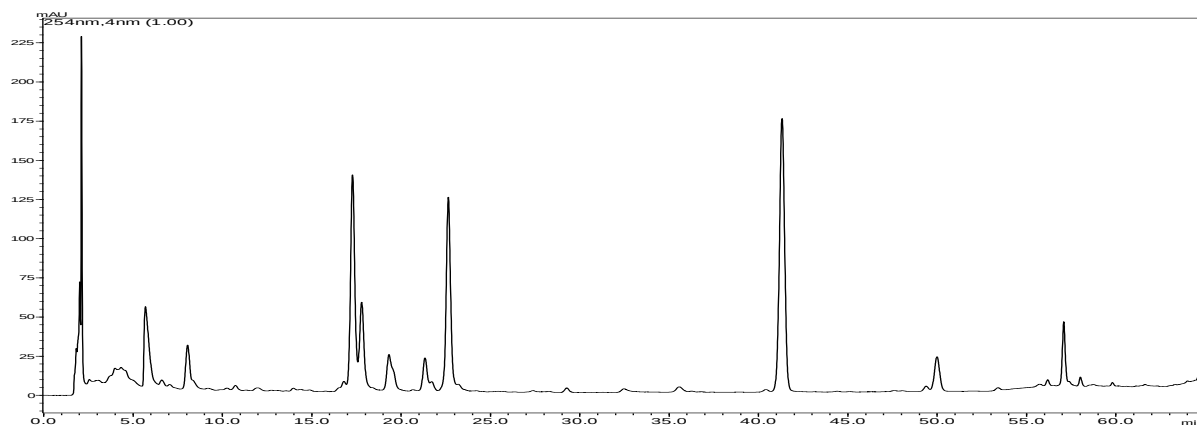
Figura 23 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* com gradiente otimizado, temperatura: 40 °C, vazão 0,8 mL.min⁻¹, λ =254 nm.



Fonte: Autor.

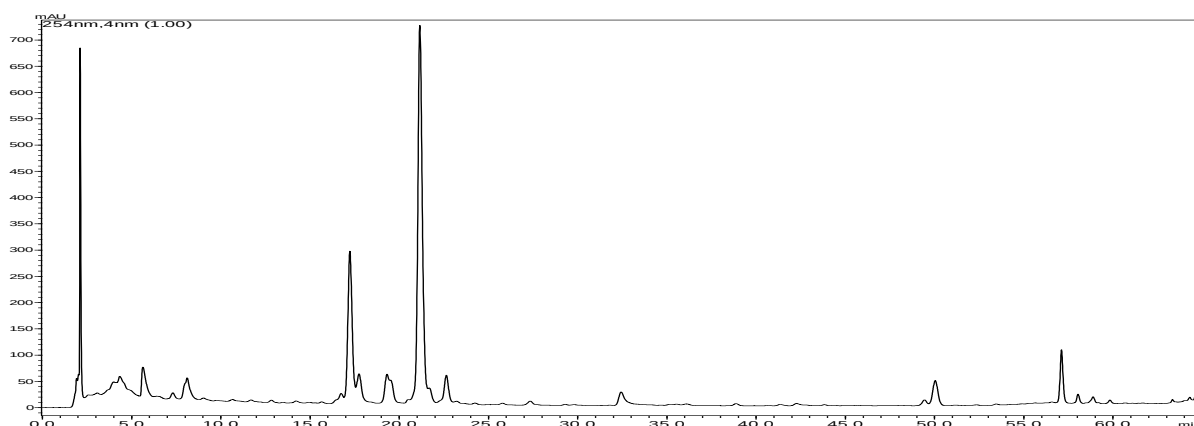
Como o resultado foi satisfatório, com os picos distribuídos por todo o cromatograma, o mesmo gradiente segmentado e as mesmas condições cromatográficas foram utilizadas para a análise dos extratos das folhas de *C. moschata* e *C. botelhensis*. Os cromatogramas obtidos são apresentados a seguir (Figura 24 e 25 respectivamente).

Figura 24 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. moschata*, temperatura: 40 °C, vazão 0,8 mL.min⁻¹, λ =254 nm.



Fonte: Autor.

Figura 25 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. botelhensis*, temperatura: 40 °C, vazão 0,8 mL.min⁻¹, λ =254 nm.

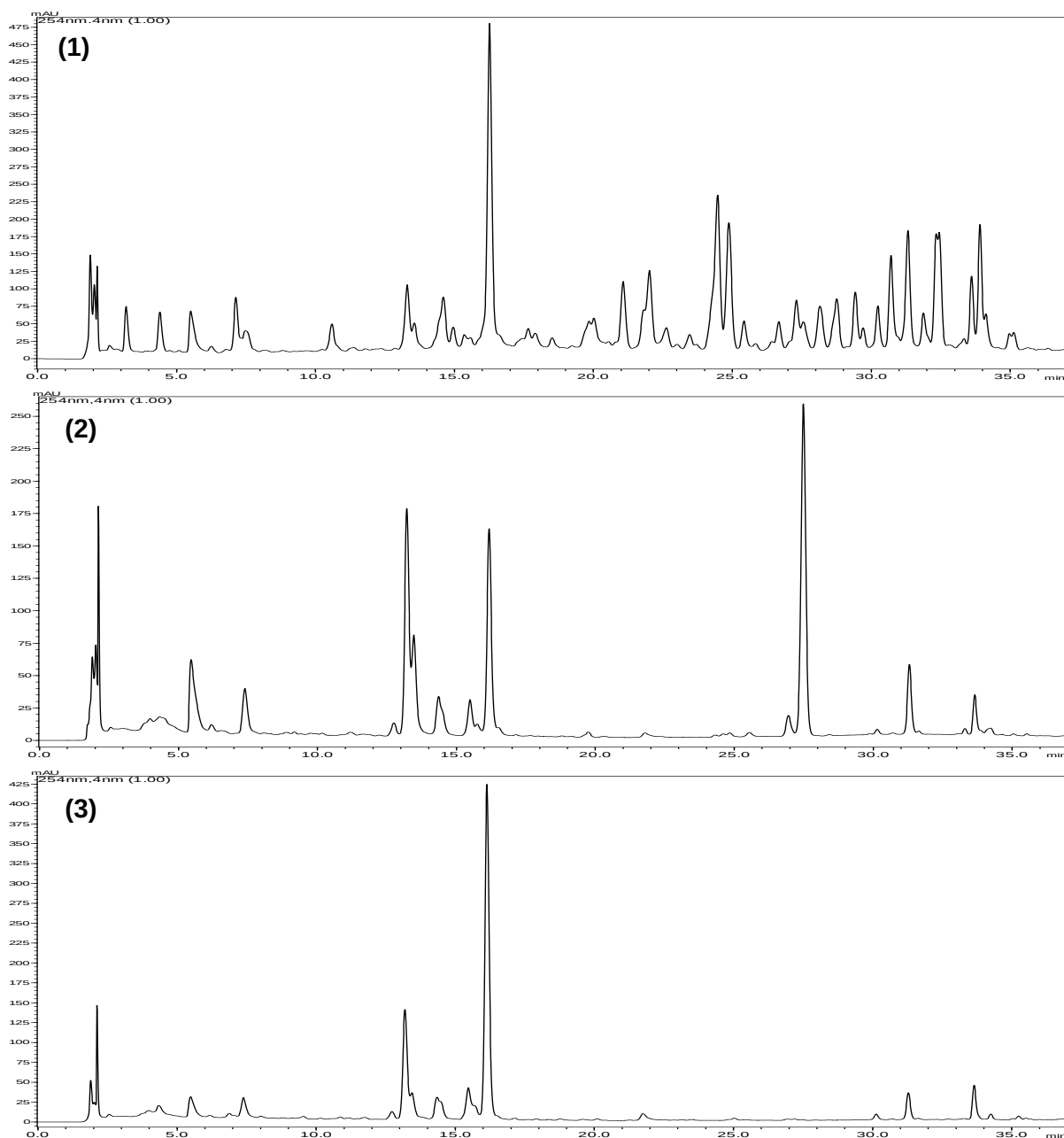


Fonte: Autor.

Analisando os cromatogramas, notou-se que a quantidade de picos entre as espécies apresenta grande variação. Dados da literatura indicam que a *C. mandioccana* apresenta de fato uma maior diversidade de metabólitos. Problemas como extração pouco efetiva ou quantidade pequena de material vegetal utilizado para a extração das outras espécies pode ter interferido nos resultados, fazendo com que o limite de detecção das substâncias não tenha sido atingido.

Para as análises por HPLC-MS e HPLC-MS/MS, foram realizadas mudanças no tempo das rampas do gradiente otimizado, para que as análises fossem mais rápidas. Com isso, obteve-se o seguinte gradiente: 85:15 - 60:40 (A:B) em 25 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 2 minutos seguido por eluição isocrática 0:100 (A:B) por 6 minutos, a fase móvel foi composta por água ultra pura 0,1% ácido fórmico/etanol grau HPLC da marca J. T. Baker (A:B). Com esta condição realizaram-se também análises por HPLC-DAD para comparação do tempo de retenção entre os equipamentos utilizados. Os cromatogramas obtidos para as três espécies são apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cryptocarya* com gradiente otimizado ajustado para HPLC-MS e HPLC-MS/MS, temperatura: 40 °C, vazão 0,8 mL.min⁻¹, λ =254 nm. *C. mandioccana* (1), *C. moschata* (2) e *C. botelhensis* (3).



Fonte: Autor.

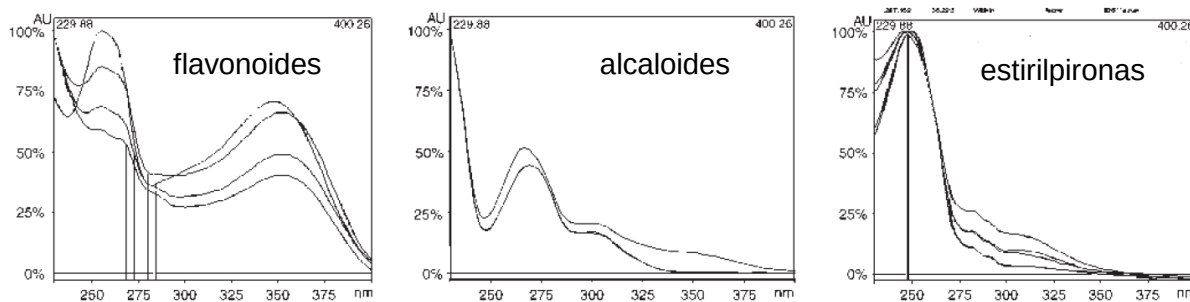
4.3 Análise dos espectros no ultravioleta obtidos por HPLC-DAD

Uma análise dos espectros no UV obtidos seria de grande auxílio para o conhecimento das classes de metabólitos presentes nos extratos de folhas das

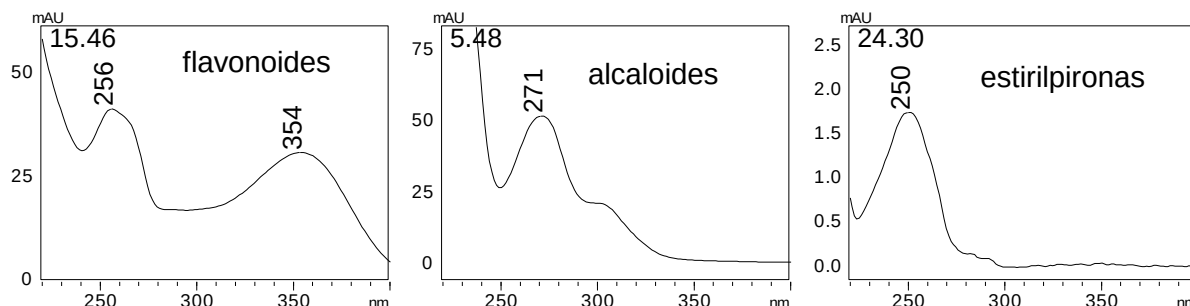
espécies de *Cryptocarya*, além de fornecer uma visão geral da faixa de tempos de retenção dessas classes com o gradiente utilizado. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas nas análises por HPLC-MS e HPLC-MS/MS: 85:15 - 60:40 (A:B) em 25 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 2 minutos, seguido por 6 minutos em eluição isocrática 0:100 (A:B) por 6 minutos. A fase móvel foi composta por água 0,1% HCO₂H (A) e etanol (B), temperatura da coluna 40 °C e vazão 0,8 mL.min⁻¹.

Levando em consideração as substâncias já identificadas em *C. mandioccana* e *C. moschata* (Seções 1.2.1 e 1.2.2 respectivamente), buscamos por espectros referentes às estilipironas, alcalóides aporfínicos e flavonóides. Na figura 27 são apresentados alguns dos espectros obtidos com as bandas características dessas classes de metabólitos juntamente com os espectros no UV obtidos por Nehme e colaboradores (2005) que foram utilizados como modelo.

Figura 27 - Espectros no UV obtidos por Nehme e colaboradores (2005) para flavonoides, alcaloides e estilipironas (respectivamente) das folhas de *C. mandioccana* (espectros superiores), e espectros obtidos no presente trabalho para as mesmas classes metabólicas (espectros inferiores).



Fonte: Nehme et al., (2005).

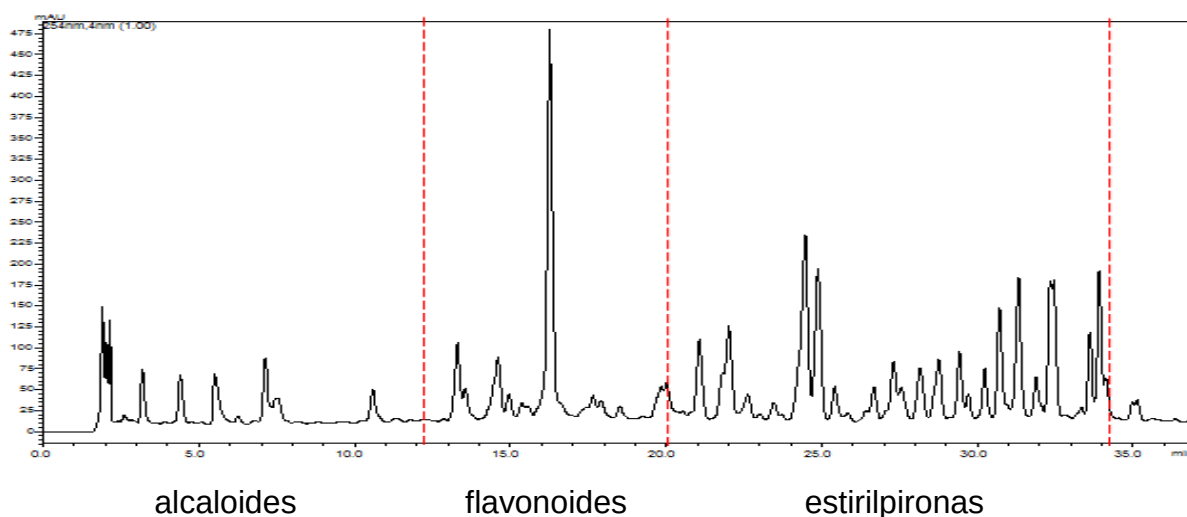


Fonte: Autor.

Os flavonoides podem ser caracterizados por um espectro no UV contendo dois máximos de absorvância: a Banda I entre 300 e 380 nm e a Banda II entre 240 e 280 nm, sendo que a posição dessas bandas podem indicar o tipo de flavonoide e seu padrão de substituição (STEFONA; STAFILOV; KULEVANONA, 2003). Para as estililpironas, a banda entre 220 e 255 nm é característica para a classe metabólica (transição $\pi \rightarrow \pi^*$), podendo apresentar também uma banda menos intensa em 290 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) (TELASCREIA, 2006). No caso dos alcaloides aporfínicos, a banda principal se encontra na região entre 268 e 282 nm (BHAKUNI; TEWARI; DHAR, 1972).

Analisando o tempo de retenção referente a cada uma das classes metabólicas presentes nos extratos estudados, são encontradas leves variações entre as faixas de tempo de retenção, porém, de forma geral, a eluição segue na seguinte ordem: alcaloides (tempos de retenção inferiores aos 12 minutos), flavonoides (tempos de retenção entre 12 e 20 minutos) e por ultimo as estililpironas (tempos de retenção entre 20 e 34 minutos). Uma representação das faixas de tempo de retenção características das classes metabólicas pode ser visto na Figura 28.

Figura 28 - Região no cromatograma onde se encontram as classes metabólicas detectadas.



Fonte: Autor.

A ordem de eluição está diretamente ligada a polaridade das substâncias. Como utilizamos uma coluna de fase reversa, as moléculas mais polares

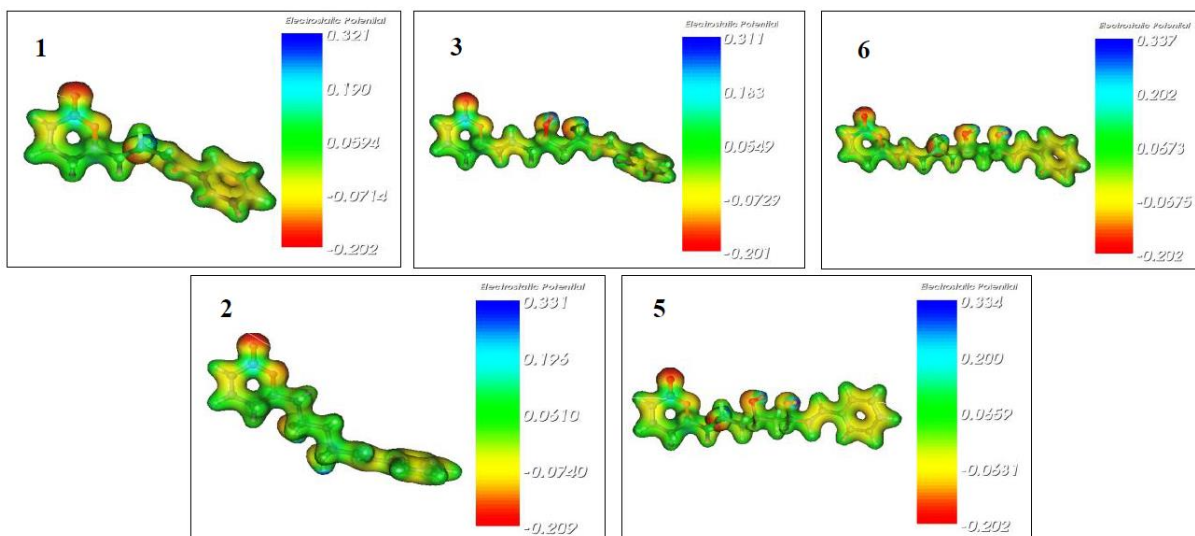
apresentam menores tempos de retenção, conforme a polaridade diminui, o tempo de retenção aumenta. Os alcaloides apresentam a maior polaridade devido a existência de um nitrogênio quaternário em sua estrutura, como podemos observar na menisperina **(33)** e na xantoplanina **(34)** (Figura 5). Já as estilipironas apresentam menor polaridade devido ao menor número de hidroxilas, enquanto os flavonoides glicosilados possuem número significativamente maior de hidroxilas, fazendo com que eles apresentem polaridade e tempo de retenção intermediários.

4.4 Análise por HPLC-MS

Utilizando os dados obtidos com o levantamento das estilipironas isoladas das espécies de *Cryptocarya*, foi realizada uma busca direcionada a esses metabólitos. O espectrômetro foi operado nos modos negativo e positivo, sendo que, em modo negativo procurou-se pelos íons $[M]^-$ e $[M-H]^-$ e em modo positivo pelos íons $[M]^+$, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$. As análises por HPLC-MS foram realizadas seguindo as condições descritas na seção 3.7 utilizando o extrato hidroalcoólico de folhas das espécies estudadas.

Entre os íons procurados, os mais frequentes foram os adutos de sódio $[M+Na]^+$. Com os estudos do mapa eletrostático molecular (MEP) realizados por Passareli (2014) em cinco estilipironas, concluiu-se que o átomo mais nucleofílico presente nessas moléculas é o oxigênio da carbonila do anel pirônico, indicando que este seria o melhor sítio para a interação com uma carga positiva (Figura 29).

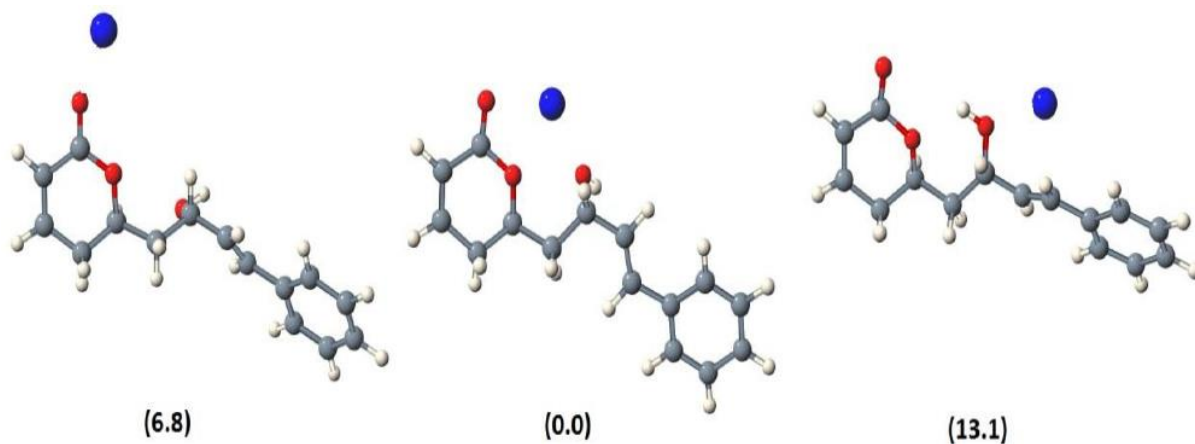
Figura 29 - Mapas do potencial eletrostático molecular (MEP) de cinco estilipironas selecionadas. As regiões vermelhas são as mais nucleofílicas (PASSARELI, 2014).



Fonte: Passareli (2014).

Para uma melhor compreensão da interação das estilipironas com o Na^+ , Passareli (2014) realizou também cálculos da estrutura eletrônica molecular com os possíveis centros de interação, sendo que, a maior estabilidade (menor energia de Gibbs) foi obtida no conformero em que o íon Na^+ interage com o oxigênio carbonílico do anel pirônico (Figura 30).

Figura 30 - Conformeros mais estáveis para a interação do Na^+ e a estilipirona desacetilcriptocarialactona (**24**) (PASSARELI, 2014).



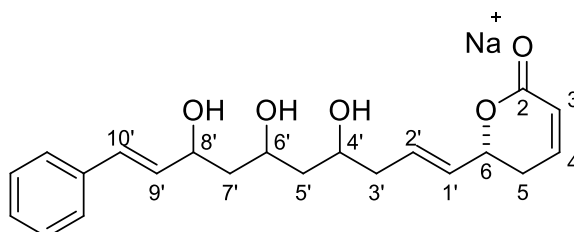
Fonte: Passareli (2014).

Levando em conta que o tempo de retenção das estilipironas presentes são superiores aos 20 minutos, como descrito na seção 4.4, íons com tempos de

retenção inferiores a esse valor foram descartados, pois esta região apresenta majoritariamente flavonóides.

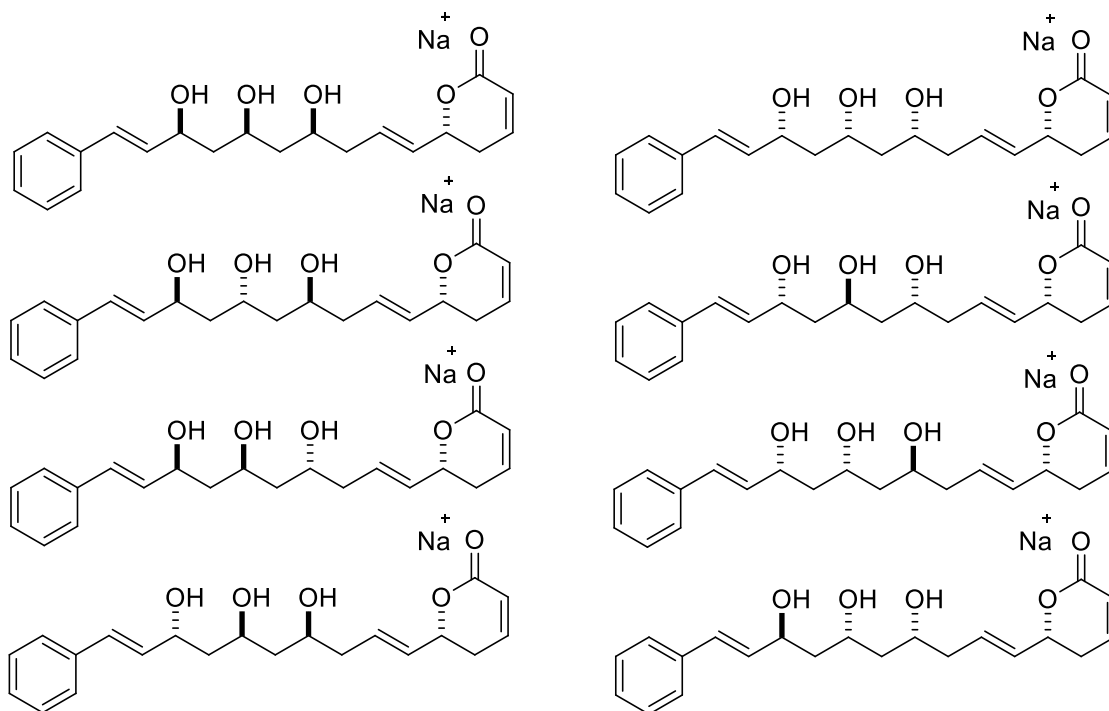
Devido a variedade estereoisomérica possível para as estilipironas de *Cryptocarya*, podem existir mais de um pico referente ao íon selecionado. Usando o íon m/z 381 (Figura 31) e fixando o carbono da posição 6 na configuração *R*, característico das estilipironas de *Cryptocarya*, restam 3 carbonos quirais (posições 4', 6' e 8'), dessa forma, podem existir até 8 estereoisômeros ($2^3 = 8$) dessa estrutura. Os 8 estereoisômeros possíveis estão representados na figura 32.

Figura 31 - Íon com m/z 381, os carbonos 4', 6' e 8' são carbonos quirais.



Fonte: Autor.

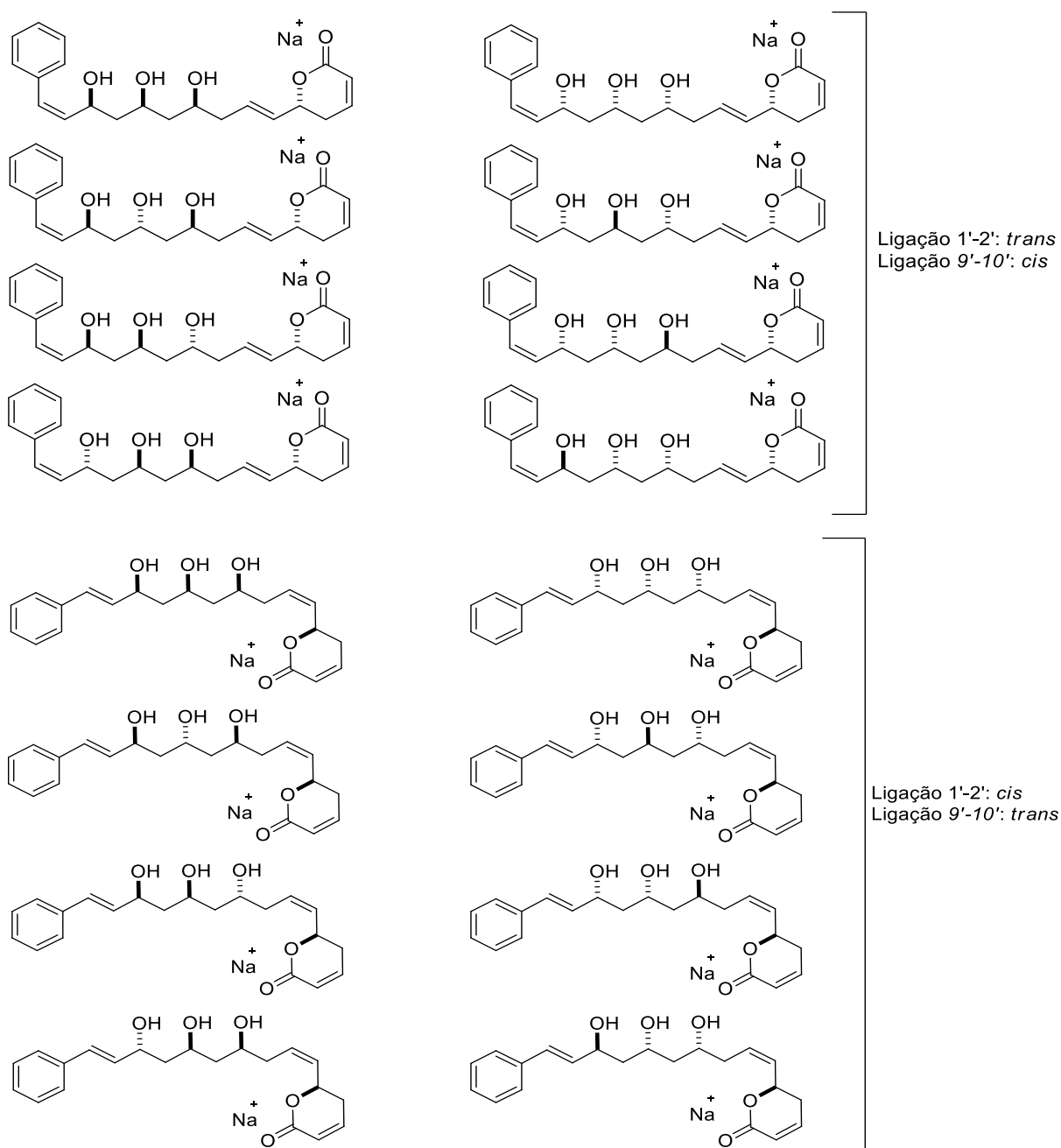
Figura 32 - Representação dos estereoisômeros possíveis para o íon m/z 381 com a mudança de configuração nos carbonos quirais, exceto C6, mantido com configuração *R*.



Fonte: Autor.

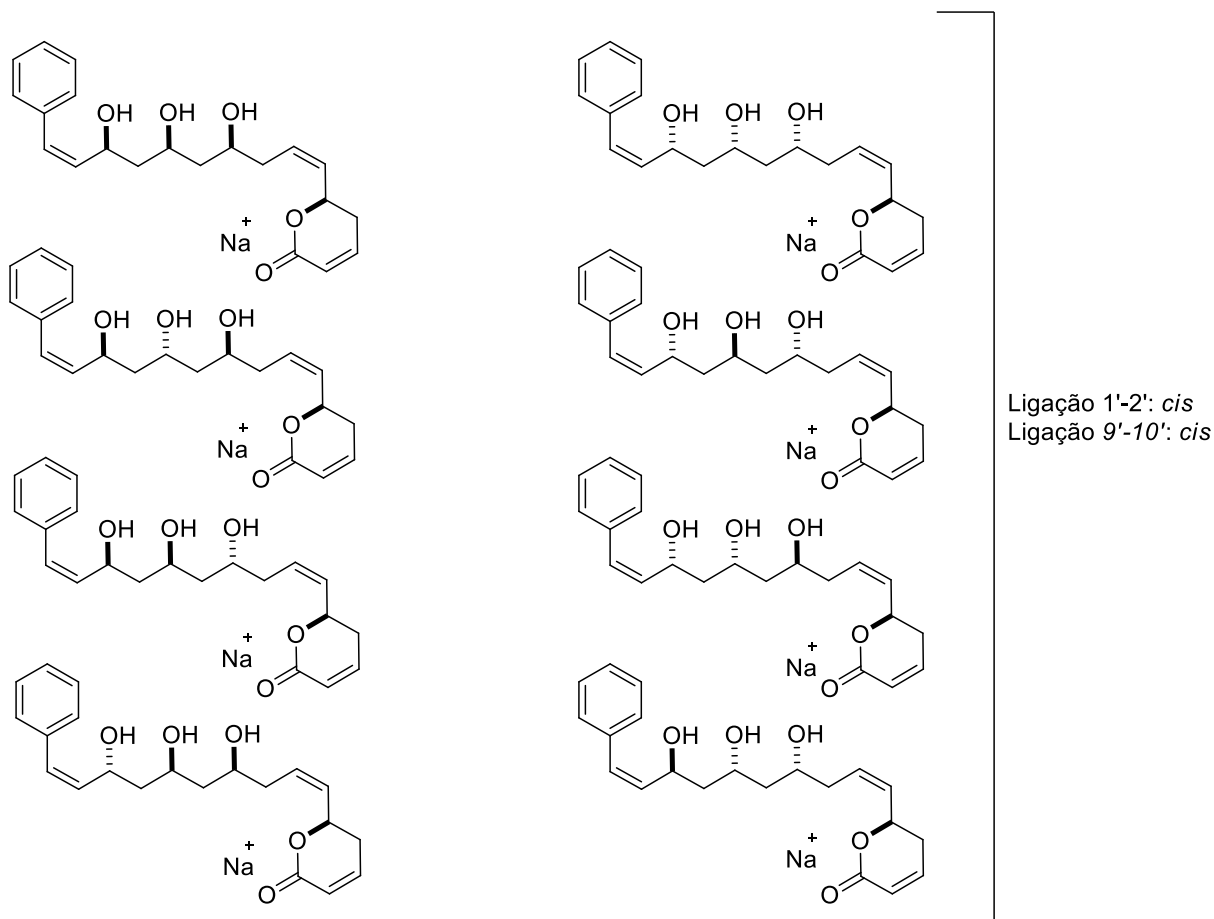
Porém, além da existência dos carbonos quirais, as ligações duplas entre os carbonos 1'-2' e 9'-10' também são centros estereogênicos, podendo apresentar configuração *cis* ou *trans*, no caso da Figura 32 ambas as duplas se encontram na configuração *trans*. Com a mudança na configuração dessas ligações formam-se outros 24 estereoisômeros, representados na Figura 33.

Figura 33 - Representação dos estereoisômeros possíveis para o íon m/z 381 com a mudança da configuração das ligações duplas levando em conta as configurações possíveis nos carbonos quirais, exceto C6, mantido com configuração *R*.



Fonte: Autor.

Figura 33 (continuação) - Representação dos estereoisômeros possíveis para o íon m/z 381 com a mudança da configuração das ligações duplas levando em conta as configurações possíveis nos carbonos quirais, exceto C6, mantido com configuração *R*.



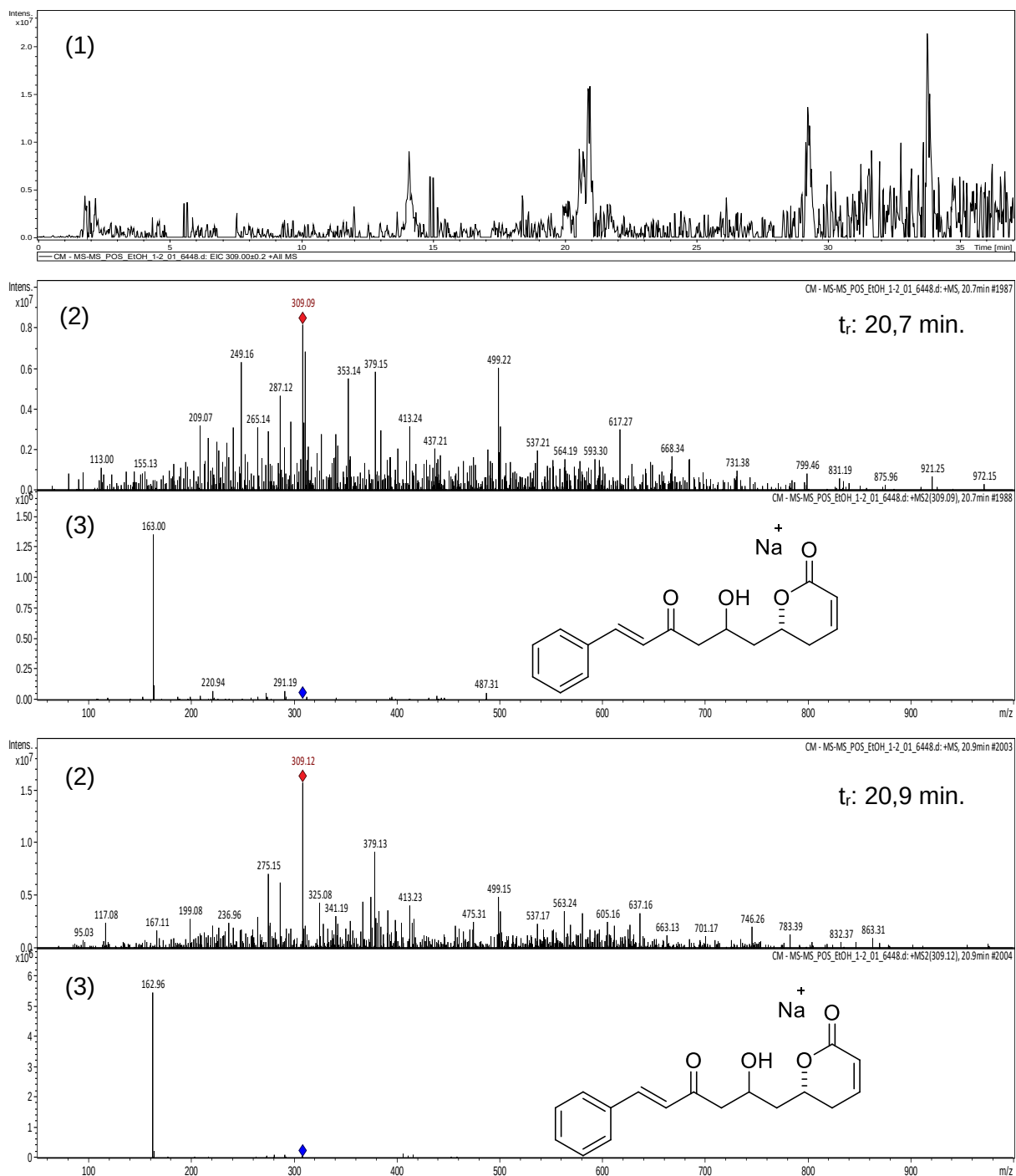
Fonte: Autor.

Considerando todas as possibilidades apresentadas, obteve-se 32 estereoisômeros. Com o levantamento das estilpironas identificadas nas espécies de *Cryptocarya*, pode-se afirmar que a possibilidade da presença de alguma estilpirona com ligação dupla da cadeia lateral na configuração *cis* é muito pequena, pois elas foram relatadas em apenas um estudo (STURGEONet al., 2008), em que foram identificadas duas substâncias com essa configuração. Somado a isso, temos o fato de nunca ter sido relatada uma estilpirona de *Cryptocarya* com configuração *cis* na ligação 1'-2', dessa forma, caso existam estereoisômeros presentes, a maior probabilidade é a detecção de no máximo 8 sinais para o íon com m/z 381, referentes aos diastereoisômeros apresentados na Figura 32. A

quantidade de sinais possíveis varia dependendo da estrutura da estirilpirona e da quantidade de centros estereogênicos.

A seguir (Figuras de 34 a 39) são apresentados alguns dos cromatogramas de íon extraído gerados a partir dos valores dos adutos de sódio das possíveis estirilpironas presentes nas espécies estudadas juntamente com seus espectros de massas de primeira e segunda ordem, os dados complementaresse encontram anexados (Anexos de 1 a 6).

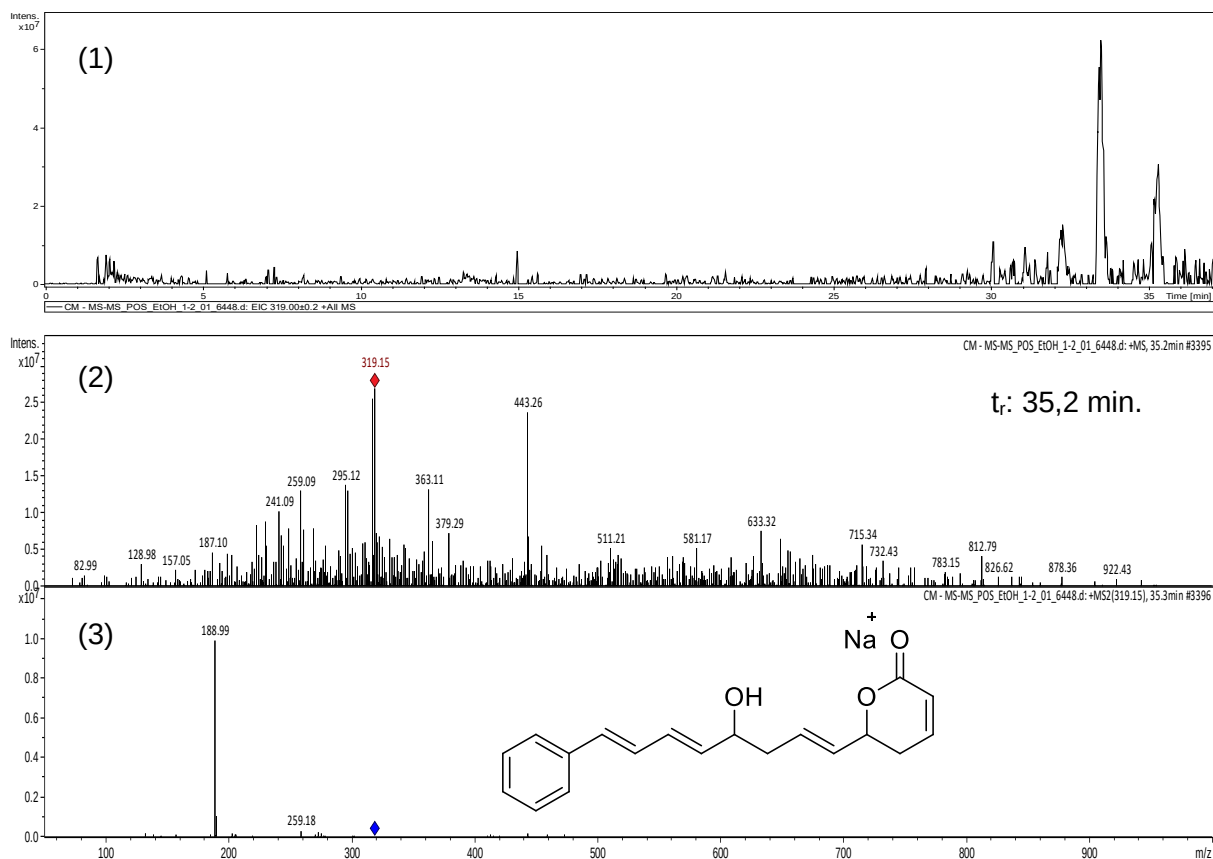
Figura 34 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon com m/z 309 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura da possível substância. t_r : tempo de retenção.



Fonte: Autor.

O íon de m/z 309 refere-se a substância **(46)** (Figura 12), isolada das folhas da *C. kurzii* (FU et al., 1993), mas sem relatos para as folhas de *C. mandioccana*.

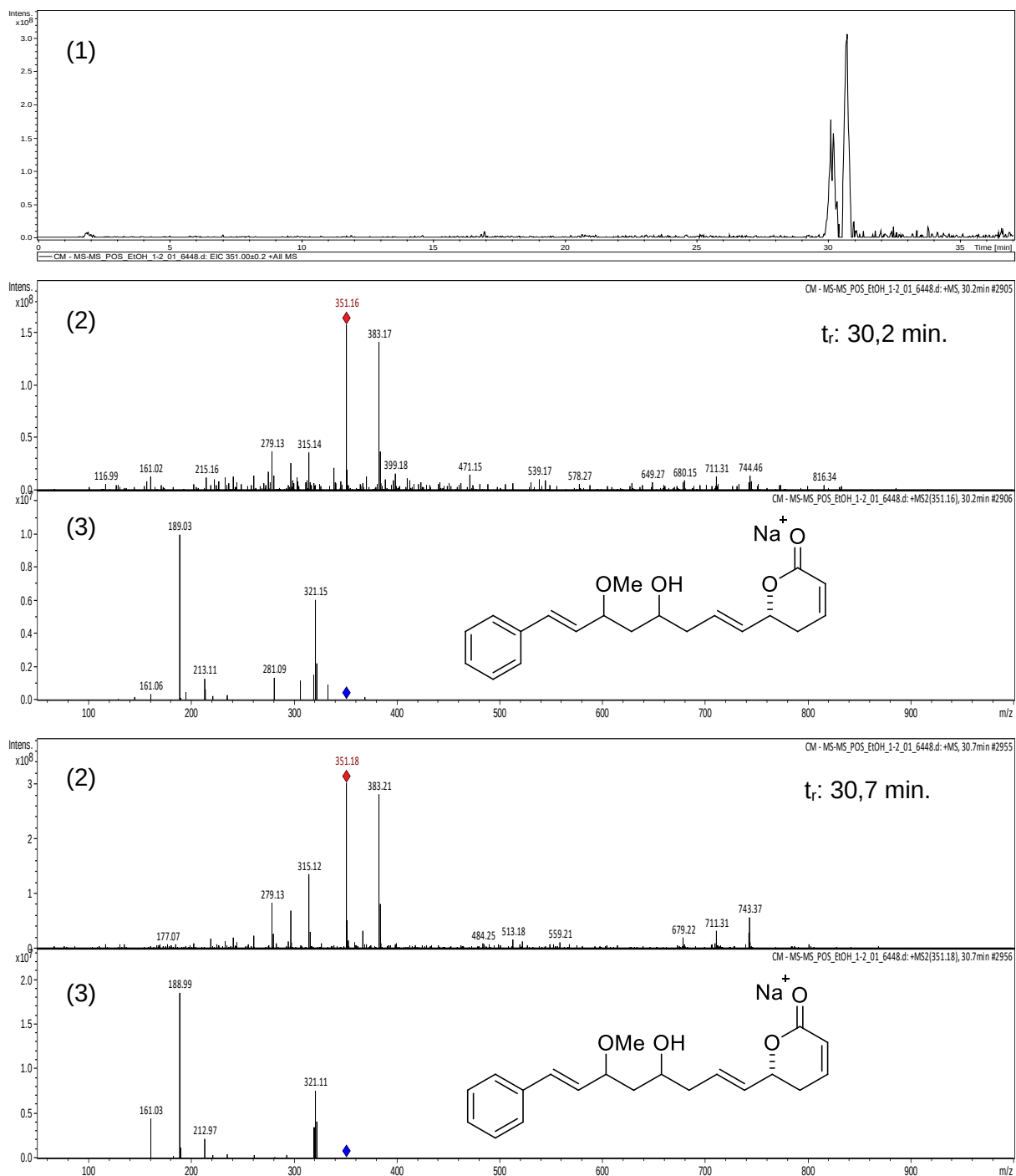
Figura 35 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 319 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura da possível substância. t_r : tempo de retenção.



Fonte: Autor.

O íon de m/z 319 refere-se provavelmente a substância **(47)** (Figura 12), isolada das cascas da *C. liebertiana* (DREWES et al., 1997), mas sem relatos para as folhas de *C. mandioccana*.

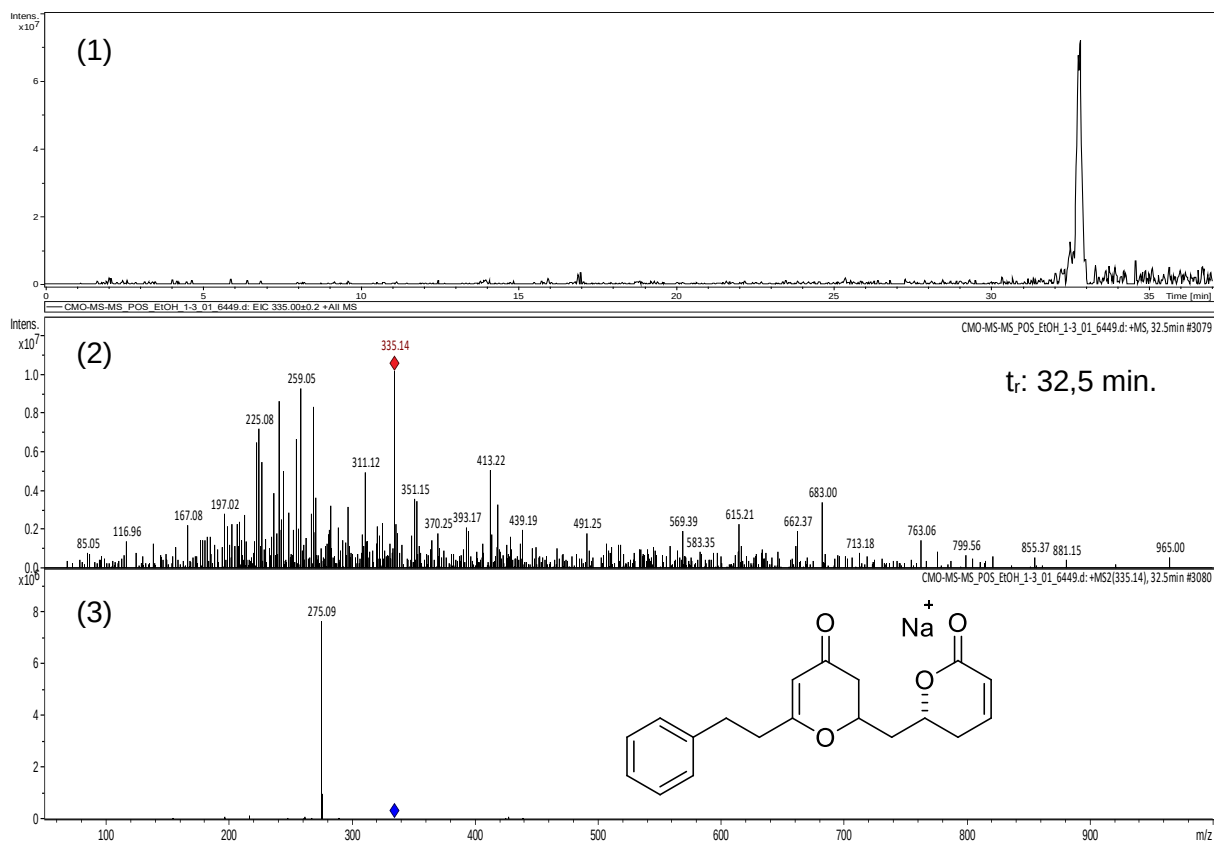
Figura 36 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 351 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura da possível substância. t_r : tempo de retenção.



Fonte: Autor.

O íon de m/z 351 refere-se a substância **(59)** (Figura 12), isolada do extrato bruto da *C. concinna* (STURGEON, 2008), mas sem relato para as folhas de *C. mandioccana*.

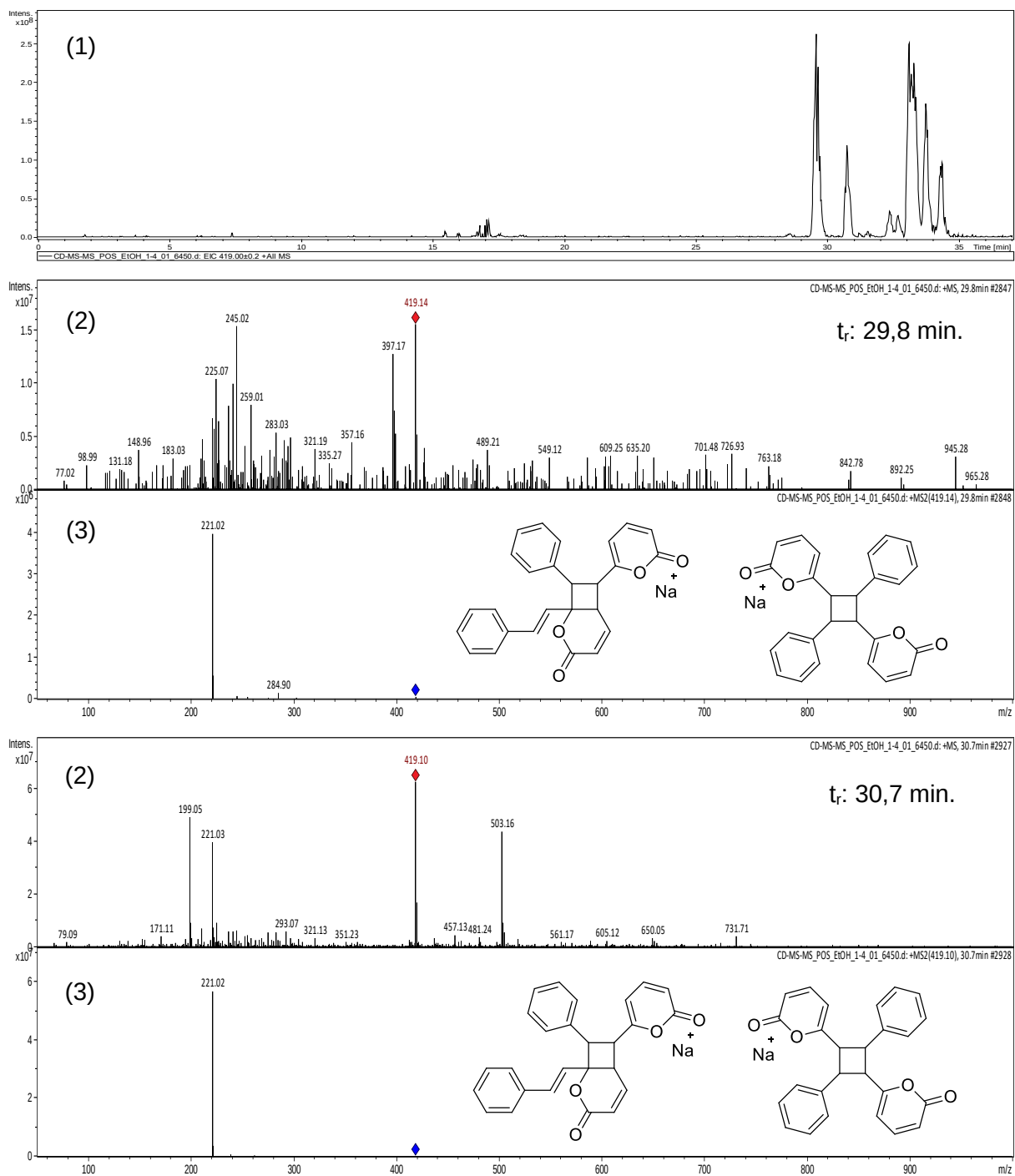
Figura 37 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 335 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. moschata* e estrutura da possível substância. tr: tempo de retenção.



Fonte: Autor.

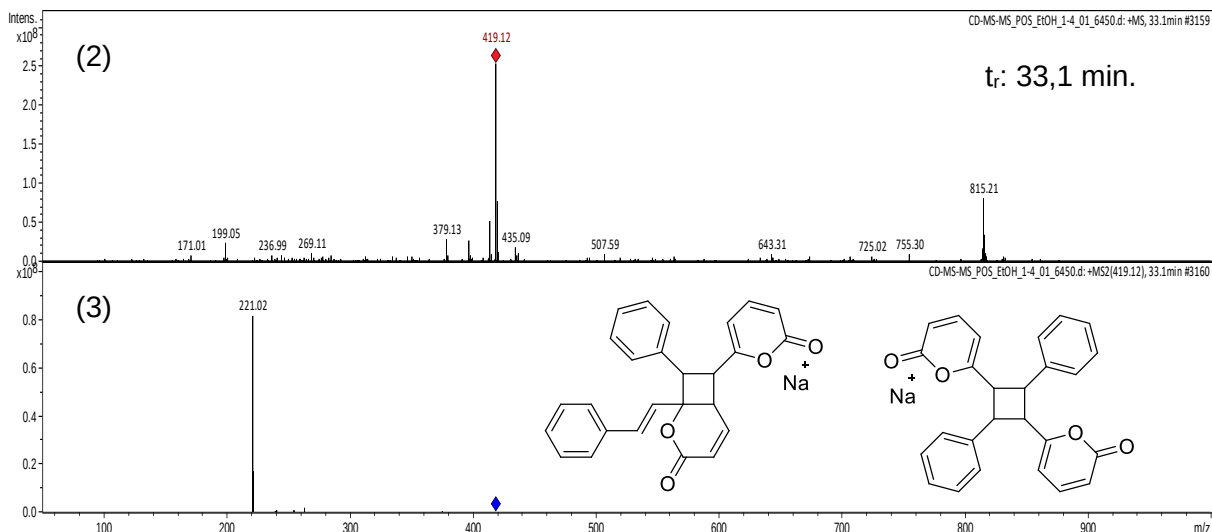
O íon de m/z 335 refere-se a substância **(55)** (Figura 12), isolada das folhas de *C. obovata* (DAVIS et al., 2010), mas sem relato para as folhas de *C. moschata*.

Figura 38 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 419 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. botelhensis* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.



Fonte: Autor.

Figura 38 (continuação) - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 419 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. botelhensis* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.

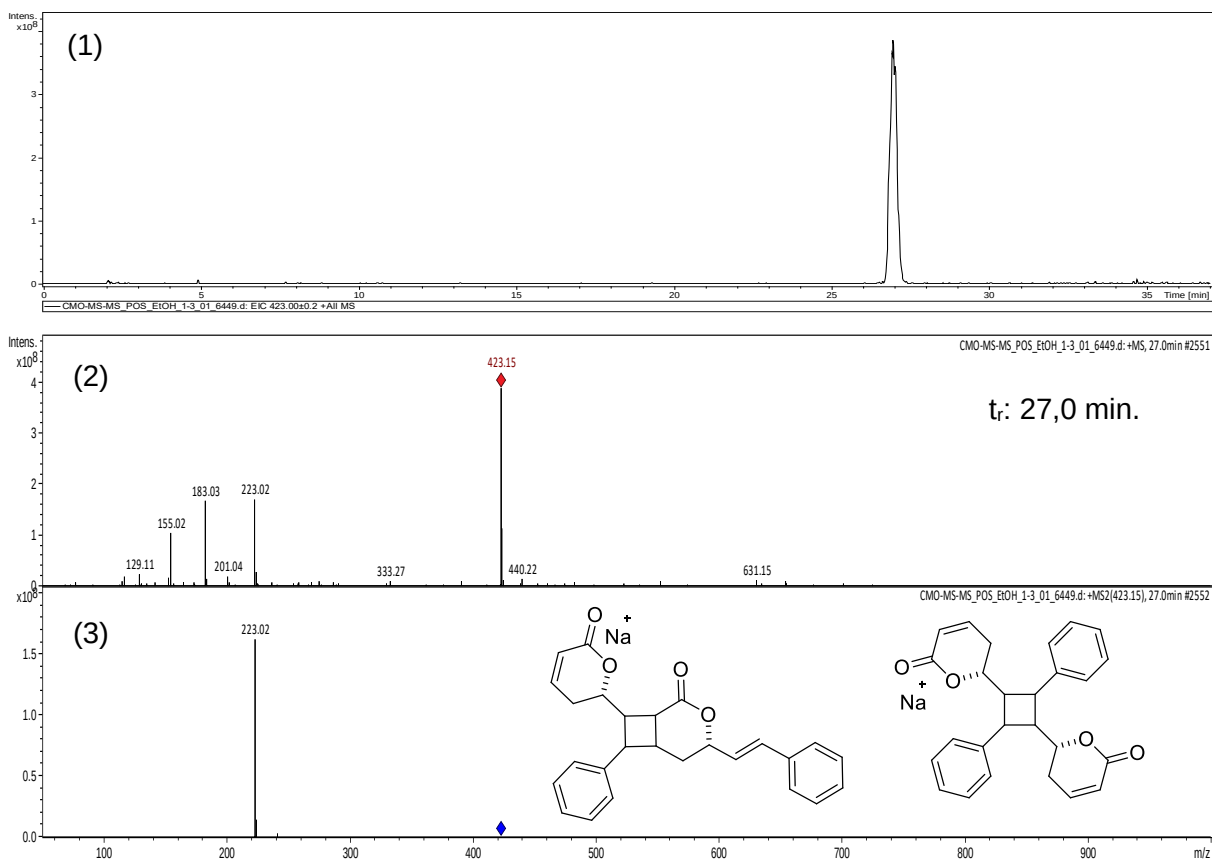


Fonte: Autor.

O íon com m/z 419 refere-se as substâncias **(41)** e **(45)** (Figura 12), isoladas das folhas de *C. moschata*, sendo que a substância **(41)** foi descrita por Telascrêa (2006) e a substância **(45)** por Martinelli (dados não publicados), mas sem relatos para as folhas de *C. botelhensis*.

Foi obtido também do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. moschata* o íon de m/z 423, cuja fragmentação gera unicamente o íon m/z 223, equivalente ao aduto de sódio da goniotalamina. A sugestão para o íon de m/z 423 é que seja um dímero de goniotalamina **(40)** (Figura 12). Na Figura 39 é apresentado o cromatograma de íon extraído, os espectros de massas de primeira e segunda ordem e sugestões de estruturas para a substância. A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 40.

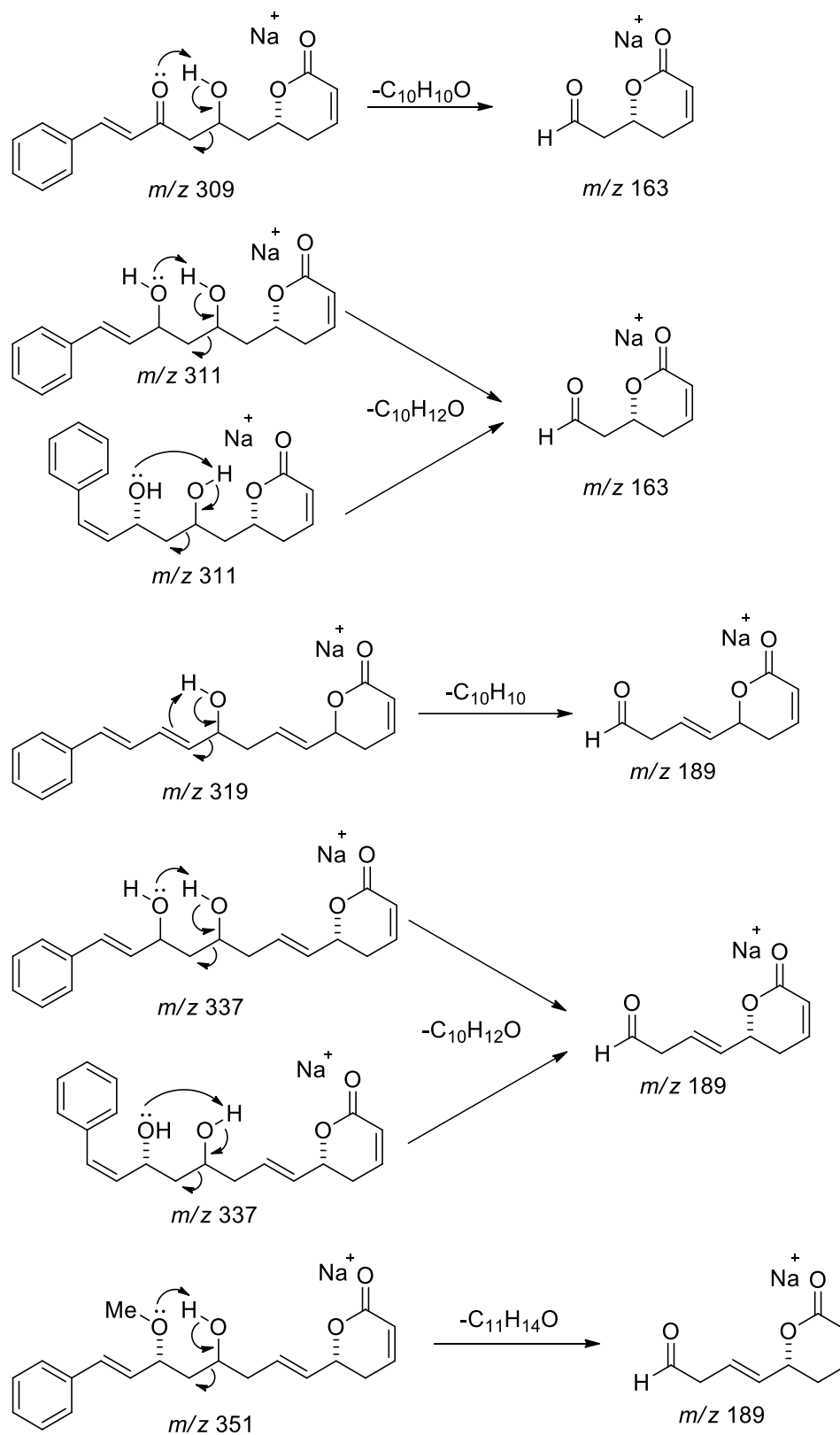
Figura 39 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 423 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. moschata* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.



Fonte: Autor.

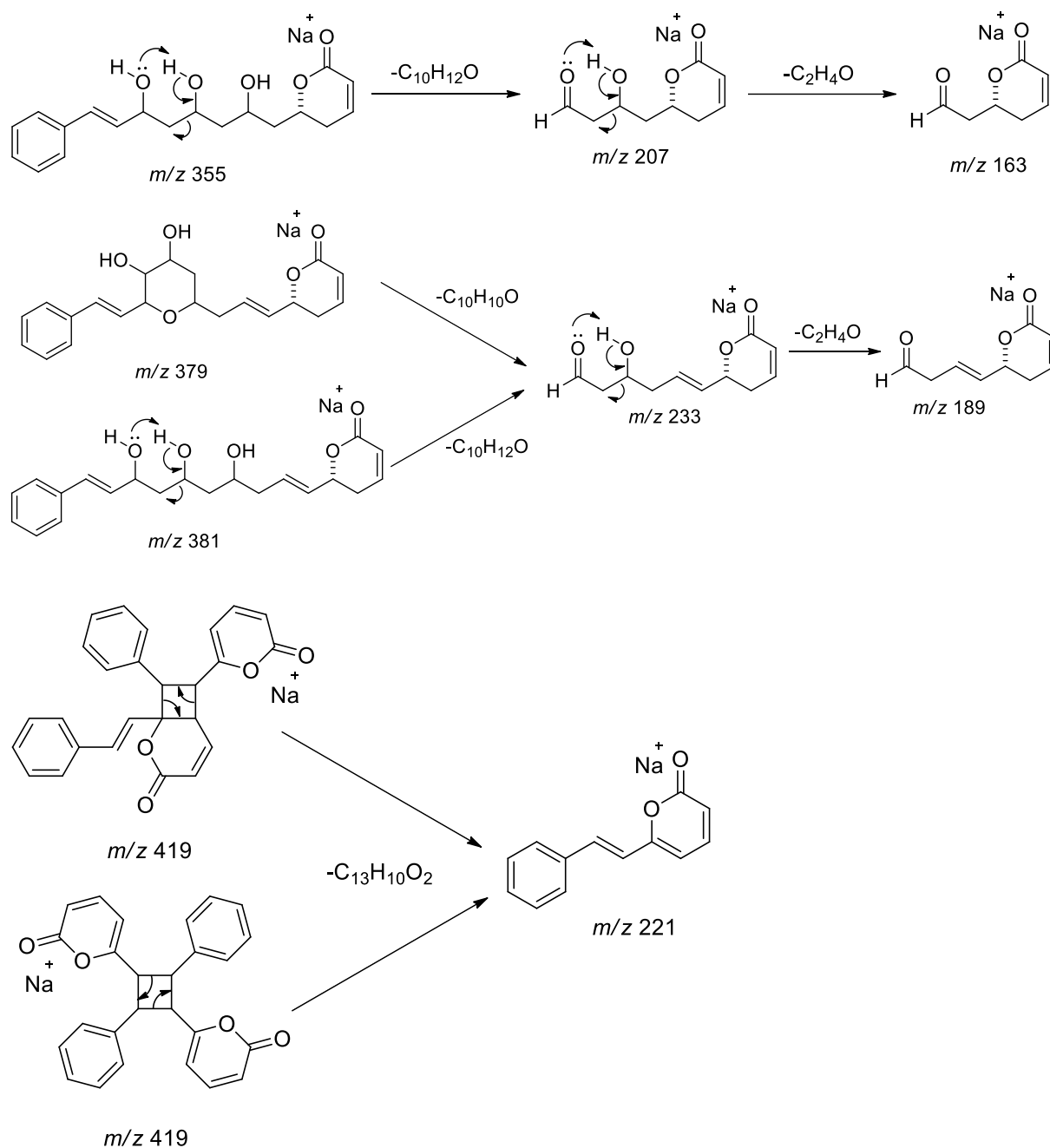
Levando em conta a possível localização do sódio nos íons $[M+Na]^+$ discutido na seção 4.5 e a fragmentação obtida com as análises por HPLC-MS/MS, pudemos sugerir os mecanismos de fragmentação para as estilipironas nas espécies de *Cryptocarya* estudadas (Figura 40). Utilizou-se como base os mecanismos de fragmentação sugeridos por PASSARELI (2014).

Figura 40 - Proposta de fragmentação das estilipironas de *Cryptocarya* cationizadas com sódio.



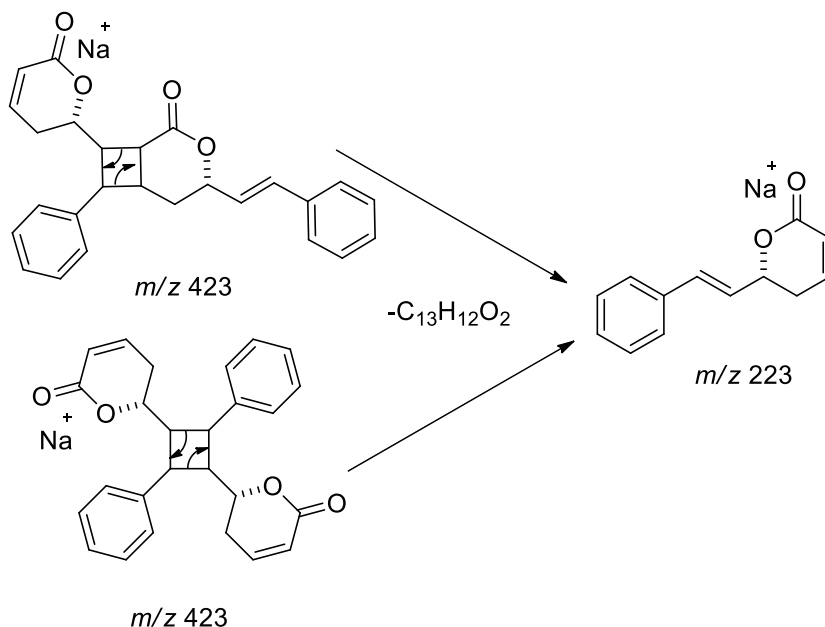
Fonte: Autor.

Figura 40 (continuação) - Proposta de fragmentação das estilipironas de *Cryptocarya* cationizadas com sódio. Em algumas das moléculas a estereoquímica não está representada devido a possível existência de estereoisômeros.



Fonte: Autor.

Figura 40 (continuação) - Proposta de fragmentação das estililpironas de *Cryptocarya* cationizadas com sódio. Em algumas das moléculas a estereoquímica não está representada devido a possível existência de estereoisômeros.



Fonte: Autor.

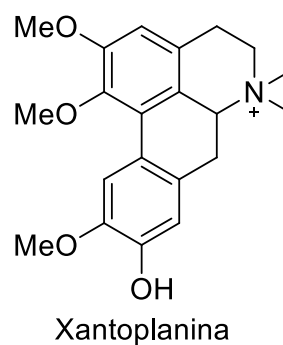
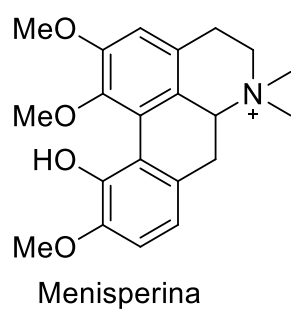
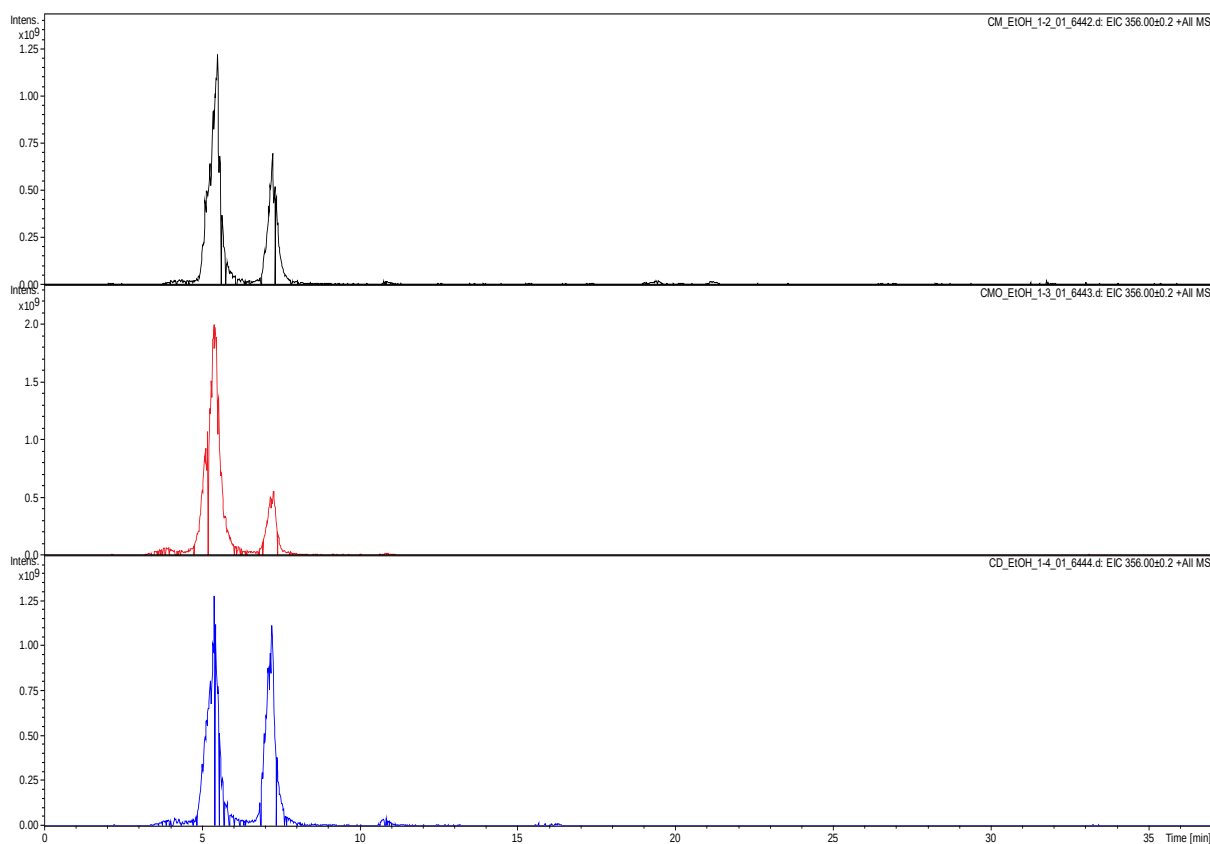
Com a análise dos mecanismos de fragmentação propostos e as fragmentações obtidas, notamos certas similaridades entre os mecanismos:

- Os íons de m/z 163 e m/z 189 são os íons produto provenientes da fragmentação das estililpironas detectadas, com exceção dos dímeros e da estililpirona (55);
- Estirilpironas hidroxiladas no carbono 2', com hidroxila ou carbonila no carbono 4' sofrem fragmentação formando íon produto de m/z 163;
- Estirilpironas com ligação dupla entre os carbonos 1' e 2' e hidroxila no carbono 4', formam o íon de m/z 189 desde que: o carbono 6' seja hidroxilado, ou, exista ligação dupla entre os carbonos 5' e 6';
- Estirilpironas trihidroxiladas podem passar por duas fragmentações diferentes, pois as hidroxilas interagem aos pares, porém, sempre chegarão aos íons produtos de m/z 163 ou m/z 189.

Além das estililpironas, pode-se destacar a presença do íon $[\text{M}]^+$ com m/z 356 encontrado nas três espécies estudadas nos mesmos tempos de retenção, possivelmente referentes aos alcaloides menisperina e xantoplanina, descritos, até o

momento, apenas para a espécie *C. mandioccana*. Na Figura 41 são apresentados os cromatogramas de íon extraído de m/z 356 para as três espécies, juntamente com a estrutura dos alcaloides sugeridas.

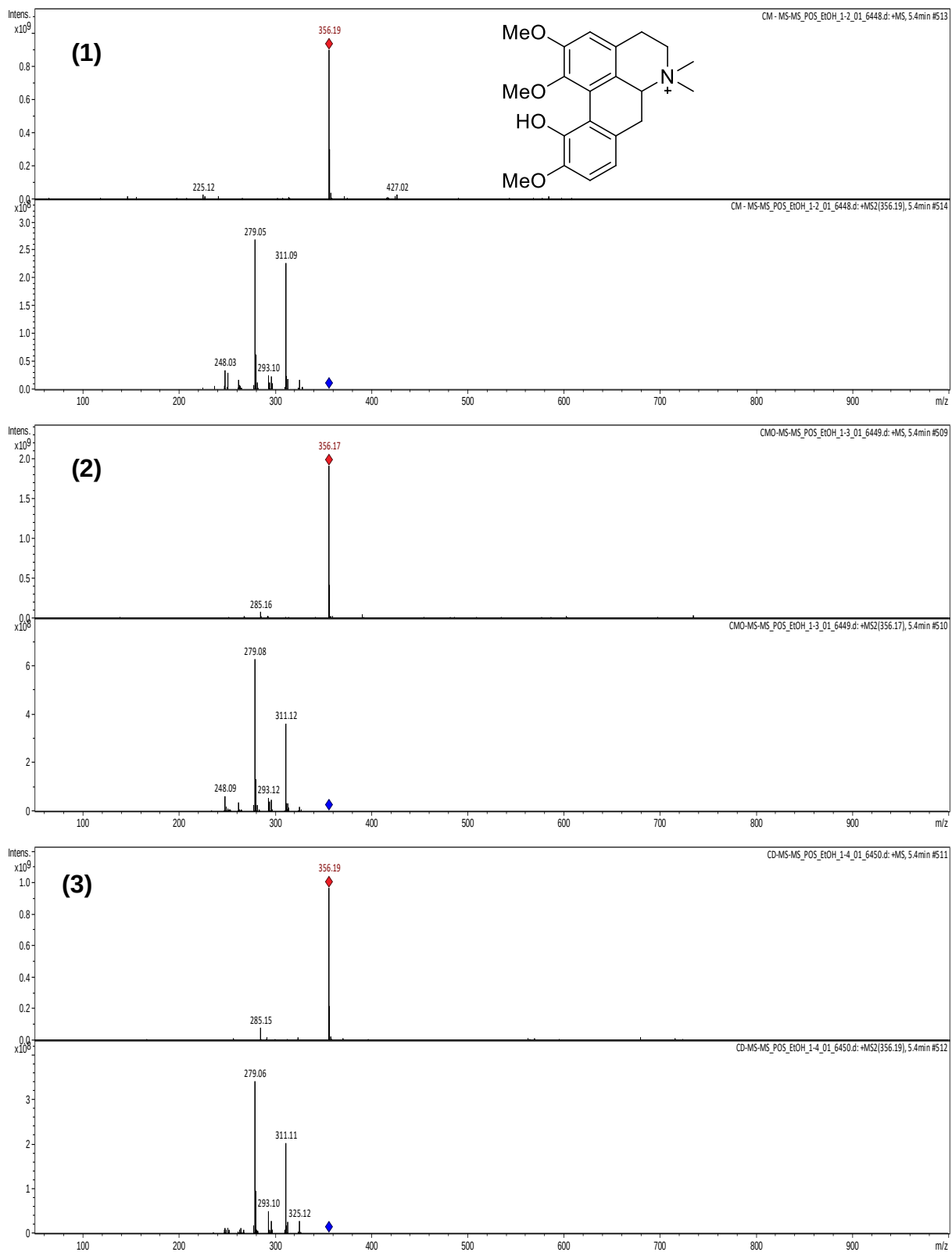
Figura 41 - Cromatograma do íon m/z 356 para as espécies de *Cryptocarya* juntamente com as estruturas dos alcaloides menisperina e xantoplanina. As cores dos cromatogramas representam as espécies, sendo que, preto: *C. mandioccana*, vermelho: *C. moschata* e azul: *C. botelhensis*.



Fonte: Autor.

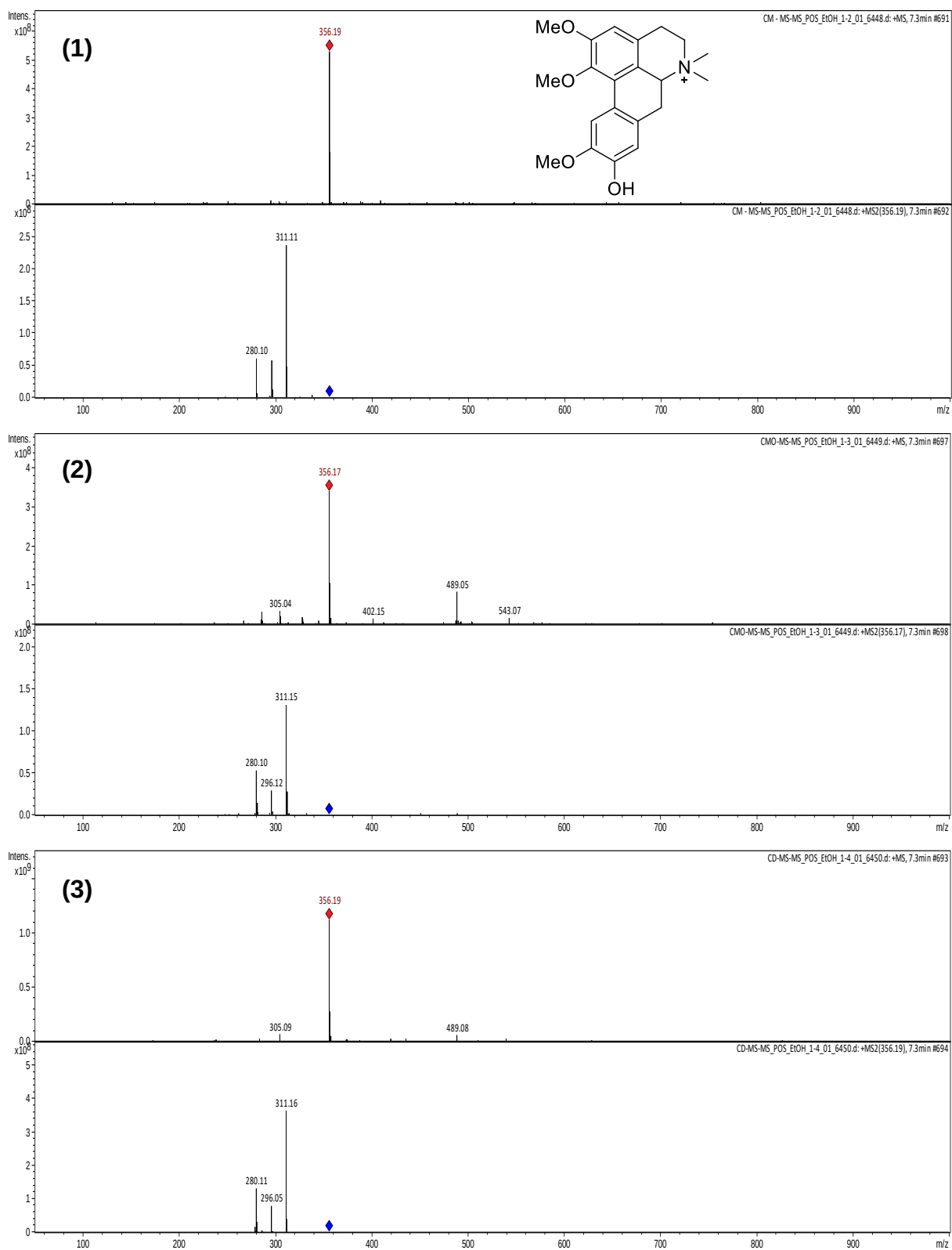
As suspeitas sobre a presença dos alcaloides menisperina e xantoplanina receberam maior embasamento com a fragmentação dos íons de m/z 356. Comparado os dados obtidos neste trabalho com os apresentados por Zhang e colaboradores (2006), são encontrados fragmentos equivalentes para os dois alcaloides, além disso, a ordem de eluição também é equivalente. A seguir são apresentados os espectros de massas de primeira e segunda ordem para a menisperina (Figura 42) e para a xantoplanina (Figura 43) para as três espécies de *Cryptocarya* estudadas, juntamente com suas estruturas.

Figura 42 - Espectros de massas de primeira e segunda ordem do íon de m/z 356 obtido do extrato das folhas de *C. mandioccana* (1), *C. moschata* (2) e *C. botelhensis* (3) com tempo de retenção de 5,4 minutos e estrutura da menisperina.



Fonte: Autor.

Figura 43 - Espectros de massas de primeira e segunda ordem do íon de m/z 356 obtido do extrato das folhas de *C. mandioccana* (1), *C. moschata* (2) e *C. botelhensis* (3) com tempo de retenção de 7,3 minutos e estrutura da xantoplanina.

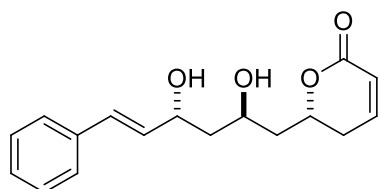


Fonte: Autor.

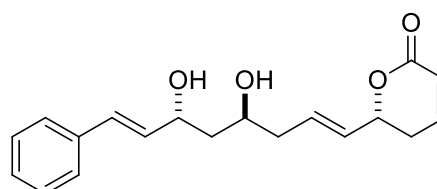
4.5 Análise de padrões de pirona

As quatro pironas analisadas por HPLC-DAD estão representadas na Figura 44, as quais foram atribuídos os códigos de EP1 a EP4.

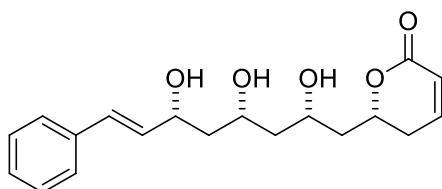
Figura 44 - Estirilpironas purificadas analisadas por HPLC-DAD.



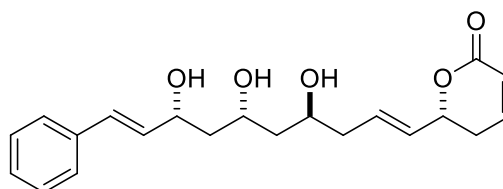
Criptomoscatoína D1 (EP1)



Criptofoliona (EP2)



Criptomoscatoína E3 (EP3)

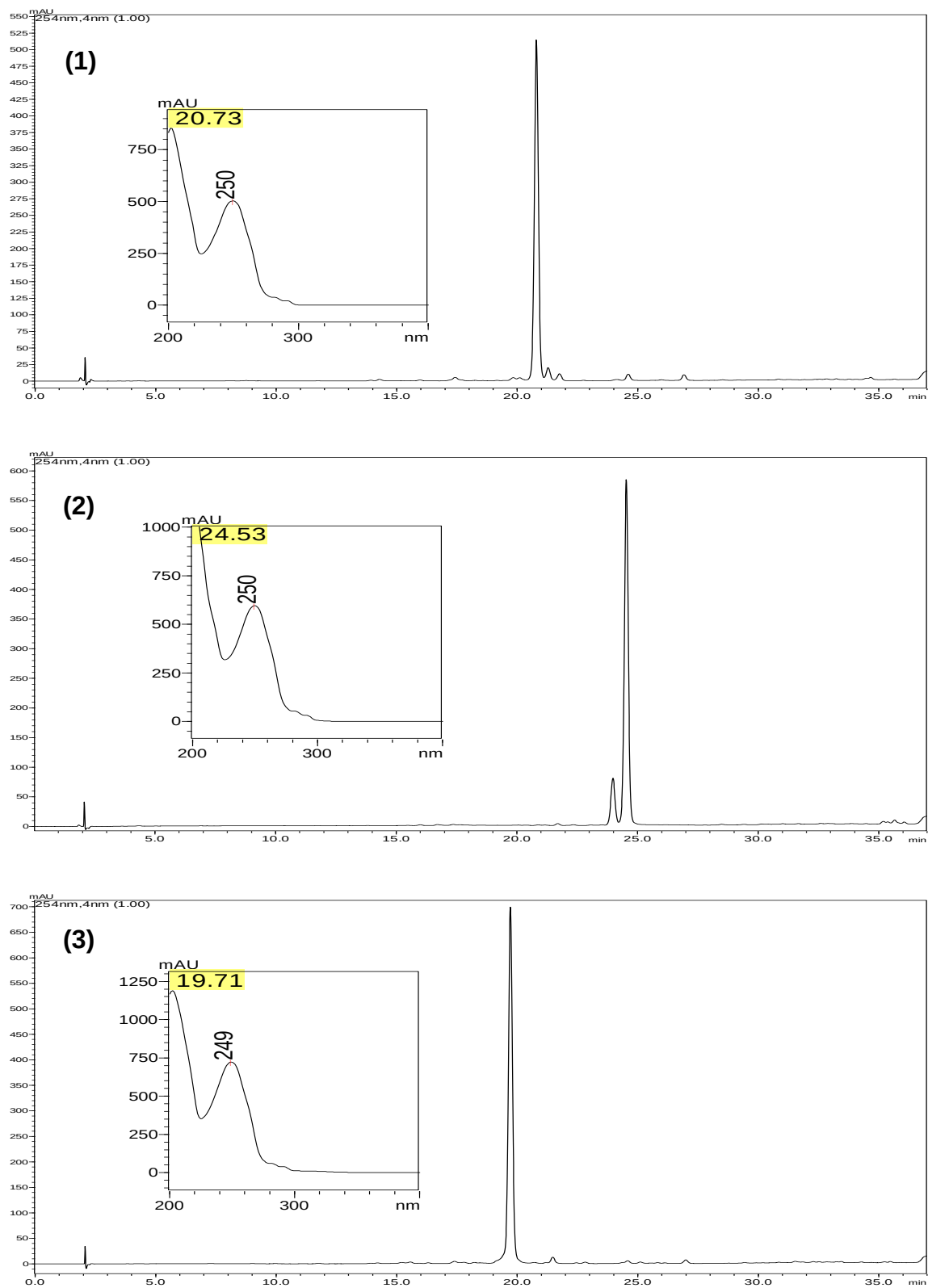


Criptomoscatoína F1 (EP4)

Fonte: Autor.

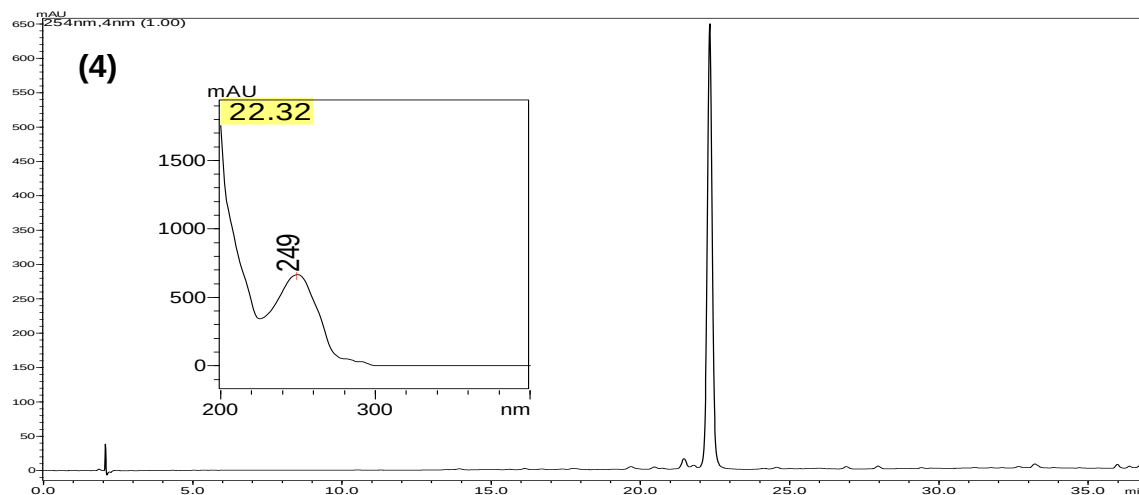
As condições de análise estão descritas na seção 3.7. Na Figura 45 são apresentados os cromatogramas para as 4 estirilpironas, juntamente com seus espectros no UV.

Figura 45 - Cromatogramas das estilpironas purificadas juntamente com seus espectros no UV e tempo de retenção. EP1 (1), EP2 (2), EP3 (3) e EP4 (4), $\lambda=254$ nm,



Fonte: Autor.

Figura 45 (continuação) - Cromatogramas das estirilpironas purificadas juntamente com seus espectros no UV e tempo de retenção. EP1 (1), EP2 (2), EP3 (3) e EP4 (4), $\lambda=254$ nm,



Fonte: Autor.

Os espectros no UV obtidos são coerentes com o esperado, apresentando uma banda intensa na região dos 250 nm, além disso, o tempo de retenção é bem próximo do sugerido na seção 4.4, em que as estirilpironas apresentariam tempo de retenção superior aos 20 minutos, para o gradiente utilizado. Com os tempos de retenção obtidos, foi realizada a comparação com o tempo de retenção dos adutos de sódio das respectivas substâncias nas análises por HPLC-MS/MS, esses dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tempos de retenção (t_r) das pironas purificadas analisadas por HPLC-DAD e seus adutos de sódio equivalentes obtidos por HPLC-MS/MS.

Pirona / aduto de sódio	t_r pironas (min.)	t_r adutos (min.)
EP1 / aduto m/z 311	20,73	19,7
		20,5
		21,4
EP2 / aduto m/z 337	24,3	22,8
		23,6
		24,3
EP3 / aduto m/z 355	19,71	19,5
		20,2
		21,2
EP4 / aduto m/z 381	22,32	22,0
		23,5

Analisando os dados de tempo de retenção, podemos notar a proximidade entre os valores, isso, juntamente com o espectro de massas de segunda ordem reforçam a possibilidade das estirilpironas purificadas analisadas estarem presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* utilizado neste trabalho. A variação entre os tempos de retenção já era esperada devido a mudança de equipamento utilizado entre as análises de HPLC-DAD e HPLC-MS/MS. A presença de mais vários tempos de retenção para um mesmo aduto possivelmente é decorrente da existência de estereoisômeros.

Nas espécies *C. moschata* e *C. botelhensis* não foram encontrados os íons m/z 311, m/z 337, m/z 355 e m/z 381.

5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e otimizado com auxílio da quimiometria um método de análise cromatográfica para o extrato hidroalcoólico das folhas de espécies de *Cryptocaria*. Esse método utiliza etanol como solvente orgânico, sendo menos tóxico do que os solventes orgânicos utilizados em estudos anteriores (metanol e acetonitrila), facilitando seu descarte e manuseio durante as análises. O método consiste no seguinte gradiente segmentado: 85:15 - 60:40 (A:B) em 25 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 2 minutos, seguido por 6 minutos em eluição isocrática 0:100 (A:B) por 6 minutos, fase móvel foi composta por água 0,1% HCO₂H (A) e etanol (B), temperatura da coluna 40 °C e vazão 0,8 mL.min⁻¹.

Com análises por HPLC-DAD-MS, foi possível destacar, através dos respectivos espectros no UV, os principais grupos de metabólitos presentes nas folhas das espécies estudadas, sendo eluídos na ordem alcalóides, flavonóides e estilipironas. As estilipironas, classe de interesse nesse trabalho, apresentaram tempos de eluição superiores aos 20 minutos, os alcalóides inferiores aos 12 minutos e os flavonóides entre 12 e 20 minutos.

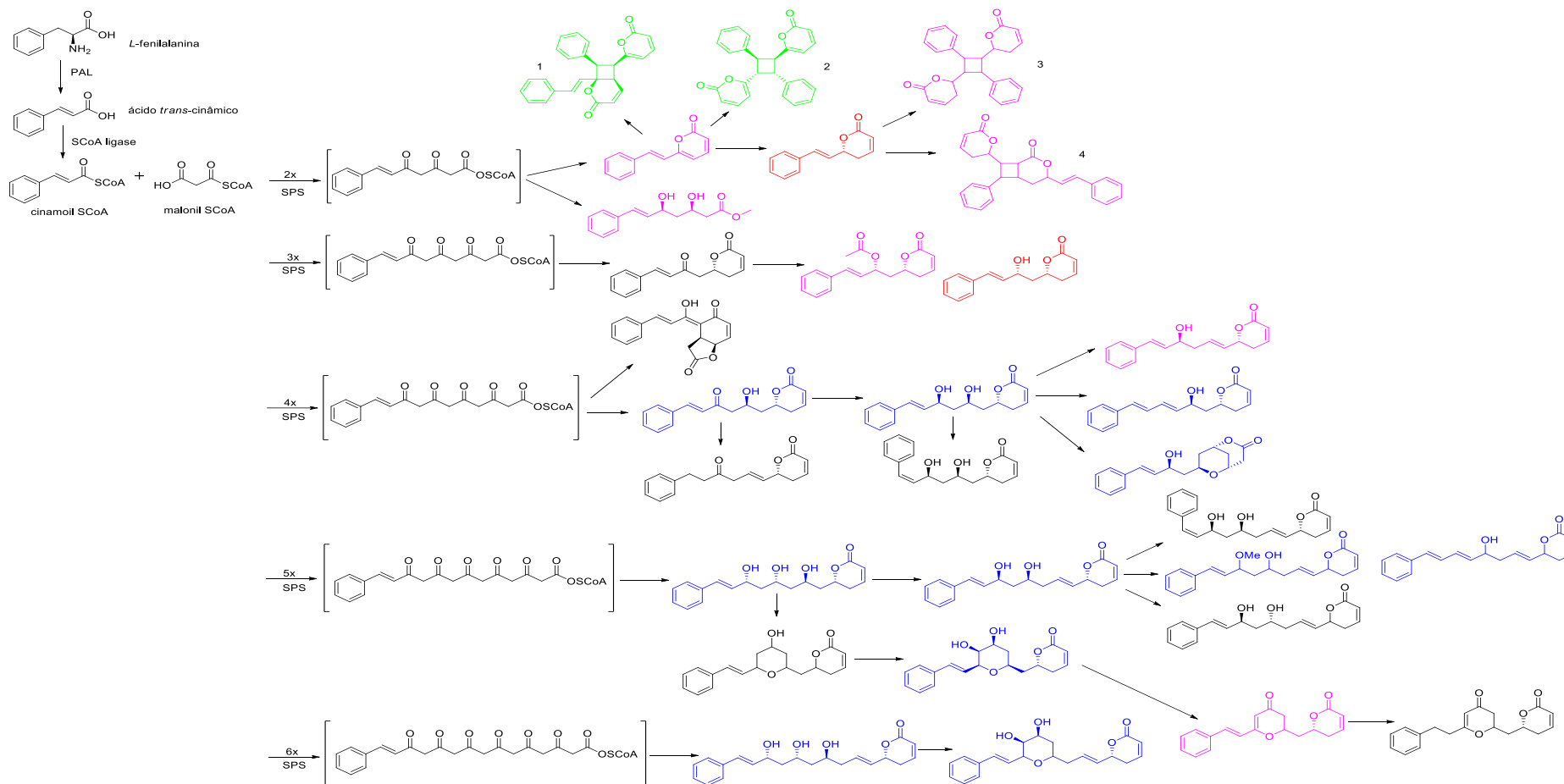
Adicionalmente, os dados de MS possibilitaram detectar a presença dos adutos de sódio [M+Na]⁺ das estilipironas. Vários picos foram detectados para alguns dos íons selecionados, devido a existência de estilipironas com a mesma massa de alta resolução, incluindo-se principalmente estereoisômeros.

Foram propostos mecanismos de fragmentação para várias estilipironas sodiadas, detectadas nos experimentos de MS/MS. Evidenciamos os íons produtos de *m/z* 163 e 189 como comuns entre as estilipironas, cada um relacionado a características presentes na molécula inicial. Foram detectados dois alcaloides presentes nas três espécies estudadas, e sua fragmentação foi coerente com dados da literatura, auxiliando na identificação.

A espécie *C. mandioccana* apresentou diversidade muito superior de estilipironas detectadas em relação as outras espécies. Foi detectado na espécie *C. moschata* um possível dímero de goniotalamina, justificado porque sua fragmentação forneceu um íon com *m/z* igual ao da goniotalamina sodiada, fortalecendo nossa teoria.

Esse trabalho contribuiu também para a atualização do quadro das propostas de biogênese das estirilpironas de *Cryptocarya* com a identificação de novas estirilpironas encontradas nas espécies estudadas (Figura 46).

Figura 46 - Quadro de biogênese das estilipironas de *Cryptocarya*. Em **rosa**, identificado de *C. moschata*, em **vermelho**, identificado de *C. moschata* e *C. mandioccana*, em **azul**, identificado de *C. mandioccana*, em **verde** identificado de *C. moschata* e *C. botelhensis*. [] indica a suposta cadeia policetílica inicial. As substâncias 1, 2, 3 e 4 são formadas possivelmente por fotodimerização.



Adaptado de: Passareli (2014).

REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, K. F.; CAVALHEIRO, A. J. An LC-DAD fingerprinting method for alkaloids, flavonoids and styrylpyrones from *Cryptocarya mandiocanna*. **Chromatographia**, v. 70, n. 9/10, p. 1455-1460, 2009.
- BARBOSA, T. D. M.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. A família Lauraceae Juss. no município de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, n. 30, p. 5-178, dez. 2012.
- BASTOS, W. L. **Variabilidade intraespecífica de flavonóides glicosilados e estilipironas em folhas de *Cryptocarya aschersoniana* (Mez)**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- BECKERT, C.; HORN, C.; SCHNITZLER, J.; LEHNING, A.; HELLER, W.; VEIT, M. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 275-283, 1997.
- BHAKUNI, D. S.; TEWARI, S.; DHAR, M. M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1819-1822, 1972.
- CAMARGO, K. F. B. **Variabilidade intraespecífica de estilipironas em quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana*: avaliação da produção em diferentes órgãos e em extratos enzimáticos**. 2008. 245 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- CAMPOS, V. A. C.; MACHADO, A. R. T.; SILVA, W. J. R.; LOPES, K. C.; TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F. Estiril-lactonas de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.) com atividade contra *Meloidogyne* spp. e interação *in silico* com provável fumerase de *Meloidogyne hapla*. **Química Nova**, v. 39, n. 2, p. 130-136, 2016.
- CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M. 6-(α -arylalkenyl)-5,6-dihydro- α pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 53, n. 7, p. 811-819, 2000.
- D'ABROSCA, B.; BUOMMINO, E.; D'ANGELO, G.; CORETTI, L.; SCOGNAMIGLIO, M.; SEVERINO, V.; PACIFICO, S.; DONNARUMMA, G.; FIORENTINO, A. Spectroscopic identification and anti-biofilm properties of polar metabolites from the medicinal plant *Helichrysum italicum* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 7038-7046, 2013.
- DAVIS, R. A.; DEMIRKIRAN, O.; SYKES, M. L.; AVERY, V. M.; SURAWEEERA, L.; FECHNER, G. A.; QUINN, R. J. 7',8'-dihydroobolactone, a trypanocidal α -pyrone from the rainforest tree *Cryptocarya obovata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4057-4059, 2010.

DESCHAMPS, J. R.; GEORGE, C.; FLIPPEN-ANDERSON, J. L.; SPENCER, G. A new *Cryptocarya* lactone. **Acta Crystallographica Section E**, v.57, n. 7, p. o648-o649, 2001.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. Chap. 4, p. 109-149.

DIGEORGIO, S. E. **Bioactive components in Kombucha tea, *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm., and *Rollinia emarginata* Schlecht.** 1999. 100 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of Purdue University, Ann Arbor, 1999.

DOLAN, J. **HPLC solutions #53: temperature and retention**. Disponível em: <<https://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/374-/HPLC-Solutions-53-Temperature-and-Retention>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

DREWES, S. E.; HORN, M. H.; MAVI, S. *Cryptocarya liebertiana* and *Ocotea bullata* - their phytochemical relationship. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 437-440, 1997.

DREWES, S. E.; HORN, M. H.; SCOTT-SHAW, R. α -pyrones and their derivatives from two *Cryptocarya* species. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321-323, 1995.

DUMONTET, V.; HUNG, N. V.; ADELIN, M.; RICHE, C.; CHIARONI, A.; SEVENET, T.; GUERITTE, F. Cytotoxic flavonoids and α -pyrones from *Cryptocarya obovata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 858-862, 2004.

FENG, R.; WANG, T.; WEI, W.; TAN, R. X.; GE, H. M. Cytotoxic constituents from *Cryptocarya maclurei*. **Phytochemistry**, v. 90, p. 147-153, 2013.

FU, X.; SEVENET, T.; HAMID, A.; HADI, A.; REMY, F.; PAIS, M. Kurzilactone from *Cryptocarya kurzii*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1272-1274, 1993.

GIOCONDO, M. P.; BASSI, C. L.; TELASCRÊA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; AGUSTONI, D.; MELLO, E. R.; SOARES, C. P. Cryptomoschatone D2 from *Cryptocarya mandioccana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell lines. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 3, p. 315-322, 2009.

GOVINDACHARI, T. R.; PARTHASARATHY, P. C. Cryptocaryalactone, a novel 5,6-dihydro-2H-pyran-2-one from *C. bourdillonii* Gamb. **Tetrahedron Letters**, n. 37, p. 3401-3402, 1971.

GOVINDACHARI, T. R.; PARTHASARATHY, P. C.; MODI, J. D. Chemical investigation of *Cryptocarya bourdillonii* Gamb. cryptocaryalactone, a new kawa-type lactone. **Indian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 149-151, 1972.

HAMMERSCHMIDT, L.; WRAY, V.; LIN, W.; KAMILOVA, E.; PROKSCH, P.; ALY, A. H. New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 600-603, 2012.

HERDERICH, M.; BECKERT, C.; VEIT, M. Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from gametophytes of *Equisetum arvense* L. by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Phytochemical Analysis, v. 8, p. 194-197, 1997.

HLUBUCEK, J. R.; ROBERTSON, A. V. (+)-(5S)-hydroxy-7-phenylhepta-2,6-dienoic acid, a natural product from *C. caloneura* (Scheff)Kostermans. **Australian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 2199-2206, 1967.

JULIAWATY, L. D.; KITAJIMA, M.; TAKAYAMA, H.; ACHMAD, S. A.; AIMI, N. A 6-substituted-5,6-dihydro-2-pyrone from *Cryptocarya strictifolia*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 989-993, 2000.

LANÇAS, F. M. Efeitos de temperatura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012.

LAURACEAE. In: WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Lauraceae>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

LEE, I.; YUN, B. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 349-359, 2011.

MADRINIÁN, S. **Rhodostemonodaphne (Lauraceae)**. New York: The New York Botanical Garden, 2004. (Flora neotropica monograph 92).

MALEBO, H. M.; KIHAMPA, C.; MGINA, C. A.; SUNG'HWA, F.; WAIBEL, R.; JONKER, S. A.; NKUNYA, M. H. H. Antifungal enantiomeric styrylpyrones from *Sanrafaelia ruffonammari* and *Ophrypetalum odoratum*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 4, p. 129-133, 2014.

MANTOVANI, S. M. **Perfil fitoquímico de frutos e de plântulas de *Cryptocarya moschata* germinadas em condições de luz e substratos controlados**. 2004. 74 f. Monografia (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

MEREGELMAN, T. L.; SCUDIERO, D. A.; DAVIS, R. E.; STAUDT, L. M.; McCLOUD, T. G.; CARDELLINA, J. H. II; SHOEMAKER, R. H. Inhibitors of the NF-κB activation pathway from *Cryptocarya rugulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 336-339, 2009.

MORAES, P. L. R. de. Lectotypification of names of Brazilian species of *Cryptocarya* (Lauraceae). **Taxon**, v. 54, p. 789-795, 2005.

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

NAVIE, S. ***Cinnamomumcamphora* (Camphor Laurel)**. Imagem: flowers Disponível em: <[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Cinnamomum_camphora_\(Camphor_Laurel\).htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Cinnamomum_camphora_(Camphor_Laurel).htm)>. Acesso em: 01 dez. 2016.

NEHME, C. J. **Estudo da dinâmica circadiana e sazonal e da variabilidade populacional dos metabólitos secundários polares das folhas de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae)**. 2001. 113 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

NEHME, C. J.; MORAES, P. L. R.; CAVALHEIRO, A. J. Intrapopulational variability of styrylpyrones in leaves of *Cryptocarya moschata* Ness (Lauraceae) from Carlos Botelho State Park. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 613-616, 2002.

NEHME, C. J.; BASTOS, W. L.; ARAUJO, A. J.; CAVALHEIRO, A. J. An HPLC-PAD method to analyse flavonoid glycosides and styrylpyrones from *Cryptocarya* species (Lauraceae). **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 93-97, 2005.

PASCOLI, I. C. **Estudo fitoquímico dos frutos de *C. moschata* (Nees et Mart.) Mez. (Lauraceae)**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

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

PEDROSO, R. Exploração de pau rosa tem instrução normativa. **Floresta Online**, set. 2011. Disponível em: <<https://florestalonline.wordpress.com/2011/09/11/exploracao-de-pau-rosa-tem-instrucao-normativa/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

PLANTS RESCUE. ***Laurusnobilis***. Disponível em: <<http://www.plantsrescue.com/laurus-nobilis/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. de; ASSIS, L.; ALVES, F. M. Lauraceae Juss. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

REDDY, D. K.; SHEKHAR, V.; PRABHAKAR, P.; BABU, B. C.; SIDDHARDHA, B.; MURTHY, U. S. N. Stereoselective synthesis and biological evaluation of (R)-rugulactone, (6R)-((4R)-hydroxy-6-phenyl-hex-2-enyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one and its 4S epimer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4657-4663, 2010.

RICARDO, M. A. G.; ANDRECO, M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; CASTRO-GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. **Arkivoc**, v. 6, p. 127-136, 2004.

- ROBERTSON, H. G. *Persea americana* (Avocado). **Biodiversity Explorer**, 2016. Disponível em: <www.biodiversityexplorer.org/plants/lauraceae/persea_americana.htm>, acesso em 21 dez. 2016.
- SCAMPERDELE. **Cinnamomumverum J.Presl (Lauraceae)**. May 27, 2009. Disponível em <<http://www.flickrriver.com/photos/36517976@N06/3569041665/>>. Acesso em: 01 dez. 2016.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ASTUDILLO, L.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; ARIAS, A. R. de; FERREIRA, M. E.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G. Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba* fruits. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 563-567, 2001.
- SEHLAPELO, B. M.; DREWES, S. E.; SCOTT-SHAW, R. A 6-substituted 5,6-dihydro- α -pyrone from two species of *Cryptocarya*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 3, p. 847-849, 1994.
- SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 285-295, 2003.
- SILVA, D. P. **Variabilidade e diversidade genética da população de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez (Lauracea)**. 2014. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. **High-performance gradient elution**: the practical application of the linear-solvent-strength model. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- SPENCER, G. F.; ENGLAND, R. E.; WOLF, R. B. (-)-Cryptocaryalactone and (-)-deacetylcryptocaryalactone - germination inhibitors from *Cryptocarya moschata* seeds. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2499-2500, 1984.
- STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millenium review. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 380-416, 2001.
- STEFONA, M.; STAFILOV, T.; KULEVANOVA, S. HPLC analysis of flavonoids. In: CAZES, J. L. (Ed.). **Encyclopedia of chromatography**: 2004 update supplement. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 113-119.
- STURGEON, C. M.; CINEL, B.; DIAZ-MARRERO, A. R.; McHARDY, L. M.; NGO, M.; ANDERSEN, R. J.; ROBERGE, M. Abrogation of ionizing radiation-induced G2 checkpoint and inhibition of nuclear export by *Cryptocarya* pyrones. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, p. 407-413, 2008.

TELASCRÊA, M. **Busca de substâncias antitumorais e antifungicas através do estudo fitoquímico biomonitorado em *cryptocaryas mandioccana* e *C. moschata* (Lauraceae)**. 2006. 236 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TELASCRÊA, M.; ARAÚJO, C. C.; CAVALHEIRO, A. J.; MARQUES, M. O.; FACANALI, R.; MORAES, P. L. R. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp from the Atlantic rain forest. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 503-507, 2008.

VAN DER WERFF, H. Eight new species and one new combination of neotropical Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, n. 75, p. 402-419, 1998.

VAN DER WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the new world. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 78, n. 2, p. 377-387, 1991.

VERDI, M. Ocoteaodorifera (Vell.) Rohwer. **Flora Digital**, 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=2449>. Acesso em: 01 dez. 2016.

VICENTINI, A.; VAN DER WERFF, H.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNCAO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazonia Central**. Manaus: INPA, 1999. p. 150-179.

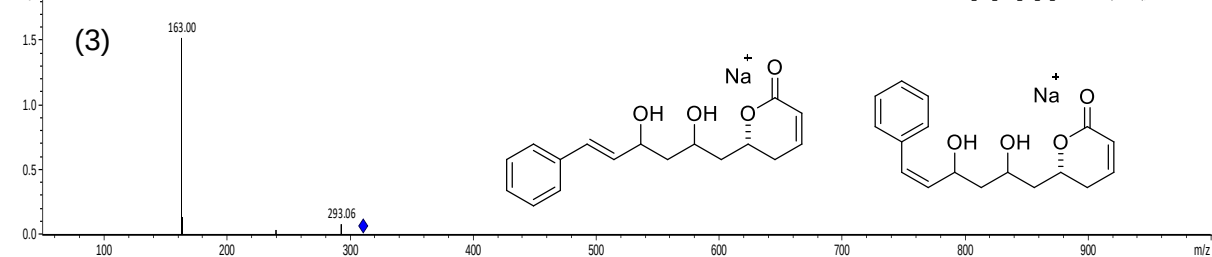
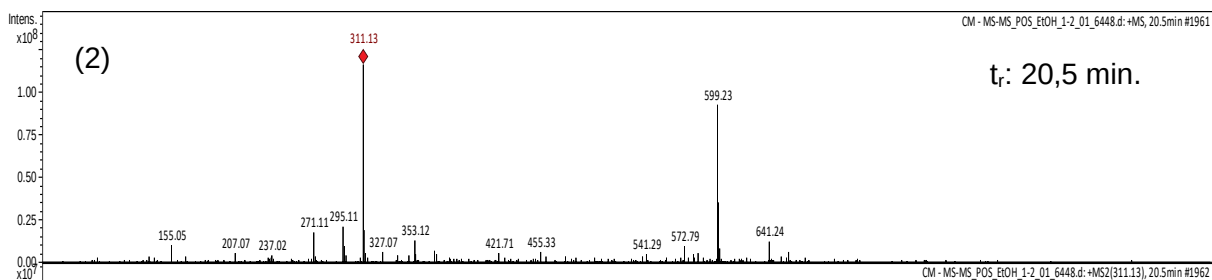
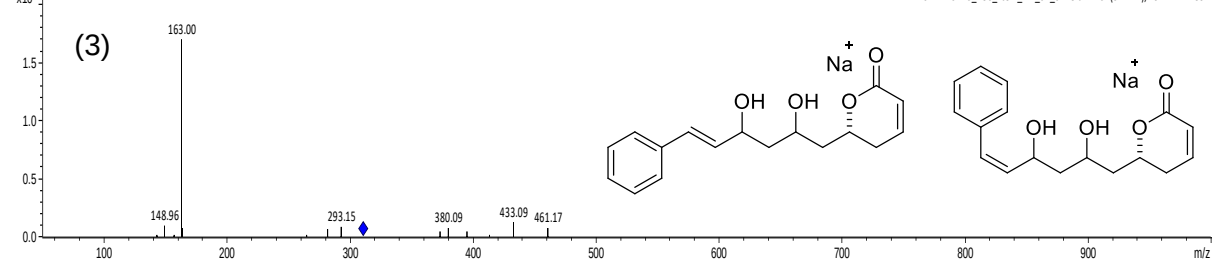
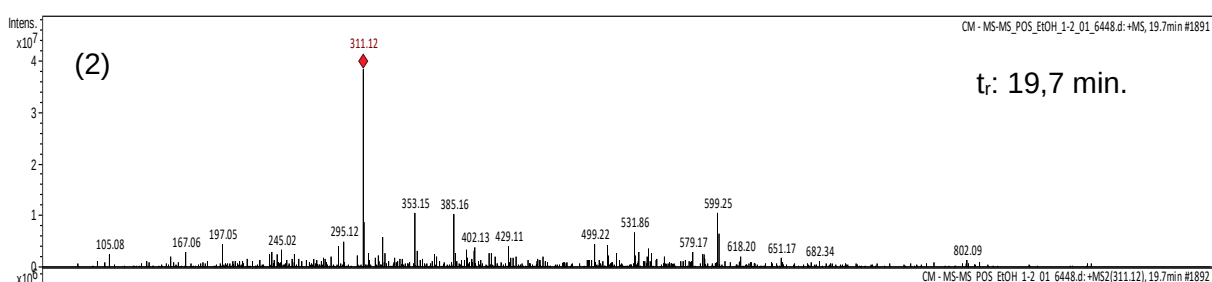
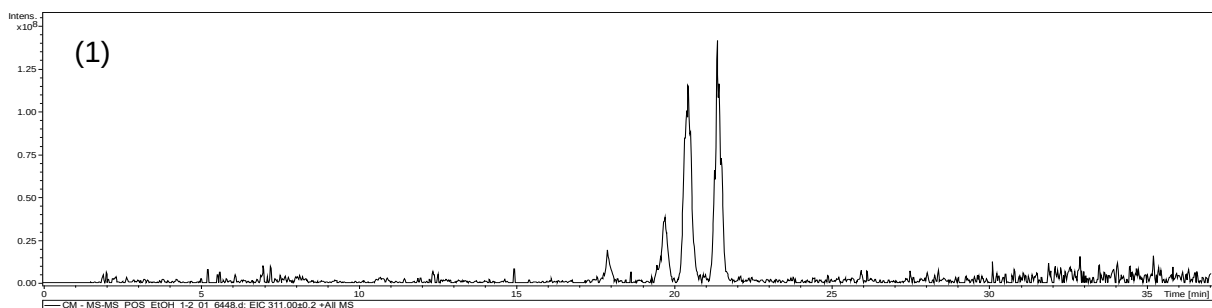
YANG, B. Y.; KONG, L. Y.; WANG, X. B.; ZHANG, Y. M.; LI, R. J.; YANG, M. H.; LUO, J. G. Nitric oxide inhibitory activity and absolute configurations of arylalkenyl α,β -unsaturated δ/γ -lactones from *Cryptocarya concinna*. **Journal of Natural Products**, n. 79, p. 196-203, 2016.

ZHANG, Y.; SHI, Q.; SHI, P.; ZHANG, W.; CHENG, Y. Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2328-2342, 2006.

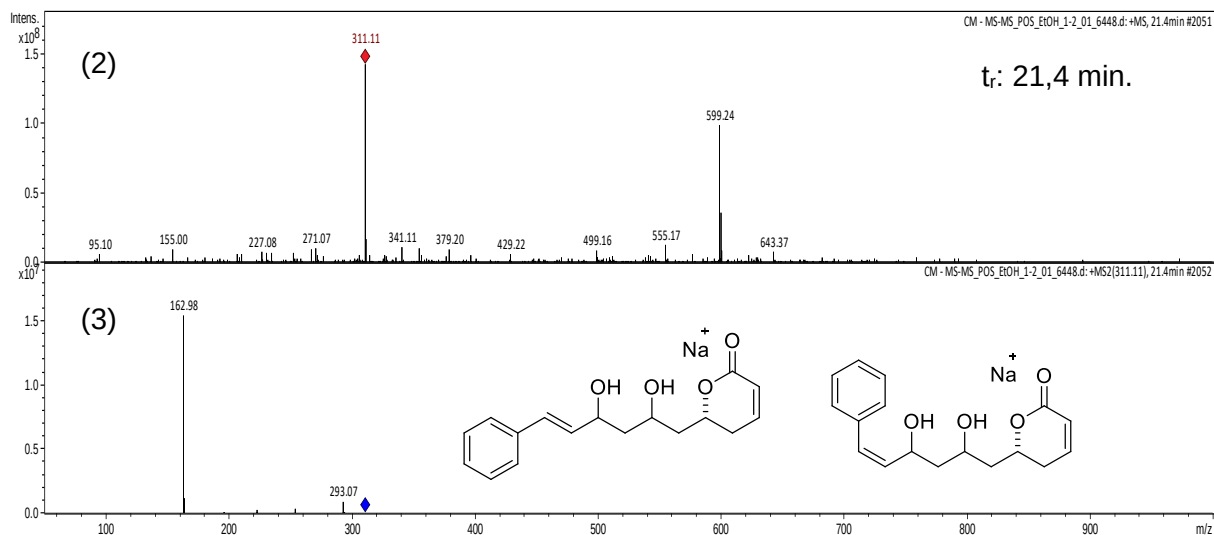
ANEXO

O anexo é composto pelos dados complementares das análises por HPLC-MS das três espécies de *Cryptocarya* estudadas. As condições de análises são as mesmas para todos os anexos: 85:15 - 60:40 (A:B) em 25 minutos, 60:40 - 40:60 (A:B) em 10 minutos, 40:60 - 0:100 (A:B) em 2 minutos seguido por eluição isocrática 0:100 (A:B) por 6 minutos, a fase móvel foi composta por água 0,1% ácido fórmico/etanol (A:B), coluna Phenomenex Synergy 4 μ Hydro-RP 80Å (150 mm x 4,6 mm), temperatura 40 °C, vazão de 0,8 mL.min⁻¹. Todos os anexos foram produzidos pelo autor.

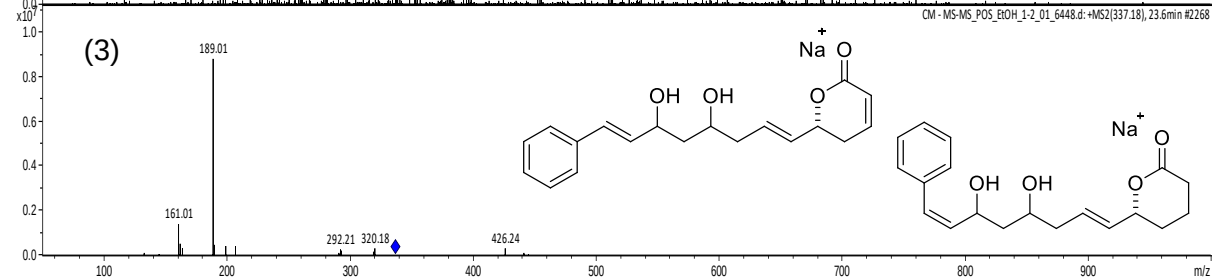
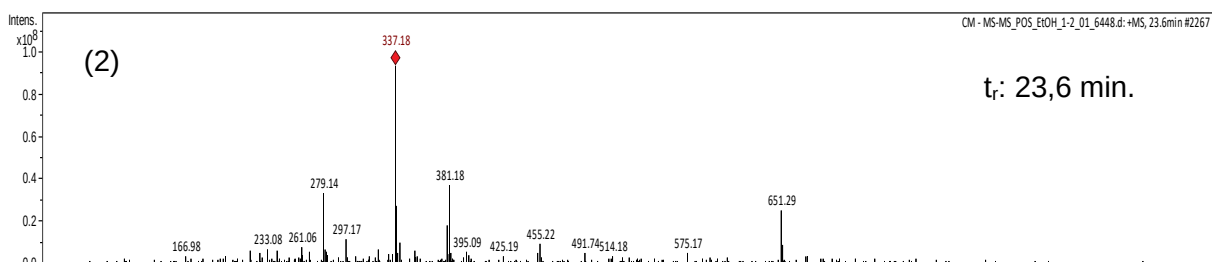
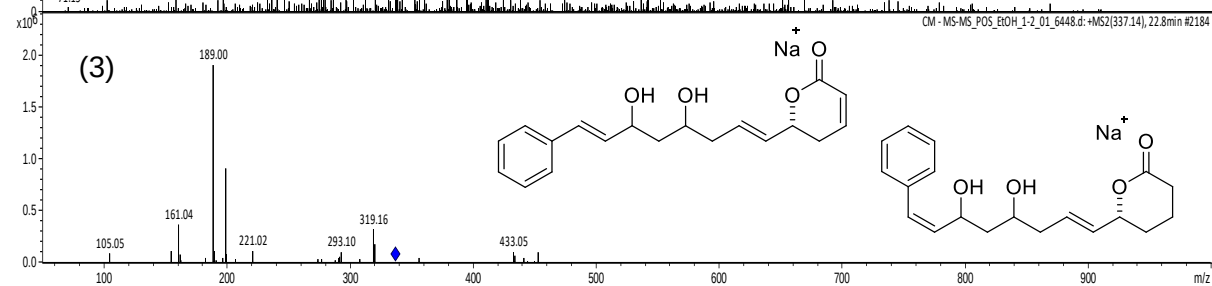
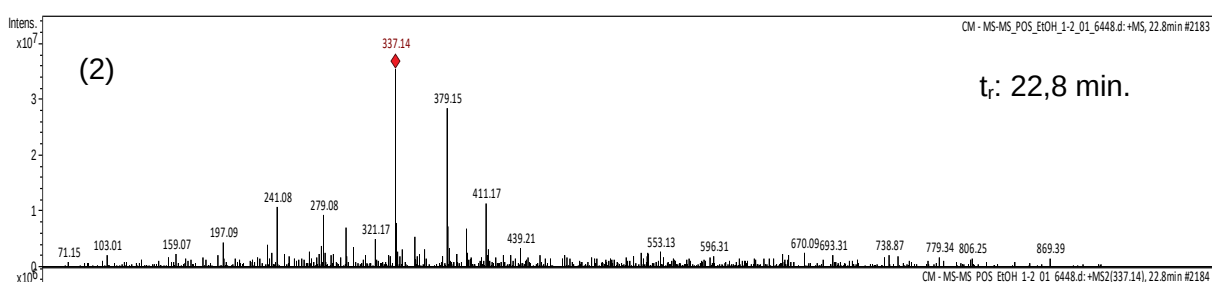
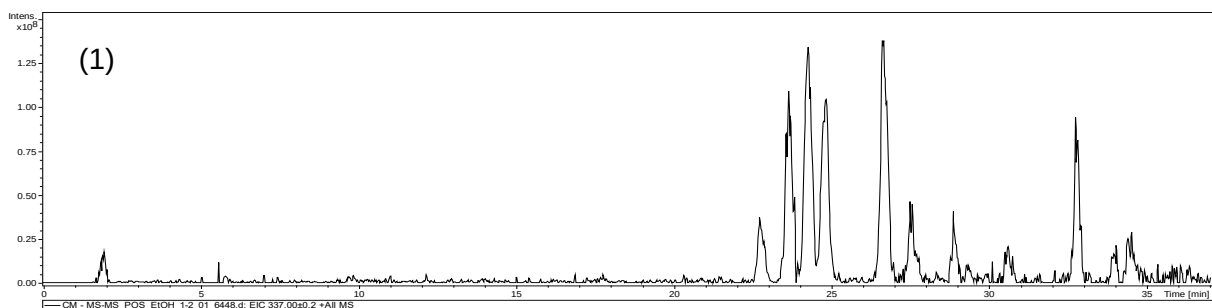
Anexo1 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 311 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.



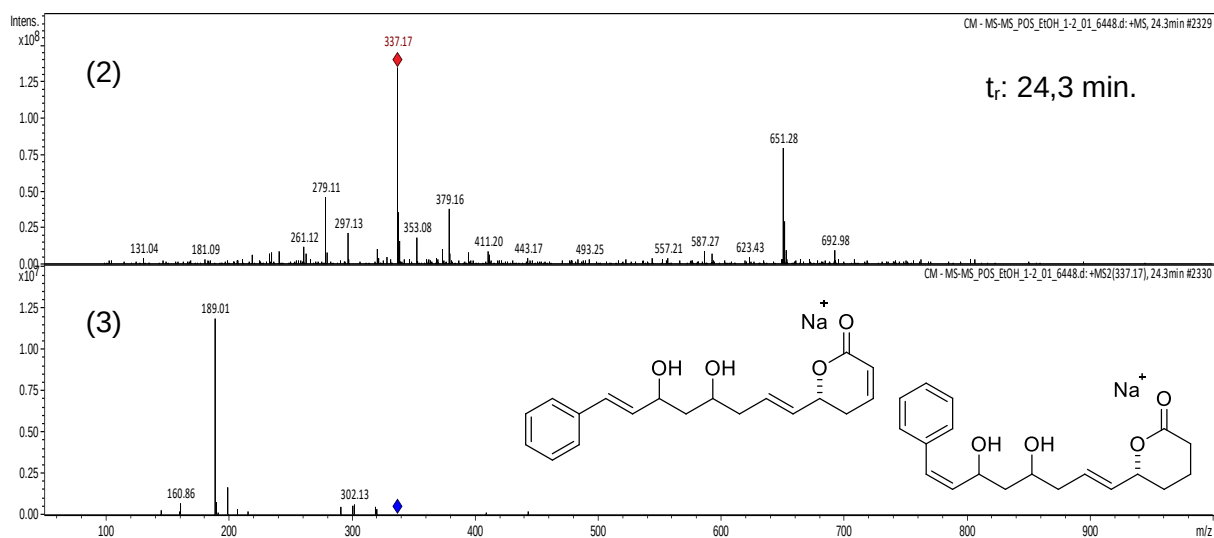
Anexo 1 (continuação) - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 311 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.



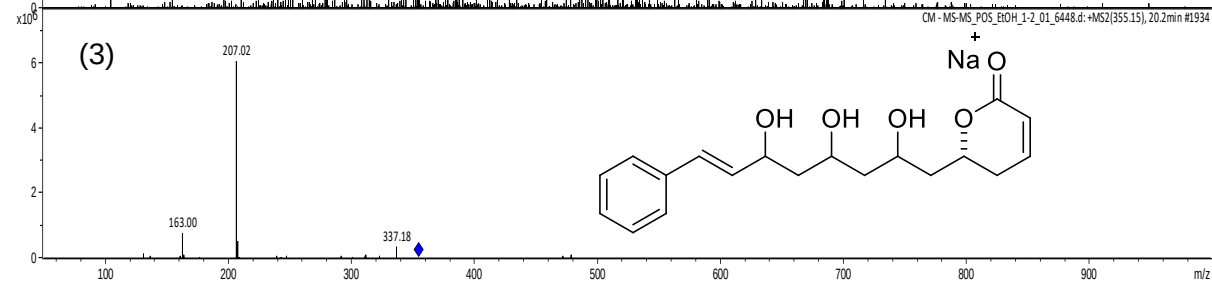
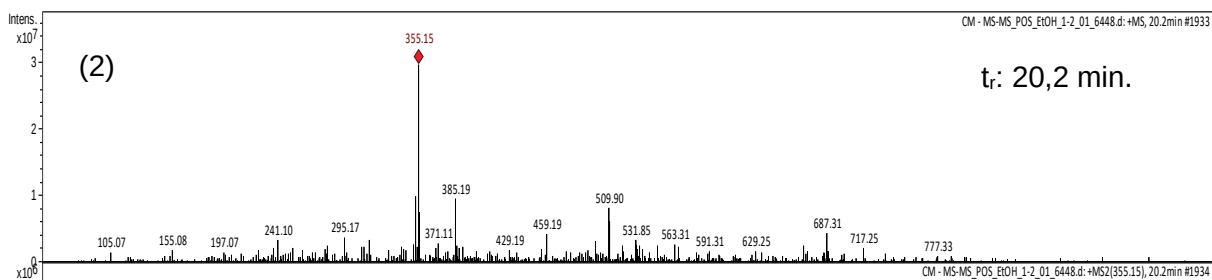
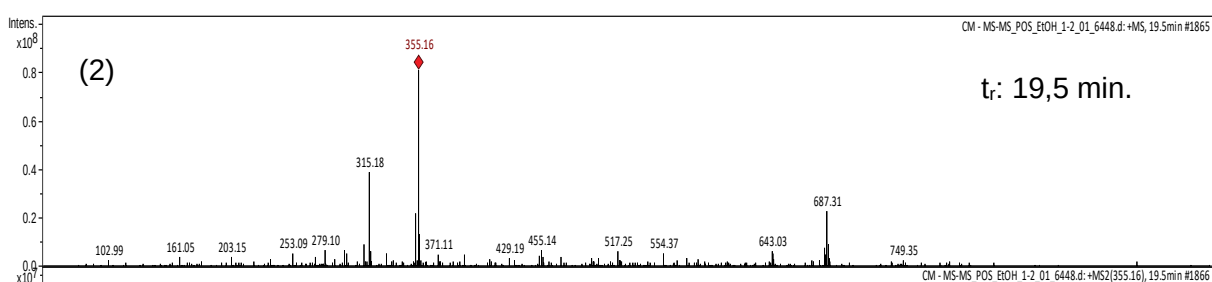
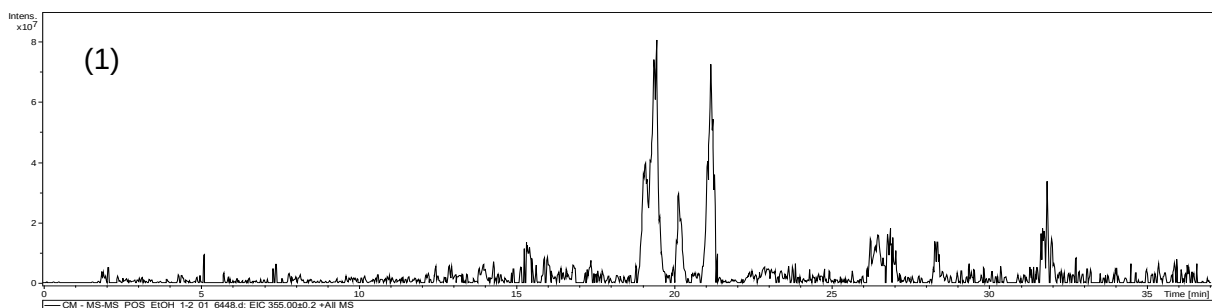
Anexo 2 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) ordem do íon m/z 337 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estruturas das possíveis substâncias. t_r: tempo de retenção.



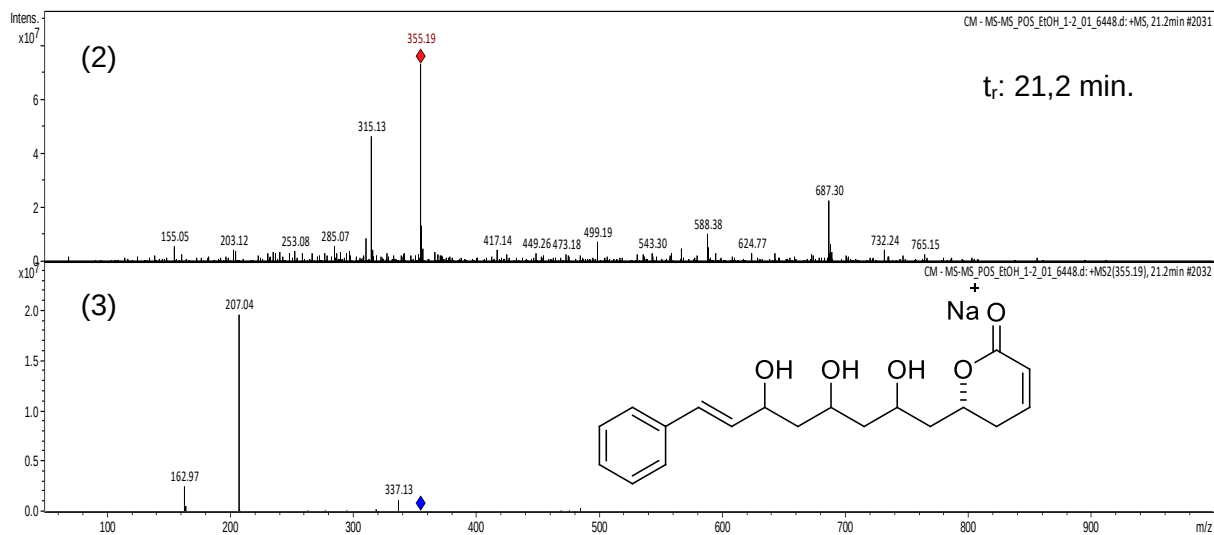
Anexo 2 (continuação) - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) ordem do íon m/z 337 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.



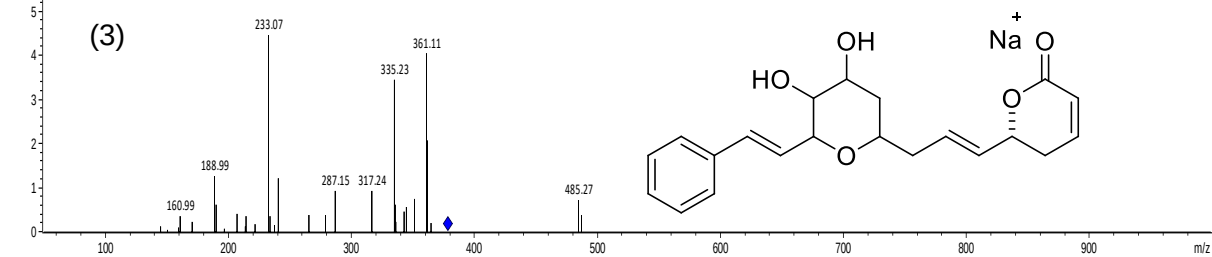
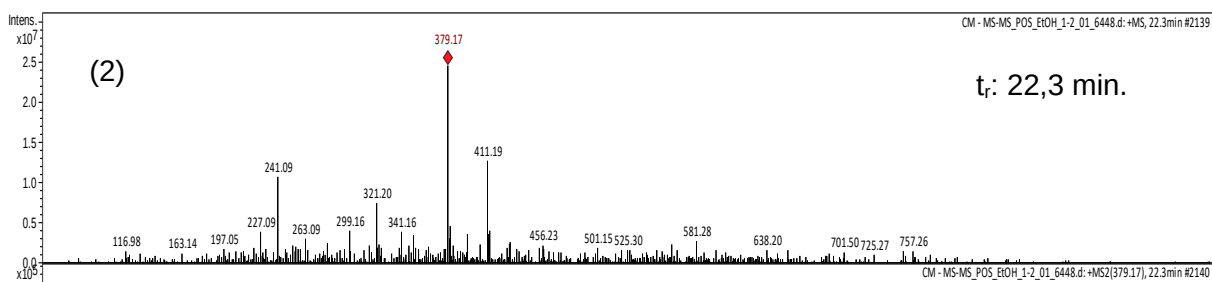
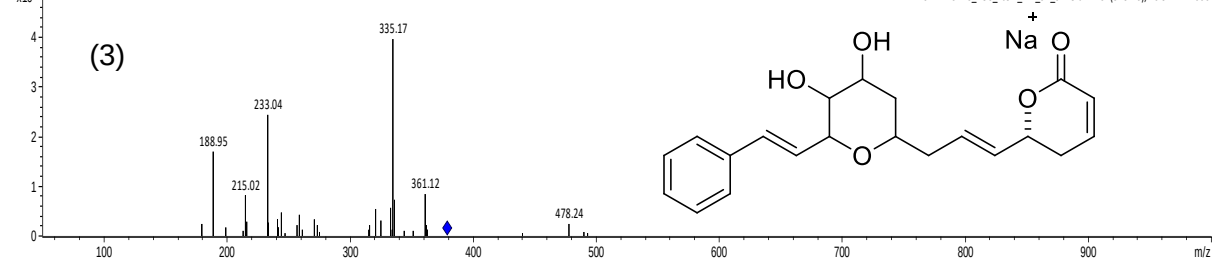
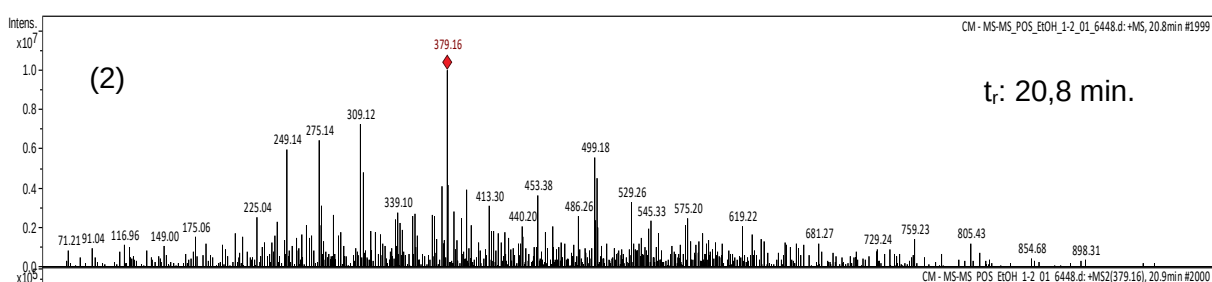
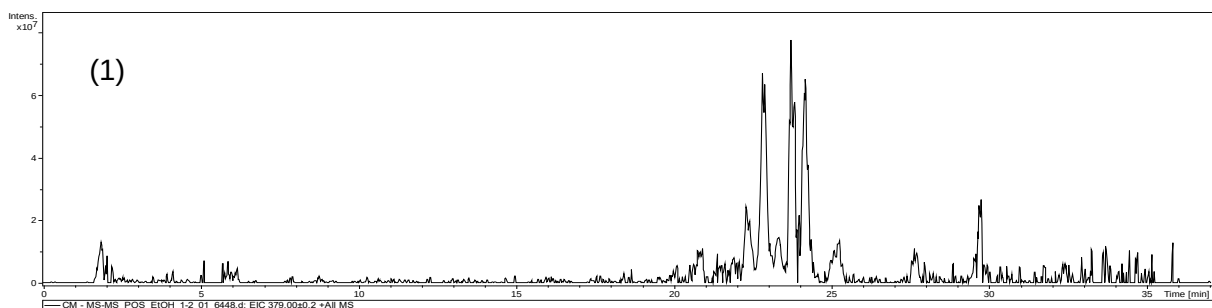
Anexo 3 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 355 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura das possíveis substâncias. t_r : tempo de retenção.



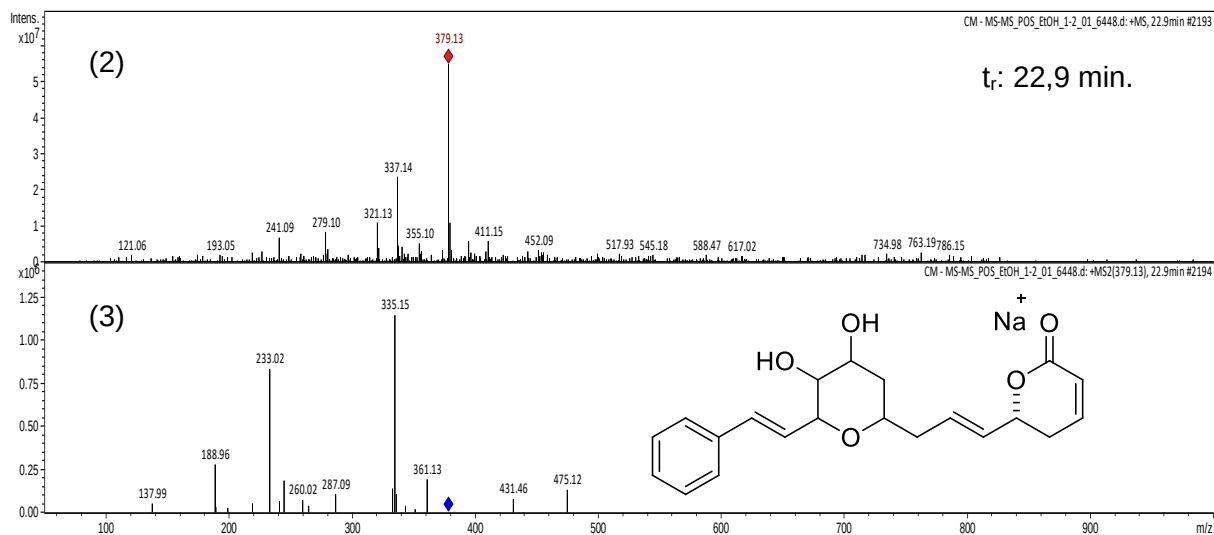
Anexo 3 (continuação) - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 355 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura das possíveis substâncias. t_r : tempo de retenção.



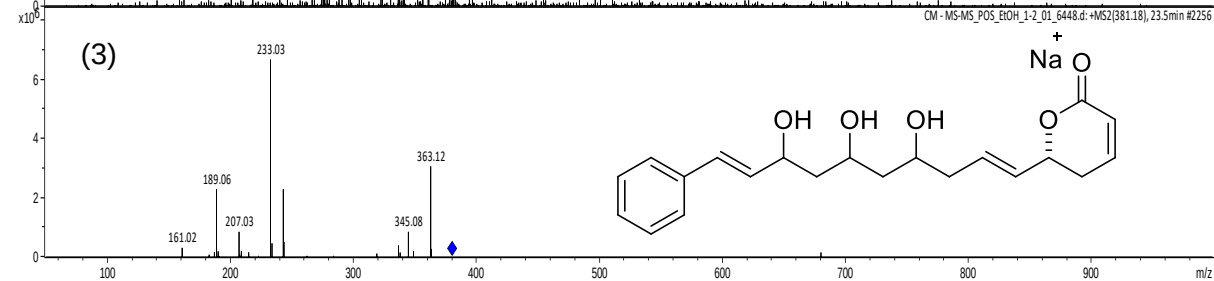
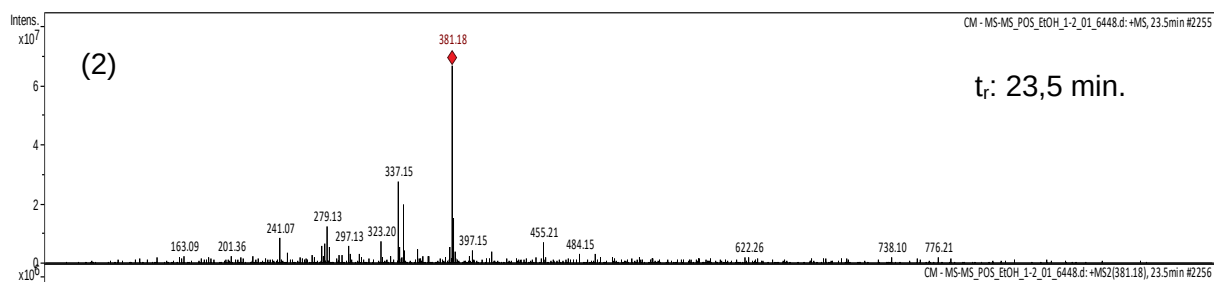
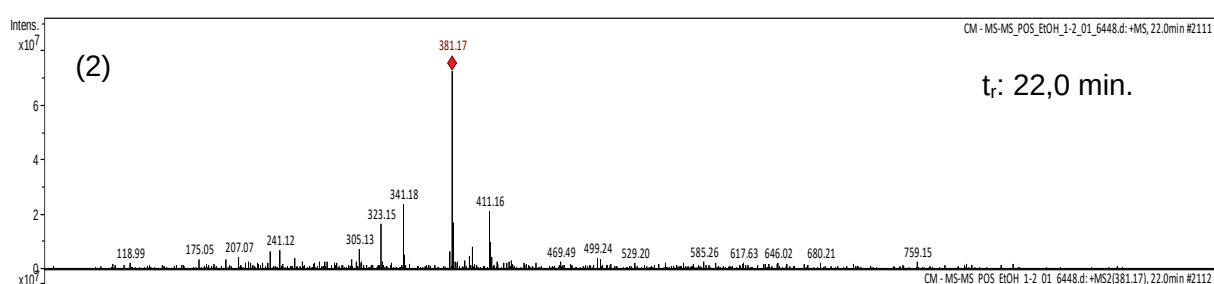
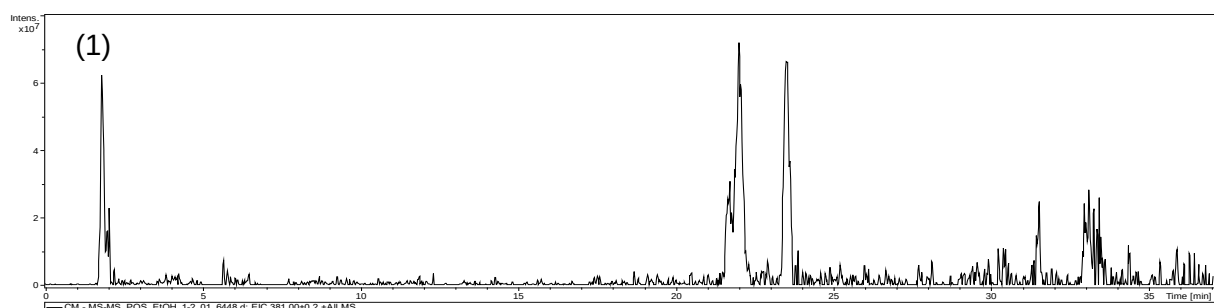
Anexo 4 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 379 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura das possíveis substâncias. t_r : tempo de retenção.



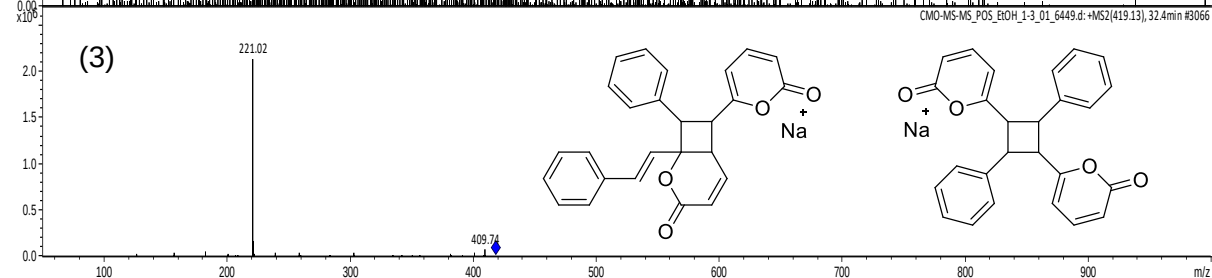
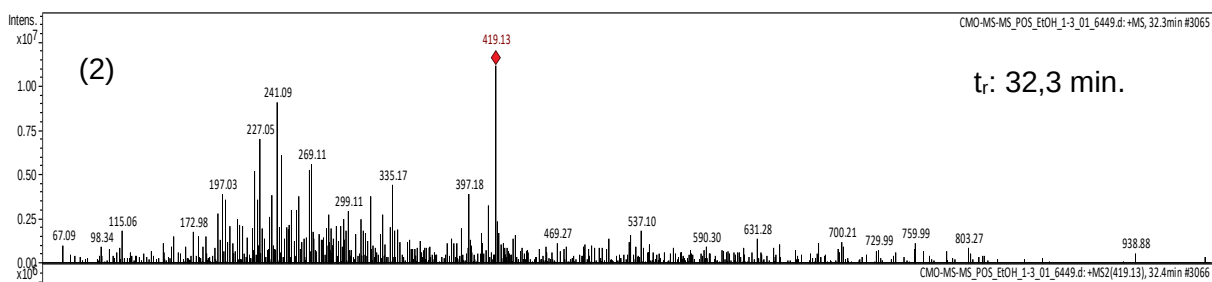
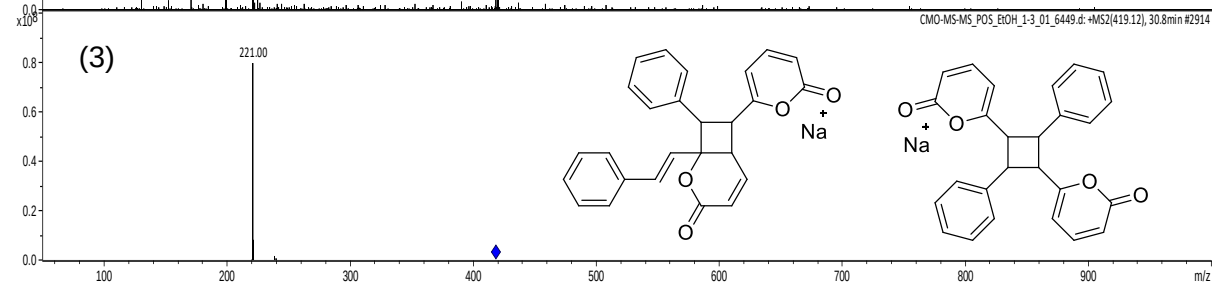
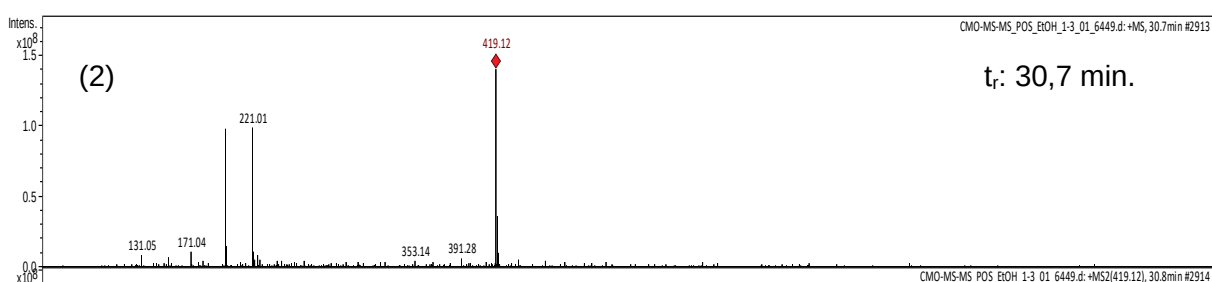
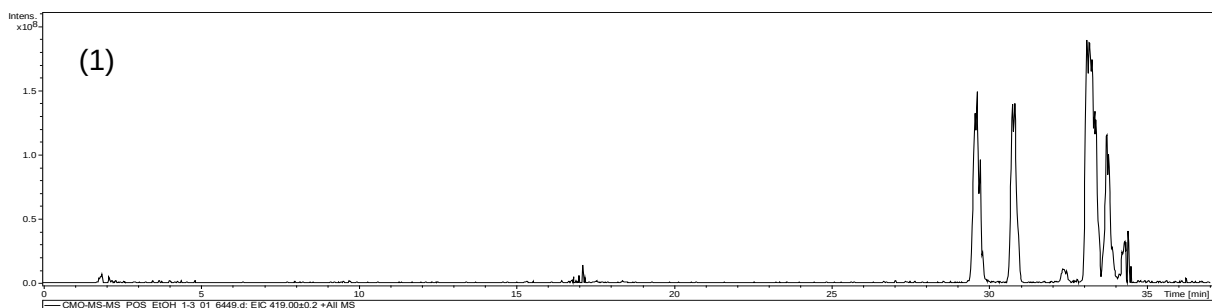
Anexo 4 (continuação) - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 379 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estrutura das possíveis substâncias. t_r : tempo de retenção.



Anexo 5 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 381 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. mandioccana* e estruturas das possíveis substâncias. t_r : tempo de retenção.



Anexo 6 - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 419 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. moschata* e estruturas das possíveis substâncias. tr: tempo de retenção.



Anexo 6 (continuação) - Cromatograma de íon extraído (1), espectros de massas de primeira (2) e segunda ordem (3) do íon m/z 419 do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. moschata* e estruturas das possíveis substâncias. t_r: tempo de retenção.

