



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS MARI-MARI (*Cassia leiandra*), PAJURÁ
(*Couepia bracteosa*) E PITOMBA (*Talisia esculenta*).**

MAYANE PEREIRA DE SOUZA.

**Orientadora: Prof.^ªDr.^a Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Co-orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza.**

**Manaus-AM
Maio de 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química
Área de Concentração: Química Orgânica
Nível: Doutorado**

***MAYANE PEREIRA DE SOUZA.**

**Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos mari-mari
(*Cassia leiandra*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*).**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Amazonas,
como requisito final para obtenção do
Título de Doutora em Química, Área de
atuação: Química Orgânica.

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

***Bolsista CAPES**

Ficha Catalográfica

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

S729c Souza, Mayane Pereira de
Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos mari-mari (*Cassia leiandra*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*) / Mayane Pereira de Souza. 2016
126 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Frutas amazônicas. 2. Potencial antioxidante. 3. Mari-mari (*Cassia leiandra* Benth). 4. Pitomba (*Talisia esculenta*). 5. Pajurá (*Couepia bracteosa*). I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

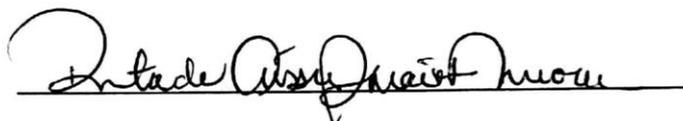
“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE
DOS FRUTOS MARI-MARI (*Cassia leiandra*), PAJURÁ (*Coupeia
bracteosa*) E PITOMBA (*Talisia Esculenta*)”.

Mayane Pereira de Souza

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas
como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada em 06 de Junho de 2016

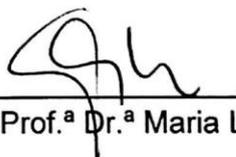
COMISSÃO EXAMINADORA



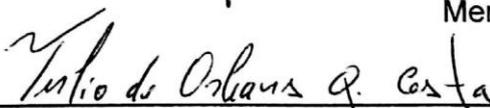
Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Universidade Federal do Amazonas
Orientadora



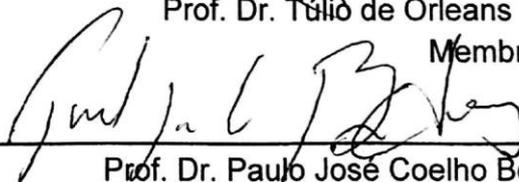
Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit
Membro INPA



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro UFAM



Prof. Dr. Túlio de Orleans Gadelha
Membro UFAM



Prof. Dr. Paulo José Coelho Benevides
Membro Externo/CBA

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 06 de Junho de 2016.

Ficha Catalográfica

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

D278c de Souza, Mayane Pereira
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS MARI-MARI (*Cassia leiandra*),
PAJURÁ (*Couepia bracteosa*) E PITOMBA (*Talisia esculenta*). /
Mayane Pereira de Souza. 2016
66 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientadora: Afonso Duarte Leão de Souza
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Frutas amazônicas. 2. potencial antioxidante. 3. mari-mari
(*Cassia leiandra* Benth). 4. pitomba (*Talisia esculenta*). 5. pajurá
(*couepia bracteosa*). I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho aos meus pais
Valdeci e Paula, minha irmã e
amiga Maryane, meu irmão Valzinho,
minha filha Catarina e meu esposo Aldrey
pelo incentivo, apoio e força, pois devo a vocês
todas as minhas conquistas.*

*“Não é o que você faz, mas
quanto amor você dedica no que
faz que realmente importa.”*

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À Deus que a cada dia nos dá uma nova oportunidade de crescermos e amadurecermos como humanos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao meu pai que contribuiu diretamente neste trabalho com o conhecimento de frutos nativas da região e principalmente por me ajudar na coleta dos frutos.

À minha mãe pelo incentivo, compreensão e apoio durante esta jornada.

Meu esposo Aldrey que sempre admirou os meus esforços me apoiando e incentivando nesta jornada e compartilhando as alegrias de cada conquista.

Aos Professores Rita de Cássia Saraiva Nunomura e Afonso Duarte Leão de Souza pela orientação, paciência, pela oportunidade de crescimento profissional e pela amizade.

Ao Doutor Sergio Massayoshi Nunomura e aos técnicos Magno Pêrea e Sabrina Kelly pelas análises de LC-MS/MS no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN), sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

As alunas de I.C. que ajudei a orientar Ingridy Sá e Thais Nobre que contribuíram em muitos dos trabalhos realizados.

Aos grandes amigos Adriana Silva, Fabiana Greyce, Andréa Medeiros, Rita Cynnara, Paulo Renan, Priscila Aquino, Aimê Oliveira, Bruna Caroline Maciel, Orlando Amazonas, Mauro Galúcio e Felipe Thiago Lima que desde a graduação caminhamos juntos e nos apoiamos durante o mestrado e doutorado.

Aos colegas Hector, Giovana, Felipe e Richardson na parceria do trabalho envolvendo a pitomba.

Aos colegas de laboratório da UFAM: Felipe Moura, Richardson, Elzalina, Paulo Senna, Lídia, Bruna Ribeiro, Liviane, Diego, André e Ingridy.

À Fiocruz em nome da professora Patrícia Orlandi pelos ensaios antimicrobianos, antimaláricos e citotóxicos.

Aos professores Marcos Machado e Andersson Barison (UFPR) pelos experimentos em RMN.

Aos membros que compõem a banca examinadora pelas valiosas contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Mari-Mari (*Cassia leiandra* Benth), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*) são frutas facilmente encontradas nos arredores da cidade e também na floresta amazônica. A composição química e informações sobre a capacidade antioxidante do mari-mari é desconhecida e do pajurá e pitomba pouco exploradas. Neste trabalho, foram produzidos extratos de polpa, cascas e sementes destes frutos utilizando acetona e metanol, para realização de análises por LC-MS para a identificação de compostos, especialmente da classe de flavonoides, quantificação do teor de fenólicos totais, avaliação da capacidade de sequestro de radicais DPPH e redução de Fe^{3+} . Os resultados de quantificação dos fenólicos totais dos extratos da parte comestível de mari-mari apresentou teor de fenólicos totais de 0,036 e 40,12 mg GAEq/100 g de extrato seco nos extratos metanólico e cetônico, respectivamente. O extrato de polpa pajurá apresentou o maior teor de fenólicos no extrato metanólico. A atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH para os extratos metanólico e cetônico de polpa de mari-mari foi CS_{50} de $620,30 \pm 0,01$ e $364,94 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Entre os frutos, o destaque foi para o extrato metanólico da amêndoa de pajurá ($63,69 \mu\text{g/mL} \pm 0,002$). A capacidade de redução de Fe^{3+} da parte comestível do fruto foi $629,88 \pm 0,01$ e $634,46 \pm 0,08$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ extrato seco. Além disso, engeletina (1) e astilbina (2) foram isolados e identificados por espectrometria de RMN e EM e comparação com a literatura. Este é o primeiro relato sobre a caracterização química e atividade antioxidante do fruto mari-mari e uma contribuição aos estudos de pajurá e pitomba.

ABSTRACT

Mari-mari (*Cassia leiandra* Benth), pajurá (*Couepia bracteosa*) and pitomba (*Talisia esculenta*) are fruits easily found in Amazon urban neighbouring and also in the Amazon forest. They are commonly consumed fresh and their chemical composition and antioxidant capacity have never been studied. Extracts in acetone and methanol pulp, fruit peel and seed of fruits were obtained and analyzed by LC-MS leading to identify flavonoid glycosides, dimer flavonoid, phenolic acids and one organic acid present in the pulp, peel and fruit seed. The scavenger capacity and total phenolic content were also evaluated. The total phenolic of extracts of the edible part of mari-mari presented total phenolic content of 0.036 and 40.12 $\mu\text{g GAEq}/100\text{ g}$ for methanolic and ketonic extracts respectively. The antioxidant activity evaluated by DPPH method revealed values of IC_{50} of 620.30 ± 0.01 and $364.94 \pm 0.01\ \mu\text{g}/$ to mari-mari extracts pulp (methanolic and ketonic respectively). The best result was seeds pajurá extracted in methanol. Iron reduction capacity of the edible part of the fruit was 629.88 ± 0.01 and $634.46 \pm 0.08\ \mu\text{mol FeSO}_4\ \text{g}^{-1}\ \text{DW}$. Additionally, engeletin (**1**) and astilbin (**2**) were isolated and identified by RMN and comparison with literature. This is the first report about the chemical characterization and antioxidant activity from mari-mari and a contribution to studies from pajurá e pitomba fruits.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teores de Fenóis totais e atividade antirradical livre (TEAC) de polpas de frutos da Amazônia segundo Canuto et al, 2010.	21
Tabela 2: Teor de fenólicos totais de alguns frutos regionais	22
Tabela 3: Padrões de flavonoides utilizados na solução de mistura de padrões.	45
Contín.Tabela 3: Padrões de flavonoides utilizados na solução de mistura de padrões.	46
Contín.Tabela 3: Padrões de flavonoides utilizados na solução de mistura de padrões.	47
Tabela 4: Padrões de ácidos fenólicos utilizados na solução de mistura de padrões	48
Contín. Tabela 4: Padrões de ácidos fenólicos utilizados na solução de mistura de padrões	49
Tabela 5: Rendimentos dos extratos brutos de mari-mari	56
Tabela 6: Rendimentos dos extratos brutos de pitomba	57
Tabela 7: Rendimentos dos extratos brutos de pajurá.....	58
Tabela 8: Tempo de retenção dos padrões de compostos fenólicos eluídos em coluna PFP	62
Tabela 9: Dados de LC-MS das amostras do fruto de mari-mari.....	71
Tabela 10: Dados de LC-MS das amostras do fruto de pitomba	77
Tabela 11: Dados de LC-MS das amostras do fruto de pajurá	80
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H da substância 1 e correlações em HSQC e HMBC.	93
Tabela 13: Dados de RMN de ^1H da substância 1 e dados da literatura.	94
Tabela 14: Dados de RMN de ^1H da substância 2 e dados da literatura.	100
Tabela 14: Resultados de fenólicos totais dos extratos do mari-mari,	103

Tabela 15: Resultados de fenólicos totais dos extratos de pitomba.....	104
Tabela 16: Resultados de fenólicos totais dos extratos de pajurá	105
Tabela 17: Resultados de DPPH dos extratos de mari-mari.	107
Tabela 18: Resultados de DPPH dos extratos de pitomba.	108
Tabela 19: Resultados de DPPH dos extratos de pajurá.....	109
Tabela 20: Resultados de FRAP dos extratos de mari-mari.....	110
Tabela 21: Resultados de FRAP dos extratos de pitomba.	111
Tabela 22: Resultados de FRAP dos extratos de pajurá.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Variedade de frutas amazônicas.....	19
Figura 2: Alguns frutos amazônicos com reconhecido potencial antioxidante.	22
Figura 3: Representação de molécula estável e um radical livre.....	24
Figura 4: Algumas classes de compostos antioxidantes provenientes de dietas	26
Figura 5: Exemplos de compostos fenólicos	27
Figura 6: Estrutura básica dos flavonoides.....	28
Figura 7: Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.	28
Figura 8: Exemplos de ácidos fenólicos	29
Figura 9: Mari-mari (<i>Cassia leiandra</i> Benth.).....	32

Figura 10: a) Mari-marizeiro em mata de várzea; b) mari-mari na árvore	32
Figura 11: a) Pajurá (fruto); b) Pajurazeiro; c) flores de pajurá.....	34
Figura 12: Frutos de pitomba (<i>Talisia esculenta</i>)	35
Figura 13: Fruto em estado de maturação se abrindo espontaneamente e fruto aberto.....	40
Figura 14: a) Semente de pajurá parte externa da semente e amêndoa (parte interna); b): extrato bruto da parte interna da semente.	41
Figura 15: Partição do extrato bruto de polpa de pajurá	42
Figura 16: Precipitação e lavagem do sólido branco proveniente do extrato de casca em acetona... 	51
Figura 17: CCD dos extratos de polpa de mari-mari (acetona) (1), de casca de (acetona) (2), de semente (acetona) (3), de polpa (metanol) (4), de casca (metanol) (5), de semente (metanol) (6).	59
Figura 18: CCD das amostras de partição líquido-líquido dos extratos de pitomba revelado em NP-PEG e observados sob luz UV 365 nm.....	60
Figura 19: Cromatograma BPC dos padrões de compostos fenólicos	63
Figura 20: Comparação dos cromatogramas BPC modo negativo das amostras de polpa a), casca b) e semente c) de mari-mari extraído em acetona.	64
Figura 21: Espectro de MS² com os principais fragmentos do pico 4.....	66
Figura 22: Proposta de fragmentação para o pico 4 *RDA= Retro Diels Alder	66
Figura 23: Comparação dos cromatogramas das amostras de polpa de mari-mari extraído a) em 100 % de acetona e b) 100% de metanol.	68

Figura 24: Comparação dos cromatogramas das amostras de casca de mari-mari extraído em a) 100 % de acetona e b) 100% de metanol.	69
Figura 25: Comparação dos cromatogramas das amostras de semente de mari-mari extraído em 100 % de acetona e 100% de metanol.....	70
Figura 26: Cromatograma BPC do extrato em acetona de polpa de pitomba.	72
Figura 27: Cromatograma BPC (modo negativo) do extrato de semente extraído em acetona em comparação com o mix de padrões. Detecção de catequina e epicatequina m/z 289.....	74
Figura 28: Cromatogramas BPC da mistura de padrões de fenólicos e cromatograma BPC do extrato de semente de pitomba extraído em acetona com detecção dos íons m/z 271 e 285 correspondente à naringenina e luteolina respectivamente.	75
Figura 29: Comparação entre os cromatogramas BPC dos extratos de casca de pitomba a) extraído em acetona b) extraído em metanol e detecção de rutina (m/z 609).....	76
Figura 30: Constituintes identificados nas polpas, cascas e sementes de pitomba.....	78
Figura 31: Comparação entre os cromatogramas de polpa de pajurá (a) extraído em acetona; (b) extraído em metanol.	79
Figura 32: Flavonoides identificados na polpa de pajurá extraída em metanol.....	81
Figura 33: Comparação entre os cromatogramas de semente (amêndoas) de pajurá (a) extraído em acetona; (b) extraído em metanol.....	82
Figura 34: Comparação entre os cromatogramas (a) de semente (parte externa) de pajurá extraído em acetona; (b) extraído em metanol.....	83
Figura 35: Comparação entre os cromatogramas (a) das cascas de pajurá extraído em acetona; (b) extraído em metanol.....	84

Figura 36: Espectro de massas da amostra substância 1 no modo negativo APCI-MS	86
Figura 37: Espectro de massas da amostra substância 1 no modo positivo APCI-MS	87
Figura 38: Espectro de RMN de ¹H da amostra substância 1 MeOH-d4, 600 MHz)	87
Figura 39: Ampliação do espectro de RMN de ¹H da substância 1.....	88
Figura 40: Ampliação do espectro de 1H da substância 1 com os sinais de H-2 e H-3.....	89
Figura 41: Ampliação de mapas de HMBC dos hidrogênios H-2 e H-3 e correlações.	90
Figura 42: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, substância 1, em MeOH, a 500.13 MHz, detalhe das interações espaciais entre os hidrogênios com o hidrogênio irradiado (H-2).	91
Figura 43: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, substância 1, em MeOH, a 500.13 MHz, detalhe das interações espaciais entre os hidrogênios com o hidrogênio irradiado (H-3).	92
Figura 44: Cristais de engeletina.....	93
Figura 45: Engeletina.....	94
Figura 46: Espectro de massas (modo negativo) substância 2 com as propostas de fragmentação. .	95
Figura 47: Espectro de RMN de ¹H da amostra substância 2 em DMSO-d6.....	97
Figura 48: Destaque para o H-2' no anel B da substância 2.....	97
Figura 49: Ampliação da região de hidrogênios ligados a oxigênio (H-O) da substância 2.....	98
Figura 50: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, da substância 2, em MeOH, a 500.13 MHz e detalhe das interações entre o hidrogênio irradiado (H-3) com os hidrogênios vizinhos.	99
Figura 51: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, da substância 2, em MeOH, a 500.13 MHz e detalhe das interações entre o hidrogênio irradiado (H-2) com os hidrogênios vizinhos.	99

Figura 52: Cristais de astilbina	101
Figura 53: Astilbina	101
Figura 54: Curva de calibração com ácido gálico usado na quantificação de FT.....	102

ESQUEMAS

Esquema 1: Metodologia geral para o preparo dos extratos de polpa, casca e semente dos frutos. .	39
Esquema 2: Partição líquido-líquido dos extratos dos frutos	42
Esquema 3: Frações da partição do extrato cetônico de casca de pitomba.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – Azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico
AVC – Acidente vascular cerebral
%CS – Porcentagem da capacidade de Sequestro
BPC – Base Peak Chromatogram (<i>Cromatograma de Pico Base</i>)
CA-LTQPN - Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais
LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE-ESI-EM/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa com Ionização por <i>Eletrospray</i>
COTI-INPA – Coordenação de Tecnologia e Inovação-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
CS ₅₀ – Capacidade de sequestro 50%
CUPRAC – Cupric ion reducing antioxidante capacity assay
Da-Daltons
DAD – Diodo array detector
DPPH – 2,2 -difetil-2-picril-hidrazina
DMSO-d ₆ – Dimetilsulfoxido deuterado

EAG – Equivalente de ácido gálico
EIC – Cromatograma de Íons Extraídos
ESI – Electrospray
FT – Fenólicos totais
FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC – High Pressure Liquid Chromatography
HMBC – Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LEMAH-UFAM – Laboratório de Espectrometria de Massas e HPLC- Universidade Federal do Amazonas
LC – Liquid chromatography
m/z – razão massa/carga
MeOH – Metanol
MeOH-d₄ – Metanol deuterado
MIC – Mínima concentração inibitória
MS – Mass spectrometry
NOE-DIFF – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ORAC– Oxigen radical absorbance capacity
PFP – Pentafluorofenil
RMN – Ressonância magnética Nuclear
TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances
TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
tr – Tempo de retenção
UV-Ultravioleta

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivo específico	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Frutos amazônicos com potencial antioxidante	19
3.2 Processos oxidativos e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	23
3.3 Compostos fenólicos e prevenção de doenças degenerativas	25
3.4 Ensaios químicos de atividade antioxidante	29
3.5 Mari-mari (<i>Cassia leiandra</i> Benth)	30
3.6 Pajurá (<i>Couepia bracteosa</i>).....	33
3.7 Pitomba (<i>Talisia esculenta</i>).....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Coleta dos Frutos	38
4.2 Preparo de Extratos (extração de compostos fenólicos).....	38
4.3 Partição líquido-líquido dos extratos.....	41
4.4 Extração em fase sólida (SPE)	43
4.5 Caracterização de compostos por LC-MS	43
4.6 Isolamento de substâncias	50
4.6.1 Casca de mari-mari	50
4.7 Quantificação de fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	52
4.8 Determinação da atividade antioxidante.....	53
4.8.1 Capacidade redutora do Ferro (FRAP).....	53
4.8.2. Captura de radicais livres de DPPH	54
5. RESULTADOS e discussões	55
5.1 Rendimentos de Extratos.....	55
5.1.1 Mari-mari	55

5.1.2 Pitomba	56
5.1.3 Pajurá	57
5.2 Comparação dos extratos por CCD.....	59
5.2.1 Mari-mari	59
5.2.2 Pitomba	60
5.3 Caracterização de compostos fenólicos por LC-MS.....	61
5.3.1 Mari-mari	63
5.3.2 Pitomba	71
5.3.3 Pajurá	78
5.4 Substâncias isoladas	85
5.4.1 Mari-mari (casca)	85
5.5 Quantificação de fenólicos totais.....	102
5.5.1 Mari-mari	102
5.5.2 Pitomba	103
5.5.3 Pajurá	104
5.6 DPPH (Ensaio de radical Difenil-2-picrihidrazil radical).....	105
5.6.1 Mari-mari	106
5.6.2 Pitomba	107
5.6.3 Pajurá	108
5.7 FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	109
5.7.1 Mari-mari	109
5.7.2 Pitomba	110
5.7.3 Pajurá	111
6. CONCLUSÃO	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
8. ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia abriga uma grande variedade de espécies frutíferas que embora o consumo destes frutos seja alto, ainda existe um grande número de espécies pouco exploradas. (ALVES et al., 2008). Muitos frutos nativos têm despertado interesse na comunidade científica por apresentarem quantidades consideráveis de micronutrientes e macronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e especialmente compostos fenólicos, os quais são capazes de agir como antioxidantes, aumentando as defesas celulares e ajudando a proteger componentes da célula de danos oxidativos (VASCO, RUALES, & KAMAL-ELDIN, 2008; VEER et al., 2000; KÚBOĀ et al., 2006). Inúmeros estudos mostram a importância desta classe de substâncias para a saúde humana bem como potencial para a prevenção de muitas doenças. Tais danos têm sido associados ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer, bem como está envolvido no processo de envelhecimento (ROËSLER et al., 2007). Desta forma, este estudo visa à caracterização por LC-MS/MS de compostos com potencial antioxidante (especialmente compostos fenólicos) presentes nos frutos mari-mari, pajurá e pitomba bem como a investigação do potencial antioxidante dos extratos dos frutos através de ensaios químicos como capacidade de sequestro de radicais DPPH e capacidade de redução de ferro (FRAP) e quantificação de fenólicos totais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar os compostos fenólicos presentes nos frutos nativos selecionados para este estudo e avaliar o potencial antioxidantes dos mesmos.

2.2. Objetivo específico

- Estudar quimicamente os frutos de mari-mari (*Cassia leiandra*) cuja composição química não foi reportada na literatura e identificar compostos fenólicos na pitomba (*Talisia esculenta*) e no pajurá (*Couepia Bracteosa*) os quais existem poucos relatos.
- Isolar substâncias dos frutos selecionados por meio de técnicas cromatográficas e identificá-las por métodos espectroscópicos e espectrométricos. Serão focadas especialmente as substâncias de classes reconhecidas como antioxidantes.
- Desenvolver métodos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (LC-MS) para caracterização dos compostos fenólicos dos frutos estudados.
- Determinar o teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, e avaliar a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenilpicilhidrazil) e FRAP (Ferric Reducing Assay Power).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Frutos amazônicos com potencial antioxidante

A Amazônia contém uma grande variedade de frutos (Figura 1), entre os quais muitos têm despertado interesse devido às suas propriedades nutricionais, apresentando uma grande variedade de micronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e especialmente compostos capazes de atuar como antioxidantes, por exemplo, vitamina C e fitoconstituintes como polifenóis e carotenóides (STEINMETZ & POTTER, 1996; VASCO, RUALES & KAMAL-ELDIN, 2008; RUFINO et al., 2011; FRACASSETTI, COSTA, MOULAY & TOMÁS-BARBERÁN, 2013).



Fonte: <http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/>

Figura 1: Variedade de frutas amazônicas.

O consumo de frutos está associado à diminuição de risco de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e acidente vascular cerebral (AVC) (WILLETT, 2002) e tais benefícios para a saúde são principalmente atribuídos ao teor de compostos antioxidantes, particularmente. Segundo Halliwell (2000) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

O potencial antioxidante de diversos frutos da Amazônia é bastante conhecido e têm sido objeto de estudos científicos anteriores (BATAGLION et al, 2014; MORALES-SOTO et al., 2014). Entre os vários relatos, destaca-se o estudo realizado por Canuto e colaboradores em 2010, cujo objetivo foi avaliar o potencial antioxidante de 15 frutos amazônicos (abiu, acerola, açaí, araçá-boi, bacaba, bacuri, buriti, cajá, cajarana, caju, cupuaçu, graviola, murici, noni e tamarindo) revelando através do método de TEAC e quantificação de fenólicos totais pelo método Folin Ciocateau que algumas polpas apresentaram alta potencialidade antioxidante (Tabela 1), associada com a atividade anti-radicaís livres e os conteúdos dos componentes bioativos como compostos fenólicos e ácido ascórbico, destacando-se acerola e açaí.

Tabela 1: Teores de Fenóis totais e atividade antirradical livre (TEAC) de polpas de frutos da Amazônia segundo Canuto et al, 2010.

Amostra	FT (mmol. ⁻¹ de ácido gálico)	TEAC (μmol.L ⁻¹ de Trolox)
Abiu	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1
Acerola	3,5 ± 0,2	12,1 ± 0,0
Açaí	2,4 ± 0,2	10,0 ± 0,3
Araçá-boi	0,6 ± 0,0	3,0 ± 0,1
Bacaba	0,3 ± 0,1	3,1 ± 2,1
Bacuri	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,3
Buriti	1,0 ± 0,0	5,4 ± 0,2
Cajá	0,6 ± 0,0	1,8 ± 0,4
Cajarana	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Caju	0,6 ± 0,0	1,5 _{ef} ± 0,2
Cupuaçu	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,2
Graviola	0,6 ± 0,0	2,2 ± 0,1
Murici	0,6 ± 0,0	1,5 ± 1,5
Noni	1,2 ± 0,1	3,9 ± 0,1
Tamarindo	0,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2

Os frutos representados na Figura 2 são os mais estudados sendo representativos da região amazônica, os quais foram avaliados o teor de fenólicos totais utilizando o método de quantificação de fenólicos totais de Folin-Ciocalteu (Tabela2), destacando o camu-camu como o fruto que contém o maior teor de fenólicos com 1120 a 1420 mg EAG/100g de fruto seguido pelo açaí, com 421 a 464 mg EAG/100 g de fruto, sendo os maiores teores encontrados para frutos nativos da região amazônica. Porém sabe-se que o camu-camu é rico em ácido ascórbico (vitamina C) (ZANATTA & MERCADANTE, 2007; GENOVESE, PINTO, GONÇALVES & LAJOLO, 2008; RUFINO et al, 2010), que por apresentar uma estrutura bastante conjugada pode atuar como antioxidante.

Tabela 2: Teor de fenólicos totais de alguns frutos regionais

Fruto	Fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto)	Referência
Açaí (<i>Euterpe olerácea</i>)	421 a 464	POMPEU, SILVA, ROGEZ.; 2009
Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	1120 a 1420	CHIRINOS, et al., 2010
Muruci (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	2,90	SOUZA, et al., 2008
Ingá (<i>Inga edulis</i>)	2,40	SOUZA, et al., 2008
Ubaia (<i>Eugenia patrisii</i>)	2,60	SILVA, et al., 2007
Castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>)	46 a 123	YANG, 2009
Araçá (<i>Psidium cattleianum</i> Sabine)	768	MEDINA, et al., 2011

Apesar de muitos frutos Amazônicos apresentarem relatos quanto à química e atividade antioxidante, ainda existem alguns frutos que a população consome cuja química e potencial biológicos ainda não são conhecidos.

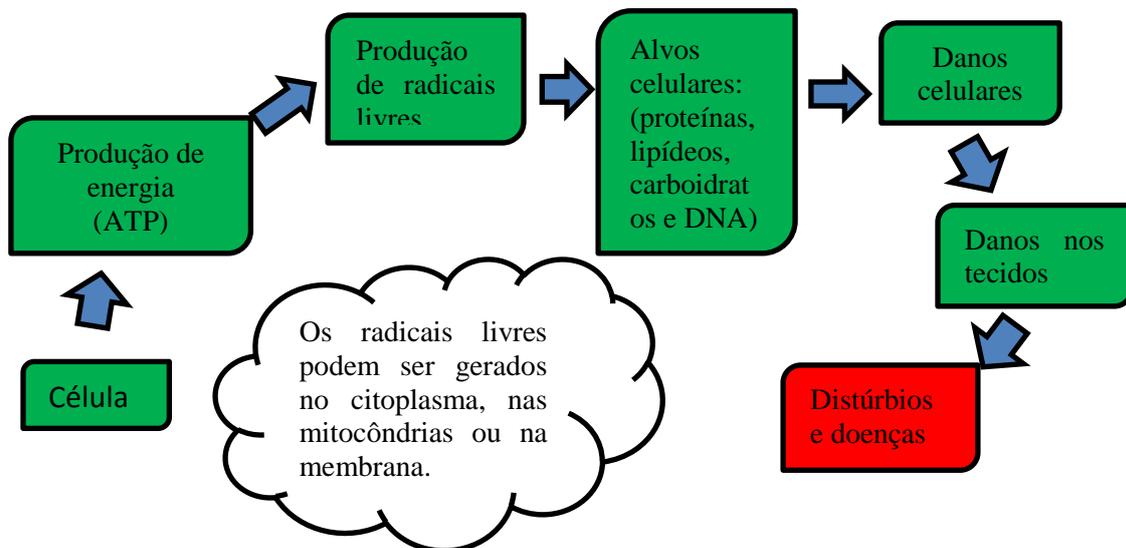


Figura 2: Alguns frutos amazônicos com reconhecido potencial antioxidante.

3.2 Processos oxidativos e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Processos oxidativos são necessários para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres que atuam como oxidantes no organismo (RÖESLER et al., 2007). Oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e, se não controlados, podem provocar danos extensivos como, por exemplo, o desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer, bem como estão envolvidos no processo de envelhecimento (ANDERSON, 1996; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

No esquema (1) a seguir, são ilustrados os passos em que a produção de radicais ocorre no organismo.



Esquema 1: Etapas da produção de radicais livres no processo metabólico.

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados e são bastante instáveis (Figura 3). As principais espécies reativas são divididas em ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio) como, ânion-radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrogênio H_2O_2 , radical hidroxila $\cdot OH$, radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) alcoxila (RO^{\cdot}), oxigênio singlete 1O_2 , óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio NO^{\cdot} , dióxido de nitrogênio NO_2^{\cdot} , cloreto de nitrila NO_2Cl , peroxinitrito $ONOO^-$ (VASCONCELOS et al., 2007). Entre as espécies reativas de oxigênio o $O_2^{\cdot-}$ apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o HO^{\cdot} mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos ao DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

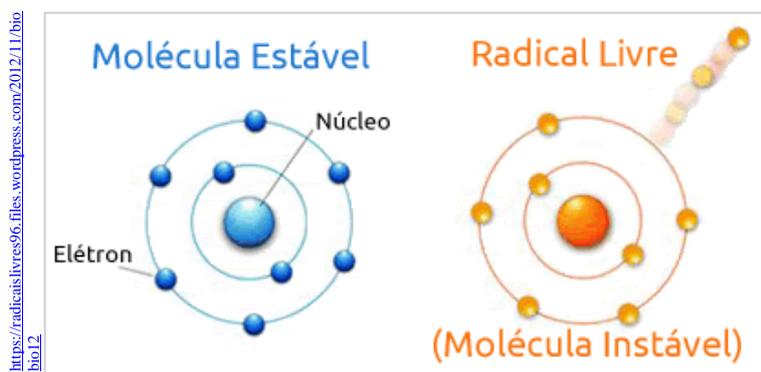


Figura 3: Representação de molécula estável e um radical livre

Antioxidantes dietéticos têm sido associados com a modulação de numerosas funções bioquímicas e fisiológicas, bem como com a redução de doenças como aterosclerose e câncer (DECKER & CLARKSON, 2000).

3.3 Compostos fenólicos e prevenção de doenças degenerativas

No organismo, os radicais livres promovem reações com substratos biológicos ocasionando danos às biomoléculas afetando a saúde humana de diferentes formas. Diante disso, os antioxidantes atuam de diferentes formas para minimizar os danos causados pelos radicais livres no organismo (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Entre os principais mecanismos de proteção do organismo, são citados, por exemplo, quando a cadeia do DNA é quebrada, podendo ser reconectada de forma errada em posição diferente alterando a ordem de suas bases iniciando um dos processos básicos da mutação sendo que o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Desta forma o mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas no DNA pelos radicais.

Outra situação é quando uma enzima tem seus aminoácidos alterados podendo perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Outro dano oxidativo ocorre na membrana celular, com a peroxidação lipídica, o qual interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura desta, levando à morte celular. Neste caso, o organismo pode atuar na reconstrução da membrana lipídica danificada. A oxidação de lipídios também pode ocorrer no sangue agredindo as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, ocasionando aterosclerose,

podendo levar à trombose, infarto ou acidente vascular cerebral. Neste caso, os antioxidantes atuam na prevenção reagindo com os radicais livres tornando-os estáveis (BIANCHI & ANTUNES, 1996; BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

Desta forma, os radicais livres tendem a ser combatidos através de proteção enzimática ou por micromoléculas produzidas pelo próprio organismo ou adquiridas através da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo organismo atuam de forma enzimática como GPx, CAT e SOD₂ ou, não enzimática a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH₂ (FINKEL & HOLBROOK, 2000; BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o a-tocoferol (vitamina-E), β-caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C), cumarinas, taninos e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides (PIETTA, 2000; HALLIWELL et al., 1995) (Figura 4).

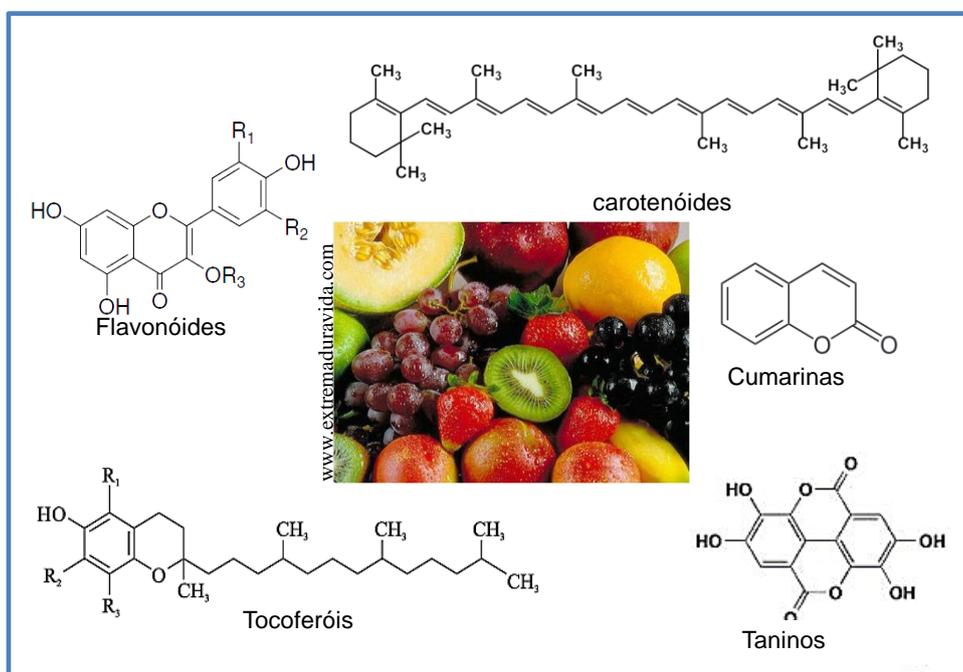


Figura 4: Algumas classes de compostos antioxidantes provenientes de dietas

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas comumente associados na defesa do organismo contra a radiação ultravioleta e doenças degenerativas. Muitos estudos abordando os benefícios à saúde resultantes dos potenciais de compostos fenólicos de fontes alimentares como antioxidante associando o consumo em longo prazo de dietas ricas em polifenóis à proteção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças degenerativas (PANDEY & RIZVI, 2009).

Quimicamente, compostos fenólicos (Figura 5), são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (CADENAS & PACKER, 2002). Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais e são classificados como flavonoides, ácidos fenólicos (Figura 8), cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007).

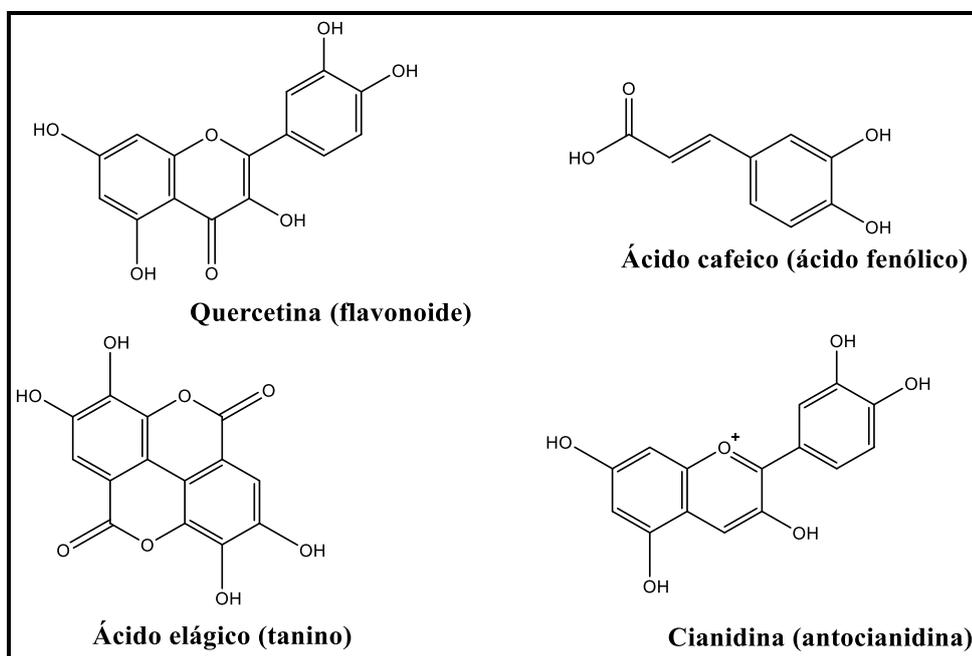


Figura 5: Exemplos de compostos fenólicos

Flavonoides possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6 (Figura 6), e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano. A Figura 6 apresenta a estrutura química dos principais tipos de flavonoides (IKAN, 1991).

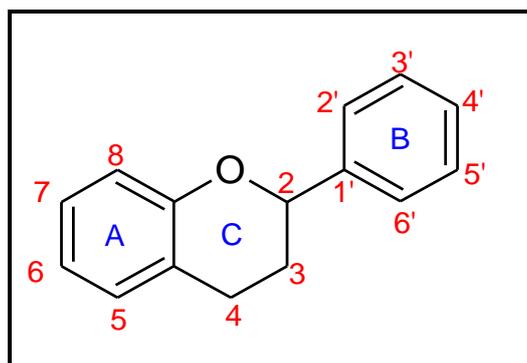


Figura 6: Estrutura básica dos flavonoides

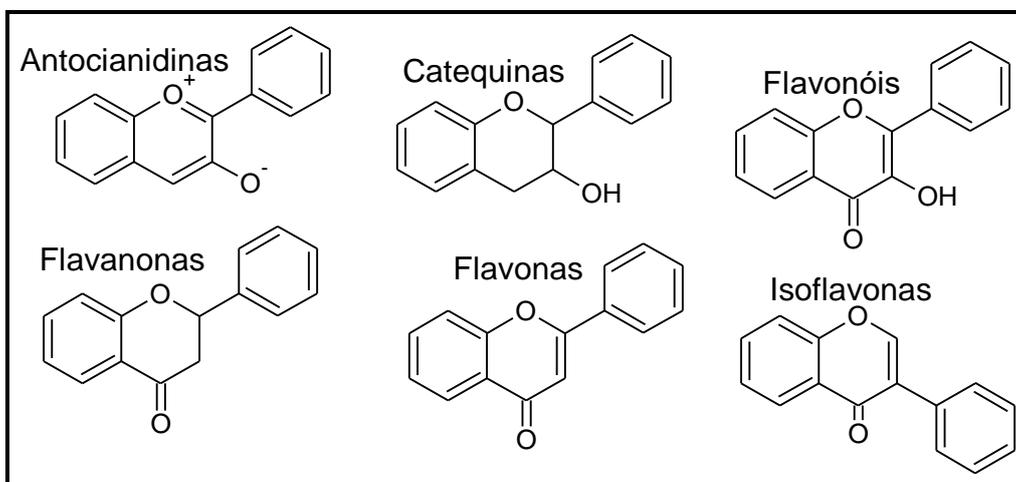


Figura 7: Estrutura química dos principais tipos de flavonoides.

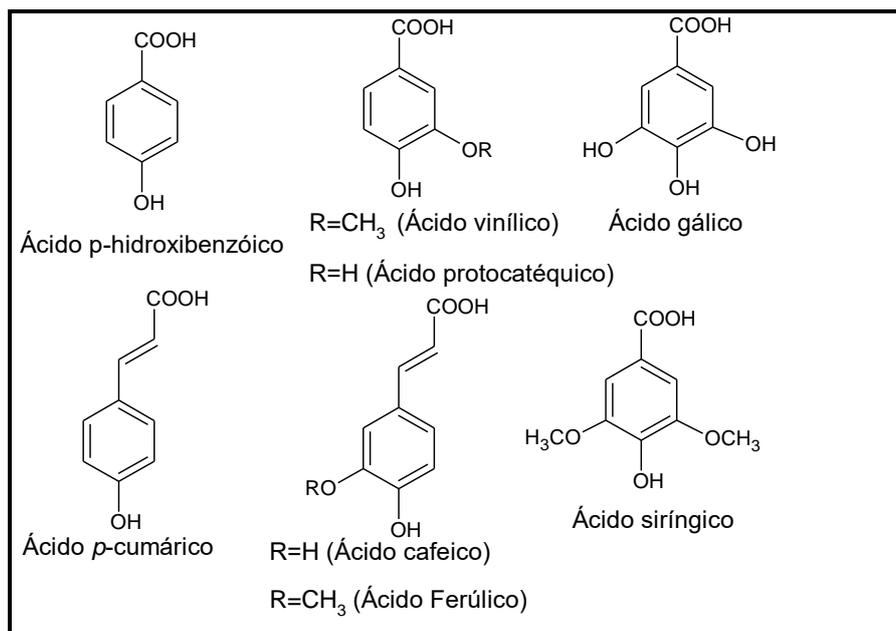


Figura 8: Exemplos de ácidos fenólicos

3.4 Ensaio químico de atividade antioxidante

Devido à meia-vida muito curta de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, dificilmente estes podem ser mensurados. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Nos experimentos de laboratório o HO• pode facilmente ser sequestrado in vitro por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados in vitro se reproduzam in vivo, é necessário administrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o local onde o radical HO• está presente em concentração suficiente para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical HO•, a primeira seria reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação. A formação do radical no organismo

ocorre principalmente pela homólise da água por exposição à radiação, desta forma o ataque intensivo e frequente do radical HO• pode levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos. Por isso a forma mais eficiente de controlar este radical é inibir sua formação com a ingestão de antioxidantes (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006).

Numerosos métodos têm sido utilizados para determinar a atividade antioxidante de frutos. Estes métodos são baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução de metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS) (FRANKEL & MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003; RUFINO et al, 2007), sendo os mais utilizados ABTS, FRAP, DPPH e ORAC.

3.5 Mari-mari (*Cassia leiandra* Benth)

Mari-mari (*Cassia leiandra* Benth.) é um fruto nativo da Amazônia, bastante consumido ao natural, conhecida como mari-mari, ingá-mari e seruaia, pertencente à família Fabaceae, (SILVA, 2011). O fruto é uma vagem com um comprimento entre 40,0 e 50,0 cm de largura e 3,0 cm e 4,0 (Figura 9), quando maduro, a parte comestível apresenta coloração esverdeada ou amarelada. O número de sementes varia em função do comprimento: com quarenta a 120 divisões no interior do fruto de forma regular e simétrica e igual numero de sementes, semelhante a comprimidos, envoltas por pouca polpa fina de coloração verde-clara, sucosa e agridoce de gosto peculiar, o consumo é *in natura* (SILVA, 2010; RABELO, 2012). Além de ser largamente consumido pela

população, o mari-mari é a fruta mais consumida por espécies de peixes da região Amazônica, especialmente durante a época das cheias dos rios (MAIA & CHALCO, 2002).

O habitat natural dessa espécie são matas de igapó e beiras de igarapés, várzeas inundáveis e lugares úmidos, no entanto pode ser cultivado em terra firme (Figura 10). Caracteriza-se como uma pequena árvore com 4,0 a 8,0 metros de altura e 20,0 e 30,0 cm de diâmetro, com caule um tanto tortuoso, ramificado desde a base e com copa ampla. As folhas são compostas de nove a doze pares de folíolos.

Há relatos de estudos de várias espécies do gênero *Cassia*, cujas partes estudadas foram, raízes, casca do caule, sementes e folhas. Foram relatadas a presença de glicosídeos, flavonóides glicosilados, antronas e derivados de antraceno (SINGH, SINGH & YADAV, 2013). A atividade biológica de extratos de espécies de *Cassia* também foi relatada como atividade hepatoprotetora, atividade anti-inflamatória, antimutagênica, antiúlcera, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (SINGH, SINGH & YADAV, 2013).

Apesar de haver vários relatos da química de espécies do gênero *Cassia*, os frutos de *C. leiandra* não apresenta nenhum estudo abordando sua composição química nem atividades biológicas.

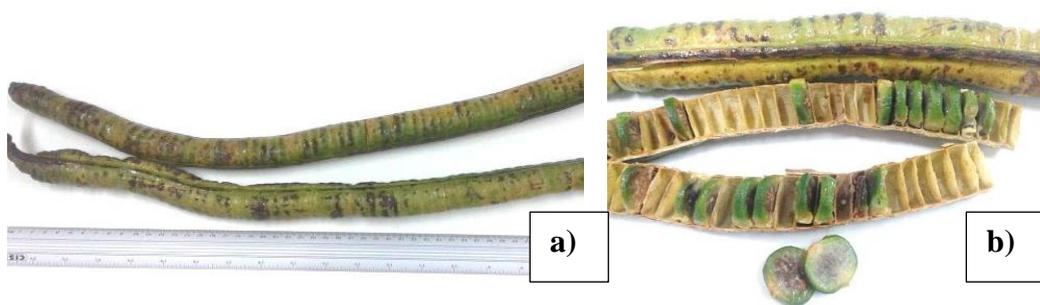


Figura 9: Mari-mari (*Cassia leiandra* Benth.)



Figura 10: a) Mari-marizeiro em mata de várzea; b) mari-mari na árvore

3.6 Pajurá (*Couepia bracteosa*)

O pajurá (*Couepia bracteosa*) (Figura 11 a) também conhecido como pajurá-da-mata e pajurá-verdadeiro pertence à família Chrysobalanaceae. Apesar de ser um fruto bastante representativo na Amazônia, seu valor econômico e nutritivo são pouco conhecidos, bem como os constituintes químicos.

O pajurazeiro (Figura 11 b) é uma árvore de porte médio com altura em torno de 25 metros. Apresenta caule alongado em florestas fechadas e curto quando cultivadas em áreas abertas. A copa é ampla e bastante ramificada com densas folhagens. É nativa da Amazônia com rara ocorrência em floresta reservadas de terra firme principalmente na Amazônia Central. (RABELO, 2012).

Seus frutos medem cerca de 8 a 12 cm de comprimento e diâmetro e pesando de 80 a 200 g. A casca apresenta cor marrom com superfície áspera coberta com pontuações esbranquiçadas. A polpa consiste em 50% do fruto, espessa, carnosofarinácea, de coloração amarela, de sabor e aroma adocicado. Os frutos apresentam um caroço bastante volumoso que contém de uma a duas sementes (SILVA, 2011).

Espécies da família Chrysobalanaceae são largamente utilizadas na medicina popular tradicional da África e América do Sul (MENDEZ & BILIA, 1996; AGRA et al., 2007, 2008). Entre os gêneros mais estudados destacam-se os gêneros *Licania*, *Couepia*, *Parinari* e *Chysobalanus*. Há relatos da presença de terpenoides, flavonoides, taninos e esteroides (CASTILHO, 2001; CARVALHO & COSTA, 2009). A população tem feito uso de plantas dessa família no tratamento de diarreia, disenteria e malária e há relatos de atividade antitumoral, antimicrobiana e antioxidante. Estas atividades têm sido atribuídas aos flavonoides e triterpenoides isolados destas plantas

(BADISA et al., 2000; BRACA et al., 2002; MENDEZ et al., 1997; OBERLIES et al., 2001).

Há relatos na literatura de que o pajurá é fonte natural de carotenóides, especialmente β -caroteno segundo Marinho & Castro (2003), e recentemente Berto e colaboradores (2015), relataram sulfato de acacetina e sulfato de apigenina como principais compostos fenólicos presentes na polpa, casca e semente do fruto, além de carotenoides como *cis*-neocromo, *trans*-neocromo, *trans*-luteoxantina, *trans*-luteína, *trans*-zeaxantina, α -carotene e β -caroteno. Neste mesmo trabalho foi reportada a atividade de sequestro de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio da semente do fruto.



Figura 11: a) Pajurá (fruto); b) Pajurazeiro; c) flores de pajurá

3.7 Pitomba (*Talisia esculenta*)

Pitomba (*Talisia esculenta*-A.St.-Hil Radlk) pertencente à família Sapindaceae é nativa da Amazônia ocidental com larga ocorrência em todo bioma amazônico e regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Em Manaus, sua ocorrência é muito comum na região metropolitana, principalmente em quintais de residências, sítios e jardins botânicos (RABELO, 2012).

O fruto contém de uma a duas sementes, são globosos a ovais, cuja cor da casca é pardo-amarelada de consistência coriácea (VIEIRA & GUSMÃO, 2008) (Figura 12). A parte comestível é conhecida como drupa, tem forma arredondada, translúcida com cerca de 2,5 a 3,0 cm de diâmetro, de sabor agridoce, consumida somente ao natural não sendo muito utilizada para sucos, sorvetes ou geleias devido à sensibilidade ao transporte e a deterioração (RABELO, 2012; NETO, SANTANA & SILVA, 2003).



Figura 12: Frutos de pitomba (*Talisia esculenta*)

Há relato da caracterização físico-química do fruto realizados por Silva e colaboradores (2008), os quais foram determinados o valor energético (56,35 kcal/100 g), umidade (83,16 g/100g), proteínas (1,15 g/100 g de fruto), lipídeos (0,19 g/100 g de fruto), carboidratos (12,51 g/100 g de fruto), fibra alimentar (2,40 g/100 g de fruto) e resíduo mineral fixo (0,61 g/100 g de fruto). Neste mesmo estudo também foram determinadas a composição de minerais da pitomba como o teor de cálcio (26,7 mg/100 g de fruto), zinco (0,84 mg/100 g de fruto) e ferro (0,60 mg/100 g de fruto). Um trabalho publicado em 2009 por Marin, Siqueira e Arruda, apresentou também resultados quanto à composição teor de minerais na pitomba, como cálcio, zinco e ferro, também determinaram o teor de cobre, fósforo e magnésio além da composição de taninos (38,3 µg/mL) e ácido fítico (1,5 µg/mL).

Existem também alguns estudos sobre a semente, que relatam a extração de uma proteína chamada lectina, usada no combate a fungos causadores de doenças de plantas cultivadas e de pragas como besouros que atacam tanto as plantas (FREIRE, et al., 2002; MACEDO, et al., 2011; FREIRE, et al., 2012).

Em 2014, foi relatado por Riet-Correa e colaboradores, um trabalho que teve como objetivo investigar o envenenamento de ovelhas e bovinos por folhas e frutos de pitomba, após três surtos em fazendas onde havia árvores de *T. esculenta*. Foi comprovado que as folhas e sementes de *T. esculenta* causam intoxicação aguda em ovinos e gados afetando principalmente o sistema nervoso, porém não o composto responsável pela toxicidade ainda é desconhecido.

Estudos recentes comprovaram atividades antiproliferativa, antimutagênica e antioxidante do extrato bruto de pitomba, além da identificação de miricetina e quercetina no extrato hidrolisado da polpa. (NERI-NUMA et al, 2014) e também existe relato quanto a composição química do aroma de pitomba identificando a 2,5-dietilpirazina como composto majoritário no aroma de pitomba obtido por técnicas de hidrodestilação (KUBOTA et al, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta dos Frutos

A coleta foi realizada levando em consideração a ausência de danos mecânicos e contaminações aparentes e visuais na epiderme do fruto.

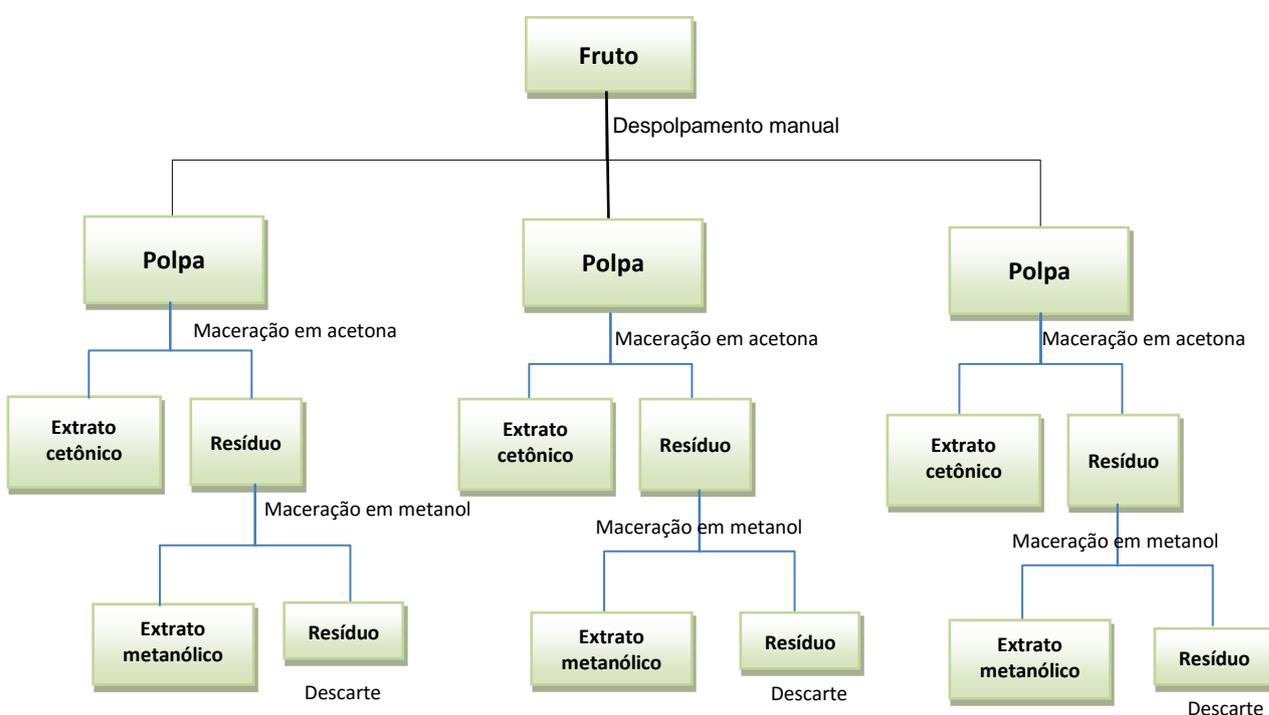
O fruto mari-mari (*Cassia leiandra* Benth) foi obtido na feira da Manaus moderna em março de 2012. O pajurá (*Couepia bracteosa*) foi coletado na feira de Parintins - Amazonas em 10 de novembro de 2013. A pitomba (*Talisia esculenta*) foi coletada no município de Parintins - Amazonas em 10 de fevereiro de 2013.

Após a coleta dos frutos, cada um foi selecionado levando em consideração o estado de conservação e ausência de possíveis falhas mecânicas, seguido da lavagem, separação manual da polpa, casca e semente em ausência de luz. As cascas e semente foram secas em estufa a 40°C e posteriormente trituradas em um moinho para aumento da superfície de contato.

4.2 Preparo de Extratos (extração de compostos fenólicos)

As extrações foram realizadas considerando a capacidade de extrair compostos fenólicos utilizando solventes que apresentam afinidade com esta classe de compostos como, por exemplo, álcoois (etanol e metanol) e acetona (CANUTO, XAVIER, NEVES & BENASSI, 2010; RÖESLER, MALTA, CARRASCO, & PASTORE, 2006). A metodologia de extração foi adaptada a partir da metodologia utilizada por Canuto e colaboradores (2010) que consistiu na maceração de aproximadamente 200 g do material por cerca de 48h primeiramente em 500 mL acetona seguida pela filtração a vácuo, seguido pela lavagem com aproximadamente 10 mL do respectivo solvente

extrator e concentrado à pressão reduzida e temperatura do banho de 40° C. O resíduo sólido foi submetido à nova extração, desta vez com 500 mL metanol, seguido pela filtração e concentração como na etapa anterior (Esquema 1). No procedimento foi utilizada a polpa fresca, enquanto que as cascas e sementes do fruto foram utilizados após serem secas em estufa de circulação de ar e pulverizadas em moinho de quatro facas. Uma porção de 10 mg de cada extrato, foi separada para tratamento em extração de fase sólida para análise posterior em LC-MS.



Esquema 1: Metodologia geral para o preparo dos extratos de polpa, casca e semente dos frutos.

Durante o preparo da amostra de casca de mari-mari (360 g), o extrato cetônico apresentou grande quantidade de um precipitado branco (6,75 g). Este, foi lavado com acetona à frio e filtrado em papel de filtro no funil de Buchner e posteriormente

analisado em LC-MS. Alguns dos constituintes majoritários foram isolados e identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

Durante a separação manual do pajurá (Figura 13) em polpa, casca e semente, observou-se que a semente continha uma amêndoa (Figura 14). Desta forma trabalhou-se com a semente considerando as duas partes separadas.

A polpa de pitomba (215,0 g) foi submetida à maceração em 100% de acetona por 48 h. Posteriormente o solvente extrator foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida enquanto a torta foi novamente submetida à maceração por 48 h, desta vez em 100% de metanol. Porém após a concentrar o material extraído em 100% de MeOH observou-se que este apresentou baixíssimo rendimento, desta forma foi considerado apenas o extrato cetônico de polpa de pitomba.



Figura 13: Fruto em estado de maturação se abrindo espontaneamente e fruto aberto

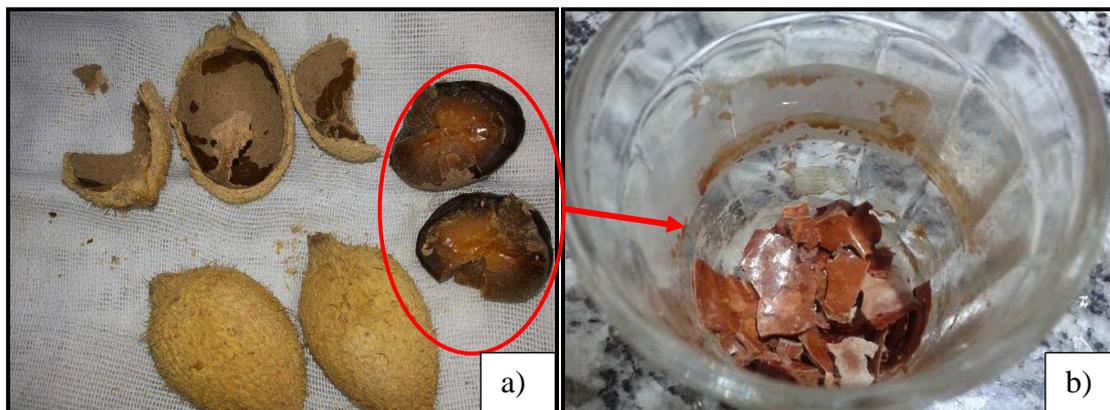
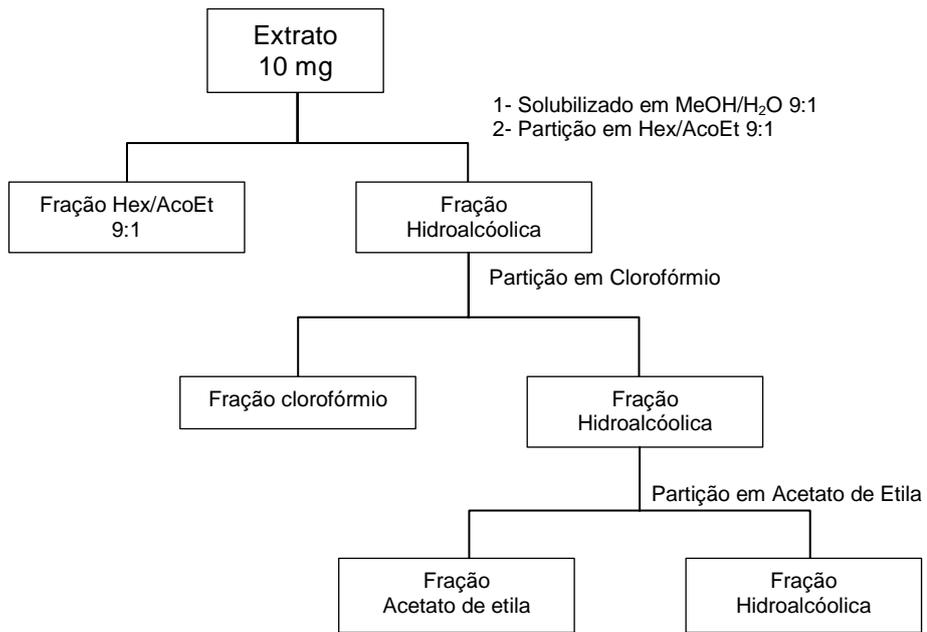


Figura 14: a) Semente de pajurá parte externa da semente e amêndoa (parte interna); b): extrato bruto da parte interna da semente.

4.3 Partição líquido-líquido dos extratos

Foram pesados cerca de 10 mg de cada extrato das amostras de pajurá (polpa, casca, casca da semente e amêndoas), de pitomba (polpa, casca e semente) e mari-mari (polpa, casca e semente), solubilizados em metanol (100%) ou uma mistura de metanol e água (9:1) os quais foram submetidas à partição líquido-líquido com hexano e a mistura de Hex/AcOEt (9:1), para remoção dos compostos de baixa polaridade. Na sequência foram extraídos com 100% de clorofórmio e posteriormente 100% de acetato de etila para extração de compostos de média polaridade (Esquema 2). Em destaque, é mostrada na Figura 15, a emulsão formada durante a partição líquido-líquido do extrato de polpa de pajurá. Os extratos em hexano, acetato de etila, clorofórmio e hidroalcoólicos foram concentrados e comparados por CCD fase normal e reversa para constatação da eficiência da partição.



Esquema 2: Partição líquido-líquido dos extratos dos frutos

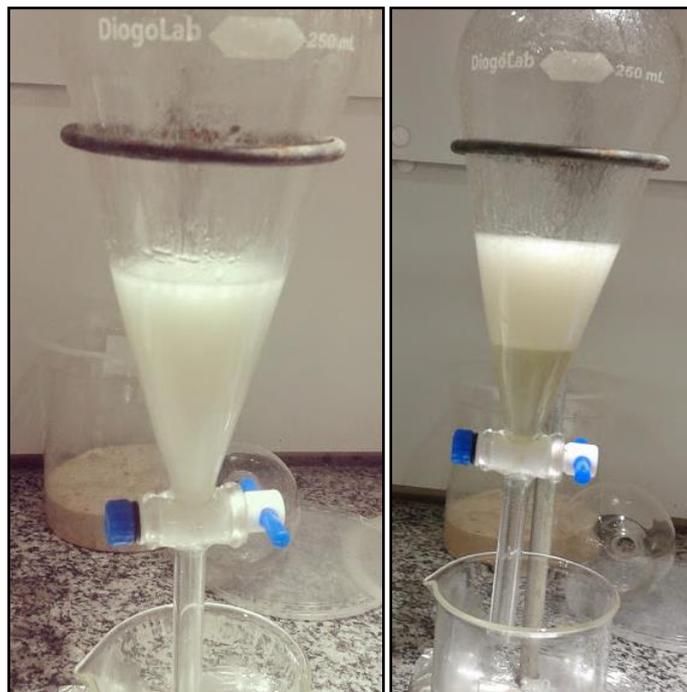


Figura 15: Partição do extrato bruto de polpa de pajurá

4.4 Extração em fase sólida (SPE)

Antes de realizar as análises por LC-MS para caracterização de compostos fenólicos, as amostras foram tratadas por extração em fase sólida utilizando cartuchos com fase estacionária C-18 eluídas em três proporções diferentes da mistura ACN/H₂O (1:9 1:1 9:1). As amostras eluídas em ACN/H₂O 1:1 foram concentradas e pesadas para as análises.

4.5 Caracterização de compostos por LC-MS

As análises por LC-MS foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O sistema LC-MS é constituído por um cromatógrafo modelo Prominence UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A e injetor automático SIL-20^a e acoplado a espectrômetro de massas (Brucker Daltonics, modelo Micro TOF-QII) através de uma fonte *electrospray* e ajustado para os seguintes parâmetros de operação: Tipo de fonte: *ESI*; voltagem do capilar: 2600 volts; Scan: 50-1200 m/z; Set nebulizer: 4,0 bar; Set dry heater: 200 °C; Set dry gas: 9,0 L/ min. As análises foram realizadas nos modo positivo e negativo, usando a coluna: PFP (Kinetex, 2,6 µm, 100A, 150x200 mm). Foram utilizados metanol, acetonitrila, isopropanol e ácido fórmico grau LC-MS, adquiridos da Sigma-Aldrich. A água utilizada foi previamente tratada no sistema Millipore Simplicity.

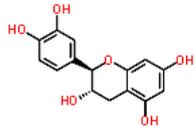
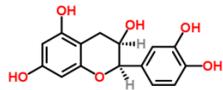
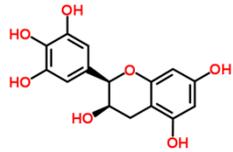
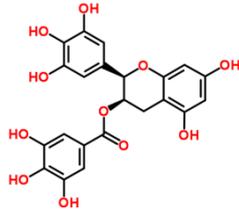
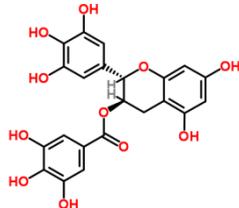
Utilizaram-se vinte e oito padrões comerciais (Tabela 3 e 4) adquiridos da Sigma-Aldrich e da Fluka.

Os padrões foram preparados previamente como soluções estoques na concentração de 1,0 mg/ mL usando metanol grau LC-MS. Aliquotas de 100 µL de cada uma das 28 soluções foram reunidas em um *vial* com o volume final de 2,8 mL posteriormente filtrada com filtro 0,2 µm da Millipore e dividida em dois *vials* previamente identificados.

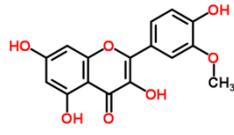
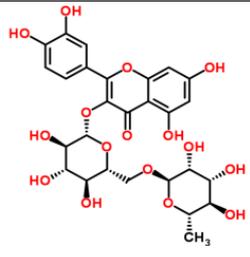
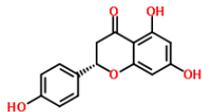
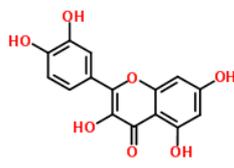
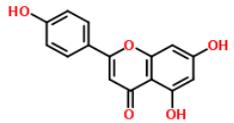
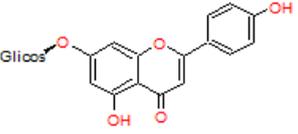
A caracterização foi feita considerando o tempo de retenção (*tr*) de cada padrão com suas respectivas razões *m/z*.

Os padrões de flavonóides e ácidos fenólicos utilizados encontram-se listados na Tabela 3 e 4 a seguir:

Tabela 3: Padrões de flavonoides utilizados na solução de mistura de padrões.

Padrão	Fórmula molecular/M.M.	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula estrutural
(+)- Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ 290,0790	291,0868	289,0712	
(-)-Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ 290,0790	291,0868	289,0712	
(-)-Epigallocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇ 306,0740	307,0710	305,0667	
(-)-Epigallocatequina galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁ 458,0849	459,0917	457,0961	
(-)-Gallocatequina galato	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁ 458,0849	459,0917	457,0965	

Contin.Tabela 3: Padrões de flavonoides utilizados na solução de mistura de padrões.

Padrão	Fórmula molecular/M.M.	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula estrutural
Isoramnetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₇ 316,0583	317,0661	315,0505	
Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ 610,1534	611,1610	609,1463	
(±)-Narigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅ 272,0684	273,0758	271,0612	
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ 302,0426	303,0280	301,0410	
Apigenina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ 270,0528	271,0600	269,0455	
Apigenina-7-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ 432,1093	433, 1068	431,0978	

Contin.Tabela 3: Padrões de flavonoides utilizados na solução de mistura de padrões.

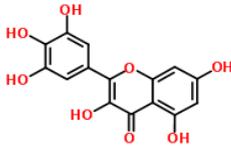
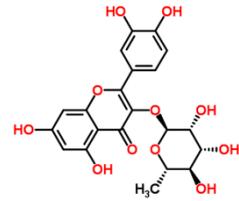
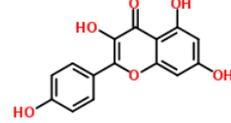
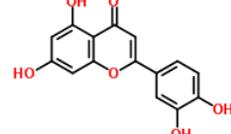
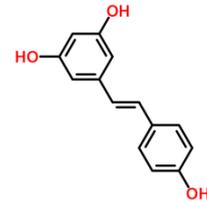
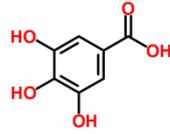
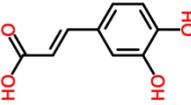
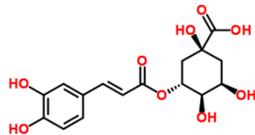
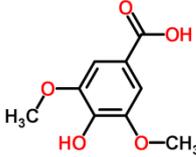
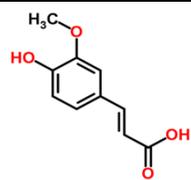
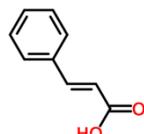
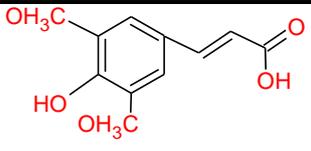
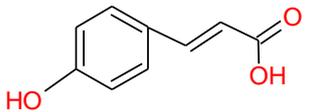
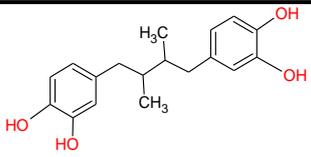
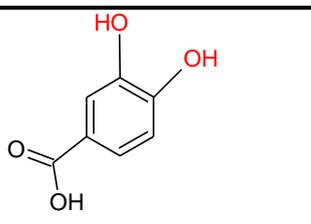
Padrão	Fórmula molecular/M.M.	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula estrutural
Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ 318,0376	319,0449	317,0303	
Quercitrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ 448,1006	449,1252	447,0999	
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ 286,0471	287,0550	285,0329	
Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ 286,0477	287,0550	285,0404	
Resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃ 228,04	229,0713	227,8559	

Tabela 4: Padrões de ácidos fenólicos utilizados na solução de mistura de padrões

Padrão	Fórmula molecular/M.M.	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula estrutural
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅ 170,0215	171,0101	169,0137	
Ácido caféico	C ₉ H ₇ O ₄ 180,1600	171,0212	179,0363	
Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ 354,0951	355,1029	353,0866	
Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅ 198,0528	199,0500	197,0450	
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ 194,0579	195,0569	193,0506	
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	C ₉ H ₈ O ₂ 148,0524	149,0489	147,0498	

Contin. Tabela 4: Padrões de ácidos fenólicos utilizados na solução de mistura de padrões

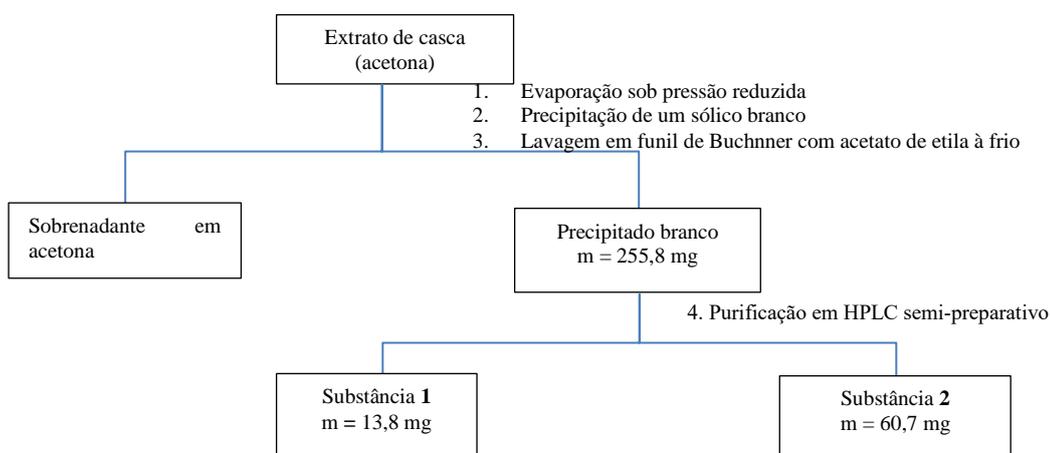
Padrão	Fórmula molecular/M.M.	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula estrutural
Ácido sináptico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅ 224,0685	225,0762	223,0607	
Ácido p-coumárico	C ₉ H ₈ O ₃ 164,0473	165, 0391	163,0395	
Ácido Nordihidroguaiarético	C ₁₈ H ₂₂ O ₄ 302,1518	303,1591	301,1445	
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	C ₇ H ₆ O ₄ 154,0266	155,0267	153,0257	

Após a otimização das condições de análise, foram injetadas a solução de mistura de padrões e as soluções das amostras. Os padrões com massas moleculares idênticas foram injetados individualmente mediante as condições determinadas podendo assim retirar as informações pertinentes à identificação destes quando em mistura.

4.6 Isolamento de substâncias

4.6.1 Casca de mari-mari

A casca e a semente de *C.leiandra* (mari-mari) foram submetidas à maceração em acetona 100% durante 48h e posteriormente em metanol 100% durante 48h. Ambos os solventes foram concentrados sob pressão reduzida e os respectivos extratos secos foram devidamente pesados. Durante a etapa de retirada do solvente em evaporador rotativo, o extrato da casca extraído em 100% de acetona apresentou grande quantidade de um precipitado nas paredes do balão de fundo redondo. O precipitado foi testado quanto à solubilidade em hexano, acetato de etila, acetona, metanol e água. Foi observado que este precipitado é insolúvel em acetato de etila e solúvel em metanol. Procede-se com a lavagem a frio com acetato de etila e filtração em funil de Büchner (Figura 16). Após este procedimento o sobrenadante, precipitado e o extrato de casca foram analisados por CCD e espectrometria de massas e purificação em HPLC semi-preparativo.



Esquema 3: Frações da partição do extrato cetônico de casca de pitomba.



Figura 16: Precipitação e lavagem do sólido branco proveniente do extrato de casca em acetona.

O precipitado ($m = 255,8$ mg) foi submetido à purificação em HPLC semi-preparativo nas seguintes condições: Fase móvel (55% de solvente A- água) (45% de solvente B- metanol grau HPLC), fluxo de 6 mg/mL, coluna Luna C-18 preparativa. Foram coletadas sete frações os quais forneceram duas amostras puras substância **2** (13,8 mg) e substância **1** (60,7 mg).

As amostras puras foram encaminhadas para análises por espectrometria de massas e espectroscopia de RMN de ^1H 1D e 2D para determinação estrutural.

4.7 Quantificação de fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

A quantificação de fenólicos presentes nas amostras de fruto estudadas foi realizada utilizando a metodologia descrita por Velioglu et al. (1998). Este método consiste na utilização do reagente Folin-Ciocalteu, que se trata de uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico. A presença de substâncias fenólicas na amostra é observada pela mudança de coloração da amostra amarela do meio reacional para a coloração azul (analisada em comprimento de onda =725 nm). Para este ensaio, foram preparadas soluções das amostras em MeOH na concentração de 1 mg/ mL. Foram transferidos para um frasco âmbar 200 µL da solução e adicionados 1,5 mL de solução Folin-Ciocalteu 10%. Após 5 minutos, adicionou-se ao meio 1,5 mL de solução NaHCO₃ 6%. Aguardou-se 90 minutos para a leitura do meio no comprimento de onda de 725 nm em espectrofotômetro UV/Visível Femto 800XI.

A determinação foi realizada através da interpolação da curva de ácido gálico, utilizado como padrão. A curva foi construída utilizando soluções padrões nas concentrações de 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicatas utilizando solventes com grau HPLC. Os resultados obtidos para o teor de Fenólicos nas amostras foram expressos em gramas de ácido gálico por grama de extrato seco (g AG/ extrato seco).

4.8 Determinação da atividade antioxidante

4.8.1 Capacidade redutora do Ferro (FRAP)

O ensaio FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power), consiste na medida da capacidade da amostra em reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} , via avaliação da redução do complexo $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ (ferritripiridiltriazina) a ferroso-tripiridiltriazina $[(\text{Fe}^{2+} - (\text{TPTZ})_2)]^{2+}$. Se a amostra apresentar capacidade antioxidante frente a este ensaio haverá a mudança da coloração do meio reacional para azul. Seguindo o procedimento descrito por Luximon-Ramma et al.(2002), foram preparadas soluções metanólicas de 1 mg/mL das amostras a serem analisadas, as quais foram reservadas. Preparou-se então o reagente FRAP, que resulta da reunião das soluções previamente preparadas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, solução de TPTZ [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] 10 mM e da solução tampão de HOAc/OAc 0,3 M e pH 3,6, na proporção de 1:1:10. Em um vidro âmbar foram transferidos 100 μL da solução de 1 mg/mL da amostra a ser analisada, ao qual foram acrescentados 300 μL de água Milli-Q. Em seguida foram adicionados 3 mL do reagente FRAP e após o período de repouso, sobre abrigo de luz por 4 minutos, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/Visível Femto 800XI no comprimento de onda de 593 nm. Os resultados foram expressos em μmol de Fe (II) / mg de extrato seco e calculados por meio da equação de regressão linear, obtida a partir da construção de uma curva analítica de sulfato ferroso nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500, 1000 e 2000 μM .

4.8.2. Captura de radicais livres de DPPH

O método consiste na captura de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-picril-hidraxina) descrito por Choi et al. (2002) que apresentam coloração roxa quando em solução. A caracterização da atividade antioxidante frente a este método é observada pela captura dos radicais livres de DPPH, o que é evidenciado pela mudança da coloração do meio. A capacidade antioxidante medida por esse ensaio é expressa pela a massa de amostra por mL (concentração da amostra) capaz de sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH (CS₅₀). Este cálculo é realizado a partir de gráficos plotados com o percentual da capacidade de sequestro de radicais para cada diluição segundo a fórmula abaixo, onde A= absorbância e concentração da amostra ensaiada.

$$AA \% = 100 - ((A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100) / A_{\text{controle}}$$

O método consiste no preparo de soluções de 1 mg/mL de amostra em MeOH grau HPLC. Em seguida são realizadas 2 diluições para concentrações finais de 0,1 e 0,01 mg/mL. Foi preparada então a solução DPPH 0,2 mg/mL em MeOH grau HPLC. A leitura da absorbância do meio é então realizada após a adição de 1 mL de solução DPPH 0,2 mg/mL a 2,5 mL de amostra, passados os 30 minutos de reação sob o abrigo de luz, em espectrofotômetro a 518 nm. Após essa fase inicial foram determinadas as diluições que serviram para a construção da curva analítica para o cálculo do CS₅₀. Utilizou-se a quercetina como padrão positivo para atividade antioxidante nas concentrações 20, 10, 5,0, 2,5 e 1,25 µg/ mL por diluições sucessivas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimentos de Extratos

5.1.1 Mari-mari

Nesta etapa foram avaliados os rendimentos de cada extrato de mari-mari enfatizando principalmente a capacidade de extrair compostos fenólicos (Tabela 5). Entre os vários métodos de extração de compostos fenólicos os quais envolvem agitação via ultrassom, maceração e extração por Soxlet utilizando diversos sistemas de solvente com variações na proporção. Optou-se por utilizar o método de maceração, pois foi realizada com grande quantidade de material in natura e a escolha dos solventes extratores foi considerando a afinidade dos compostos de interesse com os solventes selecionados. Desta forma, procedeu-se com a extração de aproximadamente 200 g de material de cada fruto em 500 mL de solvente (100% de acetona) para extrair principalmente compostos da classe de fenólicos e realizar uma segunda extração utilizando o mesmo volume (100% de metanol) para extrair especialmente compostos fenólicos glicosilados.

Foi observado que para a polpa de mari-mari, o extrato em acetona apresentou maior variedade de compostos pertencentes à classe de fenólicos, indicadas por CCD (pag. 51), quantificação de fenólicos totais e LC-MS (pag. 59). A extração em metanol apresentou maior seletividade extraíndo principalmente os dois flavonoides glicosilados os quais foram isolados e identificados neste trabalho. Quanto ao rendimento, observa-se claramente que a extração em metanol extraiu maior quantidade

de massa de compostos, visto que este solvente pode extrair além de compostos fenólicos uma grande quantidade de açúcares presentes no fruto. Em termos de seletividade de constituintes de interesse, a acetona extraiu maior variedade de compostos pertencentes à classe de polifenóis e alguns ácidos orgânicos, os quais foram identificados por técnicas espectrométricas.

Tabela 5: Rendimentos dos extratos brutos de mari-mari

Extratos	Solventes extratores	m_{inicial} (g)	m_{extrato} (g)	Rendimento (%)
Polpa	Acetona 100%	200,14	7,82	3,8
Casca	Acetona 100%	360,02	6,75	3,3
Semente	Acetona 100%	220,12	8,46	4,1
Polpa	MeOH 100%	120,18	3,51	2,9
Casca	MeOH 100%	130,25	3,43	2,6
Semente	MeOH 100%	110,66	3,01	2,5

5.1.2 Pitomba

Foram obtidos cinco extratos brutos de pitomba provenientes da polpa, casca e semente. A polpa foi extraída por maceração em 100% de acetona durante 48h. Após este período a torta filtrada foi extraída em 100% de MeOH (Tabela 6). Porém o extrato metanólico resultante de extração sucessiva não apresentou rendimento suficiente e foi necessário fazer um novo extrato em metanol da polpa íntegra de pitomba para que fosse possível fazer análises comparativas. Os extratos foram plotados em placa de CCD de modo normal e reverso com a finalidade de comparar os constituintes presentes

em cada parte de fruto e se os extratos de diferentes solventes apresentavam algumas diferenças nas extrações. Posteriormente cada extrato bruto foi submetido à partição líquido-líquido inicialmente com 100% de hexano para retirar os compostos de baixa polaridade e na sequência a partição com 100% de acetato de etila para obtenção de um extrato que contenha compostos de média polaridade especialmente alguns compostos fenólicos e alguns flavonoides.

Os extratos obtidos da polpa, casca e semente foram denominados como mostra a tabela abaixo com suas respectivas massas.

Tabela 6: Rendimentos dos extratos brutos de pitomba

Parte do fruto	Cód.	Solvente extrator	m _{inicial} (g)	m _{extrato} (g)	Rendimento (%)
<i>Talisia esculenta</i> (polpa)	Tep1	Acetona 100%	155,00	15,3707	13%
<i>Talisia esculenta</i> (polpa)	Tep2	Metanol 100%	189,00	23,1234	17%
<i>Talisia esculenta</i> (casca)	Tec1	Acetona 100%	200,00	2,1163	1,06%
<i>Talisia esculenta</i> (casca)	Tec2	Metanol 100%	197,8837	3,0027	1,52%
<i>Talisia esculenta</i> (semente)	Tes1	Acetona 100%	162,00	2,4088	1,48%
<i>Talisia esculenta</i> (semente)	Tes2	Metanol 100%	159,5912	4,7465	2,98%

5.1.3 Pajurá

Foram obtidos oito extratos brutos de pajurá provenientes da polpa, casca, semente (parte interna e parte externa) (Tabela 7). Foi observado que a extração em

100% de MeOH apresentou um rendimento bastante elevado comparado a outros extratos (39,72 g). Trata-se de um material bastante viscoso e com odor doce bastante pronunciado. Esta observação é bastante coerente com o fato de o pajurá ser um fruto de sabor bastante doce e a extração em 100% de metanol retirou grande parte dos açúcares presentes na polpa. O extrato de polpa obtido através da maceração em 100% de acetona apresentou rendimento bastante inferior (0,8990 g) não chegando a 1, 0 g de amostra. Também foi observado que as demais amostras de pajurá extraídas em 100% de acetona por maceração apresentaram rendimentos mais baixos do que as amostras extraídas em 100% de metanol. Ambos os extratos foram analisados por LC-MS e submetidos a ensaios de investigação de capacidade antioxidante, bem como as demais amostras de casca e semente deste fruto.

Tabela 7: Rendimentos dos extratos brutos de pajurá

Parte do fruto	Cód.	Solvente extrator	m _{inicial} (g)	m _{extrato} (g)	Rendimento (%)
<i>Couepia bracteosa</i> (polpa)	Cbp1	Acetona 100%	220,1358	0,8990	0,41 %
<i>Couepia bracteosa</i> (polpa)	Cbp2	Metanol 100%	229,2368	39,7216	18,11 %
<i>Couepia bracteosa</i> (casca)	Cbc1	Acetona 100%	80,2634	0,5689	0,70 %
<i>Couepia bracteosa</i> (casca)	Cbc2	Metanol 100%	79,6945	4,7199	5,92 %
<i>Couepia bracteosa</i> (amêndoas)	Cbsd1	Acetona 100%	86,2639	0,1836	0,21 %
<i>Couepia bracteosa</i> (amêndoas)	Cbsd2	Metanol 100%	83,2737	2,9902	3,47 %
<i>Couepia bracteosa</i> (semente)	Cbsf1	Acetona 100%	66,25991	0,2460	0,37 %
<i>Couepia bracteosa</i> (semente)	Cbsf2	Metanol 100%	66,3531	2,6255	3,96 %

5.2 Comparação dos extratos por CCD

5.2.1 *Mari-mari*

A comparação por cromatografia de fase reversa foi utilizada para obter um perfil com preliminar e para detectar a presença de substâncias fenólicas, visto que foi utilizado revelador FeCl_3 10% para compostos fenólicos. Foram testados vários sistemas de eluentes, sendo MeOH/água (6:4) o melhor eluente para ultrassom-casca (2), maceração-casca(5), ultrassom-casca(10), como pode ser visto na Figura 17 que apresentou uma boa separação apenas para os extratos de extrato de casca (acetona) (2) e extrato de casca (metanol) (5), onde foi possível observar a presença de fenólicos uma vez que foi utilizado revelador FeCl_3 10%, enquanto os demais extratos: extrato de polpa (acetona) (1), extrato de semente (acetona) (3), extrato de polpa (metanol) (4), extrato de semente (metanol) (6), que além de ficarem retidos na base, não apresentou manchas intensas características de flavonoides.

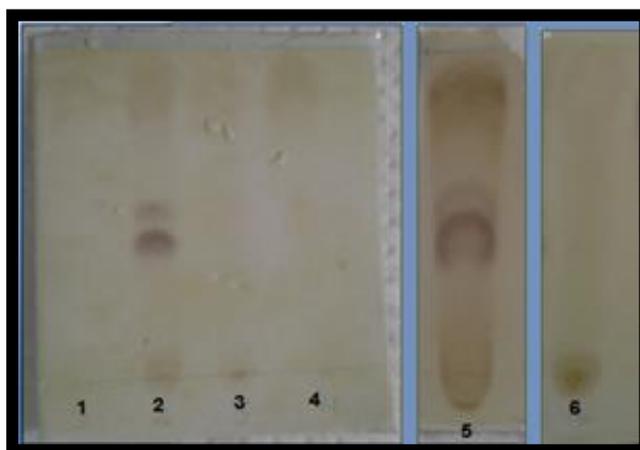


Figura 17: CCD dos extratos de polpa de mari-mari (acetona) (1), de casca de (acetona) (2), de semente (acetona) (3), de polpa (metanol) (4), de casca (metanol) (5), de semente (metanol) (6).

5.2.2 Pitomba

Após a partição as amostras de pitomba extraídas em acetato de etila e as hidroalcoólicas foram comparadas por CCD em fase reversa sendo observado que os dois extratos de casca da pitomba, particionados com acetato de etila, apresentaram grande semelhança (Figura 18). O extrato hidroalcoólico da casca apresentou uma coloração mais intensa em relação às demais da mesma amostra ao ser revelada na luz UV (365 nm) e com o revelador NP-PEG indicando a presença de flavonoides nos respectivos extratos.

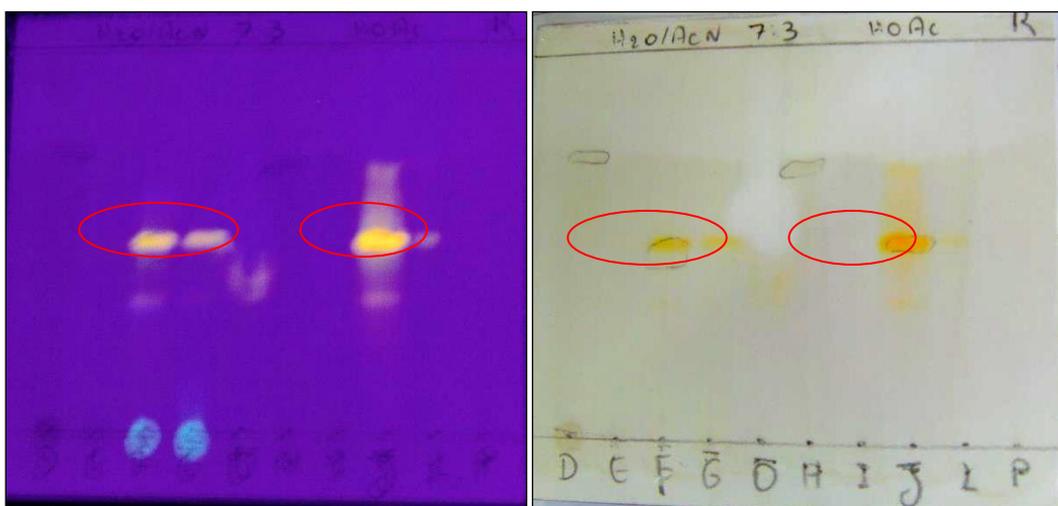


Figura 18: CCD das amostras de partição líquido-líquido dos extratos de pitomba revelado em NP-PEG e observados sob luz UV 365 nm.

5.3 Caracterização de compostos fenólicos por LC-MS

Muitas metodologias analíticas foram desenvolvidas para detectar e quantificar os flavonoides, principalmente usando técnicas hífenadas para rápida caracterização destes compostos como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de espectro de UV-VIS acoplado a espectrômetro de massas (GATES & LOPES 2012).

Uma variedade de bancos de dados comerciais foram desenvolvidos para auxiliar na identificação de compostos, como o Scifinder, MASSBANK e CrossFire Commander (NIKOLIC et al., 2012). Porém na ausência de informações para os compostos investigados, a criação de um banco de dados próprio para o trabalho é bastante útil usando padrões disponíveis analisados nas mesmas condições e aparelhagem.

Após tratamento em extração em fase sólida (SPE), os extratos obtidos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (LC-MS). A caracterização dos compostos fenólicos dos extratos de polpa, casca e semente dos frutos estudados foi realizada baseada na comparação com o tempo de retenção e razão m/z dos padrões no modo positivo e modo negativo de flavonoides e ácidos fenólicos. Neste trabalho as amostras apresentaram melhor detecção no modo negativo, desta forma este dado foi utilizado para a caracterização dos compostos identificados nos extratos dos frutos.

Na tabela 8 são apresentados os dados correspondentes aos padrões de compostos fenólicos e em seguida o cromatograma no modo negativo (Figura 19) utilizados neste trabalho para auxiliar na caracterização de compostos dos frutos estudados.

Tabela 8: Tempo de retenção dos padrões de compostos fenólicos eluídos em coluna PFP

Pico nº	tr (min)	[M-1]⁻ Erro (ppm)	Padrão
1	4,0	169,0194 (1,7)	Ácido Gálico
2	6,7	153,0243 (1,3)	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico
3	10,4	305,0785 (-3,9)	(-)- Epigallocatequina
4	10,9	289,0827 (-3,8)	(+)- Catequina
5	11,3	353,0866 (-1,7)	Ácido Clorogênico
6	12,4	179,0417 (0,1)	Ácido Caféico
7	13,5	289,0834 (-4,1)	(-)-Epicatequina
8	14,8	457,0961 (7,2)	(-)-Epigallocatequina galato
9	15,9	457,0965 (-5,9)	(-)-Galocatequina galato
10	15,5	163,0460 (1,2)	Ácido <i>p</i> -cumárico
11	17,1	609,1710 (-4,2)	Rutina
12	17,5	193,0506 (-6,2)	Ácido Ferúlico
13	17,5	223,0696 (-4,0)	Ácido Sinápico
14	19,7	447,1131 (-21)	Quercitrina
15	23	431,0969 (-7,4)	Apigenina-7-glucosídeo
16	23,2	227,0811 (-4,4)	Resveratrol
17	24,4	317,0303 (0,1)	Miricetina
18	28,6	271,0743 (-7,0)	(±)-Narigenina
20	29	301,1587 (-8,0)	Quercetina
21	29,6	285,0537 (17)	Kaempferol
22	29,6	285,0404 (-7,3)	Luteolina
23	29,9	315,0654 (-6,6)	Isorramnetina
24	31,6	269,0455 (0,2)	Apigenina
25	36,1	301,1445 (-7,0)	Ácido Nordiidroguaiarético

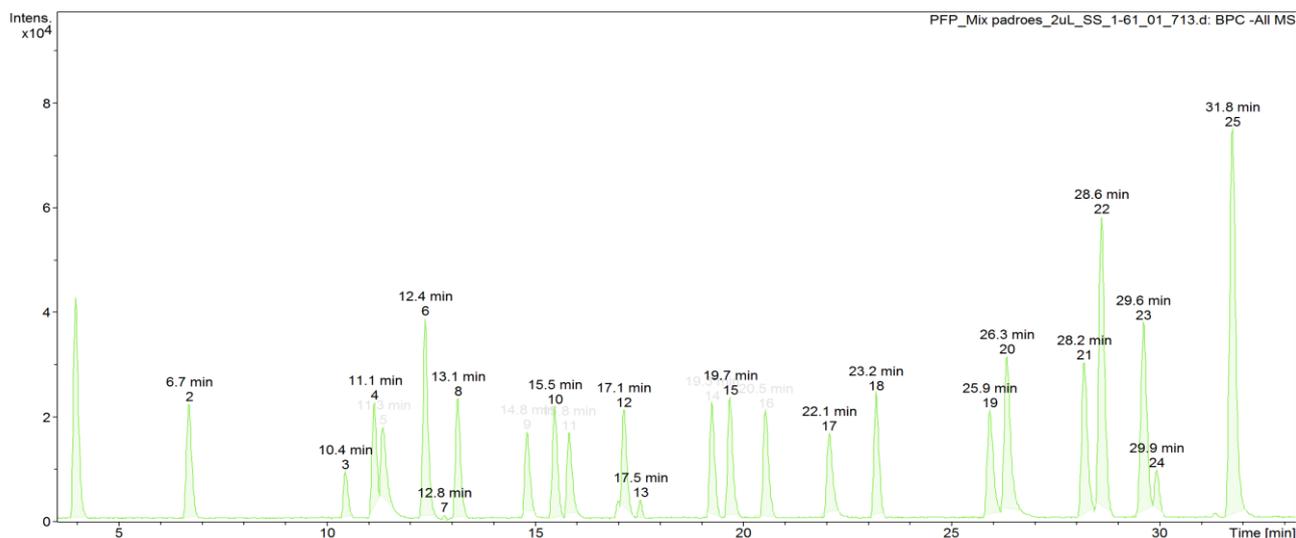


Figura 19: Cromatograma BPC dos padrões de compostos fenólicos

5.3.1 *Mari-mari*

Foram identificados na polpa, casca e semente no extrato cetônico, dois flavonoides glicosilados previamente isolados das cascas do fruto e alguns compostos são sugestões de identificação utilizando LC-MS (Figura 20). Cada pico foi identificado através do espectro de massas no modo negativo e suas respectivas fragmentações comparando os dados fornecidos com os padrões disponíveis e dados da literatura. Todos os compostos apresentaram baixo erro (<3,7 ppm) indicando a precisão de massa exata e fórmula molecular obtida. Na Tabela 9 são listados os compostos identificados incluindo os tempos de retenção, massa molecular experimental e calculado, fórmula molecular, erro (desvio entre a massa medida e massa teórica), os principais fragmentos (MS/MS) e a proposta de composto.

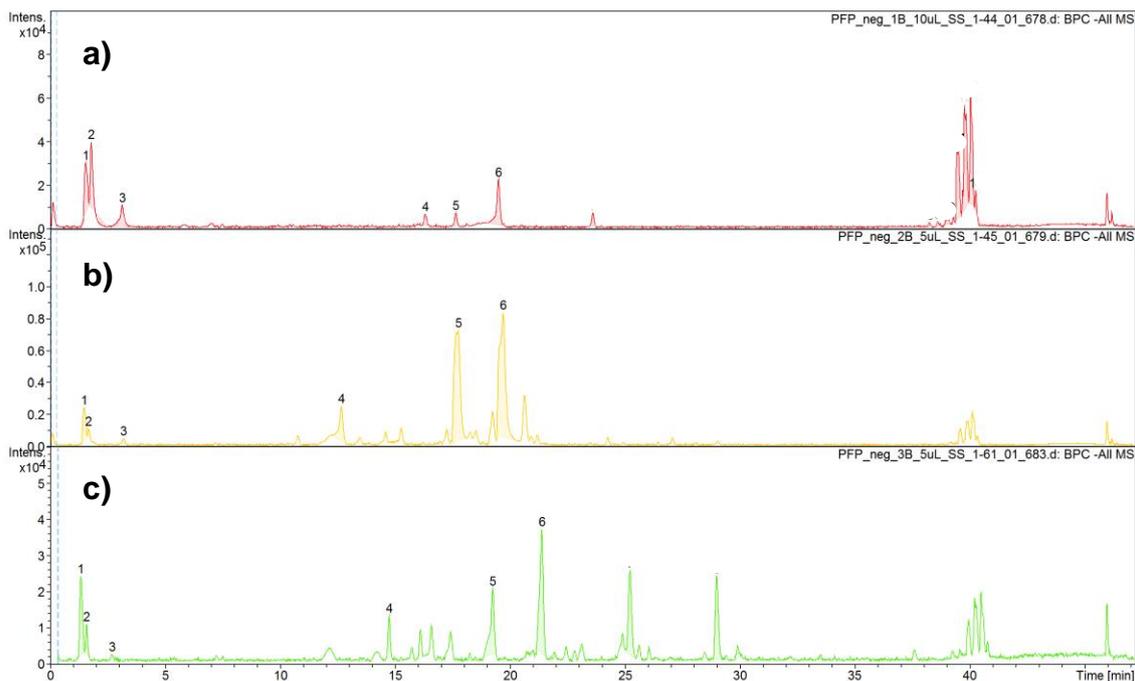


Figura 20: Comparação dos cromatogramas BPC modo negativo das amostras de polpa a), casca b) e semente c) de mari-mari extraído em acetona.

No LC-MS da polpa o pico **1** em 1,5 min apresentou íon molecular em m/z 387,1275 com principais fragmentos em m/z 341, 179, 135 e 89. Os fragmentos sugerem que o composto seja um derivado de ácido cafeico hexosídeo cujo fragmento principal em m/z 341 corresponde à perda de CO_2 seguida pela perda de hexosídeo $[\text{M}-144-146]^-$ representado pelo íon em m/z 179 coerente com o ácido cafeico e os fragmentos característicos em m/z 135 e m/z 89. Estes dados comparados com a literatura sugerem que a substância seja um derivado do cafeoil-hexosídeo (CHEN, INBARAJ & CHEN, 2012). O pico **2** em tr 1,8 min, apresentou m/z 191,0271 coerente com o ácido cítrico confirmado pelos fragmentos em m/z 173 correspondente a perda de $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ e m/z 111 resultante da perda de $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-2\text{H}_2\text{O}]^-$ (ISWALDI et al., 2013; DUNN et al., 2005; GÓMEZ-ROMERO et al., 2010).

O pico **3** com *tr* de 3,1 minutos, íon precursor em m/z 191,0203, apresentou fragmento em m/z 114. Porém a identificação deste não foi possível, pois não foram encontradas sugestões de compostos que apresentem uma fórmula molecular coerente com esta fragmentação.

No *tr* 16,3 min, o pico **4** com íon precursor em m/z 561,1907, foi identificado como um composto pertencente à classe de proantocianidinas. Os principais relatos de proantocianidinas são referentes a compostos cujas unidades monoméricas são ligadas diretamente a carbonos (C-3 e C-4) nos anéis. (HEMINGWAY, 1989; PORTER, 1994). Neste caso, os fragmentos característicos observados por espectrometria de massas para esta classe seria a perda de $[M-H-152]^-$ (Figura 21). Nesta amostra, foi observado que este dímero apresenta as unidades monoméricas ligadas por um grupo éter (C4-O-C3), apresentando como principais fragmentos a perda de $[M-1-272]^-$ em m/z 289, fragmentos correspondentes à perda de H₂O e CO₂, m/z 543 e m/z 517, respectivamente. Fragmentos resultantes da clivagem do anel A foram confirmados pelo íon em m/z 227. Os fragmentos com m/z 425 e m/z 135 foram atribuídos à clivagem Retro Diels-Alder. O íon em m/z 435 corresponde à perda de 1,2,3-benzenotriol $[M-H-126]^-$ (Figura 22). Estes dados em conjuntos com a precisão da massa molecular sugerem esse composto como epioritina-(4 β →3)-epioritina-4 β -ol, pertencente a classe rara de conhecidas proantocianidinas éter-ligadas, os quais foram reportadas previamente em espécies de *Acacia caffra* pertencentes à família Leguminosae, descrita por Bennie, Malan, Coetzee & Ferreira (2000).

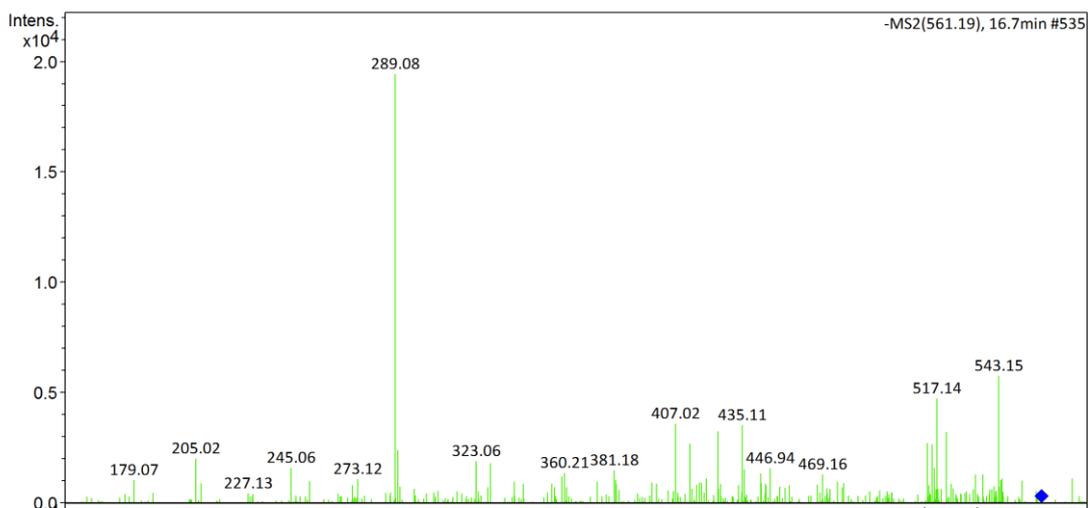


Figura 21: Espectro de MS² com os principais fragmentos do pico 4.

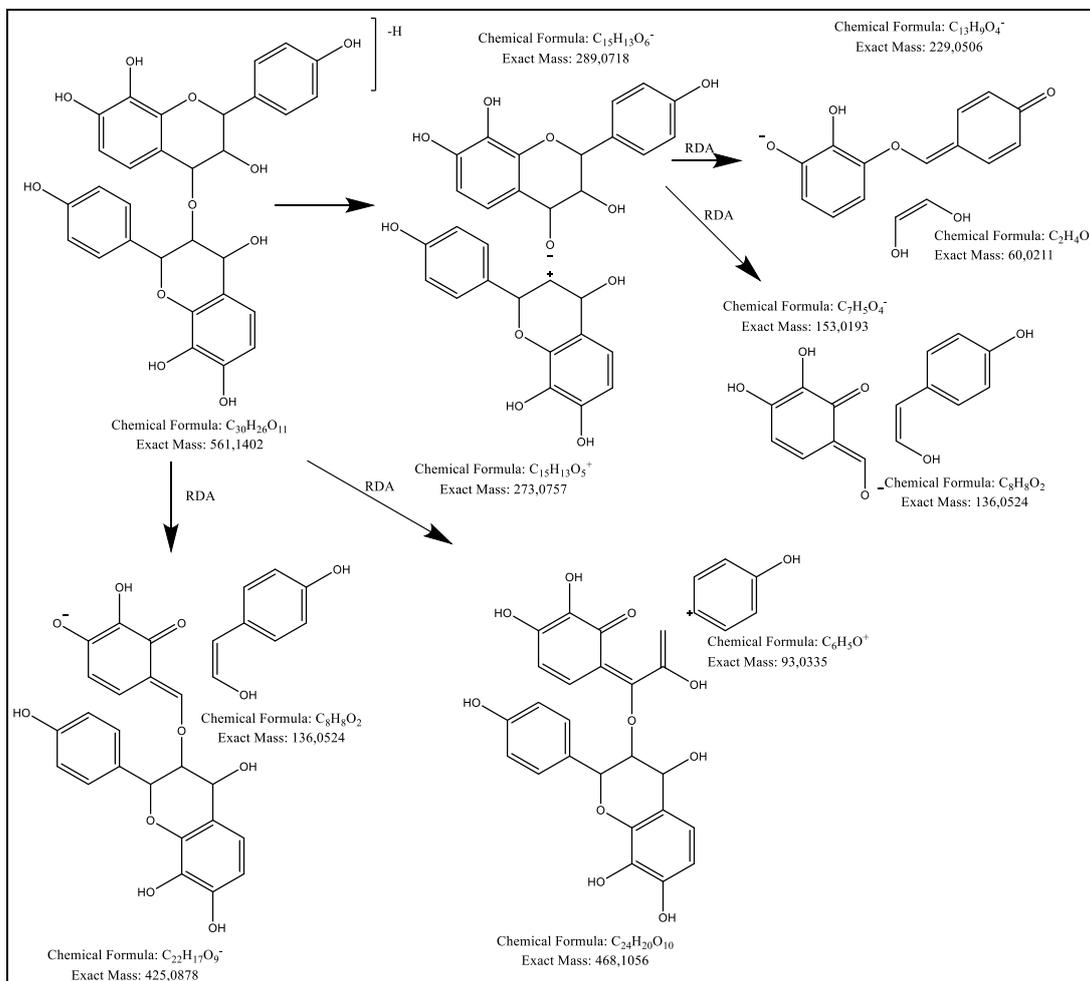


Figura 22: Proposta de fragmentação para o pico 4 *RDA= Retro Diels Alder

O pico **5** (*tr* 17,6 min) com íon precursor em m/z 449,1258 apresentou íons filhos em m/z 303, correspondente a perda de $[M-H-rhamnosil]^-$, 303, 215, 145, 89. A perda seguinte em $[M-H-18]^-$ correspondente à perda de água é confirmada pela presença do íon em m/z 285 foi identificada como astilbina. A análise do pico **6** apresentou a molécula desprotonada em m/z 433 $[M-H]^-$ e íons filhos em m/z 287 $[M-H-146]^-$ caracterizando a perda de glicosídeo e em m/z 269 $[M-H-18]^-$ correspondente a perda de água. Este pico corresponde a engeletina respectivamente, cujo isolamento e identificação destes compostos são relatados neste trabalho. Para os picos **3** e **7** em m/z 191,0203 $[M-H]^-$ e m/z 605,2768 $[M-H]^-$ não foi possível a tentativa de identificação.

Observando os cromatogramas BPC dos extratos de polpa em acetona e em metanol (Figura 23), observa-se que ambos apresentam a maioria dos identificados por LC-MS, com exceção do ácido cítrico, o derivado de cafeoil-hexosil e a proantocianidina que foram detectados apenas no extrato em acetona o qual extraiu parte considerável de compostos fenólicos.

A comparação dos extratos de cascas em acetona e em metanol (Figura 24) mostra um perfil bastante semelhante ao que foi observado para os extratos de polpa de mari-mari. Vale ressaltar a abundância dos flavonoides astibina (m/z 449) e engeletina (m/z 433) em ambos os extratos.

Nos extratos de semente extraídos em acetona e em metanol, os cromatogramas BPC (Figura 25) apresentaram foram identificados os flavonoides (astilbina, engeletina e epioritina-(4 β →3)-epioritin-4 β -ol) encontrados na polpa e nas cascas do fruto.

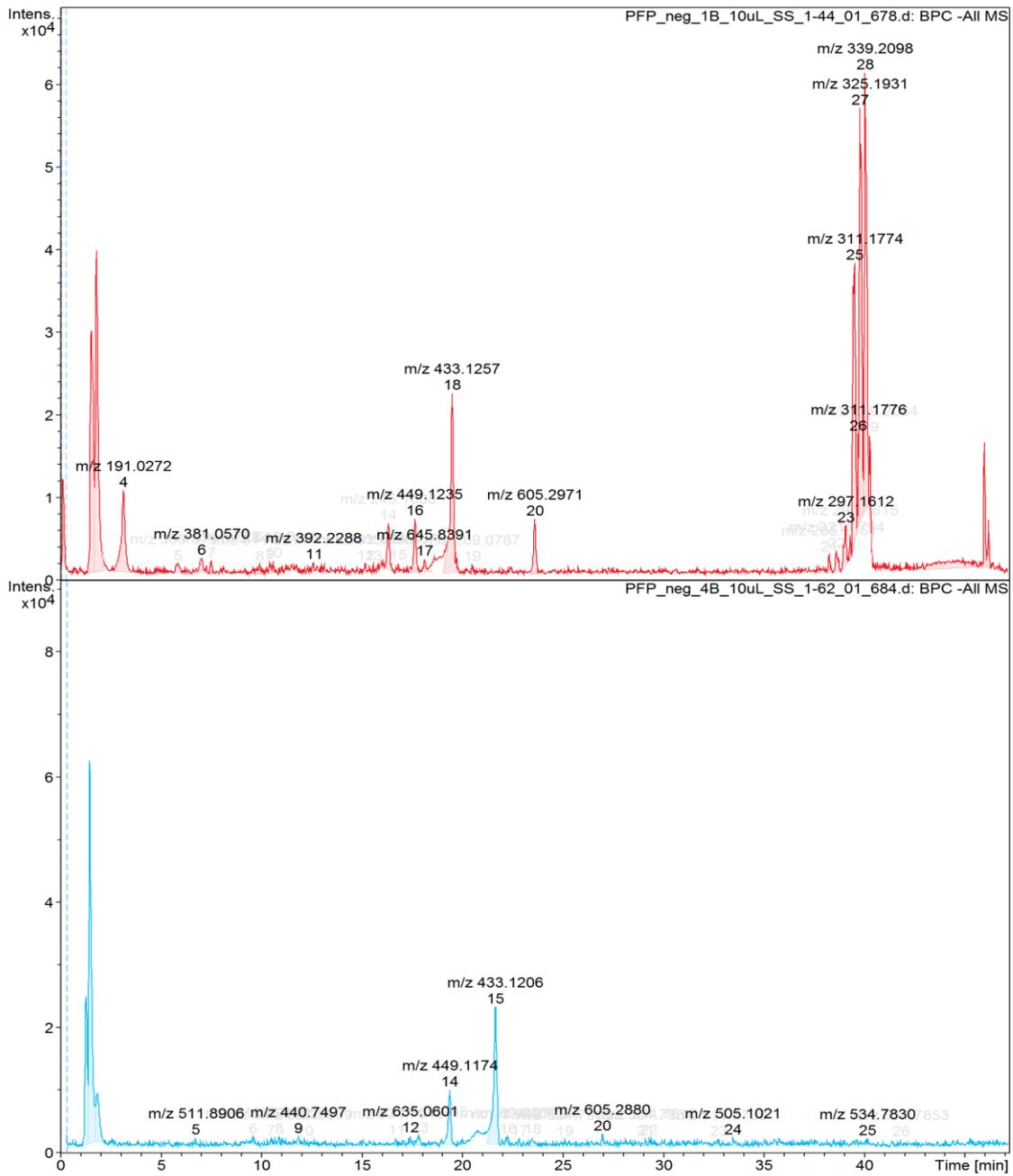


Figura 23: Comparação dos cromatogramas das amostras de polpa de mari-mari extraído a) em 100 % de acetona e b) 100% de metanol.

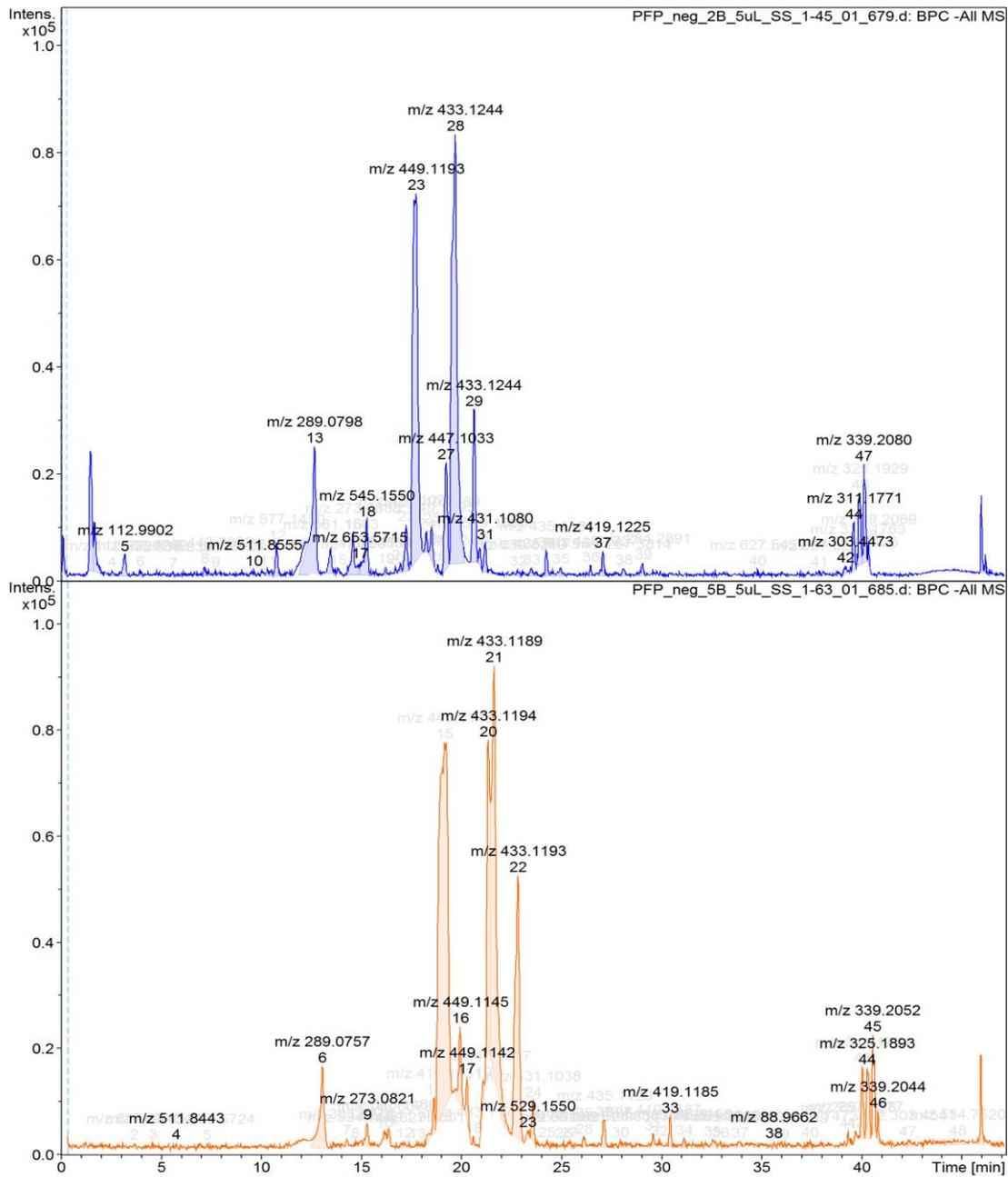


Figura 24: Comparação dos cromatogramas das amostras de casca de mari-mari extraído em a) 100 % de acetona e b) 100% de metanol.

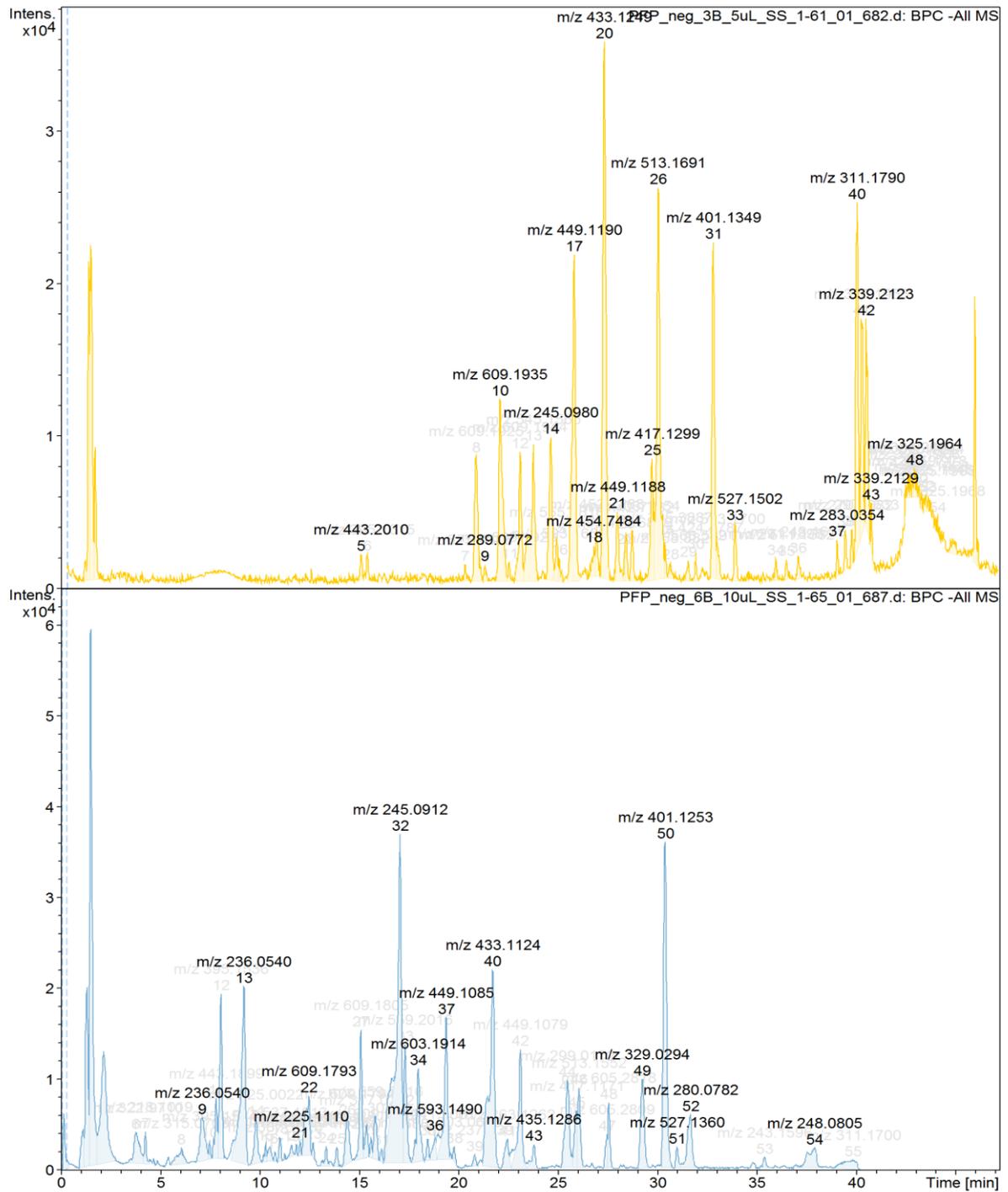


Figura 25: Comparação dos cromatogramas das amostras de semente de mari-mari extraído em 100 % de acetona e 100% de metanol.

Tabela 9: Dados de LC-MS das amostras do fruto de mari-mari

Composto	tr (min)	Experimental m/z	Teórico m/z (erro em ppm)	MS/MS Fragmentos	Possível substância	Polpa		Casca		Semente	
						A	M	A	M	A	M
1	1,5	341,1080	341,0878 (58)	179, 135, 89	Derivado de Cafeoil- hexosídeo	X					
2	1,8	191,0198	191,0197 (0,2)	173, 111,	Ácido cítrico	X					
3	3,1	191,0203	-	114	Desconhecido	X					
4	16,3	561,1415	561,1402 (2,2)	289,	Epioritina- (4 β →3)- epioritina-4 β - ol	X	X	X	X	X	X
5	17,6	449,0773	449,1089 (3,7)	303, 254, 215,145,89	Astilbina	X	X	X	X	X	X
6	19,8	433,1100	433,1140 (-9,4)	287,269	Engeletina	X	X	X	X	X	X
7	23,6	605,2768		315, 289	Desconhecido	X	X				

*A= extraído em acetona; M= extraído em metanol.

5.3.2 Pitomba

Foram identificados no cromatograma BPC do extrato em metanol de polpa de pitomba (Figura 26) compostos fenólicos e flavonoides utilizando como técnica identificação LC-MS. Cada pico foi identificado através do espectro de massas e suas respectivas fragmentações comparando os dados fornecidos com os padrões disponíveis e dados da literatura. Todos os compostos apresentaram erro abaixo de 22 ppm indicando a precisão de massa exata e fórmula molecular obtida. Na Tabela 10 são listados os compostos identificados incluindo os tempos de retenção, massa molecular

experimental e calculado, fórmula molecular, erro (desvio entre a massa medida e massa teórica), os principais fragmentos (MS/MS) e a tentativa de identificação do composto.

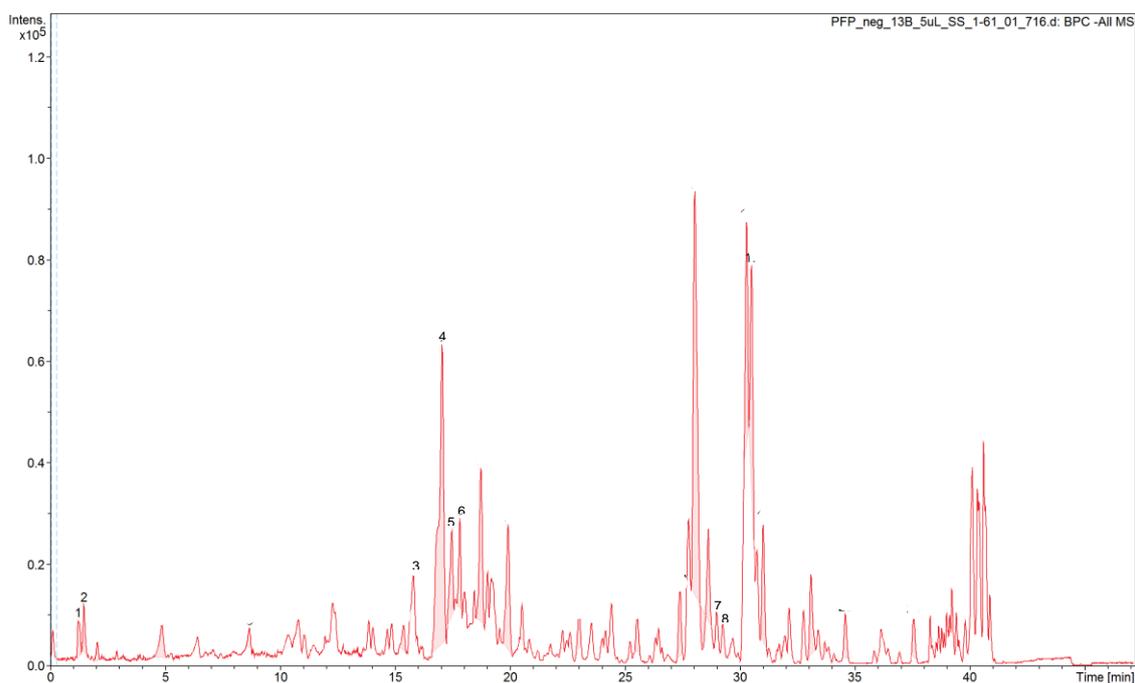


Figura 26: Cromatograma BPC do extrato em acetona de polpa de pitomba.

A análise dos dados conduziu à identificação do pico **1** como ácido quínico (*tr* 1,1 min) com íon precursor em m/z 191,0575 apresentando íons produtos em m/z 173 m/z 127, m/z 111, m/z 93 e m/z 85 compatíveis com dados da literatura (BASTOS et al, 2007). O pico **2** foi identificado como ácido gálico (*tr* 1.5 min) apresentando íon precursor em m/z 169,0142 com perda característica de CO_2 $[\text{M-H} - 44]^-$ (QUIFERRADA et al, 2015). O composto **3** foi identificado ácido *p*-coumárico (m/z 163,0423). Os experimentos de MS^2 apresentaram perdas de características de CO_2 $[\text{M-H} - 44]^-$ (VALLVERDÚ-QUERALT, DE ALVARENGA, ESTRUCH, & LAMUELA-RAVENTOS, 2013).

No extrato metanólico de polpa e cetônico de cascas foram identificadas a epicatequina (**4**) e catequina (**5**) apresentam íon precursor em m/z 289,0730 e 289,0732 com fragmentos característicos em m/z 245, m/z 205, m/z 203, m/z 179, m/z 125, m/z 109 (Figura 27) (KOOLEN et al, 2013).

A rutina (**6**) de razão m/z 609,1461 Da foi identificada no (*tr*) 18,8 min apresentando como principal fragmento m/z 301 correspondente a perda de uma porção de rutinose desidratada $[M-H-308]^-$ (HOSSAIN et al, 2010).

Nos cromatogramas de extrato de polpa em metanol e extrato de semente em acetona de pitomba, os picos **7** e **8** foram identificados os flavonoides naringenina em (*tr*) 29,1 minutos com m/z 271,0703 $[M-H]^{-1}$ e luteolina em (*tr*) 29,6 minutos com m/z 285,0501 $[M-H]^{-1}$ (Figura 28). Em ambos os extratos de casca, foram identificados no cromatogramas BPC à presença do íon m/z 609 $[M-H]^{-1}$ correspondente à rutina (Figura 29).

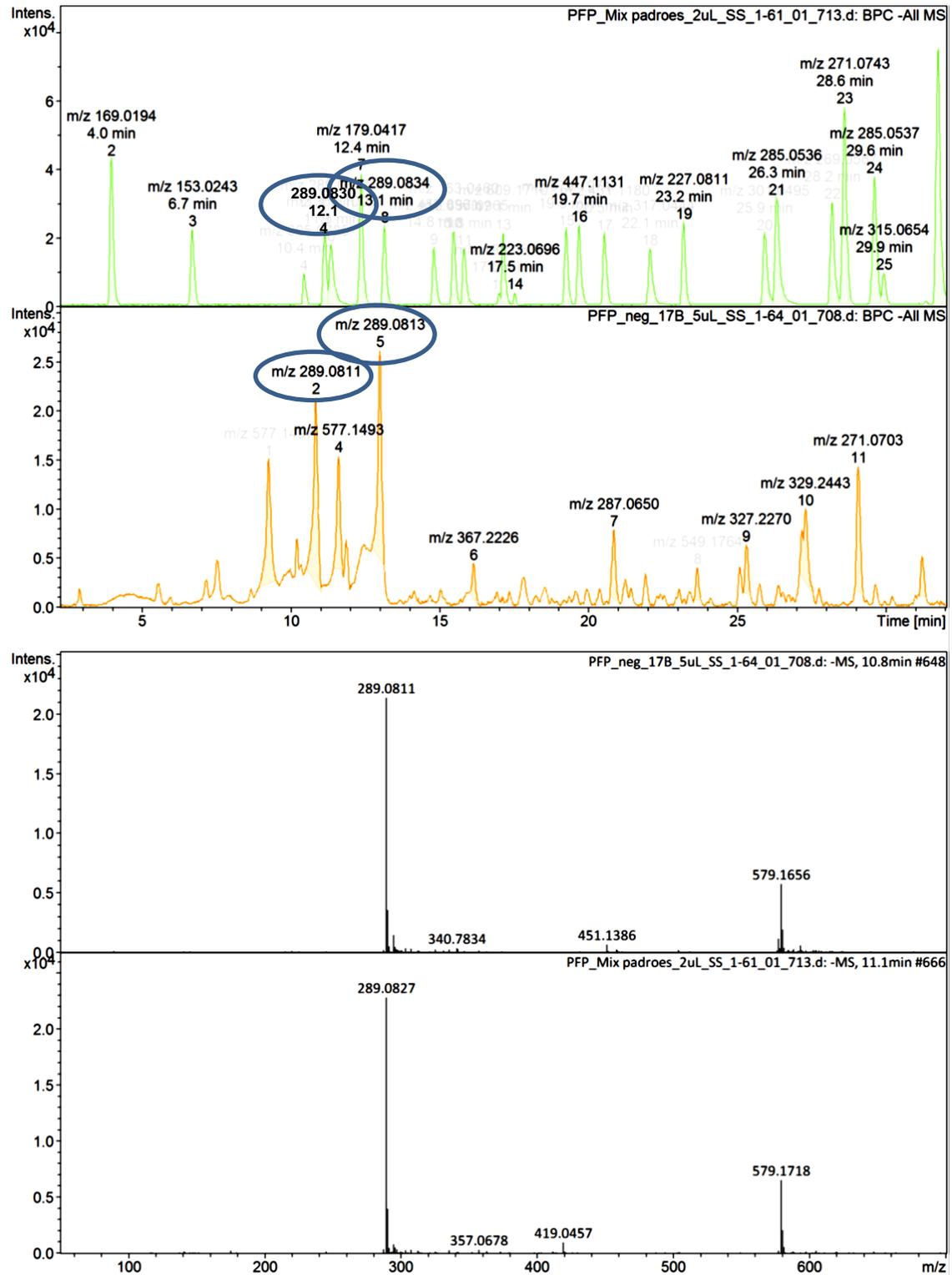


Figura 27: Cromatograma BPC (modo negativo) do extrato de semente extraído em acetona em comparação com o mix de padrões. Detecção de catequina e epicatequina m/z 289.

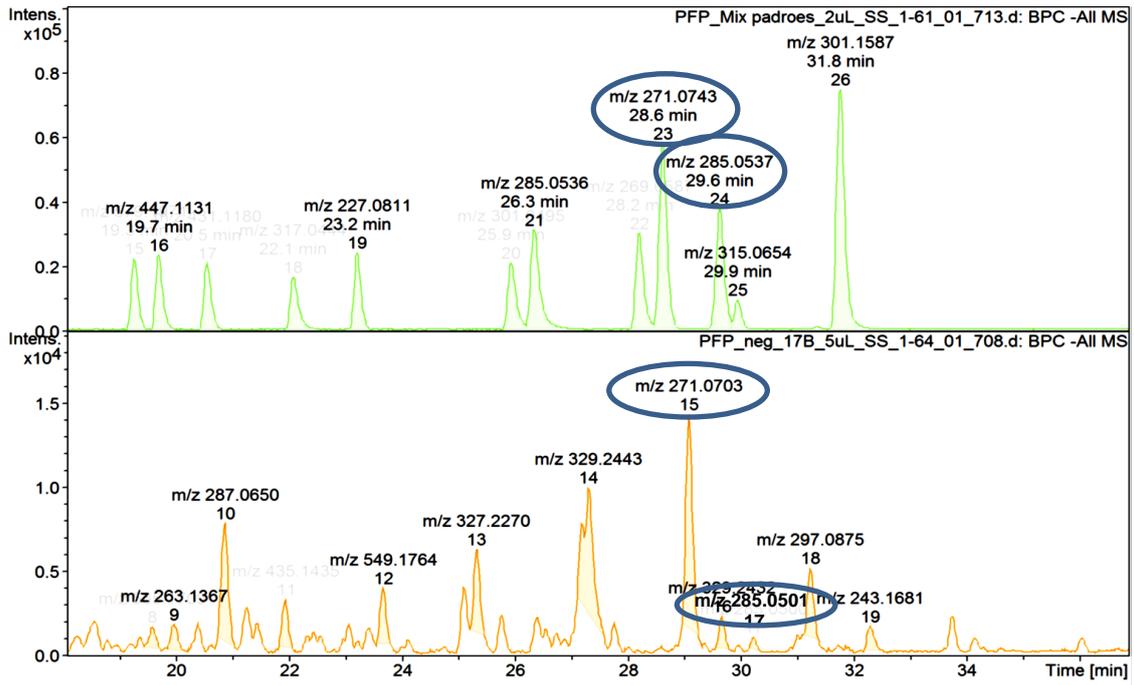


Figura 28: Cromatogramas BPC da mistura de padrões de fenólicos e cromatograma BPC do extrato de semente de pitomba extraído em acetona com detecção dos íons m/z 271 e 285 correspondente à naringenina e luteolina respectivamente.

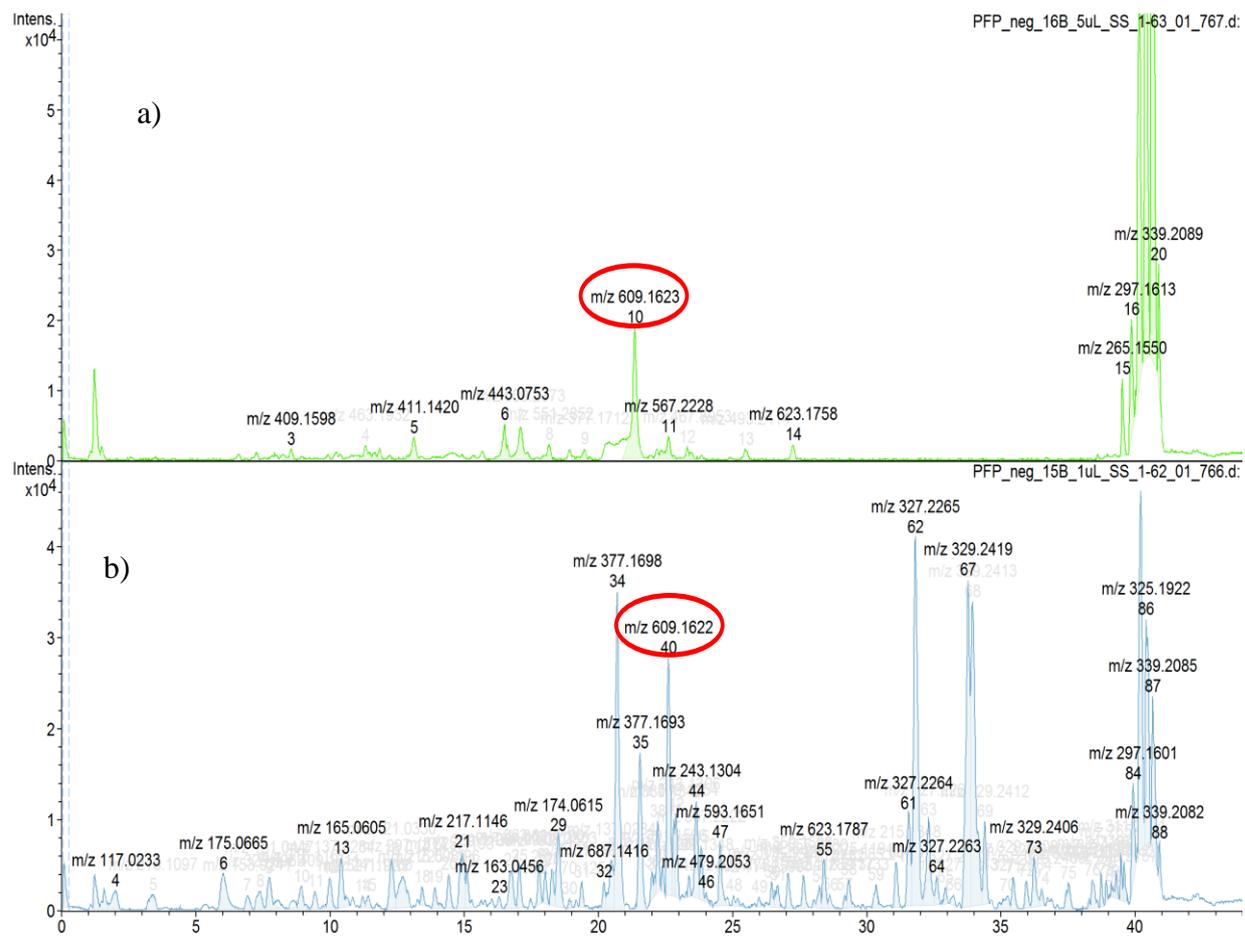


Figura 29: Comparação entre os cromatogramas BPC dos extratos de casca de pitomba a) extraído em acetona b) extraído em metanol e detecção de rutina (m/z 609).

Tabela 10: Dados de LC-MS das amostras do fruto de pitomba

Composto	<i>tr</i> (min)	Experimental <i>m/z</i>	Teórico <i>m/z</i> (erro em ppm)	MS/MS Fragmentos	Tentativa de identificação	Polpa		Casca		Semente	
						A	M	A	M	A	M
1	1,1	191,0575	191,0561 (7)	173, 127, 111, 93, 85	Ácido quínico	X					
2	1,5	169,0146	169,0142 (2,36)	125	Ácido gálico	X					
3	15,5	163,0423	163,0401 (13)	119	Ácido <i>p</i> -coumarico	X					
4	17,4	289,0732	289,0718 (5)	245, 205, 203, 179, 125, 109	Catequina	X	X	X	X	X	
5	17,9	289,0730	289,0718 (4)	245, 205, 203, 179, 125, 109	Epicatequina	X		X		X	
6	18,8	609,1490	609,1461 (5)	301	Rutina						
7	29,1	271,0703	271,0612 (6)	253	Naringenina	-	-	X	X	X	X
8	29,6	285,0501	285,0404 (22)	267, 215	Luteolina	-	-	-	-	X	X

*A= extraído em acetona; M= extraído em metanol.

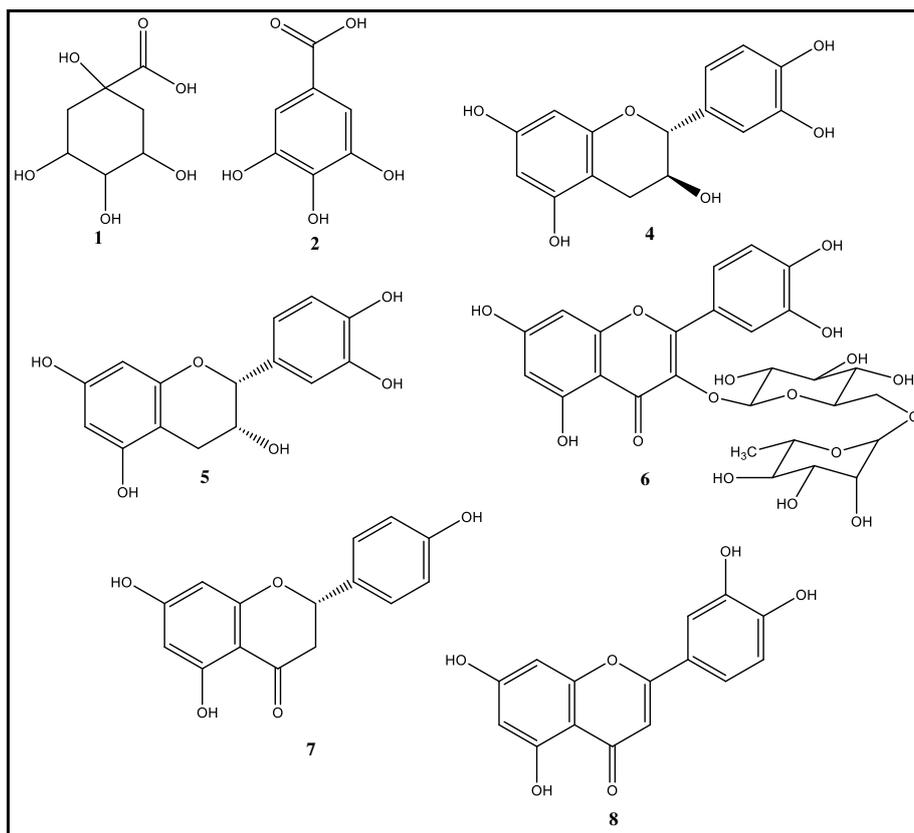


Figura 30: Constituintes identificados nas polpas, cascas e sementes de pitomba.

5.3.3 Pajurá

A comparação dos cromatogramas referentes aos extratos de polpa do pajurá extraídos em acetona e em metanol (Figura 31) mostrou grande diferença de constituintes. Na Tabela 11 são listados os dados de alguns constituintes cuja tentativa de identificação foi sugerida.

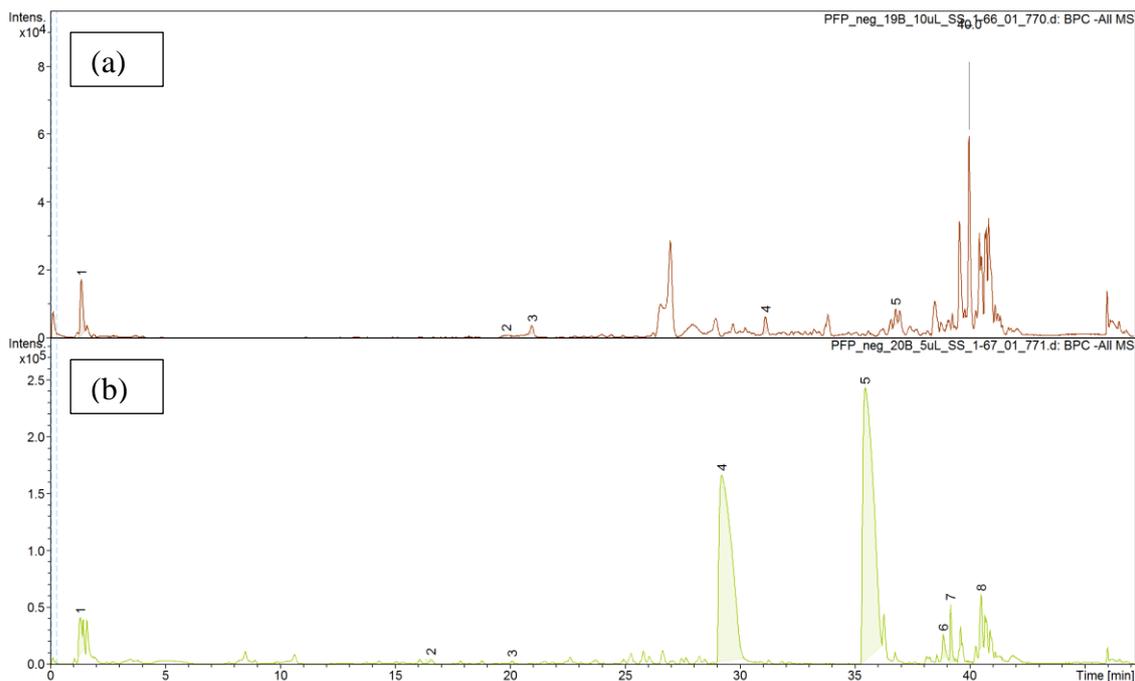


Figura 31: Comparação entre os cromatogramas de polpa de pajarú (a) extraído em acetona; (b) extraído em metanol.

No extrato de polpa em metanol observou-se a predominância dos picos **4** e **5** correspondentes aos íons m/z 363,0221 e m/z 377,0381 os quais não coincidem com nenhum dos padrões disponíveis. Relatos recentes mostraram que estes íons correspondem a sulfato de acetina, sulfato de apigenina e oleuropeína aglicona (Figura 32) (BERTO et al, 2015). Os mesmos foram observados no extrato em acetona de polpa de pajarú, porém em pequena quantidade.

Os íons observados no extrato em acetona de pajarú foram comparados com íons de ácidos orgânicos e principalmente açúcares. O pico **1** presente em ambos os extrato de polpa apresentou o íon em m/z 179,0562 (t_r 1,4 min) com fragmentos em m/z 161 e m/z 89 foi sugerido como ácido cafeico confirmado pela comparação com o padrão e com os fragmentos característicos.

Os picos **2** e **3** do extrato em acetona (Figura 31) cujos íons em m/z 173,0817 (tr 19,8 min) e 173,0816 (tr 21,0 min), porém como o erro relativo considerado alto para a sugestão de identificação deste composto, a sua identificação não foi possível.

Tabela 11: Dados de LC-MS das amostras do fruto de pajurá

Composto	tr (min)	Experimental m/z	Teórico m/z (erro em ppm)	MS/MS Fragmentos	Sugestão de identificação	Polpa		Casca		Semente		Amen- doas	
						A	M	A	M	A	M	A	M
1	14,0	179,0562	-	161, 89	Ácido cafeico	X	X	X	X	X	X	X	X
2	19,8	173,0817	-	-	Desconhecido	X	X	-	-	-	X	-	-
3	21,0	173,0816	-	-	Desconhecido	X	X	-	-	-	-	-	-
4	30,0	363,0221	363, 0201 (-5,5)	-	Sulfato de acetina	X	X	X	X	X	X	X	X
5	35,0	377,0381	377,0361 (-5,3)	-	Oleuropeína aglicona	X	X	-	-	X	X	X	X
6	32,0	271,0699	271,0612 (32)		Naringenina	-	-	-	-	-	-	X	X
7	25,0	349,0044	349,0024 (5,7)	-	Sulfato de apigenina	-	-	X	-	X	X	X	X

*A= extração em acetona; M= extração em metanol.

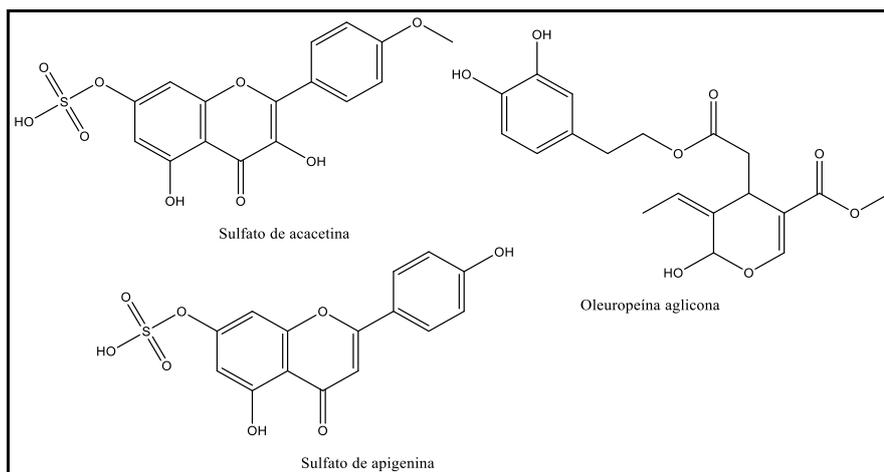


Figura 32: Flavonoides identificados na polpa de pajurá extraída em metanol

No extrato cetônico de amêndoas de semente foram identificados sulfato de acetina (m/z 363), sulfato de apigenina (m/z 349) e naringenina. No extrato metanólico foram detectados apenas os sulfatos de acetina e apigenina em abundância. O perfil dos extratos (Figura 32) mostrou que o extrato metanólico apresenta maior variedade de constituintes que talvez não sejam pertencentes à classe de compostos fenólicos. A extração em acetona mostrou que além dos sulfatos de flavonoides, extraiu naringenina, talvez seja um indicativo de que a acetona seja um solvente extrator mais apropriado para este material do que o metanol, que apesar de extrair mais compostos, é menos seletivo, pois além de extrair compostos de interesse pode extrair açúcares, que são predominantes nesta matriz.

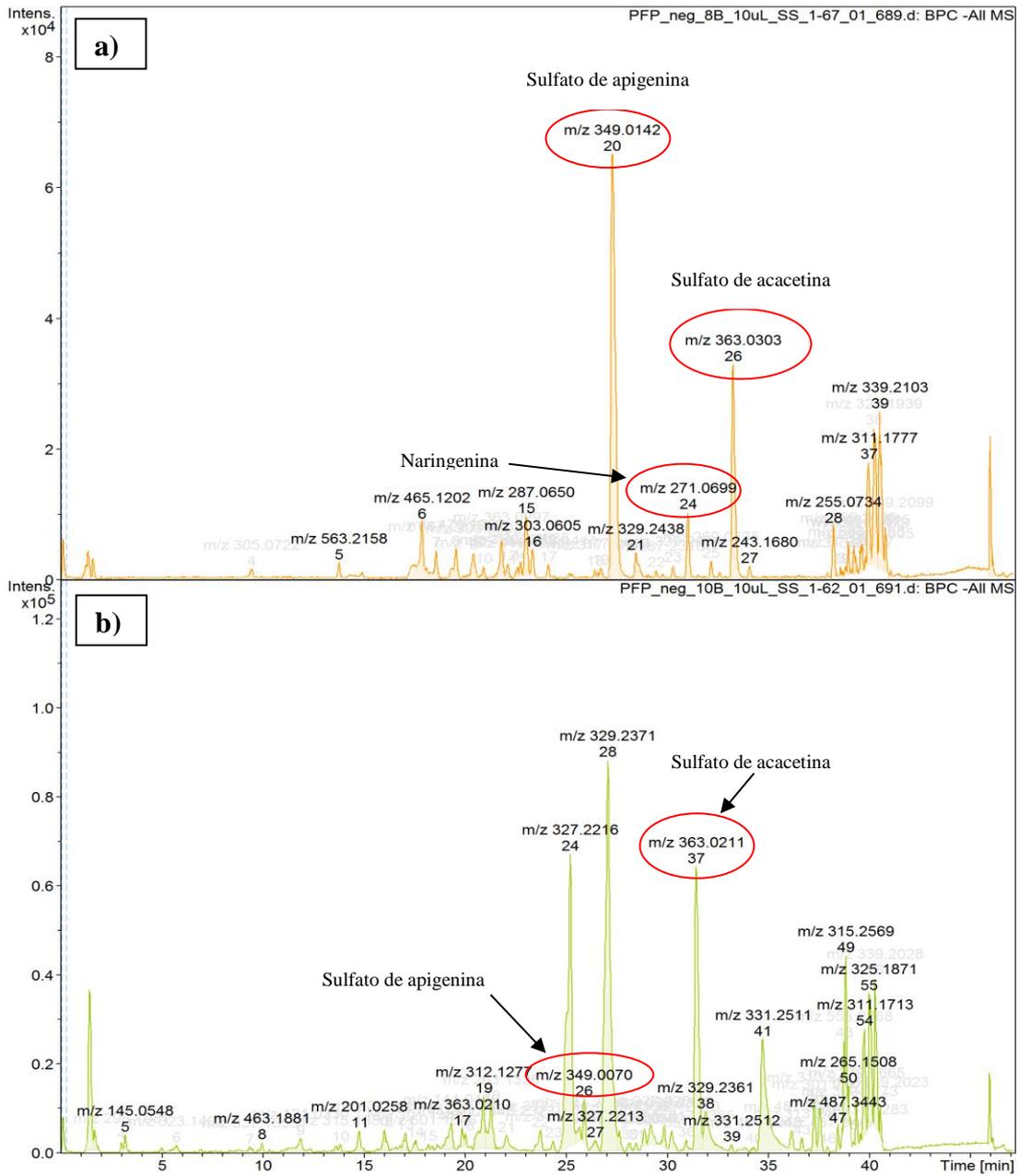


Figura 33: Comparação entre os cromatogramas de semente (amêndoas) de pajarú (a) extraído em acetona; (b) extraído em metanol.

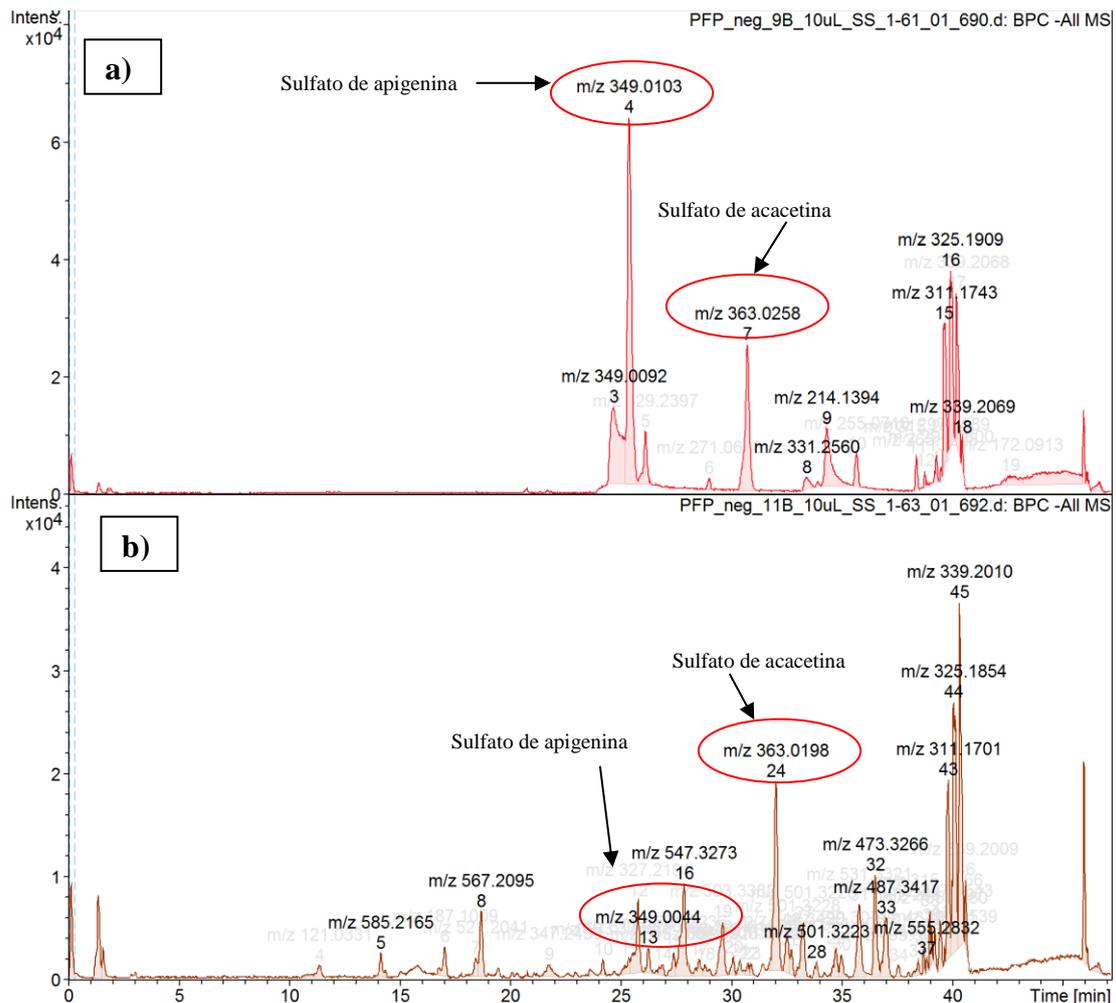


Figura 34: Comparação entre os cromatogramas (a) de semente (parte externa) de pajarú extraído em acetona; (b) extraído em metanol.

O perfil dos extratos da parte externa das sementes (Figura 34) mostra certa diferença em comparação com as amêndoas, justificando a escolha de se estudar estas partes separadas. Ainda sim os sulfatos de acetina e apigenina foram detectados em ambas as extrações. Observa-se na extração em acetona, o sinal abundante correspondente ao sulfato de apigenina, enquanto que no extrato metanólico o sinal é muito inferior ao pico que corresponde ao sulfato de acetina.

Também foram detectados nos cromatogramas (BPC) de casca do fruto (Figura 35) do extrato cetônico os íons m/z 349 e m/z 363 correspondentes ao sulfato de apigenina e sulfato de acetina respectivamente. No extrato metanólico de casca de pajurá os íons m/z 363 e m/z 377 correspondentes ao sulfato de acetina e oleuropeína aglicona, sendo este segundo, o mais abundante na amostra.

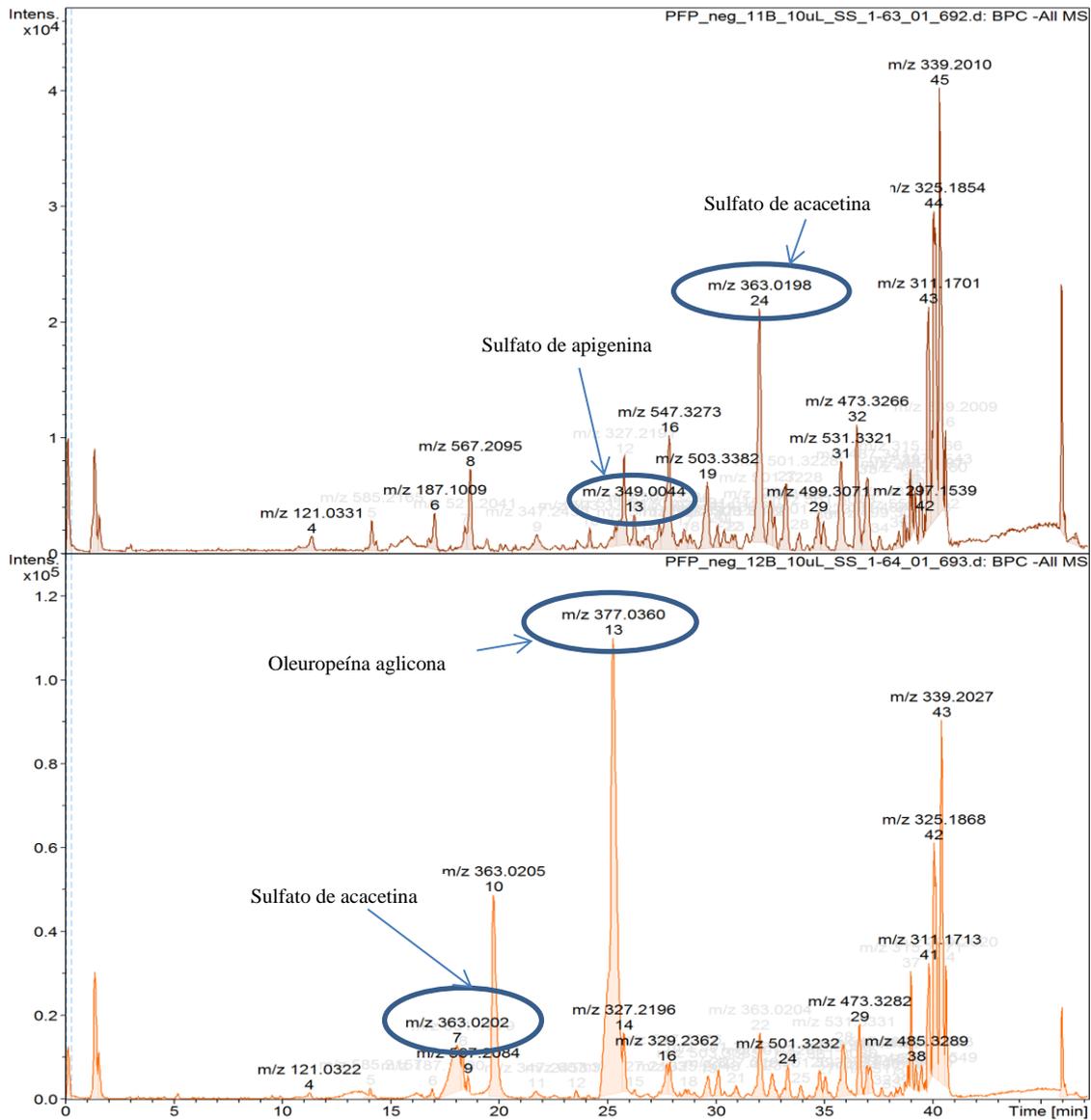


Figura 35: Comparação entre os cromatogramas (a) das cascas de pajurá extraído em acetona; (b) extraído em metanol.

5.4 Substâncias isoladas

Em função do baixo rendimento dos extratos de polpa do mari-mari, optou-se por fracionar e purificar os extratos de cascas e sementes do fruto, pois as análises prévias em LC-MS apontaram alguns compostos presentes em ambos os extratos auxiliando na caracterização de compostos presentes na polpa do fruto.

5.4.1 *Mari-mari (casca)*

O precipitado branco purificado por HPLC preparativo (Seção 4.6.1), forneceu as amostras puras substância **1** e substância **2** identificadas por espectroscopia de RMN de ^1H 1D e 2D e espectrometria de massas.

Substância 1 (Engeletina)

A análise deste composto por espectrometria de massas (Figura 36 e 37) apresentou a molécula desprotonada em m/z 433 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e suas respectivas perdas em m/z 287 $[\text{M}-\text{H}-146]^-$ e em m/z 269 $[\text{M}-\text{H}-18]^-$. No modo positivo a molécula protonada apresentou m/z 435 $[\text{M}+\text{H}]^+$ como um íon pouco intenso cujos fragmentos são em m/z 289 $[\text{M}+\text{H}-146]^+$ e em m/z 271 $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ evidenciando que a massa do composto seja de 434 Da com a perda inicial equivalente a uma perda de glicosídeo seguida pela perda de uma molécula de água coerente com a presença de hidroxila.

O espectro de RMN de ^1H da amostra substância **1** realizado em $\text{MeOH}-d_4$ 600 MHz, apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos, hidrogênios metínicos entre eles hidrogênios carbinólicos e um sinal de hidrogênios metílicos (Figura 38). Foram registrados dois dubletos em δ 6,84 e 7,35 ppm cuja a constante de acoplamento

igual a 8,6 Hz sugerem que estes estão acoplando em *orto*, típicos de anel “B” *p*-disubstituído. Cada sinal integrado indica que existem dois hidrogênios em δ 6,84 ppm que correspondem aos hidrogênios H-2’ e H-6’ e outros dois hidrogênios em δ 7,35 ppm correspondentes aos hidrogênios H-3’ e H-5’ justificados pela simetria do anel aromático confirmando a estrutura do anel “B” do flavonoide (Figura 39) . Sinais em δ 5,89 e δ 5,90 ppm cuja multiplicidade observada revelou dois dubletos com constante de acoplamento igual a 2,1 Hz, típico de acoplamento meta no anel aromático. As correlações observadas nos mapas de HMBC confirmam a caracterização do anel “A” da estrutura proposta.

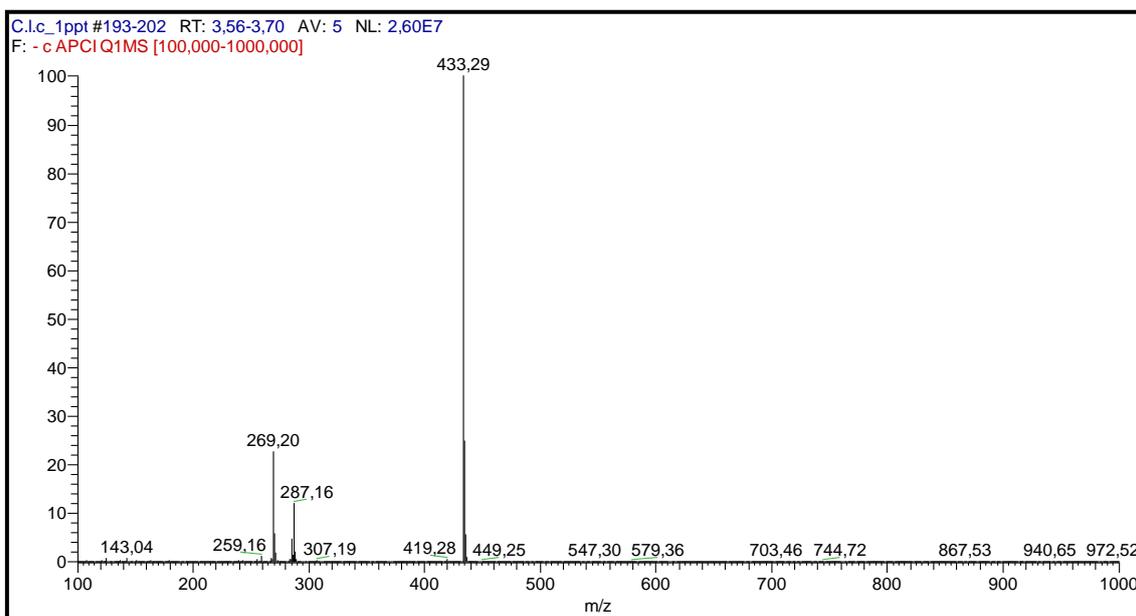


Figura 36: Espectro de massas da amostra substância 1 no modo negativo APCI-MS

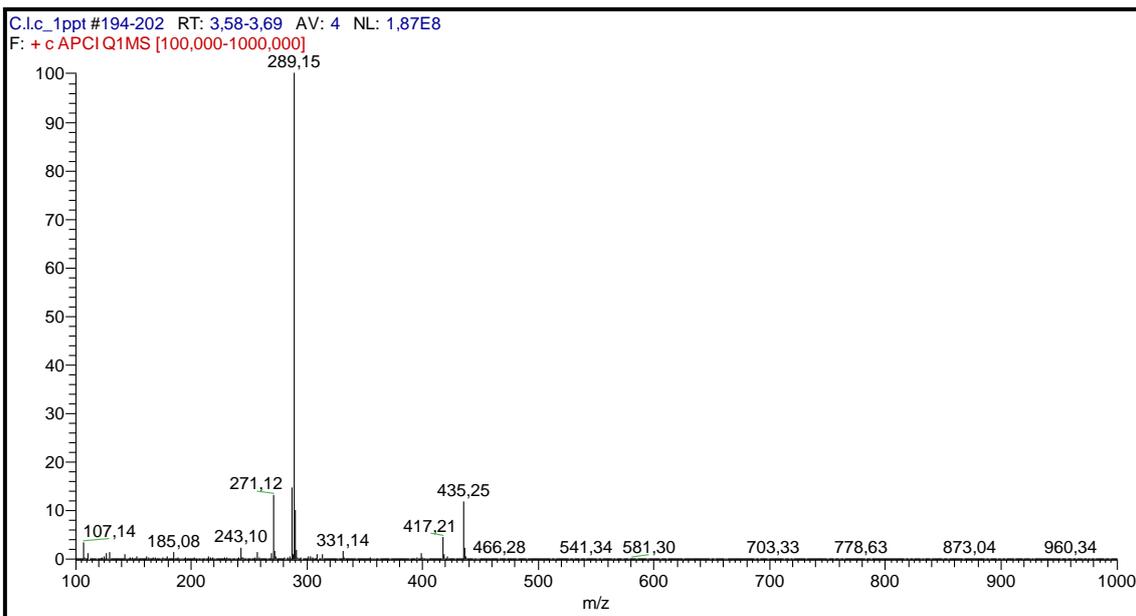


Figura 37: Espectro de massas da amostra substância 1 no modo positivo APCI-MS

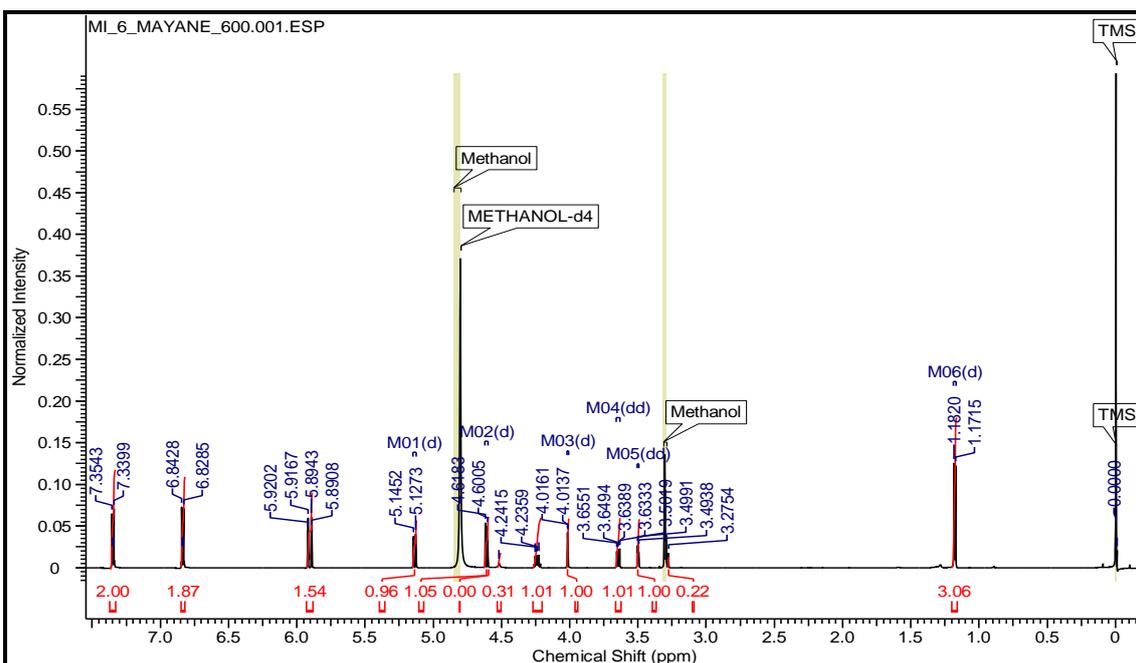


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H da amostra substância 1 MeOH-d₄, 600 MHz)

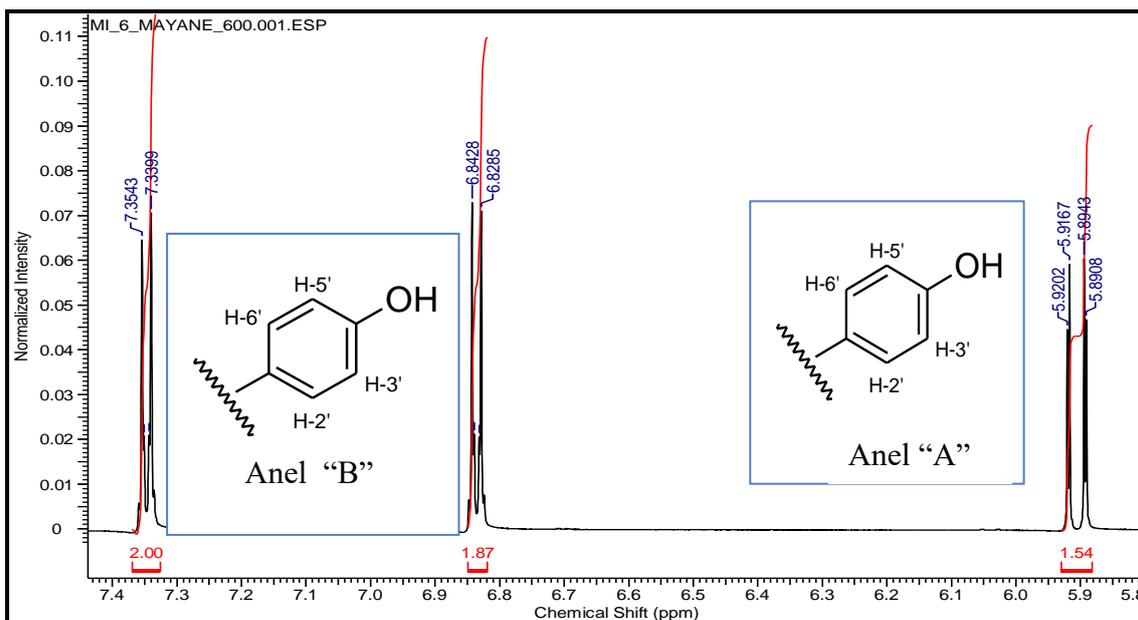


Figura 39: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 1

Sinais em δ 5,14 (d 10,7 Hz) 1H e δ 4,61 (d 10,7 Hz) 1H mostraram conexão com carbonos de deslocamento químico de δ 84,1 e 78,8 ppm no mapa de HSQC, os quais não são considerados deslocamentos químicos característicos de carbonos aromáticos mas provavelmente de carbonos secundários ligados a heteroátomo. O acoplamento observado também sugere que ambos os hidrogênios estão em posição axial no anel "C" do flavonoide (Figura 40). Através das correlações por HMBC (Figura 41), observou-se que o hidrogênio H-2 em δ 5,14, correlaciona com C-3, C-2', C-1' e C-4 sendo C-1' e C-2' carbonos que compõem o anel B do flavonoide. O hidrogênio H-3 (δ 4,61 (d $J=10,7$ Hz) apresentou correlação com C-2 e C-1 além dos carbonos C-4 e C-4 β do anel C, desta forma, foi possível determinar esta parte desta molécula.

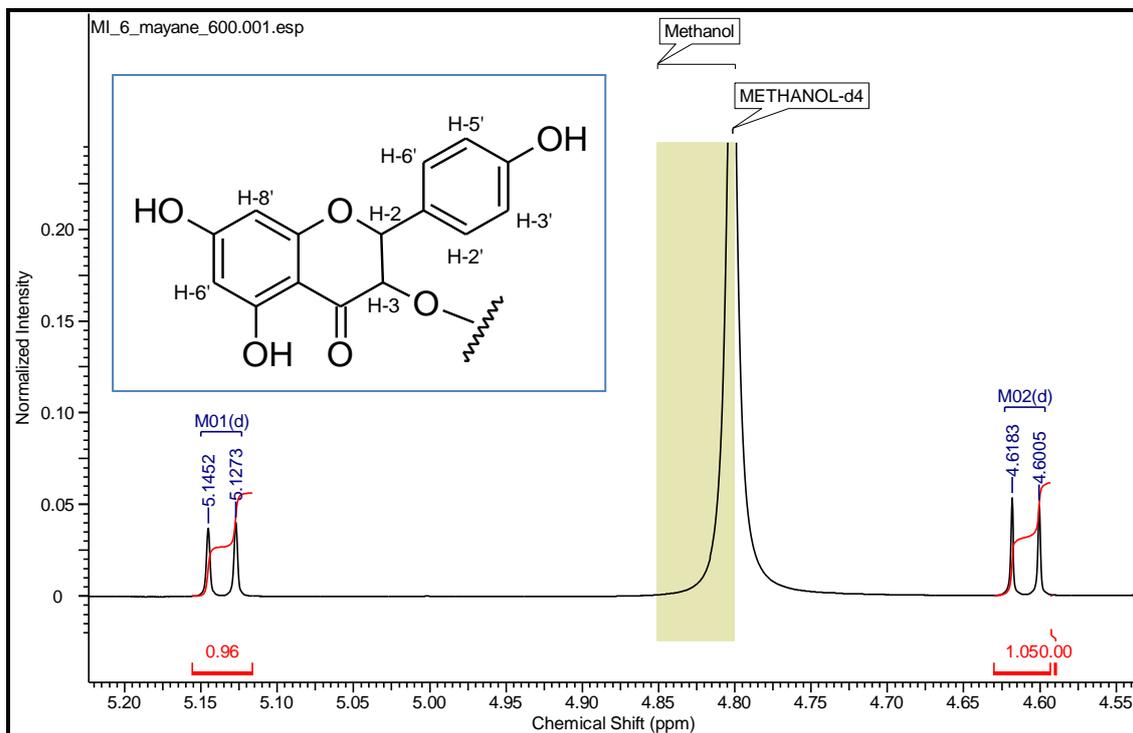


Figura 40: Ampliação do espectro de ^1H da substância 1 com os sinais de H-2 e H-3

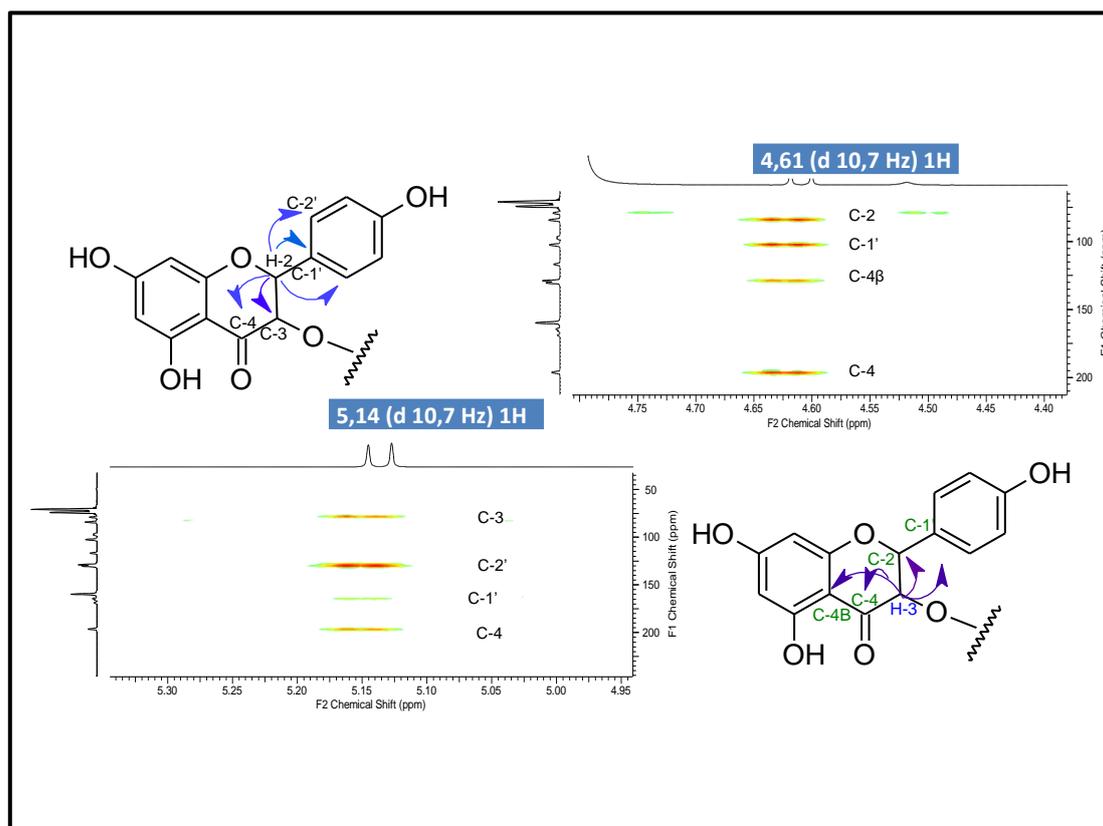


Figura 41: Ampliação de mapas de HMBC dos hidrogênios H-2 e H-3 e correlações.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do ramnosídeo foram comparados com os dados da literatura, porém alguns dados não coincidem, como pode ser observado na tabela 5, desta forma estes foram determinados através das correlações por HMBC (Tabela 12).

No espectro NOE-DIFF 1D (Figura 42) é possível observar a proximidade espacial dos hidrogênios do anel C com alguns hidrogênios vizinhos para determinação da configuração relativa da substância. O H-2 (5,14 ppm) foi irradiado e observou-se que além da interação com o hidrogênio H-3, corroborando o dado de constante de acoplamento calculado para estes hidrogênio provando que estes encontram-se do

mesmo da molécula. Na figura 43 é mostrada que além da interação com o hidrogênio H-3, o hidrogênio irradiado (H-2) também apresenta sinal de interação com os hidrogênios H-2' e H-6' que fazem parte do anel B do flavonoide. Ao irradiar o H-3 (4,61 ppm), observa-se que este hidrogênio tem além da interação com H-2, tem interação com os hidrogênios H-2' e H-6' do anel B e o hidrogênio H-1'' do rhamnosídeo. Desta forma, a configuração relativa atribuída para o composto pode ser R/S ou S/R evidenciado pelo espectro NOE-DIFF de que os hidrogênios estão do mesmo lado da molécula.

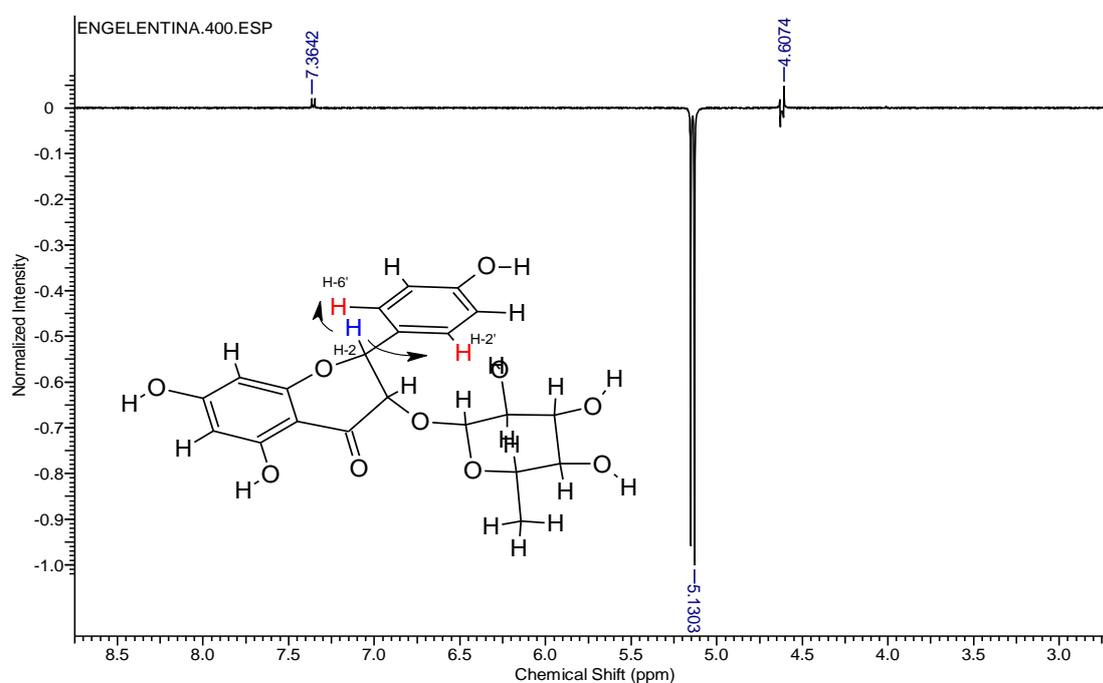


Figura 42: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, substância 1, em MeOH, a 500.13 MHz, detalhe das interações espaciais entre os hidrogênios com o hidrogênio irradiado (H-2).

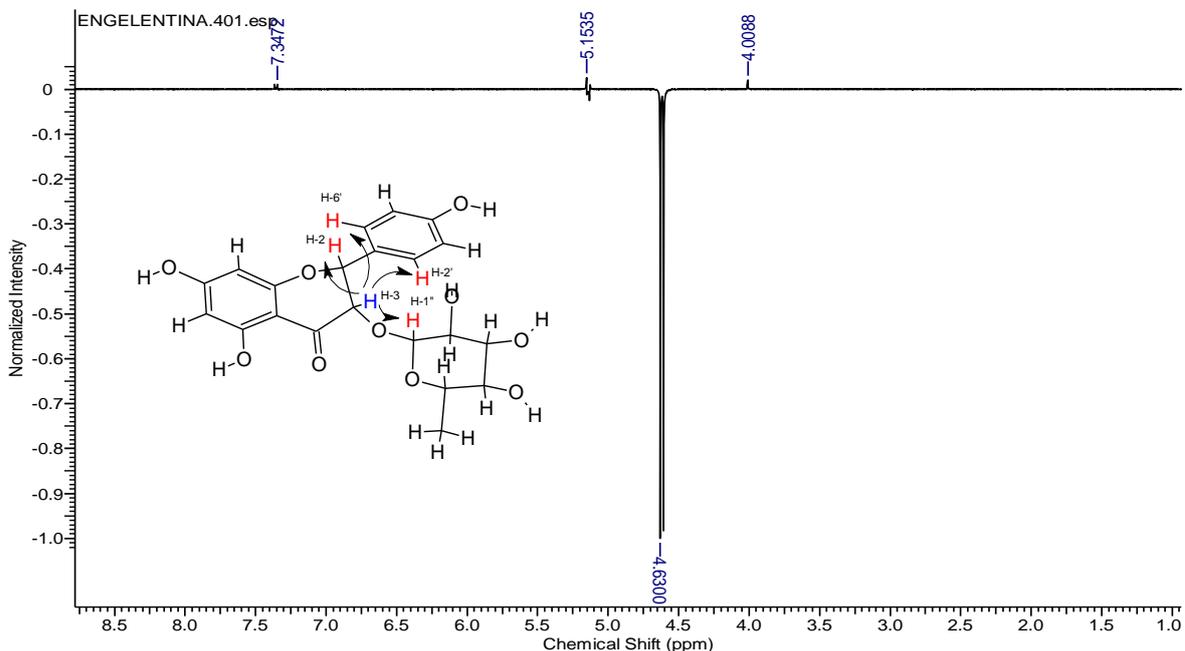


Figura 43: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, substância 1, em MeOH, a 500.13 MHz, detalhe das interações espaciais entre os hidrogênios com o hidrogênio irradiado (H-3).

A partir dos dados de RMN de ^1H , espectros de massas comparados aos dados da literatura (Tabela 13), a substância **1**, um sólido cristalina (Figura 44) foi caracterizada como engeletina (dihidrokaempferol 3-rhamnosídeo) (Figura 45), um flavonoide glicosilado reportado em outros gêneros da família Fabaceae por Silva e colaboradores em 2006 e em uvas e vinhos por Trousdale e Singleton em 1982.

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H da substância 1 e correlações em HSQC e HMBC.

	H	HSQC	HMBC
1	7,35 <i>d</i> 2H <i>J</i> 8,6 orto	130,5	83,6- 116,5 – 130,3- 159,5
2	6,84 <i>d</i> 2H <i>J</i> 8,6	116,6	116,5 – 130,5 – 159,5
3	5,90 <i>d</i> 1H <i>J</i> 2,1 meta	97,6	96,1 – 102,6 – 165,6 – 168,8
	5,89 <i>d</i> 1H <i>J</i> 2,1	96,5	97,5 – 102,6 – 164,4 – 168,8
4	5,14 <i>d</i> 1 H <i>J</i> 10,7	84,1	78,3 – 128,9- 130,4 – 164,2- 196,1
	4,61 <i>d</i> 1H <i>J</i> 10,7	78,8	83,6 – 102,1- 128,9 – 196,3 fort
6	4,24 <i>m</i> 1H	70,4	17,6 – 72,0 – 74,1
7	4,01 <i>d</i> 1H <i>J</i> 1,5	102,4	70,4 – 72,0 – 79,1 – 102,4
	3,30 <i>m</i> 1H	74,2	17,6 – 70,4 – 72,0
8	3,64 <i>ddd</i> 1H <i>J</i> 9,7 e 6,4	72,4	74,2 – 72,4 – 74,1
9	3,50 <i>ddd</i> 1H <i>J</i> 3,2 e 1,7	72,0	72,4 – 74,2
10	1,18 <i>d</i> 3H <i>J</i> 6,3	17,6	17,6 – 70,4 – 74,2



Figura 44: Cristais de engeletina

Tabela 13: Dados de RMN de ¹H da substância 1 e dados da literatura.

	Dados de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-D6) (Trousdale, E. K. & Singleton, V.L. 1982)	Substância 1 RMN de ¹ H (600 MHz, MeOH d-4)
H-2	5,28 (<i>d</i> 10,5 Hz) 1H	5,14 (<i>d</i> 10,7 Hz) 1H
H-3	4,76 (<i>d</i> 10,6 Hz) 1H	4,61 (<i>d</i> 10,7 Hz) 1H
H-6	5,90 (<i>s</i>) 1H	5,89 (<i>d</i> 2,1 Hz) 1H
H-8	5,91 (<i>s</i>) 1H	5,90 (<i>d</i> 2,1) 1H
H-2'e H-6'	7,33 (<i>d</i> 8,5 Hz) 2H	7,35 (<i>d</i> 8,6 Hz) 2H
H-3'e H-5'	6,78 (<i>d</i> 8,4 Hz) 2H	6,84 (<i>d</i> 8,6 Hz) 2H
H-1''	3,95(<i>s</i> , 1H)	4,01 (<i>d</i> 1,5 Hz) 1H
H-2''	-	3,50 <i>m</i> 1H
H-3''	-	3,64 <i>m</i> 1H
H-4''	-	3,30 <i>m</i> 1H
H-5''	-	4,24 <i>m</i> 1H
H-6''	1,05 (<i>d</i> 6,1 Hz) 3H.	1,18 (<i>d</i> 6,3 Hz) 3H

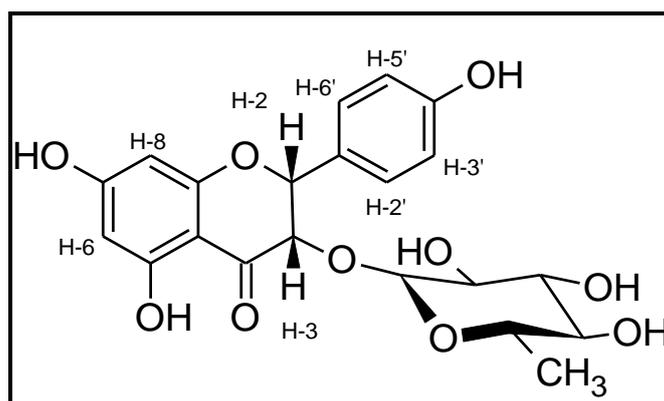


Figura 45: Engeletina

Desta forma foi realizada apenas a análise por RMN de ^1H comparando com os dados previamente reportados por Trousdale & Singleton, (1982) e Silva e colaboradores, (2006) (Tabela 14). Apesar da única diferença entre os dois compostos ser uma hidroxila no C-3', alguns sinais de deslocamento químicos dos dois compostos são diferentes devido a influencia que esta hidroxila apresenta sobre a blindagem dos átomos de carbono e hidrogênio. Esta diferença fora observada por espectrometria de massas e confirmada por espectrometria de RMN de ^1H .

No espectro de RMN de ^1H (Figura 47) realizado em DMSO- d_6 foram observados sinais com deslocamento químico (δ) com valores de deslocamento químico próximos aos valores da engeletina. A diferença principal está nos valores de deslocamento químico no anel B, onde a hidroxila na posição C-3' está localizada. O H-2' apresenta $\delta = 6,72$ ppm e aparece como um simpleto (Figura 48) Outra diferença foi o uso de DMSO- d_6 como solvente para análise que possibilitou o registro sinais de hidrogênios de hidroxila dos anéis aromáticos (Figura 49), os quais não aparecem em MeOH- d_4 . Desta forma os dados da substância **2** obtida como um sólido cristalino (Figura 52) são coerentes com a estrutura da astilbina (dihidroquercetina 3-ramnosídeo) com fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ e massa molecular 450 (Figura 53).

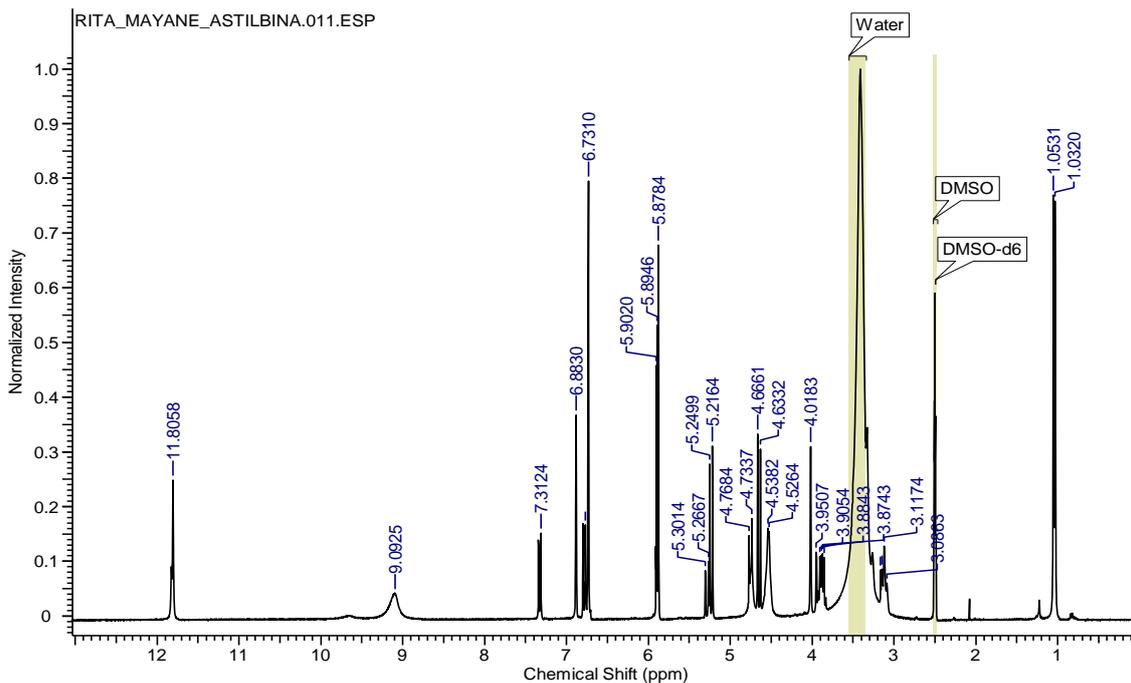


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H da amostra substância 2 em DMSO-d6

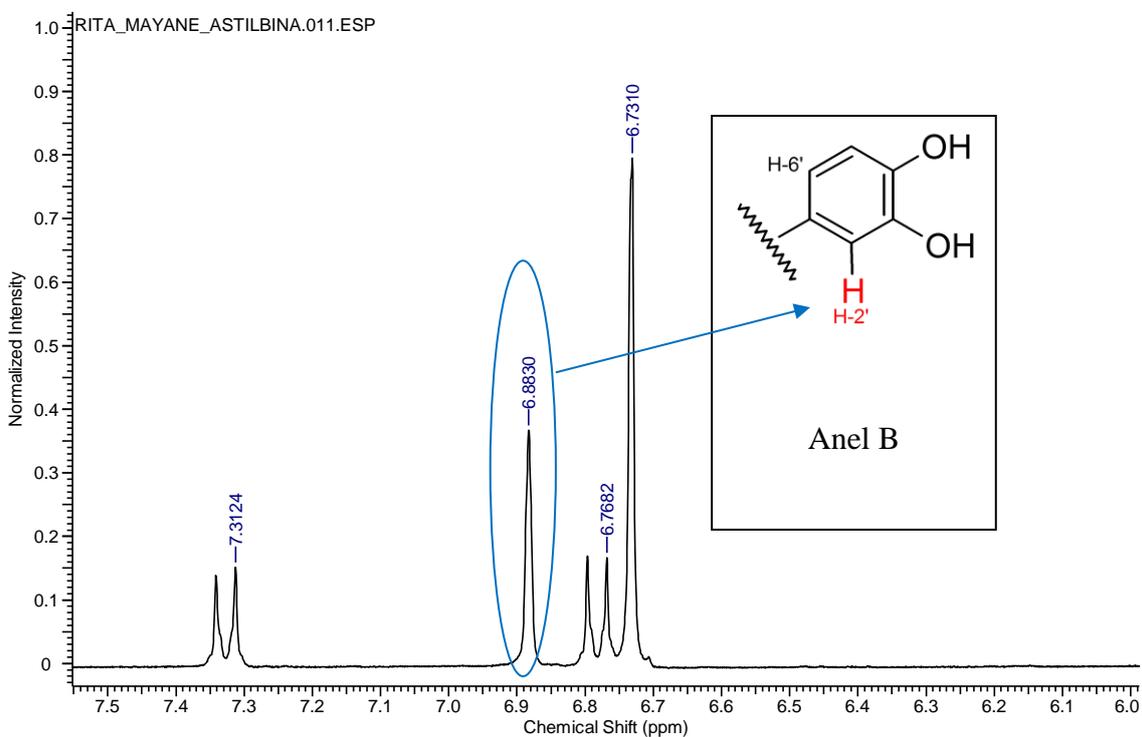


Figura 48: Destaque para o H-2' no anel B da substância 2.

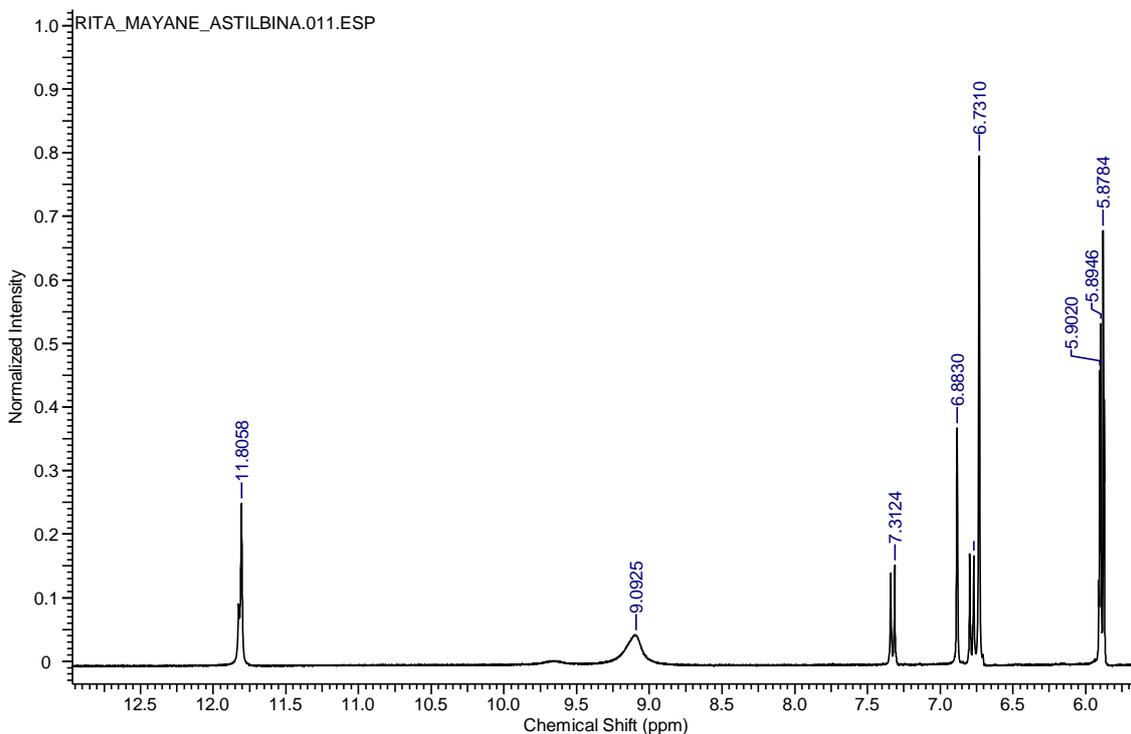


Figura 49: Ampliação da região de hidrogênios ligados a oxigênio (H-O) da substância 2.

Da mesma forma que a substância **1** (engeletina), foi realizado para esta amostra o experimento de NOE-DIFF com a finalidade de determinar a configuração relativa deste composto. O H-2 (5,23 ppm) foi irradiado e apresentou interação com H-3 (4,63 ppm) (Figura 50). Além da interação com o hidrogênio H-2, o hidrogênio H-3 também apresentou interação com os hidrogênios H-2' e H-1'' (Figura 51). Da mesma forma que a engeletina, o espectro de NOE-DIFF da astilbina revelou que a configuração relativa do composto é R/S ou S/R confirmado pela análise do espectro NOE-DIFF.

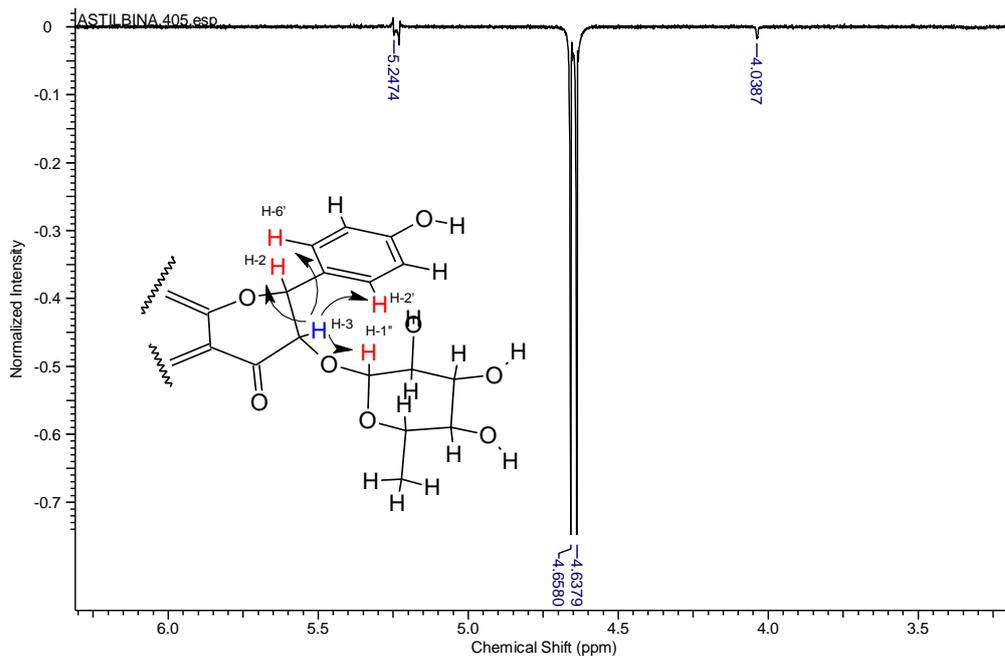


Figura 50: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, da substância 2, em MeOH, a 500.13 MHz e detalhe das interações entre o hidrogênio irradiado (H-3) com os hidrogênios vizinhos.

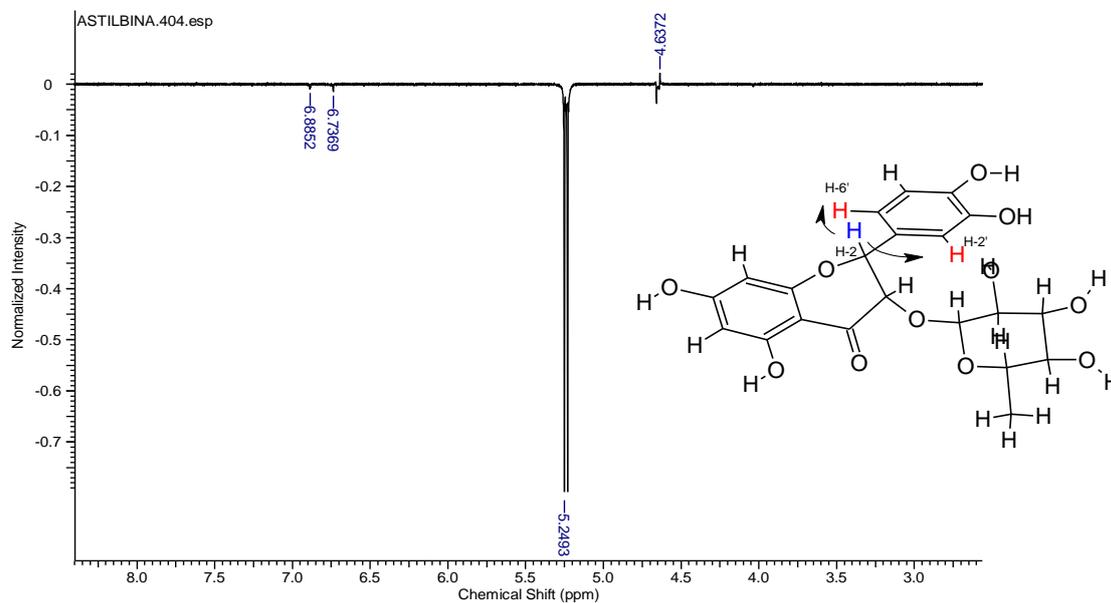


Figura 51: Espectro de RMN de 1D, NOE-DIFF, da substância 2, em MeOH, a 500.13 MHz e detalhe das interações entre o hidrogênio irradiado (H-2) com os hidrogênios vizinhos.

Tabela 14: Dados de RMN de ¹H da substância 2 e dados da literatura.

	Dados de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d6) (Trousdale, E. K. & Singleton, V.L. 1982).	Substância 2 RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO-d6)
H-2	5,23 (<i>d</i> 9,9 Hz) 1H	5,23 (<i>d</i> 9,9 Hz) 1H
H-3	4,65 (<i>d</i> 9,9 Hz) 1H	4,64 (<i>d</i> 9,9 Hz) 1H
H-6	5,88 (<i>s</i>) 1H	5,89 (<i>d</i> 2,1 Hz) 1H
H-8	5,90 (<i>s</i>) 1H	5,90 (<i>d</i> 2,1) 1H
H-2'	6,88 (<i>s</i>) 1H	6,87 (<i>s</i>) 1H
H-5'	6,73 (<i>s</i>) 1H	6,72 (<i>d</i> 8,6 Hz) 1H
H-6'	6,73 (<i>s</i>) 1H	6,79 (<i>d</i> 8,4 Hz) 1H
H-1''	4,02 (<i>s</i>) 1H	4,01 (<i>d</i> 1,2 Hz) 1H
H-2''	-	3,93 <i>m</i> 1H
H-3''	-	3,14 <i>m</i> 1H
H-4''	-	3,08 <i>m</i> 1H
H-5''	-	2,49 <i>m</i> 1H
H-6''	1,05 (<i>d</i> 6,2 Hz) 3H.	1,04 (<i>d</i> 6,0 Hz) 3H
OH-3'	9,08 (<i>s</i>) 1H	9,00 (<i>s</i>) 1H
OH-4'	9,11 (<i>s</i>) 1H	9,10 (<i>s</i>) 1H
OH-5	11,81 (<i>s</i>) 1H	11,82 (<i>s</i>) 1H
OH-7	10,75 (<i>s</i>) 1H	11,79 (<i>s</i>) 1H



Figura 52: Cristais de astilbina

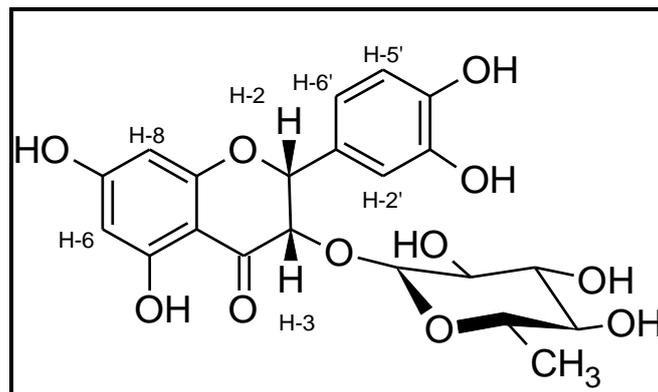


Figura 53: Astilbina

5.5 Quantificação de fenólicos totais

A partir dos dados de absorvância em função da concentração de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) foi construída uma curva de calibração nas seguintes concentrações (500; 125; 63; 31 $\mu\text{g/mL}$). (Figura 54). O coeficiente de correlação linear (R^2) da equação obtida a partir da curva apresentou um valor 0,9998 indicando uma boa correlação linear. O teor de fenólicos totais foi estimado por interpolação de dados de absorvância dos extratos e frações na reta de regressão.

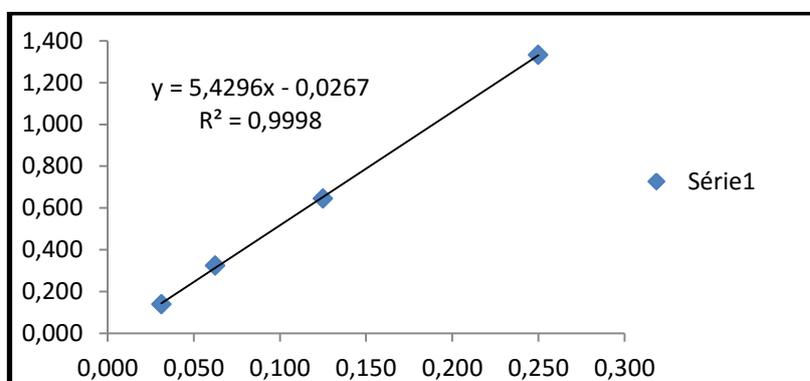


Figura 54: Curva de calibração com ácido gálico usado na quantificação de FT

5.5.1 Mari-mari

Na Tabela 14 estão listados os resultados de teor de fenólicos totais dos extratos de polpa, casca e semente de mari-mari. As amostras de polpa, casca e semente extraídas em acetona e em metanol dos frutos foram avaliadas quanto ao teor de fenólicos totais e apresentaram compostos fenólicos na sua composição. As concentrações variaram de $0,036 \pm 0,008$ a $0,169 \pm 0,003$ mg EAG^{-1} por 100 g de

extrato seco sendo que o valor mais elevado foi obtido para o precipitado de casca de mari-mari extraído em acetona. Os teores de fenólicos totais do precipitado e sobrenadante de casca foram 0,169 mg EAG/g e 0,166 mg EAG/g, respectivamente, onde pode ser observado que o precipitado apresentou o teor de fenólicos um pouco mais elevado do que o sobrenadante. Este resultado é bastante coerente, com os dados de LC-MS onde foi observada a presença abundante de dois flavonoides no precipitado, os quais foram isolados e identificados engeletina (1) e astilbina (2).

Estes dados reforçam os relatos de Ayala-Zavala e colaboradores (2011) de que o teor de compostos funcionais em diferentes tecidos de frutos exóticos tropicais está localizado preferencialmente na casca e das sementes e em menor medida na polpa.

Tabela 14: Resultados de fenólicos totais dos extratos do mari-mari,.

<i>Amostras</i>	<i>Fenólicos totais (mg EAG/100g extrato seco)</i>
Mari-mari/Polpa (metanol)	0,036 ± 0,008
Mari-mari/Casca (metanol)	0,146 ± 0,121
Mari-mari/Sementes (metanol)	0,036 ± 0,032
Mari-mari/Polpa (acetona)	0,065 ± 0,040
Mari-mari/Casca (acetona)	0,129 ± 0,020
Mari-mari/Sementes (acetona)	0,060 ± 0,005
Mari-mari/Sobrenadante (casca)	0,166 ± 0,008
Mari-mari/Precipitado (casca)	0,169 ± 0,010

5.5.2 Pitomba

Entre os extratos de pitomba apenas o extrato metanólico das cascas com 0,363 ± 0,04 EAG apresentou maior teor de fenólicos em comparação com os extratos de polpa

e semente (Tabela 15). Os extratos cetônico e metanólico de polpa apresentaram baixo teor de compostos fenólicos ($0,028 \pm 0,001$ e $0,038 \pm 0,05$ EAG) respectivamente. Apesar de análises dos dados de LC-MS apontarem a presença de flavonoides e ácidos fenólicos, estes podem se encontrar em baixa quantidade nos extratos justificando assim os valores de teor de fenólicos encontrados.

Tabela 15: Resultados de fenólicos totais dos extratos de pitomba.

<i>Amostras</i>	<i>Fenólicos totais</i> <i>(mg EAG/100g extrato seco)</i>
Pitomba/polpa (acetona)	$0,028 \pm 0,001$
Pitomba/polpa (metanol)	$0,038 \pm 0,05$
Pitomba/casca (acetona)	$0,015 \pm 0,07$
Pitomba/casca (metanol)	$0,363 \pm 0,04$
Pitomba/semente (acetona)	$0,091 \pm 0,001$
Pitomba/semente (metanol)	$0,057 \pm 0,03$

5.5.3 Pajurá

Na Tabela 16 estão listados os resultados de teor de fenólicos totais dos extratos de pajurá. As amostras de polpa, casca, semente e amêndoa extraída em acetona e em metanol dos frutos foram avaliadas quanto ao teor de fenólicos totais e apresentaram compostos fenólicos na sua composição. As concentrações variaram de $0,031 \pm 0,032$ a $0,169 \pm 0,003$ mg EAG⁻¹ por 100 g de extrato seco sendo que o valor mais elevado foi obtido para a polpa de pajurá extraído em metanol. O extrato de polpa em acetona apresentou um teor de fenólicos ligeiramente menor ($0,129 \pm 0,01$ mg EAG⁻¹ por 100 g de extrato seco), mas ainda sim foi um dos valores mais altos determinados para o fruto.

Entre os extratos de casca, o extraído em acetona apresentou melhor resultado com $0,121 \pm 0,003 \text{ mg EAG}^{-1}$ por 100 g de extrato seco, sendo que o extraído em metanol apresentou apenas $0,036 \pm 0,005 \text{ mg EAG}^{-1}$.

Os extratos de semente do pajurá também foram avaliados e o teor de fenólicos totais para o extrato metanólico foi $0,036 \pm 0,010 \text{ mg EAG}^{-1}$ e para o extrato em acetona $0,060 \pm 0,005 \text{ mg EAG}^{-1}$.

Tabela 16: Resultados de fenólicos totais dos extratos de pajurá .

<i>Amostras</i>	<i>Fenólicos totais</i> <i>(mg EAG/100g extrato seco)</i>
Pajurá/polpa (acetona)	$0,129 \pm 0,02$
Pajurá/polpa (metanol)	$0,169 \pm 0,03$
Pajurá/casca (acetona)	$0,121 \pm 0,001$
Pajurá/casca (metanol)	$0,036 \pm 0,08$
Pajurá/semente/amendoa (acetona)	$0,036 \pm 0,05$
Pajurá/semente/amendoa (metanol)	$0,031 \pm 0,12$
Pajurá/semente (acetona)	$0,118 \pm 0,03$
Pajurá/semente (metanol)	$0,060 \pm 0,091$

5.6 DPPH (Ensaio de radical Difenil-2-picrihidrazil radical)

Existe uma variedade de ensaios antioxidante *in vitro* que servem como base para o estudo da capacidade antioxidante de frutos. Neste estudo, os ensaios realizados foram o FRAP (Ferry Reduction Assay Power) e sequestro de radicais DPPH, que atuam por mecanismos diferentes (AKTER, OH, EUN & AHMED, 2011; CAO & PRIOR, 1998).

A partir da equação da reta dos gráficos da porcentagem de capacidade de sequestro do radical livre DPPH· (%CS) em função da concentração (das series de diluições dos extratos, frações e do controle positivo) foi estimado o parâmetro c em $\mu\text{g/mL}$ que expressa a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade (cor) do radical DPPH·). O controle positivo utilizado foi a quercetina com $\text{IC}_{50} = 6,0 \mu\text{g/mL}$.

5.6.1 *Mari-mari*

Os resultados de capacidade de sequestro de radicais livres, determinado pelo ensaio de DPPH (Tabela 17), mostraram que a casca de mari-mari apresentou maior atividade comparada à polpa e à semente do fruto. O valor de IC_{50} obtido para polpa extraída em acetona foi de $364.94 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ e para o extrato metanólico de polpa foi $\text{IC}_{50} = 620.30 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$. Entretanto os valores obtidos para os extratos cetônico e metanólico de casca com valores de $\text{IC}_{50} = 199.44 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ e $\text{IC}_{50} = 619.14 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, revelando que os extratos cetônicos apresentam melhor capacidade de sequestro de radicais DDPH em relação aos extratos metanólicos. O mesmo ensaio foi realizado para com os três flavonoides isolados das cascas foram ensaiados e pode ser observado que a engeletina, composto mais abundante nas amostras, não apresenta o potencial antioxidante ($\text{IC}_{50} = 3710 \pm 0.005 \mu\text{g/mL}$), enquanto que a astilbina apresenta atividade antioxidante moderada ($\text{IC}_{50} = 316 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 17: Resultados de DPPH dos extratos de mari-mari.

<i>Amostras</i>	<i>DPPH IC₅₀ (µg/mL m/v)</i>
Mari-mari/Polpa (metanol)	620,30 ± 0,01
Mari-mari/Casca (metanol)	619,14 ± 0,04
Mari-mari/Sementes (metanol)	673,73 ± 0,01
Mari-mari/Polpa (acetona)	364,40 ± 0,001
Mari-mari/Casca (acetona)	199,44 ± 0,01
Mari-mari/Sementes (acetona)	456,43 ± 0,02
Engeletina	3710,09 ± 0,005
Astilbina	316,66 ± 0,06
Quercetina	6,0 ± 0,005

5.6.2 Pitomba

As amostras ensaiadas do fruto de pitomba (Tabela 18) apresentaram a menor capacidade de sequestro, sendo que para o extrato de polpa em acetona, não foi possível calcular o IC50%, pois na triagem, a maior concentração utilizada (1,0 mg/mL), apresentou 50% da capacidade de sequestro. O extrato de polpa em metanol apresentou 818,58 µg/mL ± 0,07, concentração mínima necessária para sequestrar os radicais DPPH. O extrato com maior capacidade de sequestro de radicais DPPH entre os extrato de pitomba é o de semente extraído em acetona com 183,73 µg/mL ± 0,01, o qual contém luteolina, quercetina e naringenina que podem justificar esta atividade para este extrato.

Tabela 18: Resultados de DPPH dos extratos de pitomba.

<i>Amostras</i>	<i>DPPH IC₅₀ (µg/mL m/v)</i>
Pitomba/polpa (acetona)	n.c
Pitomba/polpa (metanol)	818,58 ± 0,07
Pitomba/casca (acetona)	n.c
Pitomba/casca (metanol)	n.c
Pitomba/semente (acetona)	183,73 ± 0,01
Pitomba/semente (metanol)	n.c
Quercetina (controle positivo)	6,0 ± 0,005

5.6.3 Pajurá

Entre os extratos de pajurá, observa-se claramente que as amêndoas da semente apresentam grande capacidade de sequestro de radicais DPPH (Tabela 19), os quais são necessários apenas 63,69 µg/mL de extrato para sequestrar 50% dos radicais. Este foi o melhor resultado entre todos os extratos ensaiados do fruto pajurá e entre dos três frutos estudados. Esta atividade pode estar diretamente associada aos flavonoides abundantes nas amêndoas, identificadas por LC-MS como sulfato de acetina, sulfato de apigenina e olerupeína. A polpa de pajurá como parte comestível, sendo a parte de maior interesse no fruto, necessita de pelo menos 282, 83 µg/mL de extrato (metanólico) para sequestrar 50% dos radicais livres, ou seja, tem uma atividade não muito alta, porém é possível atribuir aos fenólicos encontrados no fruto uma parcela da atividade antioxidante, pois esta atividade é bem reconhecida devido aos carotenoides do fruto.

Tabela 19: Resultados de DPPH dos extratos de pajurá.

<i>Amostras</i>	<i>DPPH IC₅₀ (µg/mL m/v)</i>
Pajurá/polpa (acetona)	n.c
Pajurá/polpa (metanol)	n.c
Pajurá/casca (acetona)	n.c
Pajurá/casca (metanol)	1297,78 ± 0,002
Pajurá/semente/amêndoa (acetona)	282,83 ± 0,01
Pajurá/semente/amêndoa (metanol)	63,69 ± 0,002
Pajurá/semente (acetona)	n.c
Pajurá/semente (metanol)	n.c
Quercetina (controle positivo)	6,0 ± 0,005

5.7 FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Os valores de absorvância para cada extrato/fração foram interpolados na curva de calibração com Fe₂(SO₄).7H₂O e os resultados da capacidade redutora de Fe (III) foram expressos como µg/ml de Fe(II)/g de extrato e fração.

5.7.1 Mari-mari

A partir dos resultados obtidos pelo método FRAP (Tabela 20), foi possível observar um teor significativo de Fe²⁺, indicando que os compostos fenólicos presentes nas cascas de mari-mari apresentam grande potencial de redução de Fe³⁺, tanto para o extrato cetônico (1624,46 ± 0,05 µmol/g) quanto para o extrato metanólico (1240,70 ± 0,06 µmol/g DW). Os extratos de polpa apresentaram metade do teor de Fe²⁺ encontrado nas cascas, (634,46 ± 0.06 e 629,88 ± 0.06 µmol/g) nos extratos cetônico e metanólico respectivamente. Por outro lado, os extratos de semente apresentaram baixa concentração de Fe²⁺ comparados aos extratos de polpa e semente de mari-mari. As

substâncias isoladas também foram ensaiadas para avaliação da capacidade de redução de Fe^{3+} onde a astilbina apresentou grande potencial de redução de ferro representada pela concentração de Fe^{2+} ($1905,71 \pm \mu\text{mol/g}$). A engeletina converteu uma pequena parcela de íons Fe^{3+} em Fe^{2+} representada pela concentração final de equivalente de sulfato ferroso $190,13 \pm \mu\text{mol/g}$.

Tabela 20: Resultados de FRAP dos extratos de mari-mari.

<i>Amostras</i>	<i>FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{g}^{-1} \text{DW}$)</i>
Mari-mari/Polpa (metanol)	$629,88 \pm 0,02$
Mari-mari/Casca (metanol)	$1240,71 \pm 0,06$
Mari-mari/Sementes (metanol)	$406,96 \pm 0,09$
Mari-mari/Polpa (acetona)	$634,46 \pm 0,03$
Mari-mari/Casca (acetona)	$1624,46 \pm 0,09$
Mari-mari/Sementes (acetona)	$466,12 \pm 0,02$
Engeletina	$190,13 \pm 0,002$
Astilbina	$1905,71 \pm 0,07$

5.7.2 Pitomba

Entre os extratos de pitomba (Tabela 21), destacou-se o extrato em acetona de semente de pitomba com $123,36 \pm \mu\text{mol/g}$, muito superior ao extrato em metanol de semente ($70,40 \pm \mu\text{mol/g}$). a capacidade de redução de Fe^{3+} avaliada nos extratos de polpa e casca de pitomba foram consideradas baixas com $75,61 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ (polpa extraída em acetona), $70,44 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ (polpa extraída em metanol), $63,90 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$ (casca extraída em acetona) e $61,02 \pm 0,06 \mu\text{mol/g}$ (casca extraída em metanol).

Ainda assim estes resultados são bastante significativos, pois os compostos fenólicos presentes na polpa mesmo que em menor quantidade comparados à casca, ainda sim podem contribuir em efeitos benéficos na alimentação atuando na conversão de Fe^{3+} em Fe^{2+} que tem papel fundamental no organismo.

Tabela 21: Resultados de FRAP dos extratos de pitomba.

<i>Amostras</i>	<i>FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{g}^{-1} \text{DW}$)</i>
Pitomba/polpa (acetona)	75,61 ± 0,05
Pitomba/polpa (metanol)	70,43 ± 0,02
Pitomba/casca (acetona)	63,90 ± 0,07
Pitomba/casca (metanol)	61,07 ± 0,06
Pitomba/semente (acetona)	123,36 ± 0,05
Pitomba/semente (metanol)	70,40 ± 0,06

5.7.3 Pajurá

Entre os extratos do pajurá (Figura 22), destacou-se com o maior teor de Fe^{2+} o extrato de amêndoas da semente extraído em metanol com $156,44 \pm \mu\text{mol/g}$. Este resultado é coerente com os resultados prévios de Berto e colaboradores (2015), o qual atribui a alta capacidade de sequestro de radicais livres do extrato da semente do pajurá aos compostos identificados como sulfato de acacetina, sulfato de apigenina e oleuropeína. Ambos os extratos de polpa do pajurá em acetona e metanol apresentaram teor de Fe^{2+} ($71,02 \pm 0,11$ e $77,61 \pm 0,11$) $\mu\text{mol/g}$ bastante inferiores ao teor determinado para as amêndoas da semente.

Tabela 22: Resultados de FRAP dos extratos de pajurá.

<i>Amostras</i>	<i>FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{g}^{-1} \text{DW}$)</i>
Pajurá/polpa (acetona)	71,02 ± 0,11
Pajurá/polpa (metanol)	77,61 ± 0,11
Pajurá/casca (acetona)	70,82 ± 0,03
Pajurá/casca (metanol)	116,57 ± 0,56
Pajurá/semente/amendoa (acetona)	65,09 ± 0,09
Pajurá/semente/amendoa (metanol)	156,44 ± 0,04
Pajurá/semente (acetona)	56,94 ± 0,01
Pajurá/semente (metanol)	89,44 ± 0,43

Analisando os resultados de dois diferentes mecanismos de avaliação de potencial antioxidante, os dados podem ser correlacionados, observando-se que apesar dos extratos de cascas do fruto apresentarem altos teores de fenólicos, a capacidade de sequestro de radicais ainda é considerada baixa em relação aos frutos como o açaí (421 a 464 mg/100g de frutos) (POMPEU, SILVA & ROGEZ, 2009), o camu-camu (1120 a 1420 mg/100g de frutos) (CHIRINOS, et al., 2010), o muruci (2,90 mg/g de matéria seca) o ingá (2,40 mg/g de matéria seca) (SOUZA, et al., 2008), a ubaia com (2,60 mg/g de fruto) (SILVA, et al., 2007), especialmente na parte comestível do fruto. Em contrapartida, os resultados conseguidos através do FRAP apontam para a capacidade de redução de ferro dos compostos fenólicos encontrados na polpa do mari-mari. Segundo Rice-Evans, Miller & Paganga (1997), a atividade de sequestro de flavonoides está diretamente ligada ao seu potencial de oxidação e dos radicais a serem sequestrados. Outro fator que tem grande influência sobre a capacidade de sequestro de

radicais livres de flavonoides é o numero de hidroxilas, pois quanto mais hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO, SOFIC & PRIOR, 1997), desta forma, a baixa capacidade de sequestro na flavanona engeletina é justificada comparada à astilbina.

6. CONCLUSÃO

Analisando os resultados de dois diferentes mecanismos de avaliação de potencial antioxidante (DPPH e FRAP), é possível correlacioná-lo com os valores determinados nos ensaios de fenólicos totais. Observou-se que a maior concentração de compostos fenólicos foi encontrada nos extratos de casca do fruto para o mari-mari e nos extratos de sementes de pitomba e pajurá. Estes extratos também apresentaram capacidade de sequestro de radicais DPPH assim como capacidade de redução de ferro.

Os extratos de casca do mari-mari apresentaram melhores resultados nos ensaios antioxidantes do que os extratos de polpa e de semente. As cascas contêm grande quantidade de engeletina de forma que eleva o teor de fenólicos totais. Porém o alto teor de engeletina nas amostras resultou na diminuição do potencial antioxidante, pois a engeletina apresentou baixa capacidade de sequestro de radicais DPPH quando ensaiada isoladamente.

Entre os extratos de pitomba, o extrato cetônico das sementes apresentou maior teor de fenólicos totais, maior capacidade de sequestro de radicais DPPH e maior potencial de redução de ferro. Foram identificados neste extrato os flavonoides naringenina, luteolina e rutina os quais podem estar relacionados às atividades antioxidantes ensaiadas. Nos extratos de polpa de pitomba foram identificados compostos fenólicos como ácido gálico, ácido quínico, ácido *p*-coumárico, rutina, catequina, epicatequina, observados em baixa quantidade nos extratos justificando o baixo teor de fenólicos totais e atividades antioxidantes.

Nos extratos de pajurá os picos apresentados não coincidiram com os padrões, os quais foram relatados em um estudo prévio como sulfatos de flavonoides identificados como sulfato de acetina, sulfato de apigenina e oleuropeína aglicona. Estes compostos são abundantes nas amêndoas de semente de pajurá justificando o alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante comprovada pelos ensaios de DPPH e FRAP.

Nas amostras do fruto mari-mari foram identificados engeletina, astilbina, epioritina-(4 β →3)-epioritina-4 β -ol, um derivado de cafeoil-hexosídeo e ácido cítrico).

A engeletina e astilbina isoladas das cascas do mari-mari foram identificadas tanto nos extratos de polpa como os extratos de sementes do fruto, porém estes são mais abundantes nos extratos de cascas.

Em suma, este trabalho corrobora a importância de estudos como este de frutos nativos da região Amazônica mostrando sua diversidade química e sua capacidade de fornecer compostos bioativos com potenciais efeitos benéficos à saúde humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. (2007). “Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil”. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 114-140.
- AGRA, M.F., SILVA, K.N., BASÍLIO, I.J.L.D., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 472-508.
- AKTER, M. S., OH, S., EUN, J.B, AHMED, M. (2011). “ Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review” *Food Research International* 44: 1728–1732.
- ALVES, R. E., BRITO, E. A.; RUFINO, M. S. M.; SAMPAIO, C. G. (2008). “Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola.” *Acta Horticulturae* 773, 299–305.
- ANDERSON, D. (1996). “Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage.” *Mutation Research*. 350: 103-108.
- ANGELO, P. M., JORGE, N. (2007). “Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão” *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1): 232-240.
- ARUOMA, O.I. (2003). “Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods.” *Mutation Research*, 9(20): 523-524.
- AYALA-ZAVALA, J.F., VEGA-VEGA, V., ROSAS-DOMINGUEZ, C., PALAFOX-CARLOS, H., VILLA-RODRIGUEZ, J.A., SIDDIQUI, M. (2011). “Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives”. *Food Research International*, 44, 1866–1874.
- BADISA, R.B., CHAUDHURI, S.K., PILARINOU, E., RUTKOSKI, N.J., HARE, J., LEVENSON, C.W. (2000). “*Licania michauxii* Prance root extract induces hsp 70 mRNA and necrotic cell death in cultured human hepatoma and collagen carcinoma cell lines. *Cancer* 149: 61-68.
- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M. DAVID, J.P. (2006). “Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo” *Química Nova* 29 (1): 113-123.
- BASTOS, D.H.M., SALDANHA, L.A., CATHARINO, R.R., SAWAYA, A.C., CUNHA, I.B.S., CARVALHO, P.O., EBERLIN, M.N. (2007). Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Molecules*, 12, 423-432.

- BATAGLION, G.A., DA SILVA, F.M.A, EBERLIN, M.N, KOOLEN, H.H.F. (2014). Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Research international* 66: 396-400.
- BENNIE, L., MALAN, F., COETZEE, FERREIRA, D. (2000). “Structure and synthesis of ether-linked proteracacinidin na promelacacinidin proanthocyanidins from *Acacia caffra*”. *Phytochemistry*, 53,785-793.
- BIANCHI, M. D. L. P., ANTUNES, L. M. G. (1999). “Free radicals and the main dietary antioxidants”. *Revista de Nutrição*, 12(2), 123-130.
- BERTO, A., RIBEIRO, A.B., SENTANDREU, E., DE SOUZA, N.E., MERCADANTE, A.Z., CHISTÉ, R.C., FERNANDES, E. (2015). “The seed of the Amazonian fruit *Couepia bracteosa* exhibits higher scavenging capacity against ROS and RNS than its shell and pulp extracts”. *Food & Function*. 6(9):3081-90
- BRACA, A., SORTINO, C., POLITI, M., MORELLI, I., MENDEZ, J. (2002). “Antioxidant activity of flavonoids from *L. licaniaeflora*”. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 379-381.
- CADENAS, E.; PACKER, L.(2002). *Handbook of Antioxidants*. 2º edição. New York.
- CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. (2010). “Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre” *Revista Brasileira de Fruticultura.*, 32 (4): 1196-1205.
- CAO, G. H., PRIOR, R. L. (1998). “Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum.” *Clinical Chemistry*, 44, 1309–1315.
- CARVALHO, M. G.; COSTA, P.M. (2009). “Outros constituintes isolados de *Licania arianaeae* (Chrysobalanaceae)”. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19(1B): 290-293.
- CASTILHO, R.O. (2001). “Química de *Crysobalanus icaco* e de *Licania tomentosa* (Chrysobalanaceae): Plantas Brasileiras com potencial terapêutico”. *Tese (Doutorado)* p 171. Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; PALLARDEL, I. B.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. (2010). “Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages”. *Food Chemistry* 120 1019–1024.
- CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M.Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. (2002). “Antioxidant Activity and Free Radical scavenging

capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.” *Plant Science*, 163:1161-1168.

DECKER, E.A., CLARKSON, P. M. (2000). “Dietary sources and bioavailability of essential and nonessential antioxidants”. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Part v, Chapter 13: 323-358*.

DEMARQUE, D.P., CROTTI, A.E.M., VESSECCHI, R., LOPES, J.L.C., LOPES, N.P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Products Reports*, 33 (30): 367-524.

DE ROSSO, V. V., MERCADANTE, A. Z. (2005). “Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvests.” *Food Research International*. 38:1073-1077.

DE ROSSO, V. V., MERCADANTE, A. Z. (2007). “Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 5062-5072.

FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. (2000). “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.” *Nature* 408, 239.

FRACASSETTI, D., COSTA, C.; MOULAY, L., TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2013). “Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*).” *Food Chemistry* 139: 578–588.

FRANKEL, E.N., MEYER, A.S. (2000). “The problem of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1925-1941.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L.T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. (2002). “Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth.” *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 61–68.

FREIRE, M. G. M., FRANCO, O. L.; KUBO, C. E. G.; MIGLIOLO, L.; VARGAS, R. H.; OLIVEIRA, C. F. R.; PARRA, J. R. P.; MACEDO, M. L. R. (2012). “Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control”. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 161: 86–92.

GATES, P.J., LOPES, N.P. (2012). “Characterisation of Flavonoid Aglycones by Negative Ion Chip-Based Nanospray Tandem Mass Spectrometry”. *International Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 2012.

- GENOVESE, M.I., PINTO, M.S., GONÇALVES, A.E.S.S., LAJOLO, F.M. (2008). Bioactives compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and comercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14, 207-2102.
- HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER, J., AROUMA, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
- HALLIWELL, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet*, 355(9210), 1179-1180..
- HEMINGWAY, R. W. (1989). In J. W. Rowe, Natural products of woody plants 1 (p. 571). New York: Springer±Verlag.
- HOSSAIN, M.B., RAI, D.K., BRUNTON, N.P., MARTIN-DIANA, A.B., BARRY-RYAN, C. (2010). “Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10576-10581.
- IKAN, R. (1991). “Natural products – A laboratory guide” *Academic Press: London*.
- ISWALDI, I., GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; LOZANO-SÁNCHEZ, J., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. (2013). “Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry.” *Food Research International* (50) 77–84.
- KOOLEN, H.H.F., DA SILVA, F.M.A., GOZZO, F.C., DE SOUZA, A.Q.L., DE SOUZA, A.D.L. (2013). “Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS.” *Food Research International*, 51, 467-473.
- KUBOTA, T., NOGUEIRA, P.C.L., ALVES, P.B., MACHADO, S.M.F., MORAES, V.R.S. (2009). “Volatile compounds from fruits of *Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk. (Sapindaceae)” *Journal of Essential Oil Research*, 21, 235-236.
- LUXIMON-RAMMA, A., BAHORUN, T., SOOBRAATTEE, A. M., AROUMA, I. (2002). “Antioxidant activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in extract of *Cassia fistula*.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5042-5047..
- MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., KUBO, C. E. G., PARRA, J. R. P. (2011). “Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*.” *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153 (2011) 24–33.
- MAIA, L.A., CHALCO, F.P. (2002). Fruit production from the floodplain forest of Central Amazonia: a food resource for Fish. *Acta Amazonica*, 32, 45-53.

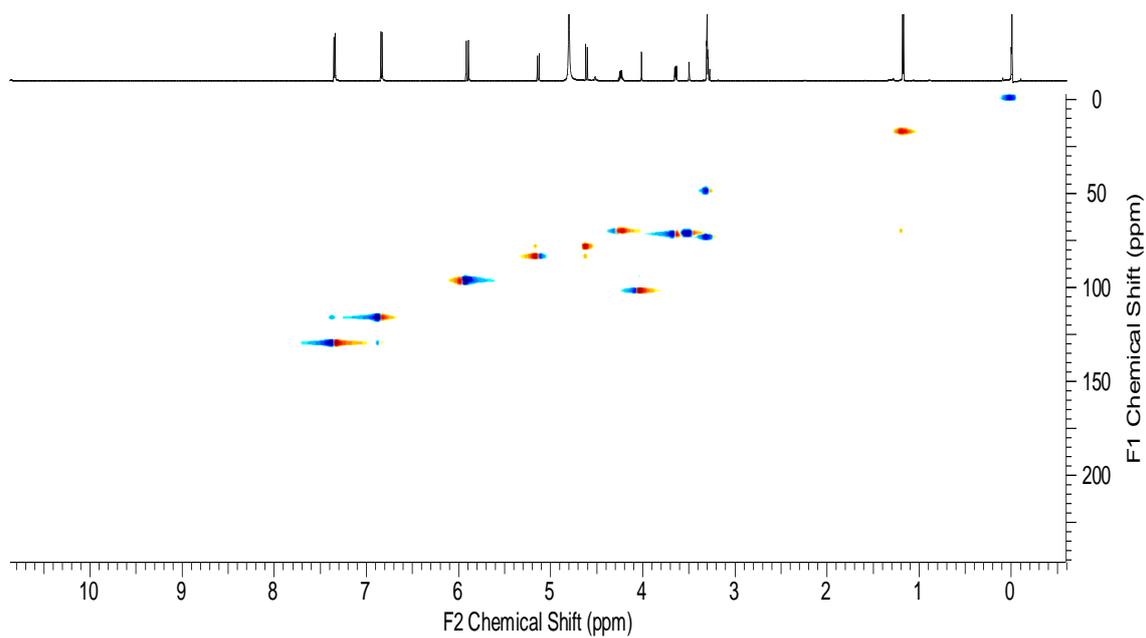
- MARINHO, H. A., CASTRO, J. S. (2003). Carotenóides e valor de pró-vitamina A em frutos da região amazônica: pajurá, piquiá, tucumã e umari. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura.
- MARIN, A.M.F., SIQUEIRA, E.M.A., ARRUDA, S.F. (2009). Minerals, phytic acid and tannins contentes of 18 fruits from Brazilian savana. *International Journal of food sciences and nutrition*. 60 (S7): 177-187.
- MEDINA, A.L., HASS, L.I.R., CHAVES, F.C., SALVADOR, M., ZAMBIAZI, R.C., SILVA, W.P. (2011). “Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidants and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells”. *Food Chemistry*. 128: 916-922.
- MENDEZ, J., BILIA, A.R. (1996). “Phytochemical investigation of *Licania* genus: Flavonoids from *L. pyrifolia*”. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta* 71: 191-197.
- MENDEZ, J., BILIA, A.R., MORELLI, I. (1997). “Phytochemical investigation of *Licania* genus: Flavonoids and triterpenoids from *L. carii*”. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta* 71: 191-197.
- MORALES-SOTO, A., GARCÍA-SALAS, P., RODRÍGUEZ-PÉREZ, C., JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C., CÁDIZ-GURREA, M.L., SEGURA-CARRETERO, A. (2014). “Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain)”. *Food Research International*, 58, 35–46.
- NERI-NUMA, I. A., CARVALHO-SILVA L. B., FERREIRA, J. E. M., MACHADO, A. R. T., MALTA, L. G., RUIZ, A. L. T. G., CARVALHO, J. E., & PASTORE, G. M. (2014). “Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*)”. *Food Science and Technology*, 59, 1233-1238.
- NETO, G.G., SANTANA, S.R., & SILVA, J.V.B. (2003). Repertório botânico da “pitombeira” (*Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk. - Sapindaceae). *Acta Amazonica*, 33, 237–242.
- NIKOLIC, D., GODECKE, T., CHEN, S. N., WHITE, J., LANKIN, D. C., PAULI, G.F., VAN BREEMENB, R. B. (2012). “Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.)”. *Fitoterapia*, 83, 441–460.
- OBERLIES, N.H., BURGESS, J.P., NAVARRO, H.A., PINOS, R.E., SOEJARTO, D.D., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D., WANI, M.C., WALL, M.E. (2001). “Bioactive constituents of roots of *L.intrapetiolaris*”. *Journal of Natural Products* 64: 496-501.
- PANDEY, K. B., RIZVI, S. I.(2009). “Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2:(5) 270-278.

- PIETTA, P. (2000). “Flavonoids as Antioxidants”. *Journal of Natural Products*. 63:1035-1042.
- POMPEU, D. R., SILVA, E. M., ROGEZ, H. (2009). “Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology”. *Bioresource Technology*. 100: 6076-6082.
- PORTER, L. J. (1994). In J. B. Harborne, *The flavonoids. Advances in research since 1986* (p. 23). London: Chapman & Hall.
- QUIFER-RADA, A. R., VALLVERDÚ-QUERALT, A., MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M., CHIVA-BLANCH, G., JÁUREGUI, O., ESTRUCH, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. (2015). “A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS).” *Food Chemistry*, 169, 336-343.
- RABELO, A. (2012). “Frutos nativos da Amazônia: comercializados nas feiras de Manaus-AM.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plants Science*, 2, 152-159.
- RIET-CORREA, F., BEZERRA, C. W., MEDEIROS, M.A., DA SILVA, T.R., MIRANDA NETO, E. G., MEDEIROS, R. M. T. (2014). “Poisoning by *Talisia esculenta* (A. St.-Hil.) Radlk in sheep and cattle”. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26 (3): 412–417.
- RÖESLER, R., MALTA, L.G., CARRASCO, L.C., PASTORE, G. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian cerrado fruit *Annona classiflora* (Araticum). *Journal of Food Science*, 71 (2):102-107.
- RÖESLER, R., MALTA, L. G., CARRASCO, L. C., HOLANDA, R.B., SOUSA, C.A. S., G. M. PASTORE. (2007). “Atividade antioxidante de frutos do cerrado” *Ciências e Tecnologia de Alimentos*. 27(1): 53-60.
- RÖESLER, R., CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., PASTORE, G. (2008) “Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry”. *Food Chemistry* 110: 711–717.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E.; BRITO, E. S., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. (2007). “Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela Captura do Radical Livre DPPH”. Comunicado técnico on line: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_127.pdf. Acessado em 16 de março de 2016.

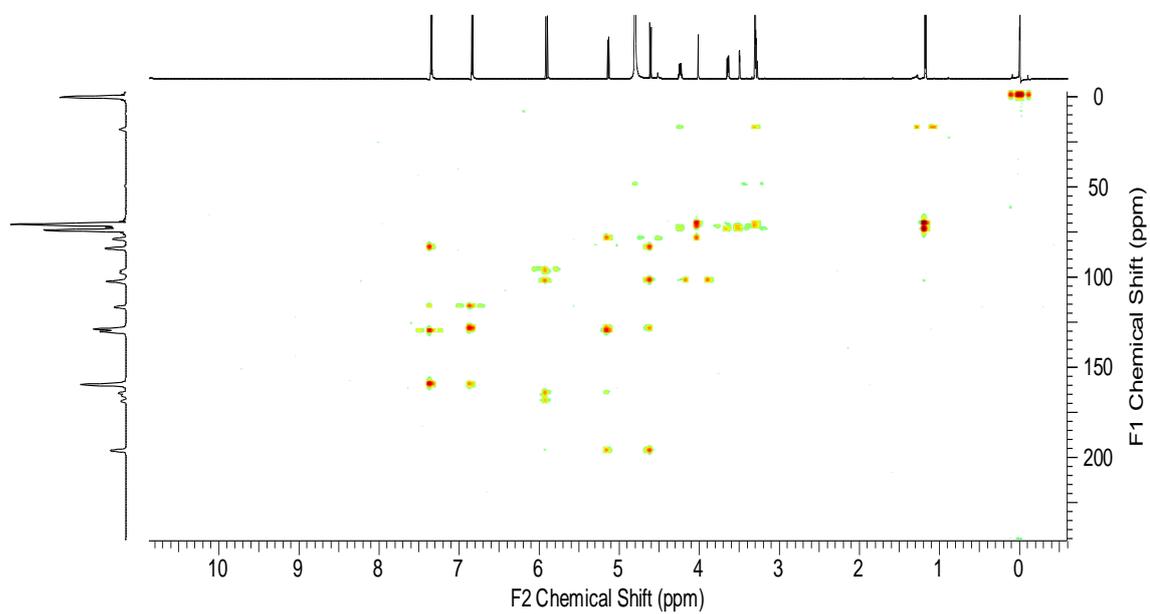
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D., FILHO, J. M. (2010). "Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil". *Food Chemistry* 121: 996–1002.
- RUFINO, M. S. M., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., ALVES, R. E., BRITO, E. S., OLIVEIRA, M. S.P., SAURA-CALIXTO, F. D. (2011) "Açaí (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil". *Food Research International* 44: 2100–2106.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. (2002). "Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems." *Food Science and Technology International*, 8:121-137.
- SILVA, Silvestre. "Frutos da Amazônia brasileira". 228. Metalivros, 2011
- SILVA, F. L., BAILO, M.T. E., ALONSO, J. J.P., GONZALO, J.C. R., BUELGA, C. S.(2007). "Anthocyanins pigments in strawberry". *LWT- Food Science and Technology*. 40: 374-382.
- SILVA, M.R., LACERDA, D.B.C.L., SANTOS, G.G., MARTINS, D.M.O. (2008). "Caracterização química de frutos nativos do cerrado". *Ciência Rural Santa Maria*, 38: 1790-1793.
- SILVA, V. C., ALVES, A. N., SANTANA, A., CARVALHO, M. G., SILVA, S. L. DA C., SCHRIPEMA, J. (2006). "Constituintes fenólicos e terpenoides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). *Química Nova*. 29: 1184-1186.
- SILVA, E. M., SOUZA, J.N.S., ROGEZ, H., REES, J.F., LARONDELLE, Y. (2007) "Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region." *Food Chemistry*. 101: 1012-1018.
- SINGH, S., SINGH, S.K., YADAV, A. (2013). "A Review on Cassia species: Pharmacological, Traditional and Medicinal Aspects in Various Countries". *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 3, 291-312.
- SOUZA, J.N.S., SILVA, E.M., LOIR, A., REES, J.F., ROGEZ, R. LARONDELLE, Y. (2008). "Antioxidant capacity of four polyphenol-rich amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological in vitro assays". *Food Chemistry*, 106: 331–339.
- STEINMETZ, K. A., & POTTER, J. D. (1996). "Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review". *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027–1039.
- TROUSDALE, E. K., SINGLETON, V. L. (1982). "Astilbin and engeletin in grapes and wine" *Phytochemistry*, 22: 619-620.

- VALLVERDÚ-QUERALT, A., DE ALVARENGA, J.F.R., ESTRUCH, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. (2013). "Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito." *Food Chemistry*, 141, 3365-3372.
- VASCO, C., RUALES, J., KAMAL-ELDIN, A. (2008). "Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador." *Food Chemistry* 111(4):816–82.
- VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. D. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. D. S., & KUBOTA, L. T. (2007). "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação". *Química nova*. 30: (5) 1323-1338.
- VEER, P. V., JANSEN, M. C.J.F., KLERK, M., KOK, F. J. (2000)."Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease". *Public Health Nutrition*: 3(1): 103–107.
- VELIOGLU, Y. S., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B. D. (1998). "Antioxidant Activity and Total Phenolics in selected fruits, vegetables and grain products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 8: 4113-4117.
- VIEIRA, F. A., & GUSMÃO, E. (2008). Biometria, armazenamento de sementes e emergência de plântulas de *Talisia esculenta* Radlk. (Sapindaceae). *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 32(4), 1073-1079.
- YANG, J. (2009). "Brazil nuts and associated health benefits: a review." *LWT - Food Science and Technology*. 42: 1573-1580.
- YADAV, J.P., ARYA, V., YADAV, S., PANGHAL, M., KUMAR, S., DHANKHAR, S. (2010). "*Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile." *Fitoterapia* 81: 223–230.
- YU, T-W., ANDERSON, D. (1997). "Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation." *Mutation Research* 379: 201-210.
- WILLETT, W. C. (2002). "Balancing life-style and genomics research for disease prevention". *Science*, 296, 695–698.
- ZANATTA, C. F., MERCADANTE, A. Z. (2007). "Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*)." *Food Chemistry*. 10: 1526-1532.

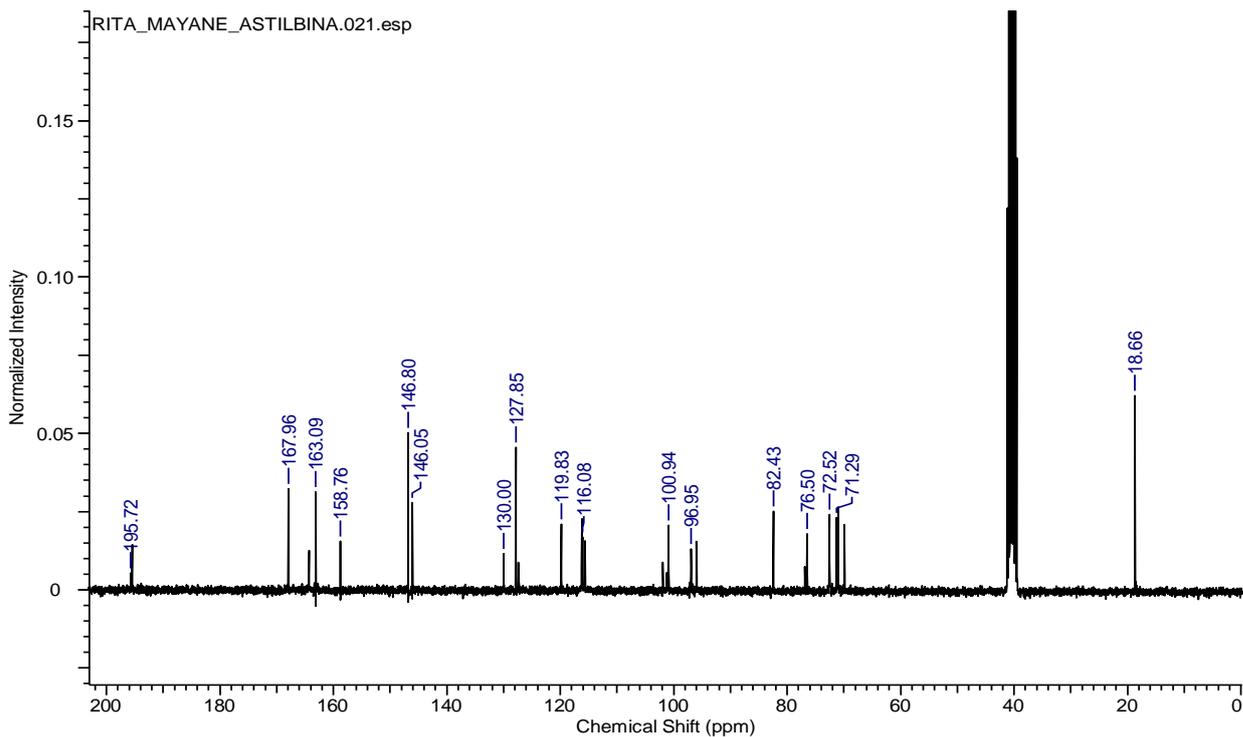
8. ANEXOS



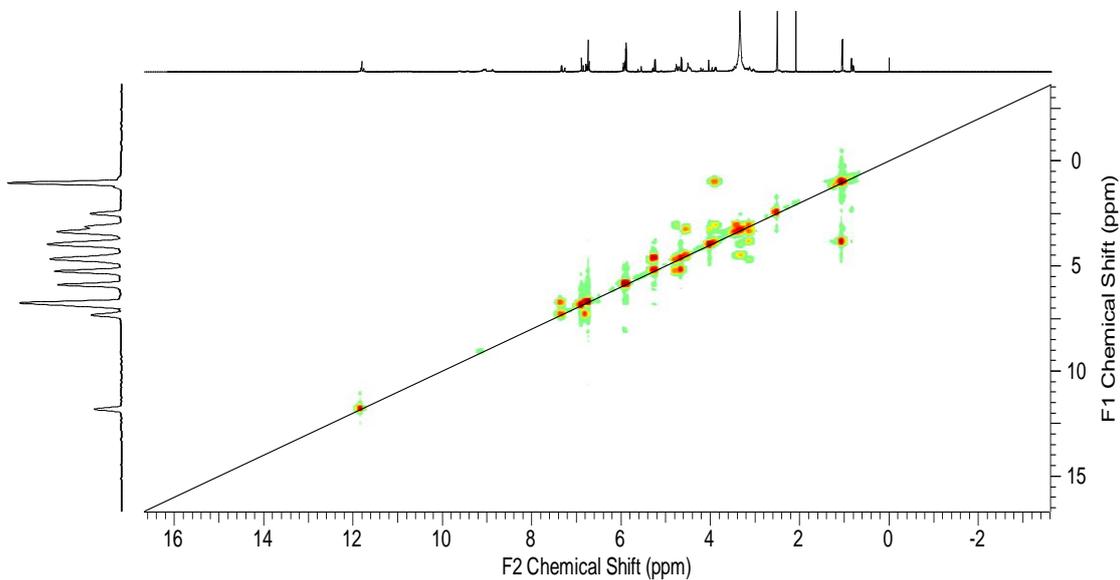
Mapa de HSQC da substância **1 (engellentina)** a 300, 2 MHz e 75,5 MHz..



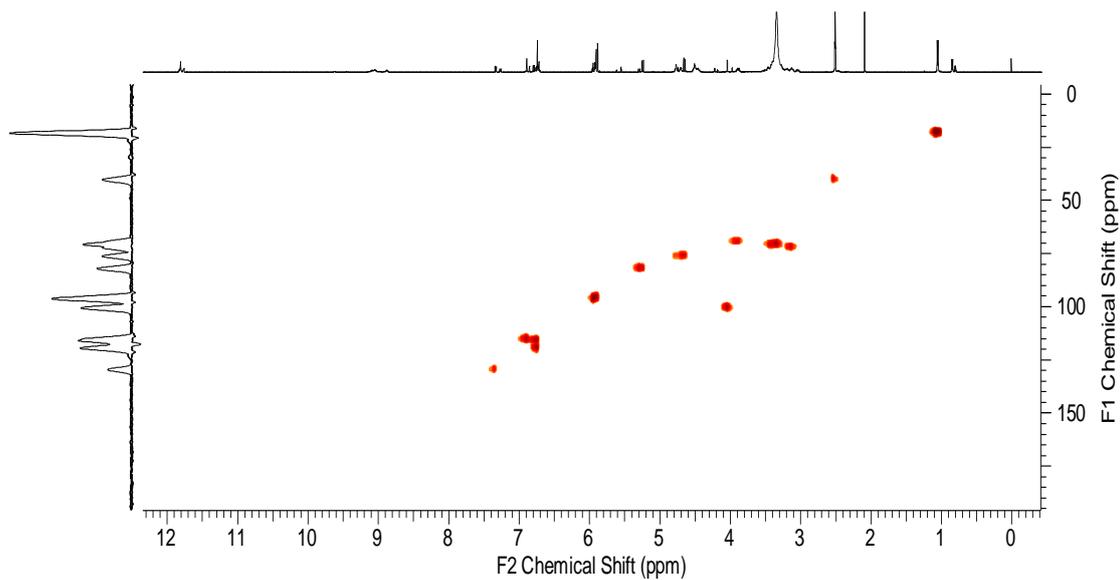
Mapa de HMBC da substância **1 (engellentina)** a 300, 2 MHz e 75,5 MHz..



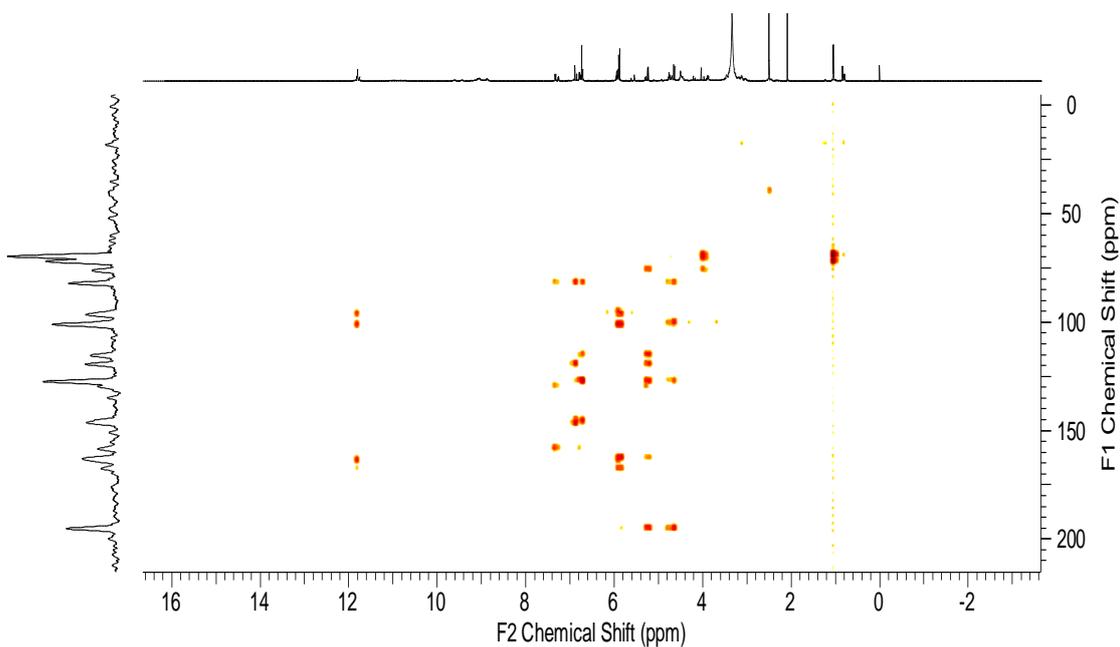
Espectro de ^{13}C da substância **2 (astilbina)** a 75.5 MHz.



Mapa de correlação COSY da substância **2 (astilbina)** a 300, 2 MHz e 75,5 MHz..



Mapa de correlação HSQC da substância **2 (astilbina)** a 300, 2 MHz e 75,5 MHz..



Mapa de correlação HMBC da substância **2 (astilbina)** a 300, 2 MHz e 75,5 MHz.