



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GISELLE LOPES SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIGLICANTE E
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE *Psidium cattleianum* var.
lucidum (ARAÇÁ-AMARELO)**

Londrina
2019

GISELLE LOPES SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIGLICANTE E
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE *Psidium cattleianum* var.
lucidum (ARAÇÁ-AMARELO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química, da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik

Londrina
2019

GISELLE LOPES SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIGLICANTE E
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE *Psidium cattleianum* var. *lucidum*
(ARAÇÁ-AMARELO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Anna Paola Butera
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Audrey Alessandra S. G. Lonni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 14 de março de 2019.

Dedico esse trabalho à minha mãe Tininha e ao meu pai Geraldo, que acreditaram na minha trajetória e ofereceram apoio incondicional, sempre com muito amor e sabedoria, guiando todos os meus passos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais Geraldo e Tininha por terem sido a minha base durante toda a trajetória da minha vida, por terem sempre incentivado os estudos e por terem me apoiado em todas as etapas, persistentes em busca dos meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Maria Luiza por ter me acolhido de braços abertos, ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e por todos os ensinamentos que ela me proporcionou durante este dois anos de mestrado.

À minha colaboradora Helena Mannocho Russo por toda paciência, muitos dias de dedicação ao meu trabalho, em todas as suas etapas. Agradeço também por sua amizade e ensinamentos, contribuindo com meu crescimento.

À Dra. Vanderlan pela oportunidade de realização de um estágio de 6 meses em seu laboratório juntamente com o grupo de pesquisa NuBBE.

Aos meus colegas da Universidade estadual de Londrina, em especial aos integrantes do grupo de pesquisa Labfitobio: Anna, Marcela, Tamires, Elisa, Suellen, George por terem sido mais que colegas e terem tornado esta jornada mais leve e prazerosa.

Aos meus colegas do Instituto de Química da Unesp em Araraquara -SP, pela parceria e colaboração com este trabalho, mas também por terem me acolhido de forma amorosa e terem feito com que eu me sentisse em casa.

Ao meu noivo Gilberto por toda paciência, auxílio e companheirismo durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Por todas as vezes em que me acalmou, esperando ao meu lado tudo se ajeitar.

Gostaria de agradecer também ao programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e que foram essenciais para que eu concluísse esta etapa da minha vida. Em especial às professoras Anna Paola Butera e Audrey Lonni por aceitarem o convite para participarem da minha banca de defesa e contribuir com este trabalho.

“Um filósofo é, portanto, alguém que reconhece que há muitas coisas que não entende. E isso aflige-o. Deste ponto de vista, é, porém, mais sábio que todos os que se gabam do seu pretenso saber.”

(O mundo de Sofia)



(Um Sábado Qualquer – Carlos Ruas)

SILVA, Giselle Lopes. **Estudo fitoquímico e avaliação antiglicante e antioxidante dos frutos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (araçá-amarelo)**. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O fruto de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (Myrtaceae), conhecido como araçá-amarelo, é fonte de substâncias bioativas com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anticarcinogênicas. Devido a estas propriedades o objetivo deste trabalho foi o estudo fitoquímico dos frutos de *P. cattleianum* em busca por substâncias bioativas. Extratos, utilizando-se os solventes acetato de etila e metanol, foram preparados para cascas e polpa dos frutos, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV-Vis (CLAE-UV/DAD) e submetidos aos ensaios de atividades antioxidantes e antiglicante. Os extratos das cascas dos frutos de *P. cattleianum* apresentaram-se mais ativos, se comparados aos extratos da polpa do fruto, sobretudo o extrato metanol das cascas (PC_CM), cujo EC₅₀ observado para atividade antioxidante foi de $38,26 \pm 2,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a porcentagem inibidora de reações de glicação de 34,2%. Assim, o extrato PC_CM foi fracionado por CL-UV/DAD em escala preparativa e as frações submetidas à novos ensaios biológicos. As frações revelaram menor capacidade antioxidante se comparada ao extrato PC_CM, possivelmente devido ao sinergismo presente entre todos os constituintes químicos desse extrato. Para o ensaio antiglicante, a fração FR4 apresentou um maior efeito antiglicação (47%), se comparada ao extrato (34,2%). Assim, o extrato PC_CM e a fração FR4 foram analisados por CL-EM/EM e foram propostas a ocorrência de sete substâncias no extrato PC_CM e fração FR4: (1) dihidromiricetina hexosídeo, (2) taxifolina hexosídeo, (3) quercetina hexosídeo, (4) quercetina glucuronídeo, (5) delphinidina glucuronídeo, (6) cianidina hexosídeo e (7) delphinidina hexosídeo, sendo todas pertencentes à classe dos flavonoides. Portanto, é possível ampliar as possibilidades de uso das cascas do fruto *P. cattleianum*, para desenvolvimento de cosméticos, auxiliando na prevenção contra danos antioxidantes e antiglicantes do organismo.

Palavras-chave: *Psidium cattleianum* var. *lucidum*. Araçá-amarelo. Flavonoide. Atividade antioxidante. Atividade antiglicante. Cromatografia líquida.

SILVA, Giselle Lopes. **Phytochemical study and antiglycant and antioxidant evaluation of fruits *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (araçá-amarelo)**. 2019. 90 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The fruits are a promising source of bioactive compounds. The fruit *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (Myrtaceae), known as araçá-amarelo, is a source of antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic properties. Due to these properties the objective of this paper was the phytochemical study of *P. cattleianum* fruits in search of bioactive substances. Acetalic and methanolic extracts from fruit peels and pulp were analyzed by HPLC-UV/DAD and antioxidant and antiglycation assays were performed. The extracts of the peel of the fruit *P. cattleianum* performed themselves more active, if compared to fruit pulp, especially the methanolic extract of peel (PC_CM), with an antioxidant result of $EC_{50} = 38.26 \pm 2.51 \mu\text{g mL}^{-1}$ and inhibition percentage of glycation reactions of 34.2%. Thus, the PC_CM extract was fractionated by CL-UV / DAD on a preparative scale and the fractions submitted to new biological assays. The fractions performed lower antioxidant capacity when compared to the PC_CM extract, possibly due to the synergism present among all the chemical constituents of this extract. For the antiglycant assay, the FR4 fraction showed a better result (47%) than the extract (34.2%). Therefore, the PC_CM extract and the FR4 fraction were analyzed by LC-MS/MS analysis. Seven substances were identified: (1) dihidromiricetin hexoside, (2) taxifolin hexoside, (3) quercetin hexoside, (4) quercetin glucuronide, (5) delphinidin glucuronide, (6) cyanidin hexoside e (7) delphinidin hexoside, all belonging to the class of flavonoids. Thus, it is possible to increase the possibilities of using the peels of the fruit *P. cattleianum*, they can be used in the development of cosmetics, helping in the prevention against antioxidant and antiglycant damages of the organism.

Keywords: *Psidium cattleianum* var. *lucidum*. Araçá-amarelo. Flavonoid. Antioxidant activity. Antiglycation. Liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> : Araçazeiro (A) e fruto araçá-aramelo, (B).....	20
Figura 2. Substâncias identificadas presentes nos frutos, polpa e folhas, da espécie <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> baseadas em dados da literatura.	21
Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.....	24
Figura 4. Representação do processo de glicação. Fonte: Modificado de Peng et al., 2011	25
Figura 5. Formação de Cross-links no colágeno.	27
Figura 6. Acoplamento CL-EM.	28
Figura 7. Ionização por Eletrospray utilizada no acoplamento CL-EM.	29
Figura 8. Fluxograma ilustrativo dos processos de extração de polpas e cascas da espécie <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	33
Figura 9. Perfis cromatográficos em gradiente exploratório (CLAE-UV/DAD) dos extratos (a) PC_CM e (b) PC_CA das cascas de <i>P. cattleianum</i> [Coluna Phenomenex [®] C ₁₈ -Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); eluição modo gradiente 5-100 %B em 40 minutos (Método A), ACN:H ₂ O (+0,1% ácido fórmico), λ=280 nm, volume de injeção: 20 µL].	41
Figura 10. Cromatograma nas condições otimizadas do extrato acetato de etila das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CA) [Coluna Phenomenex [®] C ₁₈ -Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); eluição modo gradiente 5-55-70 %B em 40 minutos (Método B), ACN:H ₂ O (+0,1% ácido fórmico), λ = 280 nm, volume de injeção: 20 µL].	43
Figura 11. Perfis cromatográficos em gradiente exploratório (CLAE-UV/DAD) dos extratos (a) PC_PM e (b) PC_PA da polpa de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> [Coluna Phenomenex [®] C ₁₈ -Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); eluição modo gradiente 5-100 %B em 40 minutos (Método A), ACN:H ₂ O (+0,1% ácido fórmico), λ = 254 nm, volume de injeção: 20 µL].	44
Figura 12. Cromatograma nas condições otimizadas do extrato metanol da polpa de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_PM) [Coluna Phenomenex [®] C ₁₈ -Luna (250	

mm x 4,6 mm, 5 μ m); eluição modo gradiente 5-45 %B em 40 minutos (Método C), ACN:H ₂ O (+0,1% ácido fórmico), λ = 254 nm, volume de injeção: 20 μ L].....	45
Figura 13. Mecanismo de ação do ensaio do cátion radical ABTS ^{•+}	46
Figura 14. Mecanismo de ação do ensaio de redução de radicais peroxila.	47
Figura 15. Mecanismo de ação da via clássica de reações de glicação para formação de AGEs.	49
Figura 16. Resultado do ensaio antiglicante para os extratos brutos da polpa e cascas do fruto <i>P. cattleinaum</i> , solventes acetato de etila e metanol.	50
Figura 17. Cromatograma CL-UV/DAD obtido para o extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC-CM) em escala preparativa. As linhas pontilhadas indicam as regiões do cromatograma em que foram coletadas as frações. Cromatograma nas condições otimizadas do extrato metanol da polpa de <i>P. cattleianum</i> (PC-PM). [Coluna Phenomenex [®] C18-Luna (150 mm x 21,20 mm, 5 μ m); gradiente 5-55-70 %B em 40 minutos (Método B), ACN:H ₂ O (+0,1% ácido fórmico), λ = 280 nm].	52
Figura 18. Cromatograma analítico ampliado do extrato (PC-CM) obtido por CLAE-UV/DAD.....	53
Figura 19. Resultados do ensaio antiglicante para as frações obtidas do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	55
Figura 20. Cromatogramas dos íons totais extraídos nos modos positivo (A) e negativo (B), respectivamente, presentes na fração FR4 obtida a partir do fracionamento do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM) obtidos por CL-EM/EM.	57
Figura 21. Cromatograma dos íons totais, no modo negativo do extrato bruto PC_CM, obtidos por CL-EM/EM.....	58
Figura 22. Propostas de identificação de substâncias presentes na fração FR4 e no extrato bruto com solvente metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM), obtidas pela análise por CL-EM/EM.	60
Figura 23. Proposta de fragmentação por clivagem heterolítica. Fonte: Autora	61
Figura 24. Proposta e fragmentação por retrociclização.	61
Figura 25. Proposta de fragmentação do anel pirânico e formação do íon <i>m/z</i> 107 (C).	61
Figura 26. Proposta de fragmentação de perda de CO ₂	62

Figura 27. Proposta de fragmentação do anel pirânico (C) com liberação de CO para clivagem heterolítica.....	62
Figura 28. Espectro de massas da substância 1, dihidromiricetina hexosídeo, presente no extrato bruto das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> , extraído com solvente metanol (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.	63
Figura 29. Espectro de massas da substância 2, taxifolina hexosídeo, presente no extrato bruto das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> , extraído com solvente metanol (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.	65
Figura 30. Espectro de massas da substância 3, quercetina hexosídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.	67
Figura 31. Espectro de massas da substância 4, quercetina glucuronídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.	69
Figura 32. Espectro de massas da substância 5, delphinidina glucuronídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM), obtidos no modo positivo por CL-EM/EM.	71
Figura 33. Espectro de massas da substância 6, cianidina hexosídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM), obtidos no modo positivo por CL-EM/EM.	73
Figura 34. Espectro de massas da substância 7, delphinidina hexosídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM), obtidos no modo positivo por CL-EM/EM.	75
Figura 35. Delphinidina hexosídeo identificada em três tempos de retenção diferentes, obtidos no modo positivo por CL-EM/EM	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas dos extratos de polpas e cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> [Fase Móvel: ACN:H ₂ O (0,1% de ácido fórmico); coluna Phenomenex [®] C18-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); vazão de 1 mL min ⁻¹ , temperatura ambiente; volume de injeção de 20 µL de solução de 10 mg mL ⁻¹).....	35
Tabela 2. Frações obtidas do extrato PC_CM por CL-UV/DAD em escala preparativa e os respectivos tempos em que foram monitoradas.	38
Tabela 3. Massas obtidas dos extratos preparados de <i>P. cattleianum</i> e seus respectivos rendimentos.....	40
Tabela 4. Valores obtidos de EC ₅₀ para os extratos de <i>P. cattleianum</i> nos ensaios de avaliação do potencial de redução do radical ABTS ^{•+} e redução de radicais peroxila.	48
Tabela 5. Massas obtidas do fracionamento do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> , PC_CM.	53
Tabela 6. Resultados do ensaio antioxidante, avaliação do potencial de redução do radical ABTS ^{•+} , para as frações obtidas do extrato metanol das cascas de <i>P. cattleianum</i>	54
Tabela 7. Proposta de identificação das substâncias presentes na fração FR4 do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> (PC_CM) por CL-EM/EM, identificação em modo negativo e modo positivo.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	Sal trissódico do ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trissulfônico
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ABTS^{•+}	Cátion radical ABTS
AG	Aminoguanidina
AGE_s	Advanced Glycated End-Products
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
APPI	Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica
BSA	Albumina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
EC₅₀	Concentração eficiente onde 50% de um radical é reduzido por uma amostra
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ESI	Electrospray
FL_{bCN}	Intensidade de fluorescência do branco do controle negativo
FL_{bs}	Intensidade de fluorescência do branco da amostra
FL_{CN}	Intensidade de fluorescência do controle negativo
FL_s	Intensidade de fluorescência da amostra

FOSHU	Foods for Specified Health Use
m/z	Razão massa carga
MGO	Metilglioxal
PC_CA	<i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> casca acetato
PC_CM	<i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> casca metanol
PC_PA	<i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> polpa acetato
PC_PM	<i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> polpa metanol
RDA	Retro Diels-Alder
ROO[•]	Radical Peroxila
TIC	Cromatograma de Íons Totais
TOF	Tempo de voo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A química dos produtos naturais e a biodiversidade brasileira	17
1.2	Família Myrtaceae e o gênero <i>Psidium</i>	18
1.2.1	Espécie <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	19
1.3	Alimentos funcionais	22
1.4	Antioxidantes.....	23
1.5	Glicação	24
1.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM).....	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos gerais	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Reagentes e solventes.....	32
3.2	Equipamentos utilizados	32
3.3	Material Vegetal	33
3.4	Obtenção dos extratos brutos de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	33
3.5	Análise dos extratos brutos de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-UV/DAD)	34
3.6	Ensaio biológicos <i>in vitro</i> realizados com os extratos brutos e frações de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	35
3.6.1	Ensaio da capacidade de redução do cátion radical ABTS ^{•+}	35
3.6.2	Ensaio da capacidade de redução dos radicais peroxila	36
3.6.3	Ensaio da atividade de inibição da glicação	37
3.7	Fracionamento do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> por CL-UV/DAD em escala preparativa.....	38
3.8	Elucidação dos constituintes químicos da Fração 4 (FR4) por CL-EM/EM..	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Obtenção dos extratos de cascas e polpas da espécie <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	40
4.2	Análise cromatográfica dos extratos da cascas e polpa de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> por CLAE-UV/DAD	40

4.3 Ensaio biológico realizados com os extratos brutos de cascas e polpa de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i>	46
4.3.1 Capacidade antioxidante	46
4.3.2 Ensaio antiglicação	49
4.4 Fracionamento do extrato metanol das cascas de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> , (PC-CM), por Cromatografia Líquida acoplada a Detector com Arranjo de Diodos (CL-UV/DAD) em escala preparativa.....	51
4.5 Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante das frações obtidas do fracionamento do extrato PC-CM de <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucidum</i> , por CL-UV/DAD em escala preparativa	54
4.6 Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato metanol das cascas do fruto de <i>P. cattleianum</i> (PC_CM) e da fração FR4 por CL-EM/EM.....	56
4.7 Associação das substâncias propostas com resultados antioxidantes e antiglicantes observados	77
5 CONCLUSÕES	80
6 REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 A química dos produtos naturais e a biodiversidade brasileira

O Brasil detém grande parte da biodiversidade mundial, onde se destacam os biomas Floresta Amazônica (49% do território nacional), Cerrado (24%), Mata Atlântica (13%), Caatinga (9%), Pantanal (2%) e Campos do Sul (3%) (BERLINCK et al., 2017; SIMÕES et al., 2017).

Os produtos naturais, provenientes da biodiversidade, sempre exerceram um papel fundamental para a ciência, ao longo do tempo. O estudo químico desses produtos engloba ao todo as partes de uma planta, como suas raízes, cascas, flores, folhas, frutos e sementes. Dessa forma, o uso de produtos naturais extraídos de plantas vem amplamente sendo utilizado como fonte promissora para obtenção de bioprodutos, como os fármacos e cosméticos (BERLINCK et al., 2017).

Empresas nacionais e internacionais apresentam crescente interesse na biodiversidade brasileira. Diante de estudos químicos voltados para a indústria farmacêutica, a empresa Achê desenvolveu dois fitoterápicos genuinamente brasileiros, sendo lançado em 2004 o anti-inflamatório de uso tópico Acheflan®, voltado para dores musculares e fabricado a partir do óleo essencial de *Cordia verbenaceae* (Borraginaceae) e em 2009 o ansiolítico Sintocalmy®, preparado a partir do extrato de *Passiflora incarnata* (Passifloraceae) (PERINI et al., 2015; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Porém, é importante ressaltar uma lacuna no conhecimento acerca de espécies de plantas estudadas, pois ainda há uma escassez de coletas quando em comparação à ampla área territorial brasileira. Fato que representa um enorme potencial inexplorado (SIMÕES et al., 2010).

A fitoquímica é responsável por verificar a presença de metabólitos e caracterizar constituintes químicos presentes em espécies vegetais cuja composição química é desconhecida, assim como, isolar metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2010).

Portanto, traçar o perfil dos metabólitos totais presentes numa planta, para identificar uma atividade biológica, e posteriormente confirmar a eficácia terapêutica de cada constituinte individual ou em mistura, é uma abordagem de

suma importância sobre a química e bioquímica de plantas. Dessa forma, o potencial para descobertas de substâncias como possíveis fitoterápicos e novos fármacos e cosméticos é ampliado (CRAGG et al., 1997).

Dentro da área de produtos naturais oriundos de plantas, destacam-se os frutos, que são uma fonte interessante para a descoberta de novos compostos bioativos. Além desses alimentos serem importantes do ponto de vista biológico, os frutos têm um alto impacto econômico, movimentando a economia global.

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutos do mundo, representando aproximadamente 6% da produção mundial, onde no ranking estão a China e a Índia em primeiros lugares (NEVES et al., 2015; PEREIRA et al., 2012).

A Organização Mundial de Saúde recomenda a ingestão diária de três tipos de frutos e, além de seu consumo *in natura*, os frutos são fontes valiosas de substâncias bioativas e despertam interesse da indústria farmacêutica (DENARDIN et al., 2015; MACHADO et al., 2008).

A maior parte dos frutos é destinada à produção de sucos e polpas congeladas, gerando alta quantidade de resíduos, principalmente cascas e sementes. No entanto, empregando-se um processo adequado, resíduos de frutos podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado, sendo aplicados, por exemplo, na área cosmética (PELIZER; PONTIERI et al., 2007).

Porém, apesar da busca por produtos confeccionados a partir desses resíduos ser uma tendência no mercado brasileiro, em comparação à grande biodiversidade brasileira, a produção desses bioprodutos ainda é restrita.

1.2 Família Myrtaceae e o gênero *Psidium*

Myrtaceae é uma família de angiospermas e suas espécies são, na sua maioria, arbustivas. Possui um valor econômico importante, com o maior número de espécies com potencial alimentar, podendo ser utilizadas *in natura*, como sorvetes, geleias, sucos, licores e sobremesas em geral, além de óleos essenciais, utilizados em perfumaria e farmácia (FRANZON et al., 2009; MORAIS et al., 2006; PEREIRA et al., 2012).

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 (BIEGELMEYER et al., 2011; RAJU, 2012).

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).

Dentre os gêneros catalogados para esta família se encontra o *Psidium sp*, que contém cerca de 100 espécies. Os frutos do gênero *Psidium sp* podem se desenvolver em locais de estresse abiótico, como temperaturas extremas, sendo que essa característica de desenvolvimento está relacionada à rica composição metabólica desses frutos, em particular os compostos fenólicos.

Espécies pertencentes a esse gênero são conhecidas por apresentarem propriedades terapêuticas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, anticarcinogênica. Dentre as espécies do gênero *Psidium sp*, encontra-se o fruto de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, conhecido popularmente como araçá-amarelo, o qual foi o foco do estudo desse trabalho (MEDINA et al., 2011; RAJU, 2012).

1.2.1 Espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*

Os frutos da espécie *Psidium cattleiaum* são consumido na forma *in natura*, ou no preparo de geleias, compotas e sucos e apresentam um alto valor sensorial, devido ao seu sabor atrativo, sendo apreciado por quem os consomem. O nome popular da espécie, araçá-amarelo, vem do tupi arasa, ou do guarani ara (céu) e aza (olho), que significa fruta com olhos ou olhos do céu.

A Figura 1 mostra a imagem de um araçazeiro (A) e do fruto araçá-amarelo (B) (FRANZON et al., 2009).



Figura 1. Espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*: Araçazeiro (A) e fruto araçá-aramelo, (B)

Fonte: G1 (Giselda Person / TG)

A árvore do araçazeiro pode chegar a ter de 4 a 8 metros de altura, seu desenvolvimento se inicia após três meses da sementeira, podendo levar até um ano para ser concluída. Floresce entre os meses de junho e dezembro e a maturação dos frutos ocorre de setembro a março. Estes frutos apresentam alta quantidade de vitamina C, até de três a quatro vezes mais que frutas cítricas (BIEGELMEYER et al., 2011; WILLE et al., 2004).

Rica em compostos bioativos, o araçá-amarelo é considerado um fruto de alto valor nutricional e farmacêutico. Isoflavonoides e óleos essenciais já foram evidenciados nas folhas da espécie *P. cattleianum* (RAJU K. CHALANNAVAR, 2012).

A Figura 2 mostra algumas moléculas já identificadas nos frutos de *P. cattleianum* por Ribeiro e colaboradores (2014), Saber e colaboradores (2018) (RIBEIRO et al., 2014; SABER et al., 2018).

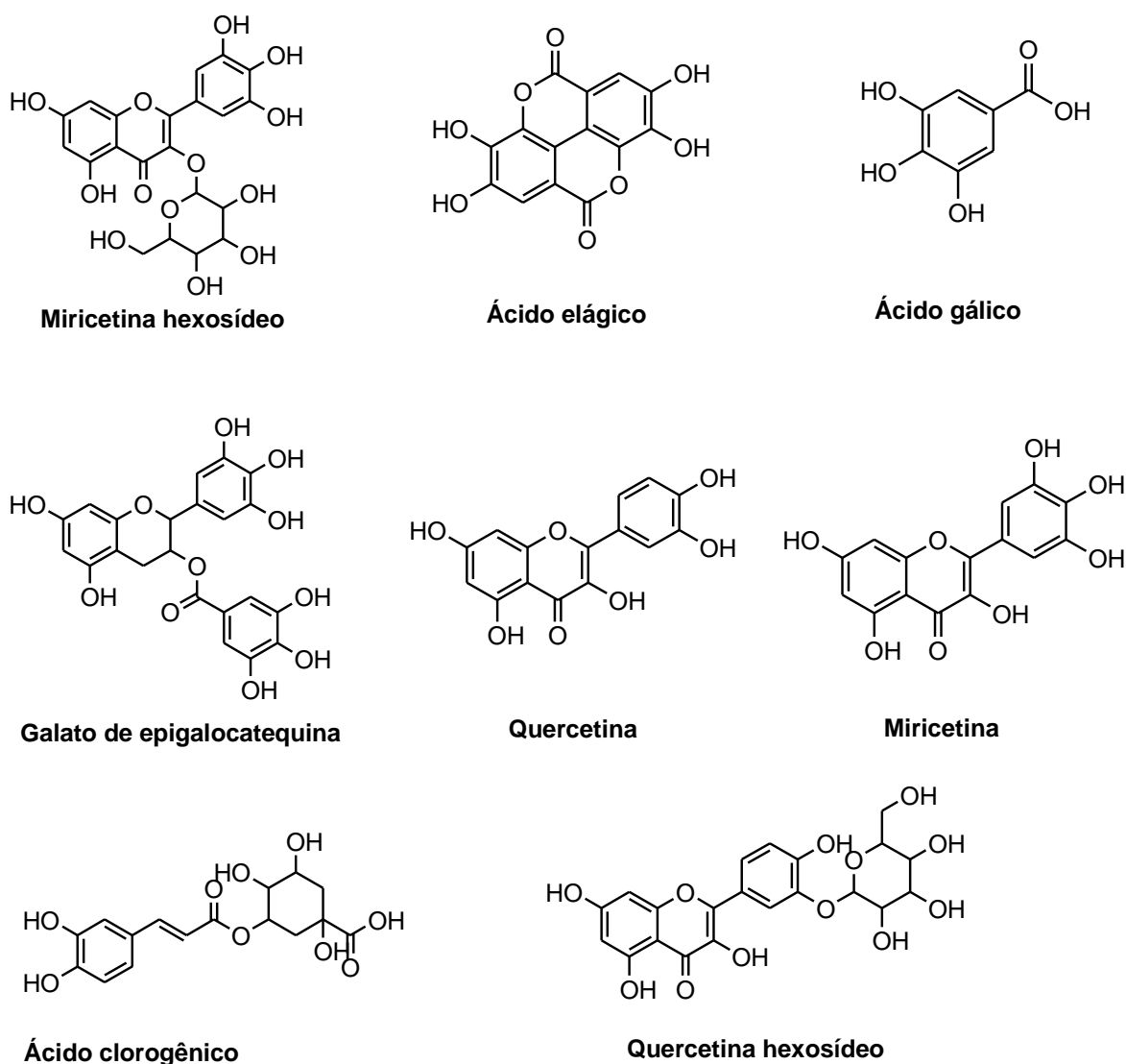


Figura 2. Substâncias identificadas presentes nos frutos, polpa e folhas, da espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum* baseadas em dados da literatura.

Autor: Elaborado pela autora, adaptado de RIBEIRO et al., 2014 e SABER et al., 2018.

Dentre as atividades biológicas encontradas nos extratos de frutos dessa espécie, se tem registro sobre potencial de atividade antioxidante, antimicrobiana, prevenção de doenças crônicas degenerativas e propriedades anticarcinogênica, em que a presença de polifenóis pode restringir o crescimento de células tumorais e combate de radicais livres (MEDINA et al., 2011; MOON et al., 2011).

Alvarenda e colaboradores em seus estudos revelaram que a casca da espécie *P. cattleianum* é usada de forma direta, em chás, efusão e uso oral para alívio de dores de garganta, barriga e abdominal (ALVARENDA et al., 2015).

Considerando as propriedades medicinais relatadas para a espécie *P. cattleinaum*, esse fruto pode ser considerado um alimento funcional, oferecendo inúmeros benefícios à saúde, além do seu valor nutricional, sendo capaz de desempenhar ações que reduzam o risco de doenças crônicas degenerativas (MORAES, 2007).

1.3 Alimentos funcionais

A presença de proteínas, vitaminas, minerais, fibras e substâncias bioativas podem indicar o potencial dos frutos como alimentos funcionais. Estudos sobre propagações de doenças apontam que frutos inclusos na dieta contribuem na redução do risco de câncer, doenças crônicas, envelhecimento precoce, obesidade e doença cardiovasculares (ARAÚJO et al., 2004; PEREIRA et al., 2012).

O termo alimento funcional surgiu pela primeira vez no Japão, na década de 1980, onde o governo local tinha a finalidade de prover alimentos de qualidade, garantindo uma melhoria na expectativa e qualidade de vida (ANJO, 2004). Esses alimentos traziam consigo um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-estar japonês – *Foods for Specified Health Use* (FOSHU) (HASLER, 1998).

A alegação da propriedade funcional deve possuir sustentação científica, e esses alimentos não podem ser considerados medicamentos, uma vez que as substâncias responsáveis pelo efeito benéfico à saúde não são extraídas diretamente do alimento e sim consumidas durante uma dieta usual (NOONAN; NOONAN, 2004).

Os alimentos funcionais podem ser classificados quanto aos benefícios oferecidos de acordo com a área atuante do organismo: sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (BRANCO et al., 2012).

1.4 Antioxidantes

Os compostos antioxidantes são substâncias capazes de retardar ou inibir as reações de oxidação geradas pela ação de radicais, protegendo o sistema biológico 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, onde espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são produzidas e podem atacar lipídeos, proteínas e DNA, causando danos estruturais e funcionais nas membranas celulares, enzimas e material genético (BARBOSA et al., 2010; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

A Equação 1 mostra a reação geral entre um radical livre e um antioxidante, onde um agente antioxidante faz doação de um próton para estabilização de um radical livre. Na Equação 1, R[•] representa um radical livre e AH um antioxidante.



Acredita-se que inúmeras patologias estejam relacionadas à produção dessas espécies radicalares, como o envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer, doenças neurodegenerativas (como o Alzheimer), processos inflamatórios (como a úlcera, asma e alergia), entre outras enfermidades (FERREIRA et al., 1997; VERMA et al., 2014).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes. A primeira classe engloba os antioxidantes que possuem atividade enzimática, capazes de bloquear a iniciação da oxidação, como as enzimas catalase, metionina-redutase, por exemplo. Assim, a partir dessa atividade as enzimas podem impedir a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou as remover. Na segunda classe encontram-se os antioxidantes que não apresentam atividade enzimática, conhecidos como antioxidantes naturais (ou antioxidantes preventivos), formado pelos compostos fenólicos, como os flavonoides. Esses antioxidantes bloqueiam a etapa de propagação de novas reações de oxidação (ABDALLA et al., 2003; MOREIRA et al., 2004).

Os flavonoides são encontrados em abundância nas plantas e apresentam uma grande variedade estrutural. Seu núcleo básico contém 15 átomos de carbono arranjados na configuração C₆-C₃-C₆ (Figura 3), onde dois anéis benzênicos (A e B) estão ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2008). Podem ocorrer como agliconas ou derivados glicosídeos e são divididos em subclasses, entre elas: chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, antocianidinas isoflavonoides (MILENE ANGELO et al., 2007).

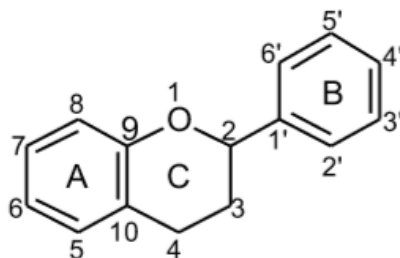


Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.

Fonte: Adaptado de Behling et al., 2008.

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 (BEHLING et al., 2008; GATTUSO et al., 2007).

Atualmente, tem-se aumentado a quantidade de estudos em busca de novos compostos com potencial antioxidante, que podem ser obtidos de fontes naturais e renováveis (BENZIE, 2003; BIANCHI et al., 1999).

1.5 Glicação

O Diabetes *mellitus* é uma doença caracterizada pela hiperglicemia, aumento do açúcar no sangue. O quadro se manifesta quando o organismo não produz a quantidade essencial de insulina no pâncreas para que o açúcar no sangue se mantenha em proporções adequadas (PORTO BARBOSA; DE OLIVEIRA; SEARA, 2009).

Existem dois tipos de Diabetes *mellitus*, o 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, 2014; SINGH et al., 2001)

A elevada quantidade de açúcar no sangue pode acarretar numa reação chamada de glicação, também conhecida como reação de Maillard, descrita pela primeira vez pelo bioquímico francês Louis Camille Maillard (1878-1936). Essa reação ocorre entre açúcares e proteínas no organismo, de forma lenta e complexa, podendo demorar semanas ou meses, envolvendo reações em cascata como condensações, rearranjos e modificações oxidativas, até atingirem o estágio irreversível de produtos finais, conhecidos como AGEs (*Advanced Glycated End-Products*) (BARBOSA et al., 2008; ROCHA et al., 2006).

A glicação é um fator comum aos portadores de diabetes, devido aos seus altos índices glicêmicos. Assim, o maior acúmulo de AGEs nesses indivíduos contribui de maneira clara e relevante para o surgimento e a progressão das complicações do diabetes, como a diminuição da circulação sanguínea que pode causar alterações no funcionamento do coração, nos olhos ocasionando a eventual perda da visão, rins, sendo necessário o tratamento por hemodiálise, além de feridas na pele e amputações (KIKUCHI, 2003; SINGH et al., 2001).

A reação de glicação *in vivo* pode ocorrer por duas vias: a via clássica e a via alternativa (em que se acrescenta o estresse carbonílico). A Figura 4 abaixo demonstra o processo simplificado da reação de glicação pelas duas vias citadas.

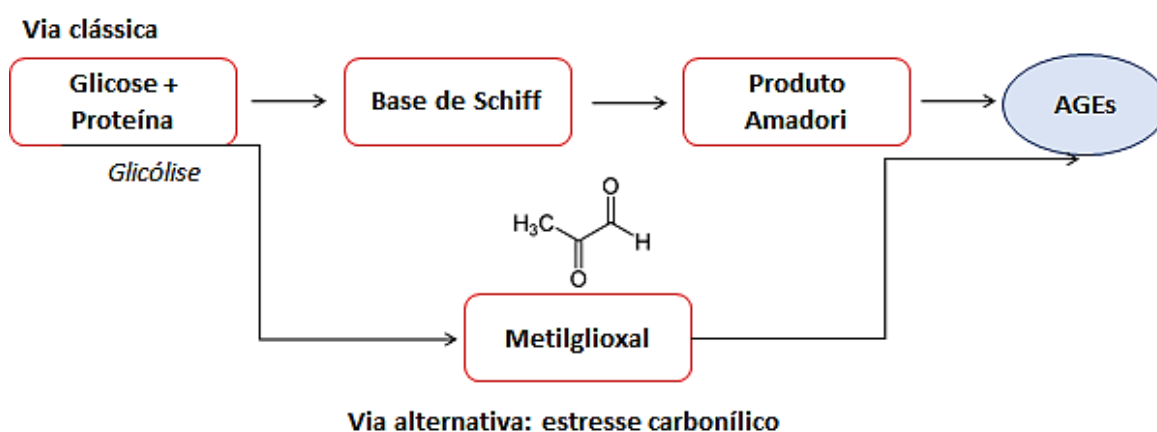


Figura 4. Representação do processo de glicação.

Fonte: Modificado de Peng et al., 2011

Pela via clássica, durante a primeira etapa da uma reação de glicação ocorre a formação de uma base de Schiff, onde um grupo amina de uma proteína ataca a carbonila de um açúcar, como a glicose. Por ser produto não estável, a partir da formação da base de Schiff ocorrem rearranjos, formando-se os produtos de Amadori, mais estáveis. Porém os produtos Amadori ainda possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos amins disponíveis, que por sua vez podem originar os produtos finais da glicação avançada, conhecidos como AGEs. Na via alternativa, durante a glicólise, processo natural do organismo, ocorre a formação de intermediários carbonílicos reativos, entre eles o metilglioxal (MGO) que também pode reagir com animas livres, formando os AGEs. Como precursor dos AGEs, o MGO é mais reativo que a glicose, sendo um dos principais intermediários na formação de AGEs *in vivo* (ICHIHASHI et al., 2011; PENG et al., 2011).

Além de potencializar os efeitos patológicos do diabetes, os AGEs que são acumulados em proteínas, como o colágeno, também estão relacionados ao envelhecimento cutâneo precoce. O colágeno é o principal componente da derme, tendões, cartilagem e vasos sanguíneos e suas fibras possuem papéis importantes no organismo, tais como manter as células dos tecidos unidas, cicatrização e elasticidade dos órgãos (SINGH et al., 2001; SURESH et al., 2012).

No colágeno, os aminoácidos lisina e arginina podem sofrer glicação e formar *crosslinks*, reduzindo, assim, a elasticidade da pele e o aparecimento de rugas, sendo as principais causas do envelhecimento cutâneo. Em seu alinhamento natural, o colágeno mantém as células unidas e a elasticidade dos órgãos. A formação de *crosslinks* pode fazer com que as células percam esse alinhamento (Figura 5), ocasionando assim, no envelhecimento cutâneo precoce (BAILEY; PAUL; KNOTT, 1998; CERVANTES-LAUREAN et al., 2006; ICHIHASHI et al., 2011).

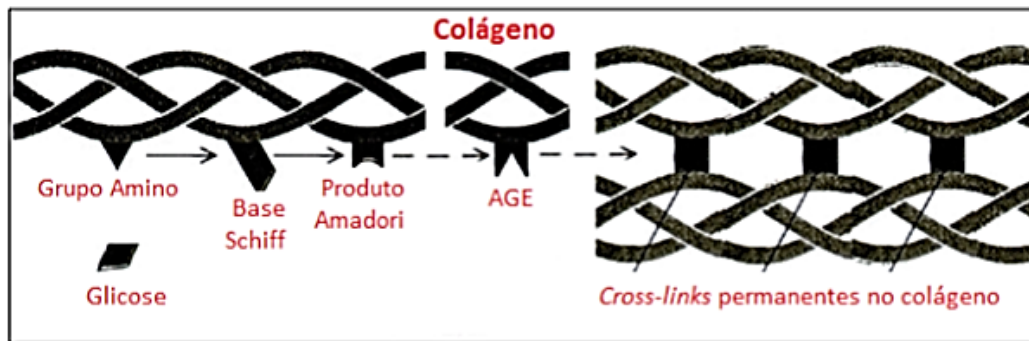


Figura 5. Formação de Cross-links no colágeno.

Fonte: Ichihashi et al., 2011.

Com a preocupação da população em manter os cuidados e elasticidade da pele, retardando as marcas do envelhecimento, a cosmetologia está se aprimorando cada vez mais.

A busca pela obtenção de cosméticos naturais dá preferência em se obter fórmulas contendo produtos de origem vegetal, evitando o uso de substâncias sintéticas. Frutos tropicais representam uma fonte original e valiosa de substâncias bioativas e, atualmente, houve um crescente reconhecimento do valor econômico e terapêutico de seus constituintes químicos para uso em cosméticos e outras finalidades (IHA et al., 2008; ZERAIK et al., 2011).

O desenvolvimento de cosméticos com elevada quantidade de substâncias provenientes de extratos de sementes, polpas e cascas de frutos nativos brasileiros é caracterizada como uma tendência de mercado, já evidenciada por produtos produzidos por grandes empresas como Natura, como o gel creme desodorante para pernas e pés andiroba, da empresa, que utiliza a sementes de andiroba em sua confecção, rica em limonoides e terpenos, por exemplo (IHA et al., 2008).

Assim, o estudo químico de frutos nativos visando o desenvolvimento de um bioproduto é de suma importância, bem como de interesse econômico para indústrias (NATURA, 2018).

Uma das técnicas que fornecem informações estruturais detalhadas sobre componentes químicos é a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM), amplamente utilizada na identificação de compostos. Assim, a CL-EM é uma aliada precursora no desenvolvimento de novos produtos biológicos.

1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma excelente técnica de separação, porém quando é necessária a confirmação de alguma estrutura química, a espectrometria de massas é essencial.

A espectrometria de massas uma técnica de alta sensibilidade que fornece informações estruturais valiosas para a determinação estrutural de uma substância, como o íon molecular e suas fragmentações. Assim, seu acoplamento com a técnica de separação CLAE dá origem à uma ferramenta de grande potencial de análise: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM) (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

O acoplamento CL-EM é mostrado de forma sucinta pela Figura 6, onde o cromatógrafo líquido é utilizado como fonte de introdução da amostra no espectrômetro de massas. Os picos cromatográficos gerados pela separação dos componentes de uma amostra analisada são individualmente introduzidos na fonte de ionização espectrômetro de massas para gerar os íons. Depois serão separados no analisador de massas e encaminhados para detecção e quantificação.

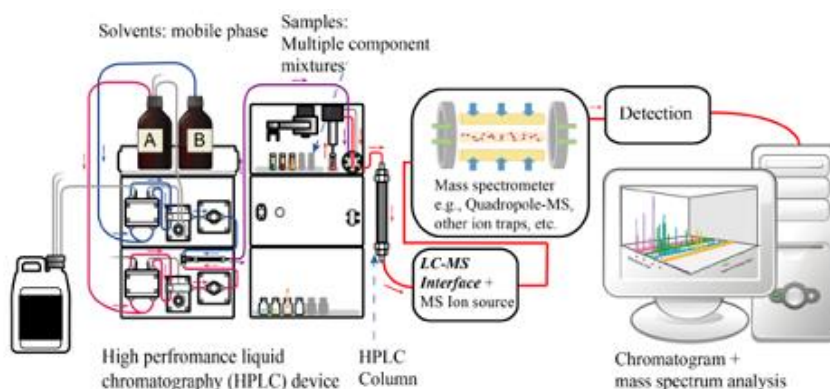


Figura 6. Acoplamento CL-EM.
Fonte: DifferenceBetween.net

Ao utilizar-se a técnica de espectrometria de massas, a ionização do analito é inicialmente 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).

Nesse trabalho foi utilizado o equipamento CL-EM sendo o analisador de massas do tipo *ion trap*, equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI), para a análise dos extratos obtidos dos frutos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*.

A Figura 7 mostra um esquema de ionização por Electrospray. A saída da coluna de CLAE é conectada à uma sonda formada por um tubo capilar de metal circundado por um fluxo de gás nebulizador, normalmente gás nitrogênio, para que ocorra um processo de dessolvatação. Assim, o solvente na amostra é evaporado, há uma alta voltagem, até que os íons do analito possam ser direcionados para o cone de amostragem e depois para o analisador de íons (NIESSEN, 1998).

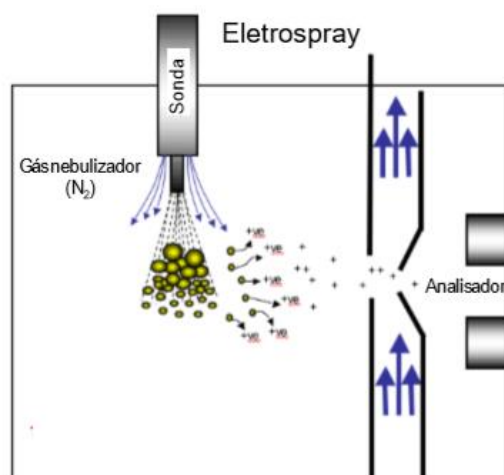


Figura 7. Ionização por Electrospray utilizada no acoplamento CL-EM.

Fonte: Adaptado de LANÇAS et al., 2009.

Após a etapa de ionização, os íons formados são direcionados para o analisador de massas, responsáveis por separá-los de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . 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), sendo que a escolha do mais apropriado irá depender da necessidade

em que se enquadra a análise, visando faixa de massas desejada e resolução (LANÇAS, 2009).

O analisador de massas do tipo *ion trap* é amplamente utilizado em sistemas de CL-EM, nele os íons são aprisionados (“trapped”) por um tempo ao redor de 1 milissegundo, posteriormente é feita uma varredura para obter-se o espectro de massas. Apresenta um custo relativamente baixo, quando comparado ao analisador do tipo quadrupolo. Apresenta boa resolução e alta sensibilidade, sendo eficaz por não apresentar limite superior de massa efetiva (LANÇAS, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O projeto teve como objetivo o mapeamento do perfil químico dos extratos obtidos de polpa e cascas dos frutos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (Myrtaceae), visando a identificação de metabólitos secundários, bem como a avaliação de suas atividades antioxidante e antiglicante.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos extratos de polpa e cascas da espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, utilizando acetato de etila e metanol como solvente extratores;
- Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-UV/DAD);
- Fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM) por CLAE-UV/DAD, em escala preparativa;
- Avaliação das atividades antioxidante e antiglicante, dos extratos e frações de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*;
- Análise da fração FR4 do extrato metanol da cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM);
- Identificação das substâncias presentes na fração FR4 do extrato PC_CM de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* por CL-EM/EM.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados no processo de extração de polpas e cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* foram acetato de etila e metanol grau PA, enquanto que o solvente utilizado nas análises por HPLC foi acetonitrila (ACN), grau HPLC da marca J. T. Baker[®]. O solvente etanol, grau HPLC da marca Sigma-Aldrich[®] foi utilizado nos ensaios biológicos. Os reagentes utilizados para os ensaios de antiglicação, metilglioxal (MGO, 40% em H₂O), aminoguanidina (AG, 97%) e albumina (BSA, 98%). Para os ensaios antioxidantes foram utilizados os reagentes ABTS (98%), persulfato de potássio (99%), quercetina (95%), sal trissódico do ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trissulfônico, AAPH (97%), ácido gálico (97,5%), sal trissódico do ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trissulfônico. Os reagentes para ambos os testes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, Missouri, USA).

3.2 Equipamentos utilizados

- Balança analítica Mettler Toledo[®], modelo AG204 (máx. 210 g);
- Rotaevaporador R-144, Büchi[®];
- Espectrofotômetro de Microplacas: Synergy 2 Multi-mode – BioTek[®]
- Banho de ultrassom: Elmasonic[®], modelo s 60H;
- Cromatógrafo líquido Prominence: Sistema LC Shimadzu[®] equipado com bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20AHT e módulo de comunicação CBM-20^A, presente no Instituto de Química da Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP), em Araraquara;
- Espectrômetro de Massas Amazon SL Bruker[®] com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e analisador *ionTrap* acoplado a um cromatógrafo líquido Sistema LC Shimadzu[®] equipado com bomba LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20AHT e módulo de comunicação CBM-20A, presente no Instituto de Química da UNESP, em Araraquara;

3.3 Material Vegetal

Os frutos maduros da espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum* foram coletados no Recanto Flora Londrina Viveiro Florestal, na cidade de Londrina, norte do Paraná, Brasil, em janeiro de 2018. Após a coleta, os frutos foram separados em cascas e polpas, onde a polpa foi 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 brutos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*

As polpas e cascas (3,0 g de cada) de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* foram submetidas à extração por maceração (60,0 mL, 30 min, 3 vezes), utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo estes, respectivamente, acetato de etila e metanol, conforme a Figura 8. Os extratos foram secos sob pressão reduzida à uma temperatura de 40°C, totalizando quatro extratos ao final, dois de cascas (PC_CA e PC_CM) e dois extratos de polpas (PC_PA e PC_PM).

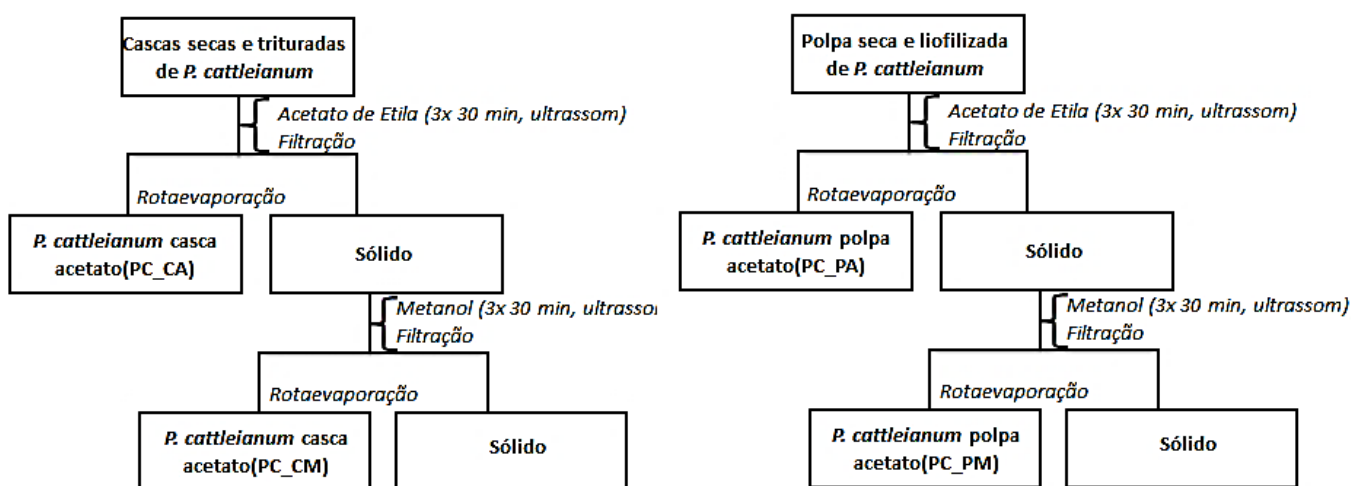


Figura 8. Fluxograma ilustrativo dos processos de extração de polpas e cascas da espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Análise dos extratos brutos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-UV/DAD)

Os quatro extratos obtidos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* foram solubilizados em água e acetonitrila, H₂O:ACN (50:50 v/v) e filtrados em filtro de 0,22 µm, membrana de polipropileno, para a injeção no CLAE-UV/DAD. As análises cromatográficas foram realizadas a fim de se obter os perfis cromatográficos dos quatro extratos brutos das cascas e polpas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* para posterior identificação dos compostos bioativos. O sistema de solventes utilizado foi H₂O (A) e ACN (B), ambos com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e vazão de 1,0 mL min⁻¹. A coluna utilizada foi C₁₈-Luna (250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), da marca Phenomenex[®], Inc (Torrance, CA, EUA). Todos os cromatogramas foram registrados, e a corrida foi monitorada nos comprimentos entre 200-400 nm.

Inicialmente, para uma avaliação inicial do perfil cromatográfico dos extratos de polpas e cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, foi empregado um gradiente exploratório (de 5 a 100 % B em 40 minutos), chamado de método A, nas condições descritas pela Tabela 1. Em seguida, de modo a otimizar a separação dos picos observados, foram empregados os métodos B e C também mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos utilizados na otimização das condições cromatográficas dos extratos de polpas e cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* [Fase Móvel: ACN:H₂O (0,1% de ácido fórmico); coluna Phenomenex[®] C₁₈-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura ambiente; volume de injeção de 20 µL de solução de 10 mg mL⁻¹).

Método	Identificação	Gradiente
A	Gradiente Exploratório	<ul style="list-style-type: none"> • 5-100% ACN em 40 min. • 5% ACN em 5 min. • 5-55% ACN em 40 min.
B	5-55-70% B em 40 min	<ul style="list-style-type: none"> • 55-70% ACN em 1 min. • 80-100% ACN em 5 min. • 100% ACN por 10 min.
C	5-45% B em 40 min	<ul style="list-style-type: none"> • 5-45% ACN em 40 min. • 45-100% ACN em 5 min. • 100% ACN por 10 min.

3.6 Ensaios biológicos *in vitro* realizados com os extratos brutos e frações de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*

Para os dois ensaios antioxidantes, sequestro do radical ABTS^{•+} e redução de radicais peroxila, pesaram-se 4 mg dos quatro extratos obtidos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* e as respectivas frações de PC_CM que posteriormente foram solubilizados em 1 mL de EtOH. A partir dessa solução estoque (4 mg mL⁻¹) foram preparadas soluções de concentrações de 4, 10, 20, 40, 70 e 100 µg mL⁻¹. Para o ensaio da atividade de inibição da glicação pesou-se 1,0 mg dos quatro extratos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* e frações de PC_CM e foram solubilizados em 1 mL de H₂O:DMSO (50:50 v/v).

3.6.1 Ensaio da capacidade de redução do cátion radical ABTS^{•+}

O ensaio é baseado no método descrito por Pellegrini et al. (1999) com algumas modificações. Esse teste consiste na captura do cátion radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e é monitorado por espectrofotômetro em 755 nm devido à coloração esverdeada que a solução do ABTS^{•+} apresenta. O radical ABTS^{•+} foi obtido pela reação de 1 mL de solução ABTS^{•+} a 10 mmol L⁻¹ com 430 µL de persulfato de amônio a 8,17 mmol L⁻¹. A

mistura foi agitada e mantida no escuro à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Essa solução foi diluída 60 vezes em água para a realização do ensaio. Os ensaios foram conduzidos com a adição de 215 µL da solução de ABTS^{•+} e 35 µL das soluções de amostras preparadas nas placas de 96 poços. Esse protocolo foi realizado em triplicata para cada uma das amostras. O branco consistiu de 35 µL de etanol e 215 µL da solução de ABTS^{•+}. A quercetina foi utilizada como controle positivo (padrão), nas concentrações de 0,4, 4 e 10 µg mL⁻¹. A mistura foi incubada por 30 min no escuro e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro (PELLEGRINI et al., 1999).

A capacidade sequestradora de radicais foi calculada conforme a Equação 2.

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} \text{ seq.} = \left(\frac{\text{Absorbância controle} - \text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância controle}} \right) \times 100 \quad (2)$$

A concentração efetiva média (EC₅₀) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais ABTS^{•+}, foi calculada através do gráfico % ABTS^{•+} sequestrado *versus* concentração da amostra.

3.6.2 Ensaio da capacidade de redução dos radicais peroxila

O ensaio de avaliação da capacidade antioxidante de redução do radical peroxila (ROO[•]) utiliza a piranina (sal trissódico do ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trissulfônico) como sonda fluorescente quando esta é submetida à oxidação por radicais peroxilados originados por AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis 2-metilpropionamida), agente oxidante. O AAPH se decompõe em 37 °C, gerando assim, um radical alquil, que na presença de oxigênio é convertido ao radical peroxil ROO[•] (XIMENES et al., 2010).

O ensaio foi adaptado de Nazaré e colaboradores (2014). A solução de piranina e a solução de AAPH, nas concentrações de 10 µmol L⁻¹ e 40 µmol L⁻¹, respectivamente, foram preparadas em tampão PBS (PBS, 40 mmol L⁻¹). No ensaio utilizaram-se dois brancos como controle, o controle 1 (com AAPH) composto de etanol (12,5 µL), piranina (75 µL) e AAPH (62,5 µL), e o controle 2 (sem AAPH), contendo PBS (37,5 µL), etanol (37,5 µL) e piranina (75 µL). O experimento seguiu-se pela adição de 12,5 µL das amostras em etanol, 75 µL de

piranina e 62,5 µL de AAPH. A fluorescência da piranina foi medida em um espectrofotômetro de microplacas a 485 nm (λ_{exc}) e 528 nm (λ_{em}) a 37 ° C durante 90 min. O ácido gálico foi usado como controle positivo por meio da construção de uma curva analítica nas concentrações 2, 5, 7, 10 15, 20 e 40 µmol L⁻¹. (NAZARÉ et al., 2014).

O resultado da porcentagem de radicais peroxila reduzidos foi obtido pela Equação 3: (arrumar essa equação)

$$\% \text{ ROO} \bullet = \left(\frac{\text{Fluorescência da amostra} - \text{Fluorescência controle 2}}{\text{Fluorescência controle 1} - \text{Fluorescência controle 2}} \right) \times 10 \quad (3)$$

3.6.3 Ensaios da atividade de inibição da glicação

A metodologia do ensaio antiglicante foi definida de acordo com Fraige e colaboradores (2018) e Lunceford e Gugliucci (2005), com algumas modificações. O teste se baseia na capacidade de inibição que uma amostra possui na reação de glicação da proteína albumina (BSA) com o 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⁻¹. 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 (150 ppm) e 2,3 µL do reagente metilglioxal (MGO, 5 mmol L⁻¹), 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⁻¹, 1500 µL) e MGO (onde AG foi utilizada como inibidor da glicação) e um controle negativo contendo tampão, BSA e MGO, com ausência do inibidor AG. 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 mL desejados. A solução resultante foi incubada a 37 °C durante três dias e 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 AGEs totais.

A porcentagem de inibição da glicação foi calculada por meio da Equação 4, onde FL_{CN} e FL_{bCN} são as intensidades de fluorescência do controles negativos e seu branco e FL_S e FL_{bS} são as intensidades de fluorescência do extrato e seu branco, respectivamente.

$$\% \text{Inibição formação de AGEs} = \frac{(FL_{CN} - FL_{bCN}) - (FL_S - FL_{bS})}{(FL_{CN} - FL_{bCN})} \times 100 \quad (4)$$

3.7 Fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* por CL-UV/DAD em escala preparativa

O extrato PC_CM de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* foi solubilizado em H₂O:ACN (50:50 v/v) e filtrados em filtro de 0,22 µm para fracionamento por CL-UV/DAD em escala preparativa. Para essa análise foi utilizada uma coluna preparativa Luna Phenomenex C₁₈ (100 Å) (150 x 21,20 mm, d.i. 5 µm). Foram feitas 10 injeções de 500 µL de uma solução de concentração 10 mg mL⁻¹, totalizando 100,0 mg de extrato injetados. A corrida foi realizada em modo gradiente 5-55% B em 35 minutos, utilizando como fases móveis H₂O (A) e ACN (B) e vazão de 10,0 mL min⁻¹, conforme o método B apresentado na Tabela 1, na seção 3.5. Os comprimentos de onda utilizados para o monitoramento foram de 280 nm e foram coletadas cinco frações, descritas na Tabela 2, onde a fração FR4 foi posteriormente analisada por CL-EM/EM e ensaios biológicos.

Tabela 2. Frações obtidas do extrato PC_CM por CL-UV/DAD em escala preparativa e os respectivos tempos em que foram monitoradas.

Código	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5
Tempo (min)	0-13	13-15	15-24	24-35	35-45

3.8 Elucidação dos constituintes químicos da Fração 4 (FR4) e extrato bruto PC_CM por CL-EM/EM

A fração (FR4) obtida a partir do fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM) foi analisada por CL-EM/EM utilizando-se um cromatógrafo líquido (Shimadzu®) acoplado a um espectrômetro de massas (Amazon SL Bruker®) do tipo *ion-trap*, equipado com

fonte de ionização do tipo eletro-spray (ESI). Os extratos foram preparados pesando-se 1 mg das amostras que foram posteriormente diluídas em 1 mL de H₂O:ACN (50:50 v/v). O método empregado na análise foi o método B, descrito na Tabela 1, seção 3.5. As análises foram realizadas em modo positivo e negativo com fragmentação até MS³, faixa de íons detectada de 50-1200, e energia de ionização de 50 V. O software Bruker Compass DataAnalysis 4.3[®] foi utilizado para a análise dos dados. A partir dos resultados obtidos foi realizada a comparação com os padrões de fragmentação das substâncias relatadas na literatura, para a identificação de compostos conhecidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos extratos de cascas e polpas da espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*

Para a extração realizada com polpas e cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, ítem 3.4, utilizou-se acetato de etila e metanol, dois solventes de diferentes polaridades. É necessária a otimização do solvente extrator, visto que a característica de cada um influencia diretamente nos compostos a serem extraídos.

A Tabela 3 apresenta os rendimentos e as massas finais obtidas a partir da extração de 3 g de cascas e polpa do fruto.

Tabela 3. Massas obtidas dos extratos preparados de *P. cattleianum* e seus respectivos rendimentos.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
PC_CA	46,6	1,55
PC_CM	268,8	8,96
PC_PA	204,0	6,79
PC_PM	1031,8	34,34

*PC = *P. cattleianum*; C = cascas; P = polpa; A = acetato de etila; M = metanol

As extrações com o solvente metanol apresentaram rendimentos maiores para polpa e cascas, quando comparadas às extrações utilizando o solvente acetato de etila. O maior rendimento obtido para o extrato metanol pode ser explicado pela maior polaridade deste solvente ($\epsilon_r = 33$) em relação ao solvente acetato de etila ($\epsilon_r = 6,02$), no qual o solvente metanol pode ter extraído compostos mais polares, como os açúcares, aumentando assim, a massa e rendimento finais.

4.2 Análise cromatográfica dos extratos da cascas e polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* por CLAE-UV/DAD

Através de CLAE-UV/DAD foi possível verificar o perfil químico dos extratos das cascas e polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, com os solventes extratores acetato de etila e metanol, e analisar qual seria o melhor solvente

extrator. Para tal, foi levado em consideração a resolução, intensidade e quantidade de picos, além de uma separação eficiente.

Os perfis cromatográficos dos extratos das cascas e polpas do fruto foram obtidos monitorando-se os comprimentos de onda numa faixa de 200-400 nm, sendo que o mais adequado para a análise dos extratos das cascas e polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* foram os comprimentos de onda de 280 nm para as cascas e 254 nm para a polpa, respectivamente, pois foi possível observar uma melhor resolução e quantidade de picos.

Assim, inicialmente empregou-se o método A, gradiente exploratório, descrito na Tabela 1, item 3.5. Os cromatogramas obtidos para os extratos das cascas de *P. cattleianum*, solvente metanol (PC_CM) e solvente acetato de etila (PC_CA), estão representados pela Figura 9, respectivamente.

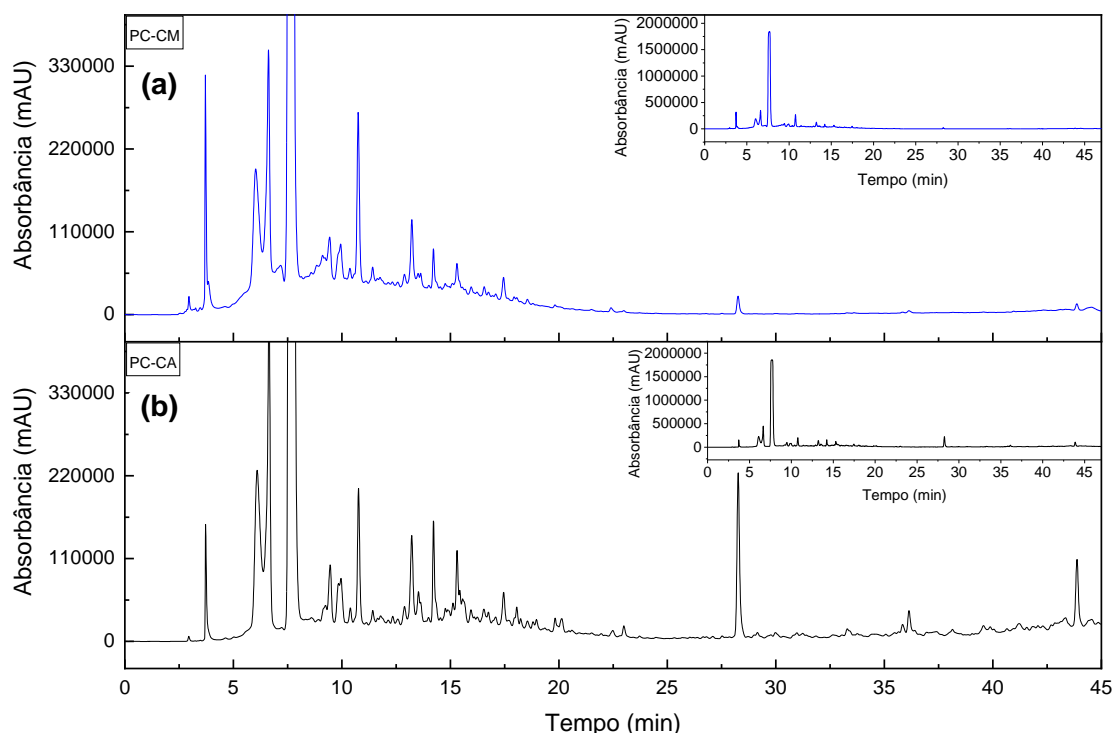


Figura 9. Perfis cromatográficos em gradiente exploratório (CLAE-UV/DAD) dos extratos (a) PC_CM e (b) PC_CA das cascas de *P. cattleianum* [Coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); eluição modo gradiente 5-100 %B em 40 minutos (Método A), ACN:H₂O (+0,1% ácido fórmico), λ=280 nm, volume de injeção: 20 µL].

Para ambos os extratos das cascas de *P. cattleianum*, a análise dos cromatogramas apresentou um pico majoritário intenso em aproximadamente sete minutos, região com substâncias mais polares que apresentaram tempos

menores de retenção. Com a ampliação dos cromatogramas é possível observar a presença de outros picos de menores intensidades.

Nota-se na Figura 9a (PC_CM), uma elevação na linha de base, sendo possível a presença de taninos (BRILLOUET et al., 2013).

Pela Figura 9b, é possível observar que o cromatograma do extrato PC_CA apresentou alguns picos mais intensos quando em comparação com o cromatograma do extrato PC_CM, Figura 9a. Porém, nota-se uma grande similaridade entre os dois perfis cromatográficos para os extratos acetato de etila e metanol da casca de *P. cattleianum*.

Assim, utilizou-se o extrato acetato de etila do fruto de *P. cattleianum*, PC_CA, para otimização do método cromatográfico através da otimização do tempo de análise e do gradiente de eluição, esperando-se obter uma melhor separação dos picos para futura identificação dos metabólitos presentes.

O método cromatográfico B (Tabela 1, item 3.5) foi o resultado da otimização do extrato acetato de etila das cascas de *P. cattleianum*, PC_CA. O método cromatográfico A, com gradiente de eluição exploratório manteve-se linear com a proporção de acetonitrila por unidade de tempo de 2,37% (%B), enquanto o método cromatográfico B iniciou-se no modo de eluição isocrático e manteve-se por cinco minutos. Posteriormente, aumentou-se a porcentagem de B linearmente (1,25% B por minuto). Assim, com a diminuição da força do eluente, sendo modificada a porcentagem de aumento de proporção de acetonitrila por unidade de tempo, obteve-se uma melhor resolução dos picos.

A Figura 10 mostra o cromatograma obtido para o extrato PC_CA após a otimização do método cromatográfico.

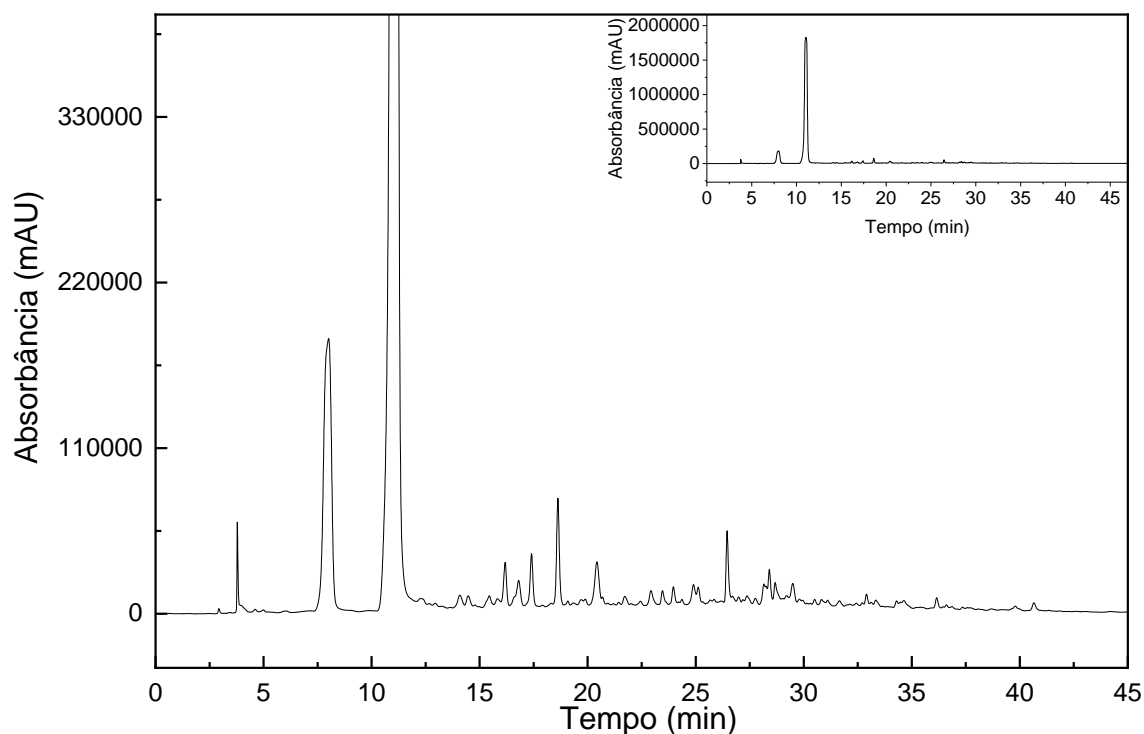


Figura 10. Cromatograma nas condições otimizadas do extrato acetato de etila das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CA) [Coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 μm); eluição modo gradiente 5-55-70 %B em 40 minutos (Método B), ACN:H₂O (+0,1% ácido fórmico), λ = 280 nm, volume de injeção: 20 μL].

Assim, comparando as Figuras 9 e 10, o método cromatográfico B mostrou uma melhor separação e resolução dos picos para os extratos das cascas de *P. cattleianum*.

Nas análises da polpa de *P. cattleianum*, extratos metanol e acetato de etila (PC_PM e PC_PA), também se empregou inicialmente o gradiente exploratório, método A, (Tabela 1, item 3.5). Os cromatogramas obtidos estão representados pela Figura 11.

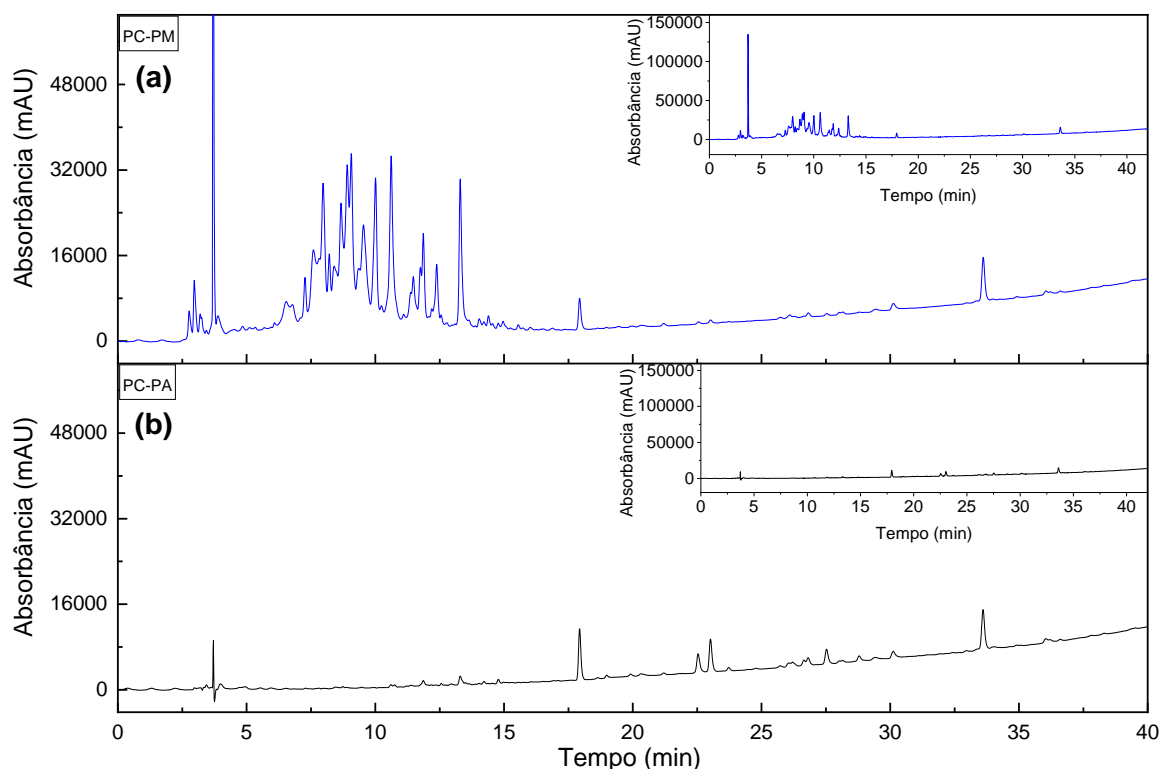


Figura 11. Perfis cromatográficos em gradiente exploratório (CLAE-UV/DAD) dos extratos (a) PC_PM e (b) PC_PA da polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* [Coluna Phenomenex® C18-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); eluição modo gradiente 5-100 %B em 40 minutos (Método A), ACN:H₂O (+0,1% ácido fórmico), λ = 254 nm, volume de injeção: 20 µL].

Ao analisar a Figura 11a, nota-se que o perfil cromatográfico para a polpa de *P. cattleianum*, obtida por extração com o solvente metanol, PC_PM, apresentou uma maior quantidade e picos mais intensos em relação ao solvente acetato de etila, PC_PA, sobretudo na região polar do cromatograma. Dessa forma, a partir do extrato PC_PM foi feita a otimização do método cromatográfico para a polpa do fruto, modificando-se o gradiente de eluição.

Assim, resultou-se no método cromatográfico otimizado C (Tabela 1, item 3.5), no qual se manteve o gradiente de eluição linear com a proporção de acetonitrila por unidade de tempo de 1,00% (%B). Em relação ao método A (gradiente de eluição exploratório - 2,37%B por minuto) diminuiu-se a força do eluente, o que resultou em uma melhor separação dos picos. O cromatograma obtido para o extrato metanol de *P. cattleianum*, PC_PM, nas condições otimizadas está representado pela Figura 12.

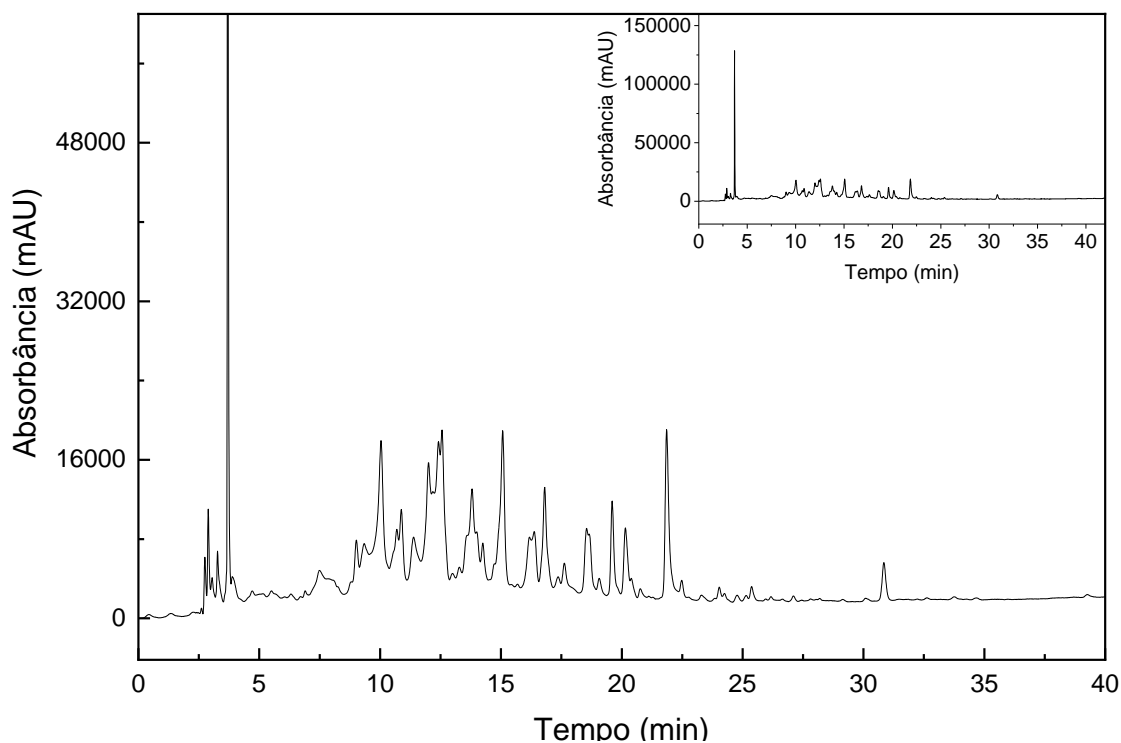


Figura 12. Cromatograma nas condições otimizadas do extrato metanol da polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_PM) [Coluna Phenomenex® C₁₈-Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); eluição modo gradiente 5-45 %B em 40 minutos (Método C), ACN:H₂O (+0,1% ácido fórmico), λ = 254 nm, volume de injeção: 20 µL].

Como os cromatogramas para as cascas do fruto apresentaram maior quantidade de substâncias com grupos cromóforos e melhor resolução, o extrato das cascas foi determinado para fracionamento por CLAE-UV/DAD, em escala preparativa. E, apesar do solvente acetato de etila apresentar uma maior intensidade relativa em alguns picos e ser utilizado durante a otimização do método cromatográfico, o extrato metanol do fruto, PC_CM, foi o mais adequado para a sequência do trabalho, visto que além dos perfis cromatográficos similares, o extrato metanol apresentou um maior rendimento na etapa de extração (8,96%), em comparação ao rendimento do extrato acetato de etila (1,55%), o que justifica a escolha desse extrato para seu fracionamento (item 4.4).

4.3 Ensaios biológicos realizados com os extratos brutos de cascas e polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*

4.3.1 Capacidade antioxidante

Uma substância com propriedade antioxidante, encontrada em plantas, pode apresentar mais de um mecanismo de ação quando em contato com o organismo humano. Assim, como podem existir variados 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., 2014).

Assim, neste trabalho foram escolhidos dois ensaios de avaliação de atividade antioxidante, para se explorar diferentes mecanismos de ação: potencial de redução do cátion radical ABTS^{•+} e redução de radicais peroxila.

O método de redução do cátion radical ABTS^{•+} pode ser utilizado em amostras que contenham compostos lipossolúveis e hidrossolúveis, sendo um radical relativamente estável. Essas vantagens conferem sensibilidade ao teste de avaliação do potencial de redução desse radical (PELLEGRINI, et al., 1999; SUCUPIRA et al., 2014).

O mecanismo de ação do ensaio do cátion radical ABTS^{•+} se baseia na capacidade de estabilização do cátion radical ABTS^{•+}, através da presença de grupos doadores de hidrogênio pertencentes aos antioxidantes. Ao sofrer esta estabilização, o cátion radical ABTS, cuja coloração natural é esverdeada, passa a ser incolor, conforme a reação mostrada na Figura 13 (TESTON; NARDINO; PIVATO, 2011).

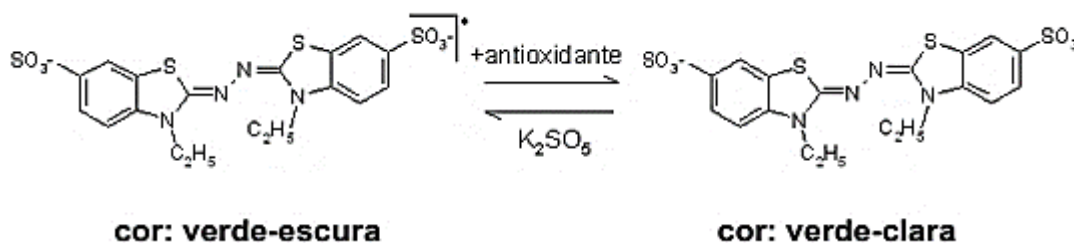


Figura 13. Mecanismo de ação do ensaio do cátion radical ABTS^{•+}.

Fonte: Sucupira et al., 2014.

O protocolo de redução de radicais peroxila utiliza a fluorescência em suas análises. Apresenta uma sensibilidade menor em relação ao teste de avaliação do potencial de redução do radical ABTS^{•+}, porém assemelha-se melhor à ação *in*

vivo, uma vez que durante o ensaio é formado o radical hidroxila, principal radical livre reativo formado no corpo humano (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

O mecanismo de ação envolvendo o ensaio de redução de radicais peroxila se baseia no decréscimo da fluorescência da piranina, sonda fluorescente utilizada no teste, quando esta foi submetida à oxidação por radicais peroxilas, conforme Figura 14.

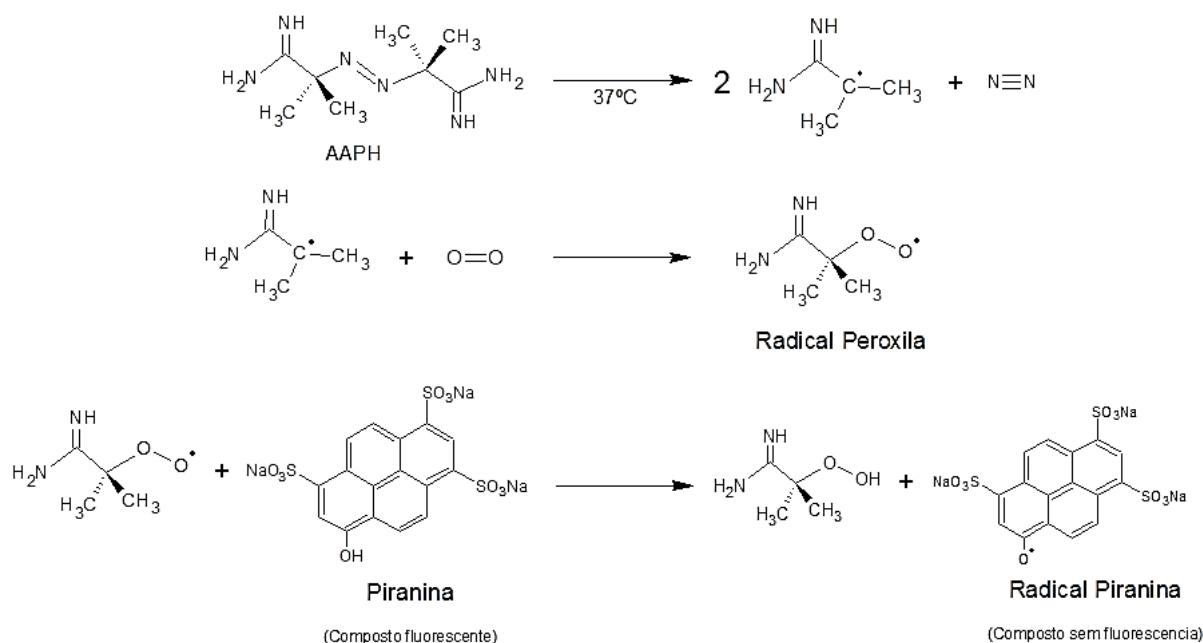


Figura 14. Mecanismo de ação do ensaio de redução de radicais peroxila.

Fonte: Ximenes et al., 2010.

Assim, um agente antioxidante, através da doação de hidrogênio, reage com radicais peroxilas, inibindo o decréscimo da fluorescência (XIMENES et al., 2010).

Para ambos os testes, a capacidade antioxidante foi avaliada por meio de gráficos de porcentagem de radicais sequestrados em função das diferentes concentrações dos extratos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* avaliados. E, através da regressão linear ($y = a + bx$) os valores de EC_{50} (concentração eficiente onde 50% do radical é reduzido pelo extrato) para os dois ensaios antioxidantes foram calculados (Tabela 4).

Tabela 4. Valores obtidos de EC₅₀ para os extratos de *P. cattleianum* nos ensaios de avaliação do potencial de redução do radical ABTS^{•+} e redução de radicais peroxila.

FRUTO	EXTRATO	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
		ABTS ^{•+}	ROO [•]
<i>P. cattleianum</i> (polpa)	PC_PA	>100	>100
	PC_PM	68,40 ± 0,75 ^b	84,8 ± 0,23 ^c
<i>P. cattleianum</i> (casca)	PC_CA	38,49 ± 0,65 ^a	41,51 ± 0,50 ^b
	PC_CM	38,26 ± 2,51 ^{a*}	31,92 ± 0,94 ^a
<i>Quercetina</i> (C ⁺)	Padrão	4,50 ± 0,17	3,01 ± 0,03

*C⁺ = controle positivo (padrão) ** Médias seguidas pelos mesmos números não diferem entre si pelo teste de Tukey, em cada coluna (p>0,05)

Comparando-se os valores de EC₅₀ (Tabela 4) obtidos pelo ensaio de avaliação do potencial de redução do radical ABTS^{•+}, para as cascas de *P. cattleinaum*, não houve diferença significativa (p > 0,05) entre os dois extratos avaliados, acetato de etila e metanol.

Entretanto, para o teste de redução de radicais peroxila, o extrato metanol das cascas do fruto (PC_CM) apresentou um menor valor de EC₅₀. Sendo assim, uma maior redução de radicais peroxila foi observada para o extrato metanol quando comparado ao extrato acetato de etila, pois quanto menor o valor de EC₅₀, maior sua capacidade antioxidante.

Quando se compara a capacidade antioxidante dos extratos das cascas de *P. cattleinaum* com os extratos da polpa (Tabela 4) nota-se que os valores de EC₅₀ para as polpas (PC_PA; PC_PM) foram maiores que os valores encontrados para os extratos das cascas do fruto. Portanto, os extratos das cascas de *P. cattleinaum* apresentaram uma maior capacidade antioxidante em relação aos extratos da polpa do fruto, sobretudo o extrato PC_CM. Este resultado pode ser atribuído aos compostos fenólicos, pois, entre as moléculas típicas de antioxidantes naturais está contida esta classe, devido às suas estruturas químicas que possuem um grupo doador de prótons, como a hidroxila do fenol e estruturas de ressonância que são capazes de estabilizar radicais livres (LOURDES; FILHO, 2006).

4.3.2 Ensaio antiglicação

A reação de glicação, citada no item 1.5, ocorre entre açúcares e proteínas. A glicose é um agente glicante natural sintetizado no organismo humano pelo processo da glicólise, além de ser obtida via alimentação. Porém, em uma reprodução *in vitro* de uma reação de glicação, utilizando a glicose como agente glicante, o tempo das reações em cascata que ocorrem, até atingir o estágio irreversível dos produtos finais de glicação (AGEs) seria demasiado longo. O mecanismo de ação das reações de glicação pela via clássica, no qual utiliza-se a glicose com agente glicante é descrito pela Figura 15.

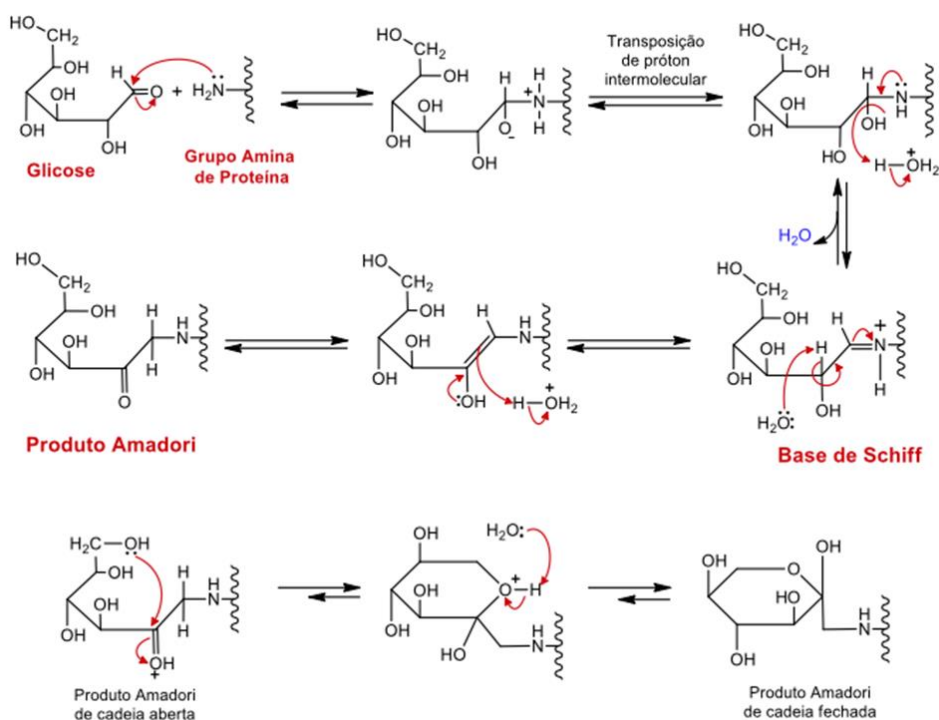


Figura 15. Mecanismo de ação de reações de glicação, pela via clássica, para formação de AGEs.

Fonte: Autora.

Dessa forma, visando um menor tempo de incubação do ensaio antiglicante utilizou-se o metilglioal, um dos produtos intermediários mais reativos da oxidação da glicose, como agente glicante, possibilitando o tempo de incubação de 72 h.

Os resultados do ensaio antiglicante para os extratos das cascas e polpa de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, extraídos com solventes acetato de etila e metanol encontram-se na Figura 16.

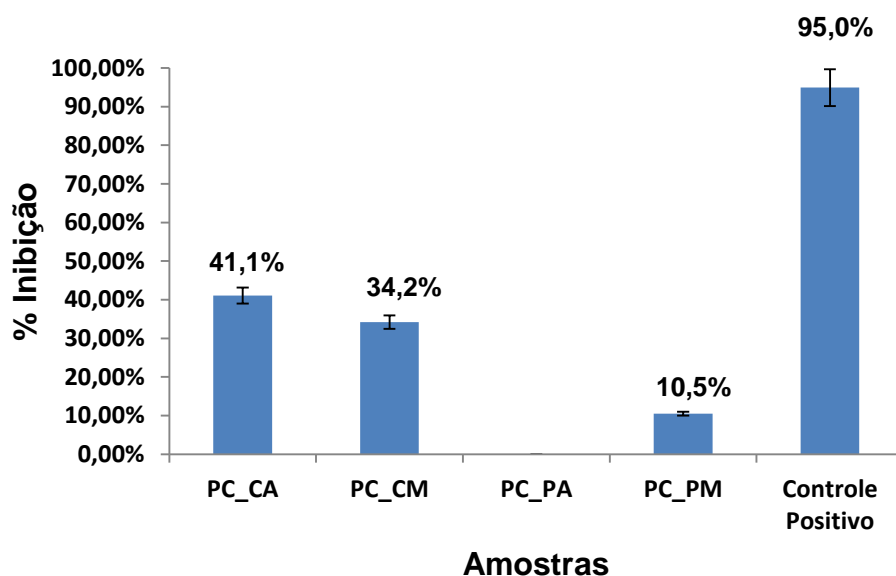


Figura 16. Resultado do ensaio antiglicante para os extratos brutos da polpa e cascas do fruto *P. cattleianum*, solventes acetato de etila e metanol.

Analisando-se a Figura 16, nota-se a diferença entre os extratos das cascas e polpa de *P. cattleianum*, onde para ambos os solventes, os extratos da polpa apresentaram uma menor porcentagem de inibição de reações de glicação em relação aos extratos da casca dos frutos.

Sendo assim, os extratos das cascas do fruto de *P. cattleianum* apresentam o resultado mais promissor entre todos os extratos dos frutos, com maior porcentagem de inibição de reações de glicação, para ambos os solventes extratores utilizados: acetato de etila e metanol.

Sobretudo, o extrato acetato de etila das cascas do fruto *P. cattleianum* (PC_CA), foi o que apresentou uma porcentagem de inibição maior (41,1%) quando comparada à porcentagem do extrato metanol (PC_CM) (34,2%). Os perfis cromatográficos para os extratos das cascas de *P. cattleianum* apresentaram similaridade, conforme descrito no item 4.2.

Por meio das análises de CL-EM/EM (item 4.6) foram identificados flavonoides nos extratos das cascas de *P. cattleianum*. Desta forma, pode ser atribuídos ao resultado antiglicante apresentados à presença dos flavonoides contidos no extrato acetato de etila (PC_CA). Já o solvente metanol, por

apresentar uma polaridade maior que o solvente acetato de etila, consegue extrair maior concentração de compostos mais polares, como os açúcares. Visto isso, a concentração de flavonoides diminui em relação à concentração de açúcares presentes no extrato metanol, o que interfere na diminuição do resultado antiglicante para o extrato PC_CM.

4.4 Fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, (PC-CM), por Cromatografia Líquida acoplada a Detector com Arranjo de Diodos (CL-UV/DAD) em escala preparativa

A partir do fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, PC_CM, por CL-UV/DAD, em escala preparativa foram recolhidas cinco frações no total (Tabela 2, item 3.5.2). O fracionamento se fez aproximadamente a cada 10 minutos, com exceção da fração 2, que apresentava a eluição de uma substância majoritária. Na Figura 17 é mostrado o cromatograma do extrato metanol das cascas de *P. cattleianum* (PC_CM) durante o fracionamento em escala preparativa, onde as linhas pontilhadas indicam as regiões do cromatograma em que foram coletadas as frações. A Figura 18 mostra uma ampliação do cromatograma analítico do extrato PC_CM, no comprimento de onda de 280 nm, onde é possível verificar as áreas em que foi realizado o fracionamento e os respectivos picos presentes em cada um das frações.

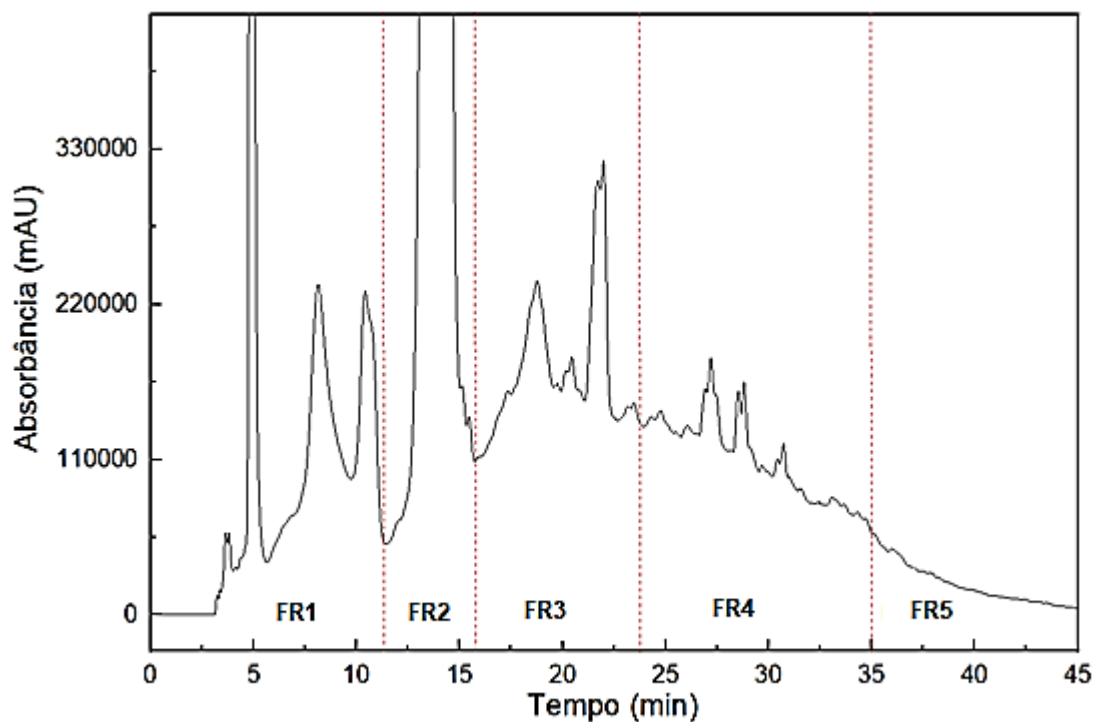


Figura 17. Cromatograma CL-UV/DAD obtido para o extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC-CM) em escala preparativa. As linhas pontilhadas indicam as regiões do cromatograma em que foram coletadas as frações. Cromatograma nas condições otimizadas do extrato metanol da polpa de *P. cattleianum* (PC-PM). [Coluna Phenomenex® C18-Luna (150 mm x 21,20 mm, 5 µm); gradiente 5-55-70 %B em 40 minutos (Método B), ACN:H₂O (+0,1% ácido fórmico), λ = 280 nm].

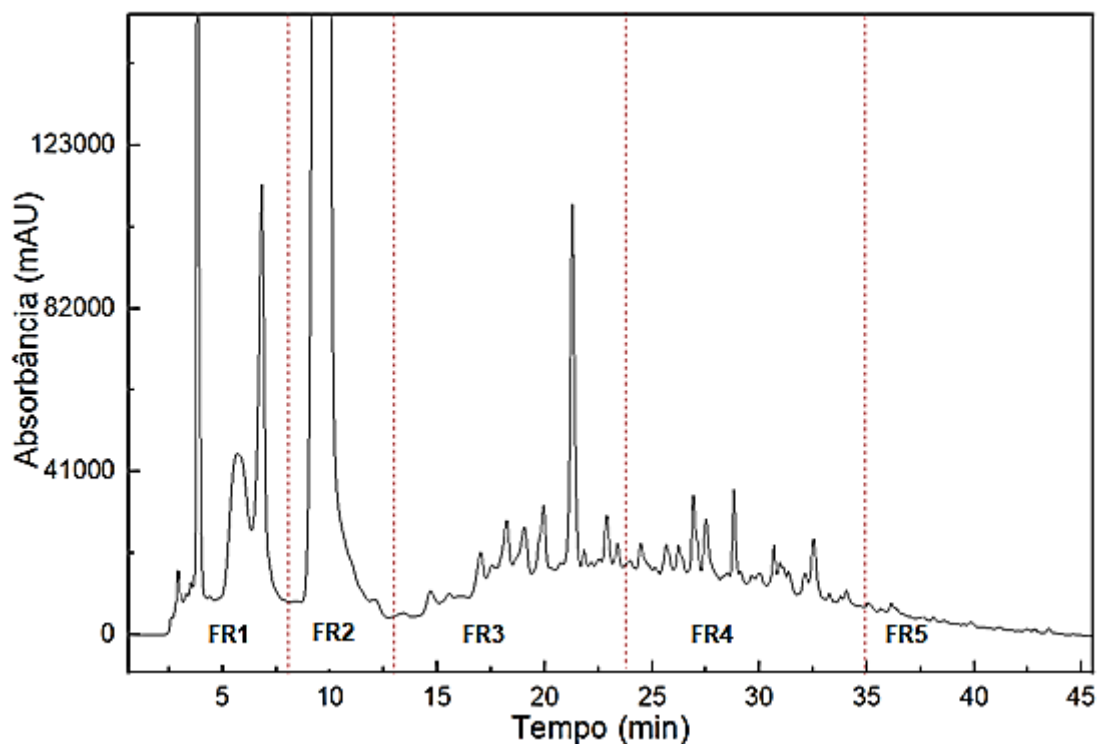


Figura 18. Cromatograma analítico ampliado do extrato (PC-CM) obtido por CLAE-UV/DAD.

Comparando-se o cromatograma em escala preparativa (Figura 14) com o cromatograma em escala analítica (Figura 15) nota-se uma pequena diferença no tempo de retenção de aproximadamente um minuto, entre os dois. A massa de amostra injetada durante a análise por CLAE foi de 10 mg (volume de 20 μ L) e durante a análise por CL em escala preparativa foi de 100 mg (volume de 500 μ L). Essa diferença de 10 vezes a mais de quantidade de massa injetada na análise em escala preparativa fez com que os picos apresentassem deslocamento no tempo de retenção, mas, de modo geral, houve uma boa reprodução cromatográfica quando as duas escalas são comparadas.

Na Tabela 5 são apresentados os valores de massa de cada fração recolhida.

Tabela 5. Massas obtidas do fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, PC_CM.

Frações	FR1	FR2	FR3	FR4	FR5
Massa (mg)	9,8	5,1	8,2	10,2	3,4

Uma observação importante dessa etapa do trabalho foi que a massa total injetada para o fracionamento por CL em escala preparativa foi de 100 mg do extrato metanol de *P. cattleianum*, PC_CM, porém 36,7 mg foram coletados em cinco frações que foram submetidos à novos ensaios biológicos e identificação por CL-EM/EM.

4.5 Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante das frações obtidas do fracionamento do extrato PC-CM de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, por CL-UV/DAD em escala preparativa

As cinco frações recolhidas do fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, PC_CM, foram submetidas aos seguintes ensaios biológicos: avaliação do potencial de redução do radical ABTS^{•+} e ensaio antiglicante.

Os resultados para o ensaio antioxidante é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do ensaio antioxidante, avaliação do potencial de redução do radical ABTS^{•+}, para as frações obtidas do extrato metanol das cascas de *P. cattleianum*.

Código	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ABTS ^{•+}
FR1	>100
FR2	>100
FR3	>100
FR4	57,30 ± 1,22
FR5	>100
Quercetina (C ⁺)	5,81 ± 0,04

*C⁺ = controle positivo

A partir dos resultados da Tabela 6, a fração FR4, dentre as outras, foi a que apresentou maior capacidade antioxidante. Os valores de EC₅₀ para as demais frações ficaram acima de 100, não apresentando atividade. Porém, ao compararmos o valor do EC₅₀ para a fração FR4 (57,30 ± 1,22) com o valor do EC₅₀ para o extrato metanol das cascas do fruto de *P. cattleianum*, PC_CM (38,26 ± 2,51), visto na Tabela 4, Seção 4.3.1, nota-se que houve um aumento do valor do EC₅₀ quando o extrato foi fracionado.

Ao se fracionar um extrato, cada fração apresenta uma porcentagem das substâncias que estão presentes no extrato bruto, podendo cada fração ser mais

concentrada em substâncias com capacidade antioxidante ou não. Assim, um possível resultado para o teste de capacidade antioxidante com as frações do extrato PC_CM, seria que ao menos uma das frações testadas obtivesse uma atividade antioxidante maior que a obtida no extrato bruto. Entretanto, esse resultado não foi observado, e, mesmo apresentando capacidade antioxidante, a fração FR4 apresentou uma menor captura de radicais livres em relação ao extrato PC_CM.

Assim, ao resultado da capacidade antioxidante observado para o extrato metanol das cascas do fruto de *P. cattleianum* (PC_CM) pode ser atribuído um sinergismo entre os constituintes químicos presentes, que ao serem fracionados não apresentaram alta capacidade antioxidante de forma isolada (SIMÕES et al., 2017).

As cinco frações obtidas por CL-UV/DAD em escala preparativa do extrato metanol de *P. cattleianum* (PC_CM) também foram submetidas ao ensaio antiglicante, cujo resultado é mostrado na Figura 19.

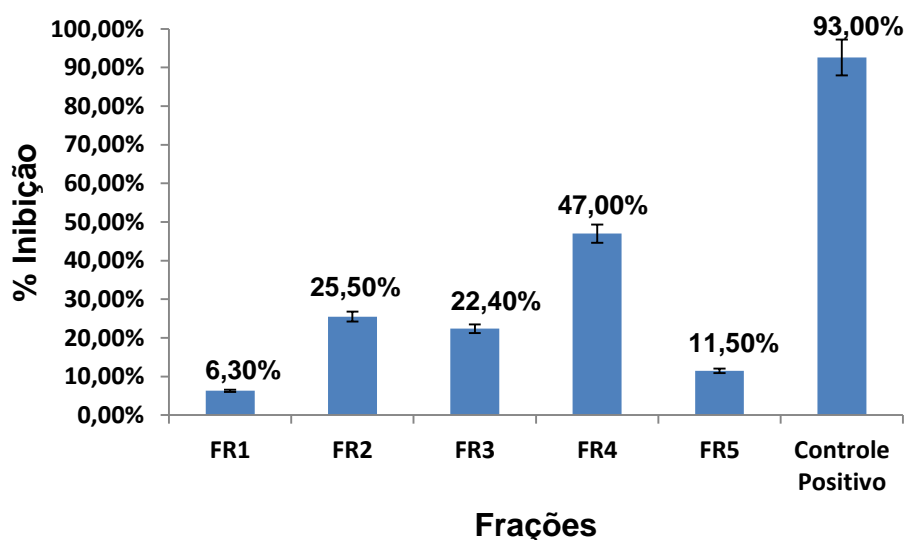


Figura 19. Resultados do ensaio antiglicante para as frações obtidas do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*.

Para o ensaio antiglicante realizado para as frações (Figura 19) pode ser observado que a fração FR4, dentre as outras frações, foi a que apresentou maior porcentagem de inibição de reações de glicação.

Em relação ao resultado antiglicante para o extrato bruto PC_CM (34,2%) houve um aumento de cerca de 13% de porcentagem de inibição de reações de

glicação para a fração. Dessa forma, uma possível explicação para este resultado seja que os flavonoides presentes na fração FR4 sejam os responsáveis pela potencial atividade antiglicante vista para o extrato PC_CM.

4.6 Proposta de identificação das substâncias presentes no extrato metanol das cascas do fruto de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM) e da fração FR4 por CL-EM/EM

A desreplicação dos cromatogramas obtidos por CL-EM/EM é uma etapa importante em trabalhos, onde com auxílio de banco de dados pode ser feita uma triagem em extratos vegetais ou frações complexas a fim de realizar a identificação de substâncias conhecidas (DA SILVA et al., 2012; FUNARI et al., 2013).

A fração FR4, obtida a partir do fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, dentre as outras frações, foi a que apresentou promissores resultados de porcentagem de inibição da reação de glicação (47%) e capacidade antioxidante ($EC_{50} = 57,30 \pm 1,22 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparado à porcentagem de inibição para o extrato bruto de PC_CM (34%). Assim, tendo em vista esse resultado, a fração FR4, foi analisada por CL-EM/EM, juntamente com o extrato bruto da casca do fruto, visando elucidar os compostos presentes nessa fração e relacionar sua possível estrutura ao resultado do ensaio biológico.

A Figura 20 apresenta os cromatogramas dos íons totais (TIC) extraídos nos modos positivo **(A)** e negativo **(B)**, respectivamente, presentes na fração FR4. Já a Figura 21 apresenta o TIC no modo negativo do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*.

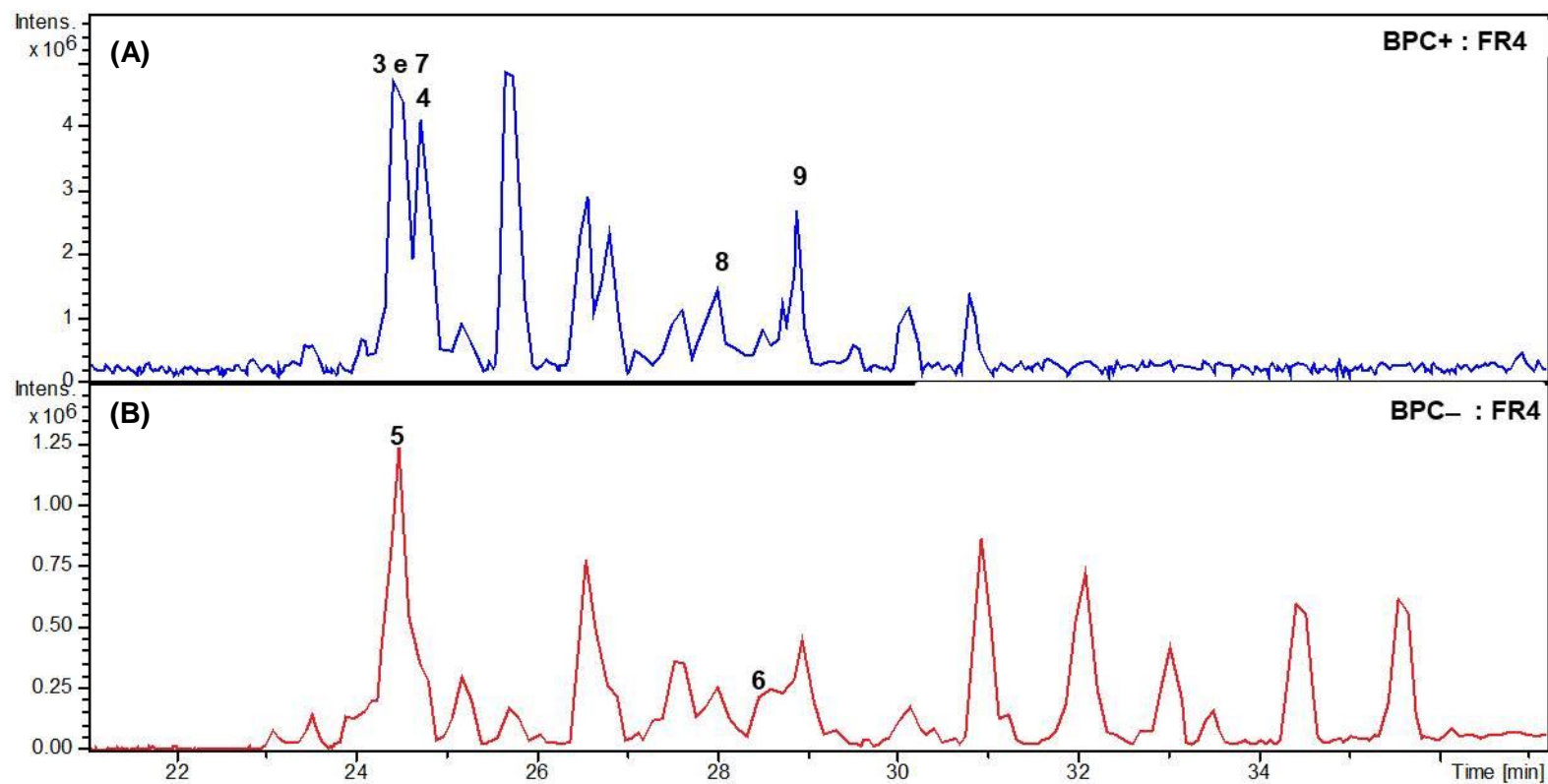


Figura 20. Cromatogramas dos íons totais extraídos nos modos positivo (A) e negativo (B), respectivamente, presentes na fração FR4 obtida a partir do fracionamento do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM) obtidos por CL-EM/EM.

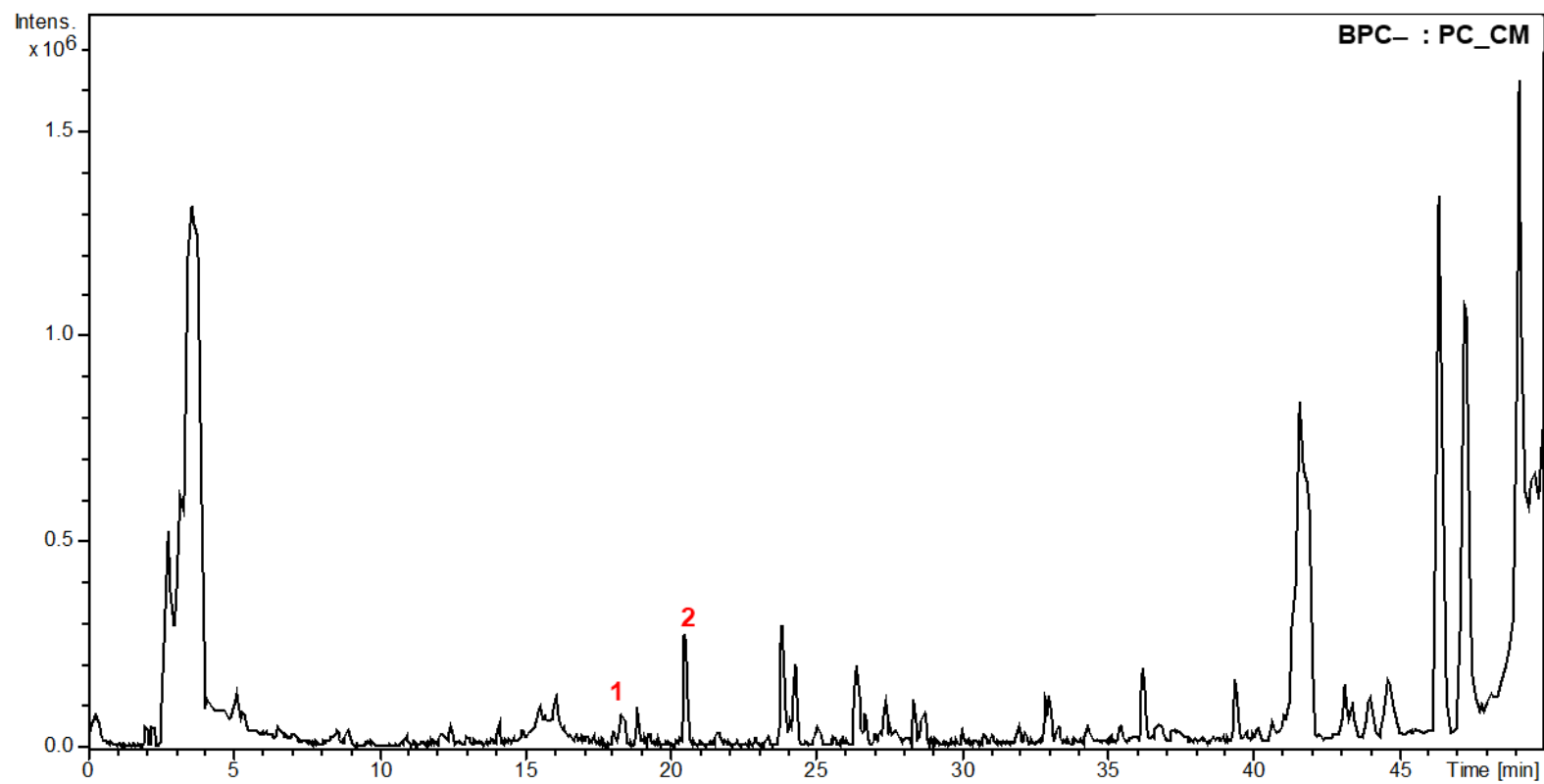


Figura 21. Cromatograma dos íons totais, no modo negativo do extrato bruto PC_CM, obtidos por CL-EM/EM.

Na Tabela 7 estão apresentadas as massas dos íons moleculares das sete substâncias propostas presentes na fração FR4 e no extrato PC_CM, enquanto que suas estruturas estão mostradas na Figura 22.

Tabela 7. Proposta de identificação das substâncias presentes na fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM) por CL-EM/EM, identificação em modo negativo e modo positivo.

Pico	Amostra	t _R (min)	Íon Molecular	MS/MS	Substância	Referência
1	PC_CM (-)	18,9	481	MS² (481): 319, 301, 273, 257 MS³ (481→319): 301, 275, 291	Dihidromiricetina hexosídeo	(DONG; HE; LIU, 2007)
2	PC_CM (-)	20,5	465	MS² (465): 447, 437, 303, 285, 275 MS³ (465→437): 275	Taxifolina hexosídeo	(KANG et al., 2016)
3	FR4 (-)	24,1	463	MS² (463): 301 MS³ (463→301): 179, 151	Quercetina hexosídeo	(AZEVEDO et al., 2014; CHANG et al., 2013; SABER et al., 2018)
4	FR4 (-)	24,8	477	MS² (477): 301 MS³ (477→301): 179, 151	Quercetina glucuronídeo	(AZEVEDO et al., 2014; CHANG et al., 2013; RODR; VINHOLES; FREITAS, 2018; SABER et al., 2018)
5	FR4 (+)	24,4	479	MS² (479): 303 MS³ (479→303)	Delfinidina glucuronídeo	(KALT et al., 2014)
6	FR4 (+)	28,7	449	MS² (449): 287 MS³ (449→287)	Cianidina hexosídeo	(AZEVEDO et al., 2014; CHAVES et al., 2018)
7	FR4 (+)	24,2	465	MS² (465): 303 MS³ (465→303)	Delfinidina hexosídeo	(CHAVES et al., 2018)
8		27,9				
9		28,9				

* t_R = tempo de retenção

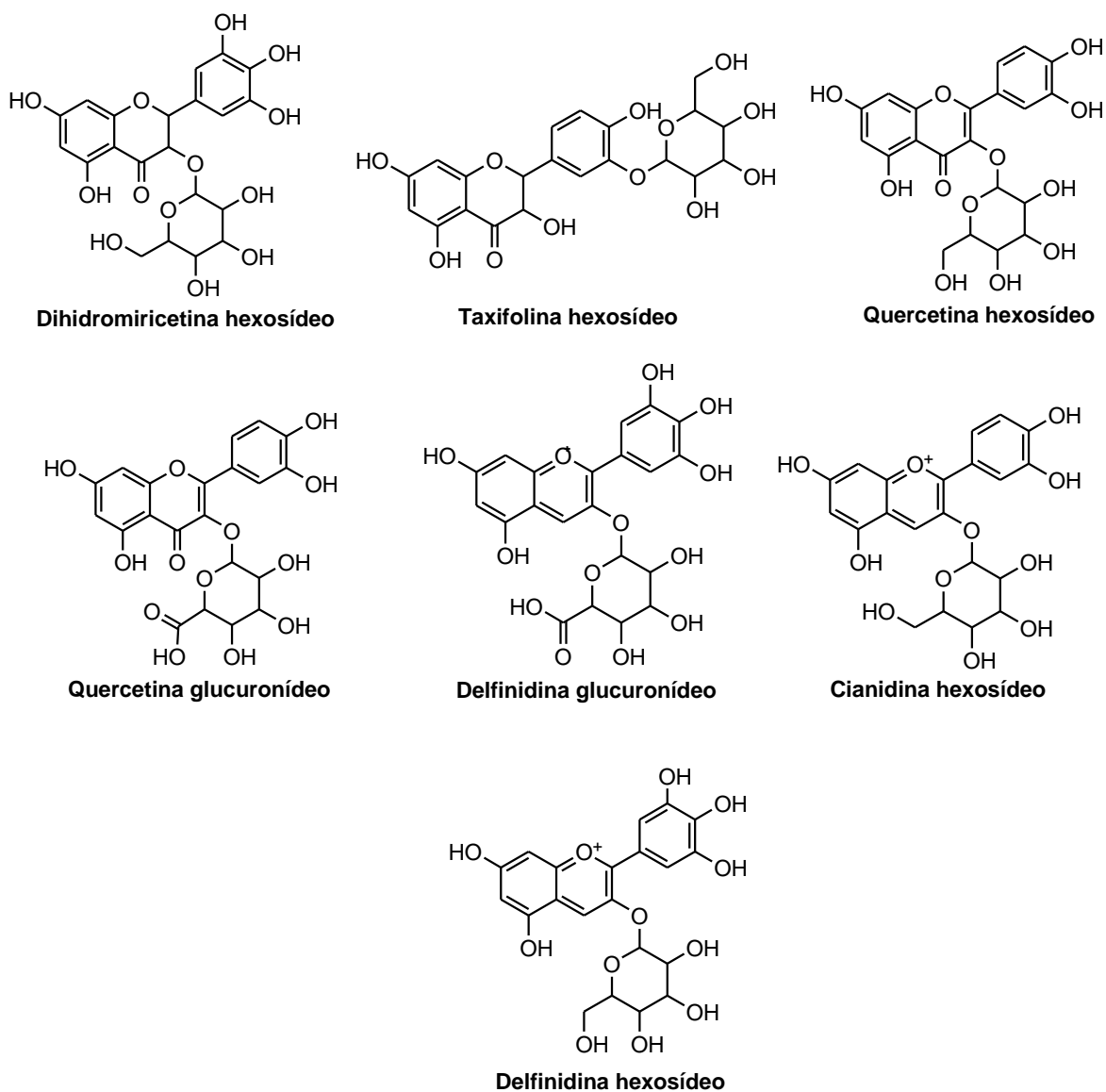


Figura 22. Propostas de identificação de substâncias presentes na fração FR4 e no extrato bruto com solvente metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), obtidas pela análise por CL-EM/EM.

Assim, as sete substâncias propostas foram identificadas como flavonoides heterosídeos. Dessa forma, as Figuras 23 a 27 mostram algumas propostas gerais de fragmentação comuns para estes compostos.

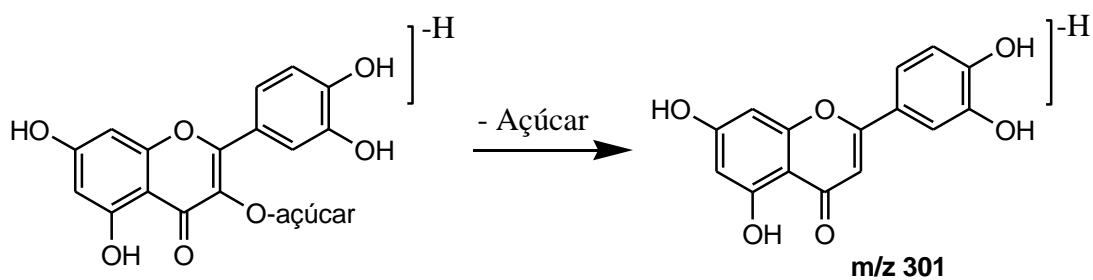


Figura 23. Proposta de fragmentação por clivagem heterolítica.
Fonte: Autora

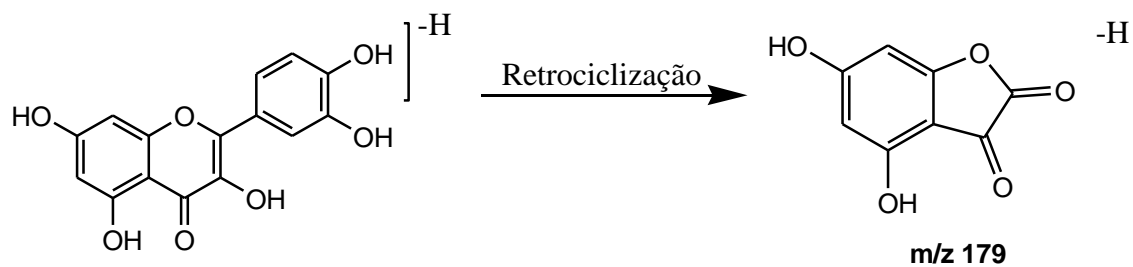


Figura 24. Proposta e fragmentação por retrociclização.
Fonte: Frabe et al. (2001)

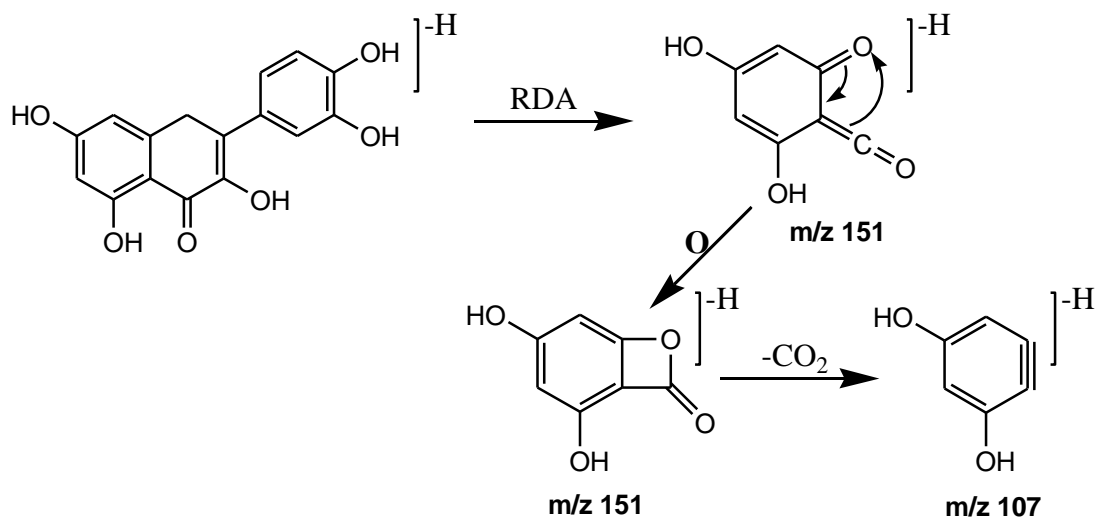


Figura 25. Proposta de fragmentação do anel pirânico e formação do íon *m/z* 107 (C).
Fonte: Autora

*RDA: Retro Diels- Alder

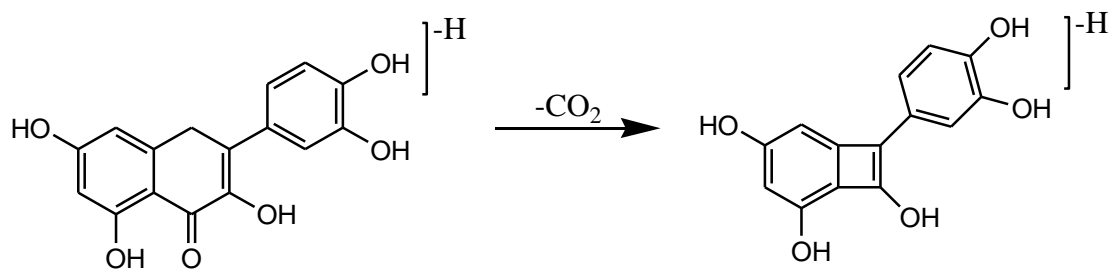


Figura 26. Proposta de fragmentação de perda de CO_2 .

Fonte: Fabre et al.(2001)

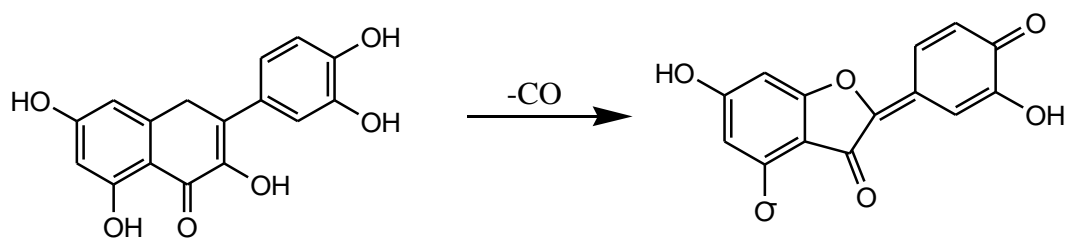


Figura 27. Proposta de fragmentação do anel pirânico (C) com liberação de CO para clivagem heterolítica.

Os espectros das sete substâncias propostas são apresentados nas Figuras de 28 a 34.

A Figura 28 representa o espectro de massas da substância 1, proposta como dihidromiricetina hexosídeo.

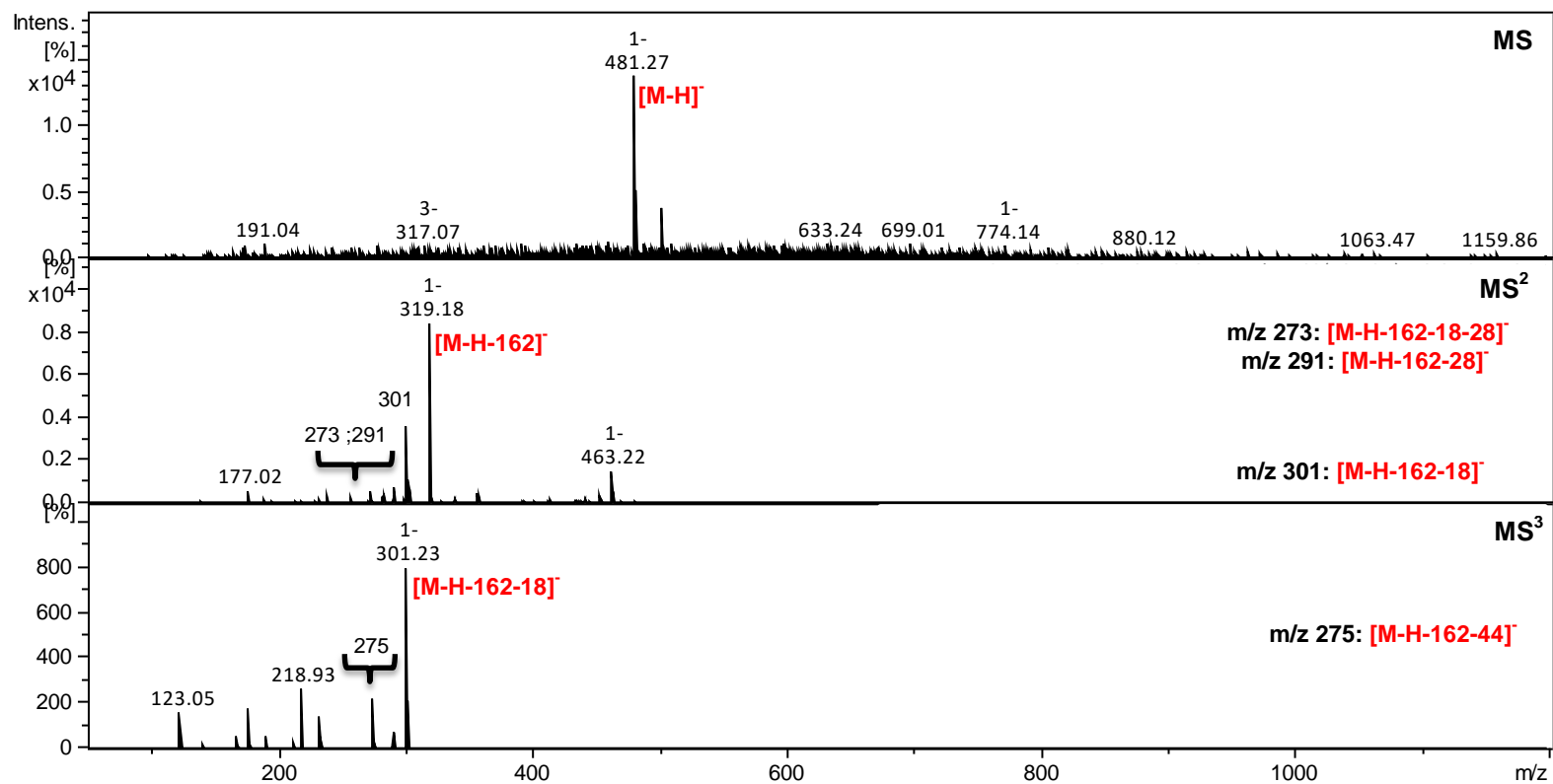


Figura 28. Espectro de massas da substância 1, dihidromiricetina hexosídeo, presente no extrato bruto das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, extraído com solvente metanol (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

Analisando o espectro de massas (Figura 28) da substância 1 proposta, dihidromiricetina hexosídeo, observa-se em MS¹ o pico mais intenso de m/z 481, correspondendo ao pico do íon molecular.

Em MS² o fragmento de m/z 319, [M-H-162]⁻, indica a perda de uma hexose e formação do núcleo aglicona da dihidromiricetina. O íon de m/z 319 foi fragmentado novamente e da perda de uma molécula de CO, [M-H-162-28]⁻, gerou-se o fragmento de m/z 291. Também se observou para o íon de m/z 319 à perda de uma molécula de água, [M-H-162-18]⁻, gerando-se o íon de m/z 301. O íon de m/z 301 fragmentou-se perdendo uma molécula de CO, [M-H-162-18-28]⁻, o que gerou o íon de m/z 273.

Além disso, em MS³ também pode ser observado o íon de m/z 301, [M-H-162-18]⁻, referente à perda da molécula de hexose e de uma molécula de água. E, foi observado o íon de m/z 275, [M-H-162-44]⁻, referente à perda de uma molécula de CO₂ a partir do íon de m/z 319. Ambos os íons de m/z 291 e m/z 275 observados apresentaram menores intensidades.

Ainda em MS² podem ser observados outros fragmentos. O fragmento m/z 301, igualmente observado em MS³, é referente à perda de uma molécula de água do íon de m/z 319, [M-H-162-18]⁻. A partir do fragmento de m/z 301 podem ser observadas duas outras fragmentações, em que os íons referentes são de menores intensidades.

Assim, à perda de uma molécula de CO, dá origem ao fragmento de m/z 273 ([M-H-162-18-28]⁻), e à perda de uma molécula de CO₂, dá origem ao fragmento de m/z 257 ([M-H-162-18-44]⁻).

Dong e colaboradores (2007) identificaram a substância 1, dihidromiricetina hexosídeo, na espécie *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae), popularmente conhecida como feijão (DONG; HE; LIU, 2007). Entretanto, para a espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, esta molécula está sendo relatada pela primeira vez.

A Figura 29 representa o espectro de massas da substância 2, proposta como taxifolina hexosídeo.

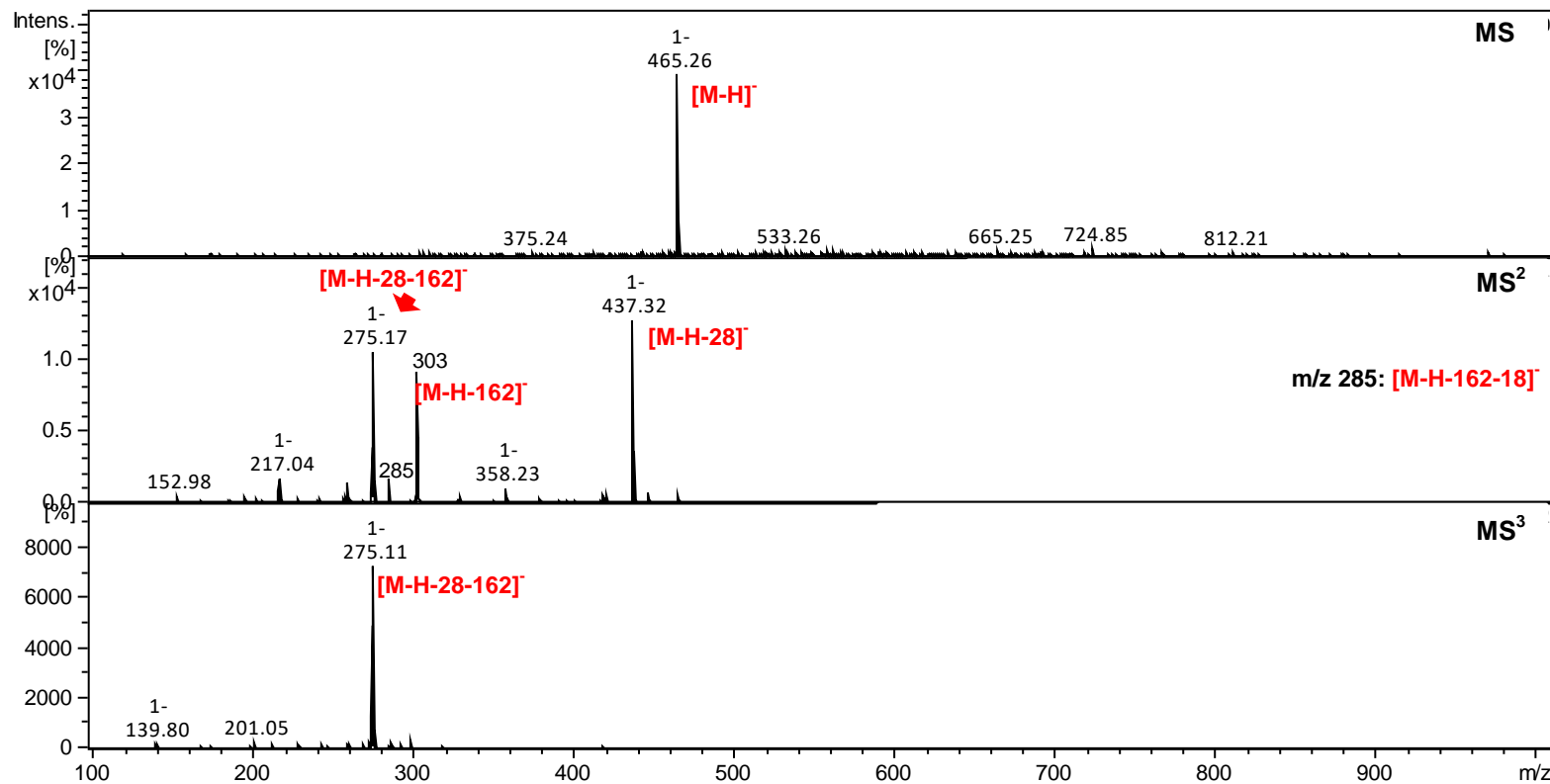


Figura 29. Espectro de massas da substância 2, taxifolina hexosídeo, presente no extrato bruto das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, extraído com solvente metanol (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

Analisando-se o espectro de massas (Figura 29) da substância 2 proposta, taxifolina hexosídeo, em MS¹ observa-se o pico de maior intensidade de m/z 465, referente ao pico do íon molecular.

Em MS² é possível observar três fragmentos de maiores intensidades, sendo eles os fragmentos de m/z 437, 303 e 275. O fragmento de m/z 437 refere-se à perda de uma molécula de CO a partir do íon molecular, [M-H-28]⁻. O fragmento de m/z 437 origina o fragmento de m/z 275, o que indica a perda de uma hexose, [M-H-28-162]⁻, originando o núcleo aglicona da molécula taxifolina.

Porém, pode haver a perda da molécula de hexose de forma direta, partindo-se do pico do íon molecular, gerando o íon m/z 303 [M-H-162]⁻. O fragmento de m/z 303 pode ser fragmentado outras duas vezes, gerando o fragmento de m/z 275, observado tanto em MS² quanto MS³, a partir da perda de uma molécula de CO, [M-H-162-28]⁻. Além disso, a perda de água também pode ser observada a partir do íon m/z 303, gerando fragmento de menor intensidade m/z 285 [M-H-162-18]⁻.

Kang e colaboradores (2016) identificaram a substância 2, taxifolina hexosídeo, na espécie *Sorghum bicolor*, popularmente conhecida como sorgo, em que seus grãos integrais são bastante utilizados como alimento. Entretanto, para a espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, a molécula ainda não foi relatada (KANG et al., 2016).

A Figura 30 mostra o espectro de massas da substância 3, proposta como quercetina hexosídeo.

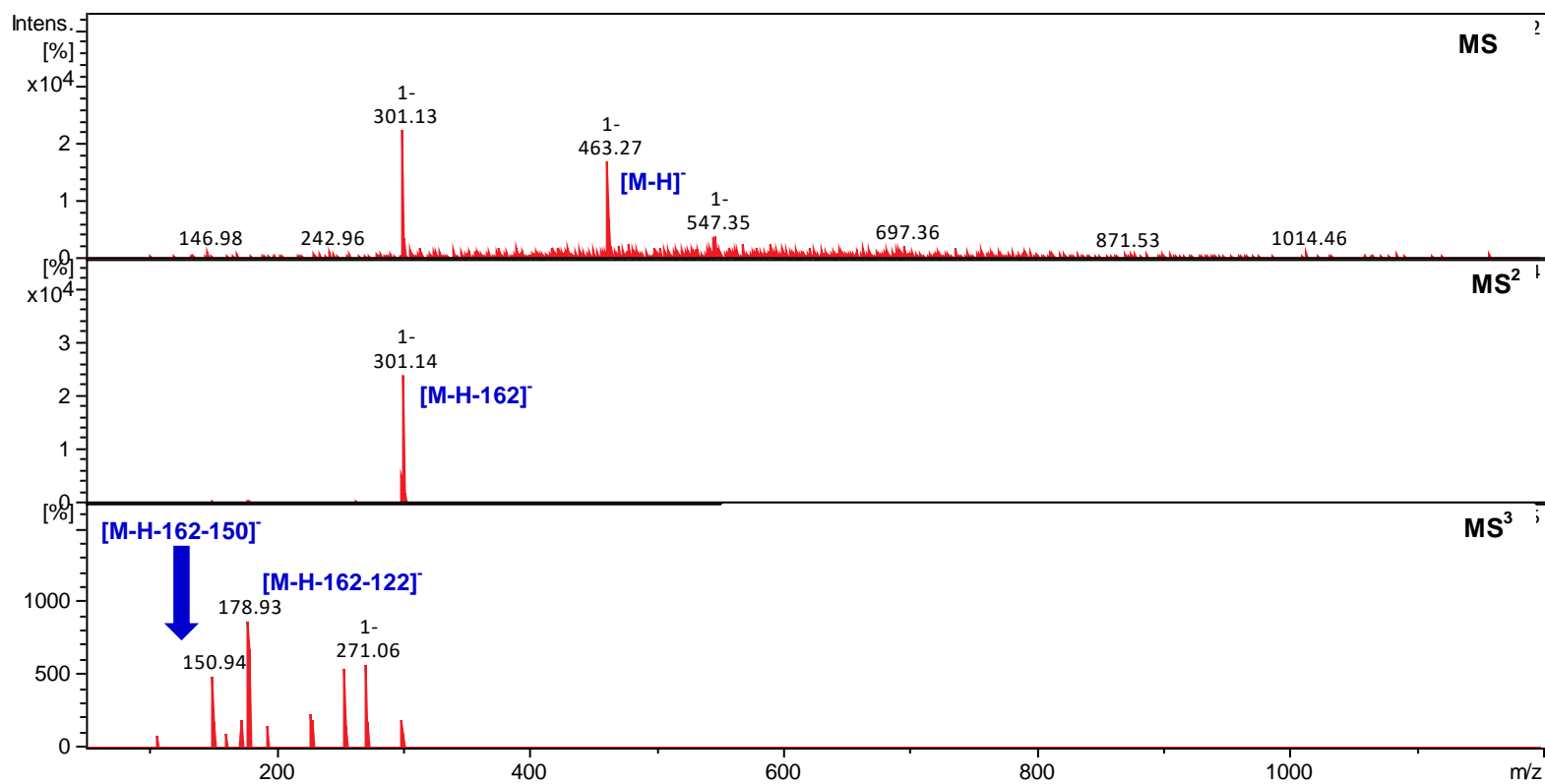


Figura 30. Espectro de massas da substância 3, quercetina hexosídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

Para o espectro de massas da substância 3, quercetina hexosídeo (Figura 30), nota-se íon m/z 463 em MS^1 , correspondente ao pico do íon molecular. A primeira transição em MS^2 observada é referente ao fragmento m/z 301 [M-H-162]. A perda de 162 unidades de massas pode estar relacionada à perda de uma hexose, formando a aglicona quercetina.

As segundas e terceiras transições observadas ocorrem em MS^3 , no qual ocorre a retrociclização do núcleo flavílico (m/z 301), gerando o fragmento m/z 179 [M-H-176-122]. O fragmento m/z 151 [M-H-176-150] também pode ser observado, sendo um íon comum em fragmentações de flavonoide, referente à quebra do anel pirano pelo mecanismo de retro Diels-Alder.

Azevedo e colaboradores (2014) já identificaram a substância 3, quercetina hexosídeo, na polpa da espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (AZEVEDO et al., 2014).

A Figura 31 mostra o espectro de massas da substância 4, proposta como quercetina glucuronídeo.

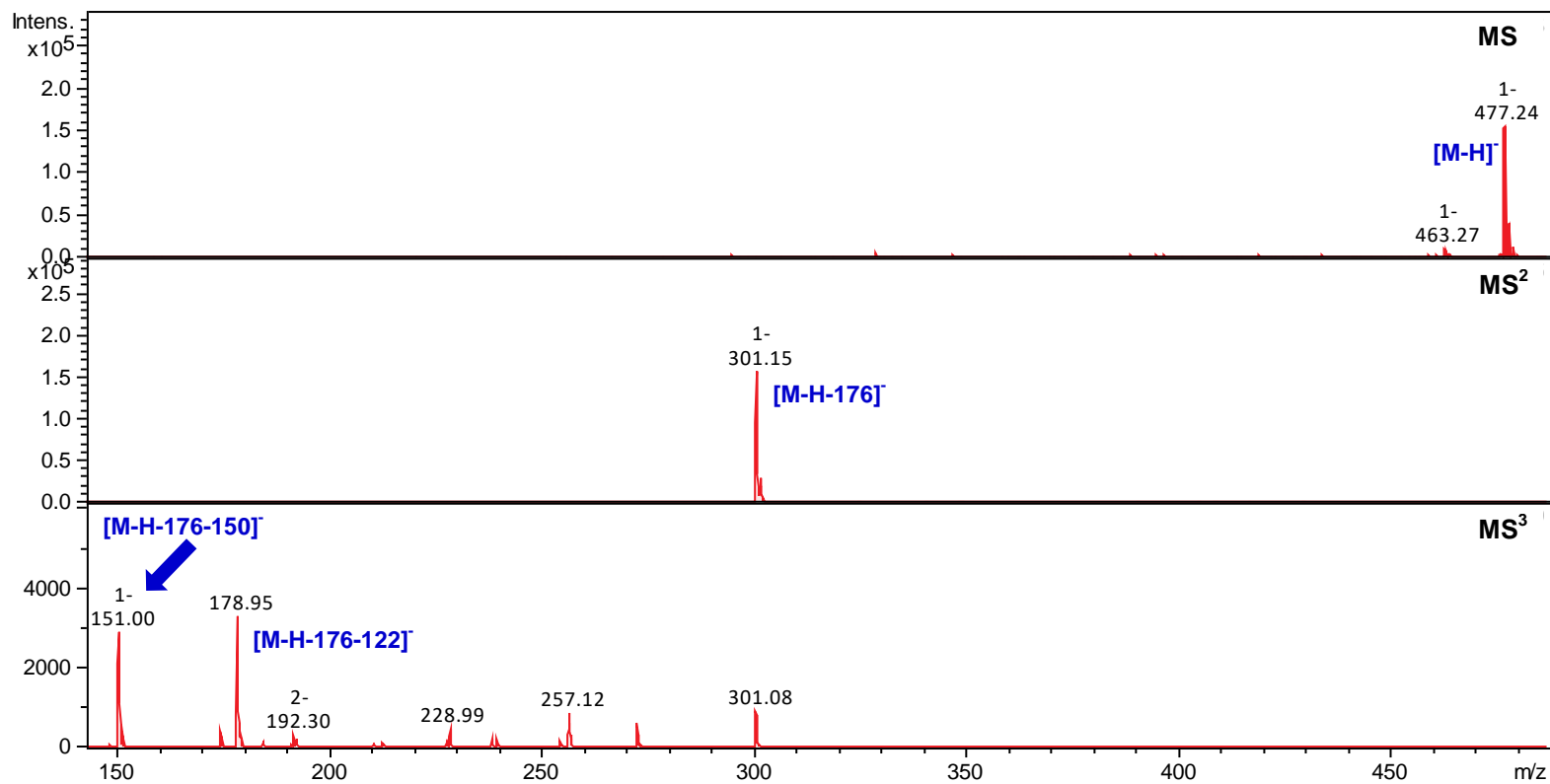


Figura 31. Espectro de massas da substância 4, quercetina glucuronídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), obtidos no modo negativo por CL-EM/EM.

Analisando o espectro de massas da substância 4 (Figura 31), proposta como quercetina glucuronídeo, podemos observar o sinal mais intenso m/z 477, correspondente ao pico do íon molecular.

As fragmentações observadas para essa substância são semelhantes à substância 3, quercetina hexosídeo, no qual a primeira transição ocorre em MS^2 . Assim, o fragmento m/z 301 $[M-H-176]^-$ é referente à perda do glucuronídeo de m/z 176, formando a aglicona quercetina. O fragmento m/z 179 $[M-H-176-122]^-$ e m/z 151 $[M-H-176-150]^-$ são referente à retrociclização e quebra do anel pirano, respectivamente, assim como observado para a substância 3.

Rodr e colaboradores (2018) identificaram a substância 4, quercetina glucuronídeo, na polpa do fruto *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, (RODR; VINHOLES; FREITAS, 2018).

A Figura 32 mostra o espectro de massa da substância 5, delphinidina glucuronídeo, proposta a partir da fração FR4, em modo de ionização positivo.

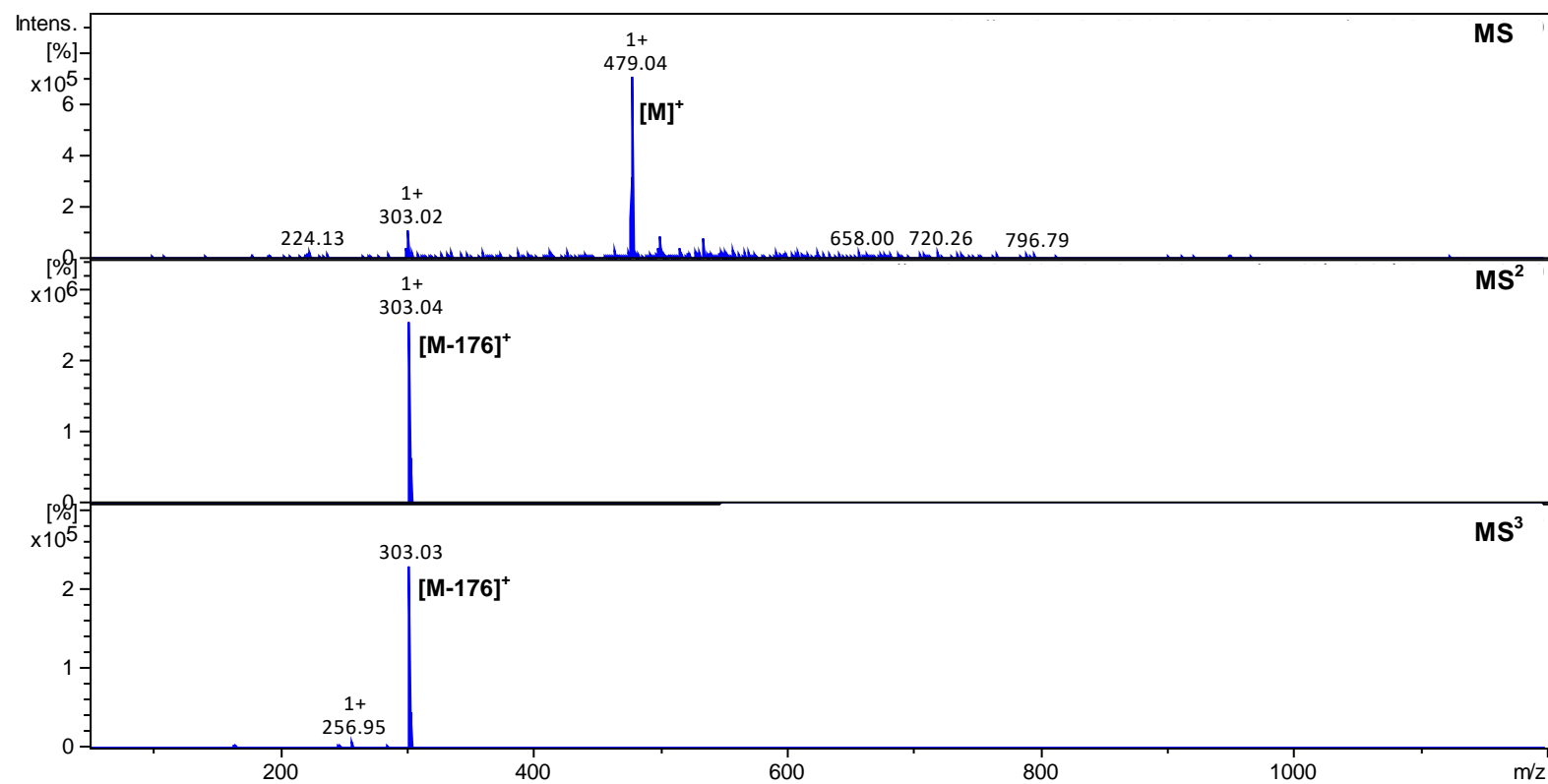


Figura 32. Espectro de massas da substância 5, delphinidina glucuronídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), obtidos no modo positivo por CL-EM/EM.

Analisando-se o espectro de massas da substância 5 (Figura 32), proposta como delfinidina glucuronídeo, observa-se o sinal mais intenso de m/z 479, correspondente ao pico do íon molecular.

Em MS^2 ocorre o fragmento m/z 303 $[M-176]^+$ referente à perda do glucuronídeo, formando-se a aglicona cianidina.

Em MS^3 não foram observados novos fragmentos em intensidades consideráveis. Como o anel C do núcleo antociânico já possui três duplas ligações, e como consequência maior estabilidade, a possibilidade de haver uma nova cisão como as observadas para as outras substâncias discutidas é reduzida. Entretanto, é pertinente relatar que possíveis fragmentações em MS^3 podem ocorrer se uma energia de ionização for utilizada durante a análise por CL-EM/EM (JIN et al., 2015).

Kalt e colaboradores (2014) identificaram a substância 5, delfinidina glucuronídeo, em amostras de urina humana após a ingestão de suco de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). Entretanto para a espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, ainda não há relatos sobre a identificação dessa substância (KALT et al., 2014).

A Figura 33 mostra o espectro de massa da substância 6, proposta como cianidina hexosídeo.

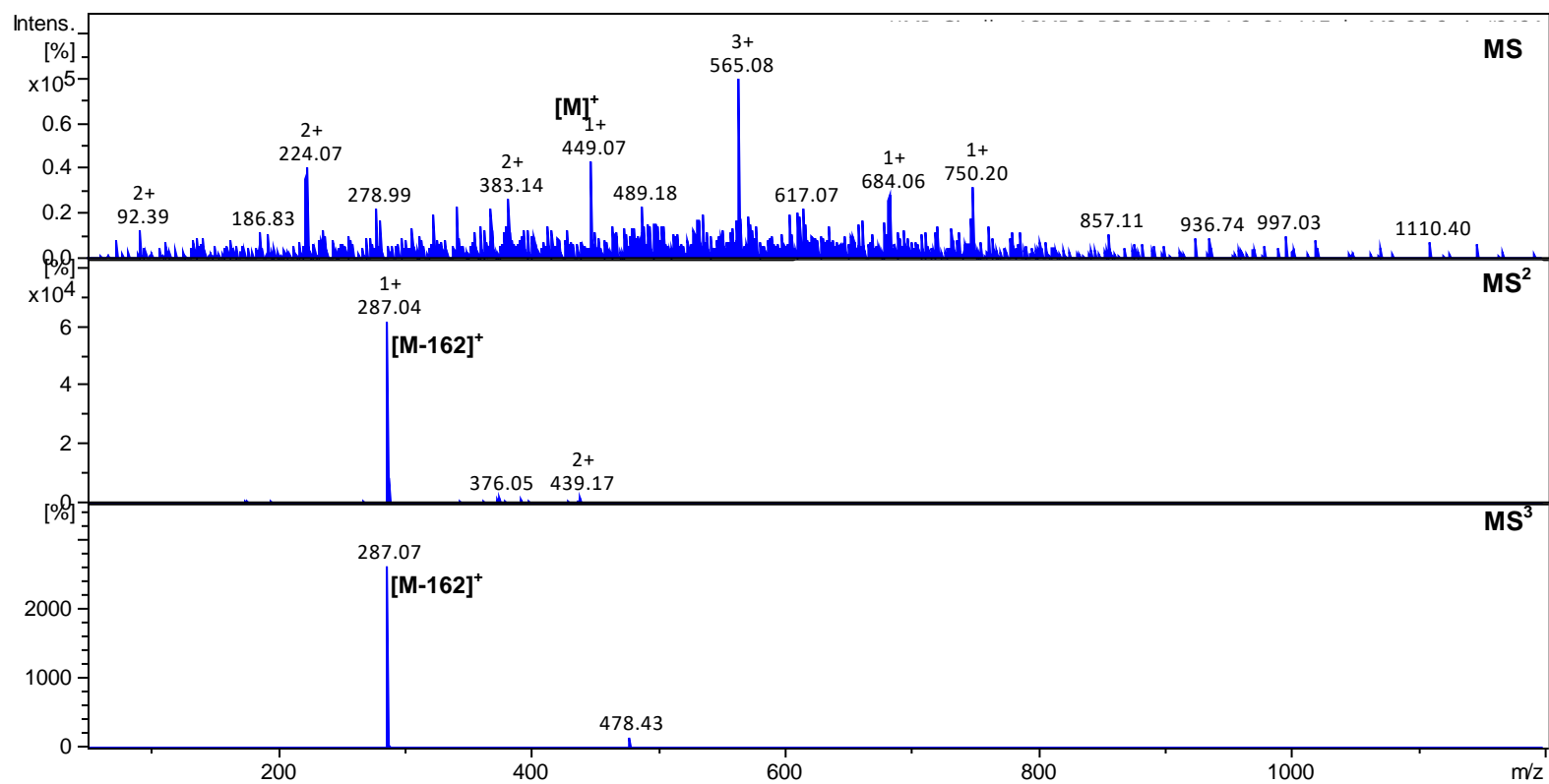


Figura 33. Espectro de massas da substância 6, cianidina hexosídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), obtidos no modo positivo por CL-EM/EM.

Para o espectro de massas da substância 6 (Figura 33), proposta como cianidina hexosídeo, observa-se o sinal de m/z 449, correspondente ao pico do íon molecular.

Em MS^2 o fragmento de m/z 287 $[M-162]^+$ é referente à perda de uma hexose, formando-se a aglicona cianidina. Assim como no caso da substância 5, por se tratar de uma antoxianidina, em MS^3 não foram observados novos fragmentos.

Chaves e colaboradores (2018) já identificaram essa substância, cianidina hexosídeo, na polpa e cascas do fruto de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, (CHAVES et al., 2018).

A Figura 34 mostra o espectro de massas da substância 7, proposta como delfinidina hexosídeo.

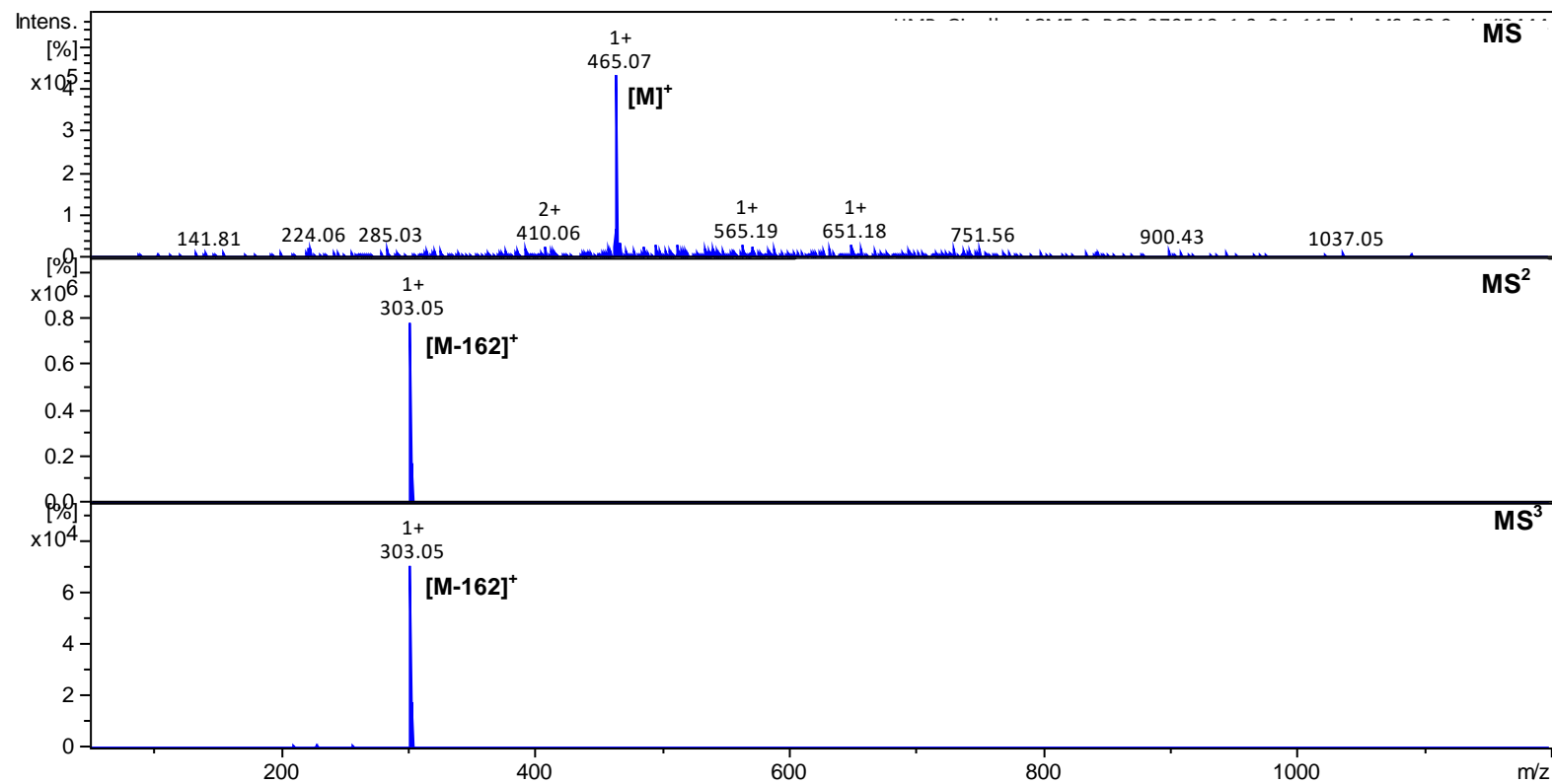


Figura 34. Espectro de massas da substância 7, definidina hexosídeo, presente na fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), obtidos no modo positivo por CL-EM/EM.

Para a substância 7, proposta como delfinidina hexosídeo, analisando-se o espectro de massas da substância (Figuras 34), o sinal mais intenso de m/z 465 é correspondente ao pico do íon molecular. Em MS^2 , o fragmento $[M-162]^+$ refere-se ao sinal m/z 303, referente à perda de uma hexose formando a aglicona delfinidina.

Assim como para as substâncias 5 e 6, para a substância 7, delfinidina hexosídeo, não foram observados novos fragmentos em MS^3 por se tratar de uma antocianidina.

Porém, para a fração FR4 do extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum var. lucidum* foi observado o íon m/z 465 com fragmento m/z 303 em três tempos de retenção distintos, conforme apresentado pela Figura 34.

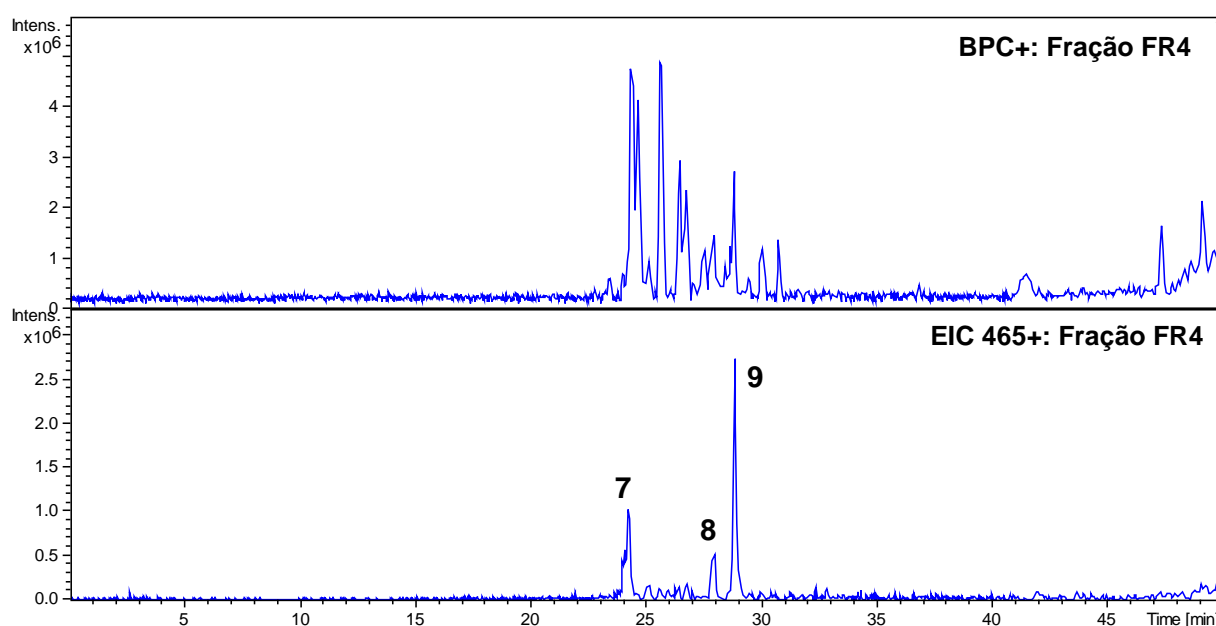


Figura 35. Delfinidina hexosídeo identificada em três tempos de retenção diferentes, obtidos no modo positivo por CL-EM/EM

Concluiu-se assim, que a hexose (m/z 162) pode estar ligada às hidroxilas do núcleo da delfinidina, em diferentes posições.

Chaves e colaboradores (2018) identificaram a molécula de delfinidina hexosídeo em espécies como *Eugenia brasiliensis*, fruto popularmente conhecido como grumixama, na espécie *Eugenia uniflora*, pitanga. Além dessas espécies, em seu estudo, Chaves identificou na

espécie *Vaccinium myrtillus*, mirtilo, a substância delfinidina hexosídeo (CHAVES et al., 2018).

Entretanto, para a espécie *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, araçá-amarelo, fruto de estudo deste trabalho, ainda não foi relatada a identificação dessa molécula, sendo apenas relatada por Flores e colaboradores (2014) para a espécie *Psidium guajava*, fruto popularmente conhecido como goiaba, de mesmo gênero (FLORES et al., 2014).

Em suma, foi possível propor por CLAE-EM/EM quatro substâncias relatadas pela primeira vez no extrato dos frutos de *Psidium cattleianum* var. *lucidum*, são elas: substância 1 (dihidromiricetina hexosídeo); substância 2 (taxifolina hexosídeo); substância 5 (delfinidina glucuronídeo) e substância 7 (delfinidina hexosídeo).

4.7 Associação das substâncias propostas com resultados antioxidantes e antiglicantes observados

As sete substâncias identificadas são pertencentes à classe dos flavonoides, como citado no ítem anterior (4.6), e foram propostas em sua forma O-glicosilados, sendo que flavonoides podem ser encontrados nas formas C-glicosilados, O-glicosilados ou agliconas. (BEZERRA et al., 2016).

A molécula 1 e 2, dihidromiricetina hexosídeo e taxifolina hexosídeo, foram identificadas como flavanonas, subclasse dos flavonoides, pois apresentam como característica redução da dupla ligação entre os carbonos C₂ e C₃, do anel C do núcleo flavílico (SIMÕES et al., 2010).

As moléculas 3 e 4, quercetina hexosídeo e quercetina glucuronídeo, foram identificadas como flavonóis, subclasse de flavonoides, pois apresentam como característica a presença de uma ligação dupla entre os carbonos C₂ e C₃, do anel C do núcleo flavílico e substituição na posição C₃ por um grupo O-glicosilado, sendo assim, possuem reações químicas comuns (SIMÕES et al., 2010).

As substância 5, 6 e 7, delfinidina glucuronídeo, cianidina hexosídeo e delfinidina hexosídeo, foram identificada como moléculas de antocianidinas, ou seja, são moléculas de antocianinas que contém um grupo heterosídeo acoplado na posição C₃ do anel C do núcleo flavílico (SIMÕES et al., 2017).

Os glicosídeos de miricetina e quercetina (substâncias 1, 3 e 4) são flavonoides encontrados em abundância em diversas espécies vegetais e

possuem capacidade antioxidante comprovada, além de exercerem papel anti-inflamatório, atuando no sistema imunológico (CHO et al., 2016; TANG et al., 2017).

A substância 2, taxifolina, da mesma forma que as substâncias miricetina e quercetina, apresenta atividade antioxidante comprovada. Além da atividade antioxidante, estudos de Tang e colaboradores (2017) e Topal e colaboradores (2016) verificaram que a molécula de taxifolina contém propriedades que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, além de efeitos anti-inflamatórios (TANG et al., 2017; TOPAL et al., 2016).

Antocianinas são pigmentos naturais, normalmente encontradas na cor avermelhada, derivados de sais flavílicos encontrados em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. (LOPES et al., 2007). Apresentam instabilidade após seu processamento, podendo ser hidrolisadas e degradadas facilmente, voltando à forma de algum flavonoide, tornando-se mais estáveis (BUENO et al., 2012).

As antocianinas podem apresentar funções biológicas como capacidade anti-inflamatória ou antiedematogênicas. Destaca-se também a função de polinização das flores, através da atração de insetos ou pássaros (SIMÕES et al., 2017).

As moléculas de delphinidina e cianidina (5, 6 e 7), são as moléculas de antocianidinas mais comumente extraídas de plantas. Entre as atividades relatadas para as substâncias encontram-se propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NAM et al., 2016; SOGO et al., 2015).

A presença de grupos doadores de prótons, como a hidroxila do fenol, e estruturas de ressonância nos anéis aromáticos das sete moléculas de flavonoides identificadas possui capacidade de estabilizar radicais livres, sendo assim, fontes antioxidantes, auxiliando, dessa forma, na explicação dos promissores resultados dos ensaios antioxidantes para o extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* e da fração FR4, sendo as substâncias presentes na fração FR4 responsáveis por uma parte desse resultado, pois a capacidade antioxidante encontrada para o extrato PC_CM é resultado do sinergismo de todos os constituintes presentes nesse extrato, como citado no item 4.3.1.

Lunceford e Gugliucci, Yoon e seus respectivos colaboradores já relataram em seus estudos que compostos fenólicos, como a rutina e ácido cafeico, apresentaram atividade inibidora de glicação. Dessa forma, acredita-se que os compostos fenólicos são importantes no processo antiglicante (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; YOON; SHIM, 2015).

Como flavonoides são compostos fenólicos, o promissor resultado antiglicante para a fração FR4 (47% de inibição) do extrato metanol das cascas de *P. cattleianum*, PC_CM, também pode ser atribuído às substâncias identificadas para a fração, pois moléculas que apresentam capacidade antioxidante tendem a apresentar efeito antiglicação potencializado, visto que antioxidantes podem neutralizar radicais livres e, portanto, inibir o processo de estresse oxidativo produzido pela glicação, diminuindo a formação de compostos carbonílicos livres, além de quebrar *crosslinks* já formados. A estrutura dos flavonoides, com o efeito de ressonância típico do anel aromático permite essa atuação e diminui, conseqüentemente, a formação de AGEs *in vivo* (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005; LIU et al., 2012).

Por essa razão, 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 cutâneo (PENG et al., 2011).

5 CONCLUSÕES

O fruto de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* apresentou resultados promissores nos ensaios antioxidantes e antiglicante, sobretudo para as cascas da espécie. O solvente metanol mostrou-se adequado ao estudo, pois o extrato metanol das cascas do fruto de *P. cattleianum* (PC_CM) apresentou alta atividade antioxidante e antiglicante, com EC_{50} $38,26 \pm 2,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ e porcentagem inibidora de glicação de 34,2%, respectivamente.

Após o fracionamento do extrato PC_CM, a fração FR4 apresentou $EC_{50} = 57,30 \pm 1,22 \mu\text{g mL}^{-1}$, maior que o extrato bruto. Sendo assim, a promissora capacidade antioxidante do extrato PC_CM deve-se ao sinergismo entre todos os constituintes químicos presentes.

Por outro lado, para o ensaio antiglicante a fração FR4 apresentou inibição do processo de glicação (47%), havendo um aumento em relação ao extrato bruto (34,2%).

Por CL-EM/EM foram propostas sete substâncias presentes no extrato metanol das cascas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (PC_CM), sendo estas: (1) dihidromiricetina hexosídeo, (2) taxifolina hexosídeo, (3) quercetina hexosídeo, (4) quercetina glucuronídeo, (5) delphinidina glucuronídeo, (6) cianidina hexosídeo e (7) delphinidina hexosídeo, sendo as substâncias de 3 a 7 presentes na fração FR4 do extrato PC_CM.

As substâncias inéditas propostas para o fruto de *P. cattleianum* foram: substância 1 (dihidromiricetina hexosídeo); substância 2 (taxifolina hexosídeo); substância 5 (delphinidina glucuronídeo) e substância 7 (delphinidina hexosídeo).

Todas as substâncias propostas são pertencentes à classe dos flavonoides, o que explica os promissores resultados antioxidante e antiglicante através das estruturas de ressonância, capazes de estabilizar radicais livres.

Sendo assim, as cascas do fruto *P. cattleianum* apresentaram um grande potencial para que, a partir de produtos naturais se desenvolva novos fármacos e cosméticos, auxiliando na prevenção contra danos antioxidantes e antiglicantes do organismo.

6 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D. S. P. Radicais livres e antioxidantes. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu. p. 474, 2003.
- 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.
- ALVAREDA, F. Q. et al. Atividade Antinociceptiva e Antimicrobiana da Casca do Caule de *Psidium Cattleianum* Sabine. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1125–1133, 2015.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Douglas Faria Corrêa Anjo**, v. 3, n. 2, p. 145–154, 2004.
- ARAÚJO, C. L. et al. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 107–110, 2004.
- AZEVEDO, N. et al. Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. 2014.
- BAILEY, A. J.; PAUL, R. G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 106, n. 1–2, p. 1–56, 1998.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. 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.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais E. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2008.
- BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 136, n. 1, p. 113–126, 2003.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Quimica Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- BEZERRA, A. G. et al. Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of

Turnera diffusa Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 56–63, 2016.

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.

BIEGELMEYER, R. et al. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. C991–C996, 2011.

BRANCO, C. DE P.; OLIVEIRA, A. R. DE; SILVA, M. P. DA. Alimentos funcionais e nutracêuticos. **Conexão**, v. 9, n. 1/2, p. 596–604, 2012.

BRILLOUET, J. M. et al. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. **Annals of Botany**, v. 112, n. 6, p. 1003–1014, 2013.

BUENO, J. M. et al. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 126–151, 2012.

CERVANTES-LAUREAN, D. et al. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 8, p. 531–540, 2006.

CHANG, C. H. et al. Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 944–954, 2013.

CHAVES, V. C. et al. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4331–4338, 2018.

CHO, B. O. et al. Anti-inflammatory activity of myricetin from *diospyros lotus* through suppression of nf-kb and stat1 activation and nrf2-mediated ho-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated raw264.7 macrophages. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 8, p. 1520–1530, 2016.

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.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of

flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DA SILVA, F. M. A. et al. Desreplicaco de alcaloides aporfonicos e oxoaporfonicos de unonopsis guatterioides por Esi-It-Ms. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 944–947, 2012.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DONG, M.; HE, X.; LIU, R. H. Phytochemicals of Black Bean Seed Coats : Isolation , Structure Elucidation , and Their Antiproliferative and Antioxidative Activities. **J. Agric. Food Chem**, v. 55, p. 6044–6051, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FLORES, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **FOOD CHEMISTRY**, 2014.

FRAIGE, K. et al. 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.

FRANZON, R. C. et al. Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, p. 1–47, 2009.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641–1673, 2007.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and Functional Characterization of Polyphenols Isolated from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 280–286, 2005.

HASLER, C. Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 61–72, 1998.

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

- ICHIHASHI, M. et al. Glycation Stress and Photo-Aging in Skin. **Anti-Aging Medicine**, v. 8, n. 3, p. 23–29, 2011.
- IHA, S. M. et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 387–393, 2008.
- JIN, H. et al. Characterization of anthocyanins in wild *Lycium ruthenicum* Murray by HPLC-DAD/QTOF-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p. 4947–4956, 2015.
- KALT, W. et al. Anthocyanin Metabolites Are Abundant and Persistent in Human Urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3926–3934, 2014.
- KANG, J. et al. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, 2016.
- KIKUCHI, S. Glycation—a sweet tempter for neuronal death. **Brain Research Reviews**, v. 41, n. 2–3, p. 306–323, 2003.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.
- LIU, L. et al. Influence of dietary flavonoids on the glycation of plasma proteins. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 8, p. 2183–2187, 2012.
- LOPES, T. J. et al. Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais E Da Estabilidade. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291–297, 2007.
- LOURDES, M. D. G. R.; FILHO, J. M. I Mportância Dos Compostos Fenólicos Da Dieta Na Promoção Da Saúde Humana the Importance of Dietary Phenolic Compounds in the Promotion of Human Health. **UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa**, v. 12, n. 4, p. 7–15, 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.
- MACHADO, F. M. S.; SIMÕES, A. N. Análise custo-efetividade e índice de qualidade da refeição aplicados à Estratégia Global da OMS. **Revista de Saude Publica**, v. 42, n. 1, p. 64–72, 2008.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* var. *lucidum* Sabine) fruit extracts

with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

MILENE ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

MOON, J. Y. et al. The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* var. *lucidum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 369–375, 2011.

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.

MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A família Myrtaceae na reserva particular do patrimônio natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 7, n. 1, p. 3–32, 2006.

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 Nutricao**, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

NAM, D. C. et al. Cytoprotective mechanism of cyanidin and delphinidin against oxidative stress-induced tenofibroblast death. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 426–432, 2016.

NATURA EKOS: conheça os ativos de cada hidratante. **Natura**. 19 de set. de 2018. Disponível em: < <https://www.natura.com.br>>. Acesso em: 16 de out. de 2018.

NAZARÉ, A. C. et al. Ethyl ferulate, a component with anti-inflammatory properties for emulsion-based creams. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8124–8139, 2014.

NEVES, L. T. B. C. et al. QUALIDADE DE FRUTOS PROCESSADOS ARTESANALMENTE DE AÇÁÍ (*Euterpe oleracea* MART.) E BACABA (*Oenocarpus bacaba* MART.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 729–738, 2015.

NIESSEN, W. M. A. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 794, n. 1–2, p. 407–435, 1998.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional food” claims. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 1, p. 19–24, 2004.

OF, D.; MELLITUS, D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes**

Care, v. 37, n. SUPPL.1, p. 81–90, 2014.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. D. O. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118–127, 2007.

PELLEGRINI, N. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical. v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

PENG, X. et al. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food and Function**, v. 2, n. 6, p. 289–301, 2011.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012.

PERINI, J. A. et al. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

PORTO BARBOSA, J. H.; DE OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutricao**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2009.

RAJU K. CHALANNAVAR. Chemical composition of essential oil of *Psidium cattleianum* var. *lucidum* var. *lucidum* (Myrtaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 33, p. 8341–8347, 2012.

RIBEIRO, A. B. et al. *Psidium cattleianum* var. *lucidum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140–148, 2014.

ROCHA, F. D. et al. Diabetes mellitus e estresse oxidativo : produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 2, p. 49–54, 2006.

RODR, B.; VINHOLES, J.; FREITAS, V. DE. Function E ff ect of in vitro digestion on the functional. v. 9, p. 6380–6390, 2018.

SABER, F. R. et al. UPLC/QTOF/MS profiling of two *Psidium* species and the in-vivo hepatoprotective activity of their nano-formulated liposomes. **Food Research International**, v. 105, n. December, p. 1029–1038, 2018.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Livro Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; et al., Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre. Artmed. 2017.

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001.

SOGO, T. et al. Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin. **BioFactors**, v. 41, n. 1, p. 58–65, 2015.

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.

SURESH, G. et al. New advanced glycation end-products inhibitors from *Dichrostachys cinerea* Wight & Arn. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 213–216, 2012.

TANG, X. M. et al. Atractylenolide I protects against lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation by anti-inflammatory and anticoagulation effect. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 6, p. 582–587, 2017.

TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. UNINGÁ Review. 2010 Jan. N. v. 7, n. 12, p. 71–84, 2011.

TOPAL, F. et al. Antioxidant activity of taxifolin: An activity-structure relationship. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 674–683, 2016.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. DA S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018.

VERMA, P.; MISHRA, S. Antioxidants and Disease Prevention Antioxidants and Disease Prevention. n. April, 2014.

WILLE, G. M. F. C. et al. Desenvolvimento de tecnologia para a fabricação de doce em massa com araçá-pêra (*Psidium acutangulum* D. C.) para o pequeno produtor. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1360–1366, 2004.

XIMENES, V. F. et al. Inhibitory Effect of Gallic Acid and Its Esters on Hemolysis and Depletion of Intracellular Glutathione in Erythrocytes. **Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5355–5362, 2010.

YOON, S. R.; SHIM, S. M. Inhibitory effect of polyphenols in *Houttuynia cordata* on advanced glycation end-products (AGEs) by trapping methylglyoxal. **LWT - Food**

Science and Technology, v. 61, n. 1, p. 158–163, 2015.

ZERAIK, M. L. et al. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 259–265, 2011.