



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - ICE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

**APLICAÇÕES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESTUDO
BIOLÓGICO DO EXTRATO DOS FRUTOS DA REMELA-DE-
CACHORRO (*Clavija lancifolia* - Theophrastaceae)**

WEIDER HENRIQUE PINHEIRO PAZ

Manaus, 2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - ICE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ**

WEIDER HENRIQUE PINHEIRO PAZ

**APLICAÇÕES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESTUDO
BIOLÓGICO DO EXTRATO DOS FRUTOS DA REMELA-DE-
CACHORRO (*Clavija lancifolia* - Theophrastaceae)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química na linha de pesquisa de Produtos naturais.

Ingresso em Outubro de 2015

Orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Neila de Almeida Braga

Manaus, 2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P348a Paz, Weider Henrique Pinheiro
APLICAÇÕES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESTUDO
BIOLÓGICO DO EXTRATO DOS FRUTOS DA REMELA-DE-
CACHORRO (*Clavija lancifolia* - Theophrastaceae) / Weider
Henrique Pinheiro Paz. 2017
114 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Coorientadora: Neila de Almeida Braga
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Espectrometria. 2. *Clavija lancifolia*. 3. atividade antioxidante.
4. extrato. I. Koolen, Hector Henrique Ferreira II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

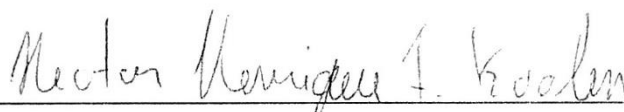
**“APLICAÇÕES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
ESTUDO BIOLÓGICO DO EXTRATO DOS FRUTOS DA
REMELA-DE-CACHORRO (*Clavija lancifolia* Desf.)”**

Weider Henrique Pinheiro Paz

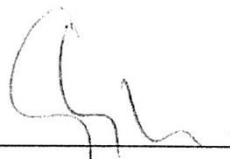
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 26 de outubro de 2017.

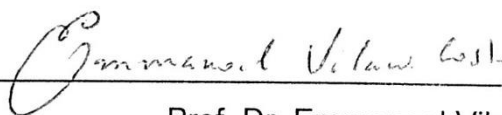
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro UFAM



Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa
Membro UFAM

[...] Aos meus pais, familiares e amigos que me acompanharam nessa trajetória e que me deram força e acreditaram no meu esforço.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me proporcionado saúde, força e esforço em todas as etapas ao longo do mestrado. Quero agradecer em especial ao meu amigo e orientador prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen, pela grandeza de humildade e profissionalismo tanto como professor quanto pesquisador, que me incentivou e me ensinou a melhorar cada vez mais. Agradeço por contribuir cada vez na minha formação acadêmica, exercendo uma influência na minha trajetória, e confiando em meus trabalhos.

Aos meus pais Tatiara Martins e Sandro Henrique que me deram total atenção, apoio e força, mesmo à longa distância. Ao meu irmão Victor Henrique que me acompanhou nesses anos, sendo meu torcedor. Ao restante da família (tias, tios, primas, primos e avós) que sempre me deram apoio e constante ajuda e incentivo.

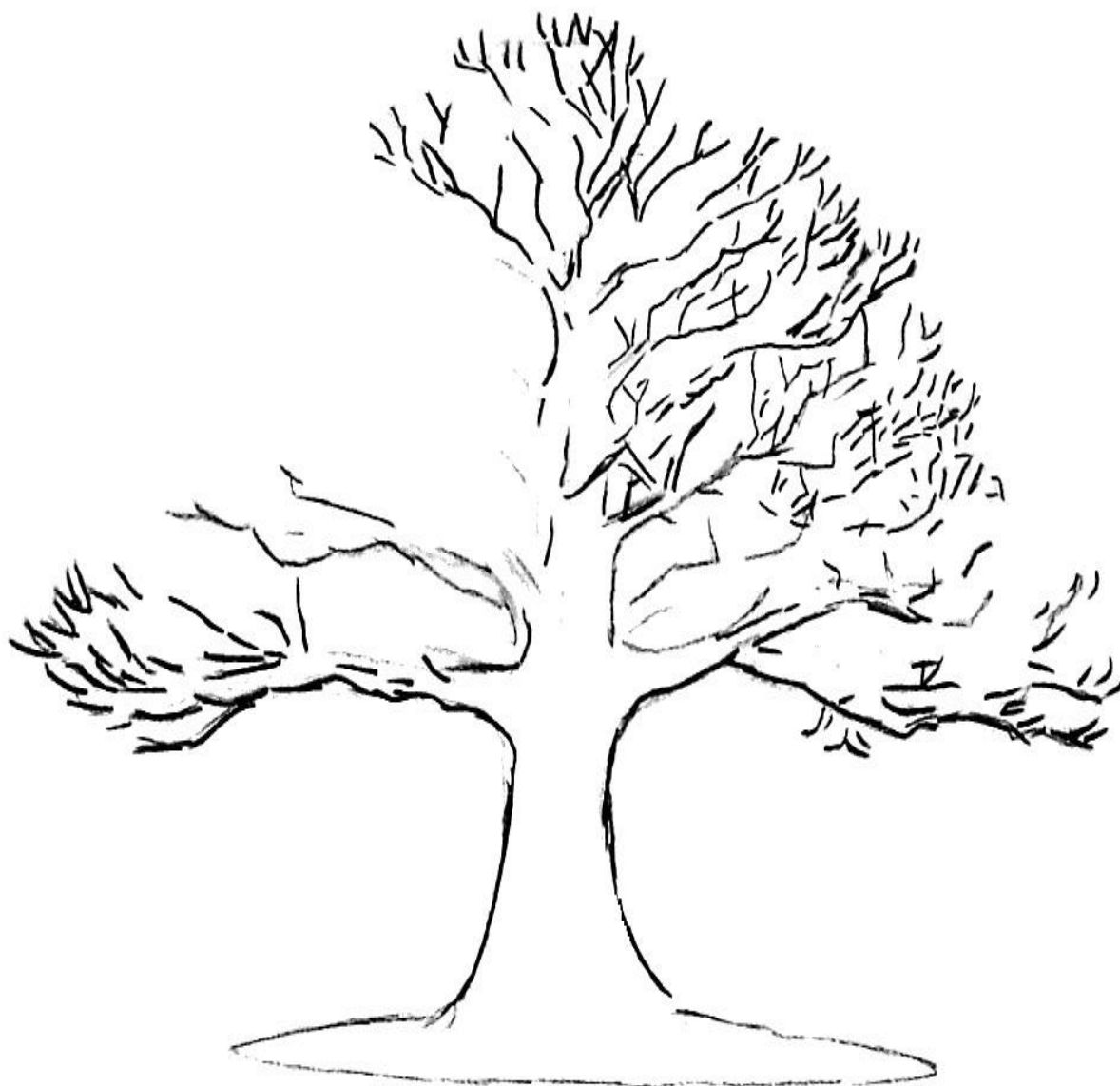
Também aos meus amigos de Teresina-PI (não citei nomes para não ser injusto) que acompanharam minha trajetória e contribuíram de forma direta e indireta.

Agradeço aos meus amigos de Manaus e colegas de turma de mestrado pela união, força e ajuda nesses 2 anos. No decorrer do curso a ajuda de vocês nas disciplinas e até mesmo na minha rotina diária me ajudaram nos dias primordiais a Manaus e nas horas difíceis que passei sozinho (Em especial a Paula Suellen, Yara lins, Berna Sousa, Kamila Fernandes, Airi Sousa, Bruna Ribeiro, Elzalina Soares, Richardson Sousa, Karolina Araújo, Luciana Viera, Rafael Xavier, Francisco Wanderley, Elijandre Gomes, Harrison Nascimento).

Aos meus professores da pós graduação em Química pelos conhecimentos adquiridos e incentivo na área. À prof.^a Dr.^a Neila Almeida Braga, minha co-orientadora, que me deu incentivo na pesquisa e desenvolvimento deste trabalho.

Também quero agradecer a equipe da Central Analítica pela experiência e aprendizagem inicial no mestrado e ao laboratório de pesquisa de Química inorgânica (LPQI) que contribuíram rotinamente na área acadêmica (Aos meus amigos Robson Dantas, Larissa Palheta, Ana Carolina, Maria Dulcilene e Marcos Valério).

Aos membros desta banca examinadora (Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Belém e Prof. Dr. Emmanoel Villaça pela aceitação da minha defesa e também pelos ensinamentos nas disciplinas e incentivo na área.



“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”.

Frederick Herzberg

RESUMO

A remela-de-cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.) é uma fruta exótica brasileira consumida exclusivamente na região Sul do Amazonas. Devido à falta de conhecimento acerca de sua composição química, a remela-de-cachorro foi estudada em relação à sua constituição fenólica e de seu aroma. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi realizar o estudo químico qualitativo e quantitativo dos seus frutos por meio da cromatografia líquida de ultra-alta performance e cromatografia gasosa acopladas à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS e GC-MS, respectivamente). Adicionalmente, avaliar as atividades antioxidante e de inibição enzimática *in vitro* do extrato metanólico. A técnica GC-MS foi empregada juntamente com a microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME) para avaliar a composição do aroma da fruta. Foram identificados 28 compostos a partir da polpa *in natura* da remela-de-cachorro, sendo os aldeídos, o grupo mais abundante de compostos orgânicos voláteis na remela-de cachorro com percentual total de 26,14%. Constatou-se que o linalol (10,1 %), 1-octen-3-ol (4,42 %), β -ionona (4,08 %) e hexanal (3,05 %) foram os principais contribuintes para o aroma característico desta espécie. Através do método de Folin-Ciocalteu, mostrou que a fruta estudada é rica em compostos fenólicos (8,28 mg GAE/g). Utilizando o sistema LC-MS/MS, 9 compostos fenólicos (galatos de alquila, flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos) foram identificados e quantificados na polpa. A capacidade antioxidante do extrato da remela-de-cachorro pelo método do ABTS apresentou melhor atividade antioxidante ($12,0 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$) comparado ao ensaio do DPPH ($30,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$). O efeito do extrato da fruta apresentou baixa porcentagem de inibição total frente às enzimas lipase e α -glicosidase.

Palavras-chave: Espectrometria; *Clavija lancifolia*; atividade antioxidante; extrato

ABSTRACT

Remela-de-cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.), is an exotic Brazilian fruit consumed exclusively in the southern region of the Amazonas state. Due to the lack of knowledge about its chemical composition, the Remela-de-cachorro was studied in relation to its phenolic constitution and its aroma. In this sense, the objective of this study was to perform a qualitative and quantitative chemical study of its fruits by means of ultrahigh-performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS/MS and GC-MS, respectively). Additionally, to evaluate the antioxidant activities and *in vitro* enzymatic inhibition of the methanolic extract. The GC-MS technique was employed along with the solid phase microextraction in *headspace* (HS-SPME) to evaluate the fruit aroma composition. Twenty-eight compounds were identified from the *in natura* pulp of remela-de-cachorro, with aldehydes being the most abundant group of volatile organic compounds in the fruits with a total percentage of 26,14%. It was found that linalool (10,1%), 1-octen-3-ol (4,42%), β -ionone (4,08%) and hexanal (3,05%) were the main contributors to the aroma characteristic of this species. Using the Folin-Ciocalteu method, showed that the studied fruit is rich in phenolic compounds (8,28 mg GAE/g). Using the LC-MS/MS system, 9 phenolic compounds (alkyl gallates, flavonoids and hydroxycinnamic acids) were identified and quantified in the pulp. The antioxidant capacity of remela-de-cachorro extract by the ABTS method presented better antioxidant activity ($12,0 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$) compared to the DPPH assay ($30,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$). The effect of fruit extract showed low percentage of total inhibition against lipase and α -glucosidase enzymes.

Keywords: Spectrometry; *Clavija lancifolia*; antioxidant activity; extract

LISTA DE SIGLAS e ACRÔNIMOS

- $^1\text{O}_2$ Oxigênio singlete;
- AA Atividade Antioxidante;
- ABTS Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico;
- ABTS^{•+} Cátion radicalar do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico;
- Abs Absorbância;
- APCI Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês "*atmospheric pressure chemical ionization*");
- API Ionização à Pressão Atmosférica (do inglês "*atmospheric pressure ionization*");
- APPI Ionização química por fotoionização à pressão atmosférica (do inglês "*atmospheric pressure photo ionization*");
- CI Ionização química (do inglês "*chemical ionization*");
- CID Dissociação Induzida por Colisão (do inglês ("*collision-induced dissociation*");
- DMSO Dimetilsulfóxido;
- DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazil;
- GAE Equivalentes de ácido gálico (do inglês "*gallic acid equivalent*");
- EI Ionização por elétrons (do inglês "*electron ionization*");
- ESI Ionização por eletrospray (do inglês "*Electrospray Ionization*");
- ESI-MS Espectrometria de massas com fonte eletrospray acoplada a espectrometria de massas (do inglês "*electrospray ionization – mass spectrometry*");
- Ext Extrato;
- FAB Ionização por bombardeamento rápido de átomos (do inglês "*fast atom bombardment*");
- TF Fenólicos totais (do inglês "*totals fenolics*");
- FT-ICR Ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (do inglês "*Fourier transform ion cyclotron resonance*");

- IC₅₀ Concentração inibitória em 50% (do inglês “*inhibition concentration*”);
- IT Ion-trap;
- HO[•] Radical hidroxila;
- MALDI Ionização/dessorção à laser auxiliada por matriz (do inglês “*matrix-assisted laser desorption/ionization*”);
- MS Espectrometria de massas (do inglês “*mass spectrometry*”);
- MS/MS Espectrometria de massa sequencial (do inglês “*tandem mass spectrometry*”);
- NIST Instituto Nacional de Normas e Tecnologia (do inglês “The National Institute of Standards and Technology”);
- ppt Partes por trilhão;
- *m/z* Razão massa carga;
- O₂^{•-} Ânion superóxido;
- PNP *p*-nitrofenilpalmitato;
- PVDF Fluoreto de polivinilideno (do inglês “*polyvinylidene difluoride*”);
- Q Quadrupolo;
- QqQ Triplo quadrupolo;
- Q-TRAP Quadrupolo – Ion-trap;
- RO[•] Radical alcóxila;
- ROO[•] Radical peróxila;
- rpm Rotação por minuto;
- SPME Micro-extração em fase sólida (do inglês “*Solid Phase Micro Extration*”);
- SRM Monitoramento de reação selecionada (do inglês “*selected reaction monitoring*”);
- TF Fenólicos totais (do inglês “*total fenolic*”);
- TOF Tempo-de-vôo (do inglês “*time-of-flight*”);

- TOF-TOF Tempo-de-vôo em tandem (do inglês “*time-of-flight-time-of-flight*”);
- UHPLC-MS/MS Cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês “*ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”);
- UV/VIS Espectroscopia no ultravioleta visível;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Terpenos encontrado nas flores das espécies <i>C. euerganea</i> e <i>C. repanda</i> . sabineno (1), β -cariofileno (2), humuleno (3), β -selineno (4), cis- α -bergamoteno (5), trans- α -bergamoteno (6) e β -sesquifelandreno (7).	17
Figura 2. Triterpenos isolados das cascas da espécie <i>C. procera</i> - aegicerina (8) e protoprimum genina A (9).....	18
Figura 3. Ilustração das partes detalhada de <i>C. lancifolia</i> Desf.....	18
Figura 4. Rota de formação das espécies reativas do oxigênio.....	20
Figura 5. Distriuição eletrônica do oxigênio no estado fundamental (triplete) e no estado excitado (singlete).....	21
Figura 6. Rota biossintética dos composto fenólicos.....	22
Figura 7. Reação de oxirredução do ácido gálico (ex: composto fenólico) com molibdênio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu).....	24
Figura 8. (A) Reação entre o radical DPPH [*] e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. (B) Reação com persulfato de potássio e redução do ABTS ⁺⁺ ocasionada por um composto antioxidante..	27
Figura 9. A) Exemplo de uma reação catalisada por α -glicosidase: oligossacarideo; B) Reação de hidrólise catalisada pela lipase.....	29
Figura 10. Representação do dispositivo utilizado para SPME.....	31
Figura 11. Etapas da microextração em fase sólida. (a) extração no modo <i>headspace</i> (b) extração no modo direto (c) dessorção dos analitos no cromatógrafo.....	31
Figura 12. Esquema genérico de um espectrômetro de massas.....	35
Figura 13. Esquema do sistema de ionização via ESI no modo positivo.....	36
Figura 14. Esquema ilustrativo da geometria instrumental de analisador do tipo QqQ.....	37
Figura 15. Cromatograma de SPME/GC-MS para polpa <i>in natura</i> da remela-de-cachorro. Picos: (1) hexanal; (2) 1-hexanol; (3) (<i>E</i>) 2-heptenal; (4) benzaldeído; (5) 1-octen-3-ol; (6) 3-octanona; (7) 2-pentil furano; (8) limoneno; (9) (<i>E</i>) 2-octenal; (10) 1-octanol; (11) linanol; (12) nonanal; (13) 1-nonanol; (14) 2-metil biciclo [4.3.0] non-1(6)-eno; (15) β -ciclocitral; (16) 2-ciclohexen-1-ol; (17) 2-undecanona; (18) undecanal; (19) (<i>E,E</i>) 2,4-decadienal; (20) (<i>E</i>) 2-dodecenal; (21) tetradecano; (22) 2,2-dihidro- α -ionona; (23) (<i>E</i>) α -ionone; (24) geranyl acetona; (25) 1-deceno; (26) (<i>E</i>) β -ionone; (27) pentadecano; (28) ciclododecano;.....	45

Figura 16. Compostos voláteis majoritários presentes na polpa <i>in natura</i> da remela-de-cachorro. (1) benzaldeído, (2) linalol, (3) 2-metil biciclo [4.3.0] non-1(6)-eno, (4) 1-octen-3-ol, (5) β -ionona, (6) 3-octanona e (7) hexanal.....	45
Figura 17. Curva de calibração do padrão ácido gálico para a determinação da concentração de fenólicos totais presentes no extrato da remela-de-cachorro.....	51
Figura 18. Separação dos compostos fenólicos do extrato da polpa da remela-de-cachorro detectado por UHPLC-MS/MS no modo SRM. (1) ácido clorogênico, (2) ácido cafeico, (3) galato de etila, (4) ácido <i>p</i> -cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) galato de propila (7) luteolina (8) kaempferol (9) apigenina. Padrões internos: ácido vanílico e isoramnetina.....	54
Figura 19. Mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico m/z 185 [M - H] ⁻	55
Figura 20. Proposta de fragmentação do ácido cafeico m/z 179 [M - H] ⁻	56
Figura 21. Proposta de fragmentação do galato de etila m/z 197 [M - H] ⁻ ..	56
Figura 22. Proposta de fragmentação do ácido <i>p</i> -cumárico m/z 167 [M - H] ⁻	57
Figura 23. Proposta de fragmentação do ácido ferúlico m/z 194 [M - H] ⁻ .	57
Figura 24. Fragmentações MS/MS da luteolina m/z 185 [M - H] ⁻	58
Figura 25. Esquema da proposta de fragmentação do kaempferol [M - H] ⁻	59
Figura 26. Mecanismos de fragmentação MS/MS para apigenina [M - H] ⁻	59
Figura 27. Inibição dos radicais DPPH e ABTS pelo extrato de remela-de-cachorro e do padrão ácido gálico expresso pelo parâmetro do IC ₅₀	63
Figura 28. Aumento da atividade antioxidante de acordo com a quantidade de grupos hidroxilas.....	67
Figura 29. Ácidos fenólicos com grupo hidroxila na posição “ <i>para</i> ”.....	67
Figura 30. Relação estrutura-atividade antioxidante de flavonol e flavona. Kaempferol (1), luteolina (2), apigenina (3).....	68
Figura 31. Atividade inibitória da microdiluição do extrato metanólico de remela-de-cachorro (0,78 - 100 μ g/mL) comparada com a atividade do orlistate e acarbose (controles positivo) frente as enzimas lipase e α -	

glicosidase, respectivamente. Dados apresentados com a média \pm desvio padrão das replicatas (n=3)..... 70

Figura 32. Aumento da atividade inibitória enzimática com base no substituinte (OH) do C-3 do anel flavonoidico (quercetina > luteolina; kaempferol > apigenina) e aumento dos substituintes do anel B (quercetina > kaempferol; luteolina > apigenina)..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Redução do oxigênio a espécies reativas.....	20
Tabela 2. Principais classes de compostos fenólicos em relação à sua cadeia de carbônica.....	23
Tabela 3. Tempos de retenção (TR), fragmentos, massa molar (MM), índice de Kovats teórico (KI teor.), índice de Kovats experimental (KI exp.), área proporcional dos compostos voláteis identificados da remela-de-cachorro por SPME-GC/MS e limite de cheiro em água (L.C).....	47
Tabela 4. Quantidades de compostos orgânicos voláteis em frutas expresso em porcentagem (%).....	48
Tabela 5. Teor de compostos fenólicos em frutas tropicais.....	52
Tabela 6. Transições SRM, massa molecular e concentração dos compostos presentes no extrato e na polpa de remela-de-cachorro obtido por UHPLC-MS/MS.....	54
Tabela 7. Atividade antioxidante de frutas tropicais pelo método do DPPH expresso em IC ₅₀	64
Tabela 8. Atividade antioxidante de frutas pelo método do DPPH e ABTS..	65

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE SIGLAS e ACRÔNIMOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Frutos Amazônicos e sua importância</i>	16
1.1.1. <i>Clavija lancifolia</i> Desf.	17
1.2. <i>Estresse oxidativo e Atividade antioxidante</i>	19
1.4. <i>Determinação de fenólicos totais</i>	24
1.5. <i>Avaliação da atividade antioxidante (DPPH e ABTS)</i>	25
1.6. <i>Testes de inibição enzimática</i>	27
1.7. <i>Composição aromática em frutas</i>	29
1.8. <i>Fundamentos da Espectrometria de Massas</i>	32
1.8.1 <i>Instrumentação da MS</i>	34
1.8.2 <i>Ionização por eletrospray (ESI)</i>	35
1.8.3 <i>Espectrometria de Massas Sequencial (MS/MS)</i>	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. <i>Objetivo geral</i>	38
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	38
3. PARTE EXPERIMENTAL	39
3.1. <i>Obtenção e preparo da amostra</i>	39
3.2. <i>Análise dos compostos voláteis por HS-SPME/GC-MS</i>	39
3.3. <i>Determinação de fenólicos totais</i>	40
3.4. <i>Análise por UHPLC-MS/MS</i>	41
3.5. <i>Ensaio antioxidantes (DPPH e ABTS)</i>	42
3.6. <i>Ensaio enzimáticos in vitro</i>	43
3.6.1. <i>α-glicosidase</i>	43
3.6.2. <i>Lipase</i>	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1. <i>Identificação dos compostos voláteis da polpa da remela-de-cachorro por GC-MS</i>	45
4.2. <i>Determinação dos compostos fenólicos totais do extrato da remela-de-cachorro</i>	50

4.3. Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato da polpa da remela-de-cachorro por UHPLC-MS/MS.....	53
4.4. Atividade antioxidante do extrato da remela-de-cachorro pelo método do DPPH e ABTS.....	62
4.4.1. Comparação da atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e ABTS.....	65
4.5. Atividade antienzimática (Lipase e α -glicosidase) da remela-de-cachorro.....	69
5. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Frutos Amazônicos e sua importância*

O Brasil atualmente é o terceiro maior produtor de frutas do mundo (BATAGLION et al., 2015), mesmo contando com uma variedade incomparável de espécies botânicas, pouca é a diversidade encontrada em mercados e feiras populares brasileiras (CLERICI & CARVALHO-SILVA, 2011). A justificativa para tal, deve-se à extensa área territorial do Brasil, o que leva a comercialização de certos frutos de um determinado bioma apenas nas regiões de abrangência desse bioma (SOUZA et al., 2016; CORADIN et al., 2011). No Brasil, a região Amazônica responde por cerca de 220 espécies de plantas frutíferas comestíveis representando 44% da diversidade de frutas nativas no Brasil (NEVES et al., 2015). Ainda são escassos estudos que relatam o uso etnofarmacológico destas espécies bem como suas aplicações como fonte de nutrição (LIMA et al., 2013).

Diversas frutas exóticas pouco conhecidas do público brasileiro em geral são consumidas apenas por uma determinada parcela da população, isto levado pelo conhecimento popular, especialmente nas regiões mais isoladas do país (por ex. Amazonas) (BRASIL, 2002). No que se diz respeito ao conhecimento nutricional, poucos são os estudos que correlacionam a composição química destas fontes de alimento com possíveis benefícios de seu consumo (GOMES, 2007).

Frutas amazônicas são em geral ricas em compostos fenólicos, indicando possíveis aplicações além da nutrição. Além dos polifenóis, carotenoides e diversas outras micromoléculas que desempenham importantes funções nutricionais. Em menor quantidade são encontrados metabólitos secundários como; alcaloides, policetídeos diversos, depsídeos, terpenoides, esteroides, e peptídeos (RAMOS et al., 2015). As observações frequentes sobre a utilização e a eficiência dos efeitos das plantas frutíferas medicinais tem despertado o interesse de pesquisadores de áreas multidisciplinares tais como a farmacologia, a botânica e a química, que enriquecem o conhecimento acerca da flora mundial (DINDA et al., 2016).

Neste sentido, o consumo de frutas tropicais tem sido incentivado devido o reconhecimento dos seus valores nutricionais e terapêuticos (RUFINO et al., 2010). Alguns grupos de pesquisa indicam que frutos Amazônicos apresentam uma gama de propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória (KANG et al., 2012), antimicrobiana (KOOLEN et al., 2013), imunomoduladora (LUSTOSA et al., 2016),

antinociceptiva (FAVACHO et al., 2011) e antioxidantes (RAMOS et al., 2015; KOOLEN et al., 2013; NEVES et al., 2012).

1.1.1. *Clavija lancifolia* Desf.

O gênero *Clavija* está incluso na família Theophrastaceae (TAYLOR et al., 2013; STAHL, 1995), compreendendo 97 espécies (THE PLANT LIST, 2013). Este gênero é distribuído predominantemente na América do Sul (KNUDSEN & STAHL, 1994), e tem ocorrências no Equador e Colômbia (STAHL, 1986).

Com base na composição química desse gênero, foi relatado a predominância de terpenoides (figura 1) nos óleos essenciais das flores de duas espécies (*Clavija euerganea* e *Clavija repanda*), sendo encontradas pequenas quantidades de terpenos irregulares, monoterpenos e em grandes quantidades os sesquiterpenos (KNUDSEN & STAHL, 1994). Já o estudo de Rojas e colaboradores (2006) mostrou que dois triterpenos isolados (figura 2) da espécie *Clavija procera* apresentou atividade antimicobacteriana.

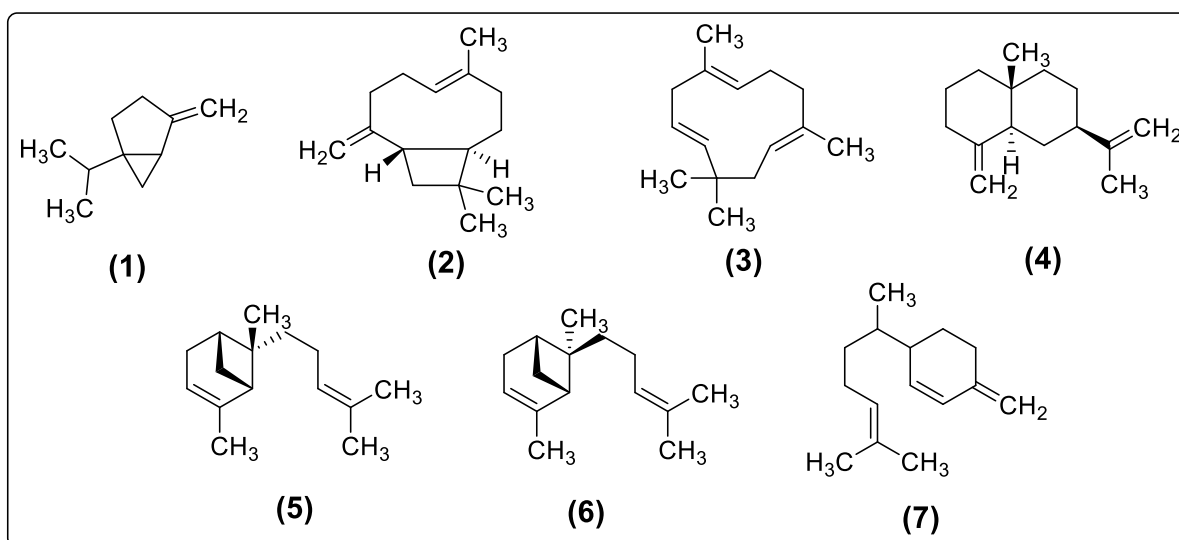


Figura 1. A) Terpenos presentes nos óleos essenciais das flores das espécies *C. euerganea* e *C. repanda*. sabineno (1), β -cariofileno (2), humuleno (3), β -selineno (4), *cis*- α -bergamoteno (5), *trans*- α -bergamoteno (6) e β -sesquifelandreno (7);

Fonte: KNUDSEN & STAHL, 1994;

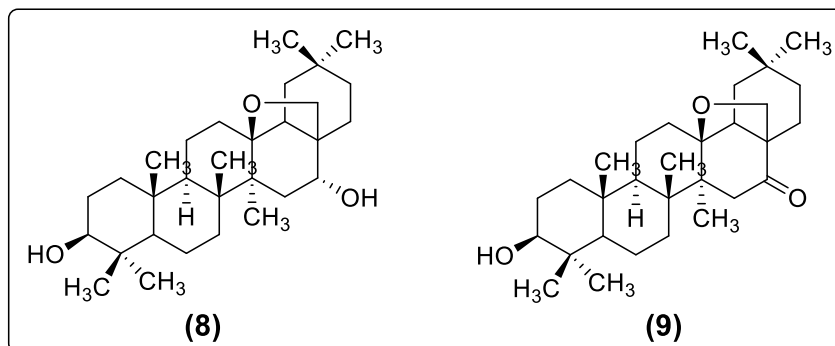


Figura 2. Triterpenos isolados das cascas da espécie *C. procera* - aegicerina **(8)** e protoprimumla genina A **(9)**.

Fonte: KNUDSEN & STAHL, 1994;

Clavija lancifolia Desf., conhecida popularmente na região Sul do estado do Amazonas como “remela-de-cachorro” é uma arvoreta que pode chegar a até 3 m de altura. As inflorescências podem ser masculinas, femininas ou fundidas (bissexuais), de coloração amarela clara e laranjada (KNUDSEN & STAHL, 1994), e sempre abundantes (CARIS & SMETS, 2003). Os frutos são amarelos quando maduros medindo de 1 a 3 cm de diâmetro (FLORA OF THE GUIANAS, 2016). A polpa é gelatinosa, com um fraco aroma de caramelo, além de um sabor semelhante à uva caramelizada (SKYFIELD TROPICAL, 2016). As folhas são pseudo-espírais, e agrupadas na parte superior do tronco (CARIS & SMETS, 2003).

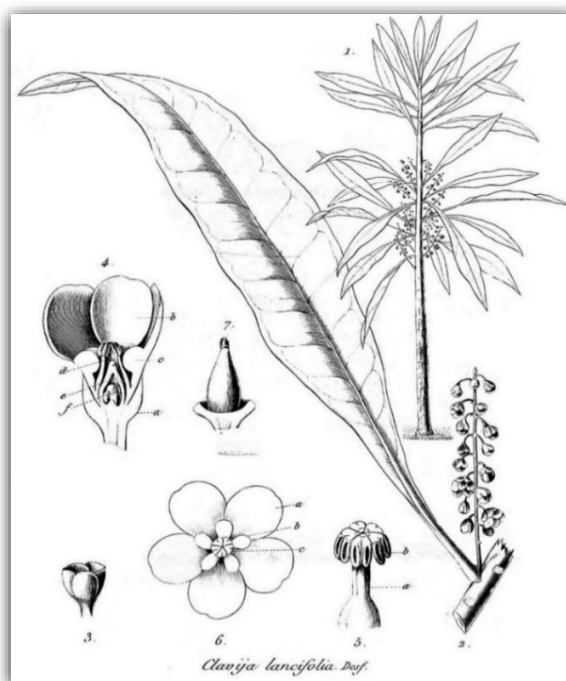


Figura 3. Ilustração das partes detalhada de *C. lancifolia* Desf.

Fonte: PREMIER, 1832

C. lancifolia encontra-se distribuída predominante na bacia do Rio Orinoco (Venezuela) (DEFILIPPS et al., 2004), e na bacia Amazônica, mais precisamente no norte do Brasil (Rondônia, Roraima, Pará, Amapá, e Amazonas), e nos países: Bolívia, Equador e Peru (GRANDTNER & CHEVRETTE, 2013). No Amazonas, seu consumo não é muito difundido, sendo principalmente consumido no Brasil pela população ribeirinha que vive ao longo das margens da calha do rio Purus.

Não há quaisquer relatos na literatura acerca da composição química de qualquer parte de *C. lancifolia*. Previamente, encontra-se apenas um trabalho na literatura relatando a citotoxicidade dos extratos de folhas de *C. lancifolia* (TAYLOR et al., 2013).

1.2. *Estresse oxidativo e Atividade antioxidante*

Compostos antioxidantes são definidos como aqueles que inibem ou retardam a velocidade de um processo oxidativo metabólico, protegendo os tecidos vivos contra danos causados por radicais instáveis, denominados de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). O oxigênio é um agente oxidante, sendo inevitável impedir oxidações secundárias para a manutenção das células humanas. O processo oxidativo natural do metabolismo do nosso corpo não é controlável, podendo em alguns casos, provocar diversos danos à saúde se seus produtos não forem neutralizados por uma substância antioxidante eficiente (BARREIROS et al., 2006).

A elevação na produção das espécies reativas de oxigênio acarreta num desequilíbrio entre compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, levando ao estresse oxidativo, ou seja, na geração excessiva de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). Vale ressaltar que fontes externas, como a radiações ionizantes, tabagismo, drogas, contaminantes e poluentes, dietas excessivamente calóricas, excesso de exercícios físicos, também aumentam o estresse oxidativo (MARTELLI & NUNES, 2014).

As principais espécies reativas de oxigênio (Tabela 1) incluem o grupo dos radicais como; radical hidroxila (HO^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), alcóxila (RO^{\bullet}); peróxila (ROO^{\bullet}) e os não-radicalares: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (MARTELLI & NUNES, 2014; BARREIROS et al., 2006; RONSEIN et al., 2006).

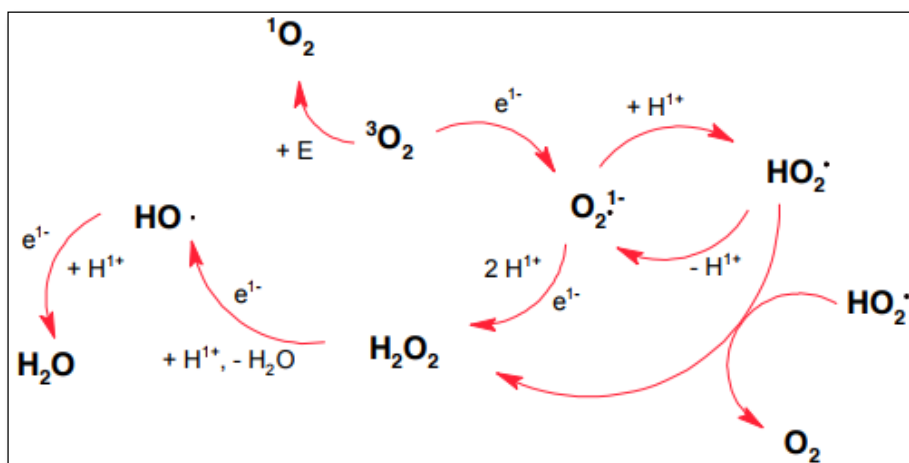


Figura 4. Rota de formação das espécies reativas do oxigênio

Tabela 1. Redução do oxigênio a espécies reativas

	Reação	Radicais
(1)	$\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{luz UV}} \cdot\text{OH} + \cdot\text{H}$	Radical hidroxila
(2)	$\text{M}^{n+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{M}^{(n+1)} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$	Radical hidroxila
(3)	$\text{O}_2 + \text{e}^- \longrightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
(4)	$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
(5)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{e}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \cdot\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	Radical hidroxila
(6)	$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
(7)	$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HOO}\cdot$	Radical hidroperoxil
(8)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MPO}} \text{H}_2\text{O} + \text{HOCl}$	Ácido hipocloroso

Fonte: BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006

A produção do radical $\text{HO}\cdot$ nas células da pele é formado no organismo pela homólise da água por exposição à radiação ionizante no ultravioleta (equação 1) e pela reação de H_2O_2 com metais de transição presentes no interior das células (equação 2). A etapa da respiração (equações 3-5) incide na maior fonte de energia para os organismos aeróbicos, pelo qual uma molécula de O_2 é reduzida formando o radical superóxido (equação 3), peróxido de hidrogênio (equação 4) e o radical hidroxila (equação 5) (BARREIROS et al., 2006).

A formação de peróxido de hidrogênio (equação 6) é ocasionado pela desmutação (reação pela qual uma parte da molécula é oxidada e a outra é reduzida desproporcionalmente) do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em meio aquoso. O $\text{O}_2^{\cdot-}$

também é uma base fraca cujo ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HOO^{\bullet}) é mais reativo (equação 7) (BARREIROS et al., 2006). O ácido hipocloroso é formado através dos neutrófilos (células sanguíneas que tem a função de defesa do organismo humano) pela reação de íons cloreto em presença de peróxido de hidrogênio catalisado pela enzima mieloperoxidase (MPO) (equação 8) (ALVES et al., 2010).

Esses subprodutos apresentam reatividade química superior ao oxigênio no estado fundamental (oxigênio triplete). O oxigênio triplete possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, o que garante certa estabilidade. Portanto o oxigênio triplete não se caracteriza com um radical livre. Já o oxigênio singlete apresenta dois estados: primeiro estado excitado, possui dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital e o segundo estado tem um elétron em cada orbital π degenerado, com spins opostos (figura 5) (RONSEIN et al., 2006).

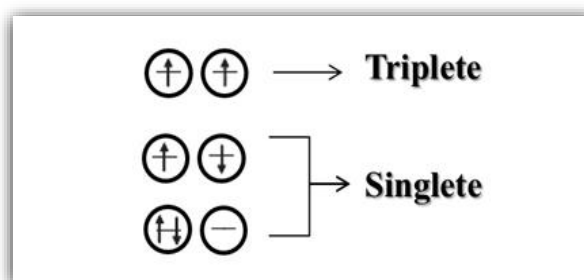


Figura 5. Distribuição eletrônica do oxigênio no estado fundamental (triplete) e no estado excitado (singlete)

Fonte: RONSEIN et al., 2006.

Muitas doenças crônicas e degenerativas estão relacionadas com a formação desses radicais instáveis, tais como doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas (doença de Parkinson e câncer) (KRISHNAIAH et al., 2011), diabetes mellitus (DANDONA et al., 1996), arterosclerose, artrite e cirrose hepática (SARIKURKCU et al., 2008). Além disso, estas espécies estão também envolvidas no processo de envelhecimento celular e declínio do sistema imune (ABRAHÃO et al., 2010). Com isso, substâncias antioxidantes têm ganhado destaque nos últimos anos por serem potenciais agentes terapêuticos para essas diversas doenças (NEVES et al., 2012; ALVES et al., 2010).

Baseando-se nisso, muitos estudos comprovam que fontes frutíferas são ricas em compostos fenólicos, os quais são responsáveis pelas atividades antioxidantes (AA) de extratos obtidos a partir destes frutos (SINGH et al., 2016; SRIPAKDEE et

al., 2015; VALDENEGRO et al., 2013). Esses compostos antioxidantes naturais incluem os tocoferóis e carotenóides (RAMALHO & JORGE, 2006), o ácido ascórbico e principalmente os compostos fenólicos e seus diversos derivados, e em poucas situações outras classes de metabólitos secundários também podem possuir tais propriedades (BROINIZI et al., 2007; CERQUEIRA et al., AUGUSTO, 2007; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

1.3. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são caracterizados pela sua estrutura central aromática com uma ou mais substituintes hidroxilas ligadas diretamente nos anéis benzênicos (TAIZ & ZEIGER, 2006). Esses compostos apresentam em sua estrutura um grupo heterogêneo de moléculas que possuem AA devido a sua capacidade de doar hidrogênios ou elétrons, o que impedem a oxidação de moléculas no organismo (SOARES, 2002). Os polifenóis são biossintetizados por meio da via metabólica chiquimato e acetato (figura 6) (BRAZ-FILHO, 2010).

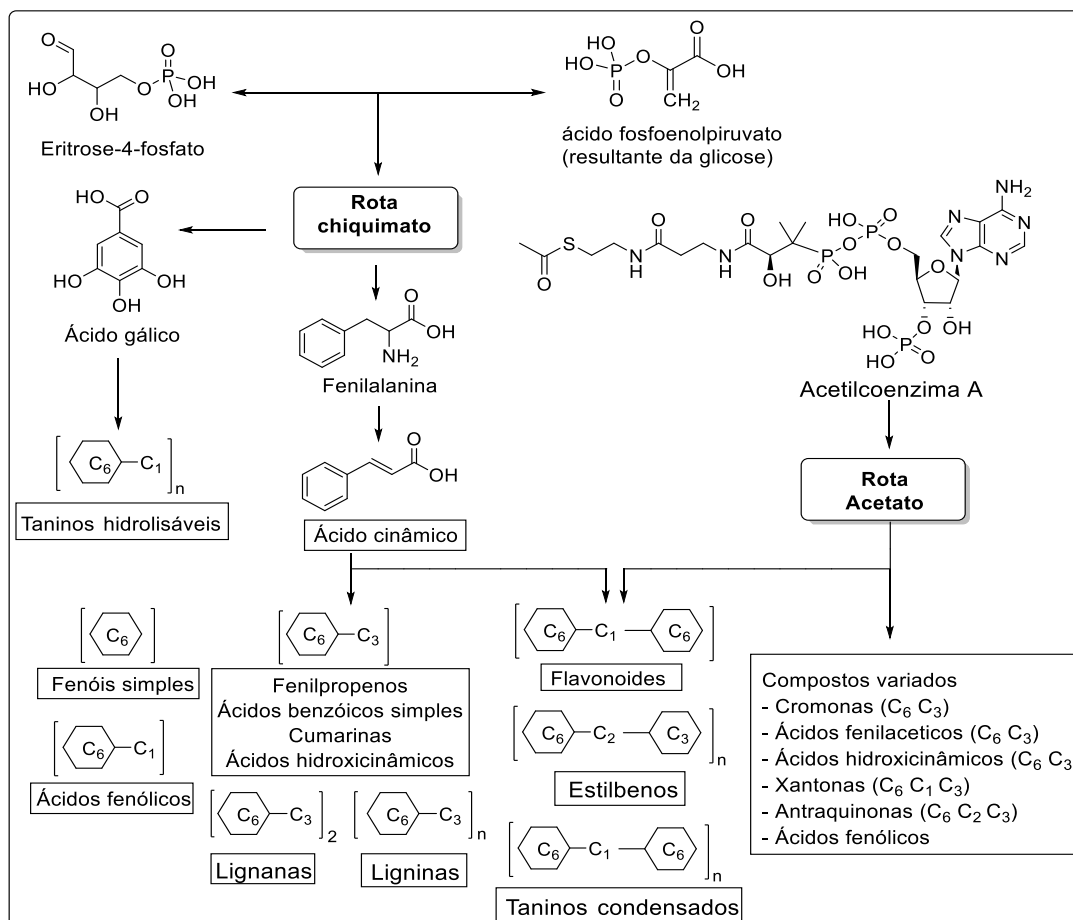


Figura 6. Rota biossintética dos composto fenólicos.

Fonte: Adaptado de BRAZ-FILHO, 2010.

Essa classe constitui um dos grupos de substâncias com distribuições amplas e mais numerosas do reino vegetal, com mais de 8.000 estruturas fenólicas já identificadas, incluindo mais de 4.000 flavonoides diferentes (IGNAT et al., 2011).

Esses compostos podem ser classificados em diferentes grupos, dependendo do número de anéis fenólicos e substituintes ligados no anel em sua estrutura básica, por exemplo, fenóis simples, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos e antraquinonas (DEY et al., 2016). Também podem ser classificados de forma simplificada, com base na sua massa molecular, como compostos de baixo, intermediário (flavonoides) e alto peso molecular (ligninas, taninos condensados e taninos hidrolisáveis) (DEY et al., 2016; SILVA et al., 2010). Os principais grupos de compostos fenólicos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Principais classes de compostos fenólicos em relação à sua cadeia de carbônica.

Classes	Rota biossintética	Esqueleto básico
Fenóis simples	Via acetato	C ₆
Ácidos fenólicos	Via acetato	C ₆ C ₁
Acetofenonas e ácidos fenilacéticos	Via acetato	C ₆ C ₂
Cromonas	Via acetato/	C ₆ C ₃
Ácidos hidroxicinâmicos	Via acetato/chiquimato	
Cumarinas e fenilpropenos	Via chiquimato	
Naftoquinonas	Via chiquimato	C ₆ C ₄
Xantonas	Via acetato/chiquimato	C ₆ C ₁ C ₆
Estilbenos	Via acetato/chiquimato	C ₆ C ₂ C ₆
antraquinonas	Via acetato	
Flavonoides	Via acetato/chiquimato	C ₆ C ₃ C ₆
Lignanas	Via chiquimato	(C ₆ C ₃) ₂
Ligninas	Via chiquimato	(C ₆ C ₃) _n
Taninos hidrolisáveis	Via chiquimato	(C ₆ C ₁) _n
Taninos condensados	Via acetato	(C ₆ C ₃ C ₆) _n

Fonte: ANGELO & JORGE, 2007

Com base na importância desta classe de substância, surge o interesse em estimar a quantidade de fenólicos totais na polpa da fruta remela-de-cachorro utilizando um método espectrofotométrico.

1.4. Determinação de fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de métodos tais como: espectrofotométricos, eletroquímicos, e cromatográficos (ARCHELAL & ANTONIA, 2013). Todavia, o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu é empregado somente para estimar o teor fenólico em amostras de vegetais (DENG et al., 2013) e frutas (VIEIRA et al., 2011), por meio de espectroscopia na região do visível a um comprimento de onda entre 730 a 760 nm.

Esse método foi desenvolvido por Singleton e Rossi (1965), oferecendo uma estimativa bruta de flavonoides, antocianinas e outros compostos fenólicos presentes em extratos e suas frações (ROESLER et al., 2007). Vários compostos fenólicos (não necessariamente todos) respondem diferentemente neste ensaio, dependendo do número de grupos fenólicos que a substância possui (ROHMAN et al., 2010).

A reação entre o reagente de Folin com um composto fenólico consiste na formação do complexo do ácido fosfotungstico-fosfomolibdico, no qual o molibdênio encontra-se na forma complexada $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ apresentando estado de oxidação $6+$ (Mo^{6+}) e de coloração amarela. Os compostos fenólicos (como por exemplo, ácido gálico (figura 7)) quando em presença do meio alcalino (Na_2CO_3) são desprotonados gerando ânions carboxilados. Com isso, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, pela qual o os complexos molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ é reduzido (estado de oxidação $+5$ (Mo^{5+})) formando o complexo de coloração azul (OLIVEIRA et al., 2009; ABDILLE et al., 2005).

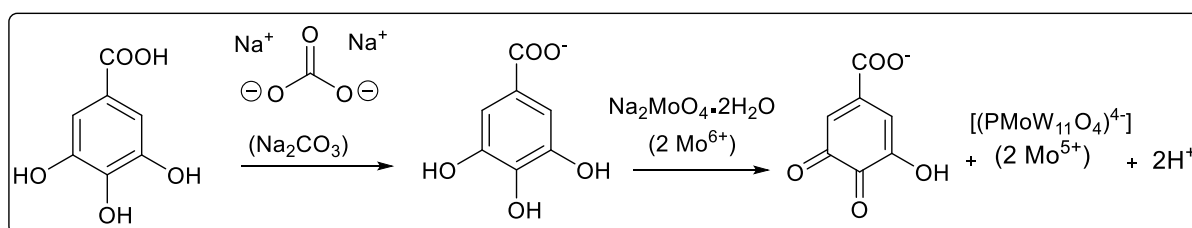


Figura 7. Reação de oxirredução do ácido gálico (ex: composto fenólico) com molibdênio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu).

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2009

Para análise dos dados, é necessária a utilização de uma curva padrão neste método, por exemplo o ácido gálico (composto mais utilizado para a formação desta curva), sendo este o motivo pelo qual a maioria dos resultados são expressos em mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato.

A mudança do estado de oxidação e a intensidade da coloração permitem a quantificação dos compostos redutores, neste caso, os compostos fenólicos presente no extrato. Além disso, outros compostos redutores (tais como o ácido ascórbico e açúcares) são quantificados indiretamente por métodos espectrofotométricos. Isso ocorre devido os produtos das reações de redução apresentarem um pico máximo de absorbância na região de 760 nm (SRIPAKDEE et al., 2015; SÁ et al., 2012).

Baseado nisso, o método não é específico para compostos fenólicos, uma vez que determina outras substâncias redutoras presentes que podem interferir no resultado final (OLIVEIRA et al., 2009; ANGELO & NEUZA, 2007). Esse fato também foi comprovado no estudo de Genovese e colaboradores (2003) que verificaram que o ácido ascórbico interfere na quantificação de fenólicos totais em concentração acima de 5 μmol . Com isso, o método de Folin-Ciocalteu torna-se apenas uma estimativa do teor fenólico em extratos.

A presença desta classe de substâncias bioativas em diversos alimentos vem estimulando a utilização de métodos para avaliação da AA *in vitro* de novas fontes frutíferas e subprodutos da produção/extração de frutos consolidados no cotidiano da população (KOOLEN et al., 2013).

1.5. Avaliação da atividade antioxidante (DPPH e ABTS)

Dentre alguns destes métodos químicos destacam-se os ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que são mais comumente utilizados para avaliar a AA de alimentos e produtos naturais (WOJDYLO et al., 2007).

O ensaio de DPPH envolve os mecanismos de transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio. É um dos métodos mais utilizados, considerado um teste rápido, preciso e com boa estabilidade na avaliação da AA (DAVID et al., 2007; SZABO et al., 2007; NIKI, 2010). O método mais recente foi introduzido por Brand-Williams (1995) e, tem sido utilizado como ponto de referência para muitos estudos recentes (STOJILJKOVICA et al., 2016; PEREIRA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2011). O DPPH^{*} é caracterizada por ser um radical de nitrogênio orgânico estável, na qual sua estabilidade é devido à deslocalização deste elétron livre sobre a molécula como um todo. Esta estabilidade atribui um aumento na coloração violeta escuro, caracterizada por uma banda de absorção máxima na faixa de 520 nm (MOLYNEUX, 2004).

O DPPH é reduzido através da ação de um antioxidante para a formação de 2,2'-difeníl-picril-hidrazina (figura 8A), ao qual é caracterizado pela sua descoloração devido a doação do hidrogênio por uma molécula antioxidante, diminuindo a absorvância (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI & SAURA-CALIXTO, 1998; BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SANTOS et al., 2007).

A determinação da AA pelo método ABTS (2,2' - azinobis-3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico) foi sugerido inicialmente por Miller et al. (1993), também muito utilizado em testes bioquímicos. O radical $ABTS^{\cdot+}$ é um composto cromóforo quimicamente estável, apresenta em seu espectro de ultravioleta absorvância máxima em torno de 414 (KUSKOSKI et al., 2005; MILLER et al., 1995), e de medidas secundárias em 645, 734 e 815 nm (SUCUPIRA et al., 2012), sendo observada a diminuição da absorvância.

O método baseia-se na geração do cátion radicalar $ABTS^{\cdot+}$, de coloração azul esverdeada, por meio da reação química com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$). A descoloração do meio reacional é favorecida por meio do grau da capacidade antioxidante da substância, reduzindo o $ABTS^{\cdot+}$ para ABTS (figura 8B). Como uma vantagem deste método tem-se a possibilidade de aplicação ao estudo de substâncias antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis (RE et al., 1999).

Assim como o DPPH, o ABTS também possui boa estabilidade em certas condições de análise, mas ambos apresentam diferenças importantes frente a certos compostos antioxidantes, implicando que estes métodos são complementares. Outra vantagem é que o DPPH é solúvel somente em solventes orgânicos (especialmente alcoólicos), enquanto que ensaios via ABTS podem ser realizados tanto em água, como em solventes orgânicos dependendo da natureza dos compostos antioxidantes (ARNAO, 2000).

Resultados de AA são interpretados pelo parâmetro da concentração inibitória (IC_{50}), referente à quantidade da amostra antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do DPPH e ABTS em 50%, ou seja, inibir a oxidação do radical em 50% (ROESLER, et al., 2007; SOUSA et al., 2007; MOLYNEUX, 2004; BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Quanto maior o consumo do reagente por uma amostra, menor será a sua IC_{50} e maior a sua AA (SOUSA et al., 2007).

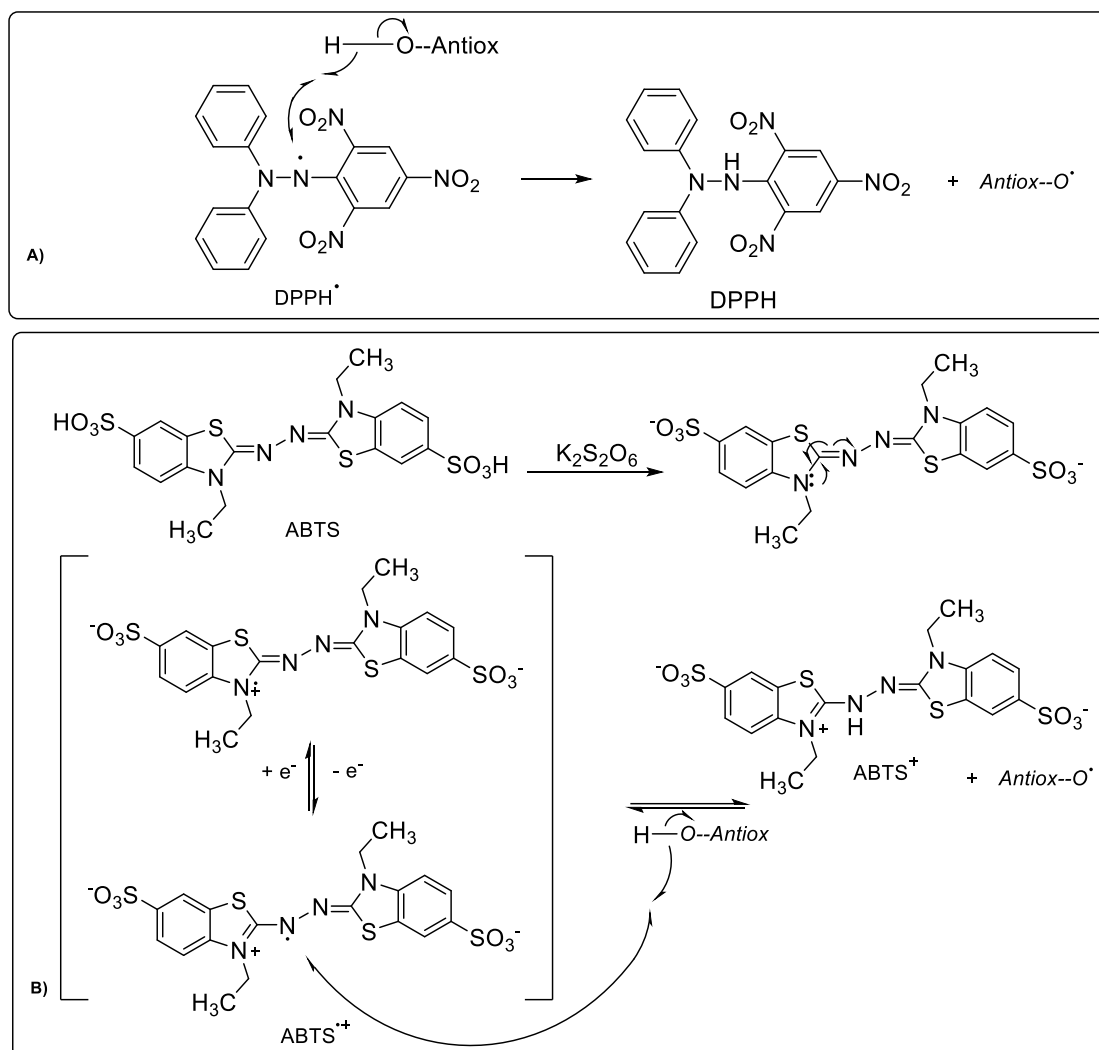


Figura 8. (A) Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. (B) Reação com persulfato de potássio e redução do ABTS^{•+} ocasionada por um composto antioxidante.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2015; HUANG et al., 2005.

1.6. Testes de inibição enzimática

Enzimas são responsáveis pela catálise de diversas reações metabólicas, incluindo aquelas inerentes do metabolismo responsável pela nutrição. Diversos hábitos alimentares podem contribuir para uma série de doenças crônicas ou degenerativas, e o tratamento para tais males passa pela inibição de certas enzimas envolvidas nos processos de digestão, por exemplo (WALTER et al., 2005). Um inibidor enzimático é qualquer substância, seja ela sintética ou natural, isolada ou associada (como é o caso dos extratos de partes de plantas que contém misturas de

substâncias), e que tem a capacidade de inibir ou reduzir a velocidade de uma reação enzimática específica (PEREIRA et al., 2011).

Nos últimos anos, a obesidade (MAHDI et al., 2015) e a diabetes (PASQUALOTTO & FRIEFERI, 2012) tem ganho destaque mundial por serem doenças crônicas associadas a altas taxas de mortalidade. As consequências da obesidade estão associadas com uma maior ocorrência de diabetes, hipertensão, entre outras doenças relacionadas com o aumento do colesterol e dos níveis de triacilgliceróis (KUMAR et al., 2006).

A lipase é a principal enzima lipolítica (responsável pela degradação de lipídeos) secretada pelo pâncreas envolvida na digestão de triacilgliceróis, ou seja, na absorção de gordura alimentar que é o principal responsável pela obesidade (KUMAR & CHAUHAN, 2010). Essa enzima é considerada um alvo terapêutico valioso para o tratamento da obesidade induzida pela dieta em humanos, uma vez que sua inibição impede a conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos livres (figura 9A), desta forma, diminuindo a absorção gastrointestinal de gorduras (FEUMBA et al., 2013).

A α -glicosidase é a enzima responsável pela digestão de carboidratos no organismo, e que em excesso, podem ocasionar diabetes, ou seja, essa enzima é responsável pela clivagem das ligações α ou β -glicosídicas, que conseqüentemente liberam resíduos de glicose (figura 9B) (ISLAM et al., 2016; MELO & CARVALHO, 2006).

Com isso, a hiperglicemia pode ser tratada por inibidores de uma via da glicosidase, retardando assim a absorção de glicose (ISLAM et al., 2016). Inibidores de α -glicosidase são amplamente utilizadas para o tratamento de pacientes com diabetes (JEONG et al., 2014; FENG et al., 2011).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o propósito de buscar alvos moleculares para o desenvolvimento de medicamentos que são eficientes no mecanismo de inibição ou redução completa da atividade catalítica de enzimas (PEREIRA et al., 2011). É importante ressaltar que os fármacos orlistate® (inibidor da enzima lipase) e acarbose® (inibidor da α -glicosidase) são os mais empregados no tratamento dessas doenças, porém produzem efeitos colaterais adversos, tais como distúrbios gastrointestinais e hepáticos, e deficiência de vitaminas lipossolúveis (SUN et al., 2017; MOHAMED et al., 2014; BIRARI & BHUTANI, 2007; WEIGLE, 2003).

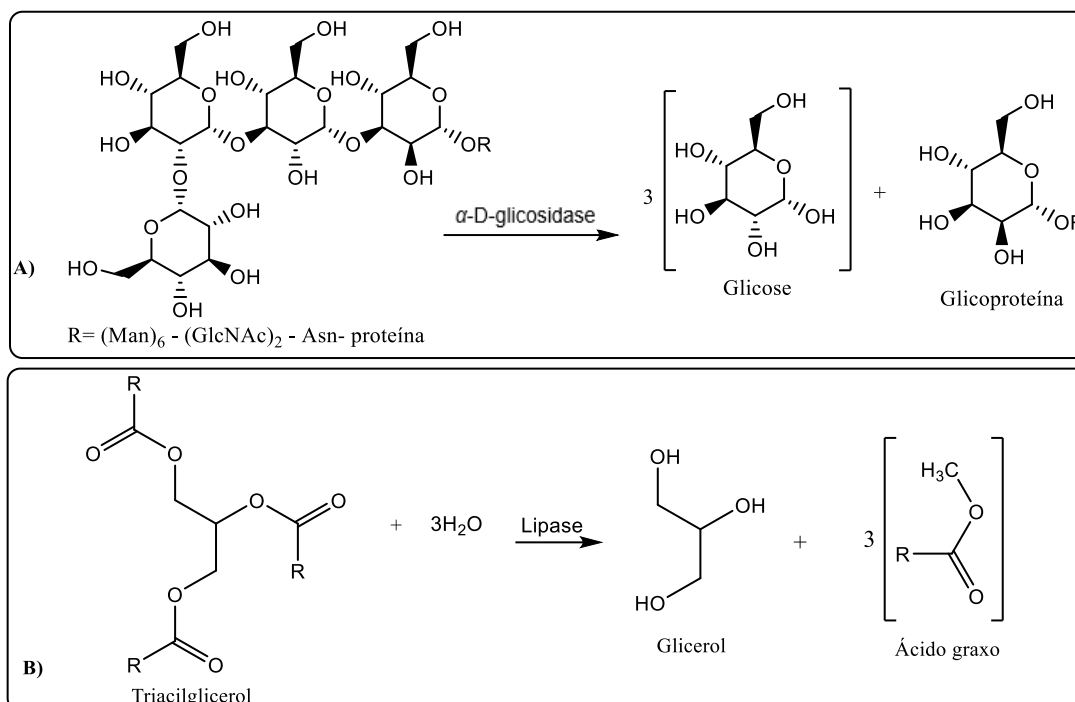


Figura 9. A) Exemplo de uma reação catalisada por α -glicosidase: oligossacarídeo; B) Reação de hidrólise catalisada pela lipase.

Fonte: MELO & CARVALHO, 2006; CORTEZ et al., 2017.

Com isso, inibidores naturais oriundos de plantas, proporcionam uma estratégia eficiente no controle de doenças como a hipertensão, obesidade e hiperglicemia associadas ao diabetes do tipo 2, com menos efeitos colaterais (JEONG et al., 2014). É comprovado que compostos fenólicos presentes em frutas inibem o mecanismo de reação dessas enzimas (ADO et al., 2013; MCDUGALL et al., 2008; LEE et al., 2008).

Alguns estudos mostram que algumas frutas são inibidores de lipases (JEONG et al., 2014; MCDUGALL & STEWART, 2009; MCDUGALL et al., 2008; HAN et al., 2007) e α -glicosidases (YANG et al., 2016; IWAI et al., 2006; MCDUGALL et al., 2005; NASU et al., 2005; MATSUURA et al., 2002) eficientes no tratamento da obesidade e diabetes respectivamente, reforçando a necessidade da busca por novas fontes inibidoras de dessas enzimas.

1.7. Composição aromática em frutas

O aroma é uma das propriedades mais apreciadas em alimentos gerado pela mistura complexa de um grande número de compostos voláteis (SOUZA et al., 2013). Como traço importante na qualidade de frutas, o aroma vem ganhando atenção das

industrias nos últimos anos para o desenvolvimento de bebidas e sobremesas (HADI et al., 2013). Os compostos voláteis que representam o sabor e aroma característico em frutas são geralmente ésteres, hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, alcoóis, terpenos ou seus derivados (BAI et al., 2016; BICAS et al., 2011).

A produção destes compostos é um fator importante na determinação da qualidade sensorial final de frutas e da satisfação dos consumidores, e é diretamente influenciada pela maturação, cuja composição é específica para uma determinada espécie e/ou muitas vezes para uma variedade de frutas (GEŐCZE et al., 2013; VILLATORIO et al., 2008).

Embora diferentes frutas apresentem muitas características aromáticas, cada espécie possui um aroma distinto que depende da concentração, da combinação e da percepção de odor individual de cada composto volátil (HADI et al., 2013). Vale ressaltar que muitos desses compostos voláteis são produzidos em quantidades vestigiais, apresentando-se abaixo limite de cheiro, o que dificulta a detecção na maioria dos instrumentos analíticos (GOFF & KLEE, 2006).

Vários métodos de extração são empregados em análises de compostos voláteis de matrizes alimentares, incluindo técnicas de destilação, extração por Soxhlet, extração assistida por micro-ondas, extração de fluido supercrítico, extração em fase sólida, microextração em fase sólida (SPME), dentre outras (UEKANE et al., 2017). A SPME é considerada uma técnicas mais convenientes no preparo de amostras para a análise de alimentos (SOUZA-SILVA, GIONFRIDDO, & PAW LISZYN, 2015).

O método de extração SPME consiste na captura dos composto voláteis em um fibra capilar de sílica fundida quimicamente modificada inserida no interior de uma agulha (finalidade de protegê-la quando não está em uso) adaptada numa micro-seringa (figura 10), com posterior dessorção térmica no injetor de um cromatógrafo. Essa fibra é exposta no recipiente contendo a amostra para efetuar a extração, sob agitação (ABDULRA'UF et al., 2012).

A extração em SPME pode ser feita no modo direto ou de *headspace* (figura 11). No modo direto envolve o equilíbrio do analito em duas fases distintas (líquida e gasosa) através da fibra sorvente, e no segundo modo, a fibra é exposta entre três fases em um recipiente confinado (amostra líquida (ou gasosa), fase de vapor sobre a amostra aquosa e a fase a ser extraída (sólido adsorvente) (DÓREA et al., 2008).

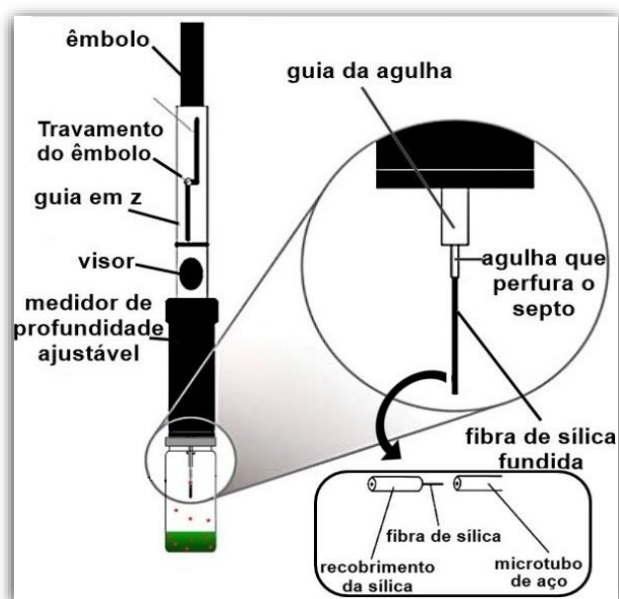


Figura 10. Representação do dispositivo utilizado para SPME.

Fonte: Adaptado de ABDULRA'UF et al., 2012.

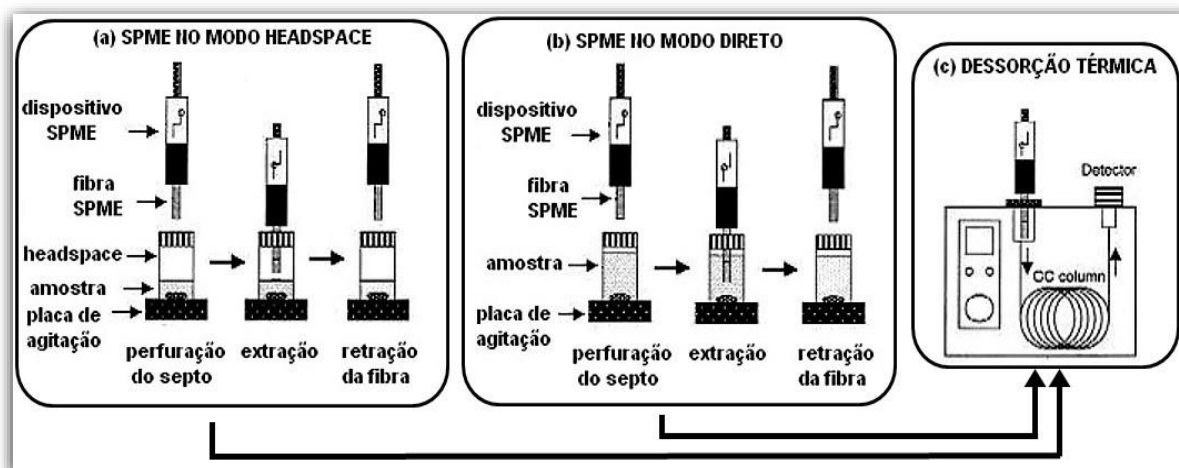


Figura 11. Etapas da microextração em fase sólida. (a) extração no modo *headspace* (b) extração no modo direto (c) dessorção dos analitos no cromatógrafo.

Fonte: Adaptado de DOREA et al., 2008.

É necessário um certo tempo para que se estabeleça o equilíbrio entre as fases envolvidas, em seguida a fibra é reposicionada no interior da agulha. Posteriormente, a fibra é exposta dentro do injetor de um cromatógrafo de gás, sob aquecimento. Com isso, os analitos serão dessorvidos, separados, e quantificados (ABDULRA'UF et al., 2012).

Esta técnica foi desenvolvida com a necessidade de preparar amostras em um pequeno intervalo de tempo (SANTANA et al., 2016), entretanto, constatou-se ao

longos de estudos (SOUZA-SILVA, GIONFRIDDO, & PAWLISZYN, 2015; MILLS & WALKER, 2000; KATAOKA et al, 2000; LORD & PAWLISZYN, 2000; PROSEN & ZUPANČIČ-KRALJ, 1999), que a técnica apresenta outras vantagens tais como: I) praticidade e simplicidade, II) ausência de solventes, III) utilização de pequenas quantidades de amostras, IV) baixo custo, V) sensibilidade e reprodutibilidade, VI) emprego de baixas temperaturas, VII) compatibilidade com análises de separação e identificação, como a GC-MS. Essas vantagens são provenientes da combinação do processo de extração e pré-concentração em uma única etapa sem a utilização de solventes (SOUZA-SILVA, GIONFRIDDO & PAWLISZYN, 2015; VAS & VÉKEY, 2004).

O método de extração HS-SPME acoplado com a GC-MS é considerada uma técnica amplamente empregada na quantificação de compostos voláteis (UEKANE et al., 2017; SOUZA et al., 2016; BUTKHUP et al., 2011) e compostos não voláteis (KHAKIMOV et al., 2016) em frutas. É importante ressaltar que através do auxílio do detector de MS, a técnica adquire um impacto considerável na quantificação desses compostos, particularmente na sua exatidão e precisão (YUAN et al., 2013).

Com a aplicação da GC-MS, o avanço na investigação do aroma tem sido feita em vários campos (HADI et al., 2013). Assim, a GC-MS permite uma melhor compreensão da composição odorante através da identificação e quantificação de seus compostos, concomitantemente oferece a possibilidade de correlacionar a natureza química de um odor e seu limite de cheiro (LO et al., 2008).

Com isso, muitos estudos empregando a GC/MS foram utilizados para analisar a composição do aroma de diferentes frutas tropicais, tais como manga (CANUTO et al., 2009), acerola (BOULANGER & CROUZET, 2001), araçá-rosa, morango (EGEA et al., 2014), banana (CAPOBIANGO et al., 2015), jaca (ONG et al., 2008), maracujá (JANZANTTI & MONTEIRO, 2014), tamarindo (LASEKAN & SEE, 2015), kiwi (GARCIA et al., 2013), dentre outras. Entretanto, poucos são os estudos que relatam a composição química volátil de frutas amazônicas. Com isso, surge o interesse em analisar a composição aromática da fruta remela-de-cachorro utilizando a técnica HS-SPME/GC-MS.

1.8. Fundamentos da Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica baseada na determinação da relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Os

princípios fundamentais da MS se deram em 1897 através de experimentos do pioneiro J. J. Thomson, que estudou os raios catódicos, levando a todo posterior desenvolvimento da técnica (LANÇAS, 2009; GRIFFITHS, 2008).

Já no ano de 1913, Thomson construiu o primeiro espectrógrafo de massas detectando a presença de isótopos no gás neônio, e desta forma, impulsionando a descobertas de compostos isotópicos (SHARMA, 2013; AUDI, 2006). Os primeiros espectrômetros foram desenvolvidos por A. J. Dempster (1918) e F. W. Aston (1919), possibilitando a descoberta de diferentes isótopos de elementos, permitindo a medição de massas atômicas exatas, além da descoberta de diversos elementos não radioativos (MEDEIROS, 1999).

A partir da década de 50 ampliaram-se as pesquisas aplicando-se MS com o desenvolvimento dos analisadores de massas do tipo tempo-de-vôo (TOF) (RYASON, 1967), ion-trap (IT) (HEROD & HARRISON, 1970), quadrupolo (Q) (DAWSON & WHETTEN, 1969) e ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) (ELKIND et al., 1988).

Concomitantemente, o desenvolvimento dos métodos de ionização também contribuiu com a expansão de pesquisas empregando MS. Os primeiros métodos de ionização utilizadas foram a ionização química (CI) (MUNSON & FIELD, 1966) e a ionização por impacto de elétrons (EI) (MARK & DUNN, 1985). Em 1973, Horning e colaboradores introduziram a ionização química à pressão atmosférica (APCI) em conjunto com diversas técnicas cromatográficas, incluindo a cromatografia líquida. Após alguns anos, Morris e colaboradores (1981) contribuíram com a MS desenvolvendo a ionização por bombardeamento por átomos rápidos (FAB).

A revolução na aplicabilidade da MS se deu no final da década de 80 pela inserção de técnicas de ionização brandas como a ionização por eletrospray (ESI) (FEEN et al., 1989) e a dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI) (KARAS & HILLENKAMP, 1988). Essas técnicas permitiram a análise de peptídeos, proteínas e complexos protéicos da ordem de megadaltons (MDa), ampliando a aplicação da MS nas áreas biológicas e médicas, consolidando a técnica como uma das mais empregadas na química (AEBERSOLD & GOODLETT, 2001).

Mais tarde, na década de 90 foram desenvolvidos equipamentos com capacidade de realizar experimentos de MS sequencial (MS/MS ou MSⁿ), aumentando significativamente a realização de diferentes tipos de análises nesses equipamentos (MATYSIAK et al., 2016; JAISWAL et al., 2014; LOO et al., 1991).

A expansão das aplicações da MS ganhou força com a hifenização com diferentes técnicas de separação. A alta sensibilidade da técnica de detecção em conjunto com métodos de separação capazes de separar analito permitindo que análises como a cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) sejam uma das primeiras escolhas dos trabalhos quantitativos atualmente, quando disponíveis (BATAGLION et al., 2015).

A técnica de separação UHPLC desenvolveu-se através da introdução das partículas de fases estacionárias porosas com $\leq 2 \mu\text{m}$ de diâmetro, juntamente com a busca contínua por separações de analitos mais rápidas e eficientes, e fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A introdução dessas partículas confere melhor resolução cromatográfica, facilitando a separação, conseqüentemente diminui o tempo de análise e reduz o consumo de solventes (MALDANER et al., 2012).

1.8.1 Instrumentação da MS

Existem diferentes arranjos instrumentais em MS, cada uma com suas vantagens e limitações. No entanto, todos apresentam as mesmas unidades construtoras básicas: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas e detector. O processo se dá inicialmente pela injeção da amostra no equipamento, no qual é conduzida até a fonte de ionização (SILVERSTEIN et al., 2006).

Na fonte de íons, os componentes da amostra são convertidos em íons (positivos ou negativos) sendo imediatamente acelerados através de um campo magnético em direção ao analisador de massas. No analisador, os íons são separados de acordo com a sua relação m/z específica e, finalmente chegam no detector. Cada íon gera um sinal próprio, transformando a corrente de íons em pulsos elétricos, e que posteriormente serão processados e analisados em forma de espectro de massas por um software adequado instalado em um computador (CHIARADIA et al., 2008) (figura 12).

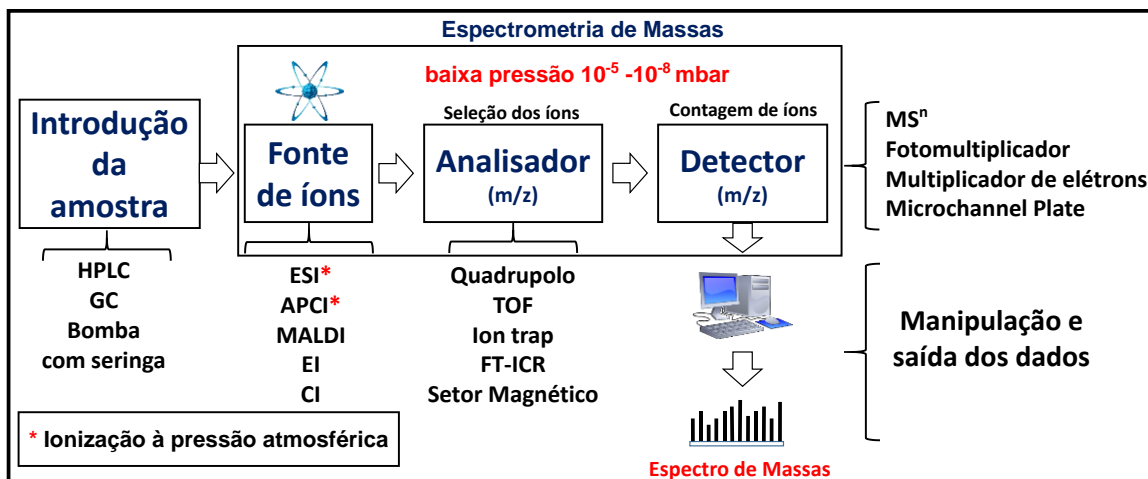


Figura 12. Esquema genérico de um espectrômetro de massas.

Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

1.8.2 Ionização por eletrospray (ESI)

O ESI é uma das principais técnicas de ionização à pressão atmosférica (API) que permite a formação de fragmentos de macromoléculas a partir do íon precursor quando ionizadas. Essa técnica é perfeita para análise de espécies não voláteis e para estudos de especiação, devido a muitos dos íons gerados na fase gasosa manterem exatamente a mesma carga e estrutura das espécies em solução (MORAES & LAGO, 2003). O ESI destaca-se por ser uma técnica branda no qual possibilita a protonação (modo positivo, $[M+H]^+$) e a desprotonação (modo negativo, $[M-H]^-$) de moléculas de diferentes massas molares, facilitando a identificação de diversos compostos sem efetuar o uso de bibliotecas de espectros (SISMOTTO et al., 2013).

No processo de ionização por ESI, o potencial elétrico (em kV) aplicado à ponta do capilar metálico gera o acúmulo de cargas na superfície do líquido ocorrendo a deformação da gota denominada de cone de Taylor. Com a evaporação do fluxo de gás nebulizante (geralmente N_2) ocorre o aumento da densidade de carga da gota, e no momento em que a densidade é capaz de vencer a tensão superficial do líquido, há um colapso, e ocorre a fissão da gota ascendente formando gotas descendentes cada vez menores. Essa tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menores ocorrendo o fenômeno denominado “explosão coulômbica”. Com isso, forma-se o spray eletrostático composto por partículas do solvente e do analito carregados (LANÇAS, 2009; CROTTI et al., 2006) (figura 13).

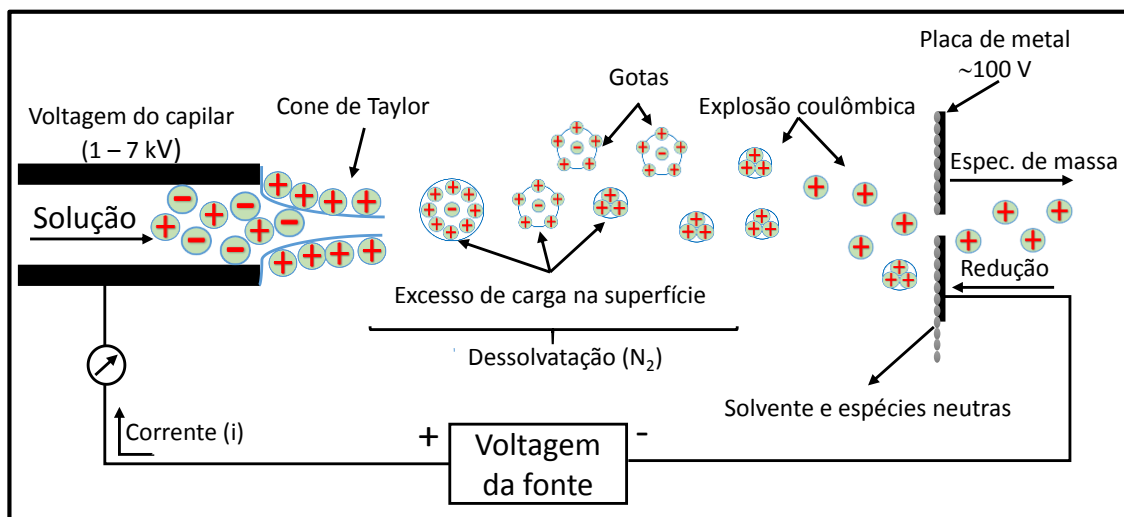


Figura 13. Esquema do sistema de ionização via ESI no modo positivo.

Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

1.8.3 Espectrometria de Massas Sequencial (MS/MS)

A MS/MS é definida como qualquer análise em MS que tenha dois ou mais estágios de medição da m/z sequencial. No primeiro estágio de análise, um íon precursor, sofre dissociação induzida por colisão (CID) com um gás inerte (geralmente argônio). O segundo estágio consiste na análise da m/z dos íons fragmentos formados pela dissociação (CHIARADIA et al., 2008).

A MS/MS pode ser concebida pela realização da análise da m/z no espaço (pelo acoplamento de dois instrumentos fisicamente distintos) ou no tempo (através da realização de uma sequência apropriada de acontecimentos num dispositivo de armazenamento de íons). Os aparelhos espaciais têm dois analisadores de massa acoplados que permitem a seleção específica de íons no sistema MS/MS. Dentre os tipos de acoplamentos mais utilizados destacam-se o triplo-quadrupolo (QqQ), TOF-TOF e Q-TOF (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

A geometria instrumental de analisadores de massa do tipo triplo-quadrupolo (QqQ) é constituída por três quadrupolos em série, sendo dois analisadores (Q1 e Q3) separados por uma cela de colisão (q2). Nessa cela ocorre a fragmentação dos íons filtrados e selecionados do primeiro quadrupolo (Q1) por meio de CID, e que também é um direcionador dos íons produzidos para o terceiro quadrupolo (Q3) (figura 14).

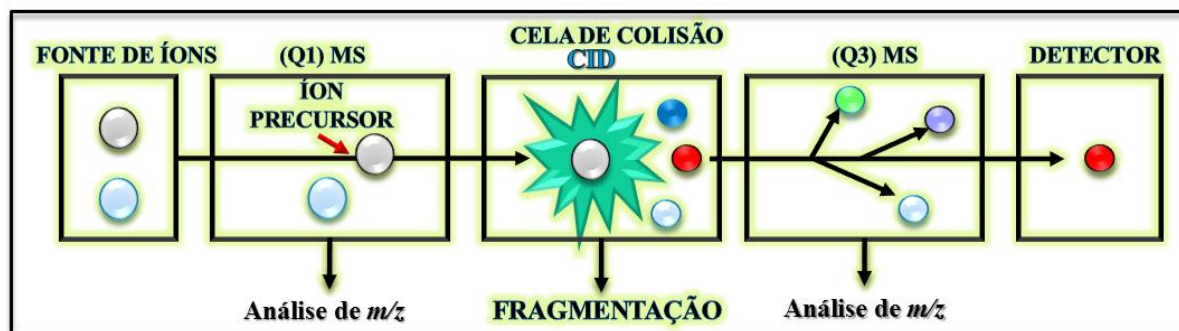


Figura 14. Esquema ilustrativo da geometria instrumental de analisador do tipo QqQ.

Além disso, todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons com uma faixa de isolamento de uma única razão m/z , desta forma, gerando informações analíticas mais exata (CHIARADIA et al., 2008).

Experimentos quantitativos envolvendo sistemas do tipo QqQ são realizados por meio de um experimento denominado monitoramento seletivo de reações (SRM) (SOUSA et al., 2016). Os dados são adquiridos somente para um ou mais íons específicos (produzidos por íons precursores) em um estágio prévio de MS, aumentando a sensibilidade da técnica associada ao aumento na seletividade (SISMOTTO et al., 2013).

Sistemas de UHPLC-MS/MS possuem vantagens, como: permitir a obtenção de informação estrutural simultaneamente à quantificação do analito, desta forma não dependendo mais tanto de perfeição na reprodutibilidade cromatográfica, além de permitir limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) na ordem de ppt (ng) (HOFFMAN & STROOBANT, 2007; SILVA & COLLINS, 2011).

Diversas aplicações da técnica de UHPLC-MS/MS são observadas tanto no meio acadêmico como na indústria. Áreas como a indústria farmacêutica (PETROVIC et al., 2005), órgãos de análise ambiental (SILVA & COLLINS, 2011), centros de ciências médicas (HIGASHI & OGAWA, 2016) e centros de produção de energia e combustíveis (LOEGEL et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Realizar estudo químico qualitativo e quantitativo do extrato dos frutos de *C. lancifolia* por meio das técnicas cromatográficas em acoplamento à espectrometria de massas, além de avaliar suas propriedades farmacológicas.

2.2. *Objetivos específicos*

- Estimar a quantidade de fenólicos totais do extrato da polpa da remela-de-cachorro por meio do método de Folin-Ciocalteu;
- Efetuar a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato dos frutos da remela-de-cachorro (*C. lancifolia*) por meio da técnica de cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS);
- Determinar a percentagem dos componentes do aroma da remela-de-cachorro por meio da técnica da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (HS-SPME/GC-MS);
- Avaliar as atividades antioxidantes do extrato pelos métodos do sequestro de radicais livres DPPH e ABTS;
- Realizar ensaios de inibição de enzimas digestivas (Lipase e α -glicosidase) *in vitro* do extrato de *C. lancifolia*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Obtenção e preparo da amostra

Frutas frescas da remela-de-cachorro (*C. lancifolia*) foram coletadas no Sul do Amazonas, no município de Canutama, localizado na calha do rio Purus (região centro-sul do Amazonas). Inicialmente foi verificado o estado de cada fruto em relação ao grau de maturação, no qual foi determinada com base no tamanho, cor e firmeza. As polpas e as cascas foram separadas manualmente das sementes e submetidas à extração. A extração foi efetuada num frasco de vidro com etanol 95% (100 mL para cada 100 g de polpa) durante 24 h. O extrato líquido foi evaporado utilizando o evaporador rotatório a vácuo e o resíduo final foi submetido ao dissecador com sílica. Uma quantidade de 1 mg dos extratos secos foram dissolvidos em 1 mL de metanol grau HPLC, e, em seguida, filtrada através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com um tamanho de poro de 0,45 µm. Os extratos obtidos até então foram posteriormente analisados.

3.2. Análise dos compostos voláteis por HS-SPME/GC-MS

Inicialmente, pesou-se 2 g da polpa da fruta *in natura* em um frasco próprio para extrações de *headspace* (Gerstel) de 10 mL e, em seguida adicionou-se 4 mL de água destilada. A força iônica foi aumentada para melhorar a eficiência da extração utilizando o NaCl (20 mg). A mistura foi cuidadosamente agitada em um vortex para homogenizá-la. Posteriormente foi realizada a incubação da pré-extração da amostra na unidade de agitação durante 30 min a 400 rpm, sob aquecimento a 60°C, seguido pela extração da fibra mista de SPME (composição: divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano - DVB/CAR/PDMS) durante 10 min no modo *headspace*. Ao final desse período, a fibra foi recolhida antes de ser retirado o amostrador SPME do frasco. Em seguida, o amostrador SPME foi inserido no injetor do cromatografo (fibra foi exposta e sujeita a dessorção dentro do injetor durante 300s a 250°C) (SOUZA et al., 2016).

As análises foram realizadas em um sistema GC-MS (Agilent Technologies) consistindo em um cromatógrafo de gás modelo 7890A acoplado a um espectrômetro de massas mono quadrupolo (MSD 5975 C) utilizando ionização EI a 70 eV. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida modelo HP-5-MS (30 m x 0,250 mm id, 0,25 µm de espessura de película) da Agilent

Technologies (Santa Clara, EUA). Utilizou-se o hélio como gás de arraste (vazão de 1 mL/min). As temperaturas do injetor, da interface GC-MS (linha de transferência) e da fonte de MS foram 250, 280 e 230°C, respectivamente. O programa de forno foi de temperatura inicial de 40°C, com rampa de aquecimento de 3°C/min até 150°C, seguindo um aumento de temperatura de 5°C/min até 300°C e mantido durante 3,0 min. A MS foi operada em modo de varredura na faixa de 40-500 m/z (RIU-AUMATELL et al., 2004).

A análise dos compostos voláteis dos frutos da remela-de-cachorro foi realizada em triplicata. Os compostos foram identificados por meio dos tempos de retenção das substâncias, comparação dos espectros dos padrões (C₇-C₄₀) de massa da base de dados NIST, e pelo índice de Kovats experimental (equação 1) (MUHLEN, 2009) concordantes com dados da literatura (ADAMS, 2007). A proporção de cada composto foi estimada dividindo a sua área média pelo somatório da área total do cromatograma e expressa em percentagem, conforme a equação 2.

$$KI = 100n + 100 \times \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right) \quad (\text{eq. 1})$$

Onde: n: número de carbonos presentes no n-alcano eluído antes da substância de interesse;

$t'_{R(i)}$: tempo de retenção da substância de interesse;

$t'_{R(n)}$: tempo de retenção do n-alcano (padrão) eluído antes da substância de interesse na coluna cromatográfica;

$t'_{R(n+1)}$: tempo de retenção do n-alcano (padrão) eluído após a substância de interesse;

$$\% \text{ na amostra} = \frac{\text{Área do pico}}{\sum \text{área total}} \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

3.3. Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais (TF) presentes no extrato metanólico da remela-de-cachorro foi determinada utilizando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) com algumas modificações. Para a reação colorimétrica, 10 μL do extrato metanólico (1 mg/mL) mais 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu (proporção 1:10) foram adicionados em uma microplaca e incubou-se, por 8 minutos.

Posteriormente adicionou-se 240 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 0,4% e novamente foi incubado a mistura por 3 minutos. Por fim, a absorbância da amostra foi medida a 740 nm em um detector espectrofotométrico multimodo (DTX 800, Beckman). A quantidade de TF foi determinado por interpolação da absorbância do extrato da fruta contra uma curva de calibração construída com padrão de ácido gálico (1000 a 7,81 µg/mL). A absorbância da amostra foi aplicada na equação da reta do padrão ($Y = 0,0022x + 0,0086$) para estimar a concentração dos TF expresso como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato. A estimativa dos fenólicos totais foi realizada em triplicata.

3.4. *Análise por UHPLC-MS/MS*

As análises foram realizadas em um sistema de UHPLC-MS/MS 8040 da Shimadzu, constituído de um cromatógrafo de ultra-alta performance e um espectrômetro de massas com geometria do tipo triplo-quadrupolo (QqQ). A técnica de ionização utilizada foi a ESI e os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem do capilar, 3500 V; tensão do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; Skimmer (capilar de transferência), 65 V; temperatura do gás, 280 °C; vazão de gás, 14 L/min; nebulizador, 45 psi. A temperatura do auto-amostrador foi mantida a 20 °C e o volume de injeção foi de 10 µL.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna C18 Shimpack (Dimensões 50 mm x 2.0 mm, diâmetro da partícula 2.2 µm) utilizando uma fase binária (solvente A: água, solvente B: metanol) para as separações. A eluição em gradiente a 30°C foi a seguinte: 0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5-60% (v/v) B; 15-25 min, 60-70% (v/v) B; 25-35 min, 70-100% (v/v) B; 35-50 min, 100% de B a vazão de 0,4 mL/min (BATAGLION et al., 2015). As identificações foram realizadas por meio da interpretação manual dos espectros de MS/MS, bem como a comparação com padrões puros das substâncias de interesse. A determinação quantitativa dos compostos fenólicos presentes no extrato foi realizada utilizando o método descrito e validado por UHPLC-MS/MS usando a seleção do íon fragmentado (segunda transição da SRM) (BATAGLION et al., 2015). A partir das curvas de calibração construídas com os padrões dos compostos fenólicos, obteve-se as respectivas equações da reta para cada substância de interesse e, posteriormente foi aplicado o valor da área do pico referente a cada substância presente na remela-de-cachorro.

3.5. *Ensaio antioxidantes (DPPH e ABTS)*

O método do DPPH foi realizado de acordo a metodologia de Molyneux (2004) com algumas modificações. A solução do DPPH (0,8 mmol/L) foi preparada, e diluída em uma concentração suficiente para resultar em cerca de uma absorbância $1,000 \pm 0,1$. Posteriormente a solução foi mantida sob refrigeração e protegida da luz. O extrato foi diluído em DMSO (1 mg/mL), solubilizado e efetuada 8 microdiluições (no intervalo de concentração de 100 - 0,78 $\mu\text{g/mL}$) em uma placa de Eliza. Foram adicionados 270 μL de DPPH com 30 μL de cada extrato, e mantida em repouso por 30 min sob proteção de luz à temperatura ambiente.

O método do ABTS foi realizado com base na metodologia de Re et al. (1998) com pequenas modificações para possibilitar que o teste fosse realizado com utilização da microplaca. Inicialmente foi preparado a solução de ABTS por meio da reação de 0,7 mmol do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ dissolvido em 5 mL de água deionizada com 5 mL de persulfato de potássio (2,4 mmol) mantida em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas. Posteriormente, diluí-se em uma proporção de 1:5 da solução/água deionizada (concentração suficiente para resultar em cerca de uma absorbância $1,000 \pm 0,1$). O procedimento foi semelhante ao método do DPPH (quantidades de amostra e reagente), com exceção da placa que foi encubada por 15 min.

O consumo de DPPH e ABTS foi monitorada através da medição da absorbância a 492 e 620 nm, respectivamente, em um detector. Os experimentos foram realizados em triplicata e como controle negativo utilizou o DMSO (diluyente dos extratos) e controle positivo o ácido gálico. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição total (equação 3) e pelo IC_{50} (quantidade de antioxidante necessária para reduzir a 50% concentração inicial de DPPH/ ABTS) por meio da equação da reta da amostra.

$$\% \text{ de inibição (DPPH/ABTS)} = 100 - \frac{\text{Abs(DPPH/ABTS)} - \text{Abs(ext)}}{\text{Abs (controle)}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

3.6. *Ensaio enzimáticos in vitro*

3.6.1. *α-glicosidase*

A atividade inibidora de α -glicosidase foi determinada de acordo com a Andrade-Cetto et al. (2008) com pequenas modificações. Após a diluição do extrato (1 mg/mL), foi adicionado 30 μ L do extrato e efetuou microdiluições (concentração de 0,78 - 100 μ g/mL) na placa de Eliza.

O primeiro monitoriamento da absorbância (A1) foi realizada em 5 min no mesmo espectrometro dos testes anteriores à 37°C a 405 nm. Posteriormente foi adicionado 170 μ L da solução da enzima diluída com o tampão fosfato a 10 mM em pH 6,9 (proporção 1:10). Logo após realizou-se a leitura da placa com medição da absorbância em 405 nm. Em seguida adicionou-se 100 μ L do reagente de cor a 5 mM (4-nitrofenilo α -D-glicopiranosideo 2 mM (Sigma)). Posteriormente efetuou-se a leitura da absorbância (A2) em 5 em 5 minutos até 30 min incubando a placa na estufa em 37 °C. Na mesma placa adicionou 30 μ L do DMSO (diluyente do extrato (branco)) em um poço e monitorou a sua absorbância em 5 em 5 minutos até 30 min, que deve ser próxima de 1,000 \pm 0,1. Utilizou-se a acabarose como controle positivo. Os resultados foram expressos em percentagem total de inibição (equação 4) e pelo parâmetro do IC₅₀ por meio da equação da reta da amostra.

$$\% \text{ de inibição (glicosidase)} = 100 - \frac{\text{Abs do ext (A2-A1)}}{\text{Abs (controle)}} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

3.6.2. *Lipase*

A atividade inibidora de lipase foi determinada de acordo com a Slanc (et al., 2009) com algumas adaptações. Foram feitas microdiluições do extrato (concentração de 0,78 - 100 μ g/mL) e adicionados 30 μ L da amostra na placa de Eliza com 170 μ L da solução da enzima lípase 1 mg/mL (preparada em tampão Tris ((hidroximetil)-aminometano) (75 mM), em pH 8,5). A placa foi encubada por 5 min a 37 °C e em seguida adicionado 130 μ L do tampão. Posteriormente efetuou-se a leitura no espectrômetro a 405 nm (A1). Logo após foi adicionada 20 μ L do substrato “*p*-nitrofenilpalmitato (PNP)” a 3,3 mM (preparado em 5 mL de acetonitrila e posteriormente diluída em 1:3 em etanol e incubar por 15 min a 37 °C. Como controle positivo foi utilizado a substância orlistate. Em seguida foi efetuada a leitura final (A2)

e os resultados foram expressos em porcentagem total de inibição (equação 5) e pelo parâmetro do IC₅₀ por meio da equação da reta.

$$\% \text{ de inibição (lipase)} = 100 - \frac{\text{Abs do ext (A2-A1)}}{\text{Abs (controle)}} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Identificação dos compostos voláteis da polpa da remela-de-cachorro por GC-MS

A técnica da microextração em fase sólida no modo de extração *headspace* (HS-SPME) em combinação com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é amplamente utilizada para extrair e quantificar, respectivamente os compostos voláteis característicos de aromas presentes em frutas (SANTANA et al., 2016; STEINGASS et al., 2014; BUTKHUP et al., 2011). Nesse sentido, foi realizada a identificação de compostos orgânicos voláteis visando-se a caracterização de possíveis marcadores do aroma da fruta remela-de-cachorro.

Na análise dos compostos voláteis foi empregado o sistema HS-SPME-GC/MS utilizando uma coluna HP5-MS. Apesar da técnica GC-MS ser uma poderosa ferramenta para análise, permitindo a identificação da maioria dos compostos na amostra com base nos espectros dos padrões de massa e pelos tempos de retenção, foi calculado o índice de Kovats teórico dos compostos e comparado com os dados da literatura, a fim de evitar uma identificação equivocada. Foram identificados 27 compostos (apêndice) a partir do aroma da polpa *in natura* da remela-de-cachorro. As áreas dos picos expressos em porcentagem para os compostos presentes na polpa foram usadas para indicar o teor aproximado de cada composto orgânico volátil presente.

O total de compostos voláteis referente à porcentagem das áreas de cada composto individualmente na polpa de remela-de-cachorro consistiu em: nove aldeídos (26,14%), três hidrocarbonetos (12,7%), seis cetonas (12,13%), cinco álcoois (10,81%), três terpenos (10,57%), e pequenas quantidades de furanos (éteres cíclicos) (2,77%).

O perfil cromatográfico e o resultado semi-quantitativo dos voláteis da polpa *in natura* com os principais fragmentos é apresentado na figura 15 e na tabela 3, respectivamente. Os aldeídos constituem o grupo mais abundante de compostos orgânicos voláteis na remela-de-cachorro com percentual total de 26,14%.

Os compostos voláteis majoritários presentes na polpa *in natura* da espécie foram: benzaldeído ($11,9 \pm 0,07\%$) > linalol ($10,1 \pm 0,11\%$) > 2-metil biciclo [4.3.0] non-1(6)-eno ($8,84 \pm 0,02\%$) > 1-octen-3-ol ($4,42 \pm 0,04\%$) > β -ionona ($4,08 \pm 0,07\%$) > 3-octanona ($3,37 \pm 0,01\%$) > hexanal ($3,05 \pm 0,07\%$), respectivamente (figura 16). A

tabela 4 mostra o comparativo das quantidades dos compostos volatéis presentes na remela de cachorro com outras frutas.

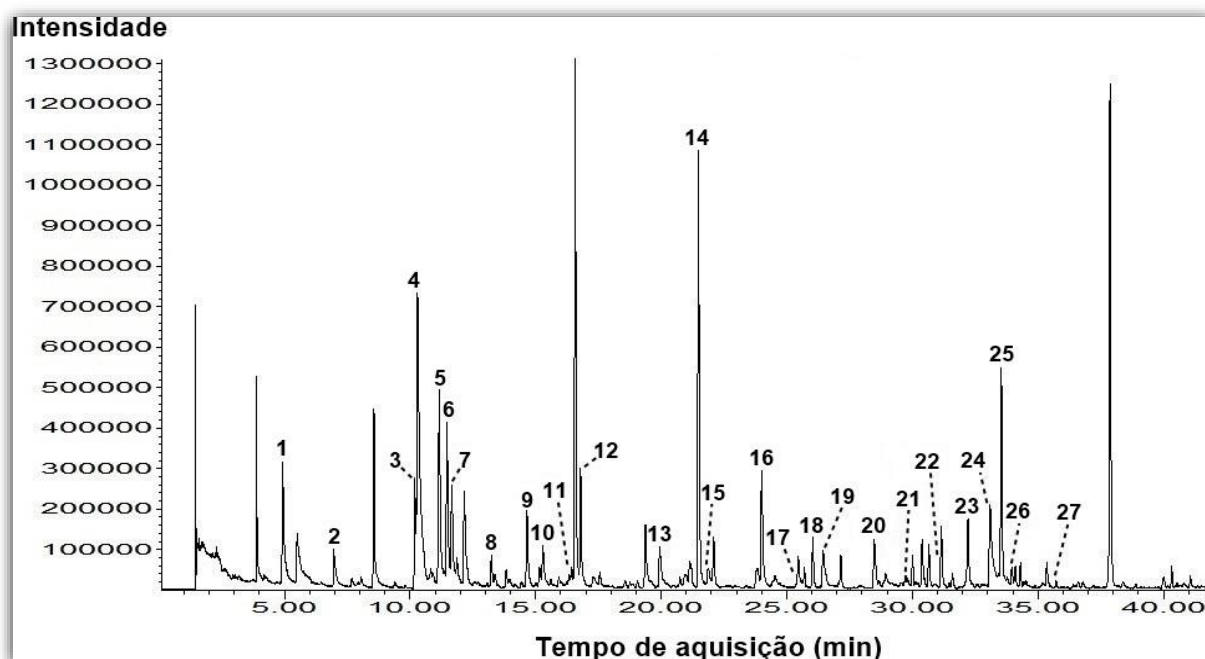


Figura 15. Cromatograma de SPME/GC-MS para polpa *in natura* da remela-de-cachorro. Picos: (1) hexanal; (2) 1-hexanol; (3) (*E*) 2-heptenal; (4) benzaldeído; (5) 1-octen-3-ol; (6) 3-octanona; (7) 2-pentil furano; (8) limoneno; (9) (*E*) 2-octenal; (10) 1-octanol; (11) linalol; (12) nonanal; (13) 1-nonanol; (14) 2-metil biciclo [4.3.0] non-1(6)-eno; (15) β -ciclocitral; (16) 2-ciclohexen-1-ol; (17) 2-undecanona; (18) undecanal; (19) (*E,E*) 2,4-decadienal; (20) (*E*) 2-dodecenal; (21) 2,2-dihidro- α -ionona; (22) (*E*) α -ionone; (23) geranil acetona; (24) 1-deceno; (25) (*E*) β -ionone; (26) pentadecano; (27) ciclododecano;

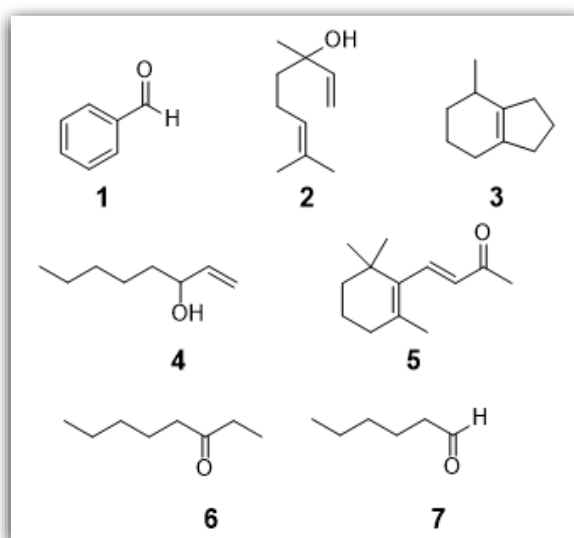


Figura 16. Compostos voláteis majoritários presentes na polpa *in natura* da remela-de-cachorro. (1) benzaldeído, (2) linalol, (3) 2-metil biciclo [4.3.0] non-1(6)-eno, (4) 1-octen-3-ol, (5) β -ionona, (6) 3-octanona e (7) hexanal.

Tabela 3. Tempos de retenção (T_R), fragmentos, massa molar (MM), índice de Kovats teórico (KI teor.), índice de Kovats experimental (KI exp.), área proporcional dos compostos voláteis identificados da remela-de-cachorro por SPME-GC/MS e limite de cheiro em água (L.C).

Pico	Composto	T_R (min)	KI ^a teor.	KI exp.	Fragmentos (m/z)	MM	Área (%)	L.C ($\mu\text{g/L}$)
1	Hexanal	4,99	801	801	44, 56, 72, 82	100	3,05 ± 0,07	4,5 ^{b,h,i,l}
2	1-hexanol	6,99	863	864	43, 56, 69, 84	102	1,05 ± 0,25	500 ^{h,l}
3	(<i>E</i>) 2-heptenal	10,2	947	945	41, 55, 70, 83, 97	112	1,98 ± 0,03	13 ^c
4	Benzaldeído	10,3	952	951	51, 77	106	11,9 ± 0,07	350 ^{b,h,i}
5	1-octen-3-ol	11,2	974	974	43, 57, 72, 85, 99	128	4,42 ± 0,04	1,0 ^{e,i,l}
6	3-octanona	11,5	979	979	43, 57, 72, 85, 99	128	3,37 ± 0,01	-
7	2-pentil furano	11,7	984	983	43, 53, 81, 93, 121	138	2,77 ± 0,05	6,0 ^{h,l}
8	Limoneno	13,2	994	995	41, 53, 68, 79, 93, 107, 121	136	0,47 ± 0,06	10,0 ^{b,g,l}
9	(<i>E</i>) 2-octenal	14,7	1024	1024	41, 55, 70, 83, 97	126	1,84 ± 0,03	3,0 ^{c,l}
10	1-octanol	15,3	1049	1049	41, 56, 70, 84, 95	130	0,94 ± 0,16	110 ^j
11	Linalol	16,6	1063	1060	43, 55, 71, 80, 93, 121	154	10,1 ± 0,11	6,0 ^{b,g,h,i}
12	Nonanal	16,8	1095	1095	29, 41, 57, 70, 82, 98	142	2,57 ± 0,08	1,0 ^{e,f,h,l}
13	1-nonanol	19,9	1165	1163	41, 56, 70, 83, 97	144	1,37 ± 0,02	50 ^{e,i}
14	2-metil biciclo[4.3.0] non-1(6)-eno	21,5	-	1198	41, 55, 67, 79, 93, 121	136	8,84 ± 0,02	-
15	β -ciclocitral	22,1	1217	1218	41, 55, 67, 81, 91, 109, 123, 137	152	1,20 ± 0,10	19 ^d
16	2-ciclohexen-1-ol	24,0	1120	-	41, 43, 55, 70, 83	98	3,03 ± 0,13	-
17	2-undecanona	25,4	1293	1295	43, 58, 71, 81	170	0,71 ± 0,07	7,0 ^e
18	Undecanal	26,0	1305	1306	41, 43, 57, 68, 82, 95	170	1,04 ± 0,09	12,5 ^l
19	(<i>E,E</i>) 2,4-decadienal	26,5	1315	1314	41, 55, 67, 81, 95	152	1,30 ± 0,06	0,07 ^{e,h}
20	(<i>E</i>) 2-dodecenal	28,5	1464	-	57, 70, 83, 97, 111, 121	182	1,26 ± 0,02	-
21	2,2-dihidro- α -ionona	30,7	1400	1406	43, 55, 67, 81, 95, 107, 121, 136, 161	194	0,88 ± 0,01	-
22	(<i>E</i>) α -Ionona	31,1	1411	1414	43, 77, 93, 109, 121, 136	192	1,30 ± 0,04	76 ^l
23	geranil acetona	32,2	1487	1488	43, 69, 107, 136	194	1,79 ± 0,14	60 ^{e,f,i,l}
24	1-deceno	33,1	1453	1453	43, 55, 70, 83, 97, 111	140	2,74 ± 0,19	-
25	(<i>E</i>) β -Ionona	33,5	1466	1469	43, 77, 91, 107, 123, 135, 177	192	4,08 ± 0,07	0,007 ^{b,h,i,l}
26	Pentadecano	34,1	1487	1488	43, 57, 71, 85, 99	212	0,39 ± 0,09	1500 ^b
27	Ciclododecano	35,4	1502	1500	43, 55, 69, 83, 97, 111	168	0,73 ± 0,04	-
Tot.							75,12 ¹	

¹ Ref: a: ADAMS, 2007; b: BERLISH et al., 2009; c: ZHU et al., 2017; d: LIU et al., 2016; e: BUTTERY et al., 1988; f: LASEKAN & SEE, 2015; g: AHMED et al., 1978; h: BUTTERY et al., 1971; i: WU et al., 2016; j: TAKEOKA et al., 1992; l: PINO & MESA, 2006;

Tabela 4. Quantidades de compostos orgânicos voláteis em frutas expresso em porcentagem (%).

Substância	Fruta (nome científico)	Teor (%)	Ref.
benzaldeído	Remela-de-cachorro (<i>Clavija lancifolia</i> Desf)	11,9 ± 0,07	-
	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	6,94	a
	Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L.)	2,97	a
	Pêssego (<i>Prunus persica</i> L.)	0,64	b
	Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	0,41	c
	Guabiroba (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Mart)	0,2	d
	Siriguela (<i>Spondias purpurea</i> L.)	0,1	e
	Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L.)	0,04	f
	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	0,04	g
	Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	2,0×10 ⁻⁶	h
Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> L.)	5,2×10 ⁻⁶	i	
hexanal	Pêssego (<i>Prunus persica</i> L.)	20,68	b
	Siriguela (<i>Spondias purpurea</i> L.)	10,6	e
	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	5,12	a
	Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	3,6	j
	Remela-de-cachorro (<i>Clavija lancifolia</i> Desf)	3,05 ± 0,08	-
	Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L.)	0,07	f
	Pitomba (<i>Talisia esculenta</i> Radlk.)	0,86	k
	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	0,82	l
	Umbu (<i>Spondias tuberosa</i> L.)	0,4	m
	Guabiroba (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Mart)	0,2	d
	Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> L.)	0,17	n
	Banana (<i>Musa sapientum</i> L.)	2,1×10 ⁻³	x
	Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	2,0×10 ⁻⁶	h
Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> L.)	3,3×10 ⁻⁶	i	
Linalol	Bacuri (<i>Platonia insignis</i> M.)	54,52	n
	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	16,82	o
	Remela-de-cachorro (<i>Clavija lancifolia</i> Desf)	10,1 ± 0,11	-
	Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	8,70	p
	Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L.)	3,9	f
	Pêssego (<i>Prunus persica</i> L.)	2,93	b
	Sapoti (<i>Manilkara zapota</i> L.)	2,26	n
	Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i> Schum.)	2,21	q
	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	0,84	l
	Pitomba (<i>Talisia esculenta</i> Radlk.)	0,84	k
	Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	0,70	r
	Guabiroba (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> Mart)	0,6	d
	Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i> L.)	0,25	n
	Araçá-rosa (<i>Psidium cattleianum</i> S.)	0,2	d
	Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L.)	0,06	a
	Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	3,0×10 ⁻⁶	h

β -ionona	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	13,81	o
	Remela-de-cachorro (<i>Clavija lancifolia</i> Desf)	4,08 ± 0,07	-
	Pitomba (<i>Talisia esculenta</i> Radlk.)	0,72	k
	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	13,81	o
	Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	1,01	c
	Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	0,07	p
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)	-	s
1-octen-3-ol	Remela-de-cachorro (<i>Clavija lancifolia</i> Desf)	4,42 ± 0,04	-
	Siriguela (<i>Spondias purpurea</i> L.)	0,4	e
	Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	8,0x10 ⁻⁶	h
	Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i> A. Chev.)	-	t
	Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	-	u
	Melancia (<i>Citrullus lanatus</i> Thunb.)	-	v
3-octanona	Romã (<i>Punica granatum</i> L.)	25,94	w
	Remela-de-cachorro (<i>Clavija lancifolia</i> Desf)	3,37 ± 0,01	-
	Taperebá (<i>Spondias mombin</i> L.)	1,02	a

O 2-metil biciclo [4.3.0] non-1(6)-eno foi o terceiro composto encontrado em grandes quantidades no extrato da espécie. Não foram encontrados estudos que relatam a presença desse composto na composição odorante de frutas. Entretanto, esse monoterpene foi relatado somente na composição de óleos essenciais de partes de plantas, tais como flores (JIANU et al., 2016), folhas (QADER et al., 2017) (DEVI & SINGH, 2014) e sementes (QI & ARMSTRONG, 2007).

Embora estes compostos estejam próximos em proporções de área relativa, eles somam na contribuição para o aroma da fruta devido aos seus valores de odor limite. O limite de cheiro ou limiar de detecção é denominado como a menor concentração de um composto que é apenas o suficiente para o reconhecimento do seu aroma (WU et al., 2016; BERLISH et al., 2009). Defoer e colaboradores (2002) mostraram que a relação entre as medidas químicas (GC-MS) e a concentração de odor (olfatometria) é específica para cada tipo de odor e não pode ser generalizada. Estes autores estabeleceram uma eficiente relação linear entre a concentração de odor e a concentração total de compostos orgânicos voláteis de resíduos de frutas.

² Ref: a. NARAIN et al., 2004; b. CHENG et al., 2012; c. WILSON et al., 1985; d. MARIN et al., 2008; e. CEVA-ANTUNES et al., 2006; f. QIAO et al., 2008; g. BARRETTO et al., 2013; h. PINO & MARBOT, 2001; i. ONG et al., 2008; j. SHALIT et al., 2001; k. SOUZA et al., 2016; l. STEINGASS et al., 2014; m. GALVÃO et al., 2011; n. UEKANE et al., 2017; o. OLIVEIRA et al., 2012; p. SANTANA et al., 2016; q. FRANCO & SHIBAMOTO, 2000; r. ANDRADE et al., 2000; s. LEE et al., 1975; t. GARCIA et al., 2012; u. JAYANTHI et al., 2014; v. BEAULIEU & LEA, 2006; w. MPHABLELEA et al., 2016; x. JORDAN et al., 2011

Apesar do benzaldeído ser considerado o principal composto volátil na espécie deste trabalho, o seu valor limite da percepção do seu aroma em água é elevado (450 µg/L) em relação aos demais compostos presentes na fruta (WU et al., 2016; BERLISH et al., 2009; BUTTERY et al., 1971). Com isso, é notório que este composto tem pouca contribuição no aroma da fruta, pois exige uma baixa concentração em água para resultar no limite mínimo de percepção do seu odor.

Entretanto, dentre os principais compostos orgânicos voláteis em remela-de-cachorro, os compostos β -ionona, 1-octen-3-ol, hexanal e linalol exibiram melhores limites de cheiro (0,007 > 1,0 > 4,5 > 6,0 µg/L, respectivamente) em água (WU et al., 2016; BERLISH et al., 2009; PINO & MESA, 2006). Com base nos seus valores odorantes, estes compostos, certamente, são os principais contribuintes para o aroma da remela-de-cachorro, sugerindo um papel significativo para este atributo.

Por outro lado, os componentes menores presentes no aroma também podem contribuir, por exemplo, (*E,E*) 2,4-decadienal com 1,30 %, nonanal com 2,57 %), (*E*) 2-octenal com 1,84 % e o 2-pentil furano com 2,77 % da composição da remela-de-cachorro, mas apresentam melhor limite de odor (0,07 > 1,0 > 3,0 > 6,0 µg/L, respectivamente) (PINO & MESA, 2006; BUTTERY et al., 1971).

É notório que os compostos majoritários da remela-de-cachorro tais como, β -ionona, 1-octen-3-ol, hexanal e linalol foram os maiores contribuintes para o aroma da fruta remela-de-cachorro. Outras abordagens quantitativas desta espécie são necessárias para correlacionar a quantidade de cada composto volátil com o respectivo limite de odor e obter seus valores de aroma. Para este estudo, a HS-SPME-GC/MS serviu como um método rápido e preciso para a determinação de compostos orgânicos voláteis na remela-de-cachorro.

4.2. Determinação dos compostos fenólicos totais do extrato da remela-de-cachorro

Folin-Ciocalteu é considerado um método bem aceito, simples, reprodutível e amplamente utilizada para avaliar o teor de compostos fenólicos em frutas (CHEN et al., 2014; VIEIRA et al., 2011) e vegetais antioxidantes (JIMÉNEZ-AGUILAR e GRUSAK, 2017; DENG et al., 2013). Com isso, este método foi utilizado como análise preliminar para estimar o conteúdo fenólico do extrato metanólico da polpa dos frutos da remela-de-cachorro. A quantificação de fenólicos totais (TF) no extrato (1 mg/mL),

foi realizada a partir da construção de uma curva de calibração de padrão de ácido gálico em diferentes concentrações (figura 17). É possível observar a linearidade dos dados com o valor de coeficiente de regressão (R^2) próximo de 1. A partir da reta obtida, realizou-se o cálculo do concentração de compostos fenólicos totais.

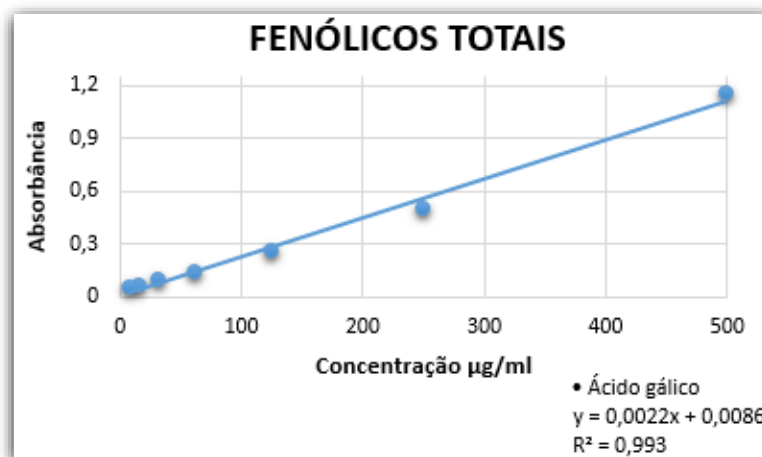


Figura 17. Curva de calibração do padrão ácido gálico para a determinação da concentração de fenólicos totais presentes no extrato da remela-de-cachorro.

Os dados das absorbâncias do extrato de remela-de-cachorro foram diretamente aplicados na equação da reta para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais, expressa em equivalente de ácido gálico por grama de polpa (GAE/g).

A avaliação de TF no extrato pelo método de Folin-Ciocalteu, mostrou que a fruta remela-de-cachorro é rica em compostos fenólicos ($8,28 \pm 11,38$ mg GAE/g) apresentando um teor alto considerável quando comparado com algumas frutas tropicais, bem como consumidas na região Amazônica: buriti (CÂNDIDO, SILVA e AGOSTINI-COSTA, 2015); açaí, bacuri, taperebá (RUFINO et al., 2010), murici, graviola (SOUZA et al., 2012), abiu (MALTA et al., 2013), ingá (SILVA et al., 2007) e cupuaçu (KUSKOSKI et al., 2006). No entanto, nenhuma dessas frutas se comparam ao conteúdo fenólico extremamente elevado do fruto Araçá-boi ($184,08 \pm 8,25$ mg GAE/g), fruta nativa da Amazônia. A Tabela 5 mostra o comparativo melhor do teor fenólico de outras frutas tropicais.

Tabela 5. Teor de compostos fenólicos em frutas tropicais.

Frutas	Nome científico	TF (mg GAE/g)	Ref.
Araçá-boi	<i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh	184,08 ± 8,25	a
Pitomba	<i>Talisia esculenta</i> Radlk.	105,84 ± 2,05	b
Manga	<i>Mangifera indica</i> L.	68,13 ± 4,10	c
Jenipapo	<i>Genipa americana</i> L.	28,0 ± 2,2	d
Cubiu	<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	18,1 ± 2,0	d
Camu-camu	<i>Myrciaria dúbia</i> Mc Vaugh	11,76 ± 14,8	e
Acerola	<i>Malpighiae marginata</i> DC.	10,63 ± 53,1	e
Gabiroba	<i>C. cambessedeanana</i> Berg.	8,510 ± 40,7	f
Remela-de-cachorro	<i>Clavija lancifolia</i> Desf.	8,284 ± 11,38	-
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i> L.	7,99 ± 54,7	g
Ata	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	7,394 ± 7,92	h
Jambolão	<i>Syzygium cumini</i> L.	6,353 ± 3,82	i
Ameixa	<i>Prunusa licina</i> Lindl.	4,951 ± 0,91	j
Açaí	<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	4,54 ± 44,6	e
Jaboticaba	<i>Myrciaria cauliflora</i> Mart.	4,40 ± 9,9	e
Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i> L.	4,351 ± 6,97	k
Murici	<i>Byrsonima crassifolia</i> L.	3,344 ± 9,07	h
Abiu	<i>Pouteria guardneriana</i> Radlk	3,211 ± 5,6	f
Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> Sims.	2,866 ± 20,4	l
Graviola	<i>Annona muricata</i> , L.	2,810 ± 5,40	h
Amora	<i>Morus nigra</i> L.	2,426 ± 5,57	i
Morango	<i>Fragaria vesca</i> L.	1,786 ± 3,40	i
Tangerina	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	1,76 ± 1,24	j
Banana	<i>Musa acuminata</i> Colla.	1,74 ± 14,5	l
Goiaba	<i>Psidium guajava</i> L.	1,275 ± 2,01	i
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> L.	1,265 ± 1,04	j
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i> L.	1,273 ± 1,48	i
Caju	<i>Anacardium occidentale</i> L.	1,18 ± 3,7	e
Umbu	<i>Spondias tuberosa</i> L.	0,904 ± 2,2	e
Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i> L	0,838 ± 6,1	m
Uva	<i>Vitis vinifera</i> L.	0,77 ± 0,68	j
Taperebá	<i>Spondias mombin</i> L.	0,720 ± 4,4	e
Ingá	<i>Inga edulis</i> Martius	0,700 ± 0,2	n
Maçã	<i>Malus pumila</i> Mill.	0,569 ± 1,42	j
Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	0,532 ± 3,6	m
Banana	<i>Musa sapientum</i> L.	0,563 ± 1,35	j
Ciriguela	<i>Spondias purpurea</i> L.	0,550 ± 2,1	m
Caqui	<i>Diospyros kaki</i> L.	0,590 ± 4,62	i
Abacaxi	<i>Ananas comosus</i> L.	0,381 ± 0,7	m
Pêssego	<i>Amygdalus persica</i> L.	0,364 ± 0,41	l
Pera	<i>Pyrus serrulata</i> Rehd.	0,306 ± 1,59	l
Jaca	<i>Artocarpus integrifolia</i> L.	0,290 ± 6,3	m
Bacuri	<i>Platonia insignis</i> Mart.	0,238 ± 0,7	e
Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i> S.	0,205 ± 3,0	o
Melancia	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb.	0,127 ± 1,21	j ³

³ Ref: a. NERI-NUMA et al., 2013; b. NERI-NUMA et al., 2014; c. GARCIA-MAGANA et al., 2013; d. TAUCHEN et al., 2016; e. RUFINO et al., 2010; f. MALTA et al., 2013; g. DENARDIN et al., 2015; h. SOUZA et al., 2012; i. BATISTON et al., 2013; j. CHEN et al., 2014; k. CÂNDIDO, SILVA e AGOSTINI-COSTA, 2015; l. SEPTEMBRE-MALATERRE et al., 2016; m. ALMEIDA et al., 2011; n. SILVA et al., 2007; o. KUSKOSKI et al., 2006.

As amostras de frutas que apresentaram maior conteúdo fenólico em relação a fruta remela-de-cachorro, possivelmente podem estar associados com o método de extração desses compostos, aumentando sua quantidades de fenólicos totais.

O método de Folin não é específico para TF, uma vez que determina outras substâncias redutoras presentes que podem interferir no resultado final (ANGELO & NEUZA, 2007). Com isso, o método de Folin-Ciocalteu torna-se apenas uma estimativa do teor fenólico em amostras.

Geralmente extratos e frações que apresentam teor fenólico elevado tendem a apresentar algumas atividades biológicas desejáveis como antimicrobiana (DICASTILLO et al., 2016), antiulcerogênica (BOLIGON et al., 2014), antienzimática (MCDUGALL et al., 2008) e antioxidante (XI et al., 2017a; SINGH et al., 2016).

4.3. Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato da polpa da remela-de-cachorro por UHPLC-MS/MS

A técnica de UHPLC-MS/MS é sensível e seletiva para a quantificação adequada de compostos fenólicos (BATAGLION et al., 2013). Além disso, os experimentos quantitativos realizados por meio do modo de operação SRM são mais apropriados para superar os desafios analíticos da determinação de compostos que estejam presentes em quantidades traço na matriz complexa que é a polpa de um fruto (fenólicos na ordem de magnitude de mg a ng e diversos polissacarídeos) (SOUZA et al., 2016). Além disso, a utilização da UHPLC-MS/MS tem ganhado destaque devido à sua capacidade de caracterizar e quantificar simultaneamente compostos estruturalmente semelhantes em matrizes complexas (RODRIGUES et al., 2016; FRANCESCATO et al., 2013, GALLART-AYALA et al., 2008).

Com isso, foram construídas curvas de calibração com os padrões dos compostos fenólicos, e em seguida aplicou-se o método previamente validado por Bataglioni e colaboradores (2015) diretamente no extrato da remela-de-cachorro. A partir das curvas de calibração, obteve-se as respectivas equações da reta para cada substância de interesse previamente coberta pelo método.

A amostra da remela-de-cachorro quando aplicada em uma concentração de 1 mg/mL forneceu respostas analíticas mensuráveis para todos os analitos de interesse (concentração acima dos limites de detecção e quantificação). Desta forma, foi possível quantificar os analitos propostos como base no método previamente validado. Foram identificados e quantificados 9 compostos fenólicos, sendo eles:

quatro ácidos hidroxicinâmicos (pico 1, 2, 4 e 5), dois galatos de alquila (pico 3 e 6) e três flavonoides (pico 7, 8 e 9) (tabela 6).

Tabela 6. Transições SRM, massa molecular e concentração dos compostos presentes no extrato e na polpa da remela-de-cachorro obtido por UHPLC-MS/MS.

Pico	Compostos	1ª transição (m/z)	2ª transição (m/z)	Conc. no extrato (µg/g)	Conc. na polpa fresca (µg/g)
1	Ácido clorogênico	353 > 191	353 > 85	32,2 ± 0,4	1,596 ± 0,1
2	Ácido cafeico	179 > 135	179 > 107	0,7 ± 0,01	0,035 ± 0,01
3	Galato de etila	197 > 124	197 > 78	14,4 ± 0,1	0,711 ± 0,03
4	Ácido <i>p</i> -cumárico	163 > 119	163 > 93	1,1 ± 0,01	0,056 ± 0,01
5	Ácido ferúlico	193 > 178	193 > 134	13,4 ± 0,1	0,663 ± 0,07
6	Galato de propila	211 > 124	211 > 78	16,0 ± 0,2	0,800 ± 0,04
7	Luteolina	285 > 151	285 > 133	66,5 ± 0,7	3,291 ± 0,1
8	Kaempferol	285 > 117	285 > 93	70,4 ± 0,9	3,483 ± 0,1
9	Apigenina	269 > 151	269 > 117	6,0 ± 0,07	0,299 ± 0,01
	Total de fenólicos			220,3	10,92

(1ª) transição usada para identificação

(2ª) segunda transição usada para quantificação

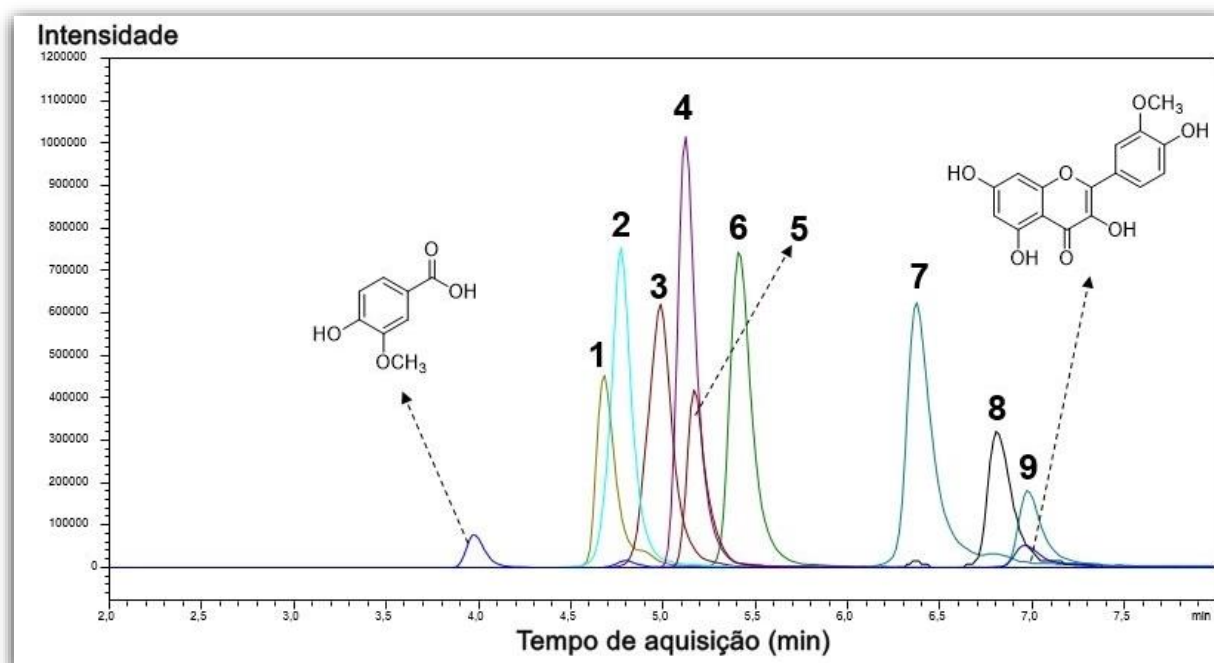


Figura 18. Separação dos compostos fenólicos do extrato da polpa da remela-de-cachorro detectado por UHPLC-MS/MS no modo SRM. (1) ácido clorogênico, (2) ácido cafeico, (3) galato de etila, (4) ácido *p*-cumárico, (5) ácido ferúlico, (6) galato de propila (7) luteolina (8) kaempferol (9) apigenina. Padrões internos: ácido vanílico e isoramnetina.

Os espectros MS/MS dos compostos fenólicos presentes na remela-de-cachorro por infusão direta encontram-se no apêndice para melhor visualização contendo seus respectivos fragmentos explanados na tabela acima. A primeira transição (MS) consistiu em selecionar o primeiro íon fragmentado intenso para a identificar do composto. Já a segunda transição (MS/MS) consistiu na seleção do segundo íon fragmentado intenso para a quantificação e confirmação do composto presente na amostra.

Os padrões de fragmentação dos espectros de massas das substâncias foram utilizados para a identificação dos compostos presentes na remela-de-cachorro. A análise de LC-MS mostrou íons desprotonados ($[M-H]^-$), que correspondem a compostos ácidos.

A fragmentação do íon precursor de m/z 353 (composto 1) levou a formação do pico base em m/z 191 $[M - 162 - H]^-$, resultante da perda correspondente ao ácido cafeico por meio de um rearranjo remoto de um próton (figura 19). Este pico base correspondeu à estrutura do ácido quínico desprotonado, logo identificou-se o composto de m/z 353 como sendo o ácido clorogênico (DEMARQUE et al., 2016; CHEN et al., 2013; LI et al., 2013). O íon em m/z 85 foi explanado em poucos trabalhos, fragmento gerado por meio da eliminação do grupo $C_{12}H_{12}O_7$, sendo um dos íons característicos do ácido clorogênico (PUIGVENTÓS et al., 2015; PEARSON et al., 2014).

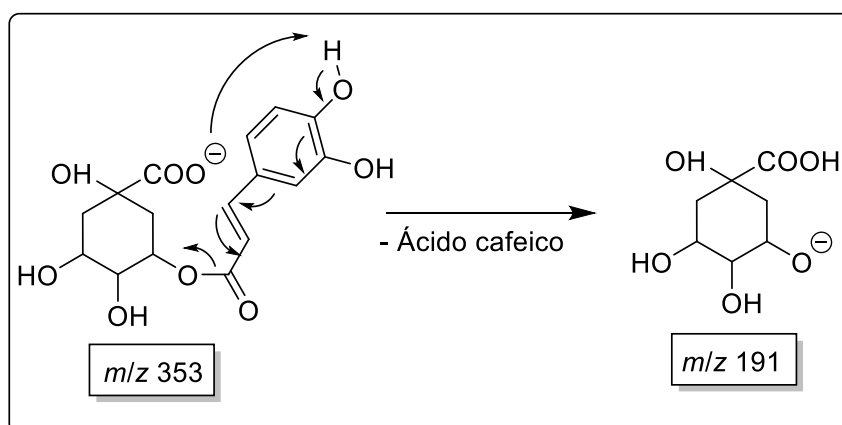


Figura 19. Mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico m/z 185 $[M - H]^-$

Fonte: DEMARQUE et al., 2016

Com base no espectro de MS/MS do composto 2 (m/z 179) revelou o pico base em m/z 135 $[M - 44 - H]^-$ resultante da perda de CO_2 (descarboxilação) (figura 20). Esta perda é comum em fenilpropanóides. O íon em m/z 107 está associado com a perda

do grupo $\text{CH}_2=\text{CH}_2\text{-COOH}$. Desta forma, o íon molecular é compatível com a estrutura do ácido cafeico (WU et al., 2009; SUN et al., 2007).

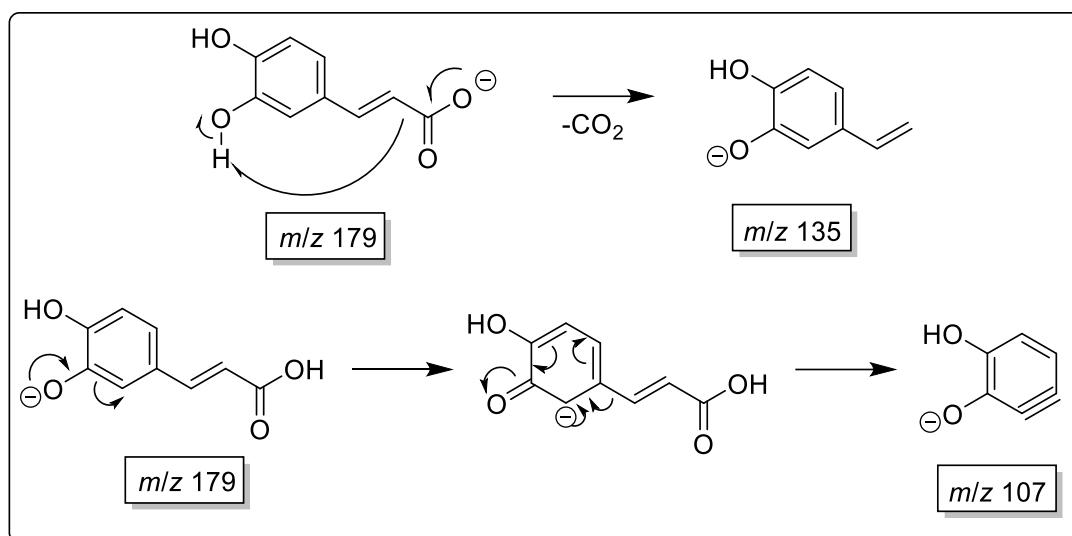


Figura 20. Proposta de fragmentação do ácido cafeico m/z 179 $[\text{M} - \text{H}]^-$

O composto 3 $[\text{M} - 197 - \text{H}]^-$ apresentou fragmentação com m/z 124 $[\text{M} - 28 - 44 - \text{H}]^-$ resultante da reação radicalar com perda do grupo $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$ (figura 21) (PUIGVENTÓS et al., 2015). Da mesma forma, o espectro do composto 6 $[\text{M} - 211 - \text{H}]^-$ apresentou o mesmo pico base em m/z 124, sendo concordante com a mesma sub classe do composto 3, sugerindo a identificação de um galato de alquila. Com base na massa molecular é possível prevê que composto 3 é o galato de etila e com m/z 211, composto 6 galato de propila (diferença de massa equivalente à adição de um grupo $-\text{CH}_3$ em relação ao composto 3).

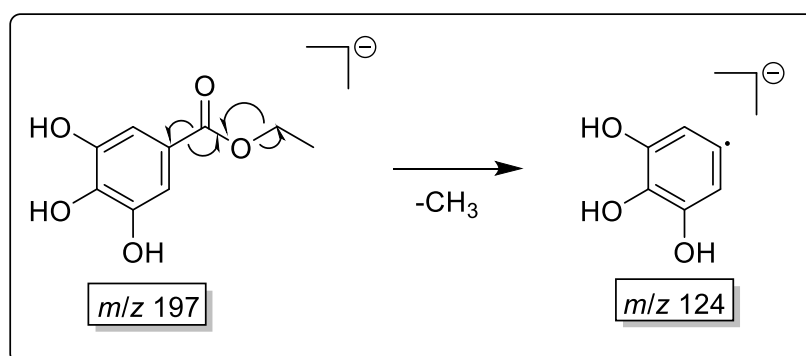


Figura 21. Proposta de fragmentação do galato de etila m/z 197 $[\text{M} - \text{H}]^-$

Em relação ao composto 4 (m/z 163) constatou-se que a fragmentação em m/z 119 $[\text{M} - 44 - \text{H}]^-$ é resultante da perda de CO_2 (figura 22) (PUIGVENTÓS et al., 2015; SUN et al., 2007). No trabalho de Puigventós e colaboradores (2015) o fragmento m/z 93 $[\text{M} - 72 - \text{H}]^-$ está associado com a eliminação do grupo $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2^-$, confirmando a

substância ácido *p*-cumárico. Com base nisso, o fragmento em m/z 93 possivelmente pode estar associado com a formação do íon oxibenzeno.

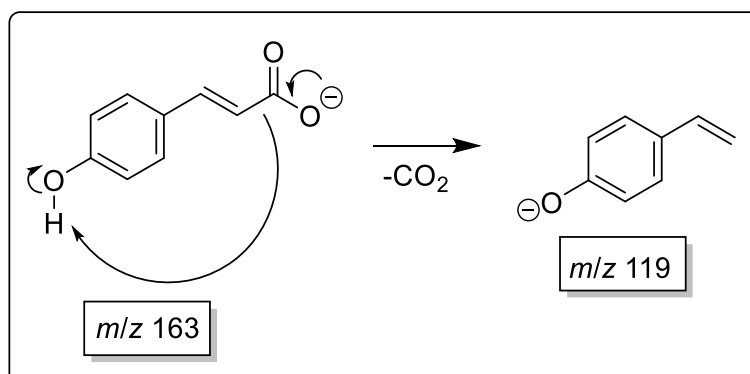


Figura 22. Proposta de fragmentação do ácido *p*-cumárico m/z 167 $[M - H]^-$

O composto 5 apresentou o mesmo padrão de fragmentação compatível com o ácido ferúlico, apresentando m/z 178 e 135 referente à eliminação do grupo $-CH_3$ $[M - 15 - H]^-$ (por fragmentação radicalar) e $-COOH$ $[M - 15 - 44 - H]^-$, respectivamente (PUIGVENTÓS et al., 2015; GUO et al., 2013; SUN et al., 2007).

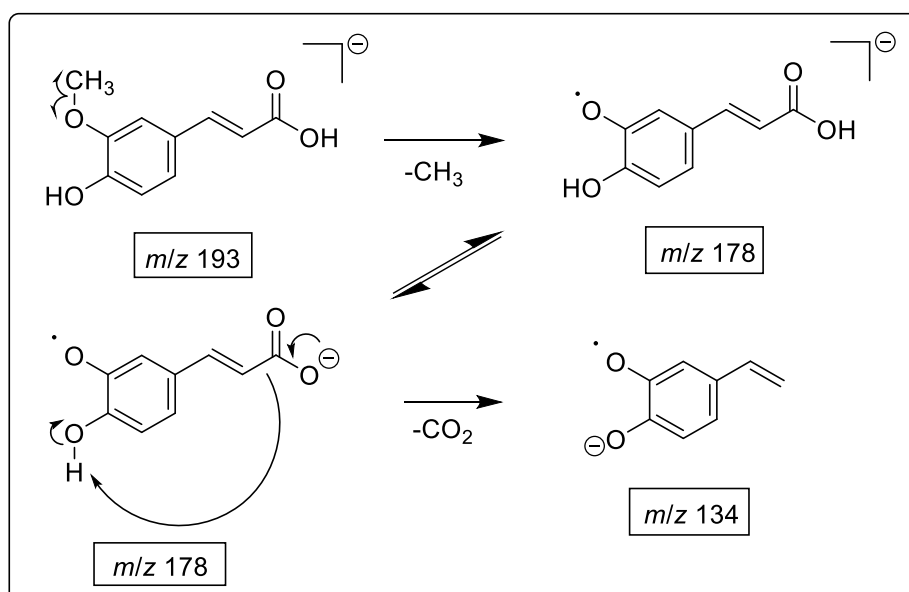


Figura 23. Proposta de fragmentação do ácido ferúlico m/z 194 $[M - H]^-$

O composto 7 com m/z 285 apresentou fragmentação proveniente da reação retro Diels-Alder em m/z 133 (pico base) e em m/z 151 resultante da perda do anel B flavonoidico e suas hidroxilas (figura 24). Com o embasamento nas propostas de fragmentações de flavonas nos estudos de Gouveia et al. (2013) e Fabre et al. (2001), pode-se associar a fragmentação em m/z 217 $[M - 68 - H]^-$ decorrente da perda do grupo $-C_3-O_2$, e a eliminação posterior do grupo C_2H_2O está associado com o íon em

m/z 175 $[M - C_3O_2 - C_2H_2O - H]^-$. Desta forma, os fragmentos são concordantes com o padrão de fragmentação da substância luteolina.

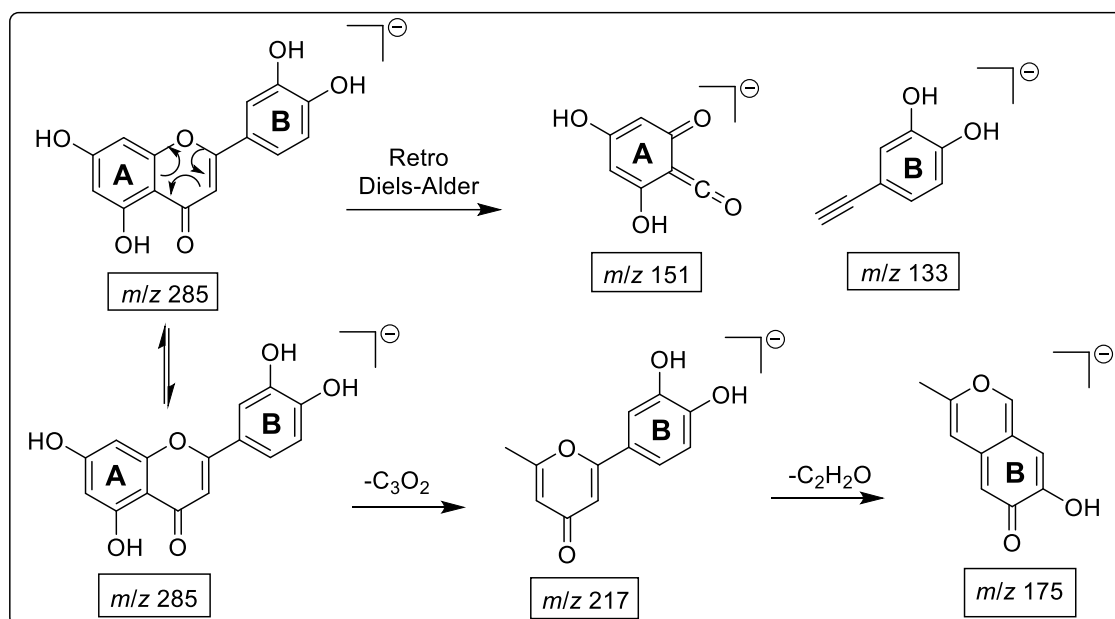


Figura 24. Fragmentações MS/MS da luteolina m/z 185 $[M - H]^-$

Fonte: GOUVEIA et al., 2013; FABRE et al., 2001;

Com base no trabalho de Chernonosov e colaboradores (2017) foi explanado os mesmos fragmentos (sem identificação de suas perdas) presentes no espectro MS/MS do compostos 8 (m/z 255, 227, 211, 187, 159, 143, 117, 108 e 93), compatível com o kaempferol. Entretanto, o trabalho de March e Miao (2004) explanou o esquema de fragmentação do kaempferol (figura 25). De acordo com este estudo, o fragmento em m/z 255 $[M - 30 - H]^-$ é proveniente da perda do grupo $-CH_2O$. A partir desse mesmo fragmento outros dois íons são formados: m/z 227 gerado pela perda de monóxido de carbono, $[M - CH_2O - CO - H]^-$ e m/z 143 proveniente da perda de mais 3 átomos de CO. Já o íon em m/z 211 $[M - 56 - 18 - H]^-$ é sugerido como produto da eliminação de dois átomos de monóxido de carbono e água, respectivamente. O íon em m/z 187 é originado pela eliminação do grupo C_2H_2O seguida de duas perdas de CO, e com mais uma perda de CO ocorre a formação do íon em m/z 159.

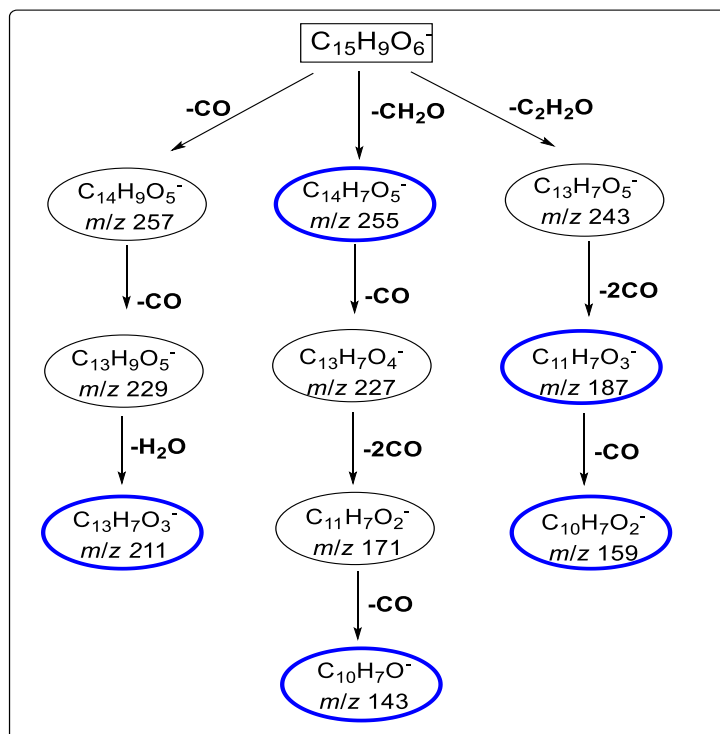


Figura 25. Esquema da proposta de fragmentação do kaempferol $[M - H]^-$.

Fonte: MARCH & MIAO, 2004.

O composto 9, apresentou fragmentações referente à flavonas, que têm fissão característica no anel C. Os fragmentos em m/z 117 e 151 denotam produtos da reação de retro Diels-Alder (figura 26). Já a perda do dióxido de carbono do fragmento em m/z 151 indica a formação em m/z 107 $[M - 44 - H]^-$, o que confirma a identificação da apigenina (WILLEMS et al., 2016; TROALEN et al., 2014;

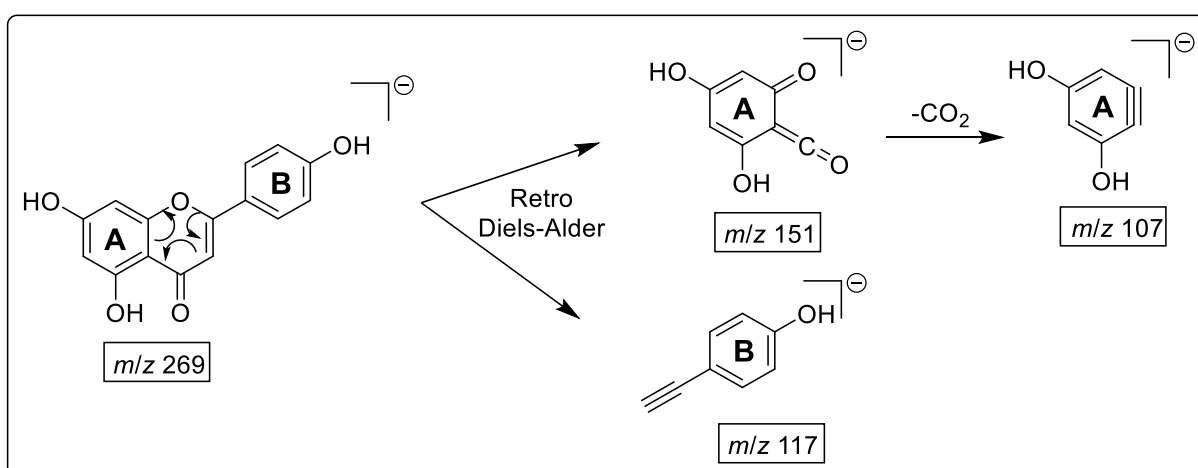


Figura 26. Mecanismos de fragmentação MS/MS para apigenina $[M - H]^-$

Fonte: TROALEN et al., 2014

O kaempferol foi o composto mais abundante encontrado no extrato da remela-de-cachorro, seguido por: luteolina > ácido clorogênico > galato de propila > galato de etila > ácido ferúlico > apigenina > ácido *p*-cumárico > ácido cafeico (tabela 6).

Estes compostos quantificados encontram-se presentes também na composição de diversas outras frutas. O composto majoritário kaempferol é encontrado no abacaxi ($0,37 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$), caju ($1,66 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015) e tomate ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$) (TOKUSOGLU et al., 2003) em quantidades menores comparado a fruta remela-de-cachorro ($3,483 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$). Entretanto, as frutas pitanga ($4,1 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$), morango ($9,6 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$), acerola ($11,0 \pm 0 \mu\text{g/g}$) (HOFFMANN-RIBANI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008) e buriti ($41,54 \pm 4,47 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2014) apresentaram quantidades superiores que a fruta alvo deste trabalho.

A luteolina sendo o segundo composto fenólico mais abundante do extrato da remela-de-cachorro apresentou $3,291 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ de polpa fresca. Esse valor é similar com a concentração das frutas: acerola ($3,16 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$), camu-camu ($3,16 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$) e caju ($3,67 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015). Entretanto, a espécie alvo apresenta concentração inferior ao açaí ($21,61 \pm 2,16 \mu\text{g/g}$).

O ácido clorogênico é o terceiro composto abundante na polpa da fruta remela-de-cachorro, apresentando maior concentração ($1,596 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$) que as frutas: ingá ($0,0057 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$), cubiu ($0,015 \pm 106,2 \mu\text{g/g}$), camu-camu ($0,0153 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$), cupuaçu ($0,017 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$) e patauí da Amazônia ($2,32 \pm 45,2 \mu\text{g/g}$) (TAUCHEN et al., 2016). A fruta pitomba apresenta quantidades similares a remela de cachorro ($1,5 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$) (SOUZA et al., 2016). As frutas limão ($10,43 \pm 1,29 \mu\text{g/g}$) (XI et al., 2017), pêssego ($15,03 \pm 1,3 \mu\text{g/g}$) (LOIZZO et al., 2015), açaí ($9,09 \pm 1,02 \mu\text{g/g}$), buriti ($1154,15 \pm 9,69 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015) e manga ($13660 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$) (ABDULLAH et al., 2015) apresentaram concentração de ácido clorogênico maior em relação a espécie de interesse.

A fruta gabioba apresentou concentração de galato de propila maior ($950,0 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ de peso seco) (MALTA et al., 2012) que a fruta remela-de-cachorro ($0,800 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$). Já um estudo qualitativo confirmou a presença desse composto em maçã (PAEPE et al., 2013). Já o galato de etila foi encontrado em caju ($4,25 \pm 0,67 \mu\text{g/g}$), taperebá ($7,26 \pm 0,67 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015) e gabioba ($3110 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ de peso seco) (MALTA et al., 2012) em quantidades maiores que a fruta remela-de-cachorro ($0,711 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$).

Já o ácido ferúlico presente na polpa da remela-de-cachorro ($0,663 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$) apresentaram concentração superior para algumas amostras de frutas tais como o ingá ($0,015 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$), camu-camu ($0,019 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$), cupuaçu ($0,076,8 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$), cubiu $0,099 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$), patauí da Amazônia ($0,352 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$) (TAUCHEN et al., 2016) e pêsego ($0,226 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$) (LOIZZO et al., 2015). O cacau ($0,62 \pm 11,7 \mu\text{g/g}$) e jenipapo ($0,59 \pm 5,4 \mu\text{g/g}$) (LOIZZO et al., 2015) exibiram concentrações similares de ácido ferúlico presente na fruta alvo deste trabalho. Entretanto as frutas pitomba ($1,8 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$) (SOUZA et al., 2016), açaí ($3,22 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$), acerola ($5,16 \pm 0,44 \mu\text{g/g}$), abacaxi ($14,74 \pm 0,93 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015) e buriti ($184,66 \pm 8,86 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2014) apresentam concentrações maiores que a espécie estudada.

A apigenina apresentou $0,299 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ na remela-de-cachorro, concentração inferior ao açaí ($12,57 \pm 1,34 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015), buriti ($102,48 \pm 0,29 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2014) e manga ($3210,0 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$) (ABDULLAH et al., 2015). O ácido *p*-cumárico apresenta na polpa da remela-de-cachorro ($0,056 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$) apresenta concentração maior que o cacau ($0,0295 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$) e similar ao ingá ($0,0604 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$) e jenipapo ($0,056 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$) (TAUCHEN et al., 2016). Entretanto diversas frutas apresentaram concentração de ácido *p*-cumárico maior que a remela-de-cachorro tais como o pêsego ($0,153 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$) (LOIZZO et al., 2015), cupuaçu ($0,149 \pm 3,9 \mu\text{g/g}$), cubiu ($0,295 \pm 7,2 \mu\text{g/g}$), patauí da Amazônia ($0,502 \pm 14,7 \mu\text{g/g}$) (TAUCHEN et al., 2016), açaí ($1,22 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$), abacaxi ($15,68 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$), cajú ($2,46 \pm 0,35 \mu\text{g/g}$), taperebá ($3,78 \pm 0,51 \mu\text{g/g}$), camu-camu ($5,13 \pm 0,61 \mu\text{g/g}$), acerola ($11,36 \pm 1,42 \mu\text{g/g}$), abacaxi ($15,68 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015), pitomba ($3,4 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$) (SOUZA et al., 2016), buriti ($277,74 \pm 12,44 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2014) e manga ($2430,0 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$) (ABDULLAH et al., 2015).

O ácido cafeico apresentou baixa concentração na remela-de-cachorro ($0,035 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$) em comparação aos demais compostos fenólicos quantificados. O cacau apresentou concentração similar ($0,0295 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$) ao da espécie estudada. Já outras frutas apresentaram quantidades de ácido cafeico maiores que a fruta remela-de-cachorro, tais como o jenipapo ($0,047 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$), cubiu ($0,235 \pm 5,3 \mu\text{g/g}$), patauí da Amazônia ($0,256 \pm 8,1 \mu\text{g/g}$) (TAUCHEN et al., 2016), açaí ($2,38 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$), acerola ($5,33 \pm 0,67 \mu\text{g/g}$), abacaxi ($6,65 \pm 0,44 \mu\text{g/g}$) (BATAGLION et al., 2015), limão

(64,75 ± 5,72 µg/g) (XI et al., 2017), buriti (895,53 ± 4,8 µg/g) (BATAGLION et al., 2014).

Os estudos sobre a quantificação de compostos fenólicos em frutas devem levar em consideração que o efeito da matriz proveniente das estruturas variáveis de suas formas conjugadas com açúcares torna-se um desafio na análise. A dificuldade em identificar e quantificar os compostos nesse tipo de matriz utilizando apenas o método cromatográfico com detecção por ultravioleta se dá pela necessidade de separação total dos compostos (BYSTROMA et al., 2008), o que já não é necessário no modo SRM. Portanto, a utilização do método de UHPLC-MS/MS previamente validado foi eficiente para vencer o efeitos de co-eluição, bem como também efeitos de matriz devido sua alta seletividade, sendo assim, útil para quantificar os compostos fenólicos presente no extrato da remela-de-cachorro.

4.4. Atividade antioxidante do extrato da remela-de-cachorro pelo método do DPPH e ABTS

O potencial antioxidante de extratos de frutas é melhor avaliada com base nos resultados obtidos por ensaios com medidas espectrofotométricas (IGNAT, et al., 2011) empregando a utilização de diferentes métodos antioxidantes (SOUZA et al., 2016; RUFINO et al., 2010; THAIPONG et al., 2006). O uso de pelo menos dois métodos é recomendável para fornecer resultados confiáveis da AA em alimentos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). Com base nisso, optou-se por avaliar o extrato metanólico da polpa de remela-de-cachorro empregando os ensaios colorimétricos *in vitro* abrangendo a faixa de baixa até alta inibição da oxidação do radical DPPH• e ABTS•⁺.

Os resultados obtidos para a determinação da atividade do sequestro dos radicais DPPH• e ABTS•⁺ pelo extrato de remela-de-cachorro foram expressos em porcentagem total e pelo parâmetro do IC₅₀ (figura 27), sendo a variável y, a porcentagem de 50 % (referente à quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do DPPH e ABTS em 50%).

O extrato metanólico de remela-de-cachorro pelo método do DPPH apresentou 60,13 ± 1,4 % de inibição total e IC₅₀ de 30,0 ± 1,0 µg/mL, sendo mais ativa a AA em comparação a algumas amostras de frutas tropicais normalmente consumidas, como o bacuri com 4700,24 ± 1,0 µg/mL, taperebá com 535,53 ± 1,0 µg/mL (VIEIRA et al.,

2011), cupuaçu com $325,21 \pm 2,27 \mu\text{g/mL}$ (SOUSA et al., 2011), graviola com $102,86 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$, abacate com $52,63 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$ (OBOH et al., 2015), e camu-camu com $73,48 \pm 4,53 \mu\text{g/mL}$ (REYNERTSON et al., 2008). As frutas pitomba-da-baía ($38,0 \pm 4,86 \mu\text{g/mL}$) (REYNERTSON et al., 2008) e acerola ($24,48 \mu\text{g/mL}$) (BATISTON et al., 2013) apresentaram valores similares de IC_{50} pelo método do DPPH quando comparados a remela-de-cachorro.

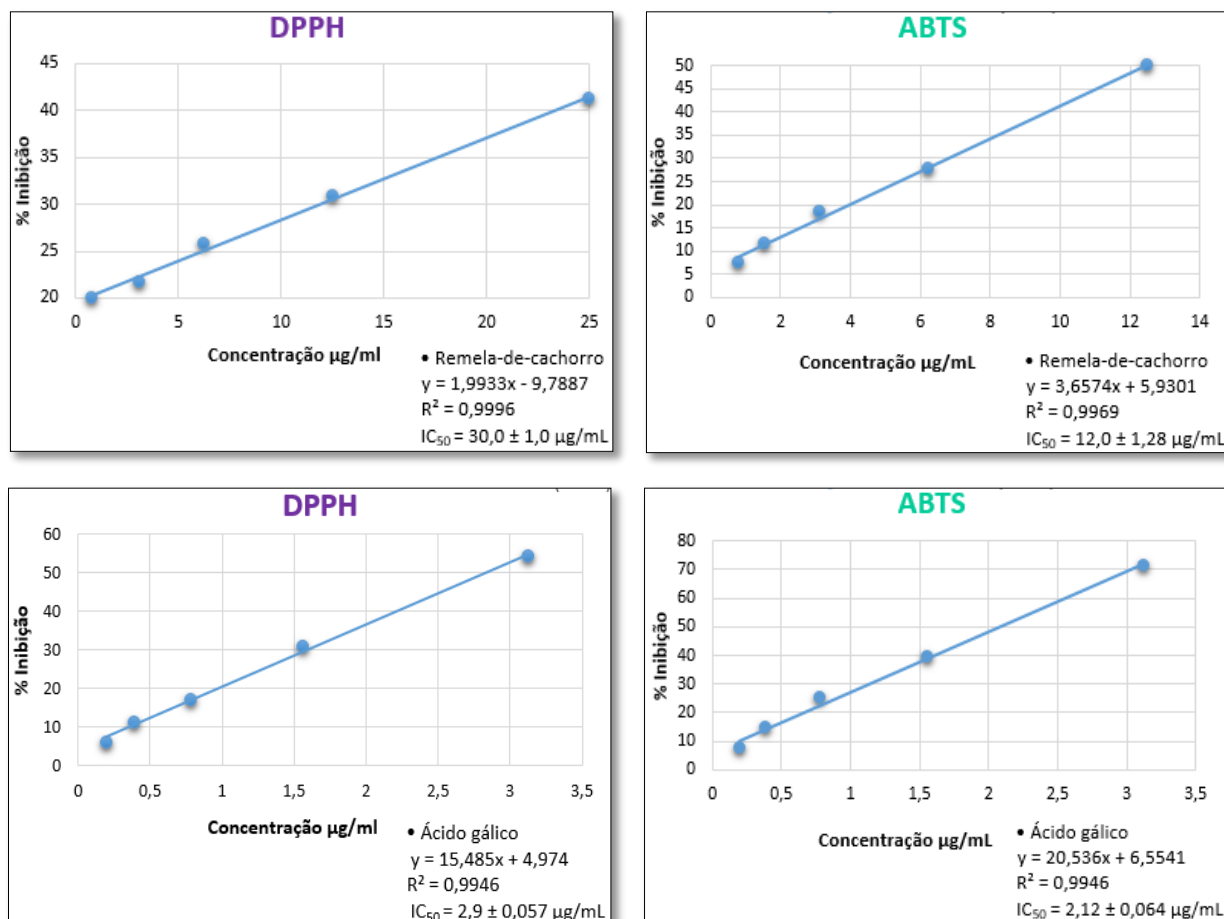


Figura 27. Inibição dos radicais DPPH e ABTS pelo extrato de remela-de-cachorro e do padrão ácido gálico expresso pelo parâmetro do IC_{50} .

Dentre as frutas abordadas, nenhuma se compara a capacidade antioxidante elevada da fruta Araçá-boi ($0,69 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$) (NERI-NUMA et al., 2013). Esse mesmo estudo mostra que a alta capacidade antioxidante desse fruto está associado pelo seu alto teor fenólico ($184,08 \pm 8,25 \text{ mg GAE/g}$). Para melhor comparação, a tabela 7 mostra a AA pelo método do DPPH em frutas tropicais.

A capacidade antioxidante da fruta remela-de-cachorro pelo método do ABTS também apresentou $91,46 \pm 0,33 \%$ e menor IC_{50} ($12,0 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$) em comparação as frutas: carambola ($284,70 \pm 4,13 \mu\text{g/mL}$), gamboja indiana ($95,27 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$) (SHARMA et al., 2015), cajá-manga ($17,92 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$), jatobá ($17,24 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$),

jambo-vermelho ($16,33 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$), jujuba ($15,37 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$) (COSTA, 2010) e roble-Palestina ($75,5 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$) (AL-MUSTAFA & AL-THUNIBAT, 2008).

Algumas frutas apresentaram resultados equivalente quando comparado a fruta alvo deste trabalho, como o jenipapo ($11,43 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$), araçá ($14,06 \pm 2,36 \mu\text{g/mL}$), pitaya ($14,58 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$) (COSTA, 2010) e azarola ($14,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) (AL-MUSTAFA & AL-THUNIBAT, 2008).

Tabela 7. Atividade antioxidante de frutas tropicais pelo método do DPPH expresso em IC₅₀

Frutas	Nome científico	IC ₅₀ (μg/mL)	Ref.
Bacuri	<i>Platonia insignis</i> Mart.	4700,24 ± 1,0	a
Taperebá	<i>Spondias mombin</i> L.	535,53 ± 1,0	a
Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i> S.	325,21 ± 2,27	b
Abacaxi	<i>Ananas comosus</i> L.	311,81 ± 0,25	c
Fruta-pão	<i>Artocarpus altilis</i>	288,39 ± 0,38	c
Mamão	<i>Carica papaya</i> L.	251,51 ± 0,37	c
Melancia	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb	217,56 ± 0,18	c
Caqui	<i>Diospyros kaki</i> L.	203,73 ± 4,80	d
Laranja	<i>Citrus sinensis</i> L.	187,30 ± 0,35	c
Banana	<i>Musa paradisíaca</i> L.	181,86 ± 0,15	c
Morango	<i>Fragaria vesca</i> L.	181,38 ± 3,66	d
Amora silvestre	<i>Rubus procerus</i> Muell.	172,46 ± 4,25	d
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i> L.	161,02 ± 1,37	d
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	105,93 ± 17,2	e
Goiaba	<i>Psidium guaiava</i> L.	105,17 ± 0,27	c
Graviola	<i>Annona muricata</i> L.	102,86 ± 0,21	c
Jambo	<i>Syzygium jambols</i> L.	92,0 ± 8,24	f
Caju	<i>Anacardium occidentale</i> L.	89,24 ± 0,16	c
Amora preta	<i>Morus nigra</i> L.	87,57 ± 2,88	d
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i> L.	73,48 ± 4,53	d
Camu-camu	<i>Myrciaria dublia</i> McVaugh	57,2 ± 5,61	f
Abacate	<i>Persea americana</i> Mill.	52,63 ± 0,37	c
Pitomba-da-Baía	<i>Eugenia luschnathiana</i> Berg	38,0 ± 4,86	f
Remela-de-cachorro	<i>Clavija lancifolia</i> Desf.	30,0 ± 1,0	-
Acerola	<i>Malpighia emarginata</i> D.C	24,48 ± 0,27	d
Jamelão	<i>Syzygium cumini</i> L.	20,94 ± 0,56	d
Jaboticaba	<i>Myrciaria cauliflora</i> Mart.	19,4 ± 0,28	f
Araçá-boi	<i>Eugenia stipitata</i> McVaugh	0,69 ± 0,23	g

⁴ a - VIEIRA et al., 2011; b - SOUSA,VIEIRA,LIMA, 2011; c - OBOH et al., 2015; d - BATISTON et al., 2013; e - RAJAN et al., 2011; f - REYNERTSON et al., 2008; g - NERI-NUMA et al., 2013

4.4.1. Comparação da atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e ABTS

A capacidade antioxidante do extrato da remela-de-cachorro pelo ensaio do ABTS ($12,0 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$) foi mais elevada em comparação ao resultado obtido pelo ensaio do DPPH ($30,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$). Alguns estudos compararam a capacidade antioxidante dos dois métodos em extratos de frutas e comprovaram a melhor atividade para o ensaio ABTS (tabela 8).

Tabela 8. Atividade antioxidante de frutas pelo método do DPPH e ABTS.

Fruta	Nome científico	DPPH (IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$)	ABTS (IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$)	Ref.
Pitaya	<i>Hylocereus polyrhizus</i> W.	823,58 \pm 13,25	328,04 \pm 0,43	a
Cubiu	<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	606,3 \pm 3,5	290,3 \pm 10,7	b
Umbu	<i>Spondias tuberosa</i> L.	558,0 \pm 0,01	465,0 \pm 0,03	c
Amora	<i>Rubus rosaefolius</i> Sm	291,7 \pm 4,2	135,5 \pm 0,2	d
Maria-preta	<i>Diosbus inconstans</i> Jacq.	164,4 \pm 8,9	73,20 \pm 0,9	d
Lulo	<i>Solanum quitoense</i> LAM	134,6 \pm 3,7	99,71 \pm 0,1	d
Bael	<i>Aegle marmelos</i> L.	106,16 \pm 25,3	35,02 \pm 19,2	e
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	105,93 \pm 17,2	40,03 \pm 14,7	f
Ucria	<i>Rhus tripartitum</i> D.C	105,33 \pm 6,1	3,81 \pm 0,17	g
Corozo	<i>Bactris minor</i> Jacq.	97,4 \pm 3,6	29,4 \pm 1,6	h
Umbellata	<i>Sorbus umbellata</i> Desf.	62,09 \pm 1,41	20,17 \pm 0,94	i
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i> L.	58,5 \pm 3,1	42,7 \pm 0,7	h
Remela-de-cachorro	<i>Clavija lancifolia</i> Desf.	30,0 \pm 1,0	12,0 \pm 1,28	-
Uva rustica	<i>Vitis labrusca</i> L.	29,1 \pm 1,7	14,4 \pm 1,1	h
Achachairú	<i>Garcinia achachairu</i> Rubsy	27,0 \pm 3,2	23,28 \pm 1,43	b
Agraz	<i>Vaccinium meridionale</i> Swa.	22,9 \pm 5,4	3,8 \pm 0,3	h

Também é possível ressaltar que a maioria dessas amostras de frutas relatadas na literatura apresentaram maior IC₅₀, ou seja, menor AA para os dois métodos utilizados em comparação a espécie alvo deste trabalho. Porém o extrato metanólico da fruta ucria da Tunisia apresentou menor IC₅₀ pelo método ABTS ($3,81 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$) comparado a espécie alvo deste trabalho. O seu potencial antioxidante pode ser justificado pela presença considerável de TF ($23,31 \text{ mg GAE/g}$) (TLILI et al., 2014).

A justificativa para tal fato está diretamente associado pela cinética da reação entre a interação dos compostos fenólicos com o reagente radicalar (DPPH• e ABTS•+). Bondet e colaboradores (1997) estudaram a cinética de algumas reações e

⁵ a - LOURITH e KANLAYAVATANAKUL, 2013; b - MASCATO et al., 2015; c - SILVA et al., 2012; d - BAGATTOLI et al., 2016; e - RAJAN^b et al., 2011; f - RAJAN^a et al., 2011; g - TLILI et al., 2014; h - SEQUEDA-CASTAÑEDA et al., 2016; i - KIVRAK e KIVRAK, 2014.

verificaram que antioxidantes fenólicos reagem lentamente com o DPPH, atingindo um estado estacionário no intervalo de 1 até 5 h ou mais. Outro estudo, expõe que compostos fenólicos reagem rapidamente com o ABTS atingindo um estado estacionário em 30 min (SHALABY & SHANAB, 2013).

O mecanismo de reação para a inibição do radical livre com os compostos antioxidantes também dependem da conformação estrutural dos compostos envolvidos na reação, ou seja, algumas substâncias reagem rapidamente, enquanto que outras, ocorrem lentamente (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Os compostos fenólicos em geral são majoritariamente responsáveis pela AA em frutas (ZHAO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011). Esses compostos têm sido destacados das demais classes por serem considerados os maiores contribuintes da AA, possuindo maior potencial de inibição de radicais em comparação a vitamina C (BARREIROS et al., 2006; SUN et al., 2002; RICE-EVAN et al., 1996), vitamina E e carotenoides (BARREIROS et al., 2006; SOARES, 2002).

Alguns estudos relatam a correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de frutas pelo método do DPPH e ABTS (CHEN et al., 2017; OMENA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011). Com isso é possível associar o potencial antioxidante do extrato de remela-de-cachorro com a concentração de fenólicos totais ($8,28 \pm 11,38$ mg GAE/g) obtido pelo método de Folin-Ciocalteu. Esses compostos apresentaram quantidades significativas quando comparadas a outras frutas, indicando a contribuição na AA para os dois métodos utilizados.

É comprovado que alguns fatores influenciam diretamente na AA de compostos fenólicos, em especial a posição da substituição e o número de grupos hidroxila no anel aromático, a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio e as propriedades de outros grupos substituintes (SCOTTI et al., 2007). Em relação a quantidade de grupos hidroxilas de ácidos fenólicos, a AA é mais ativa com a presença de duas ou três grupos hidroxilas no anel aromático do que os monohidroxilados (PEREIRA et al., 2009; SCOTTI et al., 2007) (comparação do ácido cafeico e o ácido *p*-cumárico identificado neste trabalho) (figura 28).

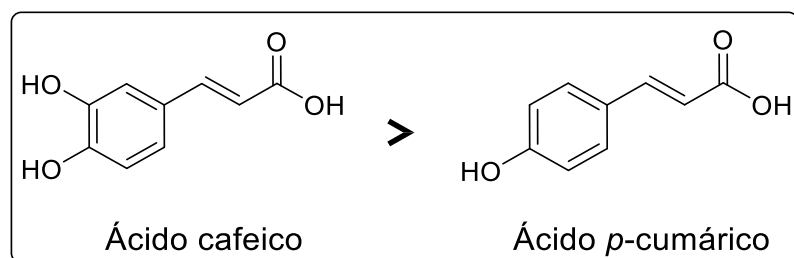


Figura 28. Aumento da atividade antioxidante de acordo com a quantidade de grupos hidroxilas;

Fonte: SCOTTI et al., 2007

Em relação a posição dos substituintes no anel aromático, a presença do grupo hidroxila em posição “*orto*” e/ou “*para*” no anel contendo heteroátomo oxigênio, potencializa a AA por efeito de ressonância entre o par de elétrons do tipo “*p*” do oxigênio e o radical fenóxil formado (SCOTTI et al., 2007). A eficiência antioxidante de ácidos fenólicos é mais ativa pela introdução de um grupo hidroxila na posição “*para*” do que aqueles substituídos na posição “*orto*” ou “*meta*” (PEREIRA et al., 2009; SCOTTI et al., 2007), sendo as características dos ácidos fenólicos identificados neste trabalho tais como o ácido clorogênico, *p*-cumárico, e cafeico (figura 29). Vale ressaltar que o grupo -CH=CH-COOH aumenta a atividade estabilizando os radicais fenóxil desses compostos por ressonância (MATHEW et al., 2015).

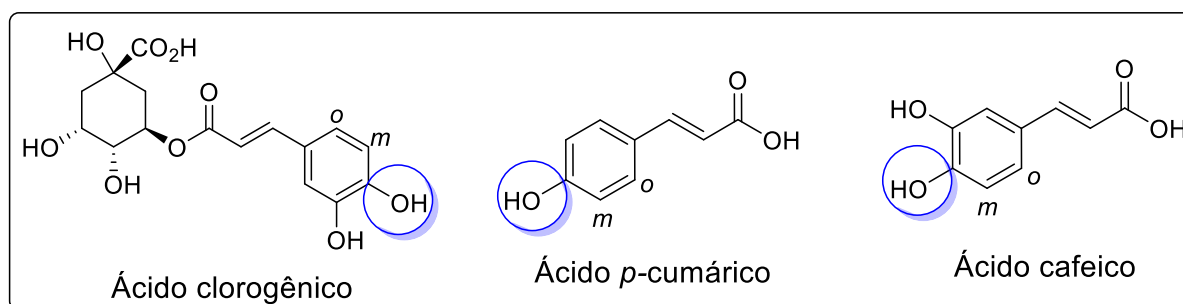


Figura 29. Ácidos fenólicos com grupo hidroxila na posição “*para*”.

É comprovado também que a eficiência antioxidante comparada aos monofenóis é fortemente reforçada pela introdução de uma ou duas metoxilas (-OCH₃) em posição “*orto*” em relação ao grupo hidroxila (PEREIRA et al., 2009), sendo um fator que aumenta a estabilidade do radical fenóxil (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004), como por exemplo, o ácido ferúlico identificado na espécie alvo deste trabalho. Entretanto, a presença de uma segunda hidroxila na posição “*orto*” ou “*para*” também aumenta a AA em relação aos monofenóis, como por exemplo, o ácido caféico, que possui uma ação antioxidante maior do que o ácido ferúlico (MATHEW et al., 2015; CHEN & HO, 1997).

Em relação aos flavonoides, a AA provêm de diversas características estruturais em relação ao protótipo apresentado na figura 30. No anel B do núcleo flavonoídico, a posição “*para*” do grupo hidroxila (C_{4'}) favorece a ação antioxidante, e potencializa a atividade com a presença de um segundo grupo OH no anel B.

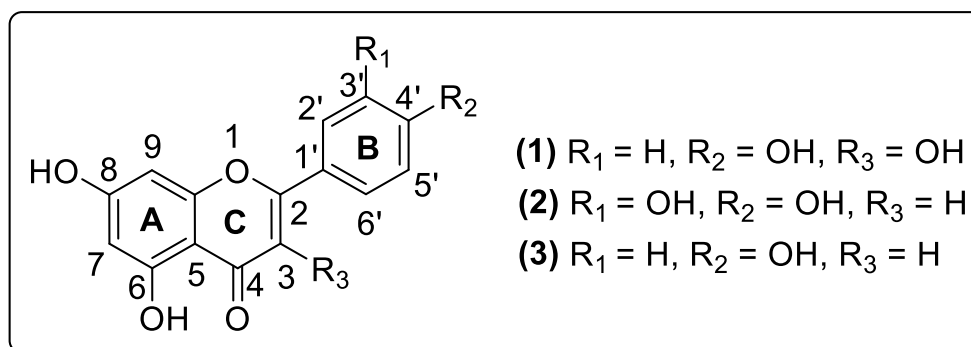


Figura 30. Relação estrutura-atividade antioxidante de flavonol e flavona. Kaempferol (1), luteolina (2), apigenina (3).

Fonte: Adaptado de SCOTTI et al., 2007.

Além da presença da dissstituição hidroxila no anel B (C_{3'} e C_{4'}), a conjugação da dupla ligação C₂-C₃ com o grupo 4-oxo (C₄), no anel C é essencial à AA, como por exemplo, a luteolina (PANNALA et al., 2001). O estudo prévio de Lin e colaboradores (2014) reforça essa justificativa e comprova a melhor AA para a luteolina (IC₅₀ = 0,08 ± 0,02 mg/mL) em relação a apigenina (IC₅₀ = 42,36 ± 0,41 mg/mL), sendo os mesmos flavonoides identificados na espécie estudada deste trabalho.

Outra contribuição para a AA de flavonoides é a presença do grupo hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico C. Além disso, a atividade se torna ainda mais eficiente com a presença de outro grupo hidroxila da posição C_{4'} (PANNALA et al., 2001), como por exemplo, o kaempferol (identificado na espécie alvo). Em relação aos galatos de alquilas identificados na polpa da espécie alvo, a ação antioxidante pode ser atribuída à múltipla substituição hidroxila no anel aromático (MATHEW et al., 2015).

Com isso, os compostos fenólicos identificados e quantificados no extrato, por meio da técnica de UHPLC-MS/MS, corroboram com os resultados obtidos pelos ensaios antioxidantes. Alguns estudos realizados com compostos fenólicos isolados de extratos de frutas descritas na literatura, que são os mesmos presentes no extrato de remela-de-cachorro, tais como o ácido ferúlico (BROINIZI et al., 2007), ácido *p*-cumárico (JAKOBEK et al., 2007; BROINIZI et al., 2007), ácido clorogênico (XI et al., 2017; PALAFOX-CARLOS et al., 2012; MULLEN et al., 2011), apigenina (GANAI, 2017) e kaempferol (NERI-NUMA et al., 2014) apresentaram AA *in vitro*.

Além disso, o ácido caféico, (BENSAQUEM, 2009; SOARES, 2002), galato de propila (SOARES, 2002), galato de etila (KALAIIVANI et al., 2011) e luteolina (SALA et al., 2003) também apresentaram AA em outras amostras vegetais. Com isso, os dados obtidos na análise de UHPLC-MS/MS justificam os resultados da avaliação da capacidade antioxidante do extrato de remela-de-cachorro.

4.5. *Atividade antienzimática (Lipase e α -glicosidase) da remela-de-cachorro*

É sugerido que a inibição de enzimas associadas com síndromes metabólicas, tais como a lipase pancreática e α -glicosidase seja um alvo terapêutico eficiente na regulação da obesidade e diabetes, respectivamente. Os fármacos sintéticos orlistate e acarbose são os mais empregados no tratamento dessas doenças respectivamente, todavia produzem efeitos colaterais adversos (SUN et al., 2017; MOHAMED et al., 2014).

Portanto, a investigação de novas fontes (frutas) contendo agentes inibitórios dessas enzimas ainda se fazem necessárias. A dieta à base de frutas contém quantidades de compostos bioativos que proporcionam benefícios que vão além da nutrição básica e podem reduzir riscos de doenças crônicas (BAENAL, 2015). Com o propósito de se encontrar fontes naturais alternativas que possam auxiliar na prevenção de certas doenças, avaliamos o extrato metanólico da polpa dos frutos da remela-de-cachorro sobre as atividades catalíticas das enzimas lipase e α -glicosidase.

O efeito a partir do extrato da polpa de remela-de-cachorro apresentou baixa porcentagem de inibição total frente a lipase e α -glicosidase (figura 31). Como base nesses baixos percentuais de inibição, não foi possível determinar a atividade inibitória pelo parâmetro do IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da enzima).

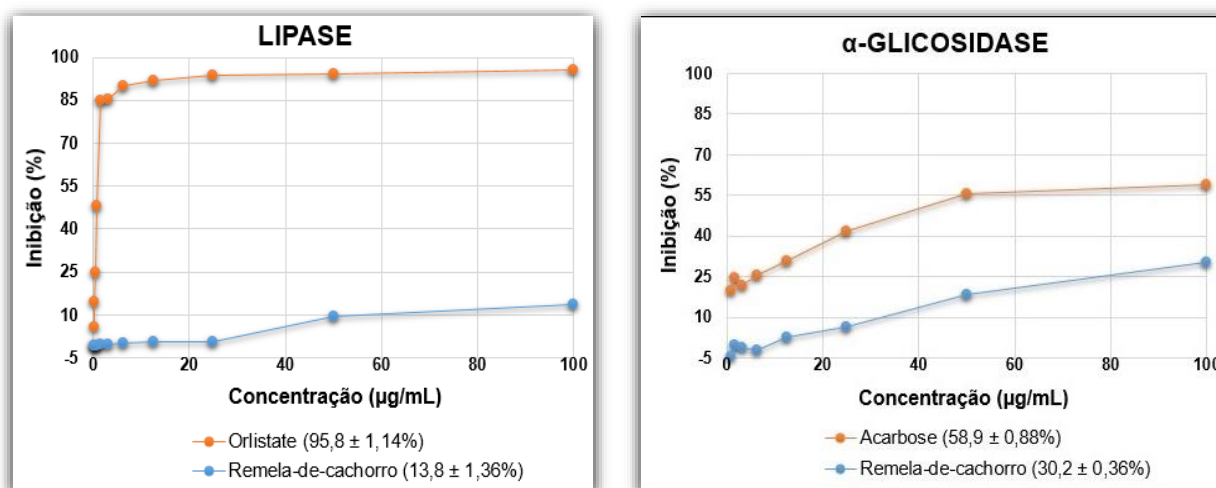


Figura 31. Atividade inibitória da microdiluição do extrato metanólico da remela-de-cachorro (100 - 0,78 µg/mL) comparada com a atividade do orlistate e acarbose (controles positivo) frente as enzimas lipase e α -glicosidase, respectivamente. Dados apresentados com a média \pm desvio padrão das replicatas (n=3).

Alguns estudos mostram que amostras de frutas cultivadas em outros países, tais como o kiwi ($3,2 \pm 0,2$ %), arônia ($4,06 \pm 0,48$ %), groselha ($5,12 \pm 0,13$ %), uva-crispa ($6,28 \pm 0,43$ %) (SOSNOWSKA et al., 2015), jujuba-da-china ($6,6 \pm 1,5$ %), amargoseira ($8,6 \pm 0,8$ %) (ROH e JUNG, 2013) e melão-de-São-Caetano ($10,8 \pm 1,4$ %) (SAHIB et al., 2011) apresentaram percentuais de inibição menores frente a lipase quando comparada com a fruta remela-de-cachorro. Já os frutos do jasmim-da-índia com $11,8 \pm 0,3\%$ (ROH & JUNG, 2013) e groselha-preta com $15,20 \pm 0,79$ % (SOSNOWSKA et al., 2015) exibiram atividade similar a espécie alvo deste trabalho. As frutas banana (19,6 %), noni (35,1 %) e tamarindo (68 %) na concentração de 300 µg/mL apresentaram inibição maior em relação a fruta remela-de-cachorro frente a lipase (ADO et al., 2013). Nesse mesmo estudo a fruta carambola teve inibição máxima (100%) frente a essa enima lipase (ADO et al., 2013).

Vale ressaltar que as amostras de frutas nas quais foram mencionadas acima (com exceção da fruta melão-de-São-Caetano), apresentam concentrações dos extratos maiores em relação ao extrato da remela-de-cachorro.

Para atividade inibitória da enzima α -glicosidase, apenas um estudo relatou percentual de inibição inferior de frutas comparada com a remela-de-cachorro. Os extratos das frutas (50 mg/mL) umê-da-Asia e ameixeira-japonesa exibiram 17,4 % e 8,7 % de inibição frente a α -glicosidase, respectivamente (PARK et al., 2012). Nesse mesmo estudo, o extrato da fruta pêra apresentou atividade inibitória similar (28,3%)

ao da espécie alvo. Entretanto a inibição da enzima α -glicosidase pelo extrato da fruta tomate exibiu 73,9 % de inibição.

Pesquisas publicadas relatam que compostos fenólicos presentes em extratos de frutas são capazes de inibir as enzimas lipase e α -glicosidase (ORQUEDA et al., 2017; YOU et al., 2012). Com base na análise do extrato de remela-de-cachorro pela técnica UHPLC-MS/MS, revelou a presença de alguns compostos fenólicos bioativos que podem estar associados com a inibição dessas enzimas.

Diversos autores relataram o isolamento de compostos fenólicos inibidores de lipase e α -glicosidase a partir de extratos de plantas, os mesmos identificados e quantificados no presente trabalho. Esses compostos relatados na literatura demonstraram inibição frente às enzimas estudadas neste trabalho. Foi previamente comprovado que os ácidos: cafeico (HAN et al., 2007), clorogênico (SUGIYAMA et al., 2007) e *p*-cumárico (MARQUES et al., 2016) isolados de extratos de frutas inibiram a enzima lipase. Também é atestado o potencial inibitório dos compostos fenólicos: ácido ferúlico (SERGENT et al., 2012; MORENO et al., 2006), luteolina e kaempferol (LUNAGARIYA et al., 2014; SERGENT et al., 2012) isolados de partes aéreas de plantas frente a enzima lipase.

Em estudo prévio de Marques et al. (2016) foi comprovado que o ácido *p*-cumárico isolado dos frutos de acerola (*Malpighia emarginata*) é capaz de inibir a enzima α -glicosidase (MARQUES et al., 2016). Outros compostos fenólicos isolados de plantas também são eficientes inibidores de α -glicosidase, tais como: o ácido clorogênico (DALAR et al., 2014), ácido cafeico (ISHIKAWA et al., 2007), ácido ferúlico (JEONG et al., 2012), luteolina, apigenina e kaempferol (LIU et al., 2014).

Outros estudos reforçam a interação dos compostos fenólicos na atividade inibitória dessas enzimas digestivas. O estudo de Dechakhamphu e Wongchum (2015) exibiu uma correlação positiva e significativa entre compostos fenólicos e a atividade de inibição da enzima lipase por meio da avaliação das potencialidades de 28 ervas medicinais tailandesas. Já no estudo de Mai e colaboradores (2007) foram relatadas as relações positivas entre as quantidades de compostos fenólicos, e a atividade inibitória da α -glicosidase do mesmo número plantas comestíveis do Vietnã.

As interações entre esses compostos na matriz de frutos podem contribuir para seus resultados distintos frente a enzimas diferentes (GIRONÉS-VILAPLANA et al., 2014) dependendo também da estrutura de cada composto (RAGHAVENDRA et al., 2007). Desta forma, todos os inibidores não reagem com a mesma frequência. Alguns

compostos podem reagir rapidamente enquanto outros podem ter reatividade mais baixa (RAGHAVENDRA et al., 2007).

Foi proposto que compostos fenólicos podem interagir com aminoácidos hidrofóbicos presentes no sítio ativo de enzimas, ocupando o centro catalítico da enzima para evitar a entrada do substrato e, finalmente, inibir a atividade enzimática (PENG et al., 2016; RAGHAVENDRA et al., 2007). Já o estudo de Tadera e colaboradores (2006) mostrou a eficiência de determinados flavonoides na atividade antienzimática, que são os mesmos compostos identificados anteriormente (com exceção da quercetina). Nesse estudo foi relado que a presença do grupo hidroxila na posição C-3 do esqueleto flavonoídico aumentou a atividade inibitória (quercetina > luteolina; kaempferol > apigenina), e também a presença de mais ou dois grupos hidroxilas presentes no anel B do flavonoide torna a inibição destas enzimas mais eficiente (quercetina > caempferol; luteolina > apigenina) (figura 32).

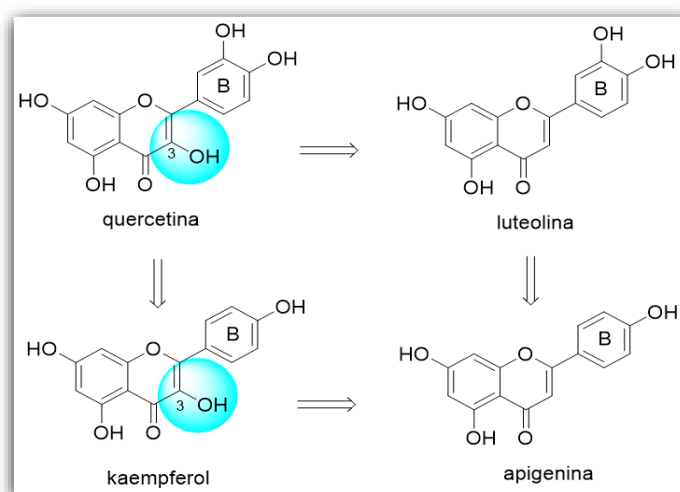


Figura 32. Aumento da atividade inibitória enzimática com base no substituinte (OH) do C-3 do anel flavonoídico (quercetina > luteolina; kaempferol > apigenina) e aumento dos substituintes do anel B (quercetina > kaempferol; luteolina > apigenina).

Desta forma, compostos fenólicos são considerados peças-chave para a inibição dessas enzimas. A baixa atividade de determinados inibidores podem estar associados com o tipo e a concentração do substrato utilizado no ensaio enzimático (OLIVEIRA et al., 2015; SOSNOWSKA et al., 2015).

Vale ressaltar que poucos são os estudos com frutas tropicais brasileiras acerca da atuação sobre a inibição das enzimas lipase e α -glicosidase. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que tais compostos presentes no extrato da espécie estudada são os principais contribuintes para a atividade, ainda que fraca, perante as enzimas testadas

5. CONCLUSÃO

Este trabalho expõe o primeiro relato de uma fruta exótica da região amazônica, ainda pouca explorada, o que evidencia a importância da investigação da composição química de frutas típicas pouco exploradas da região. Por meio da técnica HS-SPME/GC-MS foram identificados um total de 27 compostos orgânicos voláteis a partir da polpa *in natura* da remela-de-cachorro. Constatou-se que os compostos linalol (10,1 %), 1-octen-3-ol (4,42 %), β -ionona (4,08 %) e hexanal (3,05 %) foram os principais contribuintes para o aroma característica da espécie alvo. Foram identificados e quantificados 9 compostos fenólicos por UHPLC-MS/MS. A espécie apresentou alto potencial antioxidante e moderada atividade antienzimática (lipase e α -glicosidase). Além de acrescentar informações da composição química da fruta remela-de-cachorro para posteriores estudos, os resultados precedentes fornecem sua potencialidade como fonte de alimento natural da região amazônica do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M. D.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.
- ABDULLAH, A. H.; MOHAMMED, A. S.; ABDULLAH, R. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Mangifera Indica* Waterlily Kernel and Their Free Radical Scavenging Activity. **Journal of Advanced Agricultural Technologies**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2015.
- ABDULRA'UF, L. B.; HAMMED, W. A. H.; TAN, G. H. SPME Fibers for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 152-161, 2012.
- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D.J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ADO, M. A.; ABAS, F.; MOHAMMED, A. S.; GHAZALI, H. M. Anti- and Pro-Lipase Activity of Selected Medicinal, Herbal and Aquatic Plants, and Structure Elucidation of an Anti-Lipase Compound. **Molecules**, v. 18, p. 14651-14669, 2013.
- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass Spectrometry in Proteomics. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 2, p. 269-296, 2001.
- AGUIAR, M. C. S; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P.; LOPES, P. S. N.; FIDÊNCIO, P. H.; VENTURA, S. J. Volatile compounds from fruits of *Butia capitata* at diferente stages of maturity and storage. **Food Research International**, v. 62, p.1095-1099, 2014.
- AHMED, E. M.; DENNISON, R. A.; DOUGHERTY, R. H.; SHAW, P. E. Flavor and Odor Thresholds in Water of Selected Orange Juice Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 187-191, 1978.
- AL-MUSTAFA, A. H.; AL-THUNIBAT, O. Y. Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 11, n. 3, p. 351-358, 2008.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**. v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, n, 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMENIZ, J.; CARDENAS-VAZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.

ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B. Aroma Volatile Constituents of Brazilian Varieties of Mango Fruit. **Journal of food composition and analysis**, v. 13, p. 27-33, 2000.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARCHELAL, E.; ANTONIA, L. H. D. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão Determination of Phenolic Compounds in Wine: A Review. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

AUDI, G. The history of nuclidic masses and of their evaluation. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 251, p. 85-94, 2006.

BAENAL, R. C. Muito além dos nutrientes: o papel dos fitoquímicos nos alimentos integrais. **Diagnóstico e Tratamento**. v. 20, n. 1, p. 17-21, 2015.

BAGATTOLI, P.CD.; CIPRIANI, D. C.; MARIANO, L. N. B.; CORREA, M.; WAGNER, T. M.; NOLDIN, V. F.; V. FILHO, V.; NIERO, R. Phytochemical, Antioxidant and Anticancer Activities of Extracts of Seven Fruits Found in the Southern Brazilian Flora. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 1, p. 34-40, 2016.

BAI, J.; BALDWIN, E. A.; MCCOLLUM, G.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J. A.; WIDMER, W. W.; GARY LUZIO, G.; CAMERON, R. Changes in Volatile and Non-Volatile Flavor Chemicals of "Valencia" Orange Juice over the Harvest Seasons. **Foods**, v. 5, p.1-17, 2016.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETTO, L. C.O.; MOREIRA, J. J. S.; SANTOS, J. A. B. S.; NARAIN, N.; SANTOS, R. A. R. Characterization and extraction of volatile compounds from pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) processing residues. **Food Science and Technology**. v. 33, n. 4, p. 638-645, 2013.

BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121-127, 2016.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A., EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 18, p. 280-287, 2015.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396-400, 2014.

BATISTON, W. P.; MARUYAMA, S. A.; GOMES, S. T. M.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Total phenolic content and antioxidant capacity of methanolic extracts of ten fruits. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 581-585, 2013.

BEAULIEU, J. C.; LEA, J. M. Characterization and Semiquantitative Analysis of Volatiles in Seedless Watermelon Varieties Using Solid-Phase Microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7789-7793, 2006.

BERGER, R. G. **Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**. Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2007, 648 p.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discov Today**, v. 12, p. 879-889, 2007.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BOONYUEN, C.; WANGKARN, S.; SUNTORNWAT, O.; CHAISUKSANT, R. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Mimosa elengi Fruit Extract. **Kasetsart Journal - Natural Science**. v. 43, p. 21-27, 2009.

BOULANGER, R.; CROUZET, J. Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra* L.): free and bound flavour compounds. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 209-216, 2001.

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

BRASIL. Ministerio da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Alimentos Regionais Brasileiros. Brasília: ministério da Saúde. 2002. 141 p. Disponível em <http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/alimentos_regionais_brasileiros.pdf> Acesso 09 de mai de 2016.

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

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BRUBAKER, W. M.; TUUL, J. Performance Studies of a Quadrupole Mass Filter. **Review of Scientific Instruments**, v. 35, p. 1007-1010, 1964.

BRUCKNER, B.; WYLLIE, G. **Fruit and Vegetable Flavour: Recent Advances and Future Prospects**. Woodhead Publishing Limited: Abington Hall, Cambridge, UK, 2008. 336 p.

BUTKHUP, L.; JEENPHAKDEE, M.; JORJONG, S.; SAMAPPITO, S.; SAMAPPITO, W.; CHOWTIVANNAKUL, S. HS-SPME-GC-MS analysis of volatile aromatic compounds in alcohol related beverages made with mulberry fruits. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 1021–1032, 2011.

BUTTERY, R. G.; SEIFERT, R. M.; GUADAGNI, D. G.; LING, L. C. Characterization of additional volatile components of tomato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 524-529, 1971.

BUTTERY, R. G.; TURNBAUGH, J. G.; LING, L. C. Contribution of Volatiles to Rice Aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 5, 1988 p. 1006- 1009, 1988.

BYSTROMA, L. M.; LEWISA, B. A.; BROWNB, D. L.; RODRIGUEZC, E.; OBENDORFD, R. L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1017-1024, 2008.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313–319, 2015.

CANUTO, K. M.; NETO, M. A. S.; GARRUTI, D. S. Composição química volátil, em diferentes estádios de maturação, de manga 'Tommy atkins' produzida no vale do são Francisco. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2377-2381, 2009.

CAPOBIANGO, M.; MASTELLO, R. B.; CHIN, S. T.; OLIVEIRA, E. S.; CARDEAL, Z. L.; MARRIOTT, P. J. Identification of aroma-active volatiles in banana Terra spirit using multidimensional gas chromatography with simultaneous mass spectrometry and olfactometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 227-235, 2015.

CARIS, P. L.; SMETS, E. F. A floral ontogenetic study on the sister group relationship between the genus *Samolus* (Primulaceae) and the Theophrastaceae. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 5, p. 627-643, 2003.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CEVA-ANTUNES, P. M. N., BIZZO, H. R., SILVA, A. S., CARVALHO, C. P. S., & ANTUNES, O. A. C. Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 436–442, 2006.

CHAKRABORTY, S.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 27, p. 57–68, 2015.

CHEN, J.; CAO, J.; GAO, W.; QI, L. W.; LI, P. Environmentally friendly ionic liquid-in-water microemulsions for extraction of hydrophilic and lipophilic components from *Flos Chrysanthemi*. **Analyst**, v. 138, p. 5933-5941, 2013.

CHEN, G.; CHEN, S.; ZHAO, Y.; LUO, C. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. **Industrial Crops and Products**. v.57, p. 150-157, 2014.

CHEN, G.; ZHANG, X.; CHEN, S.; HAN, M.; GAO, Y. Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China. **Journal of Functional Foods**. v.30, p. 290-302, 2017.

CHEN, J. H.; HO, C. T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v, 45, n. 7, p. 2374-2378, 1997.

CHEN, J. Y, ZHANG, H, MATSUNAGA, R. Rapid determination of the main organic acid composition of raw Japanese apricot fruit juices using near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9652-9657, 2006.

CHENG, L.; XIAO, L.; CHEN, W.; WANG, J.; CHE, F.; WU, B. Identification of compounds characterizing the aroma of oblate-peach fruit during storage by GC-MS. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 3, n. 5, p. 54-62, 2012.

CHEONG, K.W.; TAN, C.P.; MIRHOSSEINI, H.; HAMID, N.S.A.; OSMAN, A.; BASRI, M. Equilibrium headspace analysis of volatile flavour compounds extracted from soursop (*Anona muricata*) using solid phase microextraction. **Food Research International**, v. 43, p. 1267–1276, 2010.

CHERNONOSOV, A. A.; KARPOVA, E. A.; LYAKH, E. M. Identification of phenolic compounds in *Myricaria bracteata* leaves by high-performance liquid chromatography with a diode array detector and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 576–579, 2017.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CLERECI M.T.P.S.; CARVALHO-SILVA L.B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1658-1670, 2011.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: ministério do meio ambiente, 2011. 934 p.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

COSTA, M. P. **Estudo da Atividade Antioxidante de Frutas Tropicais Exóticas sobre Espécies Reativas de Oxigênio de importância Biológica em Ensaio Modelos**. 2010. 129f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, SP, 2010. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87974/costa_mp_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em 20 de Fev. 2017.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DALAR, A.; TÜRKER, M.; ZABARAS, D.; KONCZAK, I. Phenolic Composition, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Eryngium bornmuelleri* leaf. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 30-36, 2014.

DANDONA, P.; THUSU, K.; COOK, S.; SNYDER, B.; MAKOWSKI, J.; ARMSTRONG, D.; NICOTERA, T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 347, n. 8999, p. 444–445, 1996.

DASTMALCHI, K.; DORMAN, H. J. D.; KOŞAR, M.; HILTUNEN, R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 239-248, 2007.

DAVID, J. P.; BRANDÃO, H. N.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M.; BRANCO, A.; AGRA, M. F. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215- 218, 2007.

DAWSON, P. H.; WHETTEN, N. R. Non-linear resonances in quadrupole mass spectrometers due to imperfect fields: II. The quadrupole mass filter and the monopole mass spectrometer. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics**, v. 3, p. 1-12, 1969.

DECHAKHAMPHU, A.; WONGCHUM, N. Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 12, p. 1042-1045, 2015.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. **Medicinal plants of the Guianas** (Guyana, Surinam, French Guiana). Washington, DC: Instituto Smithsonian, 2004. 490 p.

DEFOER, N.; BO, I.; VAN LANGENHOVE, H.; DEWULF, J.; VAN ELST, T. Gas chromatography-mass spectrometry as a tool for estimating odour concentrations of biofilter effluents at aerobic composting and rendering plants. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 259-273, 2002.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**. v. 33, p. 432-455, 2016.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; ROCHA, R. F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. F.; GUMA, F. T. C. R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 23, p. 387-398, 2015.

DENG, G.; LIN, X.; XU, X.; GAO, L.; XIE, J.; LI, H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**. v. 5, p. 260-266, 2013.

DEVANSHU, S.; RAHUL, M.; ANNU, G.; KISHAN, S.; ANROOP, N. Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. **Journal of pharmaceutical and biomedical sciences**. v. 7, n. 1, p. 1-9, 2010.

DEVI, W. R.; SINGH, C. B. Chemical composition, anti-dermatophytic activity, antioxidant and total phenolic content within the leaves essential oil of *Vitex trifolia*. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 1, n. 5, p. 1-6, 2014.

DEY, T. B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN, K. K.; S.; SHARMA, A.; KUHAD, R. C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 60-74, 2016.

DICASTILLO, C. L.; BUSTOS, F.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J. Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 335-344, 2016.

DINDA, B.; KYRIAKOPOULOS, A. M.; DINDA, S.; ZOUMPOURLIS, V.; THOMAIDIS, N. S.; VELEGRAKI, A.; MARKOPOULOS, C.; DINDA, M. *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 193, p. 670-690, 2016.

DÓREA, H. S.; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**, v. 4, n. 7, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J. dos; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EGEA, M. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; LOPEZ, R. Comparative analysis of aroma compounds and sensorial features of strawberry and lemon guavas (*Psidium cattleianum* Sabine). **Food Chemistry**, v. 164, p. 272-277, 2014.

ELKIND, J. L.; WEISS, F. D.; ALFORD, J. M.; LAAKSONEN, R. T.; SMALLEY, R. S. Fourier transform ion cyclotron resonance studies of H₂ chemisorption on niobium cluster cations. **The Journal of Chemical Physics**. v. 88, p. 5215- 5224, 1988.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.12, p. 707-715, 2001.

FAVACHO, H. A. S.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; MEDEIROS, B. J. L.; SOUSA, P. J. C.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p.105-114, 2011.

FENG, J.; YANG, X. W.; WANG, R. F. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 242–247, 2011.

FENN, J. B, MANN, M, MENG, C. K, WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64-71, 1989.

FEUMBA, D. R.; NGANDO, E. G. F.; OBEN, J. E.; MBOFUNG, C. M. F. A phenolic-rich herbal tea from stathmostelma sp. (statroltea) inhibits in vitro pancreatic lipase activity. **Journal of Enzyme Research**, v. 4, n. 1, p. 50-53, 2013.

FIELD MUSEUM. Environmental and conservation Progrms Neotropical Live plants Photos. 2005. Disponível em <<http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/results.asp?genus=Clavija>> Acesso em 17 de Out. 2015.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 10, p. 15-27, 2003.

FLORA OF THE GUIANAS, **Clavija lancifolia**. Disponível em <http://portal.cybertaxonomy.org/flora-guianas/node/1833>. Acesso em 12 de Dez. 2016.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 24, p. 1043-1048, 2011.

FRANCESCATO, L.N.; DEBENEDETTI, S. L.; SCHWANZ, T. G.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. **Talanta**, v. 105, n. 15, p. 192-203, 2013.

FRANCO, R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile Composition of Some Brazilian Fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araca-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) Maria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.

FULLER, G. H., STELTENKAMP, R.; TISSERAND, G. A. The gas chromatograph with human sensor: Perfumer model. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 116, p. 711-724, 1964.

GALLART-AYALA, H.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the analysis of isopropylthioxanthone in packaged food. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 182-188, 2008.

GALVÃO, M. S.; NARAIN, N.; SANTOS, M. S. P.; NUNES, M. L. Volatile compounds and descriptive odor attributes in umbu (*Spondias tuberosa*) fruits during maturation. **Food Research International**. v. 44, n. 7, p. 1919-1926, 2011.

GANAI, S. A. Plant-derived flavone Apigenin: The small-molecule with promising activity against therapeutically resistant prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 85, p. 47-56, 2017.

GARCIA, C. V.; QUEK, S.; STEVENSON, R. J.; WINZ, R. A. Characterisation of bound volatile compounds of a low flavour kiwi fruit species: *Actinidia eriantha*. **Food Chemistry**, v. 134, p. 655-661, 2012.

GARCÍA-MAGAÑA, M. L.; GARCÍA, H. S.; BELLO-PÉREZ, L. A.; SÁYAGO-AYERDI, S. G.; OCA, M. M. Functional Properties and Dietary Fiber Characterization of Mango Processing By-products (*Mangifera indica* L., cv *Ataulfo* and *Tommy Atkins*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 254-258, 2013.

GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 67-69, 2003.

GEÓCZE, K. C.; BARBOSA, L. C. A.; FIDÊNCIO, P. H.; SILVÉRIO, F. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, M. C. A.; ISMAIL, F.M. D. Essential oils from pequi fruits from the Brazilian Cerrado ecosystem. **Food Research International**, v. 54, p. 1-8, 2013.

GIRONÉS-VILAPLANA, A.; BAENAS, N.; VILLAÑO, D.; SPEISKY, H.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D. A. Evaluation of Latin-American fruits rich in

phytochemicals with biological effects. **Journal of Functional Foods**. v. 7, p. 599–608, 2014.

GOFF, S. A.; KLEE, H. J. Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value. **Science**, v. 311, p. 815-819, 2006.

GOMES, F. S. Frutas, legumes e verduras: recomendações técnicas versus constructos sociais. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 6, p. 669-680, 2007.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 170-181, 2013.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S. C; CASTILHO, P. Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSn and antioxidant capacity of leaves, flowers and berries of *Rubus grandifolius* Lowe. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 28-40, 2015.

GRANDTNER, M. M.; CHEVRETTE, J. **Dictionary of Trees, Volume 2: South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology**. 1 ed. Amsterdam: Academic Press, 2013. 1172 p.

GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**. v. 80, n. 15, p. 5678-5683, 2008.

GUERCHE, S.; DAUPHIN, B.; PONS, M.; BLANCARD, D.; DARRIET, P. Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9193-9200, 2006.

GUO, E.; BETA, T. Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals. **Food Research International**, v. 51, p. 518-525, 2013.

HADI, M. A. M.; ZHANG, F.; WU, F.; ZHOU, C.; TAO, J. Advances in Fruit Aroma Volatile Research. **Molecules**. v. 18, p. 8200-8229, 2013.

HAN, L.; LI, WEI.; NARIMATSU, S.; LIU, L.; FU, H.; OKUDA, H.; KOIKE, K. Inhibitory effects of compounds isolated from fruit of *Juglans mandshurica* on pancreatic lipase. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 2, p 184-186, 2007.

HEROD, A. A.; HARRISON, A. G. Bimolecular reactions of ions trapped in an electron space charge. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics**, v. 4, p. 415-431, 1970.

HIGASHI, T.; OGAWA, S. Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI–MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 162, p. 57-69, 2016.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and applications**. 3 ed. Chichester: Wiley, 2007. 502 p.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1378-1384, 2008.

HORNING, E. C., HORNING, M. G., CARROLL, D.; DZIDIC, I.; STILLWELL, R. N. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 936-943, 1973.

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

HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; CONTRERAS-GUTIÉRREZ, P. K.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Merging a sensitive capillary electrophoresis-ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3492-3503, 2013.

IGNAT, I.; VOLF, I. POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

ISLAM, M. S.; BARAKAT, A.; AL-MAJID, A. M.; GHABBOUR, H. A.; MOTIUR RAHMAN, A. F. M.; JAVAID, K.; IMAD, R.; YOUSUF, S.; CHOUDHARY, M. I. A concise synthesis and evaluation of new malonamide derivatives as potential α -glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 1675-1682, 2016.

ISHIKAWA, A.; YAMASHITA, H.; HIEMORI, M.; INAGAKI, E.; KIMOTO, M.; OKAMOTO, M.; TSUJI, H.; MEMON, A. N.; MOHAMMADIO, A.; NATORI, Y. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 2, p.166-173, 2007.

IWAI K, KIM, MY, ONODERA A, MATSUE H. Alpha-glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4588-4592, 2006.

JAKOBEK, L.; SERUGA, M.; NOVAK, I.; MEDVIDOVIC-KOSA, M. Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 103, 369-378, 2007.

JANZANTTI, N. S.; MONTEIRO, M. Changes in the aroma of organic passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) during ripeness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 612-620, 2014.

JAISWAL, R.; MULLER, H.; MULLER, A.; KARAR, M. G. E.; KUHNERT. Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids

from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC–MSⁿ. **Phytochemistry**, v. 108, p. 252-263, 2014.

JAYANTHI, P. D. K.; KEMPRAJ, V.; AURADE, R. M.; VENKATARAMANAPPA, R. K.; NANDAGOPAL, B.; VERGHESE, A.; BRUCE, T. J. Specific volatile compounds from mango elicit oviposition in gravid *Bactrocera dorsalis* females. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 3, p. 259-266, 2014.

JEONG, E.; CHO, K.; LEE, H. α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitors Isolated from *Triticum aestivum* L. Sprouts Eun-Young. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, p. 47–51, 2012.

JEONG, J. Y.; JO, Y. H.; LEE, Y. K.; DO, S.; HWANGA, B. Y.; LEE, M. K. Optimization of pancreatic lipase inhibition by *Cudrania tricuspidata* fruits using response surface methodology. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 10, p. 2329–2333, 2014.

JIANU, C.; MISCA, C.; MUNTEAN, S. G.; GRUIA, A. T. Composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea collina* Becker growing wild in western Romania. **Hemijaska industrija**, v. 69, n. 4, p. 381-386, 2015.

JIMÉNEZ-AGUILAR, D. M.; GRUSAK, M. A. Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of *Amaranthus* leafy vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 33-39, 2017.

JORDÁN, M. J.; TANDOM, K.; SHAW, P. E.; GOODNER, K. L. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4813-4817, 2001.

KALAIVANI, T.; RAJASEKARAN, C.; MATHEW, L. Free radical scavenging, cytotoxic, and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. Ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 144-149, 2011.

KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000.

KAUSHIK, N.; P.; RAO, P. S.; MISHRA, H. N. Process optimization for thermal-assisted high pressure processing of mango (*Mangifera indica* L.) pulp using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 372-381, 2016.

KELEBEK, H. Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 269-274, 2010.

KHAKIMOV, B.; MONGI, R. J.; SORENSEN, K. M.; NDABIKUNZE, B. K.; CHOVE, B. E.; ENGELSEN, S. B. A comprehensive and comparative GC–MS metabolomics study of non-volatiles in Tanzanian grown mango, pineapple, jackfruit, baobab and tamarind fruits. **Food Chemistry**, v. 213, p. 691–699, 2016.

KIVRAK, I.; KIVRAK, S. Antioxidant Properties, Phenolic Profile and Nutritional Value for *Sorbus umbellata* Fruits from Turkey. **Austin Journal of Nutrition and Food Sciences**. v. 2, n. 8, p. 1043, 2014.

KNUDSEN, J. T; STAHL, B. Floral Odours in the Theophrastaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, p. 259-268, 1994.

KOOLEN, H. F. Phenolic and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC–MS/MS and HS-SPME/GC–MS. **Food Research International**. v. 83, p. 87–94, 2016.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 217–233, 2011.

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C., SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467–473, 2013.

KUMAR, A.; CHAUHAN, G. S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 454-459, 2010.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**. v. 1, n. 2, p.35-61, 2009.

LASEKAN, O.; SEE, N. S. Key volatile aroma compounds of three black velvet tamarind (*Dialium*) fruit species. **Food Chemistry**, v. 168, p. 561-565, 2015.

LEE, S.S.; LIN, H. C.; CHEN, C. K. Acylated flavonol monorhamnosides, α -glucosidase inhibitors, from *Machilus philippinensis*, **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2347-2353, 2008.

LEE, P. L.; SWORDS, G.; HUNTER, G. L. K. Volatile constituents of tamarind (*Tamarindus indica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 1195-1199, 1975.

LEKBIR, A.; LOMBARKIA, O. A.; HADDAD, S.; MIZANE, B.; NOUI, Y.; ABDEDDAIM, M.; BAISSISSE, S.; FERHAT, R. Phenolic contents and antioxidant activity of six algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars. **Annals: Food Science and Technology**, v. 15, p. 201-206, 2015.

LI, J.; JIA, S.; YOON, S. J.; LEE, S. J. KWON, S. W.; LEE, J. Ion-pair dispersive liquid-liquid microextraction solidification of floating organic droplets method for the rapid and sensitive detection of phenolic acids in wine samples using liquid chromatography combined with a core-shell particle column. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 73-79, 2016.

LIMA, C. A.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.V.; COHEN, K. O.; GUIMARÃES, T. G.; Características físico-químicas, polifenóis e flavonoides amarelos em frutos de espécies de pitaias comerciais e nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 35, n. 2, p. 565-570, 2013.

LIN, C.; ZHU, C.; HU, M.; WU, A.; BAIRU, Z.; KANGSA, S. Structure-activity relationships of antioxidant activity *in vitro* about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**. v. 3, p. 123-127, 2014.

LIU, X.; SHI, C.; XU, X.; LI, X.; XU, Y.; HUANG, H.; ZHAO, Y.; ZHOU, Y.; SHEN, H.; CHEN, C.; WANG, G. Spatial distributions of β -cyclocitral and β -ionone in the sediment and overlying water of the west shore of Taihu Lake. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 430-438, 2017.

LI, Y.; WANG, Z.; BI, Y.; DING, G.; SHENG, L.; MUSSELMAN, B.; ZHANG, C.; CHENAB, J.; XIAO, W. Direct analysis in real time ionization/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for rapid identification of iridoid glycosides and caffeoylquinic acids in Re Du Ning Injections. **Analytical Methods**, v. 5, p. 7081–7089, 2013.

LIU, X.; ZHU, L.; TAN, J.; ZHOU, X.; XIAO, L.; YANG, X.; WANG, B. Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n.12, p. 1-10, 2014.

LO, Y. C. M.; KOZIEL, J. A.; CAI, L.; HOFF, S. J.; JENKS, W. S.; XIN, H. Simultaneous chemical and sensory characterization of volatile organic compounds and semi-volatile organic compounds emitted from swine manure using solid phase microextraction and multidimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Olfactometry. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 521-534, 2008.

LOEGOL, T. N.; MORRIS, R. E.; MYERS, K. M.; KATILIE, C. J. Analysis of Phenolic Antioxidants in Navy Mobility Fuels by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Energy Fuels**, v. 28, n. 10, p 6267–6274, 2014.

LOIZZO, M. R.; PACETTI, D.; LUCCI, P.; NÚÑEZ, O.; MENICHINI, F.; FREGA, N. G.; TUNDIS, R. *Prunus persica* var. platycarpa (Tabacchiera Peach): Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Pulp, Peel and Seed Ethanolic Extracts. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, p.331-337, 2015.

LOO, J. A.; EDMONDS, C. G.; SMITH, R. D. Tandem mass spectrometry of very large molecules: serum albumin sequence information from multiply charged ions formed by electrospray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 2488-2499, 1991.

LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antioxidant and stability of dragon fruit peel colour. **Agro Food Industry Hi Tech**, v. 24, n. 3, p. 56-58, 2013.

LUNAGARIYA, N. A.; PATEL, N. K.; JAGTAP, S. C.; BHUTANI, K. K. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **EXCLI Journal**, 13, p. 897-921, 2014.

MAATTA, K.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, R. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6736–6744, 2003.

MAHDI, H.; JERNIGAN, A. M.; ALJEBORI, Q.; LOCKHART, D.; LEMI-KEBRIA, M. The Impact of Obesity on the 30-Day Morbidity and Mortality After Surgery for Endometrial Cancer. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 22, n. 1, p. 94-102, 2015.

MAI, T. T.; THU, N. N.; TIEN, P. G.; CHUYEN, N. V. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. **Journal of Nutritional science and vitaminology**, v. 53, n. 3, p. 267-276, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC-Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MALTA, L. G.; GHIRALDINI, F. G.; REIS, R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, L. B.; PASTORE, G. M. *In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, p. 604-611, 2012.

MALTA, L. G.; TESSARO, E. P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G. M.; HAI, R. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**. v. 53, p. 417-425, 2013.

MARCH, R. E.; MIAO, X. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, p. 157-167, 2004.

MARIN, R., APEL, M. A., LIMBERGER, R. P., RASEIRA, M. C. B., PEREIRA, J. F.M., ZUANAZZI, J.A. S. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 172–177, 2008.

MARK, T. D.; DUNN, G. H. **Electron Impact Ionization**. Vienna: Springer Verlag, 1985. 384 p.

MARQUES, T. R.; CAETANO, A. A.; SIMÃO, A. A.; CASTRO, F. C. O.; RAMOS, V. O.; CORRÊA, A. D. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 191-196, 2016.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

MASCATO, D. R. L. H.; MONTEIRO, J. B.; PASSARINHO, M. M.; GALENO, D. M. L.; CRUZ, R. J.; ORTIZ, C.; MORALES, L.; LIMA, E. L.; CARVALHO, R. P. Evaluation of Antioxidant Capacity of *Solanum sessiliflorum* (Cubiu) Extract: An In Vitro Assay. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

MATHEW, S.; ABRAHAM, E. A.; ZAKARIA, Z. A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5790-5798, 2015.

MATSUURA, H.; ASAKAWA, C.; KURIMOTO, M.; MIZUTAN, J. Alpha-glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1576-1578, 2002.

MATYSIAK, J. HAJDUK, J. MAYER, F.; HEBELER, R.; KOKOT, Z. Hyphenated LC–MALDI–ToF/ToF and LC–ESI–QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 121, p. 69-76, 2016.

MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. **Food Chemistry**, v. 115, p. 193–199, 2009.

MCDOUGALL, G. J.; KULKARNI, N. N.; STEWART, D. Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v. 34, n. 1, p. 73-80, 2008.

MCDOUGALL, G. J.; SHPIRO, F.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2760–2766, 2005.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 840-843, 2006.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPONATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 267-287, 2000.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 26, n. 2, p. 211-218, 2004.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MORENO, D. A.; ILIC, N.; POULEV, A.; RASKIN, I. Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. **Life Sciences**, v. 78, p. 2797-803, 2006.

MOSER, B. R. Efficacy of myricetin as an antioxidant in methyl esters of soybean oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 110, p. 1167–1174, 2008.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ELKHAYAT, E. S.; DINE, R. S. Natural anti-obesity agentes. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 52, n. 2, p. 269-284, 2014.

MORRIS, H. R.; PANICO, M.; BARBER, M.; BORDOLI, R. S.; SEDGWICK, R. D.; TYLER, A. Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 101, n. 2, p. 623-31, 1981.

MPHAHLELEA, R. R.; FAWOLEA, O. A.; UMEZURUIKE LINUS OPARA, U. L. Influence of packaging system and long term storage on physiological attributes, biochemical quality, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 140-151, 2016.

MÜHLEN, C. V. Cromatografia gasosa índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente **Scientia Chromatographica**. v. 1, n. 3, p. 21-29, 2009.

MULLEN, W.; NEMZER, B.; OU, B.; STALMACH, A.; HUNTER, J.; CLIFFORD, M. N.; COMBET, E. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3754-3762, 2011.

MUNSON, M. S. B.; FIELD, F. H. Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 12, p. 2621-2630, 1966.

NARAIN, N.; ALMEIDA, J. N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S.; BRITO, E. S. Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* forma *Flavicarpa*) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de *headspace* dinâmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 2, p. 212-216, 2004.

NASU, R.; MIURA, M.; GOMYO, T. Effects of Fruit, Spices and Herbs on a Glucosidase Activity and Glycemic Index. *Food Science and Technology Research*. v. 11, n. 1, p. 77-78, 2005.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; FERREIRA, J. E. M.; MORALES, J. P.; MACHADO, A. R. T.; MALTA, L. G.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M.; Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*). **LWT - Food Science and Technology**. v. 59, p. 1233-1238, 2014.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; MARÓSTICA-JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**. v. 50, p. 70-76, 2013.

NEVES, L. C.; CAMPOS, A. J.; BENEDETTE, R. M.; TOSIN, J.; CHAGAS, E. A. Characterization of the antioxidant capacity of natives fruits from the Brazilian Amazon Region. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 34, n. 4, p. 1165-1173, 2012.

NEVES, L. C.; TOSIN, J. M.; BENEDETTE, R. M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**. v. 174, p. 188-196, 2015.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OBOH, G.; ADEMOSUN, A. O.; AKINLEYE, M.; OMOJOKUN, O. S.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Starch composition, glycemic indices, phenolic constituents, and antioxidative and antidiabetic properties of some common tropical fruits. **Journal of Ethnic Foods**. v. 2, n. 2, p. 64-73, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTI, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-7002, 2009.

OLIVEIRA, B. G.; COSTA, H. B.; VENTURA, J. A.; KONDRATYUK, T. P.; BARROSO, M. E. S.; CORREIA, R. M.; PIMENTEL, E. F.; PINTO, F. E.; ENDRINGER, D. C.; ROMÃO, W. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 204, p. 37-45, 2016.

OLIVEIRA, D. S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R.; PROENÇA, R. P. C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Maringá**, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1. p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, R. F.; GEFERSON ALMEIDA GONÇALVES, G. A. INÁCIO, F. D.; KOEHNLEIN, E. A.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat

(*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. **Nutrients**. v. 7, n. 7, p. 5601-5614, 2015.

OLIVEIRA, L. C. O.; SANTOS, J. A. B.; NARAINI, N.; FONTES, A. S.; CAMPOS, R. S. S.; SOUZA, T. L. Caracterização e extração de compostos voláteis de resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* degener). **Ciência Rural**, v. 42, p. 2280-2287, 2012

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G.; FERREIRA, R. C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, p. 334-344, 2012.

ONG, B. T.; NAZIMAH, S. A. H.; TAN, C. P.; MIRHOSSEINI, H.; OSMAN, A.; D. HASHIM, D. M.; RUSUL, G. Analysis of volatile compounds in five jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) cultivars using solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 416- 422, 2008.

ORQUEDA, M. E.; RIVAS, M.; ZAMPINI, I. C.; ALBERTO, M. R.; TORRES, S.; CUELLO, S.; THOMAS-VALDES, S.; JIMENEZ-ASPEE, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ISLA, M. I. Chemical and functional characterization of seed, pulp and skin powder from chilito (*Solanum betaceum*), an Argentine native fruit. Phenolic fractions affect key enzymes involved in metabolic syndrome and oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 216, p. 70-79, 2017.

PAEPE, D.; SERVAES, K.; NOTEN, B.; DIELS, L.; LOOSE, M.; DROOGENBROECK, B. V.; VOORSPOELS, S. An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 368-375, 2013.

PALAFIX-CARLOS, H.; GIL-CHÁVEZ, J.; SOTELO-MUNDO, R. R.; NAMIESNIK, J.; GORINSTEIN, S.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. **Molecules**. v. 17, p. 12657-12664, 2012.

PANNALA, A. S.; CHAN, S. T.; O'BRIEN, J. P.; RICE-EVANS, A. C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p.1161-1168, 2001.

PARIKH, B.; PATEL, V. H. Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. **Food Science and Human Wellness**. v. 6, p. 10-19, 2017.

PARK, J.; KIM, R.; PARK, E. Antidiabetic Activity of Fruits and Vegetables Commonly Consumed in Korea: Inhibitory Potential against α -Glucosidase and Insulin-like Action in vitro. **Food Science and Biotechnology**. v. 21, n. 4, p. 1187-1193, 2012.

PASQUALOTTO, K. R.; FRIEFERI, H. R. *Diabetes mellitus* e Complicações. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 134-145, 2012.

PEARSON, J. L.; LEE, S.; SURESH, H.; LOW, M.; NANG, M.; SINGH, S.; LAMIN, F.; KAZZEM, M.; SULLIVAN, S.; KHOO, C. S. The Liquid Chromatographic Determination of Chlorogenic and Caffeic Acids in Xu Duan (*Dipsacus asperoides*) Raw Herb. **Analytical Chemistry**, p. 1-6, 2014.

PENG, X.; ZHANG, G.; LIAO, Y.; GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α glucosidase. **Food Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 207-215, 2016.

PENNAZZA, G.; FANALI, C.; SANTONICO, N.; DUGO, L.; CUCCHIARINI, L.; DACHÀ, M.; D'AMICO, A.; COSTA, R.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Electronic nose and GC-MS analysis of volatiles compounds in *Tuber magnatum* Pico: Evaluation of different storage conditions. **Food Chemistry**, v. 136, p. 668-374, 2013.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, p. 2202-2211, 2009.

PEREIRA, L. S.; SANTOS C. D.; PEREIRA, C. A.; SOUZA, S. P. Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 367-372, 2011.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F., RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLORES, S. H. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 19-24, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ- RUBIO, E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, p. 272-285, 2008.

PETROVIC, M.; HERNANDO, M. D.; DIAZ-CRUZ, M. S.; BARCELO, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 1-14, 2005.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINO, J. A.; MARBOT, R. Volatile Flavor Constituents of Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5880-5888, 2001.

PINO, J. A.; MESA, J. Contribution of volatile compounds to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 207-213, 2006.

PONNAPALLI, M. G.; SUKKI, S.; ANNAM, S. C. V. A. R.; ANKIREDDY, M.; TIRUNAGARI, H.; TUNIKI, V. R.; BOBBILI, V. V. P. α -Glucosidase inhibitory monoacylated polyhydroxytriterpenoids from the fruits of *Barringtonia racemosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 1570–1574, 2015.

PROSEN, H.; ZUPANČIČ-KRALJ, L. Solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 272-282, 1999.

PUIGVENTÓS, L.; NAVARRO, M.; ALECHAGA, É.; NÚÑEZ, O.; SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; PUIGNOU, L. Determination of polyphenolic profiles by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the authentication of fruit extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 597-608, 2015.

QADER, K. O.; SALAH, T. F. M.; RASUL, A. A. GC- MS Analysis of Essential Oil Extract from Leaves and Stems of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 7, n. 4, 2017.

QI, M.; ARMSTRONG, D. W. Dicationic ionic liquid stationary phase for GC-MS analysis of volatile compounds in herbal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 4, p. 889-899, 2007.

QIAO, Y.; XIE, B. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; FAN, G.; YAO, X. L.; PAN, S. Y. Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jinchen Sweet Orange Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. **Molecules**, v. 13, p. 1333-1344, 2008.

RAGHAVENDRA, M. P.; KUMAR, P. R.; PRAKASH, V. Mechanism of Inhibition of Rice Bran Lipase by Polyphenols: A Case Study with Chlorogenic Acid and Caffeic Acid. **Food Engineering & Physical Properties**. v. 72, n. 8, p. 412-419, 2007.

RAJAN^a, S.; MAHALAKSHMI, S.; DEEPA, V. M.; SATHYA, K.; SHAJITHA, S.; THIRUNALASUNDARI, T. Antioxidant potentials of *punica granatum* fruit rind extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 82-88, 2011.

RAJAN^b, S.; GOKILA, M.; JENCY, P.; BRINDHA, P.; SUJATHA, K. R. Antioxidant and phytochemical properties of *Aegle marmelos* fruit pulp. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, 65-70, 2011.

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

RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. A.; BRUGINSKI, E. R. D.; LIMA, E. S.; CAMPOS, F. R.; MACHADO, M. B. Chemical characterization and antioxidant capacity of the araçá-pera (*Psidium acutangulum*): An exotic Amazon fruit. **Food Research International**, v. 75, p. 315–327, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation

decolorization assay. **Free Radical Biological Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

RIU-AUMATELL, M., CASTELLARI, M., LÓPEZ-TAMAMES, E., GALASSI, S., BUXADEIRAS, S. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. **Food Chemistry**, v. 87, p. 627-637, 2004.

RIZZOLO, A.; GRASSI, M.; ZERBINI, P. E. Influence of harvest date on ripening and volatile compounds in the scab-resistant apple cultivar 'Golden Orange'. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 81, p. 681-690, 2006.

RODRIGUES, E.; POERNER, N.; ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; MENDES, C. R.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 911-917, 2011.

RODRIGUES, E. T.; PARDAL, M. A.; SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; ALPENDURADA, M. F. A single-step pesticide extraction and clean-up multi-residue analytical method by selective pressurized liquid extraction followed by on-line solid phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for complex matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1452, p.10-17, 2016.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROH, C.; JUNG, U. Screening of Crude Plant Extracts with Anti-Obesity Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 1710-1719, 2013.

ROHMAN, A.; RIYANTO, S.; YUNIARTI, N.; SAPUTRA, W. R.; UTAMI, R.; MULATSIH, W. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). **International Food Research Journal**, v. 17, p. 97-106, 2010.

ROJAS, R.; CAVIEDES, L.; APONTE, J. C.; VAISBERG, A. J.; LEWIS, W. H.; LAMAS, G.; SARASARA, C.; GILMAN, R. H.; HAMMOND, G. B. Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 845-856, 2006.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. D.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of

18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, p. 996–1002, 2010.

RYASON, P. R. Shock tube TOF mass spectrometer apparatus with cryosorption pumping: **Review of Scientific Instruments**, v. 38, p. 607-611, 1967.

SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SALA, A.; RECIO, M. C.; SCHINELLA, G. R.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; CERDA-NICOLAS, M.; RIOS, J. L; Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **European Journal of Pharmacology**. v. 461, p. 53-61, 2003.

SAHIB, N. G.; HAMID, A. A.; KITTS, D.; PURNAMA, M.; SAARI, N.; ABAS, F. The effects of morinda citrifolia, momordica charantia and centella asiatica extracts on lipoprotein lipase and 3t3-l1 preadipocytes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1186-1205, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANDÍN-ESPAÑA, P.; MATEO-MIRANDA, M.; LÓPEZ-GOTI, C.; CAL, A.; ALONSO-PRADOS, J. L. Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC–ESI-MS. **Food Chemistry**, v. 191, p. 268-273, 2016.

SANTANA, K. L.; GALVÃO, M. S.; JESUS, M. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. HS-SPME optimization and extraction of volatile compounds from soursop (*Annona muricata* L.) pulp with emphasis on their characteristic impact compounds. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 250-260, 2016.

SANTOS, M. H. S.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**. v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SARIKURKCU, C.; TEPE, B.; DAFERA, D.; POLISSIOU, M.; HARMANDAR, M. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4239-4246, 2008.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A.; STANISLAS, G.; DOURAGUIA, E.; GONTHIER, M. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island. **Food Chemistry**. v. 212, p. 225–233, 2016.

SEQUEDA-CASTAÑEDA, L. G.; BARRERA-BUGALLO, A. R.; CELIS, C.; IGLESIAS, J. I.; MORALES, L. Evaluation of antioxidant and cytotoxic activity of extracts from fruits in fibroblastoma HT1080 cell lines: four fruits with commercial potential in Colombia. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v. 28, n. 2, p. 143-151, 2016.

SERGEN, T.; VANDERSTRAETEN, J.; WINAND, J.; BEGUIN, P.; SCHNEIDER, Y. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 68-73, 2012.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**. v. 42, p. 556-564, 2013.

SHALIT, M.; KATZIR, N.; TADMOR, Y.; LARKOV, O.; BURGER, Y.; SHALEKHET, F.; LASTOCHKIN, E.; RAVID, U.; AMAR, O.; EDELSTEIN, M.; KARCHI, Z.; LEWINSOHN, E. Acetyl-CoA: Alcohol Acetyltransferase Activity and Aroma Formation in Ripening Melon Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 794-799, 2001.

SHARMA, K. S. Mass spectrometry -The early years. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.3-4, p. 349-350, 2013.

SHARMA, P. B.; HANDIQUE, P. J.; DEVI, H. S. Antioxidant properties, physico-chemical characteristics and proximate composition of five wild fruits of Manipur, India. **Journal of Food Science and Technology** v. 52, n. 2, p. 894-902, 2015.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F. O.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**. v. 101, p. 1012-1018, 2007.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Brasil: Ltc, 2006. 508 p.

SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **Food Science and Technology**. v. 65, p. 1025-1030, 2016.

SINGLETON, V. L, ROSSI JR, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Americal Journal of Enology Viticulture**, v. 16, p. 144, 1965.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 449-461, 2013.

SKOGG, Douglas A. **Fundamentos de Química analítica**. 8 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 1026 p.

SKYFIELD TROPICAL. **The fruits of western Ecuador**. Disponível em <<https://www.skyfieldtropical.com/blog/into-ecuador/>> Acesso em 11 de set. 2016.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANES, D., STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 6, p. 874-877, 2009.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, J. Flavour volatile production and regulation in apple fruit. **Stewart Postharvest Review**. v. 2, p. 1-8, 2007.

SOSNOWSKA, D.; PODSEDEK, A.; REDZYNIA, M.; ZYZELEWICZ, D. Effects of Fruit Extracts on Pancreatic Lipase Activity in Lipid Emulsions. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, p. 344-350, 2015.

SOUSA, C. M. M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR. G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 14, n.3, p. 202-210, 2011.

SOUZA-SILVA, E. A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236-248, 2015.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**. v. 134, p. 381-386, 2012.

SOUZA, M. P.; BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; PAZ, W. H. P.; NOBRE, T. A.; MARINHO, J. V. N.; SALVADOR, M. J.; FIDELIS, C. H. V.; ACHO, L. D. R.; SOUZA, A. D. L.; NUNOMURA, R. C. S.; EBERLIN, M. N.; LIMA, E. S.;

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 643-648, 2012.

SRIPAKDEE, T.; SRIWICHA, A.; JANSAM, N.; MAHACHAI, R.; CHANTHAI, S. Determination of total phenolics and ascorbic acid related to an antioxidant activity and thermal stability of the Mao fruit juice. **International Food Research Journal**. v. 22, n. 2. p. 618-624, 2015.

STAHL, B. Three new species of *Clavija* (Theophrastaceae). **Novon**, v. 5, n. 4, p. 370-374, 1995.

STAHL, B. Two new species of *Clavija* (Theophrastaceae) from NW South America. **Nordic Journal of Botany** .v. 6, n. 6, p. 769-772, 1986.

STEINGASS, C. B.; GRAUWET, T.; CARLE, R. Influence of harvest maturity and fruit logistics on pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) volatiles assessed by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS). **Food Chemistry**, v. 150, p. 382–391, 2014.

STOJILJKOVICA, D.; ARSICB, I.; TADIC, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 165–176, 2016.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. B. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v.14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUGIYAMA, H.; AKAZOME, Y.; SHOJI, T.; YAMAGUCHI, A.; YASUE, M.; KANDA, T.; OHTAKE, Y. Oligomeric Procyanidins in Apple Polyphenol Are Main Active Components for Inhibition of Pancreatic Lipase and Triglyceride Absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 4604-4609, 2007.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X, LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7449–7454, 2002.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2007.

SUN, W.; SANG, Y.; ZHANG, B.; YU, X.; XU, Q.; XIU, Z.; DONG, Y. Synergistic effects of acarbose and an *Oroxylum indicum* seed extract in streptozotocin and high-fat-diet induced prediabetic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 160-170, 2017.

SVECOVA, B.; BORDOVSKA, M.; KALVACHOVÁ, D.; HAJEK, T. Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 80-88, 2015.

SZABO, M.R.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**, v. 61, n. 3, p. 214–216, 2007.

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, p. 149-153, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 643p.

TAKEOKA, G. R.; BUTTERY, R. G.; FLATH, R. A. Volatile Constituents of Asian Pear (*Pyrus serotina*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1925-1929, 1992.

TAUCHEN, J.; BORTL, L.; HUML, L.; PETRA MIKSATKOVA, P.; DOSKOCIL, I.; MARIK, P.; VILLEGAS, P. P. P.; FLORES, Y. B.; DAMME, P. V.; LOJKA, B.; HAVLIK, J.; LAPCIK, O.; KOKOSKA, L. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, p. 728–737, 2016.

TAYLOR, P.; ARSENAK, M.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, A.; MILANO, B.; GONTO, R.; RUIZ, M. C; FRAILE, S.; TAYLOR, S.; ESTRADA, O.; MICHELANGELI, F. Screening of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Cytostatic and Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 4, p. 530–539, 2013.

TERRES, N. G.; PINHEIRO, R. T.; HORTA, B. L.; PINHEIRO, K. A. T.; HORTA, L. L. Prevalência e fatores associados ao sobrepeso e à obesidade em adolescentes. **Revista de Saúde Pública**. v. 40, n. 4. p. 627-633, 2006.

THAIPONGA, K.; BOONPRAKOKA, U.; CROSBYB, K.; CISNEROS-ZEVALLOSC, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. p. 669–675, 2006.

THE PLANT LIST. A working list of all plant species. 2013. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=clavija>> Acesso 23 de Jan. 2016.

THOMSON, J. J. Rays of Positive Electricity. **Proceedings of the Royal Society of London A**. v. 89, n. 607, p. 1-20, 1913.

TLILI, N.; MEJRI, H.; YAHIA, Y.; SAADAOU, E.; REJEB, S.; KHALDI, A.; NASRI, N. Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartita* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 160, p. 98–103, 2014.

TOKUSOGLU, O.; UNAL, M. K.; YILDIRIM, Z. HPLC–UV and GC–MS characterization of the flavonol aglycons quercetin, kaempferol, and myricetin in tomato pastes and other tomato-based products. **Acta chromatographica**, n. 13, p. 196-207, 2003.

TROALEN, L. G.; PHILLIPS, A. S.; PEGGIE, D. A.; BARRAN, P. E.; HULME, A. N. Historical textile dyeing with *Genista tinctoria* L.: a comprehensive study by UPLC-MS/MS analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8915-8923, 2014.

UEKANE, T. M.; NICOLOTTI, L.; GRIGLIONE, A.; BIZZO, H. R.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; REZENDE, C. M. Studies on the volatile fraction composition of three native Amazonian-Brazilian fruits: Murici (*Byrsonima crassifolia* L., Malpighiaceae), bacuri (*Platonia insignis* M., Clusiaceae), and sapodilla (*Manilkara sapota* L., Sapotaceae). **Food Chemistry**, v. 219, p. 13–22, 2017.

VALDENEGRO, M., S. ALMONACID, C. HENRIQUEZ, M. LUTZ, L. FUENTES, AND R. SIMPSON. The effects of drying processes on organoleptic characteristics and the health quality of food ingredients obtained from goldenberry fruits (*Physalis peruviana*). **Open Access Scientific Reports**, v. 2, p. 1-7. 2013.

VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 233–254, 2004.

VIEIRA, L. M; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**. . v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

VILLATORO, C.; ALTISENT, R.; ECHEVERRÍA, G.; GRAELL, J.; LÓPEZ, M. L.; LARA, I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of 'Pink Lady[®]' apples. **Postharvest Biology and Technology**. v. 47, p. 286–295, 2008.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 974-980, 2005.

WANA, C.; YUANA, T.; CIRELLOA, A. L.; SEERAM, N. P. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbushblueberry flowers. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1929-1937, 2012.

WANSI, J. D.; LALLEMAND, M.C.; CHIOZEM, D. D.; TOZE, F. A. A.; MBAZE, L. M.; NAHARKHAN, S.; IQBAL, M.C.; TILLEQUIN, F.; WANDJI, J.; FOMUM, Z. T. α -Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2096-2100, 2007.

WEIGLE, D. S. Pharmacological therapy of obesity: past, present, and future. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 2462-2469, 2003.

WILLEMS, J. L.; SAEID, W. M.; PURVES, R. W.; KATSELIS, G.; LOW, N. H.; EL-ANEED, A. Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion

mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, V. 933, p. 164-174, 2016.

WILSON, C. W. SHAW, P. E.; KNIGHT JR, R. J.; NAGY, S.; KLIM, M. Volatile Constituents of Carambola (*Averrhoa carambola* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p.199-201, 1985.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

WU, Y.; DUAN, S.; ZHAO, L.; GAO, Z.; LUO, M.; SONG, S.; XU, W.; ZHANG, C.; MA, C.; WANG, S. Aroma characterization based on aromatic series analysis in table grapes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 31116, p. 1-16, 2016.

WU, Z.; MA, X.; FANG, D.; QI, H.; RENA, W.; ZHANG, G. Analysis of caffeic acid derivatives from *Osmanthus yunnanensis* using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 15, p. 415-429, 2009.

XI, Y.; FAN, X.; ZHAO, H.; LI, X.; CAO, J.; JIANG, W. Postharvest fruit quality and antioxidants of nectarine fruit as influenced by chlorogenic acid. **LWT - Food Science and Technology**. v. 75, p. 537-544, 2017.

XI, W.; LU, J.; QUN, J.; JIAO, B. Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1108-1118, 2017.

YANG, D.; XIE, H.; JIANG, Y.; WEI, X. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. **Food Chemistry**. v. 194, p. 857–863, 2016.

YOU, Q.; CHEN, F.; WANG, X.; JIANG, Y.; LIN, S. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. **Food Science and Technology**. v. 46, p. 164-168, 2012.

YOUNG, L. M.; SAUNDERS, J. C.; MAHOOD, R. A.; REVILL, C. H.; FOSTER, R. J.; ASCROFT, A. E.; RADFORD, S. E. ESI-IMS–MS: A method for rapid analysis of **protein** aggregation and its inhibition by small molecules. **Methods**, v. 95, p. 62-69, 2016.

YUAN, B.; LI, F.; XU, D.; FU, M. L. Comparison of two methods for the determination of geosmin and 2-methylisoborneol in algae samples by stable isotope dilution assay through purge-and-trap or headspace solid-phase microextraction combined with GC/MS. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1739–1746, 2013.

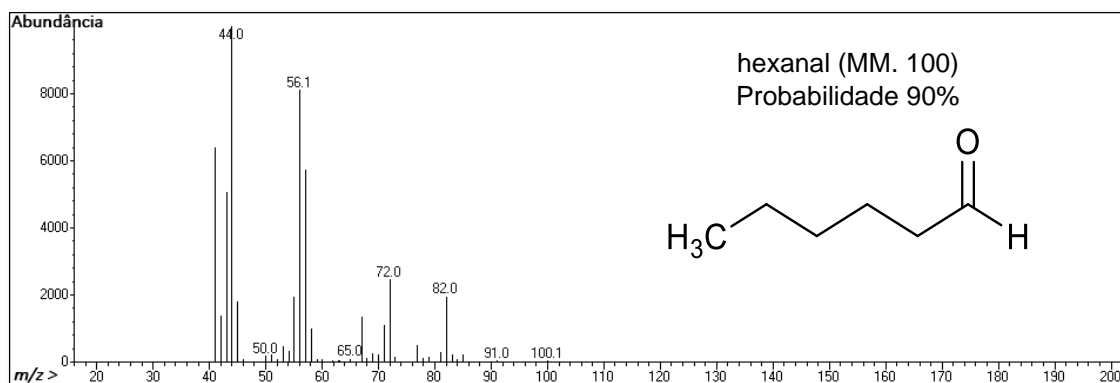
ZHAO, H. X.; ZHANG, H. S.; YANG, S. F. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. **Food Science and Human Wellness**. v. 3, p. 183–190, 2014.

ZHU, J.; CHEN, F.; WANG, L.; NIU, Y.; XIAO, Z.; Evaluation of the synergism among volatile compounds in Oolong tea infusion by odour threshold with sensory analysis and E-nose. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1484-1490, 2017.

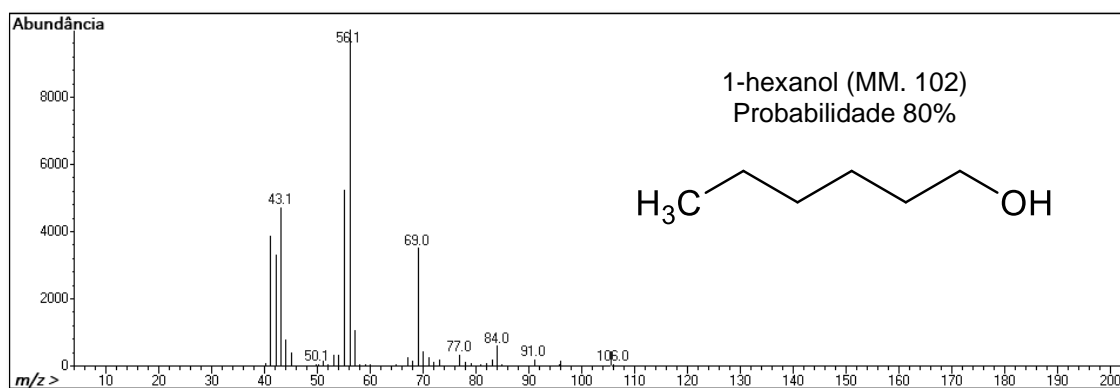
APÊNDICE

1. Espectro de massas dos 27 compostos voláteis identificados da espécie alvo

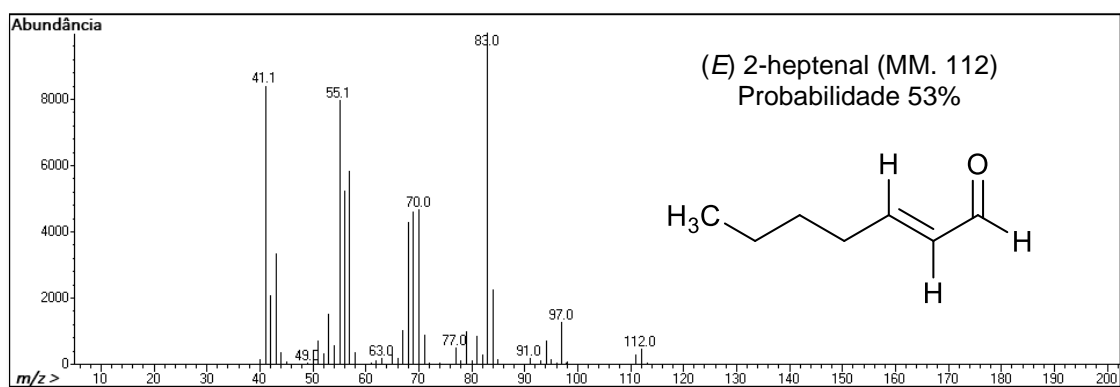
Pico 1



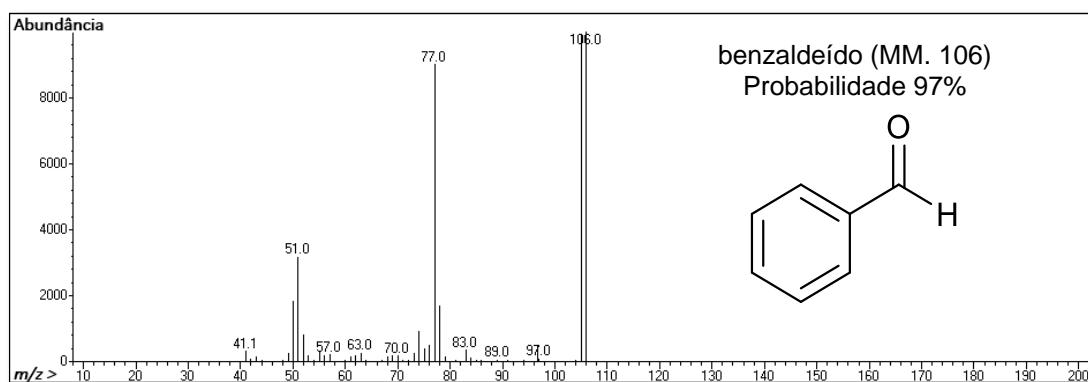
Pico 2



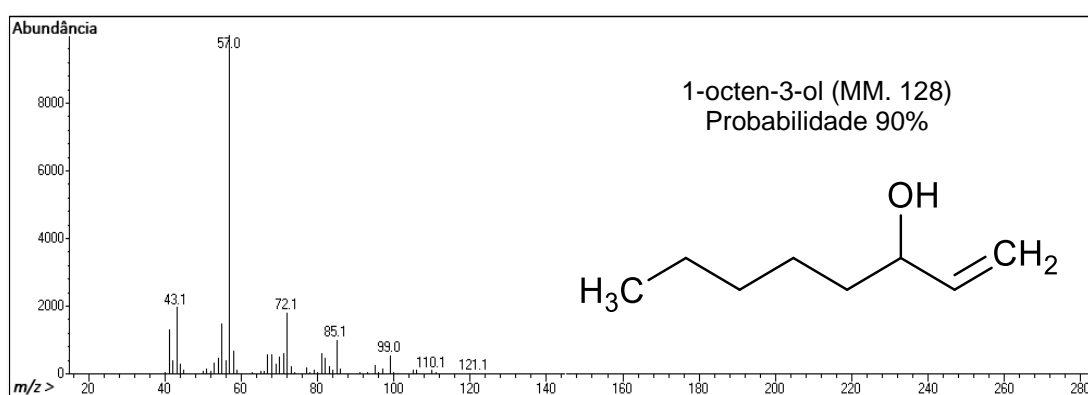
Pico 3



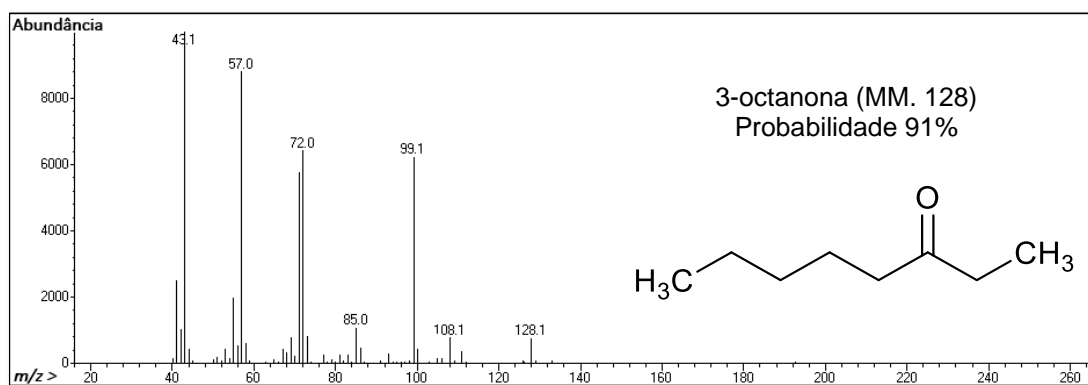
Pico 4



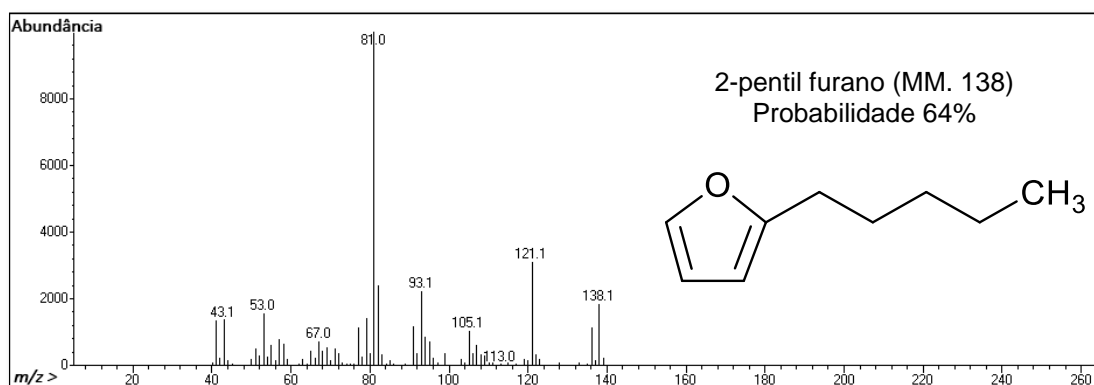
Pico 5



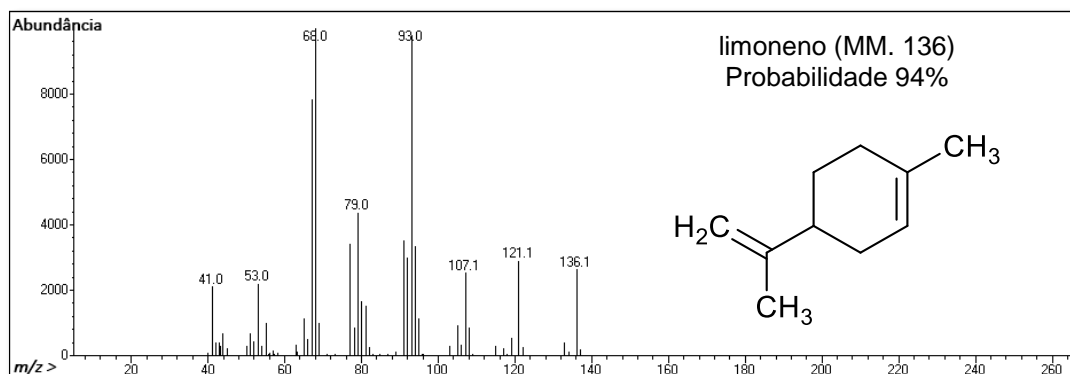
Pico 6



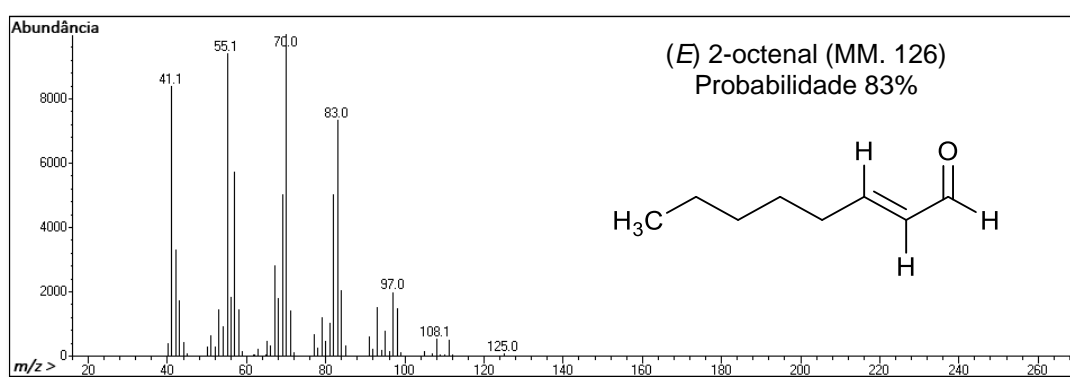
Pico 7



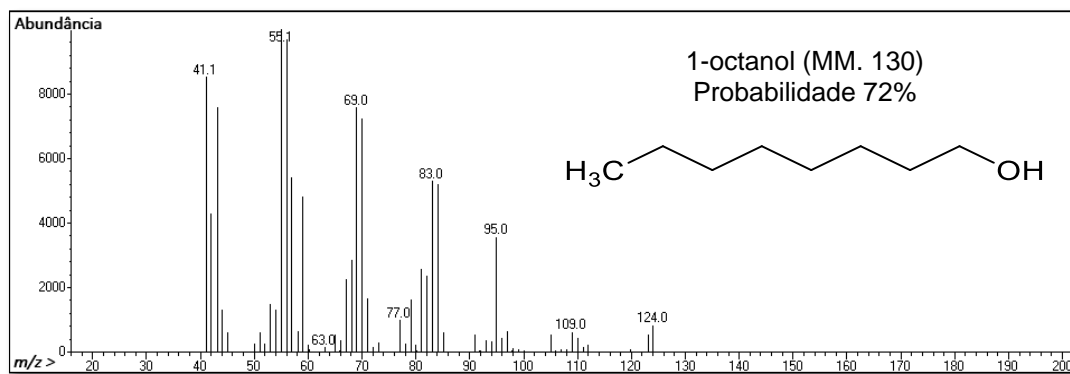
Pico 8



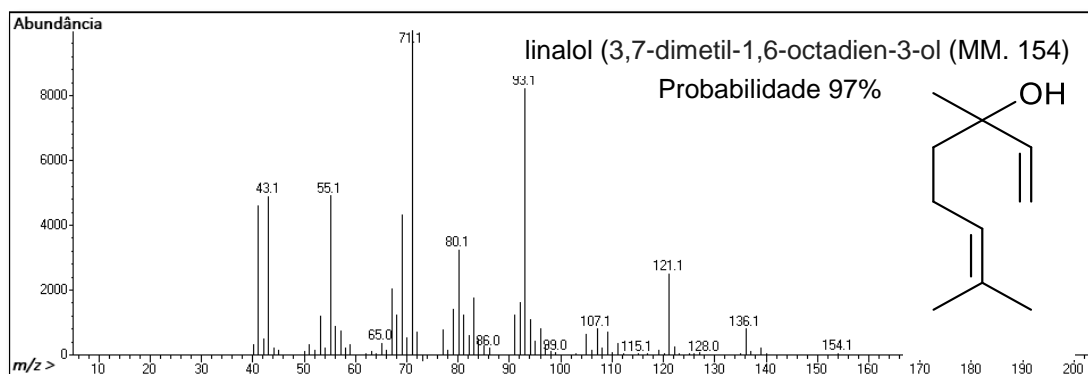
Pico 9



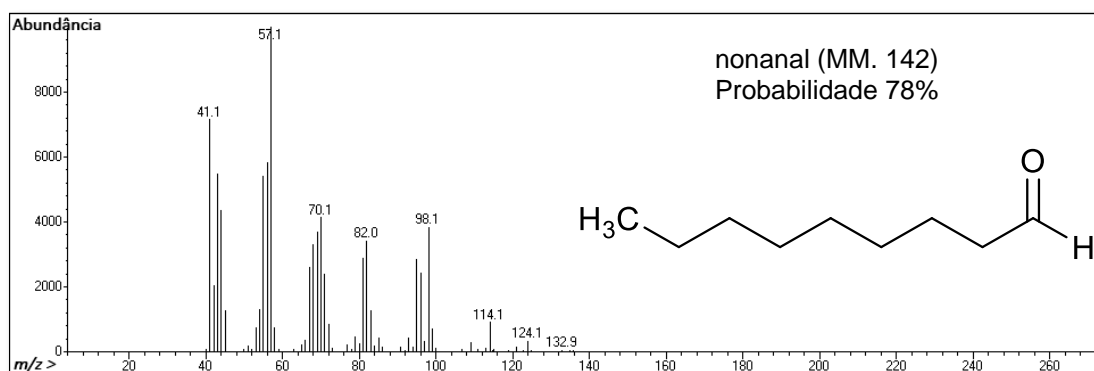
Pico 10



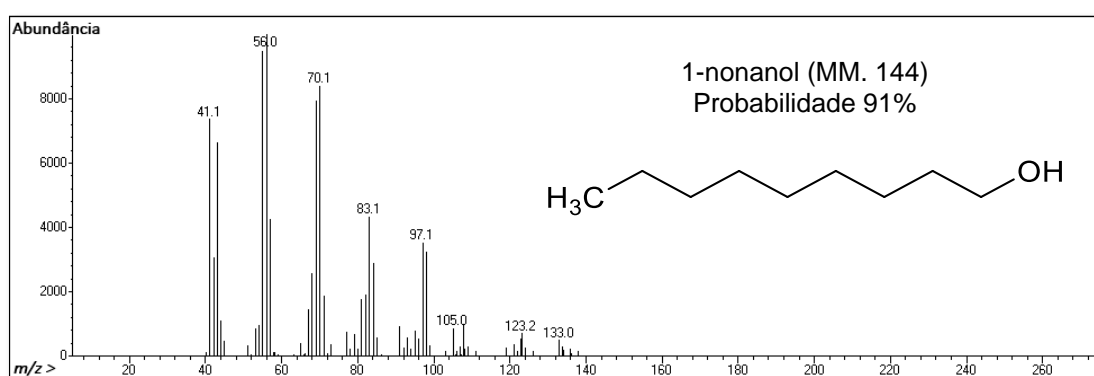
Pico 11



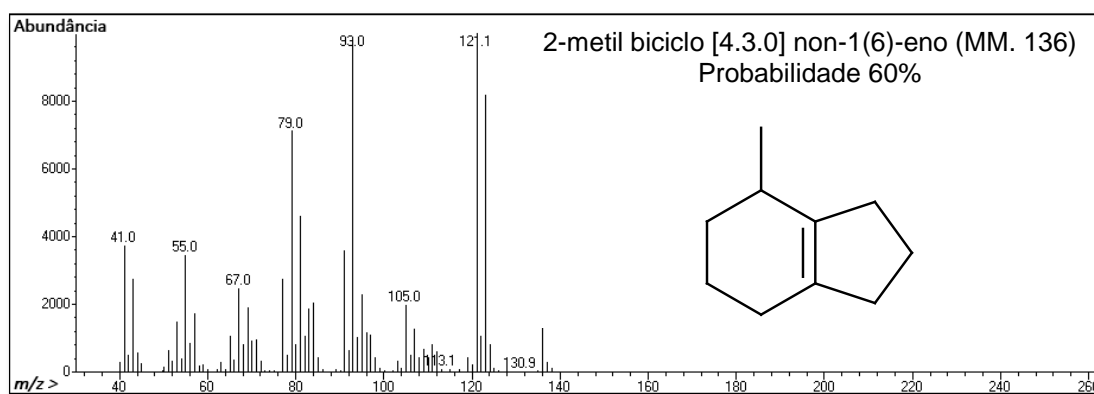
Pico 12



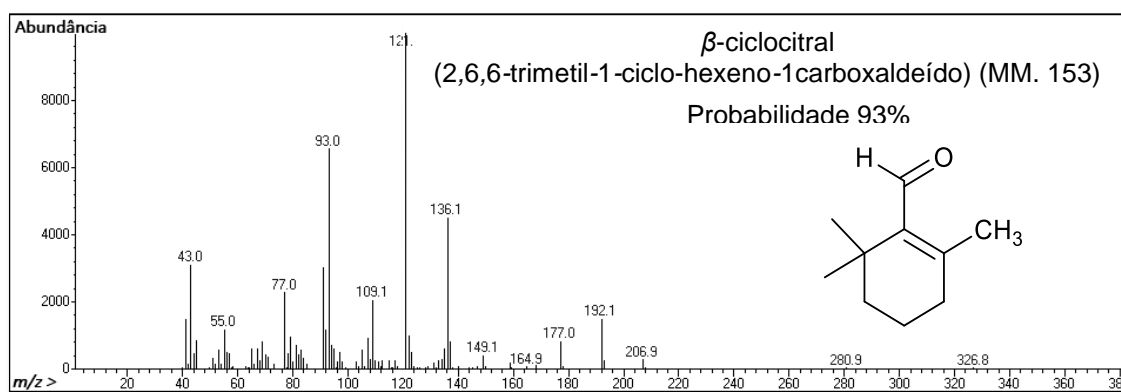
Pico 13



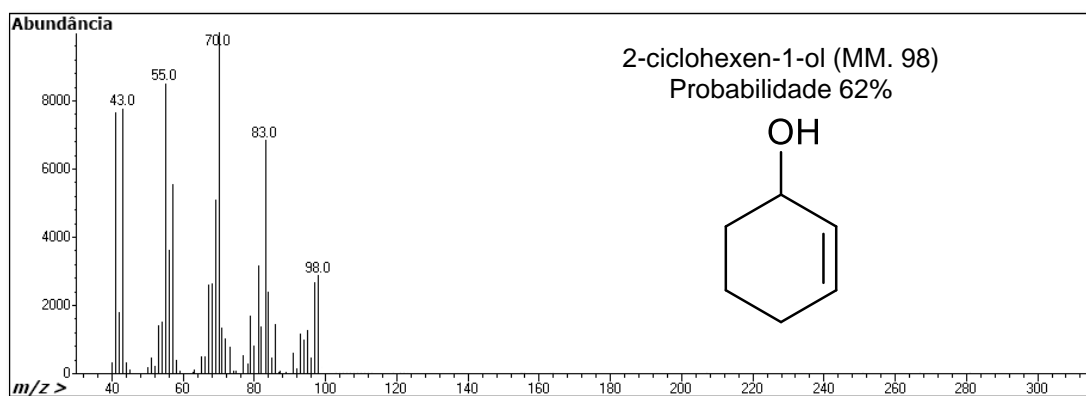
Pico 14



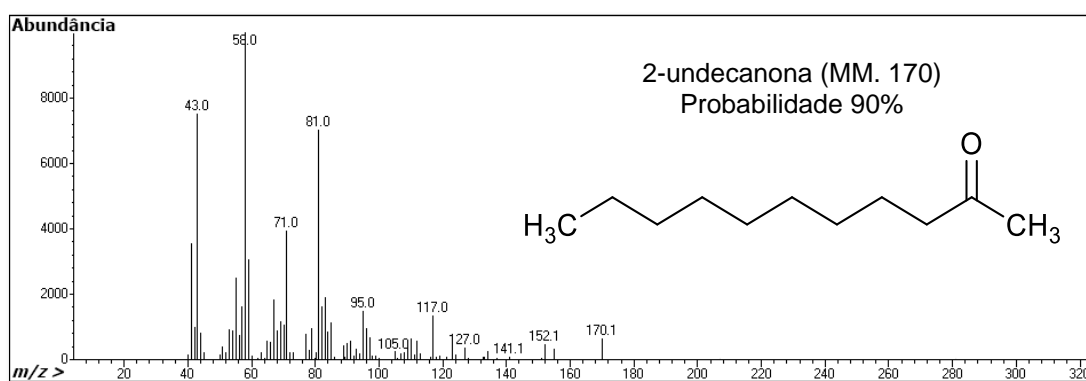
Pico 15



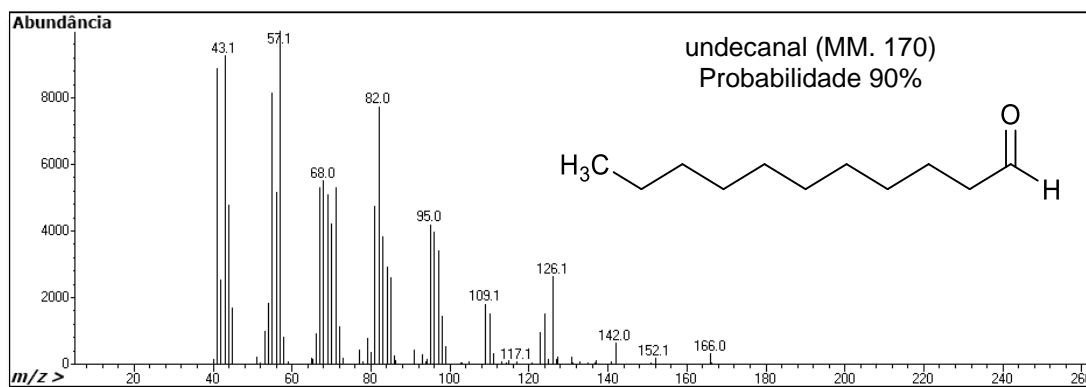
Pico 16



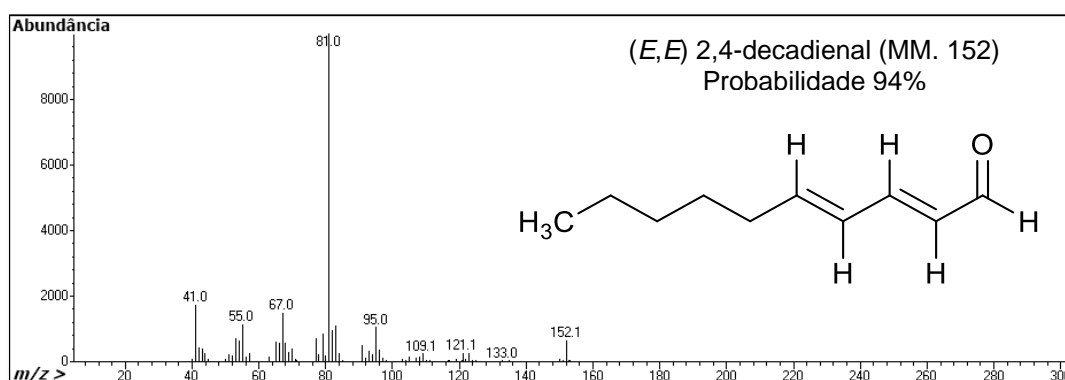
Pico 17



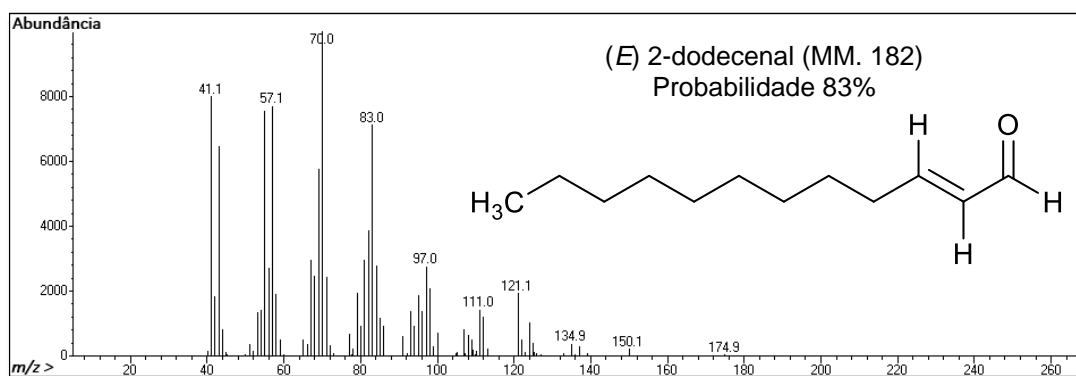
Pico 18



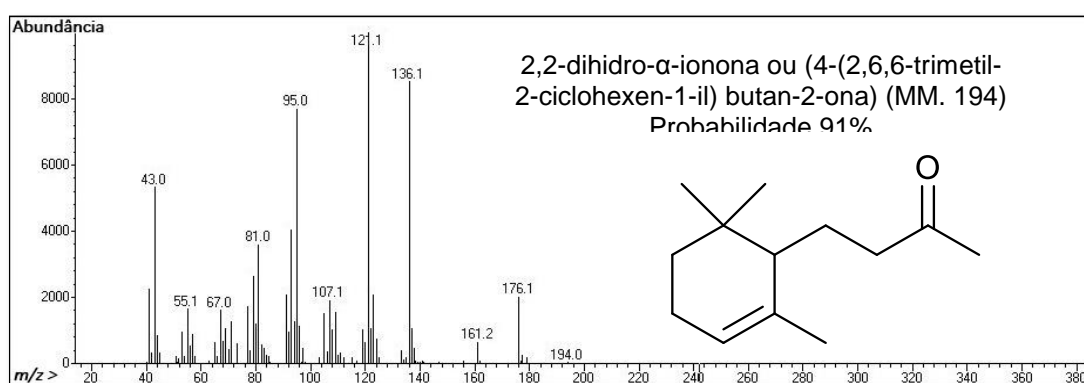
Pico 19



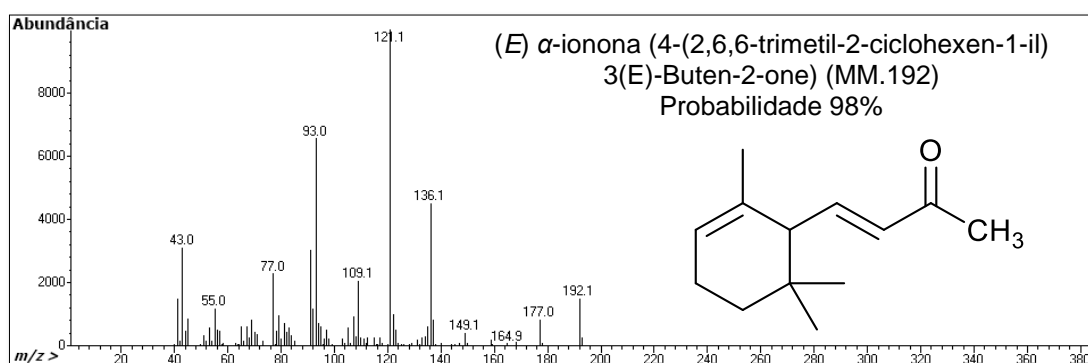
Pico 20



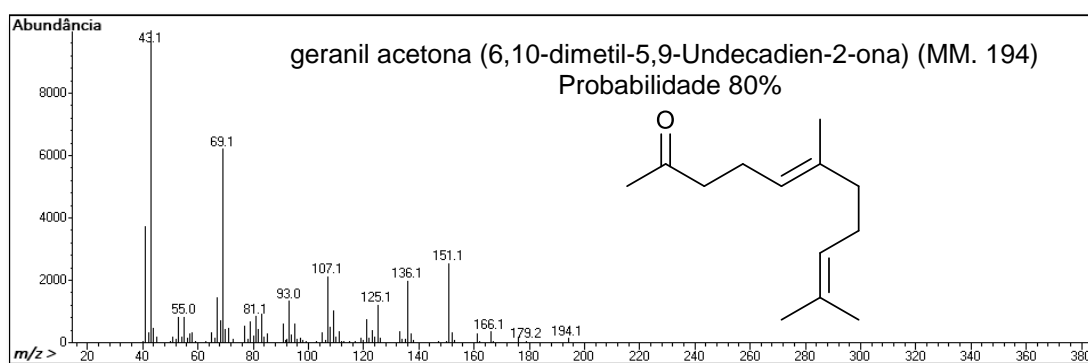
Pico 21



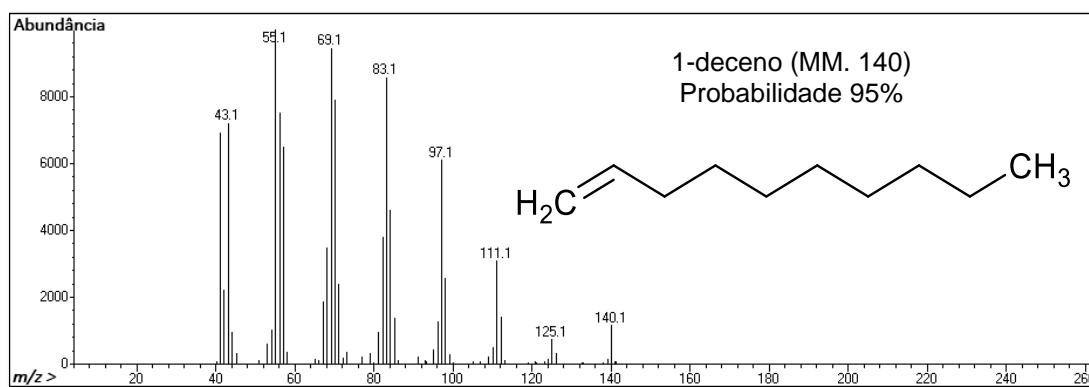
Pico 22



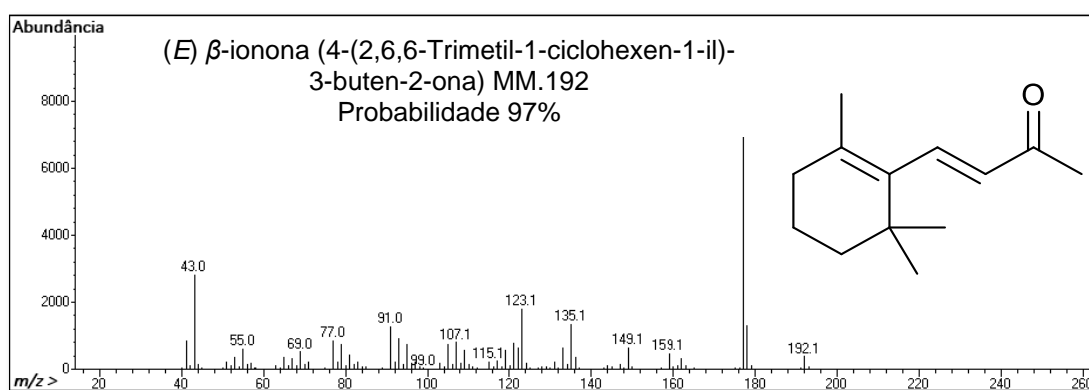
Pico 23



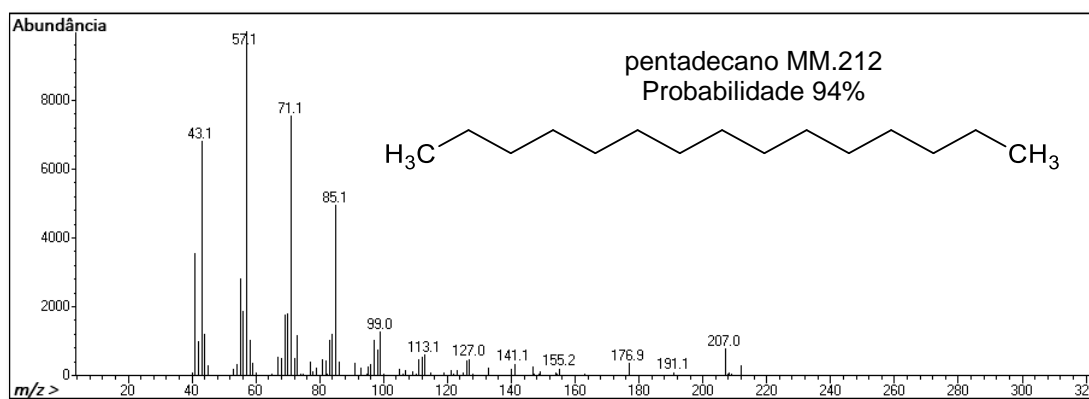
Pico 24



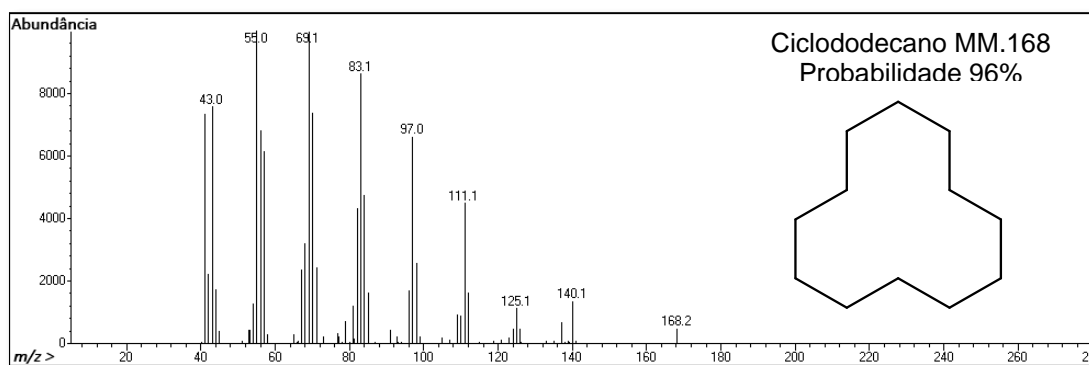
Pico 25



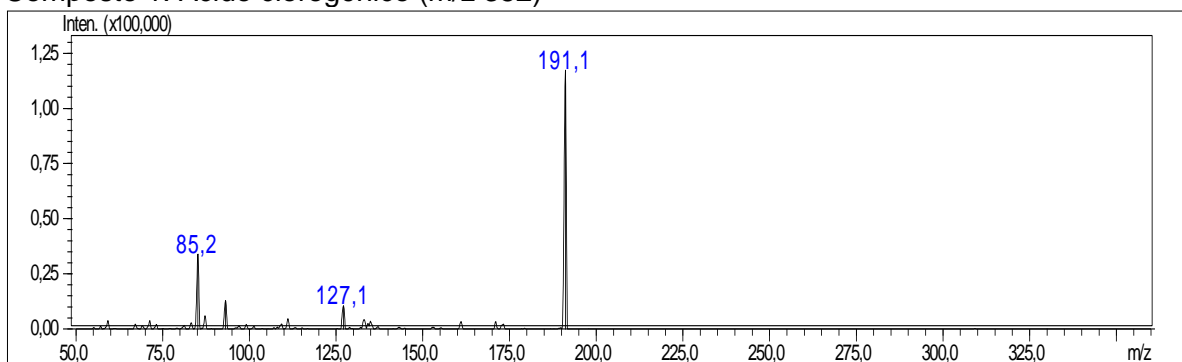
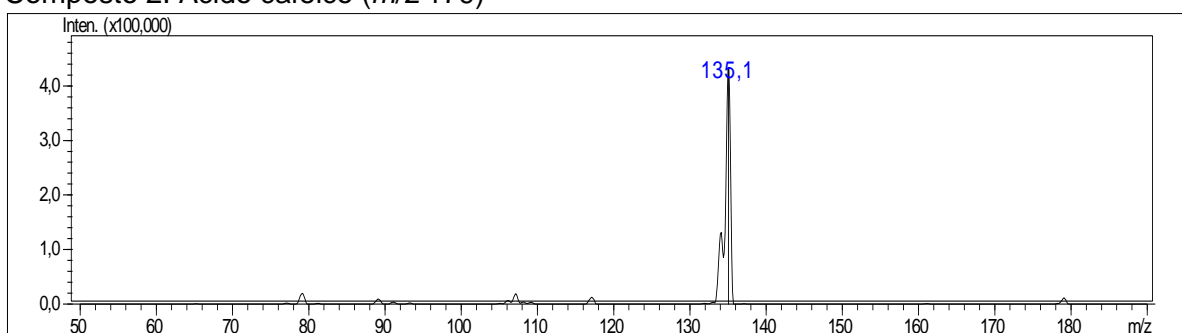
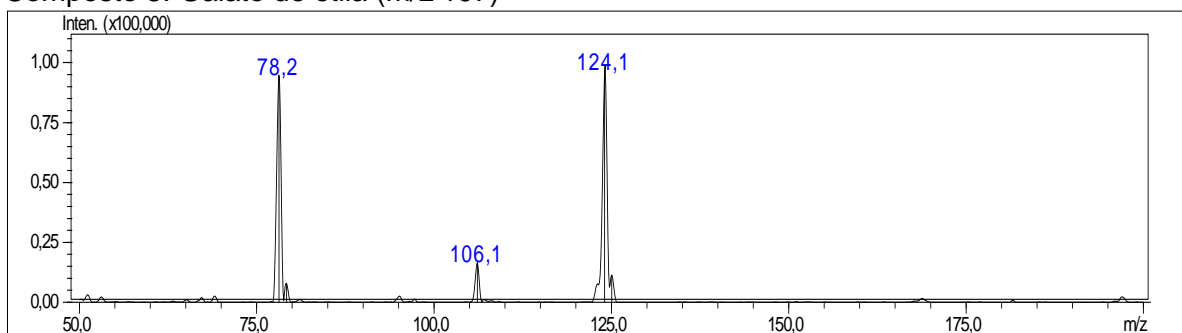
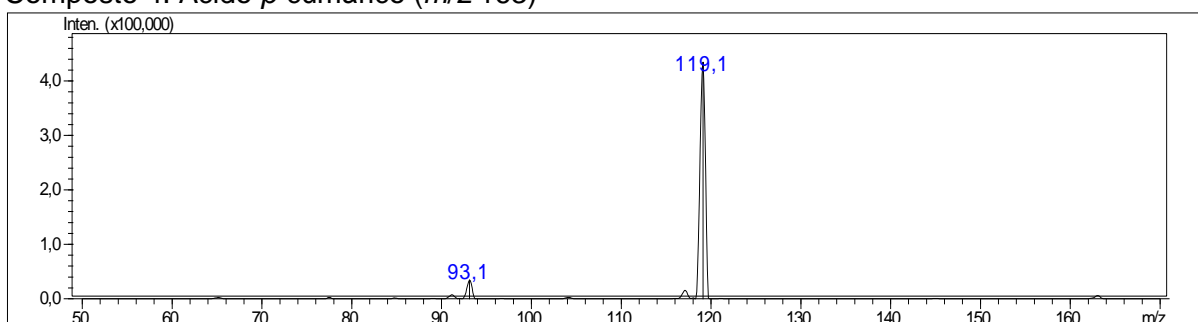
Pico 26

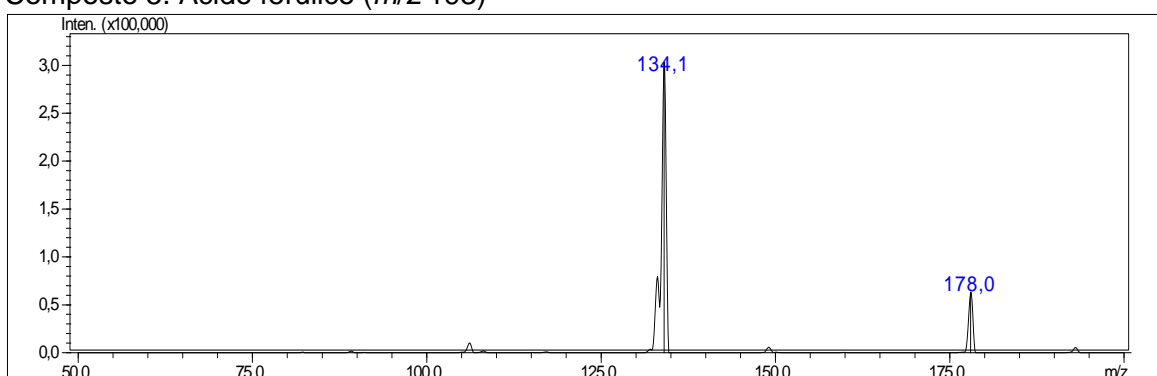
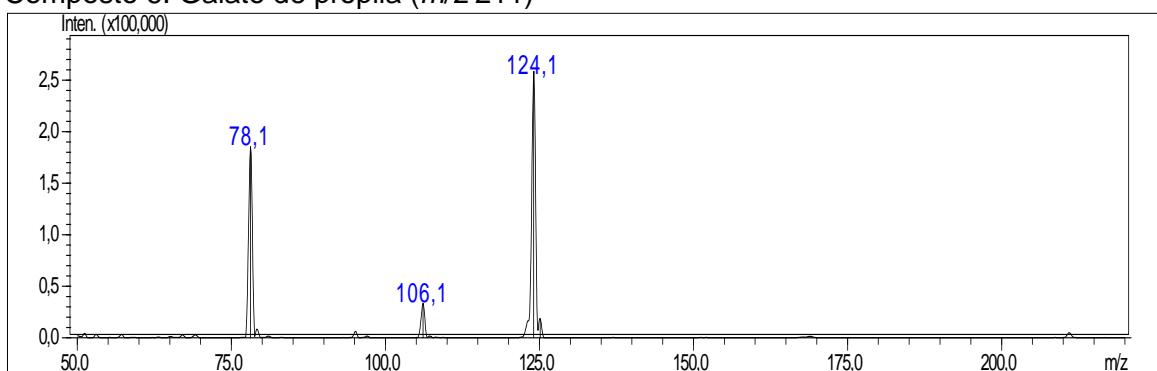
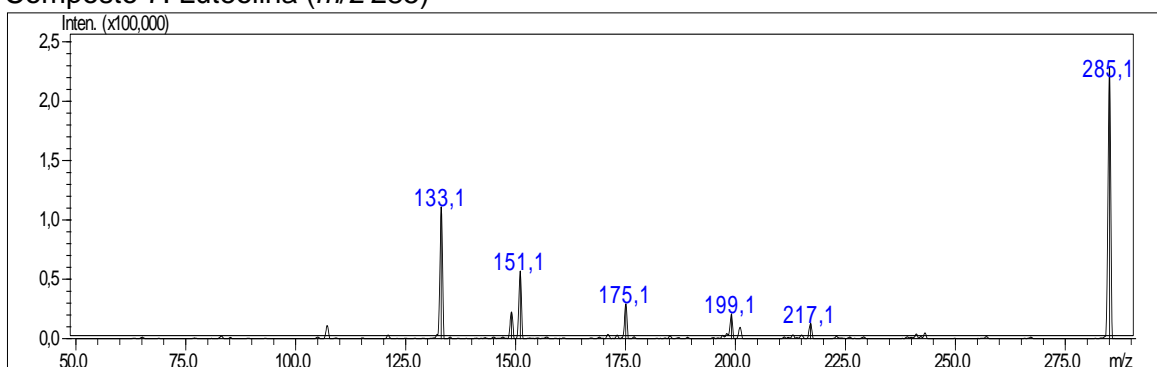
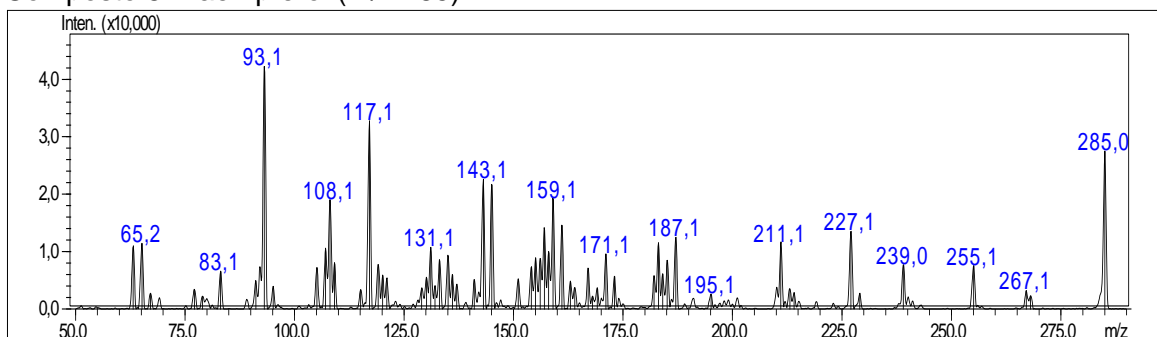


Pico 27



2. Espectros MS/MS dos 9 compostos fenólicos presentes no extrato da espécie alvo

Composto 1. Ácido clorogênico (m/z 352)Composto 2. Ácido cafeico (m/z 179)Composto 3. Galato de etila (m/z 197)Composto 4. Ácido *p*-cumárico (m/z 163)

Composto 5. Ácido ferúlico (m/z 193)Composto 6. Galato de propila (m/z 211)Composto 7. Luteolina (m/z 285)Composto 8. Kaempferol (m/z 285)

Composto 9. Apigenina (m/z 269)