



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉ GALLO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS DE  
*CAMPOMANESIA PHAEA* O. BERG. LANDRUM**

---

Londrina  
2021

ANDRÉ GALLO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS DE  
*CAMPOMANESIA PHAEA* O. BERG. LANDRUM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G172 Gallo, André.  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS DE *Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum / André Gallo. - Londrina, 2021.  
110 f. : il.

Orientador: Maria Luiza Zeraik.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. *Campomanesia phaea* - Tese. 2. cambuci - Tese. 3. Atividade antioxidante - Tese. 4. CLAE-DAD - Tese. I. Zeraik, Maria Luiza . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

ANDRÉ GALLO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FRUTOS DE  
*CAMPOMANESIA PHAEA* O. BERG. LANDRUM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito a obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luiz Fernando Cabeça  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

---

Profa. Dra. Maria Cristina Solci  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de outubro de 2021

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que sempre me guiou e iluminou o caminho a ser percorrido.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que colaboraram para esta experiência.

Ao meu pai que me ensinou a nunca desistir!

A minha mãe (Em memória). Obrigado mãe e pai pela pessoa que me tornei.

A minha irmã.

Ao grupo LabfitoBio

A Profa Maria Luiza Zeraik, pelos ensinamentos.

A todos os professores e servidores do departamento.

A todos meus amigos e pessoas que conviveram ao meu lado esses anos.

Acima de tudo agradeço a Deus.

GALLO, André. **Caracterização química dos frutos de *Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum**. 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

Estudos sobre a composição química e propriedades biológicas de plantas da biodiversidade brasileira ainda são escassos. Uma estratégia valiosa para encontrar compostos com possíveis atividades biológicas consiste em traçar o perfil de seus metabólitos secundários totais. Neste sentido, o presente trabalho visa a determinação da composição fitoquímica dos frutos da espécie nativa *Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum (Myrtaceae). Os extratos das cascas e polpas dos frutos de cambuci foram preparados utilizando-se os solventes acetato de etila (CP\_CA e CP\_PA), etanol (CP\_C100 e CP\_P100) e etanol 70% (CP\_C70 e CP\_P70), respectivamente. Estes extratos foram submetidos aos ensaios de atividades antioxidante e antiglicante, e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (CLAE-UV/DAD) e espectrometria de massa (CL-EM/EM). Um método analítico otimizado com eluição no modo gradiente foi desenvolvido alcançando alta eficiência na separação de seus componentes. Os extratos CP\_P70 e CP\_C70 apresentaram maior capacidade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> ( $58,54 \pm 2,11$  e  $64,42 \pm 0,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente) e ABTS<sup>•+</sup> ( $41,21 \pm 0,74$  e  $41,04 \pm 0,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), quando comparados aos demais extratos analisados. Quanto à atividade antiglicante, o extrato CP\_PA foi o mais ativo, com 52,8% de inibição de atividade antiglicante. A análise da composição química dos extratos CP\_CA e CP\_PA por CL-EM/EM levou à identificação de 15 substâncias, dentre elas: cardamonin, flavokawain B, ácido quínico e derivados do ácido elágico. Este estudo mostrou a identificação de 9 substâncias no extrato da polpa e 4 no extrato da casca relatadas pela primeira vez nos frutos de *C. phaea*. As propriedades biológicas observadas, bem como a presença de compostos fenólicos, abrem perspectivas para o emprego dos frutos de *C. phaea* no desenvolvimento de produtos cosméticos anti-idade.

**Palavras-chave:** *campomanesia phaea*; cambuci; atividade antioxidante; myrtaceae.

GALLO, Andrew. **Chemical characterization of *Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum.** 2021. 91 p. Dissertation (Master's in Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Studies on the chemical composition and biological properties of plants in Brazilian biodiversity are still scarce. A valuable strategy for finding compounds with possible biological activities is to profile their total secondary metabolites. In this sense, the present work aims to determine the phytochemical composition of the fruits of the native species *Campomanesia phaea* O. Berg. Landrum (Myrtaceae). The extracts of the peel and pulp of cambuci fruits were prepared using the solvents ethyl acetate (CP\_CA and CP\_PA), ethanol (CP\_C100 and CP\_P100) and 70% ethanol (CP\_C70 and CP\_P70), respectively. These extracts were submitted to tests of antioxidant and antiglycant activities, and analyzed by high performance liquid chromatography with UV-Vis detector (HPLC-UV/DAD) and mass spectrometry (CL-EM/EM). An optimized analytical method with gradient mode elution was developed achieving high efficiency in the separation of its components. CP\_P70 and CP\_C70 extracts showed greater antioxidant capacity by the DPPH<sup>•</sup> radical scavenging method ( $58.54 \pm 2.11$  and  $64.42 \pm 0.74 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively) and ABTS<sup>•+</sup> ( $41.21 \pm 0.74$  and  $41.04 \pm 0.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively), when compared to the other extracts analyzed. As for the antiglycerin activity, the CP\_PA extract was the most active, with 52.8% inhibition of antiglycerin activity. The analysis of the chemical composition of CP\_CA and CP\_PA extracts by CL-EM/EM led to the identification of 15 substances, including: cardamonin, flavokawain B, quinic acid and ellagic acid derivatives. This study showed the identification of 9 substances in the pulp extract and 4 in the peel extract reported for the first time in *C. phaea* fruits. The biological properties observed, as well as the presence of phenolic compounds, open perspectives for the use of *C. phaea* fruits in the development of anti-aging cosmetic products.

**Key words:** *campomanesia phaea*; cambuci; antioxidant activity; myrtaceae.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa de ocorrência do Cambucizeiro (*C. Phaea*) no Sudeste Brasileiro .....17
- Figura 2** - Espécie *C. Phaea*: Cambucizeiro e Fruto Cambuci .....18
- Figura 3** - Substâncias identificadas nos frutos, polpa e casca, da espécie...20
- Figura 4** - Estrutura básica dos Flavonoides .....22
- Figura 5** - Redução do ABTS•+ por um antioxidante auxiliado por Persulfato de Potássio.....23
- Figura 6** - Reação química entre o BHT e o radical DPPH• .....23
- Figura 7** - Substâncias formadas a partir de interações amino carbonilo e seus rearranjos para formar a base de Schiff instável .....25
- Figura 8** - Base de Schiff com rearranjo para formação do produto amadori .....25
- Figura 9** - Produto em cadeia aberta e fechada .....26
- Figura 10** - Esquema geral de um cromatógrafo para CLAE.....28
- Figura 11** - (A) Desenho simplificado de uma sonda para electrospray e (B) Interface do tipo eletrospray utilizada para o acoplamento CL-EM.....33
- Figura 12** - Procedimento ilustrativo do processo de extração de polpa e cascas da espécie *C. Phaea*.....35
- Figura 13** - Atividade inibitória de glicação dos extratos de polpa e casca do fruto *C. Phaea* extraídos com diferentes solventes. Todos os extratos e controles positivos foram diluídos em H<sub>2</sub>O e DMSO (50:50) na concentração de 1 mg ml<sup>-1</sup>. Valores expressos em porcentagem de inibição. Amostras CP\_CA: Extração das cascas com Acetato de Etila; CP\_C70: Extração das cascas com Etanol 70%; CP\_P70: Extração das polpas com Etanol 70%; CP\_C100: Extração das cascas com Etanol 100%; CP\_P100: Extração das polpas com Etanol 100%.....44
- Figura 14** - Perfis cromatográficos no modo isocrático de eluição com ACN:H<sub>2</sub>O (50:50), Obtidos por CLAE-UV/DAD, Extratos: (A) CP\_C70; (B) CP\_C100 e (C) CP\_CA das cascas de *C. Phaea*, usando coluna Phenomenex □ C18 Luna (250 mm X 4,6 mm, 5

	μm); método I, ACN:H <sub>2</sub> O (Com 0,1% Ácido Fórmico em ambas as fases), λ=280 nm, volume de injeção: 10 μl de uma solução de 10 mg ml <sup>-1</sup> .....	46
<b>Figura 15</b>	- Perfil cromatográfico da amostra CP_CA (Extrato das cascas de <i>C. Phaea</i> ), modo de eluição gradiente com 15-85% de ACN em 35 min, por CLAE-UV/DAD, usando coluna Phenomenex □ C18 Luna (250 mm X 4,6 mm, 5 μm); método II, ACN:H <sub>2</sub> O (Com 0,1% ácido fórmico em ambas as fases), λ=280 nm, volume de injeção: 10 μl de uma concentração de 10 mg ml <sup>-1</sup> .....	47
<b>Figura 16</b>	- Perfis cromatográficos dos extratos das polpas de <i>C. Phaea</i> obtidos por CLAE-UV/DAD: (A) CP_PA; (B) CP_P70 E (C) CP_P100 em coluna Phenomenex □ C18 Luna (250 mm X 4,6 mm, 5 μm), modo de eluição gradiente com 15-85% de ACN:H <sub>2</sub> O em 35 min, volume de injeção: 10 μl, concentração de 10 mg ml <sup>-1</sup> .....	48
<b>Figura 17</b>	- Perfis cromatográficos dos três extratos de cascas de <i>C. Phaea</i> , obtidos por CLAE-UV/DAD, extratos: (A) CP_CA; (B) CP_C70 E (C) CP_C100, em coluna Phenomenex □ C18 Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 μm); método ii, 15% (B) e 85% (A) (Com 0,1% Ácido Fórmico em ambas as fases), λ=280 nm, volume de injeção: 10 μl de uma solução de 10 mg ml <sup>-1</sup> .....	49
<b>Figura 18</b>	- Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos obtidos das cascas do <i>C. Phaea</i> , modo negativo de ionização, por CL-EM/EM .....	52
<b>Figura 19</b>	- Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das polpas de <i>C. Phaea</i> , modo negativo de ionização, por CL-EM/EM .....	53
<b>Figura 20</b>	- Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos obtidos das cascas do <i>C. Phaea</i> , modo positivo de ionização, por CL-EM/EM .....	54
<b>Figura 21</b>	- Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos obtidos das polpas do <i>C. Phaea</i> , modo positivo de ionização, por CL-EM/EM .....	55

<b>Figura 22</b> - Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das cascas de <i>C. Phaea</i> , modo negativo e positivo de ionização por CL-EM/EM, e cromatograma UV obtido a 280 nm por CL-UV/DAD.....	56
<b>Figura 23</b> - Espectros de fragmentação MS2 obtidos para as substâncias 1, 2, 4 e 5, bem como as suas estruturas e principais fragmentos formados a partir da análise do extrato das cascas de <i>C. Phaea</i> ..	57
<b>Figura 24</b> - Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das polpas de <i>C. Phaea</i> (Modo positivo de ionização) por CI-EM/EM. ....	61
<b>Figura 25</b> - Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das polpas de <i>C. Phaea</i> (Modo negativo de ionização) por CI-EM/EM. ....	62
<b>Figura 26</b> - Propostas de identificação de substâncias presentes nas frações do extrato Acetato de Etila da polpa de <i>C. Phaea</i> (CP_PA), obtidas pela análise por CI-EM/EM .....	64
<b>Figura 27</b> - Espectro de massas da substância 6:3+6O Acil Hexosídeo Graxo, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 10% (FR10), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM....	65
<b>Figura 28</b> - Proposta de fragmentação por clivagem heterolítica da substância 1 .....	65
<b>Figura 29</b> - Espectro de massas da substância 2, Ácido Quínico, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração metanol 10% (FR10), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	66
<b>Figura 30</b> - Proposta de fragmentação por perda de OH .....	67
<b>Figura 31</b> - Espectro de massas da substância 3, Ácido Galoil Chiquímico, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 20% (FR20), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	67
<b>Figura 32</b> - Proposta de fragmentação por perda de grupo funcional de Ácido Carboxílico .....	68
<b>Figura 33</b> - Espectro de massas da substância 4, galoil-HHDP-hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 20% (FR20), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	68

<b>Figura 34</b> - Espectro de massas da substância 5, digalloil-HHDP-hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 20% (FR20), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	69
<b>Figura 35</b> - Espectro de massas da substância 6, galoil(-6)L-Glc(B)-O-galoil, presente no extrato da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 30% (FR30), espectro obtido no modo negativo por CI-EM/EM.....	70
<b>Figura 36</b> - Proposta de fragmentação de galoil(-6)L-Glc(B)-O-galoil .....	71
<b>Figura 37</b> - Espectro de massas da substância 7, Trigaloílo Hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	71
<b>Figura 38</b> - Proposta de fragmentação Trigaloil Hexosídeo .....	72
<b>Figura 39</b> - Espectro de massas da substância 8, Tetragaloil Hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	72
<b>Figura 40</b> - Proposta de padrão de fragmentação de Elagitaninos e derivados de galoil .....	73
<b>Figura 41</b> - Espectro de massas da substância 9, Pentagaloil Hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	73
<b>Figura 42</b> - Espectro de massas da substância 10, quercetina-O-pentosida, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	74
<b>Figura 43</b> - Reação Retro Diels- Alder (RDA) e formação de produto Lactona .....	75
<b>Figura 44</b> - Espectro de massas da substância 11, Metoxi Quercetina-Desoxihexosida, presente no extrato bruto da polpa de <i>C. Phaea</i> , fração Metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CI-EM/EM.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas para análise dos extratos de polpas e cascas de <i>C. Phaea</i> * .....	36
<b>Tabela 2</b> - Massas obtidas dos extratos preparados de <i>C. Phaea</i> e seus respectivos rendimentos. ....	41
<b>Tabela 3</b> - Valores obtidos de EC50 para os extratos de <i>C. Phaea</i> nos ensaios de avaliação do potencial de redução dos radicais ABTS•+ e DPPH•. ....	42
<b>Tabela 4</b> - Massas obtidas do extrato CP_PA em extração em fase sólida ....	60
<b>Tabela 5</b> - Proposta de identificação das substâncias presentes nas frações do extrato acetato da polpa de <i>C. Phaea</i> (CP_PA) por CL-EM/EM, identificação em modo negativo. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS <sup>•+</sup>	Cátion radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACN	Acetonitrila
AG	Aminoguanidina
AGEs	Advanced Glycated End-Products
BHT	Di-terc-butil metil fenol
BSA	Albumina de soro bovino
CLAE-UV/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
CP_C100	Cascas de <i>Campomanesia phaea</i> extraídas com etanol 100%
CP_C70	Cascas de <i>Campomanesia phaea</i> extraídas com etanol 70%
CP_CA	Cascas de <i>Campomanesia phaea</i> extraídas com acetato de etila
CP_P100	Polpas de <i>Campomanesia phaea</i> extraídas com etanol 100%
CP_P70	Polpas de <i>Campomanesia phaea</i> extraídas com etanol 70%
CP_PA	Polpas de <i>Campomanesia phaea</i> extraídas com acetato de etila
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC <sub>50</sub>	Concentração eficiente – indica que 50% de um radical é reduzido por uma amostra
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
EtOAc	Acetato de Etila
EtOH 100%	Etanol 100%
EtOH 70%	Etanol 70%
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MeOH	Metanol
MGO	Metilglioxal
OMS	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	ESPÉCIE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> (O. BERG) LANDRUM (MYRTACEAE).....	16
1.2	ANTIOXIDANTES .....	21
1.3	GLICAÇÃO .....	24
1.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE .....	27
1.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CL-EM).....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	34
3.1	REAGENTES E SOLVENTES.....	34
3.2	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS .....	34
3.3	MATERIAL VEGETAL .....	35
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> .....	35
3.5	ANÁLISE DOS EXTRATOS DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-UV/DAD) .....	36
3.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> REALIZADOS COM OS EXTRATOS DE <i>C.</i> <i>PHAEA</i> .....	37
3.6.1	Ensaio da Capacidade de Redução do Cátion Radical ABTS•+ .....	37
3.6.2	Ensaio da Capacidade de Redução do Radical DPPH' .....	38
3.6.3	Ensaio da Atividade de Inibição da Glicação .....	38
3.7	FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> (CP_PA) POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) ...	39
3.8	DESREPLICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS DE CASCAS E POLPA DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> POR CL-EM/EM .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41

4.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CASCAS E POLPAS DA ESPÉCIE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> .....	41
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS BRUTOS DE CASCAS E POLPAS DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> .....	42
4.2.1	Ensaio da Capacidade Antioxidante .....	42
4.2.2	Ensaio Antiglicação .....	44
4.3	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS CASCAS E POLPAS DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> POR CLAE-UV/DAD .....	44
4.4	PROPOSTA E INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS EXTRATOS DAS CASCAS E POLPAS DO FRUTO DE <i>CAMPOMANESIA PHAEA</i> POR CL-EM/EM .....	50
4.4.1	Cascas de <i>C. Phaea</i> Extraídas com Solvente Acetato de Etila (CP_CA) .....	50
4.4.2	Polpa de <i>C. Phaea</i> Extraída com Solvente Acetato de Etila (CP_PA)....	60
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, com 15% a 20% do número total de espécies e com a mais diversa flora. O país conta também com alguns dos biomas mais ricos do planeta em número de espécies vegetais. Um destes biomas é a Mata Atlântica, que abriga um amplo patrimônio genético de espécies vegetais que permite garantir a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e naturais com grande potencial para o desenvolvimento da ciência de produtos naturais, devido a grande parcela de espécies inexploradas (MYERS et al., 2000; CORADIN et al., 2011; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2019).

Esta grande variedade de espécies dispõe de frutas com potencialidades nutricionais, funcionais e terapêuticas a serem exploradas que, uma vez conhecidas, podem lançar o país à novos mercados com produtos diferenciados, oriundos de produtos naturais da flora brasileira.

Os produtos naturais (PN) sempre exerceram um papel fundamental para a ciência. O estudo químico desses produtos engloba todas as partes da planta, como suas raízes, cascas, flores, folhas, frutos e sementes. Desta maneira, o uso de PN extraídos de plantas vem sendo amplamente utilizado como fonte promissora para obtenção de bioprodutos, como fármacos ou produtos afins (BERLINCK et al., 2017).

Dados da literatura indicam que algumas espécies de frutas nativas brasileiras contêm constituintes biologicamente ativos, como compostos fenólicos, flavonoides, cumarinas, estilbenos, lignanas entre outras classes de metabólitos secundários. Esses compostos têm sido associados ao combate e à capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), como também propriedades antiproliferativas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (SOARES et al., 2019).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 1,7 milhão de mortes por ano no mundo (2,8%) são causadas por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer, sendo seu desenvolvimento associado as ERON. Dessa forma, o estudo da grande diversidade de espécies de frutas nativas, catalogadas ou ainda desconhecidas, é de suma importância visando por exemplo seu consumo *in natura*, ou mesmo na forma de extratos e bioprodutos para um possível controle e/ou prevenção de DCNT (INFANTE et al., 2016).

Ainda que parte das pesquisas brasileiras no campo da etnoecologia seja ampla e distinta, abrangendo estudos voltados para a aplicação nas áreas industriais (OLIVEIRA et al., 2009), o conhecimento popular e cultivo de plantas está intimamente associado à manutenção e permanência da espécie no meio ao que está inserida (FARIA, 2002).

De acordo com Campanini (2017), existe relato de morador da comunidade de Paranapiacaba, localizada na cidade de Santo André (SP), que faz uso de cascas e folhas de *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum no combate a dores de garganta.

Portanto, conhecer os constituintes químicos presentes nas espécies vegetais, além de sua toxicidade e bioatividade é de extrema importância, assim, surge a análise fitoquímica para identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES, 2001).

A fitoquímica, é responsável por verificar a presença de metabólitos e caracterizar os constituintes químicos presentes em espécies vegetais por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SIMÕES et al., 2010).

Em vista disto, fazer o mapeamento e traçar o perfil químico de uma planta, para identificar uma atividade biológica, e posteriormente confirmar a eficácia terapêutica de cada constituinte individual ou em mistura, é necessário para o desenvolvimento de possíveis fitoterápicos, novos fármacos ou cosméticos com diversas aplicações (CRAGG et al., 1997).

### 1.1 ESPÉCIE *CAMPOMANESIA PHAEA* (O. BERG) LANDRUM (MYRTACEAE)

Myrtaceae é uma família de angiospermas e suas espécies são, na sua maioria, arbustivas. Essa família apresenta aproximadamente 100 gêneros e 3000 espécies catalogadas, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com centros de diversidade na América tropical e Austrália e poucas espécies ocorrendo nas regiões temperadas. No Brasil, as espécies pertencentes à família Myrtaceae são encontradas em regiões da Mata Atlântica, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul.

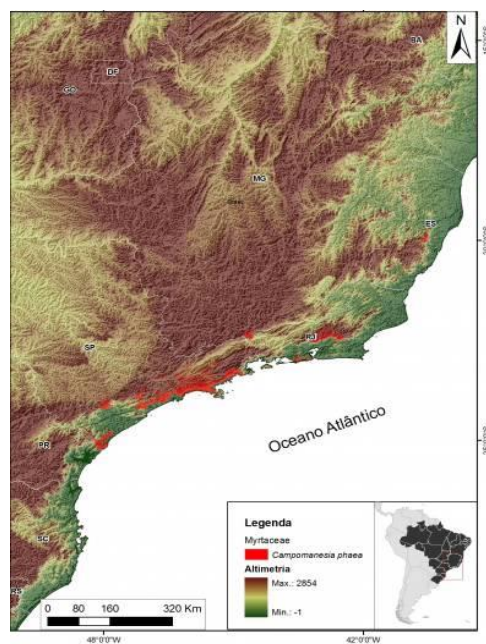
A grande maioria das espécies da família Myrtaceae possuem promissora atividade antioxidante, devido principalmente à presença de compostos fenólicos,

como os flavonoides, em sua composição fitoquímica (ALBUQUERQUE; SOARES, OLIVEIRA; 2017)

*Campomanesia phaea* é uma espécie nativa da Mata Atlântica brasileira, alocada na tribo Myrteae e subfamília Myrtoideae, da família Myrtaceae (CRONQUIST, 1984; LANDRUM, 1997). Segundo KAWASAKI e LANDRUM (1997), esta espécie está ameaçada de extinção devido à exploração predatória da sua madeira para fabricação de ferramentas e, também, pelo desmatamento da Mata Atlântica.

A ocorrência do cambucizeiro em sua forma natural está restrita às áreas remanescentes e fragmentos florestais de Mata Atlântica, ou seja, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, conforme mapa elaborado pelo CNCFlora (Figura 1).

**Figura 1** Mapa de ocorrência do cambucizeiro (*C. phaea*) no sudeste brasileiro.



Fonte: CNCFlora (Acesso em 30 de maio de 2021).

Um aspecto muito interessante dos frutos de *C. phaea* é o seu formato de disco voador, em nada semelhante a qualquer outra fruta conhecida, sua principal marca registrada. O nome popular da espécie, cambuci, para os indígenas da região, significava recipiente ou vaso, sendo o fruto uma perfeita reprodução dos vasilhames que eles utilizavam para guardar água Figura 2.

**Figura 2** Espécie *C. phaea*: cambucizeiro e fruto cambuci.



**Fonte:** Descascandoaciencia (Acesso em 30 de maio de 2021).

As características do fruto incluem casca fina e coloração verde, inclusive com a maturidade (tornando-se às vezes um pouco mais amarelada). Desse modo, o fruto amadurece quando fica mais macio e cai dos galhos. A época de florescimento se estende de agosto a novembro, meses de maior temperatura e umidade, estando os frutos maduros nos meses de fevereiro a abril (VALLILO et al., 2005).

A árvore do cambucizeiro pode chegar a atingir de 8 a 16 metros de altura em seu habitat natural, entre 10 e 40 anos, respectivamente, as plantas do cambucizeiro são halófitas e semidecíduas. Seu tronco tem coloração escura e aspecto descamado, assim como outros representantes da família Myrtaceae (DONADIO et al., 2002; VALLILO et al., 2005).

Os frutos desta espécie apresentam cheiro doce, mas são extremamente ácidos limitando o consumo dos mesmos na forma in natura (KAWASAKI e LANDRUM, 1997). No entanto, são bastante utilizados no preparo de sucos, geleias e doces em calda, sendo considerado um fruto com propriedades aromáticas que favorecem o seu uso como agente flavorizante em alimentos e bebidas (SILVA et al., 2012; VALLILO et al., 2005).

As folhas de cambuci são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de disenteria, problemas estomacais e diarreia, (Pio Correa, 1952), além de cistites e uretrites (D'ÁVILA, 1910), bem como contra distúrbios hepáticos (MORAES, 1881).

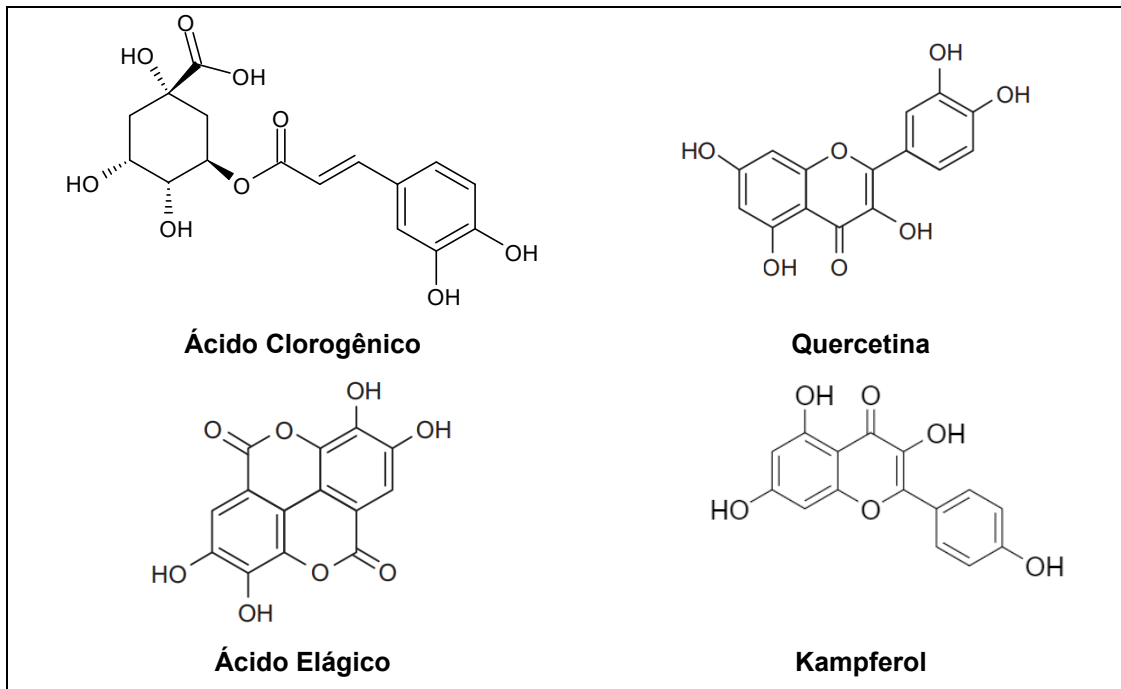
Estes extratos também têm sido usados para reduzir o colesterol no sangue e induzir a perda de peso (DICKEL et al., 2007).

Segundo Adati e Ferro (2006), as folhas dessa espécie apresentam grande quantidade de óleo essencial, rico em linalol, óxido de cariofileno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -selineno e  $\alpha$ -cadinol, substâncias que apresentam valor comercial para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

De acordo com Soares e colaboradores (2020), os frutos nativos de cambuci contêm constituintes biologicamente ativos como compostos fenólicos, carotenóides, fitoesteróis, polifenóis, ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, antocianinas, proantocianidinas, flavonóides, cumarinas, estilbenos e lignanas. Esses compostos têm sido relacionados à capacidade de eliminação de ERON, bem como propriedades antiproliferativas, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Em estudos com a polpa da espécie *C. phaea*, foram identificadas pela primeira vez as seguintes substâncias: ácidos fenólicos e derivados (ácido salvianólico, ácido gálico, isômeros de hexosídeo de ácido ferúlico, ácido dicafeoilquínico, isômeros de ácido O-hexosídeo e grupo cafeoil, flavonóis (isoquercetina) e lignanas (isolariciresinol hexosídeo e traquelosídeo) (SOARES et. al., 2020).

A Figura 3 mostra algumas moléculas já identificadas nos frutos de *C. phaea* por Gonçalves, Lajolo e Genovese (2010). Estes autores identificaram os flavonoides, quercetina, kampferol e o ácido clorogênico, entre outros, em amostras de polpa dos frutos de cambuci, além de quercetina em polpas comerciais dessa fruta, moléculas conhecidas por suas propriedades antioxidantes.

**Figura 3** Algumas substâncias identificadas nos frutos da espécie *C. phaea*.



Fonte: o próprio autor

Dentre as atividades relatadas na literatura para os extratos de frutos dessa espécie, estão as anti-inflamatórias e antimicrobianas, devido a quantidade de compostos fenólicos encontrada (Gonçalves, Lajolo, Genovese, 2010; SOARES et. al., 2019; SOARES et. al., 2020).

Considerando as propriedades medicinais relatadas para a espécie *C. phaea*, esse fruto pode ser considerado benéfico à saúde, além do seu valor nutricional, sendo capaz de desempenhar ações que reduzam o risco de doenças crônicas degenerativas (MORAES, 2007).

Os compostos fenólicos, como aqueles encontrados em *C. Phaea* exercem efeito antioxidante através de diversos mecanismos de ação incluindo o sequestro de radicais livres, inibição do surgimento de espécies reativas, por interação com enzimas e sequestro de metais. E o principal mecanismo ocorre pela doação de hidrogênios e formação de radicais fenólicos intermediários estabilizados por ressonância de elétrons não pareados na estrutura aromática, ou seja, pela ação sequestrante de radicais livres (DAI et. al., 2010).

Devido à grande diversidade de frutas nativas brasileiras e a presença de efeitos benéficos para à saúde, em virtude da presença dos fitoquímicos nas mesmas, considera-se necessária a realização de mais estudos com essas amostras, a fim de identificar novas aplicações, principalmente visando suas propriedades antioxidantes.

## 1.2 ANTIOXIDANTES

Segundo Abdalla (2003), de um modo geral, antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, são substâncias químicas capazes de retardar ou inibir o processo de oxidação, gerado pela ação de radicais, protegendo sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações de oxidação.

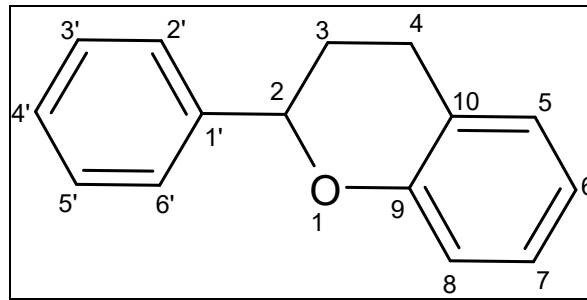
Quando a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante dos sistemas vivos ocorre o chamado estresse oxidativo. As ERON são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos, afetando moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as ERON. E na segunda classe encontram-se os antioxidantes que não apresentam atividade enzimática, sendo eles antioxidantes preventivos, formado pelos compostos fenólicos, como os flavonoides e derivados. Por sua vez, esses antioxidantes bloqueiam a etapa de início das reações de oxidação (ABDALLA et al., 2003; MOREIRA et al., 2004).

Uma das mais importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas que contêm compostos fenólicos, como os flavonoides, os quais podem ocorrer em todas as partes dos vegetais (BIANCHI et al., 1999; BENZIE et al., 2003).

Os flavonoides são compostos bioativos encontrados amplamente nos alimentos e caracterizados por sua estrutura de difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ), composta por quinze átomos de carbono, isto é, são dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono que podem ou não formar um terceiro anel (Figura 4), ligados a substituintes (ANGELO et al., 2006). Os flavonoides subdividem-se em diversas classes incluindo antocianinas, flavonas, flavanois, flavanonas, isoflavanos e flavonois.

**Figura 4** Estrutura básica dos flavonoides.



**Fonte:** o próprio autor

Além da capacidade antioxidante, os flavonoides são importantes na dieta humana, apresentando diversos efeitos biológicos e farmacológicos, como a atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, entre outras (GATTUSO et al., 2007).

Substâncias com propriedades antioxidantes encontradas na polpa e cascas de *C. phaea* podem apresentar mais de um mecanismo de ação quando em contato com o organismo humano. Assim, como podem existir vários radicais e sítios de ação, um único teste não representa de forma segura a verdadeira capacidade antioxidante de uma amostra em estudo (SUCUPIRA et al., 2012).

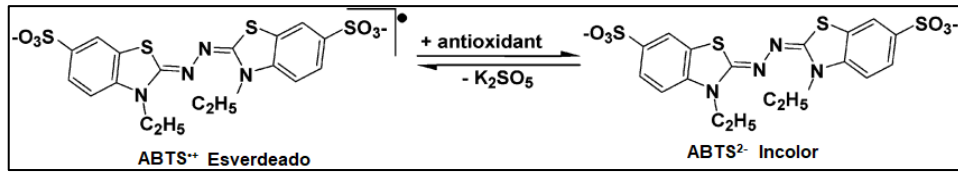
Portanto, neste trabalho foram executados dois ensaios de avaliação de atividade antioxidante: o método baseado na redução do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> e o método de redução do radical livre DPPH<sup>•</sup>.

O método ABTS<sup>•+</sup> apresenta estabilidade e reprodutibilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante, além disso, também oferece vários máximos de absorção na execução do experimento, e apresenta uma boa solubilidade, sendo possível sua aplicação em análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica.

O método se baseia na competência da estabilização do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, através da presença de grupos doadores de hidrogênio que pertence aos antioxidantes. Ao estabilizar-se, o cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, cuja coloração natural é esverdeada, passa a ser incolor, conforme a reação mostrada na

Figura 5, mostrando o término reacional (TESTON; NARDINO; PIVATO; 2011).

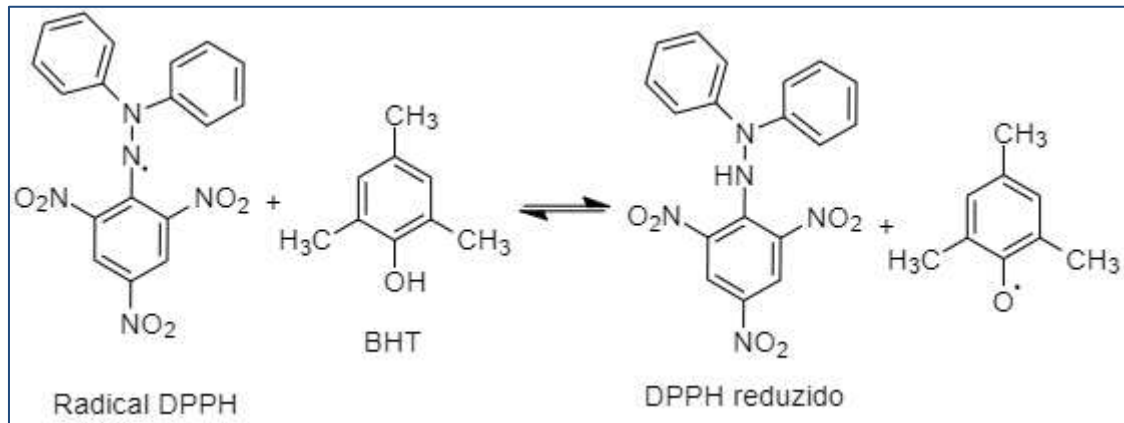
**Figura 5** Redução do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  por um antioxidante auxiliado por persulfato de potássio.



Fonte: HUANG, OU, PRIOR, (2005).

Já o método fundamentado no sequestro do radical livre DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) surgiu primeiramente em meados da década de 50, originalmente para descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais, e, mais tarde para determinar o potencial antioxidante em fenólicos individuais e alimentos (ROGINSKY; LISSI, 2005). Na Figura 6 é mostrada uma reação do radical DPPH $\cdot$  com o antioxidante sintético BHT, exemplificando o caminho da reação.

**Figura 6** Reação química entre o BHT e o radical DPPH $\cdot$ .



Fonte: OLIVEIRA, VALENTIM, GOULART, 2009.

Utiliza-se expressar os resultados da atividade antioxidante em termos de  $\text{EC}_{50}$ , que mede a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH $\cdot$  (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURACALIXTO, 1998).

Em ambos os ensaios, a capacidade antioxidante foi avaliada pelos valores de  $\text{EC}_{50}$ , calculados por meio de gráficos de porcentagem de radicais sequestrados em função das diferentes concentrações dos extratos de *C. Phaea*, onde realizando as

respectivas regressões lineares obtém-se as equações das retas ( $y = a + bx$ ) e com a substituição da variável  $y$  por 50 é alcançado o parâmetro desejado.

Atualmente, as pesquisas mostram um crescimento na quantidade de estudos em busca de novos compostos com potencial antioxidante e também antiglicante, dos quais podem ser obtidos de fontes naturais (BENZIE, 2003; BIANCHI et al., 1999).

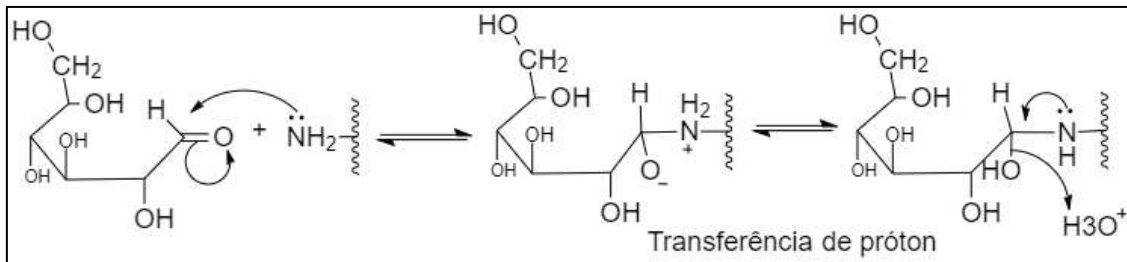
### 1.3 GLICAÇÃO

A glicação é uma reação amino-carbonila de natureza não enzimática que em geral ocorre entre açúcares e proteínas. A função desse tipo de reação é proteger as proteínas contra proteases, reconhecimentos celulares entre outros. Também chamada de glicosilação não-enzimática, escrita por L. Maillard, no século XX (MAILLARD, 1912). Esta reação não enzimática ocorre na presença de açúcares redutores (glicose, frutose, entre outros) que reagem com os grupos amina de diversas moléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. Estas espécies químicas, ao sofrerem glicação, alteram as suas propriedades físicas e químicas, como também a sua função biológica (BROWNLEE, 2005; GOLDIN et al., 2006; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009).

As reações de glicação e oxidação ocorrem através de um conjunto de reações complexas e extensas, com rearranjos moleculares, originalmente iniciadas nas bases de Schiff, transição a produtos Amadori de cadeia aberta e fechada, até atingirem o estágio irreversível de produtos finais, conhecidos como AGEs (*Advanced Glycated End-Products*) que são acumulados em proteínas, como o colágeno (GOLDIN et al., 2006; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009).

As Figura 7, 8 e 9 mostram o mecanismo de formação das reações de glicação pela via clássica, no qual utiliza-se a glicose como agente glicante.

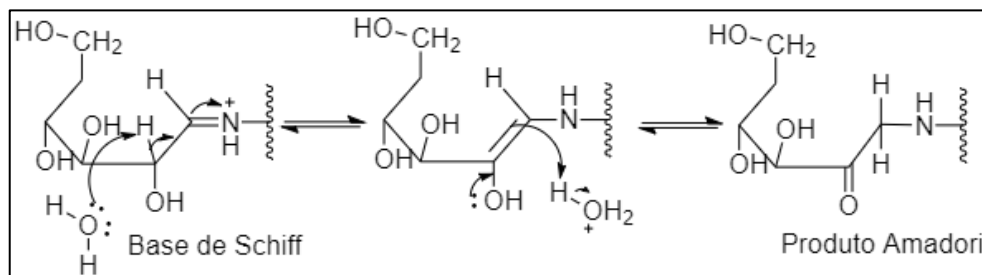
**Figura 7** Substâncias formadas a partir de interações amino carbonilo e seus rearranjos para formar a base de Schiff instável.



Fonte: o próprio autor

Na Figura 7 ocorre o ataque do par de elétrons do grupo amino da proteína, resultando em um produto amino carbonilo. Após formação da base de Schiff instável, gerada pela condensação do grupamento carbonila do açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina, oriundo, por exemplo do aminoácido lisina, composto especialmente suscetível à reação (BARBOSA et. al., 2008). Na sequência, a base de Schiff sofre desidratação e rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de Amadori, conhecido como produtos iniciais da reação de Maillard, conforme apresentado na Figura 8 (JAKUS et. al., 2004).

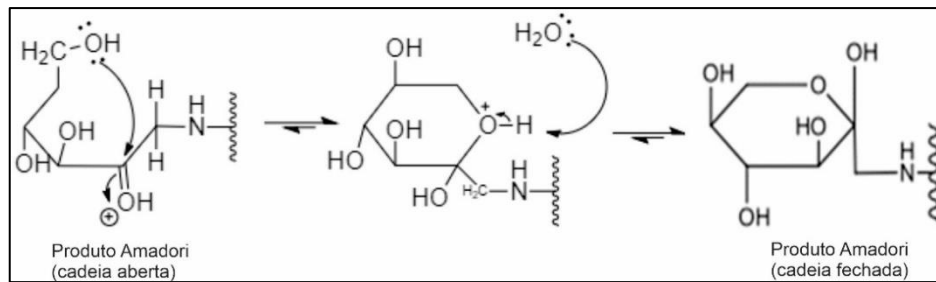
**Figura 8** Base de Schiff com rearranjo para formação do produto Amadori.



Fonte: o próprio autor

Os produtos Amadori, por sua vez, sofrem desidratação, oxidação e rearranjos, gerando os produtos finais de glicação avançada (AGEs), ou sofrem oxidação ou hidrólise formando compostos carbonílicos (BARBOSA et. al., 2008).

**Figura 9** Produto em cadeia aberta e fechada



**Fonte:** o próprio autor

Com o intuito de diminuir o tempo reacional, foi utilizado no ensaio antiglicante o agente glicante metilglioxal (MG), agente carbonílico reativo, sendo um dos produtos intermediários mais reativos da oxidação da glicose, que faz com que a reação de glicação ocorra mais rapidamente.

A formação dos AGEs a partir de compostos carbonílicos é menor do que a partir da glicose. Entretanto, é frequente a sua formação por fragmentação de gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato a metilglioxal (MG) ou, então, pela oxidação da própria glicose em glioxal, seguindo-se as transições e rearranjos através de bases de Schiff e produtos Amadori (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; DESAI et al., 2010).

No organismo, a glicação acontece naturalmente e de forma acelerada em indivíduos portadores de diabetes. E, quanto maior o nível de concentração de açúcares redutores no organismo maior será a taxa de glicação das biomoléculas, que é relacionada com a hiperglicemia e, por consequência com a diabetes tipo 2 (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Os produtos de glicação AGEs contribuem para as complicações da doença diabetes, de duas formas: no tipo 1 que acomete principalmente crianças e adolescentes, onde o pâncreas produz pouca insulina ou nenhuma; e o tipo 2, comum em indivíduos com mais de 30 anos. Nesse segundo caso, o pâncreas continua produzindo insulina, porém o organismo do indivíduo se torna resistente aos seus efeitos. Em ambos os casos, o quadro de diabetes é controlado através de alimentação adequada e injeção diária de insulina (OF, MELLITUS et. al., 2014; SINGH et al., 2001). Os AGEs contribuem de maneira clara e relevante para o surgimento de diversas patologias, além de estarem também entre as principais causas do envelhecimento cutâneo (ICHIHASHI et al., 2011). Assim, o estudo químico

de frutos nativos visando o desenvolvimento de um bioproduto capaz de auxiliar na redução do processo de glicação tem grande valor agregado para saúde e a ciência, como exemplo no desenvolvimento de novos cosméticos anti-idade.

Com esse intuito de aplicação, uma das técnicas que fornecem informações sobre os compostos químicos bioativos presentes nos frutos, por exemplo, é a cromatografia líquida (CL), técnica amplamente utilizada na separação, identificação e quantificação de estruturas químicas. As técnicas hífenadas, como a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM) é especialmente útil para identificação estrutural, na resolução de problemas de caracterização de amostras biológicas e extratos complexos de espécies vegetais e animais (PATEL et al., 2010). Estas técnicas foram utilizadas neste trabalho a fim de realizar a caracterização química dos frutos de *C. phaea*.

#### 1.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica antiga, que a partir do década de 70 passou a ter o seu uso intensificado em várias áreas. E desde então, vem apresentando novas sofisticções tecnológicas, dentre elas a utilização de colunas preenchidas por partículas de pequenos tamanhos, desenvolvimento e aperfeiçoamento de vários detectores, como por exemplo fluorescência, espectrofotômetros de massa acoplados a CLAE, e dentre outros avanços que ocorreram desde a descoberta do equipamento (MEYER, 2004).

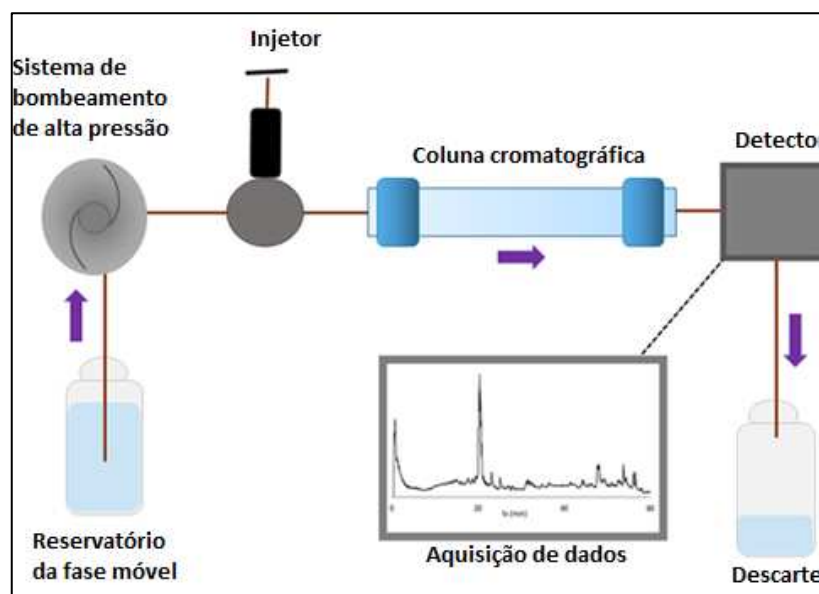
As principais vantagens da cromatografia líquida incluem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, independente da volatilidade, estabilidade térmica e polaridade, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade.

A separação de uma mistura ocorre através das interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, as quais podem ser do tipo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada entre outra. De acordo com essas interações pode-se classificar os modos de separação por: cromatografia em fase normal, fase reversa, exclusão molecular e troca iônica.

Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel e em fase reversa, a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada, uma vez que permite o uso de fases móveis aquosas, conforme utilizada neste trabalho (CASS et al., 2001). Já a cromatografia por exclusão de tamanho separa as moléculas de acordo com a sua diferença de tamanho.

Para aplicação destas técnicas existem diversos sistemas e marcas comerciais, porém, apesar das diferenças entre os equipamentos comerciais existentes, os componentes básicos de um instrumento para CLAE consistem: em um reservatório de solvente, o qual armazena a fase móvel; a bomba, usada para bombear o solvente através da coluna e todo o sistema; o sistema de pressão, para monitorar a pressão da bomba antes da coluna; o injetor, usado na coleta de uma fração da amostra; a coluna, contendo a fase estacionária, que geralmente é um tubo de aço inoxidável com diversos comprimentos e aplicações; o detector, a amostra após eluída pela fase estacionária é detectada na forma de sinais (picos) através de detectores que variam conforme a natureza da amostra, e o sistema de aquisição de dados mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise e por último um recipiente para descarte da fase móvel usada pra carrear a amostra através da coluna e do sistema após a injeção, conforme a Figura 10 (COLLINS et al., 1987).

**Figura 10** Esquema geral de um cromatógrafo para CLAE.



Fonte: Adaptado de semanticscholar.org.br

Para a garantia de resultados precisos e reprodutíveis os solventes utilizados como fase móvel em cromatografia líquida devem apresentar alta pureza, baixa absorção UV, baixa toxicidade, baixa acidez ou alcalinidade, baixa viscosidade, não ser corrosivo ao sistema e apresentar alta solubilidade na amostra analisada (DONG, 2006; MERCK, 2012).

A amostra não deve sofrer mudança de estrutura e também deve ser solúvel na fase móvel, para que possa ser eluída através da coluna sem que se alterem. O solvente da amostra deve ser a própria fase móvel, ou solvente que o analito seja completamente solúvel para garantir que não haja precipitação no injetor ou na coluna, o que pode provocar entupimento do sistema ou queda de resolução na separação (COLLINS et al., 2007).

A força de eluição do solvente, é atribuída em função da polaridade da fase estacionária. Considera-se um solvente forte, quando possui grau de polaridade semelhante ao da fase estacionária. Já em cromatografia líquida de fase reversa, a fase estacionária é mais apolar, os solventes fortes são os mais apolares. Com isso, fases móveis que possuem maior proporção de solvente orgânico são consideradas fases móveis fortes em cromatografia de fase reversa, ao aumentar a proporção de água na fase móvel, diminui a força da fase e aumenta o tempo de retenção (COLLINS, 2006).

Os solventes orgânicos mais usuais empregados em cromatografia são metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN) em mistura com água ultrapura. Estes são os modelos de fase móvel com maior ocorrência em cromatografia líquida de fase reversa (DONG, 2006; KROMIDAS, 2005).

A acetonitrila apresenta vantagens por apresentar menor viscosidade, podendo reduzir a pressão do sistema, bem como prolongar a vida útil das colunas, além de apresentar um comprimento de onda de detecção no UV inferior ao do metanol (KROMIDAS, 2005). Já o metanol apresenta um menor custo comparado a acetonitrila. Além disso, é menos propenso à contaminação, e por ser mais polar ao ser utilizado em fase móvel tampão o risco de precipitação de sais no sistema é reduzido (JONES, 2011; KROMIDAS, 2005).

Após a amostra ser eluída pela fase estacionária e separada, esta é detectada na forma de sinais (picos) através de detectores que variam conforme a natureza da amostra.

Os detectores mais utilizados são: detector UV (comprimento de onda fixo ou

variável), índice de refração, fluorescência, condutividade elétrica e eletroquímico (LANÇAS, 2009).

O detector UV-Visível é o mais empregado atualmente em CLAE para as análises rotineiras que já se conhece o analito. No desenvolvimento de uma metodologia analítica, o uso do sistema com arranjos de fotodiodos é o mais indicado, pois no extrato de *C. phaea* existe diversos compostos com várias bandas de absorção características no UV, e com isso é possível localizar o melhor comprimento de onda para determinada substância de interesse e obter o espectro de absorbância de cada substância separadamente.

Neste tipo de detector com comprimento de onda múltiplo, detector de arranjo de diodos (DAD), a radiação é absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que individualmente são detectados no arranjo de fotodiodos, registrando dados de absorbância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível.

Também, os espectros de cada pico vão sendo registrado no cromatograma, fornecendo assim, espectros UV dos picos eluídos, enquanto monitora vários comprimentos de onda ao mesmo tempo, registrando espectros tridimensionais, onde se pode observar o comprimento de onda máximo em todo pico e tempo de retenção. Esse tipo de detector facilita a identificação do pico e é o detector mais aconselhado para o desenvolvimento de métodos (COLLINS, 2006; DONG, 2006).

Um complemento desta técnica é a utilização de sistemas hifenados. Uma das técnicas que fornecem informações estruturais detalhadas sobre componentes químicos é denominada cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), amplamente utilizada na identificação de compostos. Assim, a CL-EM é uma técnica aliada precursora na identificação e no desenvolvimento de metodologias para identificar espécies químicas com potencial de serem aplicadas em produtos específicos.

Numerosas publicações recomendam avanços na determinação de compostos orgânicos, especialmente por CLAE (KAWAI et al., 1999) em conjunto com a detecção de arranjo de fotodiodos, além do seu acoplamento com a técnica de espectrometria de massa. Este é um dos métodos analíticos também aplicados à determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos, sendo indispensáveis o uso de ambas as técnicas concomitantemente para um estudo completo do perfil metabólico de diferentes amostras.

Vários estudos relataram a identificação de compostos orgânicos, em especial flavonoides, em diversos alimentos como cacau, tomate, maçã e alcachofra, por meio de CLAE-UV (JUSTESEN et al. 1998; SÁNCHEZ-RABANEDA et al., 2003). Polifenóis também foram relatados nos frutos de cambuci por esta técnica, sendo eles derivados de ácido elágico, ácido gálico, quercetina e ácido p-cumárico (DONADO-PESTANA et al., 2016). CLAE-UV/DAD juntamente com espectrometria de massa CL-EM) foram escolhidas como técnicas seletivas para análise de compostos bioativos nos frutos de cambuci.

### 1.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CL-EM)

Quando necessita-se realizar a separação e quantificação de compostos de uma amostra a CLAE é uma excelente técnica, no entanto, quando o intuito é a descoberta da identidade ou confirmação de uma estrutura química, o emprego da espectrometria de massas faz-se necessário, por ser uma técnica de alta sensibilidade que nos fornece informações estruturais valiosas, fornecendo o íon molecular e suas fragmentações. Assim, o uso desta técnica hifenada dá origem a uma ferramenta analítica multivalente e de grande aplicabilidade no campo do desenvolvimento e confirmação estrutural, sendo ela a CL-EM (CUYCKENS, et al., 2004).

A CL-EM também fornece informações sobre: a composição elementar de amostras; a estrutura molecular; a composição qualitativa e quantitativa; a estrutura e as proporções isotópicas de átomos na amostra, sendo uma técnica dominante para identificação em tempo real de substâncias em misturas complexas, especialmente em extratos brutos. De acordo com sua alta sensibilidade, os extratos são preparados a partir de quantidades pequenas de material vegetal, quando realizado de forma tradicional em escala preparativa de isolamento de produtos naturais (WOLFENDER et al., 2003).

Ao utilizar-se a técnica de espectrometria de massas, a fonte de energia é acionada e transmitida uma quantidade de energia para a amostra e então a ionização do analito é realizada, o que permite a obtenção de íons a partir de moléculas termolábeis e/ou pouco voláteis. As formas de ionização mais utilizadas atualmente no acoplamento CL-EM são: Electrospray (ESI), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica (APPI), sendo a

ionização por Electrospray a mais empregada no acoplamento CL-EM (LANÇAS, 2009).

A interface é mostrada na Figura 11 (B) utilizando a ionização via electrospray. A saída da coluna da CLAE é conectada à sonda, formada por um tubo capilar de metal circundado por um fluxo de gás nebulizador (usualmente N<sub>2</sub>), este gás é utilizado para diminuir os aglomerados de íons indesejáveis que se formam, assim como para facilitar o processo de eliminação do solvente (dessolvatação). Aplica-se uma diferença de potencial de alguns milhares de volts entre a ponta do tubo de metal e o cone de amostragem Figura 11 (A) criando um spray formado por gotículas do analito na fase móvel e o gás nebulizador. O solvente é então evaporado, e à medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido sucessivamente, até que os íons do analito evaporem e sejam direcionados para o cone de amostragem, e a seguir para o analisador de íons, onde ocorre a separação dos íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, razão  $m/z$  (LANÇAS, 2009).

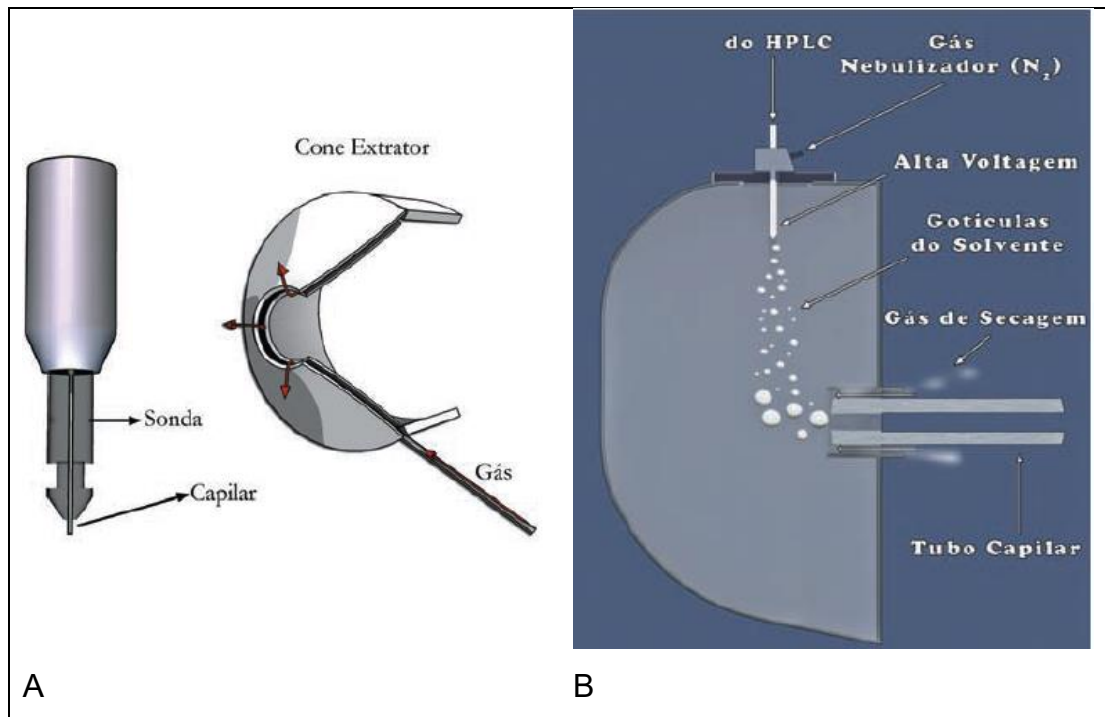
Existe uma grande diversidade de analisadores de massas, os mais comuns utilizados em acoplamento CL-EM são os analisadores de massa do tipo quadrupolo, analisadores de massa do tipo *ion trap* e analisadores de massa por tempo de voo (TOF). A escolha do mais apropriado irá depender da necessidade em que se enquadra a análise, visando faixa de massas desejada e resolução (LANÇAS, 2009).

Neste trabalho foi utilizado o equipamento CL-EM com fonte de tipo electrospray e analisador de massas do tipo *ion trap* (armadilha de íons), para a análise dos extratos obtidos dos frutos de *C. phaea*.

O analisador de massas do tipo *ion trap* é amplamente utilizado em sistemas de CL-EM, onde os íons são aprisionados (*trapped*) por um tempo ao redor de 1 milissegundo. Posteriormente, é feita uma varredura, os íons de razão massa/carga igual a  $m/z$  são acelerados na direção do eixo z, e ejetados pelo eletrodo *end cap* de saída dos íons, sendo então detectados, obtendo-se o espectro de massas.

Para esta análise o custo é relativamente baixo, quando comparado ao analisador do tipo quadrupolo, e tem-se uma boa resolução e alta sensibilidade, sendo eficaz por não apresentar limite superior de massa efetiva (LANÇAS, 2009).

**Figura 11** (A) Desenho simplificado de uma sonda para electrospray e (B) Interface do tipo eletrospray utilizada para o acoplamento CL-EM.



Fonte: Lanças, 2009

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Neste estudo o objetivo foi analisar o perfil químico dos extratos de polpa e cascas dos frutos de *Campomanesia phaea*, com a identificação de metabólitos secundários bioativos, bem como a avaliação de suas atividades antioxidante e antiglicante, visando uma futura aplicação em produto cosmético.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção dos extratos de polpa e cascas da espécie *C. phaea*, utilizando-se diferentes solvente extratores (acetato de etila, etanol 70% e 100%);
- Avaliação das atividades antioxidante e antiglicante, dos extratos *C. phaea*;
- Otimização de um método de extração dos compostos orgânicos de *C. phaea* com base na literatura;

- Determinação do perfil fitoquímico dos frutos de *C. phaea* com o desenvolvimento de um método analítico por CLAE-UV/DAD);
- Identificação de compostos orgânicos da polpa e casca de *C. phaea* por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os solventes utilizados no processo de extração de polpas e cascas de *C. phaea* foram acetato de etila e etanol grau PA da marca J. T. Baker<sup>®</sup>, enquanto que o solvente utilizado nas análises por CLAE-UV foi acetonitrila (ACN), grau HPLC da marca J. T. Baker<sup>®</sup> e água ultra pura em sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA).

#### 3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Balança analítica Mettler Toledo<sup>®</sup>, modelo AG204 (máx. 210 g);
- Banho de ultrassom: Branson<sup>®</sup>, modelo 5800;
- Cromatógrafo a líquido da Agilent Hewlett Packard<sup>®</sup> modelo HP G1311A (Palo Alto, CA, EUA) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos modelo HP. Coluna Luna<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 µm, 100 Å (250 x 4.6 mm) marca Phenomenex<sup>®</sup>, equipamento presente na Adama Brasil em Londrina-PR;
- Cromatógrafo a líquido da marca Shimadzu<sup>®</sup> modelo LC-20A Prominence, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (armadilha de íons) amaZon SL Bruker Daltonics<sup>®</sup>, equipado com fonte de ionização electrospray (ESI). Coluna Luna<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 µm, 100 Å (250 x 4.6 mm), marca Phenomenex<sup>®</sup>, equipamento presente no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-IQ/Ar).

### 3.3 MATERIAL VEGETAL

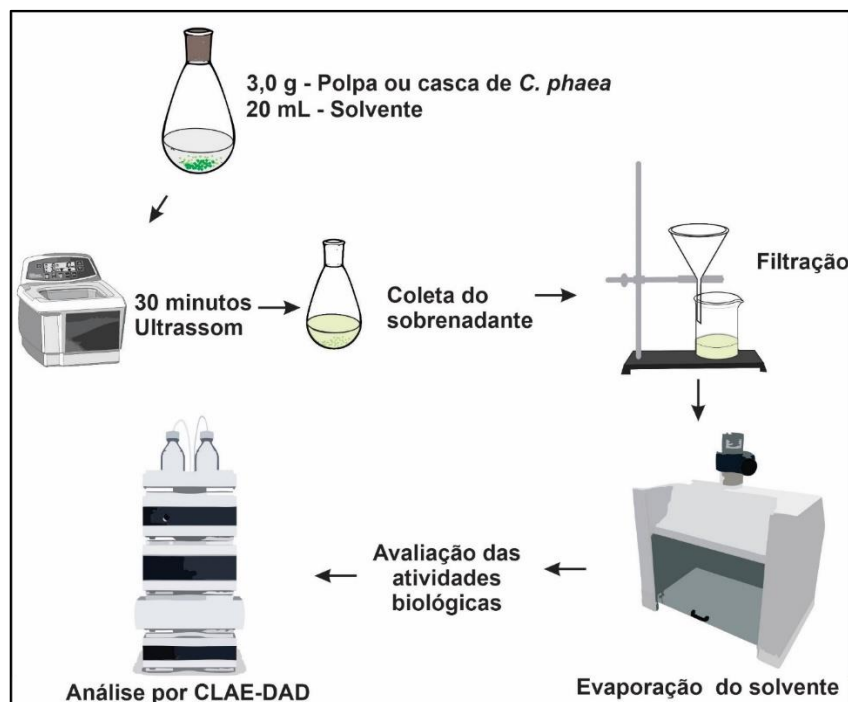
Os frutos maduros da espécie *C. phaea* foram comprados do Instituto Auá de Empreendedorismo Socioambiental da cidade Osasco - SP, Brasil, em março de 2019. Os frutos foram separados em cascas e polpas, sendo a polpa congelada e liofilizada. As cascas foram secas em estufa à 40 °C por 24 h e moídas posteriormente em moinho analítico.

### 3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *CAMPOMANESIA PHAEA*

As polpas e cascas (3,0 g de cada) de *C. phaea* foram submetidas à extração por ultrassom (20,0 mL solvente, 30 min no ultrassom), utilizando os seguintes solventes: acetato de etila e etanol (70% e 100%) para cada extração separadamente, conforme a Figura 12. As extrações foram realizadas em triplicata para cada solvente.

Os extratos foram secos em capela à uma temperatura ambiente, totalizando seis extratos ao final, três de cascas (CP\_CA, CP\_C70 e CP\_C100) e três extratos de polpas (CP\_PA, CP\_P70 e CP\_P100).

**Figura 12** Procedimento ilustrativo do processo de extração de polpa e cascas da espécie *C. phaea*.



Fonte: o próprio autor

### 3.5 ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *CAMPOMANESIA PHAEA* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-UV/DAD)

Os seis extratos obtidos de *C. phaea* foram solubilizados em água e acetonitrila (H<sub>2</sub>O:ACN, 50:50 v/v), e filtrados em membrana de polipropileno de 0,22 µm, para a injeção no CLAE-UV/DAD. As análises cromatográficas foram realizadas a fim de se obter os perfis cromatográficos dos seis extratos brutos das cascas e polpas de *C. phaea* para posterior identificação dos compostos bioativos. O sistema de solventes utilizado foi H<sub>2</sub>O no canal (A) e Acetonitrila (ACN) no canal (B), ambos com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Utilizou-se a coluna C<sub>18</sub> Luna (250 x 4,6 mm x 5 µm), da marca Phenomenex®. Todos os cromatogramas foram registrados nos comprimentos entre 200-400 nm.

Inicialmente, visando uma avaliação preliminar do perfil cromatográfico dos extratos de polpas e cascas de *C. phaea*, foi empregado um gradiente exploratório (de 5 a 100 % de B em 40 minutos), chamado de método I. Em seguida, de modo a otimizar a separação dos picos observados, foi empregado o método II. As condições são descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas para análise dos extratos de polpas e cascas de *C. phaea*\*

Método	Proporção da fase móvel
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>50% (A) e 50% (B) por 35 min.</li> </ul> (Isocrático)
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>85% (A) e 15% (B) em 0,0 min.</li> <li>0% (A) 100% (B) em 35 min.</li> </ul> (Gradiente)

\*O sistema de solventes usado foi (A) H<sub>2</sub>O contendo 0,1% ácido fórmico e (B) ACN contendo 0,1% ácido fórmico; coluna; vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>; temperatura ambiente 23 ± 3 °C; volume de injeção de 10 µL de uma solução de 10 mg mL<sup>-1</sup>, os espectros de UV (DAD) foram registrados entre 200 e 400 nm.

### 3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* REALIZADOS COM OS EXTRATOS DE *C. PHAEA*

Para a realização dos ensaios antioxidantes, baseados nos métodos de sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, preparou-se uma solução de 4 mg mL<sup>-1</sup> dos seis extratos obtidos de *C. phaea*.

A partir dessa solução estoque (4 mg mL<sup>-1</sup>) foram preparadas soluções de trabalho com concentrações variando-se de 5,0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Para o ensaio de atividade antiglicante pesou-se 1,0 mg dos seis extratos de *C. phaea* e foram solubilizados em 1 mL de H<sub>2</sub>O:DMSO (50:50 v/v).

Estes ensaios foram realizados pela doutoranda Anna Beatriz Sabino Ferrari, doutoranda no Laboratório de Fitoquímica e Biomoléculas (LabFitoBio), da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### 3.6.1 Ensaio da Capacidade de Redução do Cátion Radical ABTS<sup>•+</sup>

O ensaio é fundamentado no método descrito por Fraige e colaboradores (2018), com modificações. Esse teste consiste na captura do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e seu monitoramento por espectrofotômetro em comprimento de onda de 734 nm, devido à coloração esverdeada que a solução do ABTS<sup>•+</sup> apresenta. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi obtido pela reação de 1 mL de solução ABTS<sup>•+</sup> a 0,01 mol L<sup>-1</sup> com 430 µL de persulfato de amônio a 0,01 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi agitada e mantida no escuro e em geladeira 4,0 ± 1°C por 24 horas. Essa solução foi diluída 60 vezes em água para a realização do ensaio.

Os ensaios foram conduzidos com a adição de 800 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup> e 200 µL das soluções de amostras preparadas em cubeta de quartzo. Esse ensaio foi realizado em triplicata para cada uma das amostras.

O branco consistiu de 200 µL de etanol e 800 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup>. A quercetina foi utilizada como controle positivo (padrão), nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg mL<sup>-1</sup>. A mistura foi incubada por 30 min no escuro e posteriormente realizada a leitura com espectrofotômetro em 734 nm.

A capacidade sequestradora de radicais foi calculada conforme a Equação 1.

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} \text{ seq.} = \left( \frac{\text{Absorbância branco} - \text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância branco}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A concentração efetiva média ( $EC_{50}$ ) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais  $ABTS^{\bullet+}$  foi calculada através do gráfico % $ABTS^{\bullet+}$  sequestrado *versus* a concentração da amostra (BRAND-WILLIAMS, 1995).

### 3.6.2 Ensaio da Capacidade de Redução do Radical DPPH $\cdot$

O ensaio é baseado no método descrito por Brand-Williams et al. (1995) com modificações. Esse teste consiste no sequestro do radical DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) que é monitorado por espectrofotômetro em 515 nm. O radical DPPH $\cdot$  foi preparado a  $1.10^{-4}$  mol L $^{-1}$  em etanol.

Os ensaios foram conduzidos com a adição de 800  $\mu$ L da solução de DPPH $\cdot$  e 200  $\mu$ L das soluções de amostras preparadas em cubeta de quartzo. Esse protocolo foi realizado em triplicata para cada uma das amostras.

O branco consistiu de 200  $\mu$ L de etanol e 800  $\mu$ L da solução de DPPH $\cdot$ . A quercetina foi utilizada como padrão, nas concentrações variando de 5,0 a 100  $\mu$ g mL $^{-1}$ . A mistura foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e posteriormente realizada a leitura com espectrofotômetro em 515 nm.

A capacidade de sequestrar ou neutralizar um radical foi calculada conforme Equação 2.

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} \text{ seqs} = \left( \frac{\text{Absorbância branco} - \text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância branco}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

### 3.6.3 Ensaios da Atividade de Inibição da Glicação

O ensaio antiglicante foi realizado de acordo com Fraige e colaboradores (2018), com algumas modificações. Neste ensaio avalia-se a atividade antiglicação dos extratos, por sua capacidade de inibir a formação de AGEs usando um sistema albumina de soro bovino (BSA) e metilglioxal (MGO), uma espécie reativa de carbonila com potente ação de glicação. Esta inibição é medida por fluorescência (FRAIGE et al., 2018; LUNCEFORD, GUGLIUCCI, 2005).

A proteína BSA foi solubilizada em uma solução de tampão fosfato (pH 7,4) em concentração final de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. Foram feitas soluções finais para análise de 3 mL. Para isso, à 500 µL da solução de proteína BSA foram adicionados 450 µL das amostras a serem testadas como agente inibidor e 2,3 µL do reagente metilgloxal (MGO, 5 mmol L<sup>-1</sup>), que corresponde ao agente glicante.

Para o grupo controle do ensaio, foi preparado um branco contendo apenas tampão e BSA, um controle positivo contendo tampão, BSA, aminoguanidina (AG, 10 mmol L<sup>-1</sup>, 1500 µL), e MGO, sendo AG utilizada como padrão inibidor da glicação. Além disso um controle negativo contendo tampão, BSA e MGO, com ausência do inibidor AG também foi preparado. O volume de tampão fosfato foi adaptado para cada solução preparada no teste (branco, controle negativo, controle positivo e amostras), para se atingir o volume final de 3,0 mL desejados.

A solução resultante foi incubada a 37 ± 1 °C durante três dias sob agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a leitura foi realizada em triplicata, nas quais as medidas de fluorescência foram realizadas a 370 nm ( $\lambda_{excitação}$ ) e a 440 nm ( $\lambda_{emissão}$ ) para detectar a inibição das AGEs totais.

A porcentagem de inibição da glicação foi calculada por meio da Equação 3, onde FL<sub>CN</sub> e FL<sub>bcn</sub> são as intensidades de fluorescência do controle negativo e seu branco, respectivamente, e FL<sub>s</sub> e FL<sub>bs</sub> são as intensidades de fluorescência do extrato e seu branco, respectivamente.

$$\% \text{Inibição formação de AGEs} = \frac{(FL_{CN} - FL_{bcn}) - (FL_s - FL_{bs})}{(FL_{CN} - FL_{bcn})} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

### 3.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA POLPA DE *CAMPOMANESIA PHAEA* (CP\_PA) POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)

O extrato CP\_PA de *C. phaea* foi solubilizado em H<sub>2</sub>O:ACN (50:50 v/v) para fracionamento por extração em fase sólida (EFS). Para essa análise foi utilizado um cartucho para extração com fase estacionária C<sub>18</sub> (octadecil), não-capeado, com 500 mg de sorvente e volume máximo de 3,0 mL.

Os cartuchos de EFS de 3 mL, com 500 mg de fase estacionária foram condicionados com 5 mL de metanol grau CLAE e na sequência passados 5 mL de metanol 10%. Em seguida 5 mL do extrato (CP\_PA) foram eluídos através da coluna (na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>), posteriormente lavada com 5 mL de metanol 10%

e a fração coletada. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com diferentes proporções de metanol em água: metanol 20%, 30%, 80% e 100%, sequencialmente, a fim de separar os analitos por polaridade.

Posteriormente as amostras foram submetidas ao processo de liofilização para remoção completa da água residual e analisadas por CL-EM/EM.

### 3.8 DESREPLICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS DE CASCAS E POLPA DE *CAMPOMANESIA PHAEA* POR CL-EM/EM

Os extratos dos frutos de cambuci foram analisados em um cromatógrafo CLAE Prominence (Shimadzu<sup>®</sup>, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (armadilha de íons) amaZon SL Bruker Daltonics<sup>®</sup>, equipado com fonte de ionização electrospray (ESI) para se obter a fragmentação dos compostos para desreplicação. O cromatógrafo consistiu de uma bomba LC-20AD, unidade de degaseificação DGU 20-A3R, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20AHT, e módulo de comunicação CBM-20. Uma coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> Luna (250 x 4,6mm d.i.; 5 µm) foi empregada como fase estacionária, e o sistema de solventes consistiu em água (A) e acetonitrila (ACN, B), ambas acidificadas com 0,1% ácido fórmico (v/v). A vazão de fase móvel de 1 mL min<sup>-1</sup> foi empregada, bem como temperatura de forno de coluna a 23 °C, e volume de injeção de 4 µL. Os extratos secos foram solubilizados a 1 mg mL<sup>-1</sup> em ACN:H<sub>2</sub>O (1:1), centrifugados a 4500 rpm, e os sobrenadantes foram analisados.

O gradiente empregado nas análises foi de 15 a 100% B em 35 min. Os espectros de massas foram obtidos no modo positivo e negativo de ionização, separadamente, considerando uma faixa de massa de 50–1200 Da, aplicando o modo auto EMn (n = 3). Os parâmetros da fonte do espectrômetro de massas foram definidos como: voltagem capilar a 4,5 kV, e nitrogênio usado como gás de nebulização e secagem (50 psi, 10 L min<sup>-1</sup>, 300 °C). Os dados foram processados no software Bruker Compass Data Analysis 4.3<sup>®</sup>.

Estas análises foram realizadas no Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Araraquara (IQ-Ar, UNESP), pela doutoranda Helena Mannocho Russo, do Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do IQ-Ar, UNESP.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CASCAS E POLPAS DA ESPÉCIE *CAMPOMANESIA PHAEA*

Para a extração das polpas e cascas de *C. Phaea*, conforme descrito no item 3.4, utilizou-se acetato de etila (EtOAc) e etanol (EtOH) 70 e 100 %, obtendo-se extratos de diferentes polaridades, com o intuito de extrair o maior número de substâncias de cada parte dos frutos, tanto da polpa, quanto das cascas, visto que a característica de cada solvente influencia diretamente nos tipos de compostos a serem extraídos.

A Tabela 2 apresenta os rendimentos e as massas finais obtidas a partir da extração de 3,0 g de polpa dos frutos de cambuci com 60 mL de solvente, e devido à pouca quantidade de cascas obtida, foi realizada uma micro extração com 0,5 g das cascas do fruto e 3,33 mL do solvente. Foram realizadas três extrações com cada solvente.

**Tabela 2** Massas obtidas dos extratos preparados de *C. phaea* e seus respectivos rendimentos.

<b>Amostras</b>	<b>Código das Amostras</b>	<b>Solvente extrator</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<i>C. phaea</i> (casca)	CP_CA	Acetato de etila	10,0	2,0
	CP_C70	Etanol 70%	212,9	42,6
	CP_C100	Etanol 100%	133,2	26,6
<i>C. phaea</i> (polpa)	CP_PA	Acetato de etila	89,4	3,0
	CP_P70	Etanol 70%	841,4	28,1
	CP_P100	Etanol 100%	729,07	24,3

CP = *C. phaea*; C = cascas; P = polpa; A = acetato de etila; 70 = Etanol 70%; 100 = Etanol 100%

As extrações com o solvente etanol apresentaram rendimentos maiores tanto para cascas, quanto polpas de cambuci, quando comparadas às extrações utilizando o solvente EtOAc. O maior rendimento encontrado foi obtido para o extrato CP\_C70, extraído com EtOH 70%, este resultado pode ser explicado pela maior polaridade deste solvente em relação ao solvente EtOH 100% e EtOAc. O solvente EtOH 70% pode ter extraído compostos mais polares, como compostos glicosilados e também

maior quantidade de açúcares, devido a quantidade de 30% de água em sua composição, aumentando-se assim, a massa e o rendimento final da extração.

#### 4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS BRUTOS DE CASCAS E POLPAS DE *CAMPOMANESIA PHAEA*

##### 4.2.1 Ensaio da Capacidade Antioxidante

Neste trabalho foram realizados dois ensaios de avaliação de atividade antioxidante: o método baseado na redução do cátion radical ABTS<sup>•+</sup> e o método de redução do radical livre DPPH<sup>•</sup>. Os valores de EC<sub>50</sub> obtidos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** Valores obtidos de EC<sub>50</sub> para os extratos de *C. phaea* nos ensaios de avaliação do potencial de redução dos radicais ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>.

Amostras	Código das Amostras	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup> ABTS <sup>•+</sup>	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup> DPPH <sup>•</sup>
<i>C. phaea</i> (casca)	CP_CA	54,87 ± 0,65 <sup>c</sup>	82,71 ± 2,93 <sup>d</sup>
	CP_C70	41,21 ± 0,74 <sup>b</sup>	58,54 ± 2,11 <sup>b</sup>
	CP_C100	58,67 ± 2,51 <sup>c</sup>	75,25 ± 1,64 <sup>c</sup>
<i>C. phaea</i> (polpa)	CP_PA	>100	>100
	CP_P70	41,04 ± 0,87 <sup>b</sup>	64,42 ± 1,25 <sup>b</sup>
	CP_P100	>100	>100
Quercetina (Controle)	Padrão	1,39 ± 0,001 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,03 <sup>a</sup>

\*Ensaio realizado em triplicata; valores seguidos por diferentes letras minúsculas dentro de uma coluna são significativamente diferentes em t < 0,05.

Ao compararmos os valores de EC<sub>50</sub> da Tabela 3 obtidos pelo ensaio de avaliação do potencial de redução do radical ABTS<sup>•+</sup> para os extratos de cascas e polpa de *C. phaea*, extraídos com etanol 70% (CP\_C70 e CP\_P70), observou-se que não houve diferença significativa (p > 0,05) entre os extratos avaliados, sendo que

ambos apresentaram os menores valores de  $EC_{50}$ , ou seja, maior capacidade antioxidante, com a estabilização do cátion radical  $ABTS^{•+}$  através da presença de grupos doadores de hidrogênio e/ou elétrons pertencentes aos antioxidantes presentes nos extratos.

Os mesmos extratos de polpa e casca de cambuci extraído com etanol 70% (CP\_C70 e CP\_P70) também apresentaram maior capacidade antioxidante pelo método do sequestro do radical  $DPPH^•$ , quando comparado aos outros extratos analisados.

Além disso, os extratos das cascas de *C. phaea* extraídos com solvente EtOH 70% apresentaram uma maior capacidade antioxidante também em relação aos extratos das cascas do fruto extraídos com EtOAc e EtOH 100%.

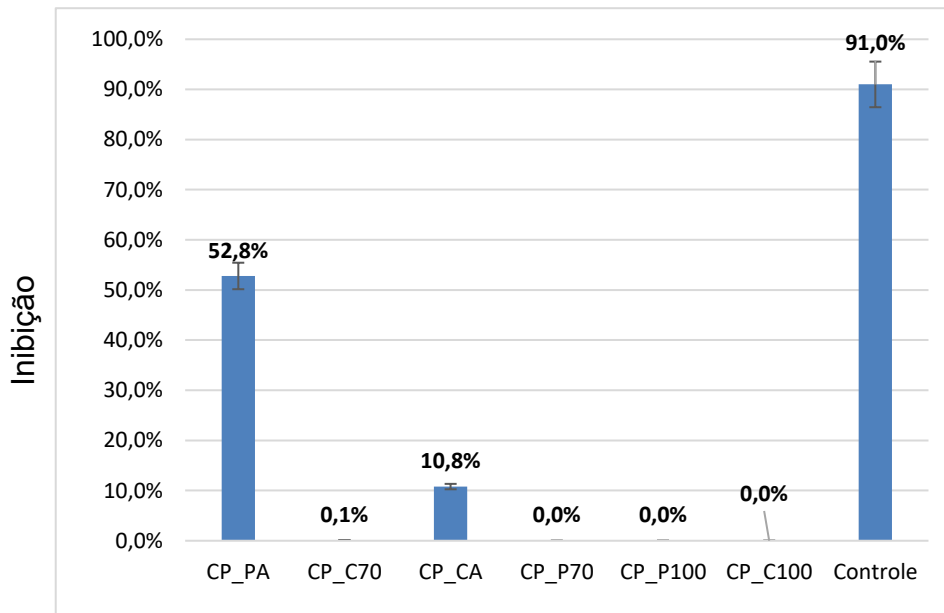
De acordo com Garcia e colaboradores (2019) é possível classificar a bioatividade dos extratos de acordo com os resultados obtidos de  $EC_{50}$ . Os extratos podem ser categorizados em quatro grupos: altamente ativos ( $EC_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); moderadamente ativo ( $50 < EC_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); fracamente ativo ( $100 < EC_{50} < 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou simplesmente inativo ( $EC_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Diante desses parâmetros, nos ensaios  $DPPH^•$  e  $ABTS^{•+}$  o extrato etanólico 70% da casca e da polpa apresentaram-se moderadamente ativo, enquanto os outros extratos (etanólico 100% e extrato acetato) apresentaram-se fracamente ativos e/ou inativos. Mediante os resultados pode-se notar que a bioatividades dos extratos etanólico da casca e polpa de *C. phaea* estão possivelmente relacionadas à sua composição fenólica.

#### 4.2.2 ENSAIO ANTIGLICAÇÃO

Os resultados do ensaio antiglicante para os extratos das cascas e polpa de *C. phaea*, extraídos com diferentes solventes encontram-se na Figura 13.

**Figura 13** Atividade inibitória de glicação dos extratos de polpa e casca do fruto *C. phaea* extraídos com diferentes solventes. Todos os extratos e controles positivos foram diluídos em H<sub>2</sub>O e DMSO (50:50) na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Valores expressos em porcentagem de inibição. Amostras CP\_CA: extração das cascas com acetato de etila; CP\_C70: extração das cascas com etanol 70%; CP\_P70: extração das polpas com etanol 70%; CP\_C100: extração das cascas com etanol 100%; CP\_P100: extração das polpas com etanol 100%.



**Fonte:** o próprio autor

Analisando-se a Figura 13, nota-se a grande diferença de atividade entre os extratos das cascas e polpa de *C. phaea*, extraídos com solventes de polaridades diferentes. O extrato CP\_PA foi capaz de inibir a reação de glicação de forma mais efetiva se comparado aos outros extratos, tanto na casca (10,8%), quanto a polpa (52,8%).

O fato do extrato de cascas extraído com solvente mais apolar ter apresentado maior atividade pode ser explicado pela característica do solvente, o EtOAc, sendo menos polar comparado ao EtOH, sendo capaz de retirar óleos, gorduras, esteróis e pigmentos, facilitando a extração por exemplo de flavonoides, além de agliconas livres

pouco polares, tais como flavonas, chalconas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação (SIMEÕES et al, 2007).

Com o aumento da polaridade do solvente, por exemplo com o EtOH 70% e 100% pode-se extrair as agliconas poli-hidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares, auronas, e heterosídeos mais polares, tais como os poliglicosídeos, flavanodióis, catequinas e procianidinas, e principalmente os açúcares segundo Simeões (2007), justamente a extração de açúcares pode explicar a diminuição do resultado antiglicante para os extratos CP\_C70, CP\_C100, CP\_P70, CP\_P100.

Assim, essa propriedade antiglicante apresentada pela polpa do fruto de *C. campomanesea* foi observada pela primeira vez neste trabalho, contribuindo assim para usos futuros, como por exemplo em formulações cosméticas anti-idade.

#### 4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS DAS CASCAS E POLPAS DE *CAMPOMANESIA PHAEA* POR CLAE-UV/DAD

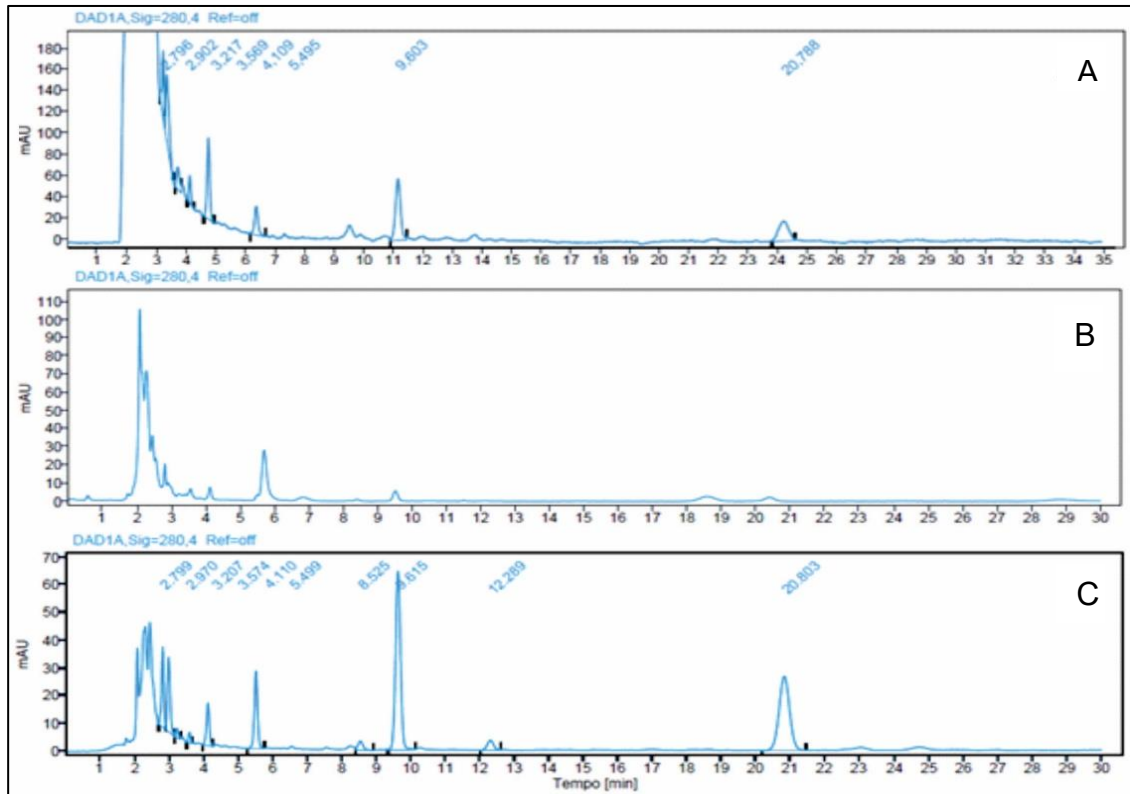
Por meio da CLAE-UV/DAD foi possível verificar o perfil químico dos extratos das cascas e polpas de *C. phaea*, extraídos com os solventes EtOAc, EtOH 70 e 100%, a fim de analisar qual seria o melhor solvente extrator. Para isso, foi levado em consideração alguns parâmetros importantes da cromatografia, tais como: a resolução, intensidade e quantidade de picos.

Os perfis cromatográficos dos extratos das cascas e polpas dos frutos foram obtidos através do método I descrito no item 3.5, monitorando-se os comprimentos de onda numa faixa de 200-400 nm.

Ao longo do estudo, notou-se que os valores de comprimento de onda mais adequados para as análises dos extratos das cascas e polpa de *C. phaea* foi de 280 nm para cascas extraídas com EtOAc, EtOH 70% e 100%, e o comprimento de onda de 254 nm para os extratos de polpa usando os três solventes extratores, pois foi possível observar uma melhor resolução e quantidade de picos.

Inicialmente empregou-se o método I, desenvolvido no modo isocrático de eluição com 50% ACN:H<sub>2</sub>O, descrito na Tabela 1, item 3.5. Os cromatogramas obtidos para os extratos das cascas de *C. phaea* com solvente EtOH 70% (CP\_C70), EtOH 100% (CP\_C100) e acetato de etila (CP\_CA), estão apresentados na Figura 14, respectivamente.

**Figura 14** Perfis cromatográficos no modo isocrático de eluição com ACN:H<sub>2</sub>O (50:50), obtidos por CLAE-UV/DAD, extratos: (A) CP\_C70; (B) CP\_C100 e (C) CP\_CA das cascas de *C. phaea*, usando coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); método I, ACN:H<sub>2</sub>O (com 0,1% ácido fórmico em ambas as fases), λ=280 nm, volume de injeção: 10 µL de uma solução de 10 mg mL<sup>-1</sup>.



Fonte: o próprio autor

Os cromatogramas dos extratos das cascas apresentaram muita coeluição na região inicial da análise, com substâncias mais polares que apresentam tempos de retenção menores. No entanto, nota-se a presença de picos intensos após esta região coeluída de 4 minutos em diante. Além disso, é possível notar uma grande similaridade entre os perfis cromatográficos para os três solventes extratores das cascas de *C. phaea*, com diferença na intensidade dos sinais.

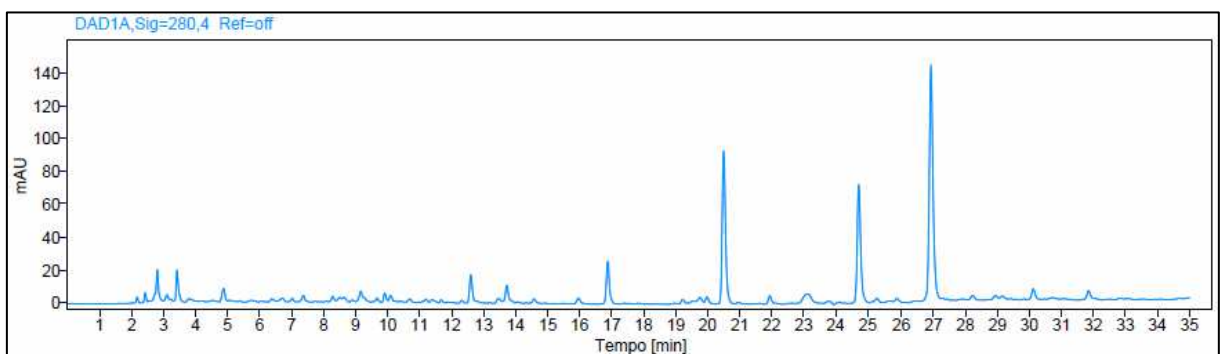
Como o cromatograma da Figura 14 (C) apresentou picos de maiores intensidades, a amostra de cascas de *C. phaea* extraída com acetato de etila (CP\_CA) foi utilizada para a otimização do método cromatográfico, esperando-se obter uma melhor separação dos picos para futura identificação dos metabólitos presentes.

O método cromatográfico II (descrito na Tabela 1, item 3.5) foi o resultado da otimização do gradiente de eluição usando a amostra CP\_CA. O método cromatográfico II, iniciou-se com 15% de ACN no modo de eluição gradiente,

aumentando-se a porcentagem de ACN em 2,43% por minuto até o final da corrida, assim, com o aumento da força do eluente.

A Figura 15 mostra o cromatograma obtido para o extrato CP\_CA após a otimização do método cromatográfico.

**Figura 15** Perfil cromatográfico da amostra CP\_CA (extrato das cascas de *C. phaea*), modo de eluição gradiente com 15-85% de ACN em 35 min, por CLAE-UV/DAD, usando coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); método II, ACN:H<sub>2</sub>O (com 0,1% ácido fórmico em ambas as fases), λ=280 nm, volume de injeção: 10 µL de uma concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>.

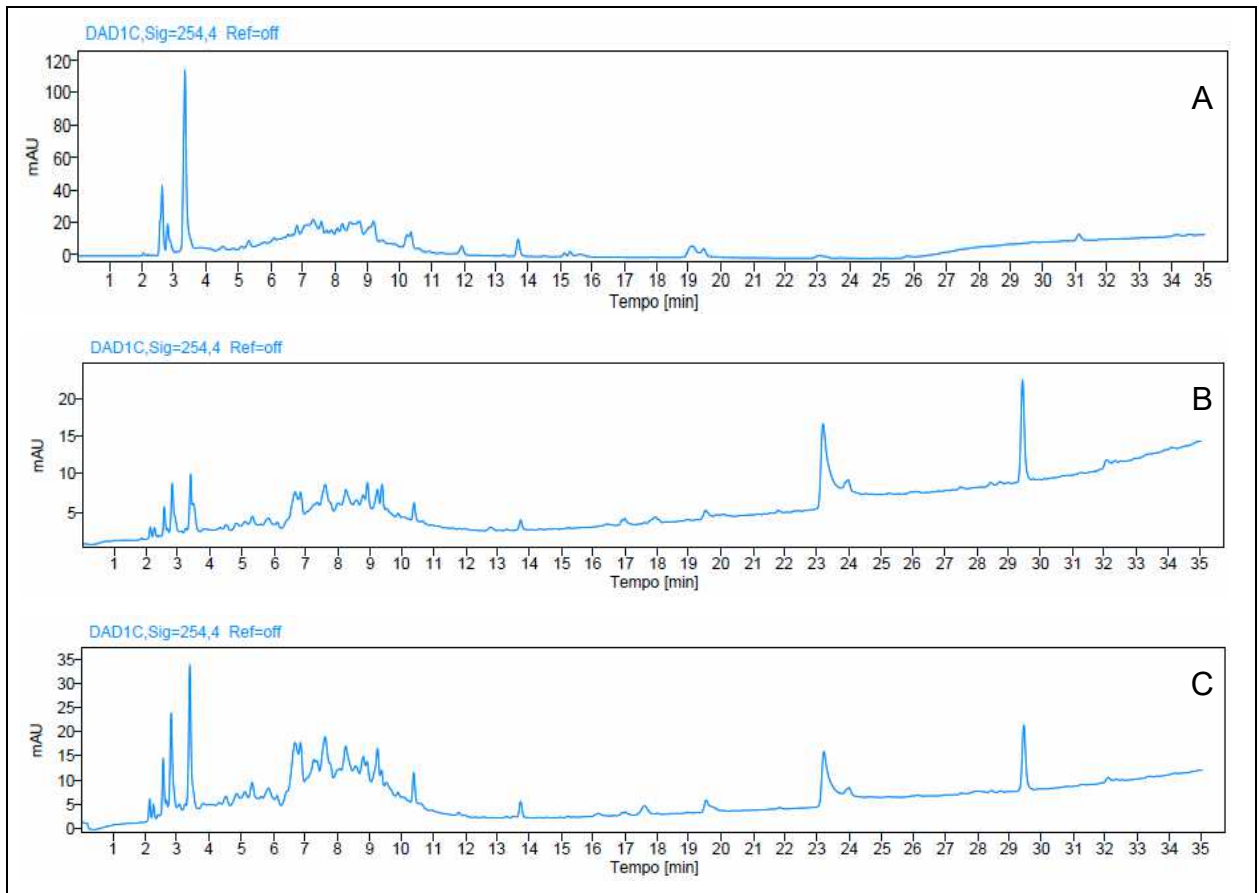


Fonte: o próprio autor

Ao compararmos os perfis cromatográficos das Figura 14 (C) e Figura 15 pode-se verificar uma melhora da separação e resolução dos picos neste último cromatograma. Assim, este gradiente otimizado foi aplicado para as análises de todas as amostras por CLAE-UV/DAD. A partir do método I, foi possível otimizar o modo de eluição e chegar ao método II, podendo classificá-lo como melhor método para este estudo de acordo com os respectivos comprimentos de ondas para cada extrato.

Nas análises da polpa de *C. phaea*, (extratos CP\_PA, CP\_P70 e CP\_P100), também foi aplicado o método II com a mudança no comprimento de onda para 254 nm. Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 16.

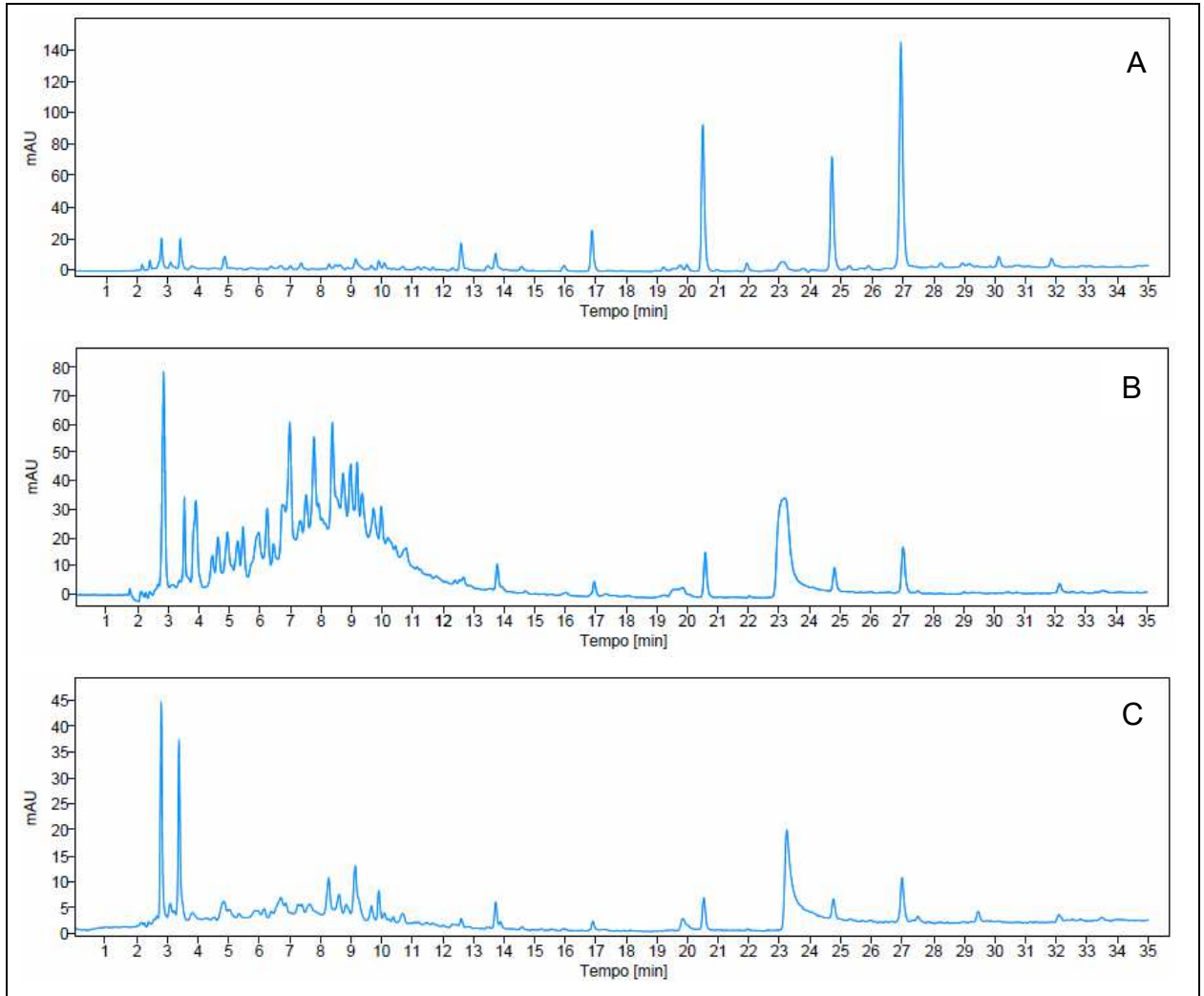
**Figura 16** Perfis cromatográficos dos extratos das polpas de *C. phaea* obtidos por CLAE-UV/DAD: (A) CP\_PA; (B) CP\_P70 e (C) CP\_P100 em coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), modo de eluição gradiente com 15-85% de ACN:H<sub>2</sub>O em 35 min, volume de injeção: 10 µL, concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>.



Fonte: o próprio autor

Apesar da extração com solvente etanol 70% apresentar um maior rendimento (42,6 %) e também o cromatograma apresentar grande similaridade no perfil químico com praticamente o mesmo número de picos para ambos os solventes extratores, o extrato CP\_CA, foi o escolhido para a sequência do trabalho (cromatograma apresentado na Figura 17 (A), visto que o extrato EtOAc apresentou números de picos com maior intensidade e bem mais definidos, comparado aos outros dois cromatogramas obtidos dos extratos CP\_C70 e CP\_C100, o que justifica a escolha desse extrato para uma futura validação da metodologia por CLAE-UV/DAD.

**Figura 17** Perfis cromatográficos dos três extratos de cascas de *C. phaea*, obtidos por CLAE-UV/DAD, extratos: (A) CP\_CA; (B) CP\_C70 e (C) CP\_C100, em coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); método II, 15% (B) e 85% (A) (com 0,1% ácido fórmico em ambas as fases), λ=280 nm, volume de injeção: 10 µL de uma solução de 10 mg mL<sup>-1</sup>.



Fonte: o próprio autor

Dentre os extratos de polpas obtidos, foi selecionado o extrato CP\_PA (extraído com o solvente acetato de etila) para continuação do estudo e identificação dos compostos bioativos, pois foi o extrato que obteve maior atividade inibitória de glicação (52,8%), conforme Figura 13. No entanto, pode ser visto no cromatograma da Figura 16 A na região de 2 a 11 minutos grande coeluições de picos. Assim, a fim de se obter uma melhor separação dos compostos visando sua identificação por CL-EM/EM, o fracionamento deste extrato orgânico foi realizado por meio da técnica de EFS, sendo este um passo fundamental na determinação de compostos proveniente desta matriz,

visando a limpeza da amostra e separação dos constituintes presentes com solvente de diferentes polaridades.

A eficiência do solvente em selecionar os compostos de interesse adsorvidos no cartucho de EFS geralmente recheados com C<sub>18</sub>, após eluição do extrato orgânico concentrado, depende da afinidade química com as diversas classes de marcadores orgânicos, do ajuste na quantidade de adsorventes e nos volumes de solventes utilizados para eluição de cada fração. Esses fatores são cruciais para uma separação precisa das diferentes classes de marcadores orgânicos, necessários para uma caracterização do analito (CAVALCANTE et al, 2008).

#### 4.4 PROPOSTA E INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NOS EXTRATOS DAS CASCAS E POLPAS DO FRUTO DE *CAMPOMANESIA PHAEA* POR CL-EM/EM

##### 4.4.1 Cascas de *C. phaea* Extraídas com Solvente Acetato de Etila (CP\_CA)

O estudo de desreplicação foi definido como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos a fim de evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias já conhecidas por meio dos métodos convencionais, onde com auxílio de banco de dados pode-se realizar a identificação de substâncias conhecidas (FUNARI et al., 2013; NG, BANDEIRA, LIU et al., 2009).

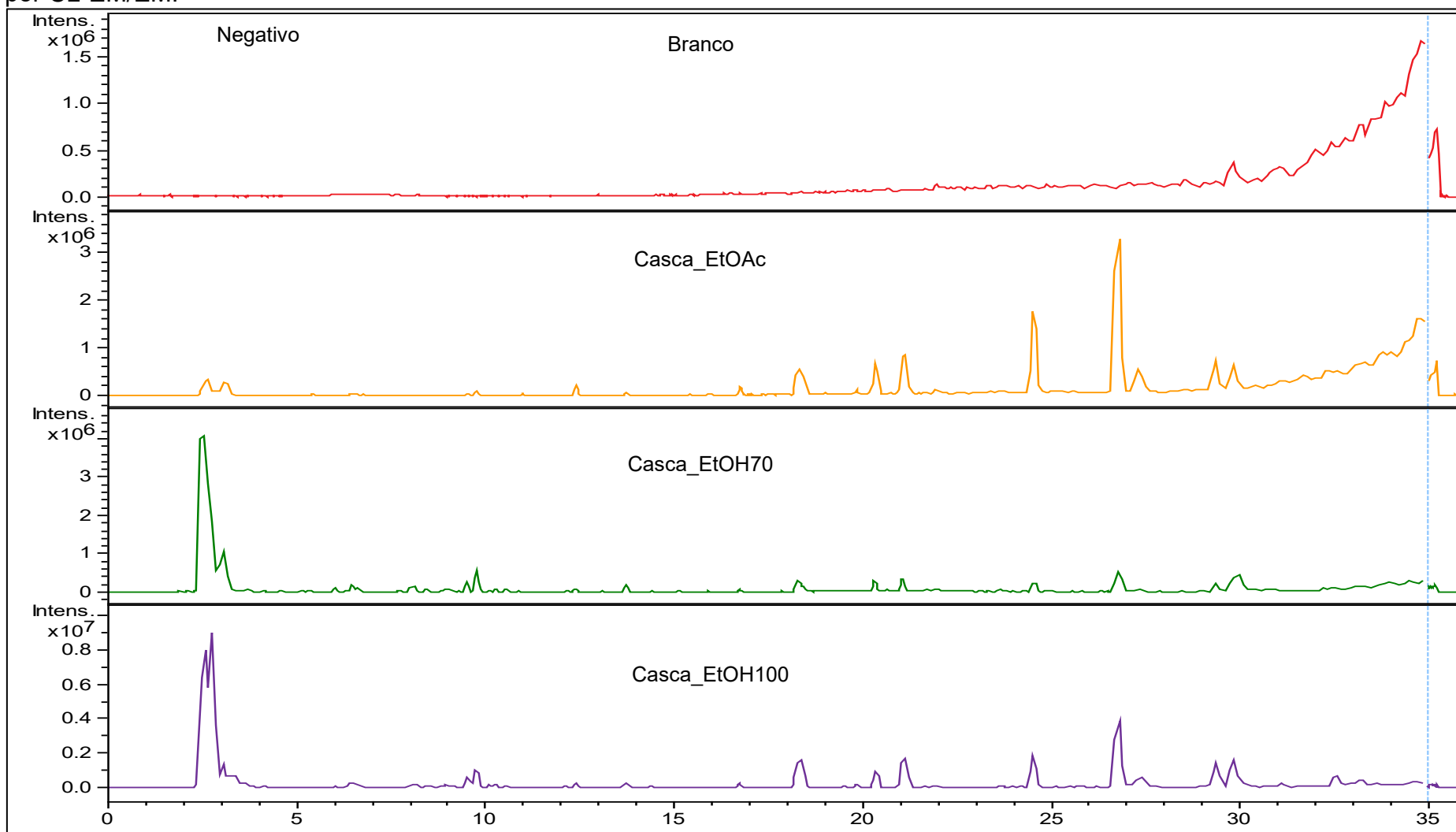
Neste trabalho, foram avaliados todos os extratos brutos de *C. phaea*, obtidos com os diferentes solventes extratores por CL-EM/EM (Figuras 18 a 22), e feita a desreplicação do extrato com maior número de picos CP\_CA, Figura 17 (A) e também do extrato com maior capacidade antiglicante CP\_PA, Figura 16 (C). Estas duas amostras foram selecionadas sendo consideradas as mais representativas para este estudo, portanto os trabalhos foram canalizados para identificação dos compostos dos extratos CP\_CA e CP\_PA (cascas e polpas extraídos com solvente acetato de etila).

Os cromatogramas de íons totais (TIC) mostram que os perfis obtidos para cada solvente extrator (EtOAc, EtOH70% e EtOH100%) são muito semelhantes em ambos os modos de ionização, e para ambas as partes dos frutos (Figuras 18 a 22).

Nas Figuras 18 a 22 pode-se observar que os extratos obtidos das cascas apresentaram sinais mais intensos que os obtidos das polpas, o que pode ser explicado pela maior quantidade de compostos polares presentes nos extratos das polpas, que eluem próximos ao volume morto da coluna. Dessa forma, as análises

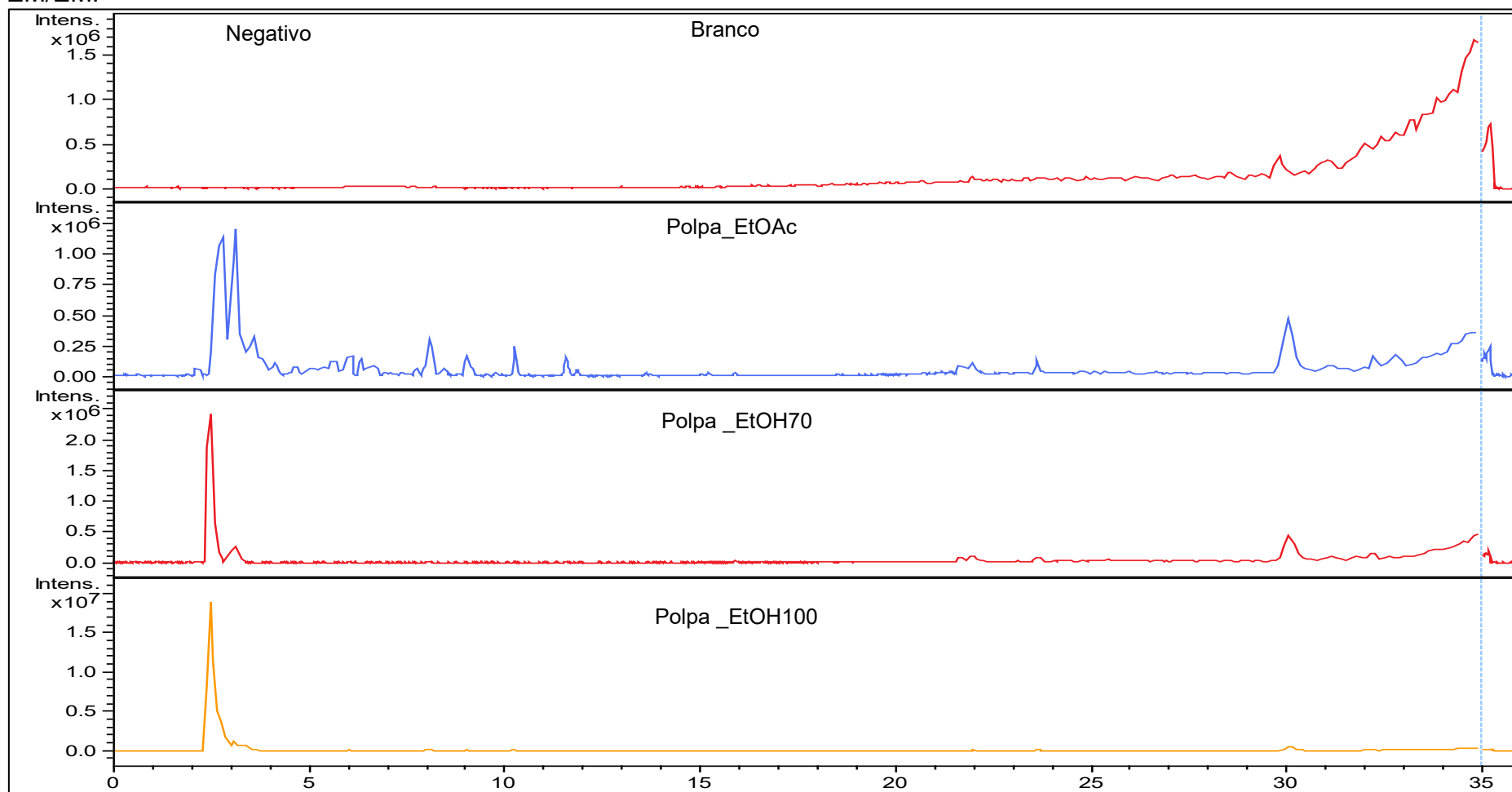
obtidas para os extratos acetato de etila foram selecionadas para anotações de compostos presentes.

**Figura 18** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos obtidos das cascas do *C. phaea*, modo negativo de ionização, por CL-EM/EM.



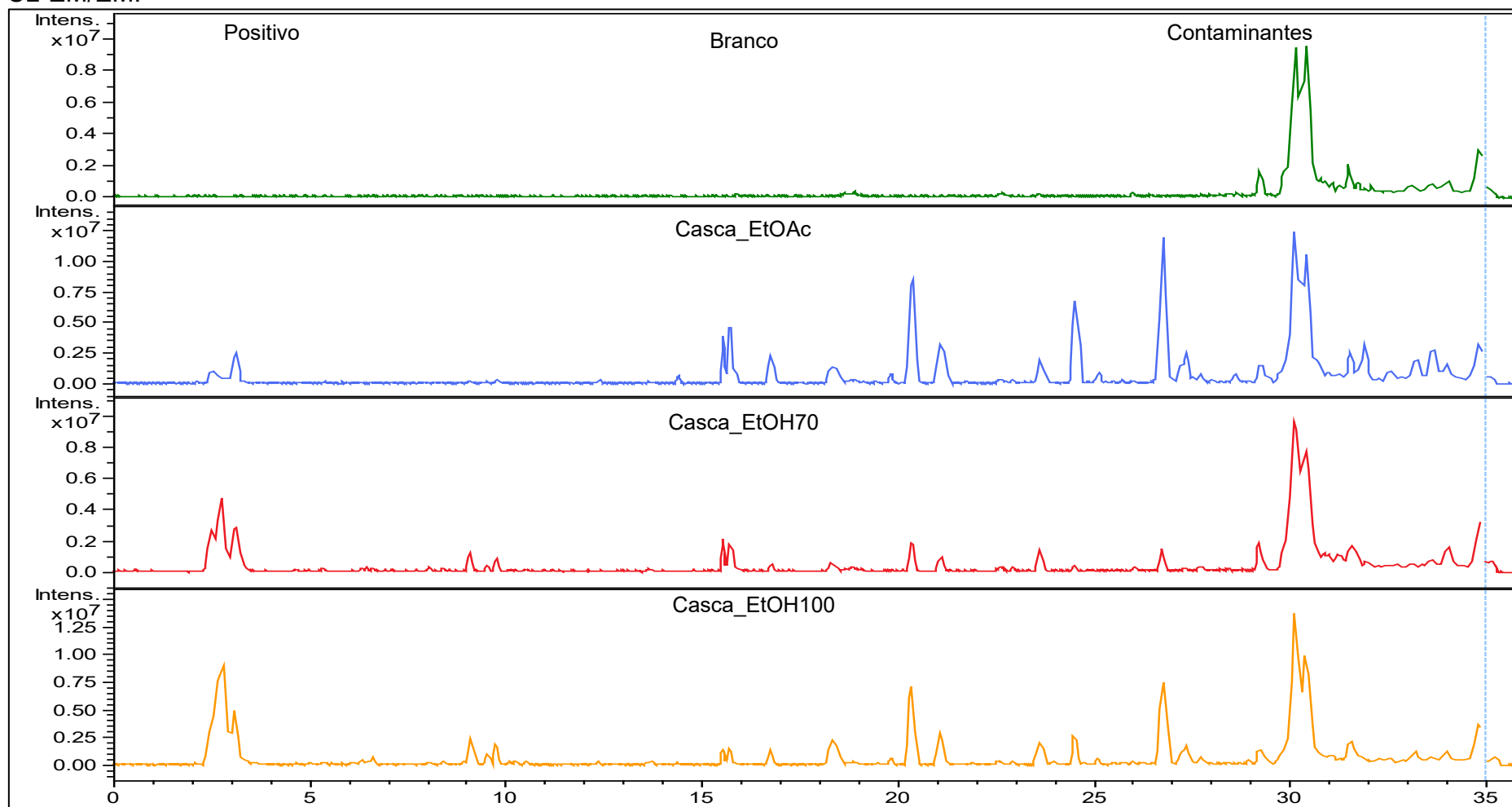
Fonte: o próprio autor

**Figura 19** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das polpas de *C. phaea*, modo negativo de ionização, por CL-EM/EM.



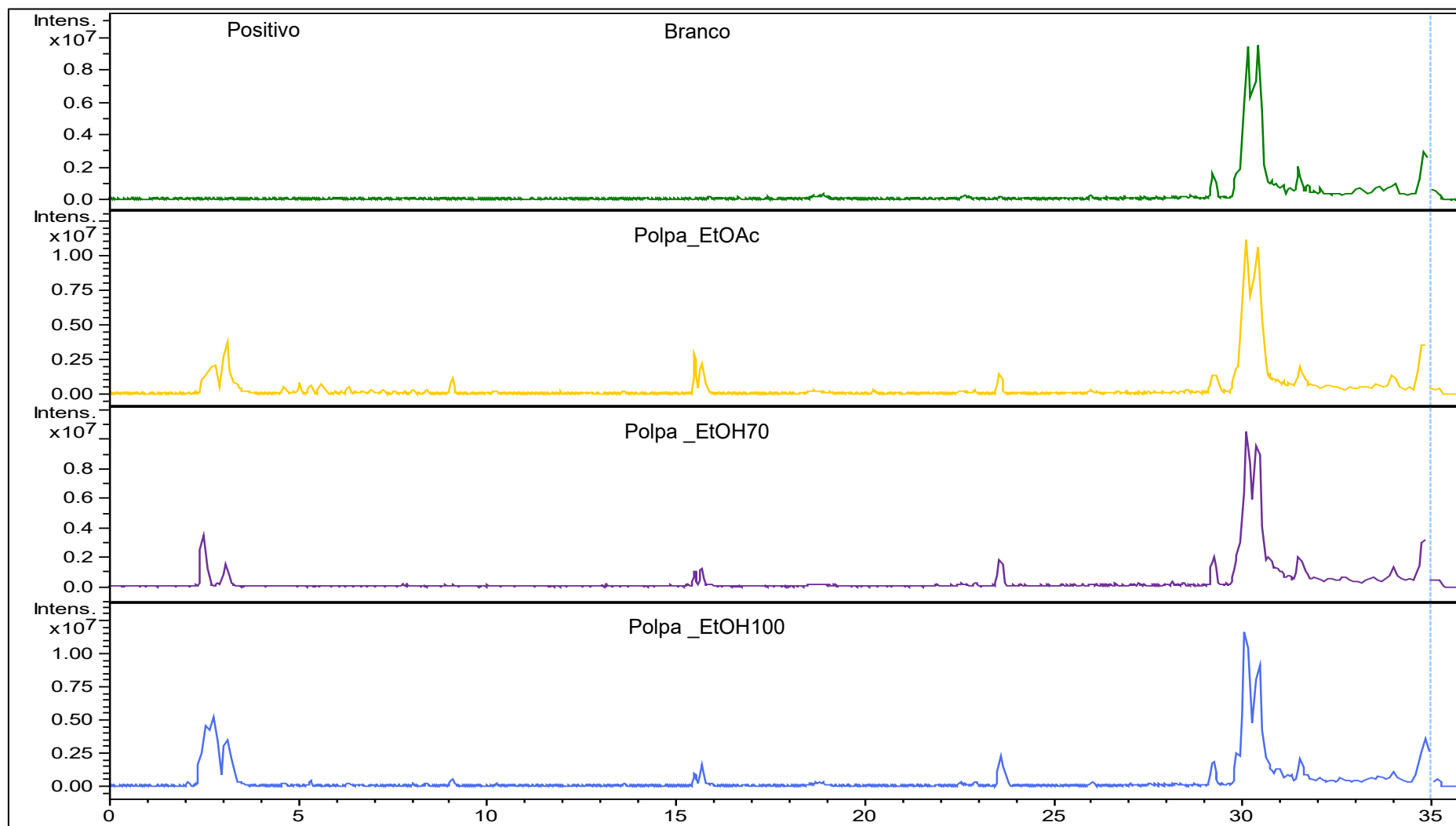
Fonte: o próprio autor

**Figura 20** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos obtidos das cascas do *C. phaea*, modo positivo de ionização, por CL-EM/EM.



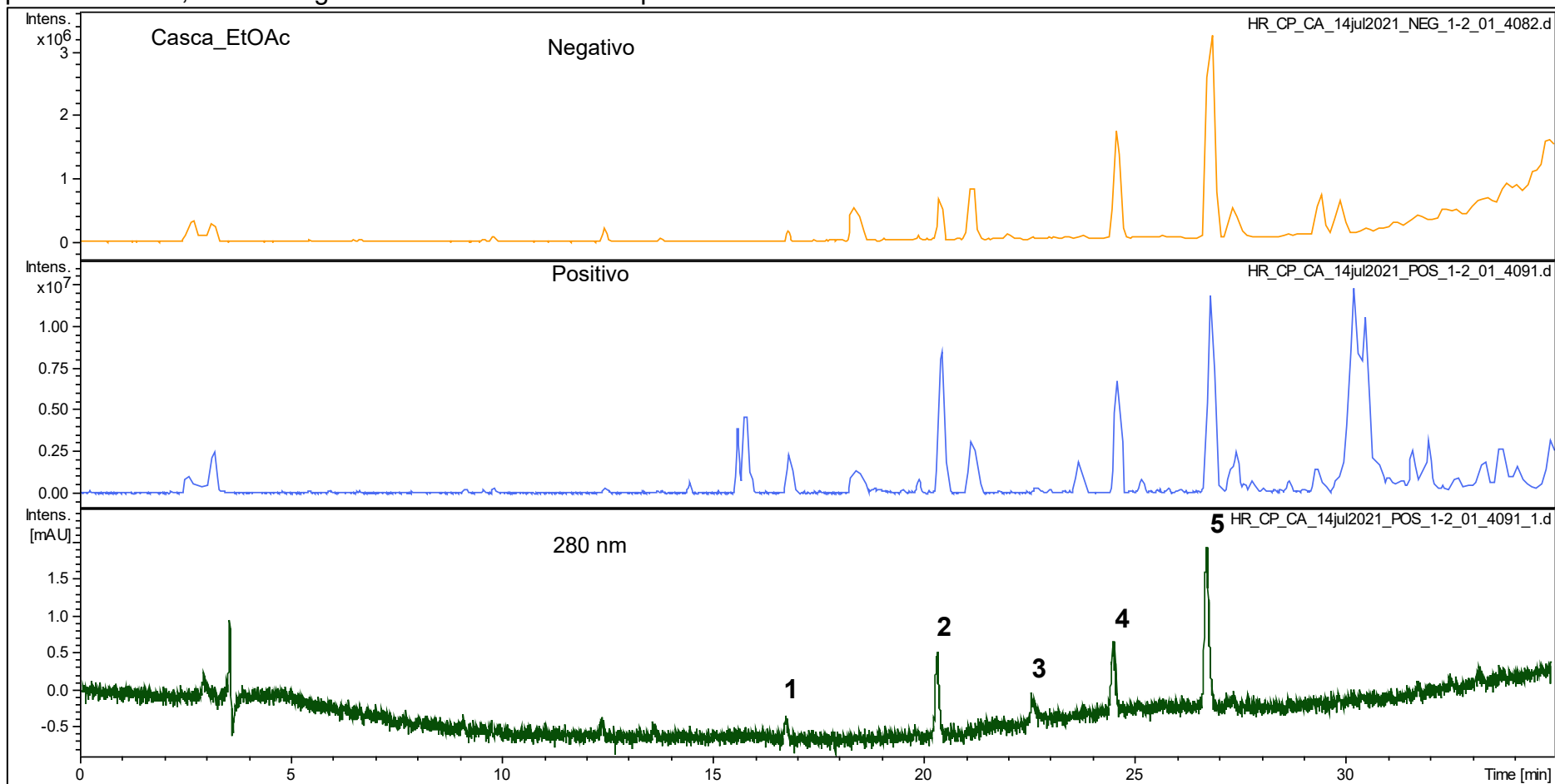
Fonte: o próprio autor

**Figura 21** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos obtidos das polpas do *C. phaea*, modo positivo de ionização, por CL-EM/EM.



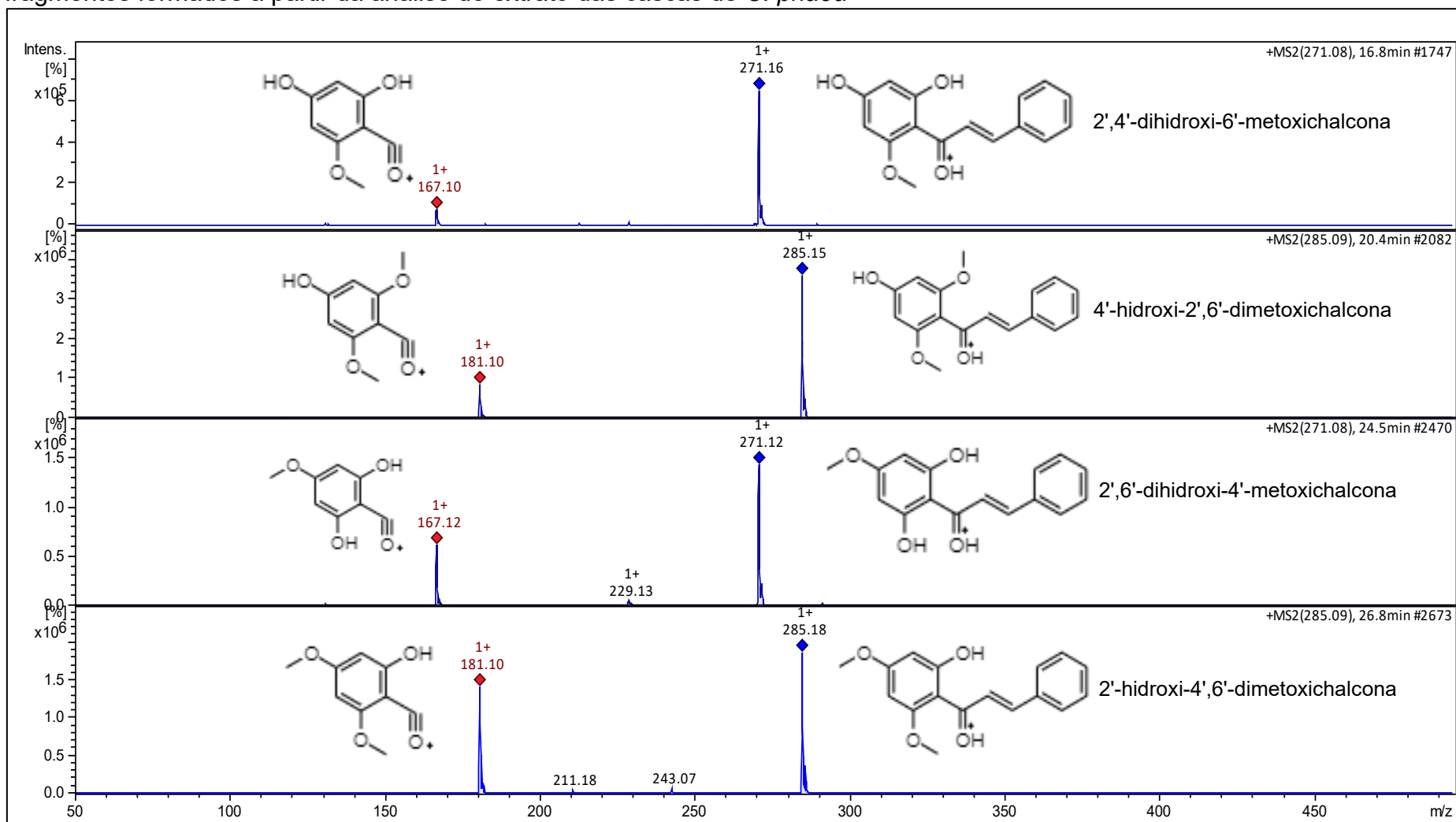
Fonte: o próprio autor

**Figura 22** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das cascas de *C. phaea*, modo negativo e positivo de ionização por CL-EM/EM, e cromatograma UV obtido a 280 nm por CL-UV/DAD.



Fonte: o próprio autor

**Figura 23** Espectros de fragmentação EM<sup>2</sup> obtidos para as substâncias **1**, **2**, **4** e **5**, bem como as suas estruturas e principais fragmentos formados a partir da análise do extrato das cascas de *C. phaea*



Fonte: o próprio autor

Observa-se que no cromatograma da Figura 22, obtido a 280 nm, 5 principais sinais são atribuídos (1–5), sendo que a substância 3 não se ioniza em nenhum modo (positivo/ negativo).

A Figura 23 apresenta os espectros de massas referentes aos picos 1 e 4 (Figura 22) como sendo moléculas protonada a  $m/z$  271  $[M+H]^+$ , ambas com o mesmo fragmento a  $m/z$  167, indicando uma perda de 104 Da. Similarmente, os picos 2 e 5 foram observadas como sendo uma molécula protonada a  $m/z$  285  $[M+H]^+$ , também com o mesmo fragmento a  $m/z$  181, indicando uma perda de 104 Da.

Após busca na literatura (GNPS e SciFinder, entre outras base de dados) por esses íons moleculares mencionados e os fragmentos obtidos, foi possível determinar as substâncias **1**, **2**, **4** e **5** como sendo as chalconas mostradas na Figura 23: 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona conhecida como cardamonina (**1**), 4'-hidroxi-2',6'-dimetoxichalcona (**2**), 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (**4**) e 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona, conhecida como flavokawain B (**5**). A perda de 104 Da deve-se à clivagem da ligação alfa à carbonila, sendo liberado  $C_8H_6$  em todos os casos (BARROS et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Essas substâncias não foram relatadas para *C. phaea* até o momento, sendo descritas pela primeira vez neste trabalho. Existem diversos relatos das atividades biológicas atribuídas a estas substâncias.

Alguns autores descrevem as atividades antitubercular, capacidade antioxidante, efeitos antiproliferativos em vários tipos de câncer e poder antimicrobiano destas chalconas identificadas na espécie *C. phaea*, conforme podemos observar alguns trabalhos abaixo.

Yue e colaboradores (2019) relatam que 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona (cardamonina) é um composto natural com efeitos antiproliferativos em vários tipos de câncer, incluindo carcinoma nasofaríngeo.

Abu e colaboradores (2013), estudaram a flavokawain A, B e C, chalconas naturais que foram isoladas de várias plantas medicinais. Neste estudo foi demonstrado que todas as três flavokawains podem ter efeitos anticâncer promissores. Também foi revelado que ambos flavokawain A e B estão envolvidos na indução da parada do ciclo celular em várias linhas de células cancerosas. Onde a flavokawain B se mostrou mais eficaz no tratamento *in vitro* de células cancerosas em comparação com flavokawain A e C. Flavokawain B também exerce efeitos antinociceptivos, bem como propriedades anti-inflamatórias.

Pavan e colaboradores (2009) estudaram a atividade anti-mycobacterium tuberculosis de extratos de frutos de *Campomanesia adamantium* onde foi avaliada e identificados seis compostos como flavanonas e chalconas (2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona) e (2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona) com atividade antitubercular promissora.

Coutinho e colaboradores (2008) isolaram três chalconas incluindo a cardamonin das folhas de *Campomanesia adamantium* Berg. Os extratos obtidos mostraram alta atividade antioxidante.

Atun, Sri e Rakhmawati (2018) identificaram chalconas (incluindo a 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona) e flavonas em rizoma de *Boesenbergia rotunda*. Estas substâncias foram submetidas a ensaios antimicrobiano, contra as bactérias patogênicas *E. coli* ATCC- 11229, *S. aureus* ATCC- 25923, *S. epidermidis* FNCC-0048 e *S. mutans*. As substâncias obtiveram alta atividade, sendo classificadas como antimicrobianas.

Todas as substâncias propostas neste trabalho, encontradas nos extratos de cascas de *C. phaea*, são pertencentes à classe dos flavonoides de cadeia aberta, especificamente chalconas, com substituinte hidroxila que passa a ser um dos responsáveis pelo aumento considerável da atividade antioxidante da chalcona como resultado da sua conversão para os radicais fenoxi correspondentes através do mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio, que lhes confere alta capacidade de estabilizar radicais livres (LAHSASNI et al., 2014).

Por essas razões, produtos naturais com unidades fenólicas, como os flavonoides, são atraentes para estudos envolvendo redução de oxidação celular e prevenção de glicação avançada. Além disso, inibidores de AGEs a partir de produtos naturais possuem um grande potencial para se desenvolver novos fármacos e cosméticos, auxiliando no tratamento de doenças e retardando o envelhecimento celular (PENG et al., 2011).

Sendo assim, apesar do experimento antiglicante para o extrato CP\_CA não apresentar valores expressivos (10,8%), existe na literatura relato de patente referente a um produto cosmético contendo derivados de chalconas que promovem a síntese de colágeno e inibem a atividade da colagenase (JIN et al., 2011). Em virtude disto, as cascas do fruto *C. phaea* necessitam serem estudadas com maior veemência e profunda, pois os dados da literatura apresentam um grande potencial para que a

partir desta espécie se destine uma nova aplicação, que pode auxiliar na prevenção contra danos vinculados ao organismo.

#### 4.4.2 Polpa de *C. phaea* Extraída com Solvente Acetato de Etila (CP\_PA)

Devido aos resultados promissores de porcentagem de inibição da reação de glicação (52,8%) obtidos pelo extrato CP\_PA, o mesmo foi submetido ao processo de investigação de substâncias, e para isso foi realizado o *clean up* da amostra, utilizando a técnica de EFS (extração por fase sólida), obtendo-se o fracionamento do extrato acetato de etila da polpa de *C. phaea* com o solvente (metanol) em diferentes polaridades conforme citado no item 3.7.

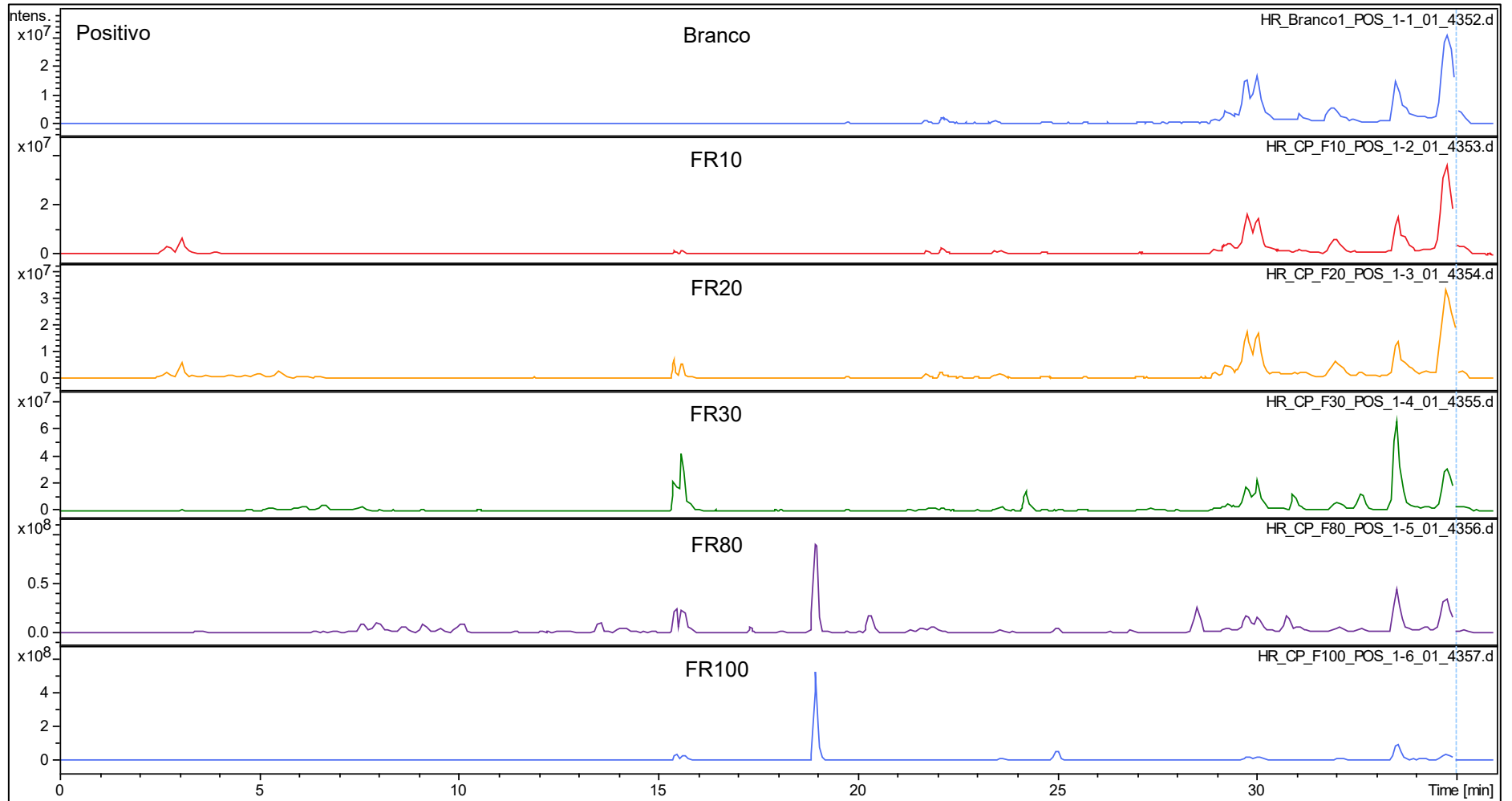
Os resultados das massas obtidas referentes a cada fração são mostrados na Tabela 4. Estas frações foram submetida as análises por CL-EM/EM, a fim de traçar o perfil químico do extrato do fruto.

**Tabela 4** Massas obtidas do extrato CP\_PA em extração em fase sólida

<b>Código</b>	<b>FR10</b>	<b>FR20</b>	<b>FR30</b>	<b>FR80</b>	<b>FR100</b>
<b>Massa final (mg)</b>	75,7	10,3	1,3	2,3	3,5

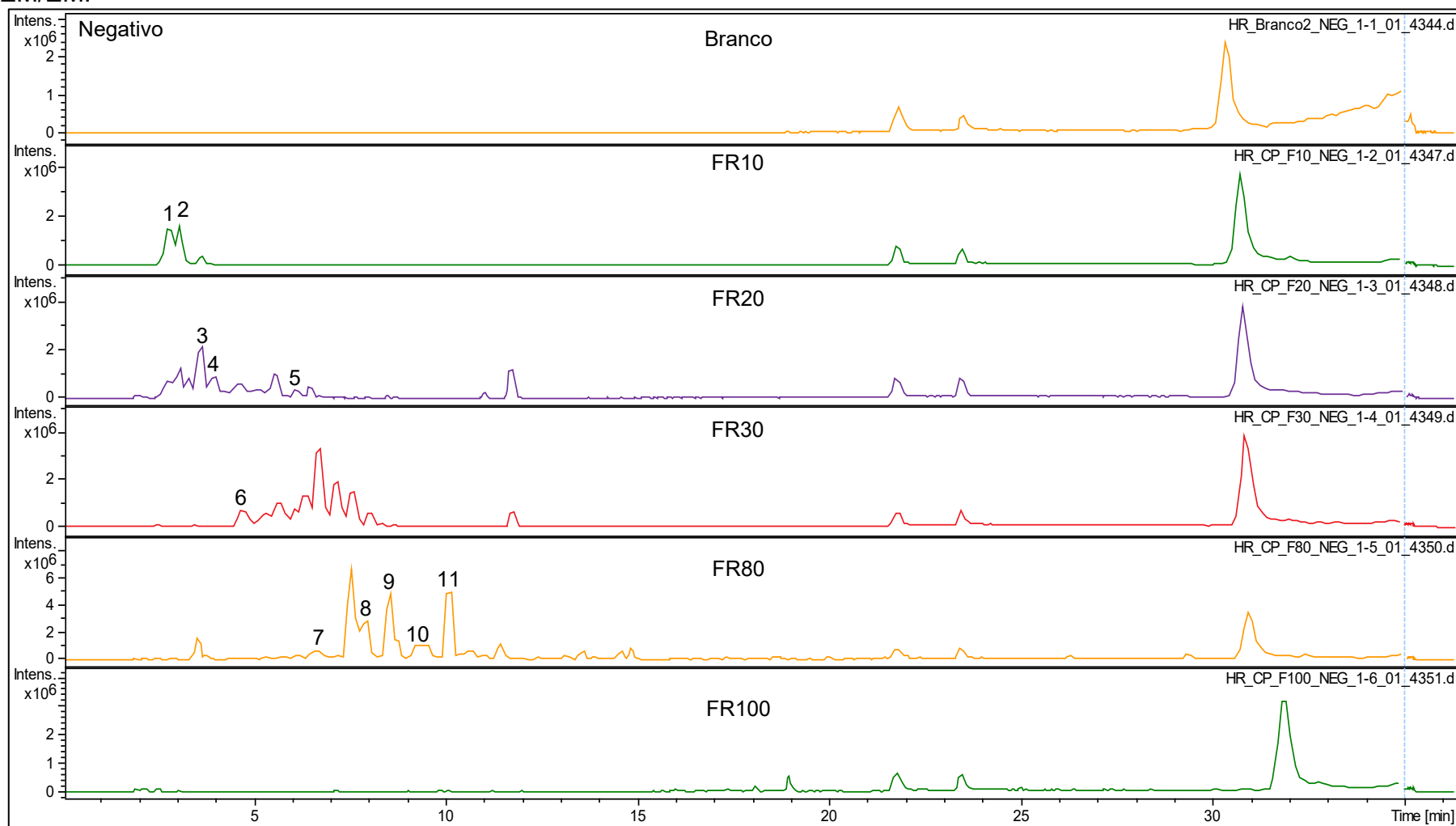
Em relação ao modo de ionização, pode-se observar nos cromatogramas dos íons totais (TIC) que a ionização negativa apresentou uma maior quantidade de íons, portanto as propostas de identificações foram guiadas pelo modo negativo de ionização, conforme pode-se observar nas Figura 24 e Figura 25

**Figura 24** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das polpas de *C. phaea* (modo positivo de ionização) por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

**Figura 25** Cromatogramas de íons totais obtidos para os extratos das polpas de *C. phaea* (modo negativo de ionização) por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

Na Tabela 5 estão exibidas as massas dos íons moleculares das onze substâncias propostas presentes nas frações de CP\_CA, enquanto que suas respectivas estruturas estão mostradas na Figura 26.

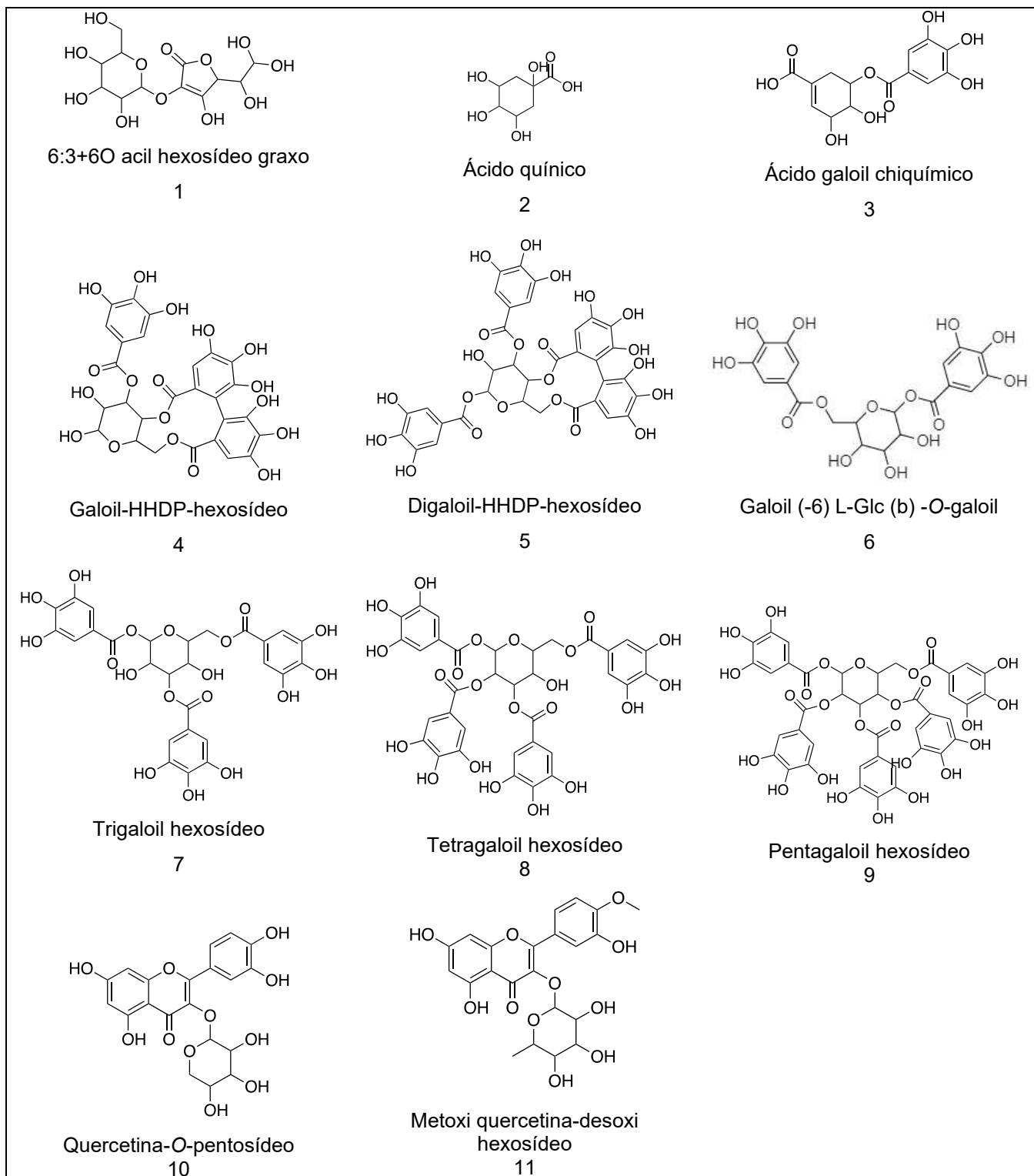
**Tabela 5** Proposta de identificação das substâncias presentes nas frações do extrato acetato da polpa de *C. phaea* (CP\_PA) por CL-EM/EM, identificação em modo negativo.

Pico	Amostra	t <sub>R</sub> (min)	Íon Molecular	EM/EM	Substâncias	Referência
1	FR10 (-)	2,8	353	<b>EM<sup>2</sup> (353)</b> : 173,111	6:3 + 6O acil hexosídeo graxo	(TSUGAWA et al., 2019)
2	FR10 (-)	3,1	191	<b>EM<sup>2</sup> (191)</b> : 173, 129, 111	Ácido quínico	(FRAIGE et al., 2017)
3	FR20 (-)	3,7	325	<b>EM<sup>2</sup> (325)</b> : 169	Ácido galoil chiquímico	(DONADO-PESTANA et al., 2012)
4	FR20 (-)	4,0	633	<b>EM<sup>2</sup> (481)</b> : 301	Galoil-HHDP-hexosídeo	(YISIMAYILI et al., 2019)
5	FR20 (-)	6,1	785	<b>EM<sup>2</sup> (785)</b> : 633, 615, 301	Digalloil-HHDP-hexosídeo	(YISIMAYILI et al., 2019)
6	FR30 (-)	4,7	483	<b>EM<sup>2</sup> (483)</b> : 439, 331	Galoil (-6) L-Glc (b) -O-galoil	(ARROYO et al., 2009; YISIMAYILI et al., 2019)
7	FR80 (-)	6,8	635	<b>EM<sup>2</sup> (635)</b> : 483,465,313	Trigaloil hexosídeo	(YISIMAYILI et al., 2019)
8	FR80 (-)	8,0	787	<b>EM<sup>2</sup> (787)</b> : 637, 617, 465 <b>EM<sup>3</sup> (787→617)</b> : 465	Tetragaloil hexosídeo	(PFUNDSTEIN et al., 2010; YISIMAYILI; et al., 2019)
9	FR80 (-)	8,5	939	<b>EM<sup>2</sup> (939)</b> : 787, 769, 617, 599 <b>EM<sup>3</sup> (939→769)</b> : 447, 277	Pentagaloil hexosídeo	(PFUNDSTEIN et al., 2010; YISIMAYILI et al., 2019)
10	FR80 (-)	9,5	433	<b>EM<sup>2</sup> (433)</b> : 301, 271 <b>EM<sup>3</sup> (433→301)</b> : 271, 179, 151	Quercetina-O-pentosídeo	(FRAIGE et al., 2017)
11	FR80 (-)	10,1	461	<b>EM<sup>2</sup> (461)</b> : 315 <b>EM<sup>3</sup> (461→315)</b> : 301	Metoxiquercetina-desoxihexosídeo	(RUSSO et al., 2020)

\* t<sub>R</sub> = tempo de retenção

As onze substâncias propostas encontradas são pertencentes a classe dos elagitaninos, gallotaninos e flavonoides.

**Figura 26** Propostas de identificação de substâncias presentes nas frações do extrato acetato de etila da polpa de *C. phaea* (CP\_PA), obtidas pela análise por CL-EM/EM.

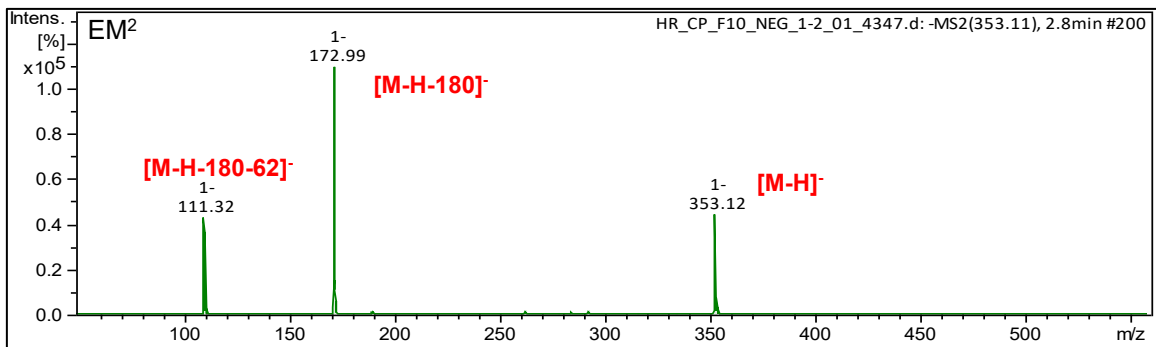


Fonte: o próprio autor

A Figura 25 apresenta os cromatogramas dos íons totais (TIC) das frações do extrato CP\_PA, obtidos no modo negativo de ionização. A identificação dos picos está de acordo com a Tabela 5, com suas respectivas  $m/z$ .

A Figura 27 representa o espectro de massas da substância **1**, proposta como 6:3+6O acil hexosídeo graxo. Analisando o espectro de massas da substância **1** proposta, 6:3+6O acil hexosídeo graxo, observa-se em EM<sup>2</sup> o pico mais intenso de  $m/z$  353, correspondente ao íon molecular.

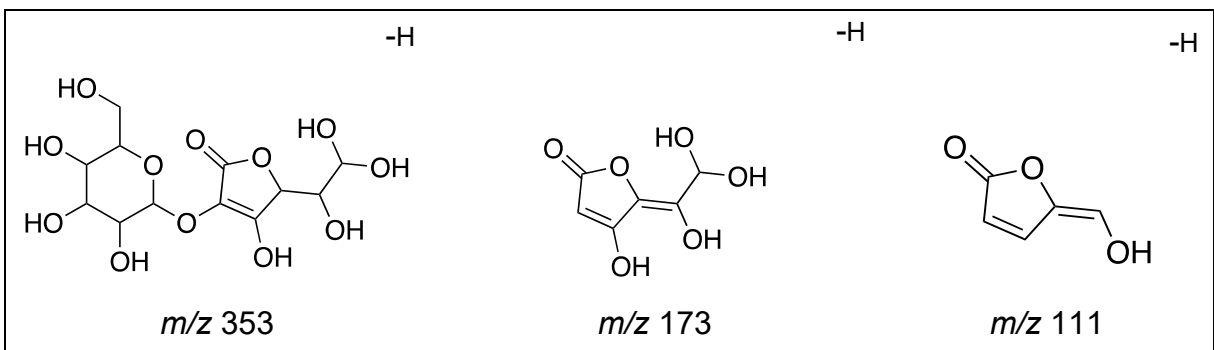
**Figura 27** Espectro de massas da substância 6:3+6O acil hexosídeo graxo, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 10% (FR10), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

O fragmento de  $m/z$  173, [M-H-180]<sup>-</sup>, indica a perda de C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub> e o fragmento de  $m/z$  111 [M-H-180-62]<sup>-</sup>, indica a perda de 62 Da, conforme a Figura 28.

**Figura 28** Proposta de fragmentação por clivagem heterolítica da substância **1**.



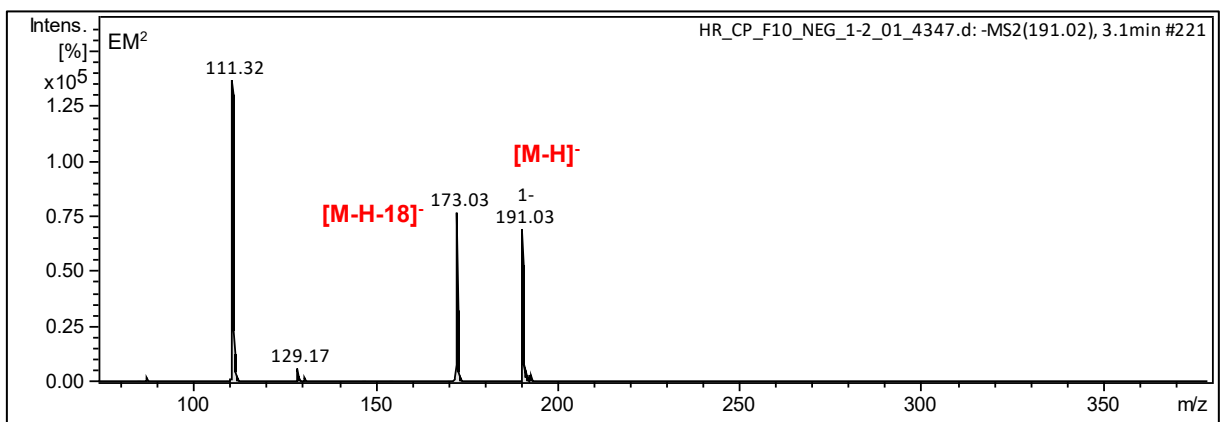
Fonte: o próprio autor

Tsugawa e colaboradores (2019) identificaram a substância **1**, 6:3+6O acil hexosídeo graxo, no estudo com 31 tecidos de plantas de 12 espécies de plantas

diferentes, numa abordagem quiminformática para caracterizar metabolomas em organismos marcados com isótopos estáveis (TSUGAWA et al., 2019). Entretanto, para a espécie *C. phaea*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

Para o espectro de massas da substância **2** (Figura 29), proposta como ácido quínico, observa-se o sinal de  $m/z$  191, correspondente ao pico do íon molecular característico para este ácido.

**Figura 29** Espectro de massas da substância **2**, ácido quínico, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 10% (FR10), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

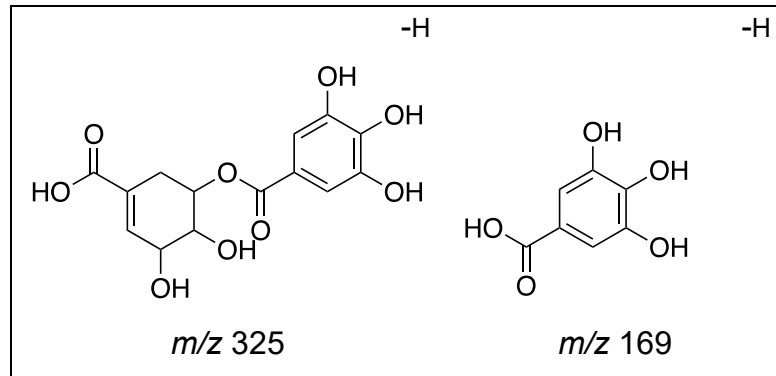
Em EM<sup>2</sup> o fragmento de  $m/z$  191 [M-H-18]<sup>-</sup> é referente à perda de uma hidroxila, formando-se ácido 3,4,5-trihidroxíciclohex-1-eno-1-carboxílico (Figura 30).

Fraige e colaboradores (2017) identificaram a substância **2**, ácido quínico, na espécie *Byrsonima*, popularmente conhecida como murici (FRAIGE et al., 2017).

Castelucci (2015) identificou a substância na polpa de *C. phaea* em diferentes processos de irradiação com polpa irradiada com doses de 2 kGy onde foram quantificados  $1,06 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ , com 4 kGy de irradiação foram quantificados  $9,52 \pm 0,06 \cdot 10^{-1} \text{ mg g}^{-1}$ , e com 6 kGy foram quantificados  $9,42 \pm 0,06 \cdot 10^{-1} \text{ mg g}^{-1}$  de ácido quínico (CASTELUCCI, 2015).



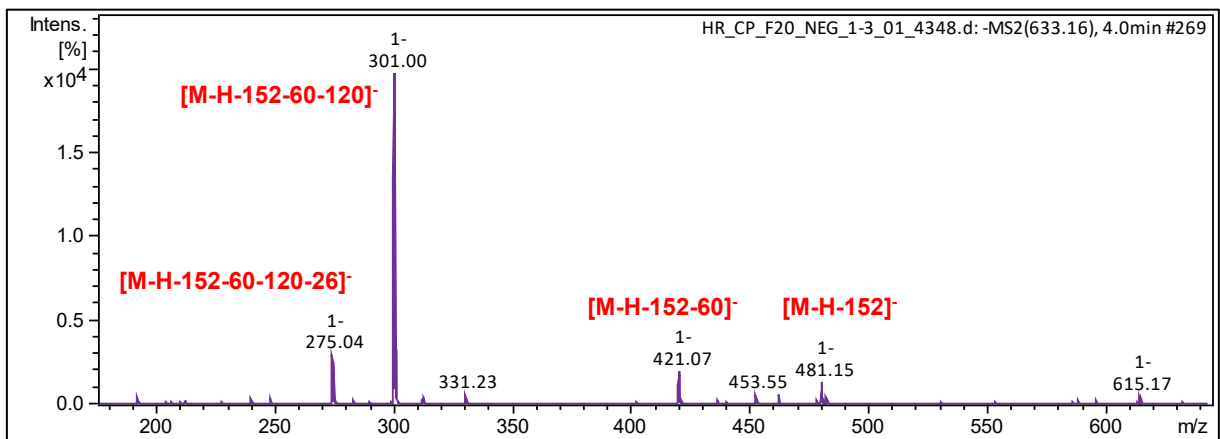
**Figura 32** Proposta de fragmentação por perda de grupo funcional de ácido carboxílico.



Fonte: o próprio autor

Analisando o espectro de massas da substância **4** (Figura 33), proposta como sendo o galoil-HHDP-hexosídeo, o fragmento  $m/z$  633 corresponde ao pico do íon molecular.

**Figura 33** Espectro de massas da substância **4**, galoil-HHDP-hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 20% (FR20), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

Assim, o fragmento  $m/z$  481  $[M-H-152]^-$  é referente à perda do 3,4,5-trihidroxibenzaldeído (perda de um grupo HHDP), de  $m/z$  154. O fragmento em  $m/z$  421 encontrado é causado pela perda de um grupo  $C_2H_4O_2$  no resíduo de glicose. O padrão de fragmentação em todos os casos resultou em dois fragmentos em  $m/z$  301 e 275. O fragmento em  $m/z$  301 representa a porção HHDP (perda de glicose por clivagem da ligação éster e lactonização espontânea em ácido elágico). A perda de

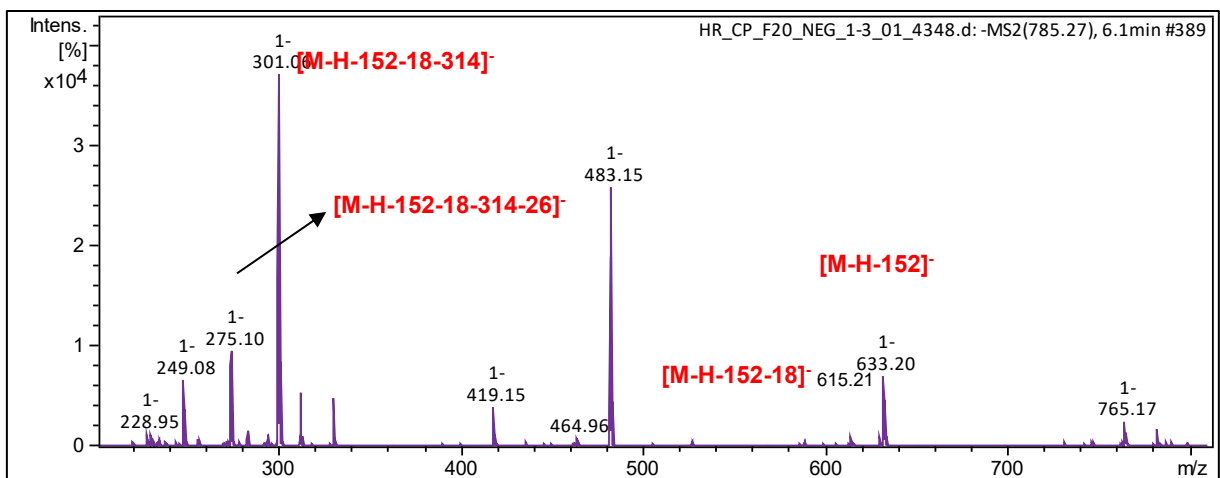
um grupo CO da porção HHDP produz o fragmento correspondente em  $m/z$  275 (FERNÁNDEZ-ARROYO et al., 2009).

Arapitsas e colaboradores (2007) relataram que o hexahidroxidifenoil (HHDF) produz ácido elágico por lactonização espontânea (Arapitsas et al., 2007).

Araujo (2019) identificou o galoil-HHDP-hexosídeo no suco de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC). Neste trabalho foi avaliado o efeito do suco de cagaita na glicemia, insulinemia e respostas incretínicas em indivíduos com síndrome metabólica e disglucemia (ARAUJO, 2019). Entretanto, para a espécie *C. phaea*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

Analisando o espectro de massas da substância **5** (Figura 34), proposta como digaloiil-HHDP-hexosídeo, o fragmento  $m/z$  785 corresponde ao pico do íon molecular.

**Figura 34** Espectro de massas da substância **5**, digaloiil-HHDP-hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 20% (FR20), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

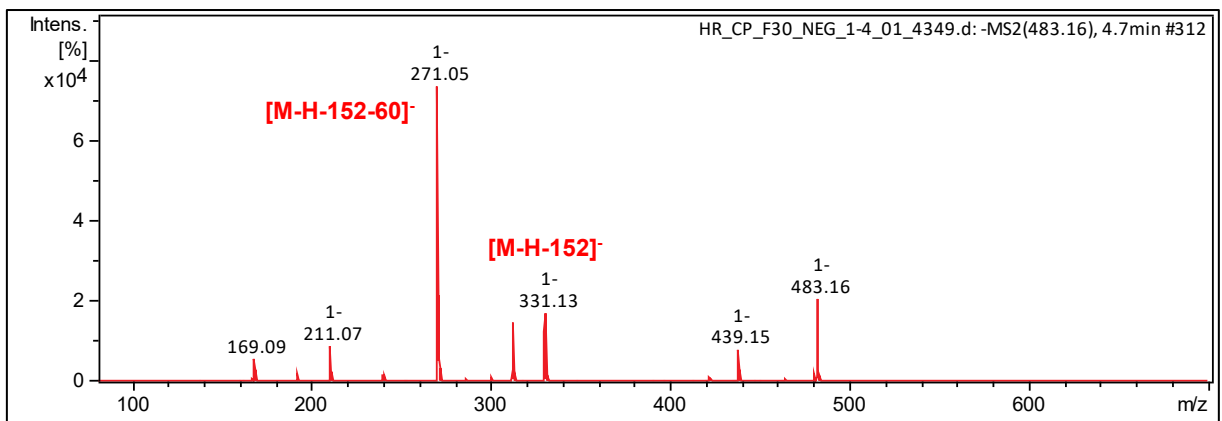
As fragmentações observadas para essa substância são semelhantes à substância **4**. Assim, o fragmento  $m/z$  633  $[M-H-152]^-$  é referente à perda do 3,4,5-trihidroxibenzaldeído (perda de um grupo HHDP), de  $m/z$  154. O fragmento em  $m/z$  615 é causado pela perda de um grupo OH. O padrão de fragmentação em ambos (digaloiil-HHDP-hexosídeo) e (galoiil-HHDP-hexosídeo) é o mesmo, conforme discutido anteriormente (FERNÁNDEZ-ARROYO et al., 2009).

Ramlagan e colaboradores (2017) identificaram este elagitanino, na polpa da espécie *Punica granatum L.*, conhecida como romã (RAMLAGAN et al., 2017). Para a espécie *C. phaea*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

A substância **6**, identificada como galoil(-6)L-Glc(b)-O-galoil, contém o fragmento  $m/z$  483, correspondente ao pico do íon molecular.

Assim, o fragmento  $m/z$  331  $[M-H-152]^-$  é referente à perda de  $C_7H_6O_4$ . O fragmento em  $m/z$  271 encontrado é causado pela perda de um grupo  $C_2H_6O_2$  conforme proposta da Figura 36.

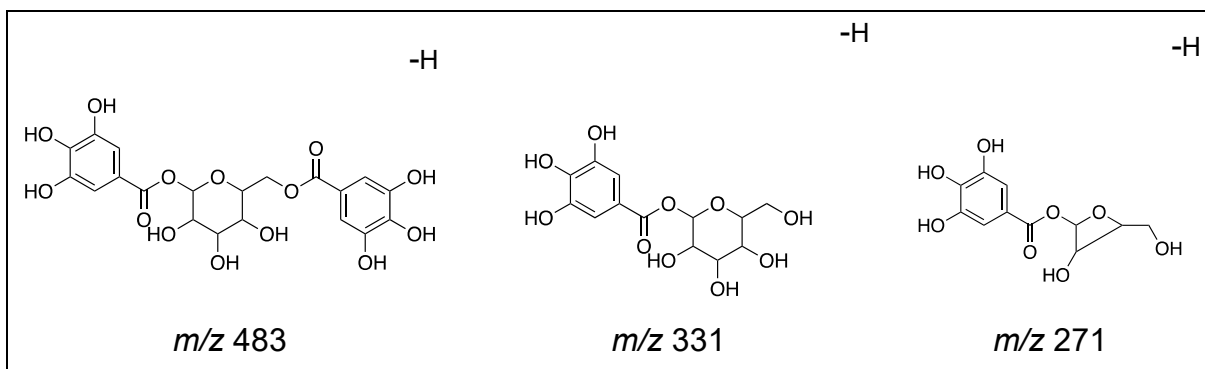
**Figura 35** Espectro de massas da substância **6**, galoil (-6) L-Glc (b) -O-galoil, presente no extrato da polpa de *C. phaea*, fração metanol 30% (FR30), espectro obtido no modo negativo por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

Liu e colaboradores (2021) identificaram a substância **6** na espécie *Juglans mandshurica* componentes na folha e raiz. Esta espécie é conhecida como noz da Manchúria, ou Tigernut, sendo uma árvore caducifólia do gênero *Juglans*, nativa da região asiática oriental. (LIU; WANG; ZHANG; ZHAI; KANG, 2021). Para a espécie *C. phaea*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

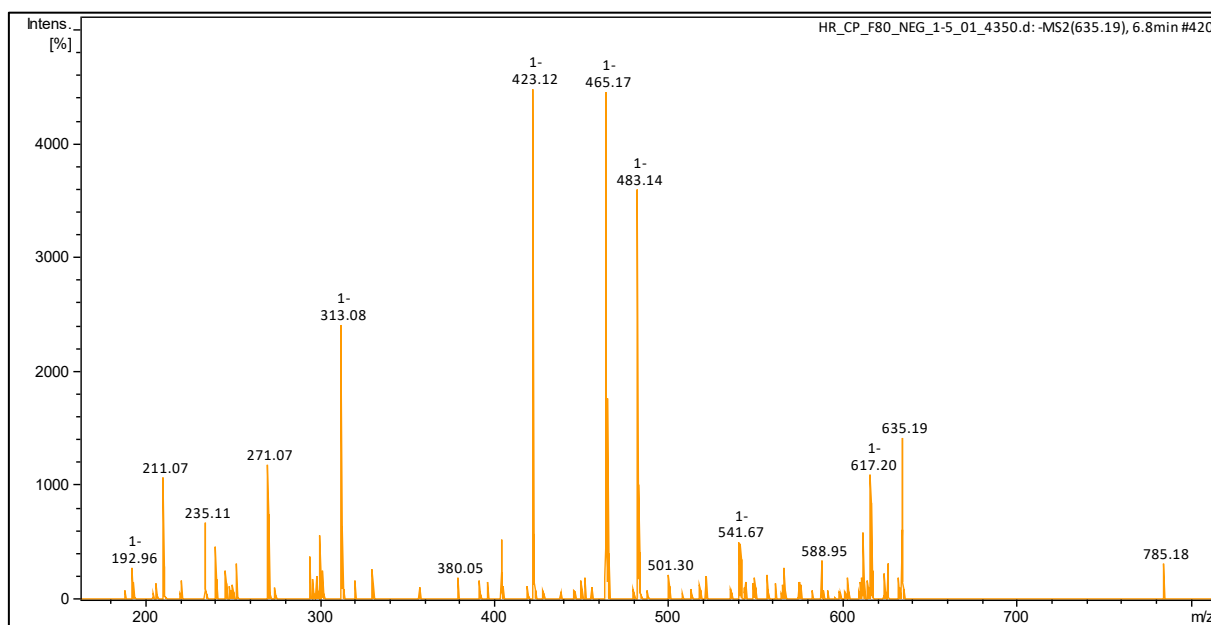
**Figura 36** Proposta de fragmentação de galoiil(-6)L-Glc(b)-O-galoil



Fonte: o próprio autor

A substância 7, identificada como sendo o trigaloílo hexosídeo, exibiu um íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  635, com a fórmula molecular de  $C_{27}H_{24}O_{18}$ .

**Figura 37** Espectro de massas da substância 7, trigaloílo hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

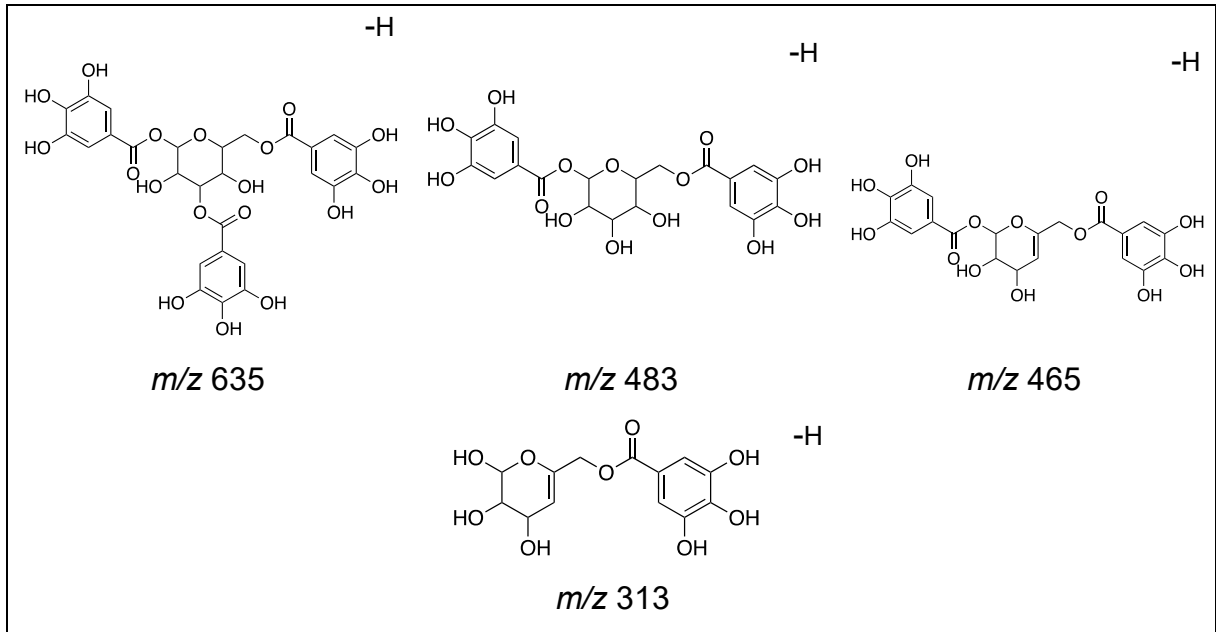


Fonte: o próprio autor

O íon do fragmento em  $m/z$  483  $m/z$  de um OH,  $m/z$  465  $[M-H-18-170]^-$  (perda de um ácido gálico), e  $m/z$  313  $[M-H-18-170-152]^-$  (perda de um ácido gálico e um porção galoiil) (YISIMAYILI; et al., 2019), conforme propostas de fragmentação da Figura 38.

García e colaboradores (2018) identificaram nas folhas e frutos (bolota) de *Quercus coccifera* (carvalho kermes) as substâncias **7** e **9** (GARCÍA et. al., 2018). Para a espécie *C. phaea*, estas moléculas estão sendo relatadas pela primeira vez.

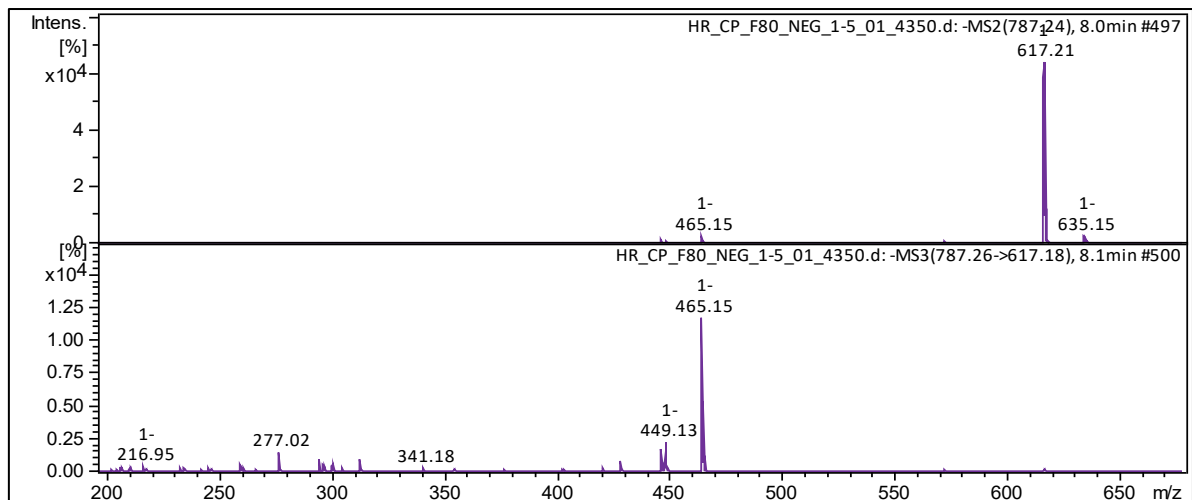
**Figura 38** Proposta de fragmentação trigaloil hexosídeo



Fonte: o próprio autor

Para a substância **8** foi identificada como tetragaloil hexosídeo, com os espectros de EM/EM da Figura 39 e o padrão de fragmentação proposto de um tetragaloil hexosídeo mostrado na Figura 40.

**Figura 39** Espectro de massas da substância **8**, tetragaloil hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

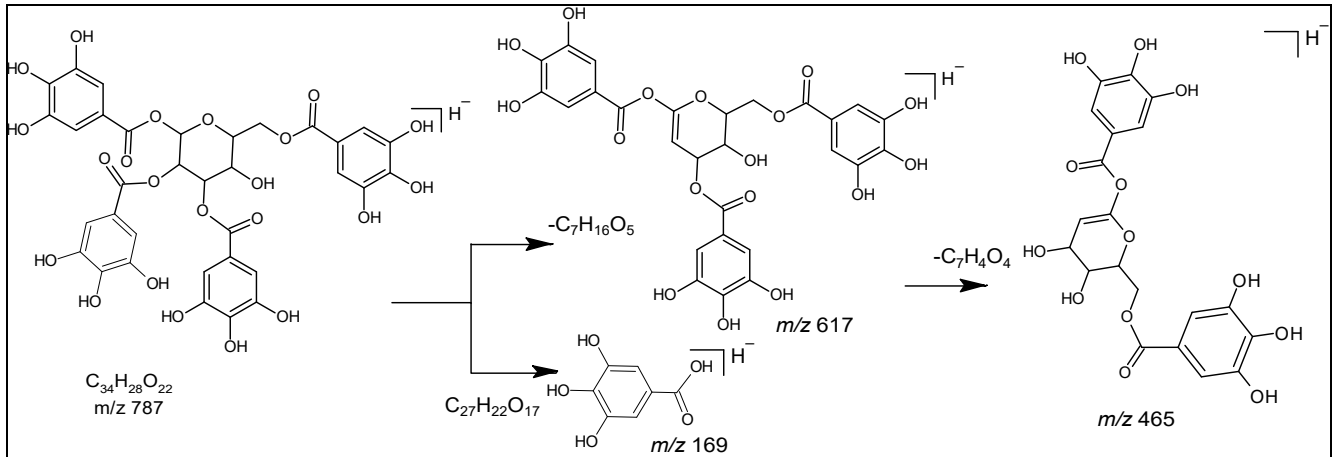


Fonte: o próprio autor

Gan e colaboradores (2018) identificaram esta substância na casca do feijão-

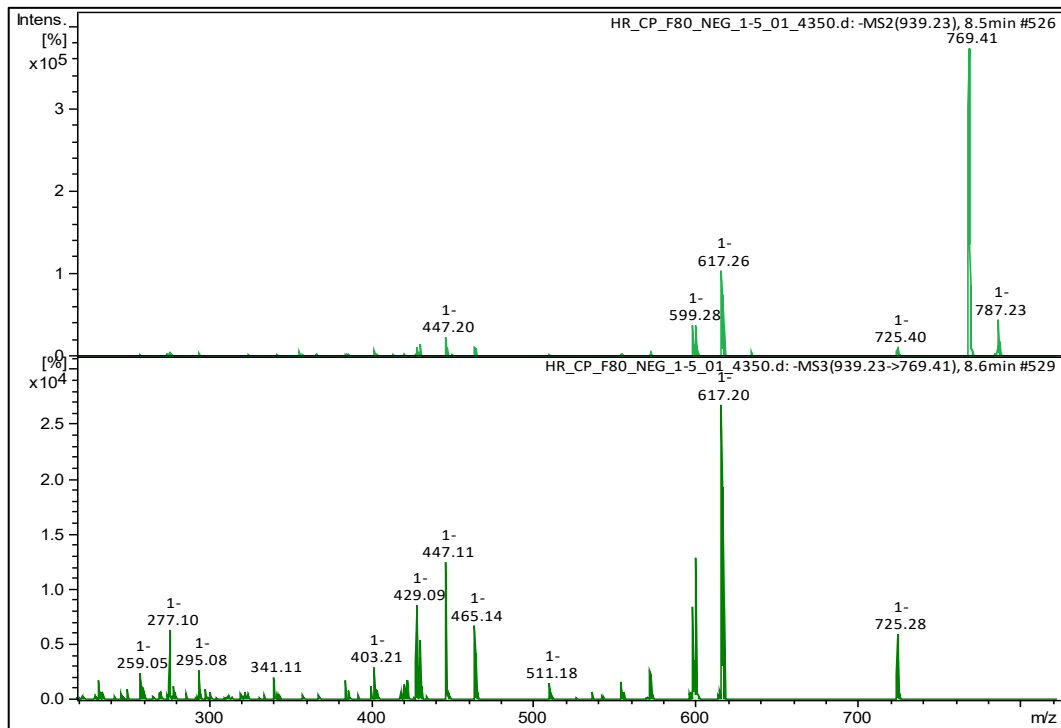
espada vermelho *Canavalia gladiata* (GAN et al., 2018). Para a espécie *C. phaea*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

**Figura 40** Proposta de padrão de fragmentação de elagitaninos e derivados de galoiil



Fonte: o próprio autor

**Figura 41** Espectro de massas da substância **9**, pentagaloiil hexosídeo, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.



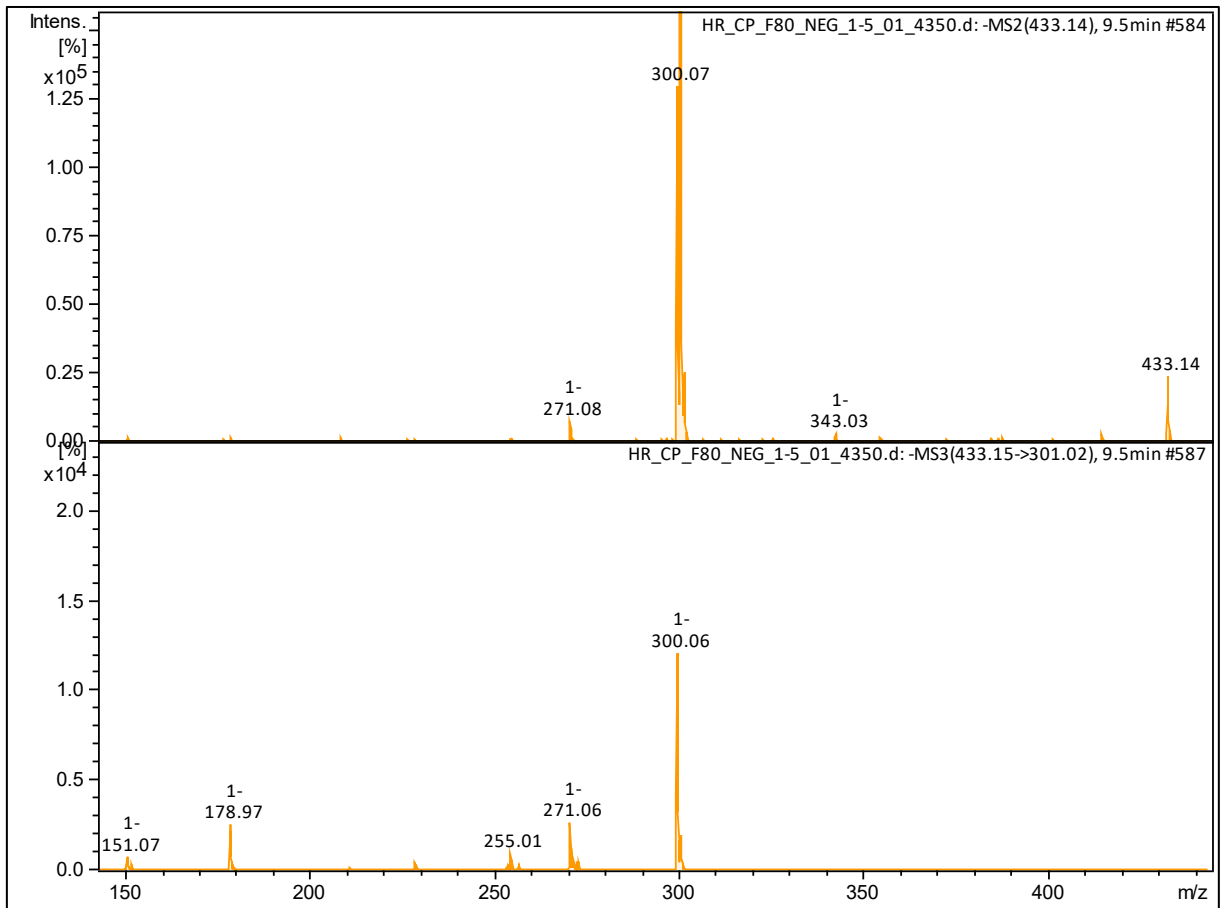
Fonte: o próprio autor

A substância **9**, identificada como o pentagaloiil hexosídeo, segue o padrão de fragmentação de elagitaninos e derivados de galoiil, conforme discutido nas

substâncias anteriores (**7 e 8**).

Para o espectro de massas da substância **10**, identificada como quercetina-O-pentosídeo (Figura 42), nota-se o íon  $m/z$  433 em  $MS^1$ , correspondente ao pico do íon molecular, e a primeira transição em  $MS^2$  observada referente ao fragmento  $m/z$  301  $[M-H-132]^-$ . A perda de 132 unidades de massas pode estar relacionada à perda de uma hexose, formando a aglicona desprotonada (quercetina).

**Figura 42** Espectro de massas da substância **10**, quercetina-O-pentosida, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

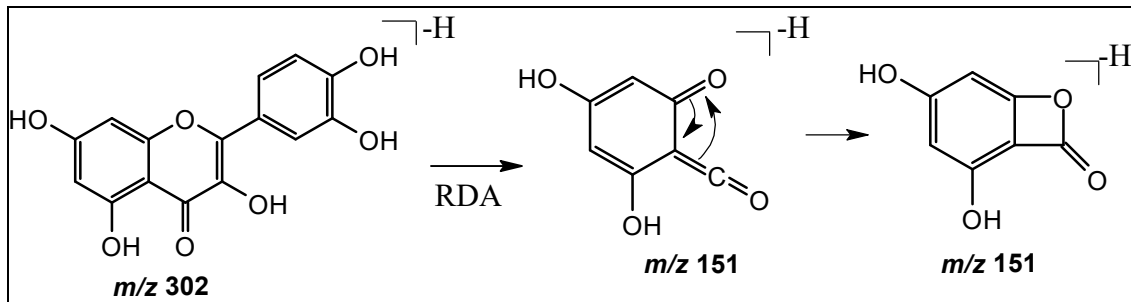


Fonte: o próprio autor

Em  $MS^3$ , no qual ocorre a retrociclização do núcleo flavílico ( $m/z$  301), gerando o fragmento  $m/z$  179  $[M-H-132-122]^-$ . O fragmento  $m/z$  151  $[M-H-132-122]^-$  também pode ser observado, sendo um íon comum em fragmentações de flavonoide, pelo mecanismo de retro Diels-Alder, conforme Figura 43.

Lescano e colaboradores (2019) identificaram a substância **10** nas folhas de *Campomanesia adamantium*. Na espécie *C. phaea* é a primeira vez relatada.

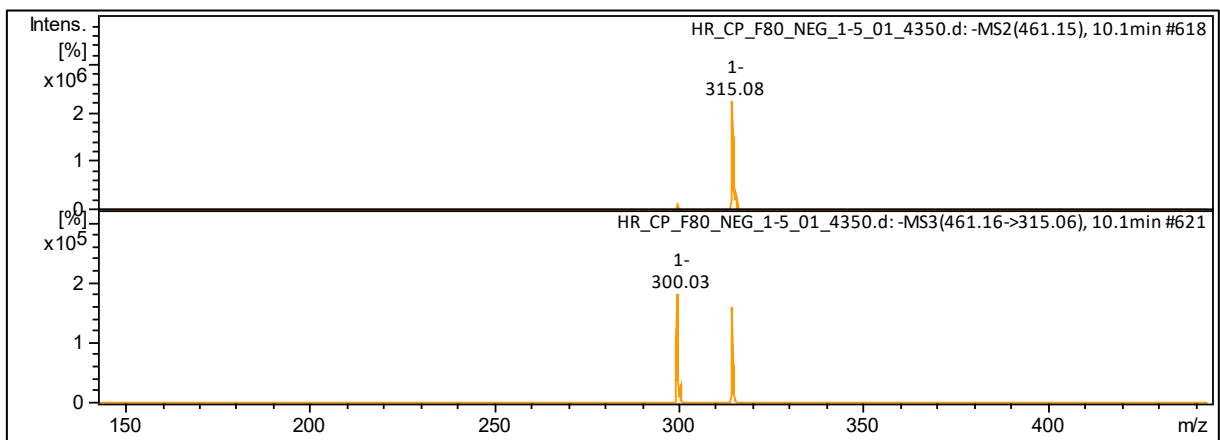
**Figura 43** Reação Retro Diels- Alder (RDA) e formação de produto lactona.



Fonte: o próprio autor

Para o espectro de massas da substância **11**, metoxiquercetina-desoxihexosida (Figura 44), nota-se o íon  $m/z$  461 em  $EM^1$ , correspondente ao pico do íon molecular.

**Figura 44** Espectro de massas da substância **11**, metoxi quercetina-desoxihexosida, presente no extrato bruto da polpa de *C. phaea*, fração metanol 80% (FR80), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.



Fonte: o próprio autor

O fragmento em  $EM^2$  observado referente ao fragmento  $m/z$  315 [ $M-H-146$ ], com a perda de 146 unidades de massas que pode estar relacionada à perda de uma hexose, formando uma aglicona (quercetina). Para a espécie *C. phaea*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

Nas interpretações dos espectros é importante considerar de modo geral que na maior parte das vezes não podemos definir e concluir a posição em que uma fragmentação ocorre, para isso são necessárias análises com outras técnicas de identificação para confirmação das posições dos substituintes.

Em síntese, foi possível propor nove substâncias relatadas pela primeira vez no extrato polpa do fruto de *C. phaea*: 6:3+6O acil hexosídeo graxo (**1**); (**4**) (galoil-HHDP-hexosídeo); (**5**) (digalloil-HHDP-hexosídeo); (**6**) (daloil (-6) L-Glc (b)-O-galoil); (**7**) (trigaloil hexosídeo); (**8**) (tetragaloil hexosídeo); (**9**) (pentagaloil hexosídeo); (**10**) (quercetina-O-pentosida) e (**11**) (metoxiquercetina-desoxihexosida), identificadas pela técnica CLAE-EM/EM.

## 5 CONCLUSÕES

Os extratos de casca e polpa dos frutos de *C. phaea*, apresentaram-se moderadamente ativos nos ensaios antioxidantes, para as extrações com etanol 70%, CP\_C70, com EC<sub>50</sub> de 41,21 ± 0,74 µg mL<sup>-1</sup> pelo ensaio de ABTS<sup>•+</sup>, e EC<sub>50</sub> de 58,54 ± 2,11 µg mL<sup>-1</sup> para o ensaio do DPPH<sup>•</sup>. Para os demais extratos (etanólico 100% e acetato de etila) os ensaios apontaram como fracamente ativos e/ou inativos. Já a extração da polpa deste fruto com acetato de etila (CP\_PA) apresentou atividade antiglicante relevante (52,8%), sendo um promissor fruto para continuação dos estudos visando uma potencial aplicação cosmética anti-idade.

O solvente acetato de etila utilizado na extração mostrou-se adequado ao estudo, pois foi possível identificar maior número de picos comparado aos outros extratos, tanto para polpa, quanto para cascas dos extratos dos frutos de cambuci.

Por CL-EM/EM foram sugeridas quatro substâncias presentes no extrato acetato de etila (CP\_CA) de cascas de *C. phaea*, sendo estas: (**1**) 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona conhecida como cardamonin, (**2**) 4'-hidroxi-2',6'-dimetoxichalcona, (**3**) 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, (**4**) 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona, conhecida como flavokawain (B). Estas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez nas cascas de *C. phaea*.

Apesar dos experimentos antiglicante com as cascas desta espécie não apresentarem resultados significativos (CP\_CA com 10,8% de inibição), existe na literatura relatos de patente que se refere a um produto cosmético contendo derivados de chalconas (substância identificada nas cascas de *C. phaea*) que promovem a síntese de colágeno e inibem a atividade da colagenase (JIN *et al.*, 2011), portanto deve-se ser avaliado por outros métodos.

Nas frações do extrato acetato de etila CP\_PA da polpa de *C. phaea* analisadas por CL-EM/EM foi possível propor 11 substâncias: **(1)** (6:3+6O acil hexosídeo graxo); **(2)** (ácido quínico); **(3)** (ácido galoil chiquímico); **(4)** (galoil-HHDP-hexosídeo); **(5)** (digalloil-HHDP-hexosídeo); **(6)** (galoil(-6)L-Glc(b)-O-galoil); **(7)** (trigaloil hexosídeo); **(8)** (tetragaloil Hexosídeo); **(9)** (pentagaloil hexosídeo); **(10)** (quercetina-O-pentosida) e **(11)** (metoxiquercetina-desoxihexosida).

As substâncias já relatadas na literatura para esta espécie foram somente as substâncias **(2)** (ácido quínico) e a substância **(3)** (ácido galoil chiquímico), as demais podem ser consideradas propostas inéditas para o fruto de *C. phaea*.

As substâncias propostas são pertencentes às classes dos elagitaninos, gallotaninos e flavonoides, o que pode explicar os resultados das atividades antioxidante e antiglicante, pois através das ligações conjugadas presentes nestas estruturas e de ressonância são capazes de estabilizar radicais livres.

Os resultados obtidos neste estudo mostra o grande potencial de aplicação dos frutos de cambuci em produtos cosméticos que podem auxiliar na prevenção contra danos antioxidantes e antiglicantes do organismo.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p. 474, 2003.

ABU, N.; HO, W.Y.; YEAP, S. K.; AKHTAR, M. N.; ABDULLAH, M. P.; OMAR, A. R.; ALITHEEN, N. B. The flavokawains: uprising medicinal chalcones. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2013.

ADATI, R. T.; FERRO V. de O. Volatile Oil Constituents of *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum. (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v 18, p. 691-692, 2006)

ALBUQUERQUE, F. H. C.; SOARES, K. DA S.; OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Myrtaceae frente à cepas de bactérias de interesse. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, p. 139–145, 2017.

ANDRADE, B.A.G.F.; FONSECA, P.Y.G.; LEMOS, F. (Org.). **Cambuci – o fruto, o bairro, a rota: história, cultura, sustentabilidade e gastronomia**, São Paulo: Ourivesaria da Palavra, p. 176, 2011.

ANDRADE, J. de S.; ARAGÃO, C.G.; FERREIRA, S.A. do N. Caracterização física e química dos frutos de Araçá-Pêra (*Psidiumacutangulum* D. C.). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 23, n. 2-3, p. 213-217, 1993.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 01-09, 2007.

ARAPITSAS, P.; MENICHETTI, S.; VINCIERI, Franco F.; ROMANI, Annalisa. Hydrolyzable Tannins with the Hexahydroxydiphenoyl Unit and the m-Depsidic Link:  $\cdot\cdot$  hplc-dad-ms identification and model synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 48-55, 2007.

ARAUJO, R. L. de. **Biodisponibilidade dos compostos fenólicos de Eugenia dysenterica DC e efeito sobre as respostas glicêmica, insulinêmica e incretínica de indivíduos portadores de síndrome metabólica e disglícemia.** 2019. 34 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências dos Alimentos, Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ATUN, S.; SRI, H.; RAKHMAWATI, A. Potential Bioactive Compounds Isolated from *Boesenbergia rotunda* as Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 3, p. 513-518, 2018.

BARBOSA, H. P. J.; OLIVEIRA, L. S.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology Parte A**, v. 136, n. 1, p. 113-126, 2003.

BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity., **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813–20, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615–25, 2005.

BRUNINI M. A.; OLIVEIRA A.L.; VARANDA D.B. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba paluma armazenada a -20°C. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 546 3, p. 394-396, 2003.

CAMPANINI, C.; LAMANO-FERREIRA, A. do N.; FRANCOS, M. S.; LAMANO-FERREIRA, M. Etnoecologia do cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum) pela população de Paranapiacaba, sudeste do Brasil. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 10, n. 4, p. 1179, 2017.

CASS, Q. B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos de HPLC: fundamentos, estratégias e validação. **Eduscar**, São Carlos: UFSCar, 2001, p. 76.

CASTELUCCI, A. C. L. **Avaliação da estabilidade dos compostos bioativos de polpas de frutas nativas submetidas ao processo de irradiação**. 2015. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-06102015-144037/pt-br.php>. Acesso em: 27 set. 2021.

CAVALCANTE, R. M.; LIMA, D. M. de; CORREIA, L. M.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G.S. S.; VIANA, R. B. Técnicas de extrações e procedimentos de *clean-up* para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em sedimentos da costa do Ceará. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1371-1377, 2008.

CNCFLORA, *Campomanesia phaea* in lista vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/pt-br/profile/Campomanesia\\_phaea](http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/pt-br/profile/Campomanesia_phaea)>. Acesso em 30 maio 2021.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1987.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da UNICAMP, Campinas, 2006.

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

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; SILVA, J. R. M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 53-60, dez. 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52–60, 1997.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**, Boston: Houghton Mifflin, p. 396, 1984.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

D'ÁVILA, M.C. **Da flora medicinal do rio grande do sul**. Faculdade livre de medicina e pharmacia de porto alegre, Porto Alegre, p. 155, 1910

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DESAI, K.M.; Chang, T.; Wang, H.; Banigesh, A.; Dhar, A.; Liu, J. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 273–84, 2010.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. Frutas brasileiras. Jaboticabal: **Novos talentos**, p. 288, 2002.

DONADO-PESTANA, C. M. **Polyphenols from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) and cambuci (*Campomanesia phaea* Berg.): bioactivities in diet-induced obesity and their metabolic alterations**. 2006. 159f. Tese (Doutorado em ciências de alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, 2016.

DONADO-PESTANA, CARLOS M.; PESSOA, É. V.M.; RODRIGUES, L.; ROSSI, R.; MOURA, M. H.C.; SANTOS-DONADO, Priscila R. dos; CASTRO, É.; FESTUCCIA, W. T.; GENOVESE, M. I. Polyphenols of cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg.)) fruit ameliorate insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice. **Food Chemistry**, v. 340, p. 128-169, 2021.

DONG, M. W. **Modern HPLC for practicing scientists**. Wiley Interscience, Massachusetts, 2006.

FARIA, A. A. Etnoconservação como política de meio ambiente no Brasil: desafios políticos de resistência e integração ao mundo globalizado. **Agroecologia Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 3, n. 3, 2002.

FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 4, p. 307-313, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-69, 1997.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; FREITAS, L. de; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 196–204, 2018.

FRANCHIN, M.; ROSALEN, P.L.; DA CUNHA, M.G.; SILVA, R.L.; COLÓN, D.F.; BASSI, G.S.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F.Q.; BEUTLER, J.A.; CUNHA, T.M. Cinnamoyloxy-mammeisin Isolated from Geopropolis Attenuates Inflammatory Process by Inhibiting Cytokine Production: Involvement of MAPK, AP-1, and NF- $\kappa$ B, **Journal of Nature Products**, v. 22, 1828–1833, 2016.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**, períodos 2018 – 2019. Relatório técnico. Disponível em < <http://mapas.sosma.org.br/> Acesso em 29/05/2021.

GAN, R.; KONG, K.; LI, H.; WU, K.; GE, Y.; CHAN, C.; SHI, X.; CORKE, H. Separation, Identification, and Bioactivities of the Main Gallotannins of Red Sword Bean (*Canavalia gladiata*) Coats: separation, identification, and bioactivities of the main gallotannins of red sword bean (*Canavalia gladiata*) coats. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. 39, p. 1-10, 2018.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, Rúbia C.G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M.V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302-308, 2019.

GARCÍA, L. MOLINA; MARTÍNEZ-EXPÓSITO, R.; CÓRDOVA, M. L. Fernández-De; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. Determination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Spanish *Quercus coccifera*. **Journal of Chemistry**, 2018, p. 1-9, 2018.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641–1673, 2007.

GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutrition Research**, v. 28, p. 198-207, 2008.

GOLDIN, A.; Beckman, J.; Schmidt, A.M.; and Creager, M. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, p. 597–605, 2006.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial Frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666-4674, 2010.

HALLIWELL B.; Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation**. 2.ed. Berlin: Springer, p. 244, 1998.

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

ICHIHASHI, M.; YAGI, M.; NOMOTO, K.; YONEI, Y. Glycation Stress and Photo-Aging in Skin. **Anti-Aging Medicine**, v. 8, n. 3, p. 23–29, 2011.

INFANTE, J.; ROSALEN, P.L.; LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S.M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits, **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1-13, 2016.

JAKUS V.; RIETBROCK N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, v. 53, n. 2, p. 131-42, 2004.

JIN, Mu Hyeon *et al.* **Antiwrinkle cosmetic compositions containing chalcone derivatives**. Titular: Lg Household & Health Care Ltd., S. Korea. KR n. KR 2011101715 A. Depósito: 09 mar. 2010. Concessão: 16 set. 2011.

JONES, S. **HPLC in a World Without Acetonitrile, Laserchrom Chromatography**. UK, 2011.

JUNIOR, M. A. de O.; DOCEMA, M. L.; SANT'ANNA, M.; SAMPAIO, L.; RIDOLFI, G.; RAMOS, M.; TAVANO, E.; STIPP, L. **Cambuci: uma superfruta que parece, mas não veio do espaço**. 2019. Disponível em: <https://www.blogs.unicamp.br/descascandoociencia/2019/08/28/a-fruta-cambuci/>. Acesso em: 30 maio 2021.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 799, n. 1–2, p. 101-110, 1998.

KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWAA, YANO, K. M. HL. Differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from *Citrus* juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.128-135, 1999.

KROMIDAS, S. **More Pratical Problem Solving in HPLC**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, 2005.

LAHSASNI, S. A.; KORBI, F. H. A.; ALJABER, N. A.-A. Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant activities of some novel chalcones analogues. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2014.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANDRUM L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brasil: An illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LESCANO, C. H.; LIMA, F. F. de; CAIRES, A. R. L.; OLIVEIRA, I. P. de. Polyphenols Present in *Campomanesia Genus*: pharmacological and nutraceutical approach. **Polyphenols In Plants**, p. 407-420, 2019.

LI, C.; SEERAM, N.P. Ultra-fast liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid phenolic profiling of red maple (*Acer rubrum*) leaves. **Journal Of Separation Science**, v. 41, n. 11, p. 2331-2346, 2018.

LIU, H.; WANG, T.; ZHANG, H.; ZHAI, Y.; KANG, T. Establishmend of Content Determination of 5 Components and Their Content Difference Analysis in the Branch and Root of *Juglans mandshurica*. **China Pharmacy**, China, v. 12, n. 1, p. 933-939, 2021.

LORENZI, H. BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 672, 2006.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419–427, 2005.

MAILLARD, L. Action des acides aminés sur les sucres. formation des delanoidins par voie methodique. **Comptes Rendus Académie Science**, v. 154, p. 66–68, 1912.

MALUF, A.M.; EREIO, W.A.P. Secagem e armazenamento de sementes de Cambuci. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 707-714, 2005.

MERCK MILLIPORE, **ChromBook – Your guide to a fascinating world of chromatography**, Germany, 2012.

MEYER, V.R., **Practical High-Performance Liquid Chromatography**, Wiley-VCH, 2004.

MORAES, F. P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2007.

MORAES, M. Botânica Brasileira: **Aplicada à Medicina às Artes e à Indústria (Seguida de um Suplemento de Matéria Médica, Inclusive as Plantas Conhecidas e Aplicadas Pelos Índios em Suas Enfermidades)**. Garnier, Rio de Janeiro, 1881.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, G. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, p. 3071– 3096, 2009.

OF, D.; MELLITUS, D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n.1, p. 81–90, 2014.

OLIVEIRA, A. C. DE; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes, **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, F.C.; ALBUQUERQUE, U.P.; FONSECA-KRUEL, V.S.; HANAZAKI, N. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 590-605, 2009.

PATEL, K.; PATEL, J.; PATEL, M.; RAJPUT, G.; PATEL, H. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. **Pharmaceutical Methods**, v.1, n.1, p. 2-13, 2010.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I.D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. de A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-Mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

- PENG, Xiaofang. et al. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food and Function**, v. 2, n. 6, p. 289–301, 2011.
- PFUNDSTEIN, B.; DESOUKY, S. K. E.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; ERBEN, G.; OWEN, R. W. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. **Phytochemistry**, v. 71, n. 10, p. 1132-1148, 2010.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1952.
- RAMLAGAN, P.; RONDEAU, P.; PLANESSE, C.; NEERGHEEN-BHUJUN, V. S.; FAWDAR, S.; BOURDON, E.; BAHORUN. *Punica granatum* L. mesocarp suppresses advanced glycation end products (AGEs)- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and pro-inflammatory biomarkers. **Journal Of Functional Foods**, v. 29, p. 115-126, 2017.
- RÉ, P.V del; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.
- RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p.133-149, 2005.
- ROGINSKY, V; LISSI, E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.
- RUSSO, H. M.; BUENO, P. C. P.; BAUERMEISTER, A.; ALMEIDA, R. F. de; DORRESTEIN, P. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Can Statistical Evaluation Tools for Chromatographic Method Development Assist in the Natural Products Workflow? A Case Study on Selected Species of the Plant Family Malpighiaceae. **Journal Of Natural Products**, v. 83, n. 11, p. 3239-3249, 2020.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8,

n. 3, p. 121-137, 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2003.

SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; JÁUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; BASTIDA J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1008, n. 1, p. 57-72, 2003.

SILVA, I. G. et al. Estudo de caracterização do fruto cambuci [*Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum] e sua aplicação no processamento de geleia. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 83-90, 2012.

SILVA, P.T.; LOPES, M.L.M.; VALENTE-MESQUITA, V.L. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geleia. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 678-682, 2006.

SIMEÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed da UFRGS/ Florianópolis: Ed. Da UFSC. p. 1104, 2007

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Livro Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed.

2010.

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

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons. P. 863, 1979.

SOARES, J. C.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; SARDI, J. de C. O.; MASSARIOLI, A. P.; NANI, B. D.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. de. Phenolic profile and potential beneficial effects of underutilized Brazilian native fruits on scavenging of ROS and RNS and anti-inflammatory and antimicrobial properties. **Food & Function**, v. 11, n. 10, p. 8905-8917, 2020.

SOARES, J.C., ROSALEN, P.L., LAZARINI, J.G., MASSARIOLI, A.P., DA SILVA, C.F., NANI, B.D., FRANCHIN, M., E ALENCAR, S.M., Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178-188, 2019.

STEHMANN, J.R.; FORZZA, R.C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D.P.; KAMINO, L.H.Y. (Eds). **Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 516, 2009

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.

TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. Envelhecimento cutâneo: teoria dos radicais livres e tratamentos visando a prevenção e o rejuvenescimento. **Revista uningá review**, v. 1, n. 1, p. 71-84, 2010.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TSUGAWA, Hiroshi; NAKABAYASHI, Ryo; MORI, Tetsuya; YAMADA, Yutaka; TAKAHASHI, Mikiko; RAI, Amit; SUGIYAMA, Ryosuke; YAMAMOTO, Hiroyuki; NAKAYA, Taiki; YAMAZAKI, Mami. A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 295-298, 2019.

VALLILO, M. I.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. de; LAMARDO, L. C. A. Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 241-244, 2005.

WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance- mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437- 455, 2003.

YISIMAYILI, Z.; ABDULLA, R.; TIAN, Q.; WANG, Y.; CHEN, M.; SUN, Z.; LI, Z.; LIU, F.; AISA, H. A.; HUANG, C. A comprehensive study of pomegranate flowers polyphenols and metabolites in rat biological samples by high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1604, p. 460-472, 2019.

YUE, Y.; LIU, L.; LIU, P.; LI, Y.; LU, H.; LI, Y.; ZHANG, G.; DUAN, X. Cardamonin as a potential treatment for melanoma induces human melanoma cell apoptosis. **Oncology Letters**, v. 2, n. 19, p. 1393-1399, 2019.