

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

LÍLIAN MACEDO BASTOS

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DAS CASCAS DE *Endopleura uchi* (HUBER)
CUATREC.



MANAUS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

LÍLIAN MACEDO BASTOS

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA COMPOSIÇÃO
FENÓLICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DAS CASCAS DE *Endopleura uchi* (HUBER)
CUATREC.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica, área de concentração: produtos naturais e moléculas bioativas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

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

B327e Bastos, Lílian Macedo
Contribuição ao conhecimento da composição fenólica e avaliação do potencial antioxidante das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. / Lílian Macedo Bastos . 2020
122 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Uchi. 2. Antioxidante. 3. Derivados do ácido galoiquinico. 4. Quimiometria. 5. Espectrometria de massas. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Contribuição ao conhecimento da composição fenólica e avaliação do potencial antioxidante das cascas de *E. uchi* (Huber.) Cuatrec.”

DISCENTE: LÍLIAN MACEDO BASTOS


PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 28/02/2020.


Prof. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Coordenadora do PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Orientadora e presidente da banca


Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit
Membro externo (INPA)


Prof. Dr. Raimundo Carlos Pereira Junior
Membro externo (UEA)


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro interno (UFAM)


Prof. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Membro interno (UFAM)

Dedico este trabalho a Deus e à minha
família.

“A grandeza da vida não consiste em não cair nunca, mas em nos levantarmos cada vez que caímos”.

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me atestar todos os dias que a oração é conexão entre a criatura e o Criador, transportando o Ser a sentimentos de paz, equilíbrio e fé, fundamentais na minha jornada evolutiva;

Aos meus pais Elson e Dilaci pela renúncia para que todos os seus filhos estudassem, pela dedicação e possibilidades múltiplas de aprendizados;

Aos meus irmãos Vivian, Daniela e Elson Júnior pela amizade e amparo dedicados;

À minha avó materna “Vô Julinha” (*in memoriam*) pela amizade, pela paciência, pelas orações e carinho, pelas perseverantes orientações e amor incondicional dedicado;

As minhas amigas Aline, Val e Ellen, pela amizade, paciência e momentos de alegria compartilhados;

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade e concessão para a capacitação;

À Prof^a. Dr^a Maria de Meneses de Pereira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo incentivo e motivação ao doutoramento e apoio na sua realização;

À Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Saraiva Nunomura pela orientação, parceria, amparo e confiança depositada para a realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora de qualificação Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro, Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza e Prof. Dr. Emerson Silva lima pelas correções e conhecimentos oportunizados;

Aos amigos do Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos (LAEQ) pelos esforços e tempo dedicados a pesquisa e em especial, pelo carinho e convivência fraternal que me oportunizaram;

À equipe do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM)
pelas análises;

Ao Dr. Felipe Moura Araújo da Silva que me apontou um novo caminho para o
objetivo que buscava, pelo apoio e dedicação nos momentos da pesquisa, quando todas as
“certezas” eram incertas;

A todos àqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae), popularmente conhecida como “uxi-amarelo” ou “uxi-liso”, uma árvore nativa da floresta amazônica encontrada em toda a bacia amazônica, tem sido alvo constante de novas pesquisas ao longo dos anos, em especial pelo seu uso popular, potencial fitoquímico e atividades biológicas. Suas cascas são comumente utilizadas como remédios naturais para o tratamento de muitas doenças. Embora amplamente investigada do ponto de vista fitoquímico, o conhecimento em relação ao conteúdo fenólico permanece inexplorado. Para acessar a composição fenólica das cascas de *E. uchi*, uma abordagem integrativa baseada no planejamento de misturas simplex centroide, na espectrometria de massas com infusão direta, operando com fonte *electrospray* (IES-EM) e análise quimiométrica foram adotadas. Em adição, todos os extratos das cascas de *E. uchi* foram avaliados quanto ao conteúdo fenólico total e atividade antioxidante. A análise multivariada apontou os extratos à base de etanol como os mais representativos dos constituintes fenólicos, com ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (**2**); ácido gálico (**4**), ácido 5-galoilquínico (**5**) e galocatequina galato (**6**), tentativamente identificados através de análises por espectrometria de massas (EM), descritos pela primeira vez nesta espécie. Além disso, o extrato etanólico puro apresentou o maior conteúdo fenólico total (CFT = $133,61 \pm 0,3$ mg de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato seco e atividade antioxidante (concentração inibitória, $CI_{50} = 9,32 \pm 0,15$). A citotoxicidade *in vitro* e a atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico foram avaliados e um protocolo simplificado para extração seletiva dos compostos alvos e um estudo quantitativo por CLAE-EM/EM foram desenvolvidos. A abordagem integrativa proposta para este trabalho forneceu uma maneira eficaz de avaliar os constituintes fenólicos das cascas de *E. uchi*, portanto contribuiu com o conhecimento sobre o conteúdo fenólico desta planta medicinal amazônica. Além disso, o estudo quantitativo do ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico foram relatados pela primeira vez na espécie.

Palavras-Chave: Uchi. Antioxidante. Derivados do ácido galoilquínico. Quimiometria. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae), popularly known as “uxi amarelo” or “uxi liso”, is a native tree of the Brazilian Amazon rainforest found throughout the Amazon basin. It has been a constant target of new research over the years, particularly for its popular use, phytochemical potential and biological activities. Its bark is commonly used as natural medicine for the treatment of many diseases. Although widely investigated from the phytochemical viewpoint, the knowledge regarding the phenolic content remains unexplored. In order to access the phenolic composition of *E. uchi* bark, an integrative approach based on simplex centroid design, direct infusion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and chemometric analysis was adopted. In addition, the extracts were evaluated for total phenolic content and antioxidant activity. The multivariate analysis pointed to the ethanol-based extracts containing as the most containing phenolic compounds, with 3,5-di-*O*-galloylquinic acid (**2**), gallic acid (**4**), 5-galloylquinic acid (**5**) and galocatechin gallate (**6**) tentatively identified by MS analysis. All are described for the first time in *E. uchi*. Besides, pure ethanol extract presented highest total phenolic content (TPC = 133.61 ± 0.3 mg of gallic acid equivalent per 100 g of dry extract) and antioxidant activity (half-maximal inhibitory concentration, $IC_{50} = 9.32 \pm 0.15$). *In vitro* cytotoxicity and an antioxidant activity by iron reduction (FRAP) of the selected extractor were applied and a simplified protocol for selective extraction of the target compounds and a quantitative study by HPLC-MS/MS were applied. The integrative approach proposed to this work provided an effective way to assess the phenolic compounds of *E. uchi* bark, therefore, improving the knowledge regarding phenolic content in this Amazonian medicinal plant. In addition, the quantitative study of quinic acid, gallic acid and galocatechin gallate were first reported in the species.

Keywords: Uchi. Antioxidant. Galloylquinic acid derivatives. Chemometric analysis. Mass spectrometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS	[(ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico))]
AcOEt	Acetato de etila
C18	Octadecilsilano
DAD	Detector de arranjo de diodo (do inglês <i>Diode Array detector</i>)
DCM	Diclorometano
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
EASI-MS	Espectrometria de massas ambiente (do inglês <i>easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry</i>)
EGC	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequina galato
IES	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>electrospray ionization</i>)
EtOH	Etanol
FRAP	Poder de redução do íon ferro (do inglês <i>ferric reducing antioxidant power</i>)
GCG	Galocatequina galato
GSIS	Secreção de insulina estimulada pela glicose (do inglês <i>glucose-stimulated insulin secretion</i>)
AHA	Análise de agrupamentos hierárquica (do inglês <i>hierarchical cluster analysis</i>)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
CI₅₀	A metade da concentração inibitória máxima
m/z	Razão massa /carga
EM	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
EM/EM	Espectrometria de massa acoplada à espectrometria de massa
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	Capacidade de absorção dos radicais oxigenados (do inglês <i>oxygen radical absorbance capacity</i>)
ACP	Análise de componentes principais (do inglês <i>principal component analysis</i>)
ppm	parte por milhão
ERN	Espécie reativa de nitrogênio (do inglês <i>reactive nitrogen species</i>)
ERO	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
SIM	Monitoramento do íon selecionado (do inglês <i>selected ion monitoring</i>)
CFT	Conteúdo fenólico total (do inglês <i>total phenolic compounds</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos gêneros da família Humiriaceae no Brasil.....	20
Figura 2. Distribuição geográfica da Humiriaceae no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira, (B) Distribuição Geográfica: Norte (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Tocantins).....	21
Figura 3. Frutos maduros de duas espécies tradicionalmente consumidos da família Humiriaceae. (A) <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (B) <i>Duckesia verrucosa</i> Ducke.....	23
Figura 4. Classificação botânica da <i>Endopleura uchi</i>	24
Figura 5. Tronco com casca avermelhada característica da espécie (A); cascas comerciais (B)	26
Figura 6. Bergenina nas cascas de <i>E. uchi</i>	27
Figura 7. Exemplos de outros constituintes relatados nas cascas da <i>E. uchi</i> : 3-oxo-friedelina (2), pseudotaraxasterol (3), lupeol (4), α -amirina (5), betulina (6) e 2β , 3β -di-hidroxi-urs-12-en-28 oato de metila (7).....	29
Figura 8. Exemplos de outros constituintes relatados nas cascas da <i>E. uchi</i> : sitosterol (8) e estigmasterol (9) relatados nas cascas da <i>E. uchi</i>	30
Figura 9. Ilustração de abordagem integrativa baseada na espectrometria de massas, cromatografia e a quimiometria.....	34
Figura 10. Planejamento de misturas simplex centroide com três componentes (A, B e C)....	36
Figura 11. Mecanismo de estresse oxidativo em lesão tecidual e defesa antioxidante natural	38
Figura 12. Principais agentes de defesa antioxidantes não enzimáticos.....	41
Figura 13. Estrutura, numeração básica (a) e classificação de flavonoides (b).....	43
Figura 14. Constituintes fenólicos da espécie <i>Camellia sinensis</i>	45
Figura 15. Constituintes fenólicos da espécie <i>Ilex paraguensis</i>	46
Figura 16. Exemplos de estruturas de antioxidantes de fontes naturais: ácido quínico e lactona de ácido quínico (a) e betalaína (b)	47
Figura 17. Imagens do herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - AM: (a) <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. e (b) frutos da espécie	51
Figura 18. Esquema do planejamento de misturas simplex centroide preparado utilizando misturas de três componentes: diclorometano (DCM); acetato de etila (AcOEt); etanol (EtOH)	52
Figura 19. Curva analítica do padrão ácido gálico (AG) para quantificação de compostos fenólicos	63
Figura 20. -Curva analítica do padrão quercetina para determinação do valor de % CI ₅₀	63
Figura 21. Espectros de massas dos extratos da casca de <i>E. uchi</i> com * denotando o pico base	66
Figura 22. Gráfico de ACP das diferentes soluções extrativas das cascas de <i>E. uchi</i> baseado na composição química	68
Figura 23. Dendograma de AHA.....	69
Figura 24. Biplot de ACP	70
Figura 25. Substâncias tentativamente identificadas através das análises de fragmentação EM/EM da casca de <i>E. uchi</i>	71
Figura 26. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 191, presente nas cascas de <i>E. uchi</i>	73
Figura 27. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 495, presente nas cascas de <i>E. uchi</i> com a proposta de fragmentação.....	74

Figura 28. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 327, presente nas cascas de <i>E. uchi</i> com a proposta de fragmentação.....	75
Figura 29. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 169, presente nas cascas de <i>E. uchi</i> com a proposta de fragmentação.....	76
Figura 30. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 343, presente nas cascas de <i>E. uchi</i> e proposta de fragmentação.....	77
Figura 31. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 457, presente nas cascas de <i>E. uchi</i> com a proposta de fragmentação.....	78
Figura 32. Curva analítica do sulfato ferroso	80
Figura 33. Cromatogramas obtidos por CLAE em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) para uma corrida final de 21 min das soluções padronizadas. Gradiente de eluição: 80-20% de B. Fases móveis: água (A) e metanol (B). Coluna Phenomenex Luna C18 (5 μ m, 150 \times 4,6 mm)	85
Figura 34. Gráficos das curvas analíticas dos padrões: bergenina (a); ácido quínico (b); galocatequina galato (c) e ácido gálico (d).....	87
Figura 35. Cromatograma do extrato etanólico por CLAE-DAD-EM, com os principais picos marcados como compostos: 1- ácido gálico; 2- bergenina; 3- ácido quínico e 4- galocatequina galato e o cromatograma baseado em EM destacando a coeluição dos picos 2 e 3	88

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Algumas atividades biológicas relatadas a bergenina	28
Tabela 2. Rendimentos (% , m/m) dos extratos brutos obtidos por diferentes soluções extratoras utilizando solventes puros ou misturas de solventes	61
Tabela 3. Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos brutos obtidos por diferentes soluções extratoras.....	64
Tabela 4. Substâncias tentativamente identificadas nas cascas de <i>E. uchi</i> por análise por IES-EM/EM.....	70
Tabela 5. Atividade antioxidante pela redução do ferro no extrato etanólico das cascas de <i>E. uchi</i>	81
Tabela 6. Citotoxicidade (CI ₅₀) do extrato a base de etanol (EtOH) comparado com o fármaco padrão doxorrubicina testados em linhagens celulares de fibroblasto de pulmão humano.....	81
Tabela 7. Rendimento dos extratos brutos em porcentagem (% , m/m), conteúdo fenólico total e atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos etanólicos (A50 – A150) preparados seguindo protocolo simplificado para extração dos constituintes das cascas de <i>E. uchi</i>	83
Tabela 8. Dados de linearidade da bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico nas cascas de <i>E. uchi</i>	86
Tabela 9. Concentrações (g. Kg ⁻¹) de bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico nas cascas de <i>E. uchi</i> por CLAE-EM/EM	89
Tabela 10. Principais atividades biológicas relatadas a bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico	92

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I

Figura A 1. Espectro de massas no modo negativo da mistura de solvente DCM das cascas de <i>E. uchi</i>	115
Figura A 2. Espectro de massas no modo negativo da mistura de solvente AcOEt das cascas de <i>E. uchi</i>	115
Figura A 3. Espectro de massas no modo negativo da mistura de solvente EtOH das cascas de <i>E. uchi</i>	116
Figura A 4. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente DCM+AcOEt das cascas de <i>E. uchi</i>	116
Figura A 5. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente DCM+EtOH das cascas de <i>E. uchi</i>	117
Figura A 6. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente AcOEt+EtOH das cascas de <i>E. uchi</i>	117
Figura A 7. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente DCM+AcOEt+EtOH das cascas de <i>E. uchi</i>	118
Figura A 8. Curva analítica do padrão quercetina para determinação do valor de % CI ₅₀	118
Figura A 9. Curva analítica do padrão galocatequina galato para determinação do valor % CI ₅₀	119
Figura A 10. Curva analítica do padrão ácido gálico para determinação do valor % CI ₅₀	119
Figura A 11. Curva analítica do padrão bergenina para determinação do valor % CI ₅₀	120
Tabela A1. Dados utilizados na análise de ACP baseado nas intensidades dos picos obtidos entre <i>m/z</i> 100 a 600, após a eliminação dos sinais de intensidade abaixo de 5%.....	122

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ANEXOS	XIV
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A Família Humiriaceae Juss.....	22
2.1.1 Etnobotânica da família Humiriaceae.....	22
2.1.2 A fitoquímica da família Humiriaceae.....	23
2.2 A espécie <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	27
2.2.1 Etnobotânica da <i>Endopleura uchi</i>	25
2.2.2 Fitoquímica da <i>Endopleura uchi</i>	28
2.3 Espectrometria de massas e quimiometria.....	30
2.4 Planejamento de misturas simplex centroide.....	35
2.5 Estresse oxidativo e os antioxidantes.....	37
2.5.1 Estresse oxidativo.....	37
2.5.2 Antioxidantes.....	39
3. OBJETIVOS	48
3.1 Geral.....	48
3.2 Específicos.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Solventes.....	49
4.2 Materiais e equipamentos.....	49
4.3 Análise cromatográfica.....	49
4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	49
4.4 Métodos espectrométricos.....	50
4.5 Coleta e identificação.....	50
4.6 Preparação dos extratos através do planejamento de misturas simplex centroide.....	51
4.7 Análise por IES-EM dos extratos obtidos através do planejamento de misturas simplex	

centroide e tratamento quimiométrico dos dados.....	53
4.8 Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	54
4.8.1 Conteúdo fenólico total (TPC).....	54
4.8.2 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	54
4.8.3 Atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico.....	54
4.9 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	56
4.10 Quantificação dos princípios ativos das cascas de <i>E. uchi</i> por CLAE-EM/EM.....	58
4.10.1 Preparo dos extratos etanólicos.....	58
4.10.2 Análise por CLAE-EM/EM dos extratos etanólicos.....	59
4.10.3 Preparação das curvas analíticas padrão de bergenina, ácido gálico, ácido quínico e galocatequina galato.....	60
4.11 Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Extração dos constituintes fenólicos através do planejamento de misturas simplex centroide e avaliação do potencial antioxidante.....	61
5.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	62
5.3 Análise por IES-EM e tratamento quimiométrico dos dados.....	65
5.4 Avaliação da atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico das cascas de <i>E. uchi</i>	80
5.5 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do extrato etanólico das cascas de <i>E. uchi</i>	82
5.6 Quantificação dos princípios ativos das cascas de <i>E. uchi</i> por CLAE-EM/EM.....	83
5.6.1 Extração seletiva dos constituintes fenólicos das cascas de <i>E. uchi</i> e potencial antioxidante.....	83
5.6.2 Quantificação da bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico das cascas de <i>E. uchi</i>	85
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8. ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 85% da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais ou preparações destas nos seus cuidados básicos de saúde (OMS, 2011). No Brasil, a finalidade curativa das plantas pode ser atribuída à diversidade de espécies vegetais e biomas, à riqueza étnico-cultural e ao modismo mundial recente de consumo de produtos considerados *in natura*.

As plantas medicinais contemplam espécies vegetais, cultivadas ou não, administradas por qualquer via ou forma, que exercem ação terapêutica e devem ser utilizadas de forma racional, pela possibilidade de apresentar interações, efeitos adversos e contraindicações (BRASIL, 2006). O reconhecimento da importância das plantas para o desenvolvimento de fármacos modernos e terapeuticamente mais eficazes foi oficializado pela Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), com o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006).

Como contribuição e valorização da medicina popular, desmistificando a ideia de “natural não faz mal”, assim como a possibilidade de devolver à população o conhecimento das espécies vegetais, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias que possam alavancar as pesquisas e apresentar soluções em benefício da sociedade, unindo o conhecimento popular, tradicional e o científico. Neste contexto, a espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae), popularmente conhecida como “uxi-amarelo” ou “uxi-liso”, uma árvore nativa da floresta amazônica encontrada em toda a bacia amazônica (MEDEIROS et al., 2019; CORRÊA, 1984), tem sido alvo constante de novas pesquisas ao longo dos anos,

em especial pelo seu uso popular, potencial fitoquímico e atividades biológicas (HYACIENTH et al., 2020; HYACIENTH et al., 2019; PEIXOTO et al., 2019). As cascas de *E. uchi* são comumente comercializadas em feiras populares e farmácias, prescritas na forma de chá na medicina tradicional para os tratamentos de diabetes, cistos e miomas, doenças inflamatórias e geniturinárias (NUNOMURA et al., 2009; TACON & FREITAS, 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

Um número significativo de estudos foi realizado com esta planta (HYACIENTH et al., 2019), considerando a bergenina, um C-glicosídeo de 4-O-metil ácido gálico (ABREU et al., 2008; NUNOMURA et al., 2009; POLITI et al., 2011; MUNIZ, 2013; SILVA & TEIXEIRA, 2015; PEIXOTO et al., 2019) como o principal constituinte químico, enquanto o conhecimento sobre o conteúdo fenólico permanece inexplorado (TACON & FREITAS, 2013; POLITI et al., 2011). A pesquisa sobre os constituintes fenólicos têm sido um foco de interesse na última década, devido a vários efeitos benéficos na saúde humana, como exemplos, antienvhecimento, anti-inflamatório, agentes antioxidantes e antiproliferativos (LIN et al., 2016).

Com o avanço da espectrometria de massas, abordagens baseadas em infusão direta com fonte de *electrospray* (IES-EM), têm sido utilizadas como um método eficiente na detecção rápida e perfil químico de compostos bioativos em matrizes complexas (SCHIOZER et al., 2012; SILVA et al., 2016). Essa abordagem tem sido aplicada na tentativa de identificação de constituintes fenólicos em várias espécies de plantas, alimentos e outros produtos (SILVA & TEIXEIRA, 2015; LIN et al., 2016). As abordagens baseadas em espectrometria de massas (EM) combinada ao planejamento de mistura (por exemplo, simplex centroide) e a análise não supervisionada (por exemplo, análise de componentes principais e análise de *cluster* hierárquico) têm permitido a identificação de interações sinérgicas e

antagônicas entre diferentes solventes de extração, maximizando ou minimizando o conteúdo dos compostos extraídos, destacando os compostos alvos (SILVA et al., 2016; PAULI et al., 2016; ROCHA et al., 2018).

Neste trabalho, primeiramente, os extratos de cascas de *E. uchi* foram obtidos com diclorometano, acetato de etila e etanol em diferentes combinações, de acordo com o planejamento de misturas simplex centroide e análises por IES-EM, sendo esses dados submetidos à análise hierárquica de agrupamentos (AHA) e análise de componentes principais (ACP), a fim de acessar a composição fenólica da casca da espécie vegetal. Em adição, todos os extratos foram avaliados quanto ao conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante. A citotoxicidade *in vitro* e a atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato selecionado foram avaliados e um protocolo simplificado para extração seletiva dos compostos alvos em associação com um estudo quantitativo por CLAE-EM/EM foram desenvolvidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Família Humiriaceae A. Juss

Humiriaceae, pertencente à ordem Malpighiales, é uma família de plantas angiospérmicas, que atualmente é constituída por cerca de sessenta espécies distribuídas em oito gêneros, sendo dois destes endêmicos. Esta família é formada de árvores de grande porte com copas densas, distribuídas desde o sul do Brasil até América Central (CUATRECASAS 1961). No Brasil, tem sua distribuição geográfica confirmada no Norte (Acre, Amapá e Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco e Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Santa Catarina) (Figura 1).

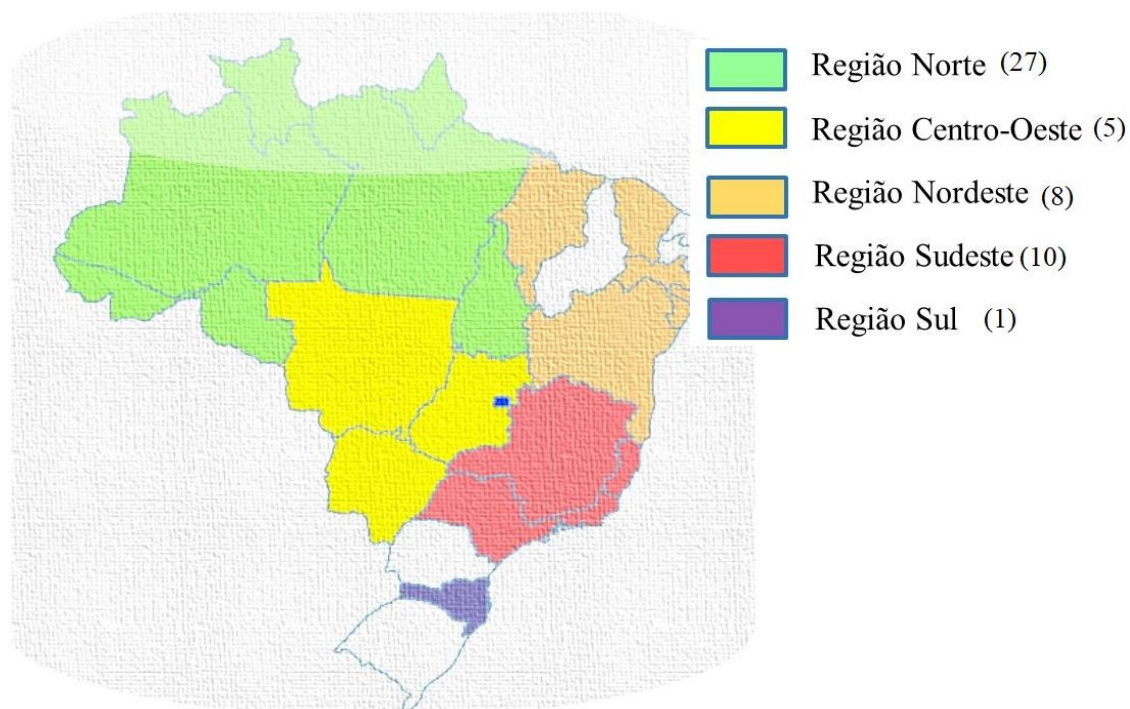


Figura 1. Distribuição dos gêneros da família Humiriaceae no Brasil
Fonte: Medeiros et al. (2019).

Estima-se que aproximadamente trinta e cinco espécies em oito gêneros [*Duckesia* Cuatrec., *Endopleura* Cuatrec., *Humiria* A. St. - Hil., *Humiriastrum* (Urb.) Cuatrec., *Hylocarpa* Cuatrec., *Sacoglottis* Mart., *Schistostemon* (Urb.) Cuatrec., *Vantanea* Aubl.] estejam distribuídas no território brasileiro, sendo dezessete espécies endêmicas. A Região Norte detém cerca de vinte e sete espécies, possuindo o Estado do Amazonas vinte e cinco espécies registradas (MEDEIROS et al., 2019) (Figura 2).

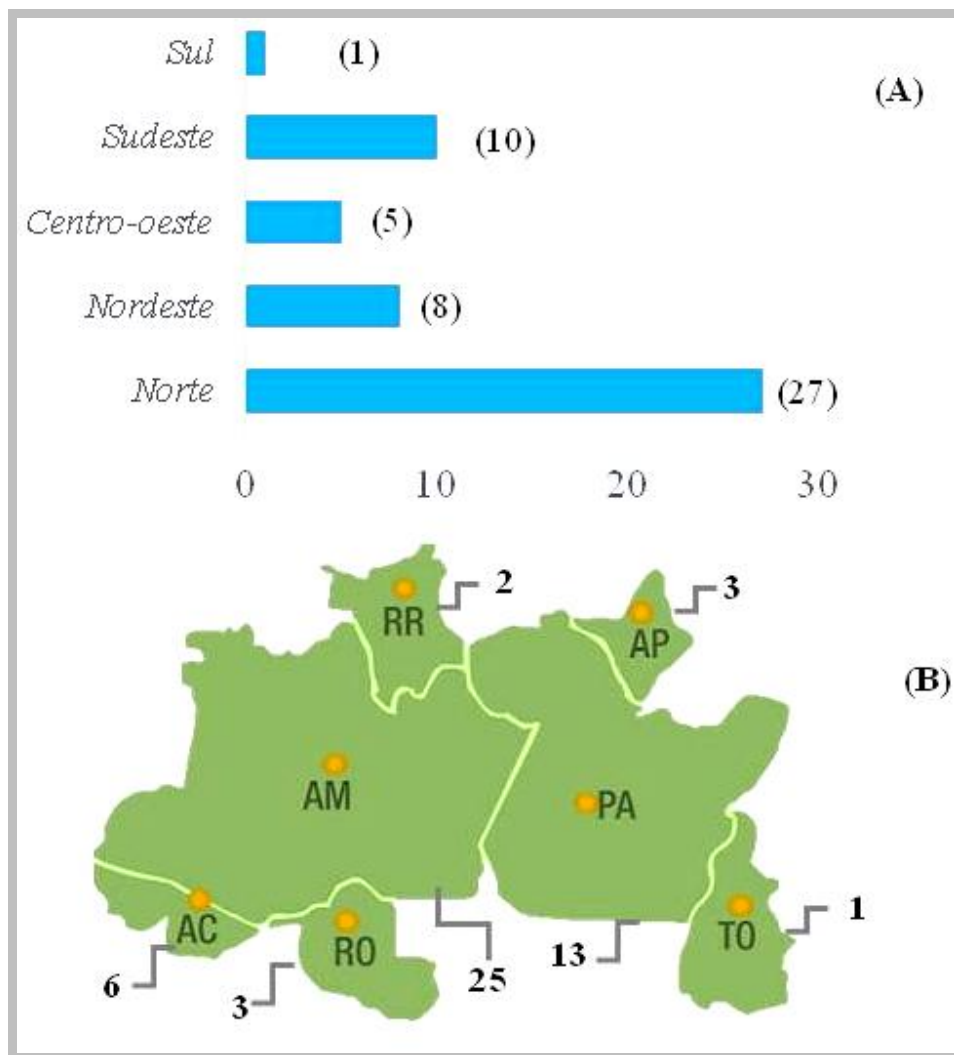


Figura 2. Distribuição geográfica da Humiriaceae no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira, (B) Distribuição Geográfica: Norte (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Tocantins)

Fonte: Medeiros et al. (2019).

A família Humiriaceae tem sua identificação botânica realizada rotineiramente através da observação do tronco, frequentemente marrom-escuro/avermelhado, são árvores de porte grande com copas densas. Possuem as folhas sempre glabras (lisas), sépalas (cálice) e pétalas (corola) em torno de cinco, sendo que suas sementes variam de um a cinco. As flores são hermafroditas, sendo sua polinização desconhecida. (CUATRECASAS, 1961; RIBEIRO et al., 1999).

A família possui frutos que são drupas (carnosos) com endocarpos lenhosos de germinação longitudinais e paredes do forame apical e endocarpo, relatado em alguns gêneros. Alguns frutos são comestíveis e em geral com adaptações para dispersão pela água além de serem disseminados por roedores, antas, primatas, pássaros e morcegos (CUATRECASAS, 1961).

2.1.1 Etnobotânica da família Humiriaceae

Os frutos são considerados alimentos de grande importância para subsistência de muitas comunidades rurais mais distantes, em especial das espécies *Duckesia verrucosa* Ducke, conhecido tradicionalmente como uxi coroa e a *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec., populamente conhecida como uxi-liso (Figura 3) (CUATRECASAS, 1961; HERRERA et al., 2010).



Figura 3. Frutos maduros de duas espécies tradicionalmente consumidos da família Humiriaceae. (A) *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (B) *Duckesia verrucosa* Ducke
Fonte: Kinupp (2015).

Há vários relatos de usos da família entre os grupos nativos no noroeste da Amazônia, em especial para as espécies do gênero *Humiria*, sendo valorizada no Brasil a espécie *Humiria balsamifera* (Aubl.) pela carpintaria em geral. Esta e outras espécies são mais conhecidas como fontes de uma resina altamente aromática chamada umiri. A resina e a tintura da casca são consideradas estimulantes, diuréticas, balsâmicas e expectorantes e são recomendadas para o tratamento contra doenças do trato genital feminino e como vermífica (SCHULTES, 1979).

2.1.2 A fitoquímica da família Humiriaceae

A fitoquímica das espécies dessa família até o momento permanece inexplorada ou pouco conhecida, sendo as sementes da espécie *Duckesia verrucosa* (Ducke) Cuatrec. e as cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. tradicionalmente usadas como abortivas (HYACIENTH et al., 2020; RODRIGUES, 2006).

2.2 A espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

A espécie *Sacoglottis uchi* descrita por Jacques Huber foi estudada pelo botânico espanhol José Cuatrecasas Arumí, que observou algumas características, como a antera (porção terminal do estame das flores) e o endocarpo não encontrados no gênero *Sacoglottis*, sendo denominado um novo gênero *Endopleura*, para a espécie *uchi*. Em homenagem ao espanhol José Cuatrecasas, a espécie apresenta como nomenclatura científica - *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). Sendo a espécie *Endopleura uchi* monotípica e tendo como sinonímia *Sacoglottis uchi* Huber (CUATRECASAS, 1961). A figura 4 relata a classificação botânica da espécie.

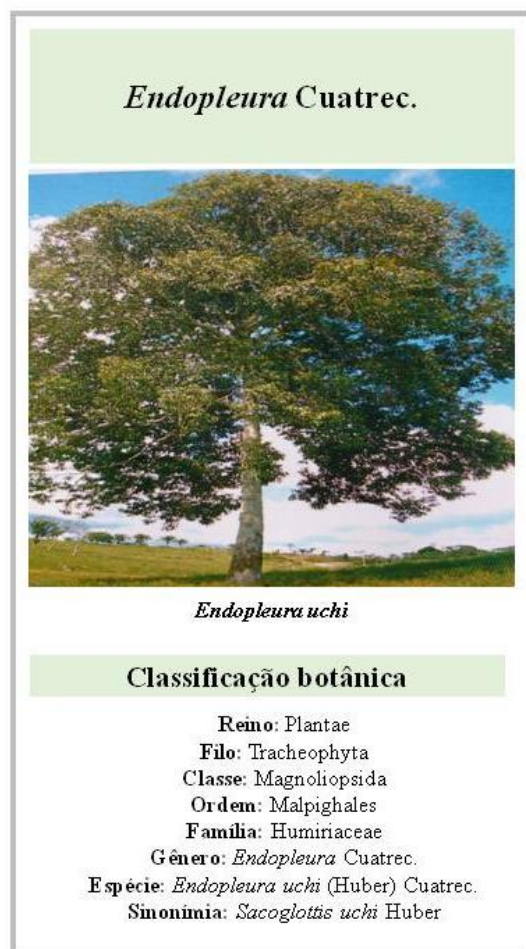


Figura 4. Classificação botânica da *Endopleura uchi*
Fonte: Revilla (2001).

A espécie é originária da Amazônia brasileira, encontrada em estado silvestre em mata de terra firme, dispersa por toda a Bacia Amazônica, porém com maior abundância e frequência nos estados do Pará e Amazonas. Conhecida na região como uchi, uxi amarelo, cumatê, pururu, uixi-liso, uxi-ordinário ou uchi-pucu (SCHULTES, 1979). É uma árvore de grande porte, alta, de tronco liso e reto, de desenvolvimento muito lento, podendo alcançar de 25 a 30 metros de altura. Devido às suas características, a madeira dessa espécie é utilizada na construção civil e naval, marcenaria e carpintaria (CORRÊA, 1984).

Os frutos apresentam uma fina espessura de polpa (mesocarpo) chegando a pesar de 50 a 70 g de constituição oleosa e resinosa, com caroço (endocarpo) lenhoso e duro, contendo em seu interior de uma ou duas sementes. O fruto apresenta coloração verde-amarelada ou parda-escuro quando maduro, considerado um alimento de grande importância para subsistência de muitas comunidades rurais mais distantes. Além disso, seu sabor e aroma são peculiares, não comparáveis com qualquer fruta conhecida, apreciado pelos amazônidas (KINUPP, 2015).

2.2.1 Etnobotânica da *Endopleura uchi*

Pesquisas recentes com os frutos de uchi na região amazônica demonstraram a sua elevada importância econômica e alimentar, com a descoberta de constituintes com propriedades terapêuticas e/ou nutricional, sugerindo o potencial desse fruto como alimento funcional (MAGALHÃES et al., 2007; DE FREITAS et al., 2018), além disso foi relatado também sua moderada atividade antimicrobiana (DE FREITAS et al., 2018).

Diversos órgãos da espécie tais como, raízes, cascas, sementes têm sido utilizados na medicina popular e alguns como sementes e cascas para o tratamento da gastralgia, disenteria, hemorroidas, infecção intestinal, inflamações, hepatite e outras doenças do fígado,

tuberculose, anemia, infecções geniturinárias, cálculos renais, hemorragia, como regulador menstrual (RODRIGUES, 2007; SANTOS et al., 2012; HYACIENTH et al., 2019; BRANCO et al., 2018).

As cascas de *E. uchi* são tradicionalmente usadas na medicina popular durante o parto para favorecer o nascimento e também como um poderoso agente contraceptivo (HYACIENTH et al., 2020). Além disso, há relatos de seu uso como agente abortivo, sendo contraindicado durante a gravidez (HYACIENTH et al., 2020; SANTOS et al., 2012; RODRIGUES, 2006). A Figura 5 destaca a característica do tronco com casca avermelhada (característica da espécie) e as cascas comerciais.



Figura 5. Tronco com casca avermelhada característica da espécie (A); cascas comerciais (B)
Fonte: A autora (2016).

Além disso, as cascas de *E. uchi* têm sido relatadas com potencial atividade antidiabética através da inibição da α -glicosidase, além de atividade bacteriostática e bactericida contra bactérias gram-negativas, principalmente *Pseudomonas Aeruginosa* nos

extratos aquosos e contra as bactérias gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* nos extratos hidroetanólicos (SILVA & TEXEIRA, 2015).

Estudos anteriores demonstraram que a bergenina, substância majoritária na espécie, é um inibidor seletivo de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. Guilliermondii* (SILVA et al., 2009), além de demonstrar boa atividade inibitória em relação à ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima que participa do processo inflamatório (NUNOMURA et al., 2009).

Além disso, o extrato das cascas é considerado um eficiente agente antioxidante (TACON & FREITAS, 2013), além do seu potencial uso para tratar o excesso de peso, a obesidade, a dislipidemia e complicações associadas (OLIVEIRA et al., 2017).

2.2.2 Fitoquímica da *Endopleura uchi*

As cascas de *E. uchi* possuem perfil de metabólitos secundários diversificado, porém é caracterizada pela presença da bergenina (1), substância majoritária na espécie (Figura 6) (ABREU et al., 2008; NUNOMURA et al., 2009; TACON & FREITAS, 2013).

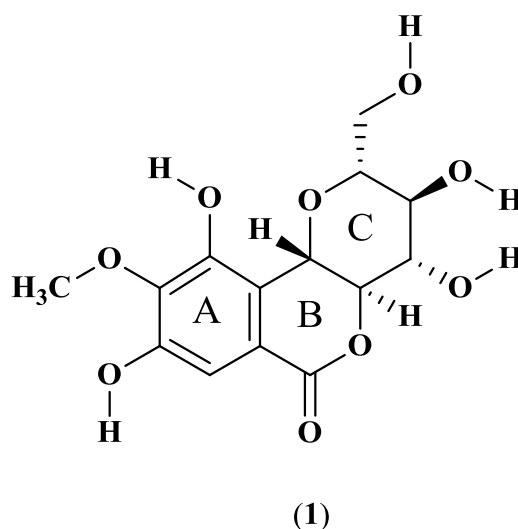


Figura 6. Bergenina nas cascas de *E. uchi*

Fonte: Abreu et al. (2008); Nunomura et al. (2009); Tacon & Freitas (2013).

A estrutura da bergenina é composta por três anéis de seis membros: um anel aromático (A), um anel de δ -lactona (B) e o anel de glicopiranosose (C). Sua estrutura permite a formação de seis ligações hidrogênio intermoleculares e uma intramolecular levando a uma extensa rede de ligações de hidrogênio dentro do cristal (RASTOGI & RAWAT, 2008). É um polifenol cristalino, cuja estrutura química foi identificada na *E. uchi* com base no seu espectro de RMN (MAGALHÃES et al., 2007; NUNOMURA et al., 2009; MUNIZ, 2013). É um C-glicosídeo do ácido 4-O-metilgálico, de fórmula molecular C₁₄H₁₆O₉. Tem sido mais abundantemente relatada em gêneros pertencentes às famílias Euphorbiaceae, Saxifragaceae Myrsinaceae, cuja crescente lista de atividades biológicas tem atraído grande interesse nos últimos anos (LIM et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2003; NAZIR et al., 2007; PEIXOTO et al., 2019). Na Tabela 1 são apresentadas algumas das atividades biológicas da bergenina.

Tabela 1. Algumas atividades biológicas relatadas a bergenina

Família	Espécies	Atividades biológicas
Euphorbiaceae	<i>Mallotus japonicus</i>	Hepatoprotetora e Antioxidante (LIM et al., 2000; RASTOGI & RAWAT, 2008).
Myrsinaceae	<i>Ardisia japonica</i>	Anti-HIV (PIACENTE et al., 1996).
Euphorbiaceae	<i>Mallotus japonicus</i>	Imunomoduladora e Neuroprotetora (TAKAHASHI et al., 2003).
Saxifragaceae	<i>Bergenia stracheyi</i>	Antimicrobiana (NAZIR et al., 2007).
Saxifragaceae	<i>Bergenia purpurascens</i>	Antiúlcero-gênica (LI et al., 2013).
Myrsinaceae	<i>Ardisia japonica</i>	Antidiabética e antiobesidade (LI et al., 2005).
Humiriaceae	<i>Endopleura uchi</i>	Antifúngica (SILVA et al., 2009).
Humiriaceae	<i>Endopleura uchi</i>	Anti-inflamatória (NUNOMURA et al., 2019).

Outras classes de metabólitos secundários podem ser encontradas nas cascas de *E. uchi*, tais como: taninos e saponinas (DE FREITAS et al., 2018; SILVA & TEIXEIRA, 2015), triterpenos pentacíclicos, tais como 3-oxo-friedelina (2) (MUNIZ, 2013), pseudotaraxasterol (3), lupeol (4), α -amirina (5), betulina (6) e 2 β , 3 β -di-hidroxi-urs-12-en-28 oato de metila (7)

e além disso esteróides tais como, sitosterol (8) e estigmasterol (9) foram também identificados (ABREU et al., 2013) nos extratos das cascas (Figuras 7 e 8).

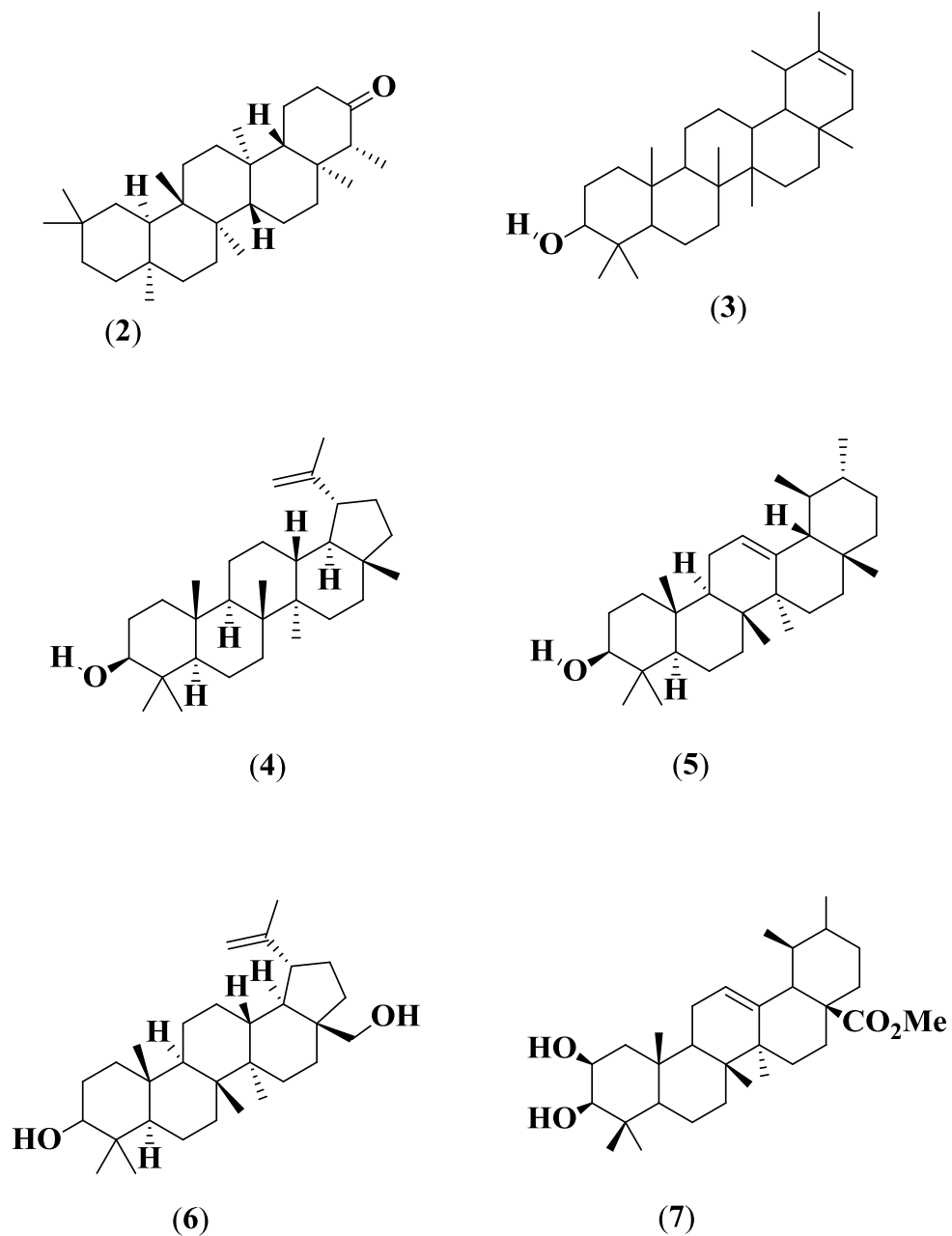


Figura 7. Exemplos de outros constituintes relatados nas cascas da *E. uchi*: 3-oxo-friedelina (2), pseudotaraxasterol (3), lupeol (4), α -amirina (5), betulina (6) e 2 β , 3 β -di-hidroxi-urs-12-en-28 oato de metila (7)

Fonte: Abreu et al. (2013).

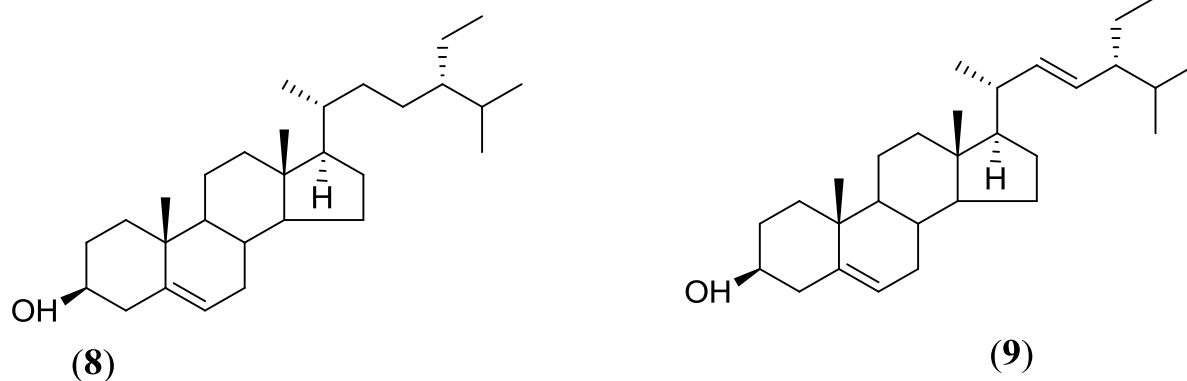


Figura 8. Exemplos de outros constituintes relatados nas cascas da *E. uchi*: sitosterol (8) e estigmasterol (9) relatados nas cascas da *E. uchi*
 Fonte: Abreu et al. (2013).

2.3 Espectrometria de massas e quimiometria

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica baseada na determinação da massa de íons em fase gasosa com base na relação massa/carga (m/z) (PITT, 2009) através de diversos processos de ionização, permitindo com isso, a determinação de sua composição elementar e a elucidação de sua estrutura molecular (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Nas décadas de 1950 e 1970, estudos sobre os produtos naturais aceleraram o emprego de métodos para o isolamento de uma grande variedade de metabólitos secundários (VAN MIDDLESWORTH & CANNELL, 1998). Porém nas últimas décadas, novas metodologias empregadas nas áreas da cromatografia e espectrometria, possibilitando o isolamento de substâncias bioativas sem o dispêndio de muito tempo e purificação de novos compostos de fontes naturais, têm despertado a atenção das indústrias farmacêuticas.

O desenvolvimento de técnicas de ionização, nas décadas de 1980 e 1990, para compostos com altos pesos moleculares (PM) e amostras biológicas ampliou novos e diferentes campos de atuação na espectrometria de massas. Como exemplos, a detecção rápida e perfil químico de compostos à base de cafeína, relatados como alvos terapêuticos ou diagnósticos para a doença de Parkinson, contribuindo com o conhecimento do metabolismo

dos medicamentos (NWABUFO et al., 2019) e na indústria, que examina e sequências proteínas, oligonucleotídeos e polissacarídeos (SILVA et al., 2017).

Além disso, a espectrometria de massas tem demonstrado ser uma técnica útil na prática clínica laboratorial de rotina e na determinação de analitos em matrizes biológicas (RASHED et al., 1997).

A EM é na atualidade uma das principais ferramentas analíticas para a comunidade científica, devido à sua sensibilidade, baixo limite de detecção e seletividade (KOULMAN et al., 2007). A EM e espectrometria de massa (EM/EM) é conhecida como sequencial (MS^n , do inglês, *tandem*) e possui como característica a caracterização de compostos por experimentos de fragmentação, através da dissociação induzida por colisão (DIC), gerando desta forma íons produtos cujos tipos dependem da intensidade de energia aplicada (SILVA et al., 2016; BATAGLION et al., 2015b).

Estudos anteriores de infusão direta com fonte de *electrospray* (IES) demonstraram a potencialidade da técnica no *screening* de vários compostos fenólicos em extratos de plantas, prática que já vem sendo desenvolvida há bastante tempo. Como exemplos, a caracterização de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) e chá verde (*Camellia sinensis*) (BASTOS et al., 2007), assim como de componentes bioativos de espécies da família Malpighiaceae (*Byrsonima coccolobifolia*, *B. verbascifolia* e *B. intermedia*) (PEREIRA et al., 2015). Além disso, possibilita a análise de compostos não voláteis e termolábeis em amostras complexas (MALDINI et al., 2011).

Estudos anteriores têm demonstrado a análise por infusão direta com fonte IES como potencial técnica no monitoramento do processo de envelhecimento de vinhos (SAWAYA et al., 2011) e no controle de qualidade de amostras de própolis brasileira, o que tem permitido distinguir padrões regionais diversos (SAWAYA et al., 2004).

Embora a análise por infusão direta com fonte IES apresente problemas relatados ao efeito de matriz, resultando em redução de sensibilidade e capacidade de identificação de metabólitos (LIN et al., 2010), a técnica fornece informação composicional das substâncias mais ionizáveis e tem demonstrado maior aplicabilidade devido ao seu uso bem-sucedido na desreplicação de biomoléculas, permitindo análises rápidas e caracterização seletiva de amostras de diferentes origens (MOLLER et al., 2007; SCHIOZER et al., 2012; OANCEA et al., 2013).

Avanços na tecnologia de instrumentação analítica possibilitaram o acoplamento de métodos de separação e detecção. Técnicas hífenadas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) têm despertado o interesse científico por ter demonstrado ser uma excelente técnica de separação e que melhor fornece as informações estruturais necessárias (BATAGLION et al., 2015b; LI et al., 2013; DEL-RIO et al., 2004).

O sistema CL-EM/EM é uma combinação que permite obter o padrão de fragmentação característico de um composto e informação sobre sua estrutura química, demonstrando grande potencial na análise qualitativa e quantitativa de substâncias presentes em diferentes matrizes complexas (BATAGLION et al., 2014). Como exemplos, a caracterização e quantificação de substâncias de diversas espécies de *Byrsonima* (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2017), *Camellia sinensis* L. (PAULI et al., 2016), *Unonopsis duckei* (ROCHA et al., 2018).

Além disso, os dados da literatura científica mostram que os métodos CLAE-EM são a melhor escolha para a determinação quantitativa de baixos níveis de hormônios (estrogênios e andrógenos) em matrizes biológicas (FÜLÖP et al., 2017).

Outras abordagens utilizando a espectrometria de massas, porém acoplada à cromatografia gasosa (CG-EM), têm demonstrado ser úteis na avaliação da composição do

aroma de frutos de pitomba (DE SOUZA et al., 2016) e análises dos perfis químicos de espécies de *Unonopsis* para abordagens quimiotaconômicas (DA SILVA et al., 2015).

Enquanto, a espectrometria de massas ambiente dessorção/ionização *sonic-spray* (EASI-EM), tem demonstrando a potencialidade da técnica no monitoramento e controle da qualidade nas indústrias de alimentos, cosméticos e biocombustíveis, como exemplo, a caracterização lipídica do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) (BATAGLION et al., 2015a).

Desta forma, todas as técnicas citadas acima possibilitam inúmeras abordagens analíticas, tanto na busca de novas substâncias com valor farmacológico ou na tentativa de caracterização química de matrizes complexas (LI et al., 2013; SILVA et al., 2016; DEL-RIO et al., 2004; ROCHA et al., 2018).

Para melhor compreensão do alto volume de dados químicos gerados, nas áreas de espectrometria de massas e cromatografia, métodos quimiométricos têm sido aplicados, reduzindo o número de respostas a serem analisadas e favorecendo melhor interpretação de seus efeitos (BRUNS et al., 2006). O que tem permitido a obtenção de informações sobre o comportamento das substâncias e uma melhor compreensão do próprio sistema (SOARES et al., 2007).

A quimiometria consiste na aplicação de ferramentas matemáticas, estatísticas e a lógica formal para o tratamento, a interpretação e previsão de dados químicos, possibilitando diversas aplicações, tais como planejar ou otimizar procedimentos experimentais, extrair o máximo da informação química relevante, através da análise dos dados e obter conhecimento sobre sistemas químicos (GARCIA et al., 2010; PAULI et al., 2016; BRUNS et al., 2006).

A análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamento hierárquico (AHA) têm se tornado recorrente na interpretação desses conjuntos significativos de dados. Como exemplo, um estudo anterior relatou as interações sinérgicas entre diferentes solventes de extração em folhas de *Mikania laevigata* Schultz Bip. conhecida popularmente como guaco e usada para o tratamento tradicional de asma, bronquite, doenças pulmonares crônicas, tosse e reumatismo (GARCIA et al., 2010).

Além disso, a quimiometria demonstrou ser uma ferramenta útil no monitoramento de qualidade, controle de adulteração e como um guia para as possíveis aplicações da grande diversidade de óleos de sementes de diversas espécies (*Bombacopsis glabra*, *Capparis flexuosa*, *Siparuna guianensis*, *Moringa oleifera*, *Hibiscus tiliaceus*, *Virola bicuhyba*, *Pouteria caimito* e *Syagrus coronata*) (DOS SANTOS et al., 2016). A Figura 9 demonstra uma abordagem integrativa baseada na espectrometria de massas, cromatografia e a quimiometria.

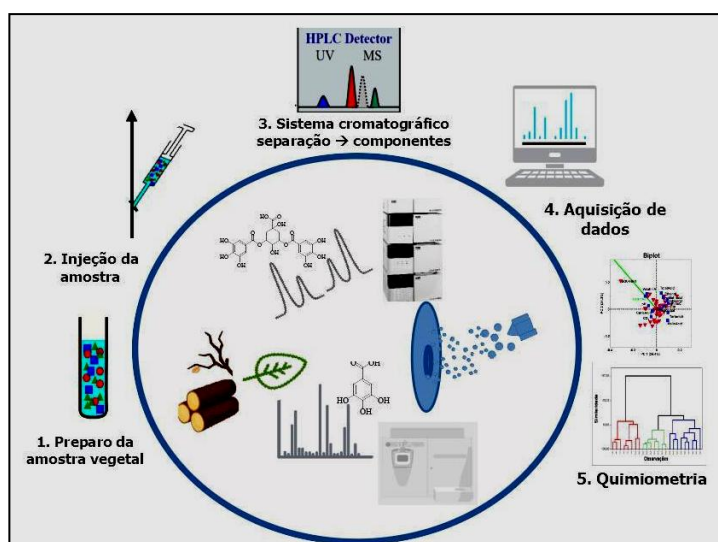


Figura 9. Ilustração de abordagem integrativa baseada na espectrometria de massas, cromatografia e a quimiometria

2.4 Planejamento de misturas simplex centroide

O planejamento de misturas pode ser definido como técnica utilizada para melhorar as características da capacidade extratora de um grupo de solventes, com diferentes polaridades e solubilidades, de tal forma que seja possível observar e identificar o melhor extrator que induz mudanças ou estímulos no sistema, ou seja, que influenciam nos parâmetros de resposta (SOARES & SCARMINIO, 2008).

O uso de matrizes experimentais para otimização de planejamento de misturas possui ampla capacidade no desenvolvimento de métodos analíticos, como exemplos, a otimização da proporção de componentes de fases móveis em cromatografia líquida de espécies vegetais do gênero *Bauhinia* (SOARES & SCARMINIO, 2008) e folhas de *Camellia sinensis* L. (PAULI et al., 2014). Além disso, demonstra ser uma ferramenta quimiométrica útil para outras técnicas.

Segundo ALMEIDA & SCARMINIO (2007), trata-se de um sistema multicomponente, onde a soma de todos os componentes permanece constante para cada amostra, sendo a soma das proporções dos componentes da mistura igual a 100% e nas quais os componentes estejam em proporções iguais. Desta forma, a resposta é medida pela proporção dos seus componentes e não de seus valores absolutos no sistema.

Para um planejamento de misturas com “ n ” componentes, o número de pontos distintos é $2^n - 1$. O planejamento de mistura com três componentes é representado por um triângulo equilátero, em que os pontos localizados nos vértices desse triângulo, representam os componentes puros, onde “ n ” equivale a 1 (100%) (BRUNS et al., 2006). Estes pontos correspondem a permutações do tipo “ n ” para solventes puros, permutações do tipo “ $n/2$ ” de iguais proporções para misturas binárias, permutações do tipo “ $n/3$ ” de igual proporção para misturas ternárias e assim por diante até as permutações do tipo “ $1/n$ ” para o ponto central.

Assim, para este tipo de experimento onde $n = 3$, temos 7 pontos distintos ($8-1 = 7$), sendo 3 pontos respectivos aos solventes puros; 3 pontos respectivos as misturas binárias; 1 ponto respectivo ao ponto central (centroide) que é característico da mistura ternária deste planejamento, onde $n_1 = n_2 = n_3 = 1/3$ (CORNELL et al., 2002). As modelagens de misturas ternárias além de apresentar maior facilidade de interpretação gráfica, possibilita a fácil eliminação de um componente, se este não apresentar efeito significativo (BRUNS et al., 2006).

O planejamento simplex centroide permite reduzir o número de pontos experimentais, proporcionando maior economia de tempo e de reagentes. Além disso, permite que o modelo mais complexo a ser ajustado seja o cúbico especial, onde ao menos um ponto central será incluído no planejamento para permitir modelar e avaliar a influência dos possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos que aparecem na presença de todos os componentes da mistura, por isso é mais empregado (ALMEIDA & SCARMINIO, 2007) (Figura 10).

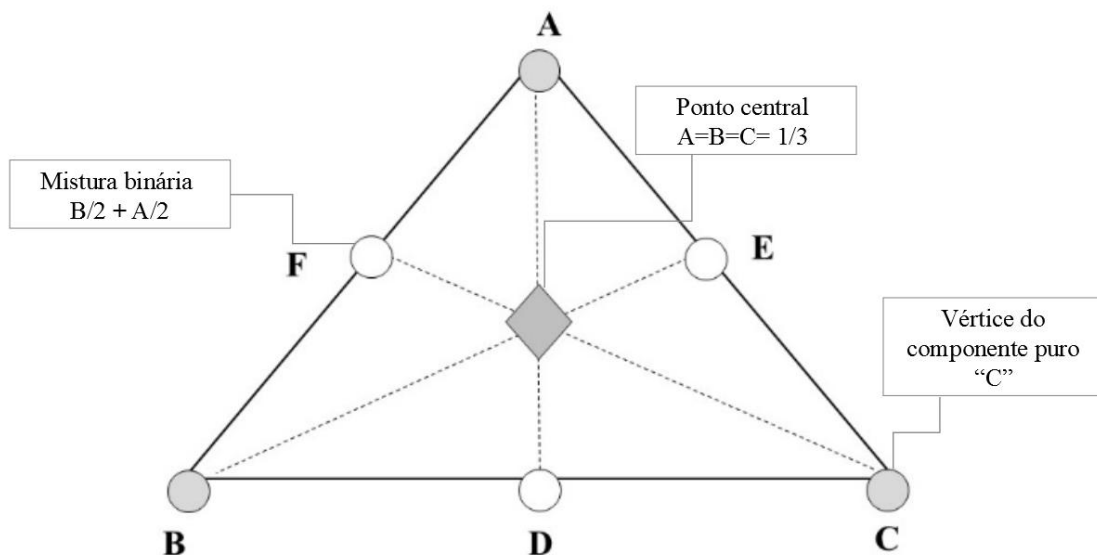


Figura 10. Planejamento de misturas simplex centroide com três componentes (A, B e C)

2.5 Estresse oxidativo e os antioxidantes

2.5.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição celular induzida pelo desequilíbrio entre a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio ERO e ERN nas células e tecidos e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar os intermediários reativos ou de reparar os danos resultantes (SIES, 1993). ERO e ERN são moléculas que podem ser geradas tanto em condições normais como em condições patológicas (NAVARRO-YEPES et al., 2013).

Os seres vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, expressando um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas. O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO/ERN determina a função normal das células. No entanto, quando as células não conseguem manter a regulação da homeostase redox através da desintoxicação das espécies reativas, removendo e/ou reparando os danos produzidos, o estresse oxidativo prevalece (KATERJI et al., 2019).

Os radicais livres são quaisquer espécies químicas, com um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada externa e que capturam elétrons de outras substâncias (PIZZINO et al., 2017). Em concentrações baixo-moderadas são essenciais mediadores de processos celulares, como sinalização celular e homeostase, morte celular, defesa imunológica contra patógenos (UNGVARI et al., 2010).

Os radicais são produzidos endogenamente como subproduto natural do metabolismo celular normal do oxigênio e que podem ser induzidos por fontes exógenas, como luz UV, radiação ionizante, estilo de vida, dieta, estresse e tabagismo (GUBORY et al., 2012). A maioria é extremamente reativa e instável e pode doar ou aceitar um elétron de outra molécula vizinha, por essa razão atua como oxidante ou redutor (TAVERNE et al., 2018).

A produção de ERO depende basicamente de reações enzimáticas e não enzimáticas. As reações enzimáticas, capazes de gerar ERO são aqueles envolvidos na cadeia respiratória, durante o metabolismo do ácido araquidônico mediados por lipoxigenases (LOX) e ciclooxigenases (COX) e por células endoteliais e inflamatórias (GUBORY et al., 2012). Enquanto, as reações não enzimáticas podem ser responsáveis por produção de radical quando o oxigênio reage com os compostos orgânicos ou quando as células são expostas a radiações ionizantes (KATERJI et al., 2019).

Um desequilíbrio entre as reações produtoras de radicais livres (particularmente ERO) é capaz de causar danos às moléculas biológicas vitais, tais como ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas, carboidratos e lipídeos (UNGVARI et al., 2010). No entanto, o organismo vivo é equipado com sistemas de defesa antioxidante que mantêm o equilíbrio entre os estados de redução e oxidação (KATERJI et al., 2019). A Figura 11 demonstra o mecanismo de estresse oxidativo na lesão tecidual e defesa antioxidante natural.

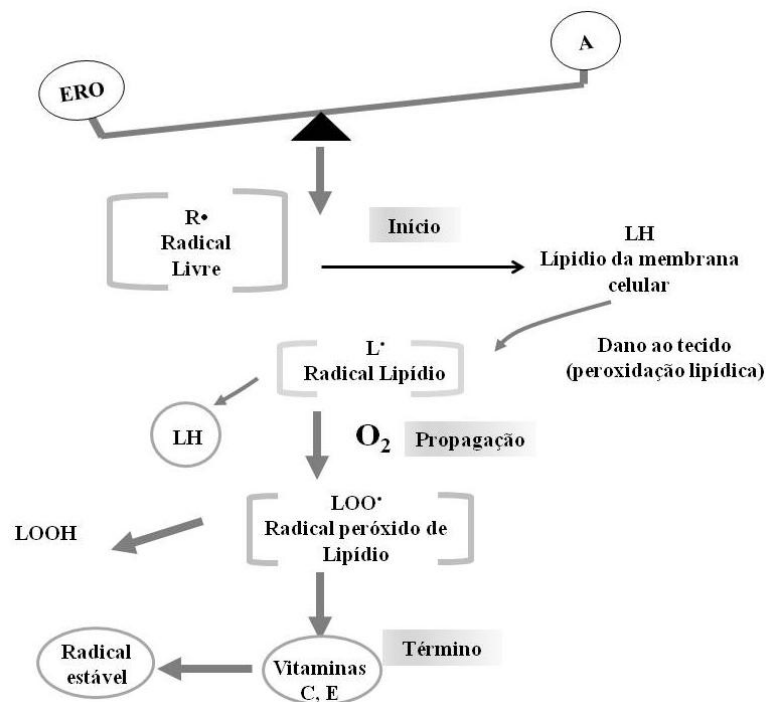


Figura 11. Mecanismo de estresse oxidativo em lesão tecidual e defesa antioxidante natural
 Fonte: Katerji et al. (2019).

Nos últimos cinco anos, ocorreram 84.620 publicações demonstrando o interesse nas pesquisas sobre o estresse oxidativo (NCBI, 2019) e a consistente relação que este apresenta com o processo natural de envelhecimento e com uma ampla variedade de doenças crônicas, como exemplos, esclerose múltipla (NWABUFO et al., 2019), artrite reumatoide e câncer (PIZZINO et al., 2017).

NAVARRO-YEPES et al (2013) destacou que o aumento do acúmulo de ERO e ERN é uma característica comum na morte celular neuronal e está associada a distúrbios neurodegenerativos, como doenças de Alzheimer e Parkinson, além de acidente vascular cerebral e lesão cerebral traumática.

O desenvolvimento de estratégias que possam atingir seletivamente o estresse oxidativo e o desequilíbrio redox pode representar importantes abordagens terapêuticas contra uma ampla variedade de doenças crônicas. Portanto, é de grande importância encontrar novas fontes de antioxidantes que sejam seguros, de baixo custo e de origem natural, que possam ser utilizados na preparação de produtos alimentícios e farmacêuticos e em substituição aos antioxidantes sintéticos, questionados quanto à sua inocuidade. Desta forma, novas pesquisas direcionadas a busca de substâncias naturais que exibam, por exemplo, propriedade funcional (BATAGLION et al, 2015) demonstra ser vital.

2.5.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo em baixas concentrações, podem inibir ou diminuir os processos de oxidação em seres vivos (SIES, 1993), influenciando na qualidade nutricional dos alimentos, na rancidez dos produtos cosméticos e no progresso de várias doenças, como exemplos, a prevenção do Parkinson (NWABUFO et al., 2019) e distúrbios do envelhecimento (PEIXOTO et al., 2019).

SIES (1993) classificou os antioxidantes em dois grupos principais, substâncias enzimáticas ou não enzimáticas. O sistema enzimático é formado por enzimas e exerce sua função inibindo o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio, produzidos endogenamente (NAVARRO-YEPES et al., 2013; KATERJI et al., 2019). Como exemplos de antioxidantes enzimáticos, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (UNGVARI et al., 2010).

Enquanto, a defesa não enzimática pode ser dividida em antioxidantes hidrofílicos (glutathione, vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina A e vitamina E). Em sua maioria, são obtidos de fontes alimentares (vegetais, frutas, chás), compostos fenólicos (ácido gálico e ácido caféico, rutina, quercetina) e minerais (Se e Zn). Além dos antioxidantes endógenos, como exemplos, o ácido lipóico, a glutathione, a L-arginina e a coenzima Q10 (PIZZINO et al., 2017). A Figura 12 descreve as estruturas dos principais agentes de defesa antioxidantes não enzimáticos.

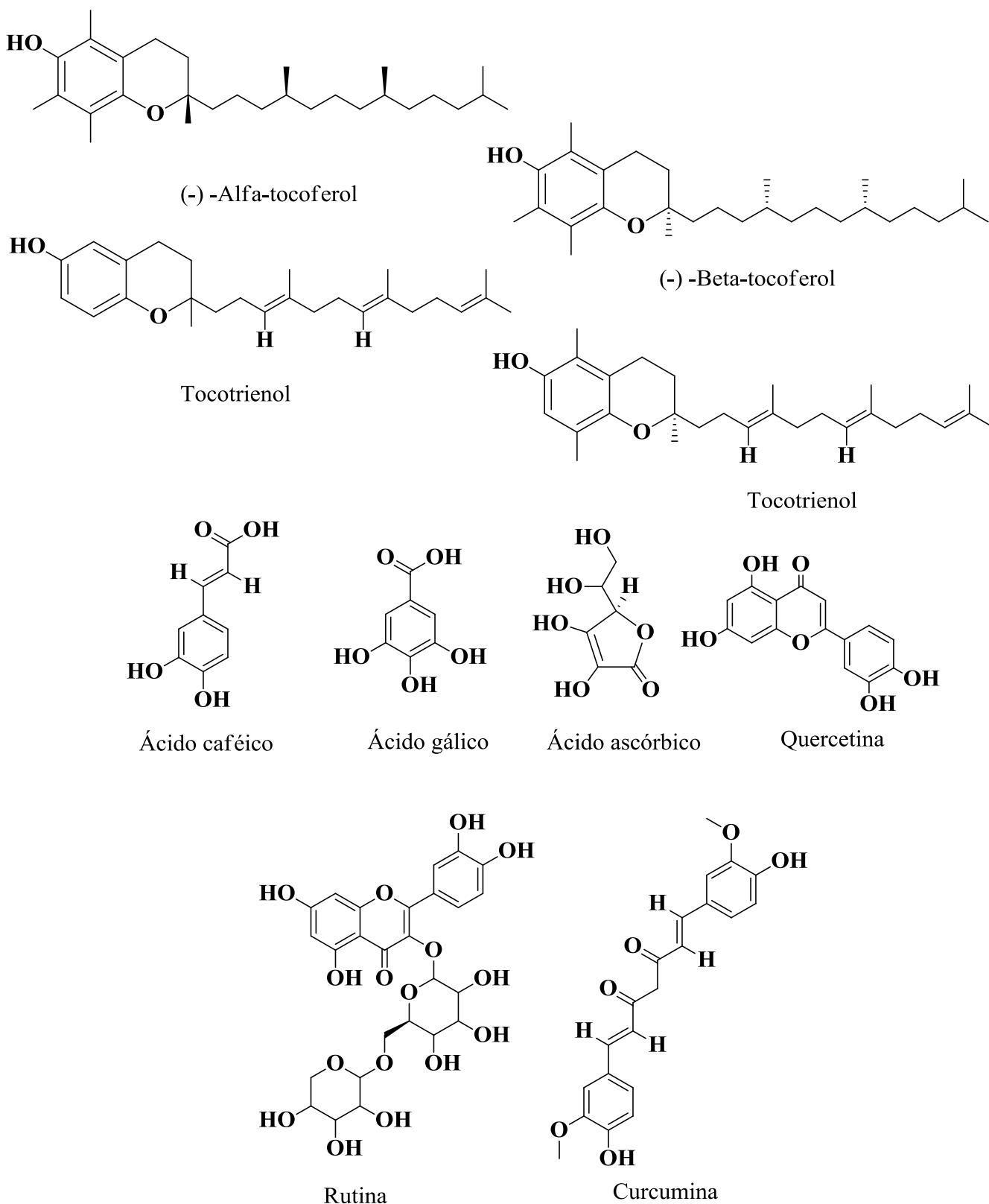


Figura 12. Principais agentes de defesa antioxidantes não enzimáticos
 Fonte: Ali et al. (2019); Becker et al. (2019); De Freitas et al. (2018).

Entre os constituintes antioxidantes naturais, os polifenóis mostraram-se os mais bioativos e conseqüentemente, as classes mais estudadas (RUFINO et al., 2010). São substâncias que contêm um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais, como os ésteres, glicosídeos e etc., com potencial para agir como antioxidantes, inibindo assim os danos oxidativos nas células humanas (LEE et al., 2014).

Os polifenóis, amplamente disseminados entre espécies de plantas são os antioxidantes mais comuns e importantes na dieta humana, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de espécies de plantas (JING et al., 2015; GUILHON-SIMPLICIO et al., 2017; SILVA et al., 2019) e em frutos, como exemplos, polpas de açaí do Amazonas, acerola, abacaxi, taperebá e pitomba (BATAGLION et al., 2015b; DE SOUZA et al., 2016).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos fenólicos, caracterizados pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na estrutura molecular, o que confere potencial para atuar como antioxidantes (MARQUES & FARAH, 2009). Apresentam-se em dois subgrupos: ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóico possuem sete átomos de carbono (C6-C1), sendo incluídos neste subgrupo, o ácido gálico, os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, elágico e sirínico. Enquanto, os hidroxicinâmicos apresentam em sua estrutura nove átomos de carbono (C6-C3) e possuem como principais representantes os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumaríco e *trans*-cinâmico (BRAVO, 1998) ou a esterificação destes ácidos com o ácido quínico, formando os ácidos clorogênicos (MARQUES & FARAH, 2009).

Os flavonoides representam uma classe de compostos polifenóis, em sua maioria possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas

ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, amplamente representada nas plantas, responsáveis por diversas atividades farmacológicas (JING et al., 2015). São compostos de biossíntese mista, provenientes da via de poliacetato e da via chiquimato. Nos compostos tricíclicos, a estrutura consiste de dois anéis aromáticos, A e B, ligados por meio de uma cadeia de três carbonos, normalmente na forma de um anel heterocíclico, C. (Figura 13).

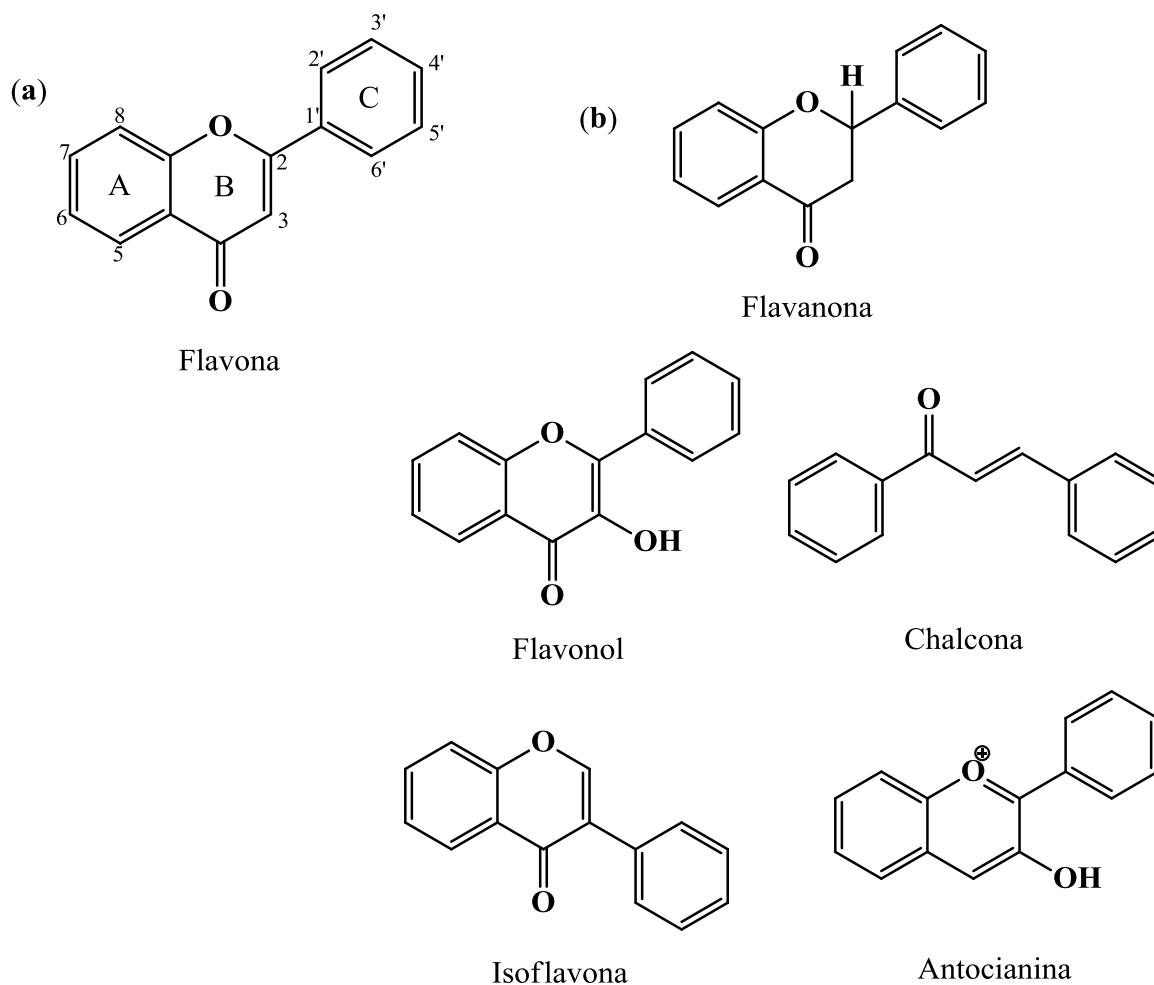


Figura 13. Estrutura, numeração básica (a) e classificação de flavonoides (b)
 Fonte: Mierziak et al. (2014).

De acordo com o nível de oxidação e o padrão de substituição no anel central, os flavonoides são distribuídos em classes como chalconas, auronas, flavanonas, flavonas, flavonois, isoflavonoides e antocianinas, substâncias frequentemente presentes nas plantas, como *O*-glicosídeos ou *C*-glicosídeos, mas também podem ocorrer como metilas, acilas, na forma prenilada, ou mesmo como uma aglicona (MIERZIAK et al., 2014).

Diversos estudos sobre os benefícios biológicos dos polifenóis têm sido relatados como importantes remédios naturais com vários constituintes benéficos à saúde, como exemplos, as catequinas presentes nos chás verdes (*Camellia sinensis*) (ZHAO et al., 2011) e ácidos fenólicos na erva-mate (*Ilex paraguensis*) (BASTOS et al., 2007). As figuras 14 e 15 demonstram os principais constituintes fenólicos em amostras de chás verdes e erva-mate, respectivamente.

Além disso, alguns estudos sugerem que a menor incidência e prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo podem estar correlacionadas à ingestão de frutas ricas em constituintes fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) e vitaminas C, E e A (ALI et al., 2019; BECKER et al., 2019; DE FREITAS et al., 2018).

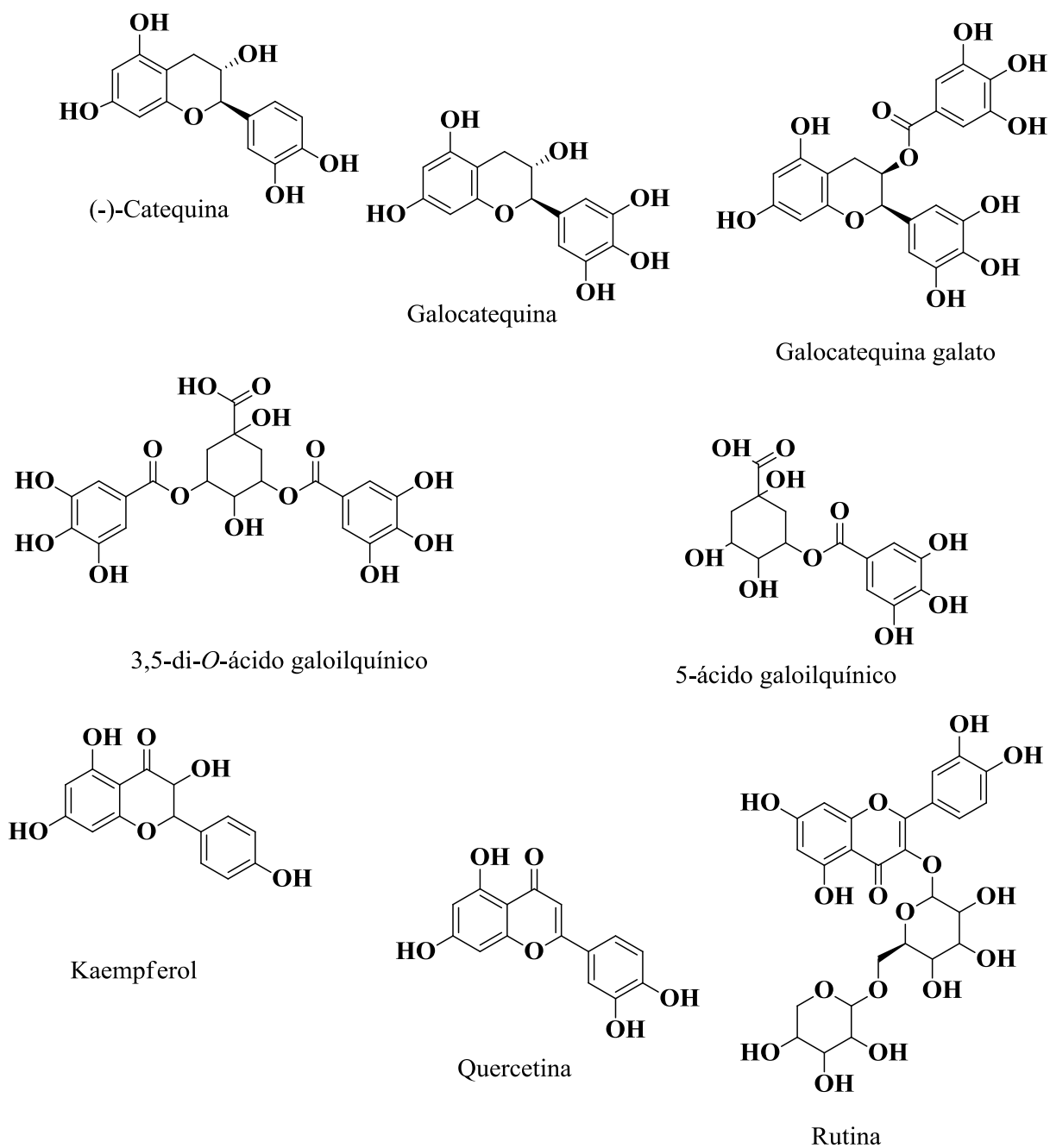


Figura 14. Constituintes fenólicos da espécie *Camellia sinensis*
 Fonte: Zhao et al. (2011).

Neste contexto, o conhecimento de novos antioxidantes de fontes naturais pode contribuir e orientar ainda mais aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Por exemplo, um estudo destacou a extração de betanina da raiz de beterraba (*Beta vulgaris* L.), como potente corante natural e elevada capacidade antioxidante (ANTIGO et al., 2018). Enquanto, SHENG et al. (2000) relatou o consumo de suplementos alimentares obtidos a partir das cascas de *Uncaria tomentosa*. A Figura 16 demonstra exemplos de estruturas de antioxidantes de fontes naturais.

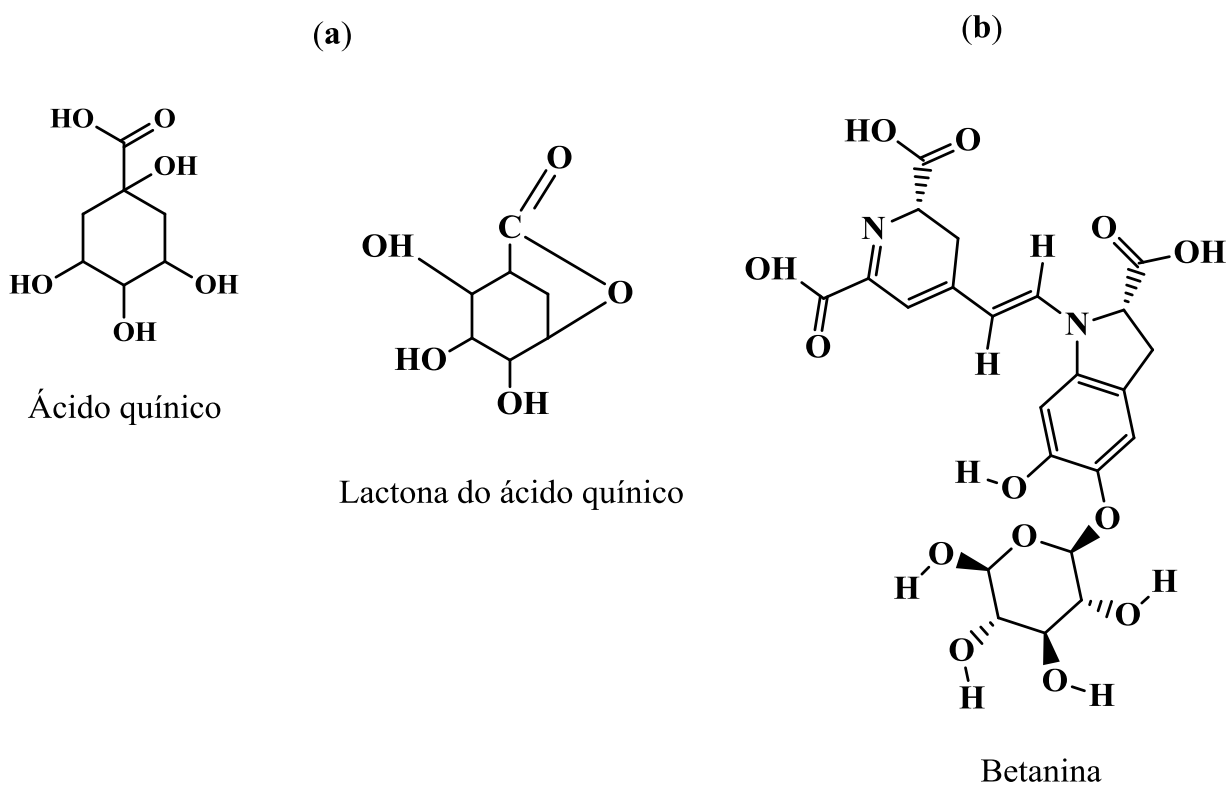


Figura 16. Exemplos de estruturas de antioxidantes de fontes naturais: ácido quínico e lactona de ácido quínico (a) e betanina (b)

Fonte: Antigo et al. (2018); Sheng et al. (2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Contribuir com o conhecimento químico e biológico das cascas de *Endopleura uchi*, através da determinação da composição fenólica e avaliação de seu potencial antioxidante.

3.2 Específicos

- Obter os extratos das cascas de *E. uchi* através do planejamento de misturas simplex centroide;
- Analisar por IES-EM os extratos obtidos e realizar análises multivariadas (AHA e ACP) dos conjuntos de dados obtidos;
- Identificar por IES-EM/EM os marcadores químicos dos extratos obtidos da casca de *E. uchi*;
- Avaliar os extratos quanto ao conteúdo fenólico total e potencial antioxidante *in vitro*;
- Avaliar o extrato promissor para constituintes fenólicos quanto à citotoxicidade *in vitro*;
- Avaliar o extrato promissor para constituintes fenólicos quanto à atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP);
- Quantificar as substâncias fenólicas biologicamente promissoras por CLAE-EM/EM.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes

Todos os solventes utilizados na cromatografia e em experimentos de EM eram grau CLAE da Tedia (Fairfield, OH, EUA) e a água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

4.2 Materiais e equipamentos

Os padrões, incluindo ácido gálico ($\geq 98\%$), ácido quínico ($\geq 97\%$), galocatequina galato ($\geq 95\%$), quercetina ($\geq 95\%$) e os reagentes de *Folin-Ciocalteu*, hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e o padrão de bergenina ($\geq 98\%$) foi adquirido da CNLAB (Nutrição, CHINA).

Outros materiais e equipamentos:

- Balança analítica: OHAUS, classe 1 (máx. 210 g – Mín. 0,01 g);
- Pipeta automática: Thermo Fisher Scientific;
- Moinho: Modelo Willey TE-680, com quatro facas;
- Banho ultrassônico: Modelo UNIQUE USC -2800;
- Equipamento de Liofilização: Modulyo D-230;
- Leitor de multiplacas de absorvância: ELX 808 Reader (Biotek, Burlington, VT).

4.3 Análise cromatográfica

4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises em CLAE analítico foram realizadas em cromatógrafo modelo Surveyor Plus® (Thermo Scientific) equipado com bomba *Surveyor LC Pump Plus*, autoamostrador *Surveyor Autosampler Plus*, válvula de injeção Rheodyne (25 μ L), operando simultaneamente

com detector de arranjo de diodos (DAD) *Surveyor PDA Plus Detector* e de espectrometria de massas (EM) (TSQ *Quantum Access*).

4.4 Métodos espectrométricos

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetros do tipo *íon trap* modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific®) e triplo-quadrupolo modelo TSQ *Quantum Access* (Thermo Scientific®), operando com fonte de *electrospray* (IES) e funcionamento em modo de íon negativo para realizar as análises por IES-EM e IES-EM/EM, respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica (CA) da UFAM.

4.5 Coleta e identificação

As cascas de *E. uchi* foram coletadas em fevereiro de 2016 na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Km 26 ao longo da rodovia AM-010, na cidade de Manaus, Amazonas) de um indivíduo previamente identificado durante a execução do Projeto Flora da Reserva Ducke (RIBEIRO et al., 1999). O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de cadastro A7C1655. A exsicata da espécie foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Figura 17) sob o número de registro # 177673.

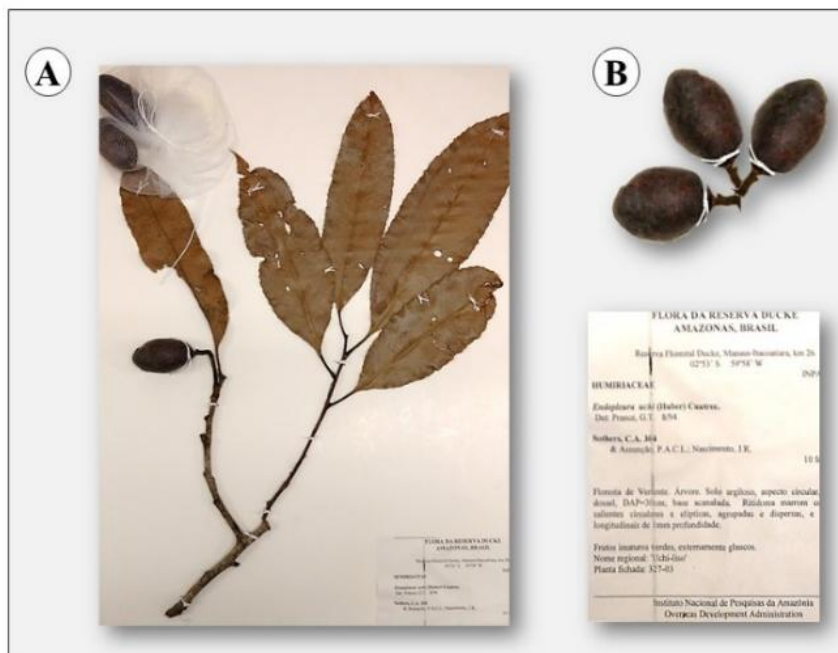


Figura 17. Imagens do herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - AM: (a) *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. e (b) frutos da espécie

4. 6 Preparação dos extratos através do planejamento de misturas simplex centroide

Após a coleta, as cascas da planta foram secas em uma estufa de circulação de ar a 40 °C durante 24 h, sendo, em seguida, trituradas em moinho de quatro facas e pesadas. As extrações foram realizadas com aproximadamente 5 g de material seco, que foi extraída com 30 mL de solvente puro (grau HPLC) ou uma mistura de solventes [diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH)] em diferentes proporções de acordo com um planejamento de misturas simplex centroide (Figura 18) (SOARES & SCARMINIO, 2008). O critério de escolha do extrator baseou-se em diferentes características dos solventes, de acordo com o triângulo de seletividade de solventes proposto por SNYDER (1978) para cromatografia.

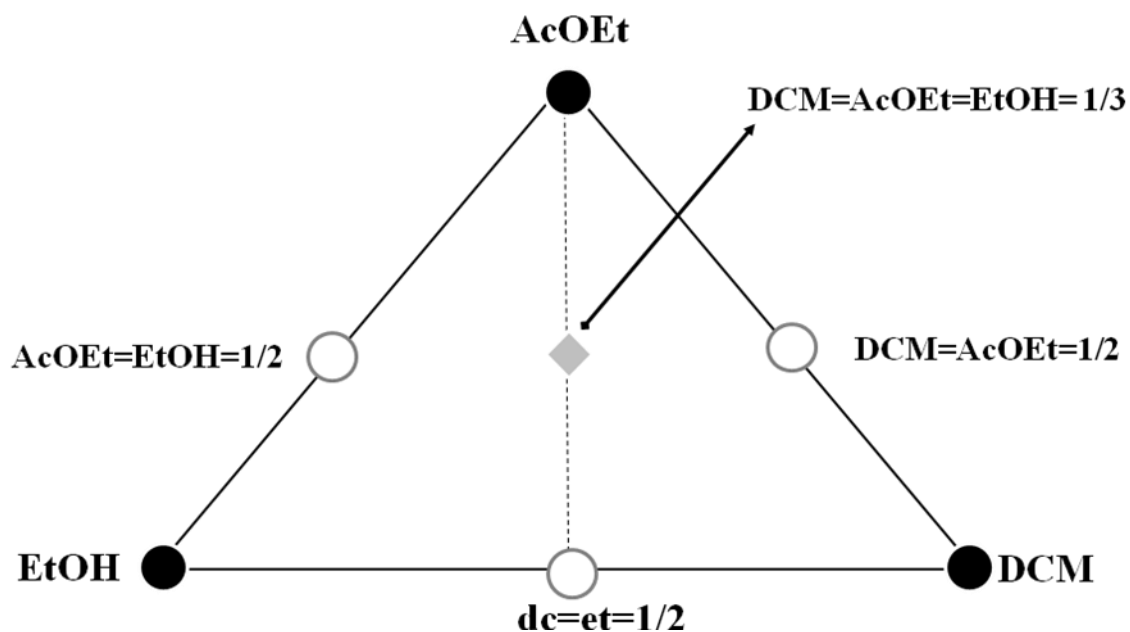


Figura 18. Esquema do planejamento de misturas simplex centrado preparado utilizando misturas de três componentes: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH)

O procedimento de extração foi realizado em banho de ultrassom por 15 min (DENT et al., 2015), a temperatura constante (31 °C). Os experimentos foram realizados em banho de ultrassom de 40 kHz (modelo USC-2800, Thornton, São Paulo, Brasil). Os extratos foram filtrados através de papel de filtro e o solvente foi evaporado até à secura sob uma corrente de nitrogênio para produzir sete extratos brutos. Logo após todos os extratos foram liofilizados e pesados, o rendimento de cada extrato foi calculado dividindo-se a massa do extrato pela massa de amostra total e o resultado multiplicado por 100. Todas as extrações foram realizadas em triplicata para cada solvente.

4.7 Análise por IES-EM dos extratos obtidos através do planejamento de misturas simplex centroide e tratamento quimiométrico dos dados

Soluções estoque (1 mg.mL^{-1}) dos extratos das cascas de *E. uchi* foram preparadas em metanol (grau HPLC). Alíquotas ($5 \text{ }\mu\text{L}$) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas.

Todos os espectros de massas foram registrados em modo de monitoramento contínuo (Thermo LCQ Fleet Tune application) utilizando-se um equipamento LCQ Fleet, equipado com fonte de IES e operando no modo negativo de aquisição para as análises por IES-EM e IES-EM/EM. As amostras foram infundidas na fonte de IES através da bomba seringa do equipamento ($10 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$). As condições analíticas da análise foram as seguintes: *spray voltage*, 5 kV; *sheath gas*, 10 arb; *auxiliary gas*, 5 arb; *sweep gas*, 0 arb; *capillary temp*, 200 °C; *capillary voltage*, 40 V; *tube lens*, 115 V; *mass range*, m/z 100 a 600. O Argônio foi usado como gás de colisão e os espectros de IES-EM/EM foram obtidos a partir da aplicação de energia de colisão de 30 a 35 eV (SILVA et al., 2016). Os espectros foram obtidos e processados através do software Xcalibur 2.07.

As análises multivariadas dos dados obtidos a partir das análises por IES-EM foram realizadas através do software *Chemoface*, versão 1.5 (NUNES et al., 2012). Íons com intensidade abaixo de 5% em relação aos íons mais abundantes foram negligenciados durante a análise dos dados (SILVA et al., 2016). Os dados foram normalizados e a análise de componentes principais (ACP) foi calculada através da variação dos íons registrados (variáveis), sendo a análise hierárquica de agrupamentos (AHA) calculada através da distância euclidiana e média de ligação das três principais componentes, cuja variância acumulada representa 96,88%.

4.8 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

4.8.1 Conteúdo fenólico total (CFT)

O conteúdo fenólico total de cada extrato foi obtido pelo método espectrofotométrico com o reagente *Folin-Ciocalteu*, de acordo com o método previamente descrito com algumas modificações (JING et al., 2015).

As amostras foram solubilizadas em metanol (grau CLAE) na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. A análise foi realizada em microplacas de 96 poços e 20 µL de cada solução de extrato a 1 mg.mL⁻¹ foi misturado com 150 µL da solução de *Folin-Ciocalteu* (previamente diluído 10 vezes com água destilada). Após 5 min, 150 µL de solução de bicarbonato de sódio a 6% foram adicionados à mistura e deixado em repouso por 90 min, em temperatura ambiente e protegido da incidência da luz. A absorbância da mistura foi medida a 750 nm com um leitor de multiplacas de absorbância ELX 808 Reader.

Foi preparada uma curva de calibração usando uma solução padrão de ácido gálico, em várias concentrações (300 - 4,68 µg.mL⁻¹) e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato (mg de EAG/100 g de extrato). A presença de substâncias fenólicas na amostra foi detectada pela conversão da coloração amarela do meio reacional para a coloração azul. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8.2 Atividade antioxidante pelo método DPPH

O potencial antioxidante dos extratos das cascas de *E. uchi* foi determinado pelo sequestro ou captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com o método previamente descrito com algumas modificações (JING et al., 2015). As amostras foram solubilizadas em metanol (grau CLAE) na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. A análise foi realizada em microplacas de 96 poços e 30 µL de solução de cada extrato foi dissolvido em

metanol em várias concentrações ($500-7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para a elaboração da curva de inibição da atividade do radical. As amostras foram misturadas a $270 \mu\text{L}$ de DPPH ($100 \mu\text{M}$). O controle negativo foi preparado usando $30 \mu\text{L}$ de metanol (grau CLAE) e $270 \mu\text{L}$ de DPPH ($100 \mu\text{M}$) e para o branco foi utilizado $300 \mu\text{L}$ de metanol. Foi preparada uma curva de calibração usando uma solução padrão de quercetina ($100-1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$), dissolvida em metanol. Após repouso por 30 min em temperatura ambiente e protegida da incidência da luz, a absorbância das misturas foi medida a 515 nm com um leitor de multiplacas de absorbância ELX 808 Reader. O ensaio foi realizado em triplicata.

Nesse processo, ocorre uma reação de oxirredução, onde o radical DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido, alterando a coloração da mistura de roxo para amarelo. As absorbâncias obtidas foram convertidas em porcentagem da atividade antioxidante (AA%) segundo a equação 1:

$$\text{AA\%} = 100 - \{[(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] / \text{Abs. controle}\} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

AA= atividade antioxidante

Abs. controle = absorbância do controle (da solução de DPPH)

Abs. branco = absorbância do branco (solução de metanol)

Abs. amostra = absorbância da amostra (extratos de cascas de *E. uchi*)

Após obter os percentuais da atividade antioxidante (AA%) de cada uma das amostras analisadas, foi construída uma curva onde a abscissa representa as concentrações da amostra analisada e a coordenada representa a AA%. Os resultados foram expressos como concentração inibitória de 50 % para a inibição do radical DPPH (CI_{50}).

4.8.3 Atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico

O poder de redução do ferro foi obtido pelo método espectrofotométrico com o reagente FRAP, de acordo com o método previamente descrito (RUFINO et al., 2010).

O ensaio antioxidante pelo método FRAP produz resultados rápidos e reprodutíveis sendo aplicados sem limitações em extratos aquosos e alcoólicos. O ensaio tem como objetivo verificar a habilidade das amostras em reduzir o complexo Fe^{3+} -TPTZ [2,4,6-tri-(2-piridil) - 1,3,5-triazina ao complexo Fe^{2+} -TPTZ (azul) por antioxidantes presentes nas amostras (PULIDO et al., 2000).

O reagente FRAP foi preparado na proporção de 10:1:1 misturando-se 25,0 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,25 M, 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6- tripiridil- 1,3,5-triazina, 10 mM) em 2,5 mL de solução de cloreto férrico (20 mM). A determinação da redução dos íons Fe^{+3} para Fe^{+2} pelas amostras foi calculada por meio da construção da curva analítica de sulfato ferroso (2 mM), em várias concentrações (500 a 2000 μM).

As amostras foram solubilizadas em metanol (grau CLAE) na concentração de 1,0 mg. mL^{-1} . A análise foi realizada com alíquotas de 90 μL da solução do extrato dissolvidos em 270 μL água mili-Q. Em seguida, as amostras foram misturadas a 2,7 mL do reagente FRAP. O branco foi obtido com 270 μL de água mili-Q misturado a 2,7 mL de reagente FRAP. Após repouso por 30 min em temperatura ambiente e protegida da incidência da luz, a absorbância das misturas foi medida a 595 nm com um espectrofotômetro UV-Visível 201/220 (Evolution™). A formação do complexo Fe^{+2} -TPTZ é observada pela intensa cor azul. Os resultados foram expressos em mmol de Fe^{+2} . mg^{-1} de extrato seco. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.9 Citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada pelo método Alamar Blue de acordo com o método previamente descrito com algumas modificações (AHMED et al., 1994). O Alamar Blue, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Em células com proliferação o Alamar Blue é reduzido (AHMED et al., 1994). A forma oxidada é azul e não fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável).

As linhagens celulares utilizadas foram MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

O extrato a base de etanol foi solubilizado em solvente DMSO (0,2%) e diluído em meio de cultura nas concentrações decrescentes 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 mg.mL⁻¹.

As células cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM, foram transferidas para placas de 96 poços na concentração celular de 0,5 x 10⁴ células/ poço por 24 h, em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Após 24h, foi adicionada a amostra nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg.mL⁻¹ e a placa permaneceu em cultura por 24 horas nas mesmas condições.

O grupo controle negativo recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO 0,1% e como controle positivo de fármaco padrão de morte foi utilizado doxorrubicina (Sigma-Aldrich, Alemanha) nas concentrações de 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 µM. Após 24 h, foi acrescentado 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% -1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) em cada poço da placa. Após 3 h de metabolização de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa 30 min antes do término, a fluorescência foi

medida usando-se um leitor de microplacas Elisa (DTX-800 Beckman Coulter) no modo fluorescência (Filtros de excitação 540 nm e de emissão 585 nm). O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{F_t \times 100}{\Delta F_b}$$

Onde:

F_t = (fluorescência da célula + meio + amostra + resazurina)

ΔF_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina)

Os dados foram analisados em relação ao controle utilizando o programa de estatística GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.10 Quantificação dos princípios ativos das cascas de *E. uchi* por CLAE-EM/EM

4.10.1 Preparo dos extratos etanólicos

Após a seleção do solvente extrator promissor para os constituintes fenólicos e avaliação do potencial antioxidante das cascas de *E. uchi*, foram preparados novos extratos a base do solvente etanol seguindo um protocolo simplificado para extração seletiva dos compostos alvos, de acordo com método previamente descrito (SILVA et al., 2019).

As extrações foram realizadas com aproximadamente 1 g de material pulverizado, extraído por diferentes volumes (50, 100, 150 mL) durante 15 min, a 31° C. Os experimentos foram realizados em banho de ultrassom de 40 kHz (modelo USC-2800, Thornton, São Paulo, Brasil). Os extratos foram filtrados através de papel de filtro e o solvente foi evaporado até à secura sob uma corrente de nitrogênio para produzir três extratos brutos. Após evaporação do solvente, todos os extratos foram liofilizados e pesados, o rendimento de cada extrato foi calculado dividindo-se a massa do extrato pela massa de amostra total e o resultado

multiplicado por 100. Todas as extrações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

4.10.2 Análise por CLAE-EM/EM dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos foram solubilizados em metanol a 1 mg.mL^{-1} e injetados ($2 \text{ }\mu\text{L}$) em uma coluna *Phenomenex* Luna C18 ($5 \text{ }\mu\text{m}$, $150 \times 4,6 \text{ mm}$) (Torrance, CA, USA). Os padrões químicos foram adquiridos de acordo com as várias substâncias descritas na Tabela 4 e injetados para comparar o tempo de retenção (t_r) e m/z com as substâncias identificadas tentativamente.

As separações foram realizadas em cromatógrafo modelo Surveyor Plus® (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), usando fase móvel binária. A fase móvel consistiu em água ultrapura (A) e metanol (B), grau CLAE, no fluxo de 1 mL.min^{-1} . A eluição do tipo gradiente, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foi a seguinte: 0-10 min, 20-80% B; 10-21 min, 80% de B, 21-26 min, 80-20%; 26-36 min, 20% B. A temperatura do amostrador automático foi mantida a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume de injeção foi de $10 \text{ }\mu\text{L}$. As absorções foram registradas de 220 a 400 nm. A saída do detector por arranjo de diodos (DAD) foi conectada através de uma válvula (vazão de $0,3 \text{ mL.min}^{-1}$) a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo TSQ *Quantum Access* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), equipado com fonte de ionização *electrospray* (IES), operando em modo de monitoramento de íon selecionado – SIM. Os seguintes parâmetros de operação foram utilizados para analisar as cascas de *E. uchi*: *spray voltage*, 3000 V; *sheath gas pressure*, 35 (arb); *ion sweep gas pressure*, 0.0 (arb); *aux gas pressure*, 15 (arb); *capillary temperature*, $270 \text{ }^\circ\text{C}$; *capillary offset*, -35 V; *skimmer offset*, 0 V; na faixa de m/z 100 a 400. Os espectros foram obtidos e processados através do software Xcalibur 2.07.

4.10.3 Preparação das curvas analíticas padrão de bergenina, ácido gálico, ácido quínico e galocatequina galato

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas soluções estoque (1 mg.mL⁻¹) dos padrões em metanol, sendo diluídos às concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 ppm e analisada as soluções das misturas de padrões (MIX) para a determinação da curva de calibração. A faixa de concentração abrangeu o intervalo de 5 a 100 ppm.

A quantificação dos extratos foi realizada pelo método do padrão externo, a partir das curvas de calibração obtidas pela injeção da solução padrão “MIX”. As concentrações dos padrões nos extratos foram calculadas por regressão linear através da equação da reta obtida da curva analítica resultante da plotagem da média das áreas versus as concentrações dos padrões. Todas as análises dos extratos etanólicos das cascas de *E. uchi* foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

4.11 Análise estatística

Todas as análises dos extratos das cascas de *E. uchi* foram realizadas em triplicata e os resultados, expressos como média \pm desvio padrão (DP). A comparação das médias foi realizada por análise de variância simples (*One way ANOVA*) ($p < 0,05$), seguida pelo teste *post hoc de Tukey* [diferença honestamente significativa (HSD) ($p < 0,01$)].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração dos constituintes fenólicos através do planejamento de misturas simplex centroide

Os constituintes fenólicos das cascas de *E. uchi* foram extraídos por 7 diferentes soluções extrativas, usando solventes puros ou misturas dos três componentes: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH), preparadas conforme descrito no item 4.6. O critério de escolha baseou-se em diferentes características dos solventes, em termos de polaridade proposto por SNYDER (1978) para a cromatografia. A Tabela 2 mostra as composições dos solventes e os respectivos percentuais dos rendimentos dos extratos com base no peso do material seco.

Tabela 2. Rendimentos (% m/m) dos extratos brutos obtidos por diferentes soluções extratoras utilizando solventes puros ou misturas de solventes

Extrato	Solvente (v/v, mL)			Rendimento (% m/m) ^d
	DCM ^a	AcOEt ^b	EtOH ^c	
1	100	0	0	0,5 ± 0,01
2	0	100	0	3,3 ± 0,12
3	0	0	100	43,1 ± 0,01
4	50	50	0	0,2 ± 0,04
5	50	0	50	5,3 ± 0,30
6	0	50	50	13,2 ± 0,75
7	33,3	33,3	33,3	5,9 ± 0,60

Diclorometano^a; acetato de etila^b; etanol^c; percentual dos rendimentos dos extratos com base no peso do material seco^d. Resultados expressos como média ± desvio padrão.

O rendimento dos extratos (% g de extrato por g de material vegetal seco) variou de 0,2 ± 0,04 a 43,1 ± 0,01 (% m/m). Os maiores rendimentos foram observados para o etanol puro (EtOH) (43,1%) e a mistura de etanol e acetato de etila (EtOH + AcOEt) (13,2%),

enquanto os menores rendimentos foram obtidos da combinação de diclorometano e acetato de etila (DCM + AcOEt) (0,2%) e diclorometano puro (DCM) (0,5%). Essa observação está de acordo com os dados da literatura que relataram rendimentos dos extratos etanólicos das cascas de *E. uchi* com valores de 7 a 17% (SILVA & TEXEIRA, 2015; OLIVEIRA et al., 2017), destacando a influência dos processos extrativos sobre as características dos extratos.

5.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

O conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante de cada extrato foram obtidos como descrito nos itens **4.8.1** e **4.8.2**, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os compostos fenólicos são considerados substâncias antioxidantes e o seu estudo nos últimos anos tem revelado amplo interesse, principalmente porque podem oferecer benefícios significativos à saúde dos seres humanos. O teor de substâncias fenólicas nos diferentes extratos de *Endopleura uchi* foi determinado pelo método de *Folin–Ciocalteu* descrito por JING et al. (2015). Foi preparada uma curva de calibração usando uma solução padrão de ácido gálico, em várias concentrações (300 - 4,68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 19) e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de ácido gálico equivalente (EAG) por 100 g de extrato.

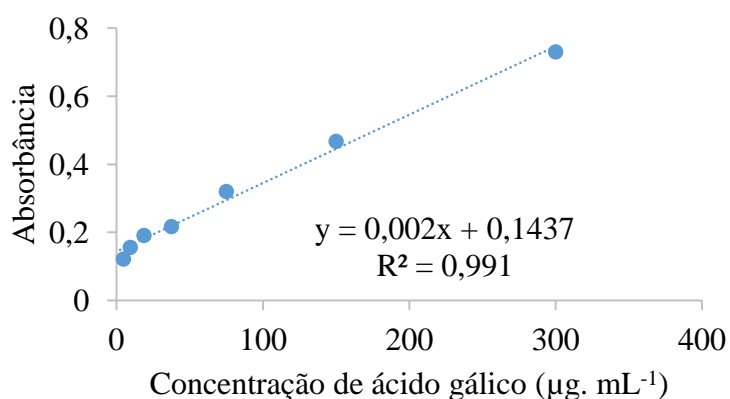


Figura 19. Curva analítica do padrão ácido gálico (AG) para quantificação de compostos fenólicos

Os valores de CI_{50} (concentração da amostra necessária para diminuir 50% de radicais livres) das amostras analisadas foram obtidos a partir da análise de regressão linear, em triplicata e mostraram bons valores de correlação ($R^2 > 0,99$). Quanto menor o valor de CI_{50} , maior a capacidade antioxidante da amostra. Foi utilizada a quercetina como padrão e a curva analítica esta apresentada na Figura 20.

A Tabela 3 relata o conteúdo fenólico total e o potencial antioxidante dos extratos obtidos através do planejamento de misturas simplex centroide.

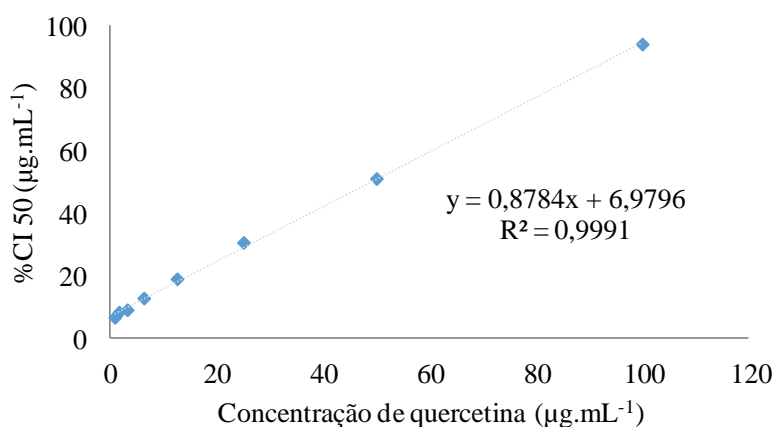


Figura 20. -Curva analítica do padrão quercetina para determinação do valor de % CI_{50}

Tabela 3. Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos brutos obtidos por diferentes soluções extratoras

Extratos	Solventes (v/v)			Conteúdo fenólico total ^d	DPPH CI ₅₀ ^{e,f} (µg.mL ⁻¹)
	DCM ^a	AcOEt ^b	EtOH ^c		
1	100	0	0	35,66 ± 0,02	195,4 ± 0,02
2	0	100	0	74,93 ± 0,07	29,10 ± 0,11
3	0	0	100	133,61 ± 0,3	9,32 ± 0,15
4	50	50	0	52,94 ± 0,08	215,22 ± 0,07
5	50	0	50	81,66 ± 0,03	43,08 ± 0,14
6	0	50	50	71,16 ± 0,01	30,36 ± 0,16
7	33,3	33,3	33,3	23,03 ± 0,02	50,42 ± 0,17

Diclorometano; acetato de etila^b; etanol^c; ^d Conteúdo fenólico total expressos em mg EAG/100g de extrato; ^edeterminação da capacidade antioxidante pelo método DPPH; padrão de referência (quercetina, CI₅₀ = 4,89 ± 0,04 µg mL⁻¹)^f.

O conteúdo fenólico total dos extratos das cascas de *E. uchi* variou de 23,03 ± 0,02 a 133,61 ± 0,3 (mg EAG/100 g de extrato). Os mais altos teores foram observados para o etanol puro (EtOH) (CFT=133,61 ± 0,3 mg EAG/100 g) e as misturas à base de etanol e diclorometano (EtOH + DCM) (CFT=81,66 ± 0,03 mg EAG/100 g) e etanol e acetato de etila (EtOH + AcOEt) (CFT=71,16 ± 0,01 mg EAG/100 g).

Enquanto os menores teores foram obtidos da combinação de diclorometano, acetato de etila e etanol (DCM+AcOEt+EtOH) (CFT=23,03 ± 0,02 mg EAG/100g) e diclorometano puro (DCM) (CFT=35,66 ± 0,02mg EAG/100g). Os resultados obtidos com os extratos à base de etanol estão de acordo com os dados da literatura que destacam altos teores de conteúdo fenólico total dos extratos etanólicos nas cascas de *E. uchi* (52 ± 0,01 mg EAG/100 g) (OLIVEIRA, et al., 2017).

A atividade antioxidante dos extratos das cascas de *E. uchi* pelo método DPPH variou de 9,32 ± 0,15 a 215,22 ± 0,07 (a metade da concentração inibitória máxima, CI₅₀). O extrato etanólico apresentou alta atividade antioxidante pelo método DPPH (CI₅₀ = 9,32 ± 0,15),

enquanto as menores atividades antioxidantes dos extratos foram obtidas da combinação de diclorometano e acetato de etila (DCM+ AcOEt) ($CI_{50} = 215,22 \pm 0,07$) e diclorometano puro ($CI_{50} = 195,4 \pm 0,02$). Estas observações estão de acordo com dados da literatura, que relataram alta atividade antioxidante pelo método DPPH nos extratos etanólicos ($CI_{50} = 4,02$ a $5,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (TACON & FREITAS, 2019) e ($CI_{50} = 9,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (OLIVEIRA et al., 2017). Esses resultados destacam os extratos de planta à base de etanol como promissores para constituintes fenólicos e potenciais antioxidantes (SILVA & TEIXEIRA, 2015; LIN et al., 2016).

5.3 Análise por IES-EM e tratamento quimiométrico dos dados

Soluções estoque (1 mg.mL^{-1}) de 7 diferentes soluções extrativas das cascas de *E. uchi* foram preparadas em metanol. As alíquotas ($5 \mu\text{L}$) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrômetro de massas. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetros do tipo *ion trap* modelo LCQ Fleet (Thermo scientific®) e triplo-quadrupolo modelo TSQ Quantum Acess (Thermo Scientific®), operando com fonte de *electrospray* (IES) e funcionamento em modo de íon negativo para realizar as análises por IES-EM e IES-EM/EM, respectivamente, conforme descrito no item 4.7.

O *fingerprint* por infusão direta em fonte de *electrospray* (IES), modo negativo, das 7 diferentes soluções extrativas das cascas, obtidos entre m/z 100 a 600, demonstrou o pico base desprotonado de m/z 191 para o extrato puro de diclorometano (DCM), o íon de m/z 327 para o extrato puro de acetato de etila (AcOEt) e para a mistura de acetato de etila e diclorometano (AcOEt + DCM), o íon de m/z 495 para os extratos à base de etanol (Figura 21). Além do pico base, vários outros íons foram observados, sugerindo a amostra como matriz complexa (Figuras A1 a A7 do material anexo).

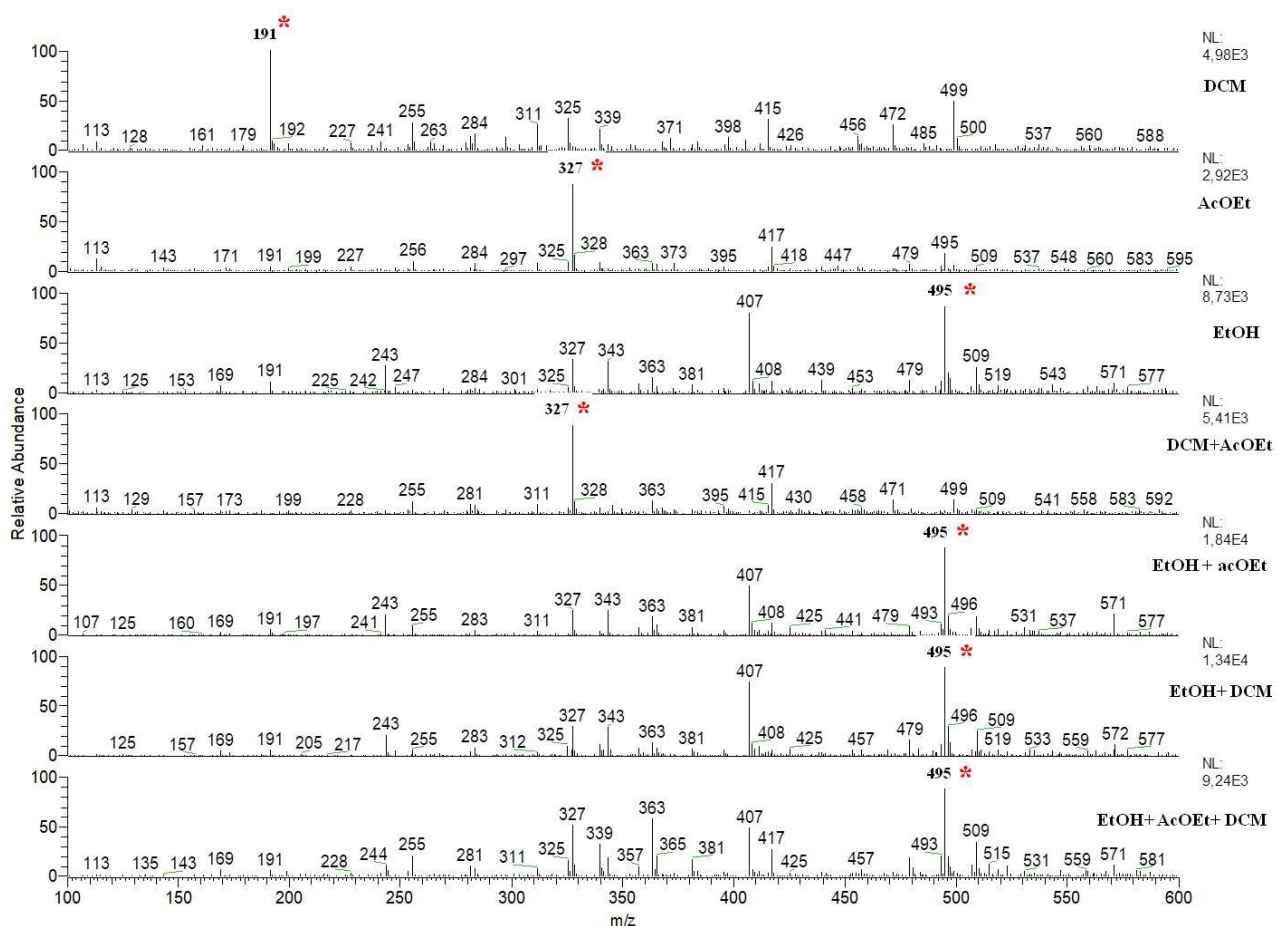


Figura 21. Espectros de massas dos extratos da casca de *E. uchi* com * denotando o pico base

Para a realização dos cálculos quimiométricos, utilizou-se uma matriz dos dados obtidos em triplicata a partir das análises por IES-EM de cada extrato. A análise dos espectros EM revelou que 96 íons permaneceram após eliminação dos íons com intensidade abaixo de 5% relativa aos íons mais abundantes (Tabela A1). Estes íons e suas intensidades relativas foram submetidos a análises de ACP e AHA.

A análise de componentes principais (ACP) foi calculada através da variação dos íons registrados (variáveis), sendo a análise hierárquica de agrupamentos (AHA) calculada através da distância euclidiana e média de ligação das três principais componentes, cuja variância acumulada representa 96,88%.

No gráfico de escore de ACP (Figura 22) foram observados três grupos principais (Grupo I-III), onde o extrato puro de diclorometano (DCM) (Grupo I), o extrato puro acetato de etila (AcOEt) e a combinação de acetato de etila e diclorometano (AcOEt + DCM) (Grupo II) e os extratos puro de etanol (EtOH) e combinações de etanol e diclorometano (EtOH + DCM), etanol (EtOH) e acetato de etila (et + AcOEt) e o ponto central do planejamento de misturas com a combinação de etanol, acetato de etila e diclorometano (DCM + AcOEt + EtOH) (Grupo III) foram claramente segregados.

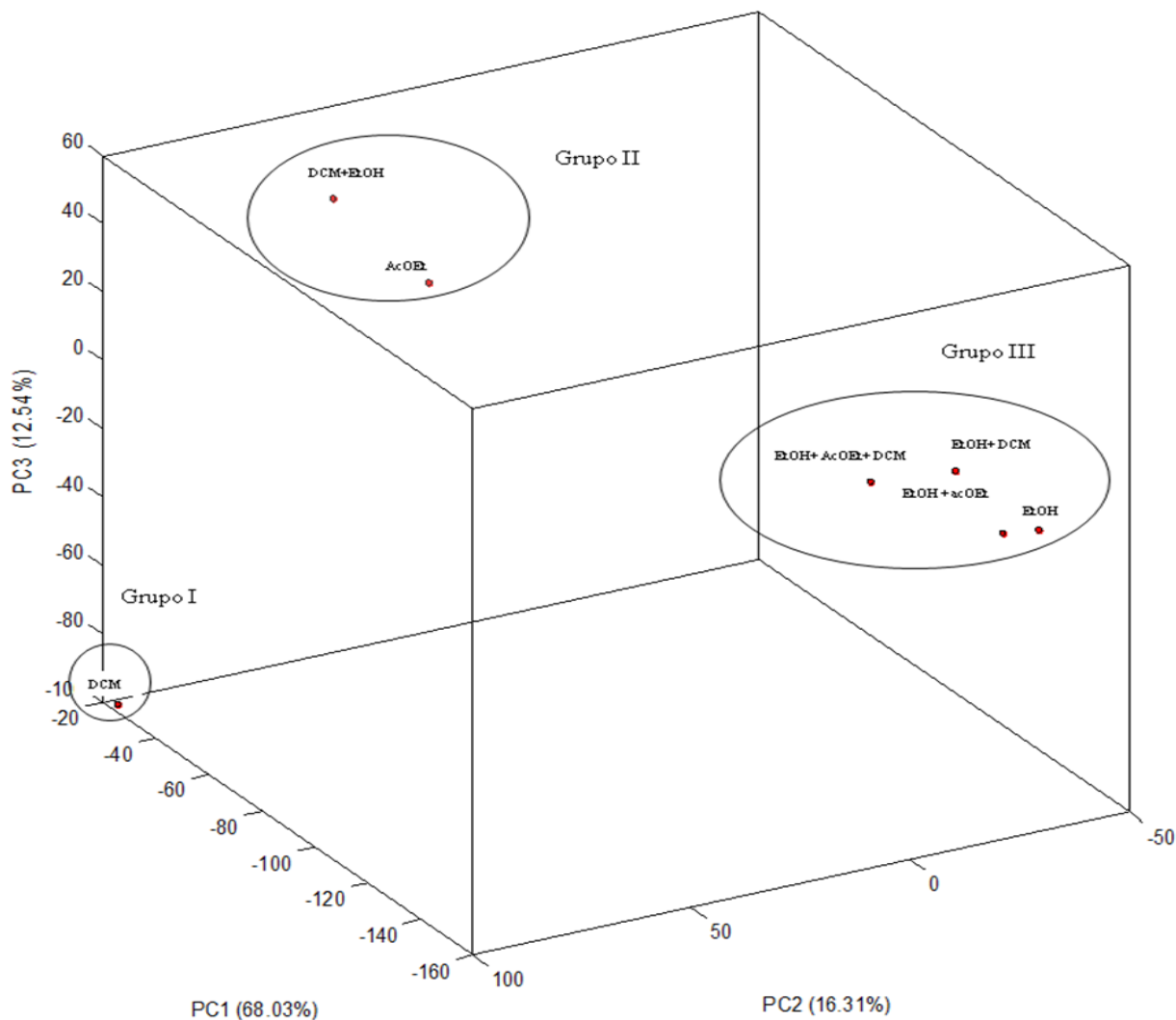


Figura 22. Gráfico de ACP das diferentes soluções extrativas das cascas de *E. uchi* baseado na composição química

O dendrograma de AHA (Figura 23) confirmou claramente os mesmos três grupos do gráfico de escore de ACP e sugeriu que os extratos à base de etanol apresentaram menor variabilidade química do que os extratos não polares. O grupo I apresentou a maior variabilidade química quando comparado aos demais grupos. Maior similaridade química foi observada entre os grupos II e III, demonstrando que os solventes possuem parâmetros de seletividade similares.

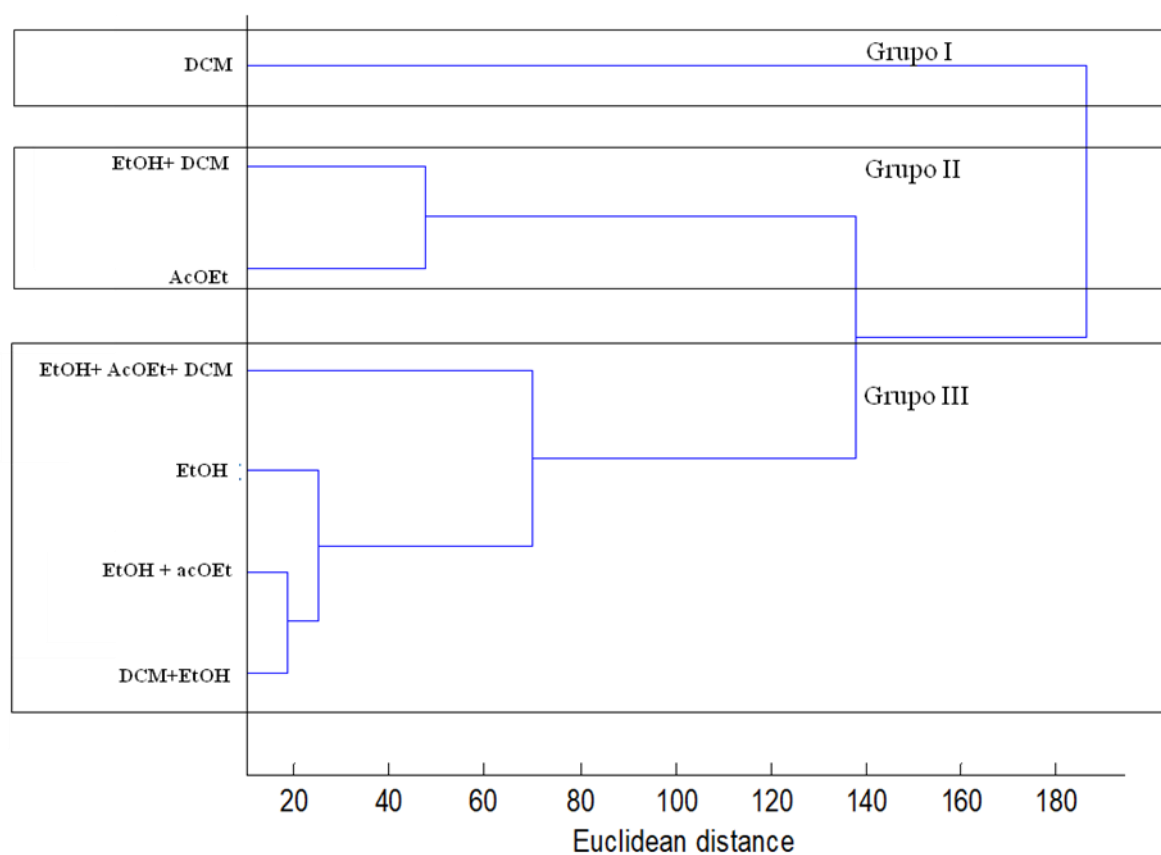


Figura 23. Dendrograma de AHA das diferentes soluções extrativas das cascas de *E. uchi*

De acordo com o biplot de ACP (Figura 24), os picos base correspondendo aos íons de m/z 191, 327 e 495 foram os principais responsáveis pela segregação dos grupos I, II e III, respectivamente. Através dos espectros de EM/EM destes íons foram observadas as fragmentações previamente descritas na literatura para os constituintes fenólicos (BATAGLION et al., 2015b.; CLIFFORD et al., 2007; LI et al., 2013; DEL-RIO et al., 2004). As principais fragmentações foram resumidas na Tabela 4.

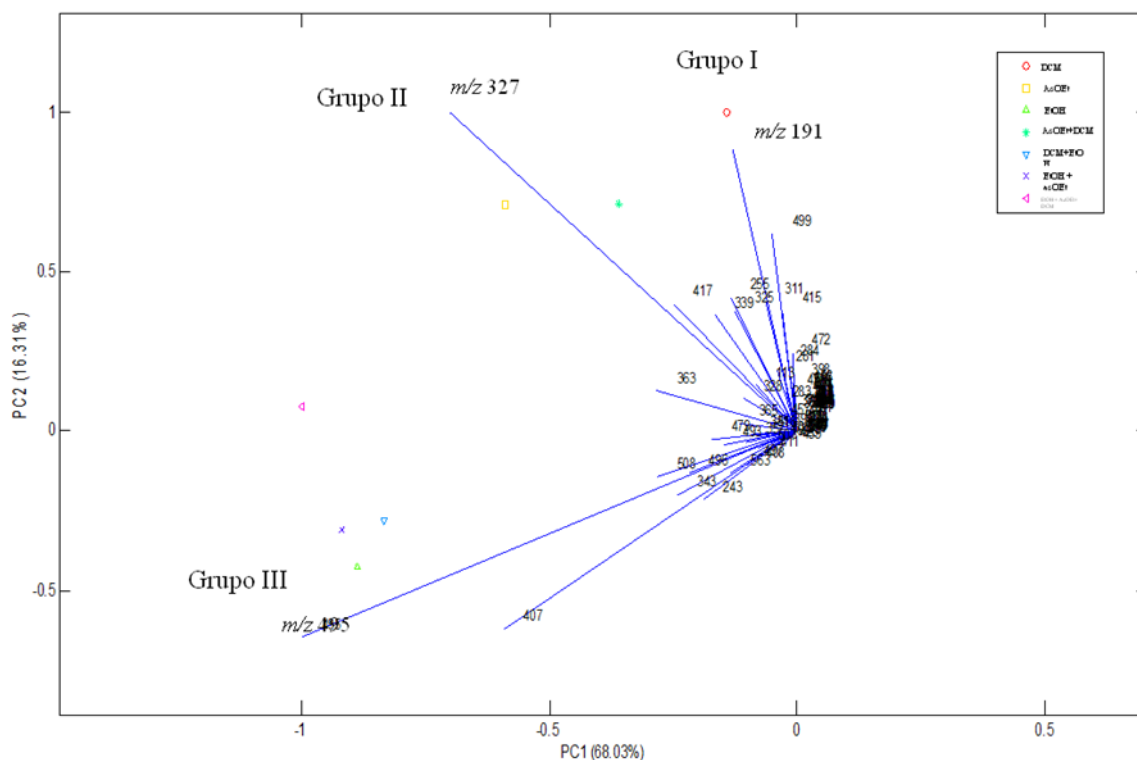
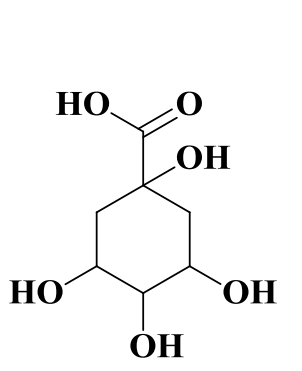


Figura 24. Biplot de ACP das diferentes soluções extrativas das cascas de *E. uchi*

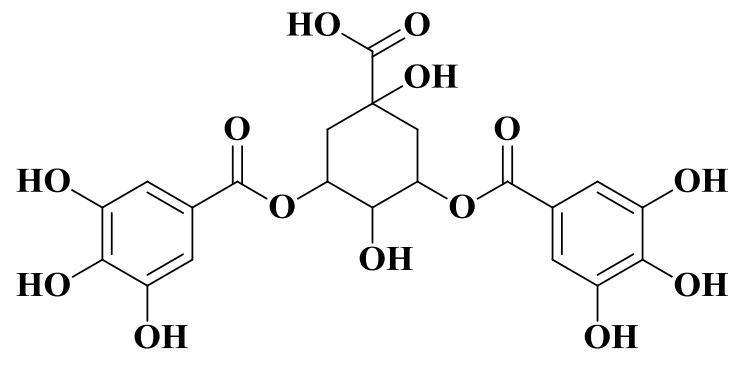
Tabela 4. Substâncias tentativamente identificadas nas cascas de *E. uchi* por análise por IES-EM/EM

Substâncias	Fórmula molecular	[M-H] ⁻	EM/EM
Ácido quínico (1)	C ₇ H ₁₂ O ₆	191	93,85
Ácido 3,5-di- <i>O</i> -galoilquínico (2)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	495	343, 325, 191, 169
Bergenina (3)	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	327	312, 249, 207
Ácido gálico (4)	C ₇ H ₆ O ₅	169	125
Ácido 5-galoilquínico (5)	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343	191, 169
Galocatequina galato (6)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457	305, 169

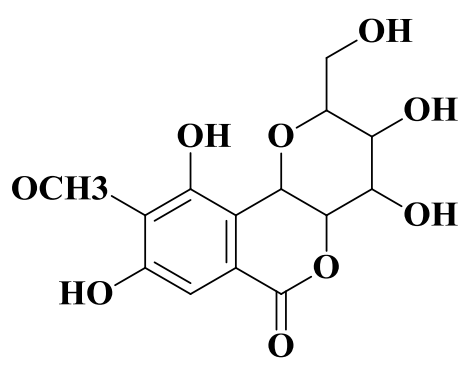
As substâncias tentativamente identificadas através das análises de fragmentação da casca de *E. uchi* foram os constituintes químicos de *m/z* 191 (ácido quínico), *m/z* 495 (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico), *m/z* 327 (bergenina), *m/z* 169 (ácido gálico), *m/z* 343 (ácido 5-galoilquínico) e *m/z* 457 (galocatequina galato), descritos na Figura 25.



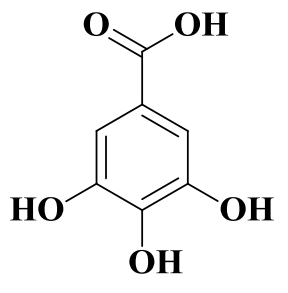
(1) Ácido quínico



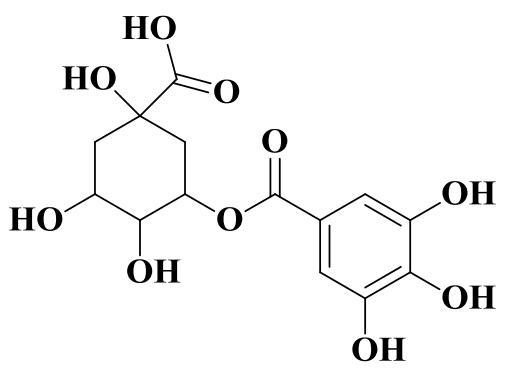
(2) 3,5-di-O-ácido galoilquínico



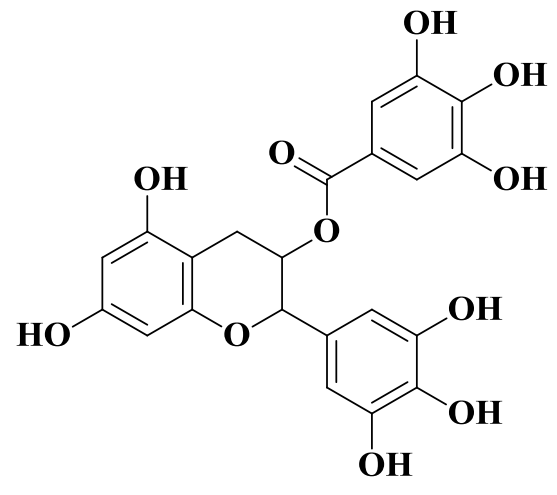
(3) Bergenina



(4) Ácido gálico



(5) 5-ácido galoilquínico



(6) Galocatequina galato

Figura 25. Substâncias tentativamente identificadas através das análises de fragmentação EM/EM da casca de *E. uchi*

A análise do espectro de EM do extrato puro de diclorometano (DCM) (Grupo I) demonstrou apenas o íon de m/z 191 observado nos demais extratos, o que pode explicar a baixa atividade antioxidante desse extrato ($CI_{50} = 195,4 \pm 0,02$) e baixo conteúdo fenólico total (CFT= $35,66 \pm 0,02$ mg EAG/100 g).

No grupo II, representado pelo extrato puro de acetato de etila (AcOEt), o espectro de EM apresentou os íons de m/z 191, 327 e 495 não observados no extrato puro de diclorometano (DCM), o que pode explicar porque esse extrato apresentou uma atividade antioxidante ligeiramente maior ($CI_{50} = 29,10 \pm 0,11$) do que o extrato de diclorometano (DCM). Enquanto a combinação de acetato de etila e diclorometano (AcOEt + DCM) (Grupo II) apresentou apenas o íon de m/z 327, o que pode explicar a baixa atividade antioxidante desse extrato ($CI_{50} = 215,22 \pm 0,07$) e baixo conteúdo fenólico total (CFT = $52,94 \pm 0,08$ mg EAG/100 g).

O grupo III se destacou pela presença dos extratos à base de etanol, representado pelos extratos puro de etanol (EtOH) e combinações de etanol e diclorometano (EtOH+DCM), etanol (EtOH) e acetato de etila (EtOH + AcOEt) e o ponto central do planejamento de misturas com a combinação de etanol, acetato de etila e diclorometano (DCM+AcOEt + EtOH), apresentando o maior número de constituintes fenólicos (ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico, bergenina, ácido gálico, ácido 5-galoilquinico e galocatequina galato). Essa observação pode explicar a atividade antioxidante ligeiramente maior e o maior conteúdo fenólico total quando comparados aos grupos I e II.

Desta forma, o extrato etanólico (EtOH) se destacou apresentando alta atividade antioxidante pelo método DPPH ($CI_{50} = 9,32 \pm 0,15$); mais alto conteúdo fenólico total (CFT= $133,61 \pm 0,3$ mg EAG/100g) e o maior rendimento (43,1%). Assim, o EtOH foi

selecionado como solvente extrator promissor dos constituintes fenólicos e potencial antioxidante das cascas de *E. uchi*.

O íon desprotonado de m/z 191 apresentou dois fragmentos principais de m/z 93 e 85, consistente com a estrutura de ácido quínico (**1**) (BATAGLION et al., 2015b) (Figura 26), enquanto o íon de m/z 495 apresentou fragmentos de m/z 343, 325, 191 e 169, os dois últimos correspondendo aos ácidos quínico e gálico, respectivamente. Com base na abundância relativa desses íons, essa fragmentação é consistente com a estrutura do ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (**2**) (CLIFFORD et al., 2007). Na figura 27 é apresentada a proposta de fragmentação para o íon m/z 495.

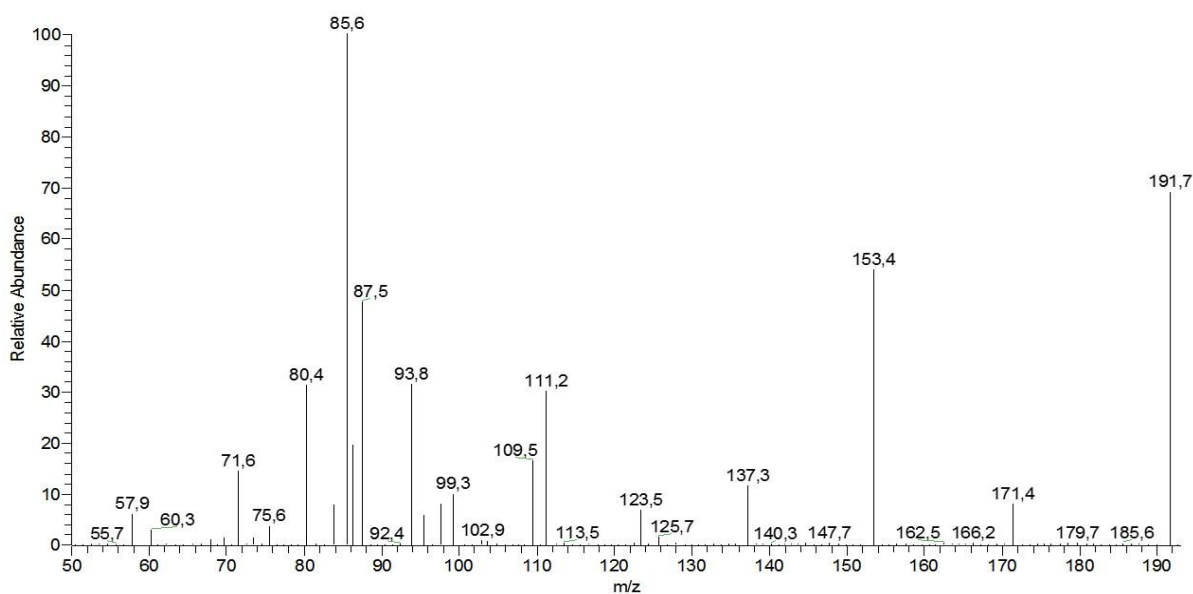


Figura 26. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 191, presente nas cascas de *E. uchi*

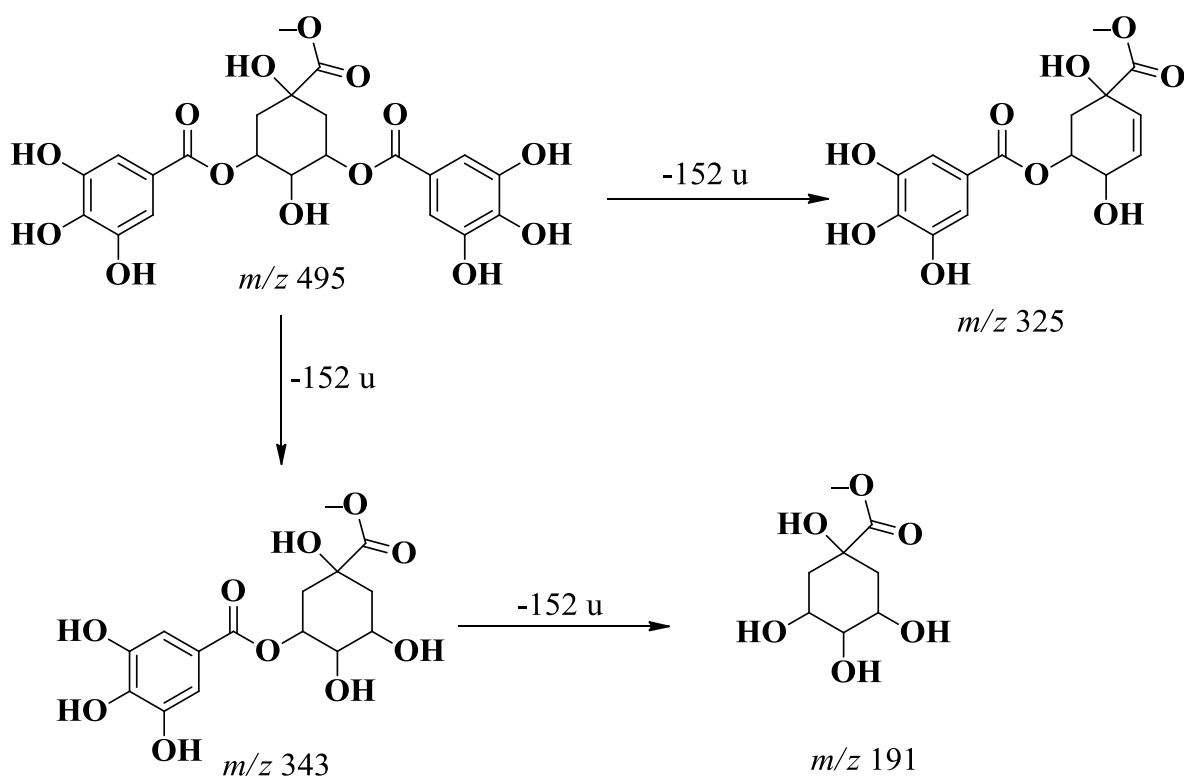
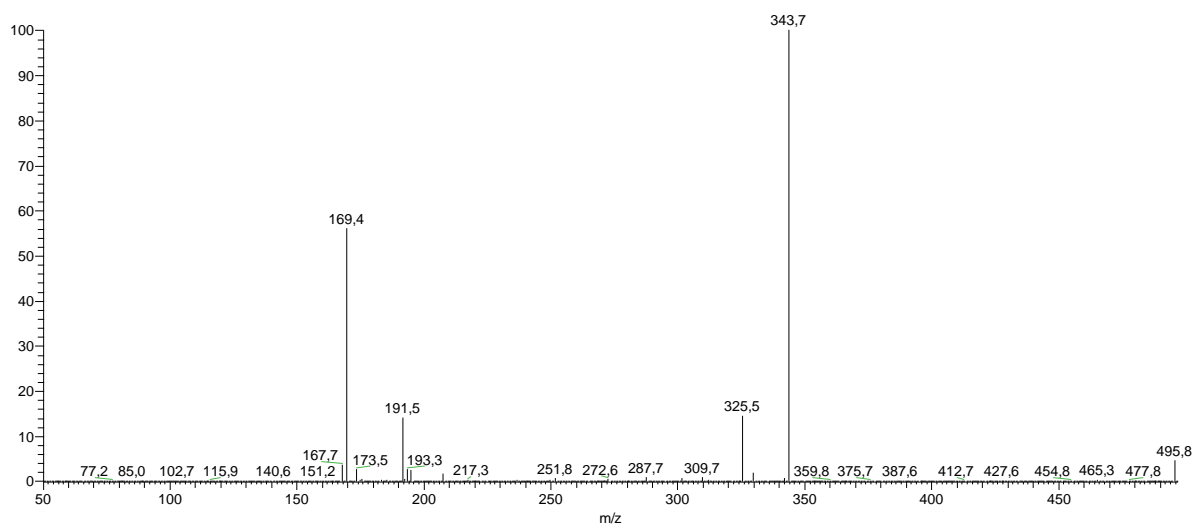


Figura 27. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 495, presente nas cascas de *E. uchi* com a proposta de fragmentação

O espectro EM/EM dos íons desprotonados de m/z 327 apresentou fragmentos de m/z 312, 249, e 207, sendo estes fragmentos previamente relatados à bergenina (**3**), (LI et al., 2013). Portanto, a análise multivariada apontou o ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (**2**) como

importante componente nos extratos à base do solvente etanol, enquanto a bergenina (**3**) foi observada principalmente no solvente puro de acetato de etila e mistura com diclorometano. Além disso, o ácido quínico (**1**) se destacou no extrato puro de diclorometano. Na figura 28 é apresentada a proposta de fragmentação para o íon de m/z 327.

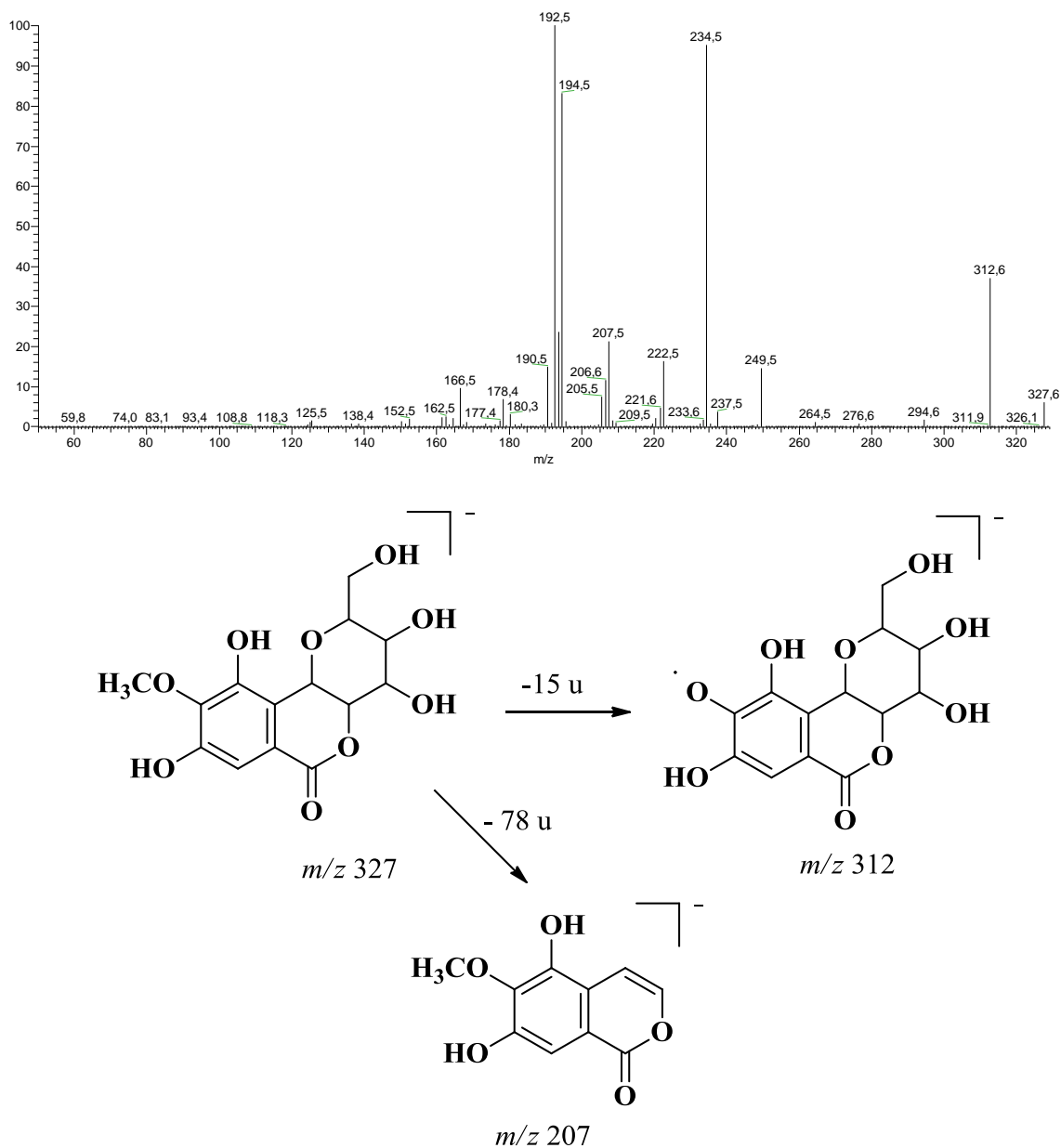


Figura 28. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 327, presente nas cascas de *E. uchi* com a proposta de fragmentação

Outros picos base correspondendo aos íons de m/z 169, 343 e 457, presentes nos extratos à base de etanol, foram tentativamente identificados através das análises de fragmentação. No espectro EM/EM do íon desprotonado de m/z 169, que apresentou o fragmento principal de m/z 125, sendo este consistente com a estrutura do ácido gálico (**4**) (CLIFFORD et al., 2007) (Figura 29).

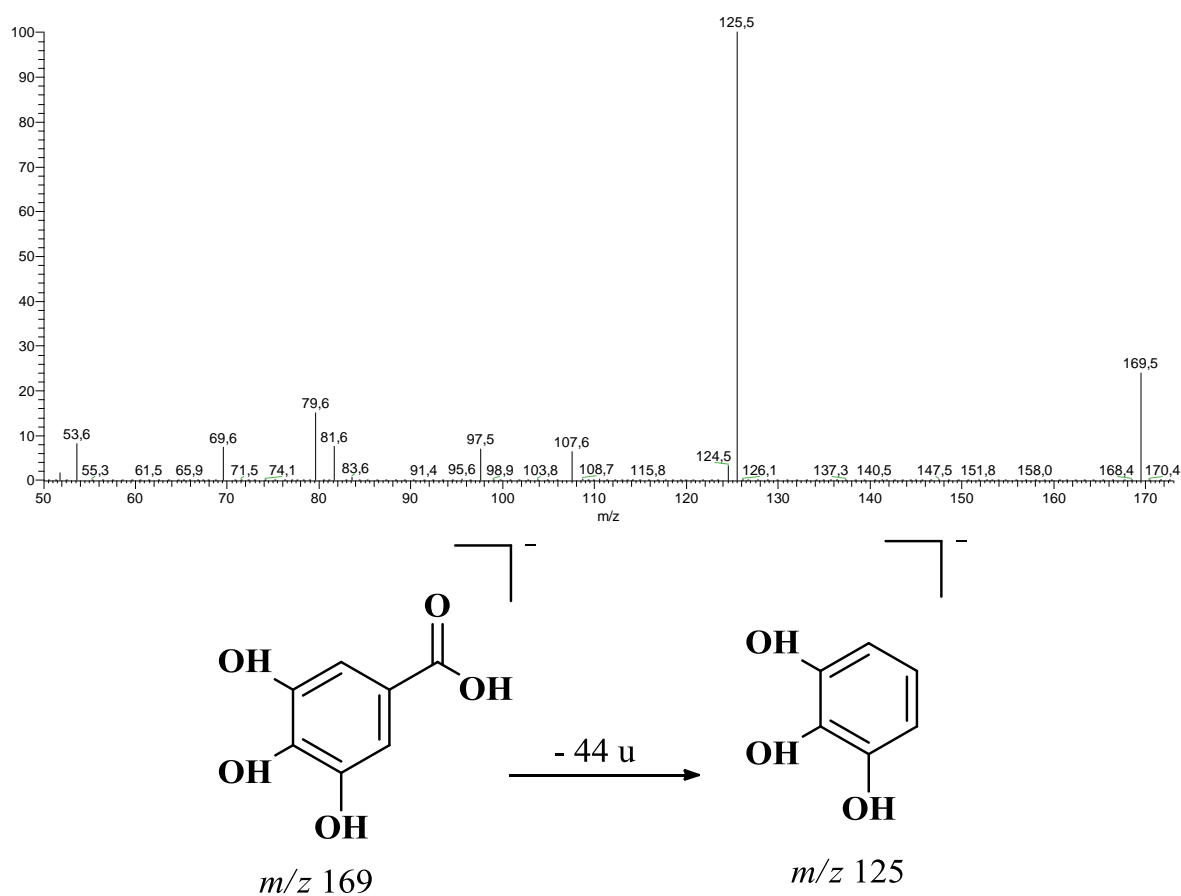


Figura 29. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 169, presente nas cascas de *E. uchi* com a proposta de fragmentação

Para o íon de m/z 343, o espectro EM/EM apresentou o pico base de m/z 191, e um íon menos intenso de m/z 169, correspondendo aos ácidos quínico e gálico, respectivamente (Figura 30). Embora esses íons sejam comuns para isômeros do ácido galoilquínico, o pico base de m/z 191 é apenas relatado para o ácido 5-galoilquínico (**5**), que está de acordo com a

proposta padrão de substituição para o ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico (**2**) (BATAGLION et al., 2015b).

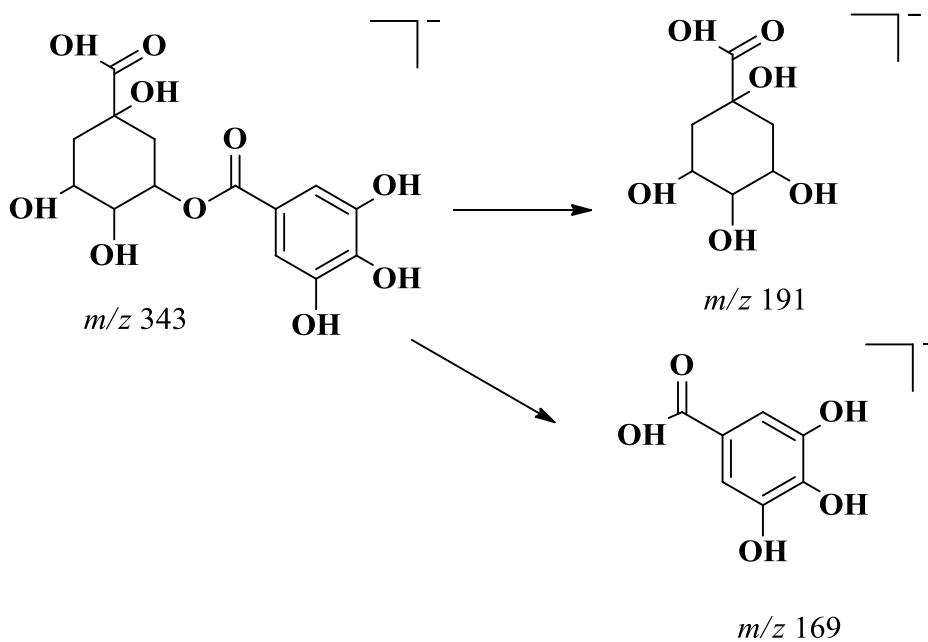
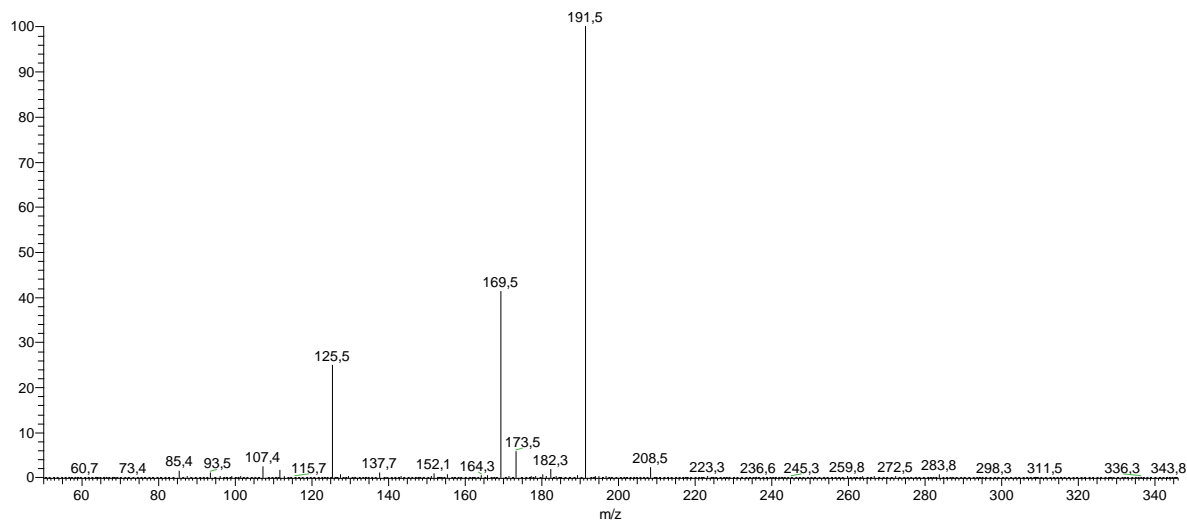


Figura 30. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 343, presente nas cascas de *E. uchi* e proposta de fragmentação

Nos espectros EM/EM do íon de m/z 457 foram observados diversos íons fragmentos destacando-se o intenso produto de m/z 169 e um íon menor de m/z 305, correspondendo ao

ácido gálico e unidade de galocatequina, respectivamente. Esta via de fragmentação é consistente com a estrutura de galocatequina galato (**6**) (DEL-RIO et al., 2004) (Figura 31).

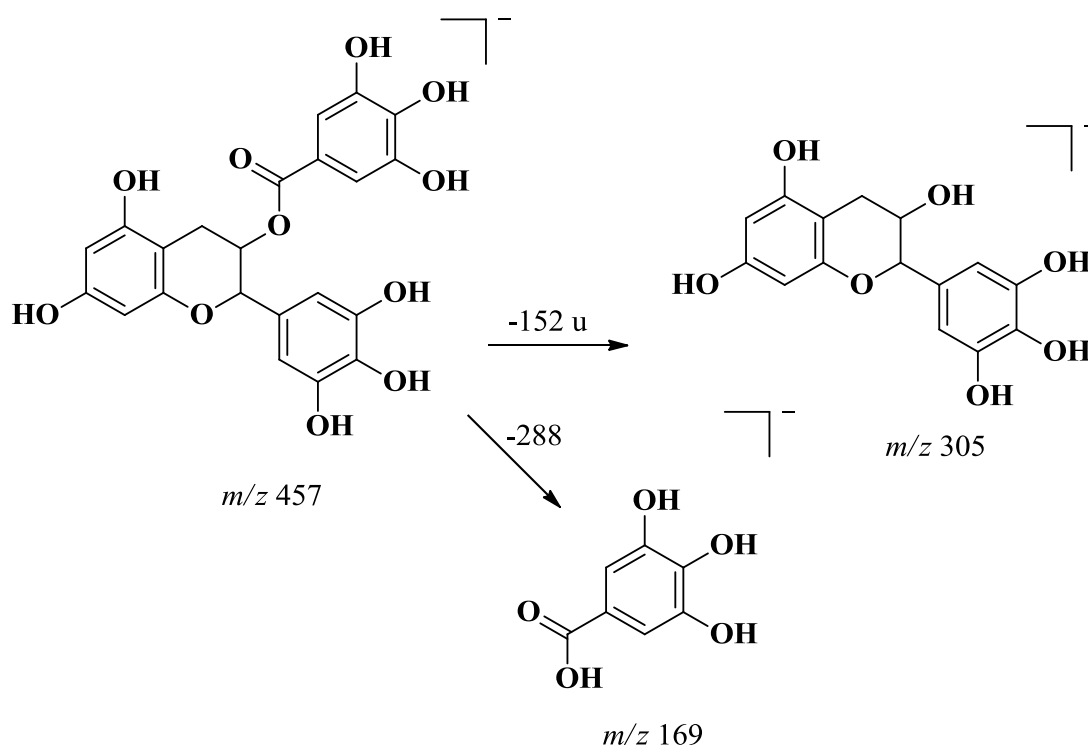
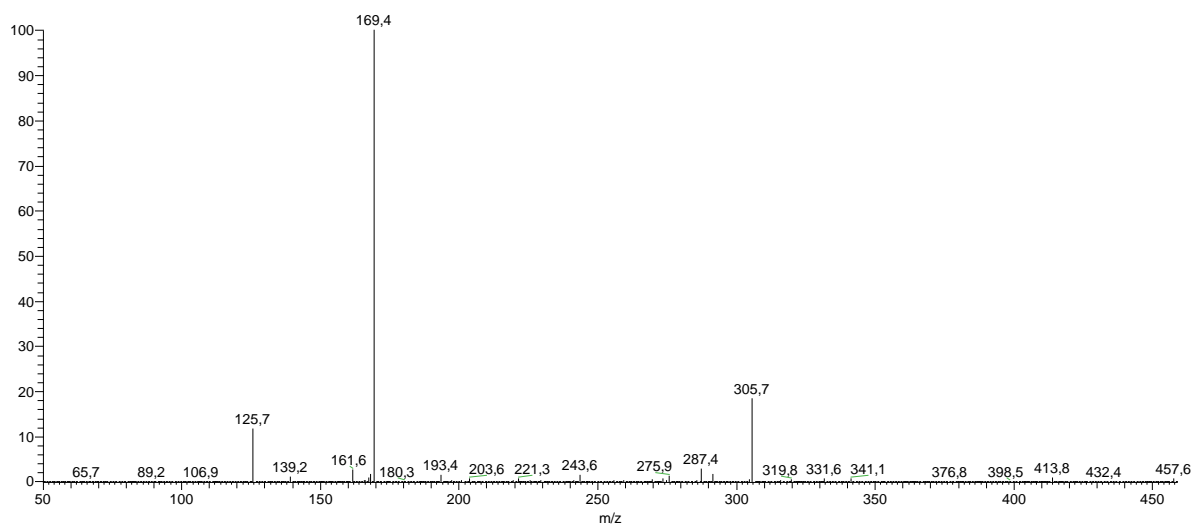


Figura 31. Espectro de IES-EM/EM (modo negativo) a energia de colisão de 35 eV do íon de m/z 457, presente nas cascas de *E. uchi* com a proposta de fragmentação

As substâncias que apresentaram os íons quasimoleculares m/z 191 (ácido quínico), m/z 327 (bergenina), m/z 169 (ácido gálico), m/z 457 (galocatequina galato) tentativamente identificadas através das análises de fragmentação da casca de *E. uchi* foram analisadas por CLAE-DAD/MS, conforme relatado no item **5.6.2**. A co-injeção de padrões permitiu a confirmação da identidade dessas substâncias baseado nos tempos de retenção (Tr) e seleção de íons com valores específicos de m/z . Para m/z 169, pico **1** com um tempo de retenção (tr) de 3,76 min é igual ao do padrão de ácido gálico; para m/z 327, o pico **2** (tr de 4,87 min) corresponde a bergenina; para a m/z 191, o pico **3** (tr de 5,33 min) corresponde ao ácido quínico e para a m/z 457, o pico **4** (tr de 5,95 min) corresponde a galocatequina galato. Os espectros de massa confirmam a presença de todas essas substâncias no extrato de *E. uchi*. A seleção dessas substâncias foi feita de acordo com a disponibilidade dos padrões.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico das cascas de *E. uchi*

Os ensaios de atividade antioxidante são ferramentas extremamente necessárias e preliminares para auxiliar a avaliação da atividade de produtos naturais. Os seus resultados permitem rejeitar um composto com baixa capacidade antioxidante *in vitro* que provavelmente exibirá pouca ou nenhuma atividade *in vivo* (MOLYNEUX, 2004). A confirmação da capacidade antioxidante deve ser realizada pelo menos por mais de um método para minimizar possíveis interferências e limitações do método de ensaio empregado (SINGH et al., 2016).

A atividade antioxidante pela redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico das cascas de *E. uchi* foi obtido como descrito no item **4.8.3**. A partir das soluções padrão de Fe (SO₄).7H₂O (μM) foram obtidas as respectivas absorbâncias e correlacionadas em função da

concentração. Foi preparada uma curva analítica do padrão sulfato ferroso (2 mM), em várias concentrações (500 a 2000 μM), que apresentou coeficiente de linearidade (R^2) de 0,9986, mostrando boa correlação linear para a realização da capacidade redutora das amostras (Figura 32).

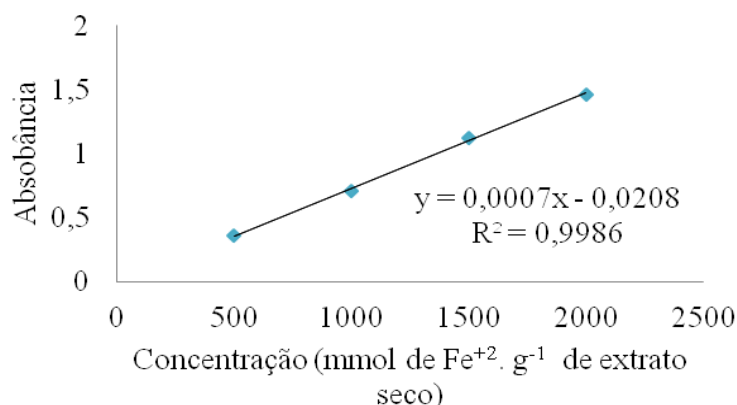


Figura 32. Curva analítica do sulfato ferroso

A atividade antioxidante pela redução de ferro do extrato etanólico foi de $174,02 \pm 0,001$ mmol de $\text{Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$ (Tabela 5). Esta observação está de acordo com dados da literatura, que relatou a atividade antioxidante pela redução de ferro em extratos etanólicos das cascas de *E. uchi* ($211,47$ mmol de $\text{Fe}^{+2} \cdot \text{g}^{-1}$) (MUNIZ, 2013).

Os dados obtidos neste ensaio e os dados obtidos da atividade antioxidante pelo método DPPH relatados neste estudo ($\text{CI}_{50} = 9,32 \pm 0,15$) quando comparados com os dados da literatura ($\text{CI}_{50} = 4,02$ a $5,87 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (TACON & FREITAS, 2019) e ($\text{CI}_{50} = 9,7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (OLIVEIRA et al., 2017), confirmam o potencial antioxidante dos extratos etanólicos das cascas de *E. uchi*.

Tabela 5. Atividade antioxidante pela redução do ferro no extrato etanólico das cascas de *E. uchi*

Extrato	Redução de Fe ^{+3a} (mmol de Fe ⁺² .g ⁻¹)
Etanol (EtOH)	174,02 ± 0,001

Resultado expresso como média ± desvio padrão. ^a Redução de Fe⁺³ expressos em mmol de Fe⁺².g⁻¹ de extrato seco

5.5 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do extrato etanólico das cascas de *E. uchi*

Na avaliação de citotoxicidade com células fibroblastos, o extrato à base de etanol (EtOH) não apresentou toxicidade nas concentrações testadas, assim como não foi capaz de inibir 50% das células. O CI₅₀ do extrato etanólico foi maior do que concentração testada (0,3401 mg.mL⁻¹) (Tabela 6), o que está de acordo com um estudo anterior, que relatou CI₅₀ maior do que a maior concentração testada (0,2 mg.mL⁻¹) em extratos de cascas de *E. uchi* (POLITI et al., 2011). Esse dado em adicional a testes preliminares, previamente relatados na literatura (POLITI et al., 2010), demonstrando ausência de toxicidade oral aguda em camundongos do extrato aquoso das cascas de *E. uchi*, sugerem que as cascas de *E. uchi* não apresenta risco, sendo necessário mais estudos *in vivo e in vitro* para sua a comprovação.

Tabela 6. Citotoxicidade (CI₅₀) do extrato a base de etanol (EtOH) comparado com o fármaco padrão doxorubicina testados em linhagens celulares de fibroblasto de pulmão humano

Extrato	CI ₅₀ mg.mL ^{-1a}
Etanol (EtOH)	>100
Doxorrubicina	0,3401 (0,2662–0,4345)* μM.mL ⁻¹

^aOs dados estão representados com o intervalo de confiança de 95% (CI₅₀)*

5.6 Quantificação dos princípios ativos das cascas de *E. uchi* por CLAE-EM/EM

5.6.1 Extração seletiva dos constituintes fenólicos das cascas de *E. uchi* e potencial antioxidante

Os extratos à base de etanol das cascas de *E. uchi* destacaram-se como os mais representativos para os constituintes fenólicos com ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido gálico, ácido 5-galoilquínico e galocatequina galato descritos pela primeira vez nesta espécie. Desta forma, o solvente etanol foi selecionado como solvente extrator promissor dos constituintes fenólicos das cascas de *E. uchi*.

Após a seleção do solvente, novos extratos foram preparados seguindo um protocolo simplificado para extração seletiva, conforme descrito no item **4.10.1**, extraídos por diferentes volumes (50, 100, 150 mL). Em seguida, um estudo de quantificação da bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico foi desenvolvido. A seleção dos constituintes foi feita de acordo com a caracterização de fenólicos dos extratos das cascas de *E. uchi* relatados anteriormente e disponibilidade dos padrões.

O conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante de cada extrato foram obtidos como descrito nos itens **4.8.1** e **4.8.2**, respectivamente. Os extratos apresentaram rendimentos (% g de extrato por g de material vegetal seco) que variaram de $9,38 \pm 0,14$ a $9,66 \pm 0,21$ (% m/m). Não foi observada diferença significativa de rendimento com o uso de 50, 100 e 150 mL de etanol para as extrações ($p > 0,05$). Assim como não foi observada diferença significativa de conteúdo de fenólicos totais nos extratos (com valores de $77,14 \pm 0,16$ a $84,03 \pm 0,16$ mg EAG/100 g) e de eliminação de radicais livres (com valores de $CI_{50} = 16,14 \pm 0,06$ a $23,77 \pm 0,06$ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) pelo método DPPH ($p > 0,05$).

Essa observação permitiu a seleção do volume de 50 mL como volume de solvente extrator para o estudo de quantificação da bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e

ácido gálico das cascas de *E. uchi*. A Tabela 7 mostra os efeitos dos volumes dos solventes sobre os rendimentos, o conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos extratos brutos.

A relação entre os quatro constituintes selecionados neste estudo e a atividade antioxidante pelo método DPPH foi avaliada, usando padrões de referência individuais de bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico com o controle positivo quercetina (Tabela 7). As curvas analíticas dos padrões utilizados nos ensaios estão relatadas nas Figuras A8 a A12 do material anexo.

Tabela 7. Rendimento dos extratos brutos em porcentagem (% m/m), conteúdo fenólico total e atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos etanólicos (A50 – A150) preparados seguindo protocolo simplificado para extração dos constituintes das cascas de *E. uchi*

Amostras	Volume (mL)	Rendimento (% m/m)	Conteúdo fenólico total ^b	DPPH CI ₅₀ ^{c,d} (µg.mL ⁻¹)
A50	50	9,71 ± 0,50 ^a	79,93 ± 0,12 ^a	16,14 ± 0,06 ^a
A100	100	9,38 ± 0,14 ^a	77,14 ± 0,16 ^a	23,77 ± 0,06 ^a
A150	150	9,66 ± 0,21 ^a	84,03 ± 0,16 ^a	21,60 ± 0,06 ^a
Quercetina	-	-	-	4,07 ± 0,05
Galocatequina galato	-	-	-	4,6 ± 0,05
Ácido gálico	-	-	-	2,5 ± 0,08
Ácido quínico	-	-	-	39,79 ± 0,03
Bergenina	-	-	-	330,76 ± 0,04

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ^a Análise de variância simples (*One-way ANOVA*) e análise de significância pelo teste *pos hoc de Tukey HSD* ($p > 0,05$). ^b Conteúdo fenólico total expressos em mg EAG/100g de extrato; ^c determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH expressa em µg.mL⁻¹; padrão de referência (quercetina, CI₅₀ = 4,07 ± 0,05 µg mL⁻¹)^d.

A ordem de atividade antioxidante dos padrões de referência foi a seguinte: ácido gálico > galocatequina galato > ácido quínico > bergenina. Conforme os dados da literatura, a galocatequina galato e o ácido gálico demonstram ser os constituintes com significativa

atividade antioxidante (BADHANI et al, 2015; LEE et al., 2014). Esses resultados sugerem essas substâncias como possíveis responsáveis em aumentar significativamente a atividade antioxidante em concentrações muito baixas nos extratos etanólicos nas cascas de *E. uchi*.

5.6.2 Quantificação da bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico nas cascas de *E. uchi*

A separação dos constituintes químicos selecionados para este estudo foi otimizada em sistema de CLAE-IES-EM para garantir a melhor resolução, seguindo protocolo previamente descrito (SILVA et al., 2019). Para garantir a sensibilidade na análise, optou-se por utilizar o modo de aquisição em EM por monitoramento dos íons selecionados. Esta forma de operação do espectrômetro permite que o cromatograma constituído apenas pelos íons de interesse possa ser obtido, ajustando-se o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Uma vez que os parâmetros cromatográficos e de espectrometria de massas foram estabelecidos, uma solução padrão "MIX" dos compostos presentes na casca de *E. uchi* foi analisada e obtido o cromatograma nas melhores condições (Figura 33).

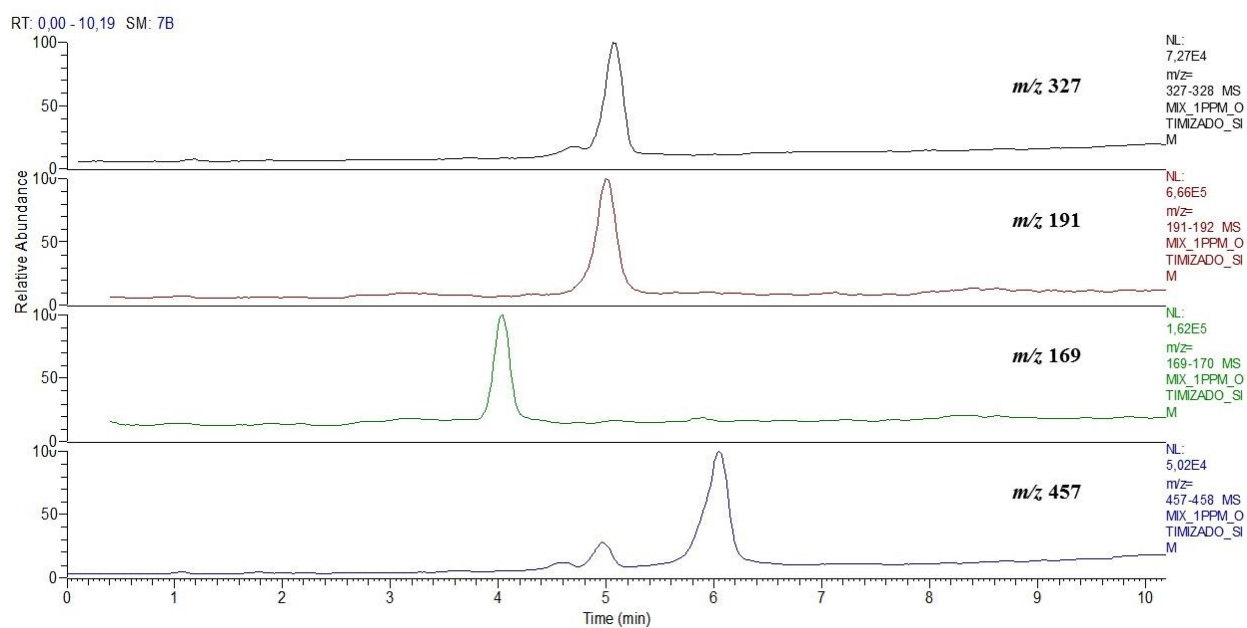


Figura 33. Cromatogramas obtidos por CLAE em modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) para uma corrida final de 21 min das soluções padronizadas. Gradiente de eluição: 80-20% de B. Fases móveis: água (A) e metanol (B). Coluna Phenomenex Luna C18 (5 μ m, 150 \times 4,6 mm)

A quantificação de bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico foi realizada pelo método do padrão externo, a partir das curvas de calibração obtidas pela injeção de soluções padrão “MIX”, nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm, analisadas nas mesmas condições para os extratos das cascas de *E. uchi*. As concentrações dos padrões nos extratos foram calculadas por regressão linear do gráfico de áreas versus as concentrações dos padrões. As curvas analíticas obtidas apresentaram excelente linearidade (expresso em R^2), na faixa de concentrações analisadas (Tabela 8) (Figura 34). Todas as análises dos extratos etanólicos das cascas de *E. uchi* foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP).

Tabela 8. Dados de linearidade da bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico nas cascas de *E. uchi*

Substâncias	R ²	Coeficiente		Faixa linear em ppm ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
		angular	linear	
Bergenina	0,992	171934	1000000	1 -100
Ácido quínico	0,999	5000000	3000000	1 -100
Galocatequina galato	0,999	269953	141370	1 -100
Ácido gálico	0,999	910182	554696	1 -100

*Valores da curva analítica para 5 níveis de concentração.

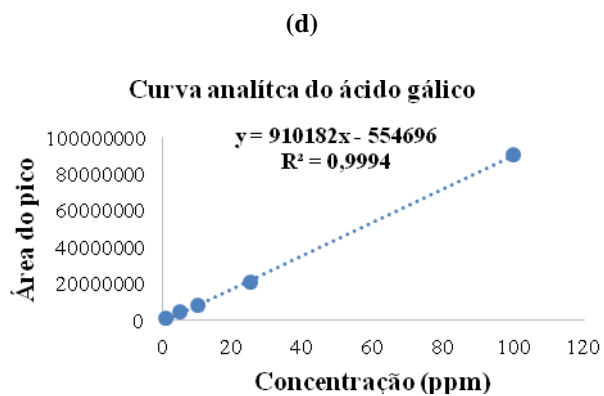
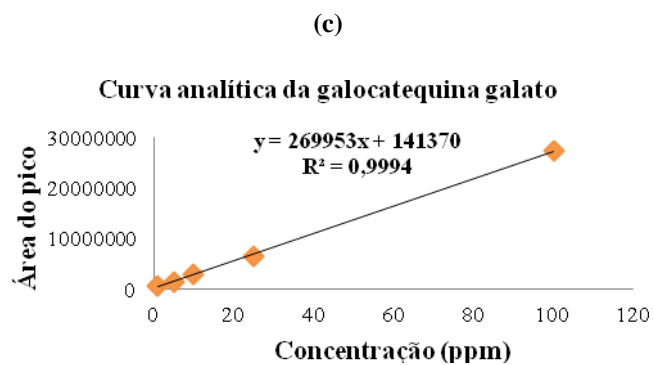
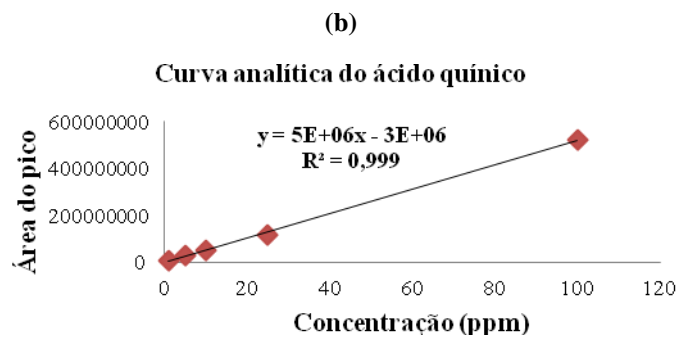
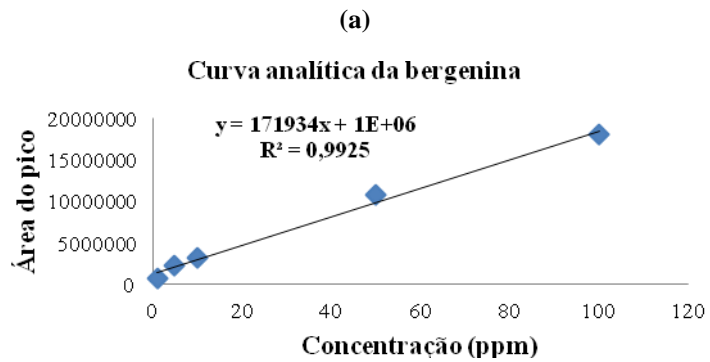


Figura 34. Gráficos das curvas analíticas dos padrões: bergenina (a); ácido quínico (b); galocatequina galato (c) e ácido gálico (d)

A figura 35 demonstra o cromatograma do extrato etanólico por CLAE-DAD, com os principais picos marcados de 1 a 4 e o cromatograma baseado em EM destacando a coeluição dos picos 2 e 3 (BATAGLION et al., 2015b; LI et al., 2013; DEL-RIO et al., 2004). Os picos foram detectados por seleção de íons com valores específicos de m/z . Para m/z 169, pico 1 com um tempo de retenção (t_r) de 3,76 min é igual ao do padrão de ácido gálico; para m/z 327, o pico 2 (t_r de 4,87 min) corresponde a bergenina; para a m/z 191, o pico 3 (t_r de 5,33 min) corresponde ao ácido quínico e para a m/z 457, o pico 4 (t_r de 5,95 min) corresponde a galocatequina galato. Os espectros de massa confirmam a presença de todas essas substâncias no extrato de *E. uchi*.

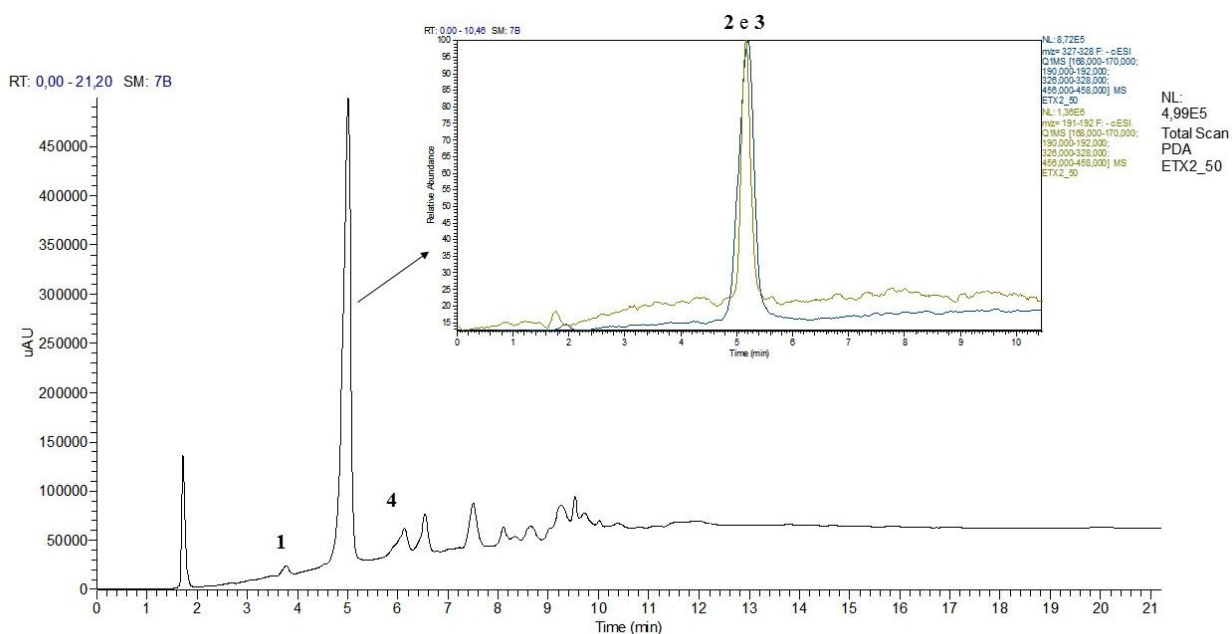


Figura 35. Cromatograma do extrato etanólico por CLAE-DAD-EM, com os principais picos marcados como compostos: **1**- ácido gálico; **2**- bergenina; **3**- ácido quínico e **4**- galocatequina galato e o cromatograma baseado em EM destacando a coeluição dos picos **2** e **3**

As análises dos constituintes químicos das cascas de *E. uchi* por CLAE-IES-EM, relataram a bergenina como constituinte majoritário ($762,83 \pm 0,06$ g. Kg⁻¹). Individualmente, as maiores concentrações dos constituintes das cascas foram obtidas para bergenina ($762,83 \pm 0,06$ g. kg⁻¹), ácido quínico ($16,97 \pm 0,04$ g. Kg⁻¹), galocatequina galato ($34,92 \pm 0,05$ g. Kg⁻¹) e ácido gálico ($38,39 \pm 0,05$ g. kg⁻¹) (Tabela 9).

Tabela 9. Concentrações (g. Kg⁻¹) de bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico nas cascas de *E. uchi* por CLAE-EM/EM

Picos	Constituintes químicos	Cascas de <i>E. uchi</i> g. kg⁻¹ (de material vegetal seco)
1	Ácido gálico	$38,39 \pm 0,05$
2	Bergenina	$762,83 \pm 0,06$
3	Ácido quínico	$16,97 \pm 0,04$
4	Galocatequina galato	$34,92 \pm 0,05$

Valores de ácido gálico, bergenina, ácido quínico e galocatequina galato expressos em g. kg⁻¹ de material vegetal seco; Extratos à base de etanol preparados de acordo com o protocolo de extração (volume de 50 mL de etanol); com tempo de extração de 15 min, a 31 °C; Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Considerando o rendimento extrativo de 9,71% do extrato etanólico (A50), descrito na tabela 7, a concentração de bergenina nas cascas secas foi de 7,4%, relatando altas concentrações de bergenina nas cascas de *E. uchi* quando comparado com os dados da literatura que relatam valores de 3,19% (NUNOMURA et al., 2009) a 4% (TACON & FREITAS, 2013). Esse dado pode ser explicado pelo uso da extração assistida por ultrassom, adotada neste trabalho, relatada como método de extração que contribui com o aumento do rendimento de extração com tempo de extração reduzido, que eleva a eficiência de extração do solvente etanol e por melhorar a extração e quantificação de antioxidantes, quando comparada às técnicas convencionais (TUNGMUNNITHUM, et al., 2019; ALTEMIMI, et al., 2016; KHOIGANI, et al., 2007).

Estudos anteriores demonstram que a bergenina é um inibidor seletivo de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. Guilliermondii* (SILVA et al., 2009), além de demonstrar boa atividade inibitória em relação a ciclooxigenase-2 (COX-2) ($CI_{50}=1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$), enzima que participa do processo inflamatório (NUNOMURA et al., 2009).

No entanto, segundo dados da literatura a galocatequina galato e o ácido gálico demonstram ser os constituintes mais significativos com atividade antioxidante (BADHANI et al, 2015; LEE et al., 2014). Esses constituintes fenólicos foram relatados pela primeira vez na espécie e apresentaram neste estudo as concentrações de $34,92 \pm 0,05 \text{g. Kg}^{-1}$ e $38,39 \pm 0,05 \text{g. Kg}^{-1}$, respectivamente e podem ser responsáveis pela maior parte da atividade antioxidante relatada as cascas de *E. uchi*.

O ácido gálico ($38,39 \pm 0,05 \text{g. Kg}^{-1}$) e o ácido quínico ($16,97 \pm 0,04 \text{g. Kg}^{-1}$), selecionados para a quantificação, foram descritos anteriormente em várias frutas brasileiras e são conhecidos como substâncias biologicamente ativas (BADHANI et al, 2015; INBATHAMIZH & PADMINI, 2013). Embora o ácido quínico, não seja um constituinte fenólico, é um importante intermediário bioquímico na via do chiquimato, via biossintética de muitos compostos aromáticos que existem em plantas (MARRUBINI et al., 2015).

Segundo SHENG et al (2000), suplementos alimentares obtidos das cascas de *Uncaria tomentosa* (C-MED-100[®]) e do Activar AC-11[®]) apresentaram altas concentrações do ácido quínico e ésteres de ácido quínico (47 e 80 g. Kg⁻¹, respectivamente), sendo considerado um potencial agente para o tratamento ou prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (XIANG et al, 2001; SOH et al., 2003). Enquanto, o ácido gálico possui atividades neuroprotetora (ADEFEGHA et al., 2017), anticâncer (INOUE et al., 2000), alto potencial antioxidante e atividade anti-inflamatória (ARUOMA et al., 1993).

Além disso, os derivados do ácido galoilquínico, principais metabólitos secundários das folhas *Copaifera langsdorffii* Desf. demonstraram atividade gastroprotetora em camundongos e atividade citotóxica contra células de adenocarcinoma gástrico (LEMOS et al., 2015; MOTTA et al., 2016).

Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que as catequinas podem oferecer benefícios significativos à saúde dos seres humanos, que decorrem em grande parte de suas propriedades anticarcinogênicas, antimutagênicas (JANKUN et al., 1997) e antioxidantes, como exemplo, a galocatequina galato foi relatada em concentrações de 6,76 g. Kg⁻¹ em amostras comerciais de chá verde (*Camellia sinensis*) (LEE et al., 2014) e valores de 98,8 g. Kg⁻¹ em três espécies do gênero *Camellia Sect. Thea*. (YANG et al., 2007), destacando o seu potencial antioxidante.

KANEKO et al (2015) avaliou se as catequinas de amostras de chá verde teriam quaisquer efeitos sobre a insulina secretada (secreção de insulina estimulada pela glicose GSIS, a partir de células β -pancreáticas (da linhagem INS-1D), sugerindo os efeitos benéficos à saúde na prevenção da diabetes de algumas catequinas (EGCG, GCG e EGC).

Além disso, outros estudos relataram o efeito de inibição dos polifenóis em amostras comerciais de chá verde na atividade da enzima lipase *in vitro*, demonstrando inibição de 54% na concentração de 0,05 mg.mL⁻¹ (HE et al., 2007). Enquanto, estudo anterior demonstrou resultados similares em extratos acetônicos (49, 33%) e etanólicos (36, 88 %), testados na concentração de 1 mg.mL⁻¹ nas cascas de *E. uchi* (OLIVEIRA et al., 2017), destacando seu potencial uso para tratar o excesso de peso, a obesidade, a dislipidemia e complicações associadas.

GUO et al (2017) destacou algumas catequinas e derivados de ácido quínico, como principais captadores de três espécies reativas de oxigênio (ROS: os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila) em amostras de chás verdes.

Além disso, as catequinas extraídas de preparações de chá verde têm sido relatadas na medicina tradicional chinesa como possíveis responsáveis por induzir alterações favoráveis no metabolismo da glicose e resistência à insulina *in vivo* (WU et al., 2004) e, portanto, pode ter um efeito favorável no distúrbio endócrino comum em mulheres na idade reprodutiva (DVORAK & VRZAL, 2011; BARGIOTA et al., 2012).

Essa observação poderia justificar o uso tradicional das cascas de *E. uchi* para tratar miomas, cistos e como regulador menstrual (HYACENTH et al., 2019), sendo necessários mais estudos para sua comprovação. Um resumo das principais atividades biológicas dos constituintes químicos quantificados das cascas de *E. uchi* está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Principais atividades biológicas relatadas a bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico

Constituintes químicos	Atividades biológicas
Bergenina	Atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2009); Atividade anti-inflamatória (NUNOMURA et al., 2009).
Ácido quínico	Potencial agente para tratamento ou prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. (XIANG et al, 2001; SOH et al., 2003).
Galocatequina galato	Atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas (JANKUN et al., 1997); Alto potencial antioxidante (LEE et al., 2014).
Ácido gálico	Alto potencial antioxidante; Atividade anti-inflamatória (ARUOMA et al., 1993); Atividade neuroprotetora (ADEFEGHA et al., 2017); Atividade anticâncer (INOUE et al., 2000).

Os resultados deste trabalho apontam as cascas de *E. uchi* como uma valiosa fonte natural de constituintes fenólicos e potencial antioxidante, com benefícios promissores à saúde, que podem ser utilizadas como matéria-prima vegetal com potencial para suplementos, produtos alimentícios e farmacêuticos.

Os dados obtidos neste estudo podem contribuir para orientar ainda mais a extração seletiva dos constituintes fenólicos nessa matriz, com menor consumo de solvente, menor tempo e maior eficiência em comparação aos métodos de extração convencionais (FARIAS, 2011; HOSSAIN et al., 2012), o que do ponto de vista industrial, eleva o seu potencial comercial.

A citotoxicidade *in vitro* do extrato testado sugeriu que as cascas de *E. uchi* não apresenta risco, sendo necessário mais estudos *in vivo e in vitro* para a sua comprovação. Além disso, o isolamento e a purificação dos constituintes fenólicos podem não ser necessários, porque os benefícios à saúde podem advir dos efeitos aditivos e sinérgicos dos constituintes fitoquímicos dos extratos (LIU, 2003), sendo necessário mais estudo para a sua comprovação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abordagem integrativa baseada no planejamento de misturas simplex centroide, a espectrometria de massas com fonte de ionização de *electrospray* (IES-EM) e a análise quimiométrica forneceu uma estratégia simples e útil para avaliar os constituintes fenólicos das cascas de *E. uchi*, melhorando assim o conhecimento sobre a composição química desta planta medicinal da Amazônia.

As impressões digitais IES-EM caracterizaram os diferentes extratos, enquanto a IES-EM/EM permitiu a identificação por tentativa dos constituintes fenólicos. As substâncias de m/z 191 (ácido quínico), m/z 327 (bergenina), m/z 169 (ácido gálico), m/z 457 (galocatequina galato) foram analisadas por CLAE-DAD/MS e a co-injeção de padrões permitiu a confirmação da identidade dessas substâncias baseado nos tempos de retenção (t_r) e seleção de íons com valores específicos de m/z . Além disso, a análise multivariada destacou importantes diferenças de componentes nos extratos à base do solvente etanol, no solvente puro de acetato de etila e mistura com diclorometano e no extrato puro de diclorometano, sugerindo a diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos compostos às condições de extração.

Os extratos à base de etanol destacaram-se como os mais representativos para os constituintes fenólicos com ácido 3,5-di-*O*-galoilquínico, ácido gálico, ácido 5-galoilquínico e galocatequina galato descritos pela primeira vez nesta espécie. Em adição, as análises do conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante destacaram a influência dos processos extrativos sobre as características dos extratos nas cascas de *E. uchi* e apontaram os extratos de planta à base de etanol como promissores para constituintes fenólicos e potencial antioxidante das cascas de *E. uchi*. A análise da citotoxicidade *in vitro* do extrato testado

sugeriu que as cascas de *E. uchi* não apresenta risco, sendo necessário mais estudos *in vivo e in vitro* para sua comprovação.

Observou-se que a extração dos constituintes químicos das cascas de *E. uchi* em diferentes volumes (50, 100 e 150 mL) forneceu um protocolo simples para extração seletiva de seus constituintes. Enquanto o uso de CLAE-IES-EM mostrou ser uma estratégia útil para a quantificação de bergenina, ácido quínico, galocatequina galato e ácido gálico, representando a primeira análise quantitativa objetivando constituintes fenólicos para as cascas de *E. uchi*.

Desta forma, este estudo explica parcialmente a atividade medicinal das cascas de *E. uchi*, pela caracterização e quantificação de alguns dos constituintes fenólicos, porém mais estudos são necessários para identificar outros princípios ativos e demonstrar suas atividades biológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. A.; LAGO, I. A. S.; SOUZA, G. P.; PILÓ-VELOSO, D.; DUARTE, H. A.; ALCÂNTARA, A. F. C. Antioxidant activity of (+)-bergenin: a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). **Organic & Biomolecular Chemistry**, 6, p. 2713-2718, 2008.

ABREU, V. G. C.; CORRÊA, G. M.; LAGOS, I. A. S.; SILVA, R. R.; ALCÂNTARA, A. F. C. Pentacyclic triterpenes and steroids from the stem bark of *uchi* (*Sacoglottis uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 43 (4), p. 525-528, 2013.

ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G.; OYELEYE, S. I.; DADA, F. A.; EJAKPOVI, I.; BOLIGON, A. A. Cognitive enhancing and antioxidant potentials of velvet beans (*Mucuna Pruriens*) and horseradish (*Moringa Oleifera*) seeds extracts: a comparative study. **Journal of Food Biochemistry**, 41, p. 12292, 2017.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALCÂNTARA, M. A.; POLARI, I. L. B.; MEIRELES, B. R. L. A.; LIMA, A. E. A.; SILVA JUNIOR, J. C.; VIEIRA, E. A.; DOS SANTOS, N. A.; CORDEIRO, A. M. T. M. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. **Food Chemistry**, v. 275, p. 489-496, 2019.

ALI, M. C.; CHEN, J.; ZHANG, H.; LI, Z.; ZHAO, L.; QIU, H. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. **Talanta**, v.203, p. 16-22, 2019.

ALMEIDA, A. A. DE.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 414 – 420, 2007.

ALTEMIMI, A.; WATSON, D. G.; CHOUDHARY, R.; DASAR, M. R.; LIGHTFOOT, D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. **PLoS ONE**, v. 11 (2), p: e0148758, 2016.

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 (10), p. 2202-2210, 2010.

ANTIGO, J. L. D.; BERGAMASCO, R. C.; MADRONA, G. S. Effect of pH on the stability of red beet extract (*Beta vulgaris* L.) microcapsules produced by spray drying or freeze drying. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 72-77, 2018.

ARUOMA, O. I.; MURCIA, M.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, p. 1880–1885, 1993.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **Royal Society of chemistry**. v. 5, p. 27540–27557, 2015.

BARGIOTA, A.; DIAMANTI-KANDARAKI, E. The effects of old, new and emerging medicines on metabolic aberrations in PCOS. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v.3, p.1., 2012.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P.O.; EBERLIN, M. N. Phenolic Antioxidants Identified by

ESI-EM from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007.

BATAGLION, G.A.; DA SILVA, F. M. A.; SANTOS, J. M.; BARCIA, M. T.; GODOY, H. T.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Integrative approach using GC-MS and easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) for comprehensive lipid characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa*) oil. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.26, p. 171-177, 2015a.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian fruits by UCLAE-EM/EM. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280, 2015b.

BATAGLION, G.A; DA SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N; KOOLEN, H. 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.

BECKER, M. M.; NUNES, G. S.; RIBEIRO, D. B.; SILVA, F. E. P. S.; CATANANTE, G.; MARTY, J. L. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 30(5), p.1108-1114, 2019.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199–1200, 1958.

BRANCO, N. V.; ALAGIA, H. F.; LUNA, F. M.; FR. Effect of uxi (*Endopleura uchi*) tea in hepatic steatosis. **Revista da Sociedade de Medicina**, v.16, p. 25-9, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148p.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical Design: Chemometrics**. Elsevier: Amsterdam, 2006. 412 p.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of the analytical methods for assessing the total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, p.1309-1315, 1998.

CLIFFORD, M. N.; STOUPI, S.; KUHNERT, N. Profiling and Characterization by LC-MS of the Galloylquinic Acids of Green Tea, Tara Tannin, and Tannic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.2797, 2007.

CORNELL, J. A. Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data, 3 ed. John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 2002.

CORRÊA, M. P.; Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.

CUATRECASAS, J. A. A taxonomic revision of Humiriaceae, Contributions from the United States National Herbarium. Bulletin of the United States National Museum. Parte 2, 35, 1961.

DA SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; DA S. PEREIRA, J. L.; FLACH, A.; DA COSTA, L. A.M. A.; DE SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemotaxonomy of the Amazonian Unonopsis Species Based on GC-MS and Chemometric Analysis of the Leaf Essential Oils. **Records of Natural Products**, v.9, p.530-537, 2015.

DE FREITAS, F. A.; ARAÚJO, R. C.; SOARES, E. R.; NUNOMURA, R. C. S.; DA SILVA, F. M. A.; DA SILVA, S. R. S.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L.; FRANCO-MONTALBÁN, F. ; ACHO, L. D. R. ; LIMA, E. S.; BATAGLION, G. A.; KOOLEN, H. H. F. Biological evaluation and quantitative analysis of antioxidant compounds in pulps of the

Amazonian fruits bacuri (*Platonia insignis* Mart.), ingá (*Inga edulis* Mart.), and uchi (*Sacoglottis uchi* Huber) by UCLAE-IES-EM/MS. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, p. 1-10, 2018.

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

DEL-RIO, D.; STEWART, A. J.; MULLEN, W.; BURNS, J. LEAN, M.E.J.; BRIGHENTI, F.; CROZIER, A. CLAE-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 2807-15, 2004.

DENT, M; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; ELEZ GAROFULIĆ, I.; BOSILJKOV, T.; JEŽEK, D.; BRNČIĆ M. Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction. **Chemical and Biochemical Engineering**. 29, p. 475–484, 2015.

DOS SANTOS, F. N.; SANTOS, J. M.; MESQUITA, P. R. R; OLIVEIRA, K B.; RODRIGUES, F. M.; LOPES, W. A.; EBERLIN, M. N. Immediate differentiation of unusual seed oils by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry and chemometric analysis. **Analytical Methods**, v. 18, p. 3639 -3852, 2016.

DVORAK, Z; VRZAL, R. Berberine reduces insulin resistance: the roles for glucocorticoid receptor and aryl hydrocarbon receptor. **Fertility Sterility**, v. 95 (2). p. 7, 2011.

FARIAS, L. A. Vinte Anos De Química Verde: Conquistas e desafios. **Química Nova**, v.34, p.1089-1093, 2011.

FÜLÖP, I.; CAMIL-EUGEN, V.; AMALIA, M.; SILVIA, I. CLAE-EM/EM methods for the determination of estrogens and androgens in biological matrix– a minireview. **Farmácia**, v. 65, 2017.

GARCIA, I. M. Z.; DE OLIVEIRA, T. F.; SOARES, P. K. BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design — Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, p. 1–7, 2010.

GUBORY, K. H. AL; GARREL, C.; FAURE, P.; SUGINO, N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, p.551–560, 2012.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; MACHADO, T. M.; NASCIMENTO, L. F.; SOUZA, R. S. S.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; ACHO, L. D. R.; SANTOS, A. R. S.; COS, P., PEREIRA, M. M.; LIMA, E. S. L. Chemical Composition and Antioxidant, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of four Amazonian Byrsonima Species. **Phytotherapy Research**, v.31, p.1686-1693, 2017.

GUO, Y-J.; SUN, L-Q.; YU, B-Y.; QI, J. An integrated antioxidant activity fingerprint for commercial teas based on their capacities to scavenge reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v.237, p.645-653, 2017.

HE, QIANG; LV, YUANPING; YAO, KAI. Effects of tea polyphenols on the activities of a-amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1178–1182, 2006

HERRERA, F.; MANCHESTER, S. R.; JARAMILLO, C.; MACFADDEN, B.; SILVA-CAMINHA, S. A. Phytogeographic history and phylogeny of the Humiriaceae. **International Journal of Plant Science**, v. 171, p. 392–408. 2010.

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

HOSSAIN, M.B.; BRUNTON, N.P.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; O'DONNELL, C.P; MARTIN-DIANA, A.B.; BARRY RYAN, C. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.19, p. 582-590, 2012.

HYACIENTH, B. M. S.; ORTIZ, B.S.; PEREIRA, A. C. M.; SÁ HYACIENT, D. C.; MOYADO, J. A. V.; GONZALES, G. M.; NAVARRTE, A. CARVALHO, J. C. T. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec., a medicinal plant with potential anti-inflammatory activity: A review of its phytochemistry and biological activities. **African Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 13, p. 76-83, 2019.

HYACIENTH, B. M. S.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; TAVARES PICANÇO, K. R.; PEREIRA, A. C. M.; SÁ HYACIENTH, D. C.; DE SOUZA, G. C.; RODRIGUES SARQUIS R. S. F.; ADUANGA, G. M. G.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C. T. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.: A medicinal plant for gynecological treatments – Reproductive toxicity assessment in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112457>, 2020.

INBATHAMIZH, L; PADMINI, E. Quinic Acid as a potent drug candidate for prostate cancer – a comparative pharmacokinetic approach. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical research**, v. 6, p. 106-112, 2013.

INOUE, M.; SAKAGUCHI, N.; ISUZUGAWA, K.; TANI, H.; OGIHARA, Y. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.23 (10), p. 1153-7, 2000.

JANKUN, J.; SELMAN, S. H.; SWIERCZ, R. Why drinking green tea could prevent cancer. **Nature**, v. 387, p. 561, 1997.

JING, L.; MA, H.; PENGCHENG, F.; GAO, R.; JIA, Z.; Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on

hypoxia-induced injury in PC12 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 287, 2015.

KHOIGANI, S.; RAJAEI, A.; GOLI, S. A. H.. Optimization of ultrasound-assisted extraction for maximum quantity and quality of phenolics from *Stachys lavandulifolia*. **Separation Science and Technology**, v. 52, p. 1815-1825, 2017.

KANEKO, Y. K.; TAKII, M.; KOJIMA, Y.; YOKOSAWA, H.; ISHIKAWA, T. Structure-Dependent Inhibitory Effects of Green Tea Catechins on Insulin Secretion from Pancreatic β -Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p.476–481, 2015.

KATERJI, M.; FILIPPOVA M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v.2019, p. 1-29, 2019.

KEBEDE, M.; ADMASSU, S. Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products. **Advances in Food Technology and Nutrition Sciences**, v. 5 (2), p. 38-49, 2019. |

KINUPP, V. P. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2015. 434 p.

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–IES-EM/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467, 2013.

KOULMAN, A.; TAPPER, B. A.; FRASER, K.; CAO, M.; LANE, G. A.; RASMUSSEN, S. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 21, p. 421-428, 2007.

LEE, L. S.; KIM, S.H.; KIM, Y. B.; KIM, Y. C. Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity. **Molecules**, v. 19, p. 9173–9186, 2014.

LEMOES, M.; SANTIN, J.R.; MIZUNO, C.S.; BOEING, T.; SOUSA, J.P.B.; NANAYAKKARA, D.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p.238–245, 2015.

LI, B. H.; WU, J. D.; LI, X. L. LC–MS/MS determination and pharmacokinetic study of bergenin, the main bioactive component of *Bergenia purpurascens* after oral administration in rats. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.3, p. 229-234, 2013.

LI, Y.F., HU, L. H., LOU, F. C., LI, J., SHEN, Q. PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*. **Journal of Asian Natural Product Research**, v. 7, p.8-13, 2005.

LIM, H. K.; KIM H. S.; CHOI, H. S.; OH, S.; CHOI, J.; Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 469-474, 2000.

LIN, L.; YU, Q.; YAN, X.; HANG, W.; ZHENG, J.; XING, J.; HUANG, B. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. **Analyst**, v. 135, p. 2970-2978, 2010.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W.; WU, H.; CHEN, S. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, p. 1374, 2016.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 517S-520S, 2003.

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v.37(3), p. 447–450, 2007.

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

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p. 1370-1376, 2009.

MARRUBINI, G.; APPELBLAD, P.; GAZZANI, G.; PAPETTI, A. Determination of free quinic acid in food matrices by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with UV detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 80-85, 2015.

MEDEIROS, H.; HOLANDA, A. S. S.; AMORIM, A. M. A. 2015. Humiriaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23294>>. Acesso em: 20 Jul. 2019.

MIERZIAK J, KOSTYN K, KULMA A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, 2014.

MOLLER, J. K. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiataeae family. **Food Chemistry**, v.100, p. 1283-1288, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26 (2), p. 211-219, 2004.

MOTTA, E. V. S.; LEMOS, M.; COSTA, J. C.; BANDERÓ-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN, H.; BASTOS, J. K. Galloylquinic acid derivatives from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity. **Chemico-Biological Interactions**, v.,261, p. 145-155, 2016.

MUNIZ, M. P. Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas, 2013. 49-62f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE.MEDLINE® / PubMed® Resources Guide. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2019: Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>> Acesso em: 30 de julho de 2019.

NAVARRO-YEPES, J.; ZAVALA-FLORES, L.; ANANDHAN, A.; WANG, F., SKOTAK, M.; CHANDRA, N.; FRANCO-CRUZ, R. Terapia gênica antioxidante contra a morte celular neuronal. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 2, p.206-230, 2013.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M.A.; TANEJA, S.C.; AHMAD, S.F.; BANI, S.; QAZI, G.N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis—A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 112, p. 401–405, 2007.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO A. C. M.; BASTOS S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 2003-2010, 2012.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M.; J. Braz.Characterization of Bergenin in *Endopleura uchi* Bark and its Anti-Inflammatory Activity. **Chemical Society**, v.20, p. 1060-1064, 2009.

NWABUFO, C. K.;EL-ANEED, A.; KROL, E. S. Tandem mass spectrometric analysis of novel caffeine scaffold-based bifunctional compounds for Parkinson's disease. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 33, p.1792–1803, 2019.

OANCEA, S.; MOISEENCO, F.; TRALDI, P. Total phenolics and anthocyanin profiles of Romanian wild and cultivated. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, p. 8350-8360, 2013.

OLIVEIRA, G.R. B.; SIMÃO, A. A.; PEREIRA, L. S.; ROCHA, F. D.; RAPOSO, N. R. B.; OLIVEIRA, V.; PEREIRA, T.V.; CARMO, H. P.; OLIVEIRA, T. C.; SOUSA, O. V.; ARAUJO, A. L. A.; YAMAMOTO, C. H. Stem bark extracts of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec: Inhibition of pancreatic lipase and antioxidant activity. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 11, p.472-479, 2017.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.4619–4626, 2001.

PAULI, E. D.; MALTA, G. B.; SANCHEZ, P. M.; MOREIRA, I. C.; SCARMINIO, I. S. Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves. **Analytical Chemistry Research**, v. 2, p.23-29, 2014.

PAULI, E. D.; SCARMINIO, I. S.; TAULER, R. Analytical investigation of secondary metabolites extracted from *Camellia sinensis* L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. **Journal of Chemometrics**, v.30, p. 75-85, 2016.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; SILVA, E.; VALENTE, K.; BRAUN, M.; WANG, X.; WINK, M. Bark extract of the Amazonian tree *Endopleura uchi* (Humiriaceae) extends lifespan and enhances stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**, v. 24(5), p. 915, 2019.

PEREIRA, V. V.; DA FONSECA, F. A.; BENTO, C. S. O.; OLIVEIRA, P. M.; ROCHA, L. L.; AUGUSTI, R.; MENDONÇA FILHO, C. V.; SILVA, R. R. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprint of the *Byrsonima* species. **Revista Virtual de Química**, v.7, p. 2539-2548, 2015.

PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N.; MAHMOOD, N. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity. **Journal of Natural Products**, v.59, p. 565–569, 1996.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical Biochemist Reviews**, v.30, p.19-34, 2009.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p.1-13, 2017.

POLITI, F. A. S.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Preliminary tests on acute oral toxicity and intestinal motility with extract of pulverized bark of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) in mice. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1 (1), p.187-189, 2010.

POLITI, F.A.S; DE MELLO, J.C.P.; MIGLIATO, K.F; NEPOMUCENO, A.L.A.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p.2757-2768, 2011.

PULIDO, R.; BRAVO, L. SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.3396–3402, 2000.

RASHED, M.S.; BUCKNALL, M. P.; LITTLE, D.; AWAD, A.; JACOB, M.; ALAMOUDI, M.; ALWATTAR, M.; OZAND, P. T. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. **Clinical Chemistry**, v. 43(7), p.1129–1141, 1997.

RASTOGI S., RAWAT, A. K.S. A comprehensive review on bergenin, a potential hepatoprotective and antioxidative phytoconstituent. **Herba Polonica**, v. 54, p.66-79, 2008.

RE, R., PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26 (910), p. 1231–1237, 1999.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. SEBRAE/INPA. Manaus, Amazonas, 2001. 405 p.

RIBEIRO, J. E. L. DA S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. DA S.; DE BRITO, J. M.; DE SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. DA C.; DA SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia. In: SOTHERS, C. A.; BRITO, J. M.; PRANCE, G. T. Humiriaceae. Manaus-AM: INPA, 502-503 p., 1999.

ROCHA, P. R. N.; FREITAS, F. A.; ANGOLINI, C. F. F.; VASCONCELOS, L. S. F.; SILVA, A. L. B.; COSTA, E. V.; SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; BATAGLION, G. A.; SOARES, P. K.; KOOLEN, H. H. F. Statistical mixture design investigation for extraction and quantitation of aporphine alkaloids from the leaves of *Unonopsis duckei* R.E. Fr. by CLAE-EM/EM. **Phytochemical Analysis**, v. 29, p. 569, 2018.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines in the Jau National Park (JNP) Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**, v. 20(5), p.378-391, 2006.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p.295-302, 2007.

ROY, M. K.; KOIDE, M.; RAO, T. P.; OKUBO, T.; OGASAWARA, Y.; JUNEJA, L. R. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions:

Relationship between total polyphenol and individual catechin content. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, p.109-124, 2010.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, 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.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v.44, p. 2072–2075, 2011.

SANTOS, J. L. F. ; PAGANI, E.; RAMOS, J.; RODRIGUES, E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p. 503-515, 2012.

SAWAYA, A. C. H. F.; CATHARINO, R. R.; PESAMOSCA, E. M.; FOGAÇA, A.; GODOY, H. T.; DAUDT, C. E.; EBERLIN, M.N. Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 730-734, 2011.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M. A.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, B. V.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v.129, p. 739–744, 2004.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F.; CHAVES, F. C. M.; POPPI, R. J.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S.; Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 409, 2012.

SCHULTES, R. E. De *Plantis toxicariis* e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, p. 89-94, 1979.

SHENG, Y.; PERO, R.W.; WAGNER, H. Treatment of chemotherapy induced leukopenia in the rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 137–143, 2000.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. The **Journal of Biochemistry**, v. 215, p.213-219, 1993.

SILVA, A. R. F.; LIMA, D. B.; LEYVA, A.; DURAN, R.; BATTHYANY, C.; AQUINO, P. F.; LEAL, J. C.; RODRIGUEZ, J. E.; DOMONT, G. B.; SANTOS, M. D. M. ; CHAMOT-ROOKE, J. ; BARBOSA, V. C. ; CARVALHO, P. C. DiagnoProt: a tool for discovery of new molecules by mass spectrometry. **Bioinformatics**, v.33, p.1883-1885, 2017.

SILVA, F. M. A; HANNA, A.C.; DE SOUZA, A.A.; SILVA-FILHO, F. A.; CANHOTO, O. M. F; MAGALHÃES, A.; BENEVIDES, P. J. C.; AZEVEDO, M. B. M.; SIANI, A. C.; POHLIT, A. M.; SOUZA, A. D. L; KOOLEN, H. H. F. Integrative Analysis Based on CLAE-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* Bark Biomass Residues: Determination of Ellagic Acid Derivatives. **Journal of Brazillian Chemical Society**, v. 30(4), p.830-836, 2019.

SILVA, F. M. A; SILVA-FILHO, F. A.; LIMA, B. R.; ALMEIDA, R. A.; SOARES, E. R; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; Chemotaxonomy of the Amazonian Unonopsis Species Based on Leaf Alkaloid Fingerprint Direct Infusion ESI-EM and Chemometric Analysis. **Journal of Brazillian Chemical Society**, v. 27, p.599, 2016.

SILVA, L. R.; TEIXEIRA, R.; Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, p. 889-897, 2015.

SILVA, S. L.; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 187-192, 2009.

SINGH, A.; SINGH, S.; PRASAD, S. M. Role of Medicinal Plants for Health Perspective: Special Reference to Antioxidant Potential. **Journal of Chemical Biology & Theapeutics**, v. 1 (2), p. 106, 2016.

SNYDER, L. R.; Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatographic Science**, v. 16, p. 223-234, 1978.

SOARES, P. K. BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design of fractioned and total extracts from *Erythrina speciose* Andrews leaves. **Journal of Separation Science**, v.32, p. 644-652, 2008.

SOARES, P. K. BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixtures design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3002-3310, 2007.

SOARES, P. K.; SCARMINIO, I. S. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 78-85, 2008.

SOH, Y.; KIM, J. A.; SOHN, N. W.; LEE, K. R.; KIM, S. Y. Protective effects of quinic acid derivatives on tetrahydropapaveroline-induced cell death in C6 glioma cells. **Biological Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p.803-807, 2003.

TACON, L. A.; FREITAS, L.A. P. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 65-71, 2013.

TAKAHASHI, H.; KOSAKA, M.; WATANABE, Y.; NAKADE, K.; FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1781-1788, 2003.

TAVERNE, Y. J.; MERKUS, D.; BOGERS, AD J.; HALLIWELL, B.; DUNCKER, D. J.; LYONS, T. Reactive oxygen species: radical factors in the evolution of animal life W. **BioEssays**, v. 40, p. 1700158, 2018.

TUNGMUNNITHUM, D.; GARROS, L.; DROUET, S.; RENOUEARD, S.; LAINÉ, E.; HANO, C.; Green Ultrasound Assisted Extraction of trans Rosmarinic Acid from *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. Leaves. **Plants**, v. 8, p. 50, 2019.

UNGVARI, Z.; KALEY, G.; DE CABO, R.; SONNTAG, W. E.; CSISZAR, A. Mechanisms of Vascular Aging: New Perspectives. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**, v. 10, p. 1028-1041, 2010.

VAN MIDDLESWORTH, F.; CANNELL, R.J.P. Dereplication and Partial Identification of Natural Products. In: Cannell R.J.P. (eds) **Natural Products Isolation**. Humana Press: New York, v. 4, p. 229-327, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 14p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva, 2011. 14p.

WU, L.Y.; JUAN, C. C.; HO, L. T.; HSU, Y. P.; HWANG, L. S. Effect of Green Tea Supplementation on Insulin Sensitivity in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.643 a 648, 2004.

XIANG, T.; XIONG, Q. B.; KETUT, A.I.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; WU, L. J.; KADOTA, S. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. **Planta Medica**, v.67 (4), p. 322-325, 2001.

YANG, X. R.; YE, C. X.; XU, J. K.; JIANG, Y. M. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by CLAE. **Food Chemistry**, v. 100, p.1132–1136, 2007.

ZHAO, Y.; CHEN, P.; LIN, L.; HARNLY, J. M.; YU, L.; LI, Z. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green *pu-erh*, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. **Food Chemistry**, v.126, p. 1269-1277, 2011.

8. ANEXO

ANEXO I

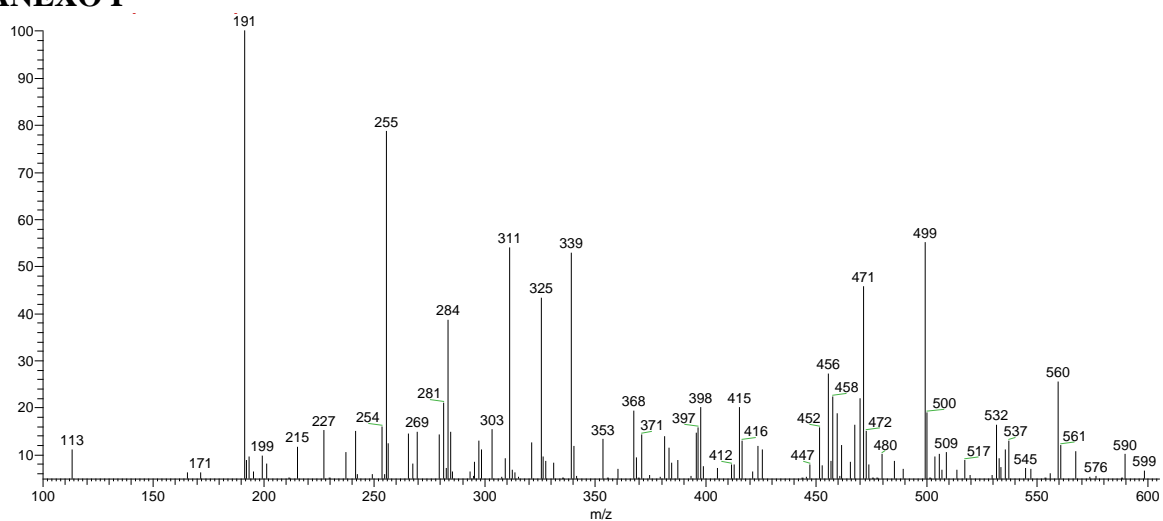


Figura A 1. Espectro de massas no modo negativo da mistura de solvente **DCM** das cascas de *E. uchi*

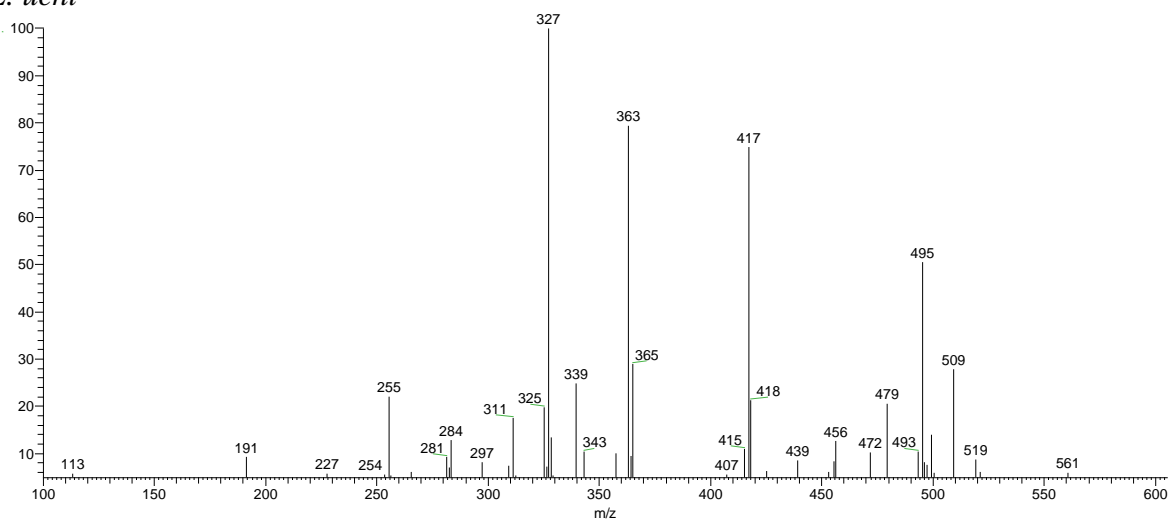


Figura A 2. Espectro de massas no modo negativo da mistura de solvente **AcOEt** das cascas de *E. uchi*

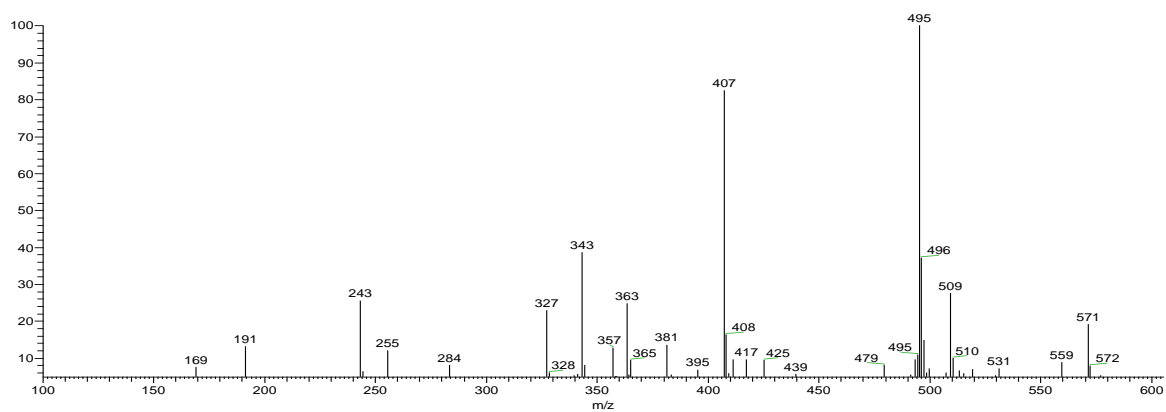


Figura A 3. Espectro de massas no modo negativo da mistura de solvente **EtOH** das cascas de *E. uchi*

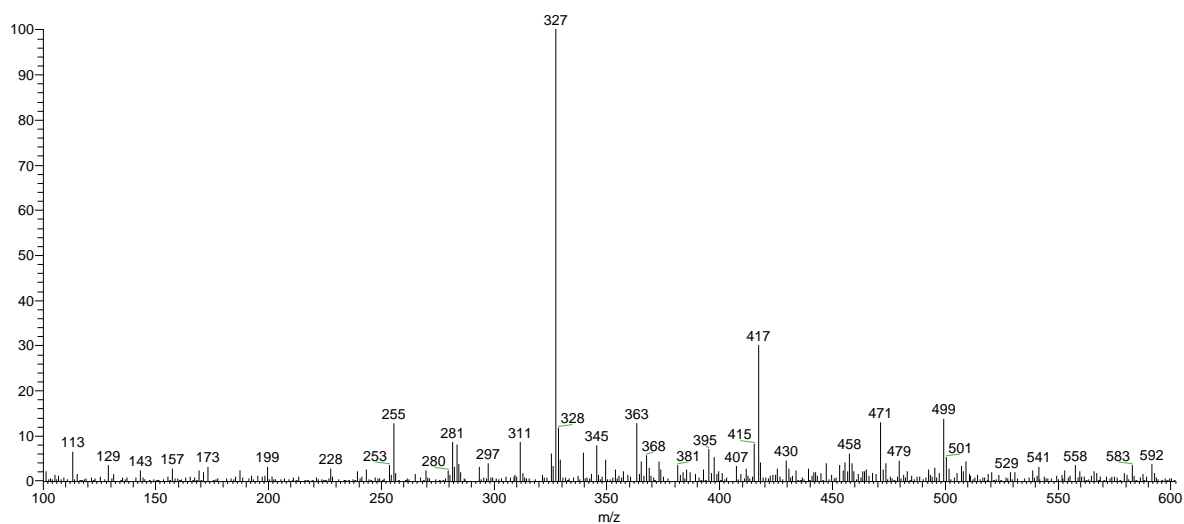


Figura A 4. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente **DCM+AcOEt** das cascas de *E. uchi*

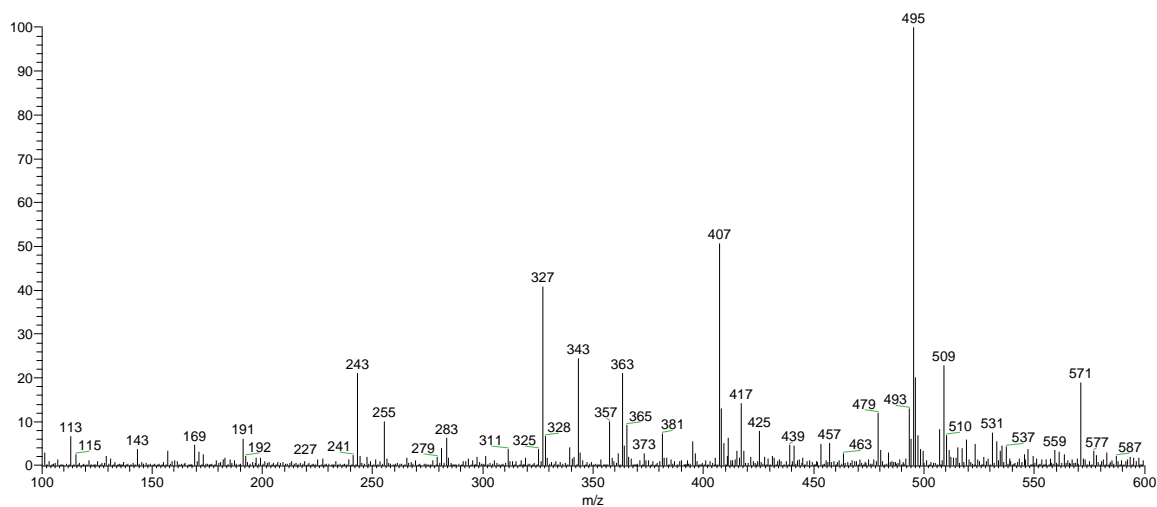


Figura A 5. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente **DCM+EtOH** das cascas de *E. uchi*

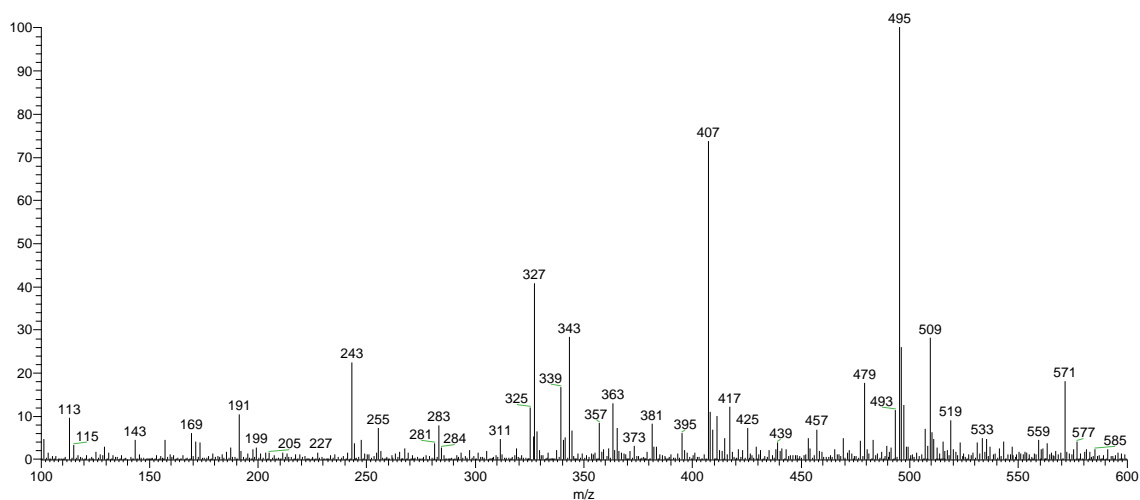


Figura A 6. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente **AcOEt+EtOH** das cascas de *E. uchi*

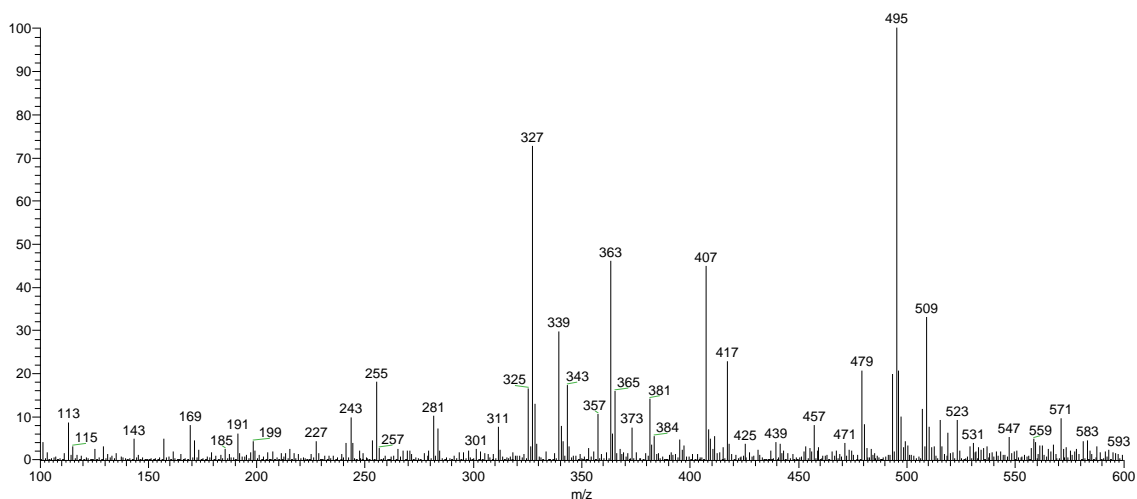


Figura A 7. Espectro de massas no modo negativo de ionização da mistura de solvente **DCM+AcOEt+EtOH** das cascas de *E. uchi*

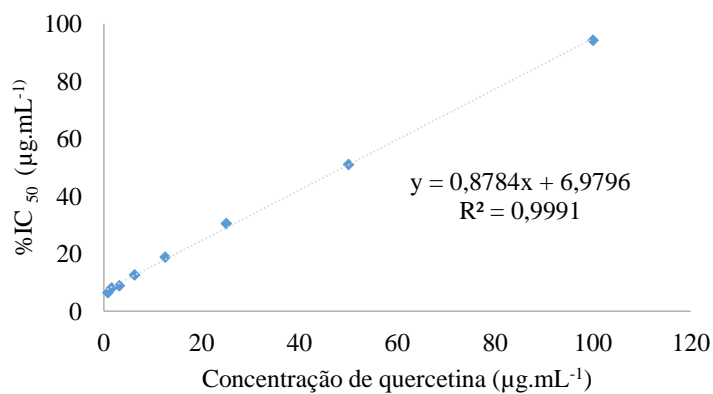


Figura A 8. Curva analítica do padrão quercetina para determinação do valor de % CI₅₀

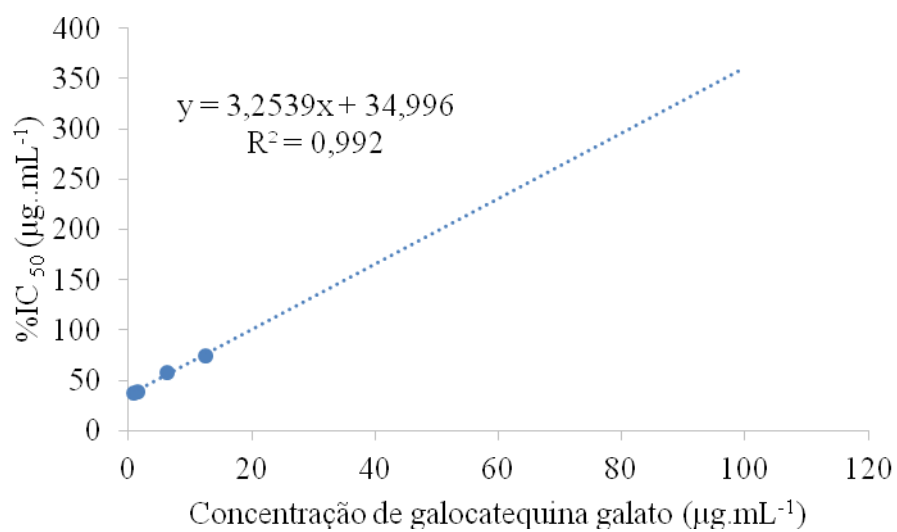


Figura A 9. Curva analítica do padrão galocatequina galato para determinação do valor $\% CI_{50}$

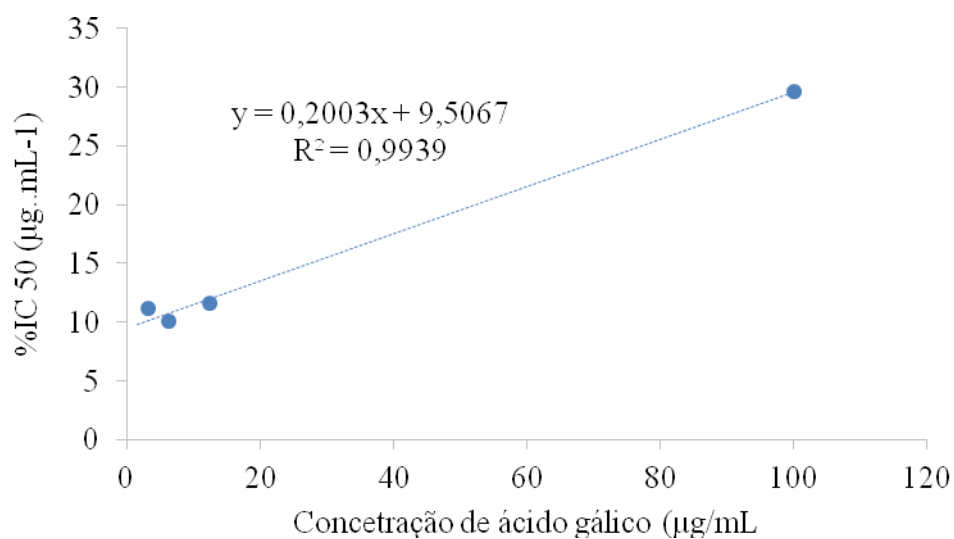


Figura A 10. Curva analítica do padrão ácido gálico para determinação do valor $\% CI_{50}$

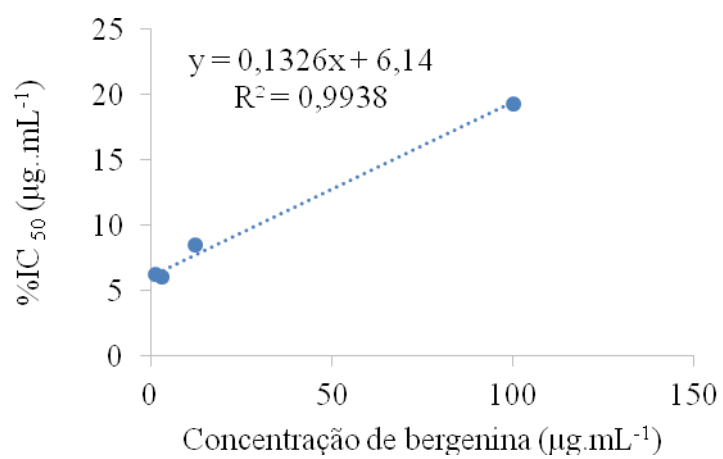


Figura A 11. Curva analítica do padrão bergenia para determinação do valor % CI₅₀

Tabela A 1. Dados utilizados na análise de ACP baseado nas intensidades dos picos obtidos entre m/z 100 a 600, após a eliminação dos sinais de intensidade abaixo de 5%

	dc	ea	et	dc+ea	dc+et	ea+et	dc+ea+et
161	3.49	0	0	0	0	0	0
169	0	0	24.30	0	0	4.36	5.05
190	0	0	0	0	0	0	0
191	100.00	2.43	20.40	0.00	6.68	10.72	3.94
192	9.36	0	0	0	0	0	0
242	1.94	0	2.13	3.00	0	0	0
243	0	0	26.36	3	17.59	27.34	4.70
255	20.79	12.83	18.37	25.06	19.32	7.52	17.94
281	16.5	4.52	2.85	7.48	5.91	0	8.01
282	2.4	0	2.48	2.68	0	0	0
283	4.41	1.81	5.95	0	7.26	6.63	0
284	16.12	5.16	2.69	12.24	4.51	0	4.67
311	35.31	4.61	13.77	14.53	5.69	4.16	6.85
325	35.88	7.02	14.51	19.56	11.80	9.17	8.78
326	8.48	0	2.31	0	0	0	0
327	2.90	48.96	67.05	40.73	58.80	29.28	70.98
328	0	11.65	8.96	15.76	6.44	0	11.74
339	32.20	8.91	20.38	29.28	8.67	7.95	18.94
340	7.65	0	5.3	5.79	2.62	0	3.16
341	1.81	0	6.73	2.49	3.61	1.75	0
342	0	0	0	0	0	0	0
343	3.82	7.54	30.89	3.10	23.65	27.85	18.11
344	0	0	5.4	0	0	2.21	0
357	0	4.33	20.41	0	9.67	9.31	8.31
363	0	39.84	29.05	22.76	29.86	19.13	47.06
364	0	4.21	6.68	0	3.08	0	6.82
365	0	16.07	10.29	7.45	15.05	7.79	16.22
381	3.72	0	11.67	2.36	10.55	12.75	10.54
407	0	0	75.76	7.06	51.9	82.47	38.66
408	0	0	13.44	0	10.30	10.99	4.53
409	0	0	1.98	0	4.01	6.207	2.077
415	27.38	6.19	2.30	11.20	0	0	0
416	4.33	0	0	3.47	0	0	0
417	0	38.50	24.04	33.78	29.16	19.89	29.84
418	0	9.30	0	6.67	3.69	0	2.23
455	0	0	0	0	0	1.84	0
456	18.70	2.15	0	6.41	0	0	0
457	6.87	0	0	2.61	2.51	4.15	7.78
458	12.00	0	0	2.04	0	0	0
459	6.24	0	0	0	0	0	0
467	5.47	0	0	1.77	0	1.99	0
468	0	0	0	0	0	0	0
469	0	0	0	0	0	0	0
470	7.30	0	0	0	0	0	0
471	15.25	2.84	0	8.16	0	0	0
472	22.68	6.25	0	3.25	0	0	0
478	1.68	0	0	0	0	0	0
479	0	14.86	7.8	4.70	15.9	13.96	19.74
493	0	9.36	11.36	6.78	19.56	12.86	17.93
494	0	0	0	0	1.84	0	3.75
495	0	52.34	39.38	8.9	68.97	69.13	83.01
496	0	10.54	20.65	0	22.07	24.25	20.34
499	51.15	8.97	4.77	20.21	0	1.71	0
500	14.59	0	0	4.89	0	0	0
501	0	0	0	1.84	0	0	1.69
509	3.52	20.23	26.93	4.87	27.08	25.56	30.52
571	0	0	14.09	0	16.85	18.80	3.74
572	0	0	2.66	0	0	1.93	0
599	2.2233	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0