



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Caryocar*  
*Villosum* (Aubl.) Pers. (PIQUIÁ)**

GABRIELA DA SILVA BEZERRA  
MESTRADO

MANAUS- AM  
2021

GABRIELA DA SILVA BEZERRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Caryocar*  
*Villosum* (Aubl.) Pers. (PIQUIÁ)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, na linha de Pesquisa Produtos Naturais e Biomoléculas.

**ORIENTADORA:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

**CO-ORIENTADOR:** Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

MANAUS- AM

2021

## Ficha Catalográfica

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

B574e Bezerra, Gabriela da Silva  
Estudo fitoquímico e potencial antioxidante de caryocar villosum  
(Aubl.) Pers. (piquiá) / Gabriela da Silva Bezerra . 2021  
138 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva  
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Caryocaraceae. 2. Quimiometria. 3. Espectrometria de massas.  
4. Ressonância magnética nuclear. 5. Antioxidante. I. Nunomura,  
Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III.  
Título

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Caryocar  
Villosum* (Aubl.) Pers. (PIQUIÁ)**

**GABRIELA DA SILVA BEZERRA**

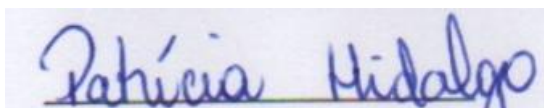
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre(a) em Química.

Aprovada em, 29 de abril de 2021.



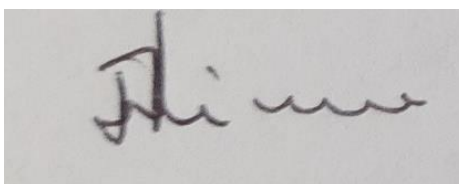
---

RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA (PPGQ/UFAM)  
Presidente/Orientadora



---

PATRÍCIA DE SOUZA PINTO HIDALGO (EST/UEA)  
Membro Externo



---

MARIA DA PAZ LIMA (PPGQ/INPA)  
Membro Interno

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 29 de abril de 2021.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que em todos os momentos esteve presente, me dando discernimento e forças para que eu conseguisse chegar onde eu estou.

A minha família que sempre acreditou em mim e sempre esteve ao meu lado, em especial a minha mãe Maria Salete Silva e minha avó Margarida Rosa da Conceição em memória.

Ao meu esposo Samoel Suênio Santos de Oliveira, que nos momentos mais difíceis nunca me deixou desistir, quando eu duvidei da minha própria capacidade em prosseguir ele me provou que eu tenho forças e capacidade para ir muito além.

A Dr. Rita de Cássia S. Nunomura que me orientou e proporcionou grande conhecimento acerca da pesquisa e finalização desse trabalho. Pelos ensinamentos e pela infinita paciência, que mesmo com todos os motivos para desistir de mim, não o fez, e sou imensamente grata por isso.

Ao Dr. Felipe Moura da Silva que foi meu coorientador e que sem dúvida alguma acrescentou muito a esse trabalho, tanto no que se diz respeito ao conhecimento adquirido quanto sobre as análises realizadas, sempre estando disposto a ajudar e proporcionado novos pontos de vistas e otimizações de processos.

Aos professores que participarão da banca avaliadora Dr. Maria da paz Lima e Dr. Patrícia de Souza Pinto Hidalgo, que irão enriquecer de forma significativa esse trabalho com seus conhecimentos.

A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao programa de Pós-graduação em Química por sempre estar à disposição para sanar dúvidas e solicitações.

A Central Analítica, em especial aos laboratórios LAEQ, LABCEM e NMRLAB onde foram realizadas a maior parte das análises.

Ao INPA e ao LABFCF pela rapidez e disponibilidade na solicitação de análises.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Caryocar villosum* é uma árvore encontrada na Amazônia central, pertencente à família Caryocaraceae, popularmente conhecida como Piquiá. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos prévios com algumas espécies do gênero *Caryocar* indicaram substâncias com propriedades biológicas. Dessa forma, o objetivo desse estudo consistiu em realizar a caracterização dos constituintes químicos presentes nos extratos das cascas do caule (obtidos pela análise quimiométrica) de *C. villosum* por meio da técnica de espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e avaliação do potencial antioxidante *in vitro*. Com base na análise quimiométrica, pelo método do triângulo de Snyder, nos quais foram utilizados métodos fundamentados em projeção (ACP - Análise de Componentes Principais) e métodos baseados na distância entre as amostras (AH - Análise Hierárquica de Agrupamentos), também conhecida como Análise de Cluster, foram selecionados somente as amostras do primeiro grupo de extratos que compõe o triângulo 1 (acetona, metanol e água) para a caracterização com base no padrão de fragmentação das substâncias comparando com os dados da literatura. Foram feitas tentativas de caracterização de 7 substâncias fenólicas, sendo elas: o ácido gálico, ácido elágico, ácido elágico ramnosídeo, a dilactona do ácido valônico, 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose, 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose e 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose. O extrato à base de metanol foi destacado como o mais representativo por conter os constituintes fenólicos. Com isso, foi possível confirmar a identificar por meio de isolamento 03 substâncias: ácido elágico, ácido elágico ramnosídeo e 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose nas quais duas delas foram identificadas como sendo as substâncias responsáveis pela separação dos grupos quimiométricos. A avaliação do teor de compostos fenólicos, realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, mostrou que a espécie *C. villosum* apresentou percentual de fenólicos em seus extratos entre 20,2 a 36,9 %, com maior conteúdo para o extrato AcOEt/H<sub>2</sub>O/EtOH, com 329,4  $\mu$ g EAG/g. Todos os extratos obtiveram alta porcentagem total de inibição do radical livre DPPH entre 91,3 a 95,3% (com CE<sub>50</sub> na faixa de inibição entre 3,5 a 6,7  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), com exceção do extrato aquoso que obteve percentual inibitório de 46,0%. As substâncias isoladas também apresentaram alta porcentagem de inibição do DPPH com CE<sub>50</sub> nas concentrações de 5,6  $\mu$ g/mL para P1(3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose) 12,3  $\mu$ g.mL para P2(ácido elágico ramnosídeo) e 5,6  $\mu$ g.mL para P3(ácido elágico). Assim, a parte utilizada da espécie *C. villosum* mostrou ser uma fonte promissora de compostos fenólicos com atividade antioxidante *in vitro*.

**Palavras-chave:** Caryocaraceae; quimiometria; espectrometria de massas; ressonância magnética nuclear; antioxidante.

## ABSTRACT

*Caryocar villosum* is a tree found in the central Amazon, belonging to the Caryocaraceae family, popularly known as Piquiá. Previous phytochemical and pharmacological studies with some species of the genus *Caryocar* indicated substances with biological properties. Thus, the objective of this study was to characterize the chemical constituents present in the extracts of the stem bark (obtained by chemometric analysis) of *C. villosum* through the technique of mass spectrometry, nuclear magnetic resonance and evaluation of the antioxidant potential in vitro. Based on the chemometric analysis, using the Snyder triangle method, in which methods based on projection (PCA - Principal Component Analysis) and methods based on the distance between (HCA - Hierarchical Cluster Analysis), also known as Cluster, were selected only as the first group of extracts that make up triangle 1 (acetone, methanol and water) for the characterization based on the fragmentation pattern of the substances compared with the data in the literature. Cascades were used to characterize 7 phenolic substances, namely: gallic acid, ellagic acid, ramnoside ellagic acid, dilactone vanoleic acid, 3,6 - di - O - gallo - D - glucose, 3,4,6 - tri - O - Galloil - D - Glucose and 1,2,3,6 - Tetra - O - Galloil -  $\beta$  - D - Glucose. The extract based on methanol was highlighted as the most representative to contain the phenolic compounds. With this, it was possible to confirm the identification through isolation 03 substances: ellagic acid, ellagic acid ramnoside and 3,6 - di - O - gallo - D - glucose in which two of them were identified as being the associated substances by the separation of the groups chemometrics. The evaluation of the content of phenolic compounds, carried out by the Folin-Ciocalteu method, showed that a type *C. villosum* presented a percentage of phenolics in its extracts between 20.2 to 36.9%, with a higher content for the extract AcOEt / H<sub>2</sub>O / EtOH, with 329.4  $\mu\text{g}$  EAG / g. All extracts obtained a high total percentage of DPPH free radical inhibition between 91.3 to 95.3% (with EC<sub>50</sub> in the inhibition range between 3.5 to 6.7  $\mu\text{g.mL}$ ), 1 with the exception of aqueous extract that obtained an inhibitory percentage of 46.0%. The isolated substances also showed a high percentage of DPPH inhibition with EC<sub>50</sub> at concentrations of 5.6  $\mu\text{g.mL}$  for P1 (3,6-di-O-galloyl-D-glucose) 12,3  $\mu\text{g.mL}$  for P2 (ramnoside ellagic acid) and 5.6  $\mu\text{g.mL}$  for P3 (ellagic acid). Thus, the part used of the species *C. villosum* proved to be a promising source of phenolic compounds with antioxidant activity in vitro.

**Keywords:** Caryocaraceae; chemometry; mass spectrometry; nuclear magnetic resonance; antioxidant.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- % - Porcentagem
- Abs – Absorbância
- ABTS – Ácido 2,2`-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfúrico)
- AA – Atividade antioxidante
- AcOEt – Acetato de etila
- ACP - Análise de Componentes Principais
- AH - Análise Hierárquica de Agrupamentos
- CE<sub>50</sub> – Concentração efetiva média
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-UV - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta
- DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazina
- EAG – Equivalente de ácido gálico
- EM – Espectrometria de massas
- EM/EM – Espectrometria de massas sequencial
- ESI – Fonte de ionização electrospray
- ESI-MS – Fonte de ionização electrospray – espectrometria de massas
- EtOH - Etanol
- FT - Fenólicos totais
- m/z – Razão massa carga
- MeOH – Metanol
- mm – Milímetros
- min - Minutos
- nm – Nanômetros
- PN – Produtos naturais
- RMN – Ressonância magnética nuclear



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas dos fármacos isolados de plantas. ....	19
<b>Figura 2.</b> Influência do nº e posição de substituintes do anel aromático na ação antioxidante. ....	24
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de reação entre o reagente radicalar DPPH <sup>*</sup> e uma substância antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. ....	25
<b>Figura 4.</b> Reação de oxirredução do ácido gálico com molibdênio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu). ....	26
<b>Figura 5.</b> Faixas de deslocamentos químicos aproximados de RMN de <sup>13</sup> C.....	28
<b>Figura 6.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (ácidos graxos e carotenoides).....	34
<b>Figura 7.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (Compostos voláteis).....	34
<b>Figura 8.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (Compostos fenólicos).....	34
<b>Figura 9.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (Saponinas).....	35
<b>Figura 10.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (Saponinas triterpênicas).....	36
<b>Figura 11.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (Glicosídeos fenólicos).....	36
<b>Figura 12.</b> Substâncias presentes nas espécies do gênero <i>Caryocar</i> (Dihidroisocumrina glicosídeo) .....	36
<b>Figura 13.</b> Partes da espécie <i>C. villosum</i> (Piquiá): 1- árvore inteira; 2- tronco; 3-tronco com casca do caule retirada; 4- folhas; 5- fruto inteiro; 6- fruto cortada.....	39
<b>Figura 14.</b> Ilustração da espécie <i>C. villosum</i> mostrando: a) ramo foliar; b) fruto imaturo. ....	39
<b>Figura 15.</b> Substâncias identificadas na espécie <i>Caryocar Villosum</i> .....	41
<b>Figura 16.</b> Ilustração esquemática do <i>triângulo de Snyder</i> .....	45
<b>Figura 17.</b> Local de coleta da espécie <i>C. villosum</i> .....	46
<b>Figura 18.</b> Esquema da metodologia do <i>triângulo de Snyder</i> para o preparo dos extratos de <i>C. villosum</i> .....	47

<b>Figura 19.</b> Fluxograma de escolha de melhor solvente extrator para o isolamento das substâncias .....	50
<b>Figura 20.</b> Curva de calibração do ácido gálico para a determinação da estimativa do conteúdo de FT presentes nos extratos de <i>C.villosum</i> .....	54
<b>Figura 21.</b> Ensaio colorimétrico da determinação de FT pelo método de Folin-Ciocalteu. ....	54
<b>Figura 22.</b> Gráfico obtido da Análise de Componentes Principais (ACP) dos extratos de <i>C. villosum</i> .....	57
<b>Figura 23.</b> Dendrograma das amostras de <i>C. villosum</i> obtida pela Análise Hierárquica de Agrupamentos (AH).....	58
<b>Figura 24.</b> Biplots da Análise de Componentes Principais (ACP).....	58
<b>Figura 25.</b> Estruturas das substâncias fenólicas presentes nas cascas do caule de <i>C. villosum</i> ; ácido gálico <b>(1)</b> , ácido elágico <b>(2)</b> , ácido elágico ramnosídeo <b>(3)</b> , a dilactona do ácido valônico <b>(4)</b> , 3,6-di-O-galoil-D-glicose <b>(5)</b> , 3,4,6-tri-O-galoil-D-glicose <b>(6)</b> , 1,2,3,6-tetra-O-galoil-β-D-glicose <b>(7)</b> .....	60
<b>Figura 26.</b> Espectro EM/EM do ácido gálico m/z 169 [M - H] <sup>-</sup> . ....	61
<b>Figura 27.</b> Proposta de fragmentação do ácido gálico <b>(1)</b> m/z 169 [M - H] <sup>-</sup> . ....	62
<b>Figura 28.</b> Espectro EM/EM do ácido elágico m/z 301 [M - H] <sup>-</sup> . ....	63
<b>Figura 29.</b> Proposta mecanística e demais fragmentos do ácido elágico <b>(2)</b> . ....	63
<b>Figura 30.</b> Espectro EM/EM da substância ácido elágico ramnosídeo 447 [M - H] <sup>-</sup> . ....	64
<b>Figura 31.</b> Proposta mecanística do íon m/z 447 e demais fragmentos do ácido elágico ramnosídeo <b>(3)</b> .....	64
<b>Figura 32.</b> Espectro EM/EM da substância a dilactona do ácido valônico m/z 469 [M - H] <sup>-</sup> . ....	65
<b>Figura 33.</b> Proposta mecanística do íon m/z 469 e demais fragmentos do ácido vanolético de lactona <b>(4)</b> . ....	65
<b>Figura 34.</b> Espectro EM/EM do 3,6-di-O-galoil-D-glicose m/z 483 [M - H] <sup>-</sup> .....	66
<b>Figura 35.</b> Proposta de fragmentação para 3,6-di-O-galoil-D-glicose <b>(5)</b> íon precursor m/z 483 [M - H] <sup>-</sup> .....	67
<b>Figura 36.</b> Proposta mecanística do fragmento em 465 [M - H] <sup>-</sup> da substância 5.....	67
<b>Figura 37.</b> Proposta mecanística da formação do pico base em 169 [M - H] <sup>-</sup> proveniente de um rearranjo do tipo McLafferty .....	67
<b>Figura 38.</b> Espectro EM/EM 3,4,6-tri-O-galoil-D-glicose m/z 635 [M - H] <sup>-</sup> .....	69

<b>Figura 39.</b> Fluxograma mostrando as fragmentações do 3,4,6-tri-O-galoil-D-glicose (6) íon precursor $m/z$ 465 $[M - H]^-$ .....	69
<b>Figura 40.</b> Espectro EM/EM do 1,2,3,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicose $m/z$ 787 $[M - H]^-$ .	70
<b>Figura 41.</b> Fragmentações do 1,2,3,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (7) íon precursor $m/z$ 783 $[M - H]^-$ .....	71
<b>Figura 42.</b> Estrutura sugerida para a P1 com base no íon de maior intensidade. ....	72
<b>Figura 43.</b> Fragmentação do íon $[M-H]^-$ 483 referente a substância P1. ....	73
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN de $^1H$ da P1. ....	74
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN de $^1H$ da P1, integrados .....	74
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^{13}C$ da P1.....	75
<b>Figura 47.</b> Espectro de HSQC $^1H$ - $^{13}C$ da P1 .....	76
<b>Figura 48.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações da região 01 .....	76
<b>Figura 49.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações da região 02 .....	77
<b>Figura 50.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações da região 03 .....	77
<b>Figura 51.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações da região 04 .....	78
<b>Figura 52.</b> Espectro de HMBC $^1H$ - $^{13}C$ da P1 .....	79
<b>Figura 53.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações da região 01 .....	80
<b>Figura 54.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações da região 02.....	81
<b>Figura 55.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações da região 03.....	82
<b>Figura 56.</b> Proposta estrutural para a 3,6-di-O-galoil- $\alpha$ -D-glicose correlações HMBC .....	84
<b>Figura 57.</b> Proposta estrutural para a 3,6-di-O-galoil- $\beta$ -D-glicose correlações HMBC .....	84
<b>Figura 58.</b> Estrutura sugerida para a P2 com base no íon de maior intensidade. ....	85
<b>Figura 59.</b> Fragmentação do íon $[M-H]^-$ 447 referente a substância P2.....	86
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN de $^1H$ da P2.....	87
<b>Figura 61.</b> Espectro de RMN de $^1H$ da P2 integrados .....	87
<b>Figura 62.</b> Espectro de RMN de $^{13}C$ da P2.....	88
<b>Figura 63.</b> Espectro de HSQC $^1H$ - $^{13}H$ da P2 .....	89
<b>Figura 64.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações na região 01 .....	89
<b>Figura 65.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações na região 02 .....	90
<b>Figura 66.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações na região 03 .....	91
<b>Figura 67.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações na região 04 .....	91

<b>Figura 68.</b> Espectro de HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ da P2 .....	92
<b>Figura 69.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações na região 01 .....	92
<b>Figura 70.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações na região 02 .....	93
<b>Figura 71.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações na região 03 .....	94
<b>Figura 72.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações na região 04 .....	94
<b>Figura 73.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações na região 05 .....	94
<b>Figura 74.</b> Proposta estrutural para o ácido elágico ramnosídeo e correlações HMBC .....	96
<b>Figura 75.</b> Estrutura sugerida para a P3 com base no íon de maior intensidade. ....	96
<b>Figura 76.</b> Fragmentação do íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ 301 referente a substância P3.....	97
<b>Figura 77.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da P3. ....	98
<b>Figura 78.</b> Espectro de HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ da P3.....	98
<b>Figura 79.</b> Espectro de HSQC suas correlações e ampliações na região 01 .....	99
<b>Figura 80.</b> Espectro de HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ da P3 .....	99
<b>Figura 81.</b> Espectro de HMBC suas correlações e ampliações na região 01 .....	101
<b>Figura 82.</b> Proposta estrutural para o ácido elágico e correlações HMBC .....	102
<b>Figura 83.</b> Ensaio colorimétrico do sequestro do radical livre DPPH $^{\bullet}$ dos extratos das cascas do caule de <i>C. villosum</i> , mostrando o controle negativo (DPPH com MeOH) e controle positivo (DPPH com o antioxidante ácido gálico). ....	103
<b>Figura 84.</b> Ensaio colorimétrico do sequestro do radical livre DPPH $^{\bullet}$ das substâncias isoladas das cascas do caule de <i>C. villosum</i> , mostrando o controle negativo (DPPH com MeOH) e controle positivo (DPPH com o antioxidante ácido gálico). ....	104
<b>Figura 85.</b> Curvas de calibração dos extratos de <i>C. villosum</i> que apresentaram atividade antioxidante pelo método do DPPH. ....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Cronologia da descoberta de fármacos isolados a partir de plantas e suas categorias terapêuticas. ....	18
<b>Tabela 2.</b> Principais espécies reativas de oxigênio: espécies radicalares (1-4) e não radicalares (5-6). ....	20
<b>Tabela 3.</b> Subclasses dos compostos fenólicos.....	22
<b>Tabela 4.</b> Espécies do gênero <i>Anthodiscus</i> e <i>Caryocar</i> .....	29
<b>Tabela 5.</b> Atividades biológicas comprovadas das espécies do gênero <i>Caryocar</i> ....	35
<b>Tabela 6.</b> Utilização das partes da espécie <i>C. villosum</i> . ....	38
<b>Tabela 7.</b> Quantidades de solventes utilizado na extração e massa obtidas dos extratos de <i>C. villosum</i> . ....	48
<b>Tabela 8.</b> Estimativa de concentração de FT presentes nos diferentes extratos de <i>C. Villosum</i> .....	55
<b>Tabela 9.</b> Principais íons ( $m/z$ ) presentes nos diferentes extratos de <i>C. villosum</i> . ...	56
<b>Tabela 10.</b> Substâncias caracterizadas dos extratos de <i>C. villosum</i> . ....	59
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , incluindo as correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC para a substância P1, comparadas com dados da literatura.....	83
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ , incluindo as correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC para a substância P2, comparadas com dados da literatura.....	95
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ , incluindo as correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC para a substância P3, comparadas com dados da literatura.....	101
<b>Tabela 14.</b> Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH expresso em porcentagem total de inibição e pelo parâmetro do $\text{CE}_{50}$ . ....	104
<b>Tabela 15.</b> Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH expresso em porcentagem total de inibição e pelo parâmetro do $\text{CE}_{50}$ para as substâncias isoladas.....	105
<b>Tabela 16.</b> Dados utilizados na análise ACP com base nas intensidades de pico obtidas entre 100 e 1000 $m/z$ , após eliminação dos sinais que apresentaram intensidades abaixo de 5% do que a intensidade do pico de base.....	129

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
<b>3. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
3.1. Produtos naturais: Aspectos gerais .....	17
3.2. Produtos naturais antioxidantes e radicais livres: Aspectos gerais.....	20
3.2.1.Compostos fenólicos e atividade antioxidante (AA).....	22
3.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	25
3.4. Quantificação de compostos fenólicos.....	26
3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear(RMN).....	2627
3.6. Família Caryocaraceae: Aspectos gerais .....	29
3.7. Gênero <i>Caryocar</i> .....	30
3.8. Espécie <i>Caryocar villosum</i> .....	37
3.9. Análise quimiométrica.....	42
3.9.1.Processo de extração .....	44
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>46</b>
4.1. Coleta e identificação da espécie <i>Caryocar villosum</i> .....	46
4.2. Preparo dos extratos das cascas do caule de <i>C. villosum</i> .....	46
4.2.1.Extração baseada no triângulo de seletividade proposto por Snyder.....	47
4.3. Determinação de fenólicos totais (FT) .....	48
4.4. Análise por espectrometria de massa – Full scan.....	49
4.5. Análise por espectrometria de massas – fragmentação (EM <sup>n</sup> ) .....	49
4.6. Isolamento dos principais constituintes químicos dos extratos.....	50
4.7. Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	51
4.8. Análise quimiométrica.....	52
4.9. Avaliação da atividade antioxidante “ <i>in vitro</i> ” .....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
5.1. Estimativa da concentração dos compostos fenólicos nos extratos de <i>C. villosum</i> ...	54
5.2. Caracterização dos compostos presentes nos extratos de <i>C. villosum</i> .....	56
5.2.1.Caracterização baseada na fragmentação para o ácido gálico (substância 1).....	61
5.2.2.Caracterização baseada na fragmentação para o ácido elágico (substância 2)....	62
5.2.3.Caracterização baseada na fragmentação para o ácido elágico ramnosídeo (substância 3).....	60

5.2.4. Caracterização baseada na fragmentação para a dilactona do ácido valônico (substância 4).....	62
5.2.5. Caracterização baseada na fragmentação para o 3,6-di-O-galoil-D-glicose (substância 5).....	66
5.2.6. Caracterização baseada na fragmentação para o 3,4,6-tri-O-galoil-D-glicose (substância 6).....	68
5.2.7. Caracterização baseada na fragmentação do 1,2,3,6-tetra-O-galoil-β-D-glicose (substância 7).....	70
5.3. Extrato metanólico: Isolamento e análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear(RMN) .....	72
5.3.1. Substância P1 .....	71
5.3.2. Substância P2 .....	76
5.3.3. Substância P1 .....	83
5.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH <i>in vitro</i> . .....	72
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>129</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são substâncias químicas produzidos por organismos vivos e que geralmente apresentam atividades biológicas podendo ser utilizados na descoberta de produtos farmacêuticos (DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012). Atualmente, medicamentos convencionais empregados rotineiramente em diversas enfermidades são derivados de plantas (VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

As plantas nos tempos antigos eram utilizadas pelas civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa no tratamento de enfermidades da época por meio da ingestão e chás de ervas e folhas (JI *et al.*, 2009). Além disso, na Amazônia, ainda é muito comum o uso de plantas medicinais na medicina popular. A utilização de plantas medicinais é bem consolidada popularmente, uma vez que é uma herança dos ancestrais indígenas e comunidades ribeirinhas.

A formação de espécies reativas de oxigênio denominadas de radicais livres é ocasionada pelo processo natural do nosso metabolismo e os maus hábitos alimentares da população e outros fatores, são responsáveis pelo estresse oxidativo (formação excessiva de radicais livres). O estresse oxidativo é responsável pela geração de outras doenças de preocupação mundial do século XXI, tais como Alzheimer, doenças inflamatórias, cardiovasculares e doenças neurodegenerativas – mal de Parkinson e câncer (CHAKRABORTY & BASU, 2017; KRISHNAIAH *et al.*, 2011), dentre outras.

Com base nisso, a investigação por novas substâncias com propriedades farmacológicas evidencia a pesquisa de metabólitos secundários e incentiva a pesquisa por novos antioxidantes de origem vegetal na busca do tratamento das suas respectivas doenças envolvidas (NEVES *et al.*, 2012).

Desta forma, a floresta Amazônica dispõe de uma ampla vegetação diversificada com princípios ativos e espécies inexploradas ou que ainda não foram totalmente estudadas (HOPKINS, 2005). É importante salientar que poucos são os estudos, e existem ainda descontinuidades referentes ao conhecimento científico de substâncias bioativas produzidas por espécies vegetais (BESSA *et al.*, 2013). Os estudos fitoquímicos e farmacológicos de algumas espécies do gênero *Caryocar* foram intensificados devido às descobertas de substâncias com propriedades biológicas, tais como antileishmania, antimicrobiana, antioxidante (PAULA-JUNIOR



*et al.*, 2006), atividade cicatrizante (BEZERRA, BARROS e COELHO, 2015), hepatoprotetora (VALE *et al.*, 2009), anti-inflamatória, cardioprotetora (TORRES *et al.*, 2016<sup>a</sup>), dentre outras. O presente estudo tem como objetivo efetuar a caracterização de substâncias fenólicas dos extratos de *C. villosum* e realizar a avaliação da atividade antioxidante (AA) *in vitro*. Desta forma, pretende-se contribuir na investigação química e farmacológica continuada dessa espécie da Amazônia, impulsionando a pesquisa para o desenvolvimento de futuros medicamentos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar os constituintes químicos presentes nos extratos de *Caryocar villosum* por meio das técnicas de espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e avaliar o potencial antioxidante da espécie.

### 2.2. Objetivos específicos

❖ Obter o perfil químico através da análise preliminar por espectrometria de massas para os diferentes extratos das cascas do caule de *Caryocar villosum* obtidos por meio do *triângulo de Snyder*;

❖ Definir quais as substâncias fenólicas responsáveis pelas separações dos grupos por análise quimiométrica;

❖ Realizar a fragmentação dos íons presentes nos extratos de *C. villosum* por EM/EM;

❖ Desenvolver um método de separação por CLAE-UV em escala preparativa a fim de isolar as substâncias presentes nos extratos;

❖ Estimar a concentração dos compostos fenólicos dos extratos por meio do método de Folin-Ciocalteu;

❖ Isolar e caracterizar as substâncias responsáveis pelas separações dos grupos pela análise quimiométrica.

❖ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e substâncias isoladas pelo método DPPH;

### 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Produtos naturais: Aspectos gerais

Historicamente, os produtos naturais foram utilizados desde os tempos antigos pelos árabes, chineses e egípcios para tratar de muitas doenças através da infusão de folhas, cascas e raízes de plantas, sendo a única forma para o tratamento e cura de enfermidades da época (DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012). As substâncias presentes em partes de plantas tais como, folhas, caule, raízes, sementes, frutos, dentre outros responsáveis por propriedades farmacológicas são chamadas de metabólitos secundários (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013).

Esses metabólitos consistem em um grupo heterogêneo de produtos metabólicos naturais, geralmente de baixo peso molecular, são diversos e restritos em todas as espécies. Além disso, esses grupos não são essenciais para o crescimento vegetativo dos organismos produtores, mas são considerados compostos de diferenciação que conferem papéis adaptativos, por exemplo, interações ecológicas, simbiose, proteção e defesa contra insetos e herbívoros, e assim por diante (THIRUMURUGAN *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários presentes em plantas que geralmente são investigadas pelos pesquisadores da química de produtos naturais se agrupam na categoria dos terpenoides (carotenoides, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos), compostos fenólicos (como lignanas, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, ligninas, estilbenos e flavonoides), compostos contendo nitrogênio (como aminoácidos não proteicos e alcaloides). Esses metabólitos são compostos bioativos que são responsáveis por variadas atividades farmacológicas (AHMED *et al.*, 2017).

A utilização indiscriminada de partes de plantas para o tratamento de doenças sem qualquer comprovação científica é perigoso e necessita de comprovação científica de sua eficácia, bem como da sua composição química através de pesquisas que levem à validação dessas espécies como medicinais pela população (EKOR, 2014). Dessa forma, as pesquisas desenvolvidas sobre a investigação de novas substâncias extraídas de plantas com propriedades farmacológicas que possam prevenir, tratar e/ou curar doenças em humanos têm

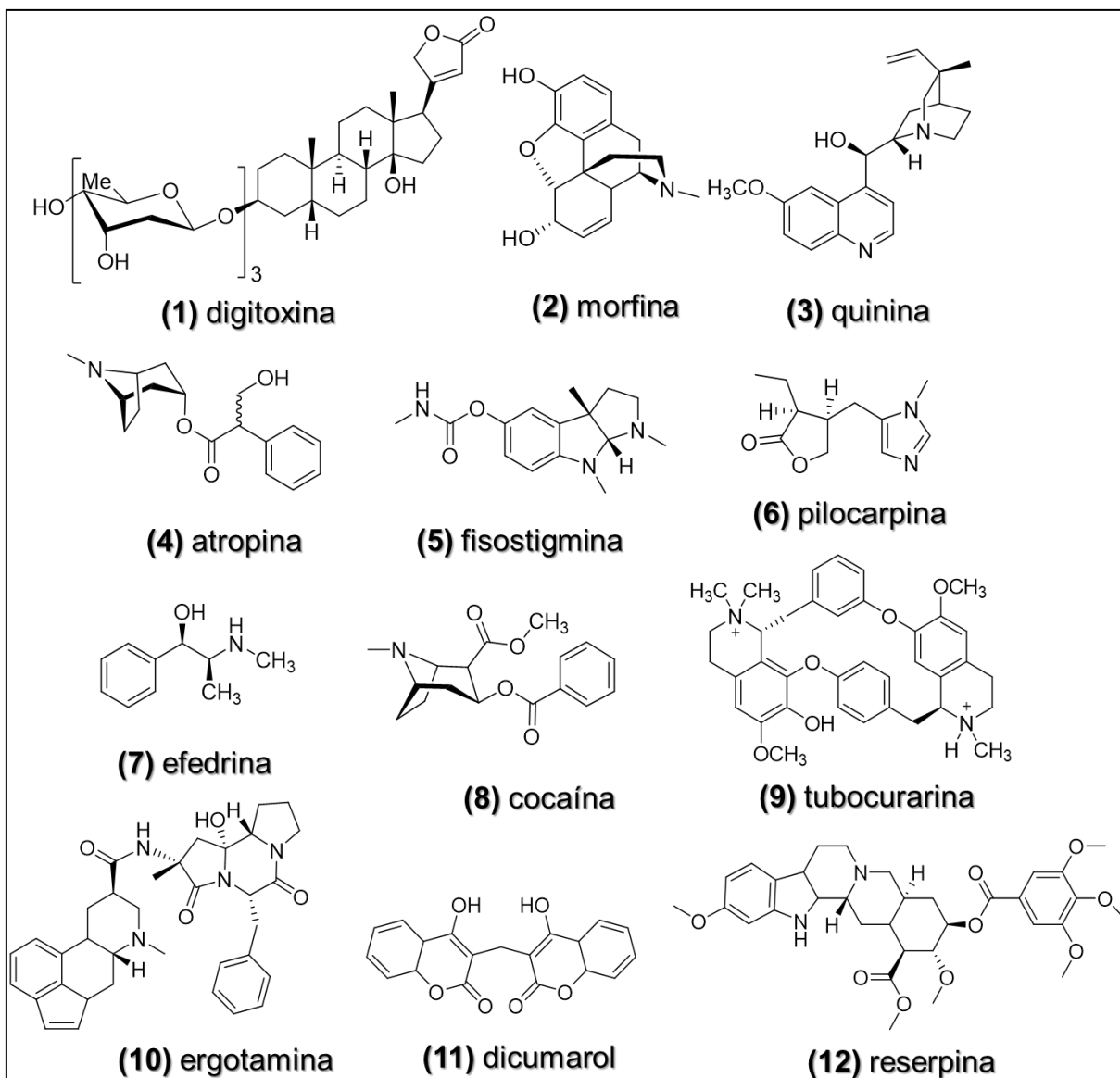
ganhado cada vez mais destaque na medicina atual e os produtos naturais têm recebido bastante atenção (VALLI, RUSSO & BOLZANI, 2019).

O início da química de produtos naturais tem como evidência o isolamento da substância digitoxina em 1785, isolada do gênero *Digitalis* para o tratamento de pessoas cardíacas, tornando-se a primeira descrição científica (SIMÕES *et al.*, 2017; WILKINS, KENDALL e WADE, 1985). A partir do isolamento da morfina, sendo um destaque para a química, outras substâncias bioativas foram isoladas de diversas espécies vegetais como pode ser visto na tabela 1 e figura 1.

**Tabela 1.** Cronologia da descoberta de fármacos isolados a partir de plantas e suas categorias terapêuticas.

Fármaco	Gênero botânico	Ano de isolamento	Categoria terapêutica
(1) <b>Digitoxina</b>	<i>Digitalis</i>	1785-1875	cardiotônico
(2) <b>morfina</b>	<i>Papaver</i>	1805	Hipnoanalgésico
(3) <b>quinina</b>	<i>Cinchona</i>	1820	Antimalárico
(4) <b>atropina</b>	<i>Atropa</i>	1833	Anticolinérgico
(5) <b>fisostigmina</b>	<i>Physostigma</i>	1864	Anticolinesterásicos
(6) <b>pilocarpina</b>	<i>Pilocarpus</i>	1875	Colinérgico
(7) <b>efedrina</b>	<i>Ephedra</i>	1887	Adrenérgico
(8) <b>cocaína</b>	<i>Erythroxylum</i>	1895	anestésico local
(9) <b>tubocuranina</b>	<i>Chondrodendron</i>	1895	bloqueador neuromuscular
(10) <b>ergotamina</b>	<i>Claviceps</i>	1922	bloqueador adrenérgico
(11) <b>dicumarol</b>	<i>Melilotus</i>	1941	Anticoagulante
(12) <b>reserpina</b>	<i>Rauvolfia</i>	1952	Neuroléptico

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2017



**Figura 1.** Estruturas dos fármacos isolados de plantas (Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2017)

Atualmente, cerca de 35% dos medicamentos são oriundos de produtos naturais. O Brasil apresenta a maior biodiversidade mundial, com mais de 50 mil espécies de plantas. Entretanto, poucos produtos inovadores foram desenvolvidos no Brasil a partir de constituintes ativos derivados da biodiversidade brasileira (CALIXTO, 2019). Dentro desse âmbito, muitas famílias botânicas são estudadas com a finalidade de extrair seus metabólitos para fins medicinais da flora Amazônica. Dessa forma, escolheu-se para o desenvolvimento desse estudo, uma espécie da região amazônica a fim de realizar a investigação fitoquímica e avaliar suas propriedades antioxidantes.

### 3.2. Produtos naturais antioxidantes e radicais livres: Aspectos gerais

Há um crescente interesse na comunidade científica acerca da descoberta e desenvolvimento de compostos antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais como plantas (OLIVEIRA, 2015). Antioxidantes naturais são definidos como substâncias que possam inibir ou retardar a velocidade de um processo oxidativo metabólico, ocasionando danos às células causadas por espécies instáveis, conhecidos como radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010). É importante ressaltar que fontes externas (radiações ionizantes, drogas, tabagismo e poluentes) e os maus hábitos alimentares (diets excessivamente calóricas), também aumentam o estresse oxidativo (MARTELLI & NUNES, 2014).

A formação desses radicais no organismo é um processo natural gerado pelo oxigênio (agente oxidante) e o excesso dessas espécies instáveis é conhecido como estresse oxidativo. Os radicais livres podem ocasionar diversos danos à saúde se não forem neutralizados por um composto antioxidante eficiente (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006). As principais espécies reativas de oxigênio são: radical hidroxila (1), radical alcoxila (2), ânion superóxido (3), peroxila (4) e as espécies não-radicalares: peróxido de hidrogênio (5) e ácido hipocloroso (6) (Tabela 2) (MARTELLI e NUNES, 2014; BARREIROS *et al.*, 2006).

**Tabela 2.** Principais espécies reativas de oxigênio: espécies radicalares (1-4) e não radicalares (5-6).

	<b>RADICAIS</b>	<b>SIGLA</b>
	<b>espécies radicalares</b>	
(1)	radical hidroxila	HO <sup>•</sup>
(2)	radical superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
(3)	radical peroxila	HOO <sup>•</sup>
(4)	Radical alcoxila	RO <sup>•</sup>
	<b>espécies não radicalares</b>	
(5)	peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
(6)	ácido hipocloroso	HOCl

**Fonte:** MARTELLI e NUNES, 2014.

Através de substâncias antioxidantes, o mecanismo de eliminação de radicais livres tem papel importante na redução da oxidação lipídica nos tecidos humanos, pois, quando incorporado à dieta humana, reduz a risco de desenvolver algumas doenças. Estudos demonstraram que uma dieta rica em alimentos (frutas e vegetais) contribui para reduzir o processo de envelhecimento e diminuir o risco de inflamação e estresse oxidativo, relacionados a muitas doenças (CHAKRABORTY & BASU, 2017; MINATEL *et al.*, 2017).

As doenças crônicas e degenerativas estão relacionadas com a formação desses radicais instáveis, tais como o câncer, doenças inflamatórias (VALAVANIDIS *et al.*, 2013; VALKO *et al.*, 2006), artrite reumática (HADJIGOGOS, 2003), mal de Alzheimer (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2016), aterosclerose, cirrose hepática, doença de Parkinson, diabetes, catarata e doenças cardiovasculares (RAJENDRAN *et al.*, 2014) KRISHNAIAH, SARBATLY, & NITHYANANDAM, 2011; SARIKURKCU *et al.*, 2008), bem como espécies estão também envolvidas no declínio do sistema imunológico e no processo de envelhecimento celular (ABRAHÃO *et al.*, 2010).

Dessa forma, a prevenção dessas doenças é proveniente da neutralização dos radicais livres por uma substância antioxidante eficiente, todavia, se essas espécies radicalar não forem neutralizadas ocorre a elevação na produção dessas espécies reativas de oxigênio gerando um desequilíbrio entre compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, ocasionando o estresse oxidativo (MARTELLI e NUNES, 2014; BARREIROS *et al.*, 2006). Com isso, as substâncias antioxidantes naturais ganharam destaque nos últimos anos por serem potenciais agentes terapêuticos dentre essas diversas doenças (NEVES *et al.*, 2012).

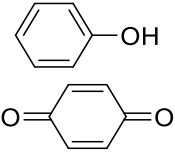
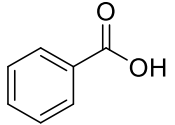
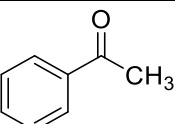
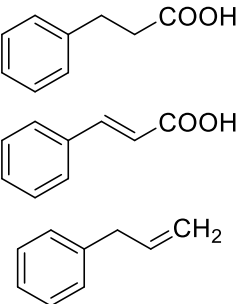
A maioria dos antioxidantes naturais é derivada de materiais vegetais, como frutas, vegetais, ervas e especiarias. As substâncias antioxidantes naturais incluem o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis, carotenoides, e principalmente os compostos fenólicos e seus derivados (LOURENÇO *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2008 RAMALHO & JORGE, 2006). Todavia, outras classes de metabólitos secundários podem apresentar propriedades antioxidantes, tais como os alcaloides (REHMAN & KHAN, 2017), hidrocarbonetos terpênicos e terpenos oxigenados (GONZALEZ-BURGOS & GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

### 3.2.1. Compostos fenólicos e atividade antioxidante (AA)

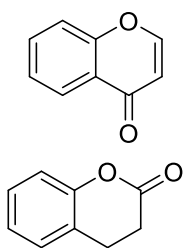
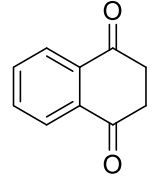
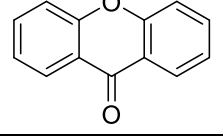
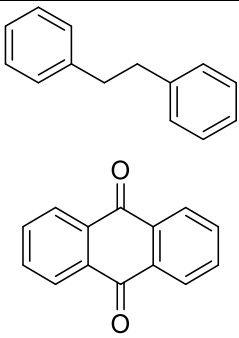
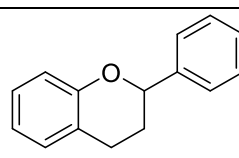
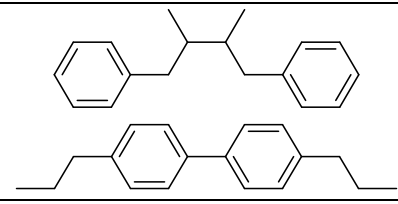
As substâncias fenólicas constituem uma classe composta de um ou mais grupos hidroxilas ligados diretamente nos anéis benzênicos (estrutura central aromá-tica) (MINATEL *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos se agrupam em uma classe principal de metabólitos secundários de plantas. Esses compostos também podem ser encontrados combinados com mono- e polissacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, ou podem ocorrer como derivados, como ésteres ou ésteres metílicos (ROSA *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos são biossintetizados através da via metabólica chiquimato e acetato (DEWICK, 2009).

Essa classe é um dos grupos de substâncias com distribuições amplas e numerosa do reino vegetal, com mais de 8.000 estruturas identificadas (IGNAT, VOLF e POPA, 2011). As substâncias fenólicas em geral são classificadas em diferentes subgrupos (Tabela 3), de acordo com a quantidade de anéis fenólicos e substituintes ligados no anel da sua estrutura básica (DEY *et al.*, 2016).

**Tabela 3.** Subclasses dos compostos fenólicos.

SUBCLASSES	ESTRUTURA BÁSICA	ESQUELETO BÁSICO
fenóis simples benzoquinonas		C <sub>6</sub>
ácidos fenólicos		C <sub>6</sub> C <sub>1</sub>
Acetofenonas		C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>
ácidos fenilacéticos ácidos cinâmicos fenilpropenos		C <sub>6</sub> C <sub>3</sub>



<b>cromonas, cumarinas</b>		
<b>naftoquinonas</b>		$C_6 C_4$
<b>xantonas</b>		$C_6 C_1 C_6$
<b>estilbenos e antraquinonas</b>		$C_6 C_2 C_6$
<b>flavonoides</b>		$C_6 C_3 C_6$
<b>lignanas neolignanas</b>		$(C_6 C_3)_2$
<b>ligninas</b>	Polímero heterogêneo composto de ácidos fenólicos e açúcar simples	$(C_6 C_3)_n$
<b>taninos hidrolisáveis</b>	polímero aromático altamente reticulado	$(C_6 C_1)_n$

Fonte: DEWICK, 2009; ANGELO & JORGE, 2007.

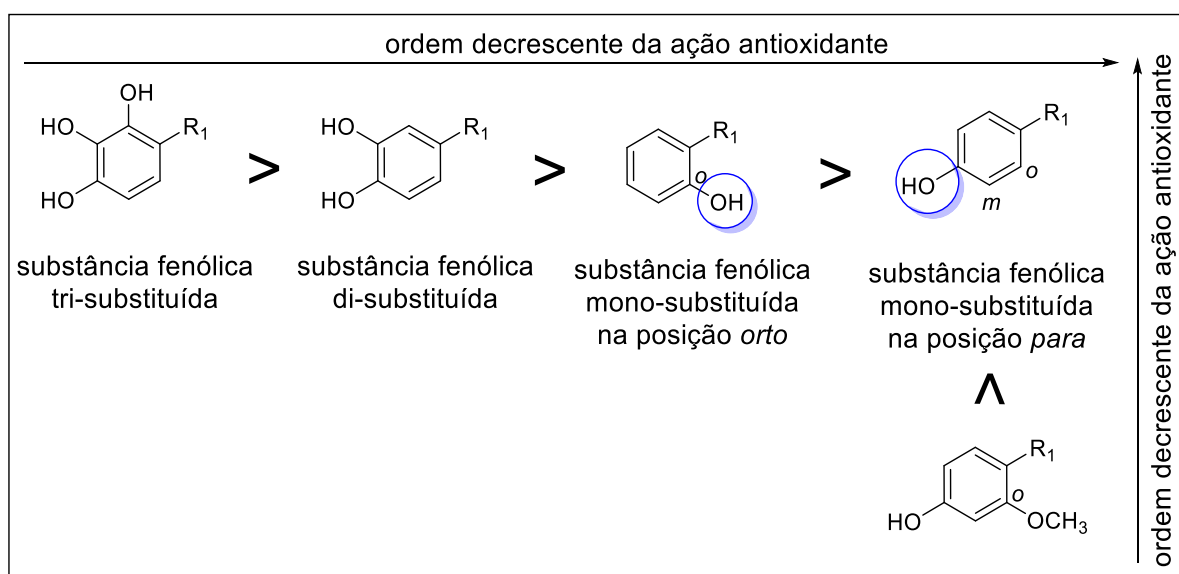
Quimicamente, os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um grupo heterogêneo de moléculas que possuem AA devido a sua capacidade de doar hidrogênios ou elétrons, ou seja, elimina os radicais livres (espécies instáveis

geradas pelo processo oxidativo natural metabólico) impedindo a oxidação de moléculas no organismo (MINATEL *et al.*, 2017).

Nesse sentido, existe uma correlação forte e positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos e o potencial antioxidante de espécies de plantas (CHEN *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2011). A literatura mostra que as principais subclasses de compostos fenólicos responsáveis pela ação promissora da AA *in vitro* e, invariavelmente, aos benefícios à saúde, são os ácidos fenólicos (KADIRI, 2017; SOARES, 2002), flavonoides (KADIRI, 2017; PANCHE, DIWAN & CHANDRA, 2016) e taninos (JAISWAL *et al.*, 2017; KADIRI, 2017; CHUNG *et al.*, 1998).

É comprovado que para os ácidos fenólicos, a atividade antioxidante se torna mais promissora com a presença de dois ou três grupos hidroxilas no anel aromático do que os monohidroxilados. Além disso, a posição em *orto* e/ou *para* no anel contendo heteroátomo oxigênio, potencializa a atividade antioxidante por efeito de ressonância entre o par de elétrons do oxigênio e o radical fenoxila formado (PEREIRA *et al.*, 2009; SCOTTI *et al.*, 2007).

Em relação as substâncias monohidroxiladas, a ação antioxidante é mais eficiente com a introdução de uma ou duas metoxilas na posição *orto* em relação ao grupo OH (PEREIRA *et al.*, 2009), aumentando a estabilidade do radical fenoxila (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).



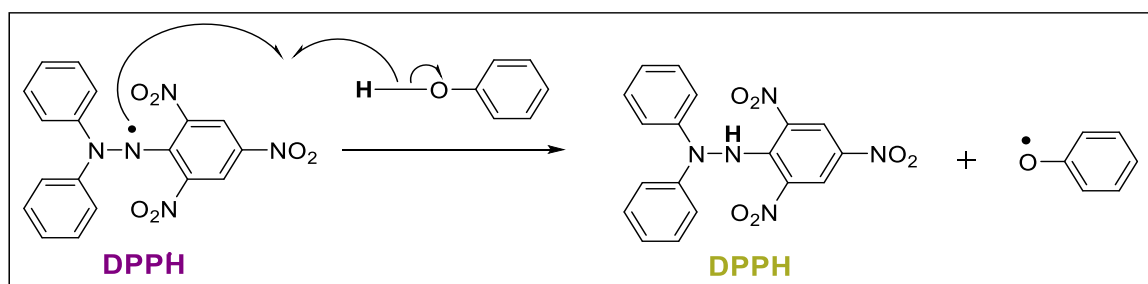
**Figura 2.** Influência do nº e posição de substituintes do anel aromático na ação antioxidante (Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2009; SCOTTI *et al.*, 2007).

A presença de substâncias fenólicas bioativas em espécies vegetais vem se destacando e estimulando a utilização de métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

### 3.3. Atividade antioxidante *in vitro*

Dentre os métodos antioxidantes *in vitro*, destaca-se a análise de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), considerado um método simples, preciso, rápido, reprodutível e apresenta com boa estabilidade na avaliação da atividade antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2009; DAVID *et al.*, 2007).

Esse método envolve o mecanismo de transferência de hidrogênio (Figura 3), onde o radical de nitrogênio orgânico atribui um aumento na coloração violeta escuro, caracterizada pela absorção máxima na faixa de 518 nm (ALVES *et al.*, 2010; NIKI, 2010).



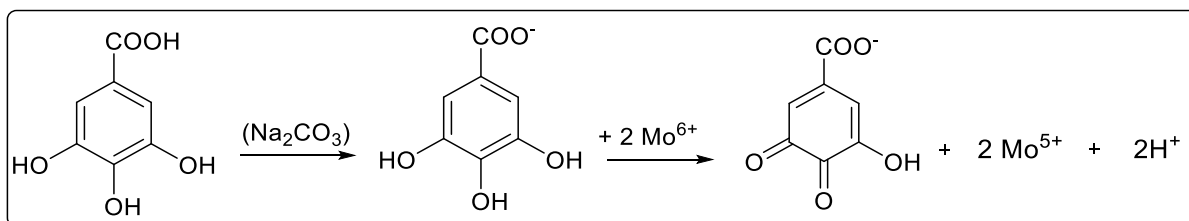
**Figura 3.** Mecanismo de reação entre o reagente radicalar DPPH• e uma substância antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio (Adaptado de OLIVEIRA, 2015).

Quando o reagente radicalar DPPH• é reduzido através da ação de um composto antioxidante ocorre a formação de 2,2'-difetil-picril-hidrazina, ocasionando a diminuição da absorbância e deslocamento no meio reacional devido doação do hidrogênio por uma molécula antioxidante (KEDARE E SINGH, 2011; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). O parâmetro da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) é usado para expressar os resultados da análise antioxidante. Esse parâmetro refere-se à quantidade de amostra necessária para inibir a oxidação do radical em 50% (ROESLER *et al.*, 2007; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

É importante ressaltar que a atividade antioxidante está diretamente relacionada com a composição fenólica, na qual incentiva a investigação da quantificação desses compostos para melhorar os dados obtidos.

### 3.4. Quantificação de substâncias fenólicas

O método Folin-Ciocalteu é amplamente utilizado para determinar a concentração de substâncias fenólicas em amostras vegetais. Esse método utilizado consiste em uma análise espectrofotométrica empregando a espectroscopia na região do visível com intervalo de comprimento de onda em 730-760 nm (SRIPAKDEE *et al.*, 2015; DENG *et al.*, 2013; SÁ *et al.*, 2012). A reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu com substâncias fenólicas (ex: ácido gálico – figura 4) consiste em uma reação de óxido-redução, gerando um complexo do ácido fosfotungstato de coloração azul. Inicialmente, o molibdênio encontra-se na forma complexada com estado de oxidação 6+ (coloração amarela). Em meio alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), as substâncias fenólicas são desprotonadas gerando ânions carboxilados. Desta forma, a reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin-Ciocalteu gera um complexo molibdênio-tungstênio que é reduzido com estado de oxidação 5+ (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SINGLETON e ROSSI, 1965).



**Figura 4.** Reação de oxirredução do ácido gálico com molibdênio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu) (Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Outra técnica mais sensível e mais eficiente para a quantificação de compostos fenólicos e também para outras classes de substâncias é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao método Detector Ultravioleta com Arranjo de Diodo (CLAE-DAD-UV). A CLAE é uma técnica analítica comumente usada para separação e identificação de substâncias em misturas complexas, como por exemplo, os extratos vegetais (MAGWAZA *et al.*, 2016).

O sistema CLAE combinado com a detecção de absorção de DAD/UV de alta resolução pode levar à automação fácil da análise. A coluna CLAE é importante para permitir eficiência na separação e maior resolução. Uma coluna de CLAE com tamanho de partícula pequena pode aumentar a eficiência no método de

separação, bem como o sistema de solvente binário incluindo água e um solvente orgânico polar (acetonitrila ou metanol) e DAD para detecção a absorção nas regiões UV-Vis. (KHODDAMI, WILKES & ROBERTS, 2013; MAGWAZA *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que essas condições podem mudar de acordo com a natureza química e formas estruturais de diferentes compostos fenólicos (BURIN *et al.*, 2011). Alguns compostos fenólicos isolados do vinho mostram um pico de absorbância típico entre 260 e 280 nm. Essa faixa de comprimento de onda de absorção é adequada para a detecção de um grande número de compostos fenólicos e flavonoides pela cromatografia líquida devido à sua versatilidade e precisão (TORRE-CARBOT *et al.*, 2005; FRANCISCO & RESURRECCION, 2009).

O interesse em avaliar a capacidade antioxidante é resultado de vários estudos sobre a importância dos antioxidantes em sistemas biológicos. Desta forma, escolheu-se para esse estudo uma espécie da família Caryocaraceae, tendo diversos relatos sobre a ação antioxidante das espécies que compõe essa família (MONTEIRO *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2013; VALE *et al.*, 2009; ROESLER *et al.*, 2008; PAULA-JUNIOR *et al.*, 2006).

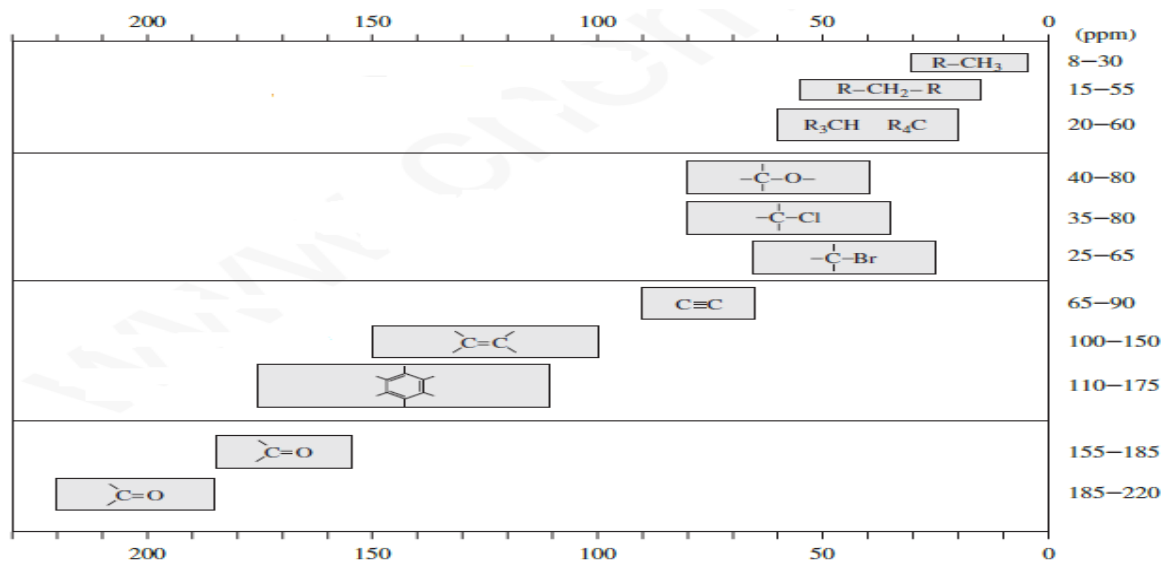
### 3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica valiosa para determinação do esqueleto da estrutura de compostos orgânicos. Para obtenção dos espectros de ressonância, submete-se a amostras a um campo magnético externo, de forma que os núcleos com números massa ímpar entram em ressonância com a frequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, de acordo com a sua vizinhança química (SIMÕES *et al.* 2007).

Os espectros de RMN de hidrogênio e carbono 13 são os mais utilizados e sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, onde a localização e o deslocamento dos sinais correspondentes à absorção e energia eletromagnética (SIMÕES *et al.* 2007). Para interpretação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  é importante considerar três aspectos dos espectros: 1) deslocamento

químico ( $\delta$ ) – localização dos sinais no eixo x, indicando a presença de núcleo em um ambiente magnético diferente; 2) área do pico – a área sob cada sinal é proporcional ao número de átomos de H (integração); 3) desdobramento de sinal – efeito sob os hidrogênios equivalentes produzindo um sinal com picos múltiplos (acoplamento) (SOLOMONS E FRYHLE., 2011).

Nos espectros de RMN os hidrogênios em grupos metilas (hidrocarbonetos saturados ou alifáticos) apresentam deslocamentos químicos em 0,7 – 1,3 ppm, frequência mais baixa em relação aos prótons metilênicos (1,2 – 1,4 ppm) e os hidrogênios metínicos com deslocamentos químicos em 1,4 – 1,7 ppm. Os hidrogênios de grupos aromáticos possuem 2 tipos característicos: hidrogênios de anel aromáticos, deslocamento alto próximo de 6,5 – 8,0 ppm e hidrogênios benzílicos apresentam deslocamento químico entre 2,3 – 2,7 ppm. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  não existe desdobramento de sinais, cada átomo de carbono único produz apenas um pico. Átomos de carbonos de hidrocarbonetos são blindados do campo magnético e os sinais aparecem em campo alto (menor ppm), enquanto que os átomos de carbonos ligados aos grupos eletronegativos, grupo hidroxila são desblindados e os sinais aparecem em campo baixo (maior ppm), por exemplo, os grupos aromáticos apresentam deslocamentos químicos entre 110 – 175 ppm. A Figura 5 mostra as faixas aproximadas de deslocamentos químicos para diferentes carbonos substituídos (PAVIA et al., 2009).



**Figura 5.** Faixas de deslocamentos químicos aproximados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (PAVIA et al., 2009).

### 3.6. Família Caryocaraceae: Aspectos gerais

Caryocaraceae é uma pequena família botânica composta por 25 espécies (Tabela 4), da ordem Malpighiales (APG-Angiosperm Phylogeny Website). Embora a família seja pequena apresenta distribuição neotropical na América Central e do Sul distribuídas em dois gêneros, *Anthodiscus* G. Mey e *Caryocar* L. (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013). O gênero *Anthodiscus* apresenta apenas 9 espécies e distribuídas na Colômbia, Costa Rica, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela e no Brasil são referidas cinco espécies. O gênero *Caryocar* L. contém 16 espécies distribuídas nos mesmos países que o gênero *Anthodiscus* e também no Equador, Bolívia (PERDIZ, SÃO-MATEUS e AMORIM, 2012).

**Tabela 4.** Espécies do gênero *Anthodiscus* e *Caryocar*

Espécies do gênero <i>Anthodiscus</i>	Espécies do gênero <i>Caryocar</i>
<b><i>A. amazonicus</i></b> Gleason	<i>C. amygdaliferum</i> Mutis.
<b><i>A. chocoensis</i></b> Prance	<i>C. amygdaliforme</i> G. Don
<b><i>A. fragrans</i></b> Sleumer	<i>C. brasiliense</i> Camb.
<b><i>A. klugii</i></b> Standl.	<i>C. coriaceum</i> Wittm.
<b><i>A. montanus</i></b> Gleason	<i>C. costaricense</i> Donn.Sm.
<b><i>A. obovatus</i></b> Benth	<i>C. cuneatum</i> Wittm.
<b><i>A. peruanus</i></b> Baill.	<i>C. dentatum</i> Gleason
<b><i>A. pilosus</i></b> Ducke	<i>C. edule</i> casar
<b><i>A. trifolius</i></b> G. Mey.	<i>C. glabrum</i> (Aubl.) Pers.
	<i>C. gracile</i> Wittm.
	<i>C. harlingii</i> Prance.
	<i>C. microcarpum</i> Ducke
	<i>C. montanum</i> Prance
	<i>C. nuciferum</i> L.
	<i>C. pallidum</i> A. C. Sm.
	<i>C. villosum</i> (Aubl.) Pers.

Fonte: ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013

No Brasil há ocorrência de 12 espécies das quais três são registradas no estado da Bahia (PRANCE e MEDEIROS, 2010), e três espécies (*C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*) foram encontrados na Reserva Florestal Adolpho Duque (Manaus-AM) (RIBEIRO, *et al.*, 1999).

As espécies desta família com maior diversidade encontram-se na região amazônica e nas Guianas. A região amazônica é considerada o centro de distribuição dessa família, entretanto, algumas espécies estão distribuídas nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. No Brasil há a ocorrência dos dois gêneros, sendo 16 espécies no total: quatro espécies pertencente ao gênero *Anthodiscus* e 12 espécies no gênero *Caryocar* L. (NUNES e GIL, 2016; DICKINSON, 1990).

Não há relatos sobre a composição química do gênero *Anthodiscus* na literatura até o momento (SciFinder®, fevereiro, 2020). A literatura relata que as espécies de *Anthodiscus* são utilizadas principalmente como fonte de madeira (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013). Poucas espécies do gênero *Caryocar* são alvo de estudos, todavia se destacam pelos seus estudos fitoquímicos e propriedades biológicas (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013).

### 3.7 Gênero *Caryocar*

As espécies de *Caryocar* foram descobertas por Prance e Silva (1973), que reconheceram quinze espécies do gênero, e posteriormente a espécie *C. harlingii* foi identificada por Prance em 1987 (PRANCE, 1990). O nome *Caryocar* vem do grego *caryon* (= núcleo, noz) e *kara* (= cabeça), referindo-se ao fruto globoso (KERNTOPF *et al.*, 2013). Na cultura popular, as espécies de *Caryocar* são conhecidas por nomes triviais como, pequi e seus derivados, piqui, piquiá, amêndoa do espinho, grão de cavalo, amêndoa do Brasil ou piquivinagreiro, a palavra pequi vem do tupi e significa pyqui em que Py = pele; casca e qui=espinho (ALMEIDA *et al.*, 2018; KERNTOPF *et al.*, 2013).

No Brasil, as espécies denominadas por pequizeiro podem ser encontradas em todas as regiões, principalmente nos estados: Amazonas, Pará, Bahia, São



Paulo, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Esse gênero apresenta dezesseis espécies, algumas das quais possuem potencial econômico, seus frutos são frequentemente utilizados como fonte de óleo comestível (rico em diversos ácidos graxos insaturados) e também são empregados na produção de cosméticos. Além disso, algumas espécies são empregadas na produção de madeira e na construção civil devido a sua qualidade apresentando boa dureza, resistência à umidade e aos ataques de insetos (BEZERRA, BARROS e COELHO, 2015; ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013; VOIGT *et al.*, 2010).

Dentre as espécies, destacam-se no Brasil as espécies *C. brasiliense*, *C. coriaceum*, *C. cuneatum*, *C. glabrum* e a espécie alvo desse trabalho *C. villosum* (BEZERRA, BARROS e COELHO, 2015). *Caryocar brasiliense* é a mais abundante do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2018) e de longe a espécie mais estudada, devido ao amplo uso de seus frutos. A polpa dessa espécie é utilizada na preparação de sucos e licores e seu caule (resistente e durável) é utilizado na construção civil e naval e na fabricação de cercas (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013). O óleo extraído dos frutos é usado na fabricação de sabonetes (ESCOBAR, ANDRIGHETTI e RIBEIRO, 2016), e os frutos são utilizados como alimento, na produção de cosméticos e lubrificantes e na indústria farmacêutica (LEITE *et al.*, 2015).

Além disso, os frutos também são consumidos tradicionalmente *in natura* ou, preferencialmente cozido, acompanhado de arroz e/ou de carne (BEZERRA, BARROS e COELHO, 2015; RAMOS *et al.*, 2001). Já as folhas desta espécie são empregadas na alimentação do gado bovino, caprino, ovino e, em alguns lugares, das galinhas (KEER, SILVA e TCHUCARRAME, 2007). A casca de *C. brasiliense* também possui um alto valor nutricional (ROCHA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2015).

Da espécie *C. coriaceum* são utilizadas as folhas e frutos na medicina popular e uso alimentício da polpa do fruto, sendo indicado por seus efeitos cicatrizante e anti-inflamatório, no tratamento de úlceras gástricas, doenças respiratórias, dores musculares e reumáticas (BEZERRA, BARROS e COELHO,

2015; QUIRINO *et al.*, 2009). Os frutos dessa espécie são comercializados e contemplados na alimentação de forma *in natura* ou na confecção de pratos regionais (SOUZA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010). As folhas da espécie *C. microcarpum* são indicadas como repelentes e utilizadas como veneno de peixe por tribos do noroeste da Amazônia (KAWANISHI e RAFFAUF, 1986).

Apenas quatro espécies do gênero são investigadas quanto a sua composição química, entretanto as espécies exploradas são muito bem estudadas. Os ácidos graxos, ácido oleico (**13**) e ácido palmítico (**14**) são os constituintes majoritários que compõe a polpa dos frutos das espécies: *C. brasiliense* (CORDEIRO *et al.*, 2013; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009; LIMA<sup>a</sup> *et al.*, 2007; SEGALL *et al.*, 2006; FACIOLI & GONÇALVEZ, 1998) e *C. coriaceum* (SARAIVA *et al.*, 2011). Além disso, essas duas substâncias foram identificadas na amêndoa no fruto da espécie *C. brasiliense* (LIMA *et al.*, 2007<sup>a</sup>).

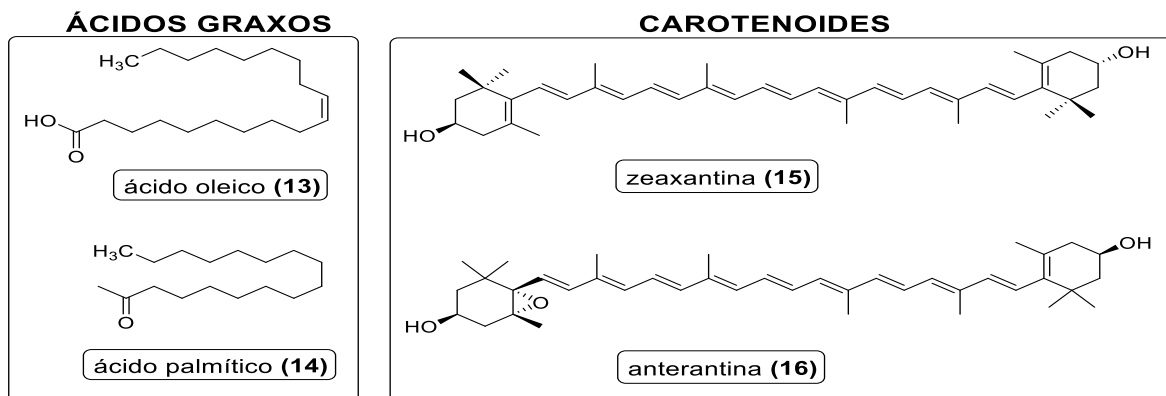
Na composição da polpa de *C. brasiliense* foram encontrados carotenoides, sendo a zeaxantina (**15**) (RAMOS *et al.*, 2007; AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004) e anteraxantina (**16**) (RAMOS *et al.*, 2007), as substâncias majoritárias na espécie (RAMOS *et al.*, 2007). Além disso, foi identificado como composto principal na polpa do fruto dessa espécie, o éster hexanoato de etila (**17**) (PASSOS *et al.*, 2003), também presente no óleo das sementes (MAIA, ANDRADE & SILVA, 2008). Nos óleos essenciais das folhas de *C. brasiliense* foram encontrados como constituintes majoritários o óxido de cariofileno (**18**), linalol (**19**),  $\beta$ -ionona (**20**) e geranyl acetona (**21**) (PASSOS *et al.*, 2003).

Foram identificados compostos fenólicos na composição de *C. brasiliense*, na qual a quercetina (**22**), o ácido quínico (**23**) o ácido gálico (**24**) estão presentes nas cascas dos frutos (ROESLER *et al.*, 2008), sendo esse último presente na polpa do fruto, bem como o galato de etila (**25**) (ASCARI, TAKAHASHI & BOAVENTURA, 2010). Nas folhas de *C. microcarpum* foram encontradas grandes quantidades de ácido gálico (**24**), galato de metila (**26**), galotanina (**27**), juntamente com triterpenos glicosilados (saponinas): hederagenina (**28**) e bayogenina (**29**) (KAWANISHI & RAFFAUF, 1986).

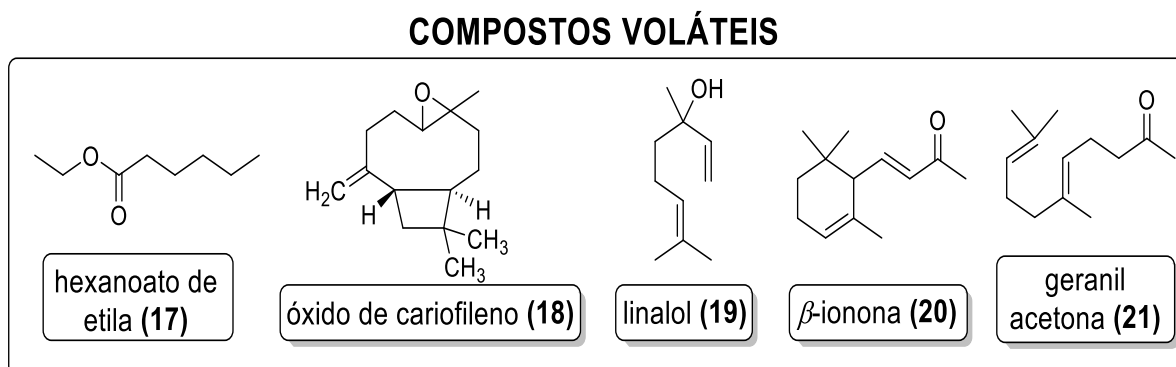
Estudos realizados com o *C. glabrum*, utilizando extrato metanólico da polpa dos frutos, foi possível a identificação de 30 saponinas triterpênicas, sendo 21 descritas pela primeira vez, figura 10: ácido 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosilgypsogênico **(30)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil hederagenina **(31)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosilbayogenina **(32)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D éster de-glucopiranosylhederagenin-28-O-β-D-glucopiranosil **(33)**, éster de 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil bayogenin-28-O-β-D-glucopiranosil **(34)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosilhederagenina **(35)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-galactopiranosil-(1-3)-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil bayogenina **(36)**, 3-O-β-D-xilopiranosil-(1-3)-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil bayogenina **(37)**, ácido 3-O-β-D-glucuro-nopiranosil-2β-hidroxioleanólico **(38)**, 3-O-β-D-glucuronopiranosilbaiogenin **(39)**, 3-O-ácido β-D-metilglucopiranosiduronato-2β-hidroxioleanólico **(40)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosil-2β-ácido hidroxioleanólico **(41)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosilhederagenina **(42)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosilbayogenina **(43)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-ácido metilglucopiranosiduronato-2β-hidroxioleanólico **(44)**, éster 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosil-2β-hidroxioleanólico-28-O-β-D-glucopiranosil**(45)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosilhederagenina-28-O-β-D-glucopiranosil éster **(46)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosilbaiogenina-28-O-β-D-glucopiranosil éster **(47)**, 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-metilglucopiranosiduronatohederagenina-28-O-β- Éster de D-glucopiranosil **(48)**, ácido 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosil-2β-hidroxioleanólico **(49)** e 3-O-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-galactopiranosil-(1-3)-β-D-glucuronopiranosilhederagenina **(50)** (MAGID *et al.*, 2006c).

O estudo realizado com o extrato aquoso das cascas do caule do *C. glabrum* levaram ao isolamento de glicosídeos fenólicos, figura 11: 1-O-3',4',5'-trimetoxifenil-(2,3-di-O-galoil)-β-D-glucopiranosídeo **(51)**, 1-O-3',4',5'-trimetoxifenil-(2-O-galoil)-β-D-glucopiranosídeo **(52)**, 1-O-3',4',5'-trimetoxifenil-(3-O-galoil-6-O-sulfato)-β-D-glucopiranosídeo **(53)**, 1-O-3',4'-dimetoxifenil-(2-O-galoil-6-O-sulfato)-β-D-glucopiranosídeo **(54)** (MAGID *et al.*, 2008). Já os extratos metanólicos das

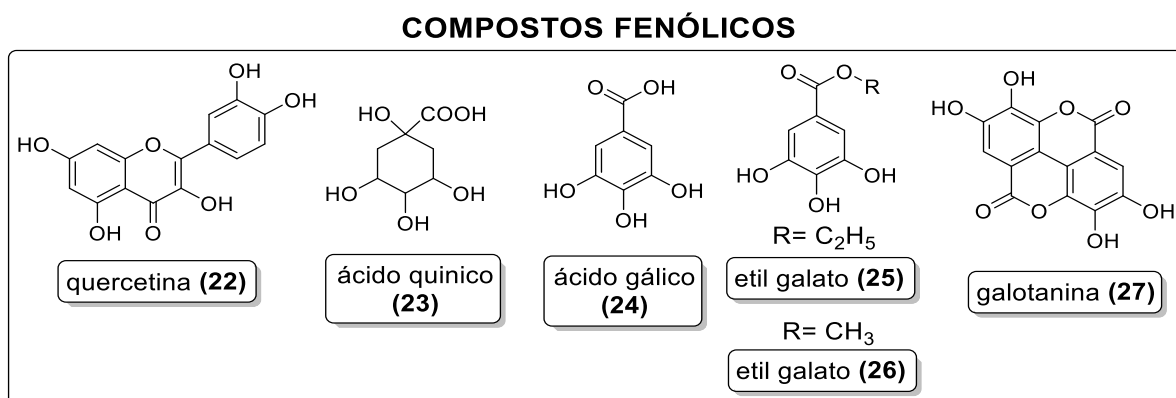
cascas do caule do *C. glabrum* mostraram a presença de dois compostos polares de dihidroisocumarina glicosídeo, figura 12: 3-( $\beta$ -D-glucopiranosiloximetil)-3,4-dihidro-5,6,7-tri-hidroxi-4-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil) -1H-[2]-benzopiran-1-ona (**55**) e 3-( $\beta$ -D-glucopiranosiloximetil)-3,4-dihidro-5,6,7-trihidroxi-4-(4'-hidroxi-3'-5'-dimetoxi fenil)-1H-[2]-benzopiran-1-ona (**56**), nessa espécie (MAGID *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Substâncias presentes nas espécies do gênero *Caryocar* (Ácidos graxos e carotenoides).



**Figura 7.** Subst. presentes nas espécies do gênero *Caryocar* (Compostos voláteis).



**Figura 8.** Substância presente nas espécies do gênero *Caryocar* (Compostos fenólicos).

## SAPONINAS

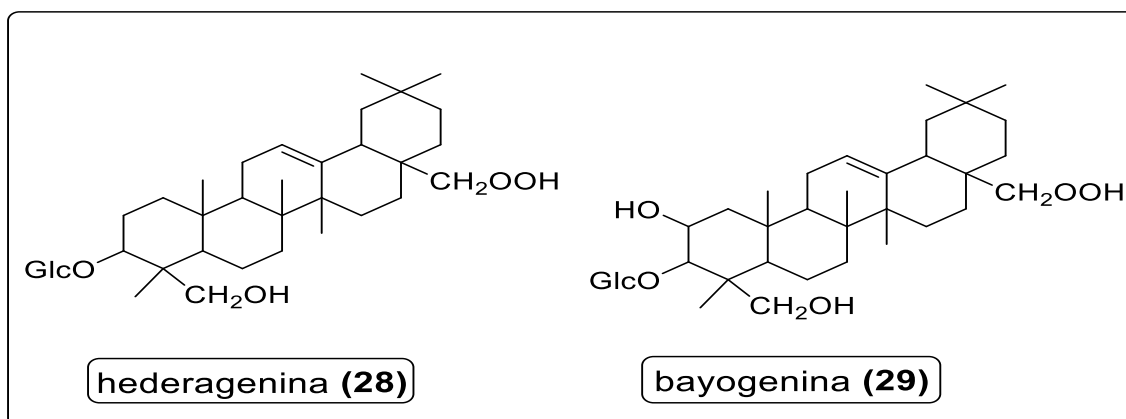
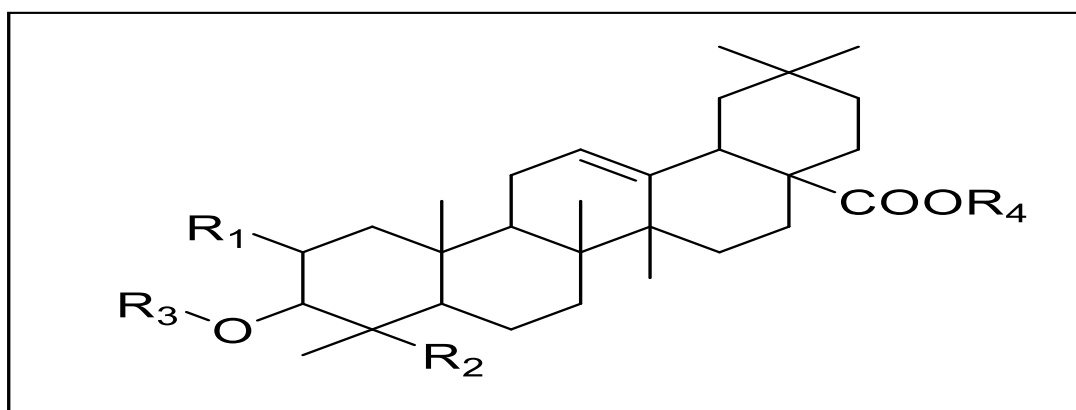


Figura 9. Substâncias presentes nas espécies do gênero *Caryocar* (Saponinas).

## SAPONINAS TRITERPÊNICAS

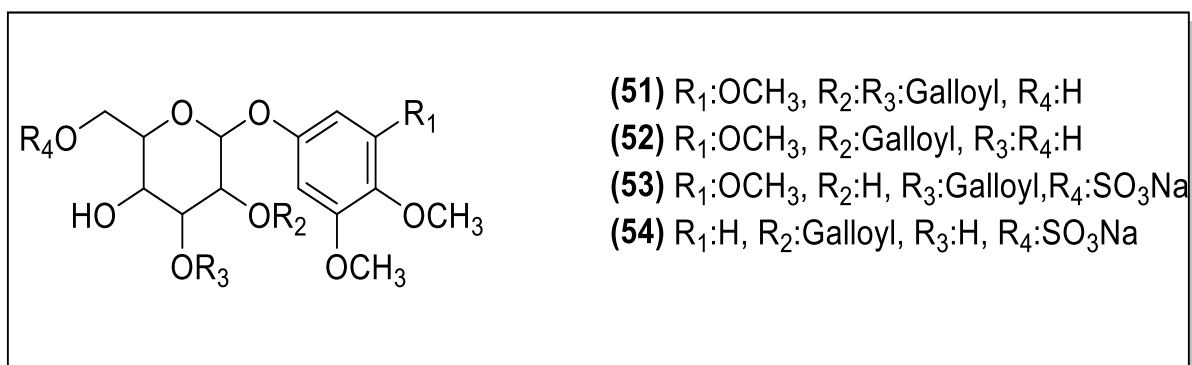


	R1	R2	R3	R4
(30)	H	COOH	Gal-(1-3)-Glc	H
(31)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Glc	H
(32)	OH	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Glc	H
(33)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Glc	Glc
(34)	OH	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Glc	Glc
(35)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Gal-(1-3)-Glc-	H
(36)	OH	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Gal-(1-3)-Glc-	H
(37)	OH	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Gal-(1-3)-Glc-	H
(38)	OH	CH <sub>3</sub>	GlcA-	H
(39)	OH	CH <sub>2</sub> OH	GlcA-	H
(40)	OH	CH <sub>3</sub>	6-O-methyl-GlcA-	H
(41)	OH	CH <sub>3</sub>	Gal-(1-3)-GlcA-	H
(42)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-GlcA-	H
(43)	OH	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-GlcA-	H
(44)	OH	CH <sub>3</sub>	Gal-(1-3)-6-O-methyl-GlcA-	H
(45)	OH	CH <sub>3</sub>	Gal-(1-3)-GlcA-	Glc
(46)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-GlcA-	Glc

(47)	OH	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-GlcA-	Glc
(48)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-6-O-methyl-GlcA-	Glc
(49)	OH	CH <sub>3</sub>	Gal-(1-3)-Gal-(1-3)-GlcA-	H
(50)	H	CH <sub>2</sub> OH	Gal-(1-3)-Gal-(1-3)-GlcA-	H

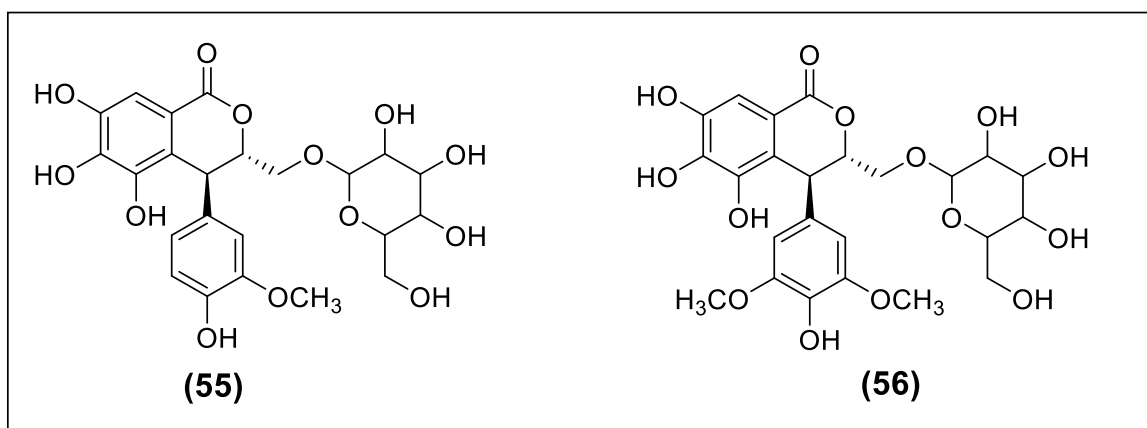
**Figura 10.** Substâncias presentes nas espécies do gênero *Caryocar* (Saponinas triterpênicas).

### GLICOSÍDEOS FENÓLICOS



**Figura 11.** Substâncias presentes nas espécies do gênero *Caryocar* (Glicosídeos fenólicos).

### DIHIDROISOCUMARINA GLICOSÍDEO



**Figura 12.** Substâncias presentes nas espécies do gênero *Caryocar* (Dihidroisocumarina glicosídeo).

A tabela 5 mostras as atividades biológicas das espécies desse gênero, com exceção da espécie *Caryocar villosum* que será explorada a seguir.

**Tabela 5.** Atividades biológicas comprovadas das espécies do gênero *Caryocar*.

Espécie	Parte da planta	Extrato/ fração	Atividade biológica	Ref.
<b><i>C. brasiliense</i></b>	folhas	extrato hidroalcoólico	antileishmania, antimicrobiana, antioxidante	[1]
<b><i>C. brasiliense</i></b>	casca	extrato hidroalcoólico	antioxidante	[2] [3] [4] [5]
<b><i>C. brasiliense</i></b>	frutos	óleo comercial	atividade cicatrizante	[6]
<b><i>C. brasiliense</i></b>	frutos	óleo macerado com etanol	atividade hepatoprotetora e antioxidante	[7]
<b><i>C. brasiliense</i></b>	folhas sementes amêndoas	extrato etanólico óleo comercial óleo comercial	antifúngica	[8]
<b><i>C. brasiliense</i></b>	folhas e cascas	extrato etanólico	atividade moluscicida	[9]
<b><i>C. brasiliense</i></b>	casca	extrato etanólico	atividade tripanocida	[10]
<b><i>C. coriaceum</i></b>	polpa dos frutos	óleo	anti-inflamatória e cardioprotetor	[11]
<b><i>C. coriaceum</i></b>	frutos	óleo da fração hexânica	atividade cicatrizante	[12] [13]
<b><i>C. coriaceum</i></b>	frutos	óleo obtido por decocção	efeito hipolipêmico e anti-inflamatório	[14]

[1] PAULA-JUNIOR *et al.*, 2006; [2] MONTEIRO *et al.*, 2015; [3] ROCHA *et al.*, 2015; [4] ROESLER *et al.*, 2008; [5] MOURA *et al.*, 2013; [6] BEZERRA, BARROS e COELHO, 2015; [7] VALE *et al.*, 2009; [8] PASSOS *et al.*, 2002; [9] BEZERRA, *et al.*, 2002; [10] HERZOG-SOARES *et al.*, 2002; [11] TORRES<sup>a</sup> *et al.*, 2016; [12] NASCIMENTO *et al.*, 2015; [13] QUIRINO *et al.*, 2009; [14] FIGUEIREDO *et al.*, 2016.

### 3.8 Espécie *Caryocar villosum*

*C. villosum* é uma árvore encontrada na Amazônia central, popularmente conhecida como piquiá (ALMEIDA *et al.*, 2013). Essa espécie apresenta grande importância no uso popular devido a sua qualidade da madeira e à produção de frutos para populações humanas (MARTINS e GRIBEL, 2007). Para mais informações a tabela 4 apresenta a utilização das partes dessa espécie. Essa árvore pode atingir 40 a 50 metros de altura, o tronco pode atingir 2,5 metros de diâmetro e os frutos apresentam parte externa e interna comestível, o endocarpo é amarelo brilhoso (Figura 13), e no interior do endocarpo possui espinhos finos e

afiados e sementes com 5 mm (NUNES e GIL, 2016; ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013; SHANLEY *et al.*, 2011).

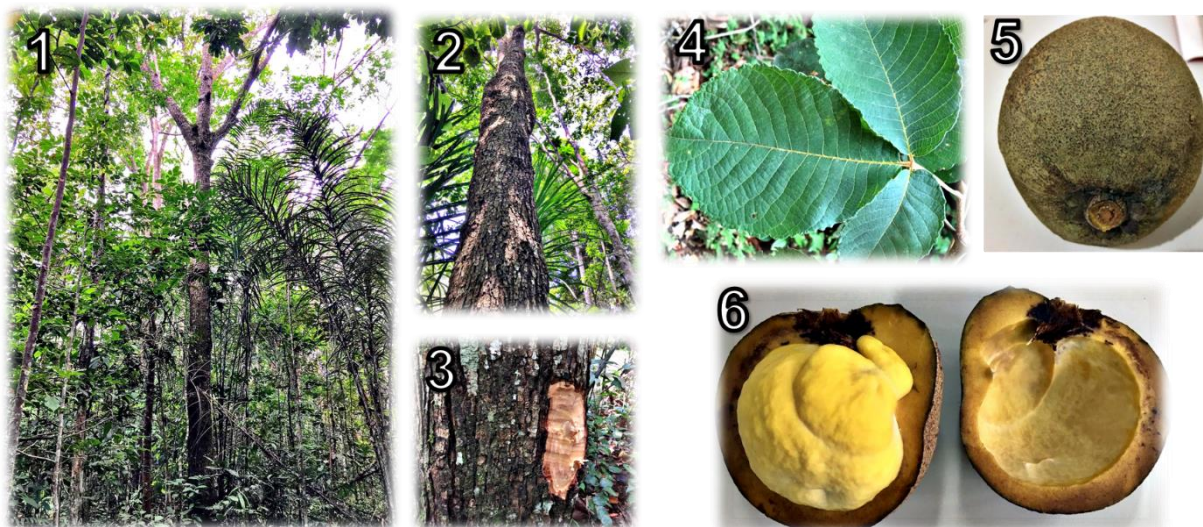
A frutificação pode ser produzida em média anual 350 frutos por árvore (SHANLEY *et al.*, 2011). As folhas são opostas, trifoliadas, a superfície das folhas pequenas é vilosa e apresenta pedicelos com duas bractéolas. Nas inflorescências há um par brácteas na base, com flores não vistas (NUNES e GIL, 2016; SHANLEY & MEDINA, 2005).

**Tabela 6.** Utilização das partes da espécie *C. villosum*.

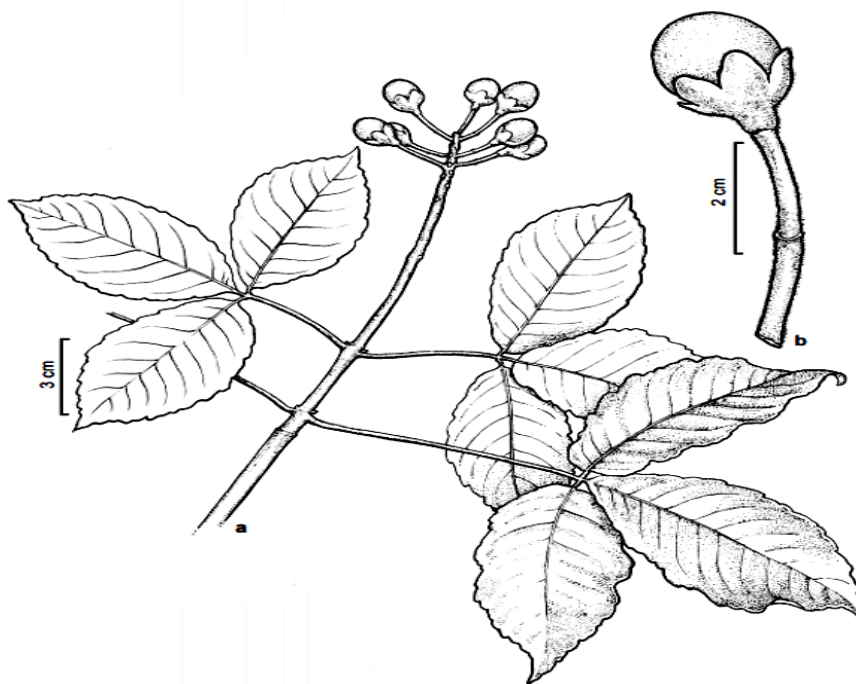
Parte da espécie	Características e uso popular das partes da espécie
	Os frutos são aromáticos com polpa amarela brilhante e são comestíveis após cozimento.
	O tronco dessa espécie é de alta qualidade (compacta, pesada, duradoura e útil para peças de grandes dimensões), sendo destaque nas indústrias de construção e construção de barcos e é frequentemente usada para reforçar a estrutura interna dos barcos fluviais. Além disso podem ser confeccionadas cercas e portões, sendo resistente à água e não se fragmentam facilmente. Nas aldeias rurais, as canoas são construídas da madeira com duração até dez anos.
	A casca grossa do fruto é rica em taninos e pode ser usada para fazer sabão. Além disso, são usados na fabricação de tinta, bem como para tingir redes e fios.
	O óleo extraído da polpa pode ser usado na culinária, sendo utilizado para fritar peixe.
	As sementes são consideradas excelente fonte de nutrição, podendo ser extraído o óleo sendo empregado na indústria de cosméticos.

**Fonte:** Adaptado de SHANLEY *et al.*, 2011; MARTINS e GRIBEL, 2007.





**Figura 13.** Partes da espécie *C. villosum* (Piquiá): 1- árvore inteira; 2- tronco; 3- tronco com casca do caule retirada; 4- folhas; 5- fruto inteiro; 6- fruto cortada.



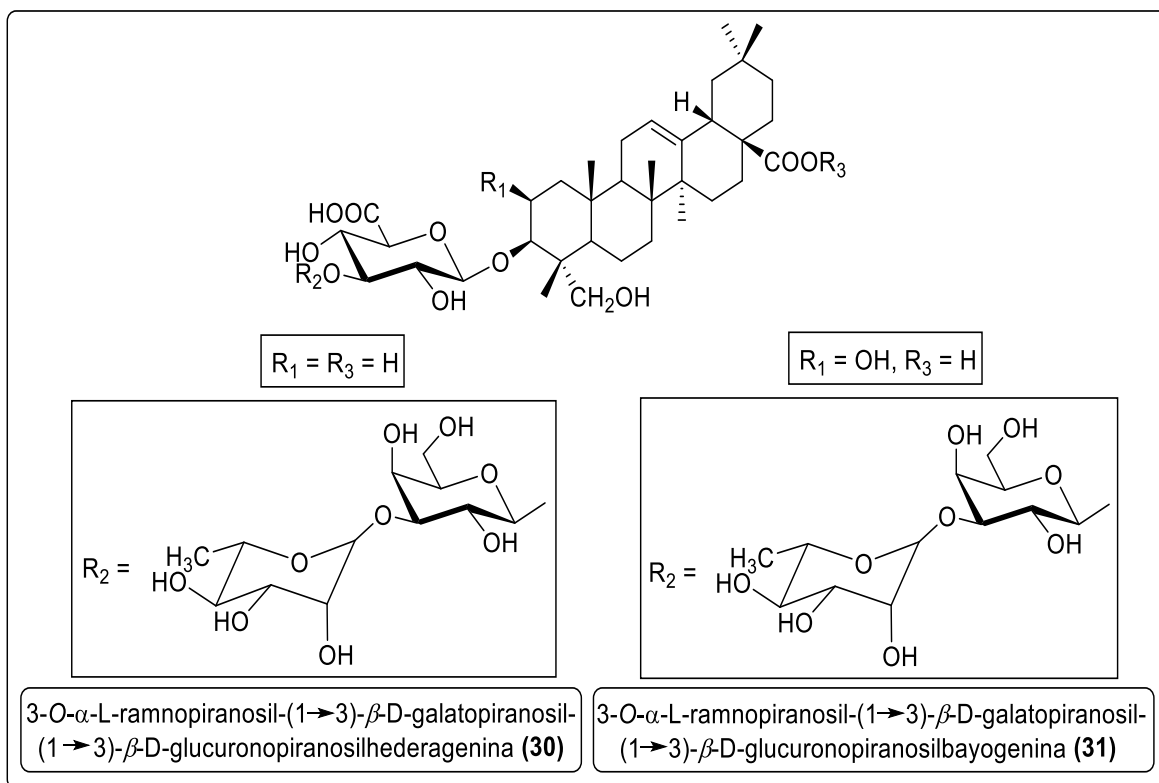
**Figura 14.** Ilustração da espécie *C. villosum* mostrando: a) ramo foliar; b) fruto imaturo (NUNES e GIL, 2016).

*C. villosum* é uma espécie Neotropical, distribuída nos países: Bolívia, Equador, Guianas, Venezuela e Brasil. No Brasil a espécie apresenta ampla distribuição na região Norte (Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima), e na região Nordeste foi registrada apenas para o estado do Maranhão (NUNES & GIL, 2016).

Com base na fitoquímica dessa espécie foi comprovado a presença de saponinas triterpênicas (3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galato-piranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosilhederagenina (**30**) e 3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galato-piranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosilbayogenina (**31**)) (MAGID<sup>c</sup> *et al.*, 2006) e fenólicos glicosilados (ácido 3-*O*-metil-4'-(3''-*O*-acetil)-L-ramnopiranosil elágico (**32**) e ácido 3-*O*-metil-4'-(4''-*O*-acetil)-L-ramnopiranosil elágico (**33**) (MAGID *et al.*, 2008) nas cascas do caule.

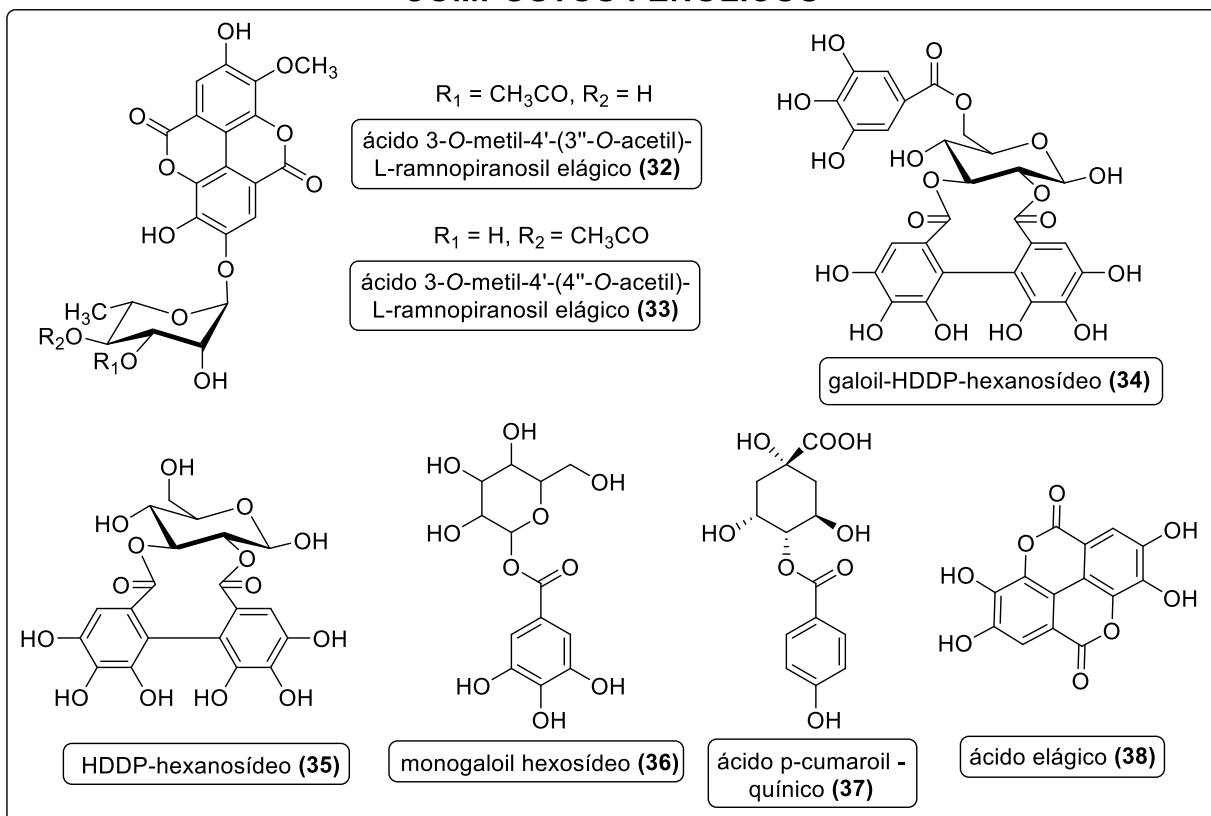
Na polpa do fruto foram identificados compostos fenólicos simples (ácido gálico (**24**) e ácido elágico (**38**)) (NASCIMENTO-SILVA e NAVES, 2019; YAMAGUCHI *et al.*, 2017; CHISTÉ, BENASSI, MERCADANTE, 2013; MARX, ANDRADE e MAIA, 1997), fenólicos glicosilados (galoil-HDDP-hexanosídeo (**34**), HDDP-hexanosídeo (**35**), monogaloil hexosídeo (**36**) e ácido p-cumaroil - quínico (**37**)) e carotenoides (zeaxantina (**15**), anteraxantina (**16**), neoxantina (**39**), 9-*cis*-violaxantina (**40**) e *trans*-luteína (**41**)) (NASCIMENTO-SILVA e NAVES, 2019; CHISTÉ, BENASSI, MERCADANTE, 2013; CHISTÉ & MERCADANTE, 2012).

### SAPONINAS TRITERPÊNICAS

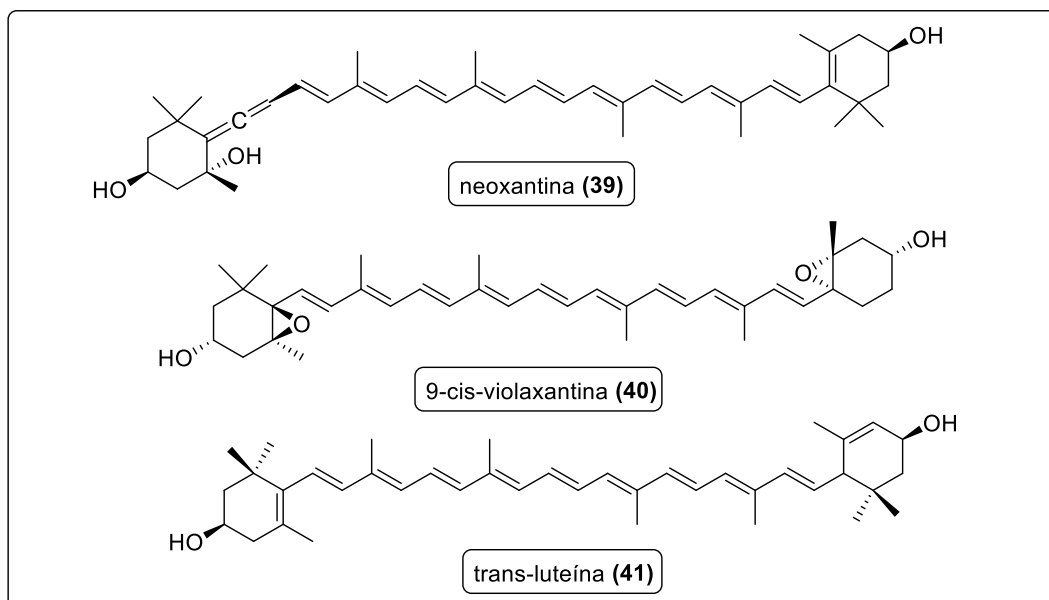


continuação

## COMPOSTOS FENÓLICOS



## CAROTENOIDES



**Figura 15.** Substâncias identificadas na espécie *Caryocar villosum* (NASCIMENTO-SILVA e NAVES, 2019; CHISTÉ, BENASSI, MERCA-DANTE, 2013; CHISTÉ *et al.*, 2012; MAGID *et al.*, 2008; MARX, ANDRADE e MAIA, 1997).

Os compostos identificados e isolados dessa espécie são responsáveis por algumas propriedades biológicas comprovadas, tais como a atividade antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2012), genotóxica (ALMEIDA *et al.*, 2013), inibidora da  $\alpha$ -glicosidase (SOUZA *et al.*, 2011), larvicida, citotóxica e atividade lipolítica *in vivo* (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013).

Com base nos relatos fitoquímicos e potenciais farmacológicos de algumas espécies do gênero *Caryocar*, foi escolhida a *C. villosum* com o objetivo de estudar continuamente a investigação química das cascas do caule e avaliar o potencial antioxidante *in vitro*.

### 3.9 Análise quimiométrica

A análise de dados multivariados vem crescendo e se destacando na área da química e de outras ciências. Isto sugere que a tendência atual do pensamento científico envolve um raciocínio multivariado, principalmente devido ao desenvolvimento tecnológico atingido neste último século (RENCHE, 2002). Em química, as análises multivariadas são úteis para planejar ou selecionar procedimentos experimentais; extrair o máximo da informação química relevante pela análise dos dados; e obter conhecimentos sobre os sistemas químicos estudados (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2006; MASSART *et al.*, 1988).

Com a aplicação destas ferramentas sobre dados fundamentalmente obtidos nas áreas da química, nasceu uma nova disciplina designada por Svante Wold em 1972, de quimiometria (ESBENSEN e GELADI, 1990). De uma maneira filosófica, a quimiometria é, teoricamente, a aplicação de quaisquer métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, a quimiometria se iniciou em 1772 com Lavoisier, que deve ser considerado o primeiro quimiometrista.

A quimiometria trata-se de um campo da análise multivariada que utiliza tratamentos estatísticos para gerar modelos que possibilitam extrair informações de natureza química a partir de conjuntos de dados multivariados bidimensionais. Seus principais objetivos consistem em classificar e agrupar amostras (WINNING *et al.*, 2008).

Os métodos de reconhecimento de padrões permitem agrupar objetos de uma mesma categoria de acordo com a similaridade entre eles, buscando

regularidade e padrões entre os dados analisados. No caso do uso da análise de espectrometria de massas, a partir dos espectros é construída uma matriz de dados, na qual são aplicados os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados. Desta forma, são utilizados métodos fundamentados em projeção (ACP – Análise de Componentes Principais) e métodos baseados na distância entre as amostras (AH – Análise Hierárquica de Agrupamentos), também conhecida como Análise de Cluster PRATA, EMIDIO e DOREA, 2011; TOZETTO, DEMIATE e NAGATA, 2007).

Essa análise de ACP é um método de análise multivariada que projeta os dados num espaço de dimensão menor por meio do agrupamento de variáveis altamente correlacionadas numa nova variável direcionada ao longo do eixo de maior variabilidade dos dados. Os dados originais são tratados e havendo correlação significativa entre as variáveis do conjunto de dados é possível encontrar novas variáveis, que são chamadas de componentes principais (PCs). Estas estão em número menor que a inicial e descrevem aproximadamente toda a informação contida nos dados originais (PIROUETTE, 2008).

As novas variáveis são combinações lineares das variáveis originais e ortogonais entre si. Elas são construídas em ordem decrescente de quantidade de variância que descrevem, de forma que as informações mais relevantes fiquem contidas nas primeiras PCs, e as de menor importância, nas últimas. A redução da dimensionalidade do conjunto de dados leva a uma diminuição na complexidade das informações analisadas, tornando-as de mais fácil compreensão (WINNING *et al.*, 2008).

A análise por agrupamento hierárquico (AH) representa graficamente os dados multidimensionais em um esquema bidimensional. Os resultados são apresentados na forma de um diagrama chamado dendrograma, na qual o comprimento dos ramos representa o grau de similaridade entre os objetos. O parâmetro usado neste processo é a medida das distâncias entre as amostras. Este método efetua cálculos e compara as distâncias entre pares de amostras (ou variáveis) em um conjunto de dados. As amostras são agrupadas de acordo com a similaridade de seus atributos (PIROUETTE, 2008).

A medida mais utilizada para estabelecer a distância entre as amostras é a Euclidiana que consiste na distância geométrica entre duas amostras  $a$  e  $b$  ( $d_{ab}$ ) em um espaço multidimensional e o Método de Ward, que consiste na análise da variância para avaliar a distância entre os grupos, com o objetivo de tentar minimizar a soma dos quadrados de quaisquer grupos que possam ser formados em cada passo da análise.

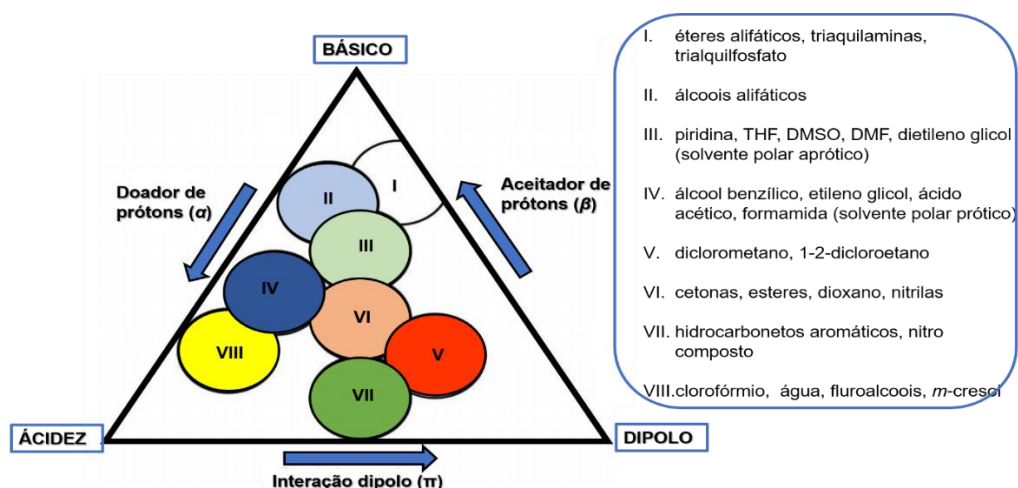
### 3.9.1 Processo de extração

A escolha de um planejamento de misturas apropriado engloba conhecimentos do número de variáveis e interações a serem estudadas, a complexidade de cada planejamento, a validade estatística, a efetividade na modelagem dos dados e a viabilidade e custos envolvidos em sua execução (NOVAES *et al.*, 2018).

Uma das preocupações no processo de extração é a manutenção das substâncias da planta, portanto deve ser realizada de maneira cuidadosa. Na extração nem sempre se utiliza um único solvente, mas misturas de diferentes solventes com polaridades diferentes. Por outro lado, o meio extrativo depende, sobretudo, da solubilidade das substâncias a extrair e de sua estabilidade, sendo assim a escolha da melhor condição experimental foi feita através de um planejamento experimental centroide simplex (NETO, 2001).

Esse planejamento permite reduzir o número de coeficientes de um modelo e, conseqüentemente, o número de pontos experimentais, levando a uma maior economia de tempo e reagentes. Foi proposta uma função polinomial, chamada de modelo cúbico especial, a qual foi formulada para conter apenas os termos que representem os pontos experimentais relacionados à presença de componentes em proporções iguais no interior do espaço experimental delimitado. Em outras palavras, ao menos um ponto central será incluído no planejamento para permitir modelar e avaliar a influência dos possíveis efeitos sinérgicos ou antagonísticos que aparecem na presença de todos os componentes da mistura. Uma alternativa para a escolha do melhor solvente extrator é a utilização do triângulo de solvente de seletividade proposta por Snyder para cromatografia (SNYDER, CARR & RUTAN, 1993).

Esse método é útil para caracterizar, otimizar e selecionar solventes no desenvolvimento de sistema de separação, no caso a cromatografia líquida utilizada neste trabalho. O triângulo de seletividade de solventes de Snyder apresenta valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi$  que correspondem aos parâmetros de acidez, basicidade e dipolaridade, respectivamente (Figura 16). Esses parâmetros são grandezas relativas da força de interação molecular do soluto (analito) e o solvente (JOHNSON & VITHA, 2011).



**Figura 16.** Ilustração esquemática do *triângulo de Snyder* (adaptado de SAMANIDOU, 2015)

O emprego dessas duas técnicas baseia-se na redução drástica do tamanho da partícula e a rápida dissolução dos componentes. Esta técnica é vantajosa em processamentos de pequena e média escala (SILVA, 2005). O planejamento quimiométrico centroide simplex propiciou a obtenção de misturas de solventes para uma melhor extração das substâncias fenólicas presentes no *C. villosum*, tendo capacidades extratoras diferentes às obtidas empregando-se solventes puros.

A vantagem do triângulo de Snyder na caracterização das substâncias presentes no *C. villosum* foi o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse, sendo assim possível a identificação dos íons responsáveis pela separação de cada grupo. Outra grande vantagem foi a redução de tempo e do baixo custo que esse método proporciona para a análise em pequena escala.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Coleta e identificação da espécie *Caryocar villosum*

As cascas do caule de *C. villosum* foram coletadas no mês de dezembro de 2017 na Reserva Florestal Adolpho Ducke de espécimes marcados e identificados sob as coordenadas S 2°55'37.4" e W 59°58'36.0", na cidade de Manaus - AM (Figura 17). Foi registrada no Sisbio com o número 1912337. A identificação da espécie foi realizada pelos botânicos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, onde foi depositada no Herbário da própria instituição a sua exsicata (Nº de registro 278987).



**Figura 17.** Local de coleta da espécie *C. villosum* (Adaptado de Google earth, 2020).

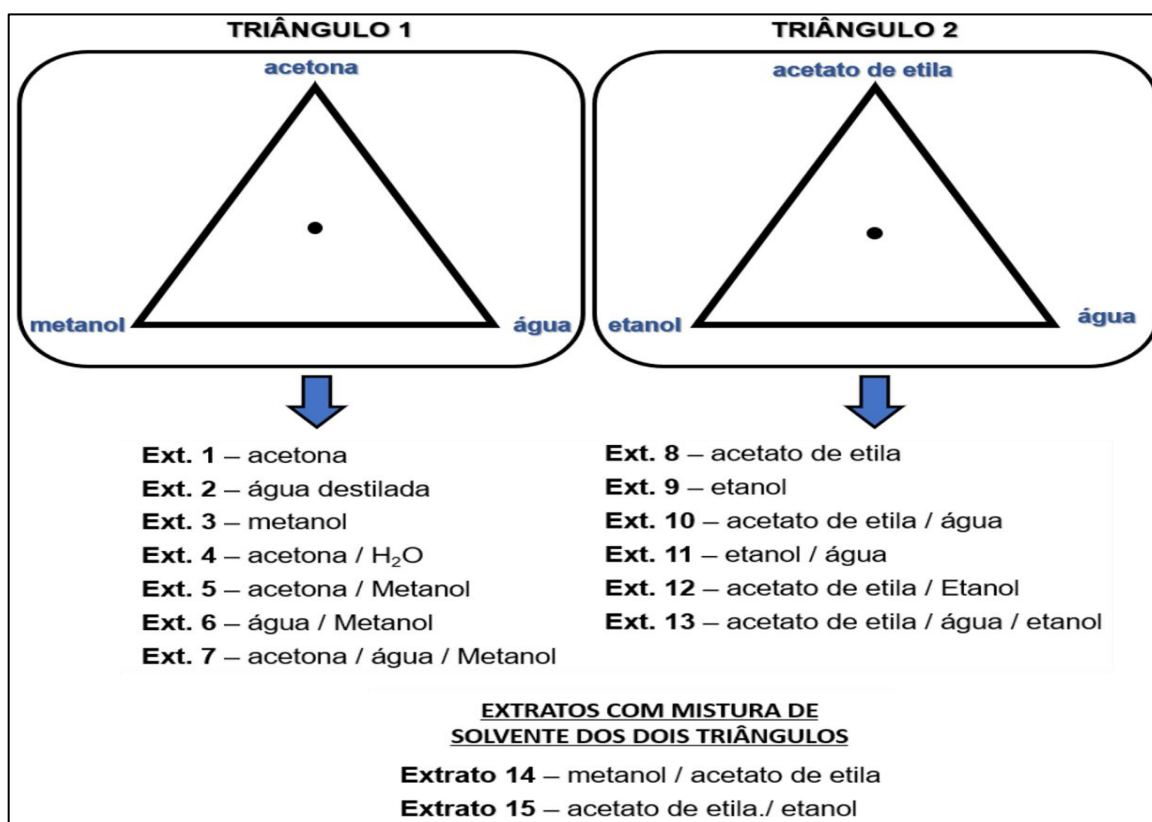
### 4.2. Preparo dos extratos das cascas do caule de *C. villosum*

Os extratos de *C. villosum* foram preparados no Laboratório de Abertura de Amostra e Ensaio Químico localizado na Central Analítica da UFAM. Após a coleta, o material botânico foi submetido à secagem a sombra em temperatura ambiente por 30 dias, e logo o material foi triturado em um moinho com 4 facas, até atingir aspecto de serragem de granulometria aproximada de 0,5 mm, rendendo cerca de 631,16 g de massa.



#### 4.2.1. Extração baseada no triângulo de seletividade proposto por Snyder

Para análise quimiométrica, inicialmente o material foi submetido à extração por maceração à temperatura ambiente. Foram utilizados água destilada e solventes grau CLAE, ou mistura destes para compor a análise do triângulo de Snyder. Para o 1º triângulo foi utilizado acetona, água e metanol, e para o 2º triângulo utilizou-se acetato de etila, etanol e água. Foi realizado também a combinação de solventes dos dois triângulos, obtendo-se no total 15 extratos (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema da metodologia do triângulo de Snyder para o preparo dos extratos de *C. villosum*

Para a extração foi adicionado 1 g de material pulverizado em tubos de ensaio, formando um conjunto de 15 amostras com 6 ml dos respectivos solventes (concentração dos extratos 0,16 g.L<sup>-1</sup>). As amostras foram colocadas em ultrassom por 20 min para melhorar a extração e posteriormente mantida 12 horas em repouso extraído. Posteriormente, os extratos foram filtrados e retirado 10 µL de cada extrato para a análise preliminar para estimar a concentração de fenólicos

totais dos extratos e pôr EM. As amostras mãe foram submetidas a secagem utilizando o liofilizador e obtido suas massas conforme a tabela 7.

**Tabela 7.** Quantidades de solventes utilizado na extração e massa obtidas dos extratos de *C. villosum*.

Extrato – Solvente	Quantidade (proporção)	Massa obtida
Extrato 1 – Acetona	6 ml	18,6 mg
Extrato 2 - H <sub>2</sub> O destilada	6 ml	-
Extrato 3 – MeOH	6 ml	22,4 mg
Extrato 4 - Acetona/H <sub>2</sub> O	6 ml (1:1)	-
Extrato 5 - Acetona/MeOH	6 ml (1:1)	24,6 mg
Extrato 6 - H <sub>2</sub> O/MeOH	6 ml (1:1)	-
Extrato 7 - Acetona/H <sub>2</sub> O/MeOH	6 ml (1:1:1)	-
Extrato 8 – AcOEt	6 ml	82,0 mg
Extrato 9 – EtOH	6 ml	10,6 mg
Extrato 10 - Acetona/H <sub>2</sub> O	6 ml (1:1)	-
Extrato 11 - EtOH/H <sub>2</sub> O	6 ml (1:1)	-
Extrato 12 - AcOEt/EtOH	6 ml (1:1)	21,7 mg
Extrato 13 - AcOEt/H <sub>2</sub> O/EtOH	6 ml (1:1:1)	-
Extrato 14 – MeOH / AcOEt	6 ml (1:1)	17,4 mg
Extrato 15 - Acetona/ EtOH	6 ml (1:1)	18,2 mg

**Legenda:** MeOH - metanol; AcOEt - acetato de etila; EtOH - etanol;

As amostras que não apresentaram massa conforme a tabela acima, deve-se a perda de parte do material no processo de secagem, as mesmas apresentaram pequenos pontos de fungos na parede lateral do recipiente de armazenamento, desta forma não foi possível a obtenção de massa precisa das amostras. Entretanto, todas as amostras foram possíveis de realizar as análises cromatográficas.

#### 4.3. Determinação de fenólicos totais (FT)

A concentração de fenólicos totais (FT) foi quantificada pelo método adaptado por KIM *et al.*, 2003. Inicialmente, 10 µL dos extratos (1 mg.mL) foram colocados em cada poço juntamente com 50 µL do reagente Folin Ciocalteu a 10% e

incubados sob proteção de luz por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado uma solução saturada de carbonato de sódio a 0,4% e incubado novamente por 3 minutos.

A absorvância da mistura dos extratos foi medida em comprimento de onda de 620 nm no leitor de microplaca (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman). A presença de substâncias fenólicas é baseada na mudança da coloração amarela do meio racional para a coloração azul (escuro). A estimativa do conteúdo fenólico das amostras foi realizada em quadruplicata e expressa em porcentagem e em µg equivalente de ácido gálico (padrão) quando comparado à diluição consecutiva do padrão.

**equação 1:** Fenólicos totais (%) =  $\frac{\text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (padrão)}} \times 100$

#### 4.4. Análise por espectrometria de massa – Full scan

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da central analítica da UFAM. Com base no item 4.2.1, através dos extratos macerados e filtrados foi retirado 10 µL de cada extrato e diluído em MeOH grau CLAE (1 mg. mL<sup>-1</sup>). Alíquotas (5 µL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas para 5 µg/ mL e analisadas por infusão direta no espectrômetro de massa do modelo LCQ Fleet com interface de ionização por electrospray (ESI) e equipado com analisador íon trap (armadilha de íons). As análises foram operadas no modo negativo de ionização (ESI-EM) com varredura na faixa de 100-1000 *m/z* (BASTOS *et al.*, 2020). Os dados espectrométricos foram processados utilizando o programa Xcalibur 2.0.7.

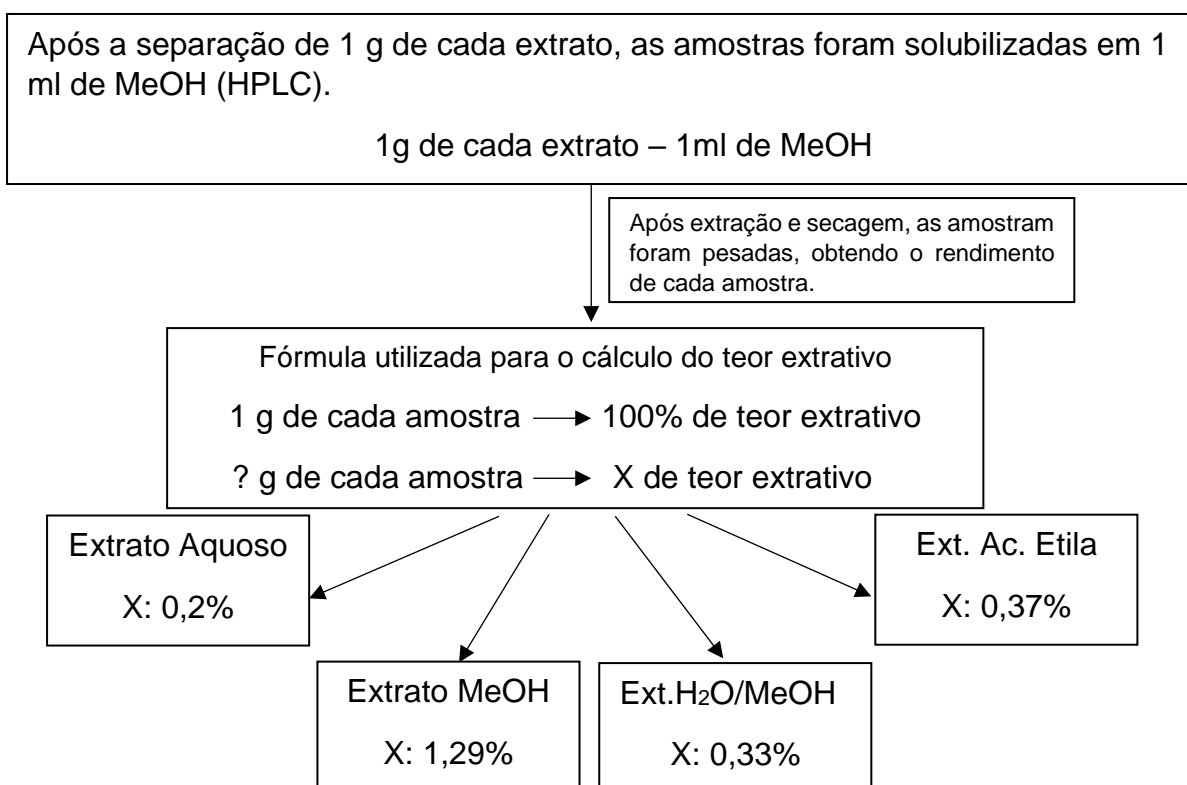
#### 4.5. Análise por espectrometria de massas – fragmentação (EM<sup>n</sup>)

As análises de fragmentação dos íons majoritários presentes nos extratos de *C. villosum* foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Foi utilizado um espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI no modo negativo e analisador do tipo íon trap da amaZon speed

da Bruker Daltonik GmbH Usando. Os extratos foram solubilizados em metanol grau CLAE, obtendo-se a concentração de 1 mg/mL. Analisada, seguindo as seguintes condições: com fluxo de 1 mL/min<sup>-1</sup>, com volume de injeção de 300 µL/h utilizando bomba de fluxo, conforme o seguinte gradiente de diluição: 30 µL + 970 µL de MeOH. Para o controle e aquisição dos dados foi utilizado o software TrapControl 7.1 e o processamento de dados foram realizados no software Bruker Compass DataAnalysis, versão 4.2.

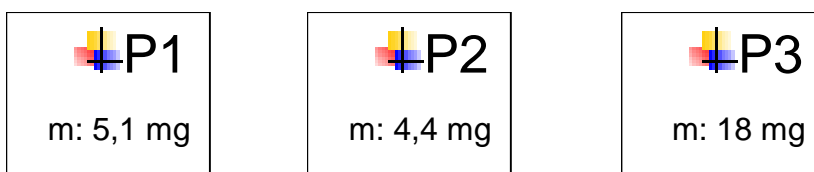
#### 4.6. Isolamento dos principais constituintes químicos dos extratos

Por intermédio da técnica de MS<sup>2</sup> verificou-se que os extratos: 02-aquoso, 03-metanólico, 06-água/metanol e 2.1-acetato de etila continha os melhores perfis e os íons de interesse (íons marcadores da análise quimiométrica). Para uma melhor obtenção de resultados foi selecionado o extrato metanólico para e extração em grande escala, partido da análise de rendimento (Teor extrativo) de cada extrato, descritas no fluxograma da Figura 19.



**Figura 19.** Fluxograma de escolha de melhor solvente extrator para o isolamento das substâncias.

As cascas (300g) foram solubilizados em MeOH (450 ml), obtendo assim o extrato bruto. Foi, portanto, realizado um *clean-up* da amostra utilizando coluna cromatográfica aberta, fase estacionária sílica reversa C18, e fase móvel, metanol. Depois de seco (com rendimento igual a 0,73%), preparou-se a amostra utilizando 1 mg da amostra e solubilizou em 1mL de MeOH grau HPLC e então foi submetida ao CLAE analítico e posteriormente ao semipreparativo, onde foram utilizadas 100mg da amostra diluída em DMSO, método isocrático de 30% de MeOH por cerca de 30 minutos, em coluna C18 e fluxo de 4,2 ml/min. Utilizando uma varredura entre 240 nm e 280 nm, com partículas de 3 µm, analisados em um Shimadzu HPLC Nexera XR composto por duas bombas LC-6AD, é acoplado a um detector ultravioleta Shimadzu de comprimento de onda variável (UV-SPD-20A) e é acoplado a um Bruker AmaZon Speed Íon Trap (IT) equipado com uma fonte de íons de eletrospray (ESI). O que possibilitou isolar três Substâncias:



Depois de seco e pesado, todas as substâncias foram analisadas por espectrometria de massas, injeção direta, fonte eletronspray modo negativo e positivo, foi utilizado o espectrômetro de massa do Laboratório de Espectrometria de Massas e CLAE (LABCEM/CA-UFAM), modelo LQC Fleet, Íon Trap (Thermo Scientific).

Todas as substâncias obtidas foram submetidas à análise de ressonância magnética uni e bidimensionais, com intuito de identificação e determinação estrutural.

#### 4.7. Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos pelo aparelho da Bruker Advance III HD, operando a 500 MHz com tetrametilsilano (TMS) ou núcleo de hidrogênio residual do solvente deuterado como referencial interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) registradas em Hertz (Hz).

Os dados obtidos das injeções foram processados através de um programa chamado TopSpin 3.5 e comparados quando possível, com os dados da literatura para elucidação estrutural das substâncias.

#### 4.8. Análise quimiométrica

A análise multivariada foi realizada por meio do software Chemoface, versão 1.5.15. Os íons obtidos pela análise no item 4.3 que apresentaram intensidade abaixo de 5% em relação ao pico base em cada espectro de massa foram negligenciados durante a análise dos dados. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi calculada através da variação dos íons, sendo a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AH) calculada através das distâncias euclidianas e da ligação média dos quatro primeiros componentes principais, cuja variação cumulativa representa 89,88%.

#### 4.9. Avaliação da atividade antioxidante “*in vitro*”

A determinação da atividade de eliminação de radicais livres foi avaliada pelo método DPPH, de acordo com a metodologia de Jing (*et al.*, 2015) com algumas modificações. Inicialmente, utilizou-se 3,9 mg de DPPH• em 100 ml de MeOH (CLAE), e posteriormente foram pipetados 270 µL do reagente (100 µM) e misturados com 30 µL de cada solução de extrato (diluído em MeOH grau CLAE - concentração 1 mg/ mL). As microdiluições (500 a 7,8 µg/mL) foram encubadas e mantidas sob reação por 30 minutos, sob proteção de luz. Foi utilizado metanol (grau CLAE), como branco e a solução de DPPH, como controle negativo.

A reação colorimétrica é ocasionada pela oxirredução, onde o radical DPPH•, que apresenta coloração violeta, é reduzido, alterando a coloração da mistura para amarelo. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 515 nm em leitor de microplacas Multimode Detetor DTX 800 da Beckman. A curva de calibração para o padrão do ácido gálico foi preparada em MeOH (grau HPLC) na concentração de 1 mg. ml<sup>-1</sup> (solução mãe). Foi retirada uma alíquota de 100 µL da solução mãe e dissolvidos em 900 µL de metanol, para uma concentração final do padrão de 100 µg/ml, e posteriormente realizada sua microdiluição (100-1,56 µg/ml).

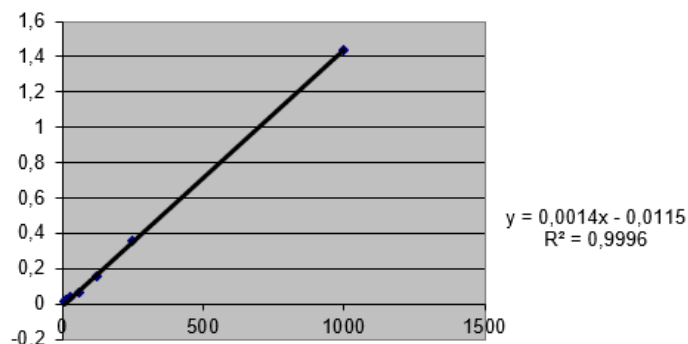
Os experimentos foram realizados em triplicata e como controle positivo utilizou-se o ácido gálico e controle negativo o MeOH (diluyente do extrato). Os resultados da atividade antioxidante das amostras foram expressos em porcentagem total de inibição (equação 2) e pelo parâmetro da concentração eficaz (CE<sub>50</sub>) (quantidade do analito capaz de sequestrar 50 % dos radicais livres do reagente DPPH). O cálculo do CE<sub>50</sub> é realizado a partir dos gráficos plotados com o percentual da capacidade de sequestro de radicais para cada diluição.

**equação 2**      % de inibição (DPPH) =  $100 - \frac{\text{Abs(DPPH)} - \text{Abs(ext)}}{\text{Abs (controle)}} \times 100$

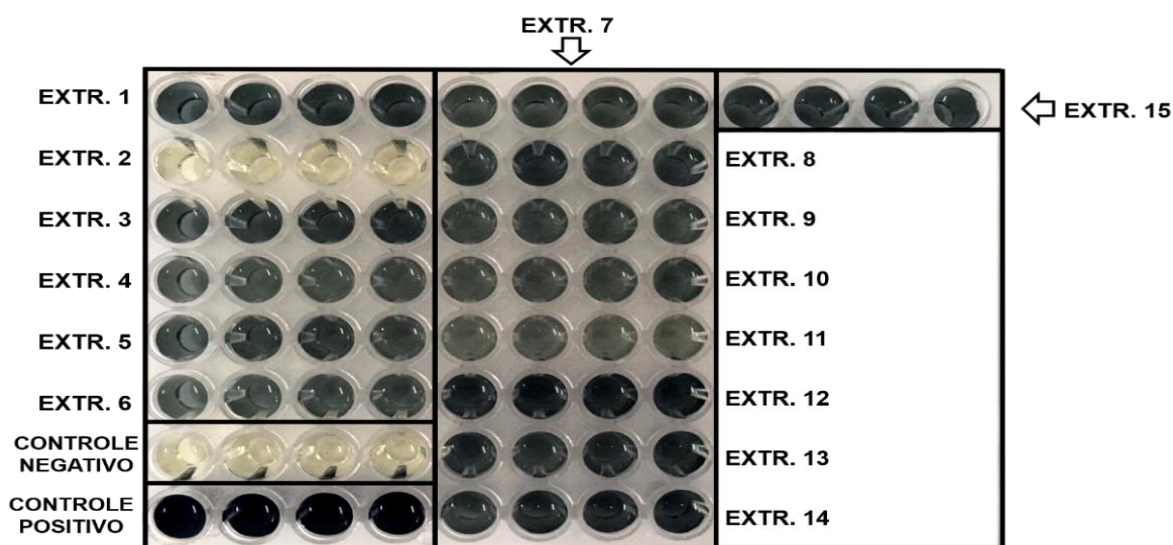
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estimativa da concentração dos compostos fenólicos nos extratos de *Caryocar villosum*

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado como análise preliminar para estimar a concentração de fenólicos dos extratos. A quantificação de FT (Fenólicos Totais) nos extratos (1 mg/ml) foi realizada a partir da construção de uma curva de calibração do padrão de ácido gálico em diferentes concentrações (Figura 14). A partir da reta obtida, realizou-se o cálculo da concentração de compostos FT. Os valores das absorbâncias dos extratos foram aplicados na equação da reta para a estimativa da concentração de FT, expresso em equivalente de ácido gálico por grama de extrato (EAG/g).



**Figura 20.** Curva de calibração do ácido gálico para a determinação da estimativa do conteúdo de FT presentes nos extratos de *C. Villosum*.



**Figura 21.** Ensaio colorimétrico da determinação de FT pelo método de Folin-Ciocalteu.



A avaliação de FT pelo método de Folin-Ciocalteu, mostrou que a espécie *C. villosum* apresentou percentual de fenólicos em seus extratos entre 20,2 a 36,9 %, com maior conteúdo para o extrato 13 (AcOEt/H<sub>2</sub>O/EtOH), e conseqüentemente maior quantidade de FT quando comparado a equivalente do padrão (329,4 ± 11,3 µg EAG/g). A tabela 8 mostra os teores fenólicos das amostras analisadas. A amostra 02 (Referente ao extrato aquoso), obteve resultado não definido, devido a mesma não ter solubilizado. As amostras que apresentaram quantidades maiores de conteúdo fenólico em relação as demais amostras, possivelmente podem estar associados com a extração desses compostos, aumentando suas quantidades de fenólicos totais.

**Tabela 8.** Estimativa da concentração de FT presentes nos diferentes extratos de *C. villosum*.

<b>Amostras</b>	<b>%</b>	<b>FT (µg EAG/g)</b>
extrato 1: acetona	28,7 ± 1,5	250,3 ± 14,9
extrato 2: H <sub>2</sub> O	0,2 ± 0,3	ND*
extrato 3: MeOH	28,6 ± 1,5	248,9 ± 14,6
extrato 4: Acetona/água	20,2 ± 0,8	168,1 ± 7,3
extrato 5: Acetona/MeOH	25,4 ± 1,6	218,0 ± 15,1
extrato 6: H <sub>2</sub> O/MeOH	20,4 ± 0,4	170,2 ± 4,1
extrato 7: Acetona/H <sub>2</sub> O/MeOH	23,7 ± 1,5	202,1 ± 14,3
extrato 8: AcOEt	28,7 ± 1,8	250,5 ± 17,4
extrato 9: EtOH	22,4 ± 1,1	189,5 ± 10,2
extrato 10: AcOEt/H <sub>2</sub> O	20,2 ± 0,8	169,03 ± 7,3
extrato 11: EtOH/H <sub>2</sub> O	21,2 ± 1,7	177,5 ± 17,2
extrato 12: AcOEt/EtOH	28,4 ± 1,0	246,9 ± 9,9
extrato 13: AcOEt/H <sub>2</sub> O/EtOH	36,9 ± 1,2	329,4 ± 11,3
extrato 14: MeOH/AcOEt	29,9 ± 1,8	261,8 ± 17,8
extrato 15: Acetona/EtOH	33,1 ± 1,9	292,3 ± 19,2

**Legenda:** Não Definido\*

É importante ressaltar que o método de Folin-Ciocalteu utilizado na determinação de FT não é específico para composto fenólicos, devido a detecção de outras substâncias redutoras presentes que podem interferir no resultado final

(ANGELO & NEUZA, 2007). Desta forma, o método de Folin-Ciocalteu torna-se apenas uma estimativa do conteúdo fenólico em amostras.

## 5.2. Caracterização dos compostos presentes nos extratos de *C. villosum*

Os extratos de *C. villosum* submetidos a análise espectrométrica preliminar sob ionização por electrospray em modo de aquisição negativo, forneceu o perfil químico analítico mensurável para todos os analitos. Desta forma, foi possível obter os íons majoritários da espécie alvo desse estudo (Tabela 9).

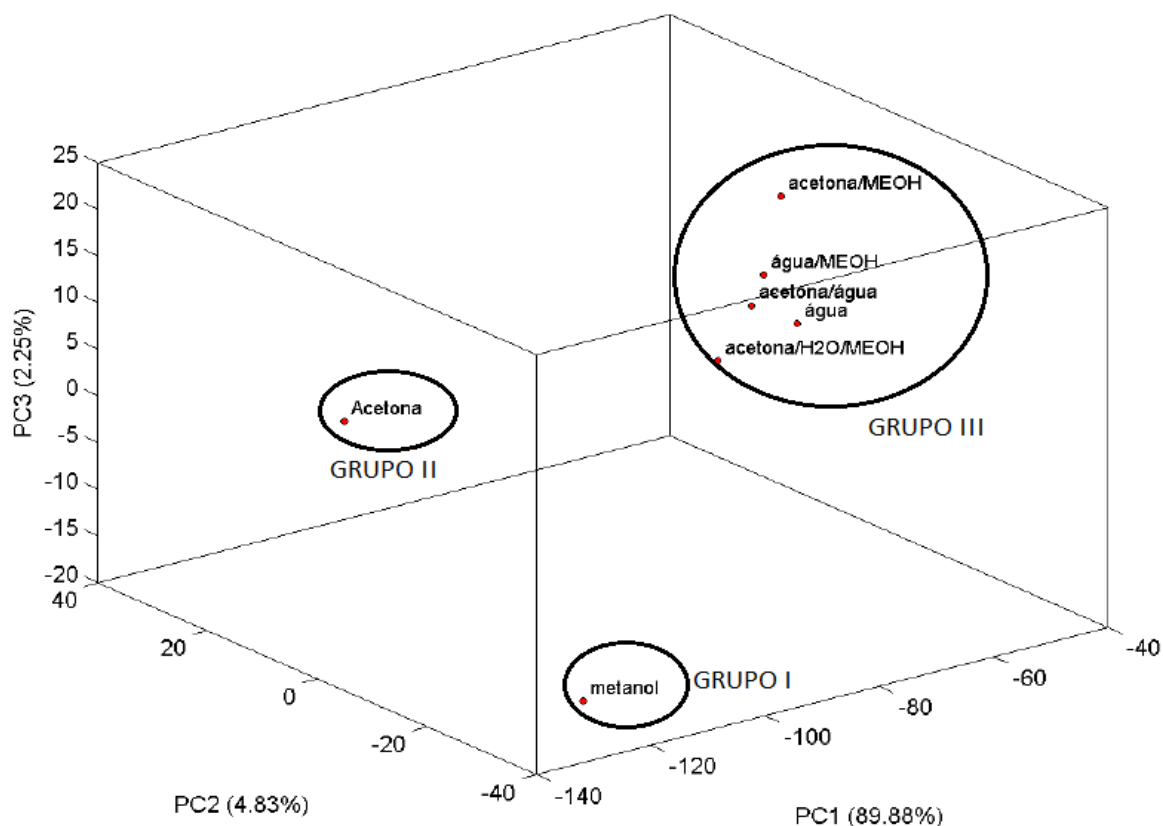
**Tabela 9.** Principais íons ( $m/z$ ) presentes nos diferentes extratos de *C. villosum*.

Amostras	tempo de retenção (s)	Íons ( $m/z$ )
extrato 1: acetona	0,43	355, 483, 635, 787, 669, 519, 469, 301, 169
extrato 2: H <sub>2</sub> O	1,63	355, 483, 518, 635, 331, 169, 669, 785
extrato 3: MeOH	2,51	355, 301, 483, 635, 469, 169, 787, 519
extrato 4: Acetona/Água	3,53	355, 483, 635, 301, 169, 787, 469
extrato 5: Acetona/MeOH	4,40	355, 635, 483, 301, 469, 169, 787
extrato 6: H <sub>2</sub> O/MeOH	5,29	355, 483, 635, 787, 301, 169, 469, 669, 519
extrato 7: Acetona/H <sub>2</sub> O/MeOH	6,37	355, 301, 335, 787, 519, 469, 169
extrato 8: AcOEt	7,31	483, 635, 787, 519, 469, 355, 301, 169, 755, 953
extrato 9: EtOH	7,98	355, 483, 635, 301, 785, 519, 469, 669, 602, 331, 169, 238, 953, 801
extrato 10: AcOEt/H <sub>2</sub> O	8,83	635, 787, 483, 169, 757, 339, 301, 469, 519, 599, 671, 801, 953
extrato 11: EtOH/H <sub>2</sub> O	9,68	355, 483, 635, 519, 469, 301, 169, 669, 787
extrato 12: AcOEt/EtOH	10,56	355, 483, 301, 635, 787, 469, 669, 169, 337
extrato 13: AcOEt/H <sub>2</sub> O/EtOH	11,39	355, 483, 635, 787, 671, 301, 169, 331, 469
extrato 14: MeOH/AcOEt	12,72	355, 301, 483, 635, 765, 469, 169, 331, 602, 669
extrato 15: Acetona/EtOH	13,54	355, 301, 483, 635, 785, 602, 469, 169, 331, 519, 669

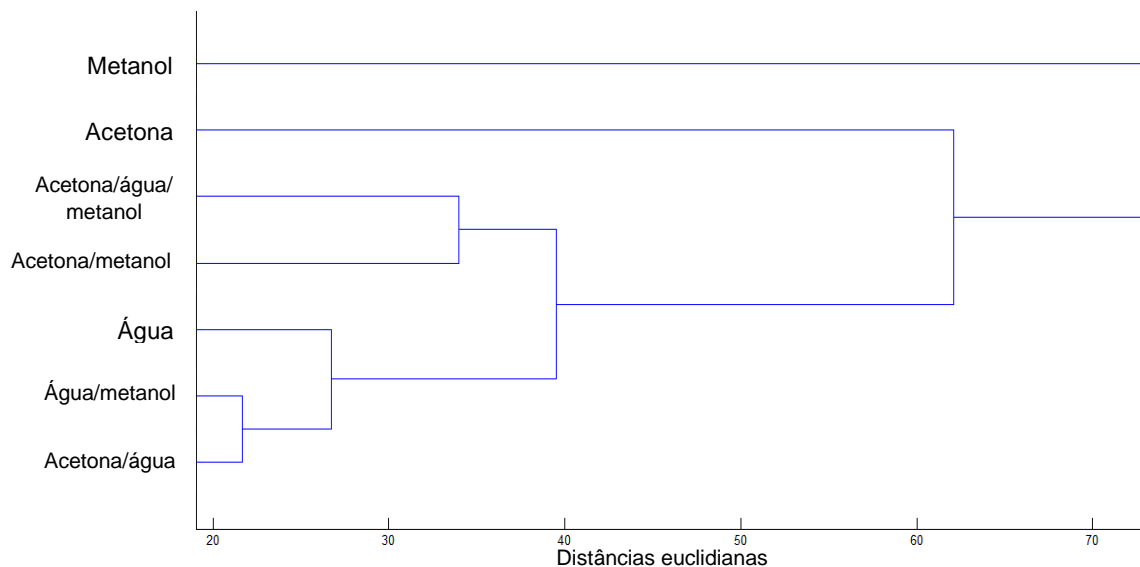
A análise dos espectros de EM revelou que 88 íons permaneceram após a eliminação dos 5% de íons menos intensos. Os espectros dos extratos de *C. villosum* obtidos por infusão direta encontram-se no apêndice para melhor visualização contendo seus principais íons apresentados na tabela acima.

A análise ACP foi obtida através da variação desses íons (Figura 22), e AH obtida através das distâncias euclidianas e da ligação média dos quatro primeiros componentes principais, cuja variação cumulativa representa 89,88% (Figura 23).

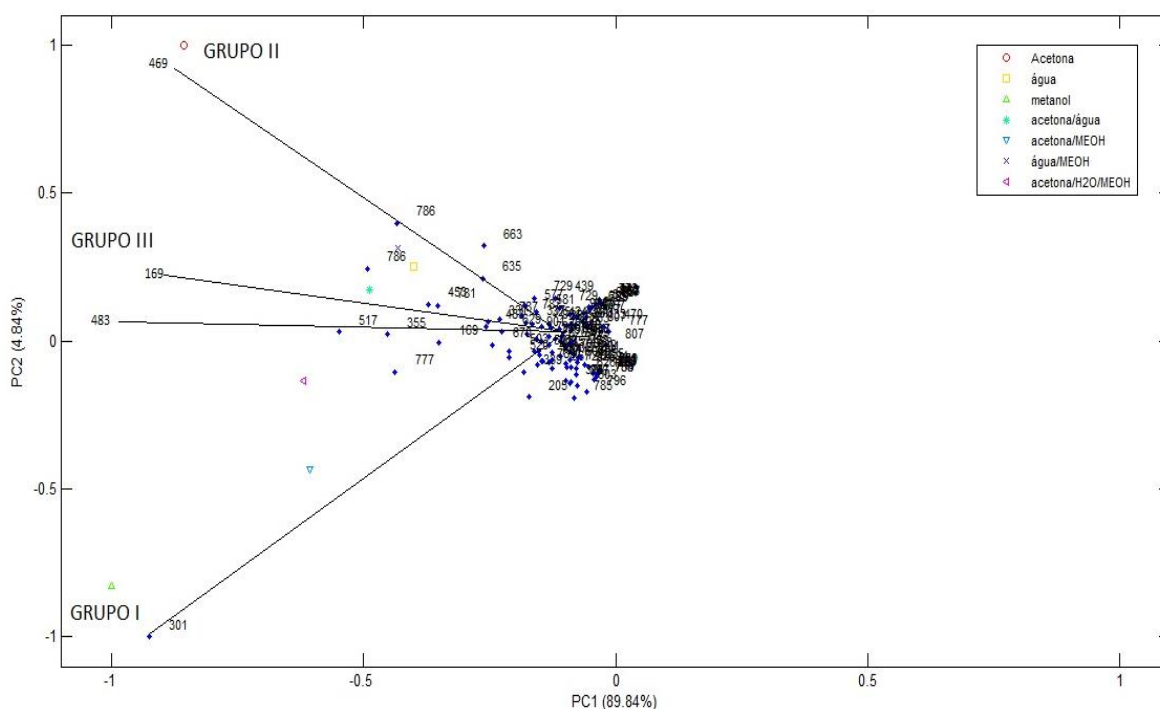
No gráfico do escore ACP, foram observados três grupos principais (Grupo I, II e III), destacando a presença de extratos à base de água nos grupos III (Figura 24), já o extrato acetona/metanol que mesmo não sendo a base de água se encontra no grupo III, se deve ao fato de que a concentração das substâncias encontradas nele, sejam semelhante as encontradas nos extratos a base de água. O dendrograma AH, confirmou claramente os mesmos três grupos da análise ACP e sugeriu que os extratos à base de água apresentam menor variabilidade química do que os demais extratos polares.



**Figura 22.** Gráfico obtido da Análise de Componentes Principais (ACP) dos extratos de *C. villosum*.



**Figura 23.** Dendrograma das amostras de *C. villosum* obtida pela Análise Hierárquica de Agrupamentos (AH).



**Figura 24.** Biplots da Análise de Componentes Principais (ACP).

De acordo com biplots da análise de componentes principais, os íons  $m/z$  169, 301, 469 e 483 foram os principais responsáveis pela segregação dos grupos I, II e III. Através dos espectros EM/EM desses íons, foi possível observar fragmentações chave descritas para íons com a mesma massa molecular para compostos fenólicos, descritos na tabela 10.

**Tabela 7.** Substâncias caracterizadas dos extratos de *Caryocar villosum*.

Substância	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	EM <sup>n</sup>	Referência
<b>(1)</b> ácido gálico	169,01	151, 125	[1] [2] [3] [4] [5] [6] [7]
<b>(2)</b> ácido elágico	301,01	257, 229, 185	[4] [5] [6] [7]
<b>(3)</b> ácido elágico ramnosídeo	447,00	301,300	[11] [12] [13]
<b>(4)</b> lactona do ácido vanolécico	469,00	301, 300, 299	[11]
<b>(5)</b> 3,6-di- <i>O</i> -galoil- <i>D</i> -glicose	483,07	465, 331, 313, 271, 211, 169	[2] [4] [6] [8]
<b>(6)</b> 3,4,6-tri- <i>O</i> -Galoil- <i>D</i> -glicose	635,10*	635, 483, 465, 447, 423, 405, 295, 223, 211	[2] [4] [8] [9]
<b>(7)</b> 1,2,3,6-tetra- <i>O</i> -Galoil- $\beta$ - <i>D</i> -glicose	787,09*	635, 617, 483, 447, 313	[2] [4] [8] [10]

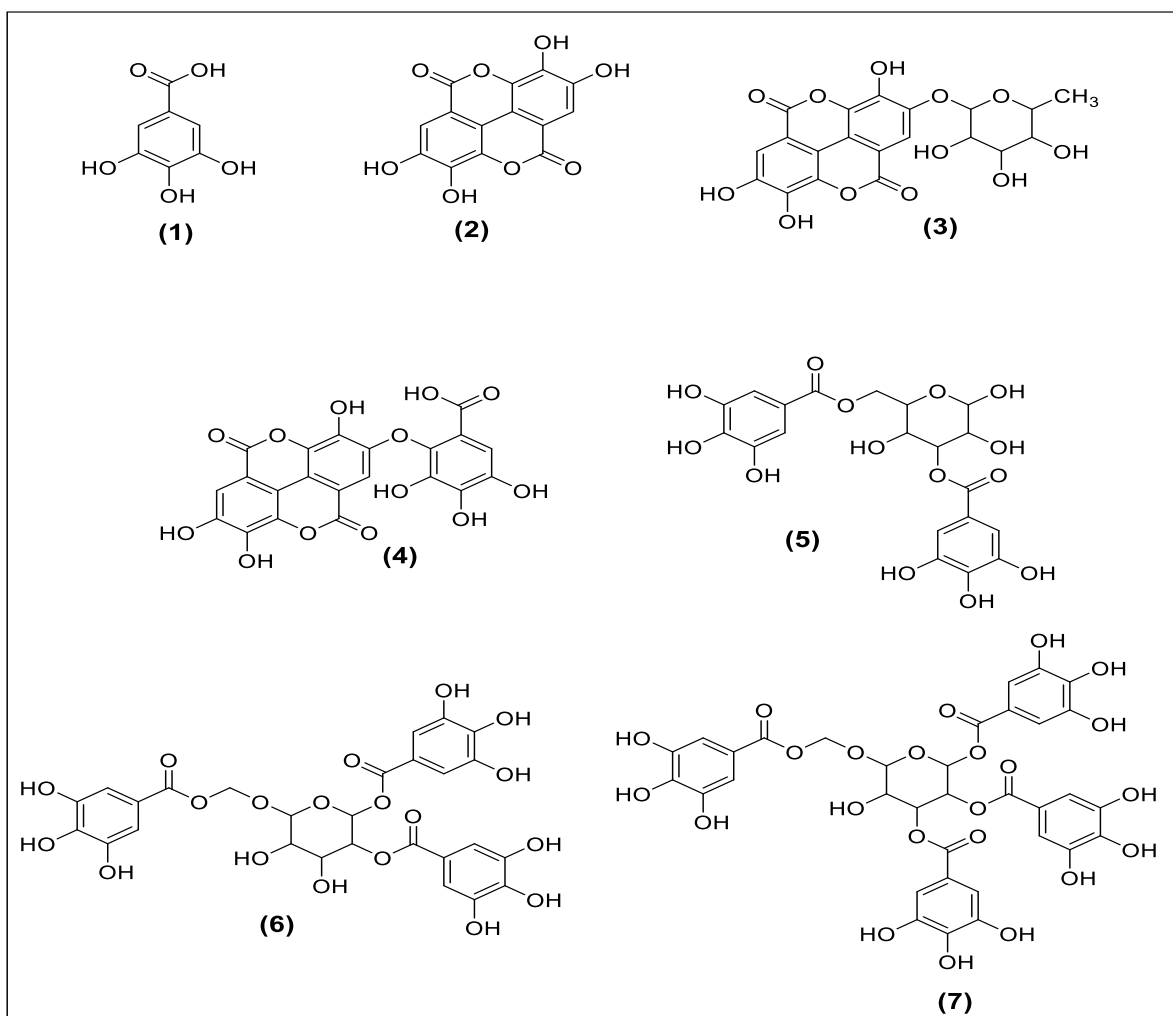
[1] SILVA *et al.*, 2011, [2] SINGH *et al.*, 2016, [3] MENA *et al.*, 2012, [4] WYREPKOWSKI *et al.*, 2014, [5] LEE, JOHNSON e TALCOTT, 2005; [6] FATHONI *et al.*, 2017; [7] YISIMAYILI *et al.*, 2018; [8] TAN, LING e CHUAH, 2011; [9] GAN *et al.*, 2018; [10] BERARDINI, CARLE e SCHIEBER, 2004; [11] SILVA *et al.*, 2019; [12] MACIEL, 2018; [13] ROMERO *et al.*, 2008.

O íon desprotonado em *m/z* 169 exibiu dois fragmentos principais em *m/z* 151 e 125, consistentes com a estrutura do ácido gálico **(1)** (SILVA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2016). Enquanto o íon em *m/z* 301 apresentou fragmentos em *m/z* 257, 229 e 185, com base nos estudos comparativos foi possível identificar que os íons fragmentados são característicos do composto ácido elágico **(2)** (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014, LEE, JOHNSON e TALCOTT, 2005).

Os espectros de EM dos íons desprotonados em *m/z* 447 apresentam fragmentos em *m/z* 300 e 301, sendo esses fragmentos-chave previamente relatados ao ácido elágico ramnosídeo **(3)** (SILVA *et al.*, 2019), um derivado do ácido elágico. O íon desprotonado *m/z* 469 apresentam fragmentos em *m/z* 300, 301 e 299, sendo esses fragmentos-chave previamente relatados à dilactona do ácido valônico **(4)** (SILVA *et al.*, 2019). O íon desprotonado em *m/z* 483 apresentou diversos fragmentos em 465, 331, 313, 271, 211, 169, sendo possível identificar como a substância 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose **(5)** (FATHONI *et al.*, 2017; TAN, LING e CHUAH, 2011). Portanto, a análise multivariada apontou o ácido gálico e o 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose, como componentes importantes nos extratos à base de água. Enquanto foi observada principalmente a dilactona do ácido valônico acetona pura. Além disso, o ácido elágico foi destacado no extrato puro de metanol. Além disso,

mais duas substâncias, o 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose **(6)** e 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose **(7)**, presentes no extrato metanólico. O extrato à base de metanol foi destacado como o mais representativo para os compostos fenólicos.

Com base na análise quimiométrica pelo método do triângulo de Snyder foram selecionados somente os extratos do primeiro triângulo para análise MS/MS (fragmentação). Os íons presentes nas amostras foram selecionados por meio da análise qualitativa dos íons das amostras do primeiro grupo de extratos que compõe o triângulo 1, e também submetidos para a caracterização com base no padrão de fragmentação das substâncias de *C. villosum* com os dados da literatura como mostra a tabela a seguir.

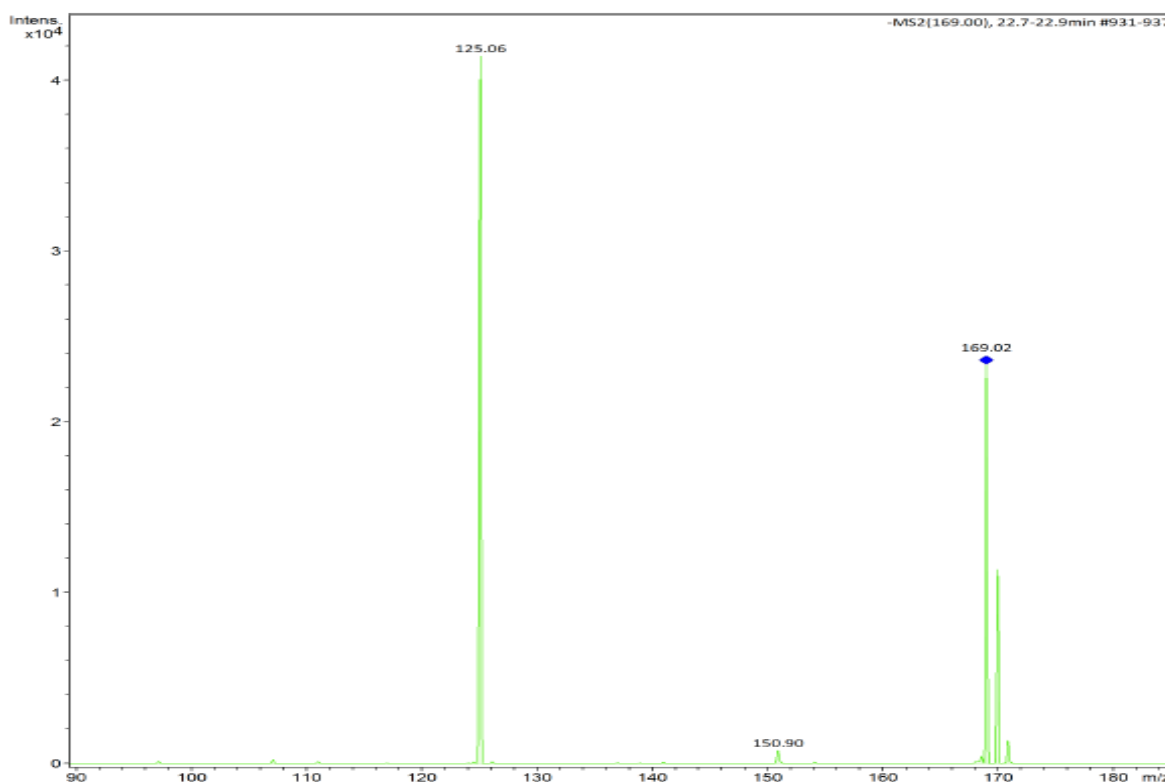


**Figura 25.** Estruturas das substâncias fenólicas presentes nas cascas do caule de *C. villosum*; ácido gálico **(1)**, ácido elágico **(2)**, ácido elágico ramosídeo**(3)**, dilactona do ácido valônico **(4)**, 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose **(5)**, 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose **(6)**, 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose **(7)**.

Com base na análise quimiométrica pelo método do triângulo de Snyder foram selecionados somente os extratos do primeiro triângulo para análise EM/EM (fragmentação). Os íons presentes nas amostras foram selecionados por meio da análise qualitativa dos íons das amostras do primeiro grupo de extratos que compõe o triângulo 1, e também submetidos para a caracterização com base no padrão de fragmentação das substâncias de *C. villosum* com os dados da literatura como mostra a tabela a seguir.

5.2.1. Caracterização baseada na fragmentação para o ácido gálico (substância 1).

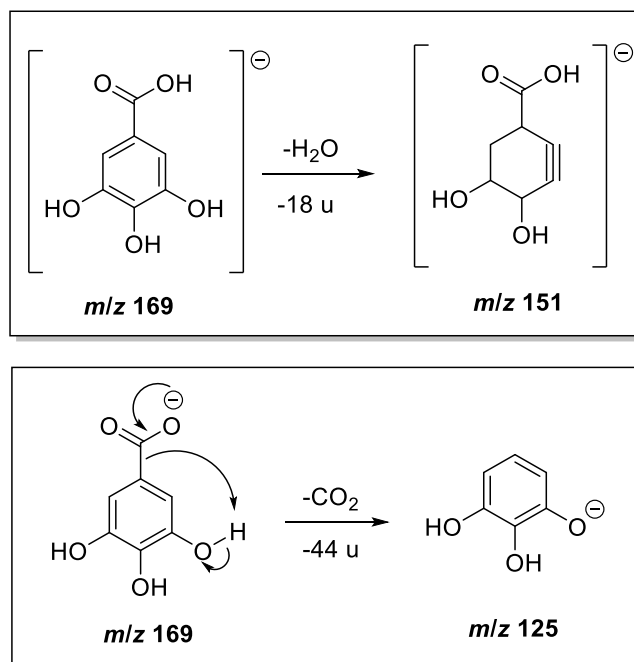
Por meio da fragmentação do íon precursor de  $m/z$  169 foi possível obter dois fragmentos, um em  $m/z$  125 e 169  $[M - H]^-$  (Figura 26).



**Figura 26.** Espectro EM/EM do ácido gálico  $m/z$  169  $[M - H]^-$ .

Com base na perda de massa, o fragmento em  $m/z$  125  $[M - 44 - H]^-$  é resultante da perda de  $CO_2$  (Figura 27). A fragmentação decorrente da descarboxilação ocasionando a formação do pico base em  $m/z$  125  $[M - H]^-$  é característica exclusiva para o ácido gálico. Desta forma caracterizou-se a

substância 1 com íon precursor de  $m/z$  169  $[M - H]^-$ , como sendo o ácido gálico (FANTHONI *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016; MENA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011). Embora menos frequente, a fragmentação em  $m/z$  151  $[M - H]^-$  é referente a perda de massa 18 u (perda de água), contribuindo para caracterização da substância 1.



**Figura 27.** Proposta de fragmentação do ácido gálico (1)  $m/z$  169  $[M - H]^-$  (Adaptado de DEMARQUE *et al.*, 2016; FANTHONI *et al.*, 2017).

5.2.2. Caracterização baseada na fragmentação para o ácido elágico (substância 2).

O espectro do íon precursor de  $m/z$  301 (Figura 28) quando fragmentado sofre perda de massa  $m/z$  257  $[M - 44 - H]^-$  e  $283,9 \sim 284$   $[M - 18 - H]^-$ , resultante da perda de  $CO_2$  e água respectivamente. O pico base formado em  $m/z$  229  $[M - H]^-$  é gerado por uma descarboxilação (-44 u) seguida da perda de CO (-28 u) (YISIMAYILI *et al.*, 2018; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). Além disso, a perda demais um grupo CO, forma o fragmento em  $m/z$  201  $[M - H]^-$  (YISIMAYILI *et al.*, 2018). O fragmento em  $m/z$  185  $[M - H]^-$  é referente a perda de dois grupos  $CO_2$  e um grupo CO (LINLIN *et al.*, 2014; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014) (Figura 29). Com base nos estudos comparativos foi possível identificar que os íons fragmentados são característicos do composto ácido elágico.



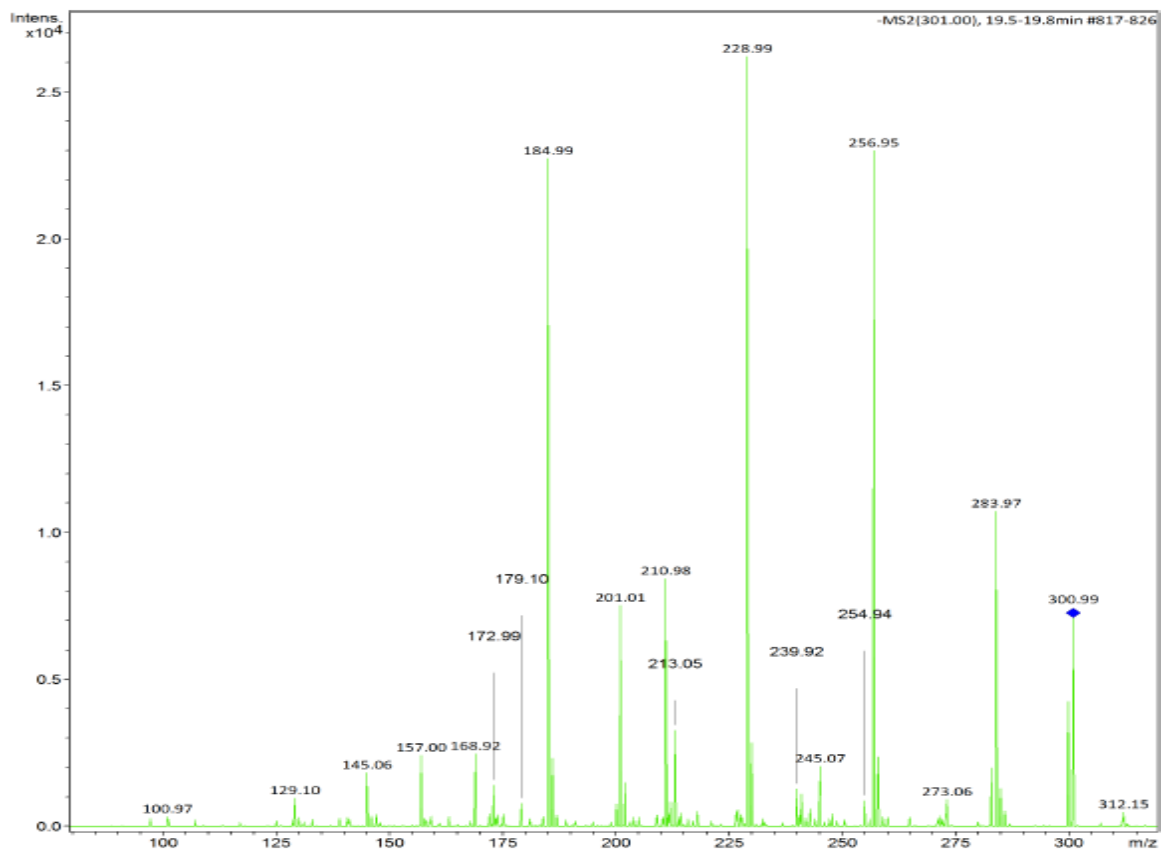


Figura 28. Espectro EM/EM do ácido elágico  $m/z$  301  $[M - H]^-$ .

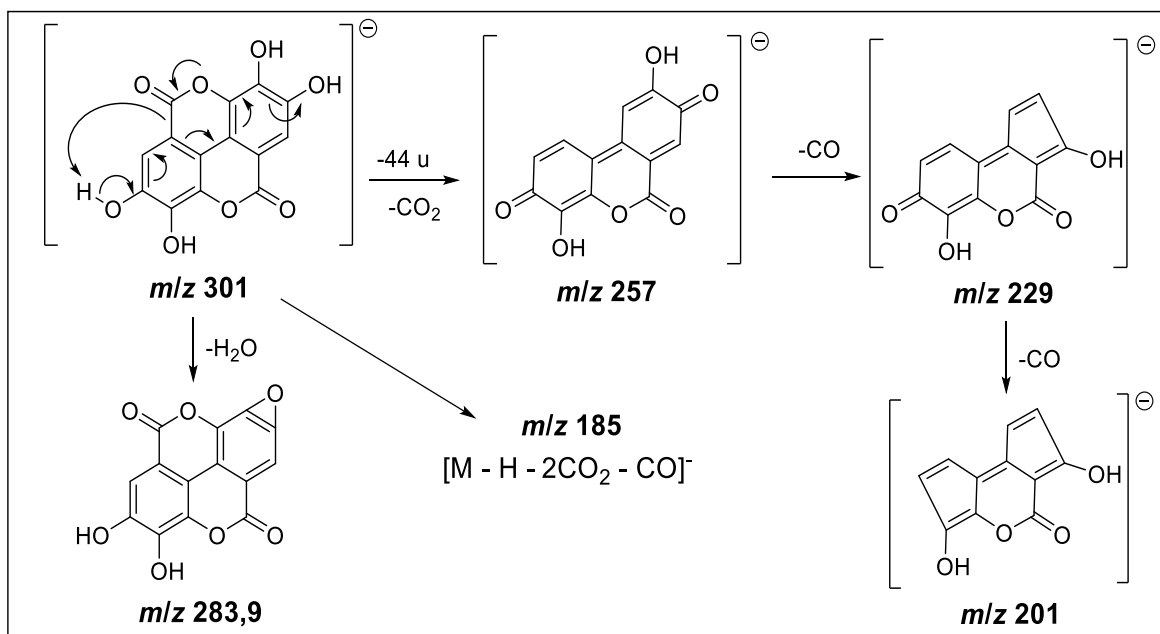


Figura 29. Proposta mecânica e demais fragmentos do ácido elágico (2) (Adaptado de YISIMAYILI *et al.*, 2018).

5.2.3. Caracterização baseada na fragmentação para o ácido elágico ramnosídeo (substância 3).

O íon precursor em  $m/z$  447 apresentou fragmentos em  $m/z$  300 e 301 (Figura 26). O pico base em  $m/z$  300  $[M - H]^-$  apresentou perda de massa de 146 u, equivalente a massa do ácido gálico.

xy\_02 #165-176 RT: 1,6-1,7 AV: 12 NL: 8,14E5  
-c ESI Full ms2 447,000 [50,000-449,000]

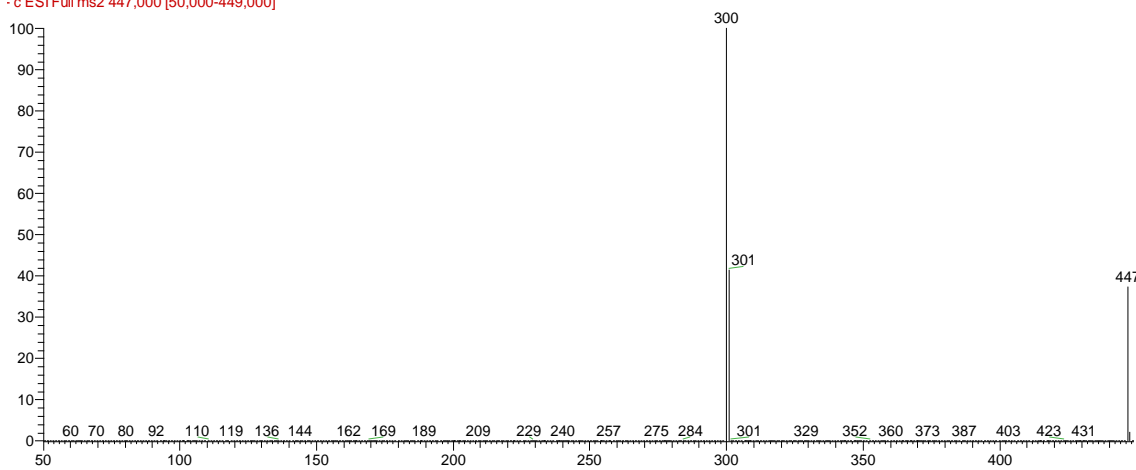


Figura 30. Espectro EM/EM da substância ácido elágico ramnosídeo 447  $[M - H]^-$ .

O estudo de SILVA e colaboradores (2019) realizou o estudo de fragmentação do íon em  $m/z$  447, constatando-se fragmentos principais em  $m/z$  300 e 301, sendo consistentes com os íons obtidos com a amostra de *C. villosum*. Desta forma, os dados indicaram que a substância 3 é ácido elágico ramnosídeo.

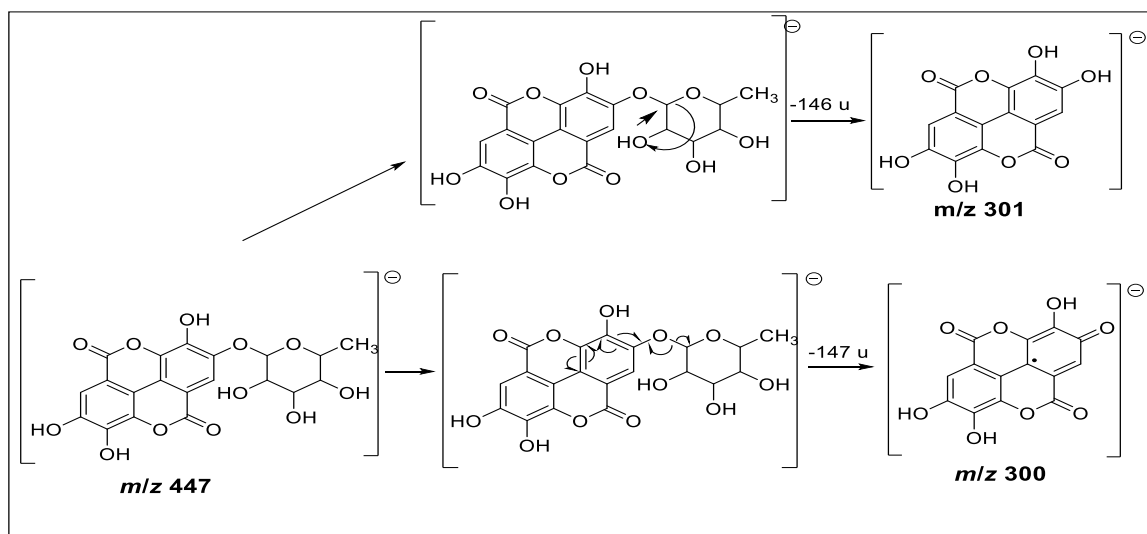


Figura 31. Proposta mecanística do íon  $m/z$  447 e demais fragmentos do ácido elágico ramnosídeo (3) (Adaptado de SILVA et al., 2019).

5.2.4. Caracterização baseada na fragmentação para a dilactona do ácido valônico (substância 4).

O íon precursor em  $m/z$  469 apresentou fragmentos em  $m/z$  299, 300 e 301 (Figura 28). O pico base em  $m/z$  300  $[M - H]^-$  apresentou perda de massa de 169 u, equivalente a massa do ácido gálico.

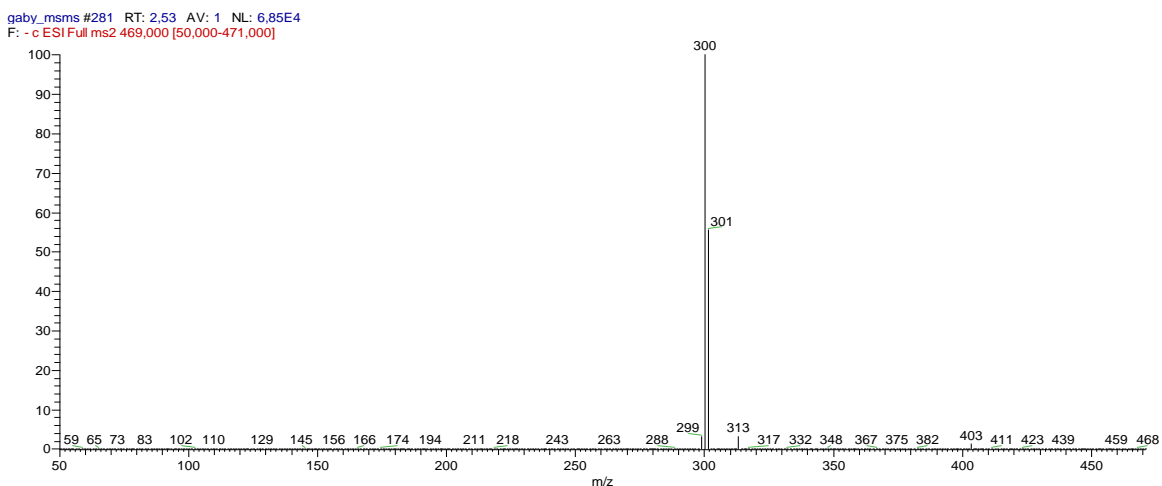


Figura 32. Espectro EM/EM da subst. dilactona do ácido valônico  $m/z$  469  $[M - H]^-$ .

O estudo de SILVA e colaboradores (2019) realizou a fragmentação do íon em  $m/z$  469, constatando-se fragmentos principais em  $m/z$  299, 300 e 301, sendo consistentes com os íons obtidos com a amostra de *C. villosum*. Desta forma, os dados indicaram que a substância 4 é a dilactona do ácido valônico.

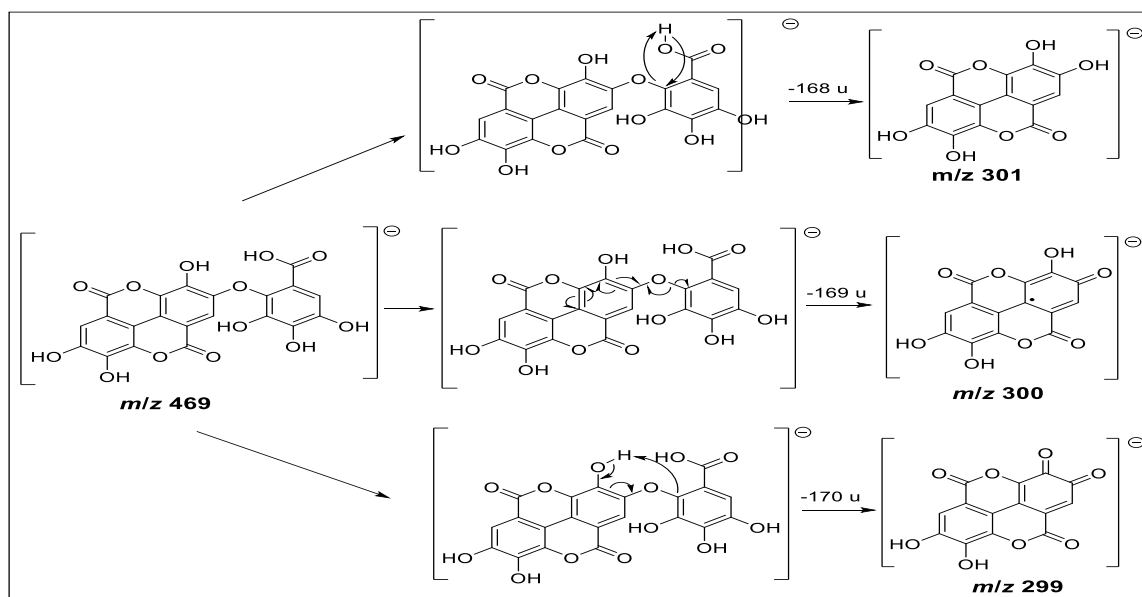
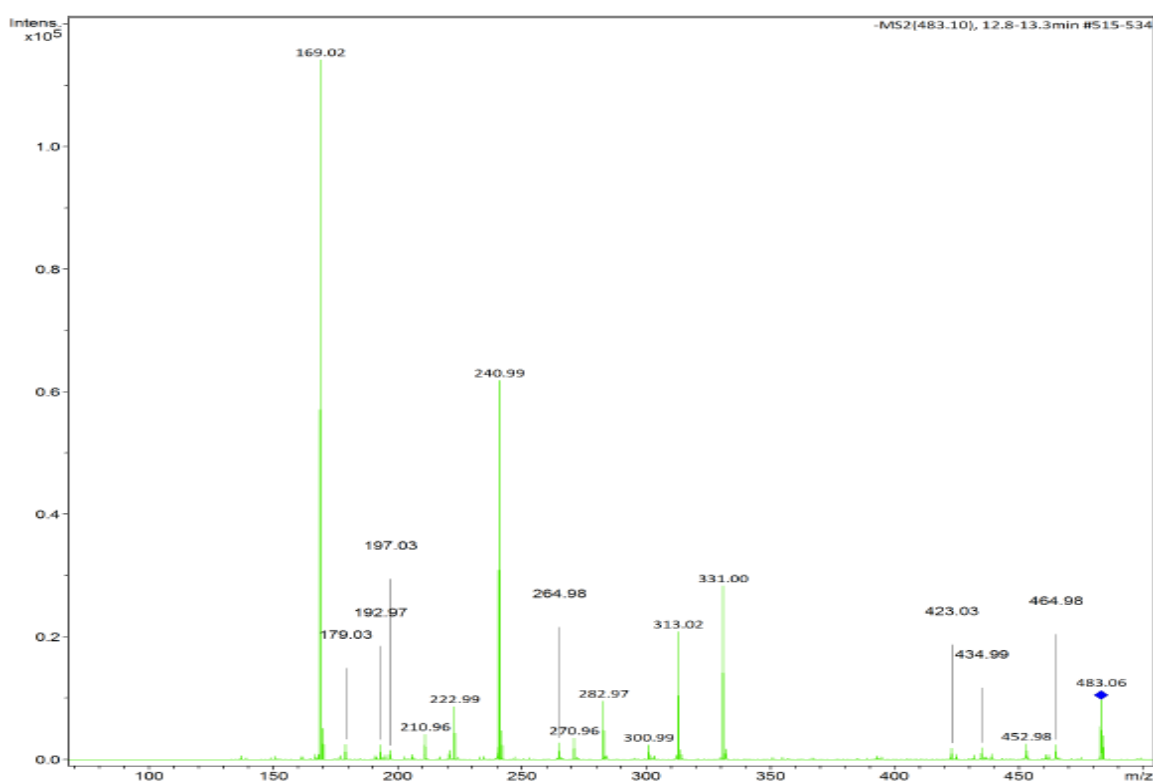


Figura 33. Proposta mecanística do íon  $m/z$  469 e demais fragmentos do ácido valônico de lactona (4) (Adaptado de SILVA *et al.*, 2019).

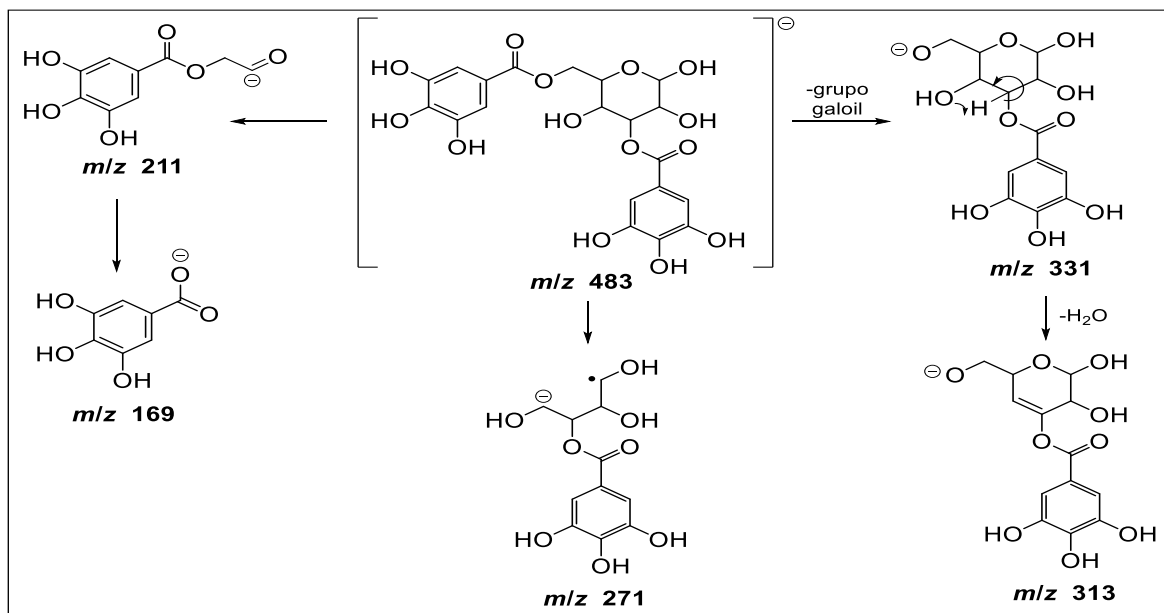
### 5.2.5. Caracterização baseada na fragmentação para o 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose (substância 5)

Através do estudo comparativo com o trabalho de Fanthoni e colaboradores (2017) foi possível observar os mesmos fragmentos ( $m/z$  331,313, 271, 211,169) oriundos do íon precursor de  $m/z$  483  $[M - H]^-$  que está presente no extrato da espécie estudada (Figura 34). Constatou-se a presença do fragmento em 313  $[M - H]^-$  proveniente da perda do grupo galoil e o fragmento em 464,98  $\sim$  465  $[M - 18 - H]^-$  indicativa de uma desidratação (Figura 35).

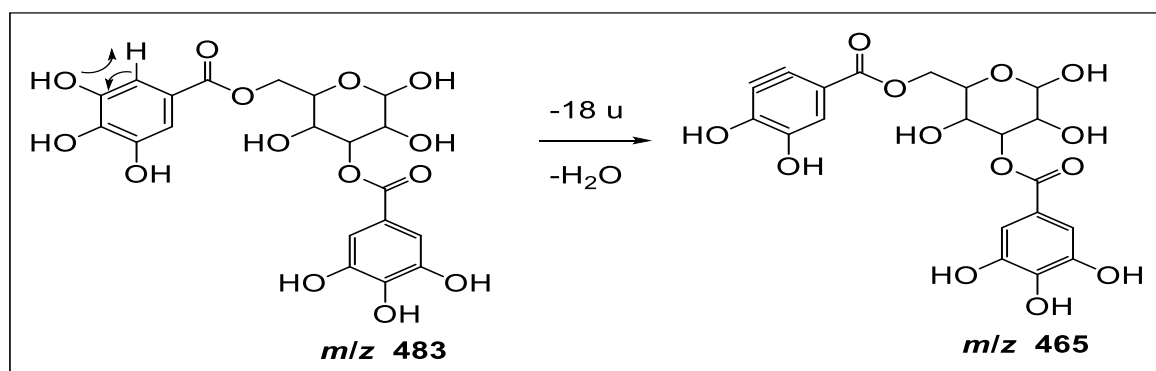


**Figura 34.** Espectro EM/EM do 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose  $m/z$  483  $[M - H]^-$ .

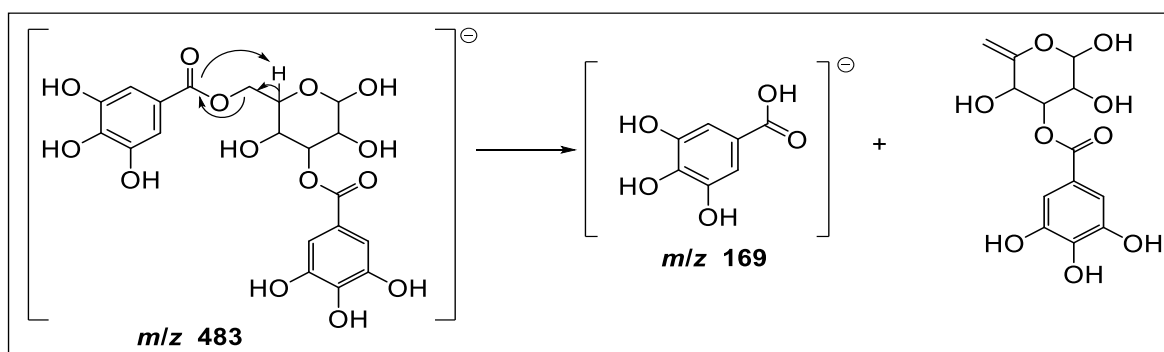
A formação do pico base em  $m/z$  169  $[M - H]^-$  é proveniente de um rearranjo do tipo McLafferty como pode ser visto na figura 36, sendo o fragmento referente ao íon galato. Outros estudos reforçam a caracterização desse íon (SINGH *et al.*, 2016; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014), sendo possível identificar como a substância 5 em 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose.



**Figura 35.** Proposta de fragmentação para 3,6-di-O-galoil-D-glicose (5) íon precursor  $m/z$  483  $[M - H]^-$  (Adaptado de FANTHONI *et al.*, 2017).



**Figura 36.** Proposta mecânica do fragmento em 465  $[M - H]^-$  da substância 5.



**Figura 37.** Proposta mecânica da formação do pico base em 169  $[M - H]^-$  proveniente de um rearranjo do tipo McLafferty (Adaptado de DEMARQUE *et al.*, 2016).

### 5.2.6. Caracterização baseada na fragmentação para o 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose (substância 6)

Com base no valor da massa e na classe de substâncias (fenólicos) foi possível excluir muitas substâncias e comparar com poucas descritas na literatura. O espectro da substância 4 apresentou íon precursor de  $m/z$  635  $[M - H]^-$  (Figura 38), quando submetido à fragmentação ocasiona a formação do pico base referente ao di-*O*-galoil-glicose ( $m/z$  483- $C_{20}H_{19}O_{14}$ ) com perda de 152 u, e subsequente perda de uma molécula de  $H_2O$   $[M-152-18-H]^-$ , gerando o fragmento em  $m/z$  465. O fragmento em 313  $[M - H]^-$  é proveniente de mais uma perda de massa 152 u, sendo o fragmento referente ao mono-*O*-galoil-glicose ( $m/z$  331 -  $C_{13}H_{16}O_{10}$ ) (GAN *et al.*, 2018). Os demais fragmentos referentes ao íon 635  $[M - H]^-$  são mostrados na figura 39.

A partir dos dados espectrométricos comparativos foi possível ter a similaridade dos fragmentos ( $EM^2$ ) em relação aos que compõe o íon precursor  $m/z$  635  $[M - H]^-$  presente na espécie estudada, sendo eles:  $m/z$  483, 465 (GAN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014; TAN, LING e CHUAH, 2011), 313 e 295 (GAN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; TAN, LING e CHUAH, 2011), 617 e 405 (TAN, LING e CHUAH, 2011). Com isso, foram estipuladas possibilidades para caracterizar essa substância, sendo isômeros do tri-*O*-galoil-*D*-glicose. Entretanto, o trabalho de Tan e colaboradores (2011) submeteu os íons ao estágio  $EM^3$  de fragmentação e apresentaram íons em comum que estão presentes na espécie alvo desse estudo, sendo eles:  $m/z$  423, 331 e 421. Dessa forma foram excluídos dois isômeros presentes no estudo comparativo (TAN, LING e CHUAH, 2011) e a substância 6 foi caracterizada como o terceiro isômero, o 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose.

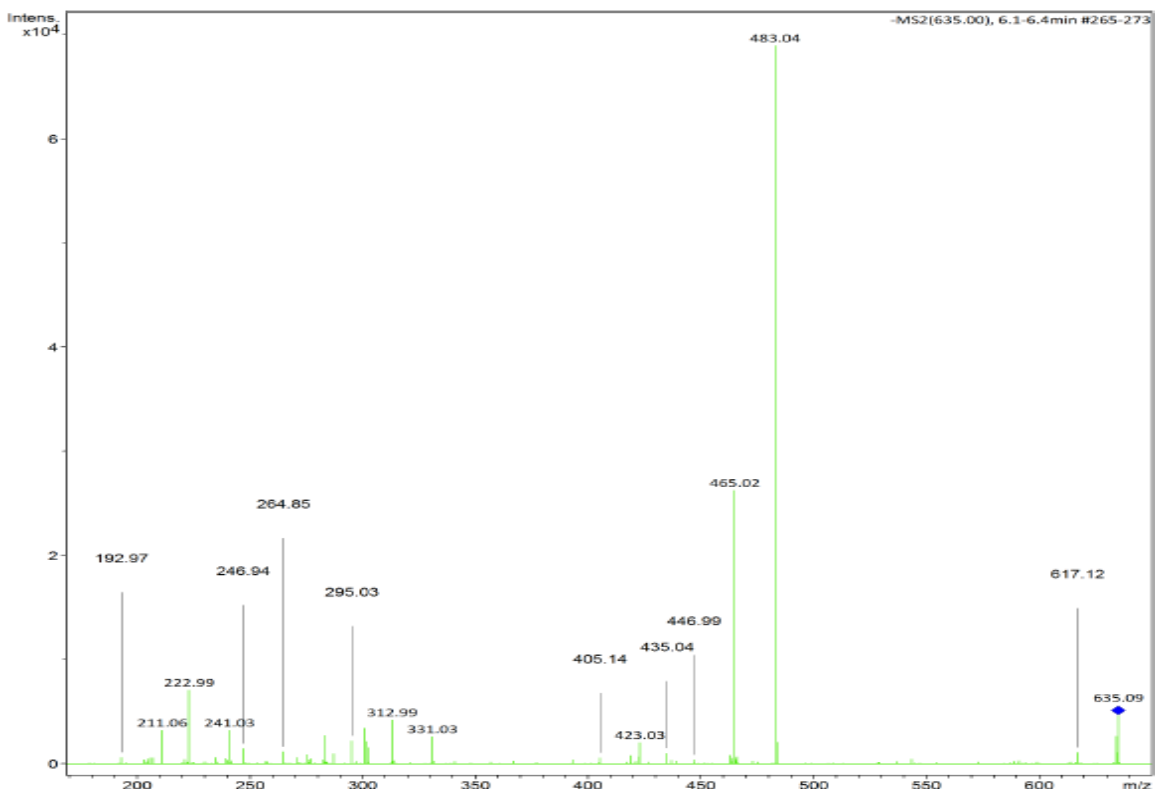


Figura 38. Espectro EM/EM 3,4,6-tri-O-galoil-D-glicose  $m/z$  635  $[M - H]^-$ .

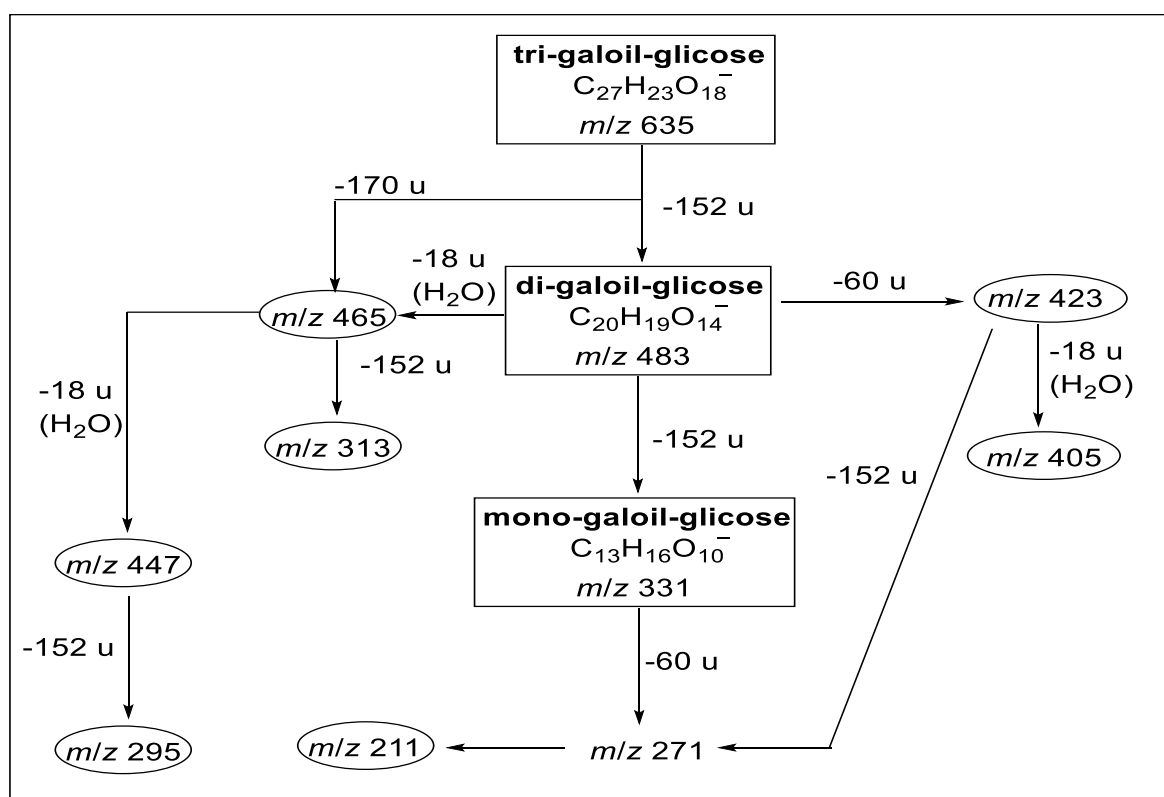
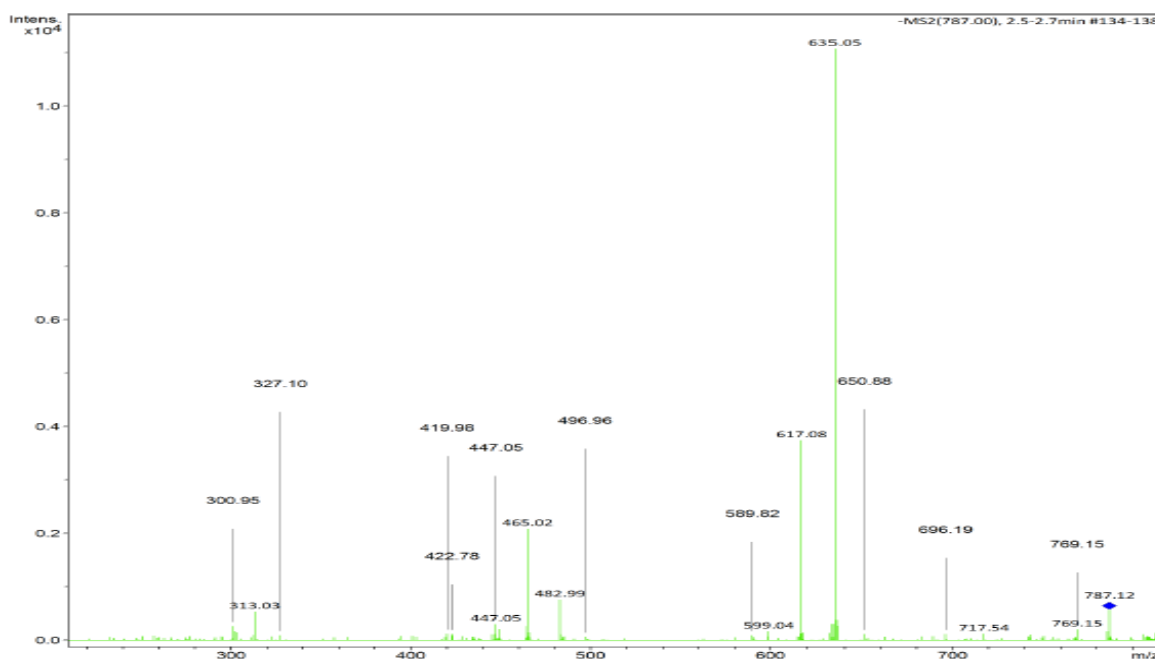


Figura 39. Fluxograma mostrando as fragmentações do 3,4,6-tri-O-galoil-D-glicose (6) íon precursor  $m/z$  465  $[M - H]^-$  (Adaptado de TAN, LING e CHUAH, 2011)

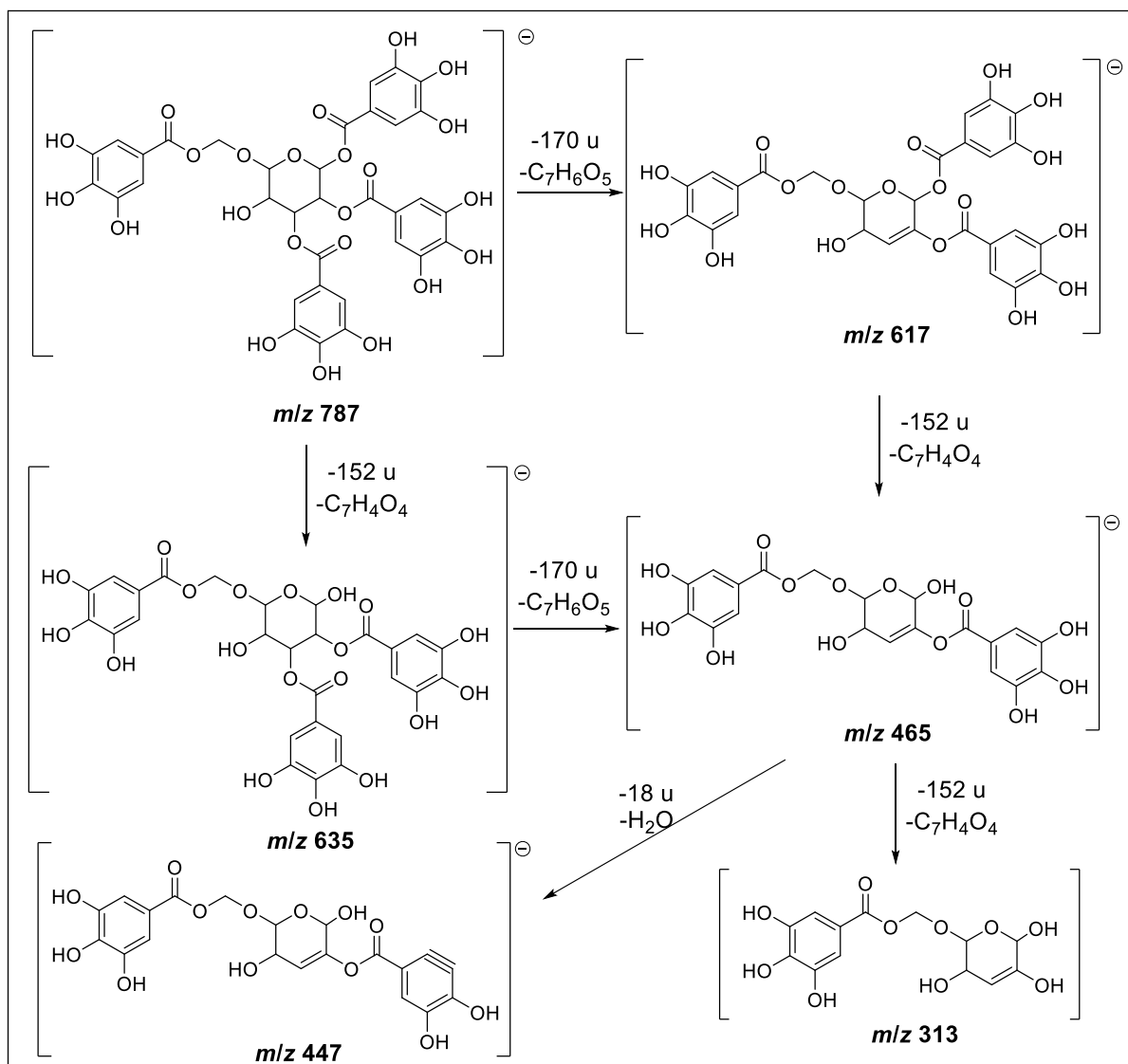
### 5.2.7. Caracterização baseada na fragmentação do 1,2,3,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (substância 7).

Na fragmentação do íon precursor em  $m/z$  787  $[M - H]^-$  observou-se o pico base em 635  $[M - H]^-$  possivelmente proveniente da perda de 152 de massa equivalente a eliminação do grupo  $C_7H_4O_4$ . Possivelmente a perda desse grupo esteja relacionado com a formação de um tri-galoil-glicose (YISIMAYILI *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014; TAN, LING e CHUAH, 2011; BERARDINI, CARLE e SCHIEBER, 2004) e o fragmento em 483  $[M - H]^-$  é referente ao di-galoil-glicose (TAN, LING e CHUAH, 2011; BERARDINI, CARLE e SCHIEBER, 2004). Além disso, os fragmentos gerados do íon em 635  $[M - H]^-$  indicam que é tri-galoil-glicose, através da presença dos mesmo fragmento obtidos da substância caracterizada anteriormente (composto 5), sendo o  $m/z$  483 -  $C_{20}H_{19}O_{14}$  referente ao di-O-galoil-glicose com perda de 152 u, e subsequente mais uma perda de 152 u, sendo o fragmento referente ao mono-O-galoil-glicose ( $m/z$  331 -  $C_{13}H_{16}O_{10}$ ) (GAN *et al.*, 2018; YISIMAYILI *et al.*, 2018; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014; BERARDINI, CARLE e SCHIEBER, 2004). O fragmento em  $m/z$  617 é comprovado em alguns trabalhos sendo originado pela perda de -170 u ( $-C_7H_6O_5$ ) (YISIMAYILI *et al.*, 2018; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). A figura 41 explana alguns fragmentos principais para a substância 7.



**Figura 40.** Espectro EM/EM do 1,2,3,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicose  $m/z$  787  $[M - H]^-$





**Figura 41.** Fragmentações do 1,2,3,6-tetra-O-galoil-β-D-glicose (**7**) íon precursor  $m/z$  787  $[M - H]^-$  (Adaptado de YISIMAYILI *et al.*, 2018; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014; TAN, LING e CHUAH, 2011).

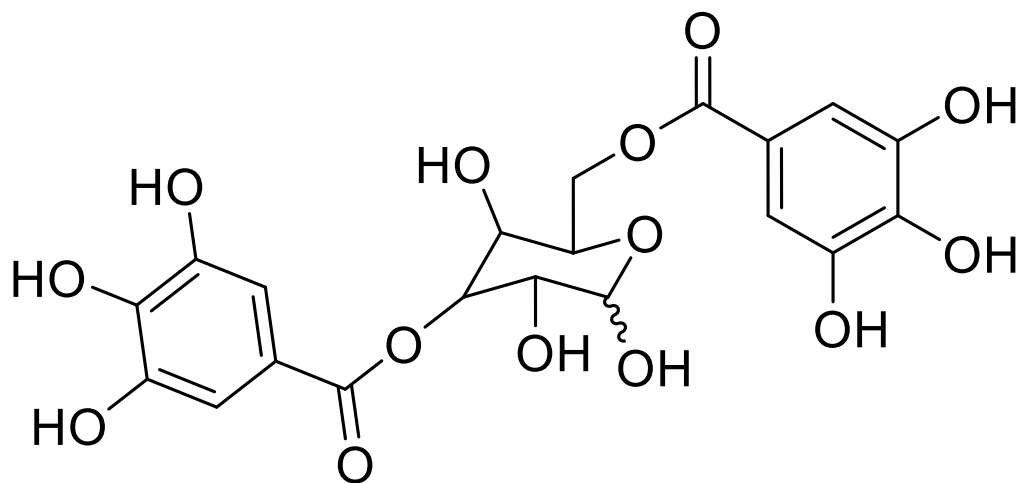
O trabalho de Berardini e colaboradores (2004), mostrou outros íons em comum com as que estão presentes no extrato de *C. villosum*. tais como, o 599, 483, 447 e 422 que enriquecem a caracterização para tal substância. Desta forma, com as contribuições dos estudos de fragmentação da literatura pode-se caracterizar a substância 7 em 1,2,3,6-tetra-O-galoil-β-D-glicose.

### 5.3. Extrato metanólico: Isolamento e análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Partindo da análise de rendimento (Teor extrativo) e análise quimiométrica, o extrato metanólico apresentou melhor CCD possível para ser analisada por CLAE, e assim foram testados os métodos para então ser fracionada por CLAE semipreparativo, o que foi possível coletar três substâncias nomeados de P1, P2 e P3.

#### 5.3.1. Substância P1.

A substância P1 (5,1 mg) foi obtida como um sólido com coloração levemente marrom, solúvel em metanol. Em análise de massas de alta resolução no modo negativo da substância, demonstrou a presença do pico de maior intensidade um pico proeminente  $[M-H]^-$  em  $m/z$  483, cuja fórmula molecular neutra mais provável seria  $C_{20}H_{20}O_{14}$ .

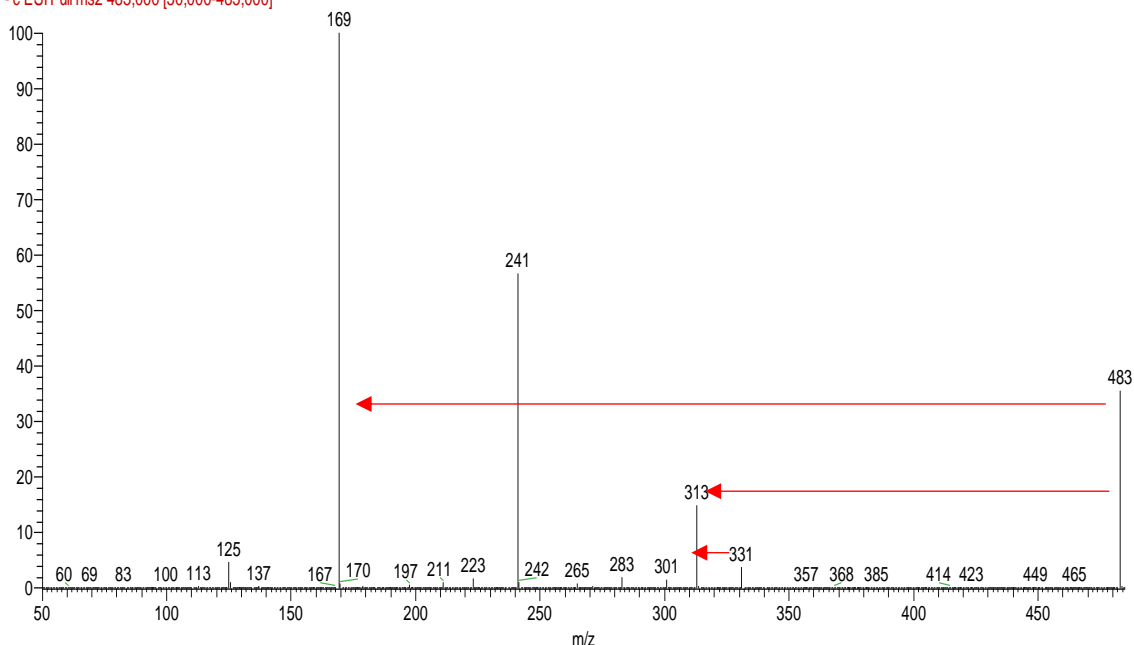


**Figura 42.** Estrutura sugerida para a P1(3,6-di-O-galoil-D-glicose) com base no íon de maior intensidade.

Este íon  $[M-H]^-$  483 foi submetido a fragmentação conforme demonstrado no espectro da Figura 43, onde foram observados a presença dos íons ( $m/z$  331,313 e 169) oriundos do íon precursor de  $m/z$  483  $[M - H]^-$  que já foi caracterizado e está presente no extrato da espécie estudada, discutido anteriormente, Constatou-se a presença do fragmento em  $331 M - H]^-$  referente a uma desidratação, um fragmento

em 313  $[M - H]^-$  proveniente da perda do grupo galoil e o fragmento em 169  $[M - H]^-$  referente ao íon galato. Estes fragmentos consistem em dois grupos de galoil e uma unidade de glicose (Figura 43).

gaby\_071130051023 #224-240 RT: 2,1-2,3 AV: 17 NL: 1,26E6  
F: -c ESI Full ms2 483,000 [50,000-485,000]



**Figura 43.** Fragmentação do íon  $[M-H]^-$  483 referente a substância P1.

O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 44, Tabela 11) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de uma mistura de  $\alpha$  e  $\beta$  anômeros. O RMN  $^1H$  exibiu dois sinais de prótons anoméricos de singletos em  $\delta H$  5,33 (s,1H,  $\alpha$ ) e  $\delta H$  5,25 (s,1H,  $\beta$ ), observou-se também outros sinais de hidrogênios ligados ao açúcar em  $\delta H$  3,68 (m,1H,  $\alpha$ ) e  $\delta H$  3,53 (d,1H,  $\beta$ ), um sinal em  $\delta H$  3,83 (m,1H,  $\alpha/\beta$ ), sinais em  $\delta H$  4,17 (m,1H,  $\alpha$ ) e  $\delta H$  4,51 (m,1H,  $\beta$ );  $\delta H$  4,28 (m,1H,  $\alpha$ ) e  $\delta H$  3,9 (d, 1H, 7,52 Hz,  $\beta$ ), como também os sinais em  $\delta H$  4,43 (s,2H,  $\alpha/\beta$ ) relativo aos hidrogênios metilênicos.

Observou-se também o sinal de singletos em  $\delta H$  7,08 (s,4H,  $\alpha$ ) e  $\delta H$  7,11 (s,4H,  $\beta$ ), atribuíveis a dois grupos galoil, hidrogênios aromáticos.

A integração dos sinais no espectro de RMN  $^1H$  indicou a presença desses sinais de hidrogênios e seus deslocamentos característicos relativos ao açúcar e grupos galoil (HE et al, 2002; TAN, 2012).

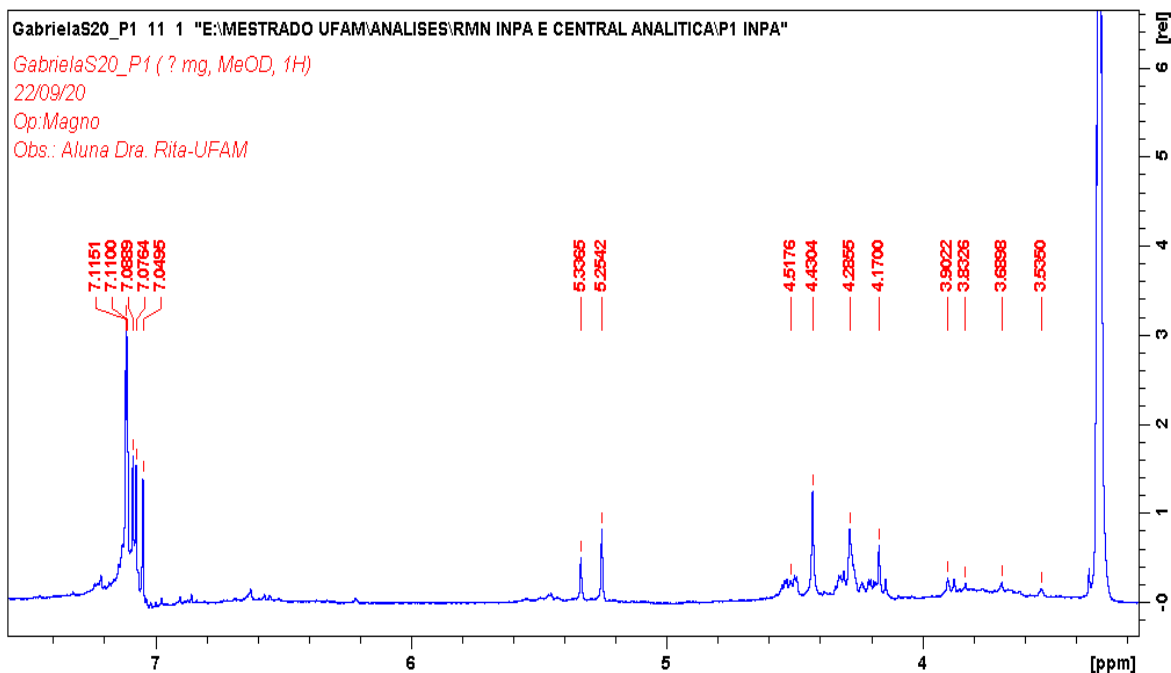


Figura 44. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da P1.

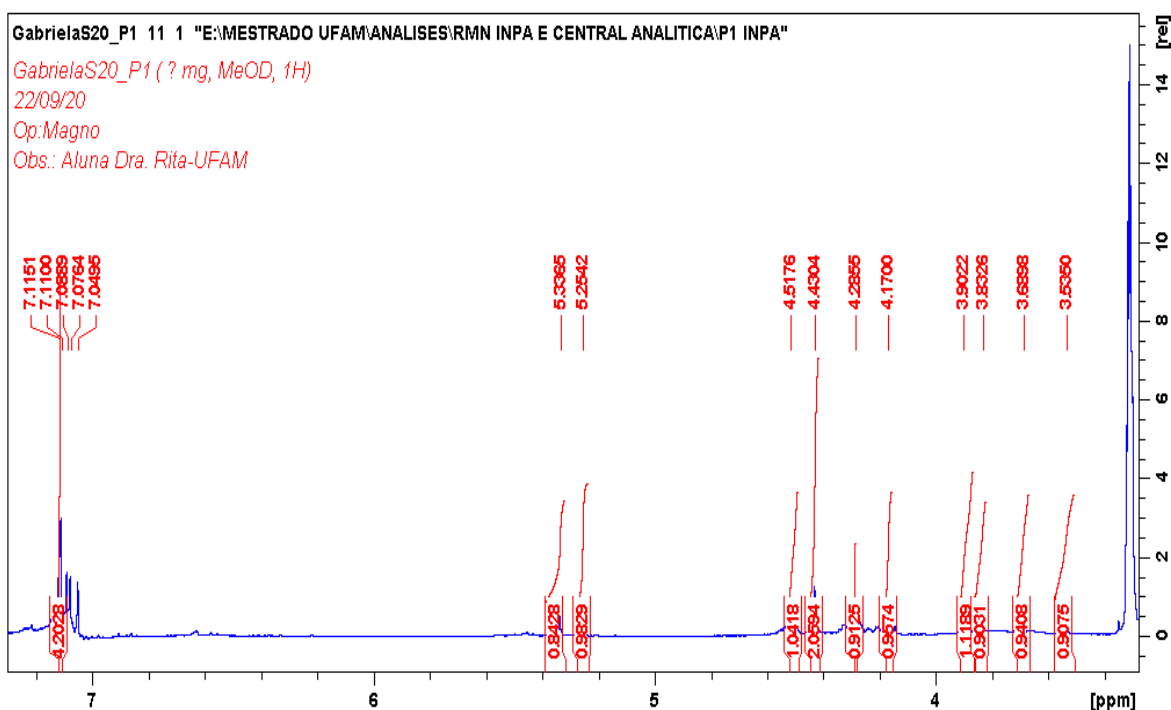
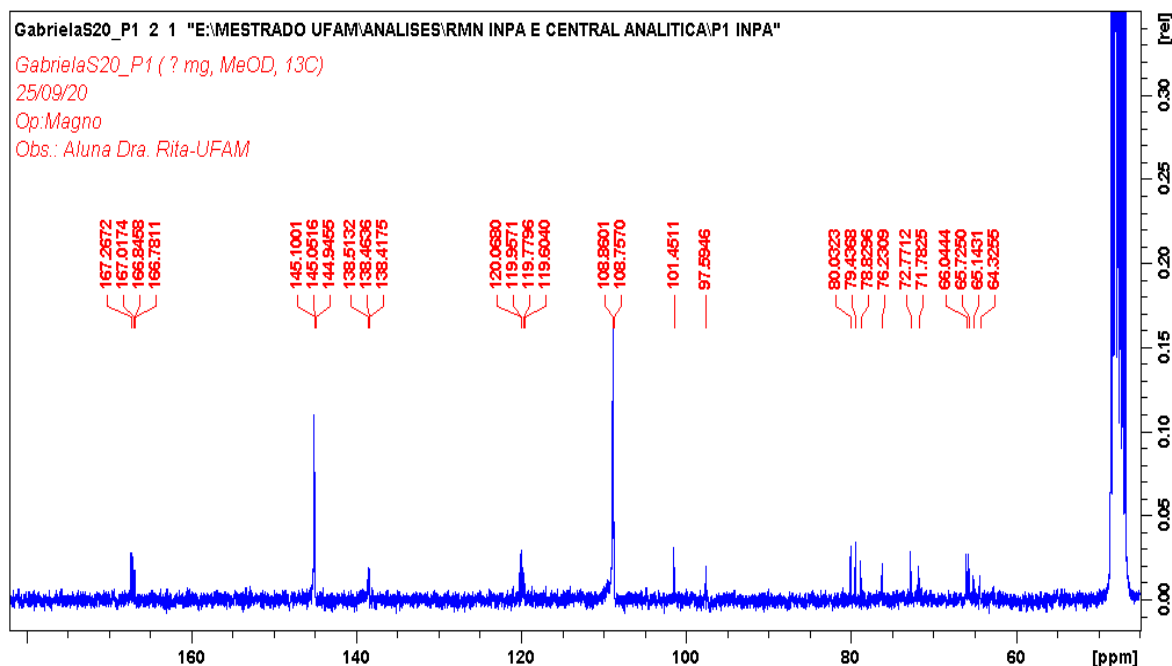


Figura 45. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da P1 com integrais dos hidrogênios.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 46, Tabela 11) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de dois sinais de carbono anomérico em  $\delta_c$  97,7  $\alpha$  e  $\delta_c$  101,4  $\beta$  indicaram que o composto P1 estava presente em uma mistura de anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ . Além de sinais em  $\delta_c$  78,8  $\alpha$  e 80,0  $\beta$ ;  $\delta_c$  72,7

$\alpha/ \beta$ ;  $\delta_c$  71,7  $\alpha$  e 76,2  $\beta$  ;  $\delta_c$  79,9  $\alpha/ \beta$ , inclusive sinais em  $\delta_c$  66,0  $\alpha$  e 65,1  $\beta$  na região do carbono metilênico todos correspondentes aos carbonos do açúcar,.

Sinais típicos de aromáticos em  $\delta_c$  119,8  $\alpha$  e 120,0  $\beta$ ;  $\delta_c$  108,7  $\alpha$  e 108,8  $\beta$ ;  $\delta_c$  138,4  $\alpha$  e 138,5  $\beta$ , como também sinais na região que compreende os carbonos aromáticos oxigenados em  $\delta_c$  145,0  $\alpha$  e 145  $\beta$ . Além de um sinal  $\delta_c$  166,8  $\alpha$  e  $\delta_c$  167,2  $\beta$  atribuído a carbono carbonila (Q. HE et al, 2002; TAN, 2012).



**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da P1.

O espectro bidimensional HSQC da P1 (Figura 47, tabela 11) mostra as correlações observadas entre  $\delta_H$  7,08 com  $\delta_C$  108,7  $\alpha$ , o  $\delta_H$  7,11 com  $\delta_C$  108,8  $\beta$  que são atribuídas às ligações terciárias de anéis aromáticos. Observou-se também as correlações entre  $\delta_H$  5,33 e  $\delta_C$  97,5 (C-1  $\alpha$ );  $\delta_H$  5,25 e  $\delta_C$  101,4 (C-1  $\beta$ ), confirmando a presença dos carbonos anoméricos e suas correlações com seus respectivos hidrogênios. Outras unidades também pode ser observadas com os sinais característicos do açúcar em  $\delta_H$  4,17  $\alpha$  /  $\delta_H$  4,51  $\beta$  com  $\delta_C$  72,5 (C-3  $\alpha/\beta$ );  $\delta_H$  3,83  $\alpha$  com  $\delta_C$  71,7 (C-4  $\alpha$ );  $\delta_H$  4,28  $\alpha$  /  $\delta_H$  3,90  $\beta$  com  $\delta_C$  79,8 (C-5  $\alpha/\beta$ ); ;  $\delta_H$  4,4  $\alpha$  com  $\delta_C$  66,0 (C-6  $\alpha$ ), característicos de açúcares.

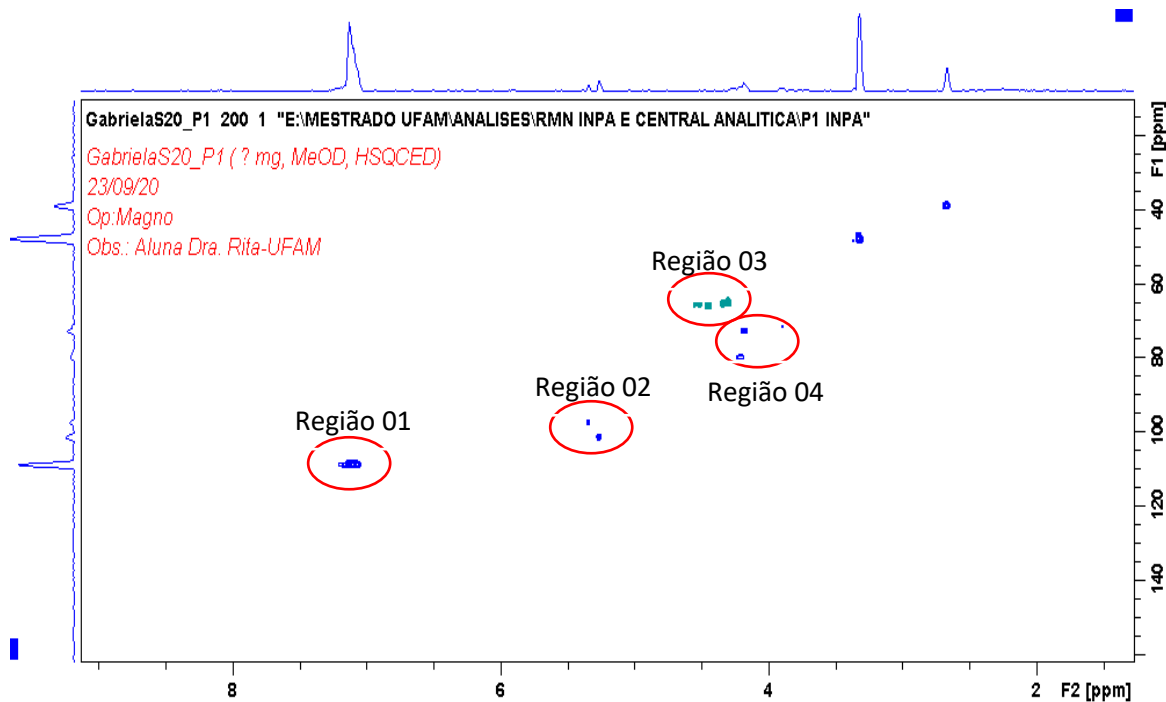


Figura 47. Espectro de HSQC  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  da substância P1.

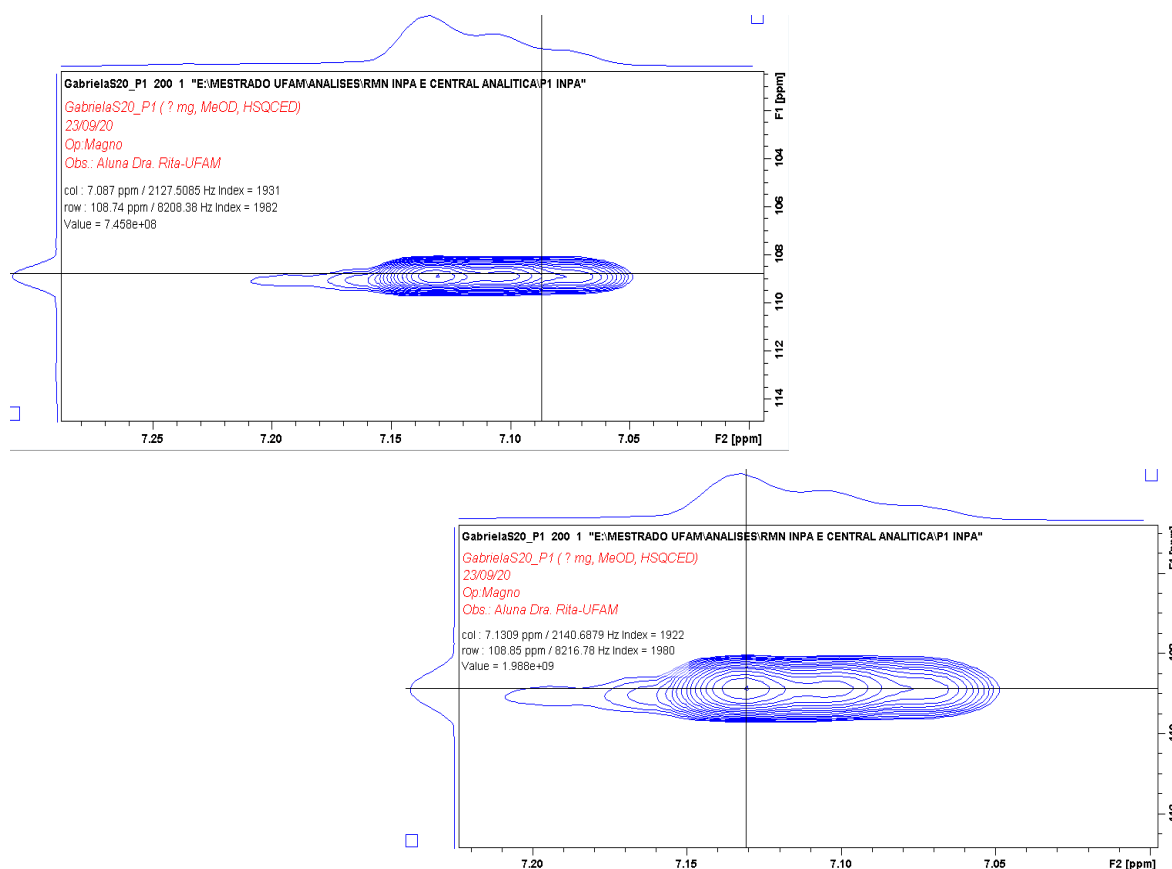


Figura 48. Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 01.

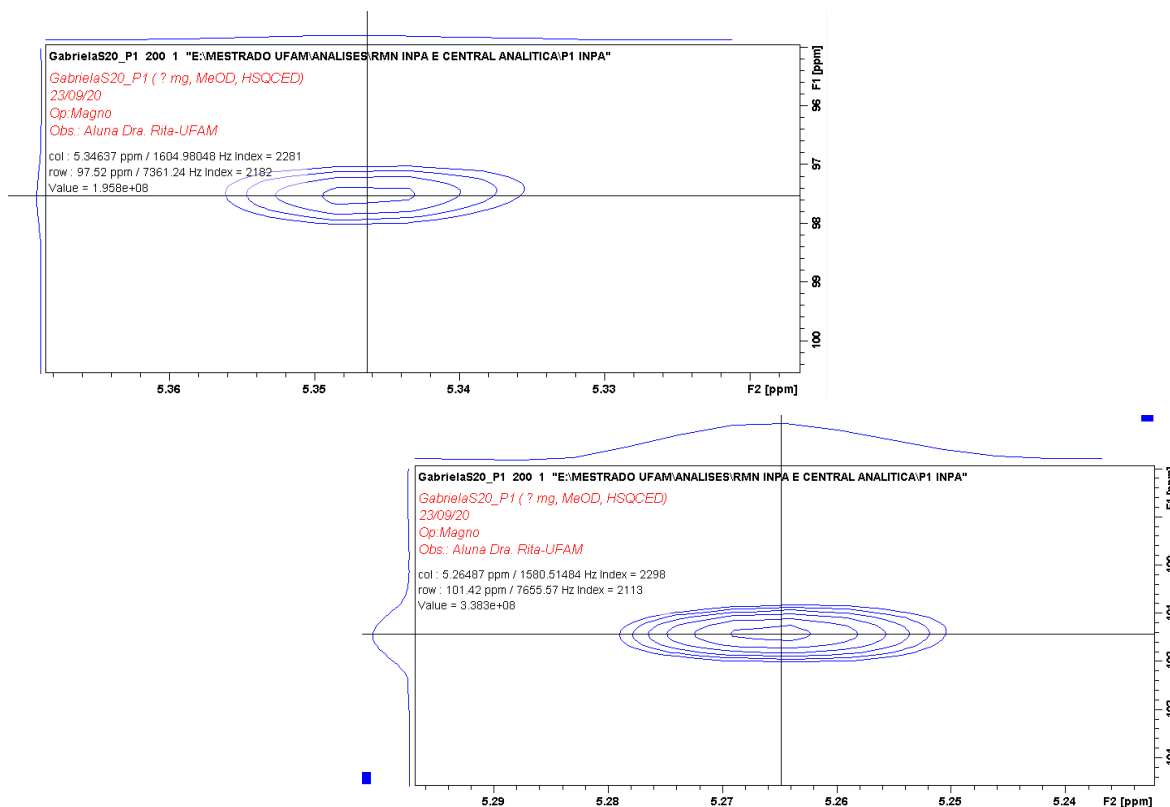


Figura 49. Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 02.

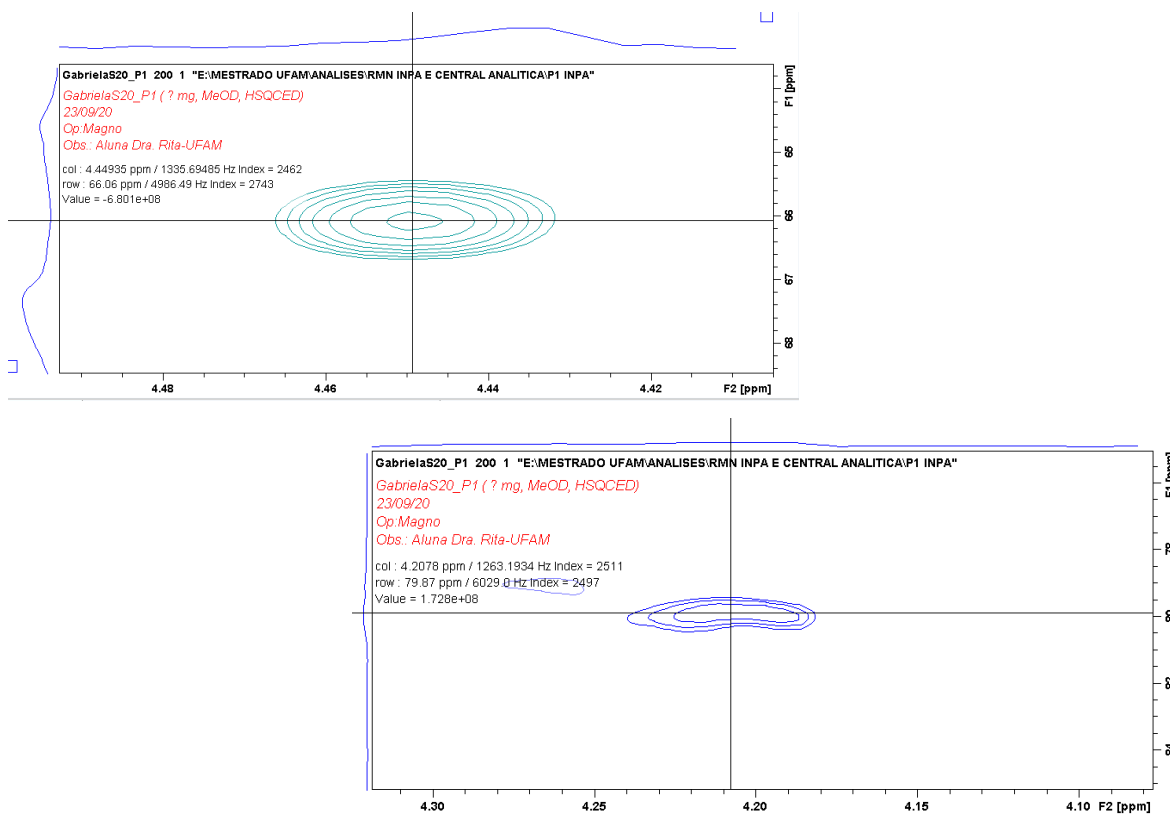
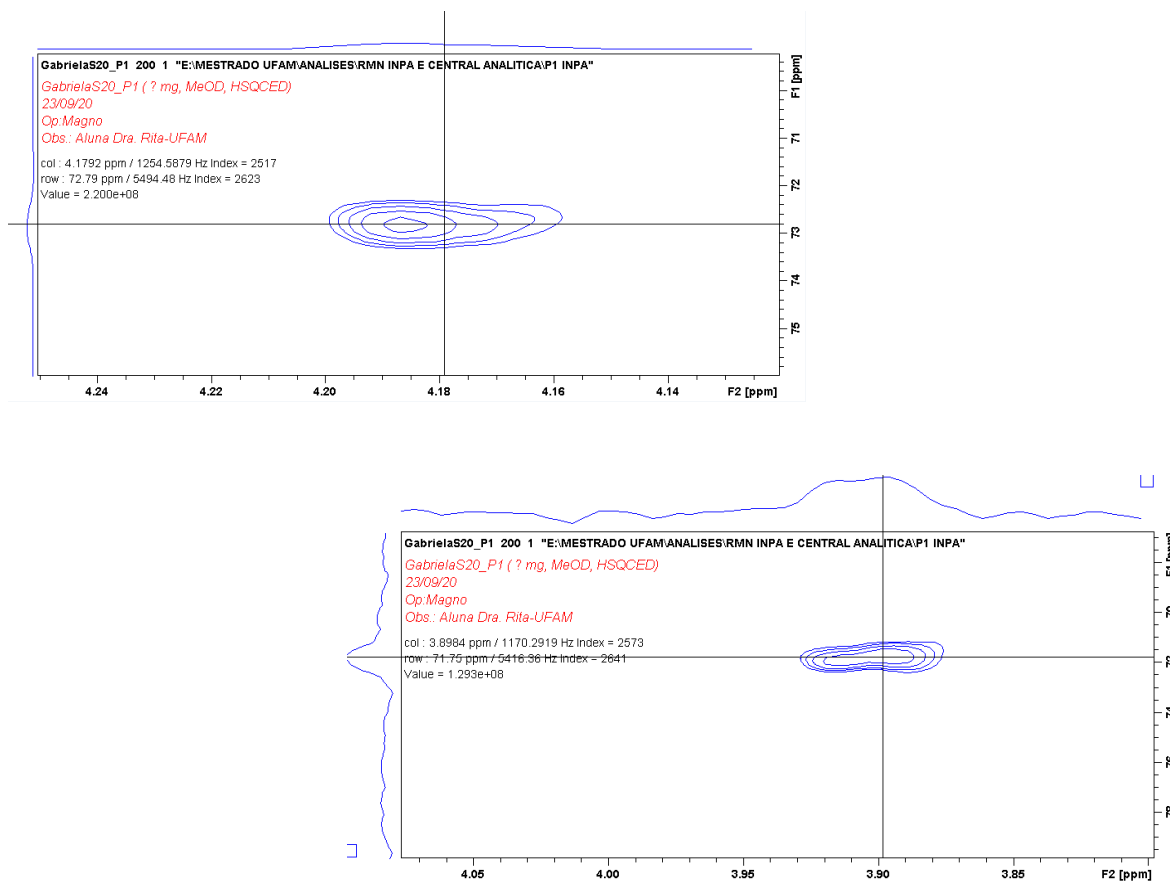


Figura 50. Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 03.



**Figura 51.** Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 04.

O espectro bidimensional HMBC (acoplamento de longa distância) da P1 (Figura 52, tabela 11) mostra as correlações observadas entre  $\delta$ H 5,33 e  $\delta$ C 78,8 (C-2  $\alpha$ ),  $\delta$ H 5,25 e  $\delta$ C 80,0 (C-2  $\beta$ );  $\delta$ H 4,17 e  $\delta$ C 66,0 (C-6  $\alpha$ );  $\delta$ H 4,28 e  $\delta$ C 97,5 (C-5  $\alpha$ ). A localização do carbono metilênico foi confirmada através das correlações entre o hidrogênio em  $\delta$ H 4,43  $\alpha/\beta$  e os carbonos  $\delta$ C 79,4 (C-5  $\alpha$ );  $\delta$ C 101,4 (C-1  $\beta$ ) e  $\delta$ C 167,0 (C-7  $\beta$ ). A posição dos grupos de carbono ligados aos hidrogênios aromáticos é confirmada através das correlações à longa distância com os hidrogênios em  $\delta$ H 7,08  $\alpha$  e  $\delta$ C 166,8 (C-7' / 7''  $\alpha$ ), como também as correlações entre os hidrogênios  $\delta$ H 7,11  $\beta$  e os carbonos  $\delta$ C 108,8 (C-2''/6''  $\beta$ );  $\delta$ C 120,0 (C-1''  $\beta$ ),  $\delta$ C 138,5 (C-4''  $\beta$ ),  $\delta$ C 145,0 (C-4''/5''  $\beta$ ) e  $\delta$ C 167,2 (C-7'/7''  $\beta$ ).



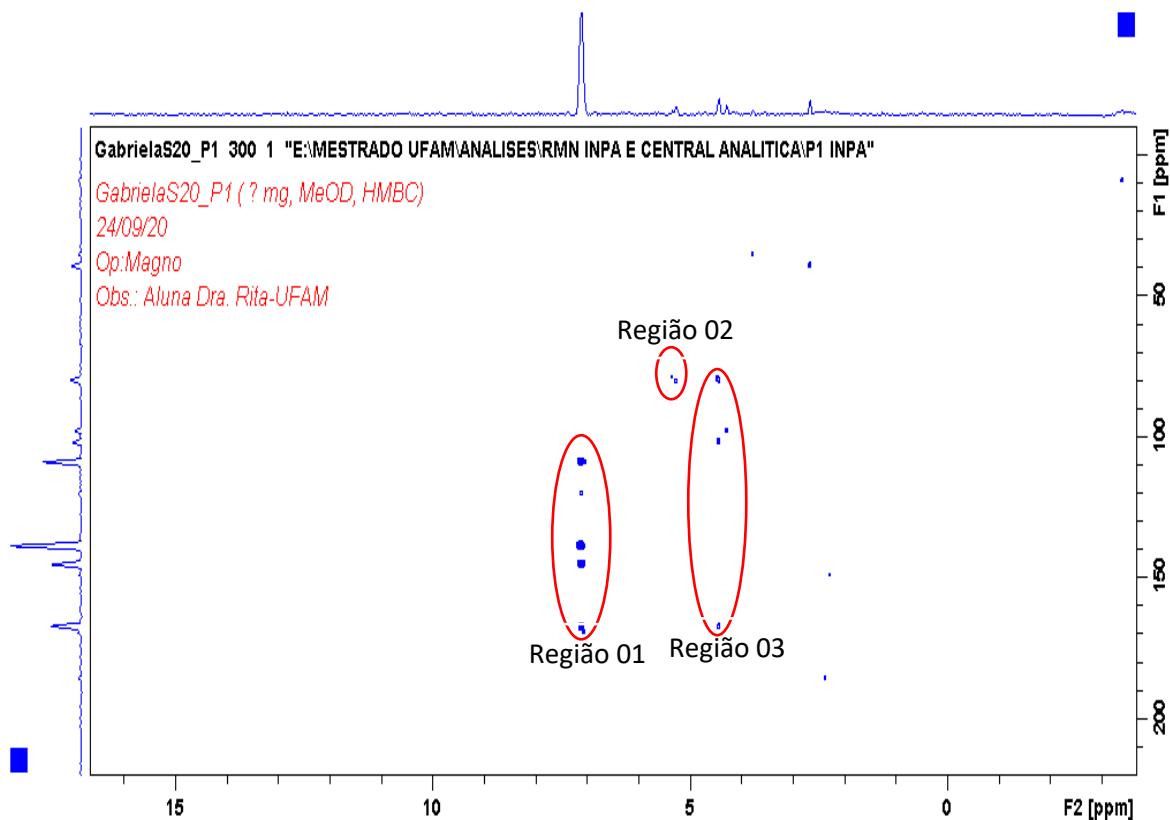
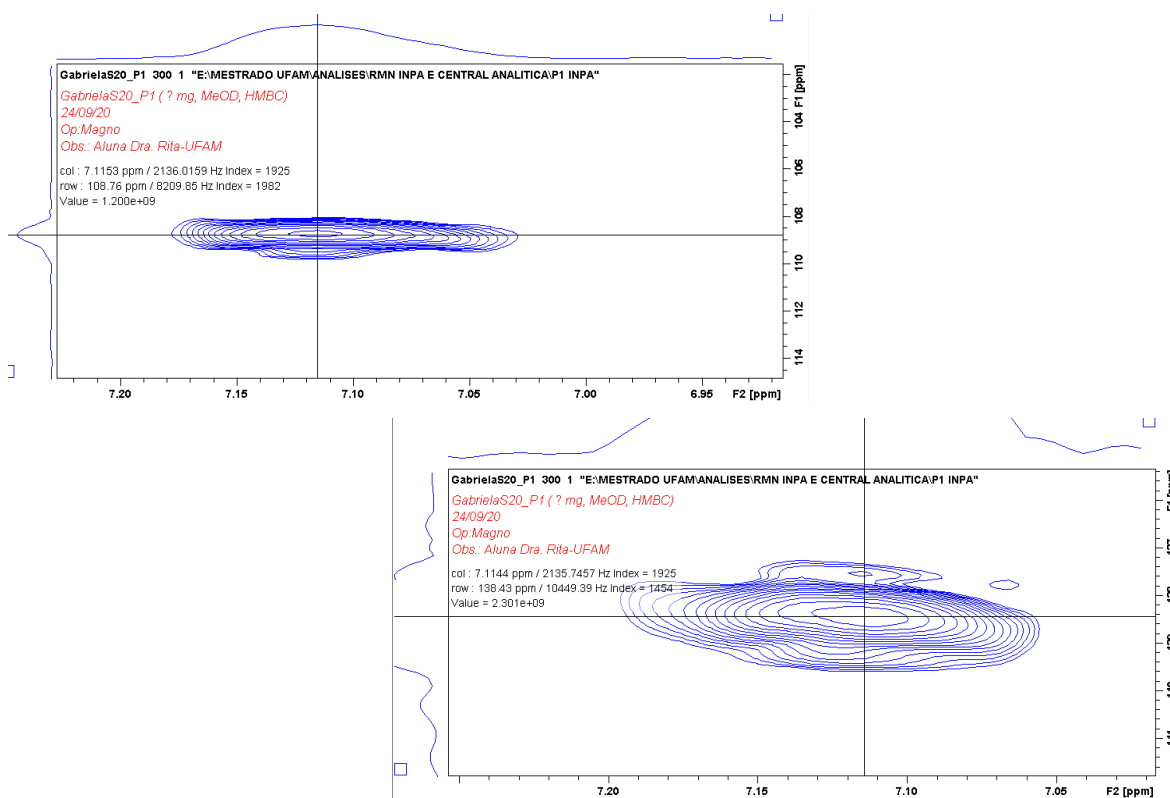


Figura 52: Espectro de HMBC  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  da substância P1.



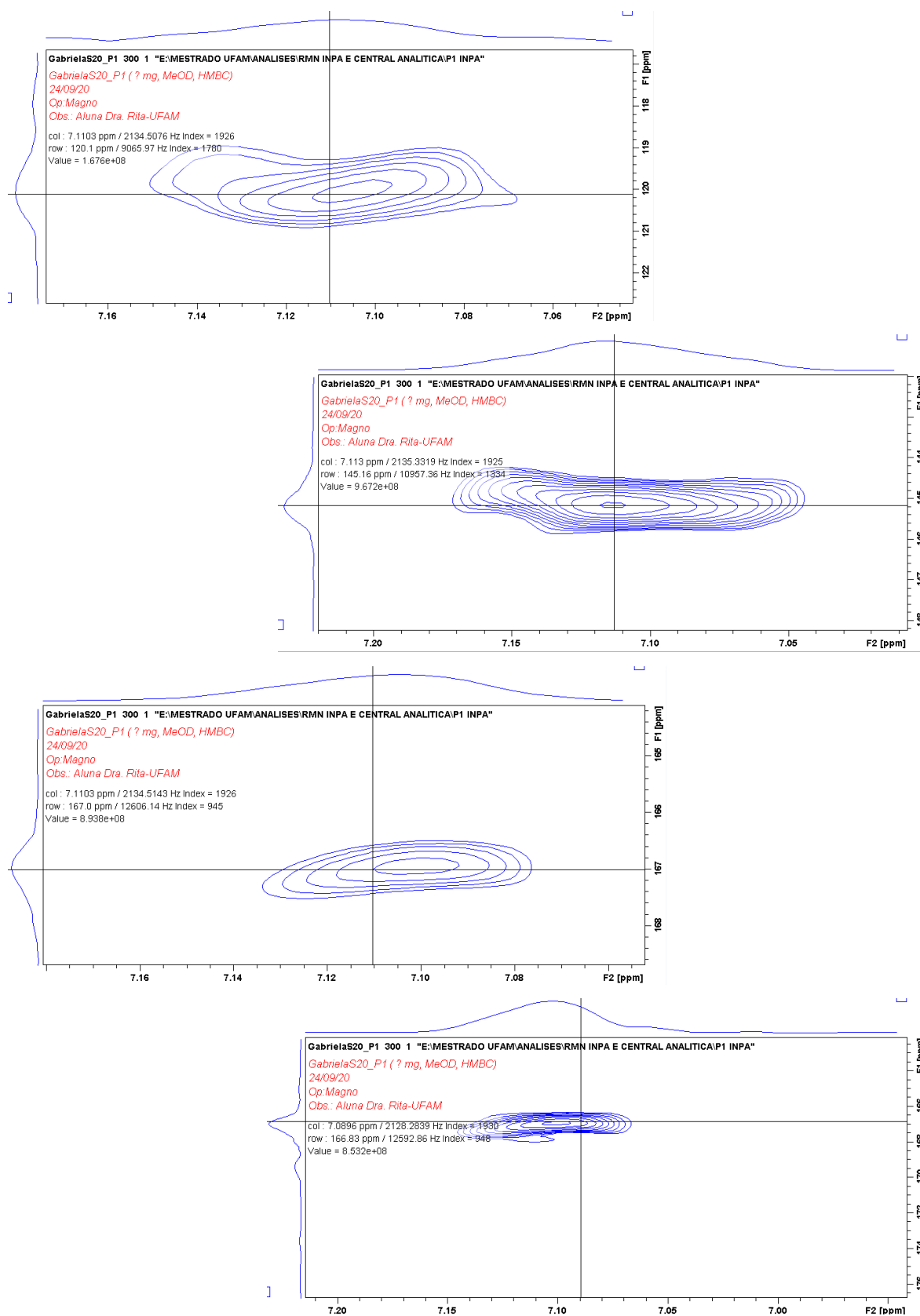


Figura 53. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 01.

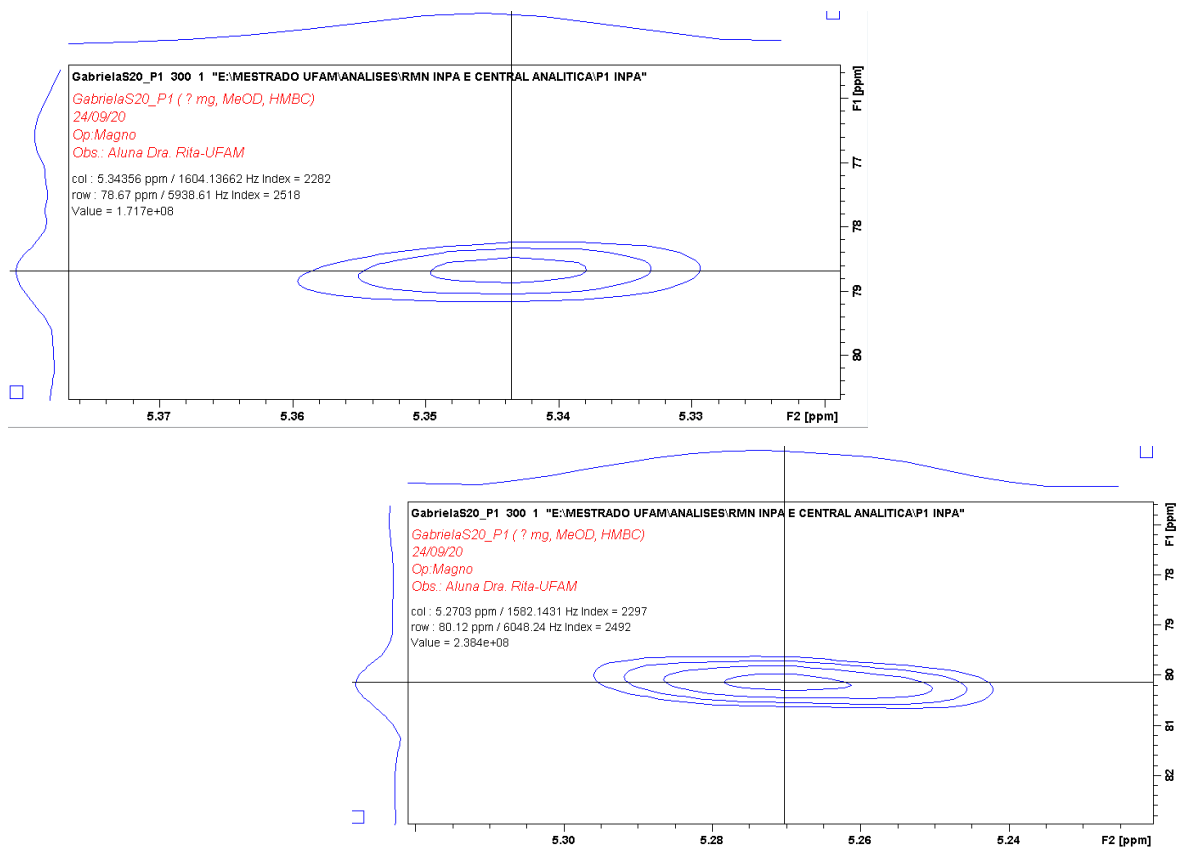
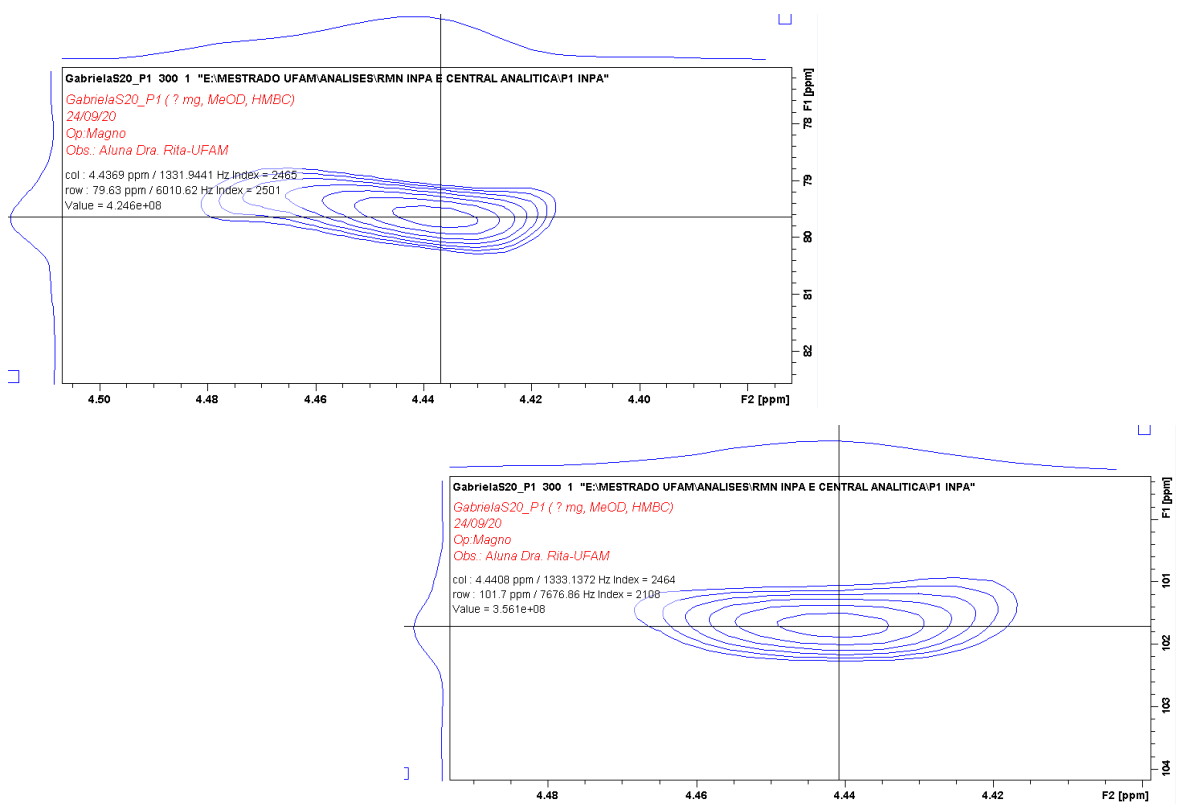


Figura 54. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 02.



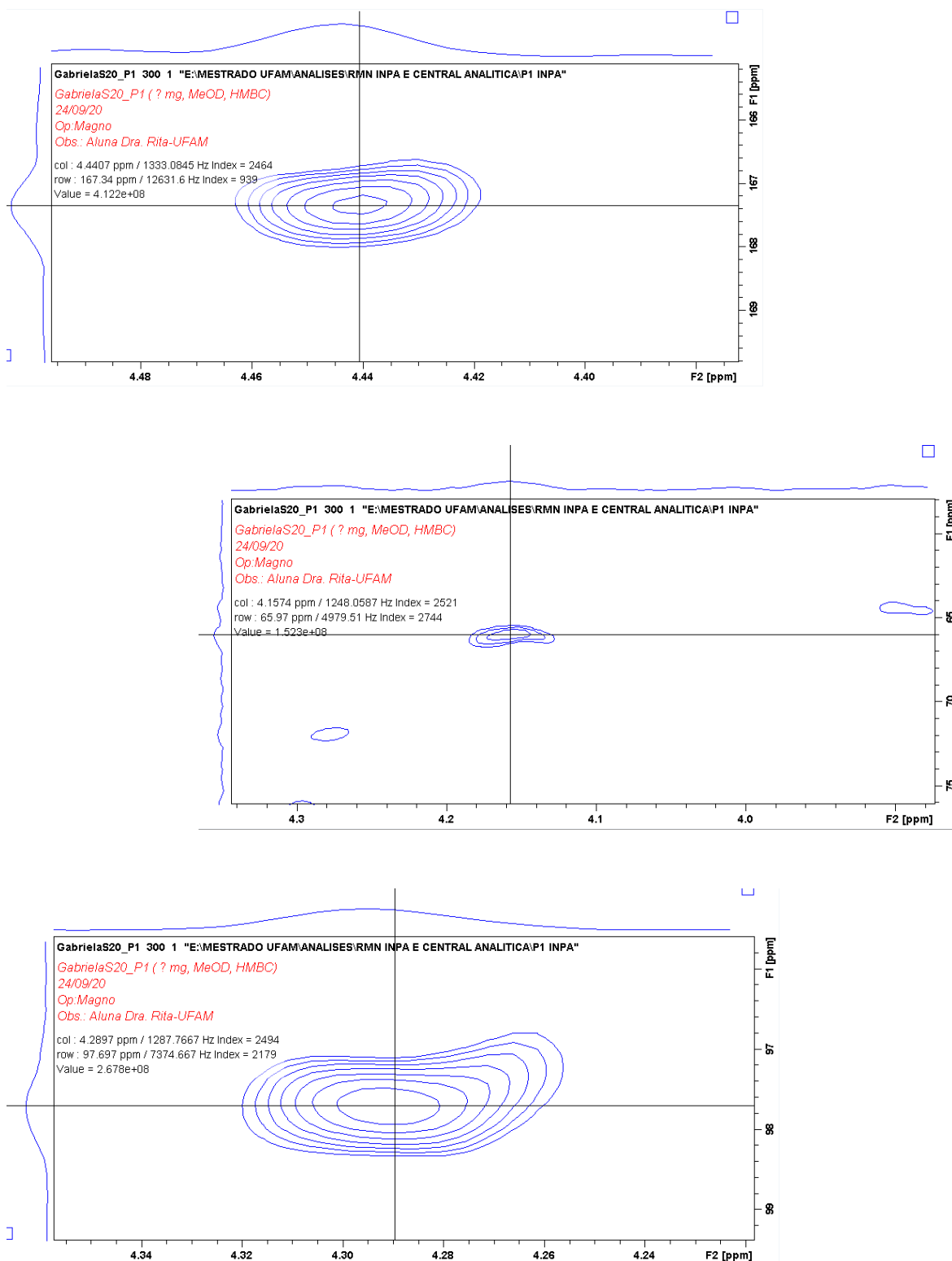


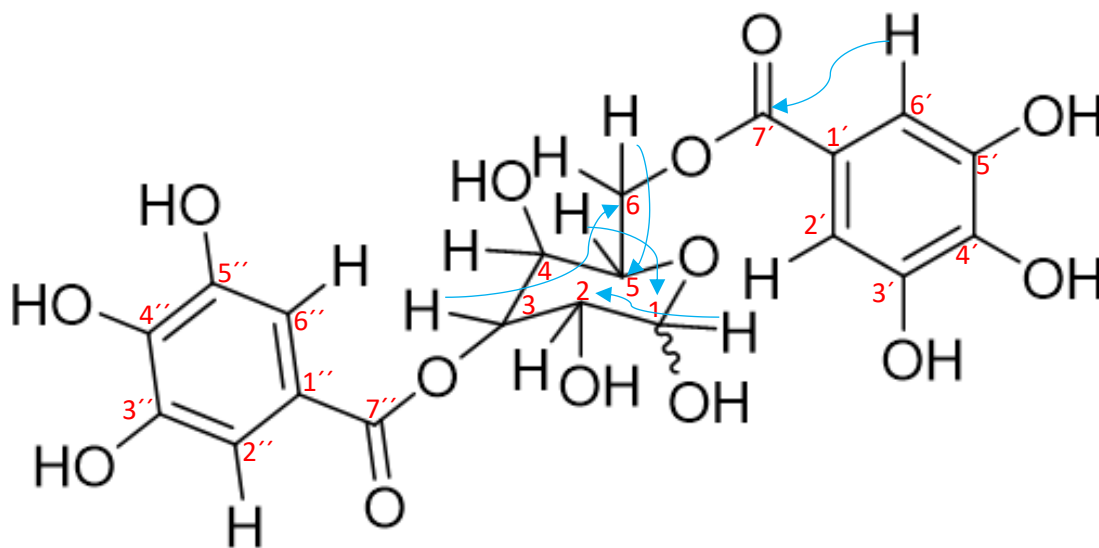
Figura 55. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 03.

**Tabela 11:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo as correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  HMBC para a substância P1, comparados com dados da literatura\* (TAN, 2012).

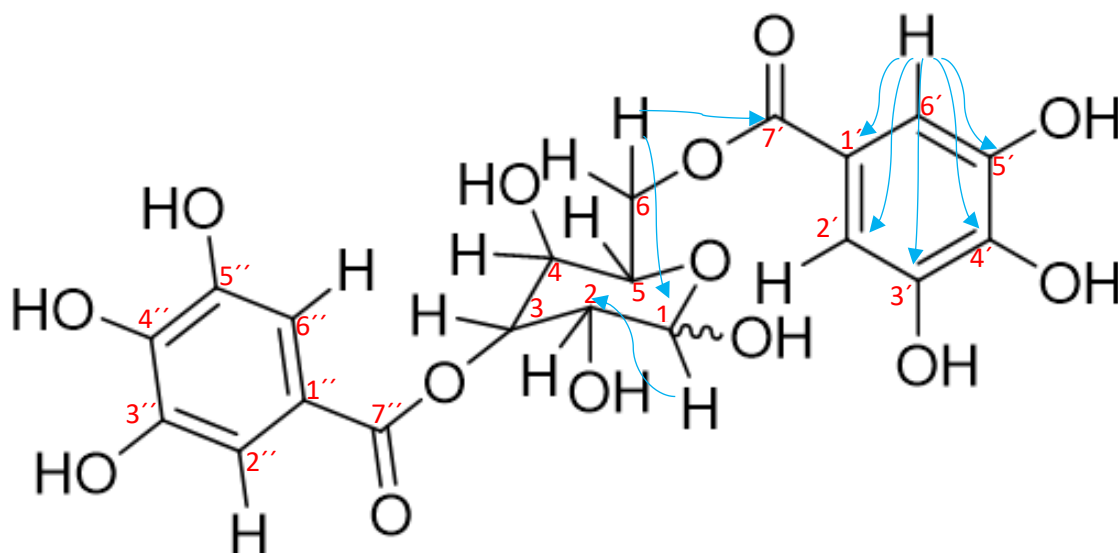
	$^{13}\text{C}$ $\alpha/\beta$	$^{13}\text{C}^*$ $\alpha/\beta$	$^1\text{H}$ $\alpha/\beta$	$^1\text{H}^*$ $\alpha/\beta$	Constante de acoplamento Hz	HMBC
<b>1 <math>\alpha</math></b>	97,5	93,5	5,33	5,21	1H(s)	C2
<b>1 <math>\beta</math></b>	101,4	98,5	5,25	4,67	1H(s)	C2
<b>2 <math>\alpha</math></b>	78,8	73,8	3,68	3,53	1H(m)	-
<b>2 <math>\beta</math></b>	80,0	76,4	3,53	3,33	1H(s)	-
<b>3 <math>\alpha</math></b>	72,7	72,5	4,17	5,13	1H(m)	C6
<b>3 <math>\beta</math></b>	72,7	72,5	4,51	5,12	1H(m)	-
<b>4 <math>\alpha</math></b>	71,7	72,9	3,83	4,04	1H(m)	-
<b>4 <math>\beta</math></b>	76,2	72,9	3,83	3,79	1H(m)	-
<b>5 <math>\alpha</math></b>	79,4	73,0	4,28	4,17	1H(m)	C1
<b>5 <math>\beta</math></b>	79,4	73,0	3,90	3,91	1H(d,7,52)	-
<b>6 <math>\alpha</math></b>	66,04	68,5	4,43	4,41	2H(s)	C5
<b>6 <math>\beta</math></b>	65,14	63,8	4,43	4,42	2H(s)	C1; C7'
<b>1' <math>\alpha</math></b>	119,9	121,6	-	-	-	-
<b>1'' <math>\beta</math></b>	120,0	121,8	-	-	-	-
<b>2'6' <math>\alpha</math></b>	108,7	109,9	7,08	7,12	4H(m)	C7'
<b>2''6'' <math>\beta</math></b>	108,8	110,1	7,11	7,13	4H(m)	C1'; C2'; C3'; C4'; C5'; C7'
<b>3'5' <math>\alpha</math></b>	145,0	145,8	-	-	-	-
<b>3''5'' <math>\beta</math></b>	145,1	145,9	-	-	-	-
<b>4' <math>\alpha</math></b>	138,4	138,6	-	-	-	-
<b>4'' <math>\beta</math></b>	138,5	138,8	-	-	-	-
<b>7'7'' <math>\alpha</math></b>	166,8	166,1	-	-	-	-
<b>7'7'' <math>\beta</math></b>	167,2	166,7	-	-	-	-

Em combinação com o RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , espectro bidimensional 2D (HSQC e HMBC) e de análise elemental do íon e sua respectiva fragmentação no MS/MS<sup>-</sup>, as posições dos grupos galoil foram determinadas como sendo em C-3 e

C-6 após o deslocamento para baixo de H-3 e H-6. Podemos perceber as correlações em comparação com os dados da literatura que permitiram confirmar a P1 como sendo o 3,6-di-O-galoil-D-glicose.



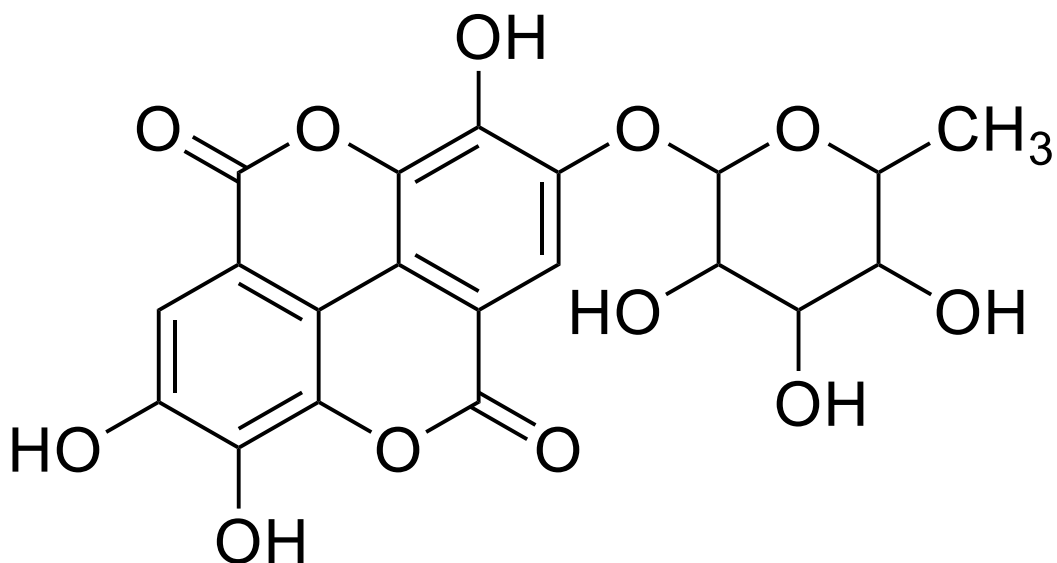
**Figura 56.** Proposta estrutural para o 3,6-di-O-galoil- $\alpha$ -D-glicose e correlações HMBC.



**Figura 57.** Proposta estrutural para o 3,6-di-O-galoil- $\beta$ -D-glicose e correlações HMBC.

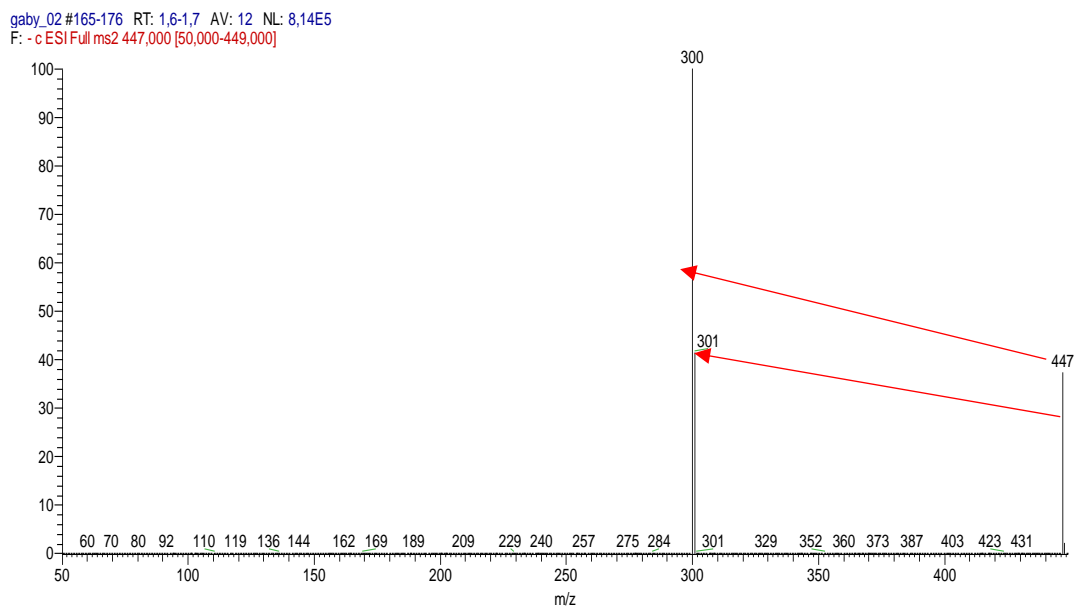
### 5.3.2. Substância P2.

A substância P2 (4,4 mg) foi obtida como um sólido com coloração levemente marrom, solúvel em DMSO. Em análise de massas de alta resolução no modo negativo da substância, demonstrou a presença do pico de maior intensidade um pico proeminente  $[M - H]^-$  em  $m/z$  447, cuja fórmula molecular neutra mais provável seria  $C_{20}H_{16}O_{12}$ .



**Figura 58.** Estrutura sugerida para a P2(ácido elágico ramnosídeo) com base no íon de maior intensidade.

Este íon  $[M-H]^-$  447 foi submetido a fragmentação conforme demonstrado no espectro da Figura 59, onde foram observados a presença dos íons ( $m/z$  301 e 300), oriundos do íon precursor de  $m/z$  447  $[M - H]^-$  que está presente no extrato da espécie estudada, discutido anteriormente, constatou-se a presença do fragmento em 301  $[M - H]^-$  que apresentou perda de massa de 146 u, equivalente a massa do ácido gálico, devido à perda de um resíduo de açúcar (ramnose), Figura 59 (CHISTÉ E MERCADANTE, 2012).



**Figura 59.** Fragmentação do íon  $[M-H]^-$  447 referente a substância P2.

O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 60, Tabela 12) apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de hidrogênios aromáticos, grupo metílico e grupos de hidrogênios ligados ao açúcar. (Figura 61) A integração dos sinais no espectro de RMN  $^1H$  indicou a presença de oito sinais de hidrogênio característicos da substância sugerida.

Na análise do espectro de RMN  $^1H$ , confirma-se a presença da unidade de ramnose através dos sinais entre  $\delta H$  3,35 a 5,45 característicos de hidrogênios carbinólicos; do singleto largo em  $\delta H$  5,45 referentes ao hidrogênio anomérico e do duplete com integral de três em  $\delta H$  1,13 atribuído à metila. Adicionalmente, são observados dois simpletos em  $\delta H$  7,39 e 7,66 com integração para um hidrogênio cada, referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos (ROMERO *et al*, 2008).



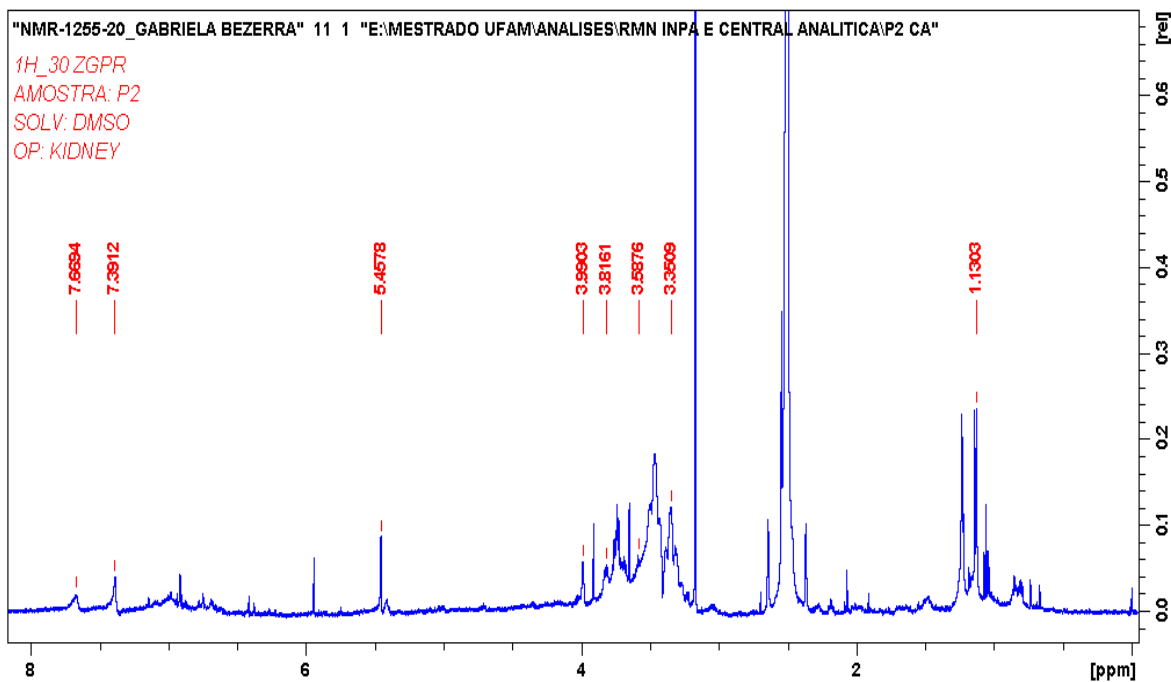


Figura 60. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da P2.

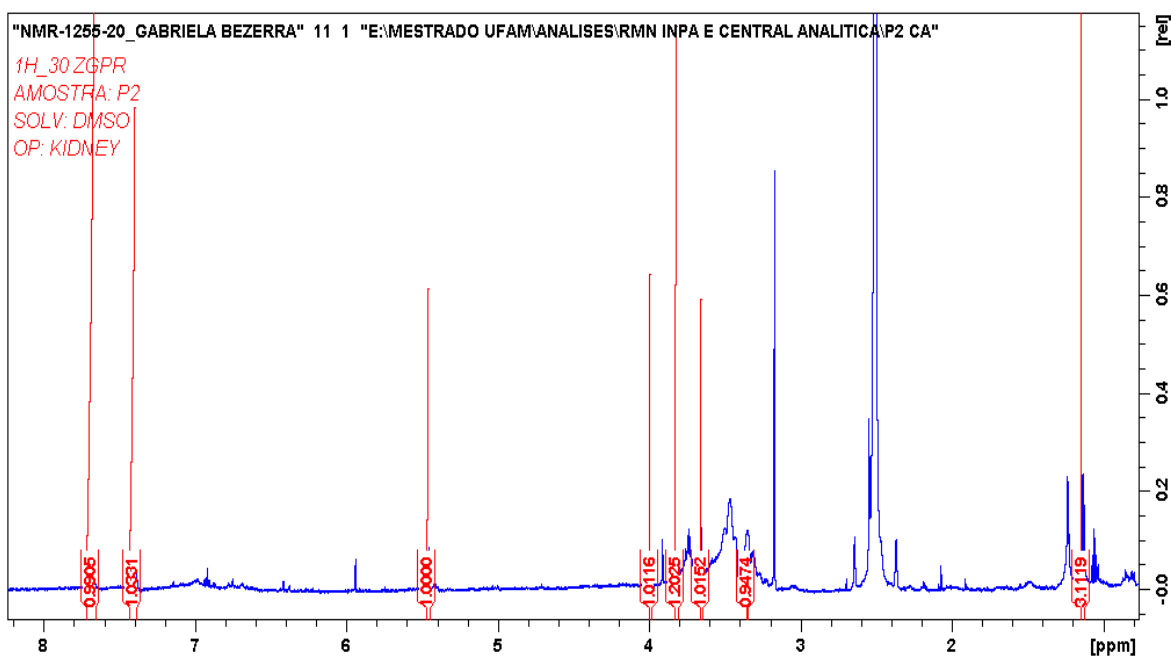
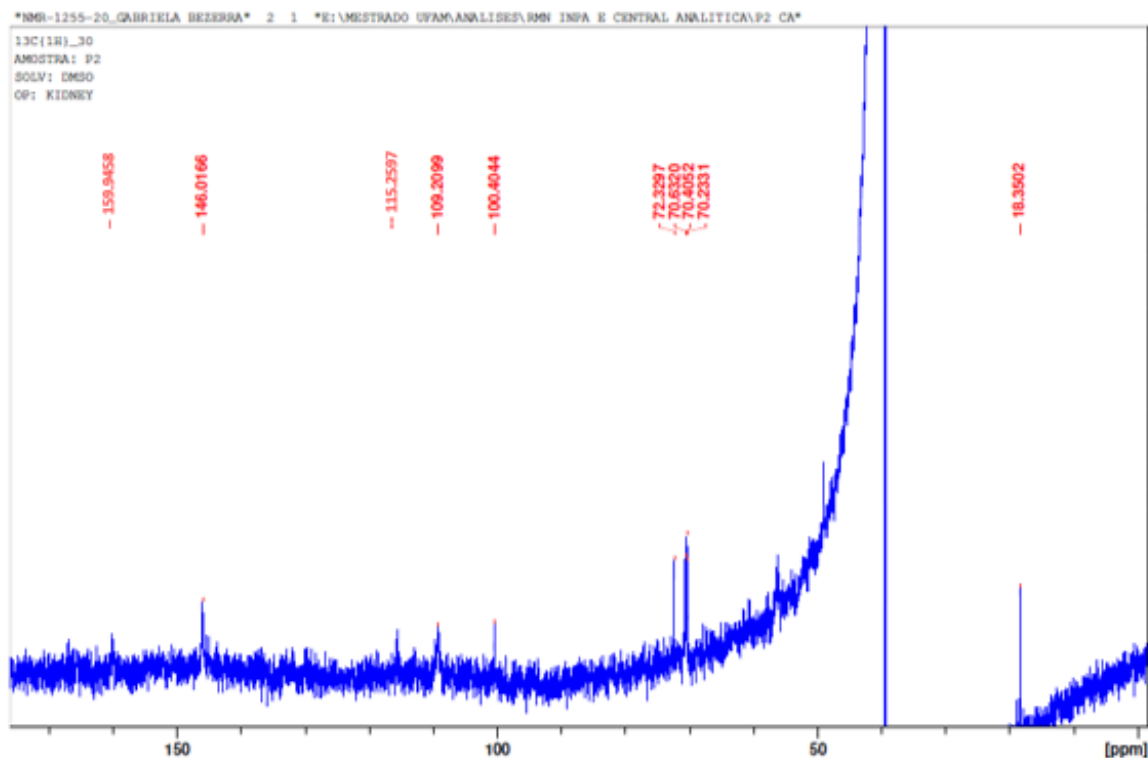


Figura 61. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da P2 integrados.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da P2 (Figura 62, Tabela 12) apresentou sinais com deslocamentos químicos relativos a quatro carbonos carbinólicos em  $\delta\text{C}$  72,3; 70,6; 70,3; 70,2 os quais sugerem uma unidade ramnose, um a carbono anomérico em  $\delta\text{C}$  100,4 e um outro referente à metila em  $\delta\text{C}$  18,3. Além de sinais típicos que

sugerem o deslocamento de carbono de aromáticos em  $\delta_c$  159,7; 146,0 e 115,2 mais os sinais em  $\delta_c$  109,2 e 112,4 que podem ser confirmados pela presença e correlação no espectro de HSQC, como também sinais em  $\delta_c$  146,7; 139,0 e 108,9 confirmado pela presença desses íons e suas correlação do espectro de HMBC (ROMERO et al, 2008).



**Figura 62.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da P2.

O espectro bidimensional HSQC da P2 (Figura 63, tabela 12) mostra as correlações observadas entre  $\delta_H$  7,55 com  $\delta_C$  109,2;  $\delta_H$  7,73 com 112,4 que são atribuídas às ligações terciárias de anéis aromáticos. Observou-se também as correlações entre  $\delta_H$  5,45 e  $\delta_C$  100,4;  $\delta_H$  3,99 e  $\delta_C$  70,4;  $\delta_H$  3,81 e  $\delta_C$  70,6;  $\delta_H$  3,58 e  $\delta_C$  70,2;  $\delta_H$  3,35 e  $\delta_C$  72,3 referentes a unidade glicosídica. Além da correlação entre  $\delta_H$  1,13 e  $\delta_C$  18,3 que confirma a correlação do grupo metílico.

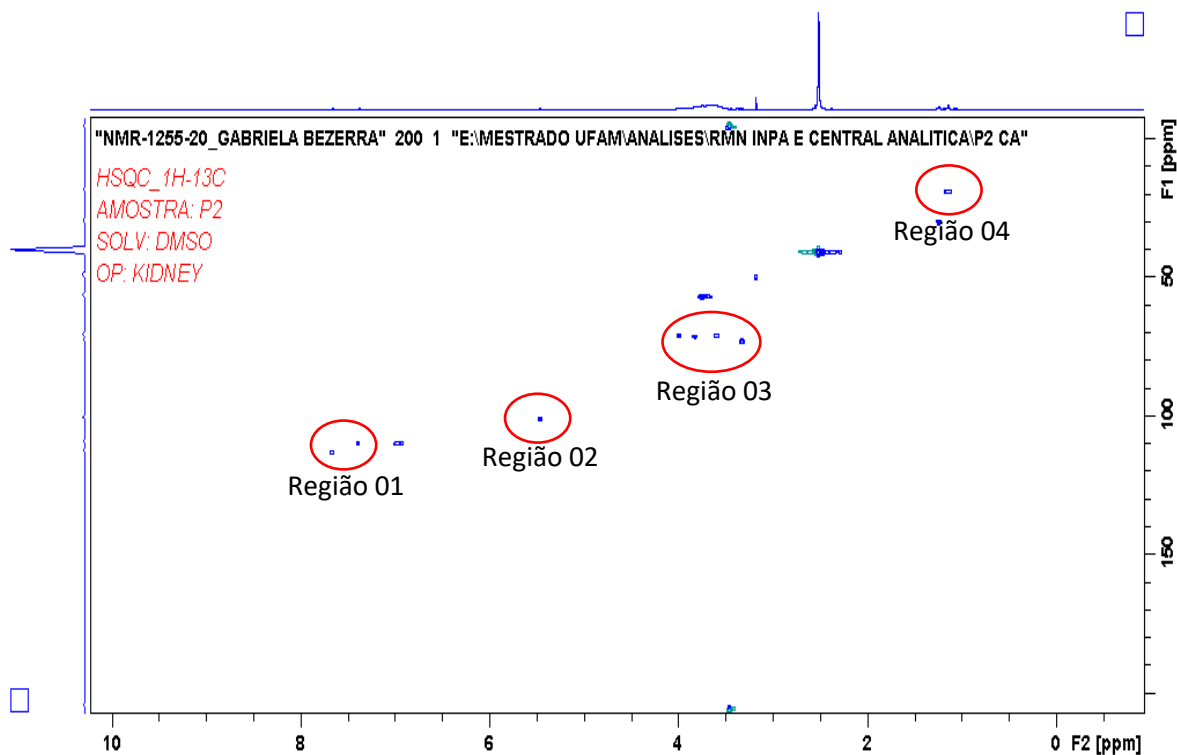


Figura 63. Espectro de HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  da substância P2.

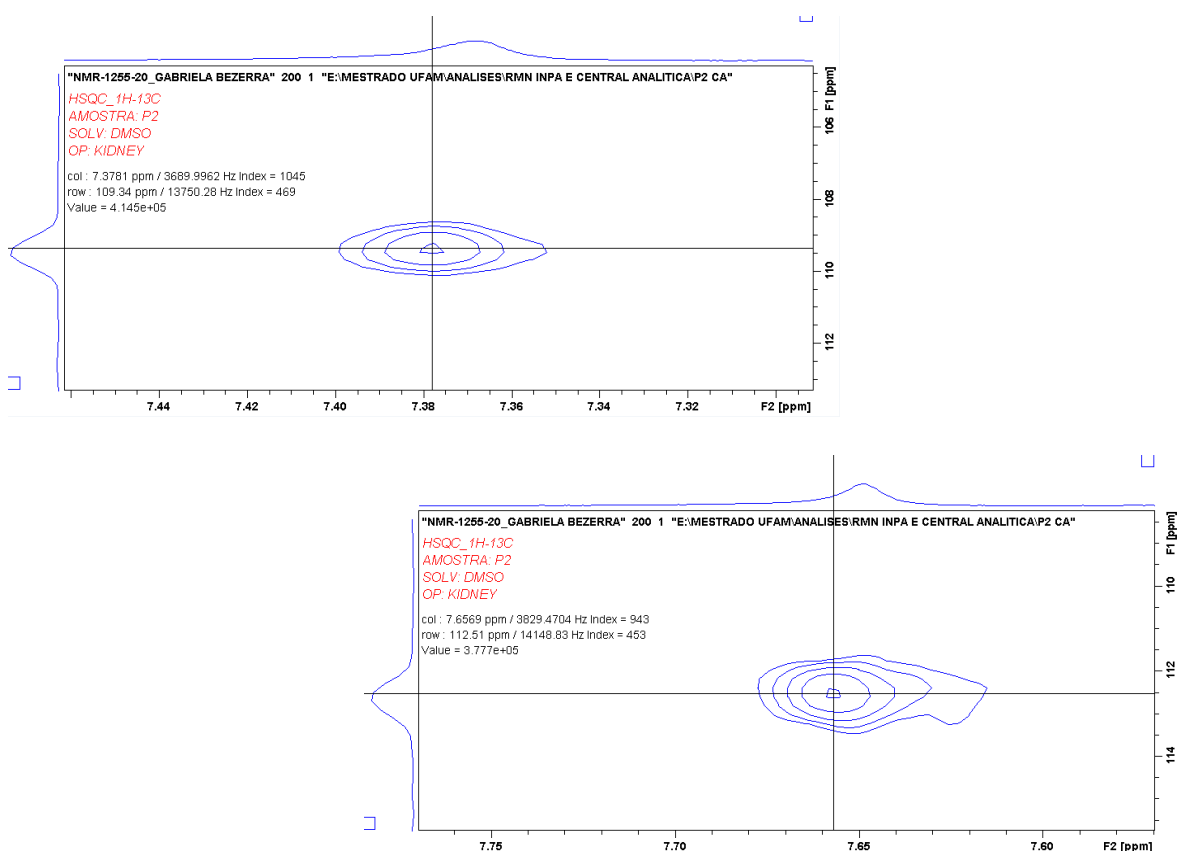


Figura 64. Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 01.

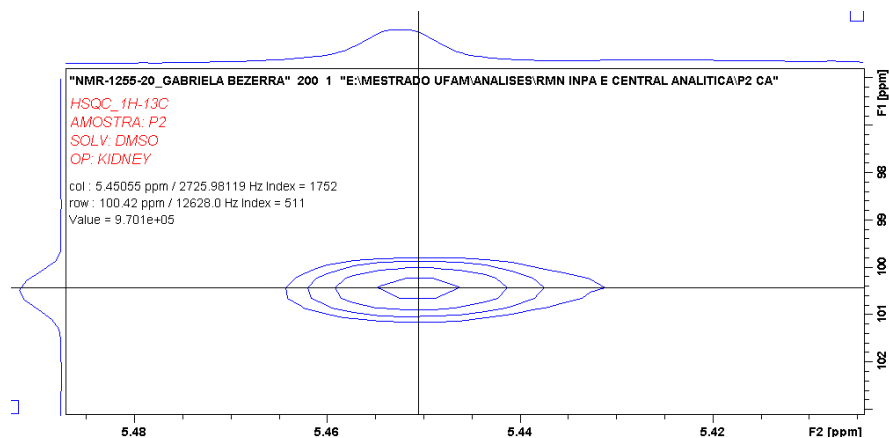
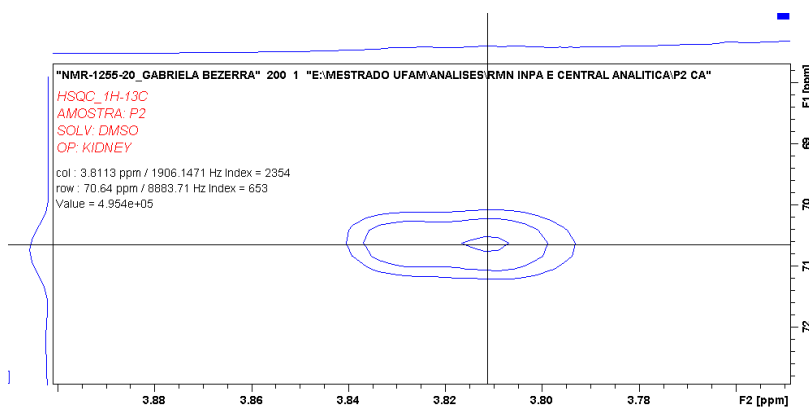
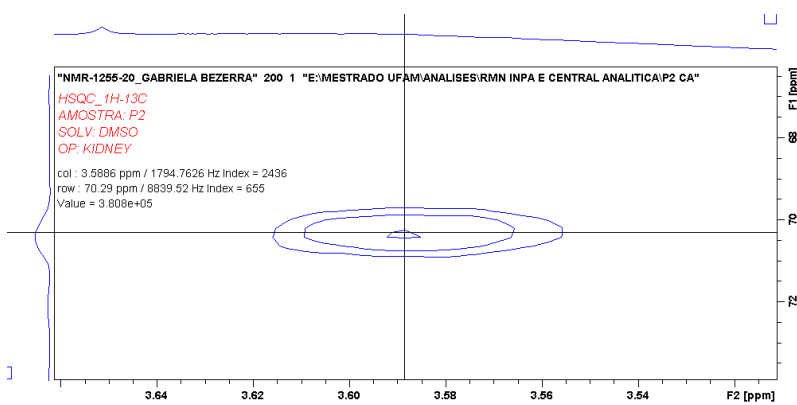
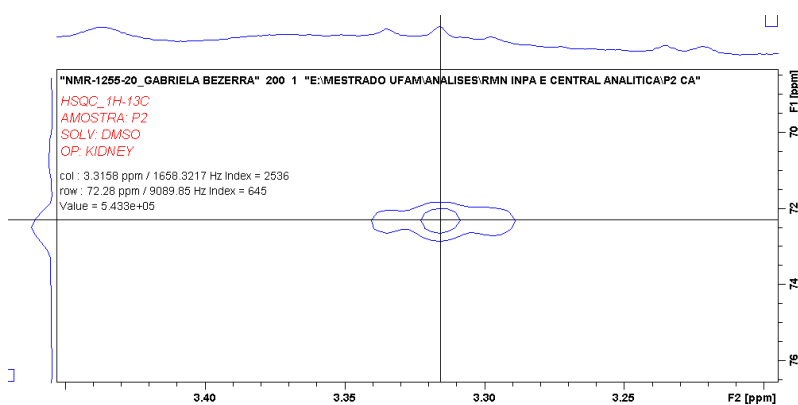
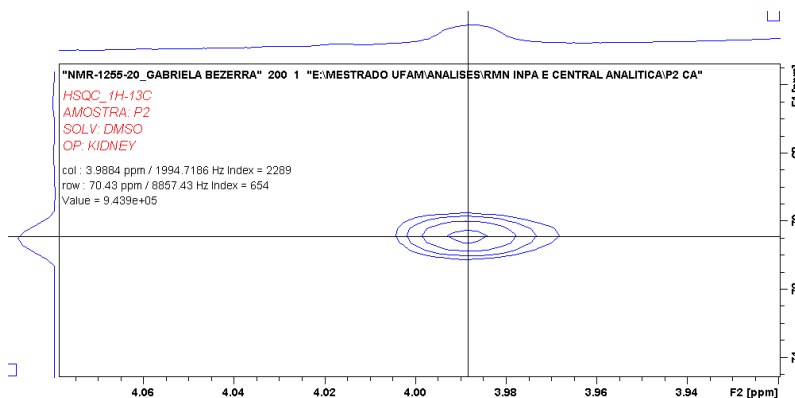
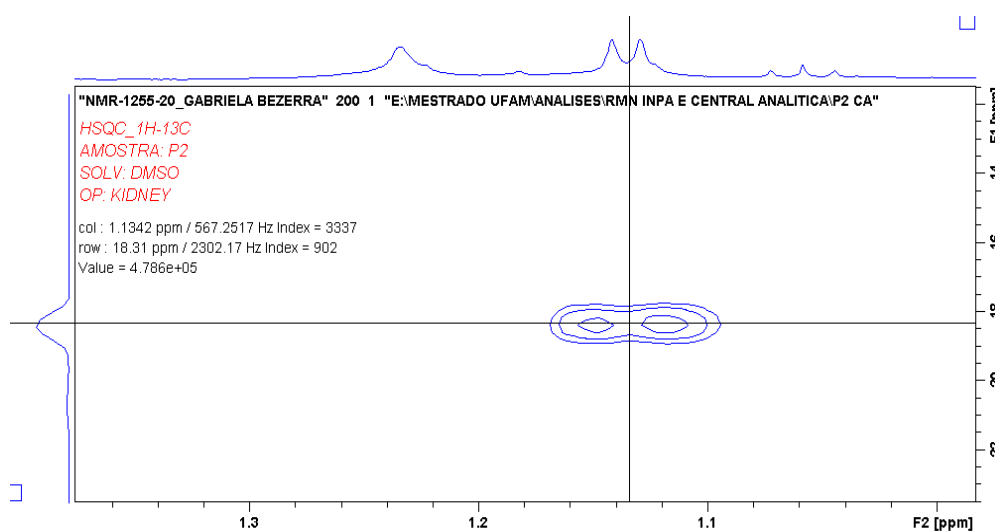


Figura 65. Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 02.





**Figura 66.** Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 03.



**Figura 67.** Espectro de HSQC suas correlações e ampliações, região 04.

O espectro bidimensional HMBC (acoplamento de longa distância) da P2 (Figura 68, tabela 12) mostra as correlações observadas entre  $\delta\text{H}$  5,45 e  $\delta\text{C}$  146,7 e  $\delta\text{C}$  70,3 confirmando a ligação entre os dois grupos, a localização do grupo metila foi confirmada através das correlações entre o hidrogênio em  $\delta\text{H}$  1,13 e os carbonos  $\delta\text{C}$  70,4 e  $\delta\text{C}$  72,0 como também da correlação entre  $\delta\text{H}$  3,35 e  $\delta\text{C}$  18,3. Além das posições dos grupos de carbonos ligados aos hidrogênios aromáticos são confirmadas através das correlações à longa distância com os hidrogênios em  $\delta\text{H}$  7,39 com os carbonos  $\delta\text{C}$  108,9;  $\delta\text{C}$  139,0;  $\delta\text{C}$  146,7 e  $\delta\text{H}$  7,66 com os carbonos  $\delta\text{C}$  115,2;  $\delta\text{C}$  159,7.

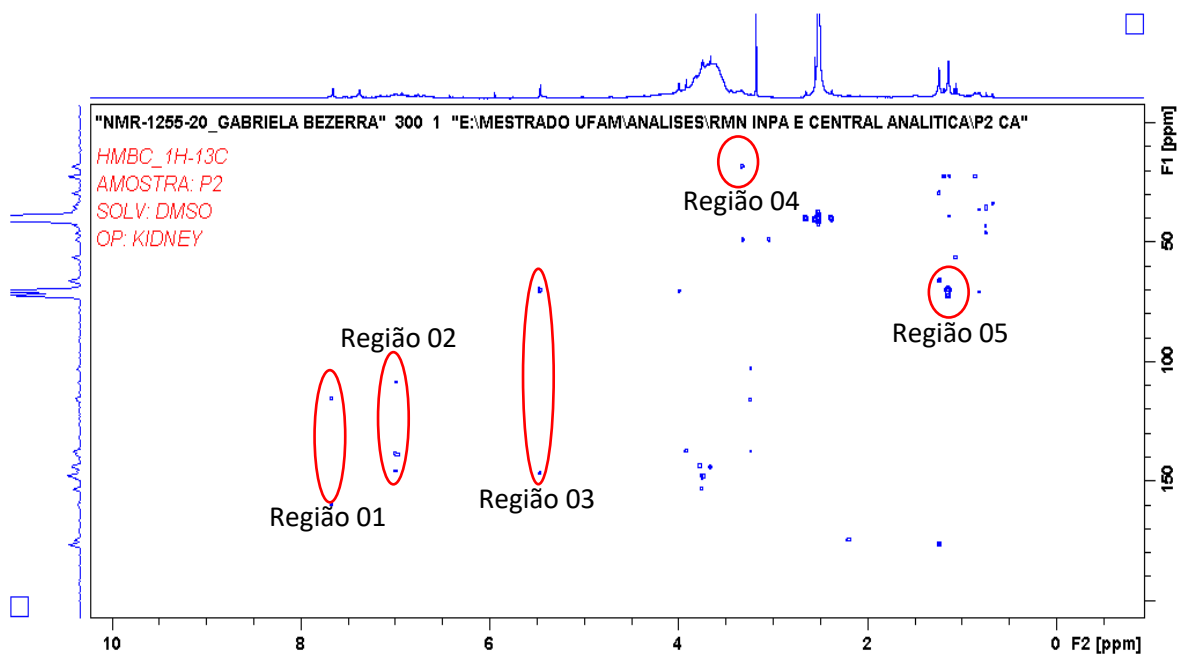


Figura 68. Espectro de HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  da substância P2.

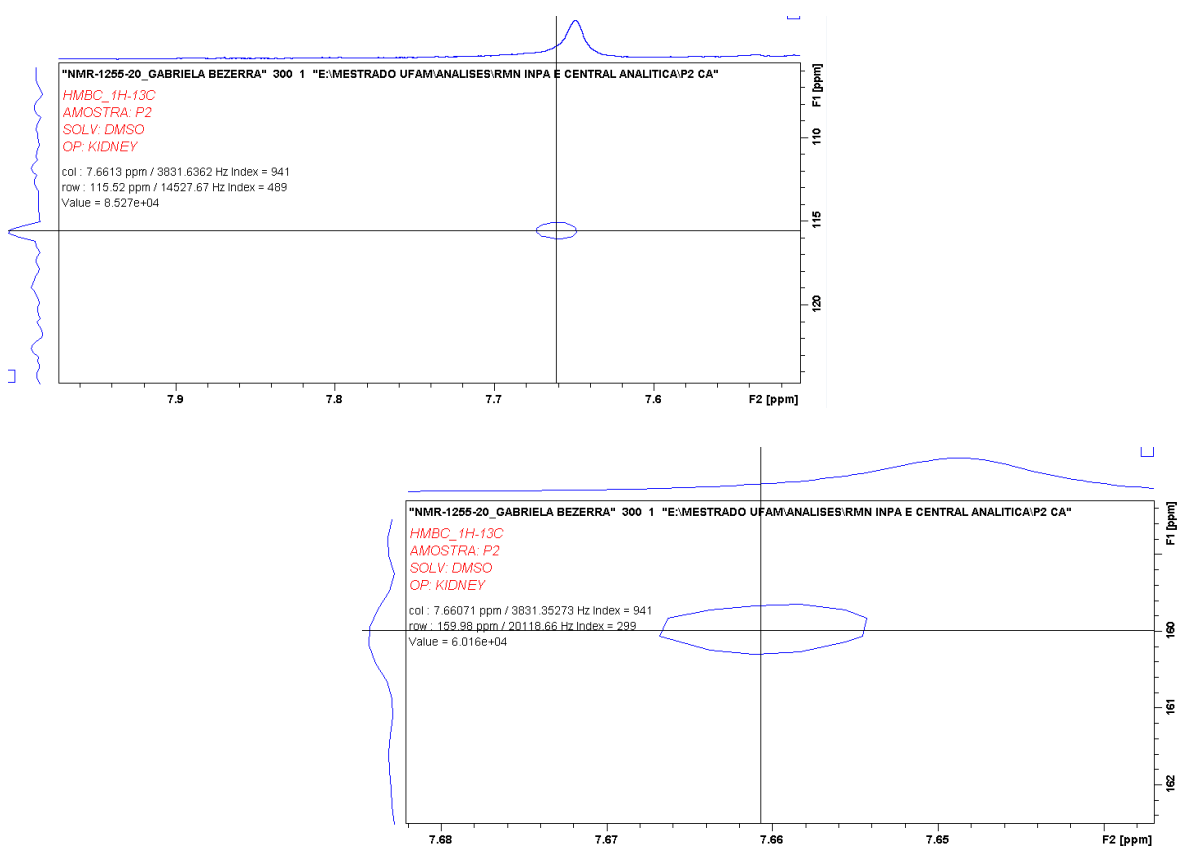


Figura 69. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 01.

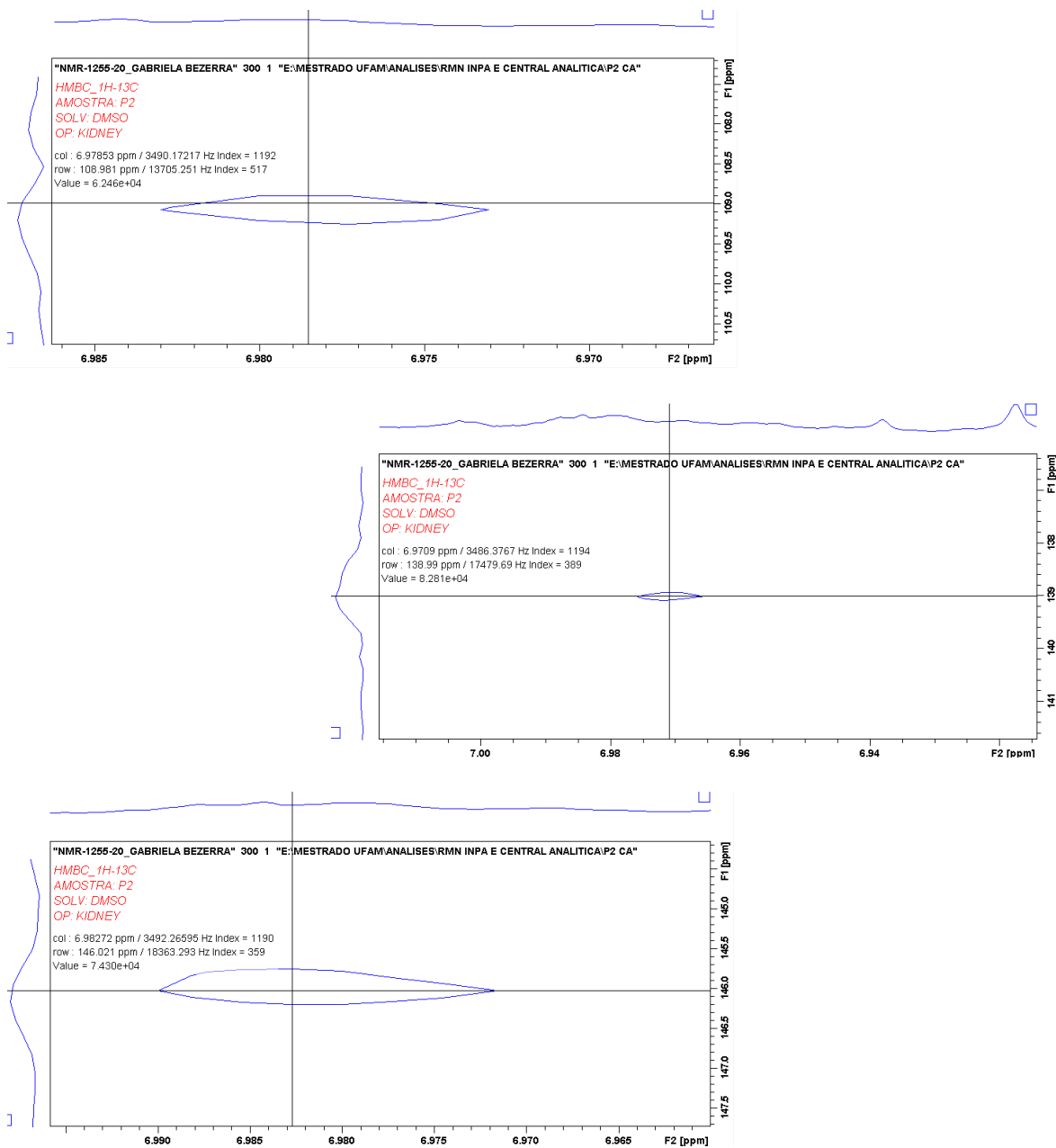
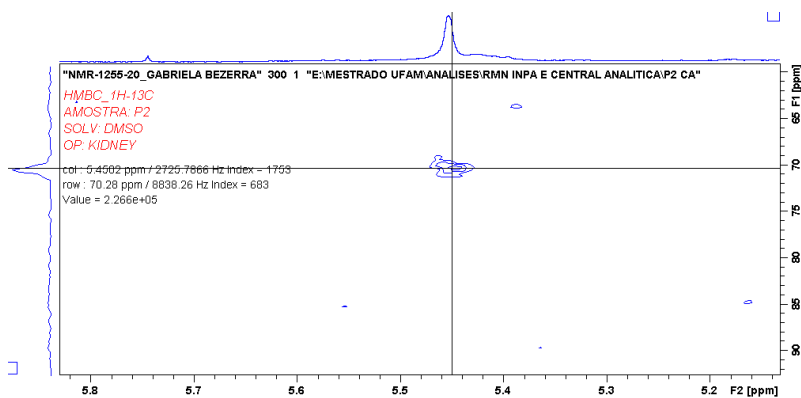


Figura 70. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 02.



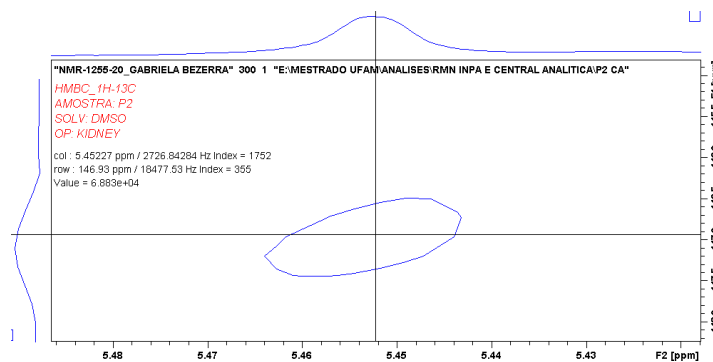


Figura 71. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 03.

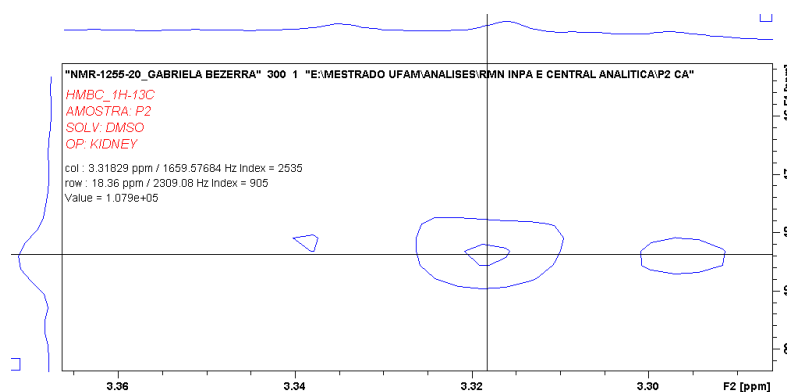


Figura 72. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 04.

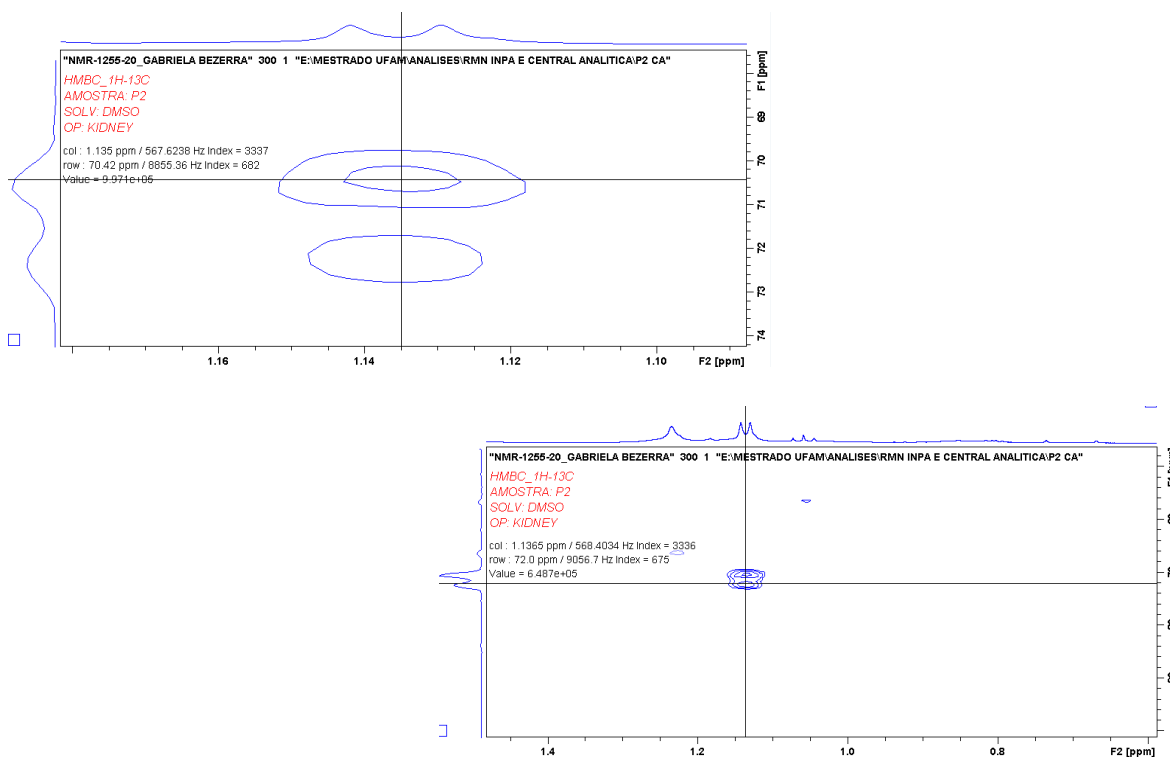


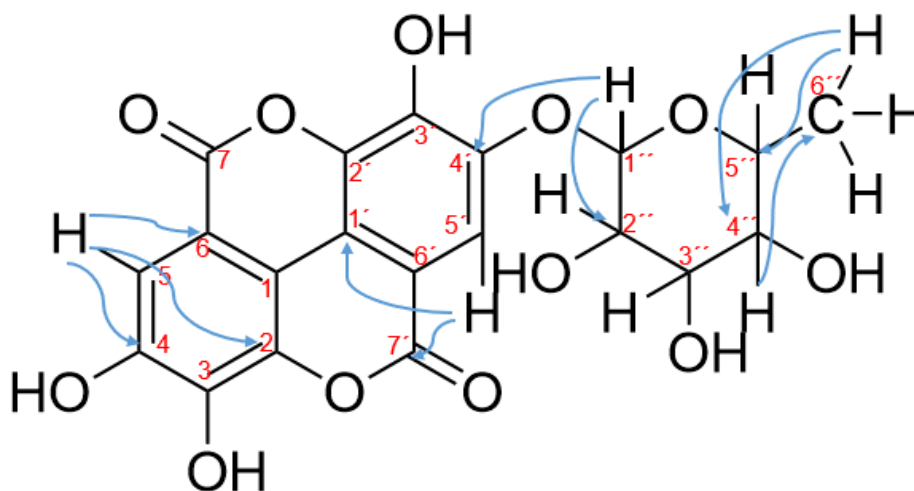
Figura 73. Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 05.



**Tabela 12:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , HMBC para a substância P2, comparados com dados da literatura\*. (\*LOPES *et al*, 2008; \*\*MEDEIROS, 2018).

	$^{13}\text{C}^*$	$^{13}\text{C}^{**}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}^*$	$^1\text{H}^{**}$	$^1\text{H}$	Multiplic. / Const. de acoplamento Hz	HMQC
<b>1</b>	112,8	111,6	115,2	-	-	-	-	-
<b>2</b>	136,3	136,4	139,0	-	-	-	-	-
<b>3</b>	139,9	140,4	146,0	-	-	-	-	-
<b>4</b>	148,2	152,9	146,7	-	-	-	-	-
<b>5</b>	110,1	111,7	109,2	7,55	7,52	7,39	1H(s)	C2; C4; C6
<b>6</b>	107,9	107,4	108,9	-	-	-	-	-
<b>7</b>	160,2	159,0	159,7	-	-	-	-	-
<b>1'</b>	112,8	114,6	115,2	-	-	-	-	-
<b>2'</b>	136,3	142,1	139,0	-	-	-	-	-
<b>3'</b>	139,9	141,6	146,0	-	-	-	-	-
<b>4'</b>	148,2	146,7	146,7	-	-	-	-	-
<b>5'</b>	110,1	111,8	112,4	7,92	7,73	7,66	1H(s)	C1'; C7'
<b>6'</b>	107,9	113,3	108,9	-	-	-	-	-
<b>7'</b>	160,2	158,9	159,7	-	-	-	-	-
<b>1''</b>	100,2	100,3	100,4	5,59	5,47	5,45	1H(sl)	C4''; C2''
<b>2''</b>	70,6	70,1	70,2	4,01	4,00	3,58	1H(t; 3,8)	-
<b>3''</b>	70,1	70,3	70,6	3,65	3,83	3,81	1H(d; 5,5)	-
<b>4''</b>	69,6	72,0	72,3	3,76	3,30	3,35	1H(m)	C6''
<b>5''</b>	72,3	70,2	70,4	3,53	3,54	3,99	1H(m)	-
<b>6''</b>	16,9	18,1	18,3	1,19	1,11	1,13	3H(d; 6,1)	C4''; C5''

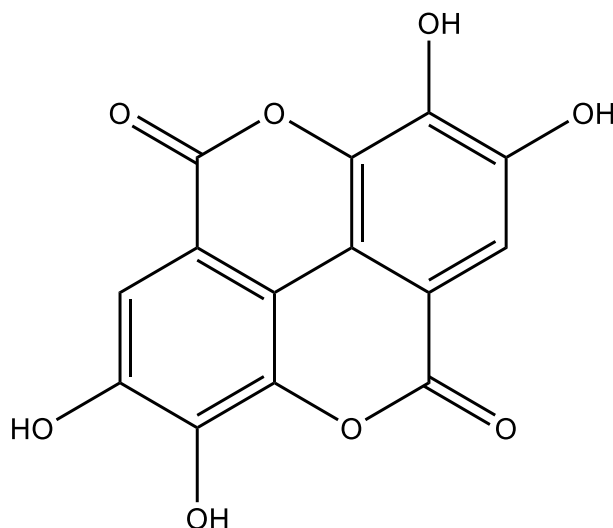
Em combinação com o RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , espectro bidimensional 2D (HSQC e HMBC) e de análise elementar do íon e sua respectiva fragmentação no MS/MS<sup>-</sup>, podemos perceber as correlações em comparação com os dados da literatura que permitiram confirmar a P2 como sendo o ácido elágico ramnosídeo.



**Figura 74.** Proposta estrutural para o ácido elágico ramnosídeo e correlações HMBC

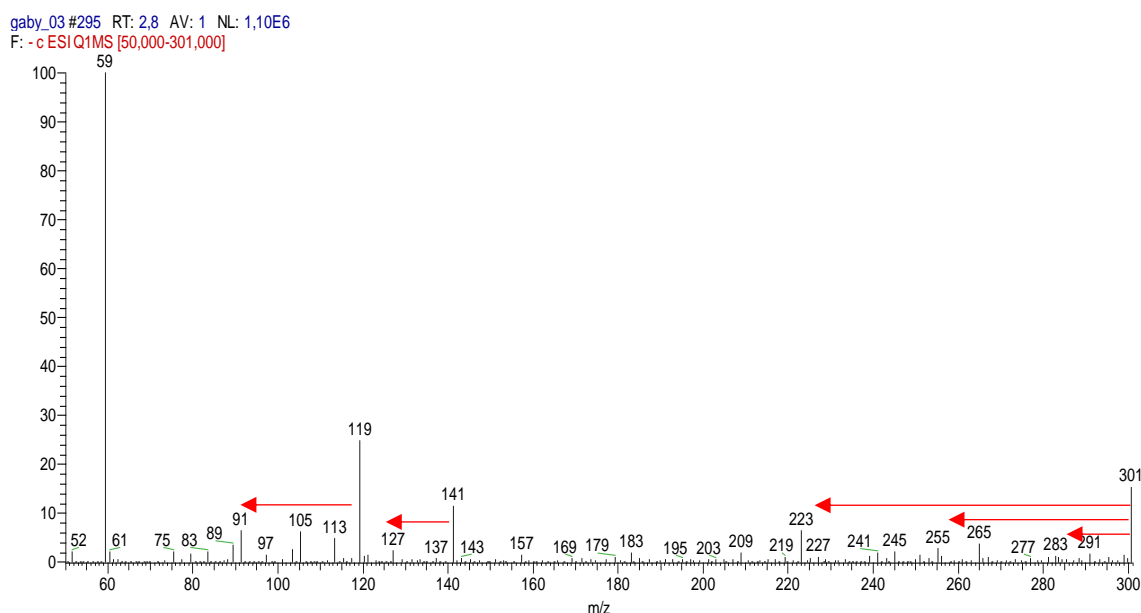
### 5.3.3. Substância P3.

A substância P3 (18 mg) foi obtida como um sólido com coloração amarela, solúvel em DMSO. Em análise de massas de alta resolução no modo negativo da substância, demonstrou a presença do pico de maior intensidade um pico proeminente  $[M - H]^-$  em  $m/z$  301, cuja fórmula molecular neutra mais provável seria  $C_{14}H_6O_8$ .



**Figura 75.** Estrutura sugerida para a P3(ácido elágico) com base no íon de maior intensidade.

Este íon [M-H]<sup>-</sup> 301 foi submetido à fragmentação conforme demonstrado no espectro da Figura 76, onde foram observados a presença dos íons (*m/z* 257, 229 e 185), oriundos do íon precursor de *m/z* 301 [M - H]<sup>-</sup> que está presente no extrato da espécie estudada, discutido anteriormente. Foi constatada perda de massa *m/z* 257 [M - 44 - H]<sup>-</sup> resultante da perda de CO<sub>2</sub>. O pico base formado em *m/z* 229 [M - H]<sup>-</sup> é gerado por uma descarboxilação (-44 u) seguida da perda de CO (-28 u) (YISIMAYILI *et al.*, 2018; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). O fragmento em *m/z* 185 [M - H]<sup>-</sup> é referente a perda de dois grupos CO<sub>2</sub> e um grupo CO (LINLIN *et al.*, 2014; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014) (Figura 76).



**Figura 76.** Fragmentação do íon [M-H]<sup>-</sup> 301 referente a substância P3

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 77, Tabela 13) apresentou apenas um sinal com deslocamento químico em δH 7,44 (com integral de 2H, s) que sugerem a presença dos hidrogênios aromáticos (ALVES, 2007).

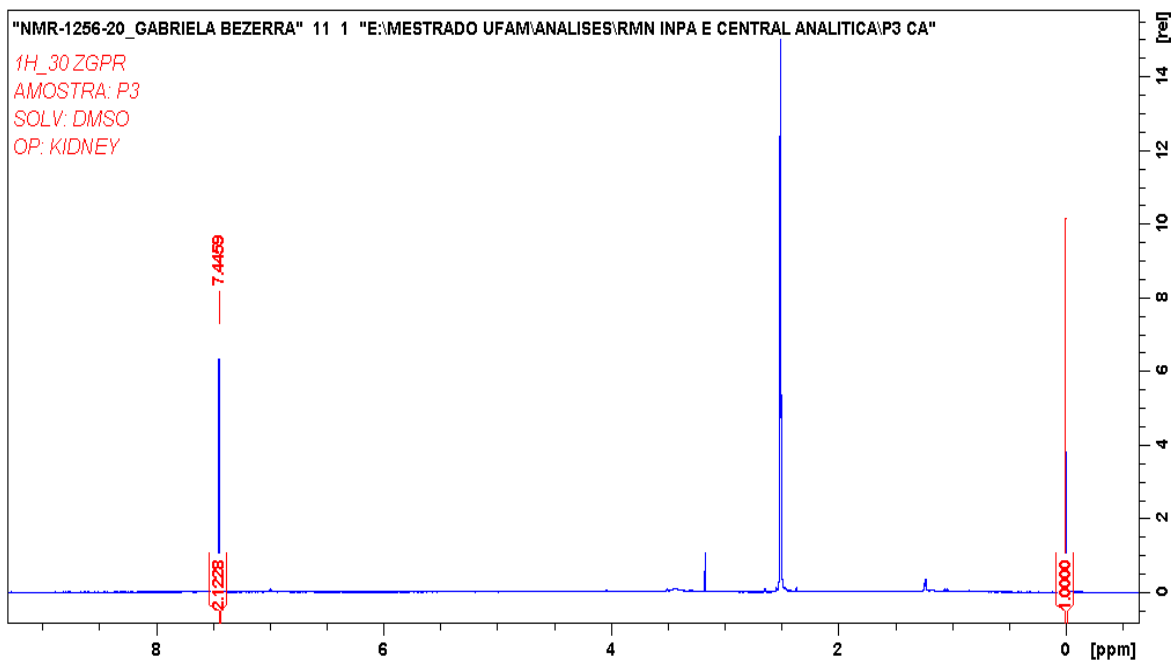


Figura 77. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da P3.

O espectro bidimensional HSQC da P3 (Figura 78, tabela 13) mostra a correlação entre o hidrogênio em  $\delta\text{H}$  7,44 com  $\delta\text{C}$  110,5, que aparece no espectro onde são atribuídos às ligações terciárias dos anéis aromáticos.

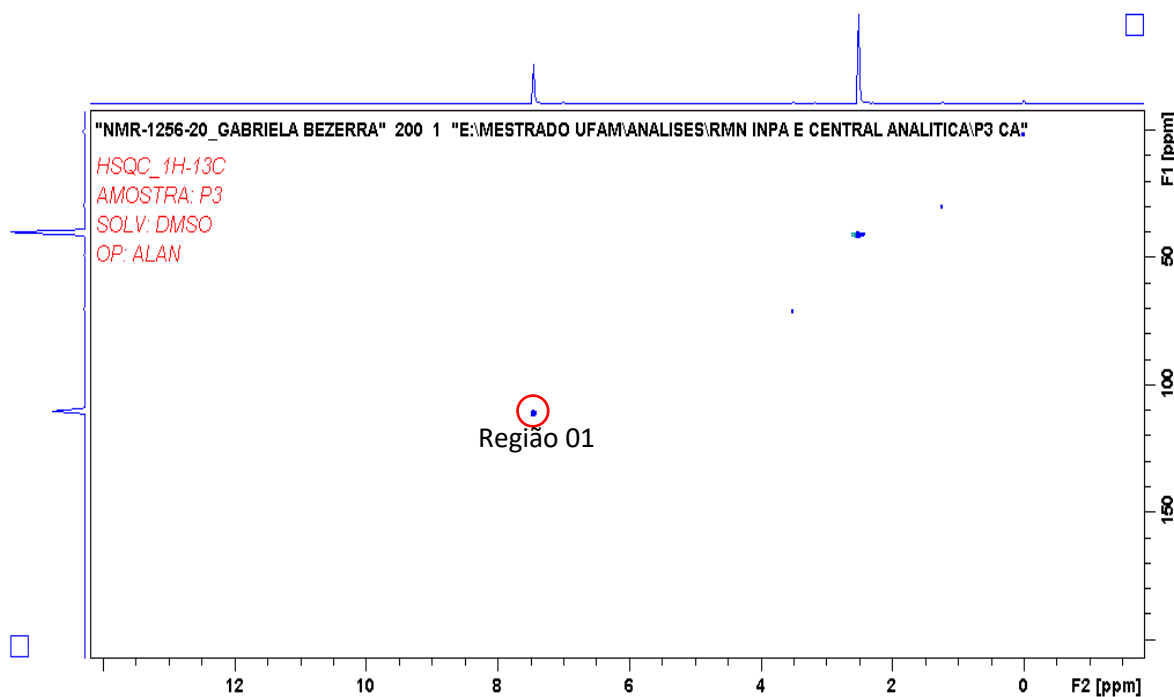
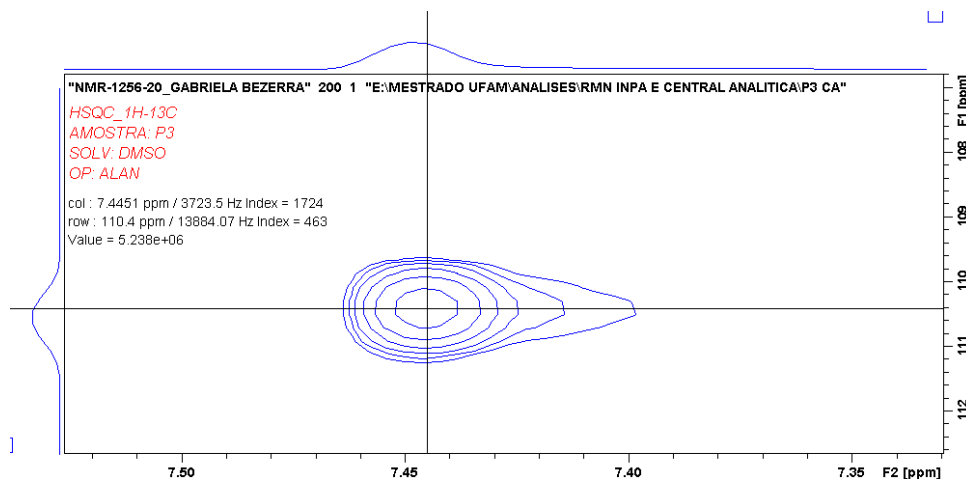
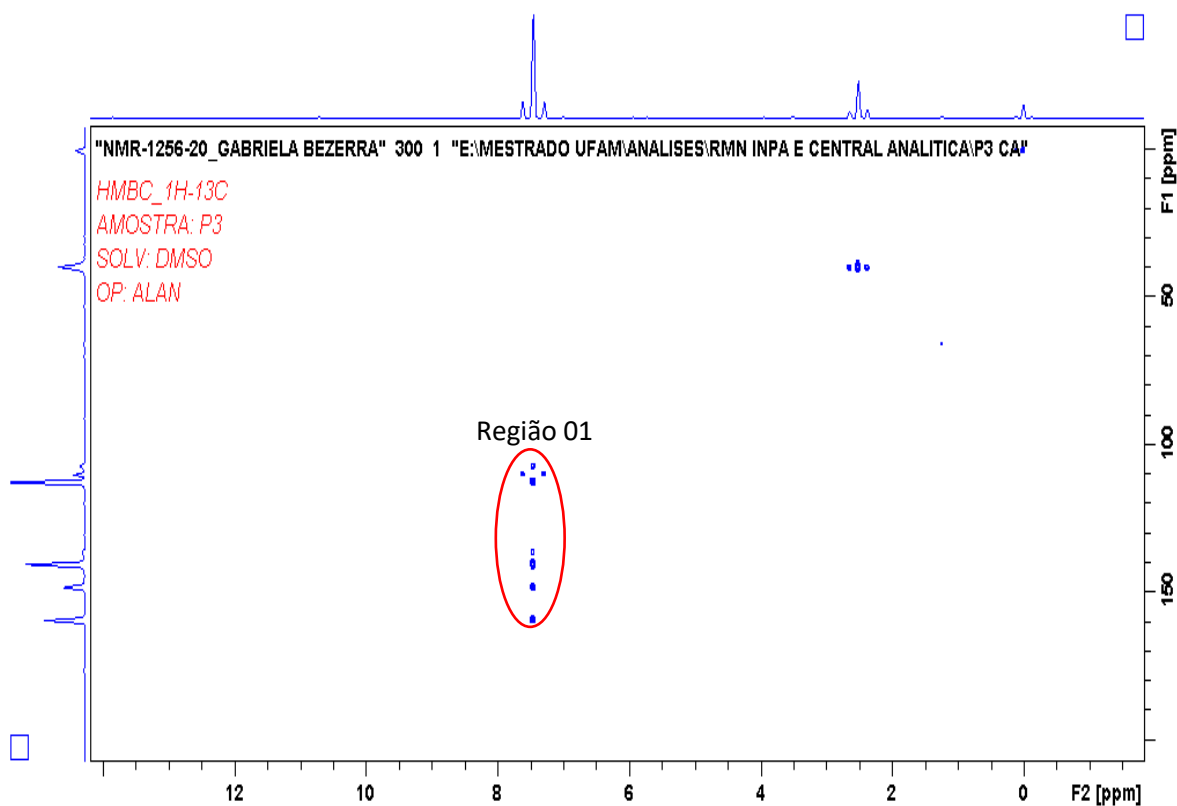


Figura 78. Espectro de HSQC da substância P3.

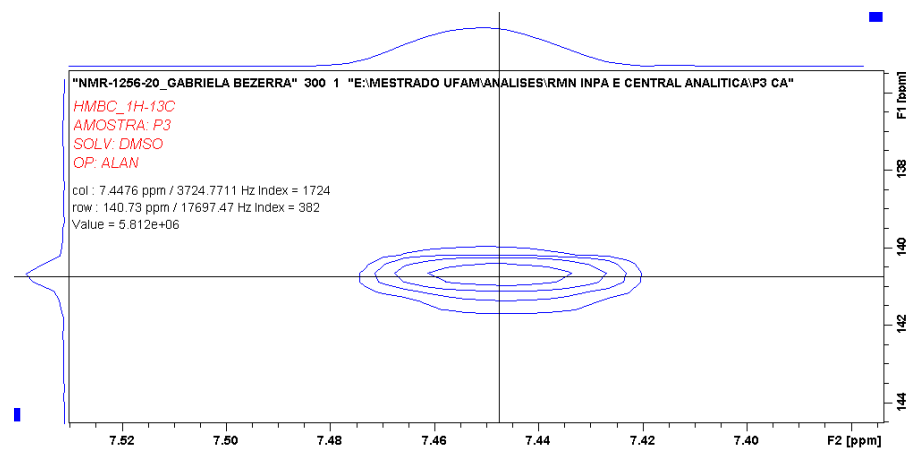
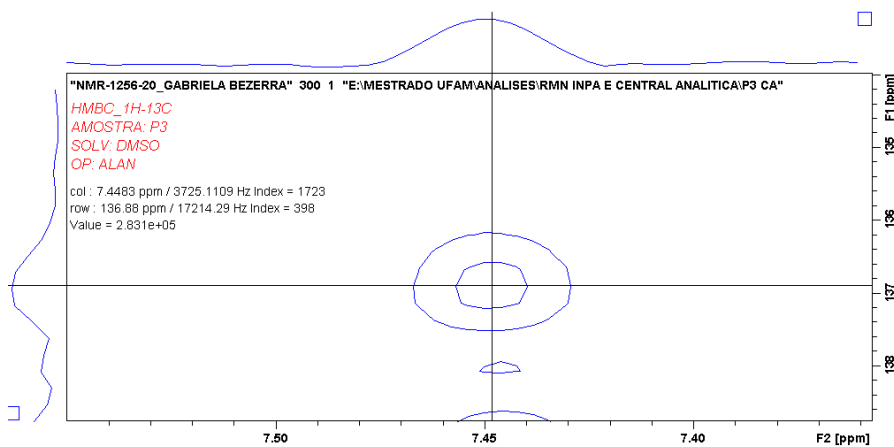
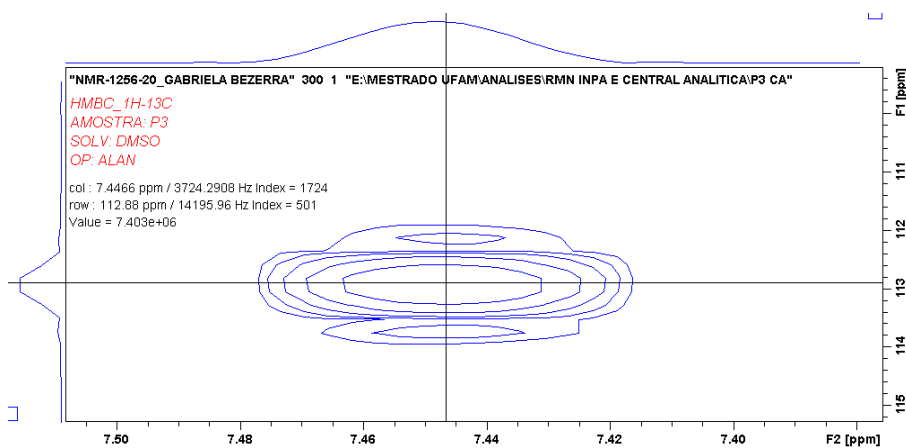
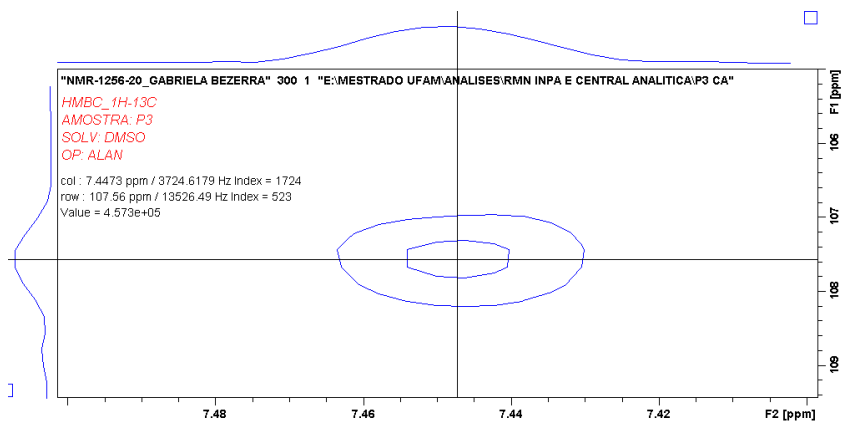


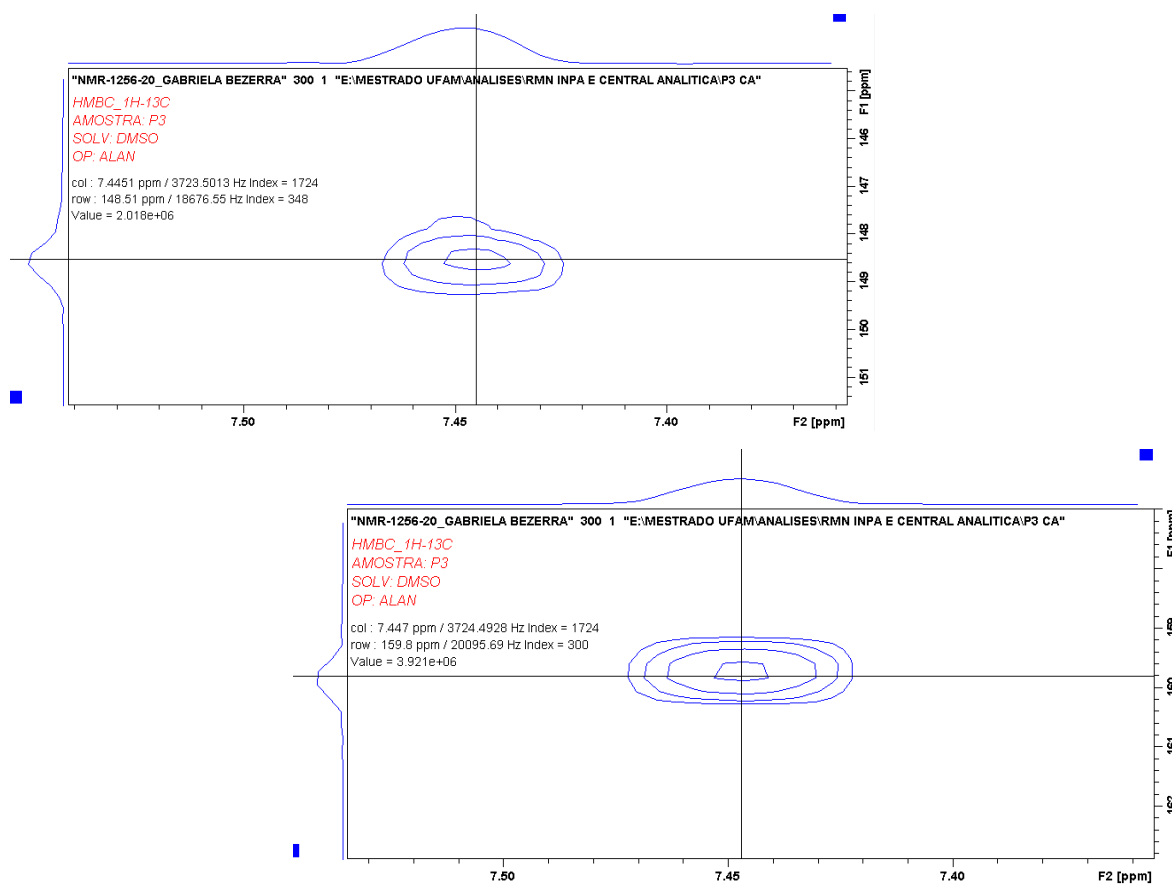
**Figura 79.** Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 01.

O espectro bidimensional HMBC (acoplamento de longa distância) da P3 (Figura 80, tabela 13), pode nos mostrar a presença dos carbonos existentes na substância, como também suas respectivas correlações à longa distância entre os hidrogênios em  $\delta$ H 7,44 e os Carbonos  $\delta$ C 107,6;  $\delta$ C 112,6;  $\delta$ C 136,9;  $\delta$ C 140,7;  $\delta$ C 148,6 e  $\delta$ C 159,8.



**Figura 80.** Espectro de HMBC da substância P3.



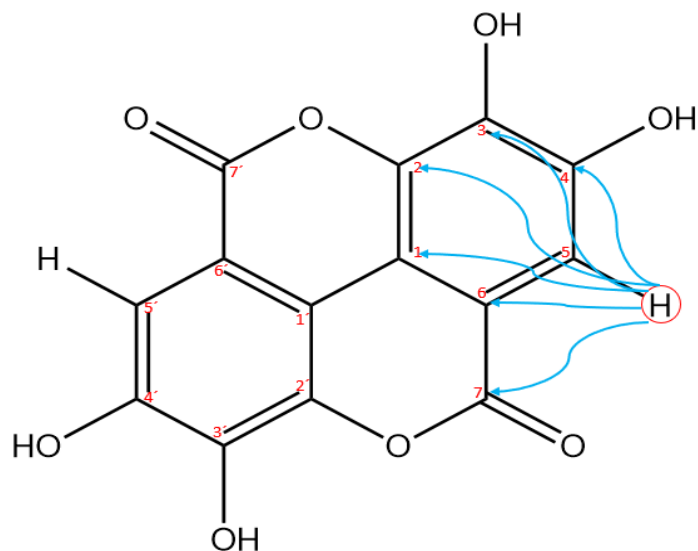


**Figura 81.** Espectro de HMBC suas correlações e ampliações, região 01.

**Tabela 13:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  incluindo correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, para a substância P3, comparados com dados da literatura\* (ALVES, 2007).

	$^{13}\text{C}^*$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}^*$	$^1\text{H}$	Multiplicidade	HMBC
<b>1,1'</b>	112,3	112,8	-	-	-	-
<b>2,2'</b>	136,3	136,9	-	-	-	-
<b>3,3'</b>	139,7	140,7	-	-	-	-
<b>4,4'</b>	148,0	148,6	-	-	-	-
<b>5,5'</b>	110,1	110,5	7,45	7,44	2H(s)	C1; C2; C3; C4; C6 e C7
<b>6,6'</b>	107,4	107,6	-	-	-	-
<b>7/7'</b>	159,1	159,8	-	-	-	-

Em combinação com o RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , espectro bidimensional 2D (HSQC e HMBC) e de análise elementar do íon e sua respectiva fragmentação no MS/MS $^-$ , podemos perceber as correlações em comparação com os dados da literatura que permitiram confirmar a P3 como sendo o ácido elágico (ALVES, 2007).



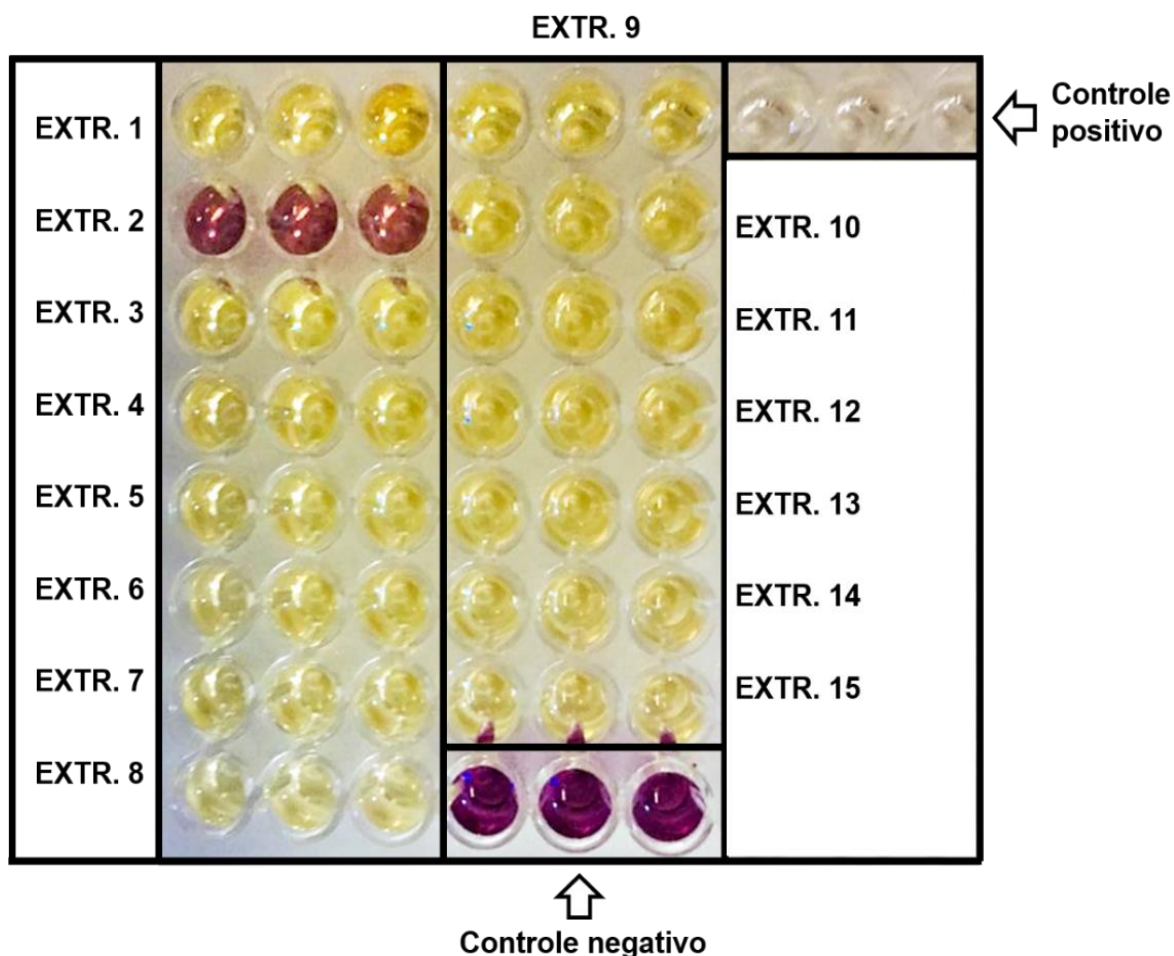
**Figura 82.** Proposta estrutural para o ácido elágico e correlação HMBC.

#### 5.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH *in vitro*.

Entre os vários métodos *in vitro* utilizados para avaliar a atividade antioxidante de amostras de interesse, o método DPPH é mais rápido, mais simples e mais barato que outros modelos de teste (ALAM, BRISTI e RAFIQUZZAMAN, 2013). Nesse sentido, foi determinada a porcentagem de inibição do radical livre pré-formado (sem o parâmetro do  $\text{CE}_{50}$ ) pelos extratos utilizados de *C. villosum*.

Por meio da avaliação da atividade antioxidante empregando esse ensaio colorimétrico *in vitro* (Figura 83) foi possível obter inibição da oxidação do radical resultando na descoloração do reagente DPPH $^{\cdot}$  pelos extratos das cascas do caule de *C. villosum*. Foi possível obter alta porcentagem total de inibição entre 91,3 a 95,3% para a maioria dos extratos, com exceção do extrato 2 (46,0%) a base de água. Já para as substâncias isoladas foi possível obter as porcentagens totais de inibição em 76,7% para a P1, 75,4% para a P2 e 73,2% para a P3 (Figura 84, tabela 15).





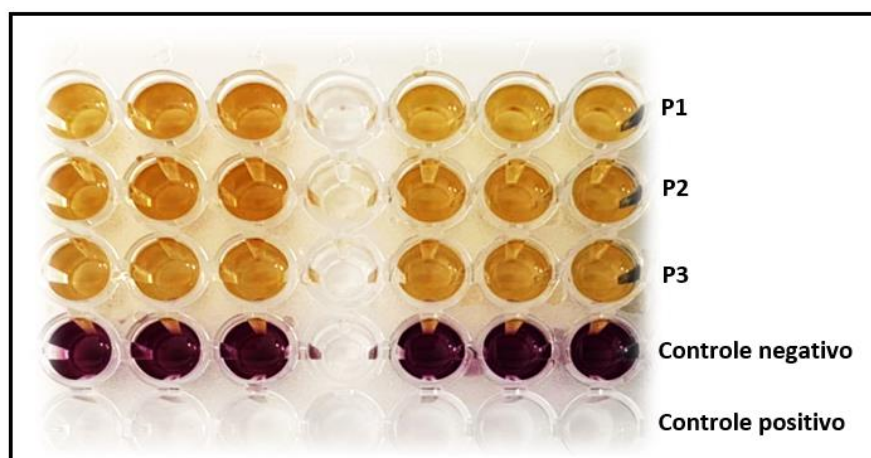
**Figura 83.** Ensaio colorimétrico do sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> dos extratos das cascas do caule de *C. villosum*, mostrando o controle negativo (DPPH com MeOH) e controle positivo (DPPH com o antioxidante ácido gálico).

Não foi possível obter a concentração efetiva do extrato 2, pois o mesmo apresentou inibição do radical DPPH<sup>•</sup> inferior a 50%, possivelmente devido à falta de solubilização do mesmo. De modo geral, os valores de CE<sub>50</sub> evidenciam que é necessário pequenas quantidades dos extratos para obter uma atividade antioxidante acima de 50% (Tabela 14). Dentre todos os extratos, a melhor atividade antioxidante pelo método DPPH foi comprovada para o extrato 8 (acetato de etila) com CE<sub>50</sub> de  $3,40 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$  de concentração efetiva.

**Tabela 14.** Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH expresso em porcentagem total de inibição e pelo parâmetro do CE<sub>50</sub>.

Amostra	AA %	CE <sub>50</sub> (µg.mL)
extrato 1	91,3	4,30 ± 0,31
extrato 2	46,0	ND
extrato 3	95,3	6,50 ± 0,30
extrato 4	93,5	7,20 ± 0,31
extrato 5	95,1	4,50 ± 0,30
extrato 6	92,4	4,50 ± 0,28
extrato 7	93,8	3,80 ± 0,28
extrato 8	95,0	3,40 ± 0,26
extrato 9	94,9	4,10 ± 0,28
extrato 10	91,8	6,70 ± 0,30
extrato 11	93,5	6,30 ± 0,30
extrato 12	93,3	5,95 ± 0,29
extrato 13	93,4	6,80 ± 0,56
extrato 14	94,0	5,75 ± 0,44
extrato 15	93,0	6,95 ± 0,67

**Legenda:** ND – não determinado; AA – atividade antioxidante



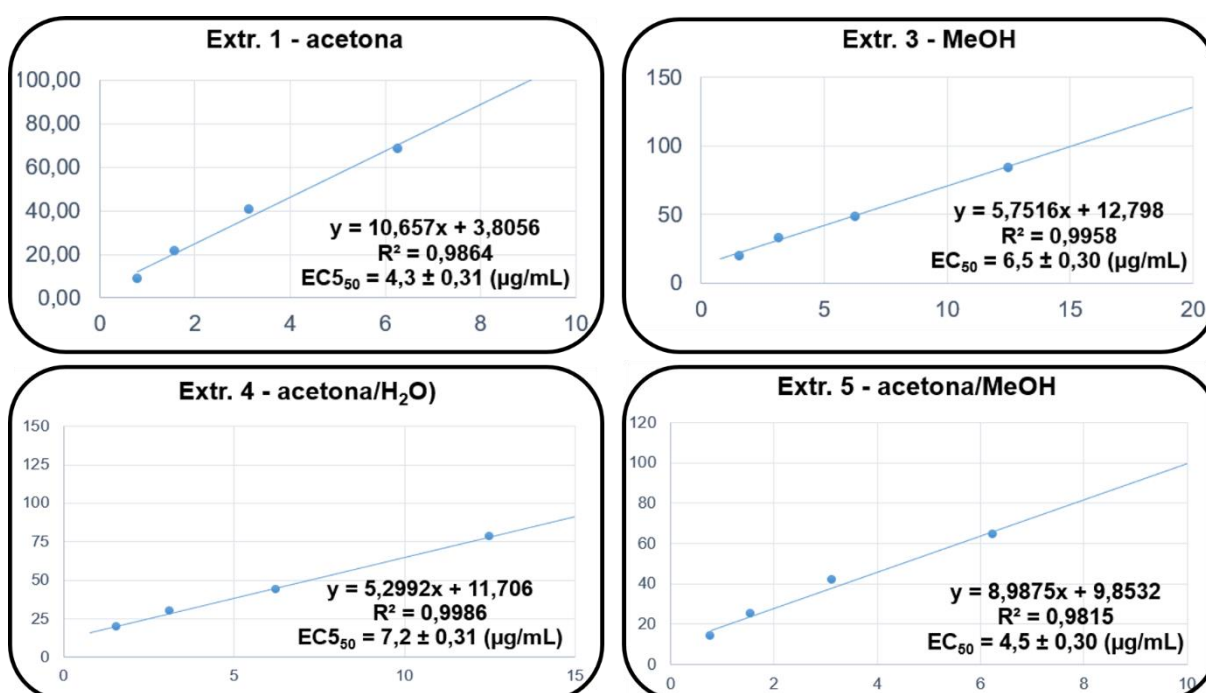
**Figura 84.** Ensaio colorimétrico do sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> das substâncias isoladas (P1, P2 e P3) das cascas do caule de *C. villosum*.

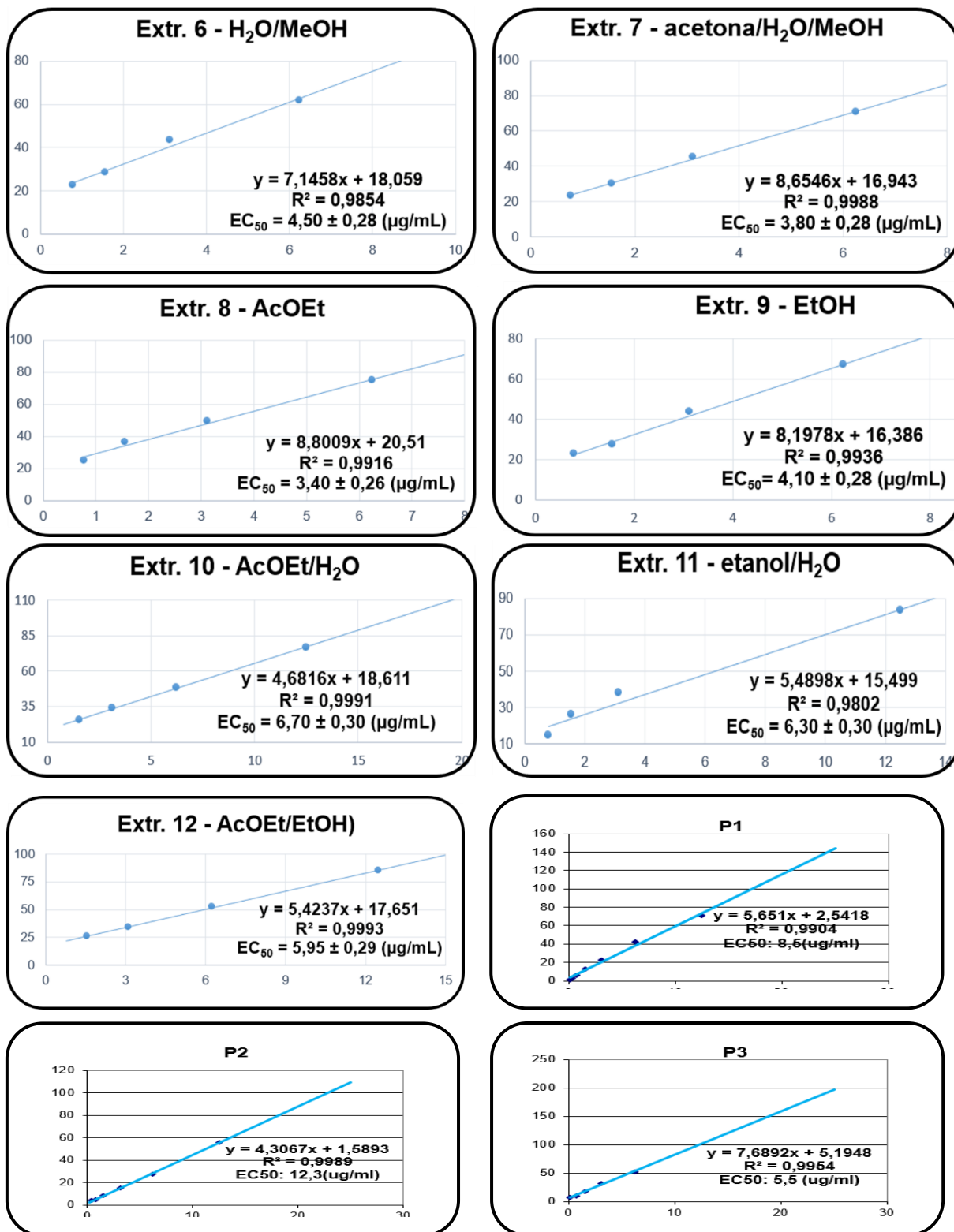
As substâncias isoladas apresentaram o com  $CE_{50}$  de  $8,5 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$  para a P1,  $CE_{50}$  de  $12,3 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$  para a P2 e  $CE_{50}$  de  $5,6 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$  para a P3 de concentração efetiva.

**Tabela 15.** Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH expresso em porcentagem total de inibição e pelo parâmetro do  $CE_{50}$  para as substâncias isoladas.

Amostras	AA%	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
P1(3,6-di-O-galoil-D-glicose)	76,7	$8,5 \pm 0,1$
P2(Ácido elágico ramnosídeo)	75,4	$12,3 \pm 2,0$
P3(Ácido elágico)	73,2	$5,6 \pm 0,0$

Os resultados expressos pelo parâmetro do  $CE_{50}$  (Figura 35), mostram a variável y, sendo a porcentagem (>50%) de inibição dos extratos de *C. villosum* pela qual é referente à quantidade mínima de amostra antioxidante suficiente para inibir o radical DPPH• em 50%. As curvas de calibração a seguir mostram a equação da reta, o coeficiente de regressão linear e os  $CE_{50}$  dos analitos com seus respectivos desvios padrão.





**Figura 85.** Curvas de calibração dos extratos e substâncias do *C. villosum* que apresentaram atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Não foram encontrados estudos que relatem o potencial antioxidante utilizando a mesma parte da planta (cascas do caule) para outras espécies que compõem o gênero *Caryocar*. Entretanto, alguns estudos relatam a atividade de outras partes diferentes das espécies deste gênero pelo método do DPPH.

Com base nos estudos da literatura expressando o resultado do potencial antioxidante DPPH em porcentagem total, o estudo de Ferreira (2019) obteve inibição do radical acima de 90% em todos os extratos testados (aquoso, etanólico, hexânica, diclorometano e acetato de etila) para a espécie *C. brasiliense* Camb. Foi encontrado outro estudo em que foi relatado atividade antioxidante para o extrato aquoso do fruto em diferentes condições obtendo baixa atividade (3,07 a 29,48 %) dessa mesma espécie (MACHADO *et al.*, 2015).

Algumas espécies do gênero apresentaram potencial antioxidante menor comparado ao da espécie alvo desse estudo pelo método do DPPH expresso pelo parâmetro do CE<sub>50</sub>, tais como as folhas de *C. coriaceum* (CE<sub>50</sub> 10,21 mg.mL) (OLIVEIRA *et al.*, 2017), e para os extratos da polpa do fruto de uma espécie não identificada - *Caryocar spp* (533,6 - 1542,7 µg.mL) (TORRES<sup>b</sup> *et al.*, 2016),

Os estudos abordando a atividade antioxidante expressa pelo parâmetro do CE<sub>50</sub> pelo método do DPPH mostra que a espécie *C. brasiliense* apresenta algumas partes com propriedade considerável de eliminação do radical livre, tais como as folhas (CE<sub>50</sub> 58,0 µg.mL) (PAULA-JUNIOR *et al.*, 2006), óleo da polpa do fruto (CE = 26,26 µg.mL) (ROLL *et al.*, 2018); cascas dos frutos (CE<sub>50</sub> = 69,16 - 37,96 µg.mL) (MONTEIRO *et al.*, 2015), polpa (CE<sub>50</sub> = 188,50 e 15,54 mg.mL) (MORAIS *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2011) e o extrato das sementes mais a polpa (CE = 298,75 µg.mL) (ROESLER *et al.*, 2007).

Todavia, outros estudos mostraram ação antioxidante similar em relação ao da espécie estudada nesse trabalho, como o trabalho de Lacerda e colaboradores (2017) que avaliaram a atividade antioxidante das folhas de *C. coriaceum* obtendo CE = 9,0 µg.mL<sup>-1</sup> e o estudo de Roesler e colaboradores (2007) com as cascas do fruto de *C. brasiliense* mostrou CE = 9,44 µg.mL.

Outro estudo mostrou que o extrato etanólico dos frutos da espécie *C. villosum* apresentou atividade promissora pelo método do DPPH (7,95 µg/mL) (YAMAGUCHI *et al.*, 2017), sendo um valor similar ao da *C. villosum* nesse estudo.

Nesse mesmo estudo, foi comprovado a atividade antioxidante para as substâncias isoladas de *C. villosum*, tais como o ácido elágico (4,1 µg/mL) e ácido gálico (CE = 3,50 µg.mL), sendo estas, as mesmas substâncias identificadas na composição química das cascas do caule dessa espécie.

Além disso, outros trabalhos realizaram a identificação dos constituintes da polpa de *C. villosum* e constataram grandes quantidades de ácido elágico e ácido gálico (NASCIMENTO-SILVA, 2019; YAMAGUCHI *et al.*, 2017; CHISTÉ *et al.*, 2012), tendo influência na ação antioxidante dos extratos testados contra os radicais livres  $O_2^{\cdot-}$  (CE = 15,0 µg/mL),  $H_2O_2$  (CE = 4,0 µg/mL) e HOCl (CE = 3,6 µg/mL) (CHISTÉ *et al.*, 2012).

Além desses, outros compostos fenólicos que compõem misturas (extratos de plantas) apresentam poder antioxidante individual, onde o trabalho de Pereira e colaboradores (2009) mostrou a ação dessa classe de substância pelo método do DPPH.

Com isso, a atividade antioxidante tem forte correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a capacidade de sequestro de radicais DPPH pelas amostras (CHEN *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2014; ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013; KIM *et al.*, 2006). Desta forma, é possível unificar o potencial antioxidante dos extratos e das substâncias isoladas de *C. villosum* com a concentração de substâncias fenólicas.

É importante ressaltar que as substâncias identificadas por meio da análise de EM e RMN, tais como ácido gálico e o ácido elágico apresentam atividade antioxidante, bem como outras propriedades farmacológicas conforme a literatura.

É comprovado que o ácido gálico apresenta atividade citotóxica, anti-inflamatória, anti-acetilcolinesterase, antimicrobiana, atividade gastroprotetora dentre outras (KAHKESHANI *et al.*, 2019). Já o ácido elágico é relatado como antimicrobiano, antimutagênico, anti-inflamatório, bem como demonstrou ser um potente agente anticarcinogênico (VATTEM & SHETTY, 2005).

Com isso, as substâncias fenólicas caracterizadas nos extratos de *C. villosum*, por meio da técnica de EM e RMN corroboram com os resultados obtidos pela análise antioxidante. Algumas pesquisas realizadas com as mesmas substâncias fenólicas caracterizadas neste trabalho, apresentaram atividade

promissora *in vitro* para o ensaio do DPPH por meio do isolamento em extratos de outras espécies vegetais, tais como ácido gálico (BHADORIYA, SHARMA e SOLANKI, 2012), ácido elágico (AHER *et al.*, 2009), 1,2,3,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (JING *et al.*, 2009), 3,6-di-O-galoil-D-glicose (HSU *et al.*, 2012).

## 6. CONCLUSÃO

Por meio da análise quimiométrica foi possível selecionar os extratos do primeiro triângulo de Snyder (acetona, metanol e água) para a caracterização química das substâncias com base no padrão de fragmentação e comparação com os dados da literatura. Podemos verificar que o extrato metanólico continha nossas substâncias de interesse em maior concentração em relação aos demais extratos.

Através da análise preliminar da determinação do teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu pode-se constatar quantidades consideráveis de substâncias fenólicas nos extratos entre 20,2 a 36,9%, com maior conteúdo para o extrato AcOEt/H<sub>2</sub>O/EtOH, com 329,4 µg GAE/g. Essas quantidades consideráveis do teor de compostos fenólicas devem-se ao fato de que todos os extratos analisados apresentaram quantidades significativas de substâncias fenólicas.

Após essa análise preliminar foi possível a realização de análise por EM, sendo caracterizadas 7 substâncias fenólicas através do padrão de fragmentação, sendo elas o ácido gálico, ácido elágico, ácido elágico ramnosídeo, a dilactona do ácido valônico, 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose, 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose e 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil-β-*D*-glicose. Dentre as substâncias tentativamente caracterizadas a dilactona do ácido valônico, foi identificada pela primeira vez na parte da planta estudada, já 3,4,6-tri-*O*-galoil-*D*-glicose e 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil-β-*D*-glicose podem ser consideradas inéditas para a espécie analisada.

A investigação fitoquímica do extrato metanólico das cascas do caule do *C. villosum*, possibilitou o isolamento e identificação de três fenólicos, ambos já caracterizados anteriormente com o uso da técnica MS/MS, e agora confirmados por RMN como sendo o ácido elágico, ácido elágico ramnosídeo e 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose. Essas substâncias podem ser consideradas marcadores para a espécie, visto que as mesmas foram identificadas em todos os extratos da casca do caule, diferindo apenas em concentração e nas demais partes da espécie em estudo.

Das três substâncias isoladas, duas delas (ácido elágico e 3,6-di-*O*-galoil-*D*-glicose) são os íons responsáveis pela separação dos grupos I e III na análise quimiométrica, na qual podemos perceber que a análise química ajudou de forma



assertiva para planejar e selecionou experimentos de forma otimizada para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos.

O potencial antioxidante de todos os extratos foi testado e comprovou-se que a maioria dos extratos apresentaram percentual total de inibição entre 91,3 a 95,3% para, com exceção do extrato 2 (46,0%), que não solubilizou. Dentre todos os extratos, a melhor atividade antioxidante foi observada para o extrato 8 (acetato de etila) com  $CE_{50}$  de  $3,40 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$  de concentração efetiva, logo podemos perceber que o bom percentual de inibição deve-se possivelmente ao fato de que esses extratos contenham as substâncias isoladas como o 3,6-di-O-galoil-D-glicose com o  $CE_{50}$  de  $8,5 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$ , o ácido elágico ramnosídeo com  $CE_{50}$  de  $12,3 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$  e o ácido elágico com e  $CE_{50}$  de  $5,6 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$  de concentração efetiva, que também obtiveram um bom potencial de inibição. Confirmando que essas substâncias além de serem os marcadores da espécie *Caryocar Villosum*, também são excelentes antioxidantes. Ressaltando a importância desse estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D.J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- AHER, A.N.; PAL, S.C.; YADAV, S.K.; PATIL, U.K. BHATTACHARYA, S. Antioxidant Activity of Isolated Phytoconstituents from *Casuarina equisetifolia* Frost (Casuarinaceae). **Journal of Plant Sciences**, v. 4, p.15-20, 2009.
- AHMED, E.; ARSHAD, M.; KHAN, M. Z.; AMJAD, M. S.; SADAF, H. M.; RIAZ, I.; SABIR, S.; SABAOON, A. N. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 2, p. 205-214, 2017.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.
- ALMEIDA, M. R.; AISSA, A. F.; DARIM, J. D. C.; GOMES, T. D. U.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P. Effect of Piquiá (*Caryocar Villosum*) Pulp Fruit on Oxidative Stress, Epx2 and Tp53 Gene Expressions in Liver of Rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 82, 2012.
- ALMEIDA, M. R.; AISSA, A. F.; GOMES, U. H.; DARIN, J. D. C.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P. *In Vivo* Genotoxicity and Oxidative Stress Evaluation of an Ethanolic Extract from Piquiá (*Caryocar villosum*) Pulp. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 3, p. 268–271, 2013.
- ALMEIDA, M. R.; AISSA, A. F.; URSULA HERMOGENES GOMES, T. D.; DARIN, J. D. C.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P. *In Vivo* Genotoxicity and Oxidative Stress Evaluation of an Ethanolic Extract from Piquiá (*Caryocar villosum*) Pulp. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 3, p. 268-271, 2013.
- ALMEIDA, A. S.; MACEDO, E. S.; SILVA, D. C. G.; SILVA, I. J. M.; FARIAS, E.; SANTOS, C. R. O. Oil of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) extraction methods, chemical constitution and medicinal properties **Diversitas Journal**, v. 3, n. 3, p. 557-563, 2018.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, n, 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, Clayton Queiroz; David, J.M.; David, J.P.; Lima, L. da Silva; Brandão, H.N. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos & Ciência**(online), V.12, p.81-89, 2007.

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

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J.; BOAVENTURA, M. A. D. Phytochemical and biological investigations of *Caryocar brasiliense* Camb. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 9, p. 20-28, 2010.

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The phytochemistry and biological aspects of Caryocaraceae Family. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 293-308, 2013.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p.385-396, 2004.

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

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

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

BASTOS, L. M.; SILVA, F. M. A.; SOUZA, L. R. S.; SÁ, I. S. C.; SILVA, R. M.; SOUZA, A. D. L.; NUNOMURA, R. C. S. Integrative Approach Based on Simplex-Centroid Design, ESI-MS and Chemometric Analysis for Comprehensive Characterization of Phenolic Compounds from *Endopleura uchi* Bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 351-356, 2020.

BERARDINI, N.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Communications in mass spectrometry**, v. 18, p. 2208–2216, 2004.

BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U; QUIRINO, M. S; CHAGAS JUNIOR, A. F; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BEZERRA, J. C.; SILVA, I.; FERREIRA, H.; FERRI, P.; SANTOS, S. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.

BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 875-880, 2015.

BHADORIYA, P.; SHARMA, P.; SOLANKI, S. S. S. *In Vitro* Free Radical Scavenging Activity of Gallic Acid Isolated from *Caesalpinia Decapetala* Wood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 2, p. 833-836, 2012.

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

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p.1-7, 2019.

CHAKRABORTY, S.; BASU, S. Multi-functional activities of citrus flavonoid narirutin in Alzheimer's disease therapeutics: An integrated screening approach and in vitro validation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 733-743, 2017.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C. I.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-64, 1998.

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

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

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC–DAD–MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884–5892, 2012.

CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A. Z.; FERNANDES, E. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1740–1749, 2012.

CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Efficiency of Different Solvents on the Extraction of Bioactive Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum* and the Effect on its Antioxidant and Colour Properties. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 364-372, 2013.

CORDEIRO, M. W. S.; CAVALLIERI, A. L. F.; FERRI, P. H.; NAVES, M. M. V. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de *Caryocar brasiliense* nativo do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1127-1139, 2013.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New Botanical Garden, 1988. p. 503-517.

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

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

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

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

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 3ª edição. London: West Sussex John Wiley & Sons, p. 539, 2009.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DICKINSON, W. C. A study of the floral morphology and anatomy of the Caryocaraceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 117, n. 2, p. 123-137, 1990.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 177, p. 1-7, 2014.

ESBENSEN, K.; GELADI, P. The start and early history of chemometrics – selected interviews. **Journal of Chemometrics**. 1990, v. 4, n. 6, p. 389-412, 1990.

ESCOBAR, J. L.; ANDRIGHETTI, C. R.; RIBEIRO, E. B.; VALLADÃO, D. M. S. Desenvolvimento de sabonetes em barra contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 2, 2016.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVEZ, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Química Nova**, v. 21, p. 16-19, 1998.

FATHONI, E.; SAEPUDIN, A. H.; CAHYANA, D. U. C. RAHAYU, J. H. Identification of Nonvolatile Compounds in Clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado A. **AIP Conference Proceedings**, v. 1862, n. 1, p. 1-10, 2017.

FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, C. G.; FAZA, L. P.; ALMEIDA, A.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L.; GRAZUL, R. M.; HYARIC, M. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5875–5885, 2011.

FIGUEIREDO, P. R. L.; OLIVEIRA, I. B.; NETO, J. B. S.; OLIVEIRA, J. A.; RIBEIRO, L. B.; VIANA, G. S. B.; ROCHA, T. M.; LEAL, L. K. A. M.; KERNTOPF, M. R.; FELIPE, C. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. Caryocar coriaceum Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, n.191, p.87-94, 2016.

FRANCISCO, M. L. L.; RESURRECCION, A. V. A. Development of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, v. 117, p. 356-363, 2009.

GAN, R. Y.; KONG, K. W.; LI, H. B.; WU, K.; GE, Y. Y.; CHAN, C. L.; SHI, X. M.; CORKE, H. Separation, Identification, and Bioactivities of the Main Gallotannins of Red Sword Bean (*Canavalia gladiata*) Coats. **Frontiers in Chemistry**, v. 28, p. 1-10, 2018.

GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319–5341, 2012.

HADJIGOGOS, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Panminerva Med.**, v. 45, p. 7–13, 2003.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliense* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 1-2, 2002.

HOPKINS, M. J. G. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p. 9-25, 2005.

HSU, F. L.; HUANG, W. J.; WU, T. H.; LEE, M. H.; CHEN, L. C.; LU, H. J.; LIN, M. H. Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Polyphenolics from Pods of *Caesalpinia pulcherrima*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6073–6088, 2012.

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

JAISWAL, H.; SINGH, O. J.; CHAUHAN, A.; SAHU, M. K.; PRAKASH, S. A review on tannins. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 6, n. 3, p. 16-17, 2018.

JI, H. F.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia. **EMBO Reports**, v. 10, p. 194-200, 2009.

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, n. 287, p. 1-12, 2015.

JING, P. M.; KYOUNG AH, K. K.; RUI, Z.; OK, K. D.; HONG, W. Z.; HWA, L. K.; YOUNG, C. W.; SUNGWOOK, C.; YOUNGHEUN, J.; TAEKYUN, S.; WOO, P. J.; HO, L. N.; WON, H. J. Antioxidant properties of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose from *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p.412-418, 2009.

JOHNSON, A. R.; VITHA, M. F. Chromatographic selectivity triangles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 4, p. 556-586, 2011.

KADIRI, O. A review on the status of the phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour: Effects of cereal processing. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 798-809, 2017.

KAHKESHANI, N.; FARZAEI, F.; FOTOUHI, M.; ALAVI, S. S.; BAHRAMSOLTANI, R.; NASERI, R.; MOMTAZ, S.; ABBASABADI, Z.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H.; BISHAYEE, A. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 225-237, 2019.

KAWANISHI, K.; RAFFAUF, R. F. *Caryocar microcarpum*: an ant repellent and fish poison of the northwest Amazon. **Journal of Natural Products**, v.49, p.1167-1168, 1986.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**. v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; FELIPE, C. F. B.; ALMEIDA, W. O.; MENEZES, I. R. A.; FERNANDES, G. P.; LEMOS, I. C. S. Óleo de pequi (*Caryocar*

*coriaceum* w.) e a potencial atividade cardioprotetora. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, p. 117-125, 2013.

KERR, E. W.; SILVA, F. R.; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 169-171, 2007.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for the analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328–2375, 2013.

KIM, D.; CHUN, O.; KIM, Y.; MOON, H.; LEE, C. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6509-6515, 2003.

KIM, H. J.; KIM, E. J.; SEO, S. H.; SHIN, C. G.; JIN, C.; LEE, Y. S. Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gardeniae fructus*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 4, p. 600-603, 2006.

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

LACERDA NETO, L. J.; RAMOS, A. G. B.; KERNTOPF, M. R.; COUTINHO, H. D. M.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MENEZES, I. R. A. Modulation of antibiotic activity by the hydroalcoholic extract from leaves of *Caryocar coriaceum* WITTM. **Natural Product Research**, v. 32, n.4, p. 477–480, 2017.

LEE, J. H.; JOHNSON, J. V.; TALCOTT, S. T. Identification of Ellagic Acid Conjugates and Other Polyphenolics in Muscadine Grapes by HPLC-ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 6003–6010, 2005.

LEITE, G. L. D.; VELOSO, R. V. D.; ZANUNCIO, J. C.; FERNANDES, G. W. F.; ALMEIDA, C. I. M.; FERREIRA, P. S. F.; ALONSO, J.; SERRÃO, J. E. Cardinal distribution of sucking insects in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in e Cerrado (Brazil). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 41, n. 1, p. 105-111, 2015.

LI, X. C.; ELSOHLY, H. N.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M.; NMR assignments of ellagic acid derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 856 - 859, 1999.

LIMA<sup>a</sup>, A.; OLIVEIRA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.



LING, Sui-Kiong; Takashi Tanaka; Isao Kouno. New Cyanogenic and Alkyl Glycoside Constituents from *Phyllagathis rotundifolia*. **Journal of Natural Products**, 65, 131-135, 2002.

LINLIN, Y.; PEIPEI, Y.; CHAO, M.; YUJUN, L. Method Development and Validation for Pharmacokinetic and Tissue Distributions of Ellagic Acid Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18923-18935, 2014.

LIU, D.; SHI, J.; COLINA IBARRA, A.; KAKUDA, Y.; JUN XUE, S. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1344–1349, 2008.

LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. **Molecules**, v. 24, n. 4132, p. 1-25, 2019.

MACHADO, M. T.; MELLO, B. C.; HUBINGER, M. D. Evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) aqueous extract quality processed by membranes. **Food and Bioproducts Processing**. v. 95. p. 304-312, 2015.

MACIEL, Karen Medeiros. Estudos químicos de extratos bioativos de piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.). **Semantic Scholar**. Dd, Ufam, 2018.

MAGID<sup>a</sup>, A. A.; VOUTQUENNE, L.; HARAKAT, D.; POUNY, I.; CARON, C.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar villosum*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.919 - 926, 2006.

MAGID<sup>b</sup>, A. A.; VOUTQUENNE, L.; MORETTI, C.; CHRISTOPHE, L.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar villosum*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.196-205, 2006.

MAGID, A. A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; MOROY, G.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Phenolic Glycosides from the Stem Bark of *Caryocar villosum* and *Caryocar glabrum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 914-917, 2008.

MAGID<sup>c</sup>, A. A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; RENIMEL, I.; HARAKAT, D.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Caryocar villosum*. **Phytochemistry**. v.67, p.2096 - 2102, 2006.

MAGWAZA, L. S.; OPARA, U. L.; CRONJE, P. J. R.; LANDAHL, S.; ORTIZ, J. O.; TERRY, L. A. Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds. **Food Science & Nutrition**, v. 4, p. 4–10, 2016.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 574-576, 2008.

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

MARTINS, R. L.; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 37-45, 2007.

MARX, F.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A**, v.20, p.442-444. 1997.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S.; LEWI, P. J.; VERBEKE-SMEYERS, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics**. Elsevier: Amsterdam, 1998; Elsevier: Amsterdam. 1997, 867 p.

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

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly) phenolic Compounds in Pomegranate (*Punicagranatum* L.) Juice by UHPLC-MS<sup>n</sup>. **Molecules**, v. 17, p. 14821–14840, 2012.

MINATEL, I. O.; BORGES, C. V.; FERRIERA, M. I.; GOMEZ, H. A. G.; CHEN, C. Y. O.; LIMA, G. P. P. **Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability**, Ed. InTech. Rijeka, Croatia, 2016.

MIRANDA-VILELA, A. L.; GRISOLIA, C. K.; RESCK, I. S.; MENDONÇA, M. A. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2310-2313, 2009.

MONTEIRO, S. S.; SILVA, R. R.; SILVA, M. S. C.; BARIN, J. S.; ROSA, C. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). **International Food Research Journal**, v. 22, n. 5, p. 1985-1992, 2015.

MORAIS, M. L.; SILVA, A. C. R.; ARAUJO, C. R. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2013.

MOURA, L. R.; MARTINS, A. C.; VAZ, L. A. R.; ORPINELLI, S. R. T.; SILVA, T. L.; FALEIRO, M. B. R.; SANTOS, S. C.; MOURA, V. M. B. D. Extrato hidroalcoólico da

casca do pequi (*Caryocar brasiliense*) em ratos submetidos à aplicação de doxorubicina. **Revista Ciências rural**, v. 43, n. 1, p. 100- 106, 2013.

NASCIMENTO-SILVA, N. R. R.; NAVES, M. M. V. Potential of Whole Pequi (*Caryocar spp.*) Fruit—Pulp, Almond, Oil, and Shell—as a Medicinal Food. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 9, p. 952-962, 2019.

NASCIMENTO, W. M.; FILHO, A. L. M.; COSTA, C. L. S.; MARTINS, M.; ARAÚJO K. S. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*). **ConScientiae Saúde**. 14, n. 3, p. 449-455, 2015.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2a ed., Campinas: UNICAMP, p. 313-319, 2001.

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

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

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO JUNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Resposta - Parte II: Variáveis de Mistura. **Revista virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 1-29, 2018.

NUNES, C. S.; GIL, A. S. B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Caryocaraceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, p. 1281-1283, 2016.

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

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, C. V.; GRIGOLETTO, J.; RIBEIRO, L. R.; FUNCK, V. R.; MEIER, L.; FIGHERAA, M. R.; ROYESA, F. F.; FURIANC, A. F.; MENEZES, I. R. A.; OLIVEIRA, M. S. Anticonvulsant activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. fixed pulp oil against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurological Research**, v. 39, n. 8, p. 667–674, 2017.

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

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; MAIA, A. H. N.; ALVES, R. E.; SANTOS, N. M.; SAMPAIO, F. G. M.; LOPES, M. M. T. Características químicas e físico-químicas de pequis da Chapada do Araripe-CE. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 114-125, 2010.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5: n. 47, p. 1-15, 2016.

PASSOS, X. S.; CASTRO, A. C. M.; PIRES, J. S.; GARCIA, A. C. F.; CAMPOS, F. C.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R. Composition and antifungal activity of essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, p.319-324, 2003.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L. D.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, suppl., p.625-630, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. E VIVIAN, J. S. Introduction to spectroscopy. 4ª edição. **Brooks/ Cole, Cengage Learning**, 2009.

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

PERDIZ, R.; SÃO-MATEUS, W. M. B.; AMORIM, A, M. Flora da Bahia: Caryocaraceae. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 109–113, 2012.

PIROUETTE. **Multivariate Data Analysis**. Version 4.0 Infometrix, Inc. 2008.

PRANCE, G. T. The genus *Caryocar* L. (Caryocaraceae): An underexploited tropical resource. **Advances in Economic Botany**, v. 8, p. 177-188, 1990.

PRANCE, G. T.; MEDEIROS, H. Caryocaraceae. In: FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M. CARVALHO JR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; Zappi, D. (eds), **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. Vol. 1. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, p. 839–840, 2010.

PRATA, V. M.; EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 53-58, 2011.

- He, Q., Shi, B., Yao, K. and Ma, Z. Synthesis of gallotannins. **Carbohydr. Res.** 335: 245-250, 2001.
- He, Z. and Xia, W. Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS. **Food Chem.** 105: 1307-1311, 2007.
- QUIRINO, G. S.; LEITE, G. O.; REBELO, L. M.; TOMÉ, A. R.; COSTA, J. G. M.; CARDOSO, A. H.; CAMPOS, A. R.; Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009.
- RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clin. Chim. Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.
- RAMOS, M. I. L.; UMAKI, M. C. S.; HIANE, P. A.; RAMOS FILHO, M. M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitaminicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.19, n.1, p.23 - 32, 2001.
- REHMAN, S.; KHAN, H. Advances in Antioxidant Potential of Natural Alkaloids. **Current Bioactive Compounds**, v. 13, n. 2, p. 101-108, 2017.
- RENCHER, A. C. **Methods of multivariate analysis**. 2<sup>a</sup> ed.; John Wiley & Sons Inc: New York. John Wiley & Sons Inc.: Chinchester, 2003, 407 p.
- RIBEIRO, J. E. L.; HOPKLINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D. S.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. 236p.
- ROCHA, L. B.; MELO, A. M.; PAULA, S. L. A.; NOBRE, S. A. M.; ABREU, I. N. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, 592-598, 2015.
- RODRIGUES, E.; POERNER; N.; ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; MENDES, C. R.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 911-917, 2011.
- ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 711-717, 2008.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; BARATA, R. H.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. Atividade antioxidante de Frutas do Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53–60, 2007.

ROLL, M. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; LONGO, J. P. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; GRISOLIA, C. K. The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 858–869, 2018.

ROMERO, Adriano Lopes; Fontana, Álvaro; Conceição da Silva, Cleuza. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE *Sloanea garckeana* K. Schum. **Química Nova**, Vol. 31, No. 6, 1359-1361, 2008

ROSA, L. A. L.; MORENO-ESCAMILLA, J. O.; RODRIGO-GARCÍA, J.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Chapter 12 - Phenolic Compounds. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**, p. 253-271, 2019.

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

SHANLEY, P.; CYMERYS, M.; SERRA, M.; MEDINA, G. **Fruit trees and useful plants in Amazonian life**. Rome: FAO: CIFOR: PIP, 2011, p. 139-152, 353 p.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belem: CIFOR, Imazon, 2005, p. 123-132.

SAMANIDOU, V. F. **Basic LC Method Development and Optimization**. Analytical Separation Science, 1ª Edição: Wiley-CVH, 2015.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504-510, 2011.

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

SEGALL, S. D. RASLAN, D. S.; FERRAZ, V. P.; TAKAHASHI, J. A. et al. Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil by electrospray

and tandem mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p.445-452, 2006.

SILVA, F. M. A.; HANNA, A. C. S.; 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. F. Integrative Analysis Based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* Bark Biomass Residues: Determination of Ellagic Acid Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 4, p. 830-836, 2019.

SILVA, L. M. C. **Estudo exploratório de extratos de carquejas por FTIR, CLAE e métodos quimiométricos** Mestrado (Química). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005, 90 p.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from Astronium species by flow injection analysis- electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European journal of mass spectrometry**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2011.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS e UFSC. 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, 486 p.

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

SINGH, A.; BAJPAIA, V.; KUMARA, S.; SHARMAC, K. R.; KUMARA, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 2 p. 239-244, 2016.

SNYDER, L. R.; CARR, P. W.; RUTAN, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**, v. 656, n. 1-2, p. 537-547, 1993.

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

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE. C. B. **Química Orgânica**, volume 1. 9ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

SOUZA, J. P.; ALVES, R. E. A.; BRITO, E. S.; NOGUEIRA, D. H.; LIMA, J. R. Estabilidade de produtos de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) sob congelamento

em diferentes tipos de embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 971-976, 2013.

SOUZA, P.; SALES, P.; SIMEONI, L.; SILVA, E.; SILVEIRA, D.; OLIVEIRA MAGALHÃES, P. Inhibitory Activity of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v. 78, n. 4, p. 393–399, 2011.

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

TAN, Hooi Poya. Phytochemical and Biological Research de *Phyllagathis rotundifolia* e *Phyllagathis praetermissa*. Doctoral Thesis, University of Malaysia, 2012.

TAN, H. P.; LING, S. K.; CHUAH, C. H. Characterisation of Galloylated Cyanogenic Glucosides and Hydrolysable Tannins from Leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 6, p. 516–525, 2011.

THIRUMURUGAN, D.; CHOLARAJAN, A.; RAJA, S. S. S.; VIJAYAKUMAR, R. **An Introductory Chapter: Secondary Metabolites**. sources Appl, p. 1–21, 2018.

TORRE-CARBOT, K.; JAUREGUI, O.; GIMENO, E.; CASTELLOTE, A. I.; RAVENTÓS, R. M. L.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC–MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4331–4340, 2005.

TORRES<sup>a</sup>, L. R. O.; SANTANA, F. C.; LEAL, F. L. T.; MELO, I. L. P.; YOSHIME, L. T.; NETO, E. M. M.; SEELAENDER, M. C. L.; C. M. M. ARAÚJO; COGLIATI, B.; FILHO, J. M. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**. n. 97, p. 205-216, 2016.

TORRES<sup>b</sup>, L. R. O.; SILVA, A. M. O.; LIMA, A. L.; MANCINI-FILHO, J. Phenolic compounds and antioxidant capacity of canned pequi pulp (*Caryocar* spp). **Científica**, v. 44, n. 4, p. 493-501, 2016.

TOZETTO, A.; DEMIATE, I. M.; NAGATA, N. Análise exploratória de adoçantes de mesa via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise por componentes principais (ACP). **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 27, n. 4, p. 723-728, 2007.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, K.; LORIDAS, S. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. **Int. J. Environ. Res. Public Heal**, v. 10, p. 3886–3907, 2013.



VALE, A. F.; FERREIRA, H. H.; BENETTI, E. J.; REBELO, A. C. S.; FIGUEIREDO, A. C. R.; BARBOSA, E. C.; SIMÕES, K. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 257-262, 2019.

VALKO, M.; RHODES, C.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Interact**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S.; The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2019.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234–266, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F, MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 464-471, 2008.

VOIGT, A. R. A.; SOFFIATTI, P.; FILHO, M.; LISI, C. S.; BOEGER, M. R. T. Anatomia comparada do lenho de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) em fisionomias de cerrado e cerrado sensu stricto. **Rodriguésia**, v. 61, n. 4, p. 603-613, 2010.

WILKINS, M. R.; KENDALL, M. J.; WADE, O. L. William Withering and digitalis, 1785 to 1985. **British Medical Journal**, v. 290, p. 7-8, 1985.

WINNING, H.; LARSEN, F.H.; BRO, R.; ENGELSEN, S.B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 190, p. 26–32, 2008.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomed. Pharmacother**, v. 78, p. 39-49, 2016.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L. M. G.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. C. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanol Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, v. 19, p. 16039-16057, 2014.

YAMAGUCHI, K. K.L.; LAMARÃO, C. V.; ARANHA, E. S. P.; SOUZA, R. O. S.; OLIVEIRA, P. D. A.; VASCONCELLOS, M. C.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. HPLC-DAD PROFILE OF PHENOLIC COMPOUNDS, CYTOTOXICITY, ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF THE AMAZON FRUIT *Caryocar villosum*. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 2017.

YISIMAYILI, Z.; GUO, X.; LIU, H.; XU, Z.; ABDULLA, R.; AISA, H. A.; HUANG, C. Metabolic Profiling Analysis of Corilagin *in Vivo* and *in Vitro* Using High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 251-260, 2018.

## APÊNDICE

**Tabela 16.** Dados utilizados na análise ACP com base nas intensidades de pico obtidas entre 100 e 1000  $m/z$ , após eliminação dos sinais que apresentaram intensidades abaixo de 5% do que a intensidade do pico de base.

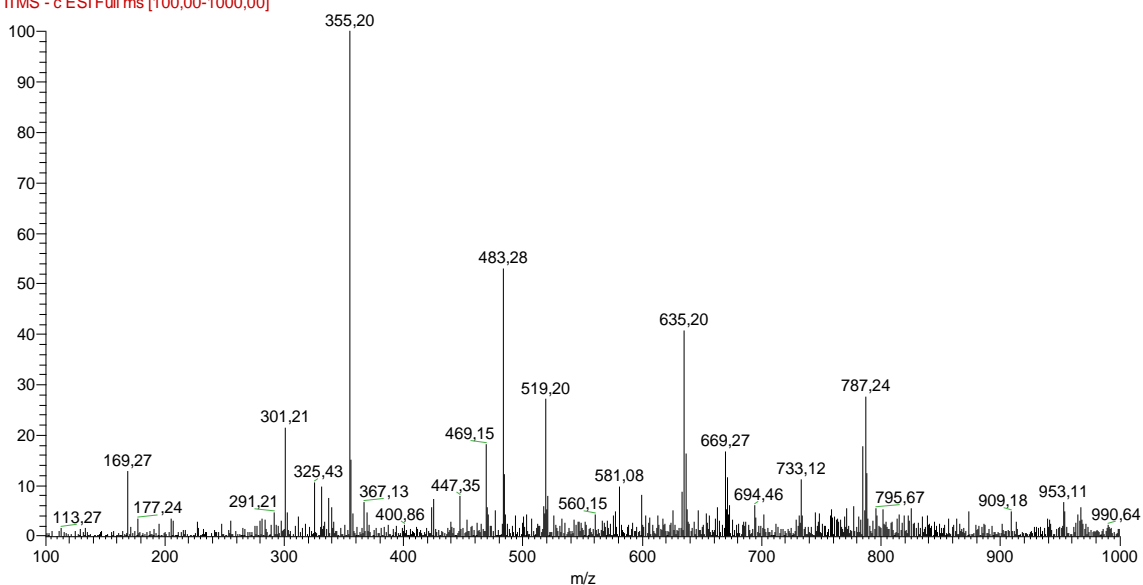
	acetona	água	metanol	acetona/ água	acetona/ MeOH	água/ MeOH	acetona/ H <sub>2</sub> O/MeOH
133	1.54	5.03	1.77	2.56	0.46	2.52	1.52
169	12.78	10.73	18.53	11.87	8.49	8.57	9.98
178	0.48	0.16	6.19	0.08	0.1	0	0.32
191	1.3	6.33	4.54	4.4	2.91	5.9	4.04
205	3.33	4.66	15.8	4.67	1.79	2.8	2.58
215	1.11	2.89	7.27	1.64	0.44	2.39	3.54
255	0	2.07	5.25	2.05	0	1.35	2.95
291	4.67	2.27	7.23	4.49	6.1	4.54	5.75
301	21.5	9.01	61.41	19.22	41.94	13.72	32.45
302	4.53	0.57	4.5	2.2	8.25	1.56	6.7
311	3.84	3.91	8.75	3.69	2.5	1.29	4.89
325	10.51	4.42	12.17	5.22	0	0	0.46
326	0.69	1.01	3.76	0.84	3.99	2.11	5.89
331	9.79	12.04	12.5	5.24	5.01	7.89	7.37
337	7.46	6.82	6.48	5.63	6.28	4.33	5.85
339	5.62	3.11	11.34	5.85	4.68	1.97	7.29
341	2.77	6.15	2.49	2.79	2.07	3.52	3.7
355	100	100	100	100	100	100	100
356	15.15	11.92	18.87	16.15	15.51	14.73	16.62
357	4.46	3.87	6.39	4.53	5.03	6.13	5.06
361	1.77	4.37	6.14	4.65	4.12	6.67	4.26
367	6.57	4.56	6.82	2.78	3.01	3.08	2.12
371	2.06	4.16	7.61	4.84	2.94	1.88	6.02
377	1.5	2.97	9.66	1.77	1.39	1.71	1.55
387	2.14	5.19	4.62	3.51	4.03	2.87	2.66
424	5.56	1.55	1.36	0.54	0.17	0	0.07
425	7.32	2.15	4.34	2.43	5.84	3.17	5.14
439	2.8	2.67	6.15	2.1	0.99	4.23	1.43
447	7.88	2.84	3.36	3.35	1.23	3.23	6.12
453	3.21	3.38	5.06	2.08	1.98	2.5	1.53
469	18.06	5.46	14.67	13.26	12.14	8.6	12.98
470	5.62	2.25	5.95	3.32	8.65	3.77	6.02
471	4.12	1.4	8.25	2.95	4.94	3.73	7.67
483	53.06	22.08	44.15	23.31	29.87	24.29	28.49
484	12.24	4.84	11.84	6.23	8.18	6.38	8.22
485	4.23	6.33	8.25	4.04	4.08	0	5.99
503	4.16	4.31	6.03	1.81	2.24	4.03	2.13
517	5.77	7.9	8.85	6.12	9.42	6.78	6.84
						continuação. . .	

	acetona	água	metanol	acetona/ água	acetona/ MeOH	água/ MeOH	acetona/ H <sub>2</sub> O/MeOH
519	27.16	15.9	31.36	7.44	12.49	7.72	16.15
520	5.27	1.41	4.66	2.83	3.31	1.57	4.17
521	7.89	6.56	13.91	3.26	3.93	4.92	5.53
577	4.77	5.75	7.46	3.78	7.12	4.88	5.11
581	9.83	5.33	7.89	4.61	3.82	5.54	4.25
599	8.13	3.73	5.69	5.08	3.33	4.04	6.71
603	3.97	1.26	26.83	2.38	13.74	1.48	9.73
604	0.57	0.5	5.66	0.9	5.64	0.43	2.16
605	2.49	1.38	4.82	2.41	4.24	0.75	6.09
623	2.14	0.33	5.11	1.64	2.9	0.75	2.81
626	5.04	1.05	0	0	0.58	1	1.02
629	1.1	1.98	7.82	0.95	0.58	1.4	1.67
633	8.63	6.06	7.44	7.14	10.48	5.87	8.77
635	40.65	14.93	30.72	23.21	29.21	19.73	19.92
636	16.34	5.75	10.08	8.21	6.03	5.41	7.77
637	5.32	2.38	3	3.01	4.09	1.49	3.38
647	5.01	1.4	1.65	2.11	0.93	0.84	2.48
663	5.73	1.47	3.42	2.68	1.16	1.46	2
669	16.76	8.83	6.62	7.14	6.6	8.61	7.96
670	5.21	5.6	4.54	3.34	3.8	0.77	3.01
671	11.63	5.04	14.43	3.23	6.61	5.26	6.06
673	6.02	2.95	6.47	1.67	2.6	1.39	4.78
685	2.72	2.98	2.12	5.14	1.99	2.91	3.22
694	5.99	0.78	2.06	1.29	0	0.25	0
727	0.23	0.09	5.07	0.1	1.22	2.68	1.49
729	3.16	4.13	7.58	6.33	5.26	3.36	5.08
733	11.17	4.93	7.81	1.34	1.14	3.24	4.92
749	4.32	1.71	5.5	1.85	1.49	1.28	2.47
751	2.33	1.72	6.13	1.5	3.66	1.53	4.04
757	3.96	0.69	5.12	2.01	2.81	3.93	4.69
758	5.17	1.27	1.52	0	1.96	0.38	2.08
763	3.21	2.01	6.47	2.25	1	1.73	2.69
771	5.35	1.09	3.61	2.58	2.07	0	4.52
773	1.9	0.9	5.58	4.99	1.65	1.07	4.48
777	5.79	0.63	2.81	1.87	2.4	2.37	1.45
785	17.67	9.37	20.37	8.87	21.79	6.94	13.6
786	4.97	2.29	8.59	3.69	5.46	2.48	7.09
787	27.63	5.56	20.75	11.92	14.81	15.12	14.22
788	12.36	4.48	11.16	7.23	6.21	3.44	5.94
789	3.34	2.75	6.55	2.72	2.58	1.85	4.73
796	5.46	1.3	1.79	0.36	0	0.83	0.72
799	1.78	0.62	8.79	1.91	2.12	0.58	1.7
801	5.3	5.17	7.4	5.87	3.57	3.79	6.07
807	1.38	1.05	5.06	1.25	1.53	2.78	2.23
817	2.55	1.79	1.36	0	0.15	2.22	5.19
						continuação. . .	

	acetona	água	metanol	acetona/ água	acetona/ meOH	água/ meOH	acetona/ H <sub>2</sub> O/meOH
<b>826</b>	5.39	1.73	3.82	0.61	0.14	0.55	0.97
<b>839</b>	3.94	3.62	5.75	4.77	4.96	4.1	4.87
<b>901</b>	2.45	0.82	5.18	2.05	2.11	0.6	2.18
<b>953</b>	6.68	4.24	7.4	5.24	4.72	5.19	7.86
<b>966</b>	2.99	1.57	5.57	0.99	2.06	1.37	3
<b>967</b>	5.55	1.21	2.67	2.89	1.91	2.95	3.82

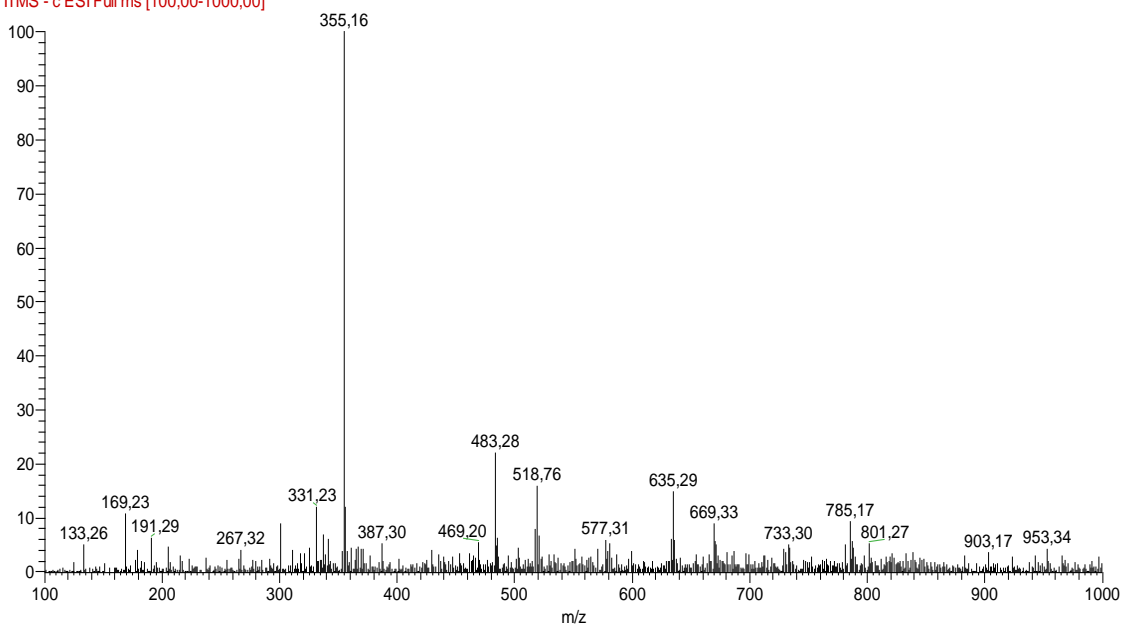
### Espectro 1. Extrato 1 - acetona

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #29-31 RT: 0,42-0,44 AV: 2 NL: 1,04E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



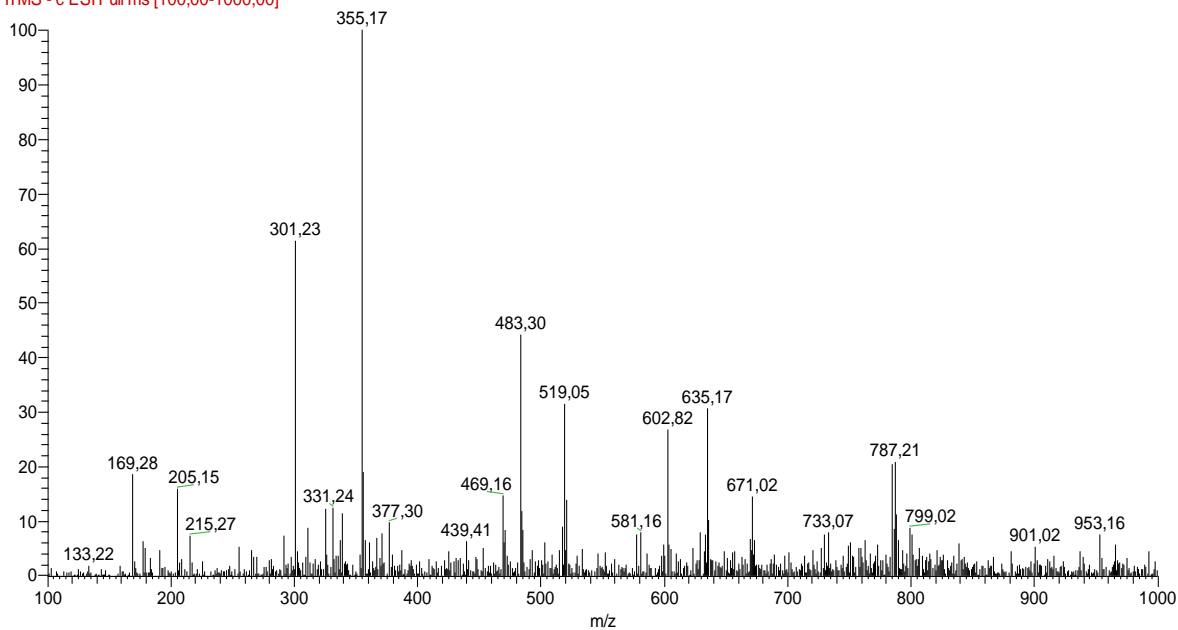
### Espectro 2. Extrato 2 - água

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #113-115 RT: 1,62-1,64 AV: 2 NL: 1,58E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



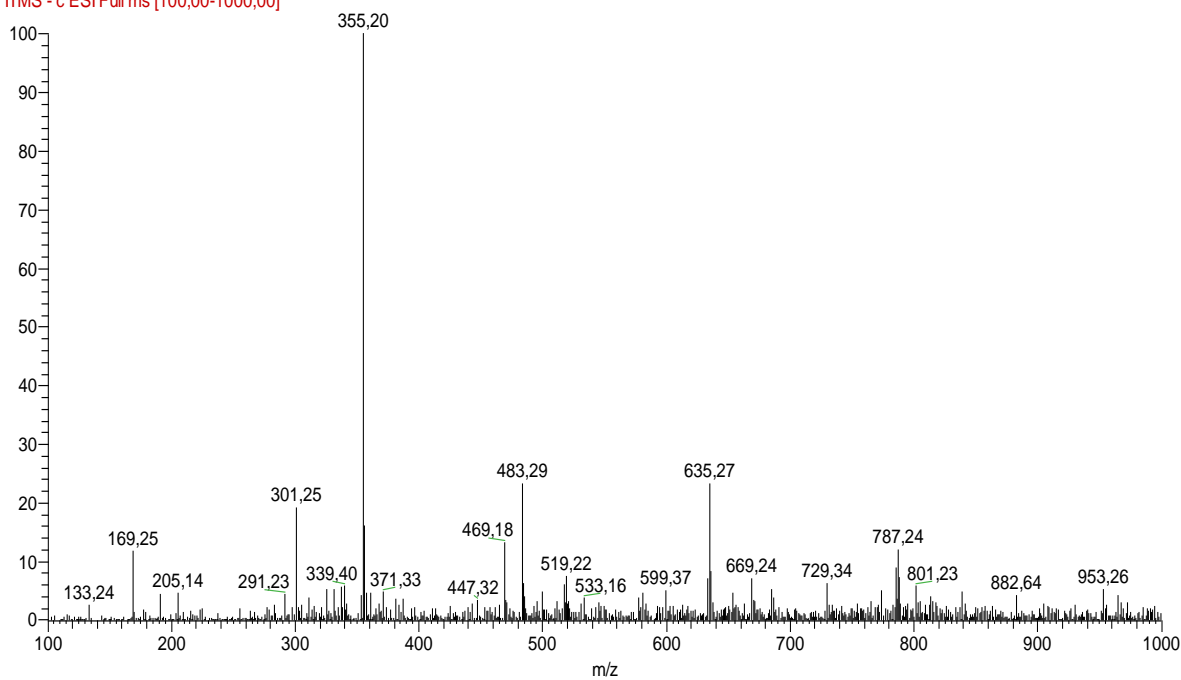
### Espectro 3: extrato 3 – metanol

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #175-177 RT: 2,49-2,52 AV: 2 NL: 1,10E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



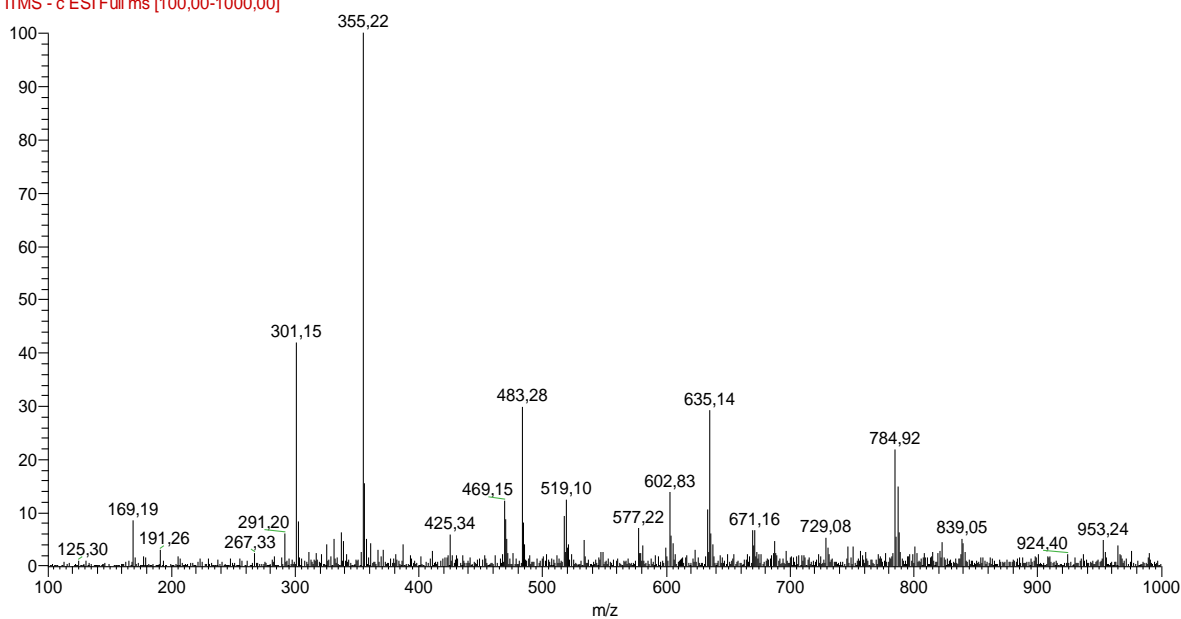
### Espectro 4: extrato 4 - acetona/água

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #247-249 RT: 3,52-3,54 AV: 2 NL: 1,81E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



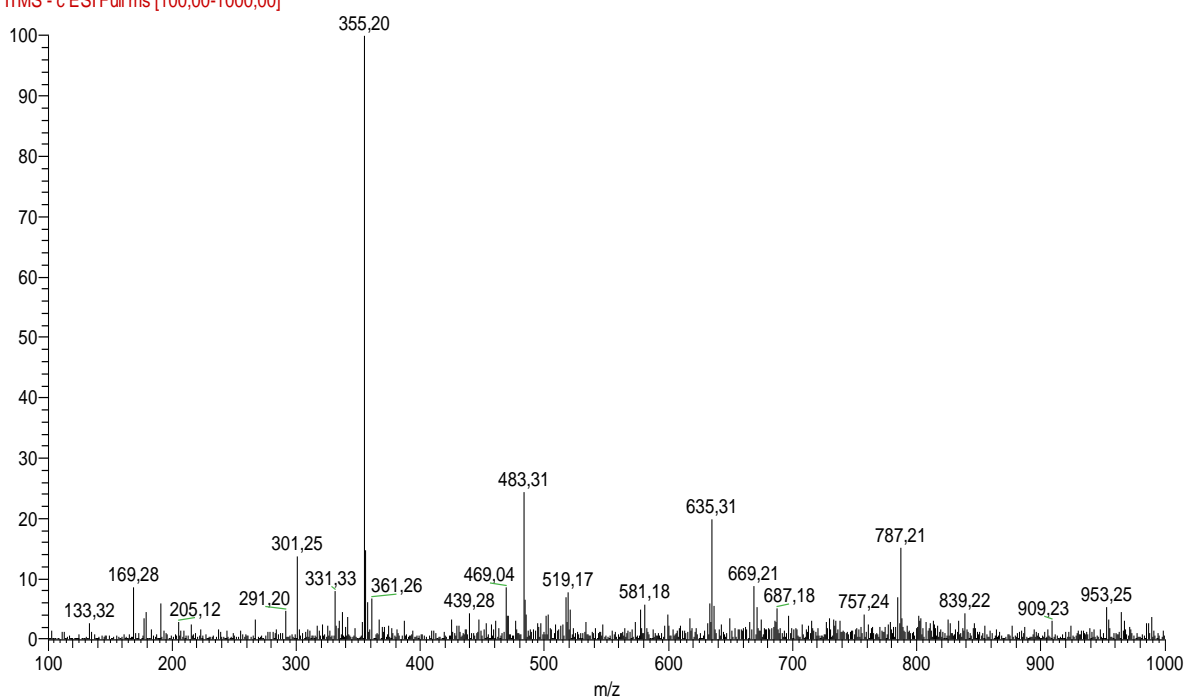
## Espectro: extrato 5 - acetona/metanol

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #307-309 RT: 4,39-4,41 AV: 2 NL: 2,05E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



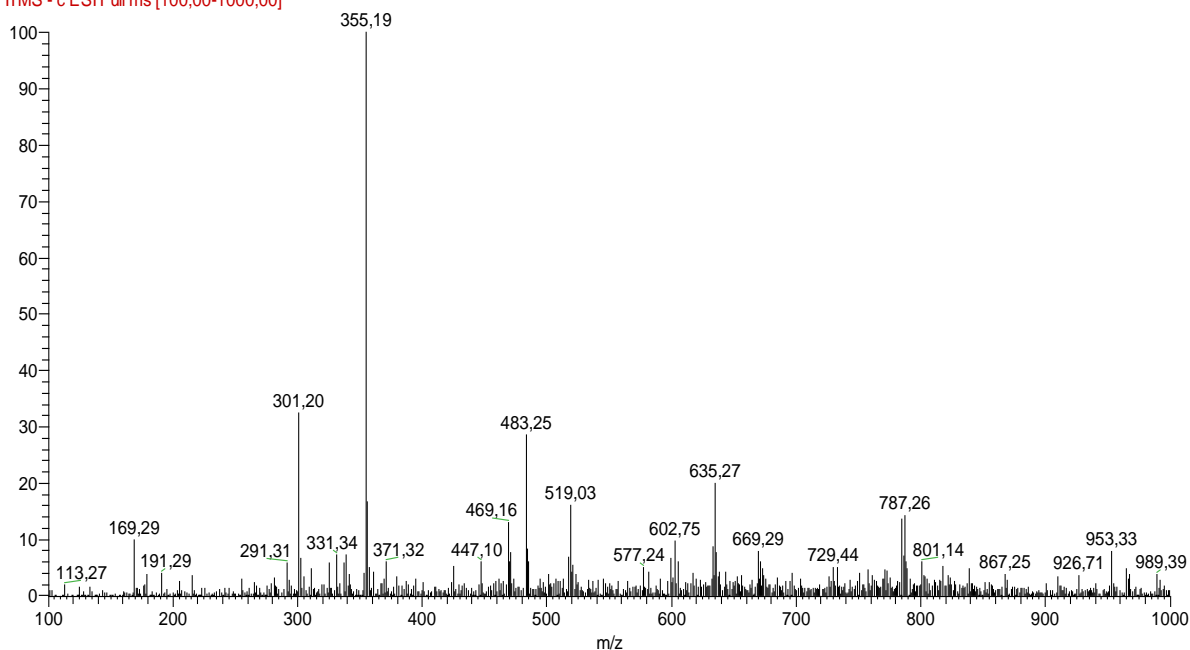
## Espectro 5: extrato 6 - água/metanol

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #369-371 RT: 5,27-5,30 AV: 2 NL: 1,60E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



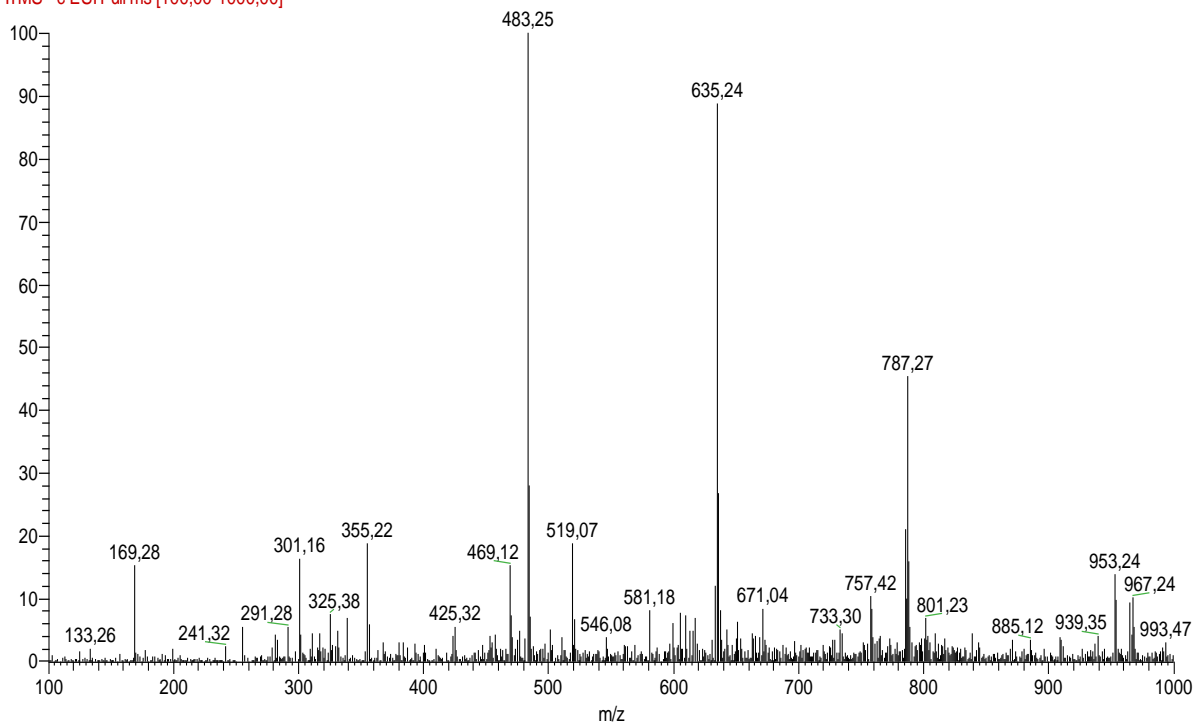
## Espectro 7: Extrato 7: acetona/água/metanol

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #444-447 RT: 6,36-6,38 AV: 2 NL: 1,56E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



## Espectro: Extrato 8 - acetato de etila

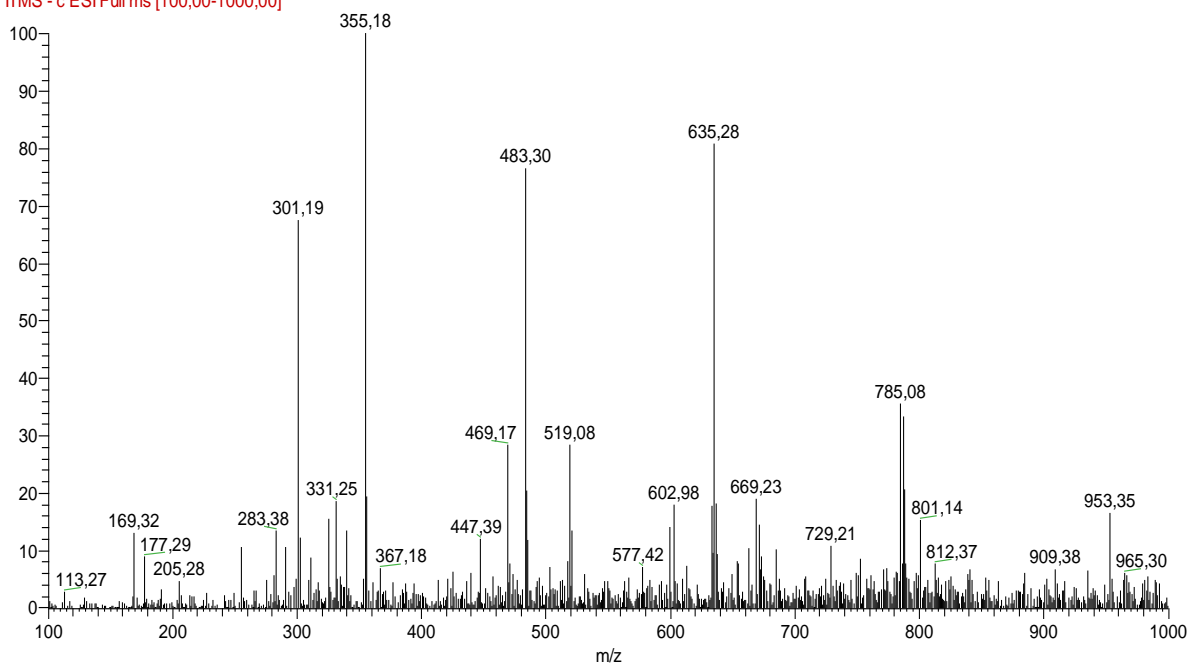
Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #511-513 RT: 7,29-7,32 AV: 2 NL: 9,56E3  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]





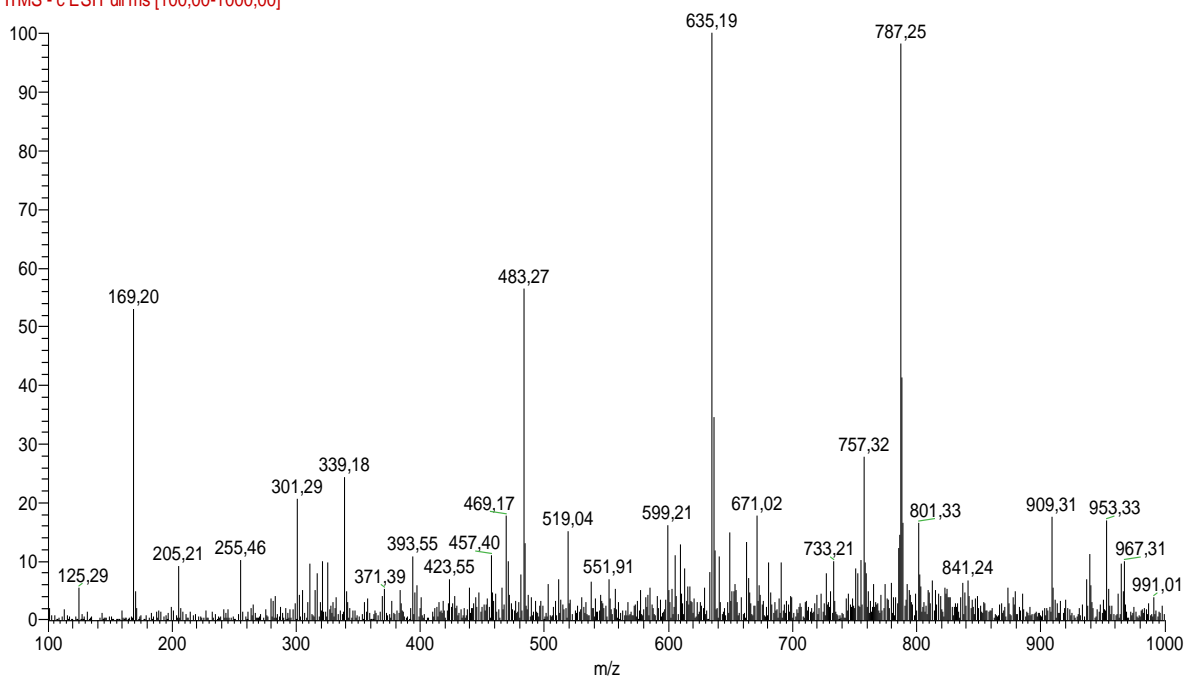
### Espectro 9: Extrato 9 - etanol

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #559-561 RT: 7,97-7,99 AV: 2 NL: 5,69E3  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



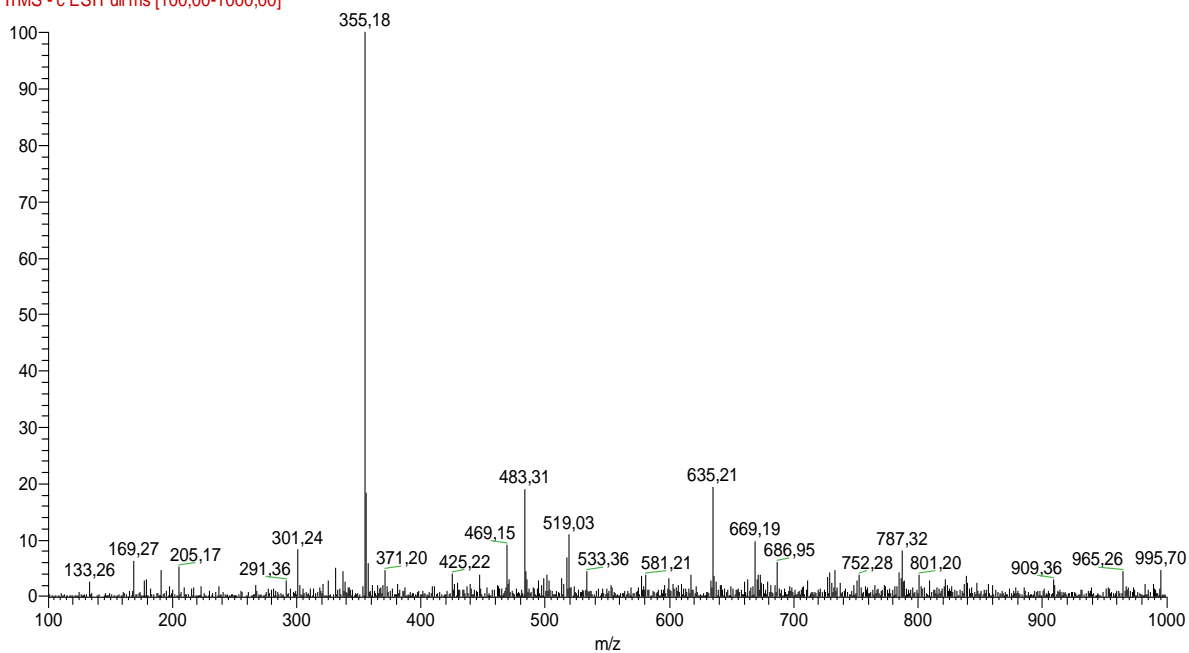
### Espectro 10: Extrato 10 - acetato de etila/água

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #619-621 RT: 8,82-8,84 AV: 2 NL: 6,62E3  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



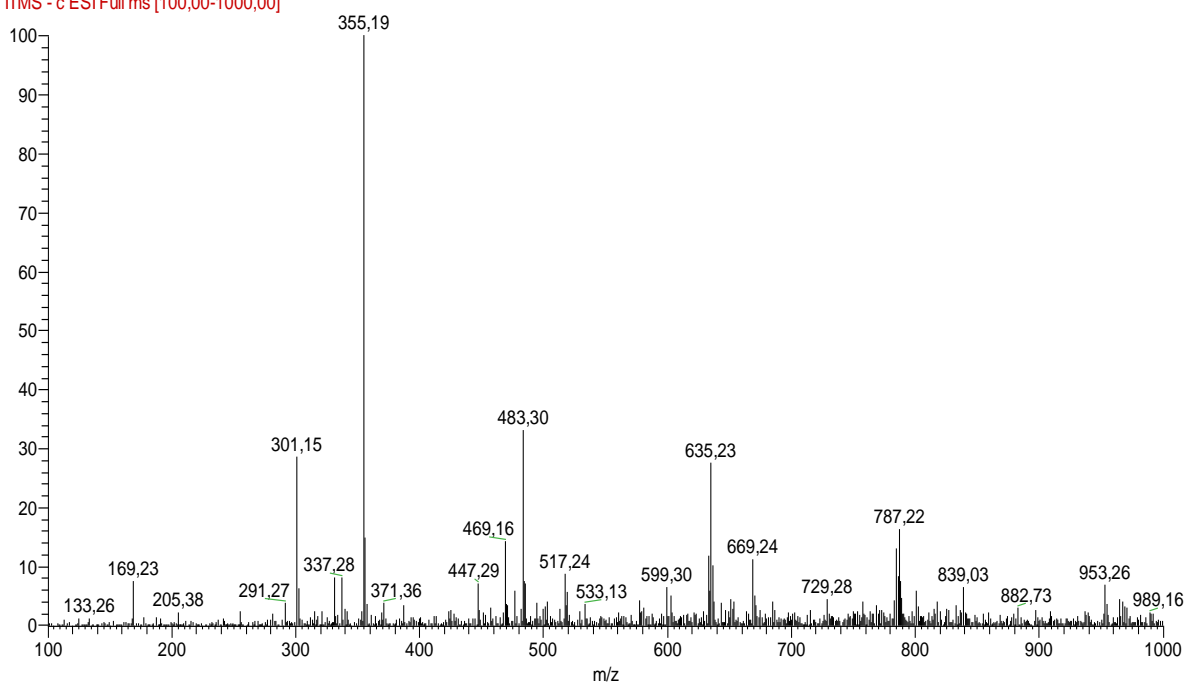
### Espectro 11: Extrato 11 - etanol/água

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #679-681 RT: 9,66-9,69 AV: 2 NL: 3,17E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



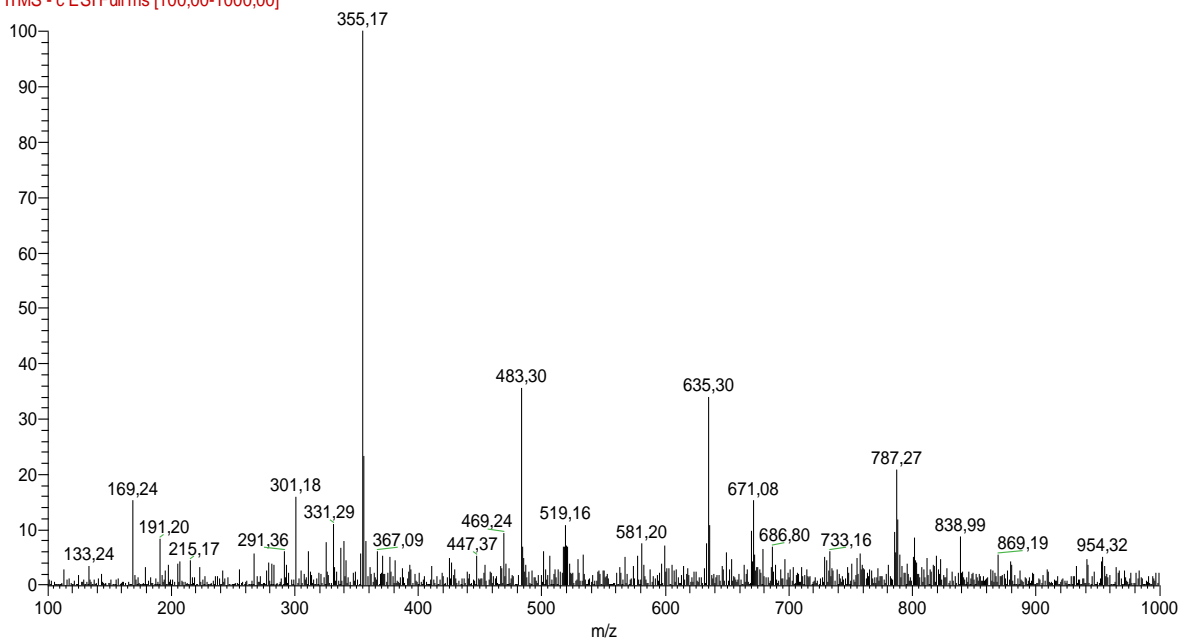
### Espectro 12: Extrato 12 - acetato de etila/etanol

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #743-745 RT: 10,55-10,57 AV: 2 NL: 1,99E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



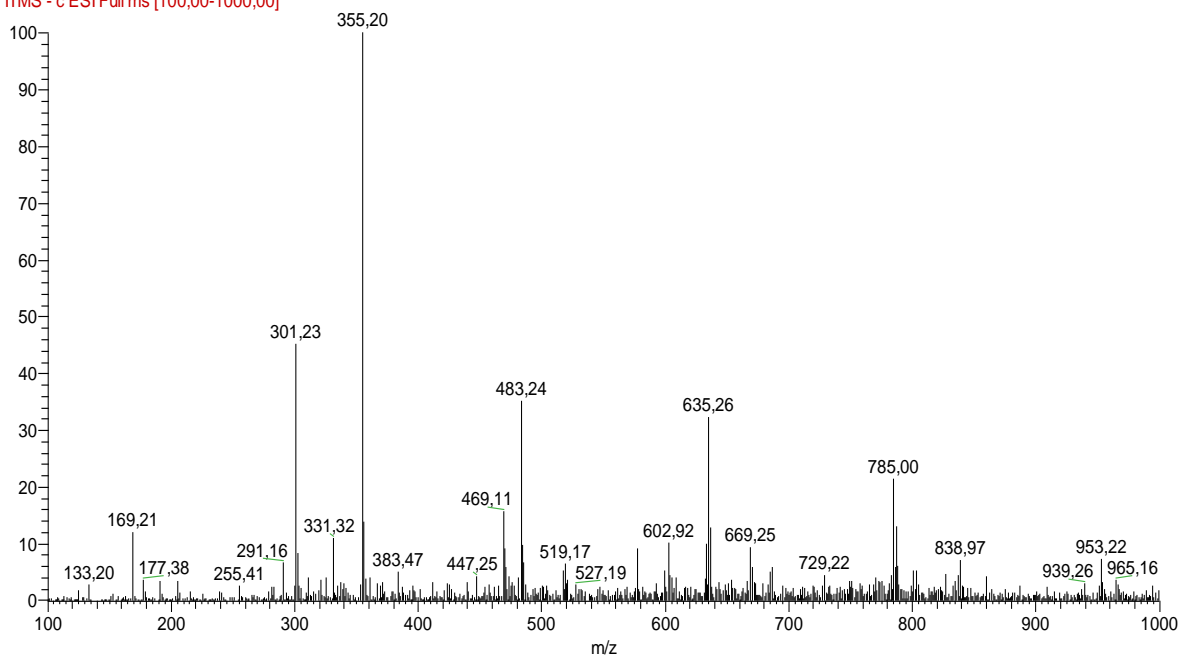
### Espectro 13: Extrato 13 - acetato de etila/água/etanol

Perfil\_Cascas\_ESL\_Gabi #801-803 RT: 11,37-11,40 AV: 2 NL: 9,93E3  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



### Espectro 14: Extrato 14 - metanol/acetato de etila

Perfil\_Cascas\_ESL\_Gabi #895-897 RT: 12,71-12,73 AV: 2 NL: 1,79E4  
F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



**Espectro 15: Extrato 15 - acetona/etanol**

Perfil\_Cascas\_ESI\_Gabi #953-955 RT: 13,53-13,55 AV: 2 NL: 1,18E4

F: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

