

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TESE**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Myrcia multiflora*  
(Lam.) DC. E *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl.**

**Carolina Passos da Cunha**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. E  
*Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlttdl.**

**CAROLINA PASSOS DA CUNHA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Raimundo Braz Filho**

*e Co-orientação do Professor*  
**Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ  
Dezembro de 2018

C972e Cunha, Carolina Passos da, 1986-  
Estudo fitoquímico de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC.  
e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld. / Carolina  
Passos da Cunha. - 2018.  
202 f.: il.

Orientador: Raimundo Braz Filho.  
Coorientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,  
2018.

1. Estudo fitoquímico. 2. *Psychotria leiocarpa*. 3.  
*Myrcia multiflora*. 4. Antocianinas aciladas. I. Braz  
Filho, Raimundo, 1935-, orient. II. Godoy, Ronoel  
Luiz de Oliveira, 1951-, coorient. III Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós  
Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CAROLINA PASSOS DA CUNHA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 17/12/2018

---

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy. (Dr.) Embrapa-CTAA  
(Co-orientador)

---

Manuela Cristina Pessanha de Araújo Santiago. (Dra.) Embrapa-CTAA

---

Humberto Ribeiro Bizzo. (Dr.) Embrapa-CTAA

---

Márcia Cristina Campos de Oliveira. (Dra.) UFRRJ

---

Luciano Ramos Suzart. (Dr.) UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico à minha amada família, Ademir, Deusimar, Ana Cláudia e Leonardo  
À memória da minha querida avó, “Dona” Maria do Carmo*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Raimundo Braz-Filho e ao Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pela orientação, apoio, confiança e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Embrapa Agroindústria de Alimentos e à Capes.

Aos amigos da UFRRJ Cristiane, Mirza, Carlos, Débora, Mariana e Sabrina que me acompanharam e incentivaram durante o curso.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Manuela, Sidney, Luzimar, Ana Cristina, Amanda, Karen, Luciana e Allien que presenciaram o desenvolvimento deste trabalho com quem pude compartilhar dúvidas e aprendizados, além de dividir a bancada.

Aos amigos Vitor e Elaine que por diversas vezes ajudaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus colegas de trabalho “Comapianos”, em especial ao meu chefe, Rodney, pelo apoio durante o curso.

Ao meu esposo Leonardo pela ajuda, apoio, compreensão, incentivo e, principalmente, por me fazer acreditar que eu seria capaz.

Aos meus pais Ademir e Deusimar, e minha irmã Ana Cláudia que sempre me apoiaram em cada escolha.

## RESUMO

CUNHA, Carolina Passos. **Estudo fitoquímico de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl.** 2018. 183 p. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, porém necessita valorizar e promover o conhecimento desta biodiversidade. A espécie *Myrcia multiflora* (Lam) DC., conhecida como “pedra-ume-caá” (fruto roxo), é uma espécie nativa que pertence à família Myrtaceae. A espécie *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl., conhecida como cafeeiro do mato (fruto azul), é uma espécie nativa que pertence à família Rubiaceae. A coloração característica dos frutos (roxo e azul, respectivamente) de ambas as espécies chama a atenção pelo seu potencial de uso como corante natural. A sazonalidade em que ocorre a frutificação tem gerado dificuldade na caracterização fitoquímica dos frutos de espécies vegetais. Diante deste contexto, as duas espécies permanecem sem investigação dos metabólitos especiais (secundários) produzidos nos frutos. Assim, estabeleceu-se como objetivo deste trabalho realizar o primeiro estudo fitoquímico dos frutos de *M. multiflora* e *P. leiocarpa*. A quantificação de antocianinas, carotenoides e ácidos fenólicos presentes nos frutos de *M. multiflora* foi realizada por CLAE-DAD e a capacidade antioxidante foi avaliada por métodos de captura de radicais livres (DPPH e ABTS). Flavonóis presentes nos frutos desta espécie foram isolados por cromatografia flash, utilizando um sistema de isolamento cromatográfico acelerado em cartucho de fase reversa. As substâncias do extrato de *P. leiocarpa* foram isoladas por CLAE em coluna analítica de fase reversa, acoplada à válvula seletora de canais e cromatografia clássica em coluna de fase normal. As substâncias isoladas de ambas as espécies tiveram suas estruturas determinadas através da interpretação dos dados espectrais fornecidos por UV-Vis, RMN 1D e 2D e EM envolvendo comparação com dados existentes na literatura. Foi realizada a comparação do perfil cromatográfico de outras espécies do gênero *Psychotria* (*P. suterella* e *P. nuda*) com o extrato de *P. leiocarpa*, objetivando a identificação de antocianinas. Foram identificadas vinte e três substâncias nos frutos de *M. multiflora*, dentre elas, carotenoides, flavonoides e ácidos fenólicos, sendo que dezenove destas substâncias foram quantificadas. O perfil e concentração das substâncias foi similar ao de outras espécies da família Myrtaceae. Os frutos de *M. multiflora* apresentaram a terceira maior atividade antioxidante quando comparado com dezoito frutos nativos. O conhecimento fitoquímico e a alta capacidade antioxidante observada para os frutos somados sua coloração roxa intensa tornam esta espécie um candidato para uso como corante alimentício natural com potencial de melhorar a funcionalidade do alimento. Oito substâncias foram isoladas dos frutos de *P. leiocarpa*, caracterizando-se antocianinas, ácido fenólico e esteroides. As antocianinas aciladas foram caracterizadas estruturalmente como Delfinidina-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil), Petunidina-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil) e Malvidina-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil), sendo elas inéditas na literatura. Identificou-se antocianinas aciladas em frutos com coloração azulada de *P. suterella* e *P. nuda*, indicando a possibilidade de existência destas substâncias em outras espécies do gênero. Os resultados obtidos com este trabalho contribuem para o conhecimento fitoquímico de dois frutos de espécies nativas, envolvendo a caracterização de substâncias inéditas e identificação de substâncias bioativas, promovendo a valorização dos frutos da biodiversidade brasileira.

**Palavras-chave:** *Psychotria leiocarpa*, *Myrcia multiflora*, Antocianinas aciladas.

## ABSTRACT

CUNHA, Carolina Passos. **Phytochemical study of *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. and *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl.** 2018. 183 p. Thesis (Doctor of Chemistry, Organic Chemistry) Institute of Exact Sciences, Postgraduation Program in Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Brazil has the greatest biodiversity in the world, but it needs to value and promote knowledge of local biodiversity. The species *M. multiflora* (Lam) DC., known as "pedra-ume-caá" (purple fruit), is a native species that belongs to the Myrtaceae family. The species *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl., known as "cafeeiro do mato" (blue fruit), is a native species that belongs to the Rubiaceae family. The characteristic coloration of the fruits (purple and blue, respectively) of both species draws attention to their potential for use as a natural colorant. The seasonality in which fruiting occurs has generated difficulty in the phytochemical characterization of fruits of plant species. In this context, the two species remain without investigation of the special (secondary) metabolites produced in the fruits. Thus, the aim of this work to carry out the first phytochemical study of the fruits of *M. multiflora* and *P. leiocarpa*. The quantification of anthocyanins, carotenoids and phenolic acids present in the fruits of *M. multiflora* was performed by HPLC-DAD and the antioxidant capacity was evaluated by free radical capture methods (DPPH and ABTS). The flavonols present in fruits of this species were isolated by accelerated liquid chromatography in reversed-phase cartridge. The substances of the *P. leiocarpa* extract were isolated by HPLC on reverse phase analytical column, coupled to the channel selector valve and classic chromatography on a normal phase column. The isolated substances of both species had their structures determined through the interpretation of the spectral data furnished by UV, 1D and 2D NMR and high-resolution MS (HRMS) involving comparison with data in the literature. The chromatographic profile of other species of the genus *Psychotria* (*P. suterella* and *P. nuda*) was compared with the extract of *P. leiocarpa*, aiming at the identification of anthocyanins. Twenty-three substances were identified in the fruits of *M. multiflora*, including carotenoids, flavonoids and phenolic acids characterization. Nineteen of these substances were quantified. The profile and concentration of the substances was similar to that of other species of the Myrtaceae family. The fruits of *M. multiflora* presented the third largest antioxidant capacity when compared to eighteen native fruits. The phytochemical knowledge and the high antioxidant capacity observed for the fruits added to their intense purple coloration make this species a candidate for use of natural food coloring with potential to improve the functionality of the food. Eight substances were isolated from the fruits of *P. leiocarpa*, characterized as anthocyanins, phenolic acid and steroids. Acylated anthocyanins were structurally characterized as Delphinidin-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloyl- $\beta$ -gentiobiosyl)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloyl- $\beta$ -glucopyranosyl), Petunidin-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloyl- $\beta$ -gentiobiosyl)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloyl- $\beta$ -glucopyranosyl) and Malvidin-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloyl- $\beta$ -gentiobiosyl)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloyl- $\beta$ -glucopyranosyl), being unpublished in the literature. Acylated anthocyanins were identified in fruits with bluish coloring of *P. suterella* and *P. nuda*, indicating the possibility of existence of these substances in other species of the genus. The results obtained with this work contribute to the phytochemical knowledge of two fruits of native species, involving the characterization of novel substances and identification of bioactive substances, promoting the valorization of Brazilian biodiversity fruits.

**Keywords:** *Psychotria leiocarpa*, *Myrcia multiflora*, Acylated anthocyanins



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias fenólicas identificadas no gênero <i>Myrcia</i> .....	5
Tabela 2. Substâncias fenólicas e esteroides identificados no gênero <i>Psychotria</i> .....	11
Tabela 3. Comparação das técnicas preparativas de cromatografias clássica (CL), flash (CF) e líquida de alta eficiência (CLAE) .....	50
Tabela 4. Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos carotenoides .....	58
Tabela 5. Gradiente de eluição das fases móveis para separação das antocianinas .....	60
Tabela 6. Coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ), comprimento de onda ( $\lambda$ ), solução de leitura, massa molecular (MM) e alíquota (AQ) para o cálculo da concentração da antocianina na solução mãe .....	62
Tabela 7. Diluições da solução mãe para o preparo da curva analítica .....	63
Tabela 8. Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos ácidos fenólicos .....	65
Tabela 9. Diluições do extrato de substâncias antioxidantes .....	65
Tabela 10. Tempo aproximado, volume de fase móvel e porcentagem da fase B .....	69
Tabela 11. Gradiente de eluição das fases móveis para separação do extrato de <i>P. leiocarpa</i> .....	72
Tabela 12. Gradiente de temperatura para cromatografia gasosa .....	74
Tabela 13. Umidade da polpa+casca, semente e fruto integral de <i>M. multiflora</i> .....	77
Tabela 14. Teor de carotenóides e desvio padrão na polpa+casca e na semente dos frutos de <i>M. multiflora</i> F032A e F032B .....	81
Tabela 15. Comparação do teor de carotenoides totais de <i>M. multiflora</i> e outros frutos tropicais .....	81
Tabela 16. Absorvância da solução de antocianina isolada (ABS) e concentração calculada da solução mãe .....	90
Tabela 17. Teores de antocianinas dos frutos de <i>M. multiflora</i> F032A e F032B em base seca .....	92
Tabela 18. Teor de ácidos fenólicos na polpa+casca de <i>M. multiflora</i> F032A e F032B .....	96
Tabela 19. Teor de ácidos fenólicos na semente de <i>M. multiflora</i> F032A e F032B .....	96
Tabela 20. Equação das curvas analíticas de trolox, DPPH <sup>+</sup> e amostras, ABS <sub>1000</sub> e MQi .....	99
Tabela 21. Capacidade antioxidante e desvio padrão da semente e da polpa+casca de <i>M. multiflora</i> F032A e B .....	100
Tabela 22. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) e <sup>13</sup> C (125 MHz) da Miricitrina (22) isolada, inclusive informações do HSQC. Deslocamentos químicos de hidrogênios em $\delta$ H	

(ppm) e carbono-13 em $\delta C$ (ppm). Constante acoplamento ( $J$ ) em Hz (entre parênteses) e comparação com dados encontrados na literatura .....	105
Tabela 23. Dados espectrais de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) e <sup>13</sup> C (125 MHz) do Ácido Clorogênico (31) e do Clorogenato de Metila (31a), inclusive informações do HSQC. Deslocamentos químicos de hidrogênios em $\delta H$ (ppm) e carbono-13 em $\delta C$ (ppm). Constante acoplamento ( $J$ ) em Hz (entre parênteses) e comparação com dados encontrados na literatura .....	118
Tabela 24. Propriedades espectroscópicas de UV-Vis das antocianinas de <i>P. leiocarpa</i> .....	123
Tabela 25. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H das unidades piranosídicas das antocianinas isoladas com valores encontrados por YOSHIDA e colaboradores.....	131
Tabela 26. Dados espectrais de RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H das antocianinas isoladas de <i>P. leiocarpa</i> ...	133
Tabela 27. Dados epectrais de RMN <sup>13</sup> C dos esteróis de <i>P. leiocarpa</i> .....	145

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias fenólicas identificadas no gênero <i>Myrcia</i> .....	7
Figura 2. <i>Myrcia multiflora</i> DC.....	8
Figura 3. Estrutura química do Epalrestar .....	9
Figura 4. Esteroides e substâncias fenólicas identificadas no gênero <i>Psychotria</i> .....	12
Figura 5. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltldl .....	13
Figura 6. Estrutura das substâncias identificadas em <i>P. leiocarpa</i> .....	14
Figura 7. Classe dos terpenos e seus respectivos precursores .....	16
Figura 8. Estrutura dos principais esteróis encontrados nas plantas em comparação com a estrutura do colesterol.....	21
Figura 9. Exemplos de carotenos e xantofilas .....	26
Figura 10. Ciclização da cadeia terminal em carotenoides .....	29
Figura 11. Esqueleto básico das subclasses dos flavonoides .....	30
Figura 12. Estruturas da Miricitrina e Quercetrina.....	34
Figura 13. Principais antocianidinas encontradas em alimentos .....	36
Figura 14. Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa.....	37
Figura 15. Interações $\pi$ - $\pi$ no empilhamento entre antocianinas e seus complexos.....	38
Figura 16. Complexo de copigmentação intramolecular sugerido .....	41
Figura 17. Estrutura dos ácidos fenólicos.....	42
Figura 18. Vista em corte de partícula <i>core shell</i> (a) e esquema de uma partícula 2,6 $\mu$ m (b) .....	52
Figura 19. <i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.....	56
Figura 20. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltldl. ....	70
Figura 21. Frutos de <i>P. leiocarpa</i> (A), polpa (B) e semente (C).....	71
Figura 22. Válvula Rheodyne® (a) e esquema da coleta dos flavonoides (b) .....	72
Figura 23. <i>P. suterella</i> (A) e <i>P. nuda</i> (B) .....	75
Figura 24. Frutos de <i>M. multiflora</i> F032A (A), semente (B) e polpa+casca (C); frutos de <i>M. multiflora</i> F032B (D), semente (E) e polpa+casca (F) .....	76
Figura 25. Separação das antocianinas e carotenoides através de extração líquido-líquido em água:éter de petróleo.....	77
Figura 26. Cromatograma do extrato de carotenoides a 450nm da polpa+casca de <i>M. multiflora</i> F032A antes (A) e após a hidrólise básica (B), F032B antes (C) e após a hidrólise básica (D) e espectros de UV dos carotenoides (E).....	78

Figura 27. Cromatograma do extrato de carotenoides a 450nm da semente de <i>M. multiflora</i> F032A antes (A) e após a hidrólise básica (B), F032B antes (C) e após a hidrólise básica (D) e espectros de UV dos carotenoides (E).....	79
Figura 28. Estrutura dos carotenoides identificados na polpa+casca e semente de <i>M. multiflora</i> .....	80
Figura 29. Casca da jabuticaba da praia (A), da uva (B) e da jabuticaba (C) em pó.....	82
Figura 30. Cromatograma das antocianinas da casca da uva (A), da casca da jabuticaba da praia (B) e da casca da jabuticaba (C) ( $\lambda=520\text{nm}$ ) .....	83
Figura 31. Cromatograma do extrato de antocianinas para coleta de padrões ( $\lambda=520\text{nm}$ ) .....	84
Figura 32. Cartucho de fase reversa ( $C_{18}$ ) saturado com Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo (14) .....	85
Figura 33. Cromatograma das antocianinas isoladas ( $\lambda=520\text{nm}$ ).....	85
Figura 34. Espectros de de UV-Vis das antocianinas isoladas.....	86
Figura 35. Espectro de massa modo MS/MS das antocianinas isoladas .....	87
Figura 36. Propostas de fragmentação das antocianinas isoladas .....	89
Figura 37. Curvas analíticas feitas com as antocianinas isoladas.....	90
Figura 38. Cromatograma do extrato de antocianinas dos frutos de <i>M. multiflora</i> F032A (A) e F032B (B) e espectros de UV-Vis (C) ( $\lambda=520\text{ nm}$ ).....	91
Figura 39. Cromatograma dos ácidos fenólicos da polpa+casca de <i>M. multiflora</i> F032A ( $\lambda=270\text{ nm}$ ) .....	93
Figura 40. Cromatograma dos ácidos fenólicos da semente de <i>M. multiflora</i> F032A ( $\lambda=270\text{ nm}$ ) .....	94
Figura 41. Cromatograma dos ácidos fenólicos da polpa+casca de <i>M. multiflora</i> F032B ( $\lambda=270\text{ nm}$ ) .....	95
Figura 42. Cromatograma dos ácidos fenólicos semente de <i>M. multiflora</i> F032B ( $\lambda=270\text{ nm}$ ) .....	95
Figura 43. Estruturas e espectros UV dos ácidos fenólicos identificados nos frutos de <i>M. multiflora</i> F032A e F032B .....	97
Figura 44. Estrutura do radical livre ABTS <sup>•+</sup> .....	98
Figura 45. Estrutura do radical livre DPPH <sup>•+</sup> .....	98
Figura 46. Curva analítica do DPPH <sup>•+</sup> e do Trolox .....	98
Figura 47. Cartucho com antocianinas retidas em meio ácido (A); eluição dos flavonóides neutros com metanol em meio ácido (B); eluição das antocianinas em meio básico (C); estrutura da fase aniônica e molécula de antocianina em várias condições de pH (D) .....	101

Figura 48. Cromatograma do extrato metanólico e das frações 1, 2 e 3 obtidas em cartucho de fase mista. Cromatograma extraído em $\lambda$ 520 nm (linha roxa); cromatograma extraído em $\lambda$ 350 nm (linha preta) .....	102
Figura 49. Cromatograma da coleta da fração 1 em sistema de isolamento cromatográfico acelerado.....	103
Figura 50. Cromatograma das substâncias 22, 23, 24 e 25 isoladas .....	104
Figura 51. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da Miricitrina (22) isolada (A) e expansões das regiões $\delta$ H 0,8 à 1,10 (B) e $\delta$ H 6,15 à 6,45 (C). .....	106
Figura 52. Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPTQ (125 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da miricitrina (22) isolada (A) e expansão da região $\delta$ C 15,5 à 17,5 (B) .....	107
Figura 53. Espectros de massas dos flavonoides isolados.....	108
Figura 54. Proposta de fragmentação da Miricitrina (22) .....	109
Figura 55. Proposta de fragmentação da Quercitrina (23).....	109
Figura 56. Proposta para os derivados acetilados da Miricitrina e Quercitrina.....	110
Figura 57. Pó obtido a partir da liofilização e moagem dos frutos de <i>P. leiocarpa</i> .....	111
Figura 58. Cromatograma da fração aquosa de <i>P. leiocarpa</i> (linha sólida); cromatograma do padrão de ácido cafeico (linha tracejada) à $\lambda_{\text{máx}}=320$ nm (A) e cromatograma da fração aquosa de <i>P. leiocarpa</i> a $\lambda_{\text{máx}}=540$ nm (B).....	112
Figura 59. Substâncias 32, 33 e 34 isoladas .....	113
Figura 60. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da mistura de Ácido Clorogênico (31) e Clorogenato de Metila (A) e expansão da região $\delta$ H 6,0 à 8,0 (B).....	115
Figura 61. Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPTQ (100 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da mistura de Ácido Clorogênico (31) e Clorogenato de Metila .....	116
Figura 62. Cromatograma do extrato metanólico de <i>P. leiocarpa</i> (A) e da fração isolada do Ácido Clorogênico (31) onde aparece a presença do Clorogenato de Metila (31a) (B) .....	117
Figura 63. Reação de esterificação do Ácido Clorogênico com metanol em meio ácido .....	119
Figura 64. Espectro de massas de íons totais da mistura de Ácido Clorogênico (31) e do Clorogenato de Metila (31a).....	119
Figura 65. Estruturas propostas para os principais íons observados no espectro de massas de íons totais da fração contendo a mistura do Ácido Clorogênico (31) e Clorogenato de Metila (31a).....	120
Figura 66. Espectro de massa MS/MS do Ácido clorogênico (31) .....	121
Figura 67. Estruturas propostas para os principais fragmentos observados no espectro de massas EM/EM do Ácido Clorogênico (31) .....	121

Figura 68. Comparação do espectro de UV-Vis da Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo (13, rosa) e Ácido Cafeico (laranja) (A) com o espectro da substância 32 (azul) e as propriedades espectroscópicas avaliadas nos espectros de UV-Vis das substâncias ( $E_{acil}$ , $E_{440}$ e $E_{vis}$ ) (B).	122
Figura 69. Cromatograma do produto da hidrólise básica da substância 32 (linha cheia) e do padrão do ácido ferúlico (linha tracejada) .....	124
Figura 70. Projeção de Newman para molécula de glicose 1 e 2 das substâncias 32 e 33.....	126
Figura 71. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da Delfinidina acilada (32) (A) e expansão das regiões $\delta_H$ 8,4 a 8,5 ppm (B); $\delta_H$ 5,1 a 5,4 ppm (C); $\delta_H$ 6,0 à 7,7 ppm (D); $\delta_H$ 3,2 à 4,78 ppm(E).	127
Figura 72. Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPTQ (100 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da Delfinidina acilada (32) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 73. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da Petunidina acilada (32) (A) e expansão das regiões $\delta_H$ 8,4 a 8,5 ppm (B); $\delta_H$ 5,1 a 5,5 ppm (C); $\delta_H$ 5,9 a 7,9 ppm (D); $\delta_H$ 3,1 a 4,0 ppm (E) e $\delta_H$ 4,0 a 4,9 ppm (F).....	129
Figura 74. Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPTQ (100 MHz, em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) da Petunidina acilada (33) .....	129
Figura 75. Correlações observadas no espectro NOESY (seta laranja) da Delfinidina acilada (substância 32).....	132
Figura 76. Correlações observadas no espectro NOESY (seta laranja) da Petunidina acilada (substância 33).....	132
Figura 77. Espectro de massa EM/EM da substância 33.....	135
Figura 78. Estruturas propostas para os principais fragmentos observados no espectro de massas EM/EM da substância 32 .....	136
Figura 79. Espectro de massa exata EM/EM da substância 33 .....	137
Figura 80. Estrutura proposta para a substância 33 e suas respectivas massas exata (teórica) e acurada (medida experimentalmente).....	137
Figura 81. Espectro de massa exata EM/EM da substância 34 .....	138
Figura 82. Estrutura proposta para a substância 34 e suas respectivas massas exata (teórica) e acurada (medida experimentalmente).....	138
Figura 83. Cromatograma a 520 nm dos extratos de <i>P. leiocarpa</i> (linha vermelha), <i>P. suterella</i> (linha verde) e <i>P. nuda</i> (linha azul) .....	139
Figura 84. Cromatograma dos esteróis de <i>P. leiocarpa</i> obtidos por CG-EM (A) e espectro de massa das substâncias majoritárias (B) .....	140

Figura 85. Proposta de fragmentação para os principais fragmentos observados no espectro de massas do Campesterol (39), Estigmasterol (40), $\beta$ -sitosterol (41) e Isofucosterol (42) .....	141
Figura 86. Proposta de fragmentação para os principais fragmentos observados no espectro de massas do Estigmasterol (40) .....	142
Figura 87. Proposta de fragmentação para os principais fragmentos observados no espectro de massas do Isofucosterol (42) .....	143
Figura 88. Estrutura dos esteróis de <i>P. leiocarpa</i> .....	144
Figura 89. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, em clorofórmio- <i>d</i> ) da mistura de esteróis (substância 39, 40, 41 e 42) (A) e expansão das regiões $\delta$ H 2,7 à 5,5 (B). .....	146

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Via do Ácido mevalônico para biossíntese do IPP e DMAPP.....	17
Esquema 2. Via da 1-deoxi- <i>D</i> -xilose-5-fosfato para biossíntese do IPP e DMAPP .....	18
Esquema 3. Formação da ligação cabeça-cauda envolvida na biossíntese do Geranyl PP.....	19
Esquema 4. Formação da ligação cauda-cauda envolvida na biossíntese do Esqualeno .....	19
Esquema 5. Formação da ligação cauda-cauda envolvida na biossíntese do <i>Z</i> -fitoeno .....	20
Esquema 6. Formação do 4 $\alpha$ -metilergostadienol a partir do 2,3 óxido esqualeno.....	23
Esquema 7. Formação dos principais esteróis vegetais a partir do 4 $\alpha$ -metilergostadienol .....	24
Esquema 8. Formação de duas moléculas de retinol a partir de uma molécula de $\beta$ -caroteno	25
Esquema 9. Via do Ácido Chiquímico .....	32
Esquema 10. Via do Acetato .....	33
Esquema 11. Formação de antocianidinas e flavonóis a partir da flavanona .....	34
Esquema 12. Formação dos ácidos fenólicos constituídos do esqueleto C <sub>3</sub> C <sub>6</sub> .....	45
Esquema 13. Formação dos ácidos benzóicos simples formados a partir do Ácido 3-dehidrochiquímico .....	45
Esquema 14. Formação dos ácidos benzoicos formados a partir de ácidos de esqueleto C <sub>3</sub> C <sub>6</sub>	46



## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

**1D** – unidimensional

**2D** - bidimensional

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CLUE** – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

**COSY** - *Correlation Spectroscopy*

**d** – duplete

**Da** – Dalton (unidade de massa atômica)

**DAD** – Detector de Arranjo de Diodos

**dd** - duplo duplete

**DEPTQ** – *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer including the Detection of Quaternary Nuclei*

**DMAPP** – Dimetil alil difosfato

**EC<sub>50</sub>** – A concentração que induz metade do efeito máximo

**EM** – Espectrômetro de Massas

**ESI** – *Electron Spray Ionization*

**ε** – Coeficiente de Absortividade Molar

**FID** – *Flame Ionization Detector*

**GC** – *Gas Chromatography*

**HMBC** – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

**HSQC** – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

**IE** – Impacto de Elétrons

**IPP** – Isopentenil difosfato

**J** – Constante de Acoplamento

**m/z** – Razão Massa Carga

**MeOD** – Metanol Deuterado

**NOESY** – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

**Q-TOF** – *Quadropole Time of Flight Mass Spectrometer*

**R<sup>2</sup>** – Coeficiente de Determinação

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**s** – Simpleto

**t** – Tripleto

**TOCSY** – *Total Correlated Spectroscopy*

**T<sub>R</sub>** – Tempo de Retenção

**UV** – Ultravioleta

**Vis** – Visível

**δ** – Deslocamento químico

**λ** – Comprimento de onda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. Família Myrtaceae e gênero <i>Myrcia</i> .....	4
3.2. <i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.....	8
3.3. Família Rubiaceae e gênero <i>Psychotria</i> .....	10
3.4. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltldl .....	13
3.5. Metabólitos secundários (especiais).....	14
3.6. Terpenos.....	15
3.6.1. Biossíntese dos terpenos .....	16
3.6.2. Esteróis .....	20
3.6.2.1. Análise e identificação de esteróis.....	22
3.6.2.2. Biossíntese de esteróis .....	23
3.6.3. Carotenoides .....	25
3.6.3.1. Análise de carotenoides .....	27
3.6.3.2. Biossíntese de carotenoides .....	29
3.7. Flavonoides .....	29
3.7.1. Biossíntese de flavonoides.....	31
3.7.2. Flavonóis.....	34
3.7.2.1. Análise de flavonóis .....	35
3.7.3. Antocianinas .....	36
3.7.3.1. Análise de antocianinas .....	39
3.7.3.2. Acilação aromática de antocianinas.....	40
3.8. Ácidos fenólicos.....	42
3.8.1. Análise de ácidos fenólicos.....	43
3.8.2. Biossíntese de ácidos fenólicos.....	44
3.9. Cromatografia Líquida.....	46
3.9.1. Cromatografia clássica.....	48
3.9.2. Cromatografia Flash .....	49
3.9.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	49
3.9.4. Tamanho da partícula.....	50
3.9.5. Estrutura da partícula .....	51
3.9.5.1. Não porosas .....	51

3.9.5.2. Totalmente porosa .....	52
3.9.5.3. Peculiar (Core Shell).....	52
4. Parte Experimental.....	53
4.1. Reagentes e solventes .....	53
4.2. Padrões.....	54
4.3. Equipamentos.....	54
4.4. Espécies vegetais .....	55
4.5. <i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.....	56
4.5.1. Análise de umidade.....	57
4.5.2. Análise de carotenoides .....	57
4.5.2.1. Extração de carotenoides .....	57
4.5.2.2. Separação cromatográfica de carotenoides.....	58
4.5.3. Análise de antocianinas .....	59
4.5.3.1. Extração de antocianinas .....	59
4.5.3.2. Separação cromatográfica de antocianinas .....	59
4.5.4. Preparo dos padrões analíticos de antocianinas .....	60
4.5.4.1. Isolamento das antocianinas .....	60
4.5.4.2. Identificação das antocianinas por espectrometria de massas de alta resolução.....	61
4.5.4.3. Quantificação dos padrões isolados e preparo da curva analítica de antocianinas .....	61
4.5.5. Análise de ácidos fenólicos.....	63
4.5.5.1. Extração e hidrólises de ácidos fenólicos .....	63
4.5.5.2. Separação cromatográfica de ácidos fenólicos .....	64
4.5.6. Análise de capacidade antioxidante.....	65
4.5.6.1. Extração de compostos antioxidantes .....	65
4.5.6.2. Determinação da capacidade antioxidante - captura do radical livre ABTS <sup>+</sup> .....	66
4.5.6.3. Determinação da capacidade antioxidante - captura do radical livre DPPH <sup>+</sup> .....	67
4.5.7. Isolamento de substâncias não identificadas com padrões analíticos .....	68
4.5.7.1. Fracionamento em cartucho com fase mista.....	68
4.5.7.2. Fracionamento em cartucho com fase reversa.....	69
4.5.7.3. Espectrometria de massas .....	69
4.6. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltldl. ....	70
4.6.1. Preparação do extrato de <i>P. leiocarpa</i> .....	71
4.6.2. Separação e isolamento das substâncias de <i>P. leiocarpa</i> por CLAE.....	71
4.6.2.1. Coleta das frações .....	72
4.6.2.2. Secagem das frações .....	73
4.6.2.3. Espectrometria de massas .....	73
4.6.3. Separação e isolamento das substâncias de <i>P. leiocarpa</i> por cromatografia clássica.....	73

4.6.3.1. Análise por CG-EM.....	74
4.6.4. Comparação do extrato de <i>P. leiocarpa</i> com o extrato de outras espécies do gênero <i>Psychotria</i> .....	74
4.7. Caracterização estrutural das substâncias .....	75
4.7.1. Ressonância Magnética Nuclear .....	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
5.1. <i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.....	76
5.1.1. Análise de umidade.....	76
5.1.2. Análise de carotenoides .....	77
5.1.3. Análise de antocianinas .....	81
5.1.3.1. Isolamento e identificação das antocianinas .....	81
5.1.3.2. Quantificação dos padrões isolados e preparo das curvas analíticas de antocianinas .....	89
5.1.3.3. Quantificação das antocianinas nos frutos de <i>M. multiflora</i> .....	91
5.1.4. Análise de ácidos fenólicos.....	92
5.1.5. Análise da capacidade antioxidante.....	97
5.1.6. Isolamento de flavonoides para determinação estrutural.....	101
5.1.6.1. Caracterização estrutural dos flavonoides isolados .....	104
5.2. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schltdl.....	111
5.2.1. Preparação dos extratos de <i>P. leiocarpa</i> .....	111
5.2.2. Análise preliminar da fase aquosa .....	112
5.2.3. Isolamento e determinação estrutural das substâncias da fase aquosa.....	113
5.2.3.1. Ácido Clorogênico.....	114
5.2.3.2. Antocianinas aciladas .....	122
5.2.4. Isolamento e determinação estrutural das substâncias da fase orgânica.....	140
6. CONCLUSÕES .....	147
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
8. APÊNDICES.....	164
9. ANEXOS .....	181

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. Contraditoriamente, as espécies nativas são subutilizadas, pois pouco se conhece sobre suas aplicações e benefícios. É necessário conhecer e promover a valorização e, conseqüentemente a conservação da biodiversidade nacional. A química de produtos naturais visa conhecer as substâncias produzidas pelo metabolismo especial (secundário) dos organismos vivos, sendo o pontapé inicial na busca por aplicações para estes recursos naturais disponíveis.

A espécie *Myrcia multiflora* DC. é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Myrtaceae, ocorre desde a região norte até o Rio Grande do Sul. Popularmente é conhecida como “pedra-ume-caá”, suas folhas são utilizadas na medicina popular como hipoglicemiante e seus frutos podem ser consumidos como alimento.

Investigações com as folhas de *M. multiflora* resultaram no isolamento de acetofenonas, flavanonas e flavonóis. Extratos brutos e algumas substâncias isoladas foram testados para inibição das enzimas aldose redutase e glicosidase. Dentre os compostos isolados testados, as mirciatricinas, mirciafenonas, 1-desmantina e guajaverina apresentaram atividade hipoglicemiante. Apesar de existirem estudos fitoquímicos e até de atividade biológica com as folhas de *M. multiflora*, para os frutos não há relatos na literatura sobre o perfil das substâncias produzidas por seu metabolismo especial. A coloração roxa intensa de tais frutos sinaliza como um potencial de utilização como corante natural.

A espécie *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltdl., família Rubiaceae, conhecida popularmente como cafeeiro do mato, pertence à família Rubiaceae, é uma espécie nativa que ocorre desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul. Suas folhas apresentaram alta concentração do alcalóide indólico N, $\beta$ -D-glucopiranosil vincosamida, além disso, foram identificados iridoides e sesquiterpenos em suas folhas. O extrato aquoso das folhas desta planta apresentou ação alelopática na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* e *Mimosa bimucronata*. Quanto aos frutos, também não foram encontrados relatos na literatura resultante de estudos fitoquímicos desta parte da planta. A coloração azul, característica dos frutos de *P. leiocarpa*, chama a atenção pois não é comumente encontrada na natureza, tendo potencial de uso como um corante natural.

As espécies frutíferas selvagens, em geral, são consumidas apenas pela fauna silvestre, pois as pesquisas relacionadas aos frutos destas espécies, contendo informações sobre valor nutricional ou medicinal, são escassas. Deste modo, não há ferramenta para estimular o

consumo. A sazonalidade em que ocorre a frutificação e o acesso e identificação de plantas selvagens dificultam a caracterização fitoquímica dos frutos.

A química de produtos naturais visa separação, elucidação estrutural e caracterização dos constituintes das plantas, contribuindo, através de uma relação interdisciplinar, com diversas áreas da ciência, como, por exemplo: botânica, farmacologia, medicina, tecnologia de alimentos e nutrição, já que o estudo fitoquímico é uma etapa necessária na pesquisa por aplicações das espécies vegetais.

Esta interdisciplinaridade culminou no interesse pela química de produtos naturais, o que influenciou o desenvolvimento de tecnologias de separação, como a cromatografia, e de métodos espectroscópicos como UV, EM e RMN, que são as ferramentas primordiais utilizadas pelos profissionais da área.

A identificação de substâncias conhecidas sempre que possível deve ser priorizada através de técnicas que não necessitem de isolamento. Para o estudo de moléculas inéditas ainda é necessário o isolamento para a determinação estrutural inequívoca da substância. No entanto, com o desenvolvimento das técnicas de separação e equipamentos este isolamento pode ser otimizado, a fim de fornecer as substâncias isoladas com alto grau de pureza e consumir menor tempo e solvente.

A diversidade biológica dos gêneros *Myrcia* e *Psychotria*, a carência de trabalhos relacionados a substâncias produzidas pelos frutos das espécies *Myrcia multiflora* (Lam) DC. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltldl. e o potencial de utilização destes frutos como matéria prima para corantes naturais demandam o desenvolvimento de um estudo fitoquímico dos frutos destas espécies.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver o primeiro estudo fitoquímico dos frutos de *Myrcia multiflora* (Lam) DC. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar e quantificar as principais substâncias bioativas presentes nos frutos de *M. multiflora* através das análises por CLAE-DAD e EM com uso de padrões analíticos de ácidos fenólicos, carotenoides, antocianinas;
- ✓ Isolar as substâncias dos frutos de *M. multiflora* não identificadas por comparação com padrões para determinação estrutural;
- ✓ Determinar a capacidade antioxidante dos frutos de *M. multiflora* através de métodos de captura de radical livre;
- ✓ Isolar as substâncias dos frutos de *P. leiocarpa*;
- ✓ Caracterizar as substâncias isoladas através da interpretação dos dados espectroscópicos fornecidos por RMN, EM e UV-Vis e comparação com dados existentes na literatura;
- ✓ Identificar antocianinas em outras espécies do gênero *Psychotria* por comparação com o extrato de *P. leiocarpa*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Família Myrtaceae e gênero *Myrcia*

A família Myrtaceae compreende cerca de 3500 a 5000 espécies, com mais ou menos 100 gêneros, distribuídas predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na Austrália, sudeste da Ásia, América do Sul tropical e temperada (WILSON *et al.*, 2001). No Brasil é reconhecida como uma das famílias lenhosas com maior riqueza de espécies, destacando-se como uma das famílias mais comuns na formação das vegetações brasileiras (SOUZA, 2005). Do ponto de vista econômico são produtoras de madeiras, de frutos comestíveis e utilizadas como plantas decorativas. Já do ponto de vista medicinal algumas espécies apresentam importantes atividades biológicas (FERREIRA, 2010).

Dentre os gêneros da família Myrtaceae, destaca-se o *Myrcia*, em que se encontra a *M. multiflora*. No continente americano estão subordinadas ao gênero mais de 300 espécies, distribuídas desde o México até o sul do Brasil (LIMBERGER *et al.*, 2004). No Brasil foram relatadas 260 espécies nativas pertencentes ao gênero *Myrcia* (ZAPPI *et al.*, 2015).

Na medicina popular as espécies de *Myrcia* são utilizadas, principalmente, como hipoglicemiantes, destacando-se as conhecidas popularmente como pedra-ume-caá: *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC., *M. salicifolia* DC. e *M. speciosa* (Amshoff) McVaugh e *M. sylvatica* (G.Mey.) (LOPES, 2015).

Os óleos essenciais de algumas espécies do gênero *Myrcia* foram avaliados. Os principais constituintes do óleo essencial da espécie *Myrcia lundiana* são Ácido Nerólico, 1,8-cineol, Neral, Geranial, Isopulegol e Iso-isopulegol (ALVES *et al.*, 2016), da espécie *Myrcia ovata* são 1,8-Cineol, Linalool, Isopulegol, Citronellal, Iso-isopulegol, Neral, Geraniol, Geranial, Ácido Nerólico e (*E*)-Nerolidol (JESUS *et al.*, 2016; SAMPAIO *et al.*, 2016) e da espécie *Myrcia sylvatica* são  $\alpha$ -Curcumene,  $\beta$ -Selinene, Z-Calamenene,  $\alpha$ -Calacorene, 1-epi-Cubenol e Cadaleno (SACCOL *et al.*, 2018).

Os principais constituintes químicos fixos encontrados em espécies de *Myrcia* reportados na literatura são substâncias fenólicas principalmente da classe dos flavonoides (LOPES, 2015). A Tabela 1 apresenta algumas substâncias fenólicas identificadas no gênero *Myrcia*.



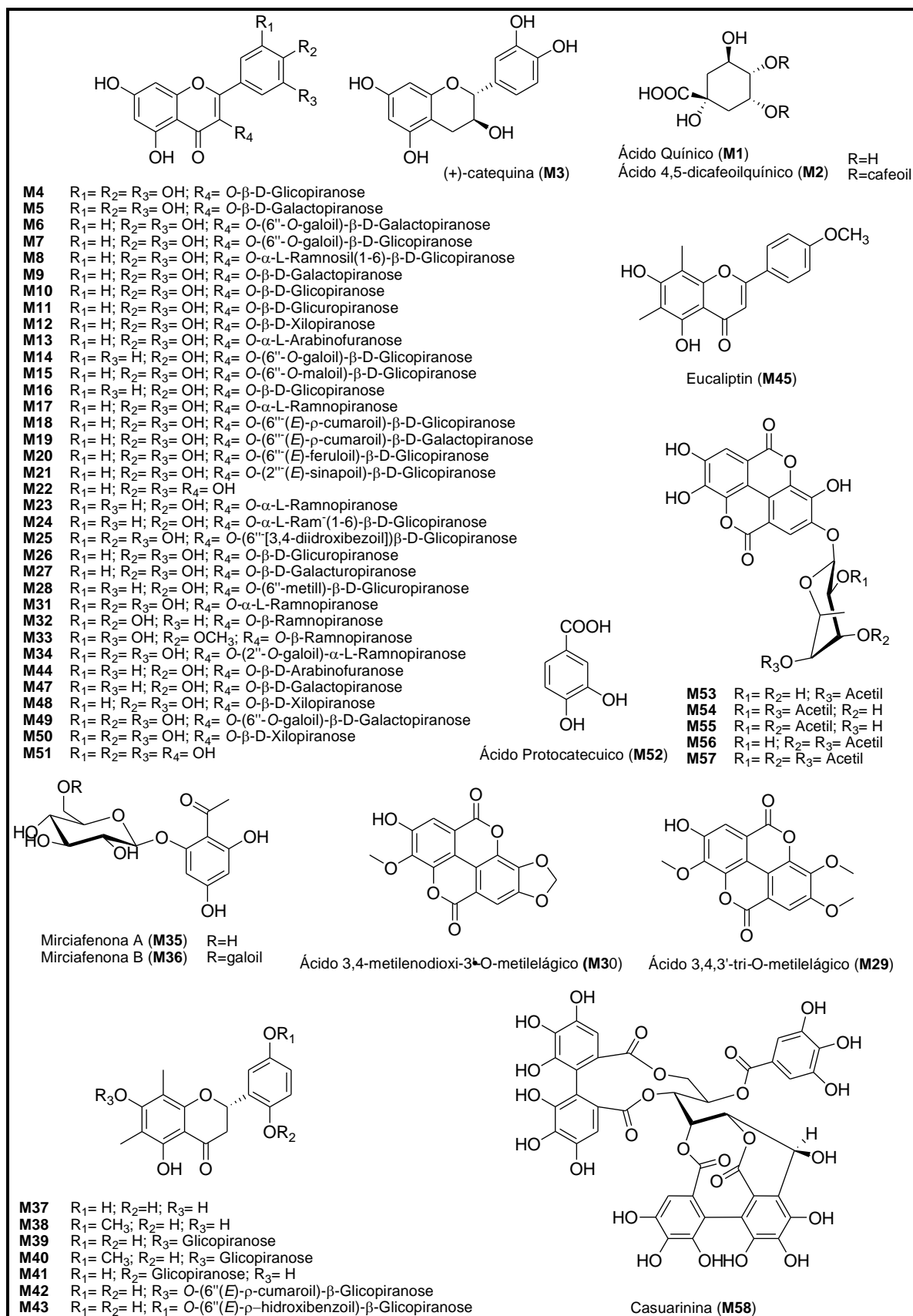
**Tabela 1.** Substâncias fenólicas identificadas no gênero *Myrcia*

Espécie	Partes	Cod.	Substância identificada no gênero <i>Myrcia</i>	Referência
<i>Myrcia rubella</i>	Folhas	M1	Ácido quínico	LIMA <i>et al.</i> , 2018
		M2	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	
		M3	(+)-catequina	
		M4	Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glicopiranosídeo	
		M5	Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo	
		M6	Quercetina-3- <i>O</i> -(6''-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	
		M7	Isoquercitrina-6''-galato	
		M8	Quercetina-3- <i>O</i> -( $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1-6))- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	
		M9	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo	
		M10	Isoquercitrina	
		M11	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucuronídeo	
		M12	Guajaverina	
		M13	Avicularina	
		M14	Kaempferol-3- <i>O</i> -(6''-galoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	
		M15	Quercetina-3- <i>O</i> -(6''-malonil)-glicopiranosídeo	
		M16	Astragalina	
		M17	Quercitrina	
		M18	Quercetina-3- <i>O</i> -(6''-( <i>E</i> )- $\rho$ -cumaroil))- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	
		M19	Quercetina-3- <i>O</i> -(6''-( <i>E</i> )- $\rho$ -cumaroil))- $\beta$ -D-galactopiranosídeo	
		M20	Quercetina-3- <i>O</i> -(6''-( <i>E</i> )-feruloil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	
		M21	Quercetina-3-(2''-( <i>E</i> )-sinapoil)- <i>O</i> -glicopiranosídeo	
		M22	Quercetina	
		M23	Kaempferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo	
		M24	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	
		M25	Miricetina-3- <i>O</i> -(6''-[3,4-diidroxibenzoil])- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	
		M26	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosídeo	
		M27	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo	
		M28	Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucuronídeo-6''-metiléster	
		M29	Ácido 3,4,3'-tri- <i>O</i> -metilelágico	
		M30	Ácido 3,4-metilenodioxil-3'- <i>O</i> -metilelágico	
M46	Ácido Arjunolico			
<i>Myrcia multiflora</i>	Folhas	M31	Miricitrina	MATSUDA <i>et al.</i> , 2002a; 2002b; YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 1998
		M32	Quercitrina	
		M33	Mearnsitrina	
		M34	1-desmantina	
		M12	Guajaverina	
		M35	Mirciafenona A	
		M36	Mirciafenona B	
		M37	Mirciacetina	
		M38	Metoximateucina	
		M39	Mirciaticina I	
		M40	Mirciaticina II	
		M41	Mirciaticina III	
		M42	Mirciaticina IV	
M43	Mirciaticina V			

**Tabela 1.** Continuação

<b>Espécie</b>	<b>Partes</b>	<b>Cod.</b>	<b>Substância identificada no gênero <i>Myrcia</i></b>	<b>Referência</b>			
<i>Myrcia tomentosa</i>	Folhas	M13	Avicularina	IMATOMI <i>et al.</i> , 2013			
		M44	Juglanina				
<i>Myrcia citrifolia</i>	Folhas	M45	Eucaliptin	WOLLENWEBER <i>et al.</i> , 1981			
		M47	Campferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo				
		M48	Quercetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosídeo				
		M12	Guajaverina				
		M13	Avicularina				
		M17	Quecitrina				
		M22	Quercetina				
		M49	Miricetina 3- <i>O</i> -(6''-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo				
		M5	Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo				
		M50	Miricetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosídeo				
		<i>Myrcia palustris</i>	Folhas		M31	Miricitrina	WUBSHET <i>et al.</i> , 2015
					M51	Miricetina	
					M34	1-desmantina	
M52	Ácido protocatecuico						
M53	Ácido 4- <i>O</i> -(4''- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)elágico						
M54	Ácido 4- <i>O</i> -(2'',4''- <i>O</i> -diacetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)elágico						
M55	Ácido 4- <i>O</i> -(2'',3''- <i>O</i> -diacetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)elágico						
M56	Ácido 4- <i>O</i> -(3'',4''- <i>O</i> -diacetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)elágico						
M57	Ácido 4- <i>O</i> -(2'',3'',4''- <i>O</i> -diacetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)elágico						
M58	Casuarina						

A Figura 1 apresenta algumas das substâncias fenólicas identificadas no gênero *Myrcia*.



**Figura 1.** Substâncias fenólicas identificadas no gênero *Myrcia*

### 3.2. *Myrcia multiflora* (Lam.) DC.

A *Myrcia multiflora* DC. (Figura 2), conhecida popularmente como “pedra-ume-caá” ou “planta insulina” (CRUZ, 1995) é utilizada na medicina popular como hipoglicemiante na forma de infusão ou decocção das folhas. Outros usos são no tratamento de hemorragias, diarreia, aftas e enterite, sendo as folhas e cascas as partes mais utilizadas dessa planta (ALMEIDA, 1993; YOSHIKAWA *et al.*, 1998; MATSUDA *et al.*, 2002). Alguns sinônimos botânicos desta espécie são *Myrcia sphaerocarpa* ou *Eugenia multiflora*. Possui uma ampla distribuição no Brasil, ocorrendo da região norte até o Rio Grande do Sul (SOUZA *et al.*, 2008). Na restinga do Rio de Janeiro ocorre na Reserva da Praia do Sul, Restinga da Marambaia, Jacarepaguá, Cabo Frio e Macaé (SOUZA, 2005).

É uma espécie que se apresenta em forma arbustiva, quando ocorrente em vegetações mais abertas com solo arenoso, como, por exemplo, na vegetação de transição entre dunas e restinga, e porte arbóreo quando em vegetação de floresta ombrófila com solo de maior influência argilosa. Floresce de julho a fevereiro e frutifica de outubro a abril (SOUZA, 2005). Dentre as mirtáceas neotropicais certamente é uma das espécies mais amplamente distribuídas (REFLORA *et al.*, 2018).



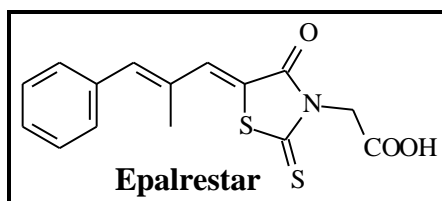
**Figura 2.** *Myrcia multiflora* DC.  
(Flora Digital RS, foto: Mateus Beise)

O peso e o tamanho médio dos frutos são de 4,5 g e 1,6 cm, respectivamente, apresentando frutificação inclusive em tamanhos menores. Seus frutos, com coloração do vermelho escuro ao roxo quando maduros contendo de uma a três sementes, são comestíveis e podem ser usados na fabricação de geléia e licor (COUTINHO *et al.*, 2013; RONCHI, 2017).

Coutinho *et al.* (2013) identificaram na polpa dos frutos de uma espécimen de *M. multiflora* o pH ácido (pH=3,9), o teor de açúcares redutores totais de 21 g/100 mL, a presença dos carboidratos Xilose e Glicose, dos aminoácidos Glicina, Lisina, Arginina, Metionina e Treonina e o teor de 22,96 % de Vitamina C. Para o óleo essencial das sementes observou antagonismo quando associado com o antibiótico Gentamicina, não tendo observado efeito quando associado aos antibióticos Kanamicina, Neomicina e Antamicina.

Estudos fitoquímicos com as folhas de *M. multiflora* resultaram no isolamento de acetofenonas (Mirciafenonas A [M35] e B [M36]), flavanonas (Mirciacetina [M37], Metoximateucina [M38], Mirciatricina I [M39], II [M40], III [M41], IV [M42] e V [M43]) e flavonóis (Miricitrina [M31], Mearnsitrina [M33], Quercitrina [M32], 1-desmantina [M34] e Guaijaverina [M12]) (Figura 1).

A atividade hipoglicemiante da *M. multiflora* vem sendo estudada. Em estudos recentes, tanto dos extratos brutos como de algumas substâncias isoladas, foram investigas como inibidor da enzima aldose redutase e glicosidase. Dentre os compostos isolados testados, as mirciatricinas (M39, M40, M41, M42, M43), mirciafenonas, 1-desmantina (M34) e Guaijaverina (M12) apresentaram atividade hipoglicimante, sendo que a 1-desmantina (M34) apresentou um potencial inibidor da enzima aldose redutase equivalente ao Epalrestat (Figura 3), um inibidor comercial sintético (MATSUDA *et al.*, 2002a; 2002b; YOSHIKAWA *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Estrutura química do Epalrestat

A Mirciafenona A (M35) isolada de folhas de *M. multiflora* apresentou atividade antiobesidade, hipolipemiante e hepatoprotetor, impediu a elevação do peso corporal de ratos

submetidos a uma dieta rica em gordura e reduziu os níveis de colesterol e triglicerídeos (FERREIRA *et al.*, 2010a; 2010b).

Verificou-se a existência de alguns estudos fitoquímicos e de atividades biológicas com as folhas de *M. multiflora*, porém não são relatadas informações sobre os metabólitos especiais presentes nos frutos desta espécie.

### **3.3. Família Rubiaceae e gênero *Psychotria***

A família Rubiaceae é constituída de cerca de 450 gêneros envolvendo 6.500 espécies. Seus integrantes são, principalmente, espécies arbóreas e arbustivas, sendo as espécies herbáceas pouco frequentes. O gênero *Psychotria* pertence a família Rubiaceae e compreende mais de 2000 espécies, distribuídas predominantemente em florestas tropicais e subtropicais (JUNIOR *et al.*, 2016), sendo 251 nativas do Brasil (ZAPPI *et al.*, 2015).

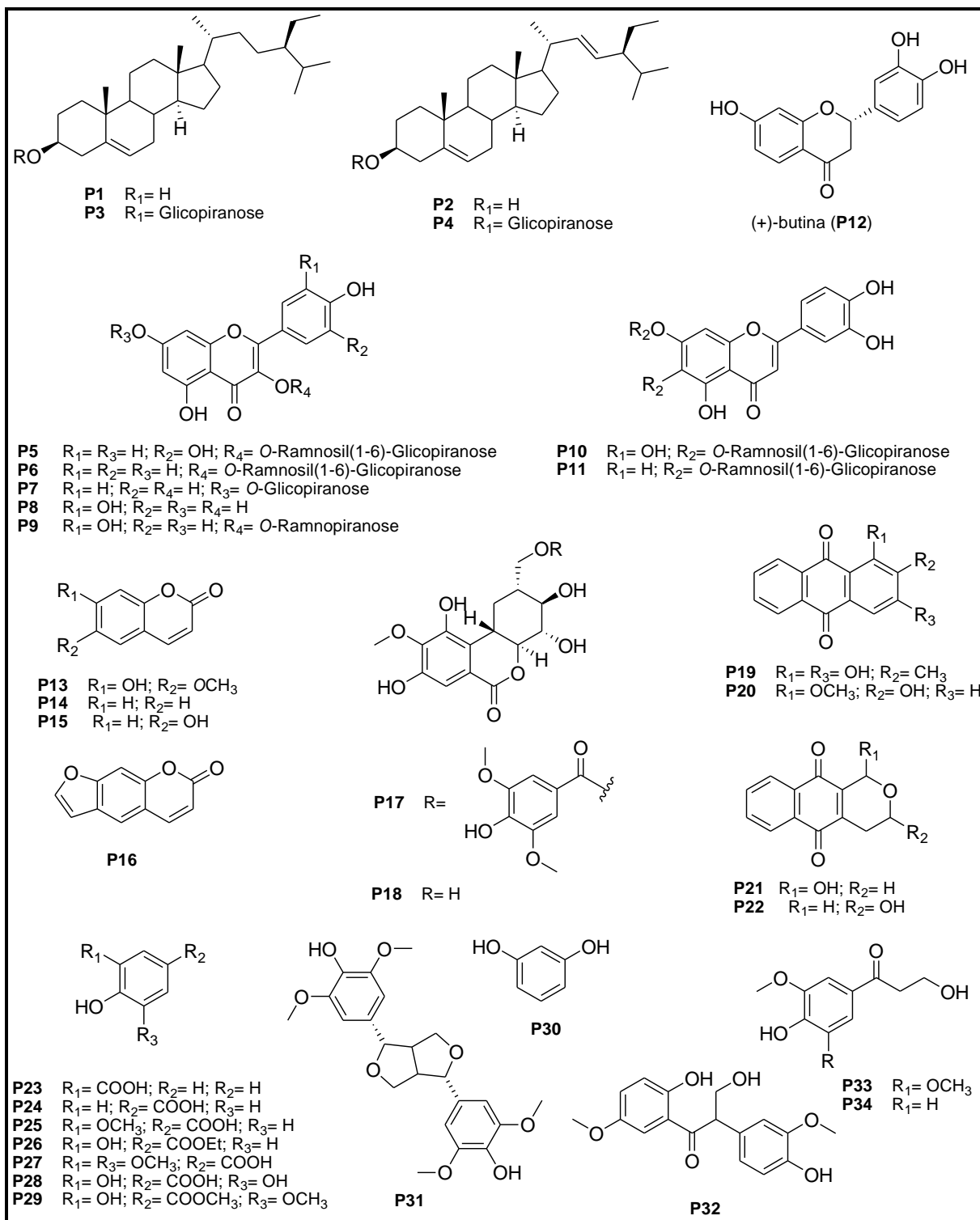
Cerca de 41 espécies do gênero *Psychotria* foram quimicamente investigadas, envolvendo estudos com as folhas, raízes, ramos, caules, partes aéreas e planta inteira (YANG *et al.*, 2016). O levantamento bibliográfico sobre os alcalóides do gênero *Psychotria* realizado por JUNIOR *et al.* (2017) revelou que o gênero é uma fonte potencial destas substâncias e pelo menos 70 alcalóides indólicos foram identificados. Cerca de 52 % das substâncias reportadas no gênero foram alcalóides, 12 % triterpenos e 6 % flavonoides. Dentre outras classes de substâncias que foram identificadas estão: norisoprednoides, esteroides, esfingolipídios, iridoides, ciclotídeos, benzoquinonas, feoforbídeos e outros compostos fenólicos (JUNIOR *et al.*, 2016).

Foram identificados esteróides em *P. correae* (ACHENBACH *et al.*, 1995), *P. hainanensis* (LI *et al.*, 2011), *P. sp.* (YE *et al.*, 2014), *P. stachyoides* (PÍMENTA *et al.*, 2011) e *P. vellosiana* (MORENO *et al.*, 2014), flavonoides em *P. spectabilis* (BENEVIDES *et al.*, 2005), *P. hainanensis* (LI *et al.*, 2011), *P. rubrae* (LU *et al.*, 2014; HAYASHI *et al.*, 1987) e *P. yunnanensis* (LU *et al.*, 2014) e ácidos fenólicos em *P. yunnanensis* (LU *et al.*, 2014) e *P.sp.* (ZHANG *et al.*, 2010). A Tabela 2 apresenta os esteroides e as substâncias fenólicas identificadas no gênero *Psychotria*.

**Tabela 2.** Substâncias fenólicas e esteroides identificados no gênero *Psychotria*

<b>Espécie</b>	<b>Parte</b>	<b>Cod.</b>	<b>Substância</b>	<b>Referência</b>
<i>P. correae</i>	Folhas e Raízes	<b>P3</b>	Daucosterol	ACHENBACH <i>et al.</i> , 1995
<i>P. hainanensis</i>	Folhas	<b>P4</b>	Stigmasterol glicopiranosídeo	LI <i>et al.</i> , 2011
		<b>P1</b>	$\beta$ -Sitosterol	
		<b>P3</b>	Daucosterol	
		<b>P5</b>	Rutina	
		<b>P6</b>	Campferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	
		<b>P7</b>	Campferol-7- <i>O</i> -glicopiranosídeo	
<i>P. rubra</i>	Raízes e Hastes	<b>P8</b>	Quercetina	LU <i>et al.</i> , 2014; HAYASHI <i>et al.</i> , 1987
		<b>P10</b>	6-Hidroxi-luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	
		<b>P11</b>	Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	
<i>P. sp.</i>	Hastes	<b>P22</b>	Psicorubrina	YE <i>et al.</i> , 2014; ZHANG <i>et al.</i> , 2010
		<b>P4</b>	Stigmasterol glicopiranosídeo	
		<b>P17</b>	11- <i>O</i> -Siringilbergenina	
		<b>P18</b>	(-)-bergenin	
<i>P. camponutans</i>	Raízes e Hastes	<b>P28</b>	Ácido Gálico	SOLIS <i>et al.</i> , 1995
		<b>P29</b>	Metilgalato	
		<b>P21</b>	1-Hidroxibenzoisocroman-quinona	
		<b>P8</b>	Quercetina	
<i>P. spectabilis</i>	Folhas	<b>P9</b>	Quercetrina	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2005
		<b>P14</b>	Coumarina	
		<b>P15</b>	Umbeliferona	
		<b>P16</b>	Psoraleno	
<i>P. stachyoides</i>	Folhas, Raízes e Partes aéreas	<b>P1</b>	$\beta$ -Sitosterol	PÍMENTA <i>et al.</i> , 2011
		<b>P3</b>	Daucosterol	
		<b>P4</b>	Stigmasterol glicopiranosídeo	
		<b>P13</b>	Escopoletina	
		<b>P19</b>	Rubiadina	
<i>P. vellosiana</i>	Partes aéreas	<b>P20</b>	Alizarina-1-metil éter	MORENO <i>et al.</i> , 2014
		<b>P1</b>	$\beta$ -Sitosterol	
		<b>P2</b>	Stigmasterol	
<i>P. yunnanensis</i>	Partes aéreas	<b>P13</b>	Escopoletina	LU <i>et al.</i> , 2014
		<b>P12</b>	(-)-Butina	
		<b>P23</b>	Ácido Salicílico	
		<b>P24</b>	Ácido 4-Hidroxibenzóico	
		<b>P25</b>	Ácid Vanílico	
		<b>P26</b>	Éster etil protocatecuato	
		<b>P27</b>	Ácido siríngico	
		<b>P30</b>	Resorcinol	
		<b>P31</b>	(+)-Siringaresinol	
		<b>P32</b>	2-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-3-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-oxo-1-propanol	
<b>P33</b>	3-Hidroxi-1-(3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil)-propan-1-ona			
<b>P34</b>	$\beta$ -Hidroxipro piovanilona			

A Figura 4 apresenta os esteróides e as substâncias fenólicas identificadas em espécies do gênero *Psychotria*.



**Figura 4.** Esteroides e substâncias fenólicas identificadas no gênero *Psychotria*



Existem relatos de espécies de *Psychotria* utilizadas na medicina popular, como exemplo temos a utilização de *P. colorata* no tratamento da dor de ouvido (flores) e dor abdominal (raízes e frutos) (VERROTA *et al.*, 1998) e de *P. serpens* como relaxante muscular e analgésico (YANG *et al.*, 2016). Além disso, a espécie *P. viridis* tem sido relatada como um dos ingredientes da bebida alucinógena *ayahuasca*, originalmente utilizada por povos indígenas da Amazônia e grupos religiosos (LOPES *et al.*, 2000; PIC-TAYLOR *et al.*, 2015).

Foram identificadas propriedades antimutagênica e antioxidante em *P. umbellata* e (FRAGOSO, 2008), analgésica em *P. colorata* e *P. umbellata* (ELISABETSKY *et al.*, 1995, BOTH *et al.*, 2002) e antimicobacteriana em *P. stachyoides* (MORAES *et al.*, 2011).

### 3.4. *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl

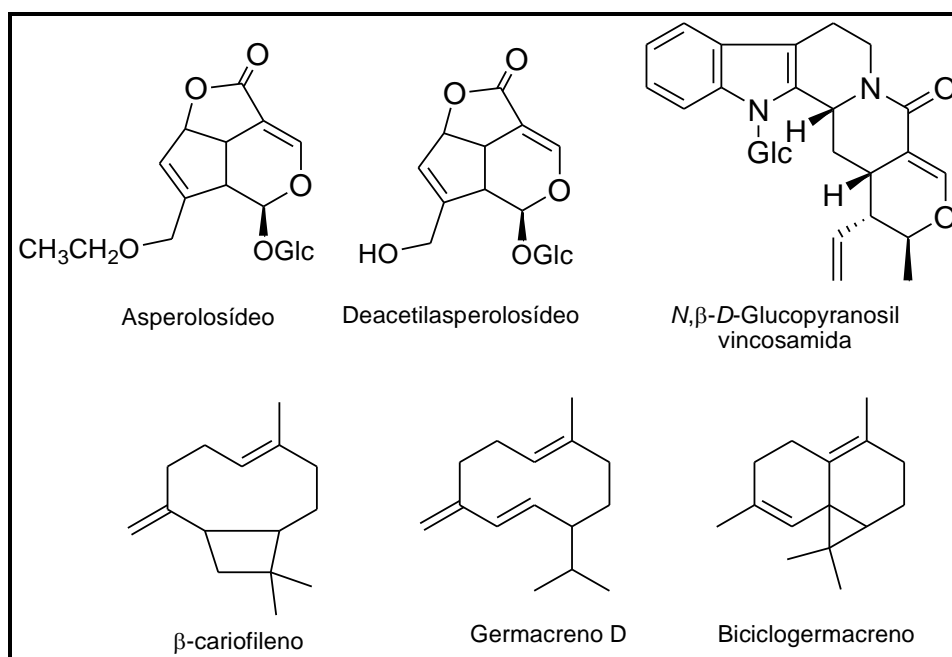
A espécie *P. leiocarpa* (Figura 5) é nativa no Brasil com ocorrência confirmada nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.



**Figura 5.** *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl  
(REFLORA, 2018, foto: Mario Gomes)

*P. leiocarpa* é um arbusto lenhoso do sub-bosque nativo das florestas do sul do Brasil, que ocorre em grupos de densidade relativamente alta. Folhas de plantas cultivadas em campo contêm aproximadamente 2,5 % de seu peso seco como alcalóide indólico *N*, $\beta$ -*D*-glucopiranosil vincosamida (GPV) (CORRÊA *et al.*, 2008). A espécie é tolerante a altas doses de UV-B, possivelmente devido ao acúmulo constitutivo de GPV nas folhas (MATSUURA *et*

al., 2016). Além do GPV, foram identificados nas folhas de *P. leiocarpa* os iridoides Asperulosídeo e Deacetilasperulosídeo (LOPES et al., 2004). ANDRADE *et al.* (2010) analisaram o óleo essencial das folhas de *P. leiocarpa*, tal óleo foi caracterizado exclusivamente por sesquiterpenos, como o Biciclogermacreno (35,6 %), o Germacreno D (17,6 %) e o  $\beta$ -cariofileno (7,2 %), respectivamente. A Figura 6 apresenta as substâncias identificadas na espécie *P. leiocarpa*.



**Figura 6.** Estrutura das substâncias identificadas em *P. leiocarpa*

O extrato aquoso de folhas de *P. leiocarpa* apresentou ação alelopática sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* e *Mimosa bimucronata* (CORRÊA *et al.*, 2008). Outra atividade biológica relatada foi a atividade analgésica do extrato etanólico de suas folhas (ELISABETSKY *et al.*, 1997).

### 3.5. Metabólitos secundários (especiais)

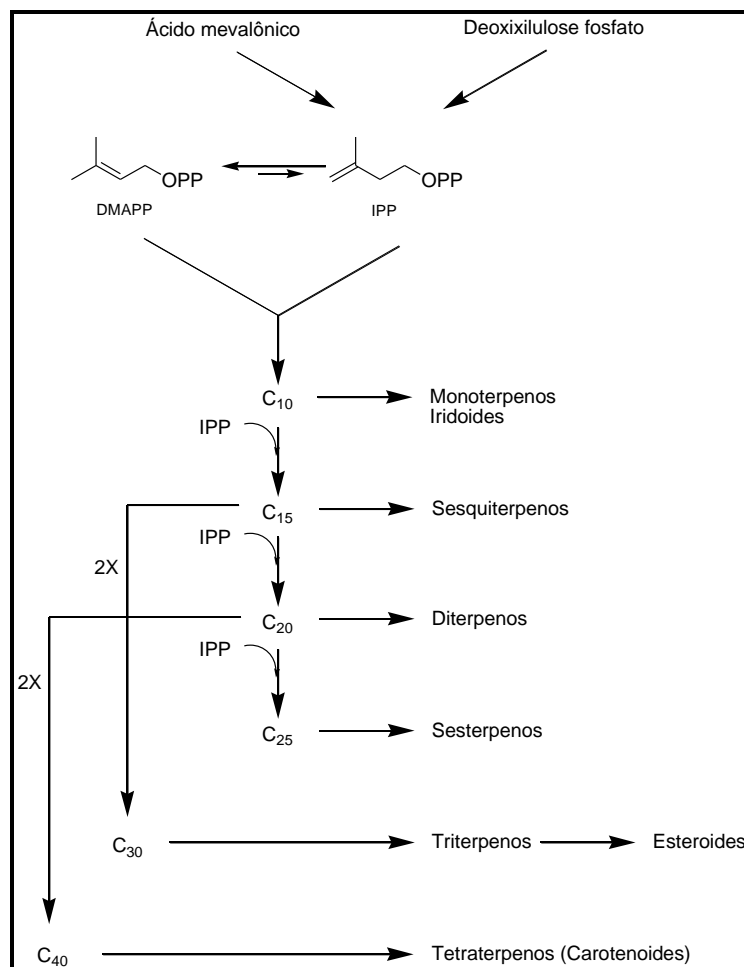
Metabólitos primários, como o açúcar, são largamente distribuídos na natureza sendo necessário para o desenvolvimento fisiológico, por exemplo: a divisão celular, crescimento e reprodução. Os metabólitos secundários (especiais) são derivados dos metabólitos primários e encontrados, principalmente em plantas e algas. Nas plantas, estão envolvidos na necessidade de adaptação ao seu ambiente; por exemplo, pigmentação, mecanismos de defesa química,

produtos finais de adaptação química à ambientes de estresse, são induzidos pela radiação solar, sendo sintetizado por tipos de células especializadas em diferentes estágios de desenvolvimento da planta ou durante processos vitais no combate a doenças (YÁÑES *et al.*, 2013).

### **3.6. Terpenos**

A classe dos terpenos é, provavelmente, a maior e mais diversificada classe de produtos naturais, ocorrendo em todos os organismos vivos, principalmente em plantas superiores. São empregados na indústria alimentícia, como aditivos alimentares e especiarias, na indústria de perfumaria como fragrâncias e cosméticos e na indústria farmacêutica como medicamentos (MARTINS *et al.*, 2017). A função dos terpenos nas plantas é considerada tanto ecológica quanto fisiológica, atuando na inibição do crescimento de plantas concorrentes (alelopatia), agindo como inseticidas, atraindo polinizadores ou atuando como hormônio vegetal (CSEKE, 2006).

Fazem parte da classe dos terpenos substâncias constituídas por unidades de Isopreno ( $C_5$ )<sub>n</sub>, unidos na forma cabeça-cauda e/ou cauda-cauda, formando os precursores Geraniol, Farnesol, Geranilgeraniol, Geranilfarnesol, Esqualeno e Fitoeno. O número de unidades de carbono possibilita a classificação em hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (Figura 7; DEWICK, 2002). Como todos os produtos naturais, dentro desta classificação simples existe uma enorme diversidade estrutural. Modificações nas estruturas de seus precursores e de produtos formados, como ciclizações, rearranjos, oxidações e reduções dão origem a uma ampla variedade de substâncias, mais de 30.000 terpenos já foram identificados (CSEKE, 2006).



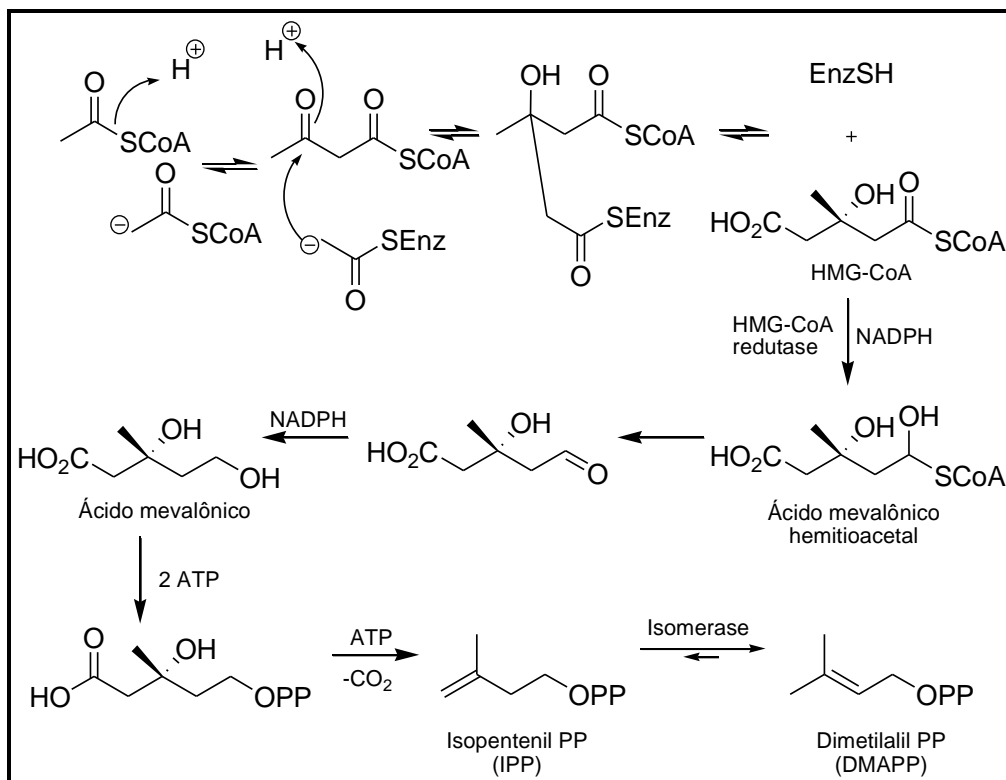
**Figura 7.** Classe dos terpenos e seus respectivos precursores (Adaptado de DEWICK, 2002)

### 3.6.1. Biossíntese dos terpenos

A biossíntese sugere a rota pela qual os metabólitos são sintetizados nos organismos vivos. Os produtos do metabolismo especial (secundário) são divididos conforme características no esqueleto básico, sendo que cada grupo de metabólitos especiais possui um precursor na rota biossintética. O conhecimento da rota biossintética das classes de metabólitos, aliado aos dados espectroscópicos, é importante no processo de elucidação estrutural de produtos naturais.

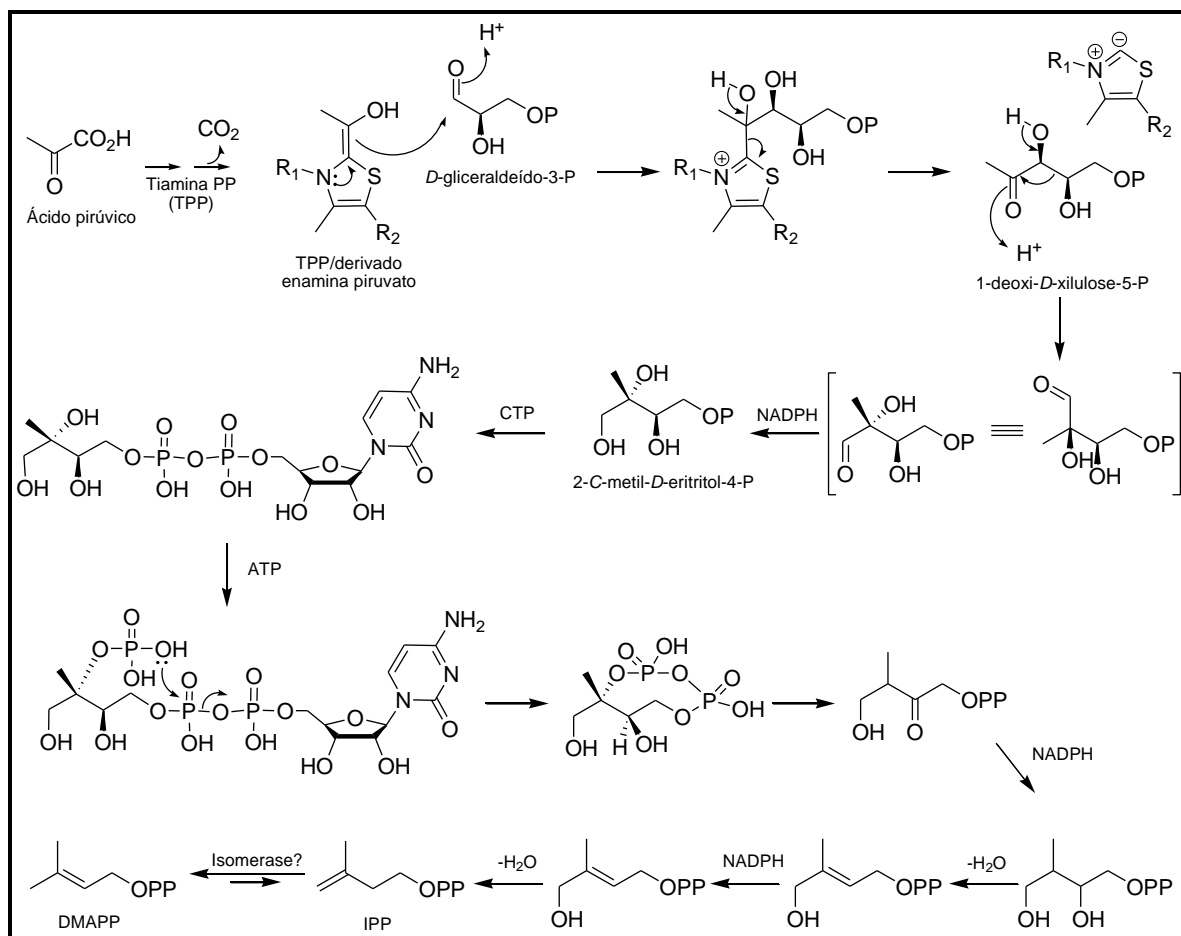
O precursor dos terpenos é o Isopentenil Difosfato (IPP), que pode ser produzido bioquimicamente por duas vias biossintéticas diferentes, através dos intermediários Ácido Mevalônico ou 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato. Os animais parecem não ter a via do 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato, utilizando exclusivamente o caminho do Ácido Mevalônico. Outros organismos, incluindo as plantas, são equipados para empregar ambas as vias. Nas plantas, as

duas vias parecem ser compartimentalizadas, de modo que as enzimas do caminho do mevalonato estão localizadas no citosol, enquanto as enzimas da via do 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato são encontradas nos cloroplastos. Por conseguinte, os triterpenos e os esteróis são formados pela via do Ácido Mevalônico, enquanto que a maioria dos outros terpenóides são formados nos cloroplastos e são derivados do 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato (DEWICK, 2002; Esquema 1 e 2).



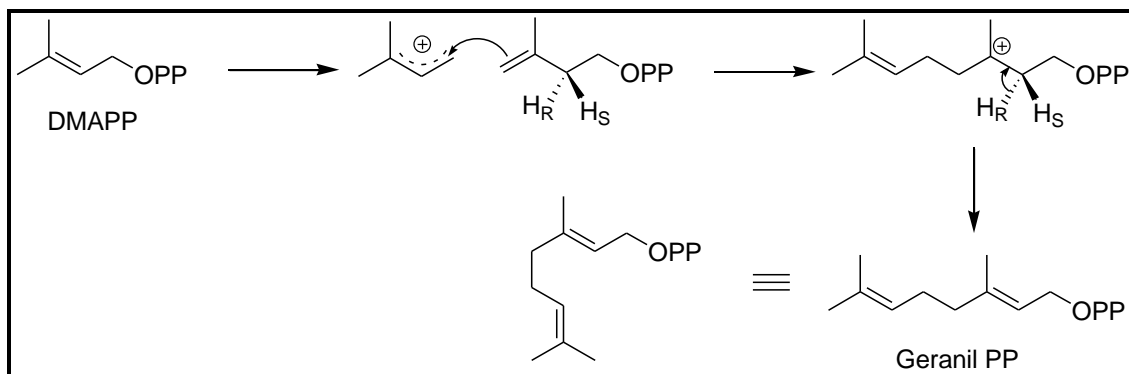
**Esquema 1.** Via do Ácido mevalônico para biossíntese do IPP e DMAPP (Adaptado de DEWICK, 2002)

Na via do Ácido Mevalônico o Dimetilalil Difosfato (DMAPP) é formado a partir da isomerização do IPP. Existem evidências que na via do 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato o DMAPP pode ser formado independentemente. Os Esquema 2 apresenta a via da 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato para biossíntese do IPP e DMAPP.



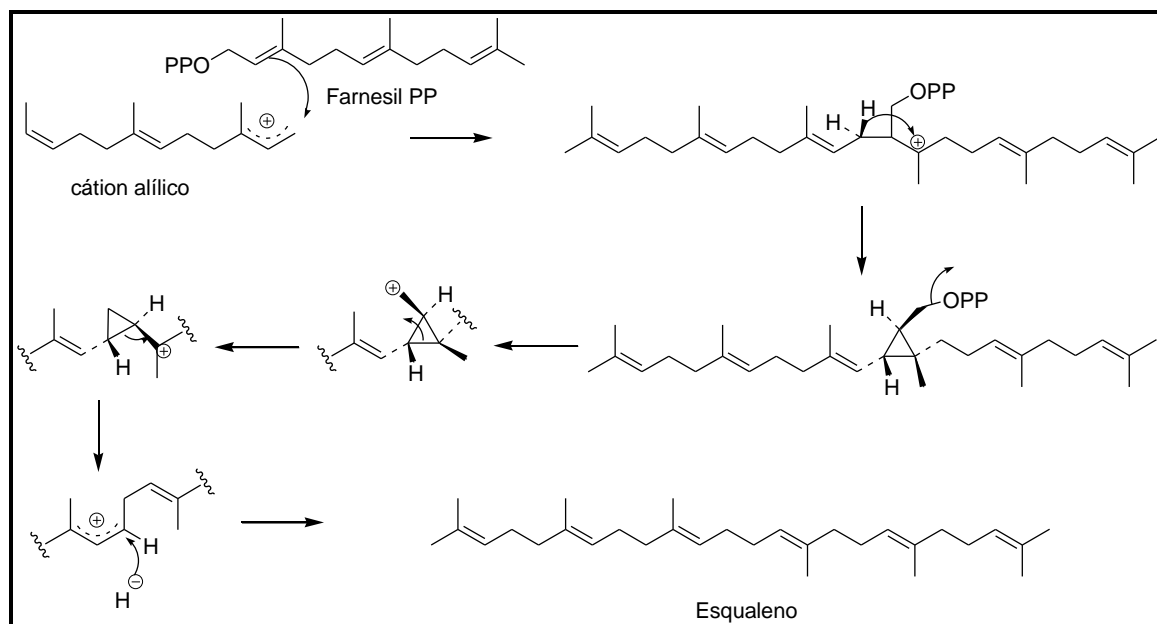
**Esquema 2.** Via da 1-deoxi-*D*-xilose-5-fosfato para biossíntese do IPP e DMAPP (Adaptado de DEWICK, 2002)

Geraniol (C<sub>10</sub>), Farnesol (C<sub>15</sub>), Geranilgeraniol (C<sub>20</sub>) e Geranilfarnesol (C<sub>25</sub>) são formados exclusivamente por unidades de Isopreno conectadas via ligação cabeça-cauda, enquanto que Esqualeno (C<sub>30</sub>) e Fitoeno (C<sub>40</sub>) exibem uma ligação cauda-cauda no centro das moléculas. O Esquema 3 sumariza a formação da ligação cabeça-cauda envolvida na biossíntese do Geraniol PP.

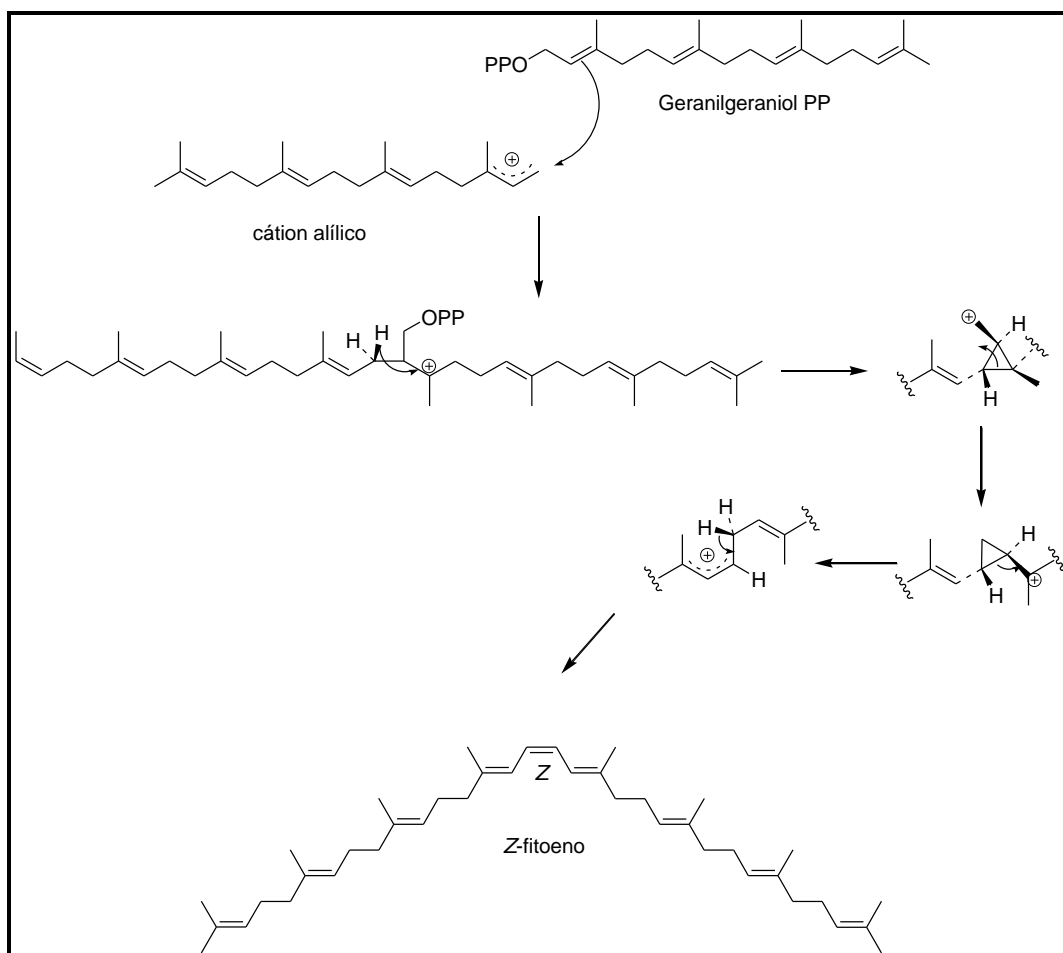


**Esquema 3.** Formação da ligação cabeça-cauda envolvida na biossíntese do Geranyl PP (Adaptado de DEWICK, 2002)

Para a formação do Esqualeno, o cátion alílico aceita um íon hidreto do NADPH, mas para a biossíntese do Fitoeno, um próton é perdido, gerando uma ligação dupla no centro da molécula, e assim uma cadeia conjugada de três ligações é desenvolvida. Este sistema impede o tipo de ciclização que ocorre com o Esqualeno que dá origem aos triterpenos (DEWICK, 2002). Os Esquemas 4 e 5 resumizam a formação da ligação cauda-cauda envolvida na biossíntese do Fitoeno e Esqualeno.



**Esquema 4.** Formação da ligação cauda-cauda envolvida na biossíntese do Esqualeno (Adaptado de DEWICK, 2002)



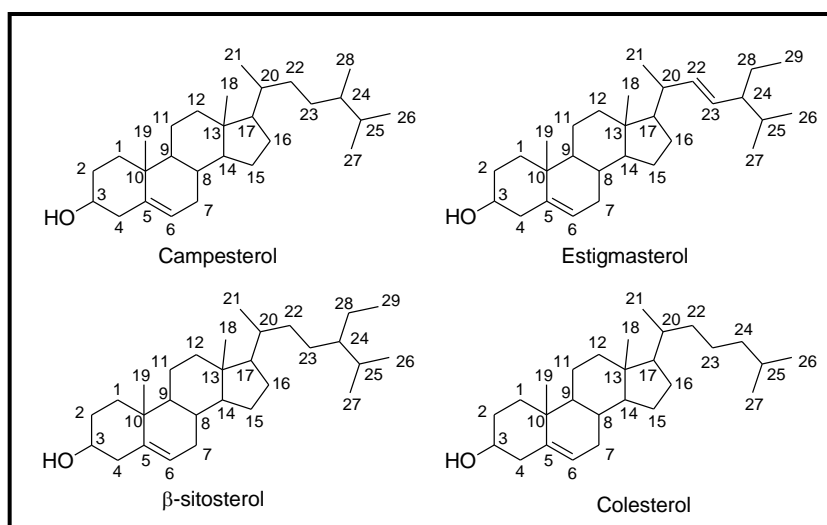
**Esquema 5.** Formação da ligação cauda-cauda envolvida na biossíntese do Z-fitoeno (Adaptado de DEWICK, 2002)

### 3.6.2. Esteróis

Os esteroides são triterpenos modificados, possuindo o sistema do anel tetracíclico do Lanosterol, porém sem os grupos metílicos nas posições C-4 e C-14 (DEWICK, 2002). Quando os esteroides são hidroxilados na posição C-3, recebem a denominação de esteróis. Os esteróis de plantas usualmente são chamados de “fitoesteróis”, os quais, em geral, possuem uma cadeia lateral na posição C-17 (SHAHZAD *et al.*, 2017). A estrutura dos esteróis vegetais muito se assemelha à estrutura do Colesterol, que é de longe o esteroide mais abundante encontrado em células animais (CSEKE, 2006; Figura 8). Mais de 250 diferentes esteróis foram identificados nas células vegetais, esta diversidade envolve principalmente diferenças nas substituições em C-4 e modificações na posição C-24 da cadeia lateral (SHAHZAD *et al.*, 2017; MOREAU *et al.*, 2018). Os fitoesteróis podem ser divididos em



grupos de acordo com sua estrutura e biossíntese: esteróis 4-desmetilado, 4- $\alpha$ -monometilado e 4,4-dimetilado. Os esteróis 4,4-dimetilado e 4- $\alpha$ -monometilado são precursores do 4-desmetilado, ocorrendo em níveis muito mais baixos que o produto final. Esteróis 4-desmetilados podem ser categorizados em  $\Delta^5$ -esteróis,  $\Delta^7$ -esteróis e  $\Delta^{5,7}$ -esteróis de acordo com a posição e o número de duplas ligações no anel B. A maioria dos esteróis vegetais, por exemplo, Campesterol e Sitosterol, são do tipo  $\Delta^5$ -esterol e possuem uma metila ou etila adicional substituinte em C-24 (PIIRONEN *et al.*, 2000; MOREAU *et al.*, 2002).



**Figura 8.** Estrutura dos principais esteróis encontrados nas plantas em comparação com a estrutura do colesterol

Os esteróis vegetais são componentes essenciais das membranas de todos os organismos eucarióticos. Nas plantas sua função parece ser controlar a fluidez e a permeabilidade da membrana, embora alguns esteróis vegetais tenham uma função específica na transdução de sinal (PIIRONEN *et al.*, 2000).

Os esteróis vegetais mais comuns na dieta humana são  $\beta$ -sitosterol, Campesterol e Estigmasterol. As concentrações desses esteróis variam entre os grupos de alimentos, mas uma distribuição típica deles em alimentos vegetais comuns consiste em 50-65% de  $\beta$ -sitosterol, 10-40% de Campesterol e 0-35% Estigmasterol (MOREAU *et al.*, 2018). Há evidências de que estes esteróis produzidos pelas plantas atuam na redução dos níveis de LDL no sangue (HENDRIKS *et al.*, 1999), prevenindo doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (BOMBO *et al.*, 2013; MOGHADASIAN *et al.*, 2016). A ingestão de  $\beta$ -sitosterol e Estigmasterol na dieta foi associada a redução de risco de câncer de esôfago e ovário, respectivamente (SHAHZAD *et al.*, 2017).

### 3.6.2.1. Análise e identificação de esteróis

Os fitoesteróis são encontrados nas plantas, em geral, em baixa concentração (<0,5% de um óleo de semente, e ainda menores porcentagens de tecidos vegetais inteiros). Um procedimento de extração para separar lipídios de outras substâncias é tradicionalmente o primeiro passo na análise de fitosteróis, por exemplo, a extração por Soxhlet. Solventes não polares como hexano ou éter de petróleo extraem eficientemente os fitoesteróis livres e esterificados. Solventes mais polares, como etanol ou acetona, são eficientemente na extração de fitoesteróis glicosilados (MOREAU *et al.*, 2018). Antes da análise cromatográfica frequentemente é realizada uma etapa de purificação do extrato. Alguns métodos empregados são a partição com solventes orgânicos e água (LEE *et al.*, 2018) e extração em fase sólida (ROZENBERG *et al.*, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser empregada para análise de fitoesteróis utilizando-se os detectores de arranjo de diodos e/ou de espectrometria de massas. Para quantificação de fitoesteróis Lee *et al.* (2018) utilizaram um sistema de cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Na separação foi empregada uma coluna de C<sub>18</sub> e fase móvel constituída por metanol e acetonitrila. Rozenberg *et al.*, (2003) utilizaram um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização química a pressão atmosférica para identificação de fitoesteróis em matrizes vegetais. A separação foi realizada em coluna de C<sub>18</sub> com fase móvel constituída por metanol e água.

No entanto, a técnica mais comum para a quantificação de fitoesteróis é a cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC). Esta técnica de separação é empregada, principalmente, devido a capacidade da CG em resolver compostos estruturalmente semelhantes. Antes da análise, os extratos podem ser derivatizados utilizando N-*O*-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida ou *n*-(terc-butildimetilsilil)-N-metil trifluoroacetamida para estabilizar termicamente o esterol, formando uma porção trimetilsilil na hidroxila (DUONG *et al.*, 2017). A etapa de derivatização não é mandatória, mas comumente é empregada, pois melhora a volatilidade, o formato do pico, os fatores de resposta e também ajuda a evitar a degradação térmica (MOREAU *et al.*, 2018).

A identificação de compostos usando FID é baseada nos tempos de retenção de padrões de referência. Técnicas diretas, como a espectrometria de massa também são frequentemente usadas para identificação. O uso da espectrometria de massas acoplada a CG permitiu a

identificação de fitosteróis com o uso de bibliotecas espectrais, portanto, sem o uso de padrões de referência (DUONG *et al.*, 2017).

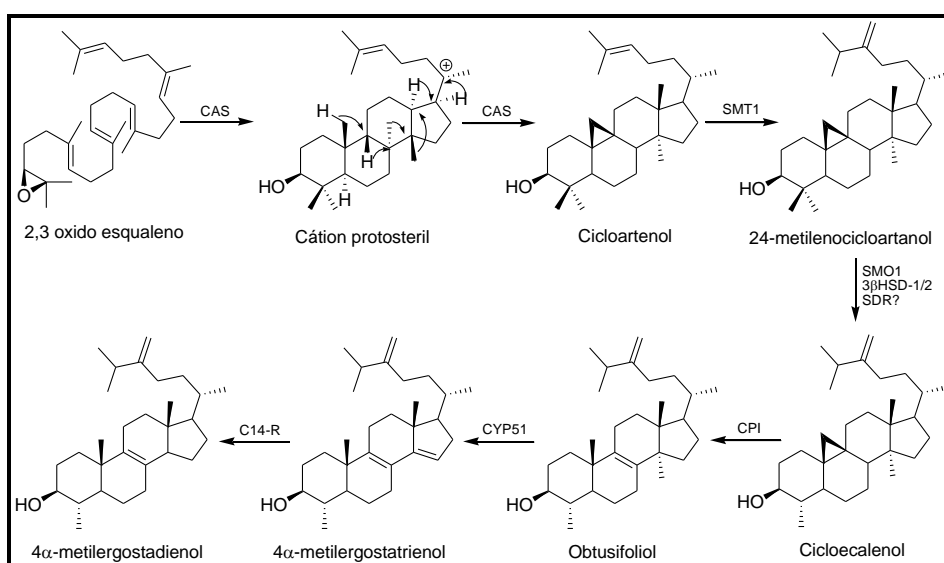
### 3.6.2.2. Biossíntese de esteróis

A biossíntese dos fitosteróis tem como precursor o Óxido de esqualeno que através de uma reação enzimática forma o cátion Protosteril. Este, por sua vez, sofre um rearranjo formando o Cicloartenol.

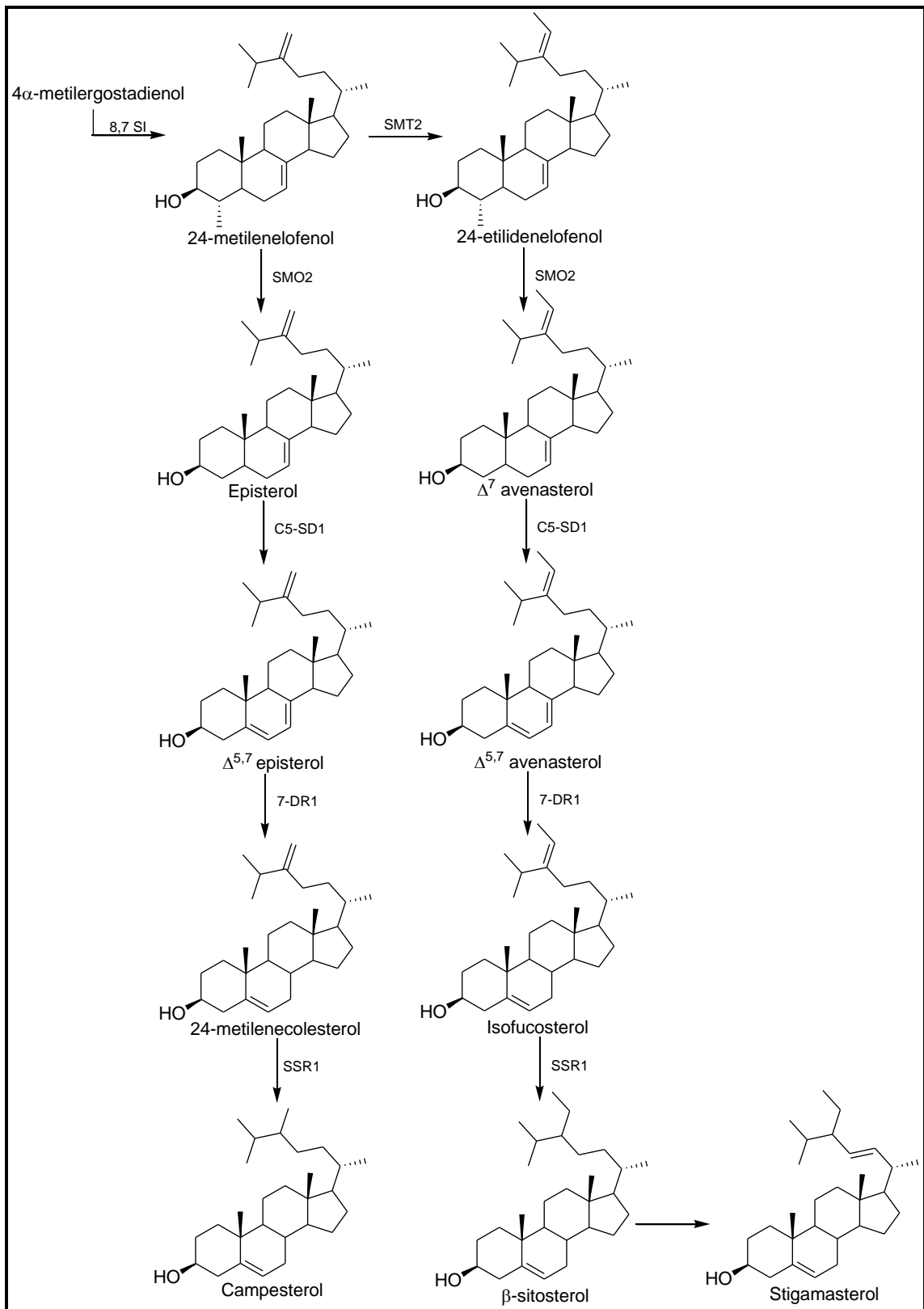
Os principais esteróis em plantas são caracterizados por possuírem um (metila) ou dois (etila) carbonos na cadeia lateral, situados na posição C-24. A fonte destes carbonos (metila ou etila) é a S-adenosilmetionina (SAM). Para que a alquilação aconteça é necessária a presença de uma ligação dupla na posição C-24, como ocorre no esqueleto do Cicloartenol.

Uma série de modificações no esqueleto do esterol ocorre concorrentemente para formar o 24-metilenelofenol, como por exemplo, perda de metila, abertura do anel de ciclopropano e migração da dupla ligação. Por ação da SAM o 24-metilenelofenol pode ser metilado para formar os esteróis com esqueleto 24-etil.

Novamente uma série de reações de perda de metila e migração da dupla ligação ocorrem dando origem aos principais fitosteróis, como Isofucosterol,  $\beta$ -sitosterol, Campesterol e Estigmasterol (DEWICK, 2002). A biossíntese destes fitosteróis foi resumida nos Esquemas 6 e 7.



**Esquema 6.** Formação do 4 $\alpha$ -metilergostadienol a partir do 2,3 óxido esqualeno (Adaptado de SONAWANE, 2016)

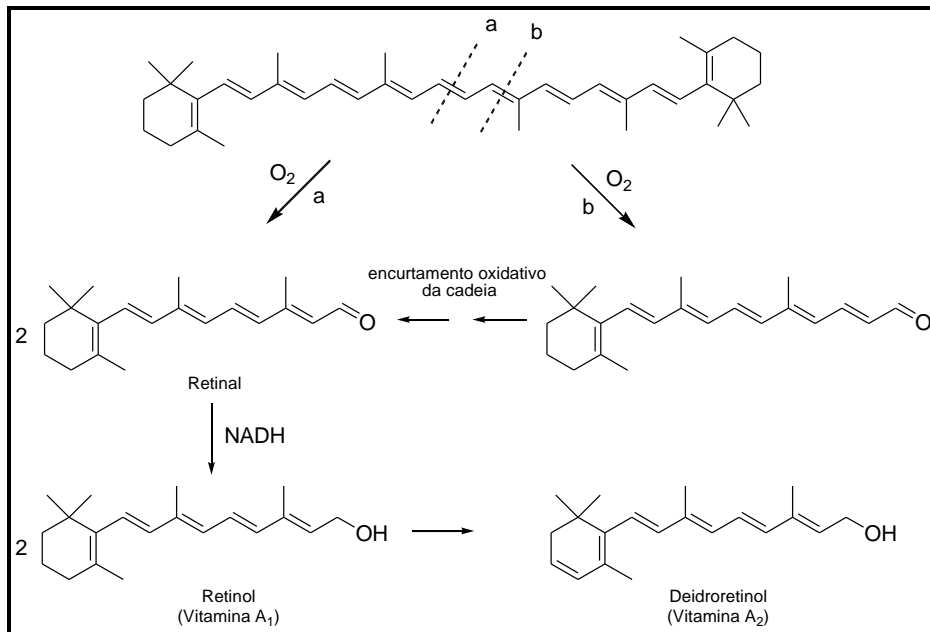


**Esquema 7.** Formação dos principais esteróis vegetais a partir do 4 $\alpha$ -metilergostadienol (Adaptado de SONAWANE, 2016)

### 3.6.3. Carotenoides

Carotenóides são tetraterpenos sintetizados por todos os organismos fotossintéticos e alguns procariontes e fungos não fotossintéticos. Nos sistemas fotossintéticos, os carotenóides são essenciais para a fotoproteção contra o excesso de luz e contribuem para sua captação. As espécies do reino animal, com raríssimas exceções, não produzem carotenoides (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018). Os seres humanos não são capazes de sintetizar carotenóides, então necessitam ingerí-los através da dieta (MARIUTTI *et al.*, 2018).

O principal papel dos carotenoides na saúde humana está relacionado à sua capacidade de atuação como precursores de retinoides, incluindo a Vitamina A (Retinol). A atividade provitamina A, é restrita a carotenóides que possuem em sua estrutura o anel  $\beta$ -ionona. Apenas 30 carotenoides conhecidos são considerados precursores da Vitamina A, dentre eles estão  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e o mais potente deles o  $\beta$ -caroteno, por apresentar dois anéis  $\beta$ -ionona (PACHECO *et al.*; 2009; Esquema 8).

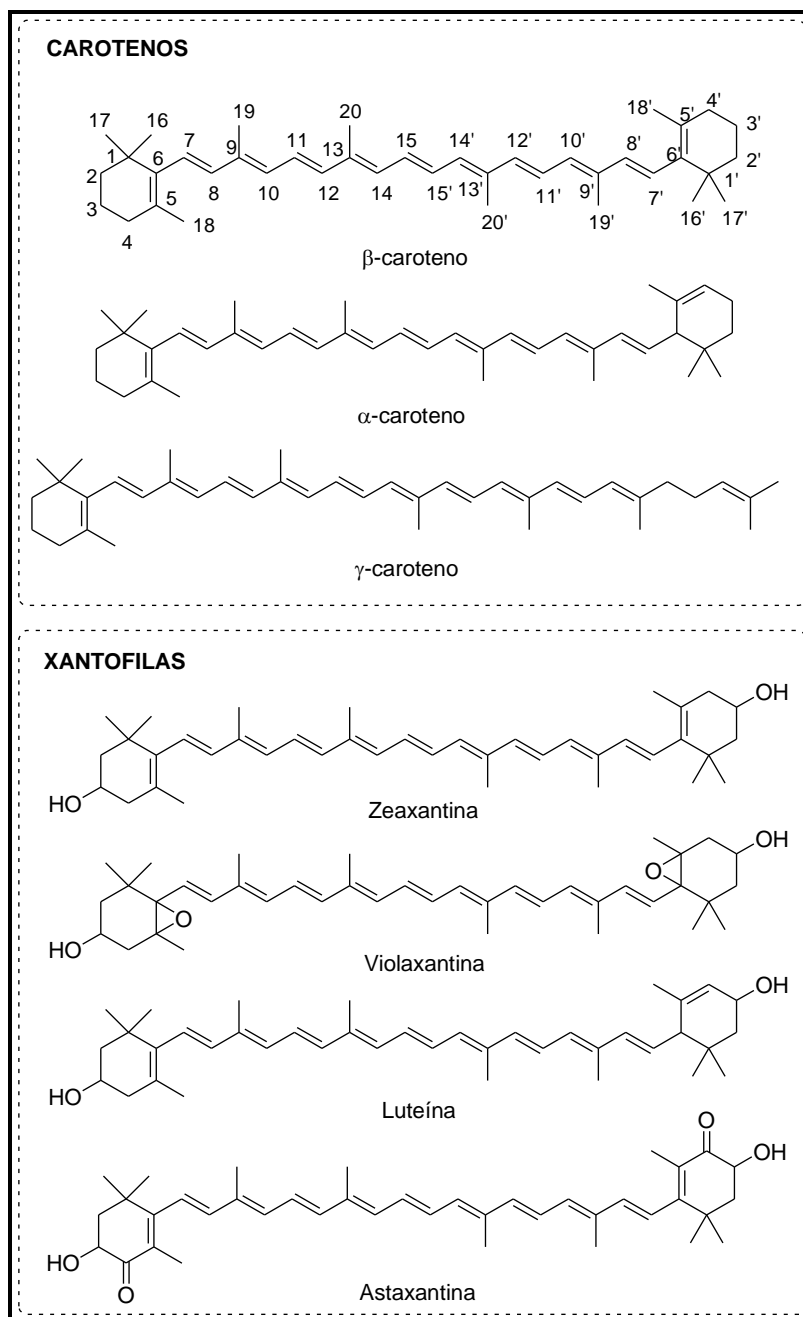


**Esquema 8.** Formação de duas moléculas de retinol a partir de uma molécula de  $\beta$ -caroteno (DEWICK, 2002)

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o consumo de alimentos ricos em carotenóides está associado à diminuição do risco de alguns tipos de câncer (LINNEWIEL-HERMONI *et al.*, 2015) e doenças cardiovasculares (KULCZYNSKI *et al.*, 2017), além

disso, alguns carotenoides, como a Zeaxantina e Luteína apresentaram efeito protetor na degeneração macular relacionada à idade (STRINGHAM & STRINGHAM, 2016).

Duas classes de carotenóides podem ser encontradas: carotenos, que possuem apenas átomos de carbono e hidrogênio, e xantofilas, que também possuem átomos de oxigênio, envolvidos em os grupos hidroxila, epóxi e carboxila (MARIUTTI *et al.*, 2018; Figura 9).



**Figura 9.** Exemplos de carotenos e xantofilas

Os carotenóides que possuem grupos hidroxilas podem ser encontrados na natureza tanto como xantofilas livres como ésteres (acilados com ácidos graxos), como glicosídicos, proteicos ou outros derivados, resultando em um alto número de possíveis estruturas de ésteres de carotenoides (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018; MARIUTTI *et al.*, 2018). Tais modificações podem alterar suas propriedades físicas e químicas e influenciar em seus papéis biológicos (RODRIGUEZ-CONCEPCION *et al.*, 2018).

### **3.6.3.1. Análise de carotenoides**

Na extração de carotenos e xantofilas esterificadas são indicados solventes não polares, como o hexano, enquanto que para extração de xantofilas os solventes mais indicados são acetona e etanol (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014). Para facilitar o rompimento das estruturas celulares uma substância abrasiva, como a celite, pode ser utilizada na extração. A extração deve ser rápida para prevenir a isomerização dos carotenoides. Para este fim também podem ser usados alguns antioxidantes como hidroxitolueno butilado (BHT), ácido ascórbico e piragalol (PACHECO, 2009).

Algumas matrizes apresentam xantofilas esterificadas com ácidos graxos. Para liberação da xantofila é realizada uma hidrólise básica após a etapa de extração, frequentemente emprega-se hidróxido de potássio para este fim. A comparação dos perfis cromatográficos antes e após a hidrólise fornece informações sobre as xantofilas esterificadas, que aparecem no cromatograma como xantofilas livres após a hidrólise. Adicionalmente, a hidrólise básica do extrato de carotenoides também é utilizada para simplificar a separação, através da remoção de substâncias interferentes capazes de dificultar a determinação cromatográfica, como clorofila e lipídios. (PACHECO, 2006; WALD *et al.*, 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando colunas constituídas de fase estacionária reversa C<sub>30</sub> e fase móvel constituída de metanol e éter metil *terc*-butílico em modo isocrático ou gradiente são frequentemente utilizadas na separação dos carotenoides. Estas condições cromatográficas apresentam melhor resolução dos isômeros geométricos do que quando se utiliza colunas de fase C<sub>18</sub> (NUNES & MERCADANTE, 2006). Os detectores acoplados a CLAE mais utilizados na análise de carotenoides são o detector de arranjo de diodos (DAD) e de espectrometria de massas (EM), a utilização destes detectores em série fornecem dados valiosos para identificação do carotenoide (AMORIM-CARRILHO *et al.*, 2014).

Além da extração em fase líquida e análise por CLAE-DAD outras técnicas têm sido aplicadas na análise de carotenoides. Giuffrida *et al.*, (2018) compararam a quantificação dos carotenoides  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina utilizando a extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono e metanol e análise por cromatografia por fluido supercrítico acoplada a espectrometria de massas com a extração em fase líquida com hexano e acetato de etila e CLAE-DAD e concluíram que para estes carotenoides as metodologias apresentaram resultados quantitativos similares.

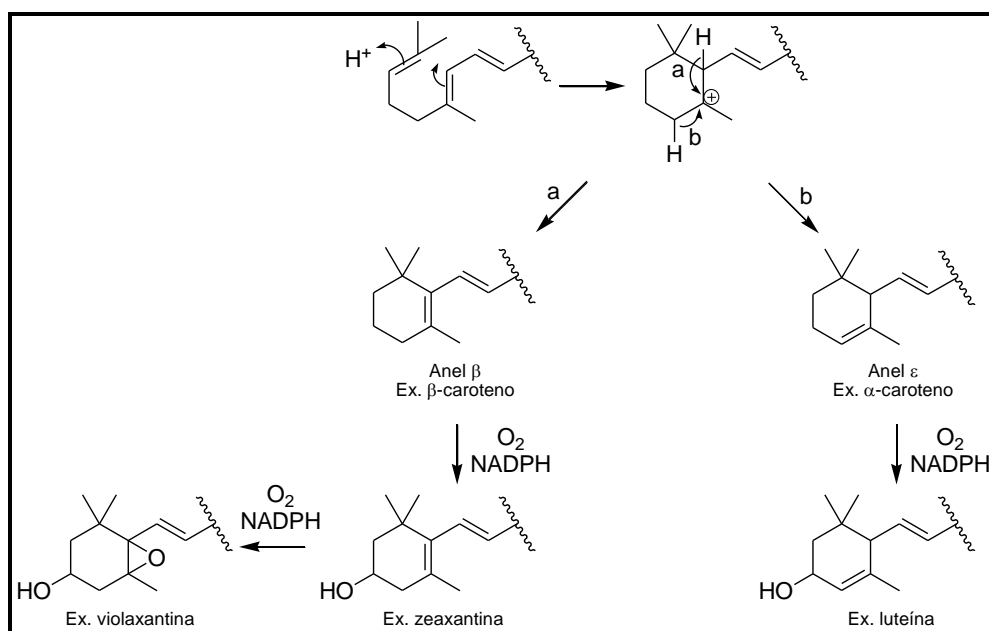
Martins (2015) empregou a espectrofotometria para quantificação de carotenoides totais utilizando a lei de Lambert Beer e correlacionou com as porcentagens dos carotenoides individuais obtidos pela análise cromatográfica. Concluindo que este método de normalização possui vantagens como praticidade, não necessitar de padrões analíticos e sua quantificação ser independente do volume injetado na quantificação de carotenoides. Mas para ser aplicado é necessário certificar que todos os componentes da amostra absorvam na região da análise utilizada para o cálculo de carotenoides totais e sejam eluídos e detectáveis através da metodologia cromatográfica utilizada.

O espectro de UV-Vis dos carotenoides é resultado da longa cadeia de duplas ligações conjugadas presentes nas moléculas dos carotenoides, que facilita na deslocalização eletrônica, diminuindo a energia necessária para promover a transição eletrônica. Em geral, a absorção da luz visível pela molécula de carotenoide é suficiente para levá-la ao seu estado excitado. Como esperado, o aumento da cadeia de duplas ligações conjugadas promove o correspondente deslocamento batocrômico e, conseqüentemente, os máximos de absorção aparecem em maior comprimento de onda, resultando na percepção da coloração na região do amarelo ao vermelho. Observa-se os máximos de absorção do  $\beta$ -caroteno em  $\lambda_{\text{máx}}=450$  nm e do  $\alpha$ -caroteno em  $\lambda_{\text{máx}}=445$  nm, revelando que a dupla ligação endocíclica de um dos anéis do  $\alpha$ -caroteno não está conjugada com as demais ligações duplas conjugadas (Figura 9). A presença de grupos hidroxílicos não conjugados com o restante da cadeia não afeta o cromóforo da molécula. Assim, os espectros do  $\beta$ -caroteno e da sua xantofila derivada, a  $\beta$ -criptoxantina, são praticamente iguais. A isomerização da dupla ligação na posição C-13 do  $\beta$ -caroteno promove o aparecimento de uma banda de absorção em  $\lambda=336$  nm e quando esta isomerização ocorre na posição 9 a banda sofre um deslocamento hipsocrômico, ou seja, quanto mais para próximo da região central da molécula mais intensa é esta banda (PACHECO, 2009).



### 3.6.3.2. Biossíntese de carotenoides

Os carotenoides são biossintetizados a partir do Fitoeno através de uma sequência de reações enzimáticas de dessaturação removendo pares de hidrogênios alternadamente de cada lado do sistema trieno seguida pela de isomerização da dupla ligação central, dando origem ao Licopeno. Através do fechamento de anel do tipo  $\beta$ -ionona ou  $\alpha$ -ionona na(s) extremidade(s) da molécula do licopeno se originam os demais carotenoides (Figura 10).



**Figura 10.** Ciclização da cadeia terminal em carotenoides

### 3.7. Flavonoides

Os flavonóides são metabólitos especiais biossintetizados por organismos vivos e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos. Nas plantas aparecem envolvidos em mecanismos de resposta contra o estresse da elevação da radiação UV-B e infecção por microorganismos ou ataque herbívoro, desempenhando também um papel importante na interação com insetos e na fertilidade de algumas espécies (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Principalmente as antocianinas e flavonóis, atuam nas plantas atraindo polinizadores e disseminadores de sementes e contribuindo na pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas (RICE-EVANS, 2004).

Estes produtos naturais constituem um grupo de substâncias com esqueleto básico fundamental de quinze átomos de carbono formando o difenilpropano ( $C_6C_3C_6$ ), dois anéis

benzênicos (A e B) conectados por três átomos de carbono (C). Podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham unidades flavonoídicas, como as flavolignanas, sendo frequentemente encontradas como glicosídeos. O trabalho “The Handbook of Natural Flavonoids” listou 6467 flavonoides contendo estrutura, referência e informação sobre atividade biológica (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

O grau de oxidação dos três carbonos centrais (anel C), inserido entre os dois grupos arílicos (anéis A e B) e a forma de conexão com os anéis A e B, originam esqueletos básicos das subclasses dos flavonóides: chalconas, diidrochalconas, auronas, diidrauronas, isoflavonas, diidroisoflavonas, flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavanas e antocianidinas (GROTEWOLD, 2006; Figura 11).

Os flavonoides receberam considerável atenção na literatura, destacando-se por sua importância biológica e fisiológica (RIJKE *et al.*, 2006). Diversos efeitos benéficos à saúde humana vêm sendo atribuídos aos flavonoides, acreditando-se que esses efeitos se baseiam principalmente na atividade antioxidante atuando como sequestradores de radicais livres (PRIOR & CAO, 2000) e quelantes de metais (TERAO & PISKULA, 1999). Estudos mostraram que uma dieta rica nesses compostos está associada ao baixo risco de algumas formas de câncer (KNEKT *et al.*, 1997; NEUHOUSER, 2004) e doenças cardiovasculares (HERTOG *et al.*, 1997; YOCHUM, 1999). Quantidades consideráveis de flavonoides são consumidas diariamente na dieta de vegetais e frutas (YÁÑEZ *et al.*, 2013).

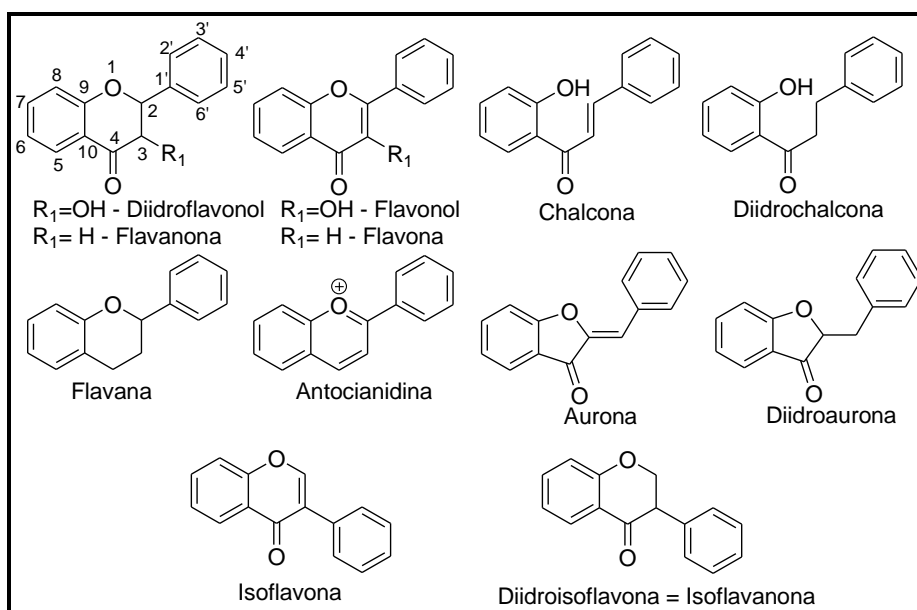
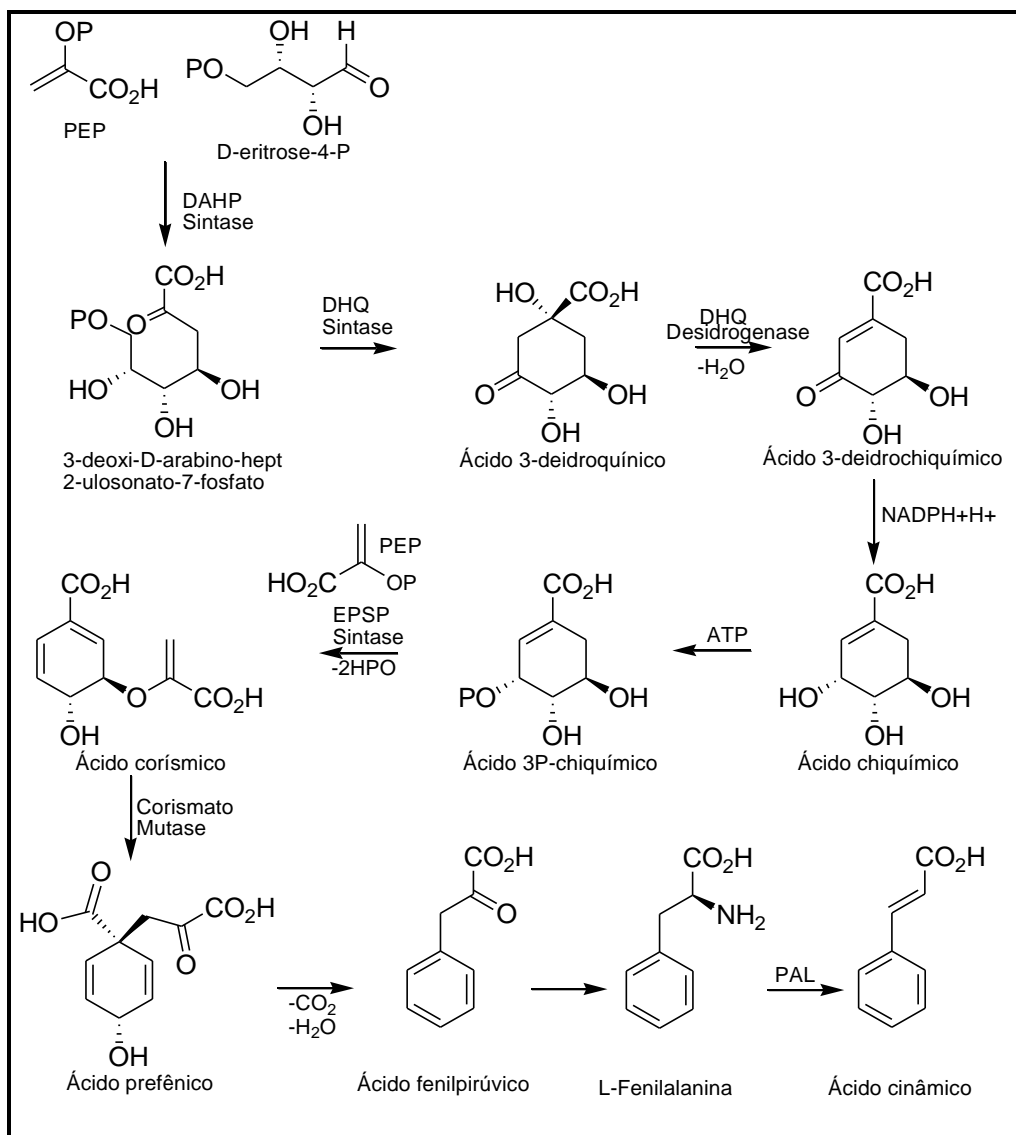


Figura 11. Esqueleto básico das subclasses dos flavonoides

### 3.7.1. Biossíntese de flavonoides

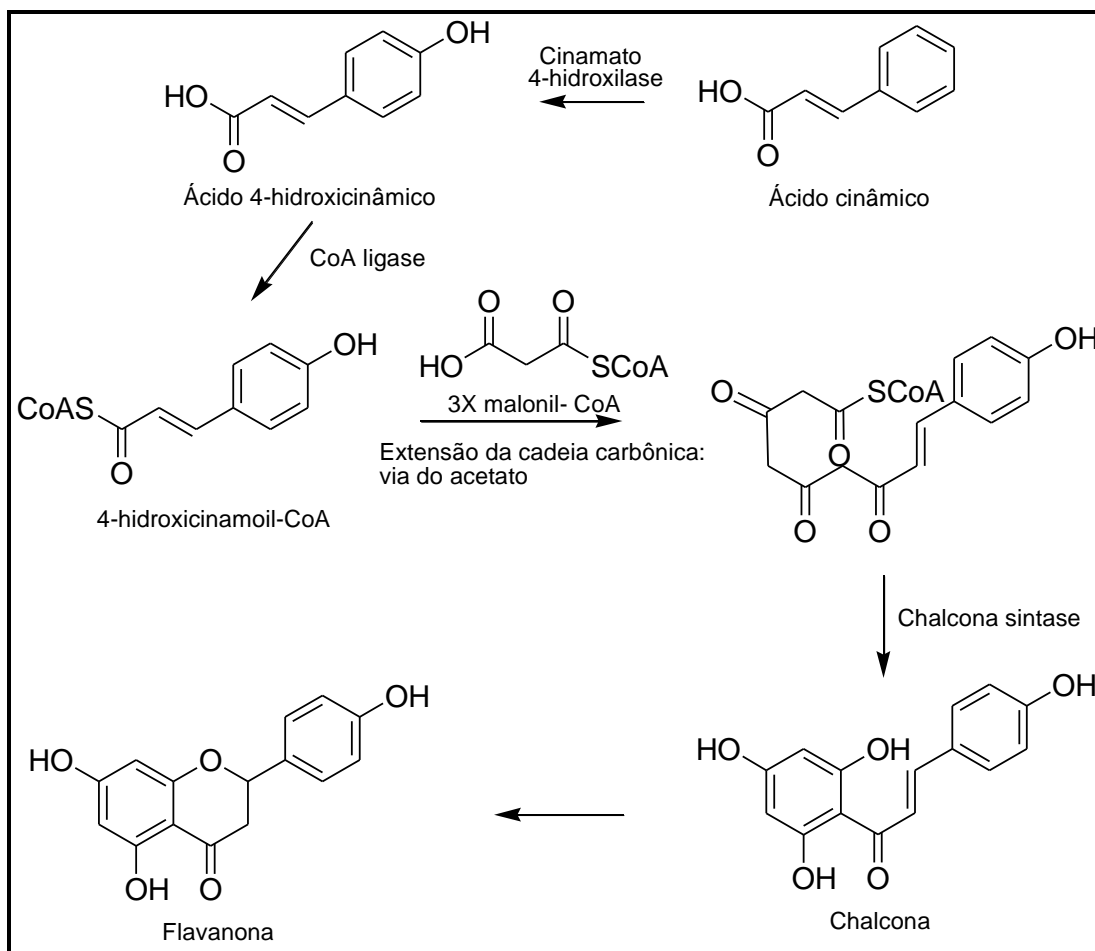
A rota biossintética dos flavonoides é considerada uma via mista, pois o esqueleto básico dos flavonoides resulta de duas rotas biossintéticas distintas: a via do Ácido Chiquímico e a via do Acetato. A via do Ácido Chiquímico produz o Ácido Cinâmico, sendo esta via responsável pela formação do anel B e a ponte de três átomos de carbono. O anel aromático A, é originário da via do Acetato através de três unidades (DEWICK, 2002).

A via do Ácido Chiquímico se inicia com a reação do Fosfoenopiruvato com Eritrose-4-fosfato para obtenção de 3-deoxi-*D*-arabino-hept-2-ulosonato-7-fosfato (Esquema 9). Esta reação é um tipo de condensação aldólica, catalisada pela enzima Deoxi-*D*-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHP Sintase). Em seguida a Desidroquinato Sintase (DHQ Sintase) catalisa a conversão de 3-deoxi-*D*-arabino-hept-2-ulosonato-7-fosfato em Ácido 3-desidroquínico. A Deidroquinato Desidrogenase (DHQ Desidrogenase) promove a desidratação do Ácido 3-dehidroquínico à Ácido 3-dehidrochiquímico via um intermediário imínico. A incorporação de uma molécula de Fosfoenopiruvato ao Ácido chiquímico ocorre via uma reação de adição e eliminação gerando Ácido 3-enolpiruvilchiquímico 3-fosfato (EPSP) é catalisada pela enzima 3-enolpiruvilchiquímico 3-fosfato Sintase (EPSP Sintase). A transformação de EPSP em Ácido Corísmico envolve uma eliminação-1,4 de Ácido Fosfórico. A transformação do Ácido Corísmico à Ácido Prefênico ocorre via rearranjo de Claisen, com transferência do derivado do Fosfoenolpiruvato. Esta reação é catalisada pela enzima Corismato Mutase. Com a descarboxilação e aromatização do Ácido Prefênico forma-se o Ácido Fenilpirúvico, que posteriormente sofre transaminação formando a Fenilalanina. A enzima Fenilalanina Smônia Liase (PAL) catalisa e eliminação da amônia para formação do Ácido Cinâmico (DEWICK, 2002).



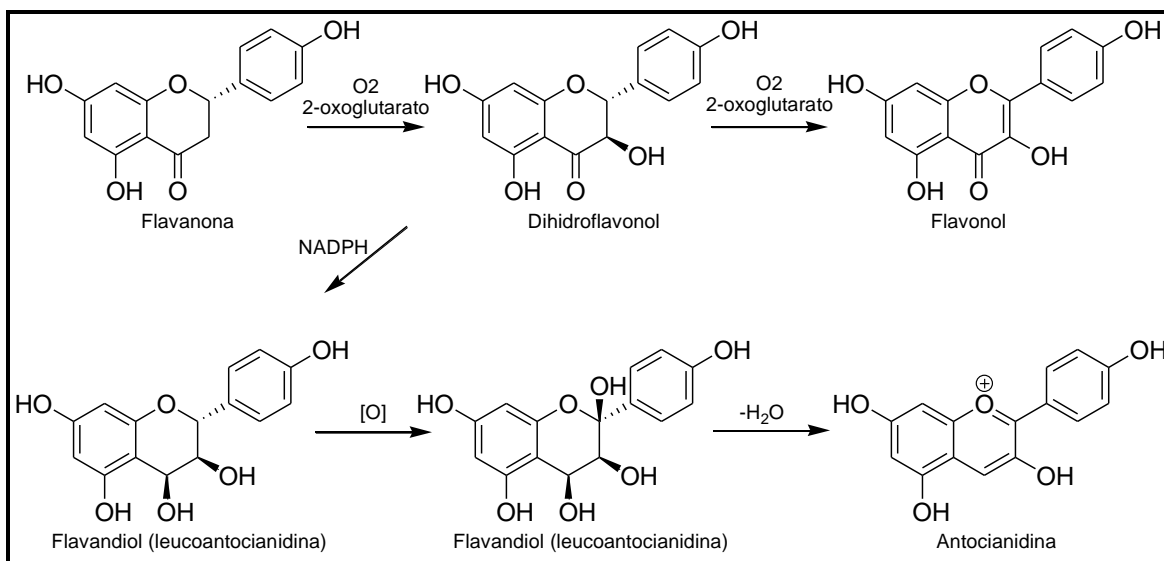
**Esquema 9.** Via do Ácido Chiquímico  
(Adaptado de DEWICK, 2002)

A formação do anel A ocorre pela via do acetato, através da condensação com três moléculas de Malonil CoA. A enzima Cinamato 4-hidroxilase converte Ácido Cinâmico em Ácido *p*-cumárico e então o grupo Acetil-CoA é adicionado pela enzima CoA Ligase. O produto é transformado em chalcona pela enzima Chalcona Sintase. O Esquema 10 apresenta a via do Acetato.



**Esquema 10.** Via do Acetato  
(Adaptado de DEWICK, 2002)

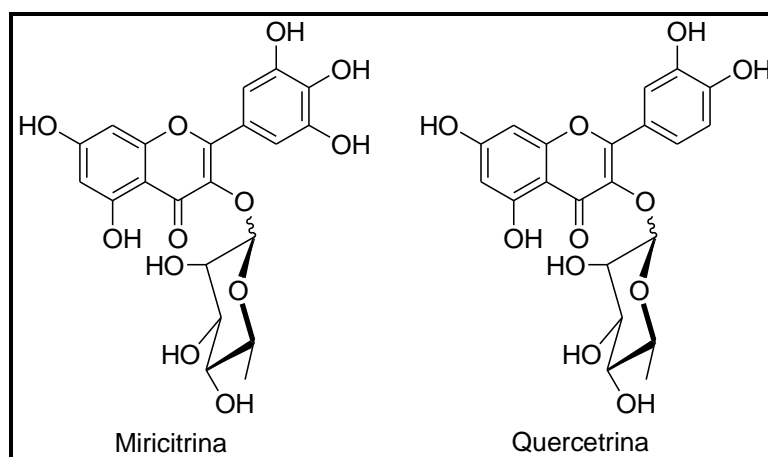
Chalconas são precursores dos demais flavonoides (Esquema 10), a maioria contendo um heterociclo de seis membros, formado por uma reação tipo Michael pelo ataque nucleofílico da hidroxila da arila (anel A) à posição  $\beta$  da cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. A chalcona é transformada em flavanona através de reação catalisada pela enzima Chalcona Isomerase (DEWICK, 2002). A flavanona é precursora dos flavonóis e antocianidinas, passando pelo dihidroflavonol (Esquema 11). Modificações na oxigenação dos anéis aromáticos, normalmente ocorrem no estágio de flavanona ou diidroflavonol. Também é possível que ocorram etilações, metilações, glicosilações, isoprenilações, entre outras modificações gerando uma enorme gama de compostos (YÁÑES *et al.*, 2013).



**Esquema 11.** Formação de antocianidinas e flavonóis a partir da flavanona

### 3.7.2. Flavonóis

Os flavonóis são caracterizados pela presença de um átomo de oxigênio (grupos hidroxila, metoxila, carboidrático como exemplos) ligado no C-3 do esqueleto flavônico. Constituem uma das principais subclasses dos flavonoides e são largamente distribuídos em alimentos. Quercitrina e Miricitrina (Figura 12) são derivados ramnosídicos das agliconas Quercetina e Miricetina, respectivamente.



**Figura 12.** Estruturas da Miricitrina e Quercetrina

O flavonol Quercitrina apresentou efeito bactericida com potencial anticariogênico (HASAN *et al.*, 2014), propriedade protetora contra os raios UV-B (YIN *et al.*, 2013),

atenuação da osteoporose em ratos (XING *et al.*, 2017; CHOI, 2012) e potencial efeito na prevenção da aterosclerose (CHOI *et al.*, 2010). Estudos com a Miricitrina relataram ação antitumoral (EDENHARDER & GRÜNHAGE, 2003), anticarcinogênica, antiinflamatória (KO *et al.*, 2005), analgésica (MEOTTI *et al.*, 2006) e prevenção da aterosclerose (YOKOMIZO & MORIWAKI, 2005).

### 3.7.2.1. Análise de flavonóis

Os principais métodos adotados no isolamento e análise de flavonoides envolvem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em contra-corrente (SHEN *et al.* 2017; XIE *et al.*, 2010). Estes métodos são rápidos e eficientes quando comparados com a cromatografia líquida clássica, mas envolvem um custo inicial relativamente elevado com a compra de equipamentos.

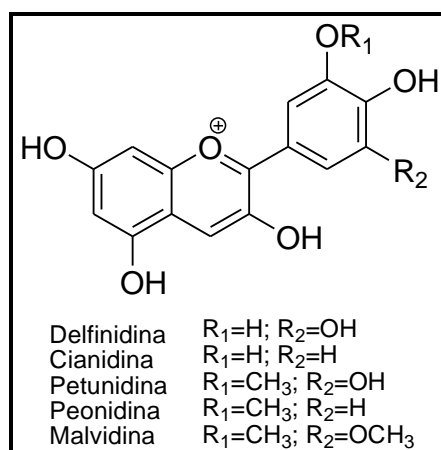
Na cromatografia clássica utiliza-se como fase estacionária sílica gel ou sephadex LH 20, um hidroxipropil derivado de dextrana com ligações cruzadas que pode ser usado com solventes orgânicos polares ou misturas aquosas contendo tais solventes (COLLINS *et al.*, 2006).

SHEN *et al.* (2017) utilizou a CLAE em coluna de fase reversa semi preparativa para isolamento de flavonóis empregando como fase móvel acetonitrila e água acidificada. As substâncias isoladas foram identificadas através da interpretação dos dados espectroscópicos obtidos por RMN e EM. Para quantificação, foi utilizada a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector arranjo de diodos (CLUE-DAD) à  $\lambda=350$  nm. O espectro de UV-Vis de flavonoides normalmente consiste de duas bandas de absorção correspondentes às transições eletrônicas dos sistemas cinamoil (banda I) e benzoil (banda II), sendo que os flavonóis exibem absorção da banda I entre  $\lambda=350$  e 390 nm.

A etapa de preparo da amostra assume extrema importância nas metodologias analíticas. Na análise de flavonoides, em geral, as principais formas de preparo da amostra envolvem a extração clássica com metanol e água, tanto para extração de agliconas quanto flavonoides glicosilados dependendo do tempo e temperaturas empregados. A solução da amostra é normalmente acidificada para evitar a ionização do flavonoide. Amostras líquidas têm sido purificadas utilizando extração em fase sólida com C<sub>18</sub> como fase estacionária. (MOLNÁR-PERL & FÜZFAI, 2005; RIJKE *et al.*, 2006).

### 3.7.3. Antocianinas

As antocianinas constituem o maior grupo de pigmentos solúveis em água encontrados na natureza, exibindo uma diversidade de cores que variam do vermelho ao azul. Podem ser encontradas em qualquer tecido vegetal, embora mais frequentemente ocorram em flores e frutos, sendo amplamente distribuídas na dieta humana através de alimentos à base de plantas. Formando uma subclasse dos flavonóides, caracterizada por conter em sua estrutura básica o esqueleto do cátion 2-fenilbenzopirilium (flavilium), as antocianidinas (agliconas) estruturalmente são constituídas pela presença de hidroxilas e/ou metoxilas no esqueleto do cátion flavilium. Aproximadamente 30 antocianidinas foram identificadas na natureza, embora apenas seis estejam disseminadas em alimentos, sendo elas: Cianidina, Delfinidina, Pelargonidina, Petunidina, Peonidina e Malvidina (Figura 13; SANTOS-BUELGA, 2018; ZHAO *et al.*, 2017).



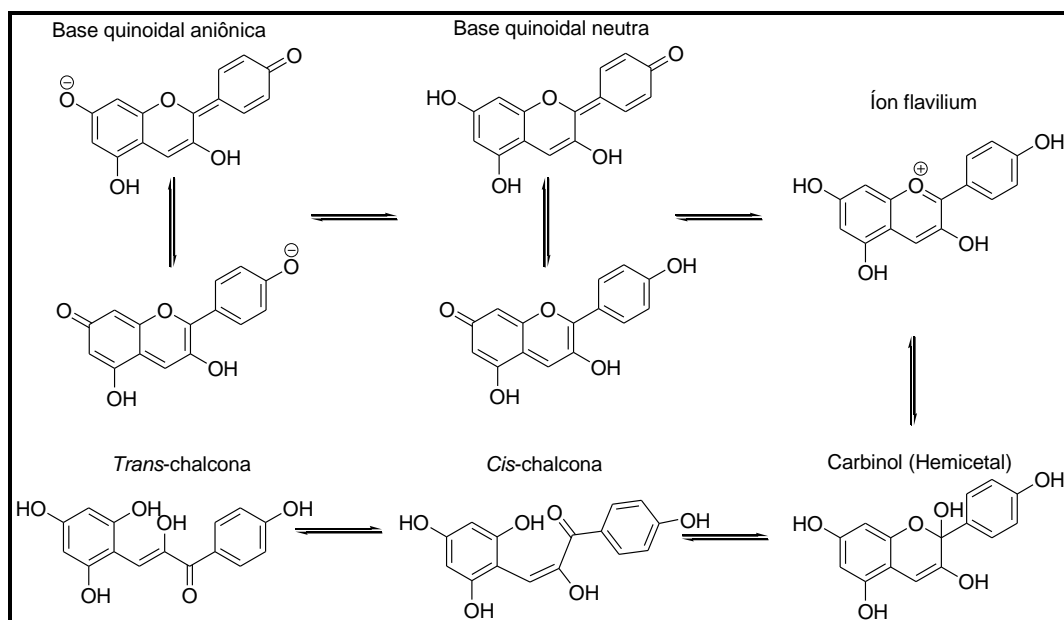
**Figura 13.** Principais antocianidinas encontradas em alimentos

As antocianidinas são bastante instáveis e raramente encontradas em tecidos vegetais e alimentos em sua forma livre. A conjugação com unidades de carboidrato e grupos acila confere estabilidade e dá origem a uma ampla variedade de antocianinas. O açúcar mais comumente ligado às antocianidinas é a Glicose, embora também ocorram outros, como por exemplo: Ramnose, Galactose, Xilose e Arabinose. Estes açúcares podem ser substituídos com ácidos alifáticos (por exemplo: Ácidos Malônico, Acético, Oxálico, Succínico), hidroxibenzóicos (por exemplo: Ácidos *p*-hidroxibenzóico, Gálico, Vanílico, Siríngico) ou hidroxicinâmicos (por exemplo: Ácidos *p*-cumárico, Cafeico, Ferúlico e Sinápico) (SANTOS-BUELGA, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018; TROUILLAS *et al.*, 2016). Algumas



antocianinas aparecem aciladas por grupos aromáticos e alifáticos simultaneamente (ZHAO *et al.*, 2017). A acilação aromática e a alifática contribuem para a estabilidade, sendo que no primeiro caso ocorre efeito batocrômico no espectro de UV-Vis da antocianina, acarretando modificação na coloração para uma tonalidade mais azulada que sua análoga aglicona (GIUSTI & WROLSTAD, 2003).

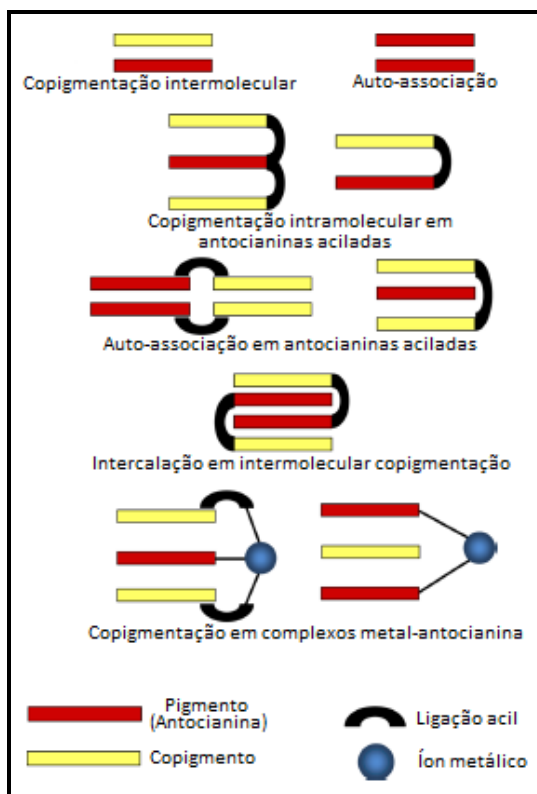
Na faixa de pH ácido a neutro as antocianinas apresentam-se como uma mistura de estruturas químicas em equilíbrio, sendo elas: o cátion flavilium, o carbinol, e a base quinonoidal (Figura 14). O equilíbrio entre as formas ocorre por meio do cátion flavilium. O cátion flavilium é a espécie predominante sob condições ácidas. Com o aumento do pH podem ocorrer duas reações paralelas: 1) desprotonação para formação da base quinoidal e 2) hidratação e perda de elétron para formação do carbinol (hemicetal). A partir do carbinol é formada a *cis*-chalcona que por um processo tautomérico isomeriza para a *trans*-chalcona. A transferência do próton é mais rápida que a hidratação, mas quando as condições favorecem a estabilidade das espécies formadas a partir do carbinol o produto cinético é a base quinoidal que posteriormente é substituída pelo produto termodinâmico. Para as antocianinas simples o cátion flavilium apresenta coloração de laranja à púrpura, a base quinoidal azul, o carbinol incolor e as *cis* e *trans* chalconas vão de amarelo pálido a incolor (PINA *et al.*, 2012).



**Figura 14.** Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa

O corante alimentício é utilizado pela indústria afim intensificar, modificar ou recuperar a cor do alimento com o objetivo de atrair o consumidor. O interesse pelas antocianinas e outros pigmentos naturais para uso como corantes alimentícios aumentou significativamente nos últimos anos em detrimento ao interesse pelos corantes sintéticos devido a questões regulatórias, de segurança alimentar e pela preocupação dos consumidores. Os potenciais efeitos benéficos à saúde pela ingestão de antocianinas têm estimulado as pesquisas relacionadas ao uso como corantes naturais na formulação de alimentos funcionais ou suplementos dietéticos (SANTOS-BUELGA, 2018).

No entanto, as aplicações de antocianinas como corantes alimentares são limitadas por questões de estabilidade. Seu uso é geralmente inadequado em alimentos que não têm um pH suficientemente ácido ou que contêm sulfitos, devido às mudanças de cor que elas sofrem nessas condições. Além disso, eles são suscetíveis à degradação pelo calor. Produtos típicos para adição de antocianina são refrigerantes, produtos lácteos ácidos, como iogurtes, ou doces e geléias, bem como produtos de baixa atividade de água, como alguns salgadinhos. Na natureza as antocianinas são estabilizadas por copigmentação, auto-associação e complexação com metais (Figura 15) (TROUILLAS *et al.*, 2016).



**Figura 15.** Interações  $\pi$ - $\pi$  no empilhamento entre antocianinas e seus complexos (Fonte: TROUILLAS *et al.*, 2016)

O interesse pelo estudo das antocianinas vem crescendo e seus potenciais benefícios para a saúde têm sido avaliados. Estudos atribuíram efeitos antioxidantes, anti-inflamatório (DUARTE *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2016), anti-diabéticos (GOWD *et al.*, 2017), anti-obesidade (TUCAKOVIC *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2018), antitumoral (ZHOU *et al.*, 2018) e cardioprotetor (LIOBIKAS *et al.*, 2016) às antocianinas ou extratos ricos em antocianinas. No entanto, essas afirmações são baseadas principalmente em estudos *in vitro* de células ou estudos em animais. Experimentos de intervenção de longo prazo e adequadamente planejados são considerados necessários para fornecer provas conclusivas de eficácia (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018).

### **3.7.3.1. Análise de antocianinas**

Técnicas de extração, como as extrações enzimáticas (SWER *et al.*, 2018) e a extração por fluido supercrítico (WANG *et al.*, 2018), têm sido empregadas nas análises de antocianinas, no entanto a extração sólido líquido empregando como solvente metanol ou acetonitrila acidificados (ONGKOWIJOYO *et al.*, 2018) ainda é a mais utilizada devido sua simplicidade e baixo custo.

Na quantificação de antocianinas emprega-se desde métodos simples como quantificação de antocianinas totais pelo método de pH diferencial (SHAO-QIAN *et al.*, 2010) a métodos sofisticados como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) (HAO *et al.* 2015; ONGKOWIJOYO *et al.*, 2018). Métodos que quantificam o teor de antocianinas totais têm a limitação de não fornecer informações sobre a natureza e concentração das antocianinas individuais presentes no extrato. A espectrometria de massa além de possibilitar a quantificação ainda fornece informações sobre as massas moleculares das antocianinas, que atrelada a outras técnicas de identificação possibilitam a determinação estrutural da molécula, no entanto tal técnica envolve alto custo. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) é uma alternativa para quantificação das antocianinas individuais com estrutura conhecida, pois a técnica envolve menor custo e maior simplicidade operacional quando comparada com a CLUE-EM.

A quantificação de antocianinas e a pesquisa sobre atividades biológicas requerem a disponibilidade das antocianinas isoladas com alto grau de pureza (He & GIUST, 2011). Existe uma grande diversidade de antocianinas na natureza, porém a disponibilidade de

padrões comerciais é limitada, sendo que os disponíveis aparecem comercializados em baixas quantidade e pureza e alto custo. Uma alternativa evidente envolve o isolamento das antocianinas de interesse a partir de matrizes estudadas e empregá-las como padrões analíticos através do uso dos coeficientes de absorvidade molar (GOUVEA *et al.*, 2012).

He & Giust (2011) utilizaram fase sólida estacionária mista (troca iônica e reversa) para separação das antocininas de outros constituintes não ionizados durante a etapa de purificação do extrato. A cromatografia líquida em fase reversa (GOUVEA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014) e a cromatografia em contra-corrente (YING *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2018) têm sido relatadas na literatura para o isolamento de antocianinas individuais com resultados satisfatórios.

### 3.7.3.2. Acilação aromática de antocianinas

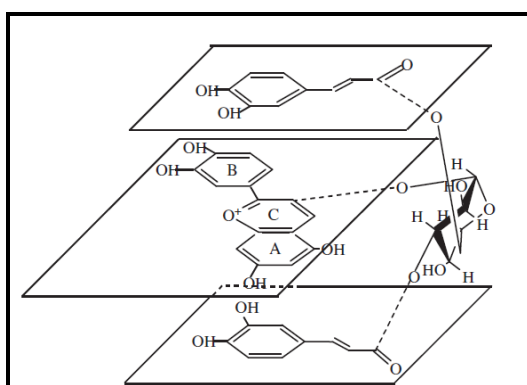
A acilação da unidade glicosil ligada à antocianina envolve a situação em que um ou mais grupos hidroxila são esterificados por ácidos alifáticos ou aromáticos. Geralmente as antocianinas aciladas revelam maior estabilidade ao calor e à luz, sendo, portanto, melhores candidatos para uso como corantes. Estes derivados revelam-se mais estáveis às mudanças de pH, contra a luz e o calor, podendo fornecer cor aceitável a valores de pH ligeiramente ácidos. Tanto a acilação aromática como a alifática melhoram a estabilidade, mas a aromatização produz efeito batocrômico no espectro de UV-Vis da antocianina, acarretando modificação na coloração para uma tonalidade mais azulada que o produto alifático e sua análoga aglicona (GIUSTI & WROLSTAD, 2003).

Usando as características espectrais através dos comprimentos de onda ( $\lambda_{\text{vis}}$ ,  $\lambda_{\text{UV}}$  e  $\lambda_{\text{acil}}$ ) e suas correspondentes absorvidades torna-se possível identificar o número de carboidratos entre o cátion flavilium e o grupo acil (relação  $E_{440}/E_{\text{vis}}$  entre 29-35% indica monosídeo e  $E_{440}/E_{\text{vis}}$  entre 15-24% indica biosídeo) e determinar o grau de acilação aromática (relação  $E_{\text{acil}}/E_{\text{vis}}$  entre 53-69% indica monoacilação e  $E_{\text{acil}}/E_{\text{vis}}$  entre 98-128% indica diacilação). Além disso, através da análise do  $\lambda_{\text{acil}}$  é possível obter informação sobre o grupo acila aromático. Valores de  $\lambda_{\text{acil}}$  na faixa de 320-333 nm indicam derivado do Ácido Ferúlico ou Sinápico, enquanto que valores de  $\lambda_{\text{acil}}$  na faixa de 310-315 nm indicam derivado do Ácido  $\rho$ -cumárico (DYRBY *et al.*, 2001).

Geralmente a acilação de antocinina glicosilada diminui a polaridade e aumenta a massa molecular, diminuindo sua solubilidade em água. Além disso, aumenta o efeito estérico,

alterando a estrutura espacial da antocianina, podendo ocasionar mudança na orientação estereoquímica conformacional. Fatores como diminuição da polaridade e aumento do efeito estérico reduzem a suscetibilidade da antocianina acilada ao ataque nucleofílico em comparação ao seu análogo não acilado, resultando no aumento da estabilidade (ZHAO *et al.*, 2017).

A copigmentação intramolecular também é um fator de estabilização. Tal efeito se dá devido ao empilhamento dos grupos acila, especialmente os aromáticos, com o anel pirílio do cátion flavilium. Na copigmentação intramolecular as antocianidinas atuam como cromóforos e os grupos acila como doadores de elétrons. Para antocianinas diaciladas a estrutura "sanduíche" favorece uma melhor sobreposição e uma interação mais forte entre os dois grupos acila e o sistema *p* do anel benzopirílico (Figura 16), melhorando a estabilidade das antocianinas (TROUILLAS *et al.*, 2016).



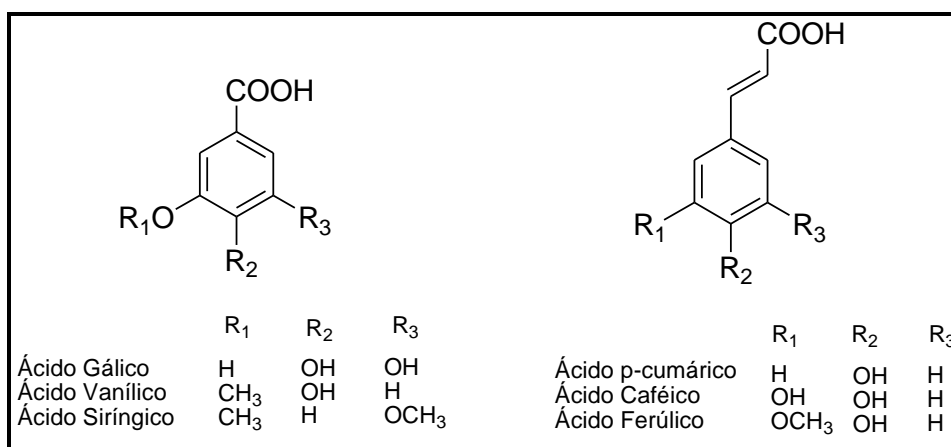
**Figura 16.** Complexo de copigmentação intramolecular sugerido (Fonte: ZHAO *et al.*, 2017).

Como um pré-requisito para a copigmentação intramolecular a unidade glicosil acilada da antocianina frequentemente está ligada nas posições C-3 ou C-5. Nestas posições, especialmente na posição C-3, o grupo glicosil é mais flexível e pode rotacionar livremente. A ligação do grupo acila na posição H<sub>2</sub>C-6-OH do glicosil fornece flexibilidade suficiente para o empilhamento. No complexo intramolecular copigmentado, os grupos glicosil atuam como espaçadores para permitir o dobramento do grupo acila. Portanto, as composições e tamanhos dos grupos glicosil devem garantir tais grupos como suficientemente longos para formar o complexo. Dois resíduos de açúcar como espaçadores permitem o dobramento da porção acila, resultando em maior integridade do cromóforo (ZHAO *et al.*, 2017).

A observação de correlações espaciais em espectros NOE (interação dipolar), revelando interações de alcance relativamente longo entre o núcleo de flavilium e o grupo acila (tipicamente um ácido fenólico), tornou-se uma evidência da existência de conformações dobradas mantendo ambas as porções em contato próximo (força de Van der Waals, por exemplo, com uma interdistância de 0,3-0,4 nm) (TROUILLAS *et al.*, 2016). Além disso, no espectro de RMN<sup>1</sup>H os sinais dos hidrogênios da unidade acil aromática e da antocianidina envolvidos em copigmentação apresentam-se mais protegidos em relação aos dos hidrogênios equivalentes nos correspondentes ésteres metílicos nas mesmas condições. O experimento NOESY na Malvidina-3-*O*-β-*D*-(6-*O*-*p*-coumaroil)-glicosídeo a interação observada entre o hidrogênio H-6 da molécula da antocianidina e o hidrogênio H<sub>α</sub> do grupo acil aromático indicou que ambos estão associados um ao outro em solução (FERNANDES *et al.*, 2015).

### 3.8. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos envolvem derivados hidroxilados do Ácido Benzóico e do Ácido Cinâmico, constituídos do esqueleto C<sub>1</sub>C<sub>6</sub> e C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>, respectivamente. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos estão incluídos os Ácidos Gálico, Vanílico e Siríngico, alguns dos ácidos hidroxicinâmicos comumente encontrados em alimentos e bebidas são os Ácidos *p*-cumárico, Cafeico e Ferúlico (Figura 17).



**Figura 17.** Estrutura dos ácidos fenólicos

Juntamente com os flavonoides os ácidos fenólicos estão entre as substâncias fenólicas mais largamente distribuídas nas espécies vegetais, tendo sido objeto de estudo de avaliação

da atividade antioxidante e potenciais benefícios para a saúde na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes. Os fenólicos dietéticos exercem seus benefícios para a saúde por várias atividades biológicas, como eliminação de radicais livres, quelação de metais, redução do potencial, quebra de cadeia e modulação da atividade enzimática (CHANDRASEKARA, 2018).

Na natureza, os ácidos fenólicos ocorrem principalmente na forma insolúvel, ligados covalentemente a componentes estruturais da parede celular. Desempenhando funções importantes como barreiras físicas e químicas, proteção contra a invasão de patógenos e adstringência que impedem o ataque de insetos e animais, funções antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. Os ácidos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico, formam ligações éter com a lignina através dos seus grupos hidroxila no anel aromático e ligações éster com carboidratos e proteínas estruturais através do seu grupo carboxílico. Ensaios da capacidade antioxidante *in vitro* indicaram que as substâncias fenólicas insolúveis têm uma capacidade antioxidante significativamente mais elevada em comparação com substâncias fenólicas livres e conjugados solúveis (glicosídeos) (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014).

### **3.8.1. Análise de ácidos fenólicos**

A identificação de ácidos fenólicos depende da capacidade de isolá-los dos tecidos vegetais. Em geral, a diversidade estrutural dos ácidos fenólicos, devido a ligação a estruturas celulares torna a análise difícil e complicada. Na extração de ácidos fenólicos são usadas misturas de solventes orgânicos e aquosos em geral acidificados. Nesta etapa são extraídos os fenólicos solúveis, incluindo ácidos fenólicos livres e conjugados solúveis, como os ácidos ligados a carboidratos solúveis via ligação éster ou éter. O resíduo remanescente após a extração solúvel pode ser usado para obter substâncias fenólicas insolúveis através de reações de hidrólise ácida, básica ou enzimática (CHANDRASEKARA, 2018; MATTILA & KUMPULAINEN, 2002).

Após a extração dos compostos fenólicos, a determinação do seu conteúdo pode ser realizada por análise espectrofotométrica, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estando acoplada a detector de arranjo de diodo (DAD) ou espectrometria de massa (EM). A tentativa de identificação dos constituintes é possível através da comparação da fragmentação característica, dados de tempo de retenção e informações espectrais de UV de padrões de

referência ou de dados dos estudos anteriores disponíveis na literatura. Quando não há esta disponibilidade, adicionalmente a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectroscopia de infravermelho (IV) são utilizados para determinação estrutural das substâncias (CHANDRASEKARA, 2018).

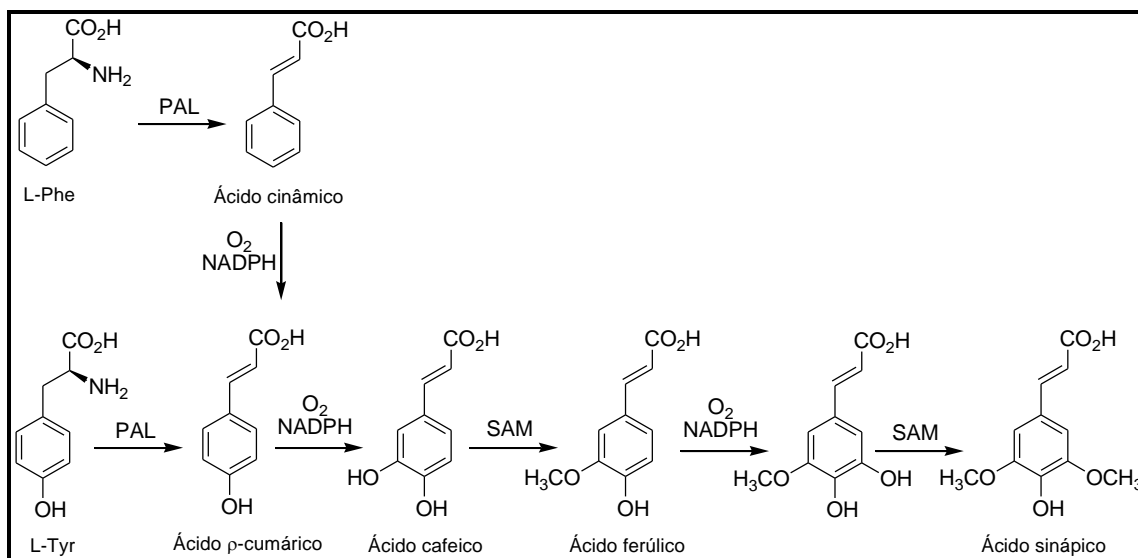
Diversos autores realizam a análise de ácidos fenólicos e flavonoides em uma única corrida cromatográfica. Matrizes de plantas contêm esses compostos com alta similaridade estrutural, o que dificulta a separação. Portanto, a seleção cuidadosa da fase estacionária, fase móvel e monitoramento dos parâmetros de comprimento de onda são necessários durante o processo de separação de análise. Os métodos de CLAE frequentemente utilizam colunas de fase reversa (C<sub>18</sub>) para análise de compostos fenólicos. A eluição de compostos polares (ácidos fenólicos livres) é observada mais cedo na eluição gradiente do que os compostos de baixa polaridade durante a análise por CLAE em fase reversa, havendo ainda chance de sobreposição dos membros das diferentes classes devido à sua enorme diversidade estrutural (BONTA, 2017).

Outros métodos cromatográficos têm sido desenvolvidos e testados para análise de ácidos fenólicos. Tang *et al.* (2018) desenvolveram um método analítico baseado em cromatografia de fluido supercrítico (CFS) acoplado a espectrometria de massa para a análise de ácidos fenólicos. Comparado a um método por CLAE, o método CFS foi cerca de três vezes mais rápido e forneceu melhor seletividade. ZHANG *et al.* (2018) estabeleceu um método rápido de identificação e quantificação simultânea de 25 compostos fenólicos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM).

### **3.8.2. Biossíntese de ácidos fenólicos**

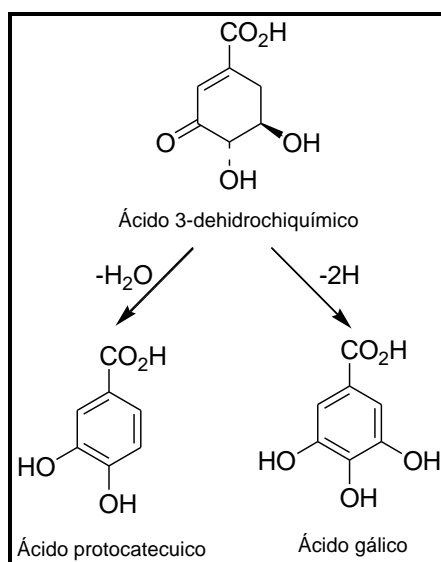
Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários de plantas produzidos através da rota biossintética do Ácido Chiquímico. Os ácidos fenólicos constituídos do esqueleto C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> têm como precursor o aminoácido Fenilalanina, através da desaminação catalisada pela enzima Fenilalanina Amônia Liase (PAL). No entanto, algumas espécies de plantas são capazes de sintetizá-los a partir da Tirosina. A diversificação estrutural é obtida por reações de hidroxilação e metilação (DEWICK, 2002). O Esquema 12 sumariza a formação dos ácidos fenólicos derivados do Ácido Cinâmico.



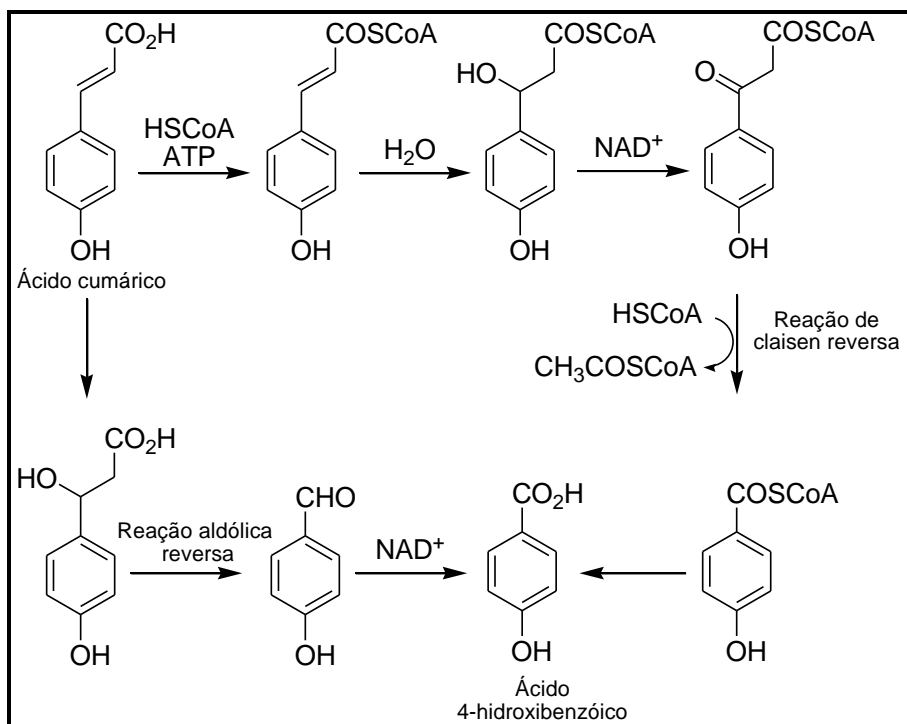


**Esquema 12.** Formação dos ácidos fenólicos constituídos do esqueleto  $C_3C_6$   
(Adaptado de DEWICK, 2002)

Alguns ácidos benzóicos simples como o Ácido Protocatecuico (Ácido 3,4-dihidroxibenzoico) e o Ácido Gálico (Ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) podem ser formados a partir de intermediários no início da via do Ácido Chiquímico, por exemplo o Ácido 3-dehidrochiquímico, através de reações de desidratação ou desidrogenação (Esquema 13), mas existem rotas alternativas em que os derivados do Ácido Cinâmico (compostos  $C_6C_3$ ) são clivados na ligação dupla e perdem dois carbonos da cadeia lateral por reação de claisen reversa ou reação aldólica reversas (DEWICK, 2002; Esquema 14).



**Esquema 13.** Formação dos ácidos benzóicos simples formados a partir do Ácido 3-dehidrochiquímico  
(Adaptado de DEWICK, 2002)



**Esquema 14.** Formação dos ácidos benzoicos formados a partir de ácidos de esqueleto C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> (Adaptado de DEWICK, 2002)

### 3.9. Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é uma técnica de separação de substâncias de uma mistura, baseada na interação entre os componentes da mistura, uma fase estacionária e um líquido em movimento. A cromatografia pode ser classificada em fase normal e reversa. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel intitula-se cromatografia líquida com fase normal, o inverso é chamado cromatografia líquida com fase reversa (COLLINS, 2006).

As fases móvel e estacionária utilizadas na cromatografia definem o mecanismo envolvido no processo de separação. Incluindo os processos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão. Os processos de adsorção e partição são mecanismos de separação físicos e estão baseados em interações eletrostáticas. Quando a fase estacionária é um sólido ocorre a adsorção do soluto na interface entre as partículas sólidas e a fase móvel. No processo de partição a fase estacionária é um líquido espalhado na superfície de um sólido, neste caso a separação baseia-se na diferença de solubilidade dos compostos da amostra nas fases móveis e estacionária (MEYER, 1997).

O mecanismo de exclusão é um processo mecânico. A separação baseia-se no tamanho das moléculas. A fase estacionária é constituída de macromoléculas com ligações cruzadas

que possuem poros de tamanhos específicos. As moléculas maiores do analito não entram nos poros e eluem mais rapidamente, enquanto as moléculas menores sofrem a difusão nos poros eluindo com maior tempo de retenção (MC MASTER, 2007).

No processo químico de troca iônica, a separação baseia-se nos diferentes graus de afinidade eletrostática dos íons. A fase estacionária é altamente carregada. Desta forma os trocadores aniônicos têm sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, o inverso ocorre para trocadores catiônicos. Os solutos são eluídos por deslocamentos com outros íons, com mesmo tipo de carga (LANÇAS, 2009).

O processo cromatográfico foi pela primeira vez interpretado como é aceito hoje por Mikhail Semenovich Tswett, um botânico russo, que observou a separação de componentes do extrato de folhas em coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio e eluído com éter de petróleo. Ele utilizou o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se separavam dentro da coluna (TSWETT apud MORHY, 1976). Seu mais importante trabalho referente à cromatografia foi publicado, em 1906; “Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendungen auf die Chemie des Chlorophylls” (Análises de adsorção e método cromatográfico: aplicações na química da clorofila). Até 1919 publicou vários trabalhos e um livro, descrevendo materiais adsorventes usados para cromatografia (VALENTE *et al.* 1983).

A cromatografia não foi bem aceita pelos cientistas da época e permaneceu esquecida por quase 25 anos. Uma das razões foi que os resultados que Tswett obteve com a separação das clorofilas a e b, discordavam do resultado obtido por Willstätter, professor de química orgânica em Munique, no qual obteve, por cristalização fracionada, somente uma clorofila. Por acreditar no método clássico, Willstätter acreditava na decomposição da clorofila durante o processo de adsorção de Tswett (ENGELHARDT, 2004; LIVENGOOD, 2009), atualmente sabemos da existência das clorofilas a e b.

Em 1940, Wilson publicou o primeiro tratamento teórico sobre cromatografia (WILSON apud VALENTE *et al.* 1983). Em 1941 Martin e Synge publicaram um trabalho onde descreveram a cromatografia líquido-líquido e introduziram o conceito da altura de um prato teórico, além disso, discutiram a possibilidade de a fase móvel ser um gás (MARTIN & SYNGE, 1941). Em 1956 van Deemter e colaboradores definiram a relação entre a altura equivalente a um prato teórico e parâmetros experimentais das colunas, a chamada equação de van Deemter (VAN DEEMTER *et al.*, 1956). Martin e Howard desenvolveram a cromatografia líquida aplicando as fases reversas. Moore e Stein mecanizaram o processo de

cromatografia, usando uma bomba peristáltica, aplicando na separação de aminoácidos usando um fotômetro como detector (MOORE & STEIN, 1963).

Na década de 1960 foram desenvolvidos enchimentos para coluna de CLAE. Primeiramente surgiram as partículas peculiares (partícula não porosa recoberta com material poroso) de troca iônica, desenvolvidas por Horvath. Nesta época as partículas eram rígidas e tinham diâmetro entre 40 e 50  $\mu\text{m}$  e resistentes às pressões impostas pela CLAE (MALDANER & JARDIM, 2009). Em 1969 surgiram os primeiros sistemas de CLAE comerciais (ENGELHARDT, 2004). Mais tarde, por volta de 1970 foram introduzidas partículas totalmente porosas com diâmetro de 10  $\mu\text{m}$ . Nos anos 1980 surgiram as partículas esféricas com 5  $\mu\text{m}$ . Com isso as análises tornaram-se mais rápidas e eficientes. Nickless e colaboradores desenvolveram fases estacionárias contendo grupos alquilas quimicamente ligados, o que ampliou a aplicação da técnica (NICKLESS apud MALDANER & JARDIM, 2009).

### **3.9.1. Cromatografia clássica**

A separação cromatográfica clássica é realizada em coluna de vidro recheada com partículas de 60 à 200  $\mu\text{m}$ , a fase móvel elui pela força gravitacional ou pela aplicação de pressão reduzida, as frações separadas são coletadas na parte inferior da coluna. Para a obtenção do material puro muitas vezes é necessário realizar uma nova cromatografia (COLLINS *et al.*, 2006).

Este tipo de cromatografia é utilizado por químicos de produtos naturais desde sua invenção até os dias de hoje para purificar compostos químicos individuais a partir de misturas. É eficiente na separação/purificação de grandes quantidades de extratos de plantas e requer material muito simples, que pode ser encontrado em qualquer laboratório de química, apresentando um custo relativamente baixo. Esta técnica exige alguma habilidade por parte do analista, utiliza grande quantidade de solvente na eluição dos analitos e o tempo empregado é longo e tedioso. A fase estacionária usada na separação nem sempre pode ser reutilizada, pois parte da amostra geralmente adsorvida de forma irreversível.

### 3.9.2. Cromatografia Flash

A técnica de cromatografia clássica com eluição por gravidade, consome muito tempo e freqüentemente resulta em uma baixa recuperação. Para aumentar a produtividade das purificações de produtos de reação, Still *et al.* (1978) desenvolveu uma técnica mais rápida que foi chamada de cromatografia flash. Esta técnica consiste no uso de fase estacionária com partícula mais fina (40-63  $\mu\text{m}$ ) do que as utilizadas em cromatografia clássica (63-200  $\mu\text{m}$ ). Sendo então, necessária a aplicação de uma pressão média para o aumento do fluxo da fase móvel percolando através desta coluna. Mais tarde, Kühler *et al.* (1983) demonstraram que as fases estacionárias de 15-40  $\mu\text{m}$  apresentaram melhor resolução e picos mais estreitos. Desde então, a técnica tem sido amplamente explorada. Vários fabricantes desenvolveram sistemas de média pressão automatizados de cromatografia flash cujas características incluem colunas pré-embaladas, bombas integradas que permitem mistura de gradiente, detecção integrada e sistemas de coleta automatizados (HOBBS *et al.*, 2013; HÉRON *et al.*, 2015)

Uckoo *et al.* (2011) utilizou a cromatografia flash em coluna de sílica gel utilizando hexano e acetona como fase móvel, resultando no isolamento de quatro polimetoxiflavonas separadas com alta pureza. Huang *et al.* (2016) isolou indigotina e indirubina com pureza acima de 96 % por cromatografia flash em coluna de sílica gel de fase reversa ( $\text{C}_{18}$ ). Os sistemas modernos de flash preenchem o nicho entre os métodos de separação de cromatografia clássica, relativamente baratos, porém limitados, e os métodos de CLAE preparativos mais caros e tecnologicamente complexos.

### 3.9.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os avanços na técnica de cromatografia líquida são, em grande parte, devidos à evolução das colunas cromatográficas. Desde a cromatografia clássica até a CLAE, muitos avanços ocorreram no tamanho, forma, estrutura e rigidez das partículas de recheio das colunas cromatográficas. Uma coluna ideal oferece a maior resolução na separação, em um menor tempo possível, possui grande capacidade de amostra, produz pequena pressão e baixo custo.

A técnica CLAE é empregada em separações tanto em escala analítica quanto em preparativa, sendo seu uso bastante difundido para fins analíticos. Na maioria das separações por CLAE são usadas partículas rígidas à base de sílica, pois esses recheios são estáveis às

altas pressões usadas na CLAE. As partículas esféricas são preferíveis para aplicações na CLAE, pois apresentam melhor empacotamento da coluna, maior resistência às pressões altas, leitos homogêneos, compactos e eficientes, quando comparados às partículas irregulares. Partículas irregulares são mais usadas em separações preparativas, porque seu custo é menor (COLLINS *et al.*, 2006).

A Tabela 3 apresenta comparação das técnicas preparativas de cromatografias clássica (CL), flash (CF) e líquida de alta eficiência (CLAE).

**Tabela 3.** Comparação das técnicas preparativas de cromatografias clássica (CL), flash (CF) e líquida de alta eficiência (CLAE)

<b>Comparação de técnicas de cromatografia preparativa<sup>(1)</sup></b>			
	<b>CL</b>	<b>CF</b>	<b>CLAE</b>
<b>Custo</b>	Relativamente baixo	Moderado	Relativamente alto
<b>Material da coluna</b>	Vidro	Plástico	Aço
<b>Pressão</b>	Ambiente	3-10 bar	100-200 bar
<b>Empacotamento</b>	Autocondicionada	Pré-empacotada	Pré-empacotada
<b>Fase normal</b>	Rotina	Rotina	Rotina, pouco explorada
<b>Fase reversa</b>	Pouco explorada	Cada vez mais disponíveis	Muitas opções disponíveis
<b>Gradiente</b>	Difícil	Automático	Automático
<b>Deteção/Coleta</b>	Frações analisadas individualmente após coleta	Detector acoplado	Detector acoplado
<b>Manutenção</b>	Muito baixa	Baixa	Alta
<b>Pureza</b>	Relativamente baixa	Moderada	Alta

(1) Tabela adaptada de HÉRON *et al.*, 2015

### 3.9.4. Tamanho da partícula

Partículas porosas com diâmetros altos possuem poros profundos. A entrada e saída das moléculas dentro dos poros é mais demorada quanto maior a profundidade do poro. Por outro lado, as moléculas na fase móvel migram mais rapidamente através da coluna, o que acarreta alargamento do pico.

A busca por separações cada vez mais rápidas resultou no desenvolvimento da CLAE. A rapidez nas separações pode ser conseguida pela diminuição da coluna e aumento da vazão, porém perde-se eficiência na separação. Com o desenvolvimento de partículas menores pode-

se empregar colunas com menores comprimentos sem comprometimento da eficiência, porém a diminuição do tamanho da partícula se limita pelo aumento da pressão do sistema. A equação de van Deemter (Equação 1) mostra a relação entre a altura do prato teórico (H), velocidade linear média da fase móvel ( $\mu$ ), tamanho da partícula ( $d_p$ ), coeficiente de difusão do soluto na fase móvel ( $D_M$ ) e coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária ( $D_S$ ):

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\delta D_M}{\mu} + \frac{8}{\pi^2} \times \frac{k d^2 f \mu}{(1+k)^2 D_S} \quad (\text{Equação 1})$$

Partículas menores que 2  $\mu\text{m}$  ocasionam separações muito rápidas e eficientes, mas a elevação na pressão de operação desencadeou o desenvolvimento de um sistemas como algumas modificações como: capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (MALDANER & JARDIM, 2009). Com o desenvolvimento deste novo sistema surgiu o novo conceito de cromatografia, a CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência), que utiliza alta pressão.

### **3.9.5. Estrutura da partícula**

#### **3.9.5.1. Não porosas**

As partículas não porosas oferecem uma cromatografia rápida e sem perda de eficiência, pois não há difusão do analito e da fase móvel nos poros, o que também acarreta menor pressão. Porém, a capacidade de amostra é muito pequena, a retenção do analito é baixa e seu uso necessita de equipamentos que possuam volumes extracoluna baixos. Por estes fatores são usadas em separações de macromoléculas, pois estas possuem lenta difusão na fase móvel. Estas partículas oferecem menor resistência à transferência de massa, facilitando o uso de uma faixa ampla de vazões de fase móvel, sem perda de desempenho cromatográfico e são mais resistentes e estáveis às altas pressões e temperaturas. Colunas recheadas com partículas esféricas não porosas de 1,5  $\mu\text{m}$  chegam a alcançar 30000 pratos/15 cm (FEKETE *et al.*, 2012).

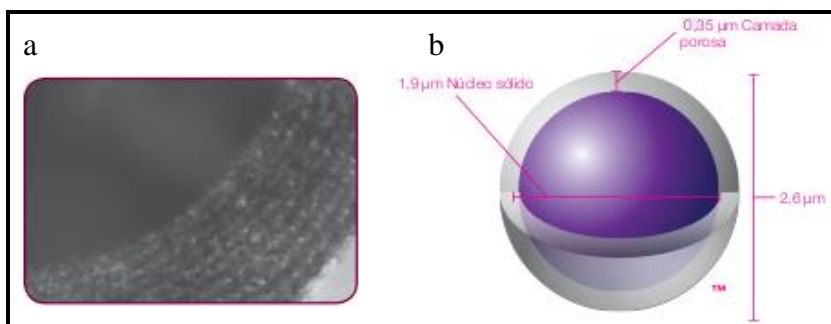
### 3.9.5.2. Totalmente porosa

Partículas totalmente porosas são as mais utilizadas em CLAE. Oferecem vantagens, como alta capacidade de amostra, eficiência, durabilidade e disponibilidade. A diminuição destas partículas diminui a profundidade dos poros, aumentando a eficiência, uma vez que diminui o alargamento do pico cromatográfico, porém esta vantagem ocorre em detrimento do aumento da pressão (COLLINS *et al.*, 2006).

Colunas recheadas com partículas esféricas porosas de 2,5  $\mu\text{m}$  podem alcançar 25000 pratos/15 cm. Estas mesmas partículas com diâmetro de 1,7  $\mu\text{m}$  alcançam 30000 pratos/15 cm, porém, necessitam de uma instrumentação mais sofisticada para serem empregadas com o máximo de desempenho cromatográfico (FEKETE *et al.*, 2012).

### 3.9.5.3. Peculiar (Core Shell)

O conceito de partículas sólidas não porosas recobertas com uma camada de material poroso (Figura 18) foi introduzido por Horváth por volta de 1960 usando partículas de 50  $\mu\text{m}$ . Ao longo dos anos, seguindo a tendência, o diâmetro destas partículas diminuiu. Este tipo de partícula inicialmente foi utilizado para separação de proteínas (LANÇAS, 2009). Atualmente, seu emprego tem aumentado e muitos estudos mostram vantagens de sua utilização em relação às partículas totalmente porosas de diâmetro reduzido, como menor pressão e maior eficiência. O volume extracoluna deve ser baixo, para evitar alargamento dos picos (FEKETE *et al.*, 2012).



**Figura 18.** Vista em corte de partícula *core shell* (a) e esquema de uma partícula 2,6  $\mu\text{m}$  (b) (adaptado de PHENOMENEX, 2013)

Nas partículas peculiares, por não serem totalmente porosas, o tempo gasto para difusão dos analitos ao entrarem e saírem dos poros é menor quando comparado às partículas totalmente porosas. Este caminho mais curto permite uma rápida transferência de massa, o



resultado é uma largura menor dos picos e eficiência comparável ou melhor do que as partículas de sub-2 µm totalmente porosas (PHENOMENEX, 2013).

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.1. Reagentes e solventes

Solventes e reagentes utilizados:

- ✓ Acetato de Etila grau ACS (Tedia, 99 %);
- ✓ Acetona grau HPLC/Spectro (Tedia, 99 %);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC/Spectro (Tedia);
- ✓ Ácido Acético glacial grau HPLC/Spectro (Tedia, 99 %);
- ✓ Ácido Clorídrico PA (Tedia, 37 %);
- ✓ Ácido Fórmico ACS (Emsure, 98 %),
- ✓ Ácido Fosfórico grau HPLC (Sigma, 85 %);
- ✓ Água milli-Q®;
- ✓ Celite 545 (Tedia);
- ✓ Clorofórmio grau ACS (Tedia, 98 %);
- ✓ Diclorometano grau ACS (Tedia, 99 %);
- ✓ DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma);
- ✓ Éter de Petróleo grau CG (Tedia);
- ✓ Éter Etílico grau CG (Tedia);
- ✓ Éter Metil-*terc*-butílico grau HPLC (Tedia, 99 %);
- ✓ Hidróxido de Amônio grau ACS (Sigma, 28-30 %);
- ✓ Hidróxido de Sódio PA (Vetec, 97 %);
- ✓ Hidroxitolueno Butilado (BHT) (Spectrum Chemical, 98 %);
- ✓ Metanol grau HPLC/Spectro (Tedia, 99 %);
- ✓ *n*-hexano grau ACS (Tedia, 95 %);
- ✓ Persulfato de Potássio (Sigma, 99%),
- ✓ Persulfato de Potássio grau ACS (Sigma, 99 %);
- ✓ sal diamônio do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfonato de diamônio)) (Sigma, 98 %);
- ✓ Sílica Flash F60 (40-63 µm, 230-400 Mesh; Silicycle).
- ✓ Sulfato de Sódio anidro (Quimex);

- ✓ Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma, 97 %).

## 4.2. Padrões

Padrões comerciais:

- ✓ Ácido Cafeico (98 %, Sigma);
- ✓ Ácido Elágico (95 %, Sigma);
- ✓ Ácido Ferúlico (99 %, Sigma);
- ✓ Ácido Gálico (97,5-102,5 %, Sigma);
- ✓ Ácido Siríngico (95 %, Sigma).
- ✓ Ácido Vanílico (97 %, Sigma);
- ✓ Ácido  $\rho$ -cumárico (98 %, Sigma).

Padrões isolados:

- ✓ Cianidina-3-*O*-glicosídeo (99 %);
- ✓ Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (99 %);
- ✓ Malvidina-3-*O*-glicosídeo (98 %);
- ✓ Peonidina-3-*O*-glicosídeo (99 %);
- ✓ Petunidina-3-*O*-glicosídeo (98 %).

## 4.3. Equipamentos

Equipamentos utilizados:

- ✓ Agitador magnético com aquecimento (NT103, Nova técnica);
- ✓ Agitador tipo vórtex (Genie 2, Scientific Industries);
- ✓ Balança analítica com resolução de quatro casas decimais (AY220, Marte);
- ✓ Banho ultrassom (2210, Branson);
- ✓ Banho-maria com agitação (929, Gyromax™);
- ✓ Cartucho de fase mista (Sep-Pak OASIS MCX, Waters),
- ✓ Cartucho de fase reversa (C<sub>18</sub> Sep-Pak, Waters®);
- ✓ Cartucho de fase reversa C<sub>18</sub> (Biotage KP-C<sub>18</sub>-HS, 50  $\mu$ m, 30 g);
- ✓ Centrífuga (Hsiangtai);
- ✓ Coletor de frações (Fraction Collector III, Waters®);
- ✓ Coluna C<sub>18</sub> (Symmetry®, Waters, 3,9 x 150 mm, 5  $\mu$ m);
- ✓ Coluna C<sub>18</sub> (Thermo BDS Hypersil, 100 mm x 4,6 mm, 2,4  $\mu$ m);

- ✓ Coluna C<sub>18</sub> (YMC-Pack ODS-AM303, 250 mm x 4,5 mm, 5µm);
- ✓ Coluna C<sub>30</sub> (YCM Carotenoid S-3; 4,6 mm x 250 mm);
- ✓ Coluna CG 5 % Fenil, 95 % Polidimetilsiloxano (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm);
- ✓ Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (QP2010 Plus, Shimadzu®);
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência com forno para colunas e injetor automático (Alliance® 2695, Waters);
- ✓ Detector de arranjo de fotodiodos UV/Vis (2996, Waters®);
- ✓ Espectrômetro de massas Q-TOF (SYNAPT mass spectrometry, Waters®);
- ✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear 400 e 500 MHz (AVANCE, Bruker); espectrofotômetro (Modelo UV-1800 – Shimadzu®);
- ✓ Estufa (WTB - Binder®); liofilizador (L101, Líotop);
- ✓ Evaporador rotatório (Büchi); ultra turrax (T 25, Ika-Werke);
- ✓ Medidor de pH (Bel®);
- ✓ Membrana hidrofílica tipo Millex (0,45 µm);
- ✓ Moinho analítico (A11; IKA);
- ✓ Pipetadores automáticos com capacidade para 10 a 100 µL, de 100 a 1000 µL e de 0,5 a 5 mL Brand®;
- ✓ Sistema de isolamento cromatográfico acelerado (Isolera Four ACI™, Biotage);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q (A10, Milipore);
- ✓ Válvula seletora motorizada de 14 portas e 6 posições (RV500-104/550-104, Rheodyne®);

#### 4.4. Espécies vegetais

As espécies vegetais utilizadas foram:

- ✓ *Eugenia astringens* (Cambess);
- ✓ *Myrcia multiflora* (Lam.) DC;
- ✓ *Myrciaria cauliflora* (Mart.);
- ✓ *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl.;
- ✓ *Psychotria nuda* Cham. & Schltl.;
- ✓ *Psychotria suterella* Müll.Arg;
- ✓ *Vitis* spp.

#### 4.5. *Myrcia multiflora* (Lam.) DC.

Os frutos de *M. multiflora* (Lam.) DC. (Figura 19) foram coletados em duas localidades do bairro da Barra da Tijuca na cidade do Rio de Janeiro, coordenada geográfica 23°0'18''S, 43°25'20''O (F032A), no mês de janeiro de 2014 e coordenada geográfica 22°59'52''S, 43°22'11''O (F032B) no mês de fevereiro de 2015. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Marcelo da Costa Souza, professor e pesquisador do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ (RBR), sob os números RBR36746 e RBR36747, respectivamente.



**Figura 19.** *Myrcia multiflora* (Lam.) DC

O fruto foi separado em duas partes: 1) semente e 2) casca mais polpa. As partes foram submetidas separadamente às análises de umidade, carotenoides, antocianinas, açúcares, ácidos fenólicos, capacidade antioxidante. Foram utilizadas três repetições para cada as análises. Algumas substâncias não identificadas por comparação com padrão analítico foram isoladas para determinação estrutural (Anexo 1).

#### 4.5.1. Análise de umidade

A análise de umidade foi realizada pelo método de perda por dessecação em estufa segundo Zenebon *et al.* (2008). Inicialmente, as partes separadas dos frutos *in natura* foram colocadas em frascos previamente secos e pesadas. Em seguida foram mantidas em estufa a 105 °C durante 3 horas e, após esfriarem em dessecador, foram pesadas. Este procedimento foi repetido até se obter pesos constantes no tratamento experimental. Os resultados foram expressos através da Equação 2:

$$\% \text{ umidade} = 100 - \left[ \frac{(M-m)}{Ma} * 100 \right] \text{ (Equação 2)}$$

Onde,

*M* = Massa do frasco de vidro mais amostra secos;

*m* = Massa do frasco de vidro seco;

*Ma* = Massa de amostra.

#### 4.5.2. Análise de carotenoides

##### 4.5.2.1. Extração de carotenoides

A extração dos carotenoides foi realizada a partir do fruto *in natura*, conforme método descrito por Rodriguez-Amaya (2001). As partes do fruto foram trituradas com celite e os carotenoides extraídos com Acetona. Em seguida, filtrou-se em funil de vidro com placa sinterizada, sendo tal procedimento repetido até ausência da coloração característica (do amarelo ao vermelho), indicativa da presença de carotenoides. O extrato foi transferido para um funil de separação com Éter de Petróleo para lavagens com água Milli-Q até que não houvesse mais resíduos de Acetona. À solução etérea foi adicionado um grão de Hidroxitolueno Butilado (BHT) e avolumou-se em balão volumétrico (10 mL para polpa+casca e 25 mL para semente). Para reação de saponificação (hidrólise básica) retirou-se uma alíquota de 5 mL transferiu-se para vial âmbar, adicionou-se 5 mL de solução de KOH 10% (m/v) em metanol, purgou-se o frasco com fluxo de N<sub>2</sub>. Manteve-se a reação no escuro por 16 horas. A seguir, completou-se o volume do frasco com água e agitou-se vigorosamente. Após separação das fases o conteúdo etéreo foi transferido quantitativamente para uma bureta. Lavou-se a solução etérea com aproximadamente 100 mL de água, descartando a fase aquosa. Registrou-se o volume final da solução etérea na bureta. Transferiu-se a solução etérea para vial de 10 mL e adicionou-se Sulfato de Sódio anidro para

absorção de resíduo de água. Uma alíquota desta solução foi utilizada para leitura de carotenóides totais em espectrofotômetro a  $\lambda=450$  nm. Outra alíquota foi seca sob fluxo de ar comprimido e o resíduo diluído com Acetona para análise cromatográfica (Anexo 2). O teor de carotenóides totais foi calculado através da Equação 3.

$$\text{Carotenoides Totais } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{\text{ABS} \times \text{Vf} \times 1000000}{\text{M} \times \varepsilon} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

ABS=Absorvância;

Vf= Volume final;

M= Massa da amostra

$\varepsilon= 2592$  (Coeficiente de absorvância do  $\beta$ -caroteno em Éter de Petróleo)

#### 4.5.2.2. Separação cromatográfica de carotenoides

A análise cromatográfica segundo Pacheco (2009) foi realizada por CLAE-DAD e os carotenoides identificados por comparação com o tempo de retenção e espectros de UV-Vis disponíveis na literatura para os padrões isolados por Pacheco *et al.* (2013). O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C<sub>30</sub>, YMC Carotenoid S-3; 4,6 x 250 mm) a 33 °C em modo de eluição gradiente (Tabela 4) de Metanol (Fase A) e Éter Metil-*tert*-butílico (Fase B) com fluxo de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi 15  $\mu$ L e o tempo de corrida de 28 minutos.

**Tabela 4.** Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos carotenoides

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	80,0	20,0
0,50	75,0	25,0
15,00	15,0	85,0
15,05	10,0	90,0
16,50	10,0	90,0
16,55	80,0	20,0
28,00	80,0	20,0

O teor de carotenoide individual foi calculado por normalização, relacionando o teor de carotenóides totais com a porcentagem das áreas dos picos no cromatograma extraído no comprimento de onda de  $\lambda_{\text{máx}}=450$  nm, conforme metodologia descrita por Martins (2015) (Equações 4 e 5)

$$\% \text{ da subst. de interesse} = \frac{\text{Área da subst. de interesse} \times 100}{\sum \text{áreas de todas as subst. detectadas}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Conc. da subst. de interesse (} \mu\text{g / 100g)} = \frac{\% \text{ da subst. de interesse} \times \text{Carotenoides totais}}{100} \quad (\text{Equação 5})$$

### 4.5.3. Análise de antocianinas

#### 4.5.3.1. Extração de antocianinas

A análise de antocianinas foi realizada na parte do fruto casca mais polpa. A amostra foi congelada e liofilizada. O material seco foi submetido à análise de umidade como descrito no item 4.5.1. A extração de antocianinas foi realizada conforme método descrito por Santiago *et al.*, (2010). A amostra foi extraída com solução 10 % de Ácido Fórmico em Metanol com agitação em vórtex durante 1 minuto, em seguida, levada ao ultrassom por 10 minutos e posteriormente à centrifugação a 6000 rpm e 20 °C por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para balão de 10 mL. O processo foi repetido com o resíduo sólido obtido na centrifugação, até que o sobrenadante obtido não apresentasse a coloração característica de antocianinas (laranja a rosa). Uma alíquota de 400  $\mu$ L foi evaporada sob fluxo de ar comprimido até a secura e em seguida o resíduo foi dissolvido em solução 5 % de Ácido Fórmico:Metanol (90:10) e submetida à análise por CLAE-DAD (Anexo 3). O teor de antocianinas do pó foi calculado através da Equação 6.

$$\text{Teor de Antocianina (mg/100g)} = \frac{R \times 500}{M} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde,

R= Resultado fornecido pela curva analítica da antocianina (mg . mL<sup>-1</sup>)

M= Massa da amostra (g)

#### 4.5.3.2. Separação cromatográfica de antocianinas

A análise cromatográfica foi realizada por CLAE-DAD, conforme método de GOUVÊA e colaboradores (2015) e os compostos identificados através do tempo de retenção, espectros de UV e espectros de massa. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>, Thermo BDS Hypersil, 100 x 4,6 mm e 2,4  $\mu$ m) a 40 °C em modo

de eluição gradiente (Tabela 5) de Ácido Fórmico 5 % (Fase A) e Acetonitrila (Fase B) com fluxo de 1,0 mL/min, o volume de injeção foi 5 µL e o tempo de corrida de 20 minutos. O cromatograma foi extraído no  $\lambda_{\text{máx}}=520$  nm

**Tabela 5.** Gradiente de eluição das fases móveis para separação das antocianinas

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	95	5
15,00	87	13
16,50	86	14
18,00	95	5
20,00	95	5

#### 4.5.4. Preparo dos padrões analíticos de antocianinas

##### 4.5.4.1. Isolamento das antocianinas

Para isolamento dos padrões de antocianinas foram utilizadas a uva preta chilena sem sementes (*Vitis* sp) e a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), obtidas no comércio da cidade do Rio de Janeiro, e a jabuticaba da praia (*Eugenia astringens*), coletada na cidade do Rio de Janeiro. As matrizes foram manualmente despulpadas, suas cascas foram congeladas e liofilizadas durante 24 h, e posteriormente moídas. Os pós obtidos da jabuticaba da praia, uva e jabuticaba foram misturados na proporção de 3:1:3, respectivamente. Foram realizadas paralelamente quatro extrações de antocianinas (item 3.5.3.1) utilizando o total de 3,4 g da mistura. Os extratos das quatro extrações foram reunidos e secos em evaporador rotatório e o resíduo dissolvido em 20 mL de solução de 5 % de Ácido Fórmico:Metanol (90:10) e filtrado por membrana hidrofílica tipo Millex (0,45 µm). Este extrato foi então submetido à separação cromatográfica em coluna de fase reversa (coluna C<sub>18</sub>, Symmetry<sup>®</sup>, Waters, 3,9 mm x 150 mm, 5 µm) com gradiente de eluição apresentado na Tabela 5 a 1 mL/min, temperatura da coluna de 40 °C e volume de injeção de 50 µL (GOUVÊA *et al.*, 2012).

Para coleta das substâncias foi utilizado um sistema de CLAE-DAD conectado à um coletor de frações (Fraction Collector III, Waters<sup>®</sup>). O coletor de frações foi programado utilizando o modo *window* de acordo com o tempo de retenção das substâncias de interesse e entre cada coleta foi realizada a lavagem da saída do coletor, utilizando a opção *monitor*, a fim de evitar a contaminação da próxima substância a ser coletada. As condições do coletor de frações foram otimizadas para se obter compostos com alto índice de pureza. O *delay*



utilizado foi de 10 segundos, *peak level* de 20 % e o comprimento de onda monitorado em 520 nm.

A concentração das antocianinas isoladas foi realizada por extração em fase sólida, utilizando um cartucho de fase reversa (C<sub>18</sub> Sep-Pak, Waters®), conforme metodologia descrita por Gouvêa e colaboradores (2014). Com o auxílio de uma seringa, o cartucho foi previamente ativado com 3 mL de Metanol, em seguida foi saturado com a fração da antocianina coletada, ficando a antocianina retida no cartucho. O cartucho foi lavado com 3 mL de solução de HCl 0,01 %, em seguida foi seco através da injeção de ar e a antocianina foi eluída com Metanol. A solução metanólica contendo a antocianina isolada foi seca em fluxo de ar comprimido filtrado em membrana hidrofílica tipo Millex (0,45 µm). O resíduo foi, então, dissolvido com 5 mL de solução 5 % de Ácido Fórmico:Metanol (90:10), obtendo-se a solução mãe. Uma alíquota da solução mãe foi utilizada para análise de pureza por CLAE-DAD (item 4.5.3.2), outra alíquota foi utilizada para análise por espectrometria de massas de alta resolução (item 4.5.4.2) e outra para o cálculo da concentração da antocianina na solução mãe e preparo da curva analítica de antocianinas (item 4.5.4.3).

#### **4.5.4.2. Identificação das antocianinas por espectrometria de massas de alta resolução**

As antocianinas coletadas foram analisadas por infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução Q-TOF Synapt (Waters®), com ionização por eletronebulização. As condições e voltagens utilizadas no espectrômetro de massas foram: modo positivo; analisador modo V; capilar 3,0 kV; cone de amostra 25,0 V; cone de extração 4,0 kV; temperatura da fonte 120 °C; temperatura de dessolvatação 150 °C; fluxo do gás de dessolvatação 750,0 L/Hr; energia de colisão 6,0 eV. Os espectros foram obtidos no modo EM/EM com energia de colisão de 12 eV (*trap e transfer*)

#### **4.5.4.3. Quantificação dos padrões isolados e preparo da curva analítica de antocianinas**

Para o cálculo da concentração da antocianina isolada na solução mãe foi retirada uma alíquota (AQ) desta solução que foi seca sob fluxo de ar comprimido filtrado em membrana

hidrofílica tipo Millex (0,45 µm) e o resíduo dissolvido com 2 mL da solução de leitura, conforme a Tabela 6.

**Tabela 6.** Coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ), comprimento de onda ( $\lambda$ ), solução de leitura, massa molecular (MM) e alíquota (AQ) para o cálculo da concentração da antocianina na solução mãe

Antocianina	Massa Molecular (MM, g . mol <sup>-1</sup> )	Alíquota (AQ, mL)	Solução de leitura	Comprimento de onda ( $\lambda$ , nm)	Absortividade molar ( $\epsilon$ , L . mol <sup>-1</sup> . cm <sup>-1</sup> )
Delfinidina-3-O-glicosídeo	465	0,4	1% HCl em MetOH	543	29000
Cianidina-3-O-glicosídeo	449	0,2	1 % HCl em MetOH	530	34300
Petunidina-3-O-glicosídeo	479	0,4	0,1 % HCl em MetOH	546	12900
Peonidina-3-O-glicosídeo	463	0,4	0,1 % HCl em MetOH	536	11300
Malvidina-3-O-glicosídeo	493	0,2	0,1 % HCl em MetOH	538	29500

Fonte: Giust *et al.* 1999

O resíduo dissolvido na solução de leitura correspondente teve sua absorvância determinada em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) indicado na Tabela 6. A concentração da solução mãe foi calculada através da lei de Lambert-Beer utilizando a Equação 7.

$$\text{Concentração da Antocianina(mg/mL)} = \frac{ABS \times MM \times 2 \times P}{\epsilon \times AQ} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde,

ABS= Absorvância fornecida pela leitura em espectrofotômetro no  $\lambda$  indicado na tabela 3

MM= Massa molecular da antocianina

$\epsilon$ = Absortividade molar da antocianina

P= Pureza

AQ= Alíquota da solução mãe

A partir de diluições da solução mãe de cada antocianina, individualmente, foram preparados os pontos da curva analítica. A solução 5 % de Ácido Fórmico:Metanol (90:10) foi utilizada para diluição do analito obtendo-se um volume final de 200 µL para cada ponto conforme a Tabela 7.

**Tabela 7.** Diluições da solução mãe para o preparo da curva analítica

Ponto	Volume da solução mãe ( $\mu\text{L}$ )
1	10
2	20
3	40
4	60
5	80
6	100
7	120
8	140
9	160
10	200

#### **4.5.5. Análise de ácidos fenólicos**

##### **4.5.5.1. Extração e hidrólises de ácidos fenólicos**

As partes do fruto casca mais polpa e a semente foram submetidas a análise de ácidos fenólicos, conforme metodologia descrita por Mattila & Kumpulainen (2002). Para obtenção do extrato de ácidos fenólicos foi realizada a extração em cerca de 0,5 g de amostra com 10 mL da solução de BHT 2 g/L em Metanol:10 % de Ácido Acético (85:15) através de agitação em vórtex, seguida de extração em banho de ultrassom por 30 minutos. Após decantação do resíduo sólido, foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da parte sobrenadante para análise de ácidos fenólicos livres por CLAE-DAD. O extrato de ácidos fenólicos (resíduo sólido + sobrenadante) foi reservado.

Para hidrólise básica dos ácidos fenólicos esterificados foram adicionados de 17 mL de NaOH 3 M ao extrato de ácidos fenólicos reservado (resíduo sólido + sobrenadante). Borbulhou-se  $\text{N}_2$  durante 1 minuto, tampou-se o frasco e este foi mantido sob agitação mecânica por 16 h. Após decantação, o resíduo sólido e sobrenadante foram separados. Ao sobrenadante foram adicionados 7 mL de HCl 6 M, e o pH ajustado para  $2,0 \pm 0,1$  com HCl 6 M com auxílio de um medidor de pH. O resíduo sólido foi reservado.

Os ácidos fenólicos hidrolisados foram extraídos com 15 mL éter etílico:acetato de etila (1:1) por três vezes. A fase orgânica foi avolumada para 50 mL com a mistura Éter Etílico:Acetato de Etila (1:1). Uma alíquota de 1 mL foi seca sob fluxo de  $\text{N}_2$  e dissolvida com 100  $\mu\text{L}$  de Metanol, procedendo-se com a análise cromatográfica da fração da hidrólise básica.

A fase aquosa foi misturada com o resíduo sólido reservado. Adicionou-se 2,5 mL de HCl concentrado para hidrólise dos ácidos fenólicos ligados através de ligação éter. A mistura foi levada à estufa a 85 °C durante 35 minutos. Após o resfriamento até temperatura ambiente adicionou-se 5 mL de NaOH 3 M, e então ajustou-se o pH para 2,0±0,1 com NaOH 3 M com auxílio de um medidor de pH. Foi realizada nova extração com 15 mL Éter Etilico:Acetato de Etila (1:1) por três vezes. A fase orgânica foi avolumada para 50 mL com a mistura Éter Etilico:Acetato de Etila (1:1). Uma alíquota de 1 mL foi seca sob fluxo de N<sub>2</sub> e dissolvida com 100 µL de Metanol, procedendo-se com a análise cromatográfica da fração da hidrólise ácida (Anexo 4). A quantificação foi feita por padronização externa, conforme Equações 8 e 9.

$$\text{Teor de ácidos fenólicos livres (mg/100g)} = \frac{RL}{M} \quad (\text{Equação 8})$$

$$\text{Teor de ácidos fenólicos totais (mg/100g)} = \frac{RB+RA}{M \times 2} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde,

RL= Resultado fornecido pela curva analítica da fração de ácidos fenólicos livres (µg . mL<sup>-1</sup>)

RB= Resultado fornecido pela curva analítica da fração de ácidos fenólicos obtidos por hidrólise básica (µg . mL<sup>-1</sup>)

RA= Resultado fornecido pela curva analítica da fração de ácidos fenólicos obtidos por hidrólise ácida (µg . mL<sup>-1</sup>)

M= Massa da amostra (g)

#### 4.5.5.2. Separação cromatográfica de ácidos fenólicos

A análise cromatográfica foi realizada por CLAE-DAD. O método baseia-se na separação cromatográfica em coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>, Thermo BDS Hypersil, 100 mm x 4,6 mm e 2,4 µm) a 30 °C em modo de eluição gradiente (Tabela 8) de 1,5 mL/L de Ácido Fosfórico em água (Fase A) e Acetonitrila (Fase B) com fluxo de 1,0 a 1,2 mL/min, o volume de injeção foi 10 µL e o tempo de corrida de 28 minutos. A quantificação foi realizada na região do ultravioleta a λ=270 nm.

**Tabela 8.** Gradiente de eluição das fases móveis para separação dos ácidos fenólicos

Tempo	Fluxo (mL/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	1,0	95,0	5,0
6,00	1,0	95,0	5,0
12,00	1,2	88,0	12,0
18,00	1,2	80,0	20,0
20,00	1,2	50,0	50,0
24,00	1,2	50,0	50,0
25,00	1,2	95,0	5,0
28,00	1,0	95,0	5,0

#### 4.5.6. Análise de capacidade antioxidante

##### 4.5.6.1. Extração de compostos antioxidantes

A análise da capacidade antioxidante foi realizada segundo a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007; 2010). Pesou-se de 1 a 1,5 g da amostra em um béquer de 100 mL, adicionou-se 40 mL de Metanol:água (1:1), homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10000 rpm durante 15 minutos, transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL. A partir do resíduo da primeira extração, adicionou-se 40 mL de Acetona:água (7:3), homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 10000 rpm durante 15 minutos, transferiu-se o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e completou-se o volume para 100 mL com água destilada.

Foram preparadas 3 diluições do extrato de compostos antioxidantes, conforme Tabela 9, afim de obter 3 concentrações da amostra.

**Tabela 9.** Diluições do extrato de substâncias antioxidantes

	Alíquota do extrato (mL)	Volume final (mL)	Fator de diluição (FD)
Polpa + Casca	2	2	1
	1,5	2	0,75
	1	2	0,5
Semente	0,2	2	0,2
	0,3	2	0,15
	0,4	2	0,1

A concentração da amostra foi calculada utilizando-se a equação 10.

$$CA \text{ (mg/L)} = \frac{m \times 10000}{DF} \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde,

m=Massa de amostra pesada

DF=Fator de diluição

#### 4.5.6.2. Determinação da capacidade antioxidante - captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>

A determinação de capacidade antioxidante foi avaliada segundo método descrito por Rufino *et al.*, (2007; 2010). O radical livre ABTS<sup>•+</sup> foi obtido pela reação do ABTS (7 mM) com Persulfato de Potássio (140 mM). O sistema foi mantido em repouso, à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C), durante 16 horas em ausência de luz. Uma vez formado o radical ABTS<sup>•+</sup>, diluiu-se com Etanol até obter um valor de absorvância entre  $A=0,650$  a  $0,750$ , a  $\lambda=734$  nm.

Foram preparadas cinco soluções padrão de trolox em álcool etílico (concentrações variando de 100 a 2000  $\mu\text{M}$ ). Para calibração adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de cada solução padrão de trolox separadamente à 3 mL de solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Após 6 minutos de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro a  $\lambda=734$  nm. Através interpolação das concentrações de trolox pela absorvância foram calculados os coeficientes de inclinação e interseção da curva analítica de trolox. A absorvância equivalente a 1000  $\mu\text{mol}$  de trolox ( $ABS_{1000}$ ) foi calculada a partir da equação 11.

$$ABS_{1000} = -1000 a_1 + b_1 \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde,

$a_1$ = Inclinação da curva analítica de trolox;

$b_1$ =Interseção da curva analítica de trolox

Para a determinação da capacidade antioxidante adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de cada concentração da amostra separadamente à 3 mL de solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Após 6 minutos de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro a  $\lambda=734$  nm. Através interpolação das concentrações da amostra ( $CA$  – Equação 10) pelas absorvâncias foram calculados os coeficientes de inclinação e interseção da curva analítica das concentrações da amostra. Através da equação 12 obteve-se a concentração da amostra equivalente a 1000  $\mu\text{mol}$  de Trolox (X).

$$X (mg/L) = \frac{ABS_{1000} + b_1 - b_2}{a_2} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde,

ABS<sub>1000</sub>= absorvância equivalente a 1000 µmol de trolox (Equação 11);

a<sub>2</sub>= Inclinação da curva analítica da amostra;

b<sub>2</sub>=Interseção da curva analítica da amostra

O valor da capacidade antioxidante foi obtido através da equação 13.

$$\text{Atividade antioxidante } (\mu\text{mol de Trolox/g de amostra}) = \frac{1000000}{X} \quad (\text{Equação 13})$$

Onde,

X= diluição da amostra equivalente a 1000 µmol de Trolox (Equação 12)

#### 4.5.6.3. Determinação da capacidade antioxidante - captura do radical livre DPPH<sup>+</sup>

A determinação de capacidade antioxidante foi avaliada segundo método descrito por Rufino *et al.*, (2007; 2010). A partir do padrão comercial do radical livre DPPH<sup>+</sup> foi preparada uma solução (60 µM) em Álcool Metílico. Por diluição foram preparadas cinco soluções do radical livre DPPH<sup>+</sup> (concentrações variando de 15 à 100 µM). Estas soluções com concentrações conhecidas do radical livre DPPH<sup>+</sup> tiveram sua absorvância lida em espectrofotômetro a λ=515 nm. Através interpolação das concentrações de DPPH<sup>+</sup> pela absorvância foram calculados os coeficientes de inclinação e interseção da curva analítica do DPPH<sup>+</sup>.

Como branco utilizou-se uma solução de Metanol 50 %:Acetona 70 %:água (40:40:20). Foi adicionado 100 µL desta solução à 3,9 mL de solução do radical DPPH<sup>+</sup> na concentração de 60 µM e sua absorvância foi lida em espectrofotômetro à λ=515 nm, esta absorvância foi denominada absorvância controle (ABSC). A quantidade equivalente a metade do radical DPPH<sup>+</sup> inicial (MQi, em g/L) foi calculada através da equação 14.

$$MQi (g/L) = \frac{0,5 \times ABSC - b_1}{1000000 \times a_1} \times MM \quad (\text{Equação 14})$$

Onde,

ABSC=Absorvância controle;

a<sub>1</sub>= Inclinação da curva analítica do DPPH<sup>+</sup>;

b<sub>1</sub>=Interseção da curva analítica do DPPH<sup>+</sup>;

MM= 394,32 – Massa molecular do DPPH.

Para a determinação da capacidade antioxidante adicionou-se 100 µL de cada concentração da amostra separadamente à 3,9 mL de solução do radical DPPH<sup>•+</sup> na concentração de 60 µM. Aguardou-se o fim da reação (até que a absorvância permanecesse constante) e realizou-se a leitura em espectrofotômetro à λ=515 nm. Através interpolação das concentrações da amostra (CA – Equação 10) pelas absorvâncias foram calculados os coeficientes de inclinação e interseção da curva analítica das concentrações da amostra. Através da equação 15 obteve-se o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50 % a quantidade do radical DPPH<sup>•+</sup> (EC<sub>50</sub>) inicial.

$$EC_{50} (mg/L) = \frac{0,5 \times ABSC - b_2}{a_2} \quad (\text{Equação 15})$$

Onde,  
 ABSC=Absorvância controle;  
 a<sub>2</sub>= Inclinação da curva analítica da amostra;  
 b<sub>2</sub>=Interseção da curva analítica da amostra

O valor da capacidade antioxidante foi obtido através da equação 16.

$$EC_{50}(\text{expresso em g de fruta/g de DPPH}) = \frac{EC_{50}}{1000 \times MQi} \quad (\text{Equação 16})$$

Onde,  
 EC<sub>50</sub>= Concentração da amostra para reduzir em 50 % o DPPH<sup>•+</sup> inicial (Equação 15)  
 MQi= Metade do radical DPPH<sup>•+</sup> inicial (g/L) (Equação 14).

#### **4.5.7. Isolamento de substâncias não identificadas com padrões analíticos**

##### **4.5.7.1. Fracionamento em cartucho com fase mista**

Cerca de 5 g de polpa mais casca foram extraídos com solução 10 % de Ácido Fórmico em Metanol, conforme item 4.5.3.1. Uma alíquota de 1 mL deste extrato, foi dissolvida com 29 mL de 0,1 % de Ácido Fórmico em água e submetida à purificação em cartucho com fase mista (C<sub>18</sub> e ácido sulfônico) conforme método descrito por He & Giusti (2011).

O cartucho foi ativado com 12 mL de Metanol, em seguida, 20 mL do extrato dissolvido foi passado através do cartucho sob vácuo. Foi realizada lavagem com 12 mL de solução 0,1 % de Ácido Fórmico em água. A fração 1 foi eluída com solução 0,1 % de Ácido Fórmico em Metanol, em seguida as frações contendo as antocianinas foram eluídas com 6 mL de solução 1 % de NH<sub>4</sub>OH em metanol (fração 2) e 6 mL de solução de 1 % de NH<sub>4</sub>OH em



Metanol:água (60:40) (fração 3). As frações 2 e 3 foram prontamente acidificadas com 250 µL de Ácido Trifluoracético. A fração 1 foi seca em fluxo de ar comprimido e seu resíduo dissolvido em 2 mL de solução 10 % de Metanol em água utilizando banho de ultrassom. As frações foram analisadas por CLAE-DAD nas condições descritas no item 4.5.3.2.

#### 4.5.7.2. Fracionamento em cartucho com fase reversa

A fração 1 obtida através de separação em cartucho de fase mista, dissolvida em 10 % de Metanol em água foi submetida a fracionamento em cartucho de fase reversa (C<sub>18</sub>, Biotage KP-C<sub>18</sub>-HS, 50 µm, 30 g) utilizando um sistema de isolamento cromatográfico acelerado (Isolera Four ACI™, Biotage), em modo de eluição gradiente (Tabela 10) de Ácido Fórmico 1 % em água (Fase A) e Acetonitrila (Fase B) com fluxo de 25 mL/min. Os comprimentos de onda monitorados foram 349 e 520 nm, volume de injeção de 5 mL e o volume de coleta foi de 17 mL. As frações foram analisadas por CLAE-DAD nas condições descritas no item 4.5.3.2. Após reunir as frações de interesse, estas foram secas sob vácuo à temperatura de 60°C em evaporador rotatório. Para caracterização estrutural foram submetidas à análise de RMN (item 4.7.1) e EM (item 4.5.7.3).

**Tabela 10.** Tempo aproximado, volume de fase móvel e porcentagem da fase B

Tempo aproximado (minutos)	Volume de fase móvel (mL)	Fase B (%)
0-4	99	0
4-10	155,1	0-3
10-11	29,7	3
11-38	669,9	3-15
38-83	1131,9	15-35
83-89	148,5	35-50
89-102	330	50-100
102-105	66	100

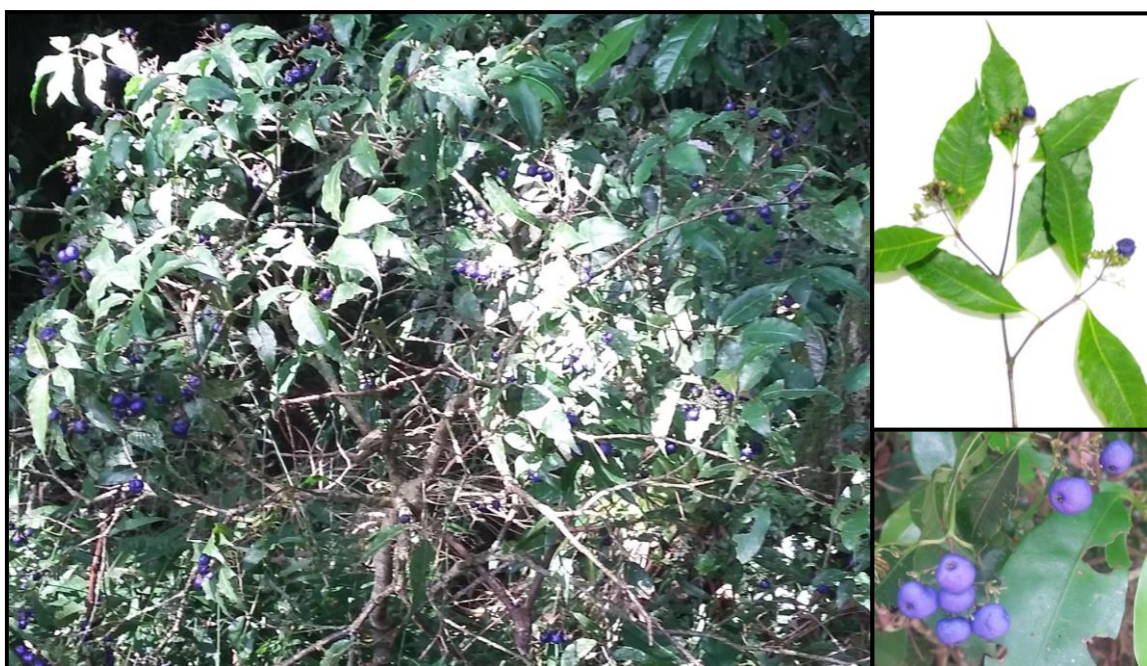
#### 4.5.7.3. Espectrometria de massas

As substâncias isoladas foram solubilizadas em sistema de solvente constituído de Metanol:0,1 % de Ácido Fórmico em água (50:50) e foram analisados por injeção direta em espectrômetro de massas Q-TOF (Synapt HDMS, Waters) com ionização por eletronebulização (ESI). As condições e voltagens utilizadas no espectrômetro de massas

foram: no modo negativo; analisador modo V; capilar 2,5 kV, cone de amostra 25,0 V; cone de extração 4,0 kV; temperatura da fonte 80 °C; temperatura de dessolvatação 40 °C; fluxo do gás de dessolvatação 150,0 L/h. Os espectros foram obtidos no modo EM/EM com energia de colisão de 10 eV (trap e transfer).

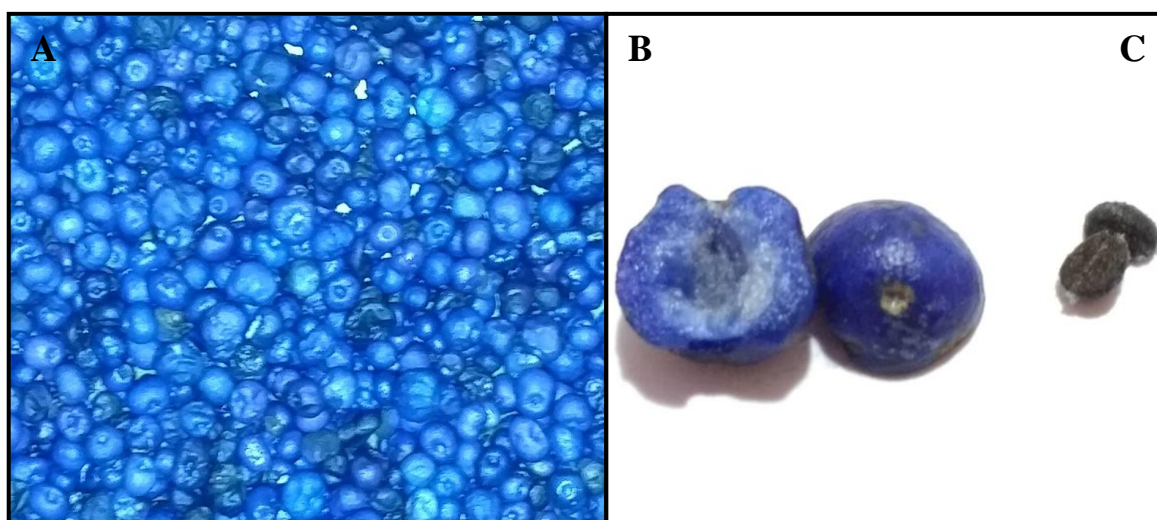
#### 4.6. *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl.

Os frutos de *P. leiocarpa* (Figura 20) foram coletados na cidade de Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro, coordenadas geográficas 22°26'55''S 42°59'14''O. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Marcelo da Costa Souza, professor e pesquisador do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ (RBR), sob os números RBR 37742, RBR 44729, RBR 44731.



**Figura 20.** *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltl.

A polpa e casca dos frutos de *P. leiocarpa* foram manualmente separadas da semente (Figura 21). Pesou-se 192,41 g de polpa e casca, que foi congelada e liofilizada. O extrato foi preparado para posterior separação e isolamento das substâncias (Anexo 5).



**Figura 21.** Frutos de *P. leiocarpa* (A), polpa (B) e semente (C)

#### **4.6.1. Preparação do extrato de *P. leiocarpa***

A polpa liofilizada (23,9 g) foi levada a banho de ultrassom por 10 minutos usando aproximadamente 70 mL de Hexano. O extrato foi filtrado sob vácuo em funil de vidro com placa sinterizada. O procedimento foi repetido três vezes com o mesmo solvente. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado utilizando Acetato de Etila e Ácido Fórmico 1 % em Metanol, em ordem crescente de polaridade. A extração com Ácido Fórmico 1 % em Metanol foi repetida até que não fosse mais observada a coloração rosa no extrato. Este extrato (1360 mg) foi seco em evaporador rotatório sob vácuo a 60 °C, e então dissolvido com 10 mL de solução de Ácido Fórmico 1% em água. A solução aquosa foi particionada através de extração líquido-líquido com Clorofórmio. A fase aquosa (960 mg) foi submetida a separação em coluna analítica de fase reversa por CLAE. A fase em Clorofórmio (390 mg) foi submetida a separação em coluna preparativa de sílica por cromatografia clássica.

#### **4.6.2. Separação e isolamento das substâncias de *P. leiocarpa* por CLAE**

A fase aquosa (obtida conforme item 4.6.1) foi centrifugada e o sobrenadante foi analisado por CLAE-DAD. A separação cromatográfica foi otimizada utilizando-se coluna C<sub>18</sub> (YMC 250 mm x4,6 mm, com partícula de 5 µm) com temperatura de 45 °C, fluxo de 1,0 mL/min em modo de eluição gradiente de solução de ácido fórmico 1 % em água (Fase A)

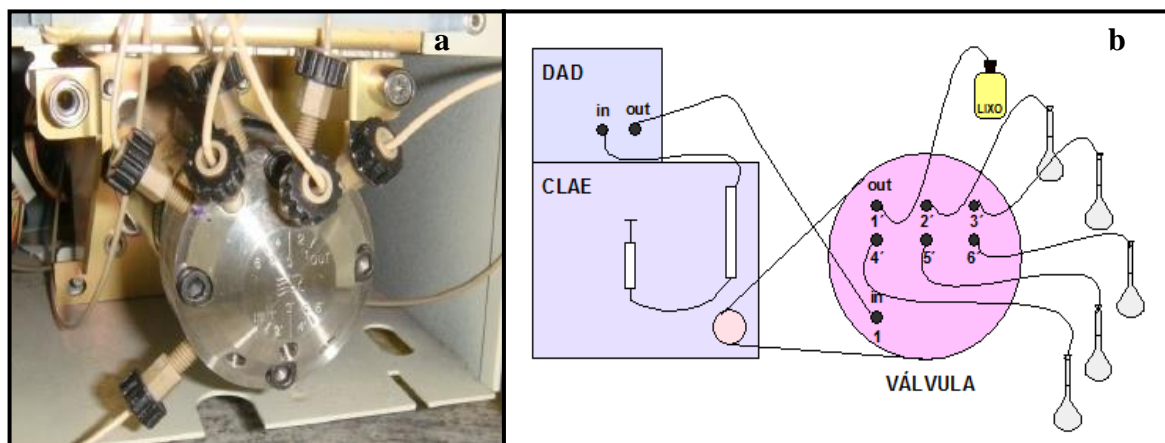
e acetonitrila (Fase B) (Tabela 11) com tempo de corrida 14 minutos. A faixa de varredura estabelecida para o detector foi de  $\lambda=200$  a 600 nm.

**Tabela 11.** Gradiente de eluição das fases móveis para separação do extrato de *P. leiocarpa*

Tempo	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	90,0	10,0
5,00	85,0	15,0
7,00	80,0	20,0
9,00	70,0	30,0
10,00	70,0	30,0
11,00	90,0	10,0
14,00	90,0	10,0

#### 4.6.2.1. Coleta das frações

As substâncias foram separadas por CLAE em coluna analítica acoplada a detector de arranjo de fotodiodos. Uma válvula seletora motorizada com 14 portas e 6 posições da Rheodyne® (Figura 22) foi adaptada à saída do detector, de forma a ser utilizada como um coletor de frações. A válvula, comandada pelo software Empower®, foi programada para coletar as substâncias de acordo com o tempo de retenção, possibilitando a coleta das substâncias de interesse ao eluirm. Foram realizadas injeções e coletas sucessivas de forma automatizada.



**Figura 22.** Válvula Rheodyne® (a) e esquema da coleta dos flavonoides (b)

#### 4.6.2.2. Secagem das frações

As frações que apresentaram coloração rosa foram concentradas em cartucho de fase reversa C<sub>18</sub> (sep-pack). Este método foi adotado por não usar aquecimento, a fim de prevenir a degradação das antocianinas. As frações foram diluídas até aproximadamente o dobro do volume coletado com água acidificada (0,1 % de Ácido Fórmico), com o intuito de reduzir a força da fase móvel, permitindo a retenção das substâncias no cartucho. O cartucho foi ativado com Metanol e, em seguida, as frações foram injetadas no cartucho com auxílio de uma seringa. Passou-se ar através do cartucho para a secagem e, então, as substâncias foram eluídas com Metanol acidificado (0,1 % de Ácido Fórmico). O solvente foi evaporado em fluxo de ar comprimido filtrado. As demais frações foram secas sob vácuo a 60 °C em evaporador rotatório. As substância isoladas foram analisadas por RMN (item 4.7.1) e EM (item 4.6.2.3).

#### 4.6.2.3. Espectrometria de massas

As substâncias isoladas diluídas em Metanol:Ácido Fórmico 0,1 % em água (50:50) foram analisados por injeção direta em espectrômetro de massas Q-TOF (Synapt HDMS, Waters) com ionização por eletronbulização (ESI). As condições e voltagens utilizadas no espectrômetro de massas foram: modo positivo; analisador modo V; capilar 3,0 kV; cone de amostra 25,0 V; cone de extração 4,0 kV; temperatura da fonte 80 °C; temperatura de dessolvatação 80 °C; fluxo do gás de dessolvatação 300,0 L/h. Os espectros foram obtidos no modo íons totais e modo EM/EM com energia de colisão de 10 eV (*trap e transfer*).

#### 4.6.3. Separação e isolamento das substâncias de *P. leiocarpa* por cromatografia clássica

O solvente da fração em clorofórmio (obtida conforme item 4.6.1) foi evaporado a temperatura e pressão ambientes. O resíduo (390 mg) foi dissolvido em Hexano. Este foi então, submetido a separação em coluna de sílica gel (26 cm x 1,1 cm) com um gradiente de eluição de Hexano/Diclorometano/Clorofórmio/Metanol. Foram obtidas 108 frações. As frações 35-43 (17,3 mg) foram recromatografadas em coluna de sílica gel (11x1,1 cm) com um gradiente de eluição de Diclorometano/Metanol, sendo obtidas 13 frações. A eluição foi

acompanhada em cromatografia em camada fina de fase normal utilizando-se como fase móvel de Diclorometano:Metanol (9:1). O solvente das frações foi evaporado a temperatura e pressão ambientes. As frações 10-11 foram reunidas e analisadas por CG-EM (item 4.6.3.1).

#### 4.6.3.1. Análise por CG-EM

Os espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (QP2010 Plus, Shimadzu) com ionização por impacto de elétrons (70 eV) da central analítica do Departamento de Química da UFRRJ. A separação foi realizada em coluna 5 % fenil e 95 % dimetilpolissiloxano (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). As amostras foram diluídas em clorofórmio, o volume de injeção foi de 1 µL no modo *split*, temperatura de 250 °C, fluxo do gás hélio de 1,00 mL/min, o tempo de retenção do solvente foi de 2,50 minutos. O programa da temperatura é apresentado na Tabela 12. As condições do espectrômetro de massas foram: temperatura da fonte de 250 °C e temperatura na interface de 310 °C.

**Tabela 12.** Gradiente de temperatura para cromatografia gasosa

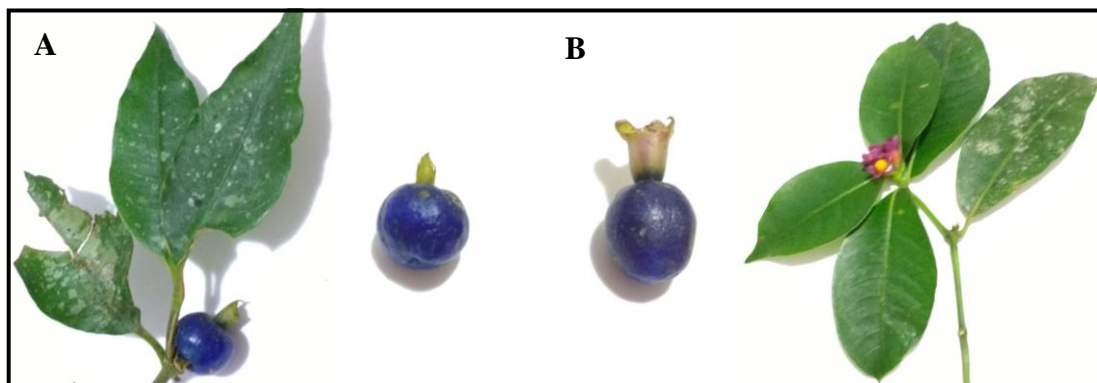
Tempo (min)	Temperatura (°C)
0,00	150,0
1,00	150,0
15,00	290,0
25,00	290,0

#### 4.6.4. Comparação do extrato de *P. leiocarpa* com o extrato de outras espécies do gênero *Psychotria*

Foi realizada a coleta de frutos de espécies do gênero *Psychotria* para comparação para comparação com perfil cromatográfico do extrato de *P. leiocarpa*. Os frutos de *Psychotria nuda* e *Psychotria suterella* (Figura 23) foram coletados na cidade de Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro, coordenadas geográficas 22°26'59.4"S 42°59'22.0"W e 22°27'16.2"S 42°59'58.9"W, respectivamente. A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Marcelo da Costa Souza, professor e pesquisador do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As exsiccatas foram depositadas no Herbário



do Departamento de Botânica da UFRRJ (RBR), sob os números RBR 44734 para *P. nuda* e RBR 44733 para *P. suterella*.



**Figura 23.** *P. suterella* (A) e *P. nuda* (B)

A polpa e casca dos frutos de *P. suterella* e *P. nuda* foram separadas manualmente das sementes, em seguida foi realizada extração Ácido Fórmico a 1 % em Metanol em banho de ultra-som por 10 minutos. O extrato foi seco sob fluxo de ar comprimido filtrado e dissolvido em 5 % de Ácido Fórmico em Metanol:água (10:90). A solução obtida foi analisada por CLAE-DAD, conforme condições descritas no item 4.6.2.

#### **4.7. Caracterização estrutural das substâncias**

A estrutura das substâncias foram determinadas através da interpretação de dados espectroscópicos, principalmente os fornecidos por Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D), Espectrometria de Massas (ESI-QTOF e CG-EM) e Ultravioleta (CLAE-DAD).

##### **4.7.1. Ressonância Magnética Nuclear**

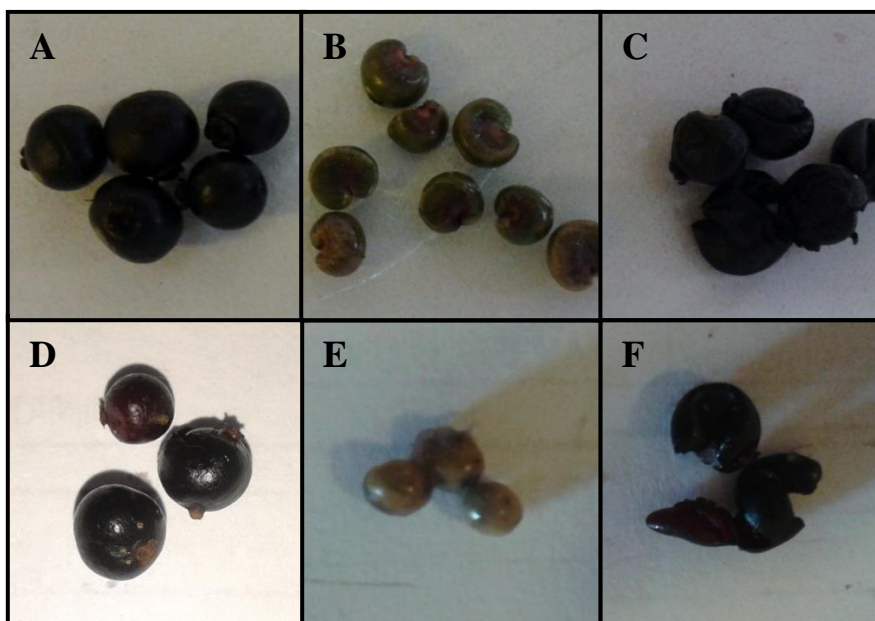
Os espectros de RMN foram adquiridos em espectrômetros Bruker AVANCE II de 11,7 T (operando a 500 e 125 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente) e de 9,4 T (operando a 400 e 100 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente) da central analítica do Departamento de Química da UFRRJ. Os deslocamentos químicos ( $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ ) em p.p.m foram referenciados com base nos correspondentes valores residuais do solvente MeOD ( $\delta_{\text{H}}$  3.31 e  $\delta_{\text{C}}$  49.15) usado. As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hz. Os espectros heteronucleares 2D HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ) e HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ , n=2 e n=3) foram adquiridos com

8 transições/128 incrementos e 4 transições/128 incrementos, respectivamente. Para os espectros homonucleares 2D COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H foram usadas larguras espectrais de 5000 Hz em ambas as dimensões e o número normal de transições.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. *Myrcia multiflora* (Lam.) DC.

Os frutos de *Myrcia multiflora* possuem o epicarpo (casca) fino e por isso não foi possível realizar sua separação da polpa. Diante disto, as análises foram realizadas na polpa juntamente com a casca (polpa+casca) e na semente (Figura 24). Foram pesados seis frutos, cada fruto integral de *M. multiflora* apresentou em média 330 mg, sendo constituído de 172 mg de polpa+casca e 158 mg de semente.



**Figura 24.** Frutos de *M. multiflora* F032A (A), semente (B) e polpa+casca (C); frutos de *M. multiflora* F032B (D), semente (E) e polpa+casca (F)

#### 5.1.1. Análise de umidade

A Tabela 13 apresenta a umidade da polpa+casca, da semente e do fruto integral de *M. multiflora* F032A e F032B.

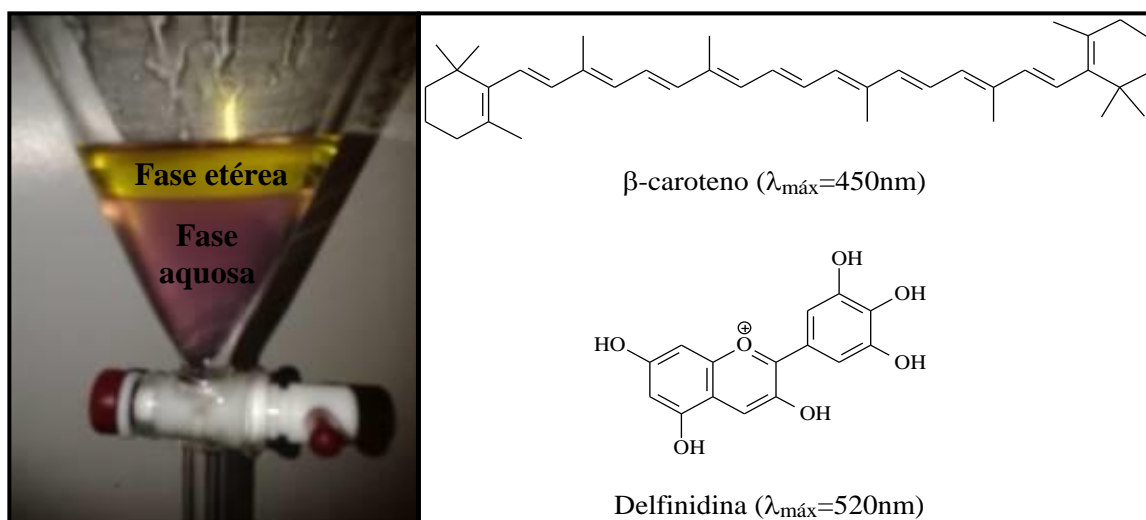


**Tabela 13.** Umidade da polpa+casca, semente e fruto integral de *M. multiflora*

	Umidade (%) $\pm$ Desvio Padrão		CV (%)	
	F032A	F032B	F032A	F032B
Polpa+casca	77,82 $\pm$ 1,16	76,49 $\pm$ 0,38	1,48	0,42
Semente	48,94 $\pm$ 0,60	38,6 $\pm$ 0,32	1,22	1,09
Fruto integral	62,53 $\pm$ 0,87	57,0 $\pm$ 0,09	1,39	0,16

### 5.1.2. Análise de carotenoides

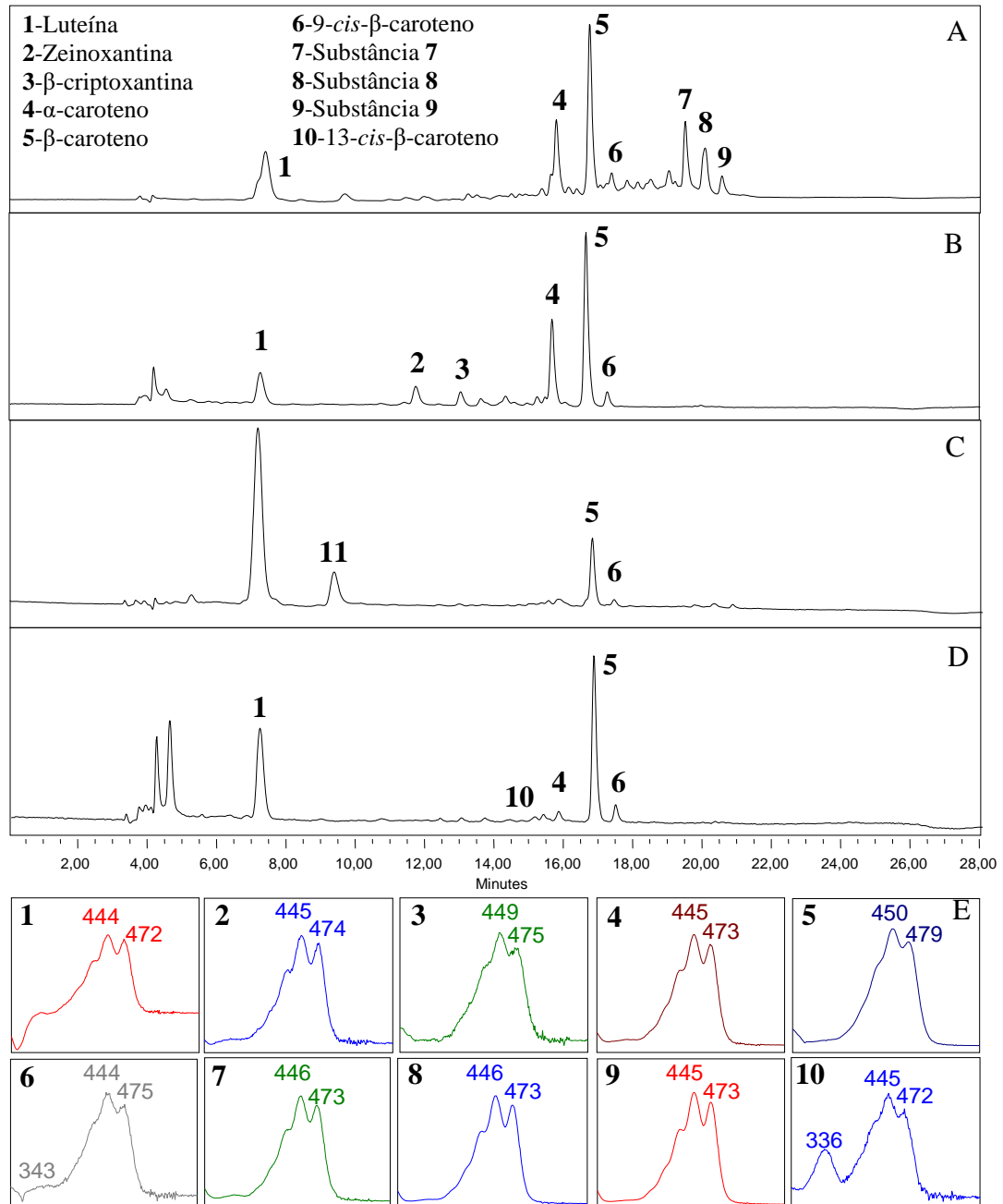
Os frutos de *M. multiflora* possuem coloração roxa intensa e, por isso, durante a etapa de extração com Acetona não foi possível observar a coloração característica de carotenoides (que varia do amarelo ao vermelho). Porém, na etapa da extração líquido-líquido em Éter de Petróleo:água observou-se claramente a separação entre carotenoides e antocianinas (responsáveis pela coloração roxa dos frutos). Os carotenoides migraram para a fase orgânica, devido a sua característica apolar, enquanto que as antocianinas permaneceram na fase aquosa na forma catiônica nas condições da análise (Figura 25).



**Figura 25.** Separação das antocianinas e carotenoides através de extração líquido-líquido em água:éter de petróleo

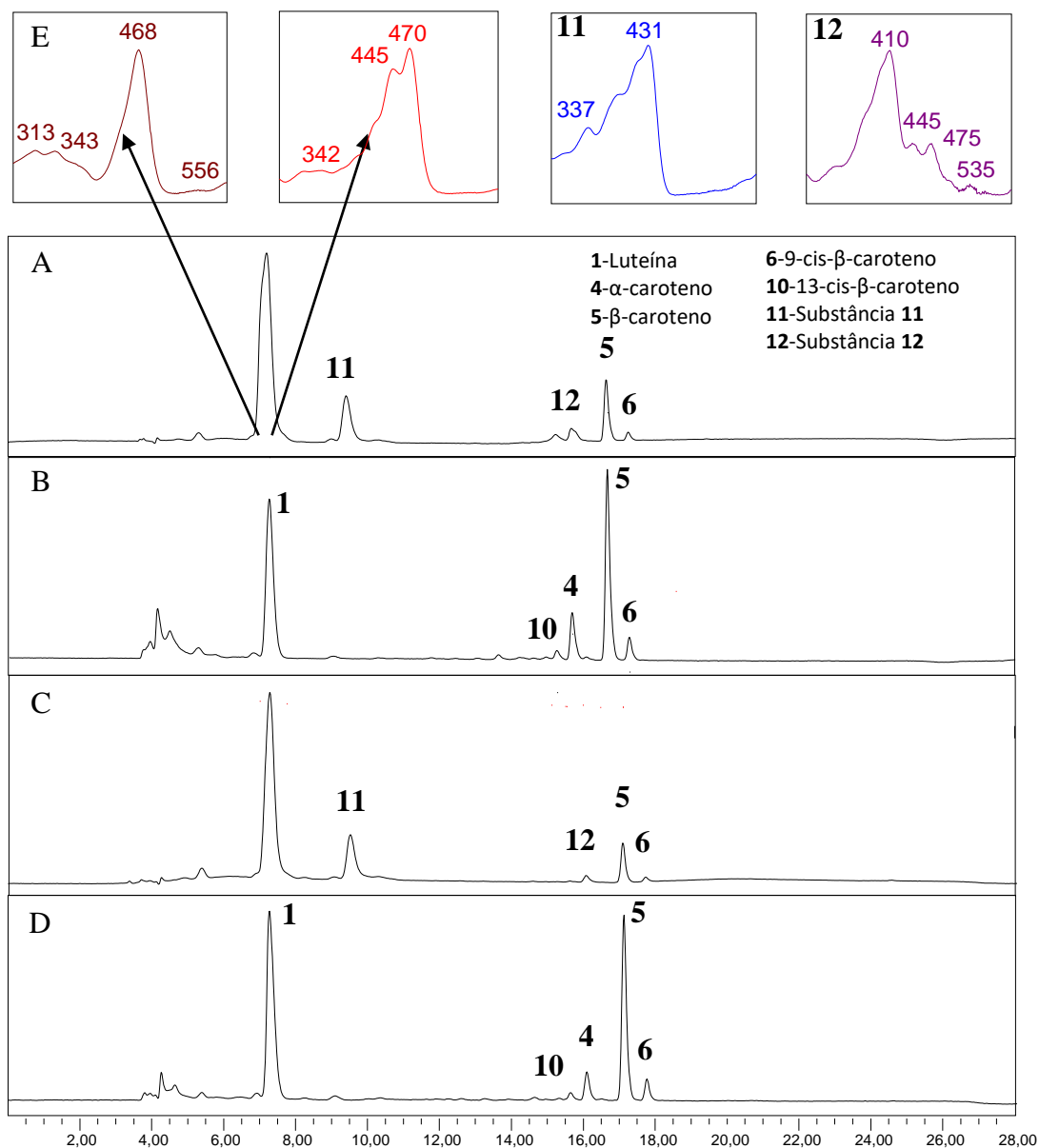
Os extratos de carotenóides da polpa+casca e da semente foram submetidos à análise cromatográfica antes e após a hidrólise básica do extrato. O cromatograma do extrato da polpa+casca dos frutos de *M. multiflora* F032A antes da hidrólise básica (saponificação) apresentou as substâncias **7**, **8** e **9**, que apesar de possuírem espectros de UV-Vis característico de carotenoides, não foram identificadas por comparação com o tempo de retenção dos padrões disponíveis. A menor da polaridade destas substâncias, em relação aos

padrões disponíveis, evidenciado através do tempo de retenção, sugeriu tratar-se de carotenoides esterificados. Após a hidrólise básica foi verificado no cromatograma do extrato hidrolisado a presença adicional dos carotenoides zeinoxantina (2) e  $\beta$ -criptoxantina (3) (Figura 26), permitindo postular a presença dos carotenoides 7, 8 e 9 como derivados esterificados destes carotenoides.



**Figura 26.** Cromatograma do extrato de carotenoides a 450nm da polpa+casca de *M. multiflora* F032A antes (A) e após a hidrólise básica (B), F032B antes (C) e após a hidrólise básica (D) e espectros de UV dos carotenoides (E)

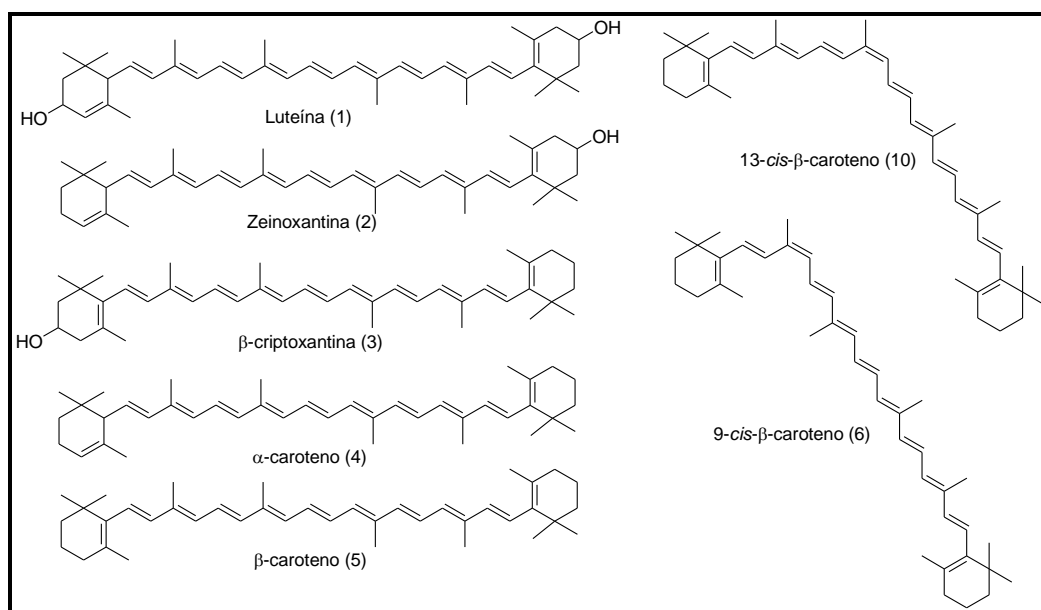
O extrato da semente de *M. multiflora* F032A e F032B e da polpa+casca F032B revelou a presença dos carotenoides luteína (1),  $\alpha$ -caroteno (4),  $\beta$ -caroteno (5), 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (6), 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (10). O cromatograma destes extratos antes da hidrólise básica apresentou um interferente co-eluindo com a luteína (1) e outro com  $T_R=9,5$  minutos (substância 11). Após a hidrólise básica estes interferentes foram removidos do cromatograma (Figura 27).



**Figura 27.** Cromatograma do extrato de carotenoides a 450nm da semente de *M. multiflora* F032A antes (A) e após a hidrólise básica (B), F032B antes (C) e após a hidrólise básica (D) e espectros de UV dos carotenoides (E)

O perfil de carotenóides nos frutos de *M. multiflora* revelou semelhança para as sementes das duas amostras coletadas (Figura 27). A polpa+casca da amostra *M. multiflora* F032A apresentou maior diversidade de carotenoides (Figura 26), porém o teor de carotenóides totais foi maior na amostra de *M. multiflora* F032B, tanto para polpa+casca quanto para semente (Tabela 14).

A Figura 28 apresenta as estruturas dos carotenóides identificados na polpa+casca e semente de *M. multiflora*, nas amostras F032A e F032B.



**Figura 28.** Estrutura dos carotenoides identificados na polpa+casca e semente de *M. multiflora*

Para quantificação dos carotenoides foi utilizado o método de normalização (item 4.5.2.2). Conforme apontado por Martins (2015) para quantificação de carotenoides através deste método é necessário certificar que todos os componentes da amostra que absorvam na região da análise utilizada para o cálculo de carotenoides totais ( $\lambda=450$  nm) sejam eluídos e detectáveis através da metodologia cromatográfica utilizada. Este método possui vantagens como praticidade, não necessitar de padrões analíticos e sua quantificação independente do volume injetado. A Tabela 14 descreve o teor de carotenoides na polpa+casca e semente dos frutos de *M. multiflora* F032A e F032B.

**Tabela 14.** Teor de carotenóides e desvio padrão na polpa+casca e na semente dos frutos de *M. multiflora* F032A e F032B

	Polpa + casca		Semente	
	Teor ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) $\pm$ Desvio Padrão			
	F032A	F032B	F032A	F032B
Totais	365,7 $\pm$ 11,0	469,5 $\pm$ 20,8	1954,3 $\pm$ 157,1	4650,6 $\pm$ 114,4
Luteína (1)	52,2 $\pm$ 5,1	109,5 $\pm$ 11,5	699,8 $\pm$ 266,2	2103,8 $\pm$ 58,0
Zeinoxantina (2)	21,2 $\pm$ 0,3	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina (3)	16,4 $\pm$ 1,3	-	-	-
$\alpha$ -caroteno (4)	75,3 $\pm$ 1,1	7,4 $\pm$ 0,4	193,8 $\pm$ 16,1	212,2 $\pm$ 12,5
$\beta$ -caroteno (5)	166,8 $\pm$ 12,7	137 $\pm$ 4,0	876,3 $\pm$ 119,1	1390,3 $\pm$ 52,0
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (6)	12,1 $\pm$ 1,0	13,0 $\pm$ 0,9	105,8 $\pm$ 15,2	154,5 $\pm$ 13,7
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (10)	-	3,8 $\pm$ 1,2	38,3 $\pm$ 4,1	54,2 $\pm$ 2,3

Rufino *et al.* (2010) avaliou 18 frutos tropicais envolvendo o teor de carotenoides totais. Dentre os frutos avaliados o teor de carotenoides totais da polpa+casca de *M. multiflora* revelou-se próximo ao encontrado para a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* - Myrtaceae), mangaba (*Hancornia speciosa* - Apocynaceae), caju (*Anacardium occidentale* - Anacardiaceae) e camu-camu (*Myrciaria dúbia* - Myrtaceae) (Tabela 15).

**Tabela 15.** Comparação do teor de carotenoides totais de *M. multiflora* e outros frutos tropicais

<i>Hancornia speciosa</i> Fruto	Carotenoides Totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
<i>M. multiflora</i> F032A	366
<i>M. multiflora</i> F032B	470
<i>M. cauliflora</i> *	320
<i>H. speciosa</i> *	300
<i>A. occidentale</i> *	400
<i>M. dubia</i> *	400

\*RUFINO *et al.*, 2010

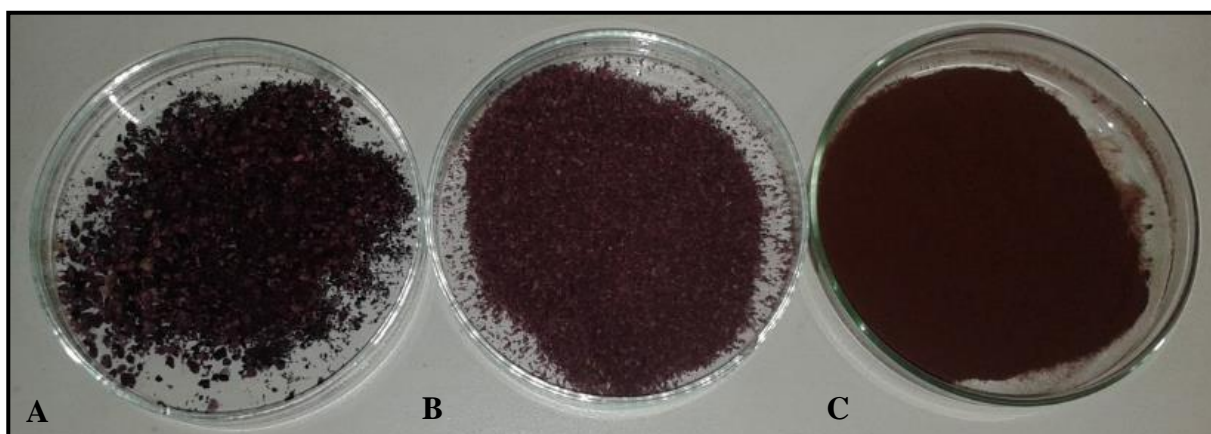
### 5.1.3. Análise de antocianinas

#### 5.1.3.1. Isolamento e identificação das antocianinas

Os padrões de antocianinas disponíveis comercialmente são vendidos com um baixo grau de pureza e em pequenas quantidades, além de serem caros. No entanto as antocianinas

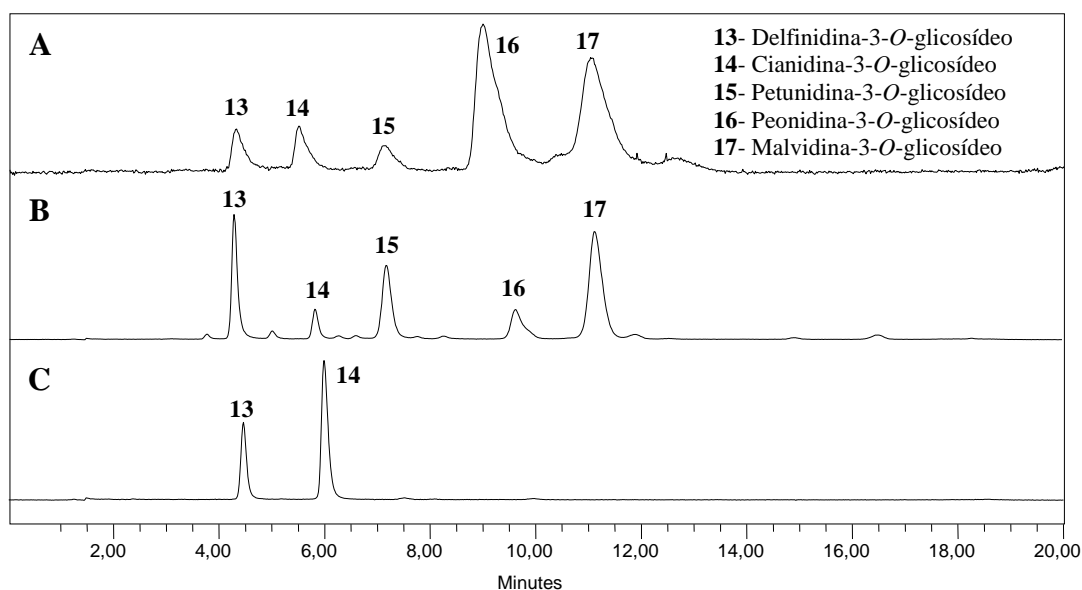
são encontradas abundantemente como substâncias naturais em frutas e flores (GOUVEA *et al.*, 2012). Assim, para a quantificação de antocianinas nos frutos de *M. multiflora* por padronização externa, utilizou-se o isolamento das antocianinas de matrizes com o perfil conhecido de tais substâncias para produção de padrões analíticos.

Foram selecionadas para o isolamento das antocianinas a casca da uva preta chilena sem sementes (*Vitis* spp.), a casca da jabuticaba da praia (*Eugenia astringens* Cambess) e a casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.)) por possuírem as substâncias de interesse em altas concentrações, sendo este um fator importante para o isolamento de substâncias com altos níveis de pureza. As matrizes foram previamente secas em um liofilizador e moídas, obtendo-se um pó rico em antocianinas. Estas técnicas, melhoram a eficiência da extração pré-concentrando e aumentando a superfície de contato entre o solvente a matriz. A Figura 29 apresenta a casca da uva, da jabuticaba da praia e da jabuticaba em pó.



**Figura 29.** Casca da jabuticaba da praia (A), da uva (B) e da jabuticaba (C) em pó

Os extratos das cascas da uva, da jabuticaba da praia e da jabuticaba foram analisados por CLAE-DAD. A identificação das antocianinas nas matrizes foi realizada com base no tempo de retenção das antocianinas, espectros de massa exata, UV-Vis e comparação com informações da literatura sobre estas matrizes e com padrões previamente isolados (GOUVÊA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2012, BRAGA, 2016). Figura 30 apresenta o cromatograma das antocianinas presentes nestas matrizes.



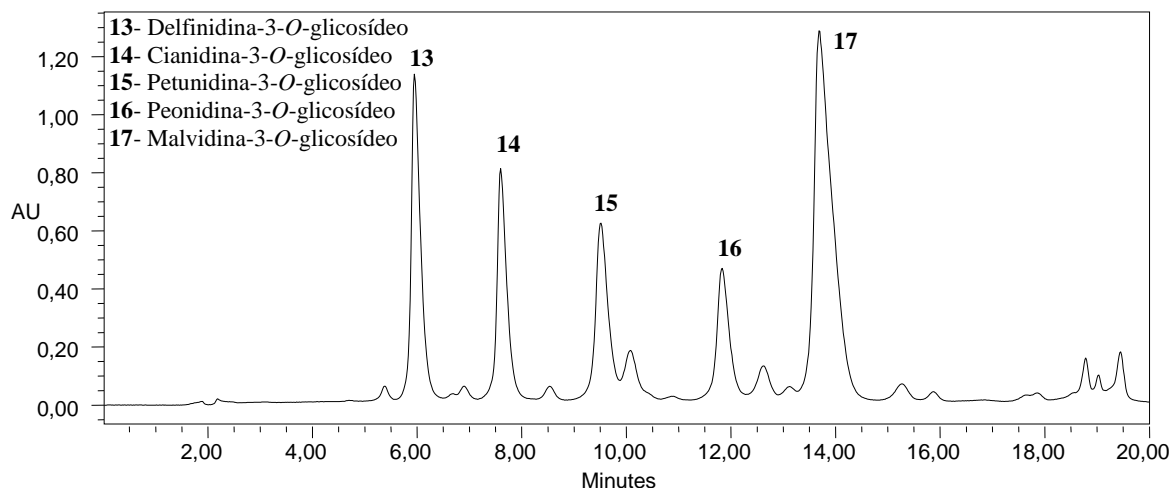
**Figura 30.** Cromatograma das antocianinas da casca da uva (A), da casca da jabuticaba da praia (B) e da casca da jabuticaba (C) ( $\lambda=520\text{nm}$ )

Pela relação das áreas dos picos observou-se a presença majoritária das antocianinas Peonidina-3-*O*-glicosídeo (**16**) e Malvidina-3-*O*-glicosídeo (**17**) na casca da uva e Delfinidina-3-glicosídeo (**13**) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**) na casca da jabuticaba. Porém nestas duas matrizes a concentração de Petunidina-3-*O*-glicosídeo (**15**) mostrou-se muito baixa. A casca dos frutos da jabuticaba da praia apresentou um perfil de antocianinas semelhante ao da uva, porém com uma concentração maior de Petunidina-3-*O*-glicosídeo (**15**). Sendo assim, foi realizada a mistura das três matrizes em pó, para se obter um extrato rico nas cinco antocianinas de interesse, tornando viável o isolamento das antocianinas simultaneamente.

As antocianinas foram isoladas através de CLAE em escala analítica. Na utilização de colunas analíticas para fins de isolamento recomenda-se uma coluna que suporte grande volume de amostra, seja reprodutiva, robusta e que o tempo de separação seja o menor possível, pois devem ser realizadas sucessivas injeções e coletas, para compensar o limitado volume de injeção. Com base na capacidade e robustez foi selecionada a coluna C<sub>18</sub>, Symmetry<sup>®</sup>, Waters, 3,9 mm x 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ .

O aumento do volume de injeção pode prejudicar a resolução do cromatograma, por outro lado injetar maior quantidade resulta em um menor número de coletas necessárias. Assim, o volume de 50  $\mu\text{L}$  foi o maior volume de injeção onde manteve-se a resolução necessária para coleta. A Figura 31 apresenta o cromatograma do extrato da mistura uva,

jaboticaba da praia e jaboticaba utilizada para isolamento das antocianinas, os picos cromatográficos revelaram uma boa intensidade e resolução suficiente para realizar a coleta das antocianinas correspondentes.



**Figura 31.** Cromatograma do extrato de antocianinas para coleta de padrões ( $\lambda=520\text{nm}$ )

Foram realizadas 45 sucessivas injeções e coletas automatizadas do extrato da mistura da casca da uva, jaboticaba e jaboticaba da praia. O sistema cromatográfico foi conectado à um coletor automático de frações (Fraction Collector III, Waters®). As condições do coletor de frações foram otimizadas de maneira que próximo ao tempo de retenção de cada antocianina o coletor de frações iniciasse a operação no modo *window*. Neste modo, quando o sinal está acima do nível estabelecido (*peak level*), o coletor realiza a coleta. Estabeleceu-se o nível ideal para coleta em 20 %, visando evitar a coleta na área de cauda do pico cromatográfico, onde a concentração do analito é baixa e há possibilidade de contaminação. Além disso, para evitar a contaminação cruzada das substâncias coletadas o coletor de frações foi programado para realizar a lavagem entre uma coleta e outra, através da coleta de fase móvel em regiões do cromatograma onde foi verificada ausência de picos cromatográficos.

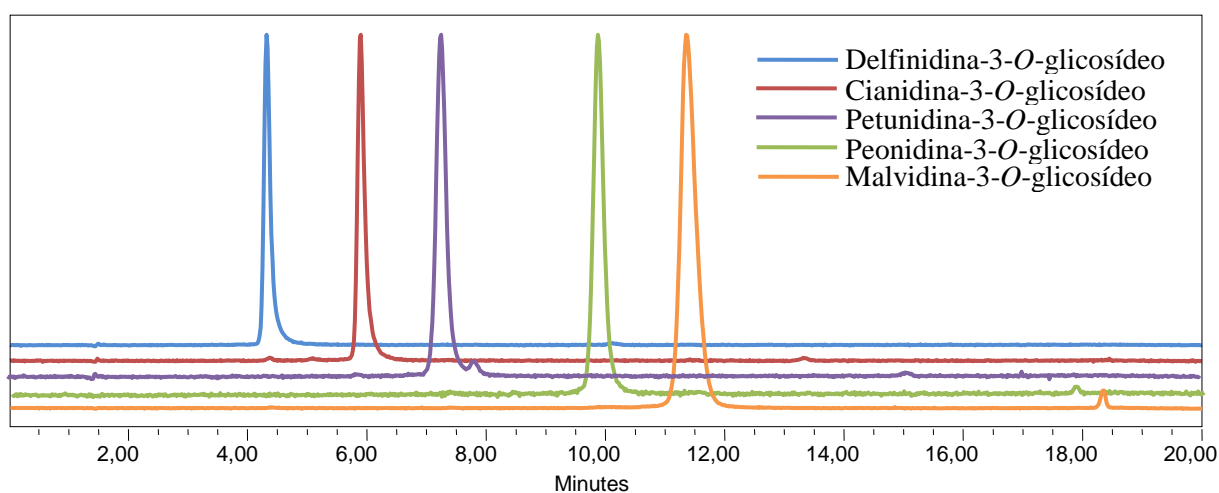
Após a separação e coleta as antocianinas isoladas foram obtidas diluídas na fase móvel utilizada para separação. Para viabilizar a utilização como padrão analítico foi necessário concentrar estas soluções. A concentração das antocianinas foi realizada por extração em fase sólida, conforme descrito no item 4.5.4.1. Este método foi selecionado por ser simples, rápido e não utilizar aquecimento, diminuindo a possibilidade de degradação das antocianinas isoladas. Devido a coloração das antocianinas é possível visualizar a saturação do cartucho (Figura 32), minimizando eventuais perdas das substâncias isolada.





**Figura 32.** Cartucho de fase reversa (C<sub>18</sub>) saturado com Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**)

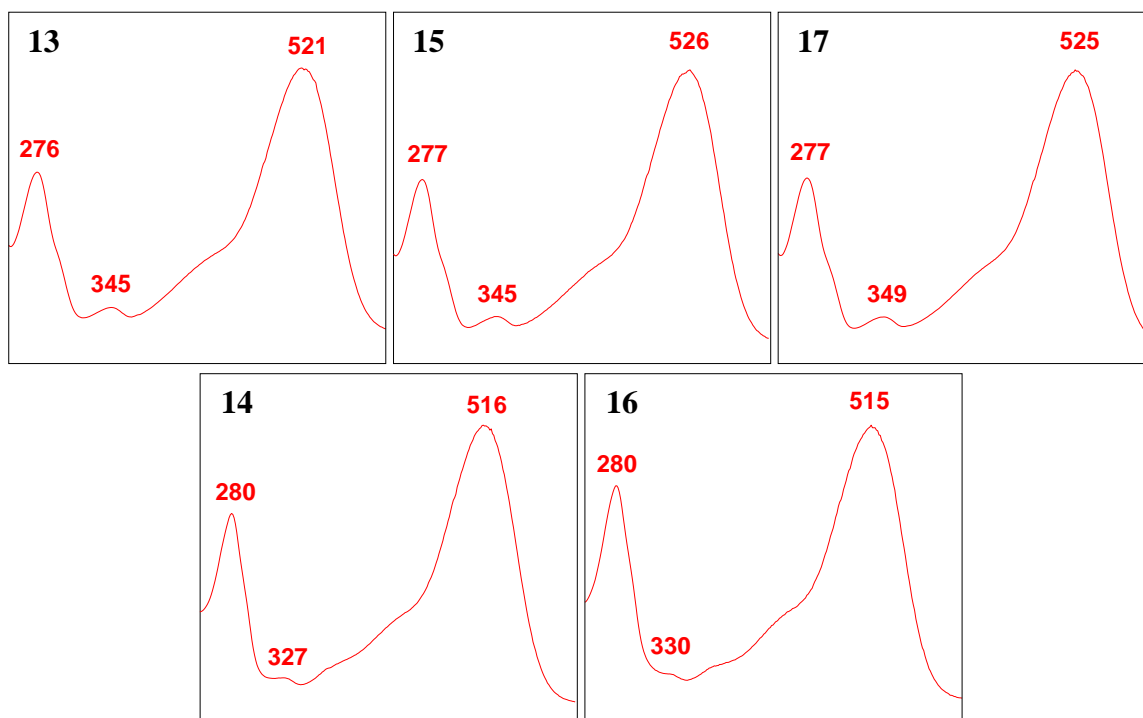
Foram isoladas as antocianinas Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**13**,  $T_R=4,37$ ), Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**,  $T_R=5,93$ ), Petunidina-3-*O*-glicosídeo (**15**,  $T_R=7,38$ ), Peonidina-3-*O*-glicosídeo (**16**,  $T_R=9,89$ ) e Malvidina-3-*O*-glicosídeo (**17**,  $T_R=11,50$ ) com grau de pureza avaliado na região do visível através do  $\lambda_{m\acute{a}x}=520\text{nm}$ , obtendo-se como resultados 99%, 99%, 98%, 99% e 98%, respectivamente. A Figura 34 apresenta o cromatograma das antocianinas isoladas.



**Figura 33.** Cromatograma das antocianinas isoladas ( $\lambda=520\text{nm}$ )

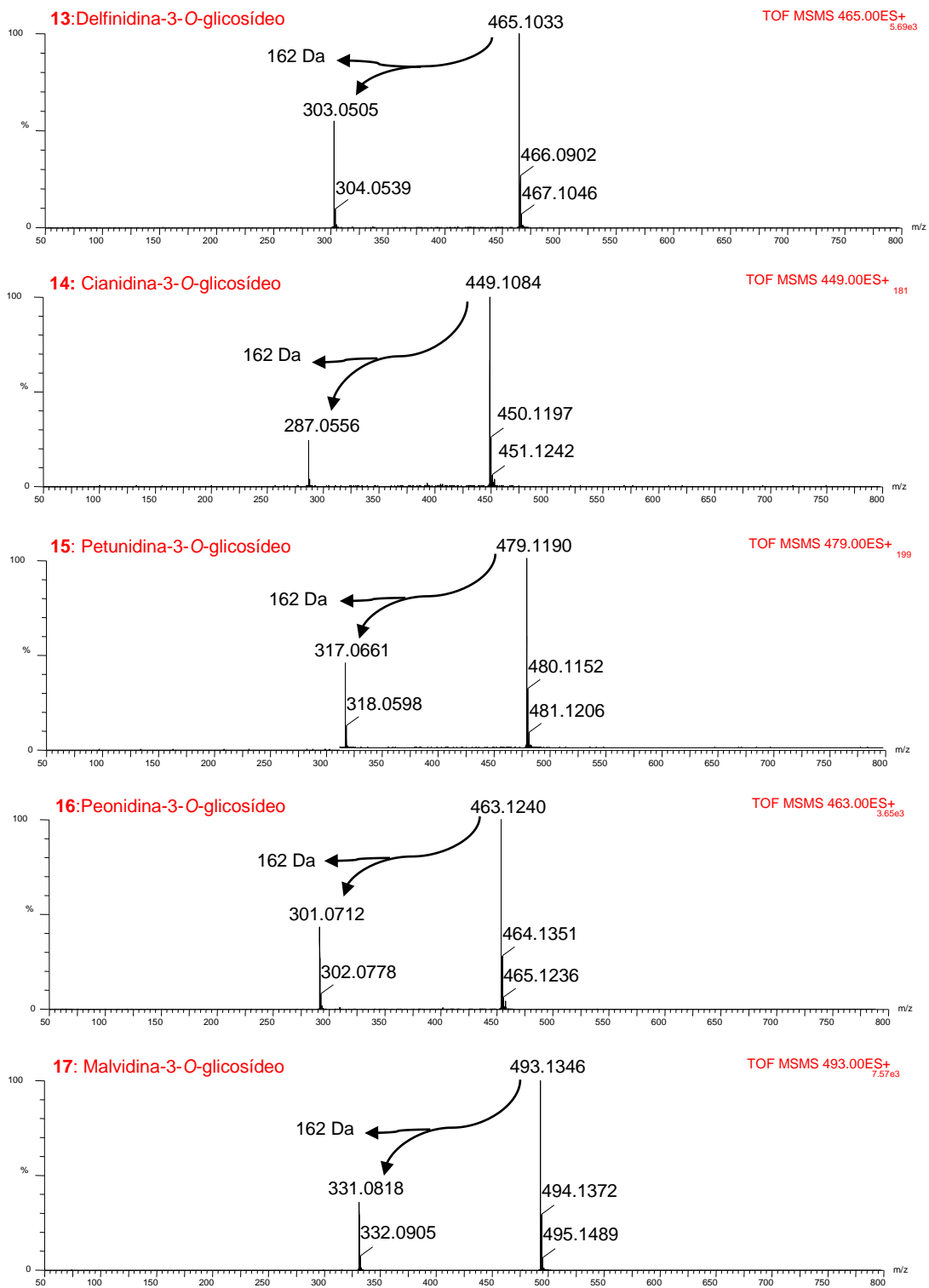
Consumiu-se 15 h para o isolamento, gastou-se 81 mL de acetonitrina e 819 mL de água. Estas quantidades foram suficientes para construir as curvas analíticas usadas na quantificação das antocianinas de *M. multiflora*.

A Figura 34 revela os espectros de UV-Vis das antocianinas obtidos por CLAE-DAD.



**Figura 34.** Espectros de de UV-Vis das antocianinas isoladas

Os espectros de massa foram obtidos por infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução (Q-TOF Synapt, Waters®) com ionização por eletronspray (ESI). A Figura 35 apresenta os espectros de massa das antocianinas isoladas.



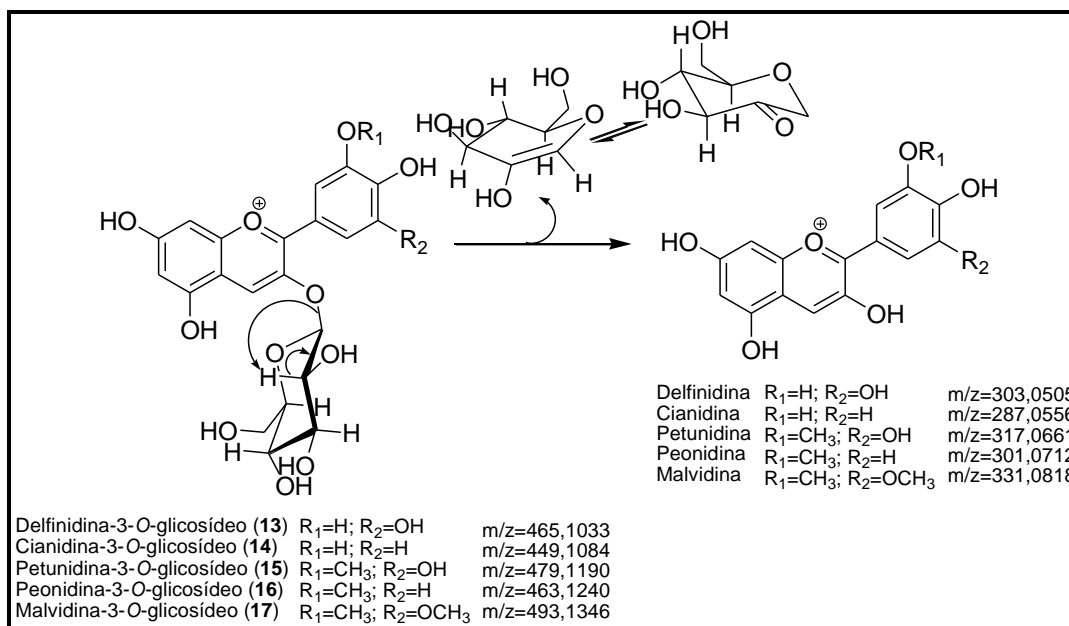
**Figura 35.** Espectro de massa modo MS/MS das antocianinas isoladas

A substância **13** foi identificada como Delfinidina-3-*O*-glicosídeo, que revelou no espectro de UV-Vis absorção no  $\lambda_{\text{máx}}$  521 nm, indicando a presença do cromóforo da aglicona Delfinidina e no espectro de massas o íon molecular ( $[M]^+$ ) em  $m/z=465,1033$ , acompanhado do pico em  $m/z=303,0505$  correspondente ao fragmento gerado pela eliminação de molécula de 162 Da ( $[C_6H_{12}O_5]$ ), em concordância com a presença da glicose e da aglicona Delfinidina.

A substância **14** foi identificada como Cianidina-3-*O*-glicosídeo. No espectro de UV-Vis observou-se a absorção no  $\lambda_{\text{máx}}$  516 nm, indicando a presença do cromóforo da aglicona Cianidina, evidenciando o efeito batocrômico da hidroxilação na posição C-5' do esqueleto antocianínico, com o  $\Delta=5$  nm no comprimento de onda máximo de absorção quando comparado com o da Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**13**). O espectro de massa da Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**) apresentou  $m/z=449,1084$  para o íon molecular ( $[M]^+$ ), que se fragmentou gerando íon de  $m/z=287,0556$ , confirmando a presença da aglicona Cianidina. A perda observada da massa de 162 Da indicou também a ligação desta aglicona a um carboidrato de fórmula  $[C_6H_{12}O_5]$ , pelo tempo de retenção da substância compatível com a glicose.

O mesmo procedimento foi utilizado para a identificação da substância **15** como Petunidina-3-*O*-glicosídeo,  $\lambda_{\text{máx}}$  526 nm (cromóforo da Petunidina),  $m/z$  479,1190 ( $[M]^+$ ) e  $m/z$  317,0661 (aglicona da Petunidina,  $[M]^+ - [C_6H_{12}O_5] = [M]^+ - \text{unidade glicose}$ ), a **16** como Peonidina-3-*O*-glicosídeo,  $\lambda_{\text{máx}}=515$  nm (cromóforo da Peonidina),  $m/z=463,1240$  ( $[M]^+$ ) e  $m/z=301,0712$  (aglicona Peonidina,  $[M]^+ - [C_6H_{12}O_5] = [M]^+ - \text{unidade glicose}$ ) e a **17** como Malvidina-3-*O*-glicosídeo,  $\lambda_{\text{máx}}$  525 nm (cromóforo da Malvidina),  $m/z=493,1346$  ( $[M]^+$ ) e  $m/z=331,0818$  (aglicona Malvidina,  $[M]^+ - [C_6H_{12}O_5] = [M]^+ - \text{unidade glicose}$ ).

A Figura 36 apresenta as propostas de fragmentação resumidas das antocianinas isoladas.



**Figura 36.** Propostas de fragmentação das antocianinas isoladas

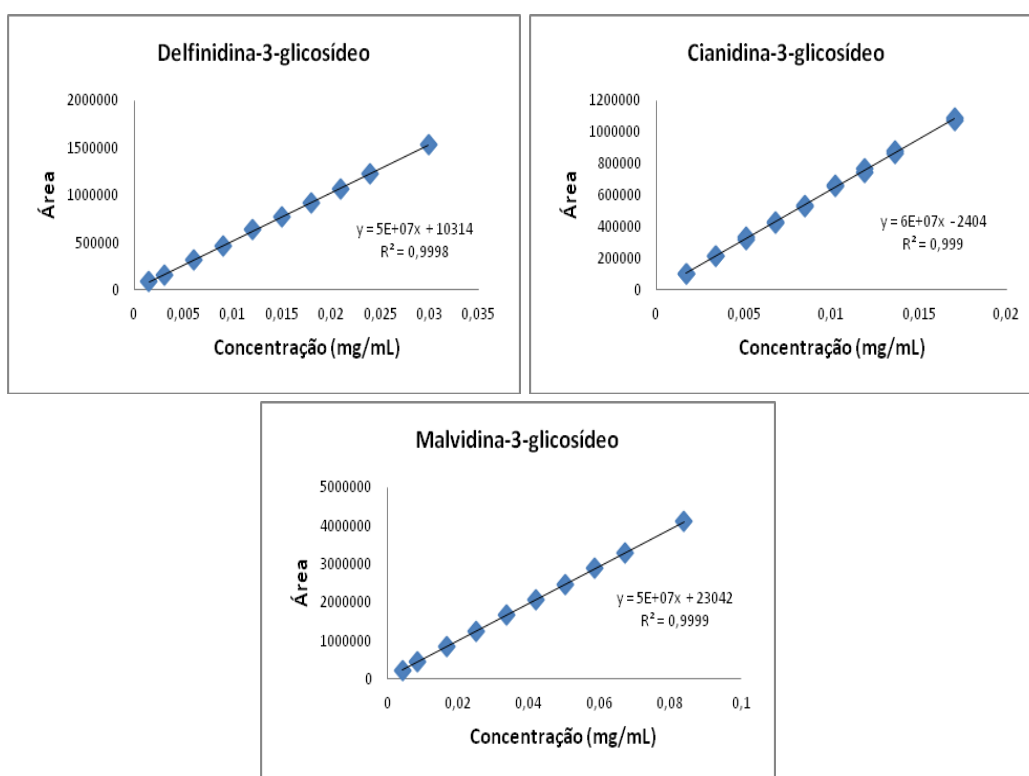
### 5.1.3.2. Quantificação dos padrões isolados e preparo das curvas analíticas de antocianinas

A principal dificuldade na quantificação das antocianinas isoladas está relacionada à obtenção das substâncias em quantidade suficiente para permitir uma pesagem confiável e isentas de impurezas (GIUSTI *et al.* 1999). Vizando o minimizar o erro oriundo da pesagem, as antocianinas isoladas foram quantificadas através da lei de Lambert-Beer (Equação 7, item 4.5.4.3). Realizou-se a leitura da absorvância das soluções em espectrofotômetro e utilizou-se coeficiente de absorvidade molar, comprimento de onda e solvente apropriados conforme descritos na literatura (Tabela 6, item 4.5.4.3). A Tabela 16 sumariza os resultados obtidos para quantificação dos padrões, tais como: a absorvância lida em espectrofotômetro e a concentração da solução mãe (Equação 7) para as soluções de antocianina.

**Tabela 16.** Absorvância da solução de antocianina isolada (ABS) e concentração calculada da solução mãe

Antocianina	ABS	Concentração da solução mãe (mg/mL)
Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,373	0,0299
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,130	0,0170
Petunidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,232	0,0430
Peonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,141	0,0289
Malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	0,512	0,0856

Foram preparadas curvas analíticas individuais para cada antocianina, utilizando-se as alíquotas da solução mãe descritas na Tabela 7 (item 4.5.4.3). Cada ponto das curvas analíticas foi preparado em vial do injetor automático e injetado em triplicata. A Figura 37 apresenta a curva analítica para cada antocianina com seus respectivos coeficientes de determinações ( $R^2$ ), sendo que para todas as antocianinas o  $R^2$  revelou-se maior que 0,99, portanto, a curva analítica foi considerada linear na faixa de trabalho utilizada.



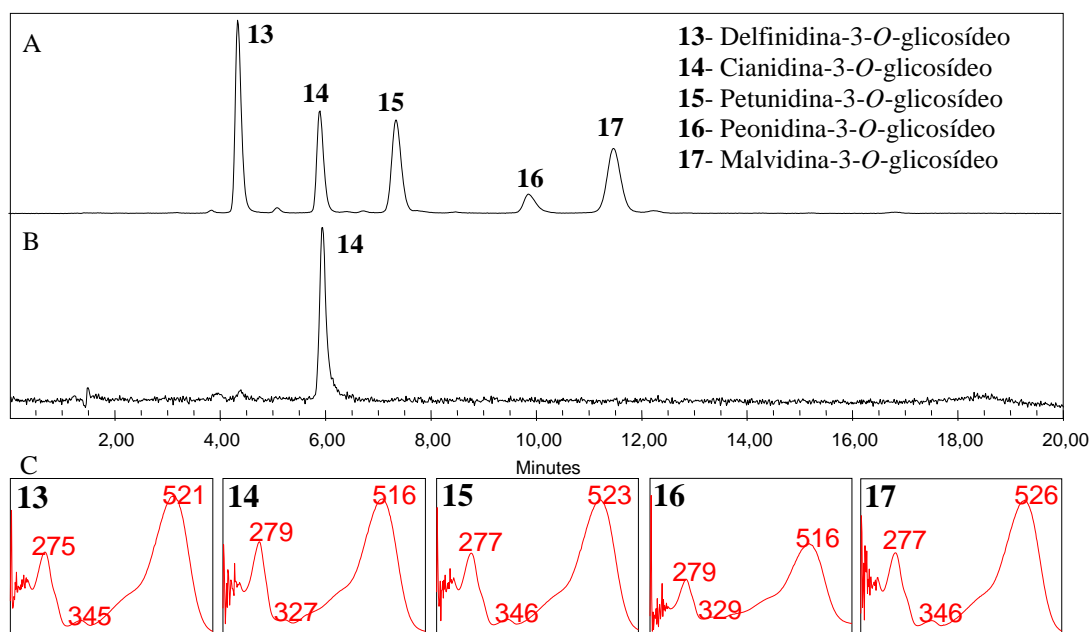
**Figura 37.** Curvas analíticas feitas com as antocianinas isoladas

Os valores do coeficiente de absorvidade molar para a Petunidina-3-*O*-glicosídeo (15) e Peonidina-3-*O*-glicosídeo (16) disponíveis na literatura apresentaram-se significamente

discrepantes, menores em relação aos das demais antocianinas, o que não é justificável, pois o cromóforo destas moléculas são similares, o solvente e o comprimento de onda de leitura não se alteram significativamente. Conforme apontado por Sigurdson *et al.* (2019), a presença de impurezas, tais como sais, ácidos ou outros compostos incolores podem contribuir para uma superestimação da quantidade de pigmento e, conseqüentemente, uma subestimação do coeficiente de absorvidade molar dos pigmentos. Portanto, optou-se por calcular os teores de Petunidina-3-*O*-glicosídeo (**15**) e Peonidina-3-*O*-glicosídeo (**16**) por equivalência à Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**13**) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**), respectivamente. Tal escolha baseou-se na similaridade estrutural do cromóforo e massa aproximada. A diferença da Petunidina-3-*O*-glicosídeo (**15**) e Peonidina-3-*O*-glicosídeo (**16**) para a Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**13**) e Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**), respectivamente, é a metilação da hidroxila da posição C-3' do anel B da antocianina, o que não interfere significativamente no cromóforo e incrementa a massa em apenas 14 Da.

### 5.1.3.3. Quantificação das antocianinas nos frutos de *M. multiflora*

Foram identificadas cinco antocianinas nos frutos de *M. multiflora* F032A e apenas uma antocianina nos frutos de *M. multiflora* F032B. A Figura 38 apresenta o cromatograma do extrato de antocianinas e os respectivos espectros de UV-Vis das antocianinas identificadas.



**Figura 38.** Cromatograma do extrato de antocianinas dos frutos de *M. multiflora* F032A (A) e F032B (B) e espectros de UV-Vis (C) ( $\lambda=520$  nm)

A Tabela 17 apresenta os teores de antocianinas dos frutos de *M. multiflora* F032A e F032B em base seca.

**Tabela 17.** Teores de antocianinas dos frutos de *M. multiflora* F032A e F032B em base seca

Antocianina	F032A (mg/100g)	F032B (mg/100g)
Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	78,5 ± 7,4	-
Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	135,8 ± 14,8	153,1 ± 6,7
Petunidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	124,5 <sup>(1)</sup> ± 8,9	-
Peonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	80,0 <sup>(2)</sup> ± 13,1	-
Malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	374,3 ± 14,4	-
Antocianinas Totais	793,1 ± 44,8	153,1 ± 6,7

<sup>(1)</sup> Calculado por equivalência à Delfinidina-3-*O*-glicosídeo

<sup>(2)</sup> Calculado por equivalência à Cianidina-3-*O*-glicosídeo

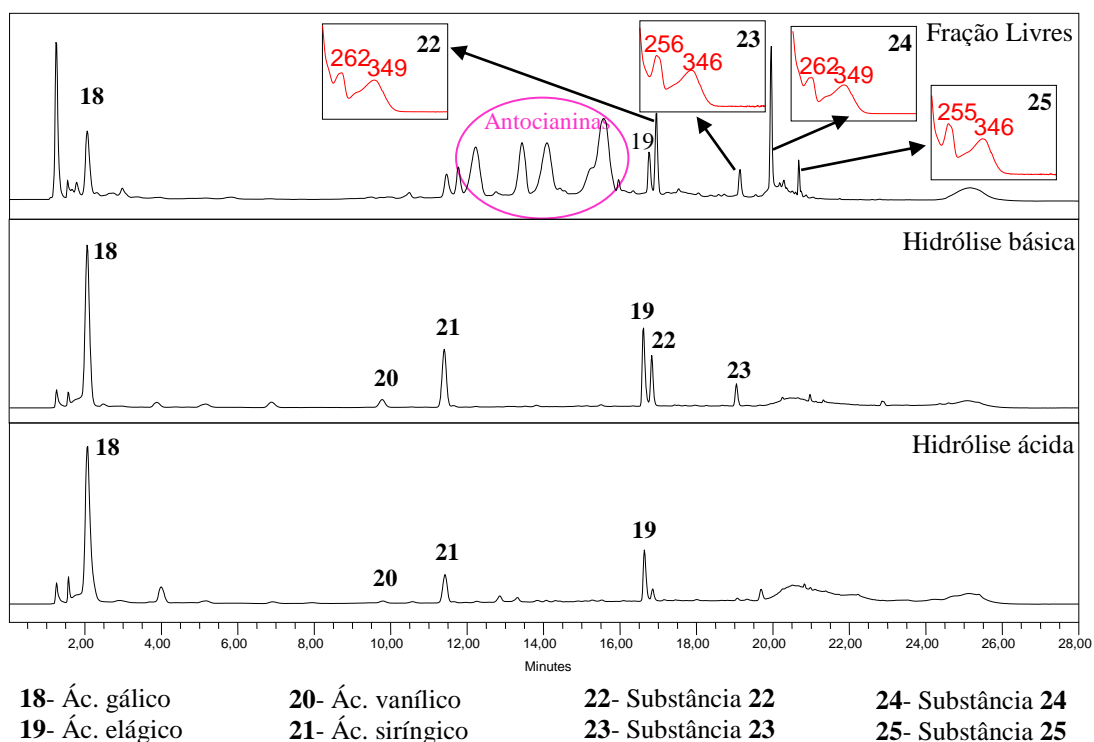
#### 5.1.4. Análise de ácidos fenólicos

Os compostos fenólicos ocorrem principalmente como conjugados solúveis e insolúveis, ligados covalentemente a açúcares ou componentes estruturais da parede celular. Tal ligação pode ocorrer via ligação éter do grupo hidroxila presente no anel aromático com ligninas ou via ligação éster do grupo carboxila com açúcares ou proteínas (ACOSTA-ESTRADA *et al.*, 2014). Dito isto, a análise de ácidos fenólicos foi realizada em três etapas. A primeira foi a extração dos ácidos fenólicos livres, em seguida a etapa de hidrólise básica, liberando os ácidos fenólicos ligados através de ligação éster com a matriz, tornando-os assim extraíveis. E posteriormente, a etapa de hidrólise ácida, desta vez para liberar os ácidos fenólicos ligados por ligação éter com a matriz. A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada por comparação do tempo de retenção e espectro de UV-Vis de padrões comerciais. As Figuras 39, 40, 41 e 42 apresentam os cromatogramas das três frações de ácidos fenólicos para a polpa+casca e a semente de *M. multiflora* F032A e F032B.

Na Figura 39, além dos ácidos fenólicos identificados por comparação com padrões comerciais, pode-se observar a presença de quatro substâncias não identificadas (Substâncias **22**, **23**, **24** e **25**) revelando espectros de UV-Vis compatíveis com flavonoides, podendo se tratar de flavonóis ou flavonas, já que apresentam duas bandas com poucas diferenças de intensidade nas regiões características destas classes, a banda I entre 300-390 nm e a banda II entre 240-280 nm.

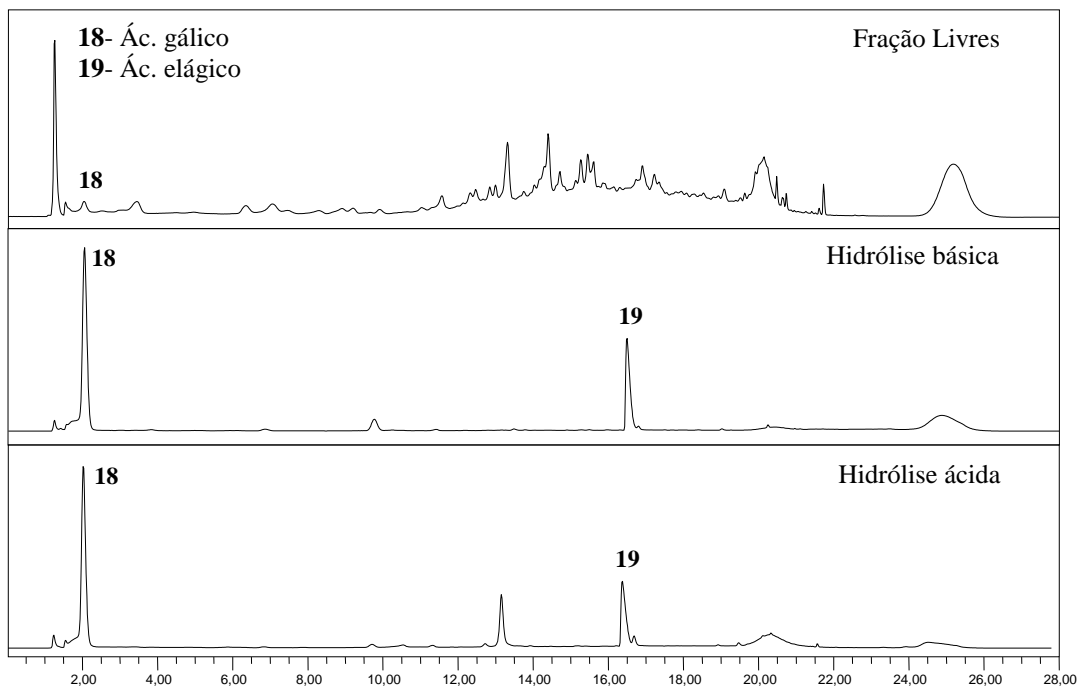


Cabe também destacar o comportamento destas substâncias durante as hidrólises. No cromatograma da fração obtida por hidrólise básica observou-se a ausência das substâncias **24** e **25**, sugerindo que tais produtos sofreram hidrólise e possuem ligação do tipo éster em sua estrutura. No cromatograma da fração obtida por hidrólise ácida observou-se a ausência das substâncias **22** e **23**, sugerindo que sofreram hidrólise e permitindo postular que tais substâncias possuem ligação do tipo éter em sua estrutura. As substâncias **22**, **23**, **24** e **25** serão abordadas com maior detalhamento no item 5.1.6.



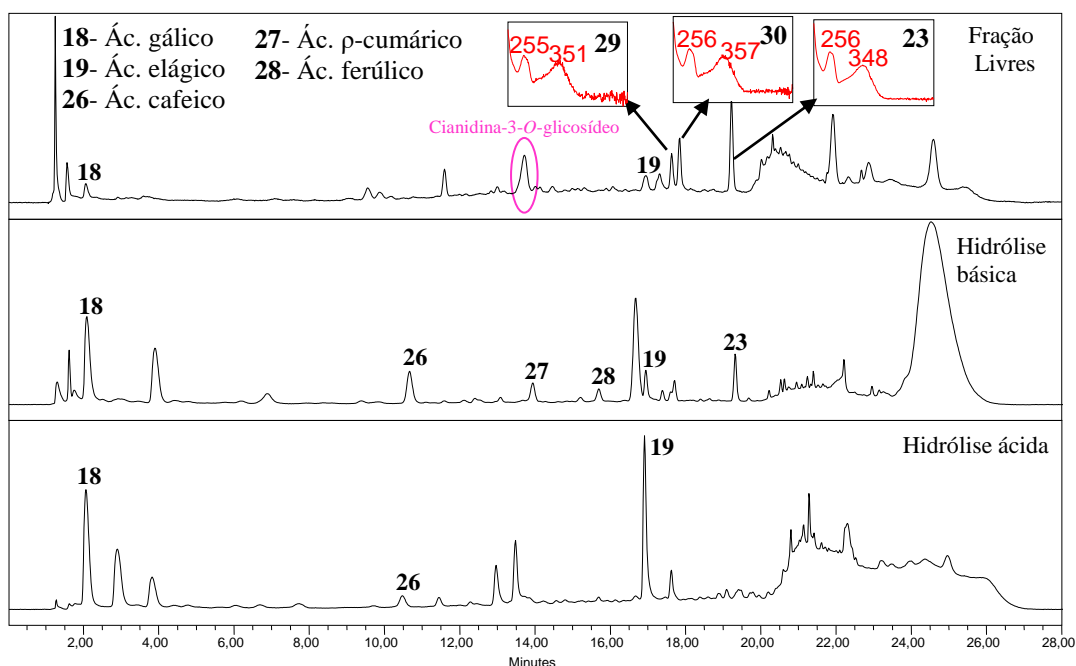
**Figura 39.** Cromatograma dos ácidos fenólicos da polpa+casca de *M. multiflora* F032A ( $\lambda=270$  nm)

Nos cromatogramas de ácidos fenólicos da amostra F032A semente (Figura 40) foi identificada a presença do Ácido Gálico em baixa concentração na fração de ácidos fenólicos livres. Nas frações hidrolisadas foram identificados os Ácidos Gálico e Elágico.



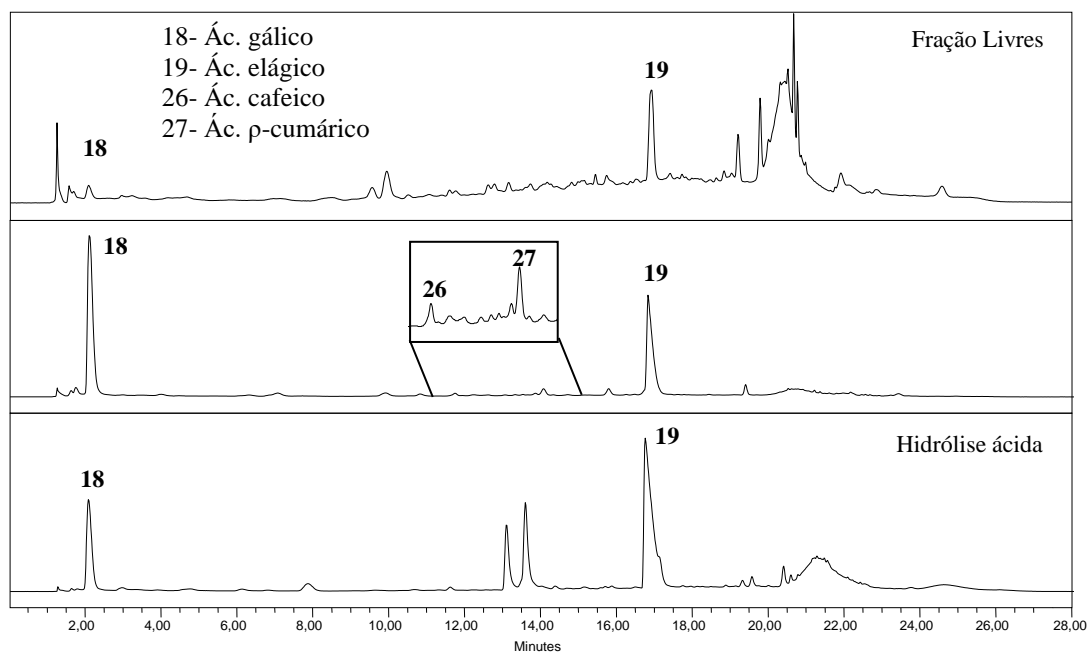
**Figura 40.** Cromatograma dos ácidos fenólicos da semente de *M. multiflora* F032A ( $\lambda=270$  nm)

No cromatograma da polpa+casca da amostra F032B (Figura 41) também foi possível identificar a presença de flavonóides (Substâncias **24**, **29** e **30**). Por comparação com o tempo de retenção, espectro de ultravioleta e comportamento frente às hidrólises básica e ácida é possível propor que a substância com tempo de retenção  $T_R=19,0$  minutos da fração livre da amostra F032B polpa+casca se trata da substância **23**, que aparece na fração livre da amostra F032A polpa+casca (Figura 39). A substância **23** será abordada com maior detalhamento no item 5.1.6. As substâncias **29** e **30** não foram identificadas.



**Figura 41.** Cromatograma dos ácidos fenólicos da polpa+casca de *M. multiflora* F032B ( $\lambda=270$  nm)

O perfil de ácidos fenólicos amostra F032B semente (Figura 42) foi similar ao perfil encontrado para amostra F032A semente, sendo ambas constituídas principalmente pelos Ácidos Gálico e Elágico. No entanto, apenas na amostra F032B semente o Ácido Elágico foi detectado também na sua forma livre.



**Figura 42.** Cromatograma dos ácidos fenólicos semente de *M. multiflora* F032B ( $\lambda=270$  nm)

As Tabelas 18 e 19 apresentam os teores de ácidos fenólicos livres e totais na polpa+casca e semente de *M. multiflora* F032A e B.

**Tabela 18.** Teor de ácidos fenólicos na polpa+casca de *M. multiflora* F032A e F032B

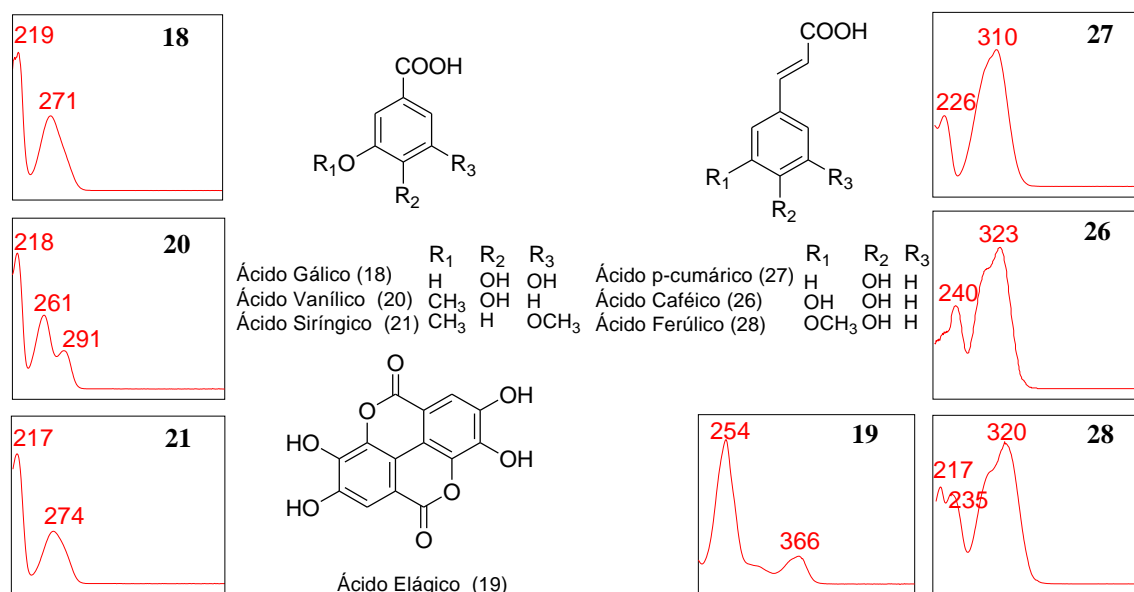
Ácidos Fenólicos	Polpa+casca			
	F032A (µg/g)		F032B (µg/g)	
	Livres	Totais	Livres	Totais
Ác. Gálico (18)	425±56	1263±116	30±6	247±4
Ác. Elágico (19)	47±7	153±19	17±1	68±2
Ác. Caféico (26)	-	-	-	142±7
Ác. p-cumárico (27)	-	-	-	32±2
Ác. Ferúlico (28)	-	-	-	38±4
Ác. Vanílico (20)	-	64±19	-	-
Ác. Siríngico (21)	-	597±113	-	-

**Tabela 19.** Teor de ácidos fenólicos na semente de *M. multiflora* F032A e F032B

Ácidos Fenólicos	Semente			
	F032A (µg/g)		F032B (µg/g)	
	Livres	Totais	Livres	Totais
Ác. Gálico (18)	98±5	6069±590	48±7	6235±301
Ác. Elágico (19)	-	2432±350	132±5	2630±209
Ác. Caféico (26)	-	-	-	66±7
Ác. p-cumárico (27)	-	-	-	100±9

Os ácidos fenólicos encontrados em maior concentração na parte comestível (polpa+casca) dos frutos de *Myrcia multiflora* foram o Ácido Gálico seguido pelo Ácido Siríngico. A parte polpa+casca dos frutos de *M. multiflora* F032A apresentou o Ácido Gálico (1263 µg/g) em concentração similar a encontrada por Nascimento e colaboradores (2017) em *Eugenia brasilienses* (1220 µg/g), espécie também pertencente a família Myrtaceae. Além disso, o teor de Ácido Siríngico (597 µg/g) para a polpa+casca do mesmo fruto foi maior que o encontrado por Braga (2016) para *Eugenia astringens* (280 µg/g).

A Figura 43 apresenta as estruturas dos ácidos fenólicos e seus respectivos espectros de UV identificados nos frutos e sementes de *M. multiflora* F032A e B.

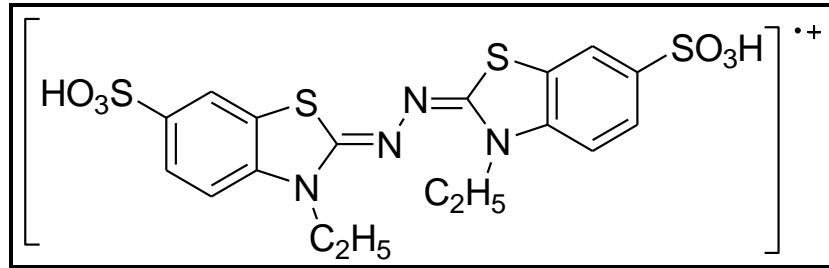


**Figura 43.** Estruturas e espectros UV dos ácidos fenólicos identificados nos frutos de *M. multiflora* F032A e F032B

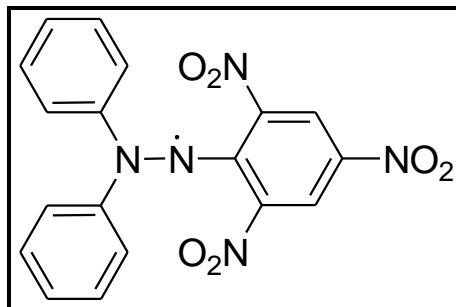
### 5.1.5. Análise da capacidade antioxidante

As diversas metodologias descritas na literatura para a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* dificultam a avaliação e comparação dos resultados. Rufino e colaboradores (2010) analisaram a capacidade antioxidante de 18 frutos tropicais. Para possibilitar a comparação dos resultados com o acervo de 18 frutos analisados pelo grupo optou-se por utilizar as mesmas metodologias empregadas por Rufino e colaboradores (2010) para a avaliação da capacidade antioxidante.

A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada através do método de captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico - ABTS<sup>•+</sup>; Figura 44) e do radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil - DPPH<sup>•+</sup>; Figura 45).

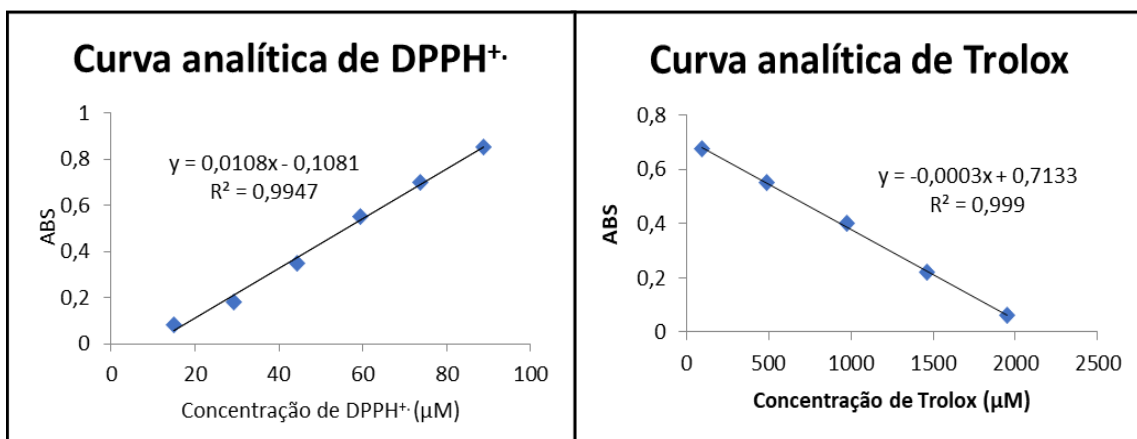


**Figura 44.** Estrutura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>



**Figura 45.** Estrutura do radical livre DPPH<sup>•+</sup>

A Figura 46 apresenta uma das curvas analíticas do DPPH<sup>•+</sup> e do Trolox usadas na determinação da capacidade antioxidante.



**Figura 46.** Curva analítica do DPPH<sup>•+</sup> e do Trolox

A Tabela 20 apresenta a equação das curvas analíticas do trolox, do radical DPPH<sup>+</sup> e das amostras, a absorvância equivalente a 1000 µmol de trolox (ABS<sub>1000</sub>) e o valor correspondente a metade da quantidade inicial do radical DPPH<sup>+</sup> (MQi), obtidos através das equações 11 e 14, respectivamente.

**Tabela 20.** Equação das curvas analíticas de trolox, DPPH<sup>+</sup> e amostras, ABS<sub>1000</sub> e MQi

Radical	Amostra	Equação amostra	Equação trolox / Equação DPPH <sup>+</sup>	ABS <sub>1000</sub> / MQi
ABTS <sup>+</sup>	Polpa+casca F032A	Y=-0,0001X+0,8773 Y=-0,0001X+0,8572 Y=-0,0001X+0,8765	Y=-0,0003X+0,6244	ABS <sub>1000</sub> =0,314
	Semente F032A	Y=-0,0001X+0,6333 Y=-0,0001X+0,6093 Y=-0,0001X+0,5867	Y=-0,0003X+0,6837	ABS <sub>1000</sub> =0,361
ABTS <sup>+</sup>	Polpa+casca F032B	Y=-3.10 <sup>-5</sup> X+0,6660 Y=-2.10 <sup>-5</sup> X+0,6433 Y=-2.10 <sup>-5</sup> X+0,6502	Y=-0,0003X+0,7133	ABS <sub>1000</sub> =0,381
	Semente F032B	Y=-0,0002X+0,6333 Y=-0,0002X+0,6980 Y=-0,0002X+0,6547	Y=-0,0003X+0,7133	ABS <sub>1000</sub> =0,381
DPPH <sup>+</sup>	Polpa+casca F032A	Y=3.10 <sup>-5</sup> X+0,0922 Y=3.10 <sup>-5</sup> X+0,0698 Y=-4.10 <sup>-5</sup> X+0,0035	Y=0,0142X-0,0440	MQi=0,0153 g/L
	Semente F032A	Y=0,0002X+0,0308 Y=0,0003X-0,0397 Y=0,0004X-0,1212	Y=-0,0126X-0,0803	MQi=0,0118 g/L
DPPH <sup>+</sup>	Polpa+casca F032B	Y=2.10 <sup>-5</sup> X+0,1265 Y=2.10 <sup>-5</sup> X+0,063 Y=3.10 <sup>-5</sup> X+0,0457	Y=0,0108X-0,1081	MQi=0,0194 g/L
	Semente F032B	Y=-0,0002X+0,5517 Y=-0,0002X+0,5958 Y=-0,0002X+0,5278	Y=0,0108X-0,1081	MQi=0,0194 g/L

Para obter a concentração da amostra equivalente a 1000 µmol de trolox substituiu-se ABS<sub>1000</sub> na equação da reta da curva analítica da amostra (Equação 12). Através da equação 13 correlacionou-se a quantidade trolox, em µmol, que é equivalente a 1 grama de amostra, fornecendo a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS<sup>+</sup>.

A concentração da amostra necessária para diminuir a absorvância inicial do radical DPPH<sup>+</sup> pela metade foi calculada através da equação 15. A equação 16 correlacionou a quantidade de fruta, em gramas, necessária para reduzir 1 grama de DPPH<sup>+</sup> pela metade, fornecendo a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH<sup>+</sup>.

A Tabela 21 apresenta os valores obtidos das capacidades antioxidantes da semente e da polpa+casca de *M. multiflora* F032A e F032B comparada aos 7 frutos com maior capacidade antioxidante analisados por Rufino *et al.* (2010).

**Tabela 21.** Capacidade antioxidante e desvio padrão da semente e da polpa+casca de *M. multiflora* F032A e B

	Método ABTS <sup>+</sup> Cap. Antioxidante ( $\mu\text{mol}$ de trolox/g) $\pm$ Desvio padrão	Método DPPH <sup>+</sup> Cap. Antioxidante EC <sub>50</sub> (g fruta/g DPPH <sup>+</sup> ) $\pm$ Desvio padrão
Semente F032A	470,80 $\pm$ 11,81	98,84 $\pm$ 5,05
Polpa+casca F032A	113,55 $\pm$ 1,61	829,99 $\pm$ 75,98
Semente F032B	667,02 $\pm$ 27,91	131,66 $\pm$ 2,26
Polpa+casca F032B	77,36 $\pm$ 11,35	841,17 $\pm$ 88,21
Camu-camu*	153,0 $\pm$ 2,6	478 $\pm$ 1,2
Puçá-preto*	125,0 $\pm$ 9,7	414 $\pm$ 14,4
Acerola*	96,6 $\pm$ 6,1	670 $\pm$ 64,5
Juçara*	78,3 $\pm$ 13,3	1711 $\pm$ 46
Murta*	49,1 $\pm$ 0,2	936 $\pm$ 33,3
Puçá-coroa-de-frade*	38,5 $\pm$ 1,2	1272 $\pm$ 51,4
Jaboticaba*	37,5 $\pm$ 1,4	1472 $\pm$ 16,9

\*RUFINO *et al.*, 2010

Para o método DPPH<sup>+</sup> a amostra F032A semente apresentou maior capacidade antioxidante e para o método ABTS<sup>+</sup> a semente F032B apresentou maior capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante da polpa+casca de *M. multiflora* F032A foi maior que da mesma parte de *M. multiflora* F032B. Seus teores de carotenóides, antocianinas e ácidos fenólicos totais também foram maiores, justificando-se com tais metabólitos antioxidantes naturais o resultado revelado.

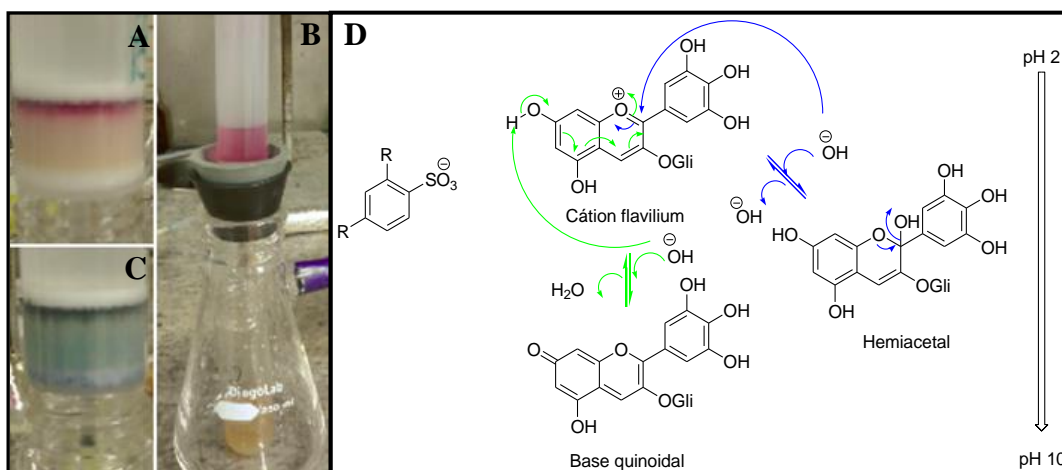
Rufino e colaboradores (2010) analisaram a capacidade antioxidante de 18 frutos nativos não convencionais, sendo eles: camu-camu, puçá preto, acerola, juçara, murta, puçá-coroa-de-frade, jaboticaba, gurguri, jambolão, uvaia, açai, mangaba, caju, carnaúba, cajá, umbu, murici e bacuri. A capacidade antioxidante, medida através do método de captura do radical ABTS<sup>+</sup>, para a polpa+casca F032A foi menor apenas que a capacidade antioxidante do camu-camu (153 $\mu\text{mol}$  de Trolox/g) e puçá preto (125 $\mu\text{mol}$  de Trolox/g). Já para o método do método de captura do radical do DPPH<sup>+</sup>, a capacidade antioxidante da polpa+casca F032A foi menor apenas que a capacidade antioxidante do camu-camu (EC<sub>50</sub> 478g/g DPPH), puçá preto (EC<sub>50</sub> 414g/g DPPH) e acerola (EC<sub>50</sub> 670g/g DPPH).



### 5.1.6. Isolamento de flavonoides para determinação estrutural

No extrato metanólico dos frutos (polpa+casca) de *M. multiflora* F032A foram observadas substâncias que não foram identificadas através da comparação com os padrões disponíveis no laboratório (substâncias **22**, **23**, **24** e **25**). Conforme discutido no item 5.1.4, os espectros de UV-Vis destas substâncias sugeriram classificação como flavonoides (flavona ou flavonol).

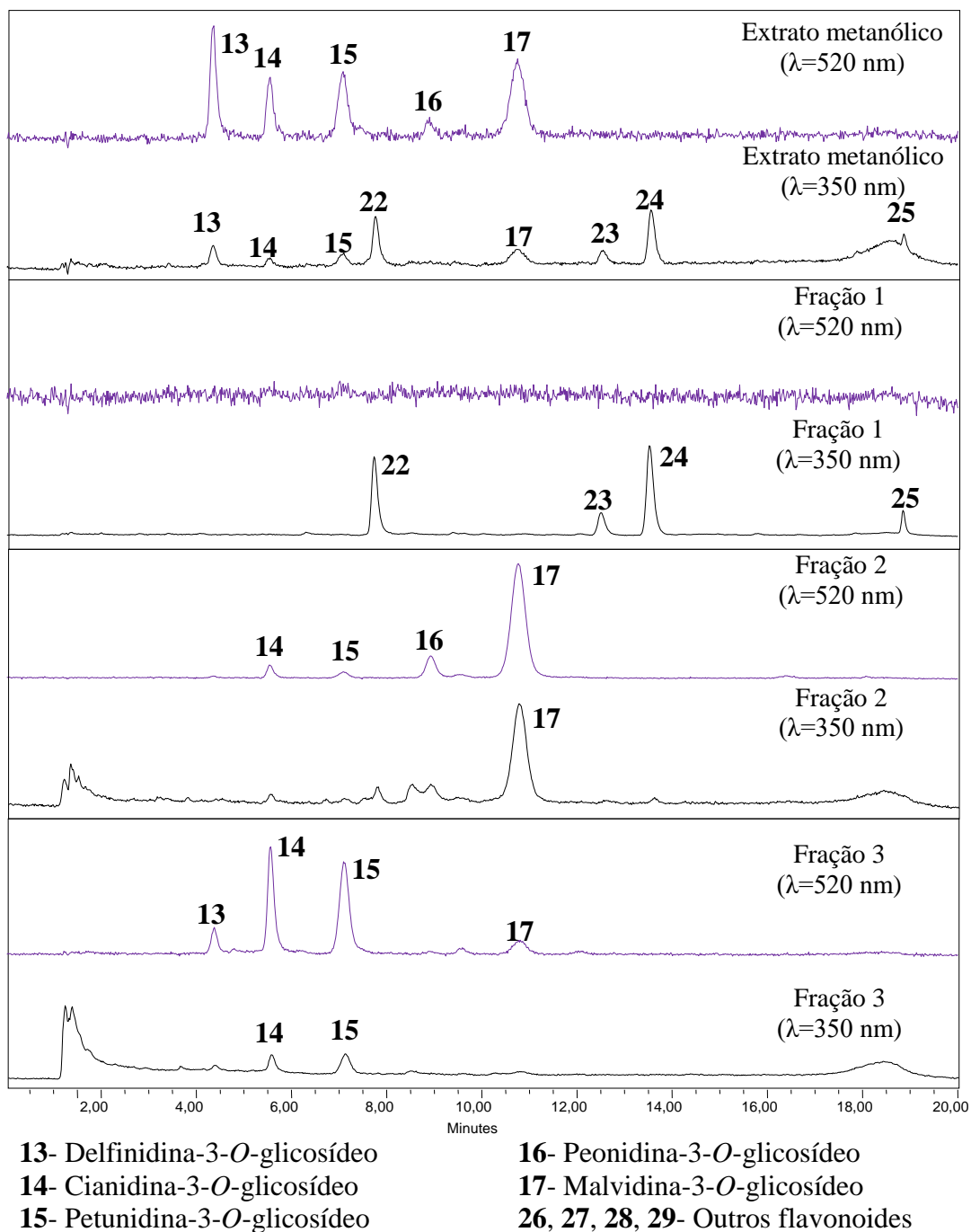
A extração destes flavonoides (substâncias **22**, **23**, **24** e **25**) foi realizada com solução de Ácido Fórmico 10 % em Metanol. O extrato apresentou elevado teor de antocianinas, impondo a adoção de separação dos flavonoides neutros e antocianinas através de fracionamento em cartucho OASIS<sup>®</sup> MCX contendo fase mista, constituída de fase reversa e fase aniônica. A estrutura molecular de uma antocianina é influenciada pelo pH, através do equilíbrio entre cátion flavilium, base quinoidal e hemiacetal. O cátion flavilium destaca-se como mais estável em pH ácido e pela elevada afinidade pela fase aniônica. Por outro lado, o pH básico desloca o equilíbrio e favorece a formação da base quinoidal. Os flavonoides neutros não possuem afinidade acentuada pela fase aniônica em qualquer valor de pH. Esta diferença de afinidade foi utilizada como ferramenta para separação das substâncias. Em pH ácido os flavonoides neutros foram eluídos mantendo as antocianinas no cartucho. Em pH básico as antocianinas foram eluídas (Figura 47) (HE & GIUSTI, 2011).



**Figura 47.** Cartucho com antocianinas retidas em meio ácido (A); eluição dos flavonóides neutros com metanol em meio ácido (B); eluição das antocianinas em meio básico (C); estrutura da fase aniônica e molécula de antocianina em várias condições de pH (D)

(Adaptado de HE & GIUSTI, 2011)

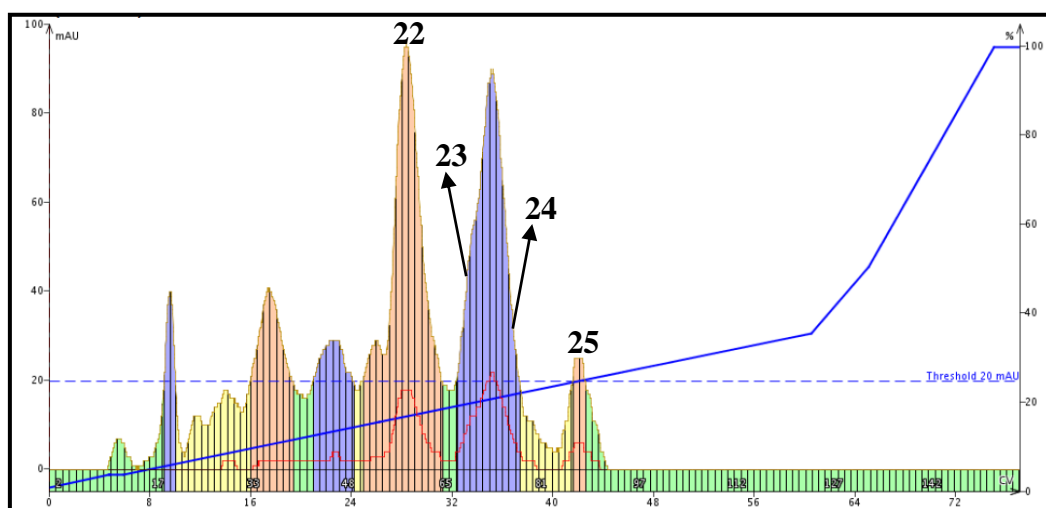
O processo de fracionamento resultou em três frações, **fração 1**: eluída com 0,1% de Ácido Fórmico em Metanol, **fração 2**: eluída com 1% NH<sub>4</sub>OH em Metanol e **fração 3**: eluída com 1% NH<sub>4</sub>OH em Metanol:água (60:40). A Figura 48 apresenta o cromatograma do extrato metanólico e das três frações monitorado à  $\lambda=350$  nm e  $\lambda=520$  nm.



**Figura 48.** Cromatograma do extrato metanólico e das frações 1, 2 e 3 obtidas em cartucho de fase mista. Cromatograma extraído em  $\lambda$  520 nm (linha roxa); cromatograma extraído em  $\lambda$  350 nm (linha preta)

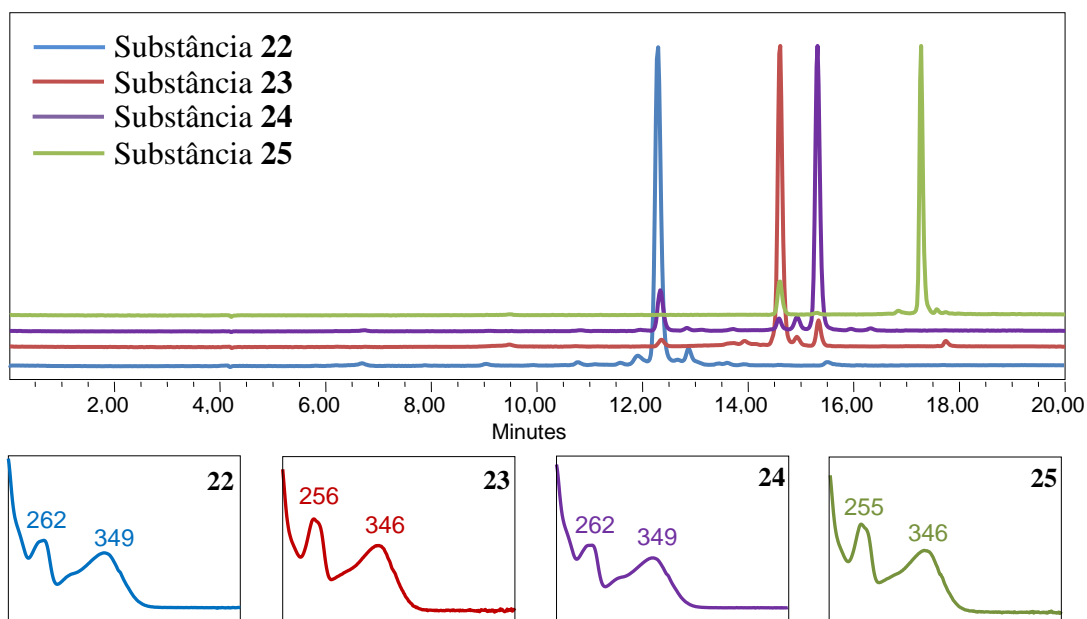
O cromatograma da fração 1 mostrou que o processo de separação enriqueceu esta fração com os flavonoides neutros (substâncias **22**, **23**, **24** e **25**). A fração 2 apresentou-se enriquecida com as antocianinas menos polares [Peonidina-3-*O*-glicosídeo (**16**) e Malvidina-3-*O*-glicosídeo (**17**)], indicando que o mecanismo de separação que prevaleceu nestas condições foi a adsorção, já que em meio básico as antocianinas não estão na forma carregada a fase estacionária funcionou como uma fase normal. A fração 3 (1% NH<sub>4</sub>OH em Metanol:água 60:40) apresentou-se enriquecida com as antocianinas mais polares [Cianidina-3-*O*-glicosídeo (**14**) e Petunidina-3-*O*-glicosídeo (**15**)]. Porém houve uma perda significativa da Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**13**), pois grande parte desta antocianina ficou retida no cartucho.

O processo de fracionamento foi repetido dez vezes e após a secagem obteve-se 20 mg da fração 1. Esta fração foi então submetida a fracionamento em cartucho de fase reversa (C<sub>18</sub>, Biotage KP-C<sub>18</sub>-HS, 50µm, 30g) e fase móvel constituída de solução a 1% de Ácido Fórmico em água (A) e Acetonitrila (B), utilizando um sistema de isolamento cromatográfico acelerado com coletor automático de frações (Isolera Four ACI™, Biotage). A Figura 49 apresenta o cromatograma da fração 1 no referido sistema.



**Figura 49.** Cromatograma da coleta da fração 1 em sistema de isolamento cromatográfico acelerado

O fracionamento resultou em 156 frações. Após a análise das frações por CLAE-DAD, as frações 55-62, 68-71, 74-79 e 85-91 foram reunidas e secas em liofilizador, fornecendo as substâncias **22** (4,1mg), **23** (3mg), **24** (2mg) e **25** (1mg), respectivamente (Figura 50).



**Figura 50.** Cromatograma das substâncias **22**, **23**, **24** e **25** isoladas

#### 5.1.6.1. Caracterização estrutural dos flavonoides isolados

A substância **22** foi submetida à análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni- (1D) e bi-dimensinal (2D). No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 51) foi possível observar os sinais dupletos (com valor de  $J=1,9$  Hz indicando interação *meta*) em  $\delta_{\text{H}}$  6,4 ppm e 6,2 ppm (H-8/H-6) representantes do sistema AB do anel A, sugerindo a presença de substituintes em C-5 e C-7. Ainda em consonância com esqueleto flavonoídico, observou-se um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,0 ppm com integração para dois hidrogênios, sugerindo um sistema AA no anel B, indicando a presença de substituintes nos carbonos C-3', C-4' e C-5'. O padrão de substituição dos anéis B e A do esqueleto flavonoídico foi confirmado através da interpretação dos dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (Figura 52). Para o anel B o deslocamento químico de  $\delta_{\text{C}}$  108,13 ppm foi atribuído aos carbonos metínicos CH-2' e CH-6' e o deslocamento químico de  $\delta_{\text{C}}$  145,45 ppm aos carbonos quaternários C-3' e C-5'. Para o anel A os deslocamentos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  98,42 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  93,29 ppm foram atribuídos aos carbonos metínicos CH-6 e CH-8, respectivamente. Os carbonos quaternários C-7 e C-9 apresentaram o deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  164,56 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  157,11 ppm, respectivamente. Os sinais dos carbonos C-3, C-4, C-5 e C-10 não foram detectados, atribui-se tal fato a pouca quantidade da substância isolada.

A presença da unidade *O*-ramnosila na **Miricitrina (22)** foi reconhecida pelo sinal simpleto largo representante do átomo de hidrogênio ligado ao carbono anomérico CH-1''

( $\delta_H$  5,30 ppm), um duplete em  $\delta_H$  0,98 ppm ( $J=6,31$  Hz) com integração para três hidrogênios e os demais sinais entre  $\delta_H$  3,5-4,2 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-2'', H-3'', H-4'' e H-5'' (Tabela 18). No espectro de RMN  $^{13}C$ -DEPTQ foram identificados os sinais em  $\delta_C$  102,20 ppm e  $\delta_C$  16,27 ppm atribuídos ao carbono anomérico CH-1'' e ao carbono metílico CH-6'', respectivamente. As correlações heteronucleares através de uma ligação ( $^1J_{C-H}$ ) destes carbonos com os respectivos hidrogênios foram confirmadas através da interpretação do espectro de RMN HSQC (Apêndice 2). As informações descritas nos levaram a concluir que o flavonol isolado se trata da **Miricitrina (5,7,3',4',5'-pentahidroxiavona-3-O-ramnosídeo)**. A Tabela 22 sumariza os dados espectrais de RMN da **Miricitrina (22)**, assim como as correlações observadas no espectro de RMN 2D HSQC.

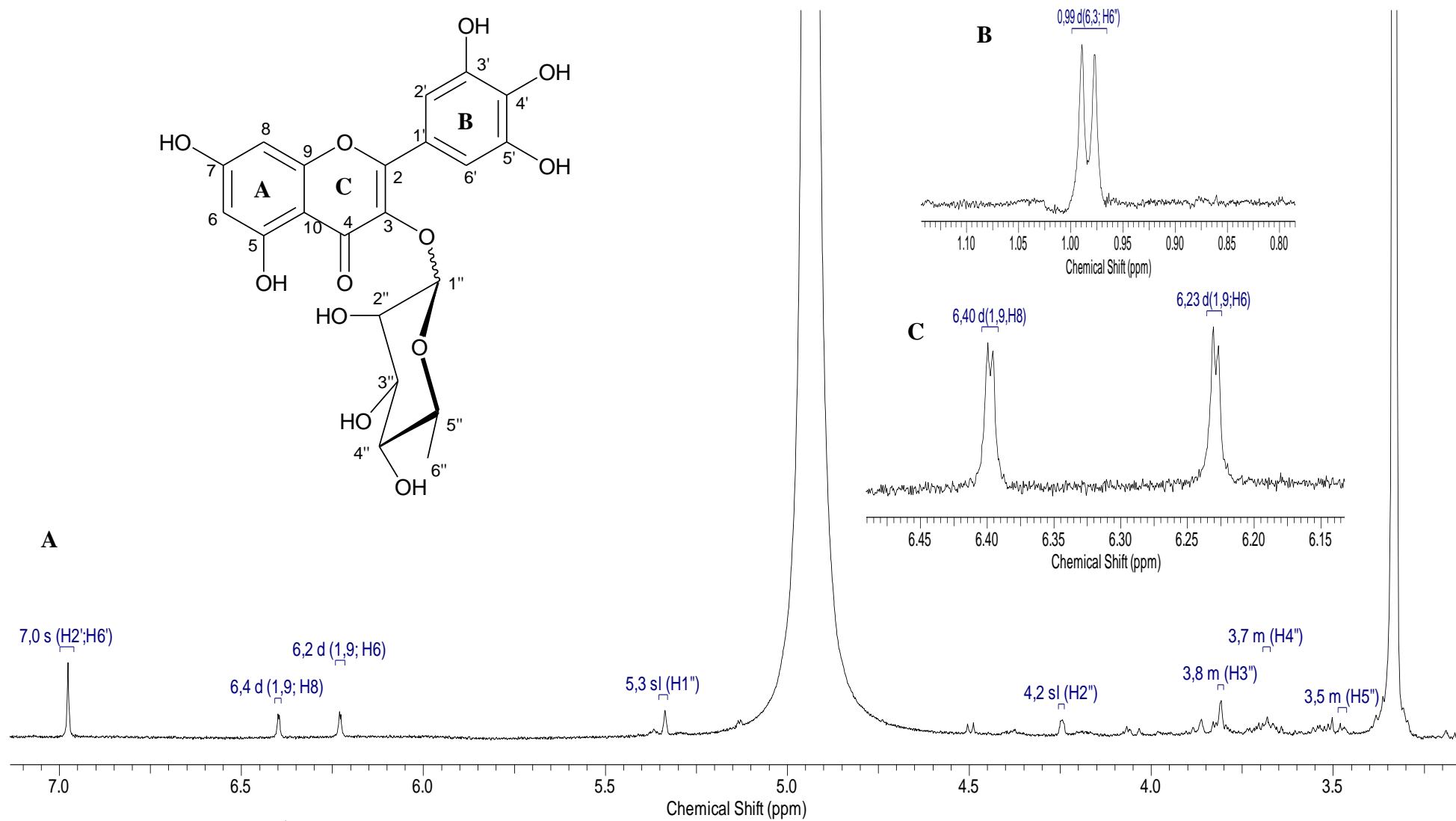
**Tabela 22.** Dados espectrais de RMN  $^1H$  (500 MHz) e  $^{13}C$  (125 MHz) da **Miricitrina (22)** isolada, inclusive informações do HSQC. Deslocamentos químicos de hidrogênios em  $\delta_H$  (ppm) e carbono-13 em  $\delta_C$  (ppm). Constante acoplamento ( $J$ ) em Hz (entre parênteses) e comparação com dados encontrados na literatura

	HSQC		Literatura [1]	
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
<b>C</b>				
2	158,08 <sup>[2]</sup>	-	159,5	-
3	ND	-	136,4	-
4	ND	-	179,7	-
5	ND	-	163,3	-
6	98,42	6,2 (d, 1,9)	99,8	6,16 (d, 2,0)
7	164,56	-	165,9	-
8	93,29	6,4 (d, 1,9)	94,7	6,37 (d, 2,0)
9	157,11	-	158,6	-
10	ND	-	105,9	-
1'	122,61	-	122,0	-
2'/6'	108,13	7,0 (s)	109,6	6,97 (s)
3'/5'	145,45	-	146,9	-
4'	136,44 <sup>[2]</sup>	-	137,9	-
1''	102,20	5,3 (sl)	103,7	5,23 (d, 1,1)
2''	71,56	4,2 (sl)	72,1	4,22 (d, 2,7)
3''	71,91	3,8 (m)	72,2	3,80-3,71 (m)
4''	73,44	3,7 (m)	73,4	3,80-3,71 (m)
5''	70,64	3,5 (dd, 9,1; 6,3)	71,9	3,32-3,20 (m)
6''	16,27	1,0 (d, 6,3)	17,7	0,85 (d, 7,4)

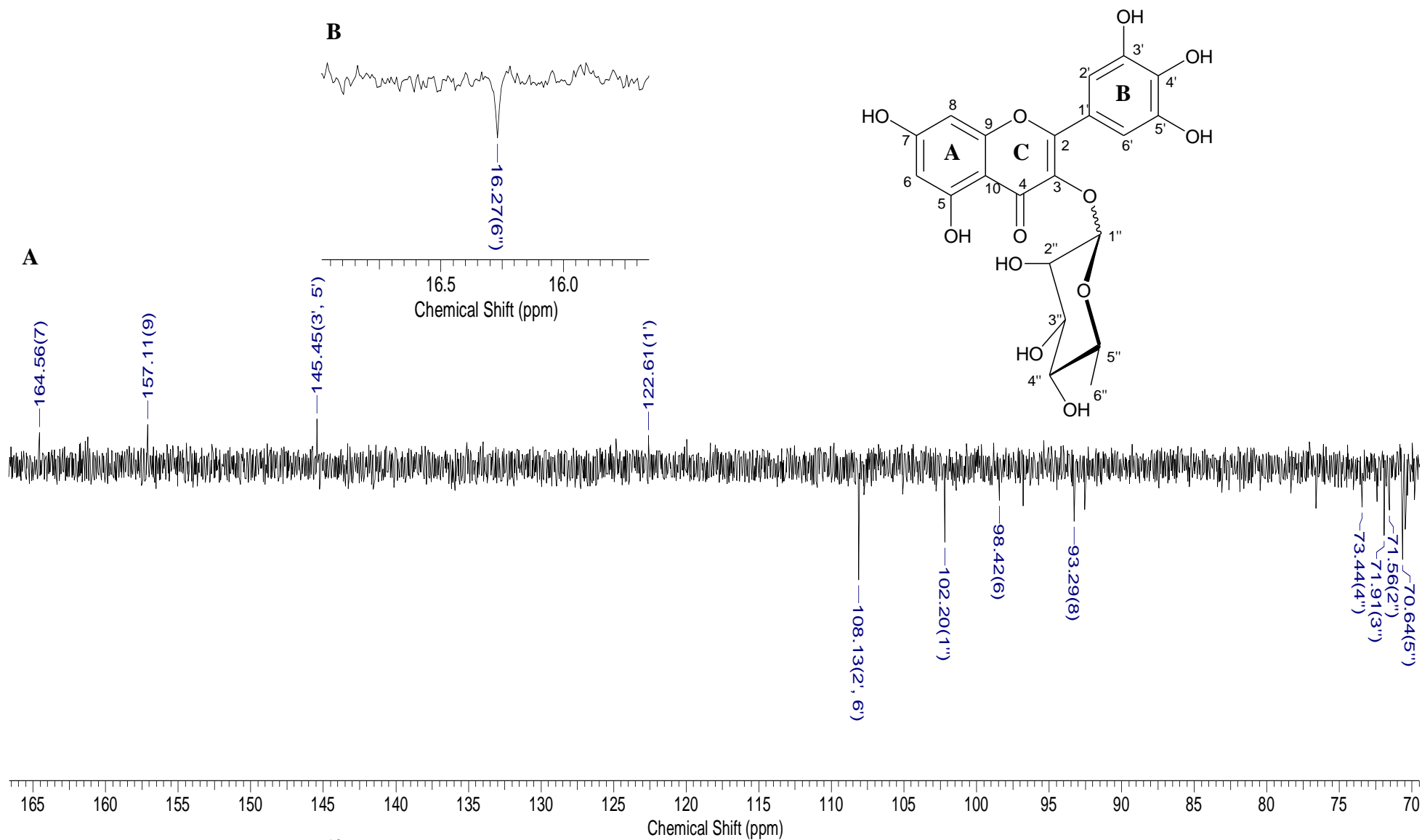
\*Espectros de RMN-DEPTQ foram usados para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de  $J$  foram deduzidos dos espectros 1D de RMN  $^1H$  e os espectros 2D homonuclear  $^1H$ - $^1H$ -COSY e heteronuclear via ligação  $^1H$ - $^{13}C$ -COSY- $^1J_{CH}$  (HSQC) colaboraram nas atribuições dos  $\delta_H$  e  $\delta_C$ .

ND= Não detectado devido à pequena quantidade de amostra isolada e do tempo usado no experimento

[1] Dados obtidos na literatura (DAVID *et al.*, 1996); [2] Detectado apenas no espectro de HMBC.



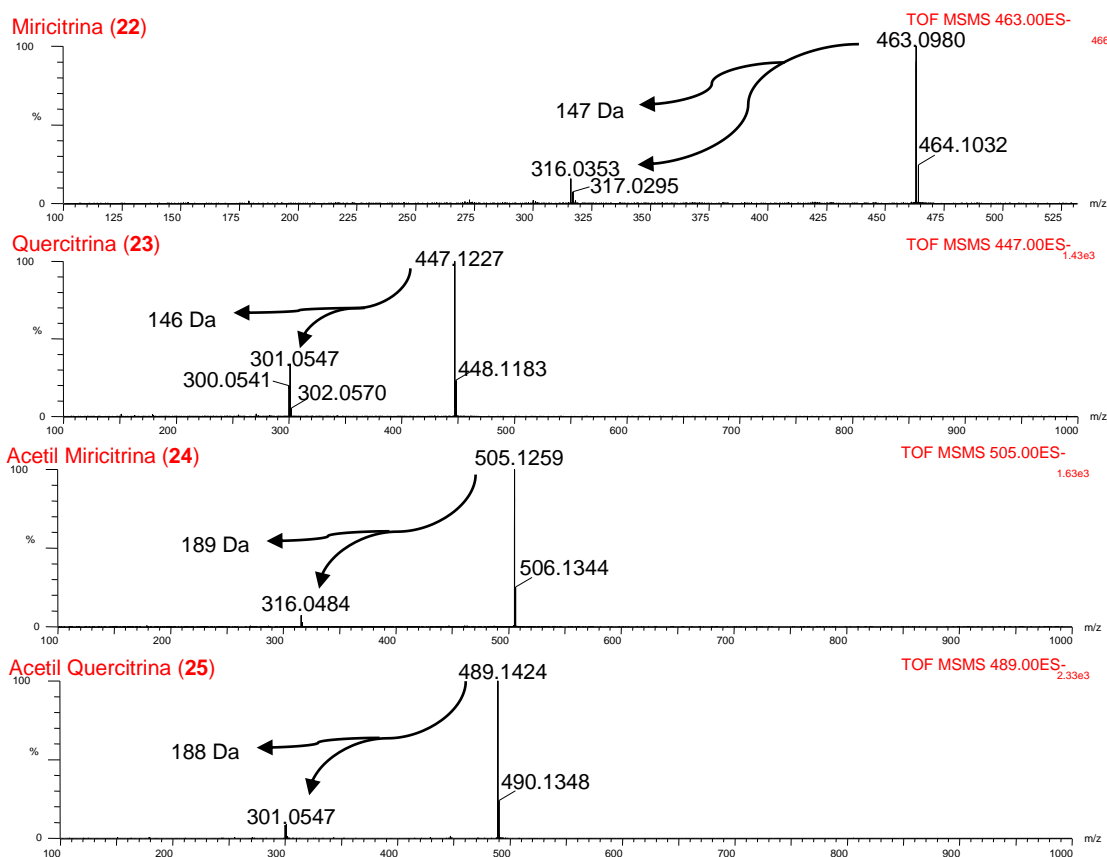
**Figura 51.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da **Miricitrina (22)** isolada (A) e expansões das regiões δH 0,8 à 1,10 (B) e δH 6,15 à 6,45 (C).



**Figura 52.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPTQ (125 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da **miricitrina (22)** isolada (A) e expansão da região  $\delta$ C 15,5 à 17,5 (B)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  2D de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Apêndice 1) da **Miricitrina (22)** revelou acoplamento entre os hidrogênios da unidade ramnosídica (H-1'' e H-2''; H-2'' e H-3''; H-3'' e H-4''; H-4'' e H-5''; H-5'' e H-6'') facilitando a atribuição dos respectivos hidrogênios. O acoplamento revelando a interação dos átomos de hidrogênio H-6 e H-8 do esqueleto flavonoídico revelou-se em concordância com espectro de RMN  $^1\text{H}$  através da constante de acoplamento  $J=1,9$  Hz. A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos e metílico foi confirmada pela correlação heteronuclear via uma ligação ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY- $^1J_{\text{CH}}$ ) revelada pelo espectro de RMN 2D HSQC (Apêndice 2). Para a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários ( $\delta_{\text{C}}$ ) usou-se o espectro RMN 2D HMBC revelando a correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY- $nJ_{\text{CH}}$ ,  $n=2$  e  $n=3$ ) (Apêndice 3). Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C-2 e C-4' (Tabela 22) foram deduzidos apenas pelo espectro RMN 2D HMBC, contribuindo para a confirmação da estrutura da **Miricitrina** proposta.

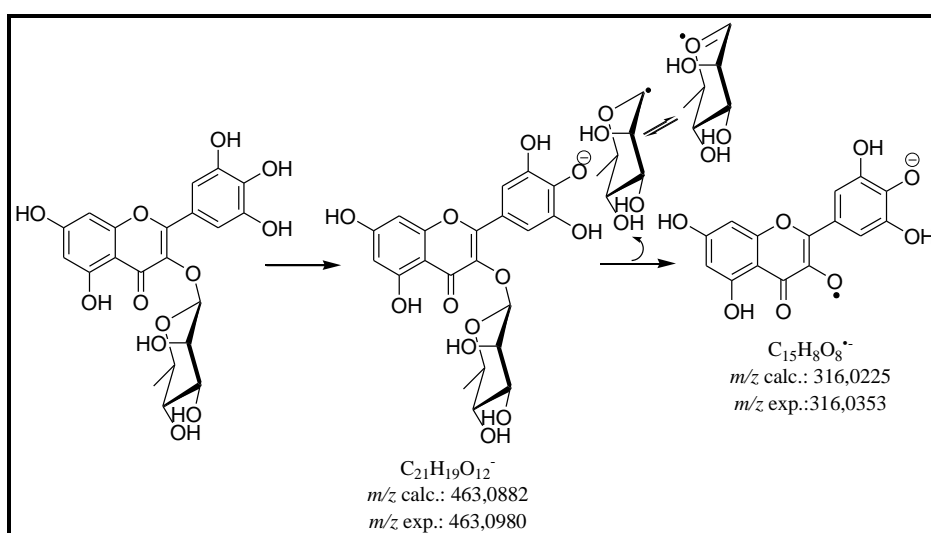
O espectro de massas (Figura 53, modo negativo) da substância **22** confirmou a estrutura proposta (**Miricitrina**). A Figura 53 apresenta também os espectros de massas (modo negativo) dos outros flavonoides isolados.



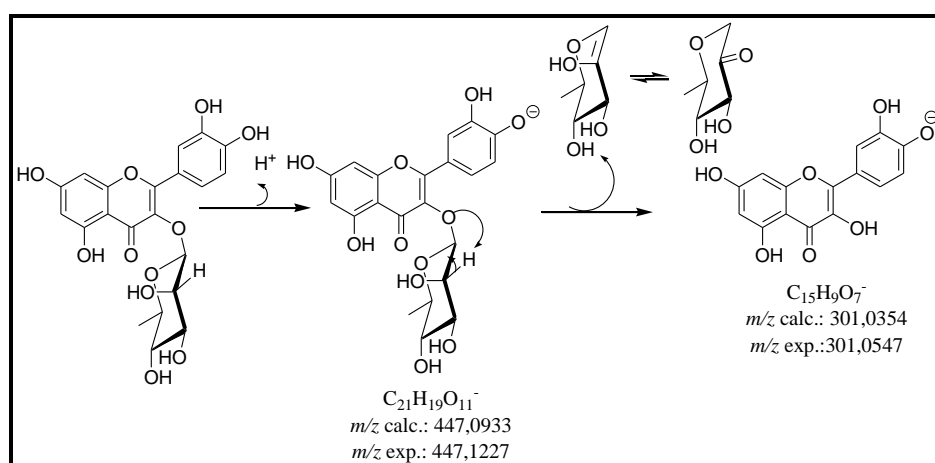
**Figura 53.** Espectros de massas dos flavonoides isolados



O mecanismo proposto para a formação do fragmento correspondente ao pico mais intenso ( $m/z=316,0353$ , pico base) do espectro de massas da **Miricitrina (22)** envolveu a formação de um ânion radical, enquanto que o análogo referente ao observado no espectro de massas da **Quercitrina (23)** ( $m/z=301,0547$ , pico base), envolveu o rearranjo de um hidrogênio culminando na formação de um ânion. Assim, as fragmentações propostas para justificar os principais picos observados nos espectros de massas das substâncias **22** e **23** corroboram com dados da literatura (SUN *et al.*, 2014; GENG *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2017) para **Miricitrina (5,7,3',4',5'-pentahidroxi flavonol-3-O-ramnosídeo)** e **Quercitrina (5,7,3',4'-tetrahidroxi flavonol-3-O-ramnosídeo)**, respectivamente. As Figuras 54 e 55 apresentam resumos das propostas de fragmentação para estas substâncias.



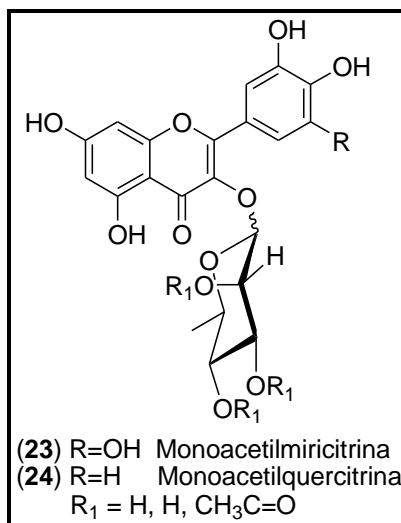
**Figura 54.** Proposta de fragmentação da **Miricitrina (22)**



**Figura 55.** Proposta de fragmentação da **Quercitrina (23)**

O espectro de massas da substância **24** indica que esta possui o mesmo núcleo básico que a **Miricitrina (22)**, uma vez a fragmentação de ambas forneceram o mesmo fragmento de  $m/z$  316. A comparação dos espectros de UV-Vis corrobora com tal afirmação, pois as duas substâncias apresentaram as bandas de absorção na mesma região do espectral ( $\lambda_{\text{máx}}=262$  nm e 349 nm; Figura 50), indicando que possuem o mesmo cromóforo.

A aplicação do mesmo procedimento para as substâncias **23** e **25** apresentaram a mesma relação através do pico em  $m/z$  301 e as bandas de absorção dos espectros de UV-Vis em  $\lambda_{\text{máx}}=255$  nm e 356 nm (Figura 50). Os espectros de massas das substâncias **24** e **25** revelaram o acréscimo de 42 Da do íon molecular em relação aos espectros de massa das substâncias **22** (**Miricitrina**) e **23** (**Quercitrina**), sugerindo a presença de unidade acetila ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ) e, conseqüentemente, como derivados acetilados destes flavonoides. Na fragmentação proposta para as substâncias **22** e **23**, foi observada a perda de massa de 147 Da ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4$ ) e 146 Da ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ ), respectivamente, sugerindo que tais flavonoides sustentam uma unidade de ramnose. Na análise dos picos e a correspondente proposta de fragmentação para as substâncias **24** e **25** observou-se a diferença de massa de 189 Da e 188 Da, respectivamente, sugerindo a presença de grupo acetil na unidade ramnose (Figura 56). As substâncias **24** e **25** não foram isoladas em pureza e quantidade suficientes para obtenção dos espectros de RMN, impedindo a possibilidade localizar a posição exata do grupo acetil.



**Figura 56.** Proposta para os derivados acetilados da **Miricitrina** e **Quercitrina**

Há relatos na literatura da produção dos flavonóis Miricitrina e Quercitrina nas folhas de *Myrcia multiflora* e *Myrcia palustris* (YOSHIKAWA *et al.*, 1998; WUBSHET *et al.*, 2015) e de Quercitrina nas folhas de *Myrcia rubella* (LIMA *et al.*, 2018).

## 5.2. *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltdl.

### 5.2.1. Preparação dos extratos de *P. leiocarpa*

A polpa e a casca dos frutos de *P. leiocarpa* foram congelados e liofilizados, obtendo-se um pó de coloração azul intensa (Figura 57).

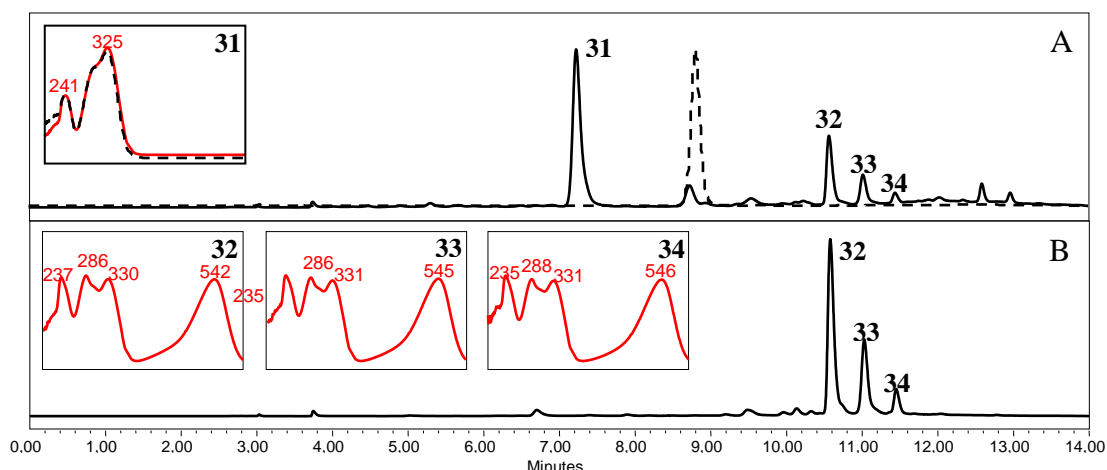


**Figura 57.** Pó obtido a partir da liofilização e moagem dos frutos de *P. leiocarpa*

A partir do pó de *P. leiocarpa* foi realizada extração com Hexano, Acetato de Etila e 1% de Ácido Fórmico em Metanol, em ordem crescente de polaridade e assistida por ultrassom. Este método foi selecionado devido ao pouco tempo de extração e baixo consumo de solventes (GRAJEDA-IGLESIAS, 2016). O extrato obtido com o solvente 1% de Ácido Fórmico em Metanol apresentou o maior rendimento (1360 mg, 5,7 %), sendo assim foi selecionado também para extração líquido-líquido com Clorofórmio e água. Esta etapa foi realizada para separar as substâncias polares, que puderam ser separadas em uma coluna de fase reversa, das substâncias lipofílicas, que foram separadas em uma coluna de fase normal.

## 5.2.2. Análise preliminar da fase aquosa

O perfil de fase aquosa foi pré-analisado por CLAE-DAD através da varredura em  $\lambda_{\text{máx}}=200$  a 600 nm. Os picos cromatográficos apresentaram seus máximos de absorção em  $\lambda_{\text{máx}}=320$  nm e a  $\lambda_{\text{máx}}=540$  nm (Figura 58). A análise preliminar do espectro de UV-Vis indicou a presença de um ácido fenólico (**31**) e três antocianinas aciladas (substâncias **32**, **33** e **34**).



**Figura 58.** Cromatograma da fração aquosa de *P. leiocarpa* (linha sólida); cromatograma do padrão de ácido cafeico (linha tracejada) a  $\lambda_{\text{máx}}=320$  nm (A) e cromatograma da fração aquosa de *P. leiocarpa* a  $\lambda_{\text{máx}}=540$  nm (B)

As substâncias **32**, **33** e **34** apresentaram espectro na região de UV-Vis característico para antocianinas com acilação aromática (GIUSTI *et al.*, 1999), com máximo de absorção em  $\lambda_{\text{máx}}=542$  nm e em  $\lambda_{\text{máx}}=310-330$  nm. Em fase reversa as antocianinas glicosiladas simples mais comumente encontradas em frutos podem ser eluídas com baixa concentração de solvente orgânico em água acidificada (vide itens 4.5.3.2 e 5.1.3). Para a eluição das antocianinas do extrato de *P. leiocarpa* foi necessária uma alta concentração de solvente orgânico, evidenciando menor polaridade que antocianinas glicosiladas simples. A diminuição da polaridade pode ser justificada pela ligação de unidades acilas às estruturas.

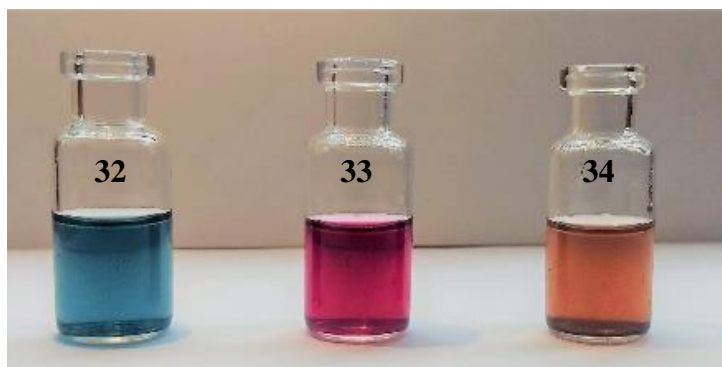
A substância **31** apresentou espectro de UV-Vis similar ao espectro do Ácido Cafeico, no entanto, maior polaridade (tempo de retenção=7,2 minutos), indicando se tratar de um derivado do Ácido Cafeico ligado a radical polar.

### 5.2.3. Isolamento e determinação estrutural das substâncias da fase aquosa

As substâncias da fase aquosa foram submetidas a separação por CLAE em coluna analítica de fase reversa. A adaptação de uma válvula seletora de canais na saída do detector e a realização de injeções e coletas sucessivas de forma automatizada possibilitou o isolamento das substâncias em quantidade suficiente para as análises espectroscópicas e determinação estrutural.

Ao realizar 1028 injeções usando 2210 mL de Acetonitrila, 10126 mL de água e 101 mL de Ácido Fórmico em 10 dias de separação, foram isoladas 4 substâncias em quantidades suficientes para determinação estrutural. A utilização de fase reversa na separação contribuiu para que aproximadamente 81 % do solvente utilizado na separação das substâncias fosse água, o que contribuiu para o baixo consumo de solventes orgânicos.

Para a concentração das soluções das substâncias **32**, **33** e **34** separadas, utilizou-se o cartucho Sep-Pak<sup>®</sup> com fase reversa (C<sub>18</sub>), eluição em Metanol e posterior secagem em fluxo de ar comprimido. Esta metodologia de concentração e secagem foi selecionada, porque é simples, rápida e não emprega aquecimento, evitando-se a possibilidade de degradação das substâncias isoladas. A Figura 59 apresenta as substâncias **32**, **33** e **34** isoladas dissolvidas em metanol. A substância **31** foi seca em evaporador rotatório. Sua característica incolor dificultou o emprego da metodologia com cartucho Sep-Pak<sup>®</sup>, já que não é possível visualizar a saturação do cartucho.



**Figura 59.** Substâncias **32**, **33** e **34** isoladas

### 5.2.3.1. Ácido Clorogênico

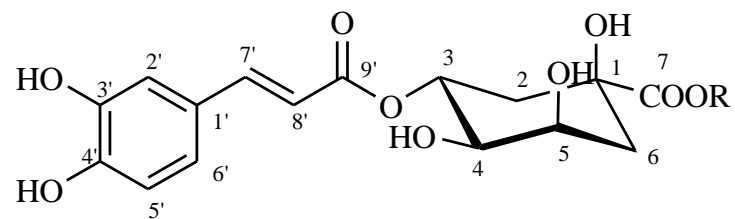
A substância **31** apresentou um espectro de UV-Vis característico do Ácido Cafeico, sendo que sua menor retenção na coluna cromatográfica (fase reversa) indicou maior polaridade em relação ao Ácido Cafeico (Figura 58). Tais informações sugeriram a substância **31** como um derivado do Ácido Cafeico sustentando substituinte para lhe conferir maior polaridade. Isolou-se 6 mg da substância **31**, que foi identificada como **Ácido Clorogênico** através da interpretação dos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bi-dimensionais, UV-Vis e de massas, envolvendo comparação com dados descritos na literatura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  7,60 ppm (H-8'/H-7') acoplando entre si com uma constante de  $J=15,8$  Hz, compatíveis com a presença de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado sustentando os átomos de hidrogênio  $\alpha$  ( $\delta_{\text{H}}$  6,30 ppm) e  $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  7,60 ppm) em estereoquímica *trans* (*E*) para atender o  $J=15,8$  Hz. Os correspondentes átomos de carbono olefínicos foram identificados no RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ através de sinais em  $\delta_{\text{C}}$  114,07 ppm (CH-8') e 145,49 ppm (CH-7'), aparecendo o sinal da carbonila de éster  $\alpha, \beta$  insaturada em  $\delta_{\text{C}}$  167,67 ppm.

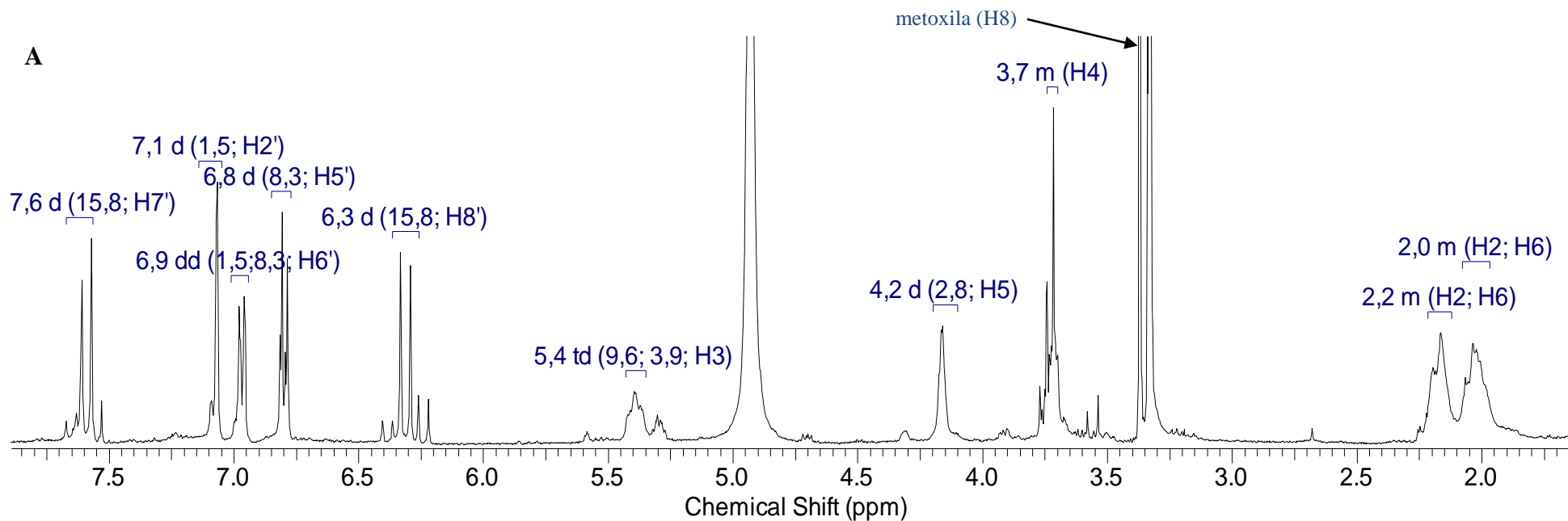
O sistema ABC do anel aromático foi caracterizado através dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,80 ppm (H-5',  $J=8,3$  Hz), 6,90 ppm (H-6',  $J=8,3$  Hz) e 7,10 ppm (H-2',  $J=1,5$  Hz), atribuídos a átomos de hidrogênio mantendo entre si relação vicinal (*orto*-H-5' e H-6') e *meta* (H-2' e H-6').

Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,00-2,20 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-6 da unidade correspondente ao Ácido Quínico. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  37,40 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  38,88 ppm foram atribuídos aos carbonos  $\text{CH}_2$ -2 e  $\text{CH}_2$ -6, respectivamente. Os carbonos metínicos (CH-3, CH-4 e CH-5) do Ácido Quínico foram identificados na região entre  $\delta_{\text{C}}$  71,0-73,3 ppm, e seus respectivos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  5,4 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  3,7 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  4,2 ppm. A carboxila da unidade quínica foi reconhecida através do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  174,05 ppm.

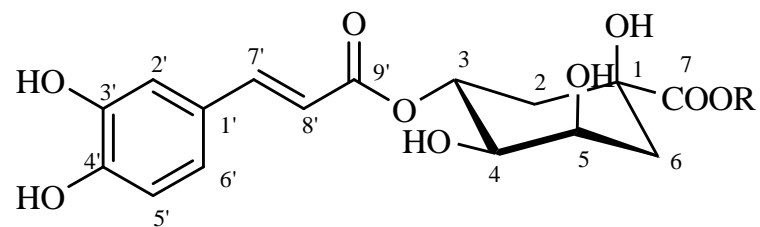
Foi observada a presença do éster metílico do Ácido Clorogênico (Clorogenato de Metila, **31a**), através da presença de um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,30 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e um sinal de carbono metílico em  $\delta_{\text{C}}$  51,59 ppm no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , atribuído ao metil de éster  $\text{CH}_3$ -8. As Figuras 60 e 61 apresentam os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **31**.



(31) R=H Ácido Clorogênico  
 (31a) R=CH<sub>3</sub> Clorogenato de Metila

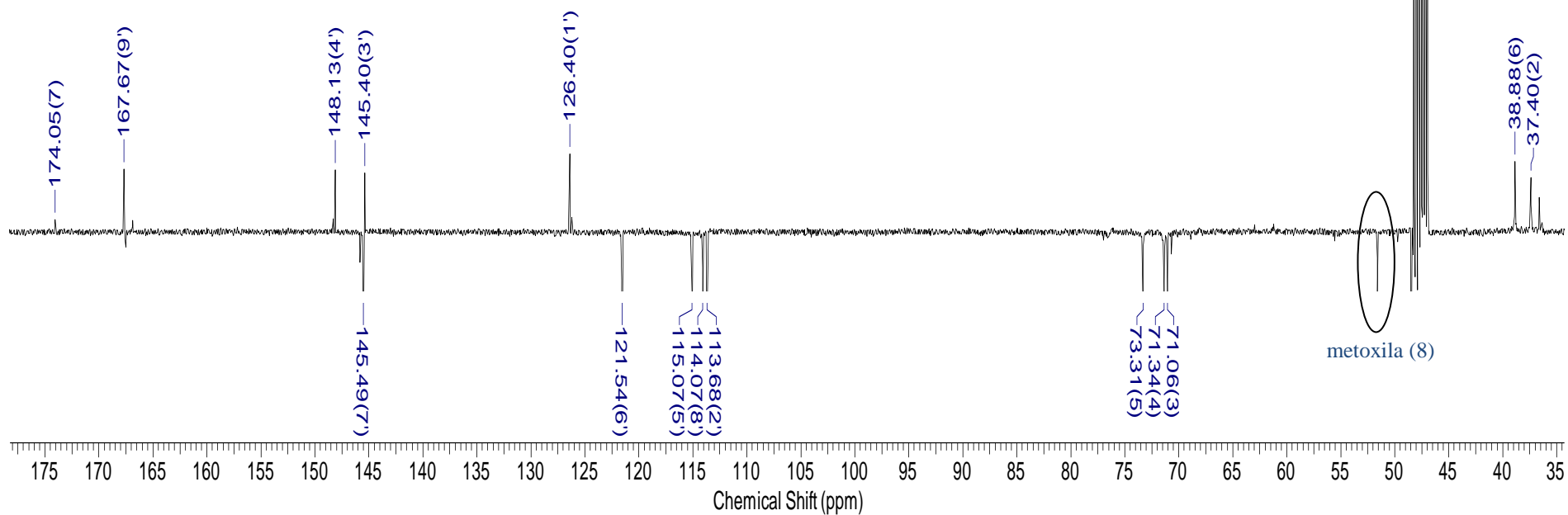


**Figura 60.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da mistura de **Ácido Clorogênico (31)** e **Clorogenato de Metila (A)** e expansão da região δH 6,0 à 8,0 (B).



(31) R=H Ácido Clorogênico

(31a) R=CH<sub>3</sub> Clorogenato de Metila

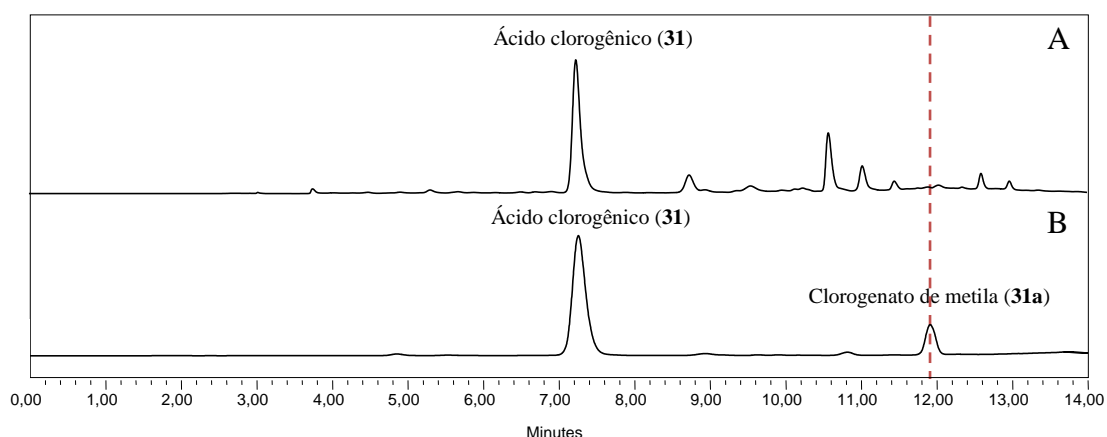


**Figura 61.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPTQ (100 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da mistura de **Ácido Clorogênico (31)** e **Clorogenato de Metila**



O espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY (Apêndice 4) da mistura de **Ácido Clorogênico (31)** e **Clorogenato de Metila (31a)** revelou acoplamento entre os hidrogênios da unidade Ácido Quínico (H-2 e H-3; H-3 e H-4; H-4 e H-5; H-5 e H-6), da unidade fenólica (H-5' e H6'), além de apresentar o acoplamento dos hidrogênios H-8 e H-7 das posições  $\alpha$  e  $\beta$  à carbonila, respectivamente (Tabela 23), observado também no espectro de RMN <sup>1</sup>H através da constante de acoplamento ( $J=15,8$  Hz). A atribuição dos carbonos metínicos e metílico foi confirmada pelo espectro de RMN 2D HSQC (Apêndice 5). Foi observada a correlação heteronuclear <sup>1</sup>J<sub>C-H</sub> entre 3H-8/CH<sub>3</sub>-8 ( $\delta_H$  3,30 ppm/ $\delta_C$  51,59 ppm) do éster **31a**. Para a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários ( $\delta_C$ ) usou-se o espectro RMN 2D HMBC (Apêndice 6) de correlação heteronuclear (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-COSY-<sup>n</sup>J<sub>CH</sub>, n=2 e n=3). A Tabela 23 sumariza os dados espectrais dados espectrais de RMN do **Ácido Clorogênico (31)**, assim como as correlações observadas no espectro de RMN 2D HSQC e comparação com dados da literatura.

A Figura 62 apresenta o cromatograma do extrato metanólico de *P. leiocarpa* e da fração isolada do **Ácido Clorogênico (31)**. É possível observar o éster Clorogenato de Metila (**31a**) apenas na fração isolada, sendo que a diferença do tempo de retenção de ambos afasta a possibilidade que tenham sido isolados como mistura. Tais fatores indicam que o Clorogenato de Metila (**31a**) trata-se de um artefato. O **Ácido Clorogênico (31)** foi isolado em Metanol acidificado e armazenado na mesma solução, preservando, assim, condições favoráveis para ocorrer a reação de metilação que está sendo proposta (Figura 63).



**Figura 62.** Cromatograma do extrato metanólico de *P. leiocarpa* (A) e da fração isolada do **Ácido Clorogênico (31)** onde aparece a presença do **Clorogenato de Metila (31a)** (B)

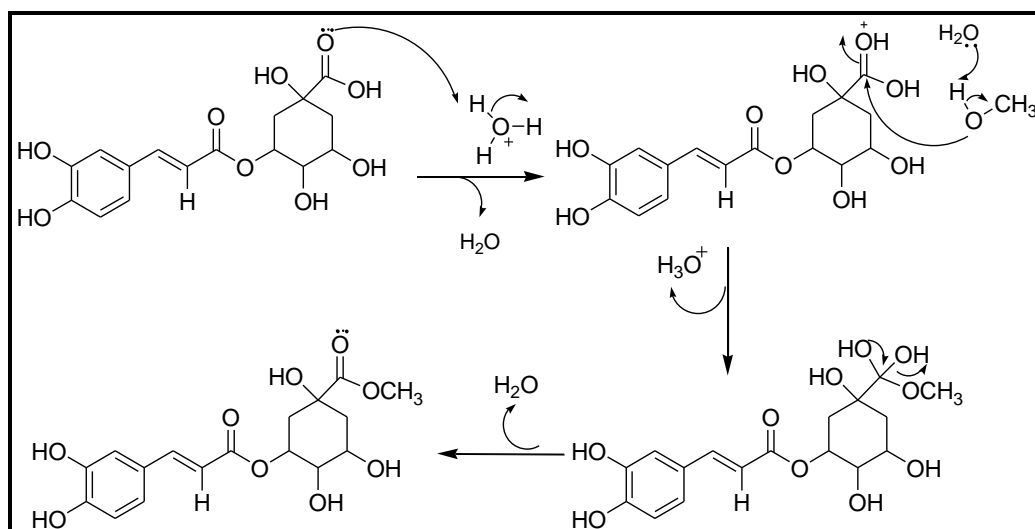
**Tabela 23.** Dados espectrais de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz) do **Ácido Clorogênico (31)** e do **Clorogenato de Metila (31a)**, inclusive informações do HSQC. Deslocamentos químicos de hidrogênios em  $\delta_H$  (ppm) e carbono-13 em  $\delta_C$  (ppm). Constante acoplamento ( $J$ ) em Hz (entre parênteses) e comparação com dados encontrados na literatura

	HSQC		Literatura <sup>[1]</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>C</b>				
1	ND	-	77,4	-
7	174,05	-	180,7	-
1'	126,40	-	126,6	-
3'	145,40	-	143,9	-
4'	148,13	-	146,8	-
9'	167,67	-	168,8	-
<b>CH</b>				
3	71,06	5,40 (m)	70,5	5,26 (ddd, 9,2; 8,8; 4,4)
4	73,31	3,70	72,4	3,58 (dd, 8,8; 3,2)
5	71,34	4,17 (m)	70,8	3,97 (m)
2'	113,68	7,08 (d, 1,5)	114,7	6,99 (d, 2,0)
5'	115,07	6,79 (d, 8,3)	115,8	6,79 (d, 8,0)
6'	121,54	6,96 (dd, 8,3, 1,5)	122,5	6,95 (dd, 8,8; 2,0)
7'	145,49	7,59 (d, 15,8)	145,8	7,43 (d, 16,00)
8'	114,07	6,31 (d, 15,8)	114,2	6,18 (d, 16,0)
<b>CH<sub>2</sub></b>				
2	37,40	2,19 (m) 2,02 (m)	37,0	2,06 (dd, 13,6; 8,0) 2,02 (dd, 13,6; 4,0)
6	38,88	2,16 (m) 2,05 (m)	38,2	2,12 (dd, 13,6; 4,0) 1,97 (dd, 13,6; 2,0)

\*Espectros de RMN-DEPTQ foram usados para deduzir o número de hidrogênios nos átomos de carbono. Os valores de  $J$  foram deduzidos dos espectros 1D de RMN<sup>1</sup>H e os espectros COSY colaboram nas atribuições dos  $\delta_H$  e  $\delta_C$ .

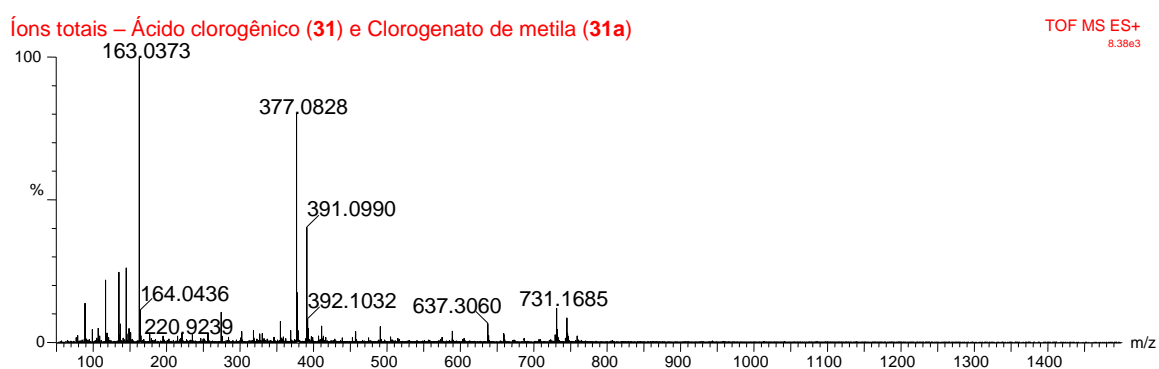
ND= Não detectado devido à pequena quantidade de amostra isolada

[1] Dados da obtidos na literatura (BAEK *et al.*, 2016)



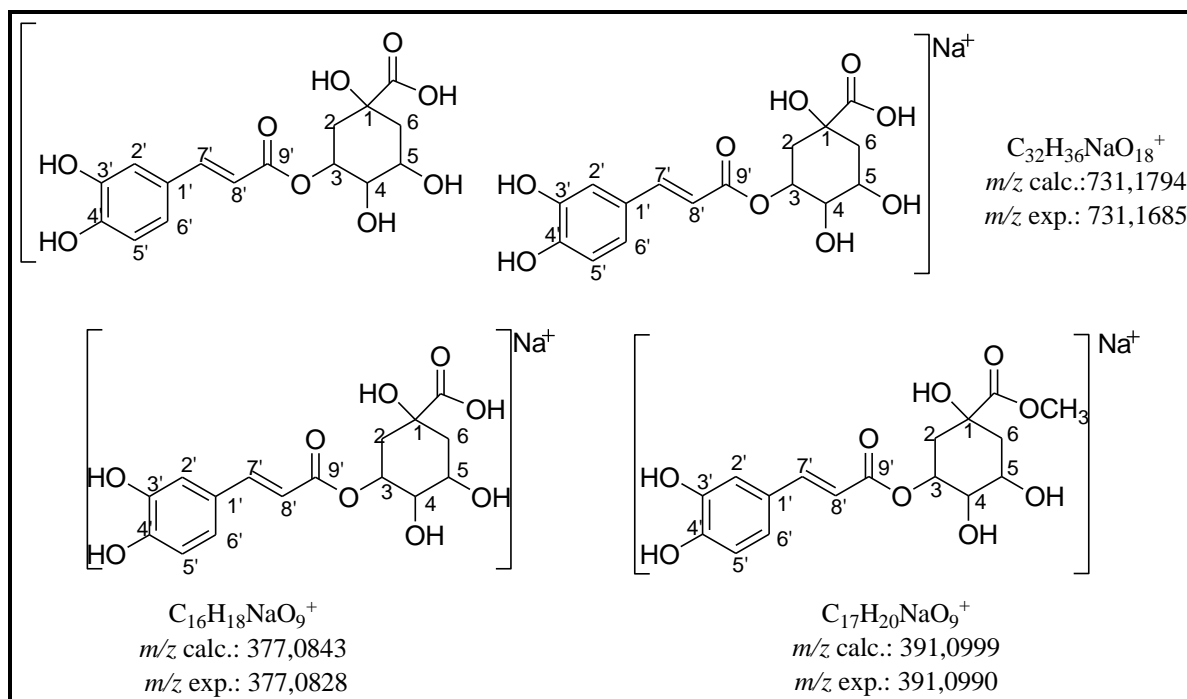
**Figura 63.** Reação de esterificação do Ácido Clorogênico com metanol em meio ácido

Figura 64 apresenta o espectro de massa de íons totais da mistura de Ácido Clorogênico (31) e com seu éster Clorogenato de Metila (31a)



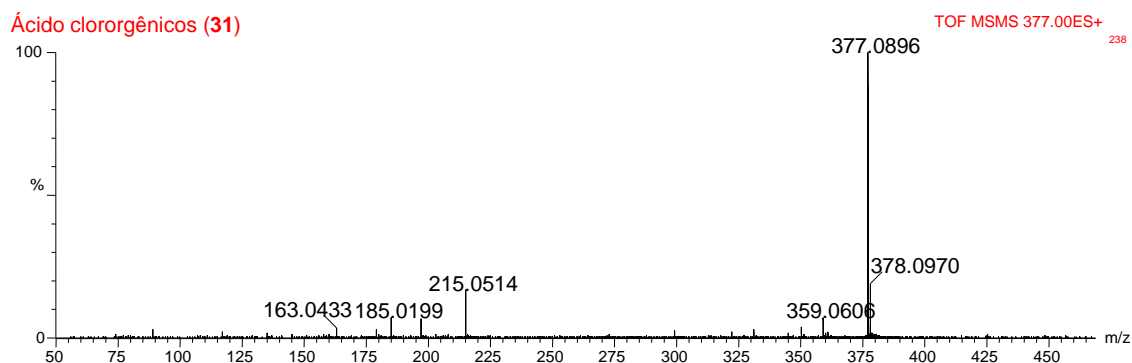
**Figura 64.** Espectro de massas de íons totais da mistura de Ácido Clorogênico (31) e do Clorogenato de Metila (31a)

No espectro de massas de íons totais foi observado o aduto do Ácido Clorogênico (31) com sódio  $[C_{16}H_{18}NaO_9]^+$ , o aduto do éster 31a com sódio  $[C_{17}H_{20}NaO_9]^+$  e o aduto de duas moléculas de Ácido Clorogênico (31) com sódio  $[C_{32}H_{36}NaO_{18}]^+$ , justificando a proposição de que a fração isolada corresponde à mistura do Ácido Clorogênio (31) e seu respectivo éster metílico. Figura 65 apresenta proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no espectro de massas de íons totais.



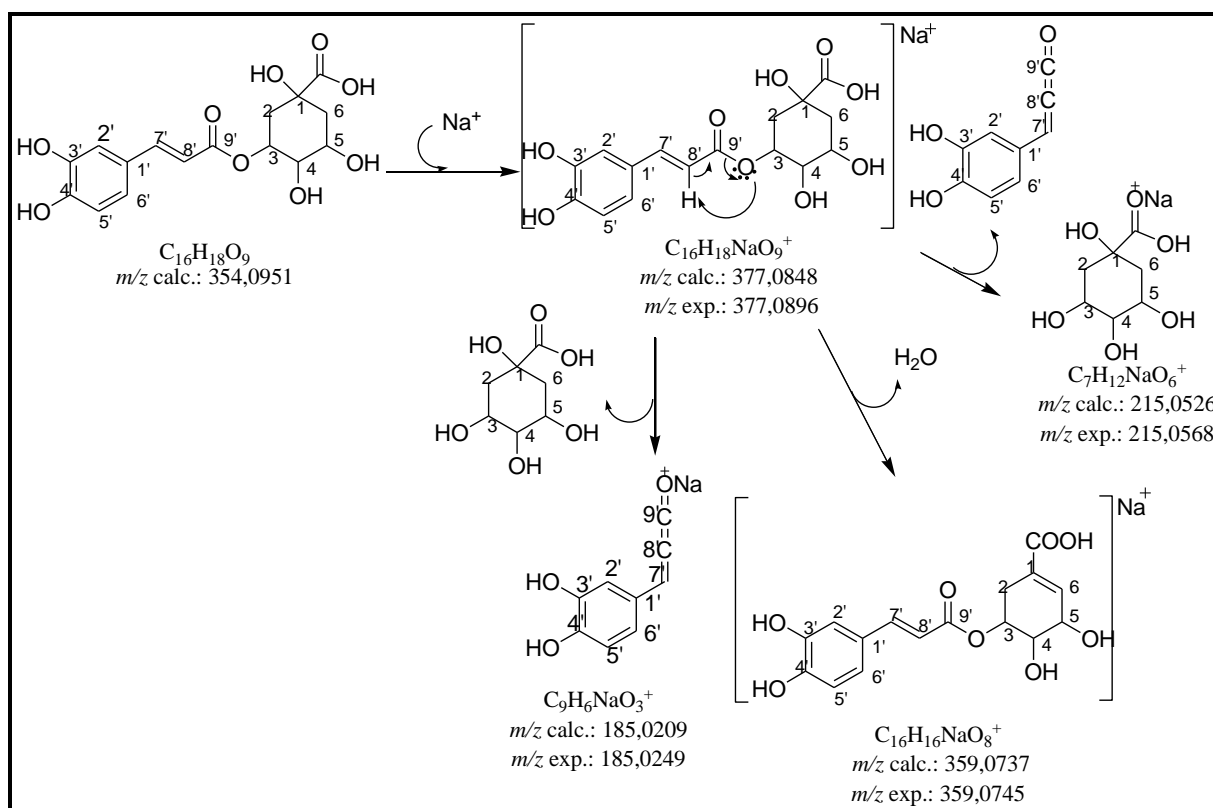
**Figura 65.** Estruturas propostas para os principais íons observados no espectro de massas de íons totais da fração contendo a mistura do **Ácido Clorogênico (31)** e **Clorogenato de Metila (31a)**

Os espectrômetros de massas híbridos do tipo quadrupolo tempo de voo (Q-TOF), são arranjos de forma que dois analisadores de massas são colocados em sequência, um do tipo quadrupolo (Q) e outro por tempo de voo (TOF), com uma célula de colisão entre eles (LI *et al.*, 2007). Denomina-se este tipo de experimento como massa em série (EM/EM). Numa primeira etapa, os íons são selecionados no quadrupolo (Q), constituído de quatro barras paralelas por onde os íons se movem oscilando, devido à aplicação de voltagem, possibilitando a inversão de polaridade entre as barras. A variação das voltagens ocorre de maneira a se realizar uma varredura na faixa de razão massa carga ( $m/z$ ) desejada. Com isso, o quadrupolo passa a atuar como um filtro de massas, permitindo que apenas os íons que apresentam estabilidade neste campo sejam selecionados. Estes íons são, então, introduzidos na célula de colisão com um gás inerte (argônio ou nitrogênio) onde ocorre a fragmentação. Finalmente, os fragmentos são analisados no analisador de massas por tempo de voo (TOF) (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Este arranjo permite que mesmo em misturas seja possível obter o espectro de massa das substâncias isoladamente. Figura 66 apresenta o espectro de massa EM/EM do Ácido Clorogênico (**31**) isoladamente.



**Figura 66.** Espectro de massa MS/MS do **Ácido clorogênico (31)**

Figura 67 apresenta proposta para os principais fragmentos observados no espectro de massas EM/EM do **Ácido Clorogênico (31)**.

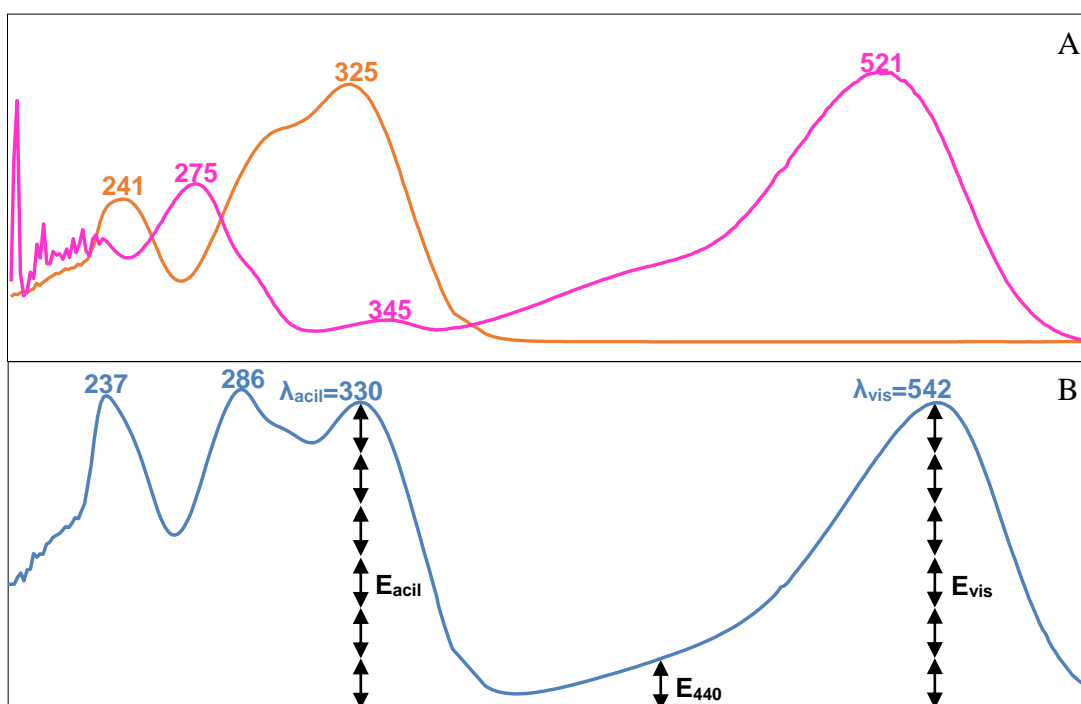


**Figura 67.** Estruturas propostas para os principais fragmentos observados no espectro de massas EM/EM do **Ácido Clorogênico (31)**

### 5.2.3.2. Antocianinas aciladas

O espectro de UV-Vis das antocianinas aciladas trazem informações importantes sobre suas estruturas. As características espectrais de UV-Vis das substâncias **32**, **33** e **34** foram avaliadas através de informações dos comprimentos de onda máximos de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e do cálculo da relação de suas intensidades ( $E$ ) na região de absorvância das antocianinas ( $\lambda_{\text{vis}}$ ) e na região de absorvância do grupo acil ( $\lambda_{\text{acil}}$ ).

A Figura 68 apresenta a comparação dos espectros de UV-Vis da Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (rosa) e do Ácido ferúlico (amarelo) com o espectro da substância **32** (azul), bem como as propriedades espectroscópicas avaliadas nos espectros de UV-Vis da substância **32**. A presença do grupo acil confere um deslocamento batocrômico no comprimento de onda máximo de absorção da substância **32** ( $\lambda_{\text{max}} = 542 \text{ nm}$ ) em relação à Delfinidina-3-*O*-glicosídeo ( $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ ).



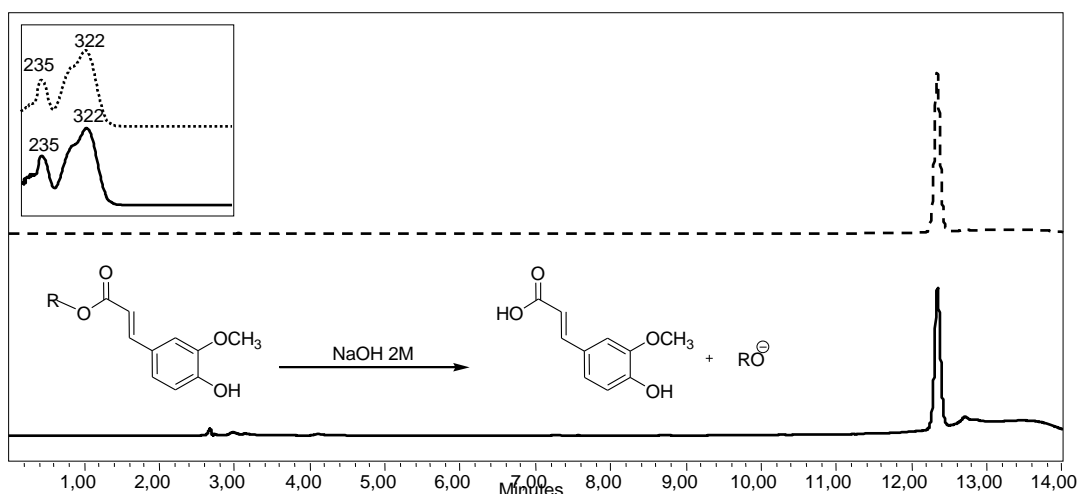
**Figura 68.** Comparação do espectro de UV-Vis da Delfinidina-3-*O*-glicosídeo (**13**, rosa) e Ácido Cafeico (laranja) (A) com o espectro da substância **32** (azul) e as propriedades espectroscópicas avaliadas nos espectros de UV-Vis das substâncias ( $E_{\text{acil}}$ ,  $E_{440}$  e  $E_{\text{vis}}$ ) (B)

Através da avaliação das relações de intensidade entre as bandas foi possível determinar a presença de monossídeo ou biosídeo ligado as antocianinas (relação  $E_{440}/E_{vis}$  entre 29-35% indica um monossídeo;  $E_{440}/E_{vis}$  entre 15-24% indica um biosídeo), o grau de acilação aromática (relação  $E_{acil}/E_{vis}$  entre 53-69% indica monoacilação;  $E_{acil}/E_{vis}$  entre 98-128% indica diacilação) e o tipo de grupo acil (região de absorção na faixa de  $\lambda_{acil}$  de 320-333 nm indica derivado do ácido ferúlico ou sinápico; na faixa de  $\lambda_{acil}$  de 310-315 nm indica derivado ácido  $\rho$ -cumárico) (DYRBY *et al.*, 2001) (Tabela 24 e Figura 68).

**Tabela 24.** Propriedades espectroscópicas de UV-Vis das antocianinas de *P. leiocarpa*

Substância	$\lambda_{vis}$	$\lambda_{acil}$	$E_{acil}/E_{vis}$ (%)	Indica	$E_{440}/E_{vis}$ (%)	Indica	Grupo Acil
<b>32</b>	542	329	100 %	Diacilação	17 %	Biosídeo	Feruloil/sinapoil
<b>33</b>	545	330	99 %	Diacilação	16 %	Biosídeo	Feruloil/sinapoil
<b>34</b>	546	330	99 %	Diacilação	15 %	Biosídeo	Feruloil/sinapoil

As propriedades listadas na Tabela 24 indicaram que as antocianinas estão ligadas a um biosídeo (duas unidades de carboidrato conectadas) e duas unidades feruloil ou sinapoil. Para identificação do grupo acil ligado foi realizada uma hidrólise branda da antocianina isolada usando hidróxido de sódio 2 M por 20 minutos. O produto da reação foi analisado por CLAE-DAD. A Figura 69 apresenta a comparação entre o tempo de retenção e espectro de UV do produto da reação de hidrólise e do padrão de ácido ferúlico.



**Figura 69.** Cromatograma do produto da hidrólise básica da substância **32** (linha cheia) e do padrão do ácido ferúlico (linha tracejada)

A propriedade espectroscópica avaliada ( $E_{\text{acil}}/E_{\text{vis}}$ ) indicou as substâncias isoladas como diaciladas. Após a hidrólise foi identificado somente o Ácido Ferúlico, indicando duas unidades feruloil como unidades acilas presentes nas antocianinas.

A tentativa de identificar as antocianinas presentes no extrato de *P. leiocarpa* por comparação com os tempos de retenção, espectros de UV-Vis e de massas de antocianinas disponíveis na literatura não foi suficiente para a determinação inequívoca das estruturas. Assim, optamos por isolar essas substâncias a fim de obter seus espectros de RMN.

As estruturas das antocianinas isoladas revelaram-se bastante semelhantes, aparecendo nos respectivos espectros de RMN sinais similares, permitindo inicialmente uma abordagem das similaridades estruturais e espectrais para, em seguida, enfatizar a análise das diferenças estruturais através dos dados espectroscópicos correlacionando com as respectivas diferenças estruturais.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das substâncias **32** (Figura 71) e **33** (Figura 73) apresentaram um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  8,4-8,5, sinal característico de hidrogênio ligado ao carbono CH-4 ( $\delta_{\text{C}}$  131,7) do esqueleto antociânico. Além dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,5 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  6,7 ppm, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos CH-6 e CH-8 ( $\delta_{\text{C}}$  103,9 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  94,4 ppm) pertencentes ao anel A do esqueleto antociânico. É possível diferir as antocianinas através dos sinais dos hidrogênios pertencentes ao anel B do esqueleto antociânico, H-6' e H-2'. Na Delfinidina, tais hidrogênios estão em ambiente químico semelhante, apresentando-se como um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,58 ppm que acopla via uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ ) com sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  112,0 ppm,



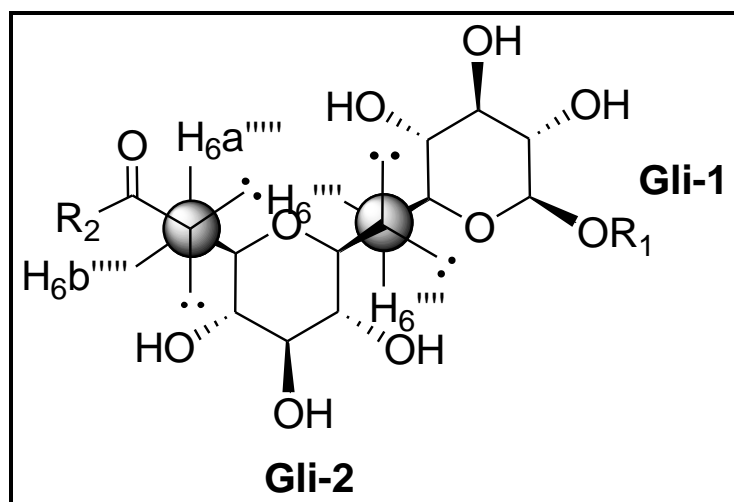
verificado através do espectro bidimensional HSQC. Na Petunidina, devido à metilação da hidroxila ligada ao carbono C-3' o hidrogênio ligado ao carbono CH-2' ( $\delta_C$  110,6 ppm) revelou sinal correspondente ao deslocamento químico em  $\delta_H$  7,78 ppm, enquanto que o hidrogênio ligado ao carbono CH-6' ( $\delta_C$  114,2 ppm) apresentou sinal com deslocamento químico  $\delta_H$  7,58 ppm. Tais informações indicaram que os núcleos antociânicos B das substâncias **32** e **33** correspondem aos da Delfinidina e da Petunidina, respectivamente.

A presença das unidades glicopiranosila nas antocianinas foi reconhecida nos espectros de RMN<sup>1</sup>H (Figuras 71 e 73) pelos sinais dupletos representantes dos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos anoméricos ( $\delta_H$  5,1-5,3 ppm, d, J=6,8 a 7,3 Hz, axial; e  $\delta_H$  4,4 ppm d, J=5,3 a 6,8 Hz, axial) e os demais sinais entre  $\delta_H$  3,2-4,8 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6 (Tabela 25).

O deslocamento químico característico de carbono anomérico (posição CH-1) de unidade piranosídica ligada a flavonoide em geral se apresenta entre  $\delta_{CH}$  97-103 ppm (carbono metínico) e do carbono na posição CH<sub>2</sub>-6 se apresenta entre  $\delta_{CH_2}$  61-62 ppm (carbono metilênico). Nos espectros de RMN <sup>13</sup>C das substâncias **32** (Figura 73) e **33** (Figura 74) foi observado sinais de carbono anomérico (CH-1''''', glicose 2) em  $\delta_C$  107,3 ppm e de CH<sub>2</sub>-6'''' (glicose 1) em  $\delta_{CH_2}$  73,7 ppm, revelando desproteção destes carbonos e induziram para a dedução de que existe uma ligação entre duas moléculas de piranose na posição CH<sub>2</sub>6''''-O-CH-1'''''. Esta dedução foi confirmada pelo valor encontrado para  $E_{440}/E_{vis}$  igual a 16% (Tabela 24). Os deslocamentos químicos de CH<sub>2</sub>-6'''' e CH<sub>2</sub>-6'''''' das glicoses 2 e 3 entre  $\delta_{CH_2}$  60-64 ppm sugeriram ligação com as unidades feruloila.

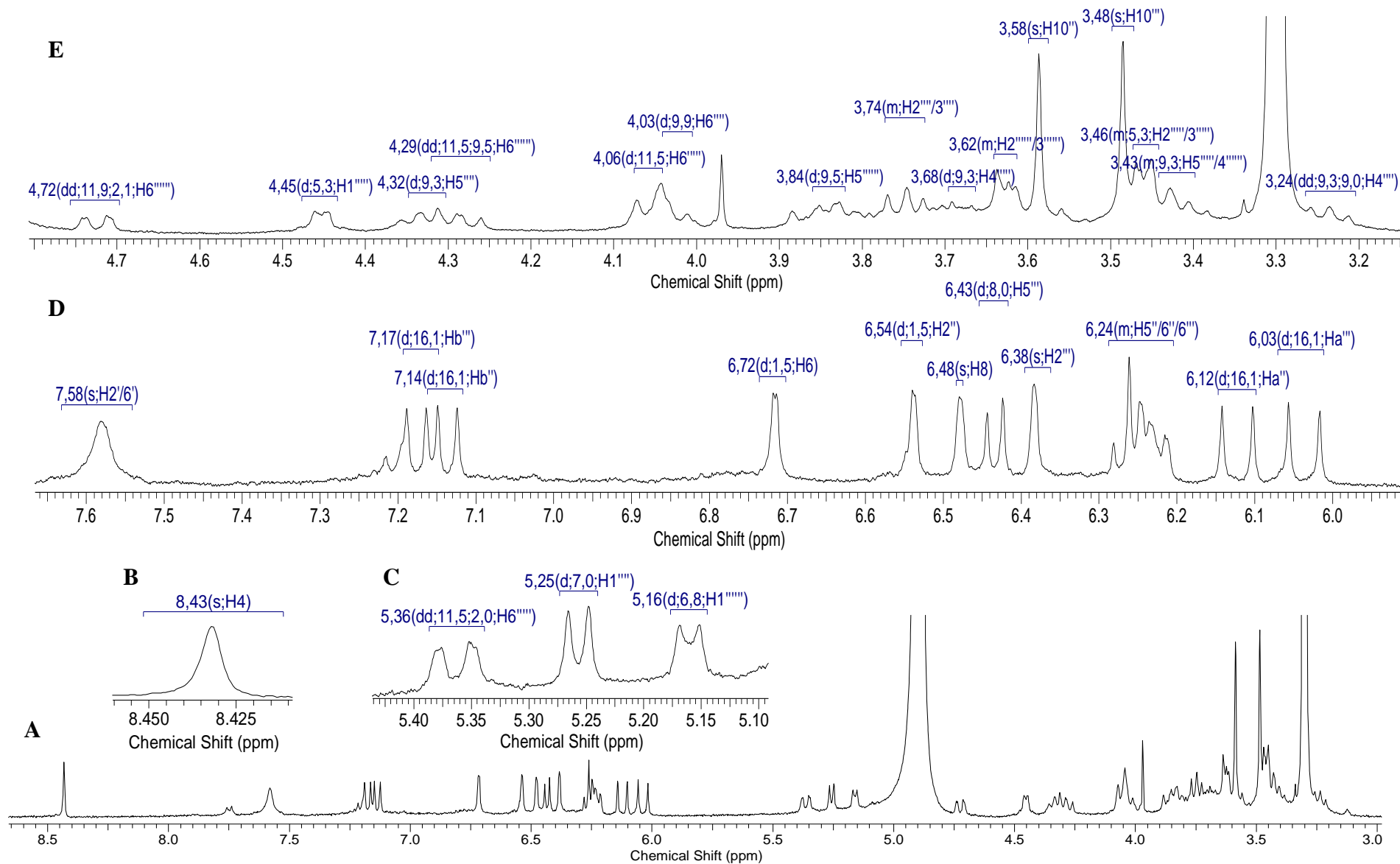
Os sinais do esqueleto piranosídico observados no espectro de RMN <sup>1</sup>H das substâncias **32** e **33** corroboram com tal proposição. O hidrogênio ligado ao carbono anomérico da glicose 2 (H-1''''') apresentou deslocamento químico em  $\delta_H$ =4,46 ppm, demonstrando o mesmo efeito de proteção observado por YOSHIDA e colaboradores em esqueleto contendo gentiobiosídeo (Tabela 25). Como previsto, os hidrogênios localizados na posição H-6'''' da molécula de glicose 2 apareceram representados por dois sinais ( $\delta_H$  4,06 ppm e  $\delta_H$  5,36 ppm). A projeção de Newman permite observar a diferença de ambiente químico para os hidrogênios da glicose 2 (H-6a'''' e H-6b'''). Tal efeito também foi observado nos hidrogênios localizados na posição H-6'''' da molécula de glicose 3. Estes hidrogênios são classificados como proquirais e diasterotópicos, pois a troca deles por outro átomo, por exemplo deutério, gera um centro assimétrico, sendo que as moléculas formadas geram um par de diastereoisômeros (ROMERO, 1998). No caso dos hidrogênios localizados na posição

H-6'''' da molécula de glicose 1 a diferença no ambiente químico é menos acentuada devido a ligação à glicose 2 (Figura 70).



**Figura 70.** Projeção de Newman para molécula de glicose 1 e 2 das substâncias **32** e **33**

As unidades feroluil foram confirmadas pelos sinais de carbono alfa e beta à carbonila ( $\delta_C$  168 ppm), com deslocamento químico entre  $\delta_{CH}$  114,8-115,8 ppm para o CH- $\alpha$  e entre  $\delta_{CH}$  146,9-147,1 ppm para o CH- $\beta$ . Seus respectivos hidrogênios apresentaram deslocamento químico entre  $\delta_H$  6,03-6,12 ppm para H- $\alpha$  e entre  $\delta_H$  7,11-7,21 ppm para H- $\beta$ . Além dos sinais dos carbonos metínicos aromáticos (CH-2,  $\delta_{CH-2}$  109,1 ppm; CH-5,  $\delta_{CH-5}$  116,6 ppm; CH-6,  $\delta_{CH-6}$  146,9 ppm) e quaternários (C-1,  $\delta_C=126,6$  ppm; CH-3,  $\delta_C$  148,9 ppm; C-4,  $\delta_C$  150,9 ppm) das unidades arilas.



**Figura 71.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da **Delfinidina acilada (32)** (A) e expansão das regiões  $\delta_{\text{H}}$  8,4 a 8,5 ppm (B);  $\delta_{\text{H}}$  5,1 a 5,4 ppm (C);  $\delta_{\text{H}}$  6,0 à 7,7 ppm (D);  $\delta_{\text{H}}$  3,2 à 4,78 ppm(E).

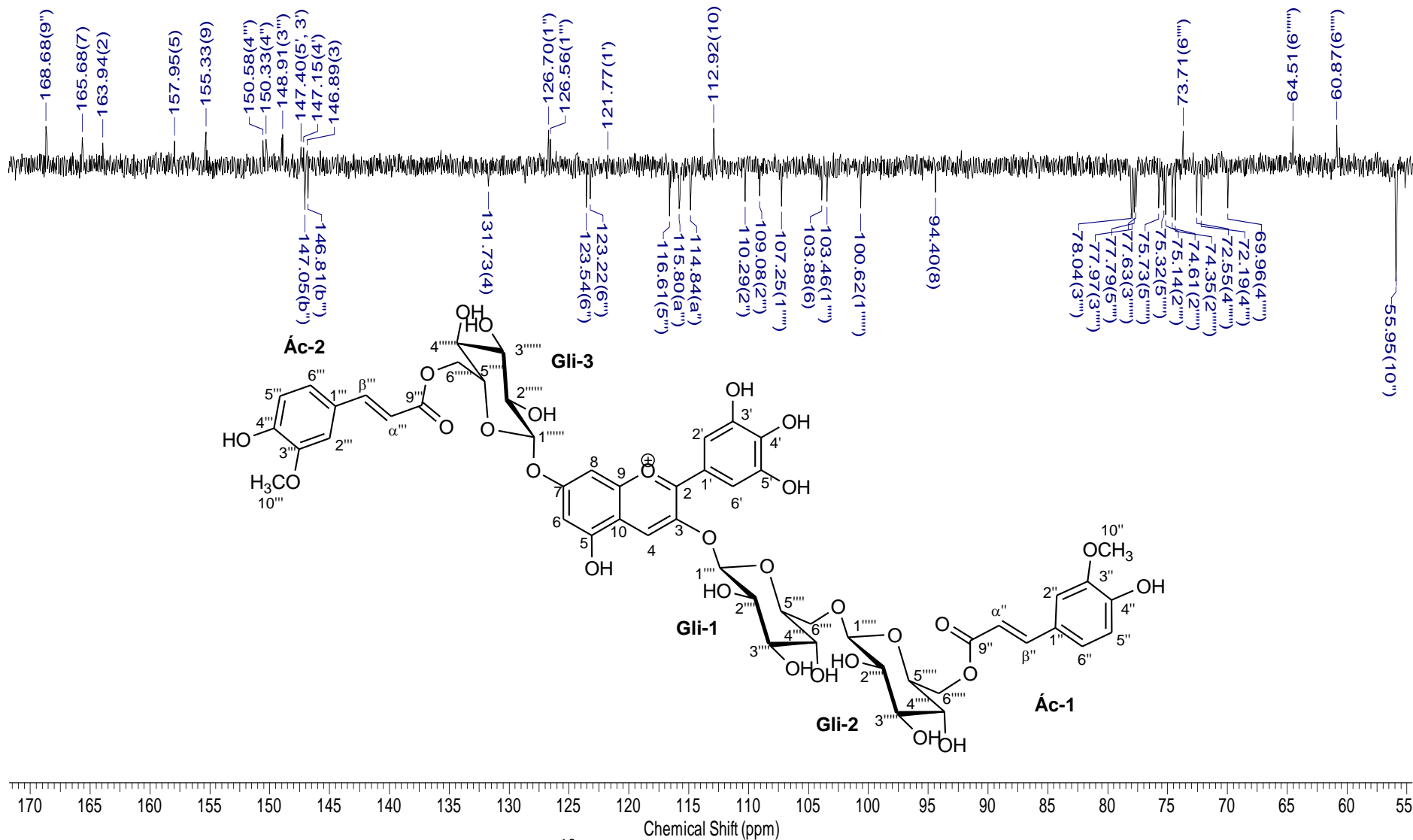
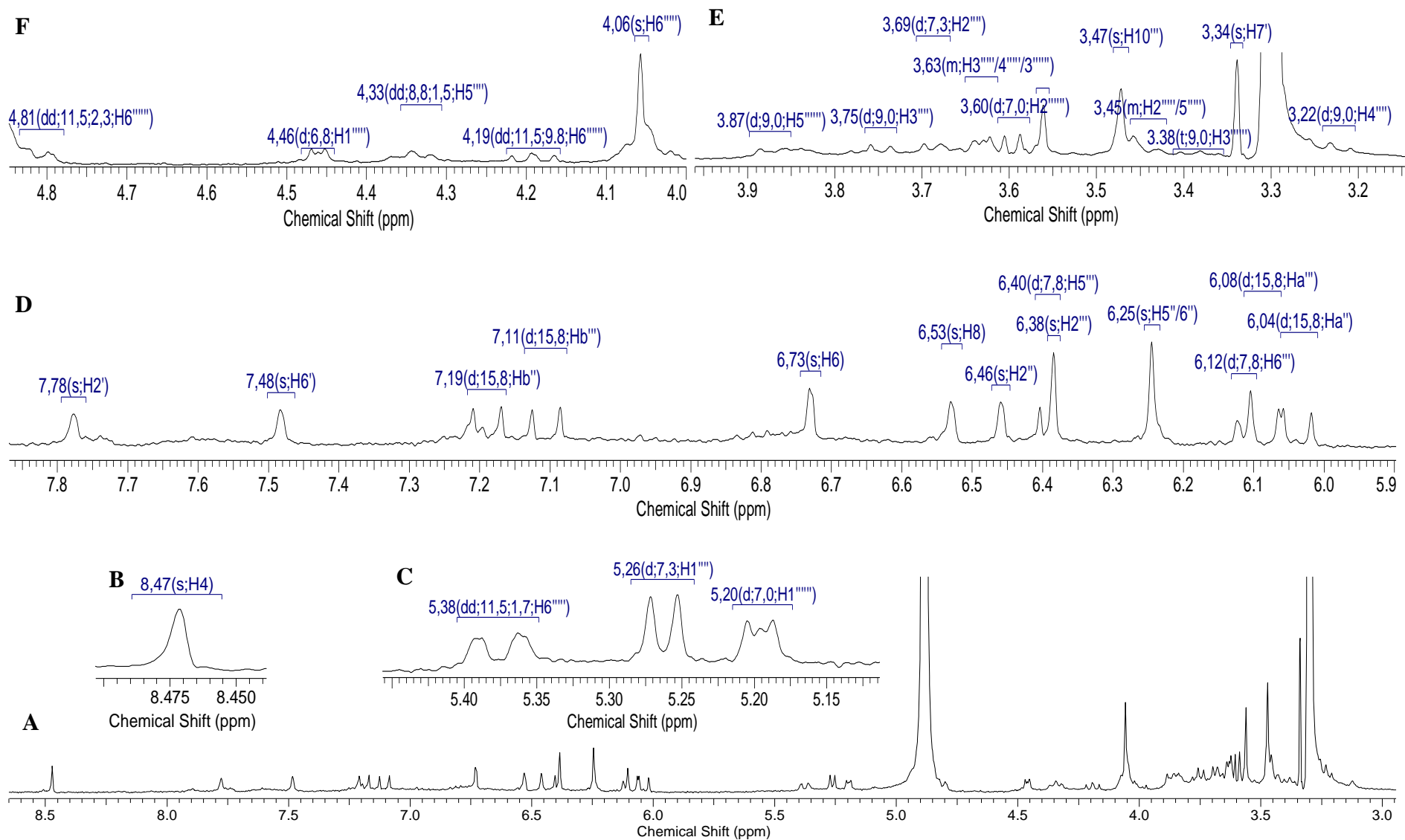


Figura 72. Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPTQ (100 MHz, em MeOH-d<sub>4</sub>) da **Delfinidina acilada (32)**



**Figura 73.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da Petunidina **acilada** (**32**) (A) e expansão das regiões δ<sub>H</sub> 8,4 a 8,5 ppm (B); δ<sub>H</sub> 5,1 a 5,5 ppm (C); δ<sub>H</sub> 5,9 a 7,9 ppm (D); δ<sub>H</sub> 3,1 a 4,0 ppm (E) e δ<sub>H</sub> 4,0 a 4,9 ppm (F).

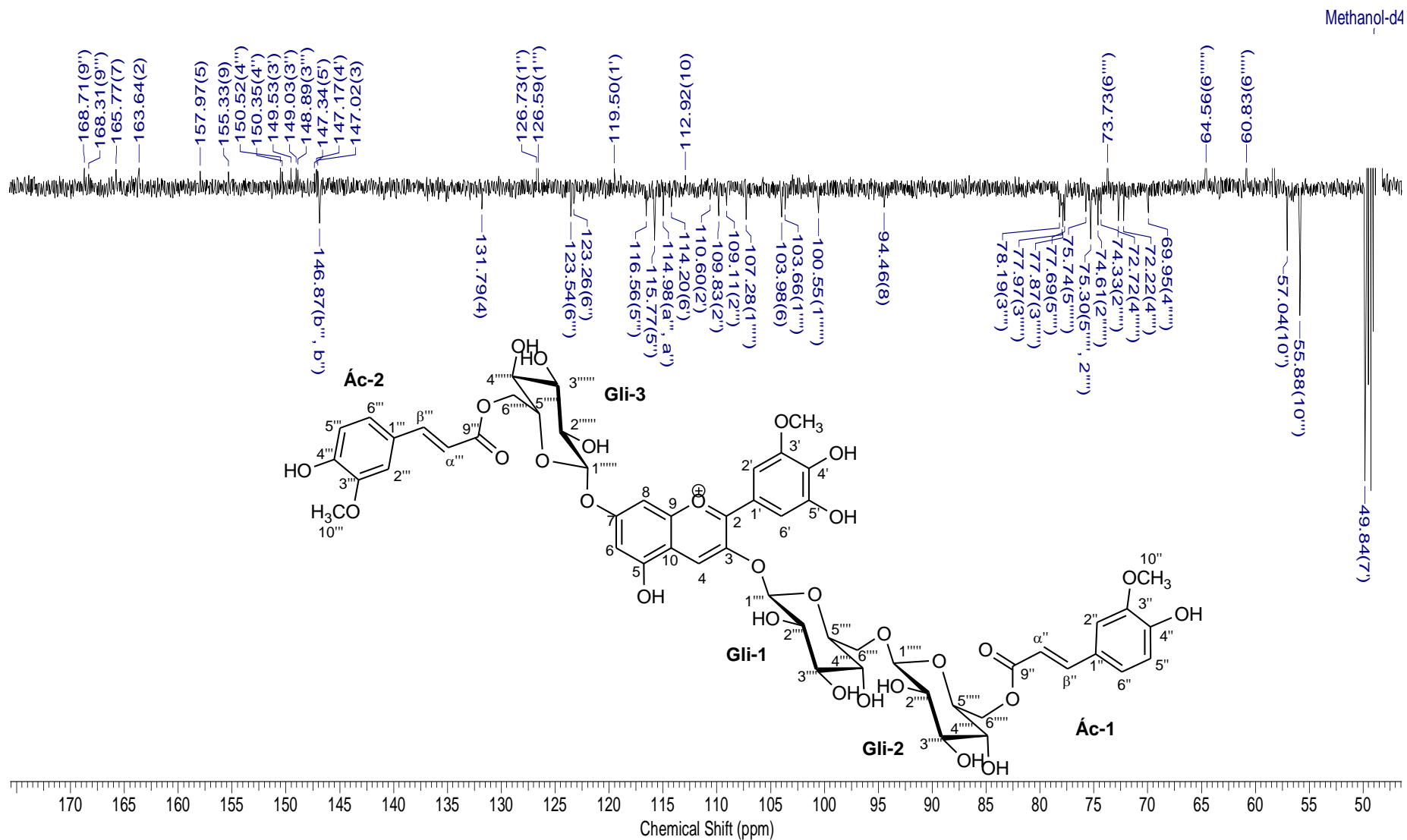


Figura 74. Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPTQ (100 MHz, em MeOH-*d*<sub>4</sub>) da Petunidina acilada (33)

Para a atribuição dos sinais das unidades piranosídicas foi imprescindível a interpretação dos espectros de COSY (Apêndices 7 e 8) e TOCSY (Apêndices 9 e 10). Tal atribuição foi confirmada através da comparação com dados de unidade gentiobiosídeo encontrados na literatura (Tabela 25).

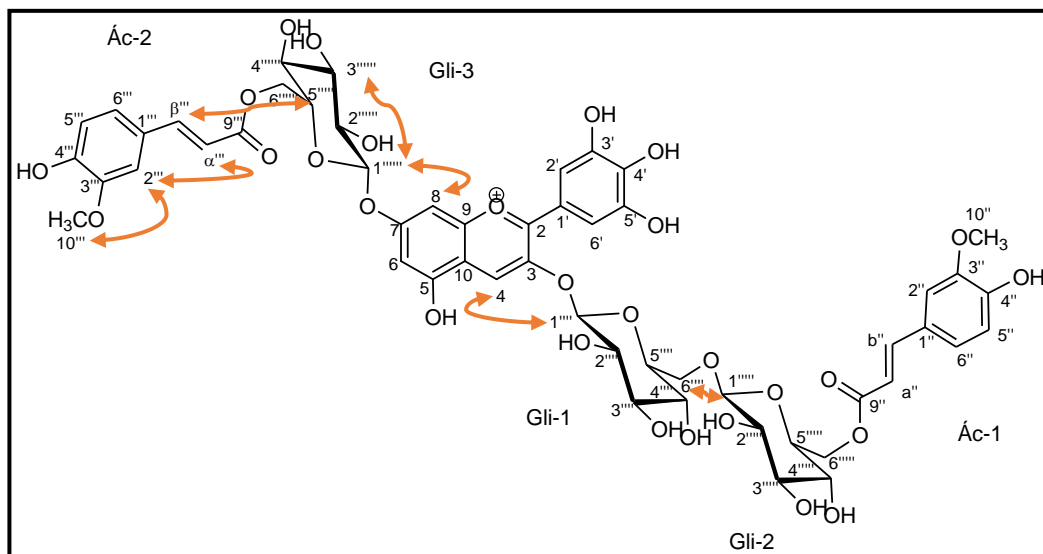
**Tabela 25.** Comparação dos deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H das unidades piranosídicas das antocianinas isoladas com valores encontrados por YOSHIDA e colaboradores

<b>Substância 32</b>	<b>Substância 33</b>	<b>Literatura<sup>[1]</sup></b>	
$\delta$ H (ppm) <i>J</i> , Hz	$\delta$ H (ppm) <i>J</i> , Hz	$\delta$ H (ppm)	
<b>Glicose 1</b>			
1''''	5,25 d (1H; 7,0)	5,26 d (1H; 7,3)	5,16
2''''	3,74 m (2H; 9,3; 7,0)	3,69 m (1H)	3,72
3''''	3,74 m (2H; 9,3; 7,0)	3,75 m (1H)	3,80
4''''	3,24 dd (1H; 9,3; 9,0)	3,22 m (1H)	3,28
5''''	4,32 d (1H; m)	4,33 d (1H; 8,78; 1.51)	4,28
6''''	4,03 d (2H; 9,9)	4,06 m (3H)	4,09; 4,06
<b>Glicose 2</b>			
1''''	4,45 d (1H; 5,3)	4,46 d (1H; 6,8)	4,51
2''''	3,46 m (1H)	3,45 m (1H)	3,50
3''''	3,46 m (1H)	3,63 m (1H)	3,50
4''''	3,69 m (1H)	3,63 m (1H)	3,72
5''''	3,43 m (1H)	3,45 m (1H)	3,46
6''''	5,36 dd (1H; 11,5, 2,0); 4,06 d (1H; 11,4)	5,38 dd (1H; 11,5; 1.7) 4,06 m (1H)	5,39; 4,08
<b>Glicose 3</b>			
1''''	5,16 d (1H; 6,8)	5,20 d (1H; 7,03)	5,47
2''''	3,62 m (1H)	3,60 d (1H; 7,03)	3,65
3''''	3,62 m (1H)	3,63 m (3H)	3,65
4''''	3,43 m (1H)	3,38 t (1H; 9,03)	3,38
5''''	3,84 m (1H)	3,87 d (1H; 9,03)	3,96
6''''	4,72 dd (1H; 11,5, 2,1); 4,29 dd (1H; 11,5; 9,5)	4,81 dd (1H; 11,54; 2,26) 4,19 dd (1H; 11,54; 9,79)	4,95; 4,15

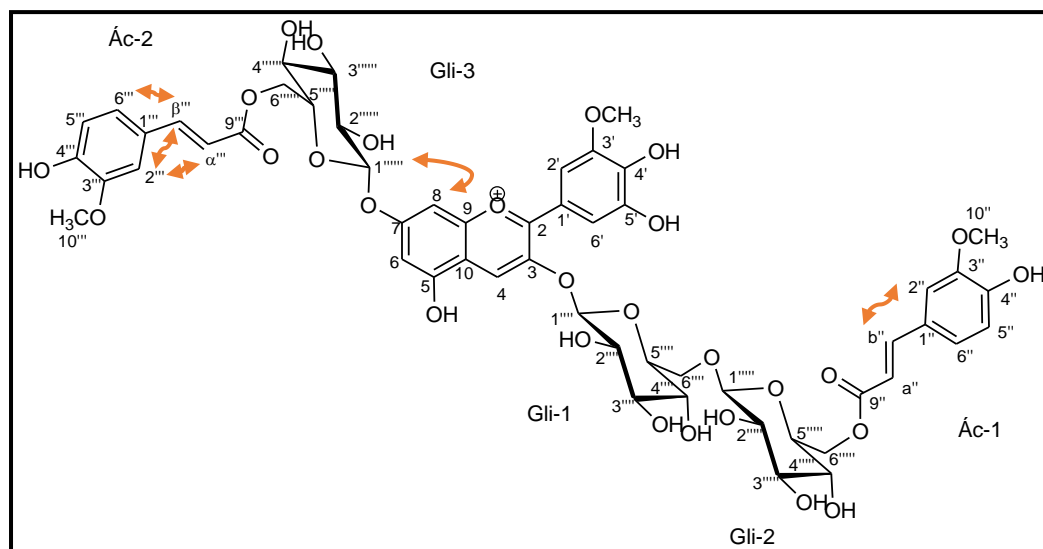
[1] Dados obtidos na literatura (YOSHIDA *et al.*, 1991)

O padrão de substituição das antocianinas recebeu significativa contribuição através da interpretação dos espectros 2D NOESY das duas substâncias, onde foram observadas as interações (espacial dipolar) entre os hidrogênios H-8 e H-1'''''' (glicose 3) nos espectros das **Delfinidina (32) e Petunidina(33) aciladas** e entre os hidrogênios H-4 e H-1'''' (glicose 1) no espectro da **Delfinidina acilada** (substância 32). Assim, tornou-se possível postular que a glicose 3 está ligada no oxigênio localizado na posição 7 (anel A) e a glicose 1 está ligada no oxigênio localizado na posição 3 (anel C) dos esqueletos antociânicos. As Figuras 75 e 76

apresentam as interações observadas nos espectros bidimensionais de efeito Overhauser nuclear (NOESY; Apêndice 11 e 12) das antocianinas isoladas.



**Figura 75.** Correlações observadas no espectro NOESY (seta laranja) da **Delfinidina acilada** (substância **32**)



**Figura 76.** Correlações observadas no espectro NOESY (seta laranja) da **Petunidina acilada** (substância **33**)

O espectro de NOESY pode ser útil para determinar proximidade dos hidrogênios no espaço, mesmo que não estejam ligados diretamente em átomos de carbono localizados na vizinhança. Além das correlações apresentadas na Figura 75, observou-se correlações espaciais adicionais entre os hidrogênios H-2'/6' (anel B do núcleo flavilium) e H-2'' (grupo acila) e entre os hidrogênios H-8 (anel A do núcleo flavilium) e H-α'' (grupo acila) no espectro da **Delfinidina acilada**. No espectro da **Petunidina acilada**, além das correlações apresentadas



na Figura 76 foi observada correlação entre os hidrogênios H-5'' (grupo acila) e H-6 (anel A do núcleo flavilium). A correlação NOE de longo alcance entre o núcleo flavilium e o grupo acila aromático é uma evidência de que as porções estão em contato espacial próximo, favorecendo a copigmentação intramolecular (TROUILLAS *et al.*, 2016). O que corrobora com o efeito batocrômico observado no espectro de UV-Vis das antocianinas ( $\Delta=20-22$  nm). Esta copigmentação pode estar envolvida na coloração azulada observada para o fruto.

Os espectros bidimensionais heteronucleares HMBC (Apêndices 13 e 14) e HSQC contribuíram significativamente para as caracterizações estruturais e possibilitaram a atribuição inequívoca dos sinais de carbono e hidrogênio. A Tabela 26 apresenta os dados espectrais das antocianinas isoladas.

**Tabela 26.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  das antocianinas isoladas de *P. leiocarpa*

		Substância 32		Substância 33	
		HSQC		HSQC	
	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm) J, Hz	$\delta\text{C}$ (ppm)	$\delta\text{H}$ (ppm) J, Hz	
Antocianina					
2	163,9	-	163,6	-	
3	146,9	-	147,0	-	
4	131,7	8,43 s (1H)	131,8	8,47 s (1H)	
5	158,0	-	158,0	-	
6	103,9	6,72 d (1H; 1,5)	104,0	6,73 s (1H)	
7	165,7	-	165,8	-	
8	94,4	6,48 s (1H)	94,5	6,53 s (1H)	
9	155,3	-	155,3	-	
10	112,9	-	112,9	-	
1'	121,8	-	119,5	-	
2'	112,0*	7,58 s (2H)	110,6	7,78 s (1H)	
3'	147,4	-	149,5	-	
4'	147,2	-	147,2	-	
5'	147,4	-	147,3	-	
6'	112,0*	7,58 s (2H)	114,2	7,48 s (1H)	
OCH <sub>3</sub>	-	-	49,8	3,34 s (1H)	
Ácido ferúlico 1					
1''	126,7	-	126,7	-	
2''	110,3	6,54 sl (1H, 1,5)	109,8	6,46 s (1H)	
3''	149,0	-	149,0	-	
4''	150,3	-	150,4	-	
5''	115,7	6,24 m (3H)	115,8	6,25 s (2H)	
6''	123,5	6,24 m (3H)	123,3	6,25 s (2H)	
b''	147,1	7,16 d (1H; 16,1)	146,9	7,19 d (1H; 15,8)	
a''	114,8	6,12 d (1H; 16,1)	115,0	6,04 d (1H; 15,8)	
9''	168,7	-	168,7	-	
OCH <sub>3</sub>	56,0	3,58 s (3H)	57,0	3,56 s (3H)	

**Tabela 26.** Continuação

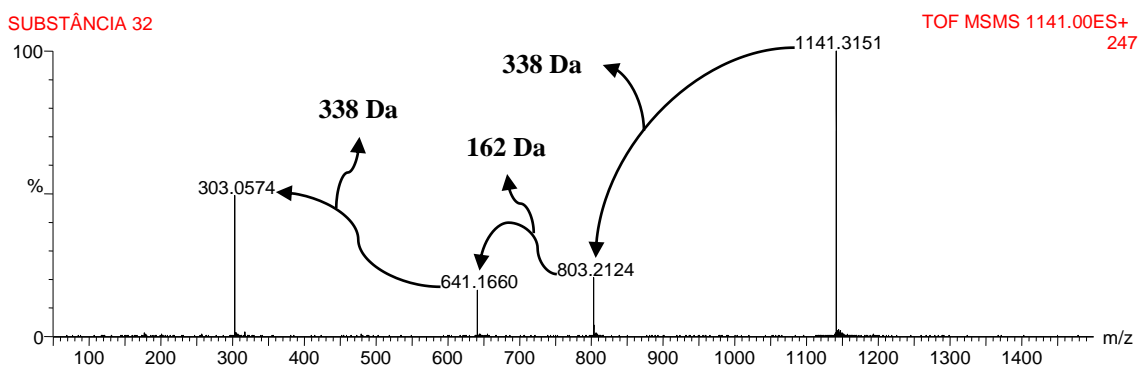
Substância 32		Substância 33	
HSQC		HSQC	
$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ (ppm) <i>J</i> , Hz	$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ (ppm) <i>J</i> , Hz
Ácido ferúlico 2			
1'''	126,6	-	126,6
2'''	109,1	6,38 sl (1H)	109,1
3'''	148,9	-	148,9
4'''	150,6	-	150,5
5'''	116,6	6,43 d (1H; 8,0)	116,6
6'''	123,2	6,24 m (3H)	123,5
b'''	146,8	7,21 d (1H; 16,1)	146,9
a'''	115,8	6,03 d (1H; 16,1)	115,0
9'''	168,6	-	168,3
OCH <sub>3</sub>	55,9	3,48 s (3H)	55,9
Glicose 1			
1''''	103,5	5,25 d (1H; 7,0)	103,7
2''''	75,1	3,74 m (2H; 9,3; 7,0)	75,3
3''''	78,0	3,74 m (2H; 9,3; 7,0)	78,2
4''''	72,2	3,24 dd (1H; 9,3; 9,0)	72,2
5''''	77,4	4,32 m (1H)	77,7
6''''	73,7	4,03 m (2H)	73,7
Glicose 2			
1'''''	107,3	4,45 d (1H; 5,3)	107,3
2'''''	74,2	3,46 m (2H; 5,3)	74,3
3'''''	78,0	3,46 m (2H; 5,3)	78,0
4'''''	70,0	3,69 d (1H; 9,3)	70,0
5'''''	75,3	3,43 d (2H; 9,3)	75,3
6'''''	60,9	5,36 dd (1H; 11,5, 2,0); 4,06 d (1H; 11,5)	60,8
Glicose 3			
1''''''	100,6	5,16 d (1H; 6,8)	100,6
2''''''	74,4	3,62 m (1H)	74,6
3''''''	77,6	3,62 m (1H)	77,9
4''''''	72,6	3,43 m (H)	72,7
5''''''	75,7	3,84m (1H)	75,7
6''''''	64,5	4,72 dd (1H; 11,5, 2,1); 4,29 dd (1H; 11,5; 9,5)	64,6

O espectro RMN-DEPTQ foi usado para identificar o número de hidrogênios em cada carbono. Os valores de *J* foram deduzidos do espectro de RMN 1D <sup>1</sup>H e os espectros 2D COSY, TOCSY, HMBC, HSQC e NOESY cooperaram para o assinalamento  $\delta_H$  e  $\delta_C$ .

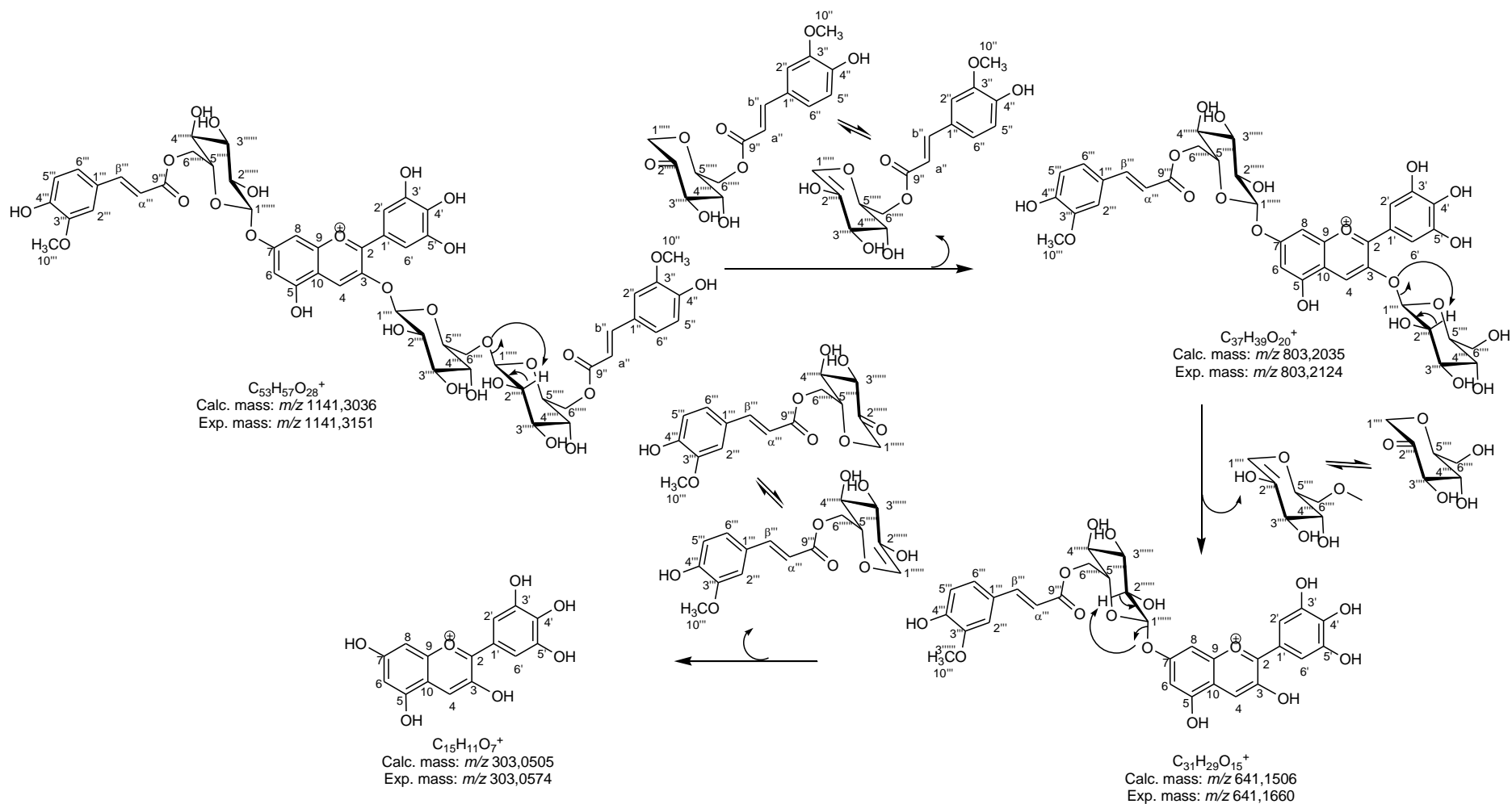
\* Deduzido apenas no espectro HSQC.

A ionização por eletron spray é classificada com um método de ionização branda na obtenção de espectros de massas, fornecendo, em geral, informações sobre íons moleculares.

Os picos majoritários observados em espectros de massas revelam frequentemente caminhos mais favoráveis para reações de fragmentação. A interpretação dos picos majoritários observados nos espectros de massas exatas das antocianinas, obtidos por ESI-QTOF (vide condições analíticas descritas no item 4.6.2.3), forneceu informações adicionais sobre as estruturas. As três antocianinas apresentaram fragmentação semelhante envolvendo três principais fragmentos, sendo eles: 1) fragmento oriundo da perda de 338 unidades de massa ( $M^+ - C_{16}H_{18}O_8$ ) equivalente a uma unidade de glicose esterificada com uma unidade de ácido ferúlico; 2) fragmento oriundo da perda adicional de 162 unidades de massa ( $M^+ - C_{16}H_{18}O_8 - C_6H_{10}O_5$ ) equivalente a uma segunda unidade de glicose; e 3) fragmento oriundo da perda adicional de 338 unidades de massa ( $M^+ - 2C_{16}H_{18}O_8 - C_6H_{10}O_5$ ) equivalente a mais uma unidade de glicose esterificada com uma unidade de ácido ferúlico, gerando as agliconas Delfinidina, Petunidina e Malvidina para as substâncias **32**, **33** e **34**, respectivamente. A Figura 77 apresenta o espectro de massas da substância **32** e a Figura 78 representa a proposta para sua fragmentação.

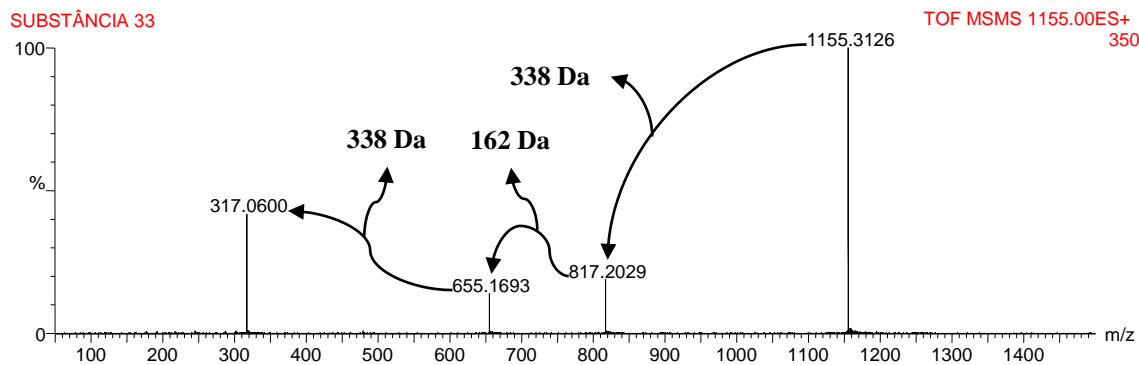


**Figura 77.** Espectro de massa EM/EM da substância **33**

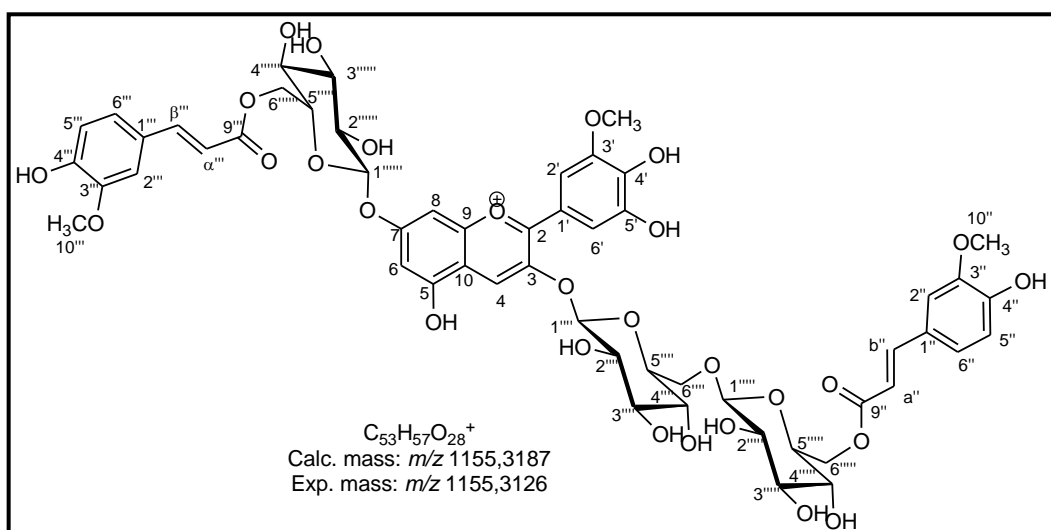


**Figura 78.** Estruturas propostas para os principais fragmentos observados no espectro de massas EM/EM da substância **32**

Os espectros de massa confirmaram as estruturas propostas para as substâncias **32** e **33**. A Figura 79 apresenta o espectro de massas da substância **33** e a Figura 80 sua respectiva estrutura.

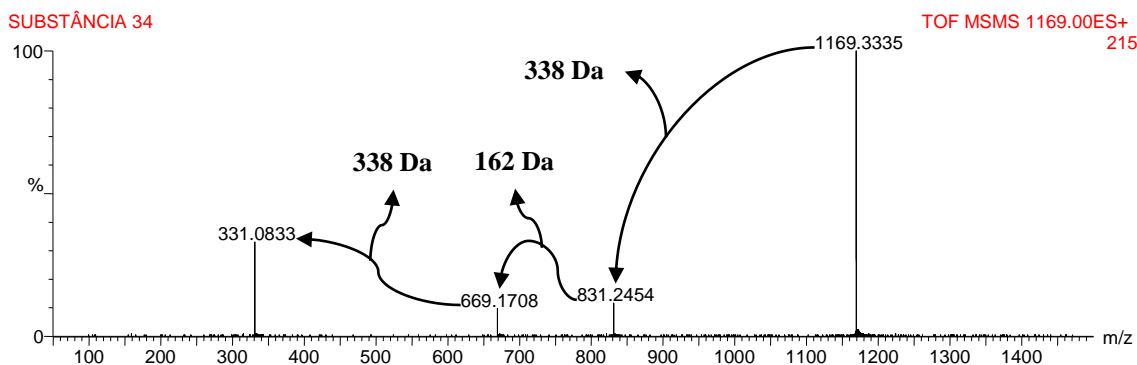


**Figura 79.** Espectro de massa exata EM/EM da substância **33**

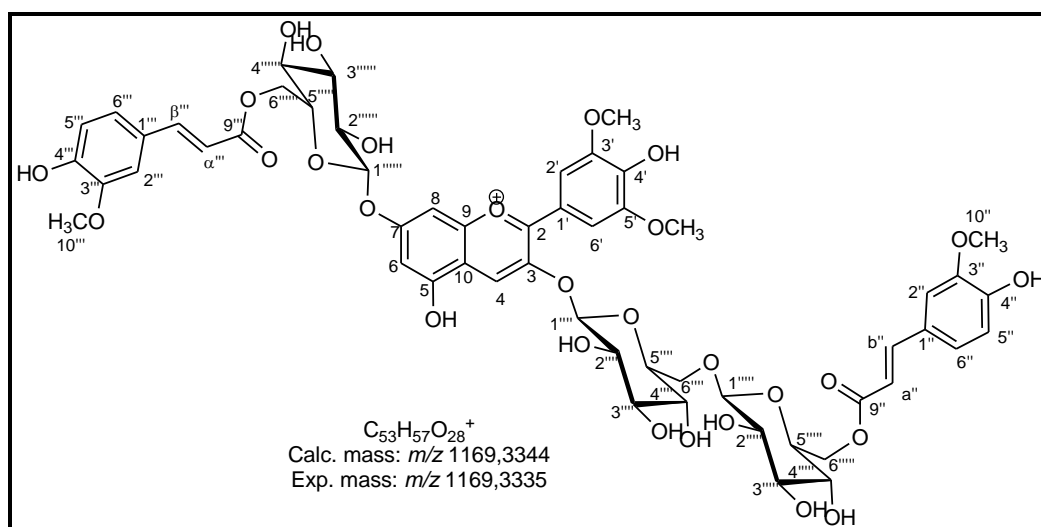


**Figura 80.** Estrutura proposta para a substância **33** e suas respectivas massas exata (teórica) e acurada (medida experimentalmente)

O extrato de *P. leiocarpa* apresentou baixa concentração da substância **34**, sendo o pico minoritário (Figura 58), o que inviabilizou seu isolamento em quantidade suficiente para obtenção dos espectros de RMN. Assim, sua estrutura foi proposta através da interpretação dos dados espectrais de massas e UV-Vis. Por analogia com o padrão de substituição das antocianinas isoladas na mesma espécie sugere-se que a substância **34** é um análogo de Malvidina das substâncias **32** e **33**. A Figura 81 apresenta o espectro de massa da substância **34** a Figura 82 sua respectiva estrutura.



**Figura 81.** Espectro de massa exata EM/EM da substância **34**



**Figura 82.** Estrutura proposta para a substância **34** e suas respectivas massas exata (teórica) e acurada (medida experimentalmente)

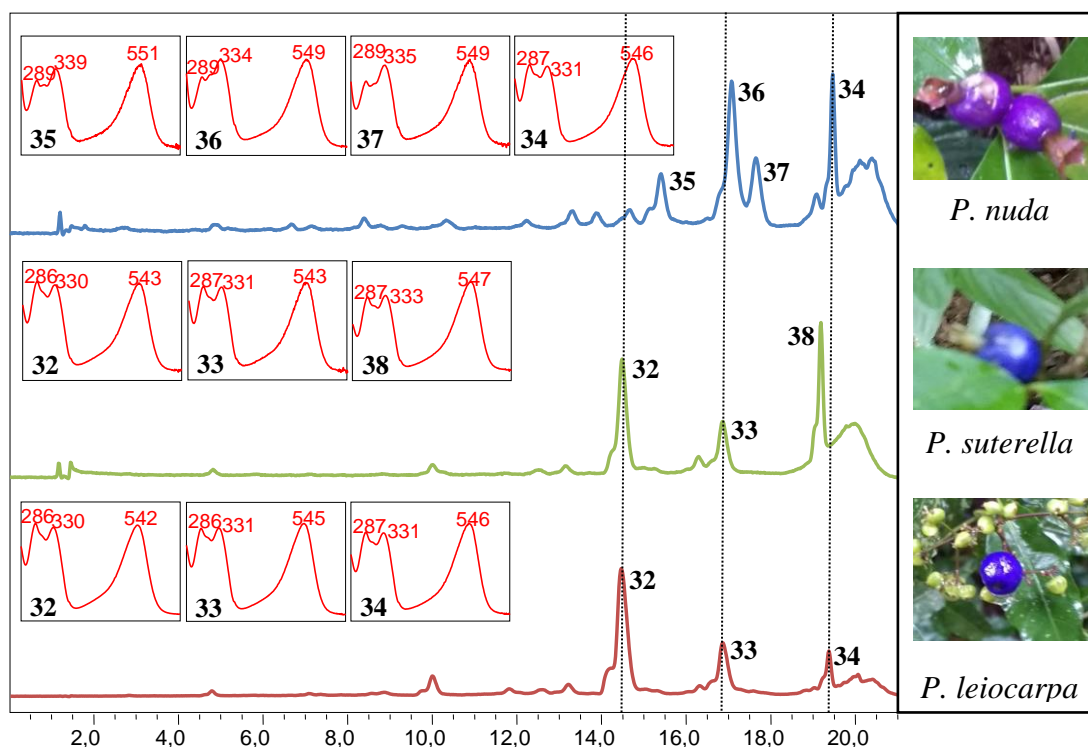
A ordem de eluição observada para as antocianinas identificadas no extrato de *P. leiocarpa* (Figura 58) é justificada pelo acréscimo de um grupo metil (metilação de hidroxila) na estrutura da substância **33** e dois na substância **34**, em relação a substância **32**. A conversão de hidroxila em metoxila produz redução da polaridade da substância.

A interpretação minuciosa dos dados espectrais de RMN uni e bi-dimensional, UV-Vis e massas e a comparação com dados espectroscópicos de substâncias similares disponíveis na literatura (MORIYA *et al.*, 2015; YOSHIDA *et al.*, 1991) permitiram a identificação das substâncias isoladas como **Delfinidina-3-O-(6-O-(E)-feruloil-β-gentiobiosil)-7-O-(6-O-(E)-feruloil-β-glicopiranosil)** (substância **32**), **Petunidina-3-O-(6-O-(E)-feruloil-β-gentiobiosil)-7-O-(6-O-(E)-feruloil-β-glicopiranosil)** (substância **33**) e **Malvidina-3-O-(6-O-(E)-feruloil-β-gentiobiosil)-7-O-(6-O-(E)-feruloil-β-glicopiranosil)** (substância **34**). Este é o primeiro relato destas substâncias na literatura.

### 5.2.3.2.1. Comparação do extrato de *P. leiocarpa* com o extrato de outras espécies do gênero *Psychotria*

Na literatura existem relatos de antocianinas aciladas envolvidas na produção da coloração azul em flores. As espécies *P. brachyceras*, *P. laciniata*, *P. leiocarpa*, *P. nitidula*, *P. nuda* e *P. suterella* *Psychotria* são algumas do gênero *Psychotria* que apresentam frutos com coloração azulada. Esta semelhança, encontrada no gênero, é incomum no reino vegetal, especialmente em frutos. Neste contexto, este é um indício de que as antocianinas encontradas em *P. leiocarpa* poderão ser encontradas em outras espécies do gênero.

Foi realizada uma análise preliminar das antocianinas de *P. suterella* e *P. nuda*, através da comparação com perfil cromatográfico das antocianinas do extrato de *P. leiocarpa* (vide item 4.6.4). A Figura 83 apresenta o cromatograma do extrato do fruto de *P. leiocarpa*, *P. suterella* e *P. nuda* a 520 nm, bem como os espectros UV-Vis dos picos majoritários.



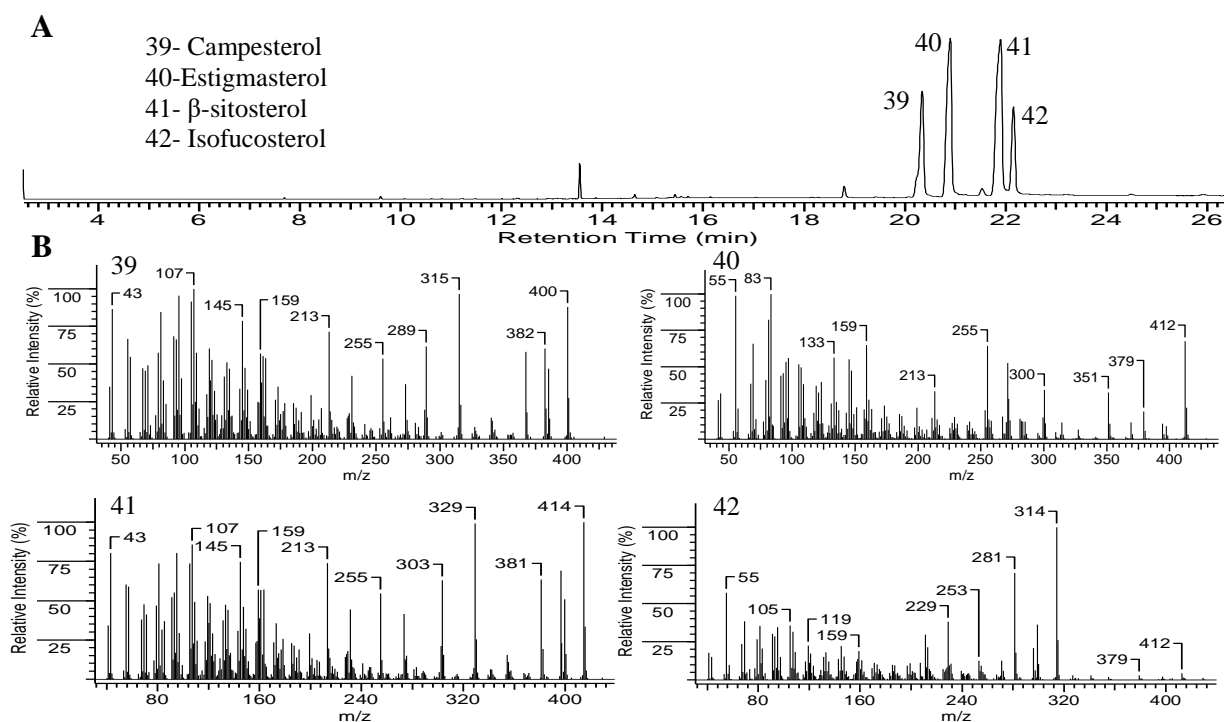
**Figura 83.** Cromatograma a 520 nm dos extratos de *P. leiocarpa* (linha vermelha), *P. suterella* (linha verde) e *P. nuda* (linha azul)

Através da comparação do tempo de retenção e espectro de UV-Vis foram identificadas nas frutos de *P. suterella* as antocianinas **Delfinidina-3-O-(6-O-(E)-feruloil-β-gentiobiosil)-7-O-(6-O-(E)-feruloil-β-glicopiranosil)** (substância 32) e **Petunidina-3-O-(6-O-(E)-feruloil-**

$\beta$ -gentiobiosil)-7-O-(6-O-(E)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil) (substância **33**) e nos frutos de *P. nuda* a antocianina **Malvidina-3-O-(6-O-(E)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-O-(6-O-(E)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil)** (substância **34**). As substâncias **35**, **36**, **37** e **38** não foram identificadas.

#### 5.2.4. Isolamento e determinação estrutural das substâncias da fase orgânica

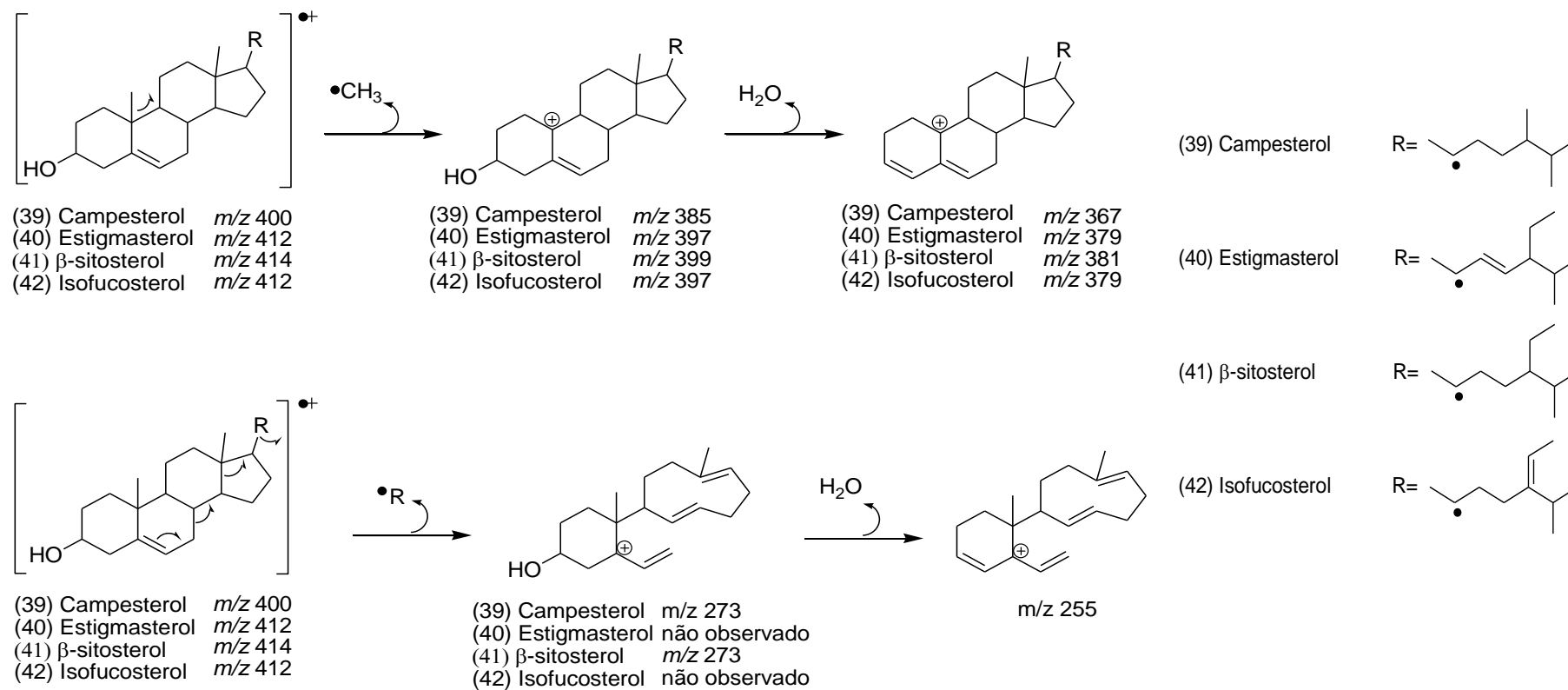
A fração de clorofórmio (390 mg) obtida conforme descrito no item 4.6.1 foi cromatografada em coluna de sílica gel (item 4.6.3) com um gradiente de Hexano/Diclorometano/Clorofórmio/Metanol e forneceu uma mistura de quatro substâncias (6,5 mg). Esta mistura foi analisada por CG-EM (Figura 84), os espectros de massas obtidos foram comparados com a biblioteca da National Institute of Standards and Technology (NIST).



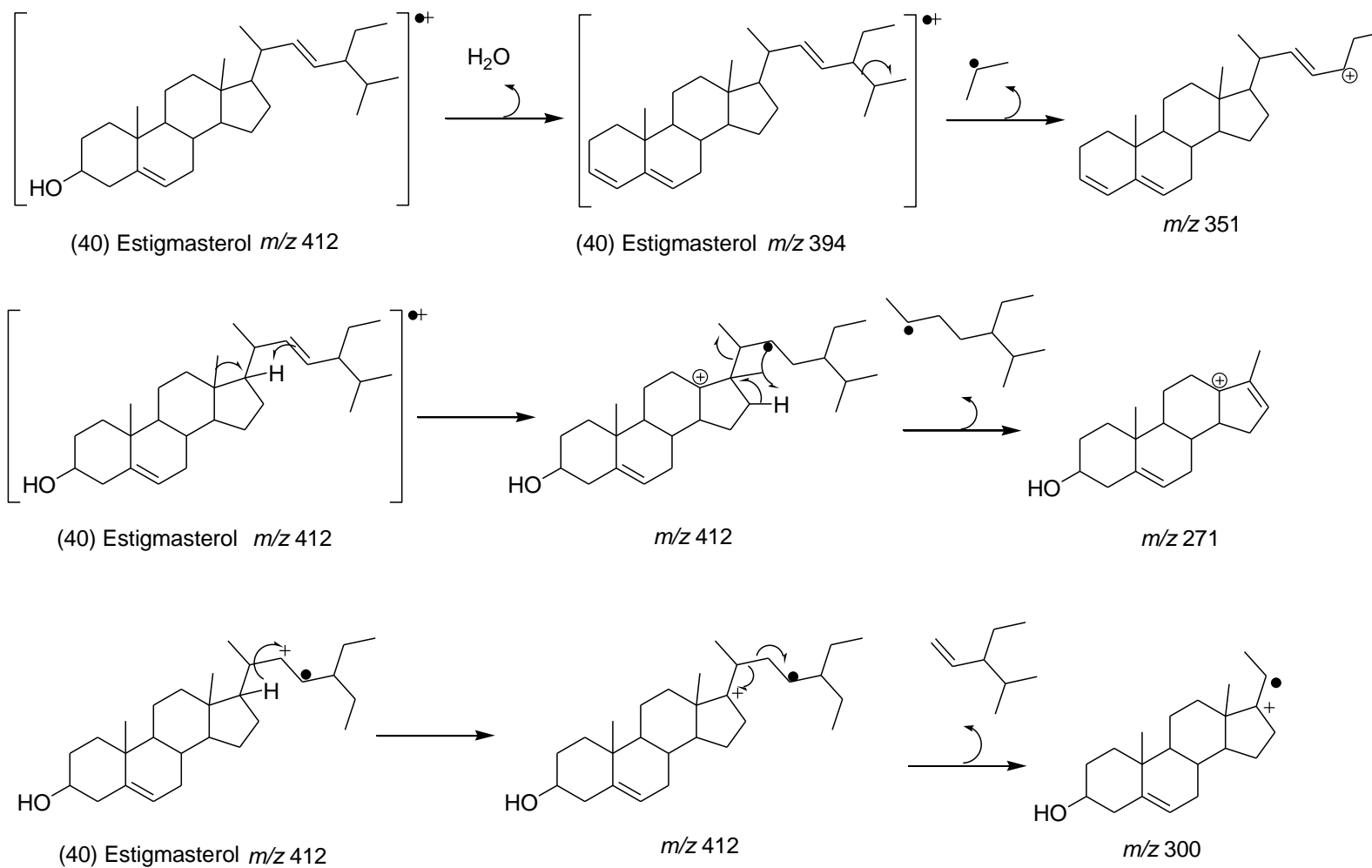
**Figura 84.** Cromatograma dos esteróis de *P. leiocarpa* obtidos por CG-EM (A) e espectro de massa das substâncias majoritárias (B)

As Figuras 85, 86 e 87 apresentam as propostas de fragmentação para os principais fragmentos observados nos espectros de massas dos esteróis correspondentes.

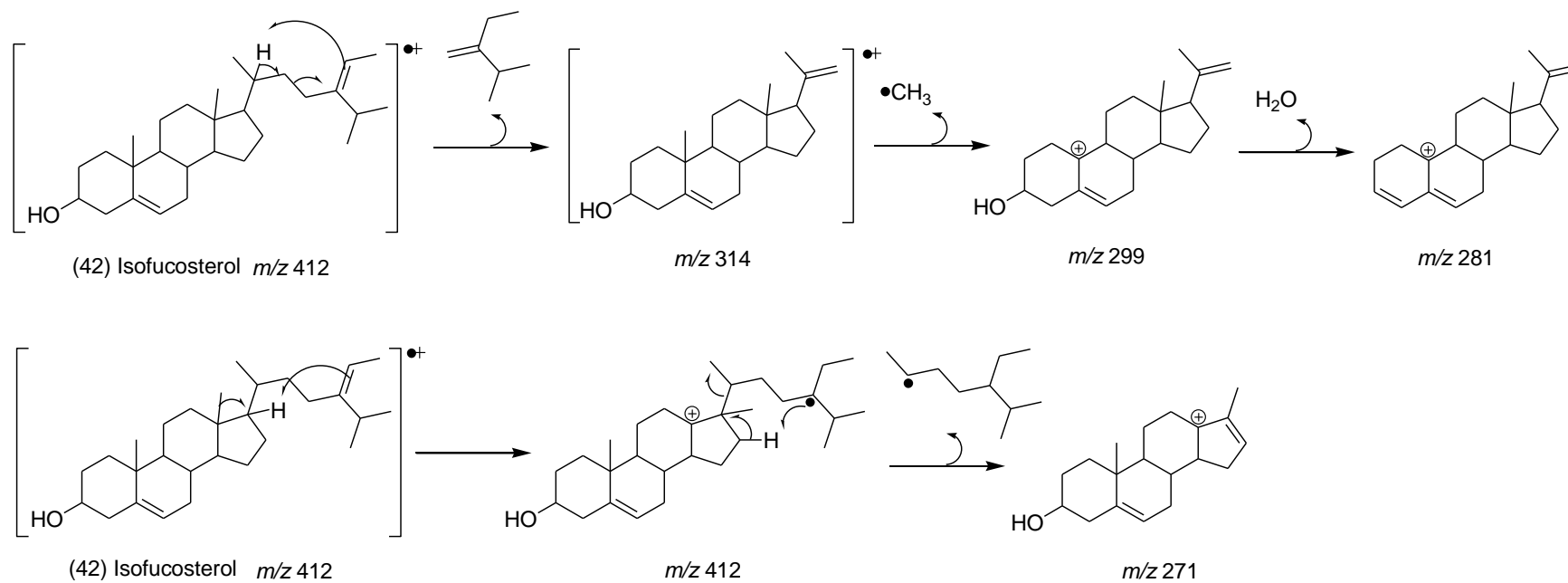




**Figura 85.** Proposta de fragmentação para os principais fragmentos observados no espectro de massas do **Campesterol (39)**, **Estigmasterol (40)**,  **$\beta$ -sitosterol (41)** e **Isfucosterol (42)**



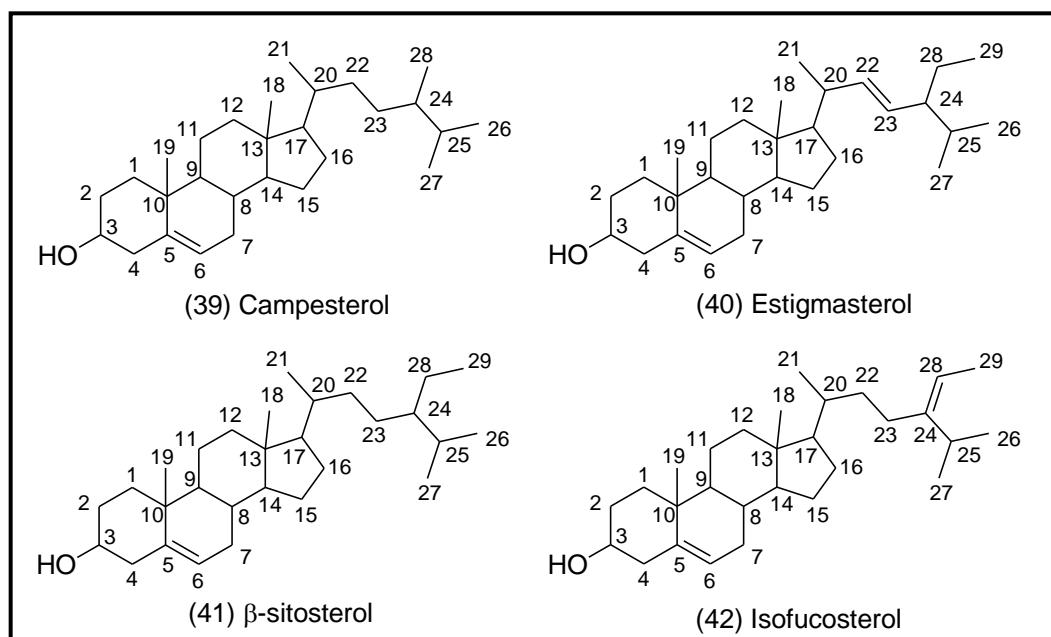
**Figura 86.** Proposta de fragmentação para os principais fragmentos observados no espectro de massas do **Estigmasterol (40)**



**Figura 87.** Proposta de fragmentação para os principais fragmentos observados no espectro de massas do **Isofucosterol (42)**

A mistura de esteróis foi analisada por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 88) e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 27 e Apêndice 15) uni e bi-dimensionais. O efeito gama observado em C-25 ( $\delta_{\text{C}}$  29,12 ppm) pela configuração *E* da ligação dupla entre C-24 e C-28 confirmou a estrutura do isofucoesterol. Os sinais em  $\delta_{\text{CH}}$  138,35 e  $\delta_{\text{CH}}$  129,26, característicos do carbono  $\text{sp}^2$ , foram atribuídos a CH-23 e CH-22 do estigmasterol, respectivamente. Os sinais em  $\delta_{\text{CH}_2}$  31,92 e  $\delta_{\text{CH}_2}$  26,02 foram atribuídos a  $\text{CH}_2$ -23 e  $\text{CH}_2$ -22 do  $\beta$ -sitosterol e campesterol.

A interpretação dos dados espectrais e a comparação com os dados da literatura permitiram a atribuição dos picos **39**, **40**, **41** e **42** ao Campesterol, Estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e Isofucoesterol, respectivamente (Figura 88). A integração dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 89) e das áreas dos picos no cromatograma por CG-EM permitiram identificar a proporção de 1:2:3:1 de isofucoesterol:estigmasterol: $\beta$ -sitosterol:campesterol.



**Figura 88.** Estrutura dos esteróis de *P. leiocarpa*

A Tabela 27 apresenta os dados espectrais dos esteróis isolados.

**Tabela 27.** Dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  dos esteróis de *P. leiocarpa*

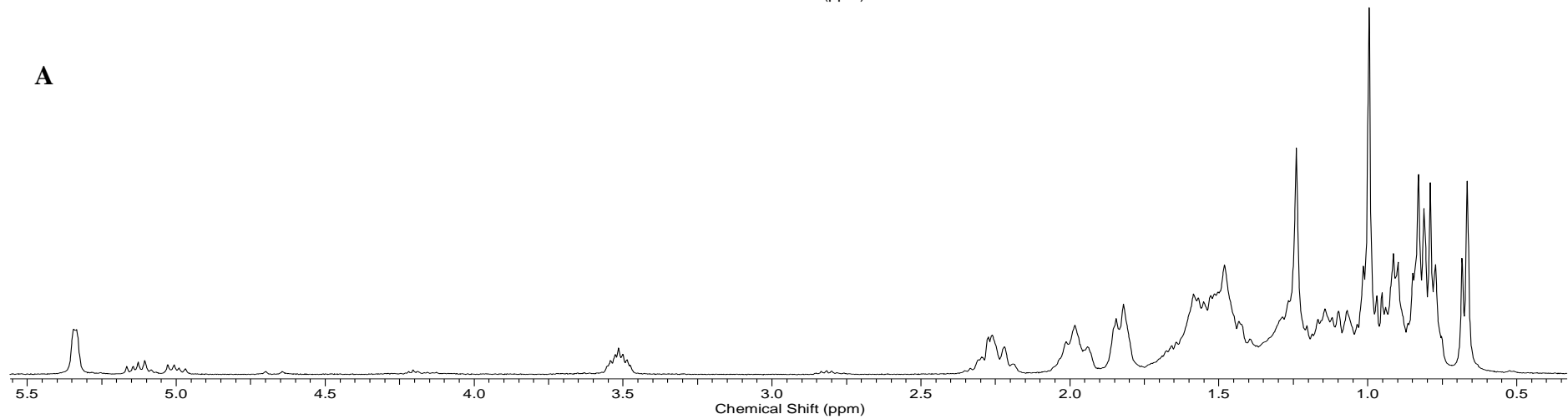
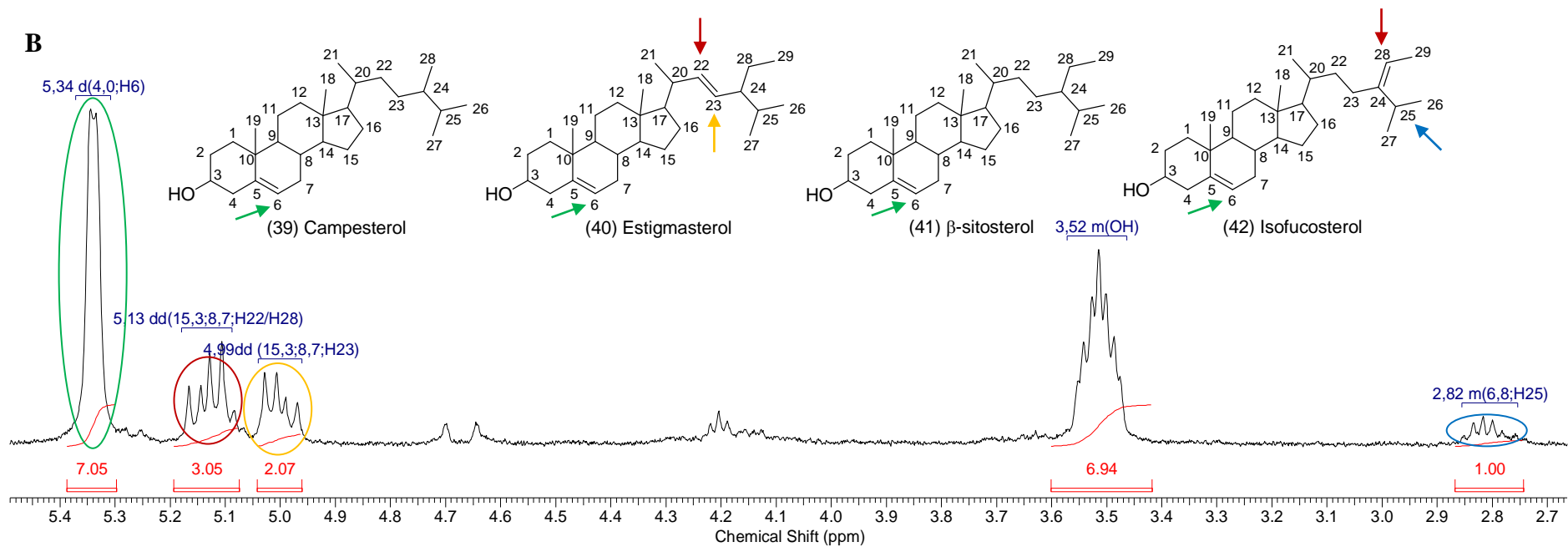
	$\beta$ -sitosterol (41) Campesterol (39)		Estigmasterol (40)		Isofucosterol (42)	
	$\delta_{\text{C}}$	$^{[1]}\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$^{[1]}\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$^{[2]}\delta_{\text{C}}$
<b>C</b>						
5	140,76	140,74	140,76	140,74	140,76	140,75
10	36,51	36,1	36,51	36,1	36,51	36,50
13	42,22	42,3	42,22	42,3	42,22	42,33
24	-	-	-	-	ND	145,88
<b>CH</b>						
3	71,83	71,8	71,83	71,8	71,83	71,80
5	-	-	-	-	-	-
6	121,75	121,7	121,75	121,7	121,75	121,71
8	31,90	31,9	31,90	31,9	31,90	31,91
9	50,11	50,1	50,11	50,1	50,11	50,12
7	-	-	-	-	-	-
14	56,86	56,8	56,86	56,8	56,76	56,75
17	56,93	56,0	56,93	56,0	55,93	55,99
20	40,54	39,8	40,54	39,8	36,16	36,16
22	-	-	138,35	138,3	-	-
23	-	-	129,26	129,3	-	-
24	45,82	45,8	51,25	51,2	-	-
25	29,12	29,0	31,90	31,9	31,9	29,12
28	-	-	-	-	-	116,43
						28,59
						116,46
<b>CH<sub>2</sub></b>						
1	37,25	37,3	37,25	37,3	37,25	37,24
2	31,66	31,9	31,66	31,9	31,66	31,66
4	42,30	42,2	42,30	42,2	42,30	42,30
7	33,93	33,9	33,93	33,9	31,92	31,91
11	21,08	21,1	21,08	21,1	21,08	21,08
12	39,76	39,8	39,76	39,8	39,67	39,71
15	24,31	24,3	24,31	24,3	24,31	22-24
16	28,96	28,9	28,96	28,9	29,72	28,22
22	31,92	32,0	-	-	-	35,93
23	26,02	26,0	-	-	-	28,27
28	23,05	23,0	25,43	25,4	25,4	-
						35,95
						27,89
						-
<b>CH<sub>3</sub></b>						
18	12,29	12,3	12,29	12,3	11,87	11,85
19	19,42	19,4	19,42	19,4	19,42	19,39
21	18,79	18,8	20,55	20,5	18,99	18,80
26	19,85	19,8	21,23	21,2	21,13	21,01
27	19,85	19,8	19,85	19,8	21,23	21,09
29	11,87	11,8	12,00	11,9	12,78	12,74

O espectro RMN-DEPTQ foi usado para identificar o número de hidrogênios em cada carbono. Os valores de  $J$  foram deduzidos do espectro de RMN 1D  $^1\text{H}$  e os espectros 2D COSY, HMBC, HSQC e NOESY cooperaram para o assinalamento  $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ .

[1] Gangwal, *et al.*, 2010.

[2] McInnes, *et al.*, 1980

ND= Não detectado



**Figura 89.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, em clorofórmio-*d*) da **mistura de esteróis** (substância **39**, **40**, **41** e **42**) (A) e expansão das regiões  $\delta$ H 2,7 à 5,5 (B).

## 6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo fitoquímico dos frutos da espécie *Myrcia multiflora*, resultando na identificação e quantificação de dezenove substâncias, dentre elas estão sete carotenoides, cinco antocianinas e sete ácidos fenólicos. Além disso, quatro flavonóis foram isolados e identificados. O perfil e concentração das substâncias foi similar ao de outras espécies da família Myrtaceae.

Os frutos de *M. multiflora* apresentaram a terceira maior capacidade antioxidante quando comparado com dezoito frutos nativos. A diversidade e a concentração de substâncias fenólicas e carotenoides encontradas nesta espécie justificam bom resultado de capacidade antioxidante.

O conhecimento fitoquímico e a alta capacidade antioxidante observada para os frutos de *M. multiflora* agregam valor à espécie e incentivam seu consumo como matéria prima alimentícia. Estes fatores somados a coloração roxa intensa dos frutos tornam esta espécie um candidato para uso corante alimentício natural com potencial de melhorar a funcionalidade do alimento.

Este é o primeiro estudo fitoquímico dos frutos de *P. leiocarpa*, resultando na identificação de oito substâncias dentre elas estão três antocianinas aciladas, quatro esteróis e um ácido fenólico.

É importante ressaltar que as antocianinas aciladas Delfinidina-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil) (substância **32**), Petunidina-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil) (substância **33**) e Malvidina-3-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -gentiobiosil)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-feruloil- $\beta$ -glicopiranosil) (substância **34**) caracterizadas estruturalmente neste trabalho são pelo o que nos consta inéditas na literatura.

Os frutos da espécie *P. leiocarpa* apresentam coloração azul intensa. Existem relatos de antocianinas aciladas envolvidas na produção da coloração azul. Foram encontradas evidências da copigmentação intramolecular nas antocianinas identificadas nos frutos, este fenômeno pode estar envolvido no desenvolvimento da coloração observada para o fruto.

Foi realizado um estudo preliminar das antocianinas dos frutos de *P. suterella* e *P. nuda* através da comparação com o extrato de *P. leiocarpa*. Foram identificadas pela primeira vez duas antocianinas aciladas nos frutos de *P. suterella* e uma nos frutos de *P. nuda*. Além das espécies analisadas há outras espécies deste gênero que produzem frutos com coloração azul.

Este é um resultado relevante, pois sinaliza que podem existir antocianinas aciladas em outras espécies do gênero. Tornando o gênero uma potencial fonte de antocianinas aciladas.

Os resultados obtidos com este trabalho promoveram o conhecimento de dois frutos de espécies nativas, envolvendo a caracterização de substâncias inéditas e identificação de substâncias bioativas, destacando a importância do estudo dos frutos da biodiversidade brasileira, ainda pouco explorados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; LOTTES, M.; WAIBEL, R.; KARIKAS, G. A.; CARREA, M. D.; GUPTA, A. M. P. Alkaloids and other compounds from *Psychotria correae*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1537, 1995.

ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIERREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. BOUND phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus Editora Ltda., 341p. 1993.

ALVES, M. F.; NIZIO, D. A. C.; SAMPAIO, T. S.; JUNIOR, A. F. N.; BRITO, F. A.; MELO, J. O.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; GAGLIARDI, P. R.; MACHADO, S. M. F.; BLANK, A. F. *Myrcia lundiana* Kiaersk native populations have different essential oil composition and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 266-273, 2016.

AMORIM-CARRILHO, K. T.; CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49-73, 2014.

ANDRADE, J.M.M.; BIEGELMEYER, R.; XAVIER, C.A.G.; BORDIGNON, S.A.L.; MORENO, P.R.H.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T.; APEL, M.A. Essential Oil Constituents of *Psychotria leiocarpa*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 649-650, 2010.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**; 18th ed. AOAC: Gaithersburg, Maryland, 2005.

BAEK, D.-R.; LEE, M.-J.; BAEK, N.-I.; SEO, K.-H.; LEE, Y.-H. Phenolic compounds from the leaves of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 103-106, 2016.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Biological Activities of Constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 565, 2005.



BRAGA, E.C.O. Caracterização química de substâncias bioativas dos frutos de duas espécies do gênero *Eugenia*. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v.1, n.5, p.405-445, 1994.

BOMBO, R.P.A; AFONSO, M.S.; MACHADO, R.M.; LAVRADOR, M.S.F.; NUNES, V.S.; QUINTÃO, E.R.; KOIKE, M.; CATANOZI, S.; LIN, C.J.; NAKANDAKARE, E.R.; LOTTENBERG, A.M. Dietary phytosterol does not accumulate in the arterial wall and prevents atherosclerosis of LDLr-KO mice. **Atherosclerosis**, v. 231, p. 442-447, 2013.

BOTH, F.L.; KERBER, V.A.; HENRIQUES, A.T.; ELISABETSKY, E. Analgesic Properties of Umbellatine from *Psychotria umbellata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 5, p. 336–341, 2002.

BONTA, R. K. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, p. 349-364, 2017.

CHANDRASEKARA, A. Phenolic Acids. **Reference Module in Food Science**, 2018.

CHOI, J-S.; BAE, J-Y.; KIM, D.S.; LI, J.; KIM, J-L.; LEE, Y-J.; KANG, Y-H. Dietary Compound Quercitrin Dampens VEGF Induction and PPAR $\gamma$  Activation in Oxidized LDL-Exposed Murine Macrophages: Association with Scavenger Receptor CD36. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.1333-1341, 2010.

CHOI, E.M. Protective effect of quercitrin against hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 211– 216, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. 2006. 453 p.

CORRÊA, L.R.; SOARES, G.L.G.; FETT-NETO, A.G. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 583–590, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; SILVA, I.; FREITAS, M.A.; GONDIM, C.N.F.L.; ANDRADE, J.C. Análise Físico-química e Avaliação Antimicrobiana do Fruto Cambuí (*Myrcia multiflora*). **Revista de Biologia Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 96-103, 2013.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5.ed. Rio de Janeiro: Ed. Bertrand do Brasil, 1995. 599p.

DAVID, J.M.; CRUZ, F.G.; GUEDES, M.L.S.; CHÁVEZ, J.P. Flavonol glycosides from *Davilla flexuosa*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 7, n. 2, p. 115-118, 1996.

DUARTE, L.J.; CHAVES, V.C.; NASCIMENTO, M.V.P.S.; CALVETE, E.; LI, M.; CIRAOLO, E.; GHIGO, A.; HIRSCH, E.; SIMÕES, C.M.O.; REGINATTO, F.H.; DALMARCO, E.M. Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. **Food Chemistry**, v. 247, p. 56-65, 2018.

DUONG, S.; STROBEL, N.; BUDDHADASA, S.; AULDIST, M.J.; WALES, W.J.; ORBELL, J.D.; CRAN, M.J. Quantitative Instrumental Analysis of Phytosterols in Fortified Foods. **Reference Module in Food Science**, 2017.

DYRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELD, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. **Food Chemistry**, v. 72, p. 431-437, 2001.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons, LTD, 2002.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research**, v. 540, p. 1-18, 2003.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; ALBUQUERQUE, R.R.; NUNES, D.S.; CARVALHO, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. Alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

ENGELHARDT, H. One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. **Journal of chromatography B**, v.800, p.3-6. 2004.

FEKETE, S.; OLÁH, E.; FEKETE, J. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. **Journal of chromatography A**, v.1228, p.57-71. 2012.

FERNANDES, A.; BRÁS, N.F.; MATEUS, N.; FREITAS, V. A study of anthocyanin self-association by NMR spectroscopy. **New Journal of Chemistry**, v. 39, p. 2602-2611, 2015.

FERREIRA, E.A. Efeitos hipolipemiante e hepatoprotetor da trihidroxiacetofenona isolada de *Myrcia multiflora*. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Instituto de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina.

FERREIRA, E.A.; GRIS, E.F.; REBELLO, J.M. CORREIA, J.F.G.; OLIVEIRA, L.F.S.; FILHO, D.W.; PEDROSA, R.C. The 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone Isolated from *Myrcia multiflora* Has Antiobesity and Mixed Hypolipidemic Effects with the Reduction of Lipid Intestinal Absorption. **Planta Medica**, v. 77, p. 77: 1569–1574, 2011.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N.C.; MOURA, D.J.; SILVA, A.C.R.; RICHTER, M.F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A.G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v. 22 p. 559–566, 2008.

GANGWAL, A.; PARMAR, S. K.; SHETH, N. R. Triterpenoid, flavonoids and sterols from *Lagenaria siceraria* fruits. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 1, p. 307-317, 2010.

GENG, D.; CHI, X.; DONG, Q.; HU, F. Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 492–497, 2015.

GIUFFRIDA, D.; ZOCCALI, M.; ARIGÒ, A.; CACCIOLA, F.; ROA, C. O.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Comparison of different analytical techniques for the analysis of carotenoids in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p. 161-167, 2018.

GIUSTI, M.M.; RODRÍGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4631-4637, 1999.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p. 217-225, 2003.

GOUVÊA, A.C.M.S.; SANTIAGO, M.C.P.A.; SCHULZ, D.F.; PACHECO, S.; GODOY, R.L.O.; CABRAL, L.M.C. Isolamento de padrões de antocianinas (Cianidina-3-*O*-glucosídeo e Cianidina-3-*O*-rutinosídeo) de açaí liofilizado (*Euterpe oleraceae* Mart.) por CLAE. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 32, v. 1, p. 43-46, 2012.

GOUVÊA, A.C. M.S.; SANTIAGO, M.C.P.A.; OLIVEIRA, L.M.; GODOY, R.L.O.; PEIXOTO, F.M.; PACHECO, S.; NASCIMENTO, L.S.M., BORGUINI, R.G. Isolamento das antocianinas do epicarpo de uvas pretas (*Vitis* spp.) por CLAE/DAD e sua identificação através do sistema CLUE-QTOF-ESI/EM/EM. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 6, n. 1/2, p. 37-45, 2014.

GOUVÊA, A.C.; MELO, A.; SANTIAGO, M.C.; PEIXOTO, F.M.; FREITAS, V.; GODOY, R.L.; FERREIRA, I.M. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira na endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. **Food Chemistry**, v.185, p. 277-283, 2015.

GOWD, V.; JIA, Z.; CHEN, W. Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes e A review of recent advances. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 1-13, 2017.

GRAJEDA-IGLESIAS, C.; FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; BAROUH, N.; BARÉA, B.; FERNANDES, A.; FREITAS, V.; SALAS, E. Isolation and Characterization of Anthocyanins from Hibiscus sabdariffa Flowers. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 1709–1718, 2016.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** v. 55, p. 481-504, 2000.

HASAN, S.; SINGH, K.; DANISUDDIN, M.; VERMA, P.K.; KHAN, A.U. Inhibition of Major Virulence Pathways of Streptococcus mutans by Quercitrin and Deoxynojirimycin: A Synergistic Approach of Infection Control. **Plos One**, v. 9, 2014.

HAYASHI, T.; SMITH, F. T.; LEE, K. H. Antitumor Agents. 89.1 Psychorubrin, a New Cytotoxic Naphthoquinone from Psychotria rubra and Its Structure-Activity Relationships. **Journal of Medical Chemistry**, v. 30, p, 2005, 1987.

HE, J.; GIUST, M.M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7914– 7922, 2011.

HENDRIKS, H.F.J.; WESTSTRATE, J.A.; VLIET, T.; MEIJER, G.W. Spreads enriched with three different levels of vegetable oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 319-397, 1999.

HÉRON, S.; CHARBONNEAU, D.; ALBISSON, P.; ESTIEVENART, G.; GRONI, S.; TCHAPLA, A. A new methodology to determine the isoelectronic conditions on ultra-performance flash purification stationary phases from analytical reversed liquid chromatography stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1397, p. 59-72, 2015.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. **Lancet**, v.349, p.699-699, 1997.

HOBBS, A. N.; YOUNG, R. J. Practical purification of hydrophilic fragments and lead/drug-like molecules by reverse phase flash chromatography: tips, tricks and contemporary developments. **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 148-154, 2013.

HUANG, Y-Y.; LIU, X-F.; LIU, J-Z.; LI, L.; CUI, Q.; WANG, L-T.; FU, Y-J.; LUO, M. Separation and purification of indigotin and indirubin from *Folium isatidis* extracts using a fast and eficiente macroporous resin column followed reversed phase flash chromatography. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 67, p. 61-68, 2016.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A. P.; GUALTIERI, S. C. J.; MOLINILLO, J. M. G.; LACRET, R.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29-35, 2013.

JESUS, I. C.; FRAZÃO, G. G. S.; BLANK, A. F.; SANTANA, L. C. L. A. *Myrcia ovata* Cambessedes essential oils: A proposal for a novel natural antimicrobial against foodborne bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 142-147, 2016.

JUNIOR, A.R.C.; CARVALHO, BRAZ-FILHO, R.; M.G.; VIEIRA, I.J.C. Psychotria Genus: Chemical Constituents, Biological Activities, and Synthetic Studies. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 48, p. 231-261, 2016.

JUNIOR, A.R.C.; VIEIRA, I.J.C.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; LIMA, M.A.; FERREIRA, R.O.; MARIA, E.J.; OLIVEIRA, D.B. <sup>13</sup>C-NMR Spectral Data of Alkaloids Isolated from *Psychotria Species* (Rubiaceae). **Molecules**, v. 22, n. 103, p. 1-22, 2017.

KO, C-H.; SHEN, S-C.; LEE, T.J.F.; CHEN, Y-C. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, p. 281-290, 2005.

KÜHLER, T.C.; LINDSEN, G.R. Preparative reversed-phase flash chromatography, a convenient method for the workup of reaction mixtures. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 3589-3591, 1983.

KULCZYNSKI, B.; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A.; KOBUS-CISOWSKA, J.; KMIECIK, D. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 45-65, 2017.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas, SP: Editora Átomo, 382 f. 2009.

LEE, D. G.; LEE, J.; KIM, K-T.; LEE, S-W.; KIM, Y-O.; CHO, I-H.; KIM, H-J.; PARK, C-G.; LEE, S. High-performance liquid chromatography analysis of phytosterols in *Panax ginseng* root grown under different conditions. **Journal of Ginseng Research**, n. 42, p. 16-20, 2018.

LI, X.-N.; ZHANG, Y.; CAI, X.-H.; FENG, T.; LIU, Y.-P.; LI, Y.; REN, J.; ZHU, H.-J.; LUO, X.-D. Psychotripine: A New Trimeric Pyrroloindoline Derivative from *Psychotria pilífera*. **Organic Letters**, v. 13, p. 5896, 2011.

LIMA, R. C. L.; KATO, L.; KONGSTAD, K. T.; STAERK, D. Brazilian insulin plant as a bifunctional food: Dual high-resolution PTP1B and  $\alpha$ -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPENMR for identification of antidiabetic compounds in *Myrcia rubella* Cambess. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p.444-451, 2018.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; S, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LINNEWIEL-HERMONI, K.; KHANIN, M.; DANILENKO, M.; ZANGO, G.; AMOSI, Y.; LEVY, J.; SHARONI, Y. The anti-cancer effects of carotenoids and other phytonutrients resides in their combined activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 572, p. 28-35, 2015.

LIOBIKAS, J.; SKEMIENE, K.; TRUMBECKAITE, S.; BORUTAITE, V. Anthocyanins in cardioprotection: A path through mitochondria. **Pharmacological Research**, v. 113, p.808-815, 2016.

LIVENGOOD, J. Why was M. S. Tswett's chromatographic adsorption analysis rejected? **Studies in history and philosophy of science**, v.40, p.57-69. 2009.

LOPES, S. O. ; MORENO, P. R. H.; HENRIQUES, A. T. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 259–264, 2000.

LOPES, S.; VON POSER, G.L.; KERBER, V.A.; FARIAS, F.M.; KONRATH, E.L.; MORENO, P.; SOBRAL, M.E.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32 p. 1187–1195, 2004.

LOPES, A. C. S. Estudo químico e isolamento de flavonoides de *Myrcia* spp. ocorrentes em Amazônia de terra firme. 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas.

LU, Q.; WANG, J.; KONG, L. Chemical constituents from *Psychotria yunnanensis* and its chemotaxonomic study. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 52, p. 20, 2014.

LU, H.-X.; LIU, L.-Y.; LI, D.-P.; LI, J.-Z.; XU, L.-C. A new iridoid glycoside from the root of *Psychotria rubra*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 57, p. 133-136, 2014.

MALDANER, L. & JARDIM, I. C. S. F. O Estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, v.32, n.1, p.214-222. 2009.

MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1 A theory of chromatography, 2 Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. **Biochemical Journal**, v. 35, p. 1358-1368, 1941.

MARIUTTI, L.R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 648, p. 36-43, 2018.

MARTINS, M.D.M. Efeito da esterilização sobre os teores de licopeno em molhos de tomates adicionados à conservas de sardinhas (*Sardinellas brasiliensis*). 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MARTINS, M.A.R.; SILVA, L.P.; FERREIRA, O.; SCHRÖDER, B.; COUTINHO, J.A.P.; PINHO, S.P. Terpenes solubility in water and their environmental distribution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 996–1002, 2017.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. V. Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, IV, and V. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 429-31, 2002a.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 50, n. 6, p. 788—795, 2002b.

MATSUURA, H.N.; FRAGOSO, V.; PARANHOS, J.T.; RAU, M.R.; FETT-NETO, A.G. The bioactive monoterpene indole alkaloid N,-d-glucopyranosyl vincosamide is regulated by irradiance quality and development in *Psychotria leiocarpa*. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 210–218, 2016.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3660-3667, 2002.

MCINNES, A.G.; WALTER, J.A.; WRIGHT, J.L.C.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of  $\Delta^{24(28)}$  Phytosterols. **Organic Magnetic Resonance**, v. 13, n. 4, p. 302-303, 1980.

MC MASTER, M. C. **HPLC a practical user's guide**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. 2007. 202 p.

MEOTTI, F.C. Análise dos Mecanismos de Ação Antinociceptiva e Antiinflamatória do Flavonoide Miricitrina: Estudos *in vivo* e *in vitro*. 2006. 132. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria.

MEYER, V. R. **Practical High Performance Liquid Chromatography**. New York, NY, USA: John Wiley & Sons. 1997. 376 p.

MOGHADASIAN, M.H.; ALSAIF, M.; LE, K.; GANGADARAN, S.; MASISI, K.; BETA, T.; SHEN, G.X. Combination effects of wild rice and phytosterols on prevention of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33 p. 128–135, 2016.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Zs. Chromatographic, capillary eletrophoretic and capillary eletrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1073, p. 201-227, 2005.

MOORE, S; STEIN, W. H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. **Methods in Enzymology**, v. 6, p. 819-831, 1963.

MORAES, T.M.S.; ARAÚJO, M.H.; BERNARDES, N.R.; OLIVEIRA, D.B.; LASUNSKAIA, E.B.; MUZITANO, M.F.; CUNHA, M. Antimycobacterial Activity and Alkaloid Prosepction of Psychotria Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Planta Medica**, v. 77, p. 964–970, 2011.

MORAIS, C.A.; ROSSO, V.V.; ESTADELLA, D.; PISANI, L.P. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 1-7, 2016.

MOREAU, R.A.; NYSTRÖMB, L.; WHITAKER, B.D.; WINKLER-MOSER, J.K.; BAER, D.J.; GEBAUER, S.K.; HICKS, K.B. Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 35-61, 2018.

MOREAU, R.A.; WHITAKER, B.D.; HICKS, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 457–500,2002.

MORENO, B. P.; FIORUCCI, L. L. R.; CARMO, M. R. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; BALDOQUI, D. C. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of Psychotria vellosiana Benth. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. V. 56, p. 80, 2014.

MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga. **Ciência e Cultura**, v. 28, n. 10, p. 1185-1189, 1976.

MORIYA, C.; HOSOYA, T.; AGAWA, S.; SUGIYAMA, Y.; KOZONE, I.; SHIN-YA, K.; TERAHARA, N.; KUMAZAWA, S. New acylated anthocyanins from purple yam and their antioxidant activity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, p. 1484–1492, 2015.

NASCIMENTO, L. S. M., SANTIAGO, M. C. P. A.; OLIVEIRA, E. M. M.; BORGUINI, R. G.; BRAGA, E. C. O.; MARTINS, V. C.; PACHECO S.; SOUZA, M. C.; GOGOY, R. L. O. Characterization of Bioactive Compounds in *Eugenia brasiliensis*, Lam. (Grumixama). **Nutrition and Food Technology: Open Access**, v. 3, p. 2-7, 2017.

NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z. Vantagens e desvantagens das colunas C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub> para a separação de carotenóides por CLAE. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 539-546, 2006.



PACHECO, S. Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PACHECO, S.; GODOY, R.L.O.; PEIXOTO, F.M.; GOUVÊA, A.C.M.S.; SANTIAGO, M.C.P.A.; FELBERG, I.; BORGUINI, R.G. Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. *Analytical Chemistry An Indian Journal*, v. 12, n. 5, p. 194-197, 2013.

PHENOMENEX HOME PAGE. Core Shell Technology. Disponível em <<http://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>> Acesso em 20 de fevereiro de 2013.

PIC-TAYLOR, A.; MOTTA, L. G.; MORAIS, J. A.; JUNIOR, W. M.; SANTOS, A. F. A.; CAMPOS, L. A.; MORTARI, M. R.; ZUBEND, M. V.; CALDAS, E. D. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. *Behavioural Processes*, v. 118, p. 102-110, 2015.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A.; TOIVO, J.; LAMPI, A-M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 939-966, 2000.

PIMENTA, A. T. A.; BRAZ-FILHO, R.; DELPRETE, P. G.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. Structure elucidation and NMR assignments of two unusual monoterpene indole alkaloids from *Psychotria stachyoides*. *Magnetic Resonance Chemistry*, v. 48, p. 734, 2010.

PINA, F.; MELO, M.J.; LAIA, C.A.T.; PAROLA, A.J.; LIMA, J.C. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chemical Society Reviews*, v. 41, p. 869–908, 2012.

PIRES, F.B.; DOLWITSCH, C.B.; PRÁ, V.D.; FACCIN, H.; MONEGO, D.L.; CARVALHO, L.M., VIANA, C.; LAMEIRA, O.; LIMA, F.O.; BRESSAN, L.; ROSA, M.B. Qualitative and quantitative analysis of the phenolic content of *Connarus* var. *angustifolius*, *Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata* and *Mansoa alliacea* based on HPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 27, p. 426–433, 2017.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. *Horticultural Science*, v.35, p.588-592, 2000.

REFLORA, *Rubiaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14188>>. Acesso em: 28 Abr. 2018

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p. 31-63, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, 64p, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, 2018.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; AVALOS, J.; BONET, M.L.; BORONAT, A.; GOMEZ-GOMEZ, L.; HORNERO-MENDEZ, D.; LIMON, M.C.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; PALOU, A.; RIBOT, J.; RODRIGO, M.J.; ZACARIAS, L.; ZHU, CHANGFU. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, v. 70, p. 62-93, 2018.

ROMERO, J. R. **Fundamentos de estereoquímica**. Ribeirão Preto, SP: USP. 1998, 108p.

RONCHI, H.S. Potencial Alimentício e Medicinal das Espécies Nativas da Área de Proteção Ambiental – APA Corumbataí, Botucatu e Tejupá – Perímetro Botucatu. 2017. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. S.; MATTA, V. M.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.4, p.837-846, 2007.

ROZENBERG, R.; RUIBAL-MENDIETA, N. L.; PETITJEAN, G.; CANID, P.; DELACROIXE, D. L.; DELZENNE, N. M.; MEURENS, M.; QUETIN-LECLERCQ; HABIB-JIWANA, J-L. Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. **Journal of Cereal Science**, n. 38, p. 189-197, 2003.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNES, J.; SURACALIXTO, F. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 128, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNES, J.; SURACALIXTO, F. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 127, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNES, J.; SURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, p. 996-1002, 2010.

SACCOL, E. M. H.; JEREZ-CEPA, I.; OURIQUE, G. M.; PÊS, T. S.; GRESSLER, L. T.; MOURÃO, R. H. V.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; MANCERA, J. M.;

BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; MARTOS-SITCHA, J. A. Myrcia sylvatica essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in Rhamdia quelen under different stress events associated to transport. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 150-160, 2018.

SAMPAIO, T. S.; NIZIO, D. A. C.; WHITE, L. A. S.; MELO, J. O.; ALMEIDA, C. S.; ALVES, M. F.; GAGLIARDI, P. R.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; JUNIOR, A. W.; SOBRAL, M. E. G.; BLANK, A. F. Chemical diversity of a wild population of Myrcia ovata Cambessedes and antifungal activity against Fusarium solani. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 196-209, 2016.

SANTIAGO, M.C.P.A.; GOUVÊA, A.C.M.S.; GODOY, R.L.O.; OIANO-NETO, J.; PACHECO, S; ROSA, J.S. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (Euterpe oleraceae Mart.). **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 162, 2010.

SANTOS, A.R.; BARROS, M.P.; SANTIN, S.M.O.; SARRAGIOTTO, M.H.; SOUZA, M.C.; EBERLIN, M.N.; MEURER, E.C. Constituintes Polares das Folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 525-527, 2004

SANTOS-BUELGA, C.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.M. Anthocyanins. **Reference Module in Food Science**, 2018.

SHAHZAD, N.; KHAN, W.; MD, S.; ALI, A.; SALUJA, S.S.; SHARMA, S.; AL-ALLAF, F.A. ABDULJALEEL, Z.; IBRAHIM, I.A.A.; ABDEL-WAHAB, A.F.; AFIFY, M.A.; AL-GHAMDI, S.S. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 786-794, 2017.

SHAO-QIAN, C.; SI-YI, P.; XIAO-LIN, Y.; HONG-FEI, F. Isolation and Purification of Anthocyanins from Blood Oranges by Column Chromatography. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 2, p. 207-215, 2010.

SIGURDSON, G.T., ROBBINS, R.J., COLLINS, T.M., GIUSTI, M.M. Molar Absorptivities ( $\epsilon$ ) and Spectral and Colorimetric Characteristics of Purple Sweet Potato Anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 497-504, 2019.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6ª edição, Editora LTC: Rio de Janeiro, 2000.

SOLIS, P. N.; LANG'AT, C.; GUPTA, M. P.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; PHILLIPSON, J. D. Compostos *Bioativos de Psychotria camponutans*. **Planta Medica**, v. 61, p. 62, 1995.

SONAWANE, P.D., POLLIER, J.; PANDA, S.; SZYMANSKI, J.; MASSALHA, H.; YONA, M.; UNGER, T.; MALITSKY, S.; ARENDT, P.; PAUWELS, L.; ALMEKIAS-SIEGL, E.; ROGACHEV, I.; MEIR, S.; CÁRDENAS, P.D.; MASRI, A.; PETRIKOV, M.; SCHALLER,

H.; SCHAFFER, A.A.; KAMBLE, A.; GIRI, A.P.; GOOSSENS, A.; AHARONI, A. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. **Nature Plants**, v. 3, n. 16205, p. 1-13, 2016.

SOUZA, M.C. Myrtaceae Juss. da Restinga da Marambaia, RJ – Brasil. 2005. 152 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical

SOUZA, M. C.; AMORIM, M. P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta bot. bras.** v.22, n.3, p.652-683, 2008.

STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923-2925, 1978.

STRINGHAM, J.M.; STRINGHAM, N.T. Serum and retinal responses to three different doses of macular carotenoids over 12 weeks of supplementation. **Experimental Eye Research**, v. 151, p.1-8, 2016.

SUN, Z.; ZHAO, L., ZUO, L.; QI, C.; ZHAO, P., HOU, X. UHPLC–MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids, gallic acid and 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Cortex Juglandis Mandshuricae extract. **Journal of Chromatography B**, v. 958 p. 55–62, 2014.

SWERA, T.L.; MUKHIM, C.; BASHIR, K.; CHAUHAN, K. Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 382-390, 2018.

TANG, G.; HUANG, Y.; ZHANG, T.; WANG, Q.; CROMMEN, J.; FILLET, M.; JIANG, Z. Determination of phenolic acids in extra virgin olive oil using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 157, p. 217-255, 2018.

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, v.15, p.790- 791, 1999.

TROUILLAS, P.; SANCHO-GARCÍA, J.C.; FREITAS, V.; GIERSCHNER, J.; OTYEPKA, M.; DANGLES, O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 4937–4982, 2016.

TUCAKOVICA, L.; COLSON, N.; SANTHAKUMAR, A.B.; KUNDUR, A.R.; SHUTTLEWORTH, M.; SINGH, I. The effects of anthocyanins on body weight and expression of adipocyte's hormones: Leptin and adiponectin. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p 173–180, 2018.

UCKOO, R. M.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. Rapid separation method of polymethoxyflavones from citrus using flash chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 81, p. 151-158, 2011.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. p. 103-109, junho, 1983.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 5, p. 271-289, 1956.

VEROTTA, L.; PILATI, T.; TATO, M.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNE, D. S. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 392-396, 1998.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALD, J.P.; NOHR, D.; BIESALSKI, H.K. Rapid and easy carotenoid quantification in Ghanaian starchy staples using RP-HPLC-PDA. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 119–127, 2018.

WANG, E.; YIN, Y.; XU, C.; LIU, J. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1327, p. 39-48, 2014.

WANGA, Y.; LUANA, G.; ZHOUA, W.; MENGA, J.; WANGA, H.; HUA, N.; SUO, Y. Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidante activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. **Food Chemistry**, v. 249, p. 119-126, 2018.

WATERS. Waters Synapt Mass Spectrometry System Operator's Guide. 2008.

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A. & QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**. v.88, p.2013-2025, 2001.

WOLLENWEBER, E.; DIETZ, V. H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 869-9321, 1981.

WU, S-B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E.J. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513–7525, 2012.

WUBSHET, S. G.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, I. M. C.; STAERK, D. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR: a-

Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). **Phytochemistry**, v. 116, p. 246-252, 2015.

XIE, Q.; WEI, Y.; ZHANG, G. Separation of flavonol glycosides from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 72, p. 229-233, 2010.

XIE, L.; SU, H.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. Recent advances in understanding the anti-obesity activity of anthocyanins and their biosynthesis in microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 13-24, 2018.

XING, L-Z.; NI, H-J. WANG, Y-L. Quercitrin attenuates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1136–1141, 2017.

YÁÑEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; TAKEMOTO, J. K.; VEGA-VILLA, K. R.; ANDREWS, P. K.; SAYRE, C. L.; MARTINEZ, S. E.; DAVIES, N. M. Polyphenols and flavonoids: an overview. In: I. John Wiley & Sons (Ed.). **Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology**, 2013.

YE, H.-C.; ZHENG, X.-H.; WANG, Y.-M.; PENG, G.-T.; SU, X.-J.; LEI, L.-F.; ZHANG, C.-X. **Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni**, v. 53, p. 93, 2014 apud.

YIN, Y.; LI, W.; SON, Y-O.; SUN, L.; LU, J.; KIM, D.; WANG, X.; YAO, H.; WANG, L.; PRATHEESHKUMAR, P.; HITRON, A.J.; LUO, J.; GAO, N.; SHI, X.; ZHANG, Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, p. 89–99, 2013.

YING, L.; JIA-YING, L.; JING, L.; MI-LU, L.; ZHONG-HUA, L. Preparative Separation of Anthocyanins from Purple Sweet Potatoes by High-Speed Counter-Current Chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 851–856, 2011.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. **American Journal Epidemiology**, v.149, p.943-949, 1999.

YOSHIDA, K.; KONDO, T.; KAMEDA, K.; KAWAKISHI, S.; LUBAG, A.J.; MENDOZA, E.M.T.; GOTO, T. Structures of alatanin A, B and C isolated from edible purple yam *Dioscorea alata*. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 40, p. 5575-5578, 1991.

YOSHIKAWA, M. et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 113-119, 1998.

YOKOMIZO, A. & MORIWAKI, M. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 69: 693-699, 2005.

ZAPPI, D.C.; FILARDI, F.L.R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V.C.; WALTER, B.M.T.; PIRANI, J.R.; MORIM, M.P.; QUEIROZ, L.P., CAVALCANTI, T.B.; MANSANO, V.F.; FORZZA, R.C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**; São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Cap. 12. 1º edição digital, p. 489- 501.

ZHANG, G.; CHEN, S.; ZHOU, W.; MENG, J.; DENG, K.; ZHOU, H.; HU, N.; SUO, Y. Rapid qualitative and quantitative analyses of eighteen phenolic compounds from *Lycium ruthenicum* Murray by UPLC-Q-Orbitrap MS and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, v. 269, p. 150-156, 2018.

ZHANG, C.-X.; PENG, G.-T.; HE, X.-X.; LIN, C.-Z.; XIONG, T.-Q.; DENG, J.-W.; ZHAO, Z.-X.; ZHU, C.-C. *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni*, v. 49, p. 147, 2010.

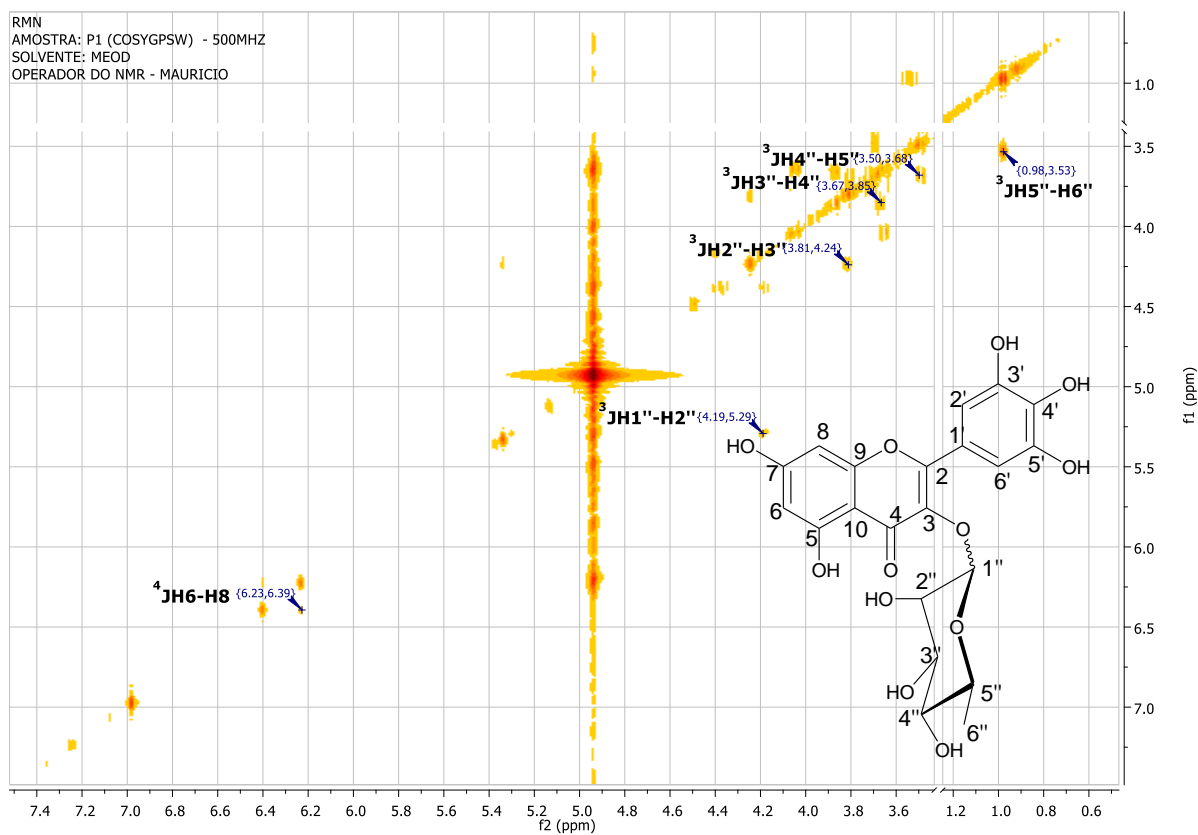
ZHAO, C-L.; YU, Y-Q.; CHEN, Z-J.; WEN, G-S.; WEI, F-G.; ZHENG, Q.; WANG, C-D.; XIAO, X-L. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, v. 214, p. 119-128, 2017.

ZHOUA, L.; WANGA, H.; YIB, J.; YANGD, B.; LIA, M.; HEA, D.; YANGD, W.; ZHANGA, Y.; NI, H. Anti-tumor properties of anthocyanins from *Lonicera caerulea* 'Beilei' fruit on human hepatocellular carcinoma: In vitro and in vivo study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 104, p. 520–529, 2018.

ZOUA, H.; MAC, Y.; XU, Z.; LIAO, X.; CHEN, A.; YANG, S. Isolation of strawberry anthocyanins using high-speed counter-current chromatography and the copigmentation with catechin or epicatechin by high pressure processing. *Food Chemistry*, v. 247, p. 81–88, 2018.

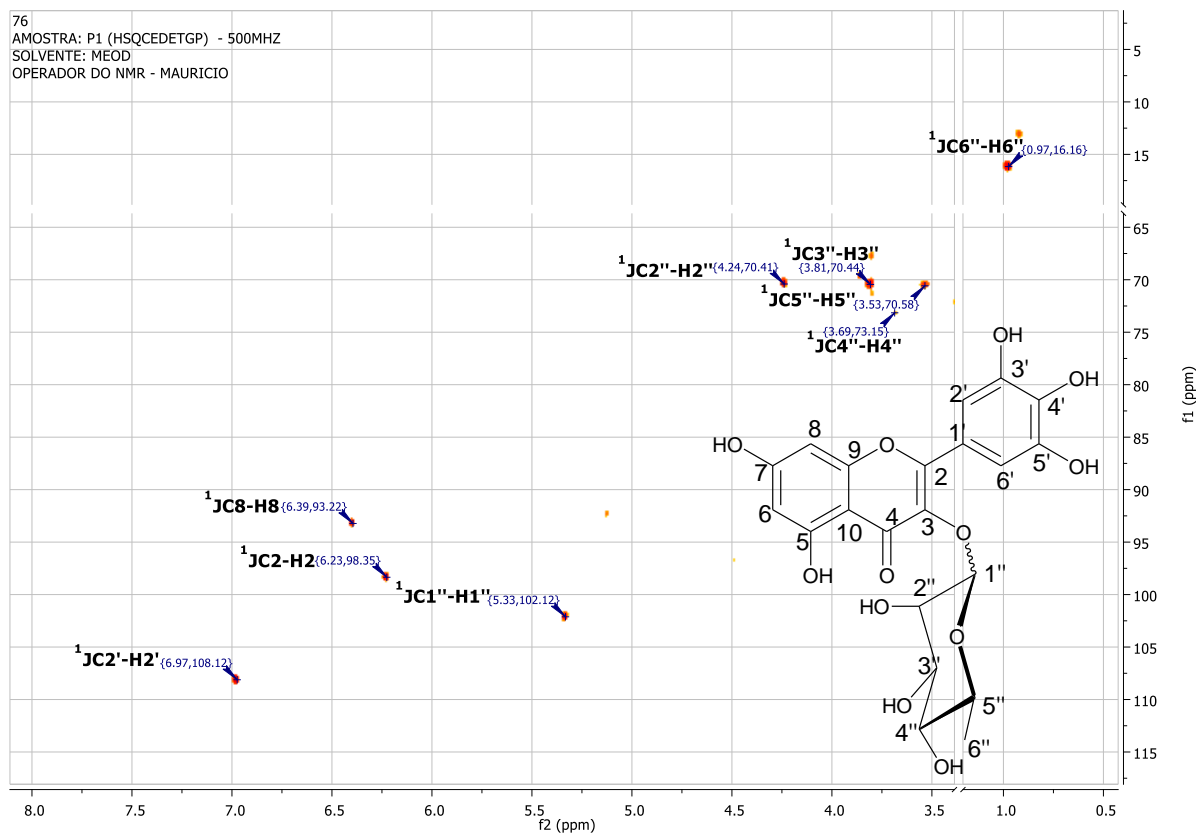
## 8. APÊNDICES

### Apêndice 1. Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- COSY da Miricitrina (22)

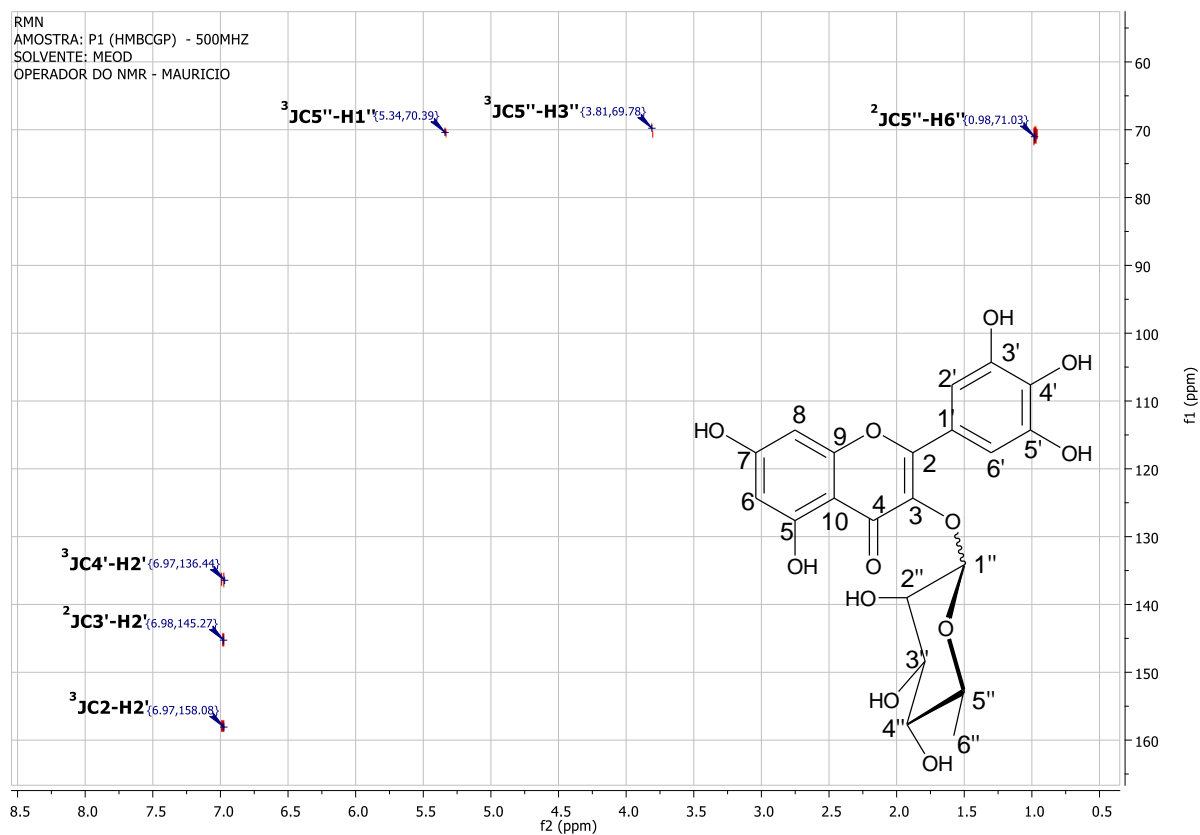




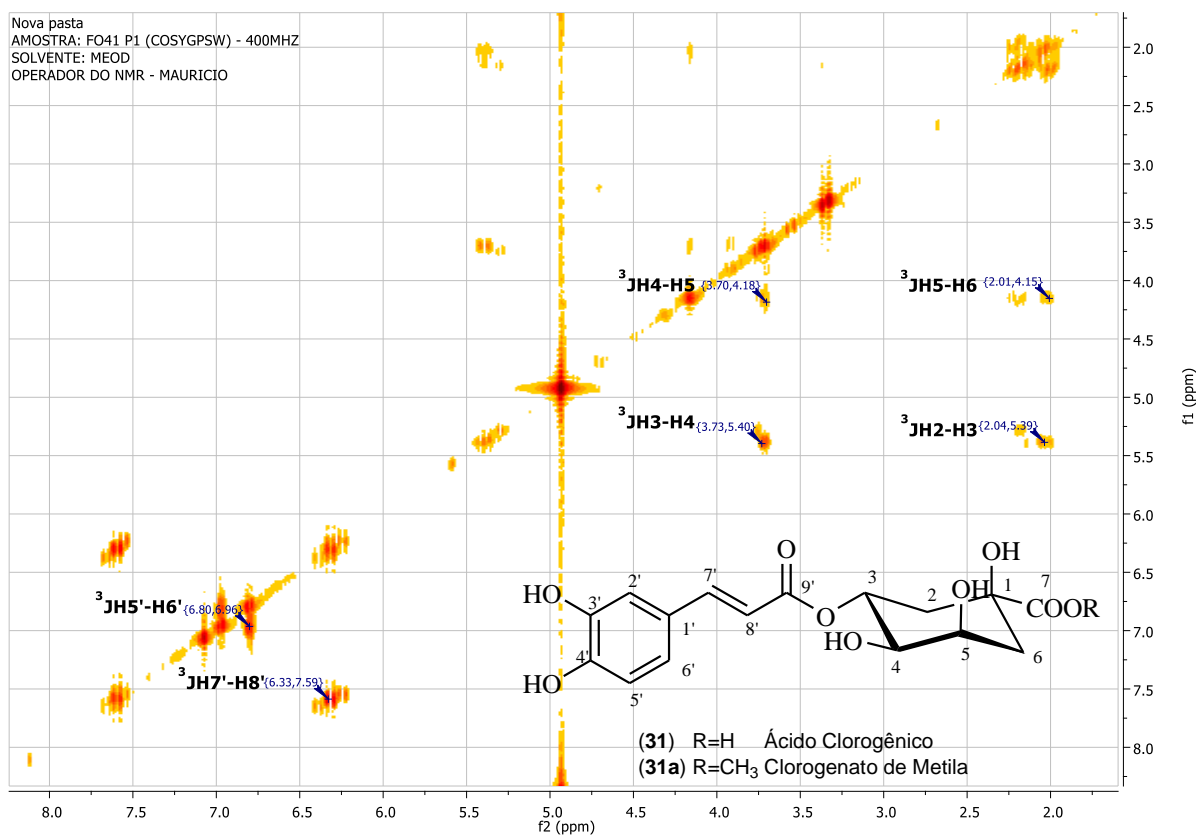
## Apêndice 2. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HSQC da Miricitrina (22)



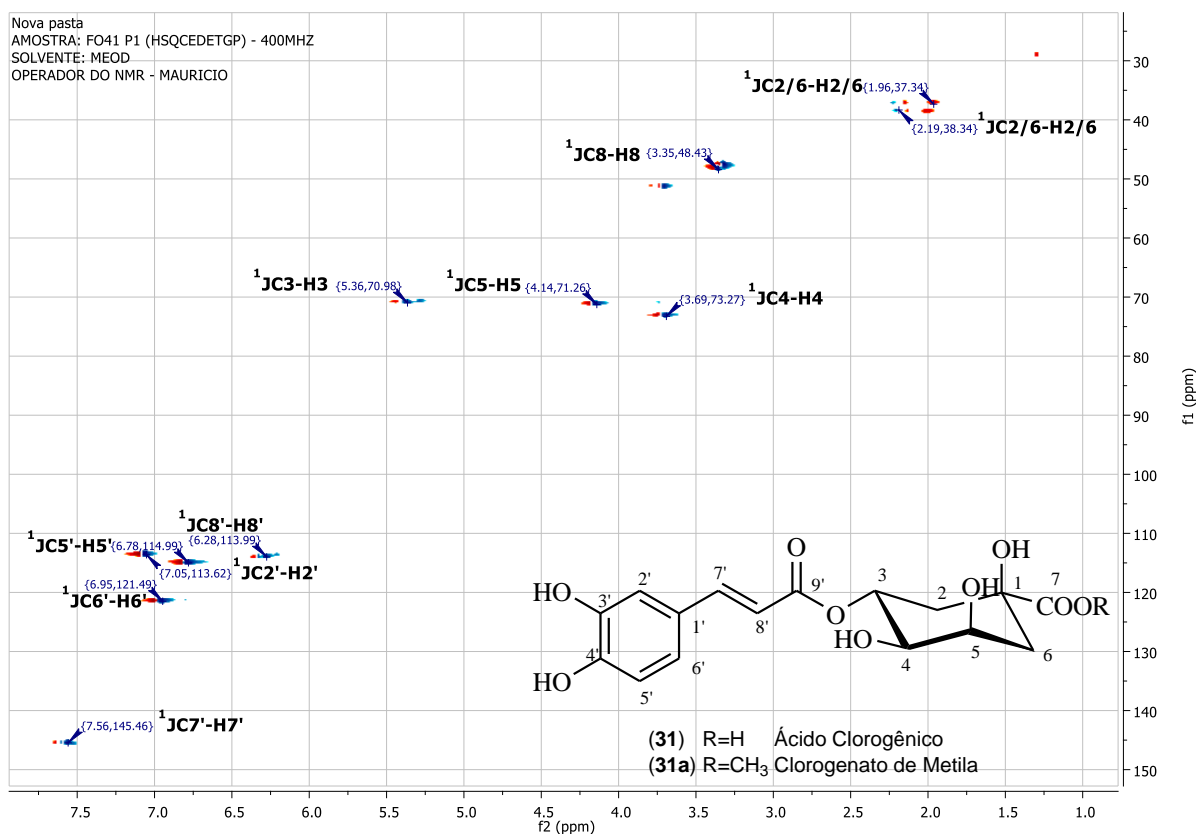
### Apêndice 3. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da Miricitrina (22)



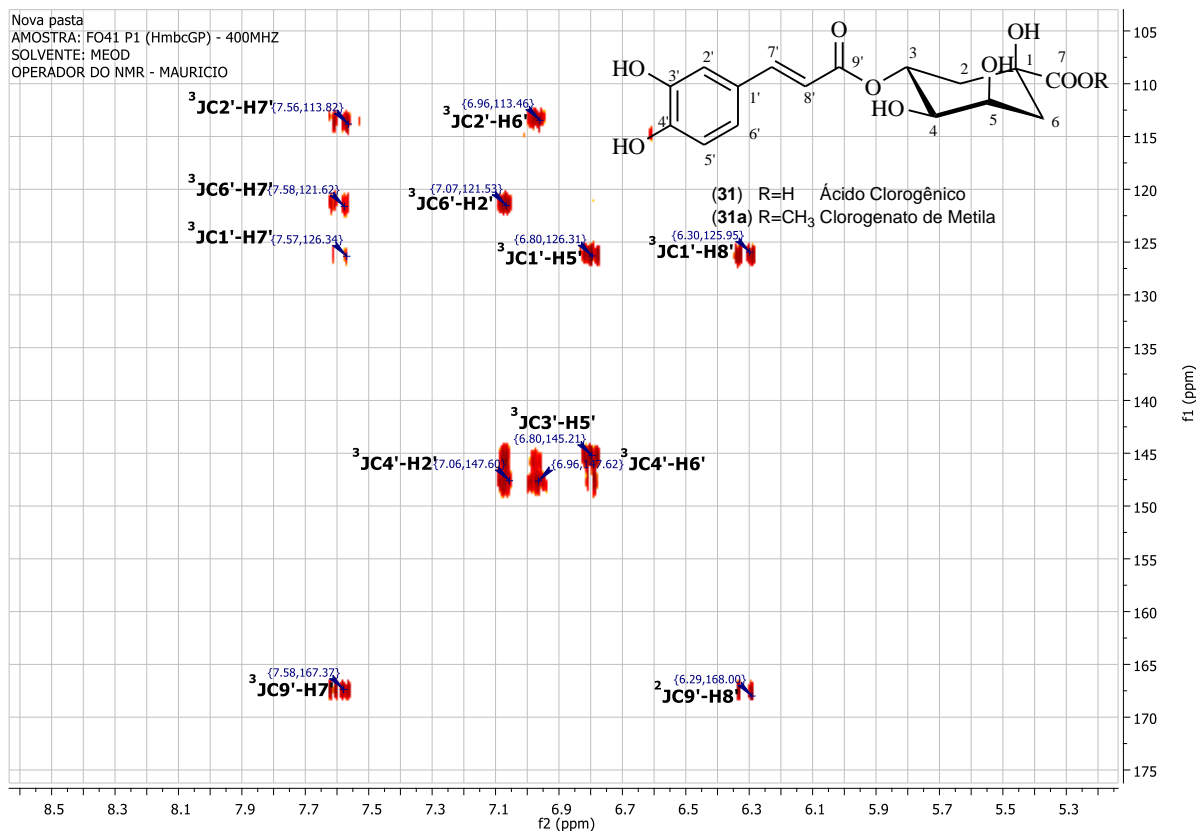
**Apêndice 4. Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- COSY da mistura de Ácido Clorogênico (31) e Clorogenato de Metila**



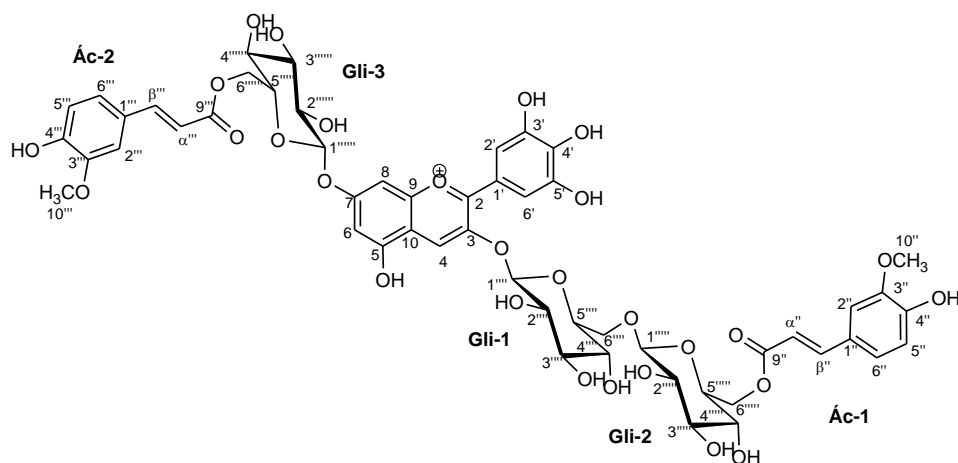
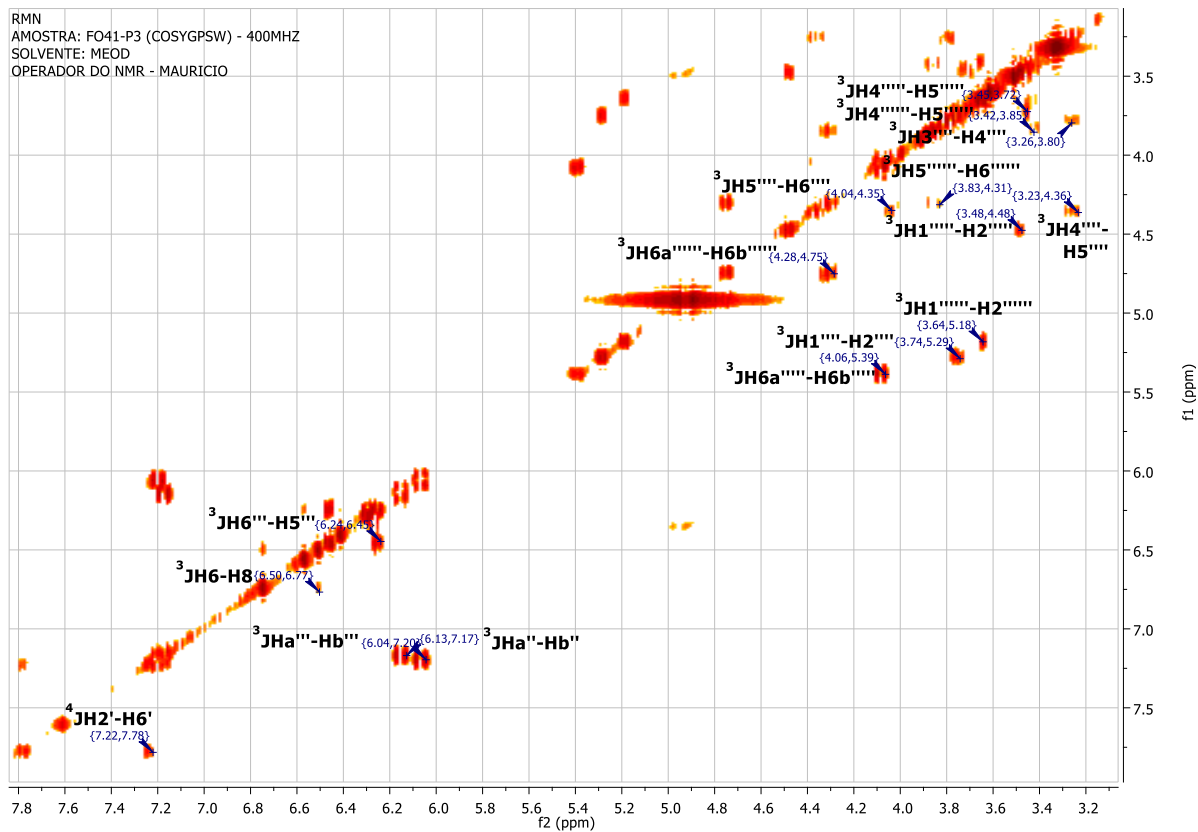
**Apêndice 5. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HSQC da mistura de Ácido Clorogênico (31) e Clorogenato de Metila**



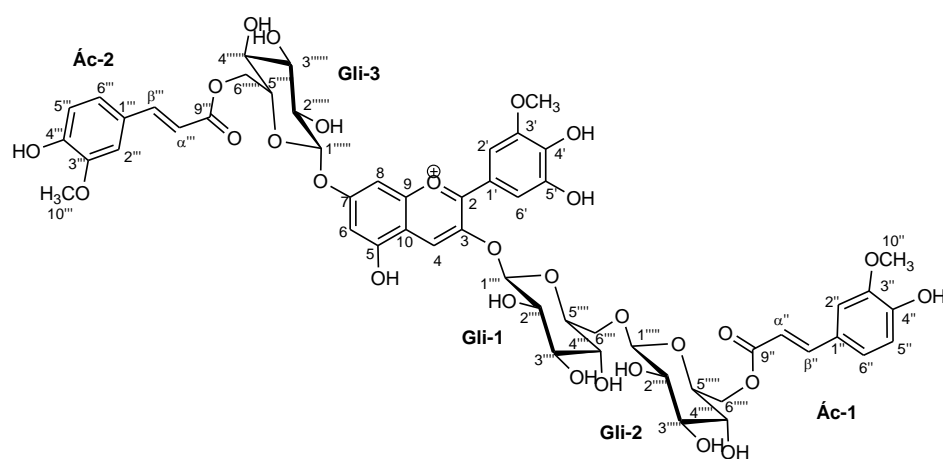
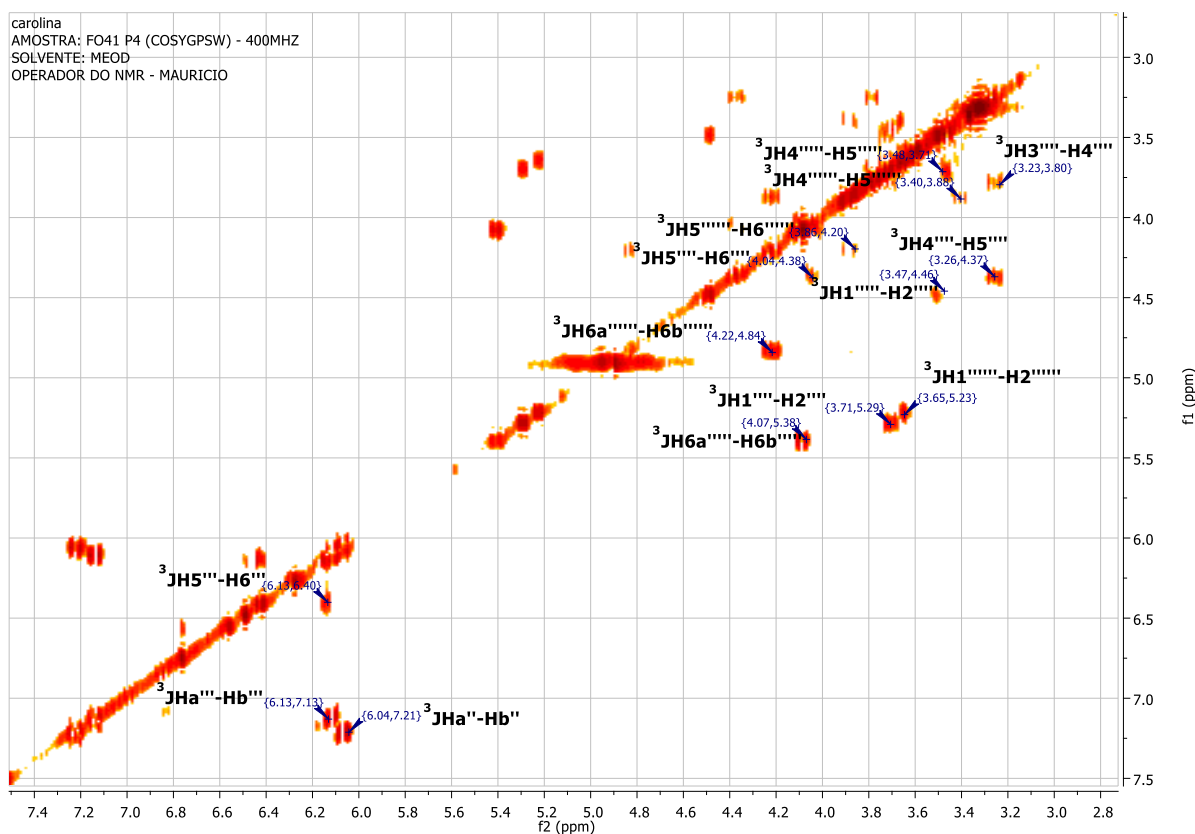
## Apêndice 6. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da mistura de **Ácido Clorogênico (31)** e **Clorogenato de Metila**



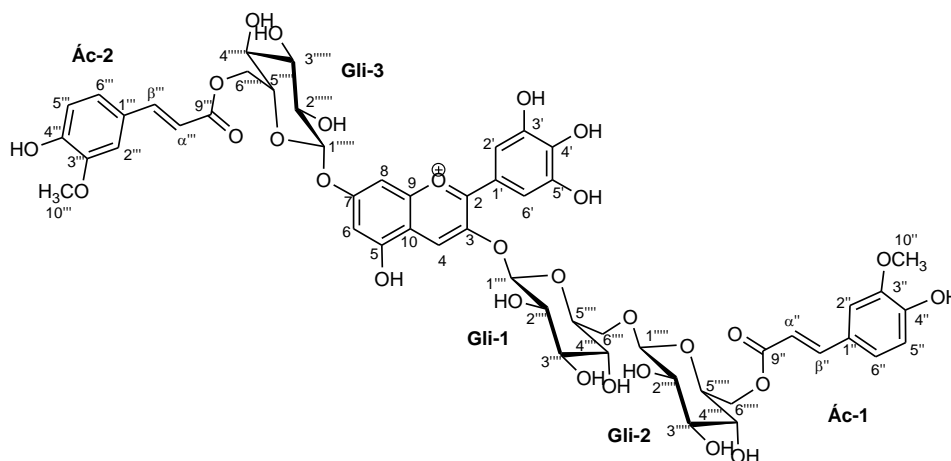
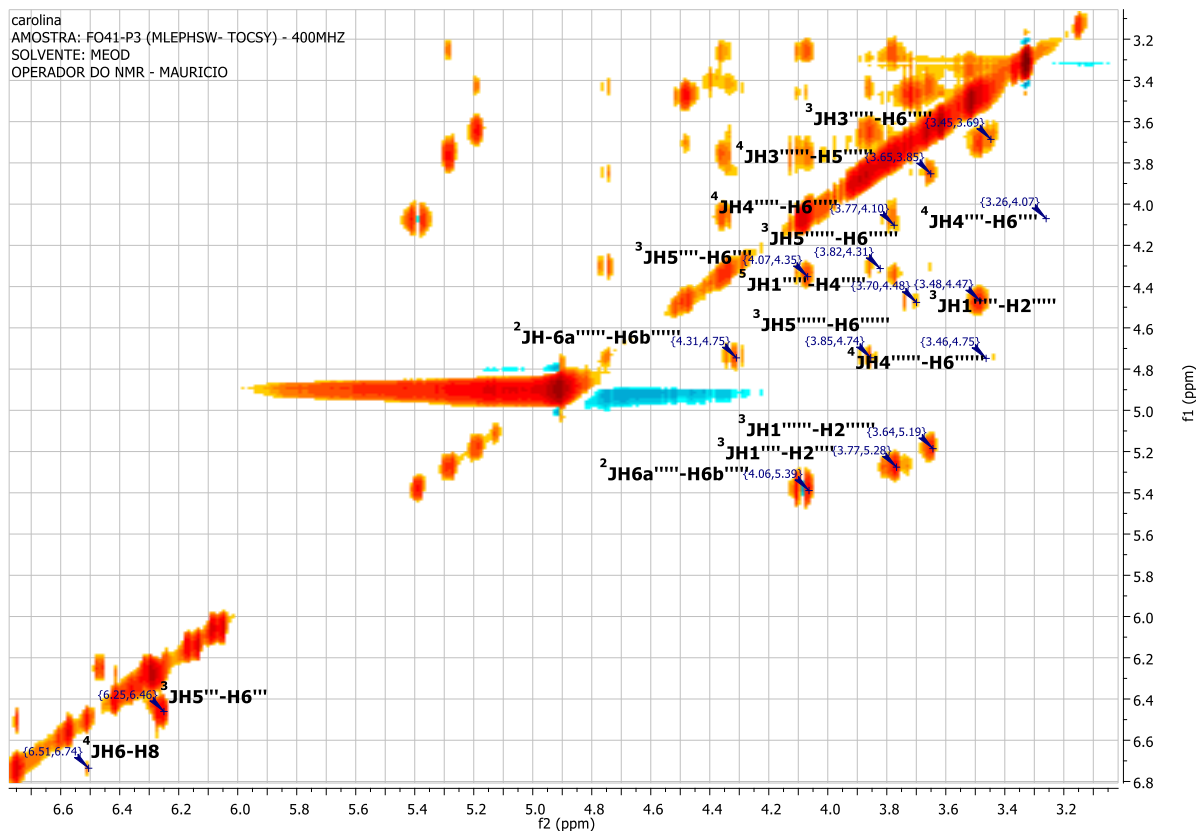
Apêndice 7. Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- COSY da Delfinidina acilada (32)



**Apêndice 8.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- COSY da Petunidina acilada (33)

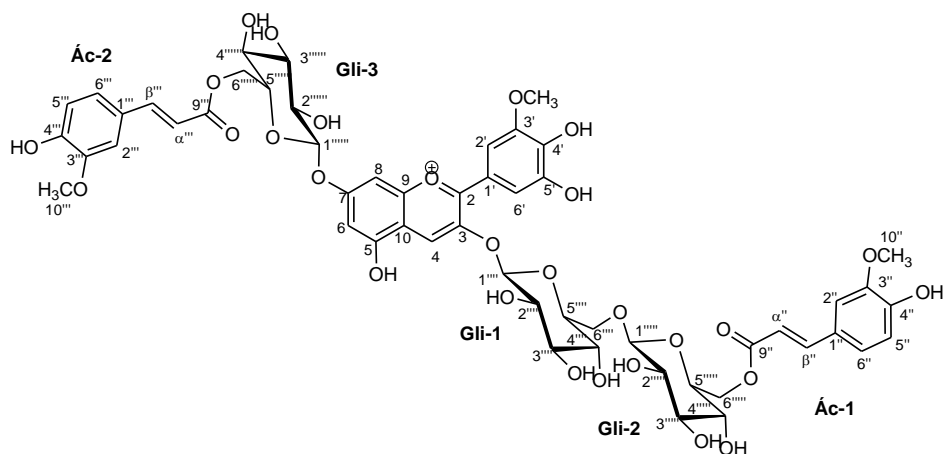
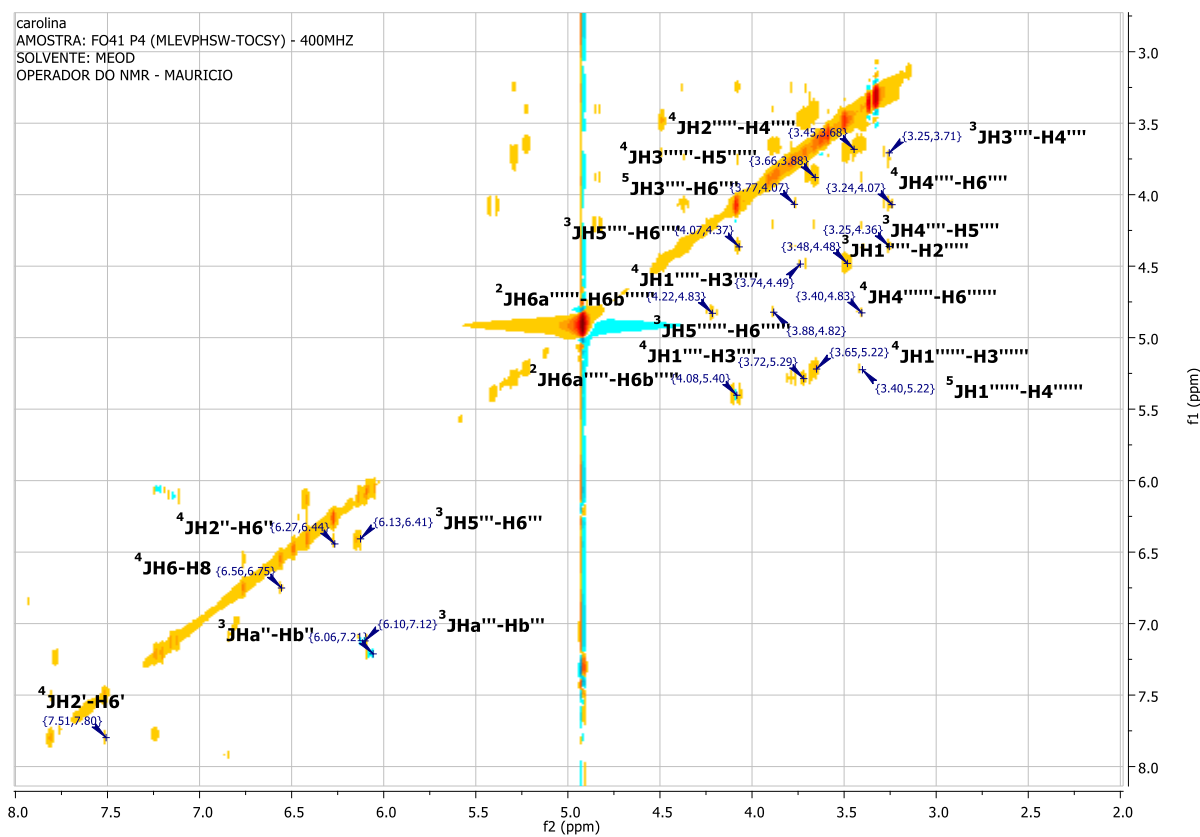


**Apêndice 9.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- TOCSY da Delfinidina acilada (32)

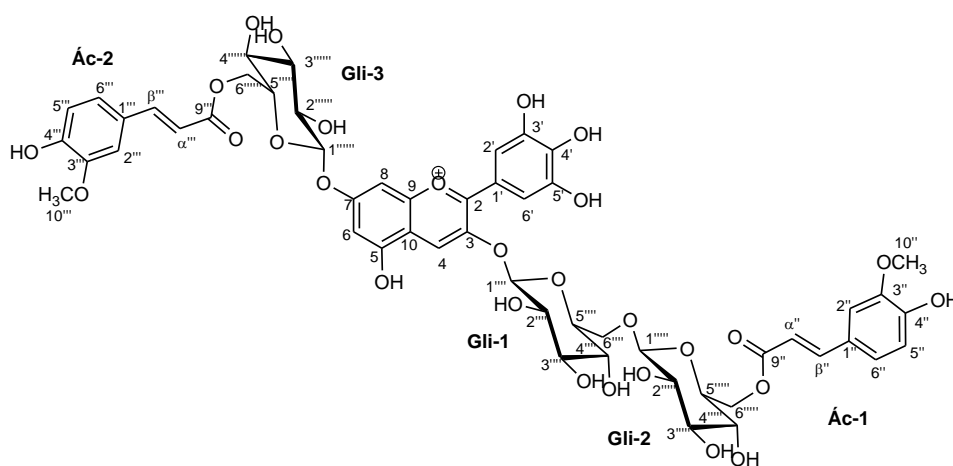
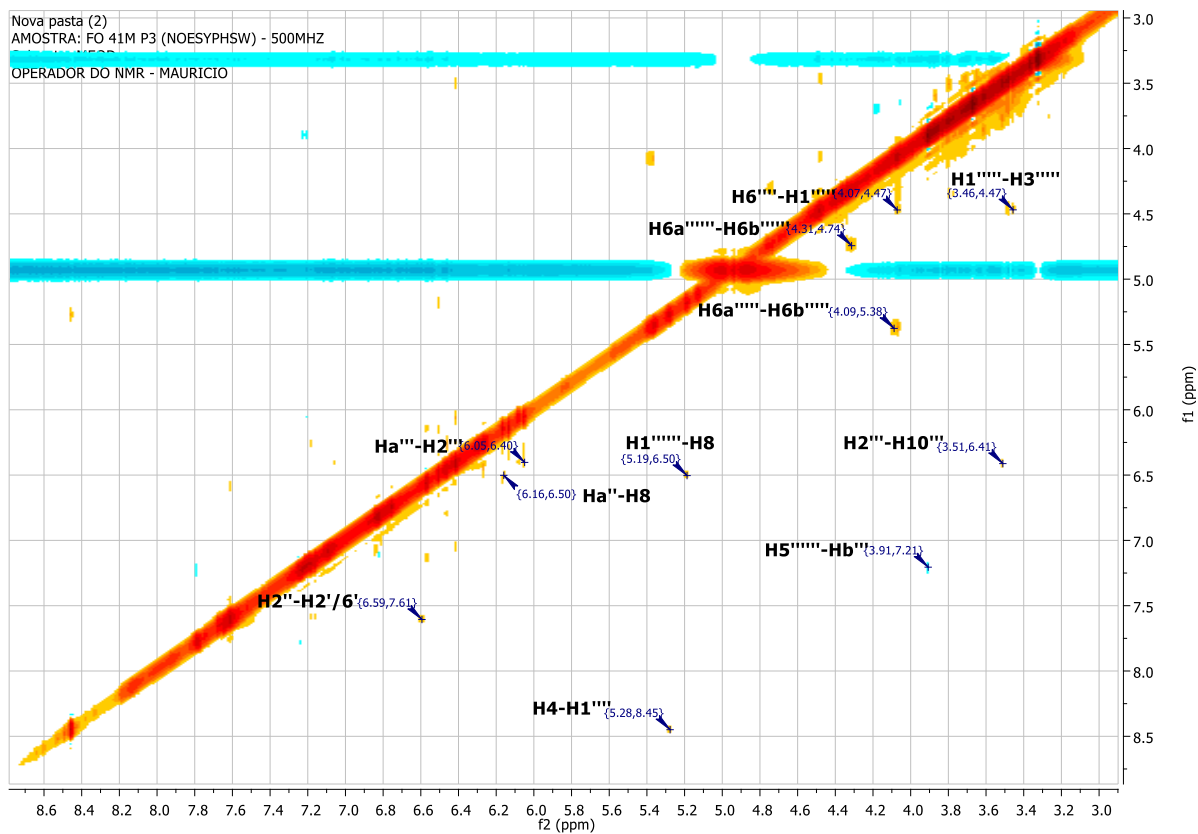




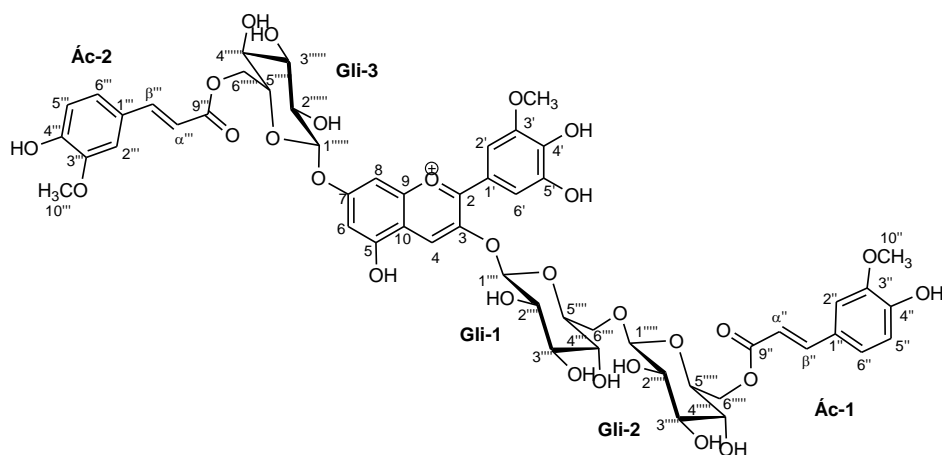
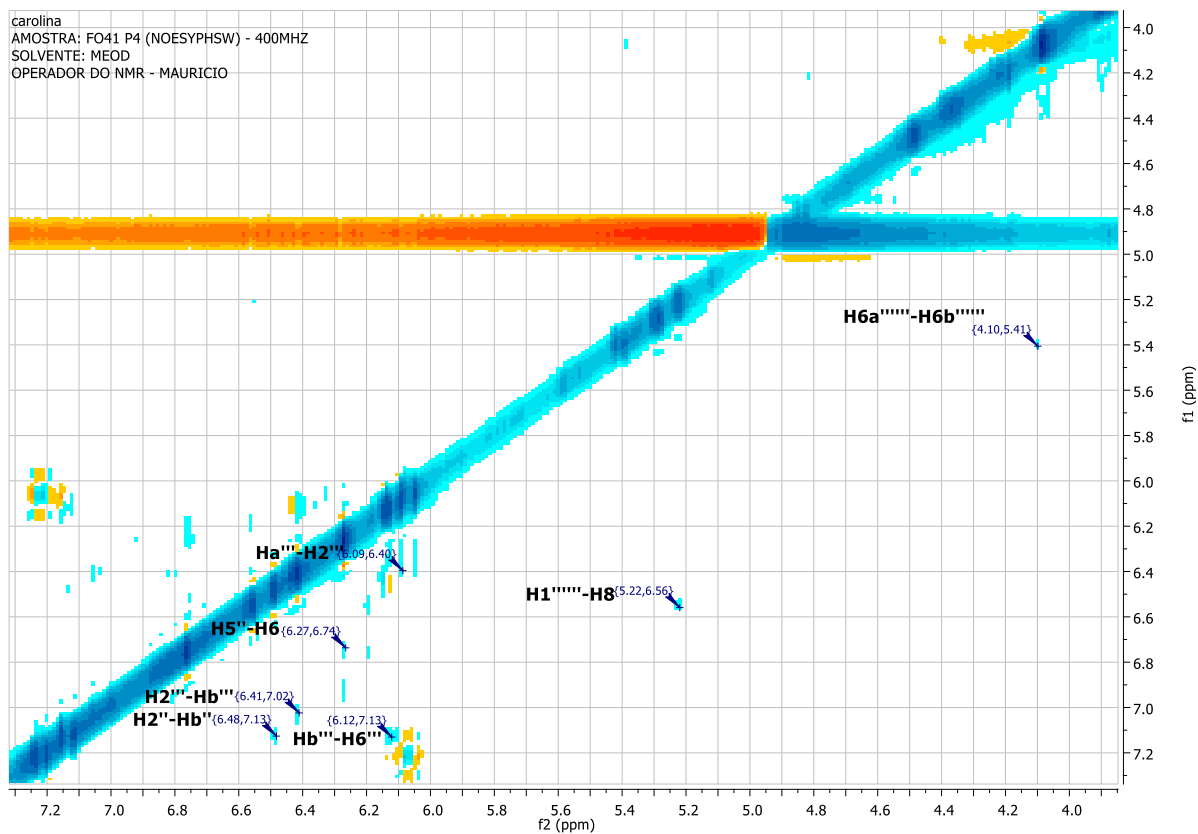
Apêndice 10. Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- TOCSY da Petunidina acilada (33)



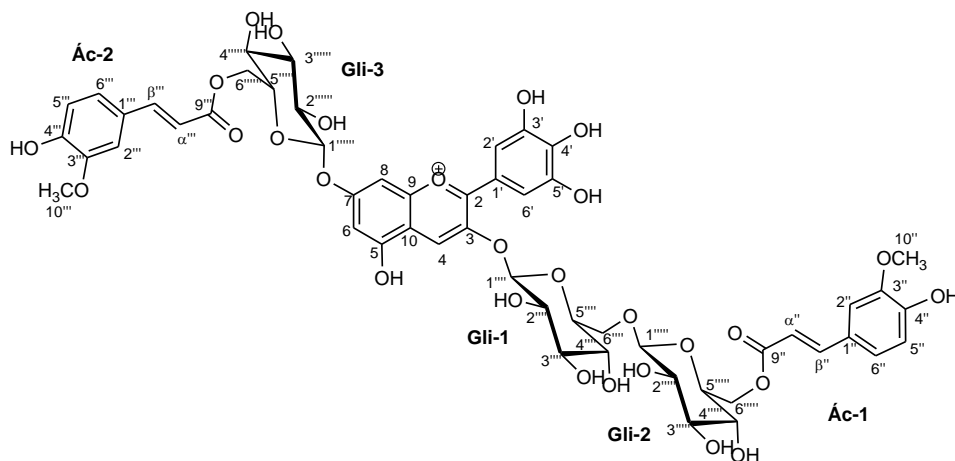
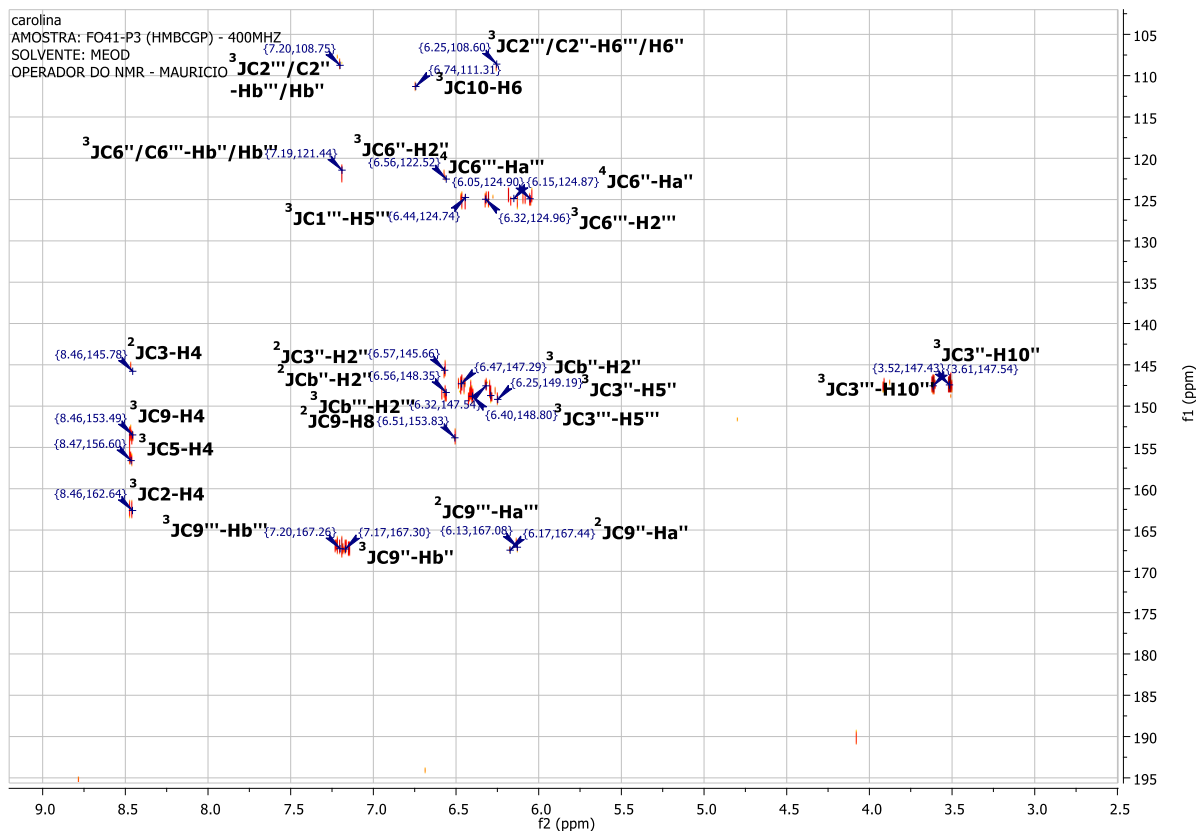
Apêndice 11. Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- NOESY da Delfinidina acilada (32)



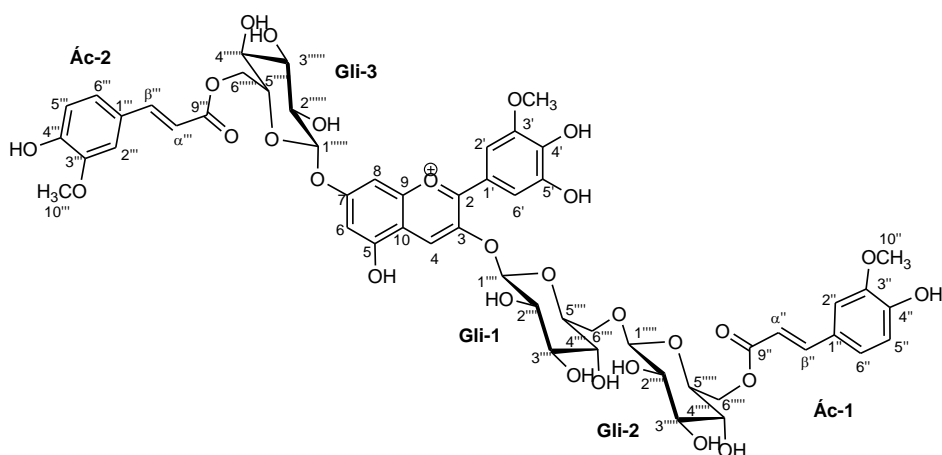
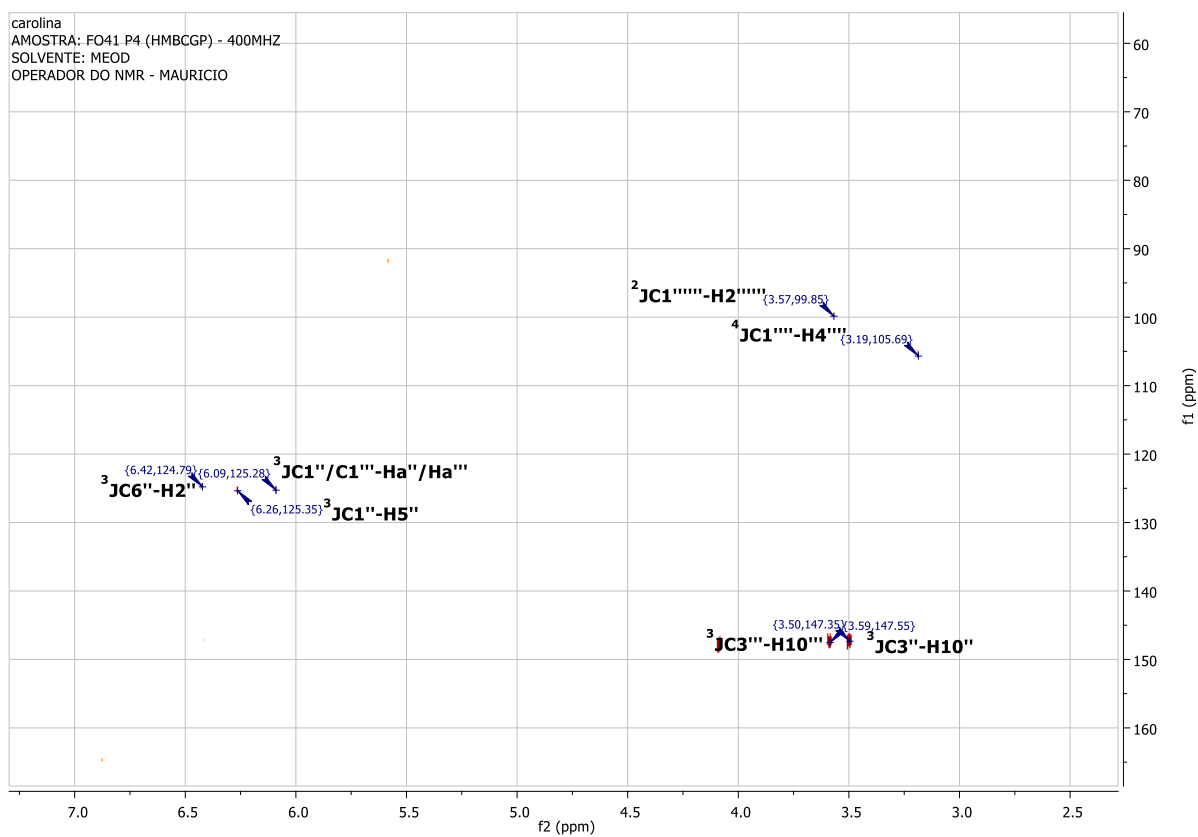
Apêndice 12. Espectro de RMN<sup>1</sup>H 2D de correlação homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- NOESY da Petunidina acilada (33)



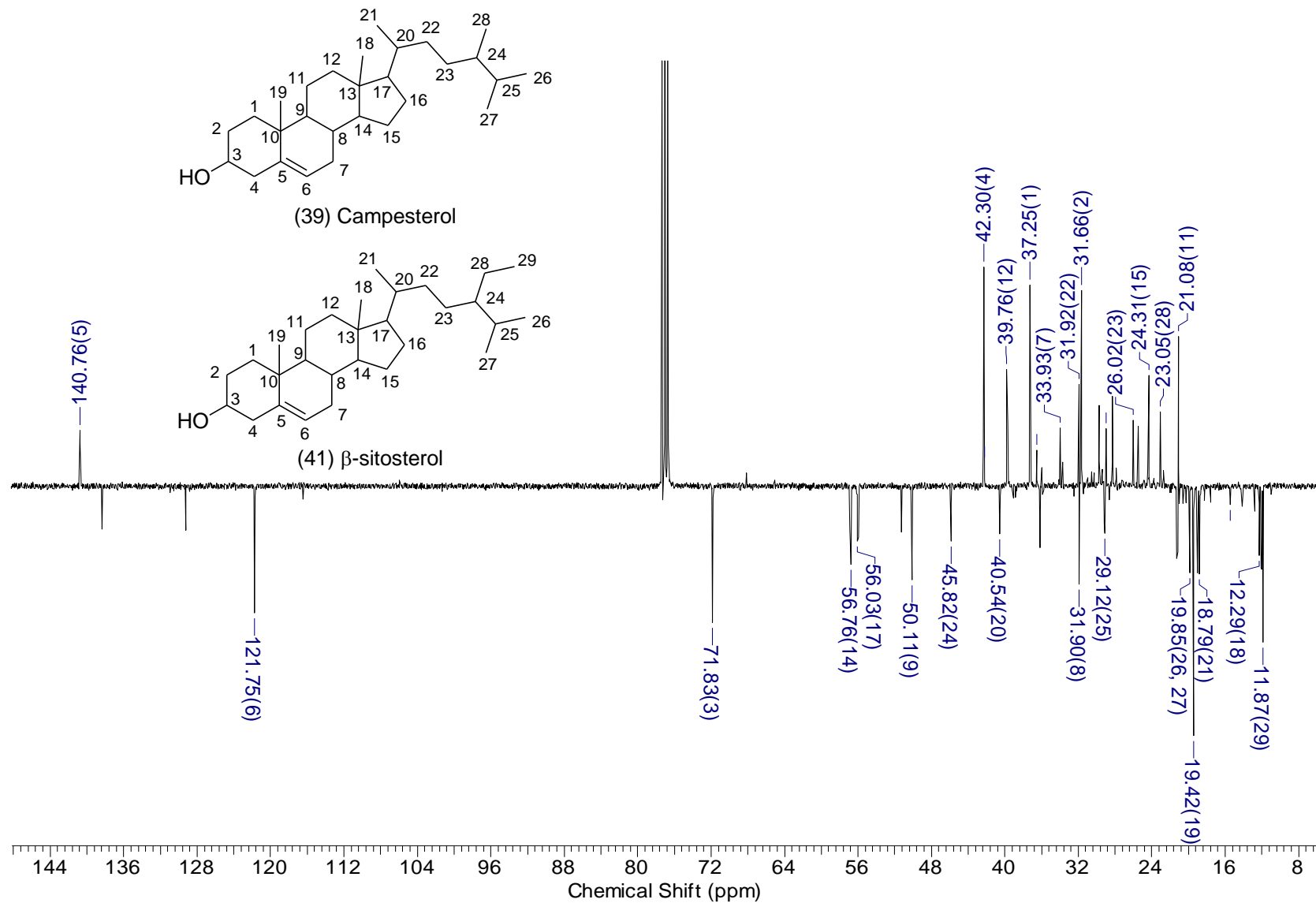
Apêndice 13. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da Delfinidina acilada (32)

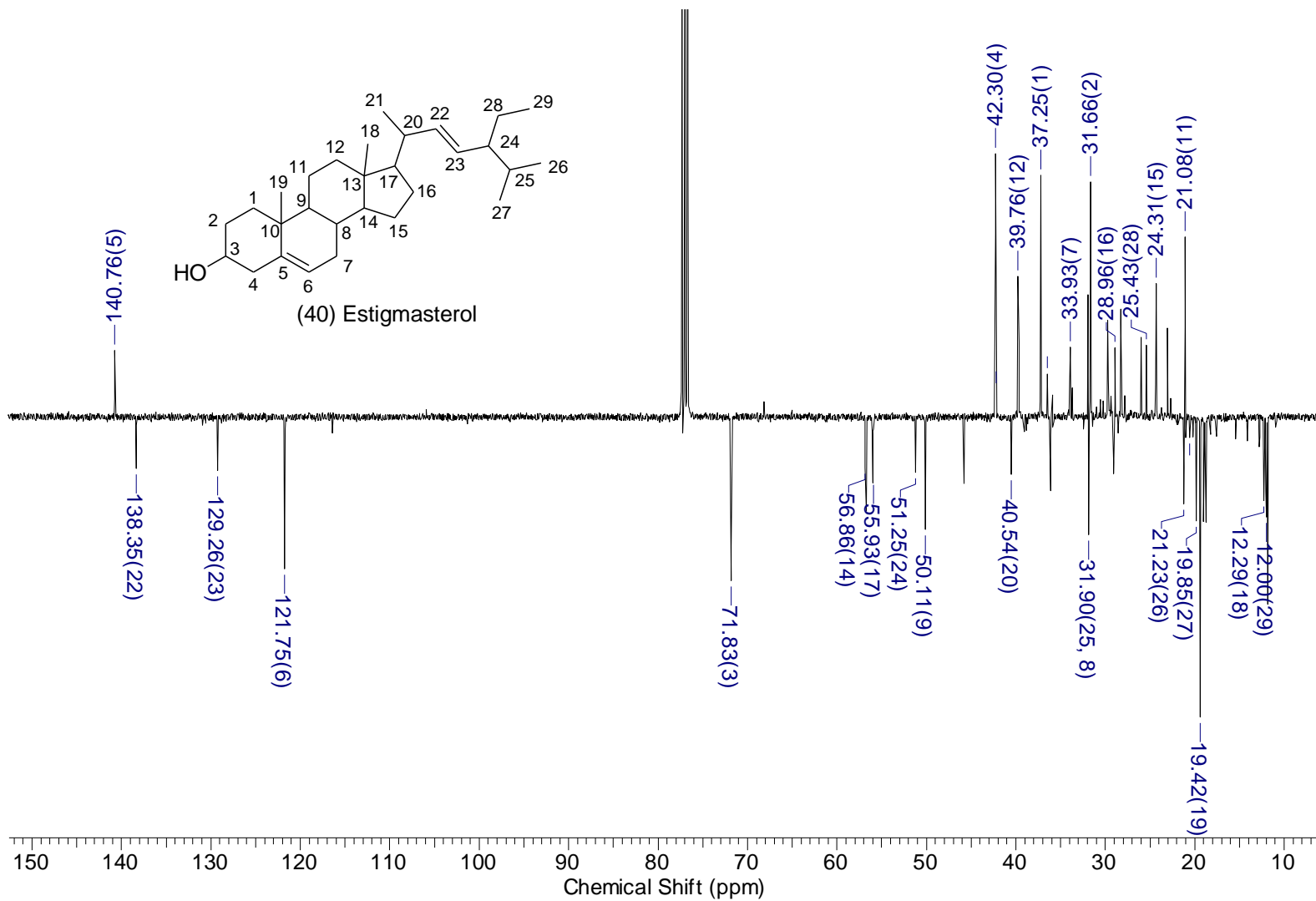


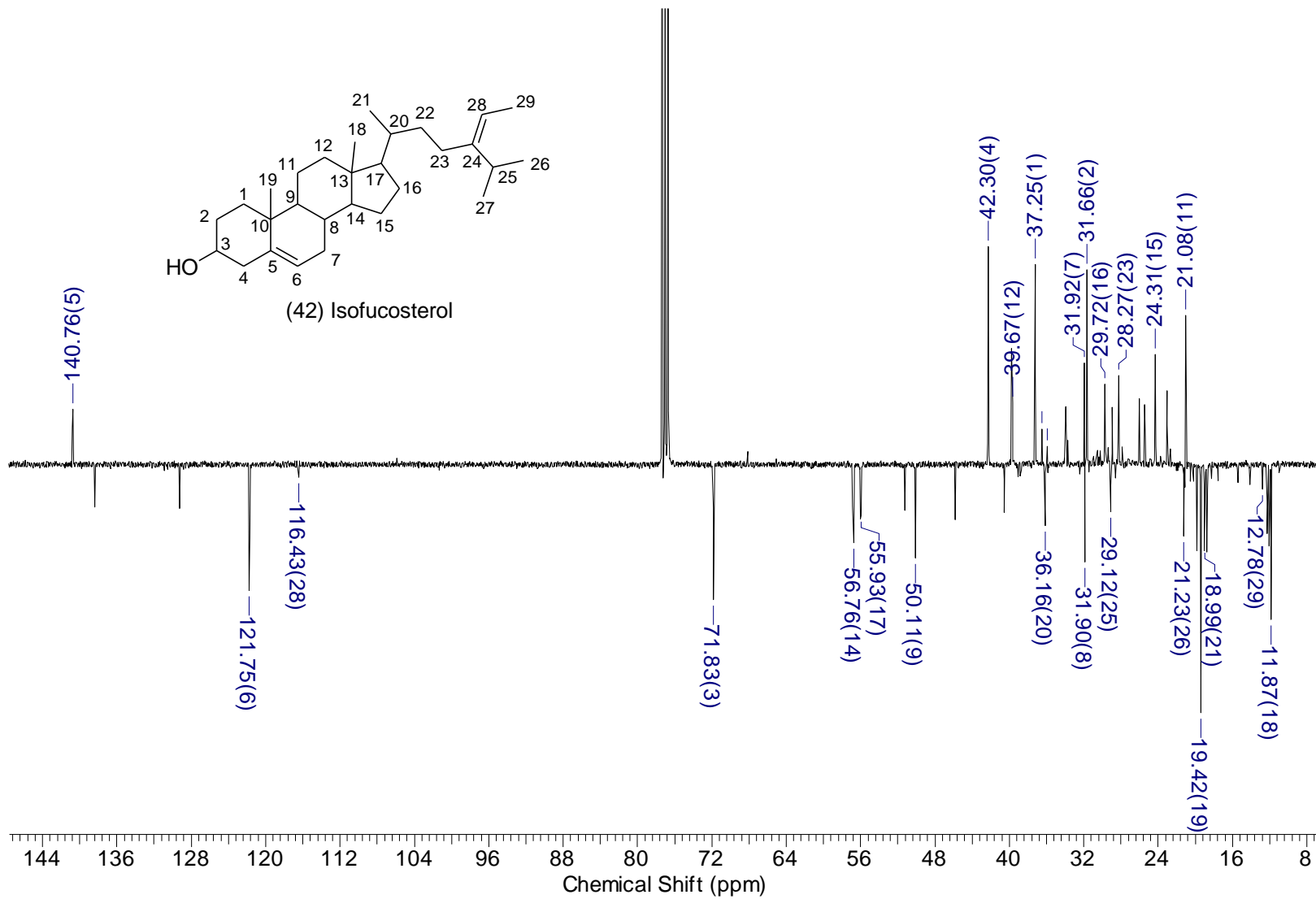
## Apêndice 14. Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear HMBC da **Petunidina acilada (33)**



Apêndice 15. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, em clorofório-*d*) da mistura de esteróis (substância 39, 40, 41 e 42)



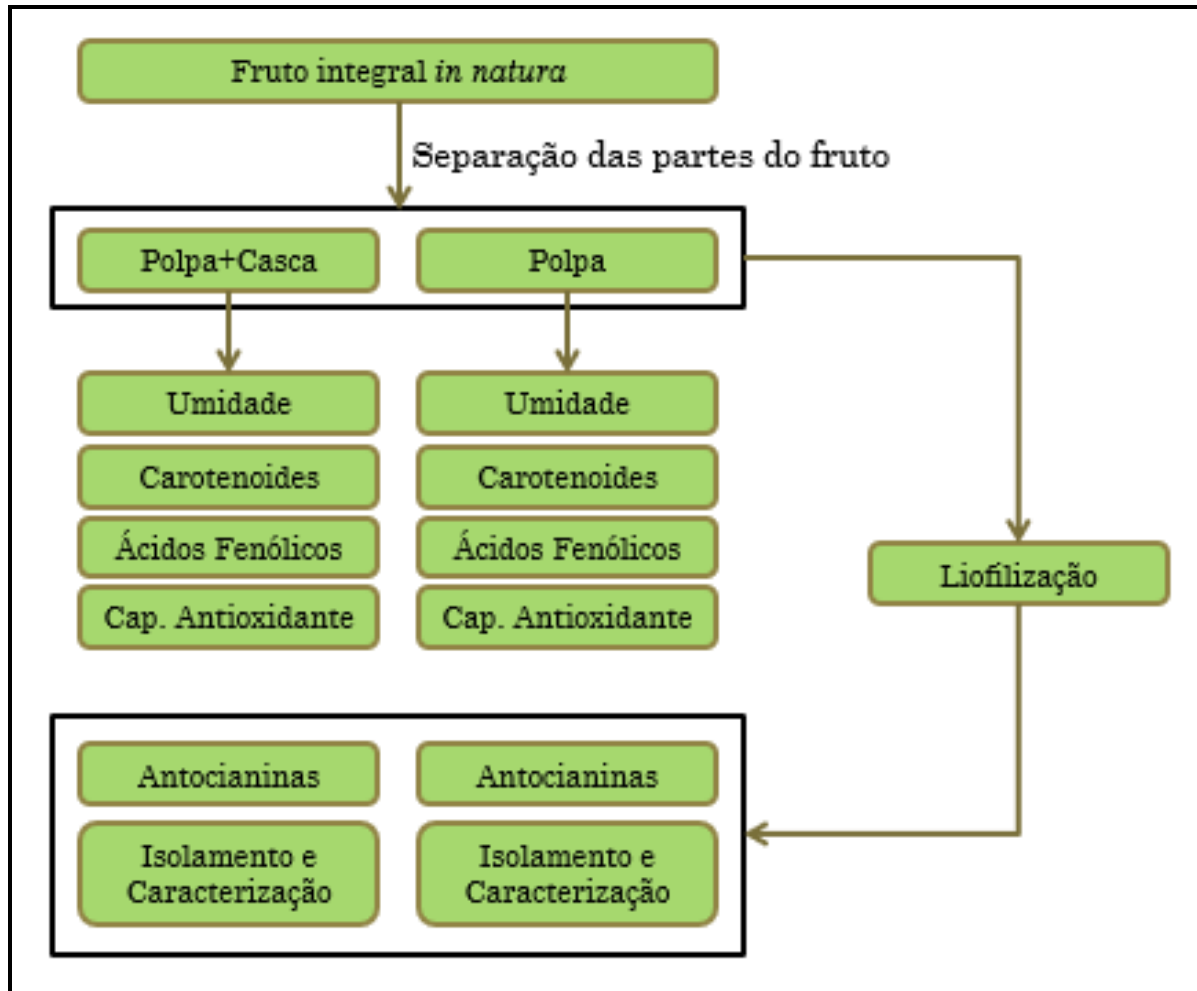




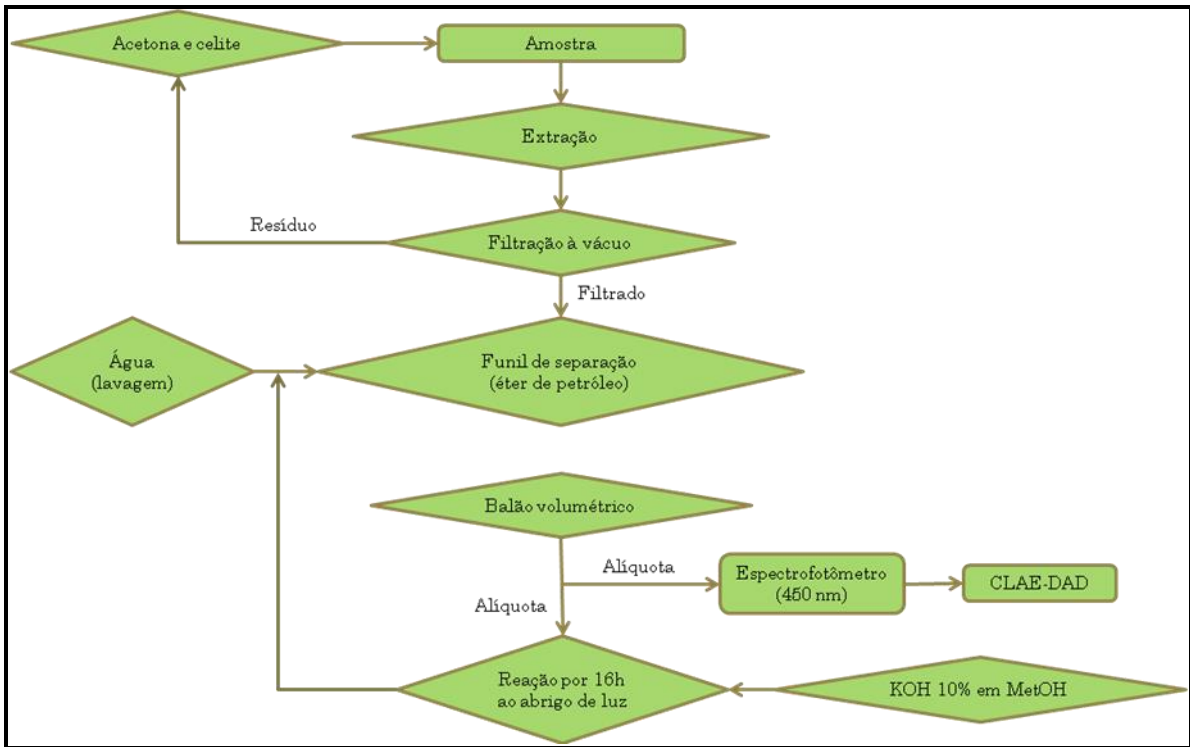


## 9. ANEXOS

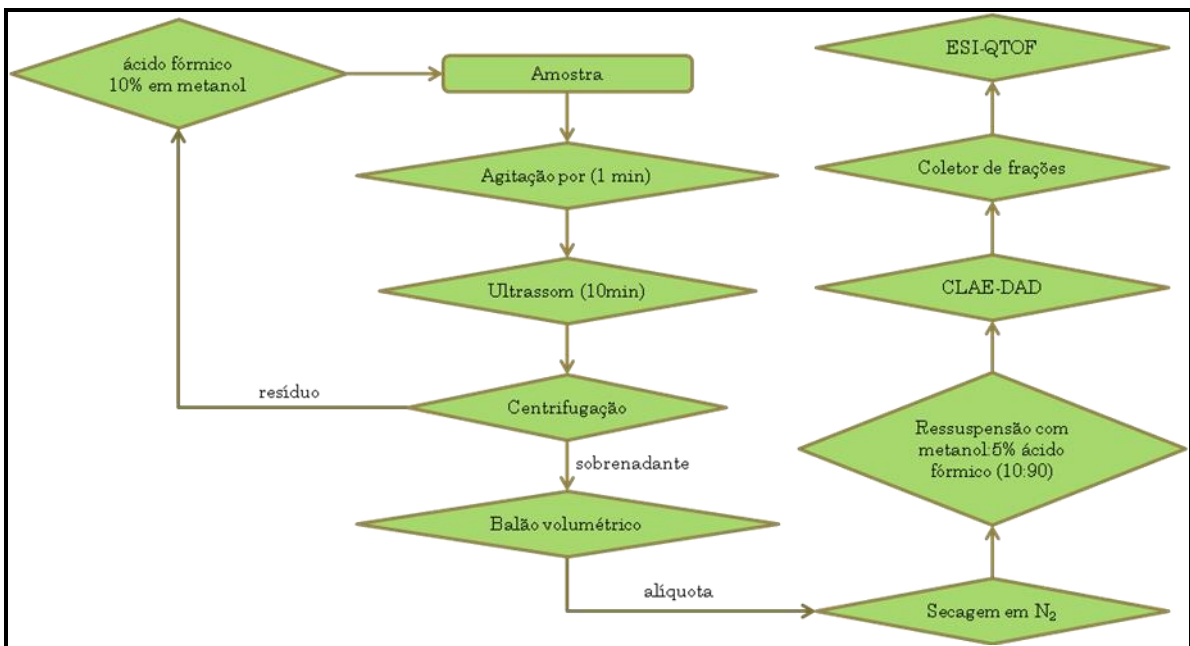
### Anexo 1. Preparação dos frutos de *M. multiflora*



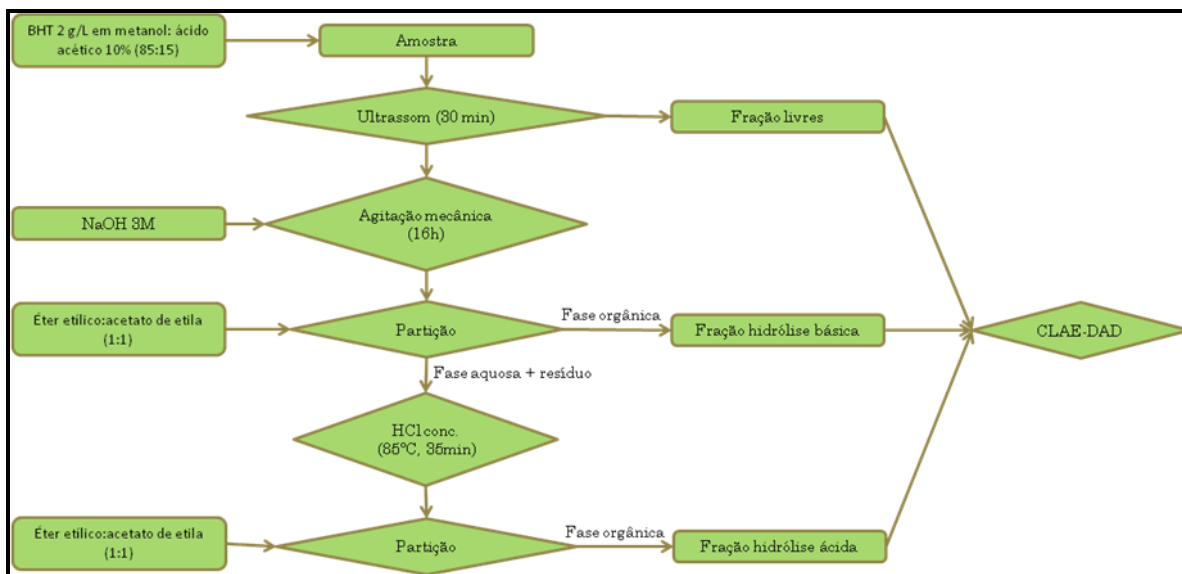
**Anexo 2. Fluxograma da extração de carotenoides**



**Anexo 3. Fluxograma da extração de antocianinas**



#### Anexo 4. Fluxograma da extração de ácidos fenólicos



#### Anexo 5. Fluxograma da preparação do extrato e isolamento das substâncias de *P. leiocarpa*

