

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO NA  
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍVEIS E NÃO  
EXTRAÍVEIS DO ARAÇÁ-PIRANGA (*Eugenia multicostata*) E DA PIXIRICA  
(*Leandra leavigata*)**

LUCAS TEIXEIRA ALVES

Orientador: Prof. Eliseu Rodrigues

Co-orientador: Prof. Vitor Manfroi

Porto Alegre

2019

LUCAS TEIXEIRA ALVES

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO NA  
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍVEIS E NÃO  
EXTRAÍVEIS DO ARAÇÁ-PIRANGA (*Eugenia multicostata*) E DA PIXIRICA  
(*Leandra leavigata*)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
como requisito parcial para a  
obtenção do título de mestre em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Eliseu Rodrigues

Co-orientador: Prof. Vitor Manfroi

Porto Alegre

2019

LUCAS TEIXEIRA ALVES

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO NA  
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍVEIS E NÃO  
EXTRAÍVEIS DO ARAÇÁ-PIRANGA (*Eugenia multicostata*) E DA PIXIRICA  
(*Leandra leavigata*)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
como requisito parcial para a  
obtenção do título de mestre em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Eliseu Rodrigues

Homologada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Co-orientador: Prof. Vitor Manfroi

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Alessandro de Oliveira Rios

---

Dr<sup>a</sup>. Giovana D. Mercali

---

Dr<sup>a</sup>. Katia Rezzadori

Porto Alegre

2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Alves, Lucas Teixeira  
APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA  
RESOLUÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
EXTRAÍVEIS E NÃO EXTRAÍVEIS DO ARAÇÁ-PIRANGA (*Eugenia  
multicostata*) E DA PIXIRICA (*Leandra leavigata*) /  
Lucas Teixeira Alves. -- 2019.  
70 f.  
Orientador: Eliseu Rodrigues.

Coorientador: Vitor Manfroi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Espectrometria de massas. 2. Compostos  
Fenólicos. 3. Frutas Nativas do Rio Grande do Sul. I.  
Rodrigues, Eliseu, orient. II. Manfroi, Vitor,  
coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao único Deus verdadeiro, nas pessoas da Santíssima Trindade, segundo creio, em acordo com o credo de Atanásio e com a Confissão de Fé de Westminster. A onipotência de toda Sua providência manifestada na vida de um ser tão indigno quanto eu mediante Sua graça só pode ser resumida a um profundo sentimento de humildade perante tal benevolência. Possa meus olhos contemplarem o cumprimento dos últimos versos do décimo sexto salmo na minha vida e de meus irmãos.

Agradeço aos meus pais pela possibilidade da existência e por suportarem minha subsistência até a fase adulta. Mas agradeço especialmente à minha falecida avó. Tenho certeza que se estivesse viva este seria um momento de grande regozijo.

João Calvino, sem seus ensinamentos eu há muito teria desesperado da vida, e isso literalmente. Não é sem razão que mudaste o rumo da civilização ocidental.

Agradeço a Ivan Throne. Sem suas nove leis eu não teria suportado o peso desses últimos meses. Quem diria que em meio a preposteridade desse mundo, *shinden* poderia manifestar *makoto* em meio a essa batalha por sobrevivência?

Aos meus verdadeiros amigos, vós sois poucos, e sabeis quem sois.

Ao professor Vitor Manfroi, sem a sua misericórdia naquele dia, de forma alguma eu teria chegado a esse momento. Obrigado por ter sido o pivô desta realização. A todos os professores que contribuíram com seu tempo e conhecimentos. Estes são os recursos mais preciosos que o ser humano possui, um porque não pode ser repostado, e o outro porque depende do primeiro. Agradeço a banca pela disposição em ler e corrigir este trabalho. Agradeço a professora Bruna pela sua paciência em me ensinar e por praticamente fazer sozinha minhas análises do método ORAC. Agradeço a Naira esposa do professor Eliseu pela revisão do manuscrito. Incluo agradecimentos à FAPERGS e aos contribuintes pela bolsa, sem esse recurso seria impossível ter concluído essa jornada sem recorrer ao desgaste extremo.

Agradeço finalmente de forma especial o professor Eliseu pela coragem em aceitar o desafio de tutorear um aluno com pelo menos cinco anos de atraso em relação aos demais. Espero sinceramente que teu imenso labor não tenha sido em vão. Desejo sinceramente que por muitos anos continue fazendo a diferença.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides .....	17
Figura 2. Flavonóis mais comumente encontrados em frutas .....	17
Figura 3. Flavonas mais comumente encontradas em frutas .....	18
Figura 4. Unidades monoméricas mais comuns nos taninos condensados .....	19
Figura 5. Exemplos de proantocianidinas .....	20
Figura 6. Exemplos de antocianidinas mais comumente encontradas em frutas .....	21
Figura 7. Exemplos de flavanonas .....	22
Figura 8. Exemplos de isoflavonas .....	22
Figura 9. Exemplos de estruturas de alguns taninos hidrolisáveis .....	24
Figura 10. Exemplos de ácidos clorogênicos .....	24
Figura 11. Exemplos de xantonas .....	25
Figura 12. Exemplos de estilbenos .....	25
Figura 13. Esquema geral da análise dos compostos fenólicos .....	26
Figura 14. Esquema básico de um espectrômetro de massas .....	28
Figura 15. Partes fundamentais de um espectrômetro de massas do tipo Q-Tof .....	31
Figura 16. Ilustração da aplicação do <i>SIRIUS</i> para a identificação .....	42
Figura 17. Cromatograma de íons extraídos dos FE do Araçá-piranga .....	43
Figura 18. Estruturas químicas das moléculas identificadas na FE do araçá-piranga .....	48
Figura 19. Cromatograma de íons extraídos dos FNE do Araçá-piranga .....	49
Figura 20. Estruturas químicas das moléculas identificadas na FNE do araçá-piranga .....	54

Figura 21. Cromatograma de íons extraídos dos FE da pixirica.....	59
Figura 22. Estruturas químicas das moléculas identificadas na FE da pixirica .....	63
Figura 23. Cromatograma de íons extraídos dos FNE da pixirica .....	65
Figura 24. Estruturas químicas das moléculas identificadas na FNE da pixirica.....	69
Figura 25. Curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição protéica e mineral (em base seca) das frutas maduras do araçá-piranga .....	34
Tabela 2. Validação do <i>software SIRIUS</i> na identificação de CF .....	41
Tabela 3. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos extraíveis (FE) da <i>Eugenia multicostata</i> .....	46
Tabela 4. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos não extraíveis (FNE) da <i>Eugenia multicostata</i> .....	51
Tabela 5. Teores de compostos fenólicos na fração FE e FNE do Araçá-piranga ..	56
Tabela 6. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos extraíveis (FE) da <i>Leandra leavigata</i> .....	60
Tabela 7. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos não extraíveis (FNE) da <i>Leandra leavigata</i> .....	66
Tabela 8. Teores de compostos fenólicos extraíveis (FE) e não extraíveis (FNE) da pixirica .....	71
Tabela 9. Capacidade de desativação do ROO <sup>•</sup> dos extratos de FE e FNE do araçá-piranga e pixirica .....	74

## GLOSSÁRIO

Acurácia – Erro de massa entre a massa exata e a massa acurada do composto

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists

APCI – Ionização química à pressão atmosférica

C18 – Octadecilsilano

FNE – Compostos fenólicos não-extraíveis

FE – Compostos fenólicos extraíveis

DAD – Detector de arranjo de diodos

ESI – Ionização por electrospray

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

$m/z$  – Razão massa/carga

Massa acurada – Massa de um íon de carga conhecida, determinada experimentalmente

Massa exata – Massa calculada (teórica) para um íon ou molécula

MS – Espectrometria de massas

Pico - Região localizada em um espectro de massas com sinal de um íon relativamente intenso

PTFE – Politetrafluoretileno

Q-ToF – Analisador de massas quadrupolo-tempo de voo

ROO• – Radical peroxila

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral .....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Compostos fenólicos .....	16
3.2 Espectrometria de massas .....	28
3.3. Frutas nativas de Porto Alegre .....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. Reagentes, solventes e padrões .....	36
4.2. Amostras .....	36
4.3. Extração de compostos fenólicos .....	37
4.4. Análise por HPLC-DAD-MS/MS.....	38
4.5. Determinação da capacidade antioxidante .....	40
4.6. Análise estatística, gráficos e estruturas químicas .....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1. Validação do <i>software SIRIUS</i> para identificação dos compostos fenólicos .....	41
5.2. Araçá-piranga.....	43
5.3. Pixirica.....	58
5.4. Capacidade antioxidante .....	73
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>85</b>

## RESUMO

Muitas pesquisas foram realizadas nas últimas décadas com o objetivo de compreender o papel dos compostos fenólicos (CF) sobre a saúde humana, porém tendo duas limitações recorrentes: (1°) análise somente dos CF extraíveis; (2°) limitada aplicação da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Com o objetivo de superar tais limitações, nesse trabalho a composição dos compostos fenólicos extraíveis (FE) e não extraíveis (FNE) de duas frutas nativas brasileiras (araçá-piranga e pixirica) foi determinada pela aplicação da HRMS associada ao uso do software *SIRIUS* 4.0.1. Foram identificados 25 CF na FE e 25 CF na FNE do araçá-piranga, e 35 CF na FE e 22 na FNE da pixirica. O composto majoritário da fração FE do araçá-piranga foi o ácido 1,3,4-tri-galoilquínico ( $2325,0 \pm 49,3 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada) e da fração FNE foi o ácido 3-O-metil-gálico ( $927,1 \pm 4,2 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada). O composto majoritário da fração FE da pixirica foi o bergapteno ( $767,6 \pm 63,2 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada) e da fração FNE foi o ácido elágico ( $533,8 \pm 3,9 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada). Quanto a capacidade em desativar o  $\text{ROO}^{\bullet}$  do araçá-piranga os valores para as frações FE e FNE foram respectivamente  $644,2 \pm 5,9$  e  $323,4 \pm 4,4 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado, enquanto para a FE e FNE da pixirica os valores foram respectivamente  $310,8 \pm 2,1$  e  $551,4 \pm 13,8 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado. Os resultados deste trabalho indicam que a fração FNE possui uma parcela significativa dos compostos fenólicos presentes nas frutas araçá-piranga e pixirica. Além disso, os dados deste trabalho confirmam que a espectrometria de massas de alta resolução associada à bioinformática pode representar uma ferramenta poderosa no estudo dos CF de alimentos.

**Palavras-chave:** compostos bioativos, antioxidantes, frutas, bioinformática.

## ABSTRACT

Many studies have been carried out in the last decades in order to understand the role of phenolic compounds (CF) on human health, but have two recurrent limitations: (1) analysis only of extractable CF; (2nd) limited application of high-resolution mass spectrometry (HRMS). In order to overcome these limitations, the composition of extractable (FE) and non-extractable phenolic compounds (FNE) of two Brazilian native fruits (araçá-piranga and pixirica) was determined by HRMS application associated to the use of SIRIUS 4.0 software. 25 CF in FE and 25 CF in FNE of araçá-piranga, and 35 CF in FE and 22 in FNE of the pixirica were identified. The major compound of the FE fraction of araçá-piranga was 1,3,4-tri-galoylquinic acid ( $2325.0 \pm 49.3 \mu\text{g g}^{-1}$  lyophilized fruit) and the FNE fraction was 3-O-methyl ( $927.1 \pm 4.2 \mu\text{g g}^{-1}$  lyophilized fruit). The major compound of the FE fraction of the pixirica was bergapten ( $767.6 \pm 63.2 \mu\text{g g}^{-1}$  of lyophilized fruit) and the FNE fraction was ellagic acid ( $533.8 \pm 3.9 \mu\text{g g}^{-1}$  of lyophilized fruit). As for the ability to deactivate the  $\text{ROO} \cdot$  of the araçá-piranga the values for the FE and FNE fractions were respectively  $644.2 \pm 5.9$  and  $323.4 \pm 4.4 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  of lyophilized extract, while for FE and FNE of the pixirica the values were respectively  $310.8 \pm 2.1$  and  $551.4 \pm 13.8 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  of lyophilized extract. The results of this work indicate that the FNE fraction has a significant portion of the phenolic compounds present in araçá-piranga and pixirica fruits. In addition, the data of this work confirm that the high-resolution mass spectrometry associated with bioinformatics may represent a powerful tool in the study of CF foods.

**Keywords:** bioactive compounds, antioxidants, fruits, bioinformatics.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis pela diminuição do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas não transmissíveis. Este efeito é atribuído, por hipótese, a capacidade destes compostos de atenuarem reações oxidativas e/ou nitrosativas que são induzidas por espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e que estão ligadas à patogênese destas doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2018). A compreensão da importância e dos mecanismos de ação dos compostos fenólicos no organismo humano dependem diretamente do conhecimento do perfil qualitativo e quantitativo dessas moléculas nos diferentes alimentos consumidos na dieta.

Na busca pela compreensão do papel dos compostos fenólicos sobre a saúde humana, muitos estudos foram realizados nos últimos 20 anos. Uma busca na base de dados *Scopus* (limitação de tempo: 1999 a 2019) utilizando as palavras-chave “*phenolic compounds and food*” gerou um total de 22.309 resultados. Uma análise criteriosa desses trabalhos mostra que há duas limitações recorrentes associadas aos métodos e técnicas analíticas utilizadas nesses trabalhos: (1º) análise somente dos compostos fenólicos extraíveis, e (2º) limitada aplicação da espectrometria de massas (MS) de alta resolução na análise de compostos fenólicos em alimentos.

Os compostos fenólicos são analisados em extratos de alimentos, os quais são produzidos com solventes orgânicos ou misturas aquosas com solventes orgânicos. Esses compostos presentes no extrato constituem os “fenólicos extraíveis” (FE) (PÉREZ-JIMÉNEZ; TORRES, 2011). Em geral, o resíduo sólido de tais extrações, denominado de *pellet*, não é considerado como fonte de compostos fenólicos, sendo ignorado e descartado. Contudo, quantidades significativas de compostos fenólicos podem permanecer nesse resíduo da extração, associados com a matriz, constituindo os “fenólicos não extraíveis” (FNE). Esta fração foi descrita como sendo a face escondida (*hidden face*) dos compostos fenólicos presentes nos alimentos, englobando, principalmente, as proantocianidinas, os taninos hidrolisáveis, e os ácidos fenólicos (TARASCOU et al., 2010).

Ao considerar o exposto acima, fica claro que há uma lacuna no campo de pesquisa dos compostos fenólicos, havendo uma grande carência de informações relativas aos tipos e ao teor dos compostos fenólicos não extraíveis presentes nos alimentos. Além disso, a utilização apenas de métodos colorimétricos ou cromatográficos acentua esse problema. Moléculas com esse grau de complexidade devem ser estudadas pela aplicação da espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS, *high resolution mass spectrometry*). A HR-MS, por ser uma técnica recente em relação a MS tradicional, ainda não é amplamente utilizada no contexto da análise de alimentos. A aplicação dessa técnica permite obter informações sobre a massa exata dos compostos estudados, bem como o padrão de fragmentação e o padrão isotópico, o que é fundamental na confirmação da identidade de compostos fenólicos ou na identificação de novos compostos presentes em frutas (LA BARBERA et al., 2017).

A carência de informações sobre os compostos fenólicos é ainda mais crítica em relação às frutas nativas brasileiras. Segundo uma revisão recente, cerca de 80% das frutas nativas brasileiras não foram estudadas quanto a sua composição fenólica (TEIXEIRA et al., 2019). Nesse contexto, enquadram-se duas frutas nativas e pouco conhecidas, o araçá-piranga (*Eugenia multicostata*) e a pixirica (*Leandra leavigata*), da qual se tem apenas trabalhos publicados sobre as suas características filogenéticas, botânicas, agronômicas ou em alguns casos sobre aspectos fitoterápicos (APEL et al., 2004; BRAS; BIOCÍ, 2009; CALLEGARO et al., 2015; FREITAS et al., 2010; GRINGS; BRACK, 2009; KINUPP, 2007a; MIKICH; SILVA, 2001; MONKS et al., 2002a; MÜLLER; WAECHTER, 2001).

O araçá-piranga é uma fruta pertencente ao gênero *Eugenia* atualmente em risco de extinção devido ao extrativismo predatório ocorrido no período colonial devido à qualidade excepcional de sua madeira. Sua exploração é protegida por lei em Saporanga-RS, cidade cujo nome provém do araçá-piranga (SAPIRANGA, 2016). Suas frutas de excepcional qualidade assemelham-se com os da pitanga, porém de proporções maiores, com sabor e aromas característicos, o que porpicia esta fruta possuir valor comercial não explorado.

A pixirica é uma fruta pertencente à família das *Melastomataceae*, encontrada nos gêneros *Huberia*, *Leandra*, *Clidemia* e *Miconia*. Algumas espécies de

*Melastomataceae* são ornamentais e produzem frutas muito apreciados pela fauna local. As *Melastomataceae* são nativas do hemisfério sul, sendo muito adaptadas para as condições climáticas desta região do planeta, onde podem ser encontradas em praticamente todos os locais. Este fato ocorre principalmente por não possuírem predadores e pela alta dispersabilidade de suas sementes, o que ocasionou estas plantas tornarem-se espécies invasivas em outros habitats, principalmente na América do Norte onde estas plantas foram batizadas de *Koster curse* (maldição de Koster). As frutas da pixirica são doces, visualmente atraentes, totalmente adaptadas às condições de solo e clima do hemisfério sul, portanto possuindo potencial agrário inexplorado.

Com todas estas informações em mente, o objetivo deste trabalho foi aplicar a espectrometria de massas de alta resolução na identificação e quantificação dos compostos fenólicos extraíveis não extraíveis do araçá-piranga (*Eugenia multcostata*) e da pixirica (*Leandra laevigata*). Faremos isto: explorando estado da arte atual sobre os CF; as metodologias empregadas nesse trabalho para a extração de FE e FNE do araçá-piranga e da pixirica; validando o software *SIRIUS* para auxiliar nas identificações; identificando e quantificando os CF; verificando a atividade antioxidante dos extratos das frutas frente ao radical peroxila (ROO<sup>•</sup>).

Esperamos com este trabalho diminuir a brecha existente no conhecimento sobre a composição de compostos fenólicos em frutas brasileiras, assim como ampliar os horizontes metodológicos para atingir tal empreitada, e, simultaneamente, tornar conhecidas espécies nativas com potencial agrícola que atualmente estão sendo sub-utilizadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi aplicar a espectrometria de massas de alta resolução na identificação e quantificação dos compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis do araçá-piranga (*Eugenia multicostata*) e da pixirica (*Leandra laevigata*).

Objetivos específicos:

(1°) Validação do *software SIRIUS* para a identificação de compostos fenólicos.

(2°) Determinação, por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, da composição de compostos fenólicos extraíveis (FE) do Araçá-Piranga e da Pixirica

(3°) Determinação, por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, da composição de compostos fenólicos não-extraíveis (FNE) do Araçá-Piranga e da Pixirica

(4°) Determinação da capacidade antioxidante de extrato hidrofílico do araçá-piranga e da pixirica frente ao radical peroxila (ROO•).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Compostos fenólicos

##### 3.1.1 Definição, funções e classificação

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, sendo amplamente distribuídos na natureza (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Até o momento foram relatados cerca de 10.000 diferentes compostos fenólicos, dos quais aproximadamente 500 estão presentes em plantas utilizadas na dieta humana (VICENTE; BOSCAIU, 2018).

Nas plantas, os compostos fenólicos possuem várias funções - estruturais como a lignina, e como parte do sistema de defesa da planta, como é o caso dos taninos (PEREIRA et al., 2009). Outra classe de compostos fenólicos, as antocianinas são as responsáveis pela pigmentação de folhas, flores e frutas, que influenciam na seletividade de espécies durante os períodos de polinização (ANDERSEN; JORDHEIM, 2010; GLOVER; MARTIN, 2012).

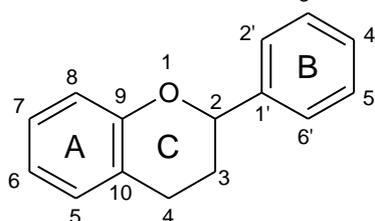
Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de pelo menos um anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas a este. As moléculas que possuem mais de um anel aromático são denominadas de polifenóis (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Em geral, essas moléculas estão ligadas a açúcares e ácidos orgânicos. Neste grupo estão incluídas desde moléculas simples, com baixa massa molecular, como o ácido gálico, até moléculas altamente complexas, com elevada massa molecular, como os taninos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). De acordo com as suas características estruturais, os compostos fenólicos são classificados em dois grandes grupos: os flavonoides e não flavonoides.

##### 3.1.2 Flavonoides

Os flavonoides são caracterizados por possuírem ao menos uma hidroxila ligada a um ou mais anéis aromáticos, organizadas em um esqueleto de 15 carbonos divididos em dois anéis de 6 carbonos e uma ponte com 3 carbonos (C6-C3-C6). Convencionou-se utilizar, para fins didáticos, denominar os anéis dos flavonoides de

A, B e C (Figura 1). As diferentes substituições na estrutura química básica dos flavonoides geram seis diferentes sub-classes: flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, antocianidinas, flavanonas e isoflavonas. Além destes, estão presentes como componentes minoritários nos vegetais os flavan-3,4-dióis, cumarinas, chalconas, di-hidrochalconas e auronas (PEREIRA et al., 2009).

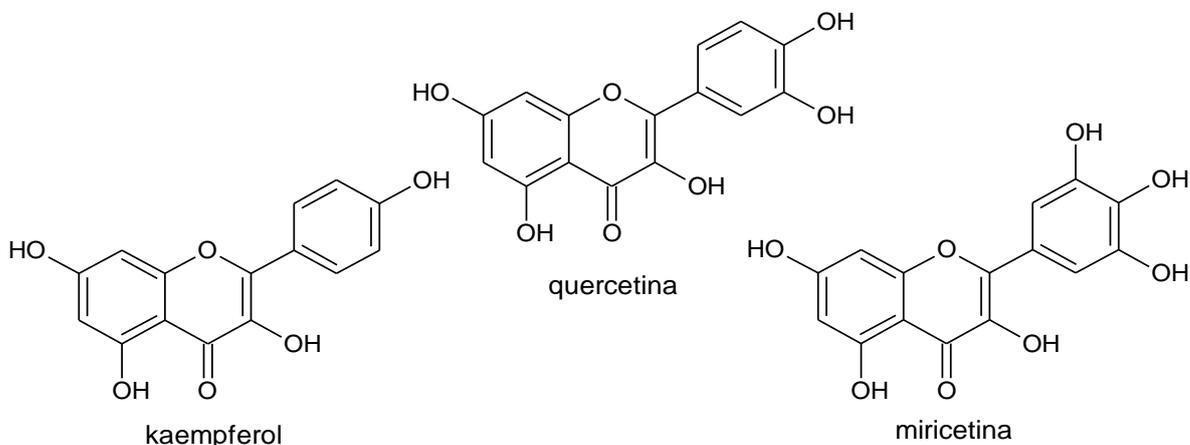
Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Os flavonóis são os flavonoides mais comuns e distribuídos no reino vegetal. Destes os mais comuns (Figura 2) são o kaempferol, a quercetina, a miricetina e a isoramnetina. Geralmente são encontrados na forma glicosilada, sendo os monossacarídeos mais comuns a glicose e a galactose (JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2017). Esses açúcares são ligados, preferencialmente, na posição 3 do anel C e, com menos frequência, nas posições 5, 7, 4', 3' e 5'. Uma das consequências dos açúcares é aumentar a polaridade desses, sendo que posição ocupada modifica o grau de influência sobre suas propriedades físicas e, conseqüentemente, analíticas (FERRERES; LLORACH; GIL-IZQUIERDO, 2004).

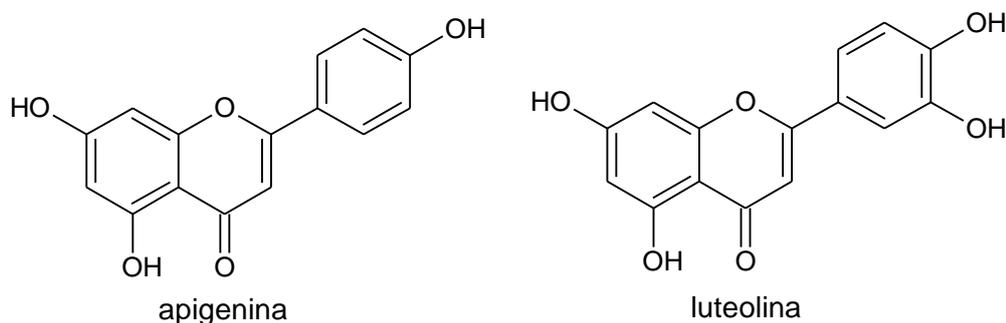
Figura 2. Flavonóis mais comumente encontrados em frutas.



Fonte: Próprio autor, 2019.

As flavonas não possuem hidroxila na posição 3 do anel C, porém, em outros sítios ocorrem diversas substituições, tais como hidroxilação, metilação, alquilação e glicosilação. Estas são encontradas principalmente na forma glicosilada. Exemplos mais comuns de flavonas são a apigenina e a luteolina (Figura 3). Não são amplamente distribuídos na natureza, porém, podem ser encontradas em algumas ervas e frutas, por exemplo: salsa, tomilho, pimentas, pimentões e radite (NABAVI et al., 2015).

Figura 3. Flavonas mais comumente encontradas em alimentos.

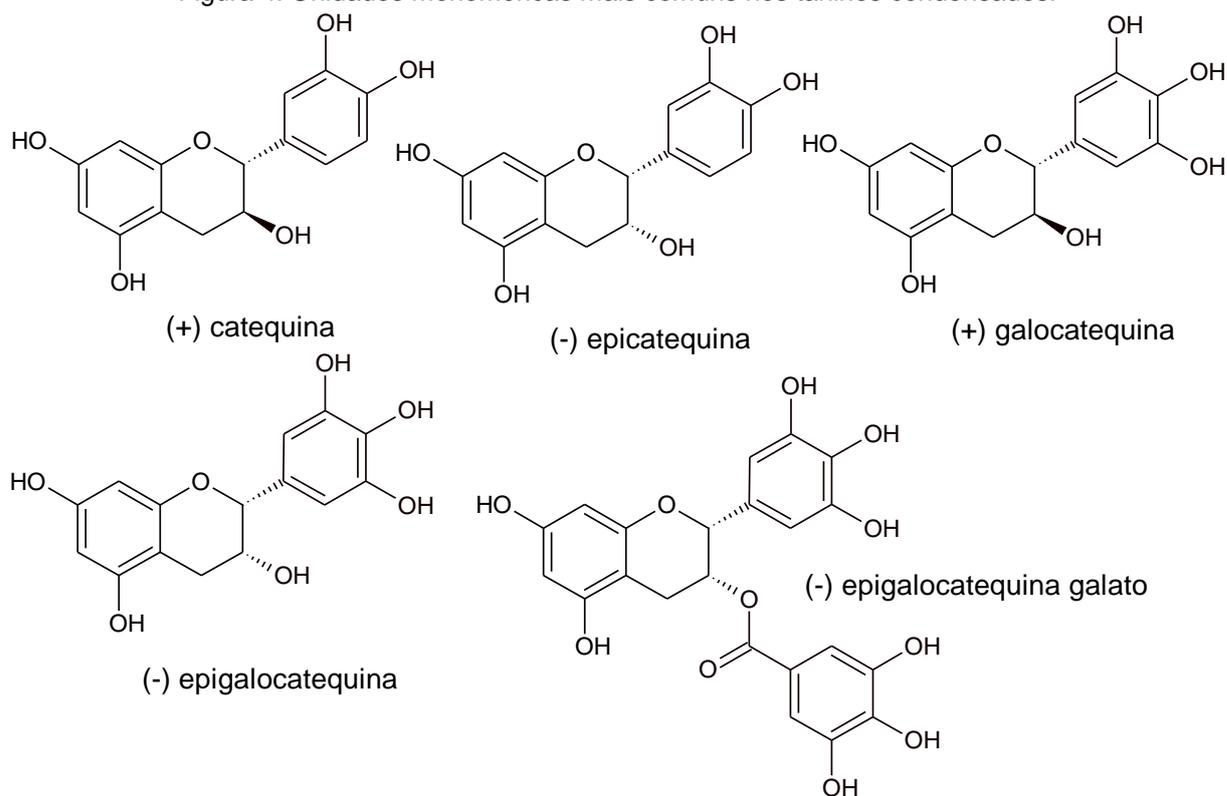


Fonte: Próprio autor, 2019.

Os flavan-3-óis possuem estruturas químicas não planares e constituem a classe mais complexa no grupo dos flavonoides. Devido a saturação do anel C, ocorre a formação de dois centros quirais no C2 e C3, ocasionando a existência de diferentes estereoisômeros na molécula. Os principais representantes dessa classe são a (+) catequina e seu isômero espacial (-) epicatequina. Geralmente esses isômeros são derivados da rotação da hidroxila do C3. Raramente ocorre a formação de isômeros (+) catequina e (-) epicatequina proveniente da rotação do anel B em C2 (PEREIRA et al., 2009).

Os taninos condensados são oligômeros ou polímeros contendo como núcleo moléculas do grupo dos flavan-3-óis. Eles também são chamados de proantocianidinas, visto que são convertidas em antocianidinas após aquecimento em solução etanólica. As mais frequentes unidades básicas dos taninos condensados são a (+) catequina, (-) epicatequina, (+) galocatequina, (-) epigalocatequina e (-) epigalocatequina galato (Figura 4) (KOLECKAR et al., 2008).

Figura 4. Unidades monoméricas mais comuns nos taninos condensados.

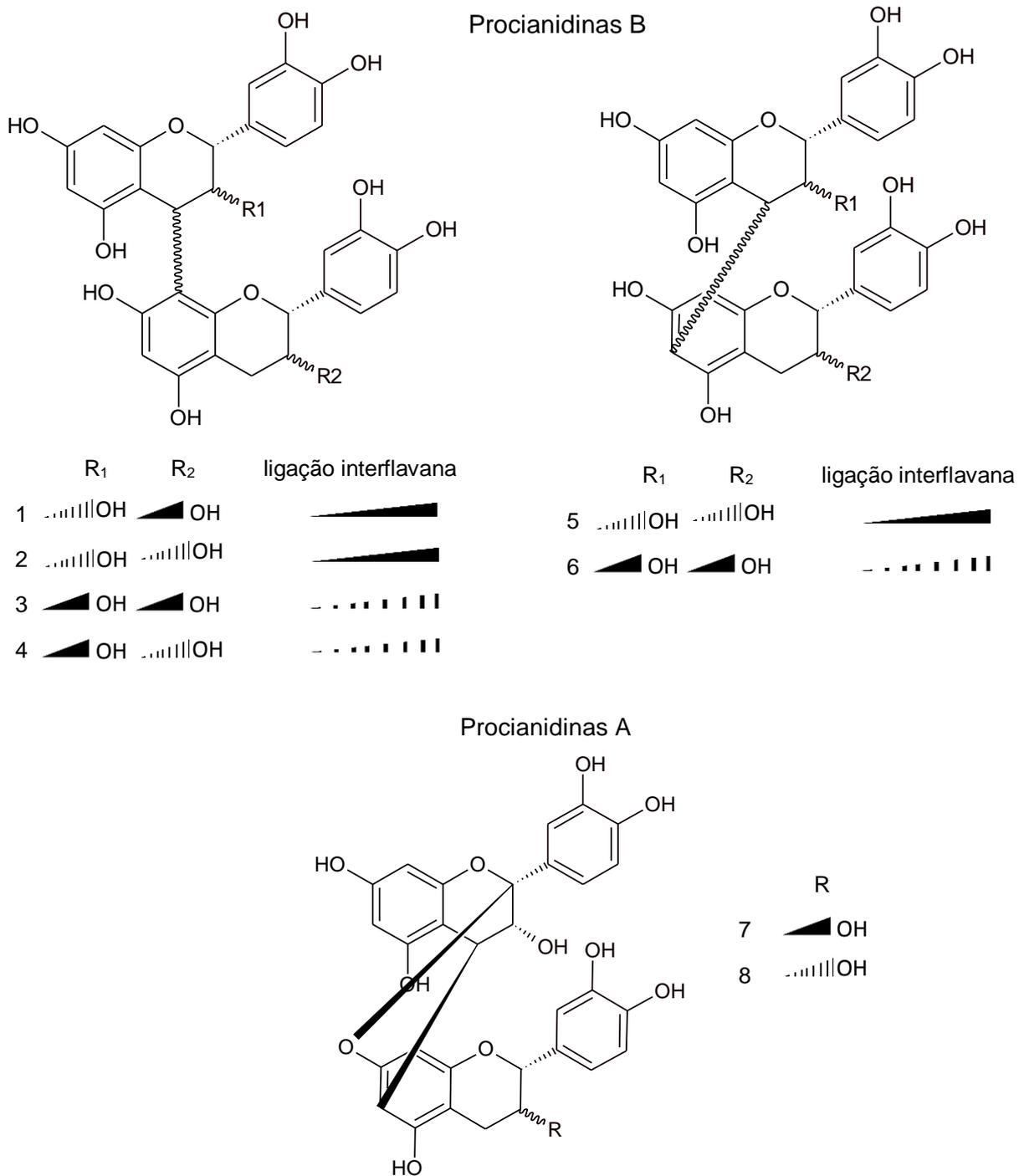


Fonte: (KOLECKAR et al., 2008)

A variedade estrutural dos taninos condensados está relacionada à diversidade no padrão de hidroxilação estereoquímica nos seus três centros quirais e a localização e o tipo de ligação interflavana (Figura 5) presente. Além disso, derivatizações do tipo O-metilação, C- e O-glicosilação e O-galoilação foram relatadas na literatura. As procianidinas são classificadas em dois grupos de acordo com o padrão de hidroxilação: (1) procianidinas (3,5,7, 4'-OH), e (2) prodelfinidinas (3,5,7, 3', 4', 5'-OH) (KOZIKOWSKI; TÜCKMANTEL; GEORGE, 2000)

As procianidinas do tipo B (diméricas) e do tipo C (triméricas) são caracterizadas por uma ligação simples entre unidades de flavanóis, geralmente envolvendo o C-4 do flavan-3-ol da unidade superior e C-6 ou C-8 da unidade inferior (Figura 5). As proantocianidinas do tipo A possuem uma ligação éter adicional entre o C-2 da unidade flavan-3-ol superior e a hidroxila 7-OH ou 5-OH da unidade inferior (Figura 5) (KOLECKAR et al., 2008).

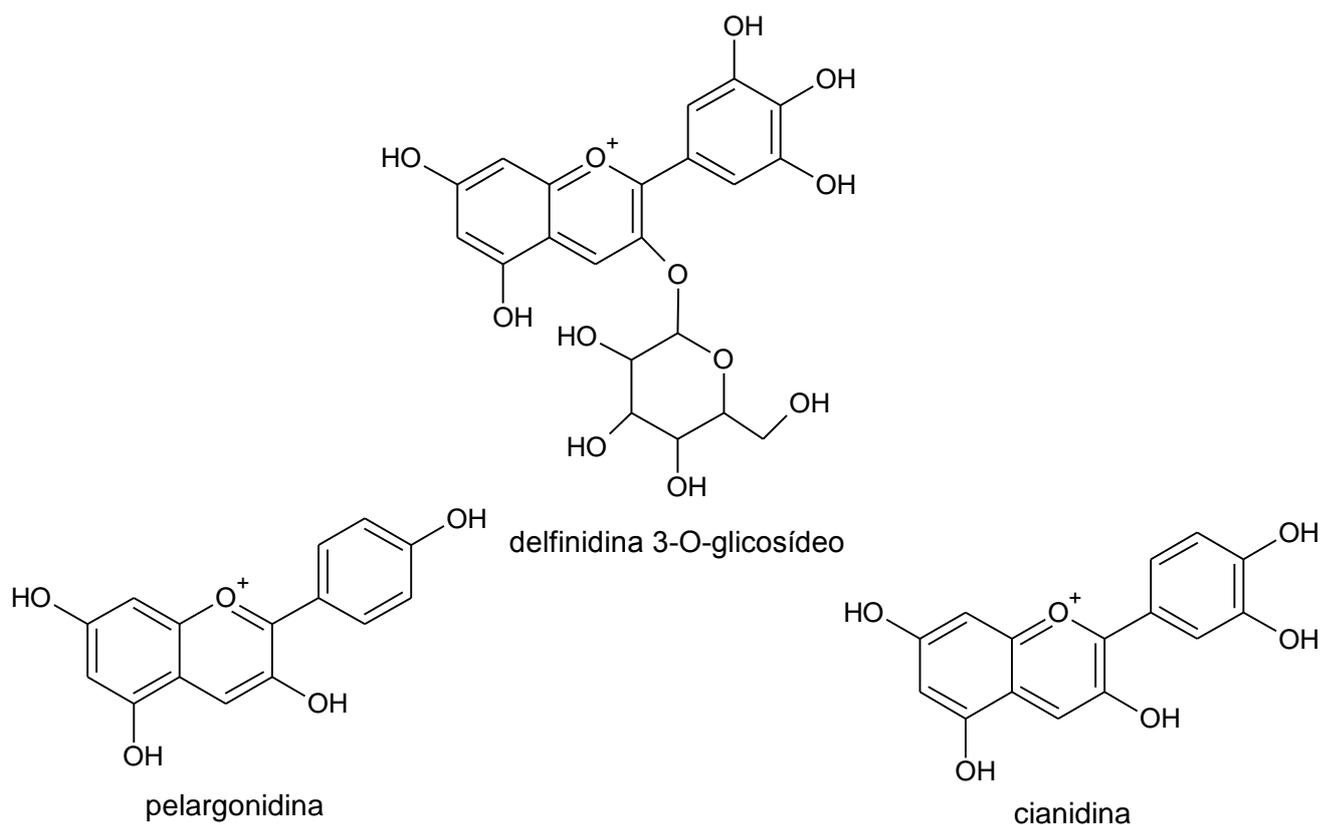
Figura 5. Exemplos de proantocianidinas. (1) procianidina B1 (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina); (2) procianidina B2 (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina); (3) procianidina B3 (catequina-(4 $\beta$ →8)-catequina); (4) procianidina B4 (catequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina); (5) procianidina B5 (epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina); (6) procianidina B6 (catequina-(4 $\beta$ →6)-catequina); (7) procianidina A1 (epicatequina-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →7)-catequina); (8) procianidina A2 (epicatequina-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →7)-epicatequina).



Fonte: (KOLECKAR et al., 2008)

As antocianinas são comuns em todo reino vegetal, sendo encontradas em todas as partes das plantas, porém, as maiores concentrações são encontradas nas cascas de frutas e em flores, a quem conferem cores que variam de vermelho, passando pelo azul, até o roxo. As antocianidinas de maior ocorrência em alimentos são a pelargonidina, a cianidina, a delphinidina, a peonidina, a petunidina e a malvidina (Figura 6). Salienta-se o fato de que as antocianidinas - forma aglicona das antocianinas - não são encontradas na natureza. Os açúcares presentes na estrutura, por sua vez, podem estar ligados a ácidos orgânicos e a hidroxicinamatos (DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2016). Os açúcares mais comuns são a glicose e a ramnose; os ácidos orgânicos mais comuns são o cumárico e o cafeico (STALMACH, 2013).

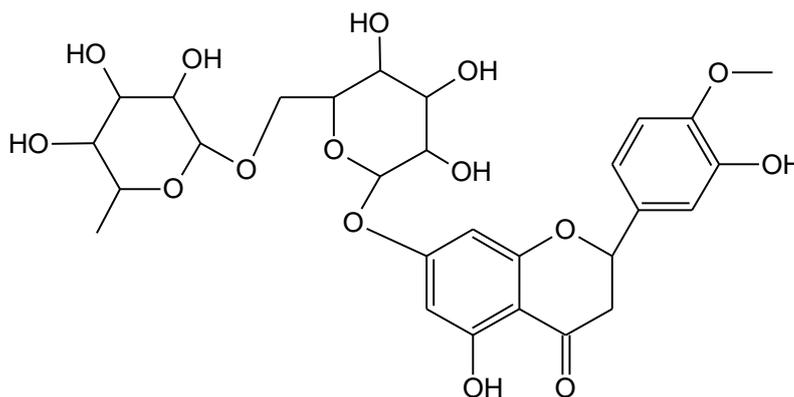
Figura 6. Exemplo de antocianidinas e antocianinas mais comumente encontradas em frutas.



Fonte: Próprio autor, 2019.

As flavanonas são encontradas principalmente em frutas cítricas, das quais a hesperetina e a naringenina são as mais comuns. Quando ligadas a rutinose essas flavanonas não possuem sabor, porém, a hesperetina-7-O-neohesperidosídeo e a naringenina-7-O-neohesperidosídeo são intensamente amargas, representando um desafio para a indústria de sucos cítricos (SLÁMOVÁ; KAPEŠOVÁ; VALENTOVÁ, 2018).

Figura 7. Exemplo de flavanona.

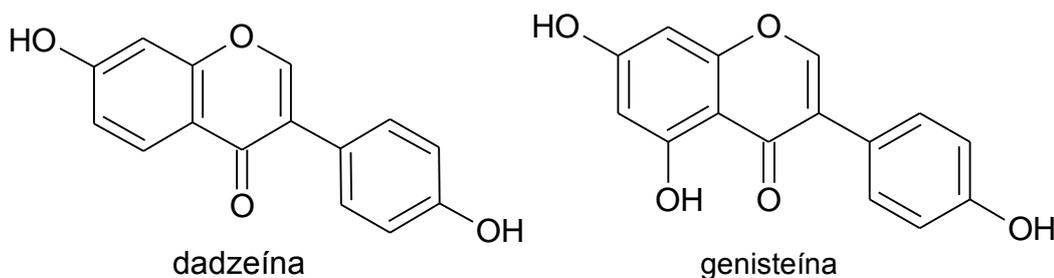


hesperetina 7-O-rutinosídeo

Fonte: Próprio autor, 2019.

As isoflavonas são predominantemente encontradas em leguminosas e são representadas principalmente pela daidzeína e pela genisteína (Figura 8). Sua diferença estrutural característica é a posição do anel B em C3 ao invés de C2. (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Estes flavonoides são particularmente estudados devido ao fato de possuírem atividade estrogênica, podendo ser antagonistas ao desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (VITALE et al., 2013).

Figura 8. Exemplos de isoflavonas.



Fonte: Próprio autor, 2019.

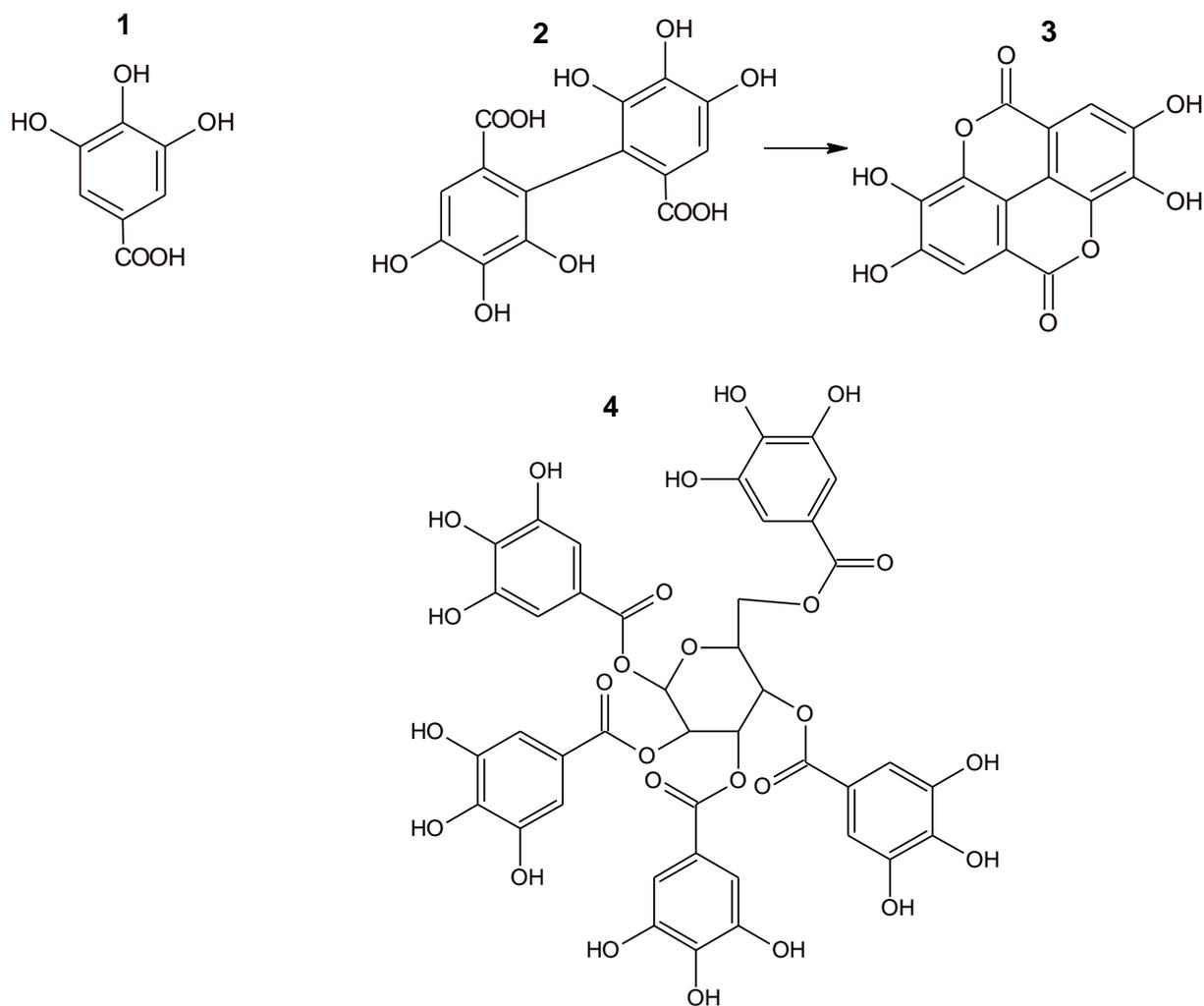
### 3.1.3 Não flavonoides

Os ácidos fenólicos são amplamente encontrados na natureza, e são os percussores de outras classes de moléculas, tais como os taninos hidrolisáveis, sendo o ácido gálico o representante mais comum dessa classe na natureza (HADDOCK et al., 1982). As maiores fontes de ácido gálico consistem em ésteres gálicos não glicosilados provenientes da uva, vinho, chá verde e preto e manga (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). O ácido elágico e seus elagitaninos são encontrados principalmente na framboesa (*Rubus idaeus*) e nos morangos (*Fragaria x ananassa*), mas também em romãs (*Punica granatum*), amoras (*Rubus spp.*), e caqui (*Diospyros kaki*) (DA SILVA PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2008; MULLEN et al., 2003).

Os taninos hidrolisáveis são compostos contendo um núcleo de glicose ou outra molécula poliol esterificada com ácido gálico, também chamados de galotaninos ou ácido hexahidroxidifênico, também chamados de elagitaninos. O pentagaloilglicose (PGG) é uma unidade básica do metabolismo dos taninos hidrolisáveis, a partir da qual outras moléculas derivam. Galotaninos são formados por uma molécula central, como a glicose, cercada por unidades de ácido gálico. Já os elagitaninos possuem o ácido elágico ou a sua forma lactona, o ácido elágico (Figura 9) (KOLECKAR et al., 2008). A grande diversidade de moléculas de estruturas de galotaninos e elagitaninos deve-se as inúmeras possibilidades de formação de ligações oxidativas. Reações de oxidação intermolecular geram muitos oligômeros, tendo massa molecular variando de 2000 até 5000 daltons (KOLECKAR et al., 2008).

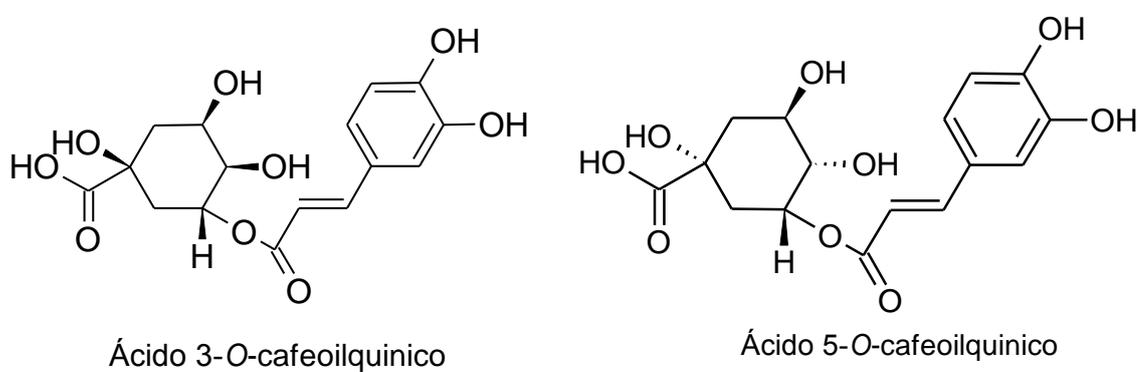
Os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e o ácido sinápico são os ácidos hidroxicinâmicos mais abundantes. Estes ocorrem como conjugados com ácidos orgânicos, tais como o ácido quínico e tartárico, sendo referenciados como ácidos clorogênicos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Os ácidos clorogênicos (Figura 10) 3-*O*-cafeoilquinico, 5-*O*-cafeoilquinico e 4-*O*-cafeoilquinico encontrados no café são os mais comuns, podendo chegar a ser a principal fonte de compostos fenólicos na dieta de pessoas que consomem grandes quantidades de café (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Figura 9. Exemplos de estruturas de alguns taninos hidrolisáveis. (1) ácido gálico; (2) ácido hexahidroxidifênico; (3) ácido elágico; (4) penta-galoilglicose (PGG).



Fonte: (KOLECKAR et al., 2008)

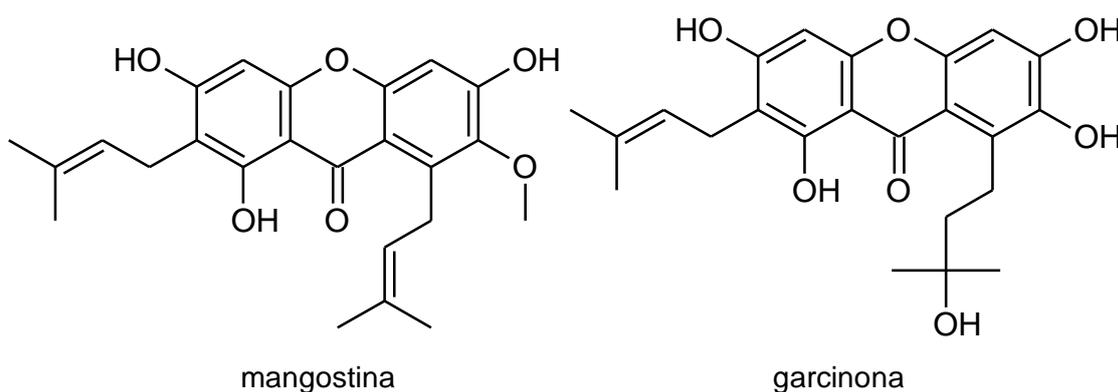
Figura 10. Exemplos de ácidos clorogênicos.



Fonte: Próprio autor, 2019.

As xantonas (Figura 11) são encontradas em plantas, fungos e líquens, porém, apenas dentro de famílias específicas: *Gentianaceae*, *Guttiferae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, e *Polygalaceae* (NEGI et al., 2013). A fonte que tem mais chamado a atenção nos últimos anos é o mangostão, que em razão das propriedades farmacológicas das xantonas, têm sido considerada uma “super” fruta (GUTIERREZ-OROZCO; FAILLA, 2013).

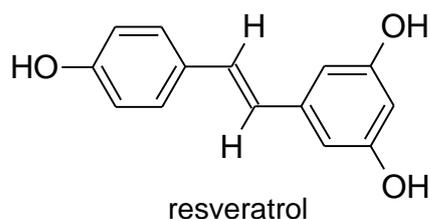
Figura 11. Exemplos de xantonas.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Os estilbenos (Figura 12) são fitoalexinas produzidas pelas plantas em resposta aos danos sofridos por ferimentos, doenças e estresses. O principal estilbeno consumido na dieta humana é o *trans*-resveratrol, sendo suas fontes principais o vinho tinto e o amendoim (*Arachis hypogaea*) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). O *trans*-resveratrol tem ganho atenção nos últimos anos pelo fato de retardar o desenvolvimento de cânceres e doenças coronárias em animais, além de retardar o envelhecimento e aumentar a resistência a estresses (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Figura 12. Exemplo de estilbeno.

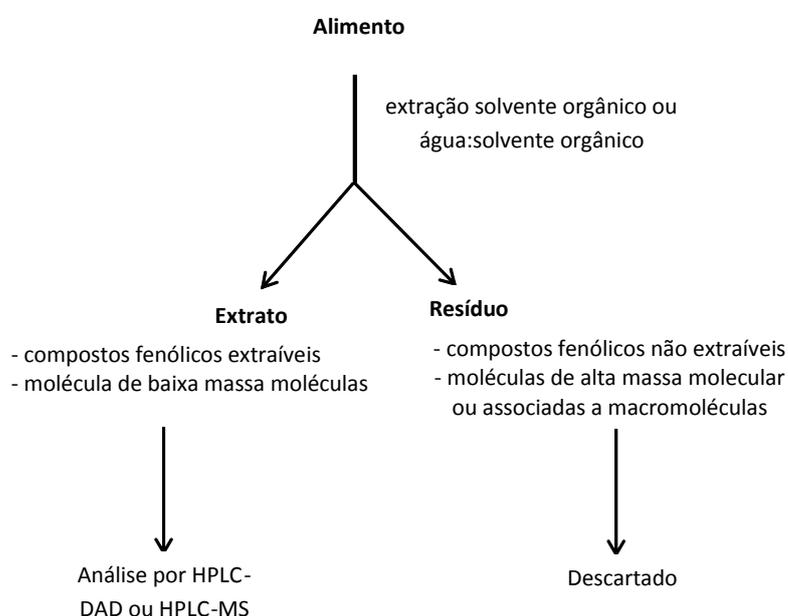


Fonte: Próprio autor, 2019.

### 3.1.4 Compostos fenólicos extraíveis (FE) e não extraíveis (FNE)

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com a sua interação com a matriz alimentar. Aqueles que estão fracamente ligados à matriz e podem ser extraídos prontamente utilizando solvente orgânico ou mistura de água e solvente orgânico, constituem os compostos fenólicos extraíveis (FE). Já os compostos que possuem interações mais fortes com a matriz e não são extraídos com os métodos convencionais de extração são denominados de compostos fenólicos não extraíveis (FNE). Na Figura 13 é apresentado um esquema de extração de FE, geralmente, utilizada como única análise de CF em alimentos.

Figura 13. Esquema geral do processo convencional de análise dos compostos fenólicos.



Fonte: (SAURA-CALIXTO; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2018a).

No grupo dos FE estão incluídas várias classes de compostos fenólicos, principalmente aqueles de baixa massa molecular, tais como: ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas (usualmente até decâmero), e até taninos hidrolisáveis de baixa massa molecular (SAURA-CALIXTO; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2018b). Já no grupo dos FNE estão incluídos tanto compostos fenólicos de elevada massa molecular, como as proantocianidinas, quanto compostos de baixa massa molecular que estão fortemente ligados à fibra alimentar e as proteínas. Esses compostos fenólicos estão ligados a matriz através de ligações covalentes, ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas (SAURA-CALIXTO; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2018b).

Devido à complexidade, a análise dos FNE requer a aplicação de várias etapas: (1º) extração dos FE, (2º) aplicação de método químico ou enzimático para a liberação dos FNE, (3º) análise por métodos espectrofotométricos, cromatográficos e/ou por espectrometria de massas.

Os FNE são liberados da matriz alimentar pela aplicação de hidrólise alcalina (saponificação) ou hidrólise ácida, tanto a temperatura ambiente quanto em temperaturas elevadas (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ; MARINA; PLAZA, 2017). Na aplicação destes métodos vários fatores são determinantes para o resultado final: (a) concentração de ácido ou base; (b) tipo de ácido ou base; (c) tempo e temperatura de hidrólise (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ; MARINA; PLAZA, 2017).

Na hidrólise ácida, ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) são os mais empregados. Nas condições normalmente utilizadas (metanol e água, 50:50, acidificados com HCl 2N) as ligações glicosídicas da hemicelulose e da celulose são rompidas, bem como de outros açúcares solúveis presentes na matriz. Um dos aspectos negativos desse tratamento é a degradação de alguns compostos fenólicos como o ácido cafeico (até 87%) e cumárico (até 15%) (SAURA-CALIXTO; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2018b).

Na hidrólise alcalina, soluções concentradas de hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) são os mais utilizados. Nessa hidrólise são rompidas principalmente ligações éster entre os ácidos fenólicos e componentes da parede celular. Esse tratamento é comum para a análise de ácidos fenólicos presentes em cereais (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ; MARINA; PLAZA, 2017). Similarmente ao tratamento ácido, o tratamento alcalino acarreta degradação de alguns compostos fenólicos. Por exemplo, em um trabalho com farelo de trigo, o ácido cafeico não foi detectado após o tratamento alcalino, apenas após o tratamento ácido (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ; MARINA; PLAZA, 2017).

O tratamento enzimático é outra alternativa para a liberação do FNE da matriz. Já foram aplicadas na análise de FNE, em alimentos, diversas enzimas tais como celulases, hemicelulases, pectinases, amilases e glucanases (PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2018). Possui como particular vantagem a utilização de condições mais brandas, evitando a degradação dos compostos fenólicos, porém, o custo elevado de aplicação pode ser proibitivo.

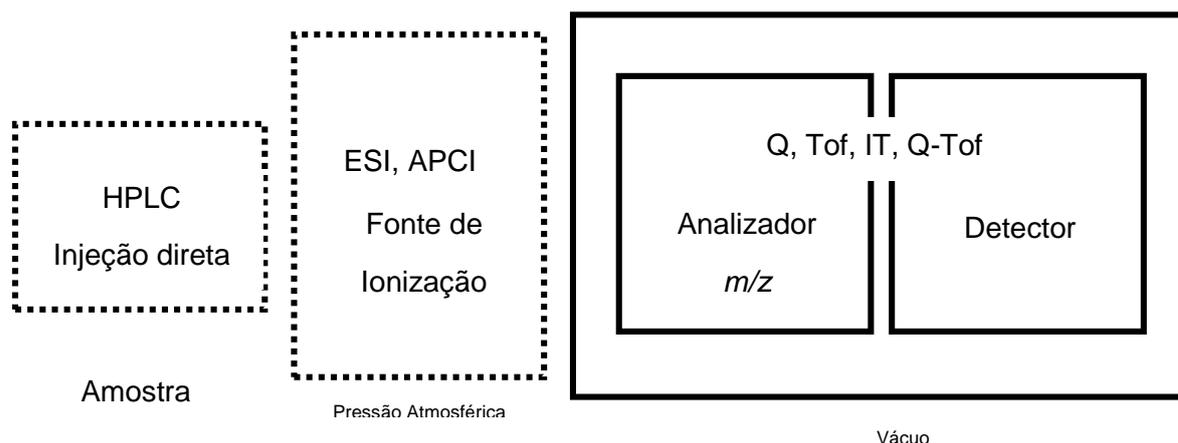
Outras técnicas mais modernas e com menor geração de resíduos foram relatadas na literatura para a análise do FNE, tais como a extração assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida ultrassom (UAE) e campo elétrico pulsado (PEF) (DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ; MARINA; PLAZA, 2017).

## 3.2 Espectrometria de massas

### 3.2.1 Conceitos básicos

A espectrometria de massas é uma técnica analítica amplamente utilizada na análise de diferentes moléculas presentes nos alimentos (HERRERO et al., 2012). Um espectrômetro de massas (MS) possui três partes fundamentais: (1) fonte de ionização, onde os íons são gerados; (2) um analisador de massas, onde os íons gerados são separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ); e um detector (**Figura 14**). Com exceção da fonte de ionização tipo APCI (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization), que opera a pressão atmosférica, as demais partes operam sob vácuo. A introdução da amostra no equipamento pode se dar de forma direta ou através de técnicas de cromatografia (THOMPSON, 2017).

Figura 14. Esquema básico de um espectrômetro de massas.



Siglas da esquerda para a direita: HPLC - *High Pressure Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE); ESI – *ElectroSpray Ionization* (ionização por electrospray); APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (ionização química à pressão atmosférica); Q – *Quadrupole mass analyzer* (analisador por quadrupolo); Tof – *Time-of-flight* (tempo de voo); IT – *Ion Trap* (armadilha de íons); Q-Tof – *Quadrupole Time-of-flight* (analisador por quadrupolo acoplado ao analisador por tempo de voo). Fonte: Próprio autor, 2019.

### 3.2.2 Fontes de ionização

A fonte de ionização é o local onde as moléculas são transferidas para a fase gasosa e ionizadas. Existem diversos tipos de fontes de ionização, sendo as mais utilizadas a ionização por elétrons (EI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), ionização e dessorção à laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por *electrospray* (ESI) (ROBOZ, 2013).

Na ionização por ESI a amostra é injetada através de uma agulha de capilar, onde é nebulizada com auxílio do gás de nebulização ( $N_2$ ). Um fino *spray* (aerossol) se forma (cone de Taylor) devido à presença de um campo elétrico derivado de uma alta voltagem. Devido a esse campo elétrico, microgotículas com excesso de carga positiva ou negativa são formadas. Essas microgotículas são dessolvatadas com o auxílio do gás secante ( $N_2$ ) e as gotas se subdividem. Por hipótese, dois mecanismos podem ser os responsáveis pela formação de moléculas carregadas: (1) formação de gotas com apenas um íon (CRM) ou (2) ejeção dos íons. Há três tipos de íons gerados nesta fonte: (1) íons moleculares, formados por processos redox; (2) íons quasi-moleculares, por reações ácido/base ou moléculas catiônicas ou aniônicas; e (3) pela coordenação com adutos metálicos. No modo de ionização negativo são formados íons do tipo  $[M-H]^-$  pela desprotonação do analito, ou adutos com ânions como cloreto, nitrato ou acetato. No modo de ionização positivo são formados íons do tipo  $[M+H]^+$ , ou adutos com cátions como sódio, amônio ou potássio (ROBOZ, 2013). Ainda, em ambos os modos podem ser formados íons moleculares, cátions ou ânions radicais, no modo positivo e negativo, respectivamente, porém, estes íons são os menos comuns. O modo escolhido depende da molécula a ser ionizada, avaliando qual gera uma análise mais sensível. Como a forma de ionização é branda, ocorre pouca ou nenhuma fragmentação na fonte.

Como a fonte ESI é uma fonte contínua e a ionização ocorre a pressão atmosférica, ela pode ser acoplada a um cromatógrafo líquido de alta eficiência. A grande desvantagem dessa fonte é sua susceptibilidade à supressão iônica, gerando uma mudança de sensibilidade. Trata-se de um efeito da matriz muito comum, onde há a competição de componentes da matriz que coeluem com os compostos a serem analisados (TRUFELLI et al., 2011).

### 3.2.3 Analisadores de massa

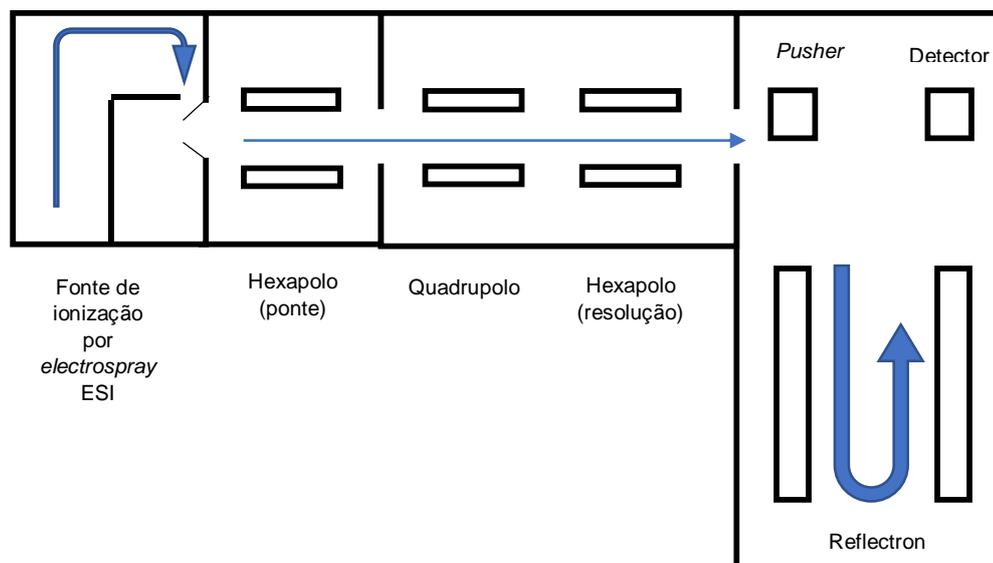
Os analisadores de relação massa/carga são os responsáveis por separar os íons gerados na fonte de ionização para posterior detecção. Dentre os analisadores mais comuns estão o quadrupolo, o tempo de voo (TOF – do inglês: *Time of Flight*), o quadrupolo *ion trap* (QIT – do inglês: *Quadrupole Ion Trap*) ou ainda, a versão híbrida que consiste em acoplar dois analisadores para obter uma melhor resolução (ROBOZ, 2013).

O princípio do analisador TOF é separar moléculas de acordo com a diferença de tempo entre o pulso inicial e o pulso gerado quando o íon chega ao detector. Quando os íons saem da região de aceleração, eles possuem energia cinética igual, porém, velocidades diferentes de acordo com sua relação  $m/z$ , conseqüentemente, terão tempos de voo distintos, possibilitando a separação. A conversão de tempo em massa é dada pela injeção de um calibrante, que contém íons com massas conhecidas. No TOF de alta resolução é utilizado um refletor que permite a correção das velocidades iniciais, pelo fato de que um íon mais leve - conseqüentemente mais rápido - penetra profundamente no campo, e com isso, sua trajetória é maior, aumentando o tempo em que ela é concluída (THOMPSON, 2017).

O quadrupolo consiste em quatro hastes posicionadas em paralelo e ligadas eletricamente em pares, com sinais opostos e amplitudes iguais, combinando corrente direta e radiofrequência, fazendo com que em determinados valores previamente estipulados, somente íons com uma faixa de razão  $m/z$  restrita consigam atravessá-lo, e os demais são ejetados não chegando até o detector, agindo como um filtro de íons. Ainda, este tipo de analisador permite o acoplamento com outros, por exemplo, o triplo quadrupolo, onde o primeiro quadrupolo filtra a massa do precursor, o segundo quadrupolo age como uma célula de colisão – onde os íons serão fragmentados – e o terceiro filtra a massa do fragmento (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001).

O Q-TOF, uma forma híbrida de analisador de massas, une as vantagens do TOF e do Q (Figura 15). O quadrupolo age como um filtro de massas, restringindo as faixas de massa/carga e o analisador por tempo de voo é capaz de separar estes íons (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001).

Figura 15. Partes fundamentais de um espectrômetro de massas do tipo Q-ToF



Fonte: Próprio autor, 2019.

Para este trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador *micrOTOF-Q II* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Como principais vantagens para a análise de CF, nosso equipamento possui uma fonte de ionização branda (ESI) com pouca fragmentação na fonte, e que, simultaneamente produz fragmentos maiores de mais fácil reconhecimento. Para exemplificar, em uma molécula de quercetina-hexosídeo MM= 464, no modo de ionização negativo, haverá um íon percussor  $m/z$  463  $[M-H]^-$  e como principal fragmento o íon  $m/z$  301  $[M-H-162]^-$ , facilmente reconhecidos como o íon de quercetina desprotonada e a perda de um resíduo de hexose após a perda de uma molécula de água. O analisador híbrido tipo *Quadrupole Time-of-Flyght* nos oferece a massa acurada do composto com confiabilidade até 1 mDa e possui resolução suficiente para possibilitar a análise da distribuição isotópica, diferentemente dos analisadores de baixa resolução. Utilizando o mesmo exemplo acima, um analisador de baixa resolução nos daria como informação relevante apenas a massa nominal do nosso composto, que no modo negativo seria equivalente ao íon  $m/z$  463, porém utilizando nosso equipamento de alta resolução podemos chegar ao íon  $m/z$  463.0876, o que nos confere uma diminuição de até 256 vezes no número de moléculas candidatas possíveis apenas para o composto exemplificado (32041 moléculas candidatas para o íon  $m/z$  463 contra 125 para o íon  $m/z$  463.0876, utilizando o site [http://www.chemcalc.org/mf\\_finder](http://www.chemcalc.org/mf_finder) para efetuar este cálculo) .

### 3.3. Frutas nativas de Porto Alegre

A região metropolitana de Porto Alegre tem cerca de 1500 espécies vegetais nativas, das quais 311 possuem potencial alimentício sendo 122 destes, frutas (KINUPP; BARROS, 2008). Após pesquisa bibliográfica nas bases de dados *Scopus*, *Google Scholar* e *Core UK* em fevereiro de 2019, pelos nomes populares e científicos destas 122 frutas, concluiu-se que 115 destas não tinham sido estudadas em relação a sua composição fenólica, bem como não tiveram a sua capacidade antioxidante investigada.

Para efetuar esse estudo foram escolhidas as frutas da *Eugenia multicostata*, conhecida como araçá-piranga, e da *Leandra leavigata*, comumente conhecida como pixirica. Estas foram escolhidos em função de sua semelhança com outras frutas convencionais de consumo já estabelecido (pitanga e mirtilo) nos quesitos estético e sensorial, e também por não terem seus potenciais como fonte de compostos bioativos previamente investigados.

#### 3.3.1 Araçá-piranga (*Eugenia Multicostata*)

O araçá-piranga (*Eugenia multicostata*) é uma árvore semelhante à pitangueira cuja ocorrência nativa está estabelecida nos arredores de Porto Alegre (RS), mas principalmente em Taquara (RS), onde foi relatada a presença de árvores em frutificação. Atualmente esta espécie encontra-se em extinção devido à exploração predatória de espécies nativas durante o período colonial. Em especial esta espécie foi muito abatida por possuir madeira de alta qualidade, durabilidade e resitência às pragas. Atualmente o município de Sapiranga-RS possui uma lei municipal que delimita uma área de proteção ambiental objetivando de forma específica a proteção desta espécie (SAPIRANGA-RS, 2016).

Também é conhecido pelos nomes populares de pau-alazão, pau-mulato, pau-brasil (SC), Sapiranga (nome este após o qual a cidade de Sapiranga-RS foi batizada), pitangão, araçazeiro-vermelho, araçá-vermelho, carambola-do-mato e carambola-vermelha. A fruta é climatérica, e a árvore frutifica em maio e em outubro. Semelhante a uma carambola ou uma pitanga de grandes proporções. Ele possui coloração

vermelha alaranjada quando maduro, sabor levemente doce e possui acidez baixa e leve adstringência, sendo a fruta firme e extremamente aromática, ideal para o consumo *in natura* ou sob a forma de compotas e geleias (KINUPP, 2007).

Uma pesquisa no *Scopus* e *Google Scholar* utilizando como termos de busca “*Eugenia multicostata*” e os nomes populares da fruta mostra que há 20 trabalhos sobre a espécie, porém, todos relatando informações puramente botânicas, ou farmacológicas dos extratos de folhas. Assim, não há na literatura informações sobre a composição fenólica e sobre a capacidade antioxidante dessa fruta, bem como qualquer indício dos efeitos benéficos associados ao seu consumo. Um estudo foi encontrado sobre algumas propriedades biológicas das folhas, onde foi relatado que o extrato aquoso das folhas da *Eugenia multicostata* possui atividade antitumoral (MONKS et al., 2002b). Em outro, estudou-se o fruta, porém, apenas a composição mineral e o total de proteínas que pode ser consultada na tabela 1 (FERREIRA KINUPP; BERGMAN; DE BARROS, 2008).

Além destes trabalhos uma pequena parte do genoma desta espécie foi elucidado e encontra-se no banco de dados NCBI sob o voucher ICN<BRA> 167424 onde existe o sequenciamento parcial: para o gene RNA polimerase C (*rpoC1*); espaçador intergenico *psbA-trnH*; RNA polimerase subunidade beta (*rpoB*); acetyl-CoA carboxilase-D (*aacD*); e a sequencia completa do espaçador interno transcrito 2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=Eugenia+multicostata%5Borgn%5D> , abril de 2019).

Foto 1 - aracá-piranga (*Eugenia multicostata*).



Fonte: próprio autor, 2018.

Tabela 1. Composição protéica e mineral (em base seca) das frutas maduras do araçá-piranga

Composto	Percentual sobre o extrato seco(%)
Proteínas	10,9
Cálcio	0,39
Magnésio	0,11
Manganês	0,0019
Fósforo	0,14
Ferro	0,0032
Sódio	0,0162
Potássio	2
Cobre	0,0013
Zinco	0,0011
Enxofre	0,09
Boro	0,0011

Fonte: KINUPP, 2007.

### 3.3.2 Pixirica (*Leandra leavigata*)

A pixirica é uma fruta não climatérica pertencente à família das *Melastomataceae*, encontrada nos gêneros *Huberia*, *Leandra*, *Clidemia* e *Miconia*. Também é conhecida popularmente como meleca-de-cachorro e tinge-língua no hemisfério sul e como *Koster curse* (maldição de Koster do inglês) na América do Norte, nome este dado em função do fato das plantas da família das *Melastomataceae* ( em especial a *Clidemia hirta* e a *Leandra Australis*) serem espécies invasoras nesse habitat, com grande prejuízo para a flora local(GERRISH; MUELLER-DOMBOIS, 1980; WISER et al., 2013).

A fruta se desenvolve em um arbusto que cresce muito bem à sombra, porém, frutifica melhor ao sol, nos meses de maio a julho. Essa fruta possui em média 150 sementes muito pequenas e apresenta textura agradável. De pigmentação azul-violácea, sabor e apelo estético semelhante ao do mirtilo - portanto, uma espécie potencialmente comercializável. Apresenta um crescimento rápido e propagação

acelerada pela fauna que aprecia muito as frutas (GERRISH; MUELLER-DOMBOIS, 1980).

As frutas podem ser consumidas *in natura* ou utilizados para a confecção de doces, geleias e sorvetes (KINUPP, 2007). Além disso um dos usos populares é o das folhas como medicamento (MOJIOL et al., 2014; SWAMP et al., 2010). Em geral as pixiricas possuem lanugem de até 3 mm de comprimento, o que pode ser um ponto comercialmente desfavorável. As frutas da *Leandra leavigata*, porém, são glabras assemelhando-se aos mirtilos, o que seria comercialmente atraente, e um dos motivadores da escolha dessa fruta para este estudo.

Uma pesquisa no *Scopus* e *Google Scholar*, realizada em fevereiro de 2019, utilizando como termos de busca “*Leandra*”, “*Leandra leavigata*” e os nomes populares da fruta, mostra que há 310 trabalhos com plantas pertencentes ao mesmo gênero, porém em nenhum deles foi relatada composição fenólica ou a capacidade antioxidante das frutas, sendo a maioria dos estudos apontando os efeitos maléficos dessa planta como invasora em *habitats* exóticos. Além dos fatos elucidados, a planta em questão (*Leandra leavigata*) não possui nenhum artigo publicado em relação as propriedades, nem da fruta, nem de outra parte qualquer da planta, sendo a única publicação disponível sobre notas taxinômicas (REGINATO; GOLDENBERG, 2012).

Foto 2: Pixirica (*Leandra leavigata*).



Fonte: próprio autor, 2018.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes, solventes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O trolox, o AAPH (2'-azobis(2- metilpropanimidamida) e a fluoresceína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). O reagente *Folin-Ciocalteu* foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany), o carbonato de sódio foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, Brazil). Os seguintes solventes foram utilizados: metanol grau P.A. (Neon), acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), ácido fórmico P.A. (Merck) e ácido clorídrico P.A. (Neon). A água utilizada foi do tipo ultrapura produzida por um sistema Millipore (Milli-Q®).

Os padrões de ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido 5-cafeoilquínico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, kaempferol e quercetina-3-glucosídeo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Estados Unidos) e Extrasynthèse (França). A pureza de todos os padrões foi avaliada por HPLC-DAD, sendo superior a 95%.

### 4.2. Amostras

As amostras de araçá-piranga (*Eugenia multicostata*) foram coletadas na Fundação Zoobotânica, que está localizada em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil), nas seguintes coordenadas geográficas: 30°03'09.2"S 51°10'37.2"W. Amostras da planta foram coletadas para a identificação e depositados no herbário da UFRGS, sendo catalogados com o nº 167424. No total, 1,0 kg de frutas maduras foram coletadas. As frutas foram consideradas maduras quando a sua cor estava com a tonalidade laranja-avermelhada e a sua polpa macia e com baixa adstringência. As sementes foram retiradas das frutas individualmente, em uma sala de preparo de amostras da fundação zoobotânica, e a polpa de cada fruta foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido. A polpa congelada foi liofilizada por 4 dias, triturada em mini processador doméstico (Black & Decker HC32P) até a obtenção de um pó da polpa que foi embalado à vácuo e armazenado em freezer (-18 °C) sob proteção da luz até o momento das análises.

As amostras de pixirica (*Leandra leavigata*) foram coletadas no Lago Negro, que está localizado em Gramado (Rio Grande do Sul, Brasil), nas seguintes coordenadas geográficas: 29°23'40.5"S 50°52'36.4"W. Amostras da planta foram

coletadas para a identificação e depositados no herbário da UFRGS, sendo catalogados com o nº 194166. No total, 100 g de frutas maduras foram coletadas. As frutas foram consideradas maduras quando a sua cor estava com a tonalidade roxa-azulada, e sua polpa macia e com baixa acidez e levemente adocicadas. As frutas foram coletadas e armazenadas em caixa térmica com gelo, sendo congeladas em freezer doméstico (-18 °C). As frutas congelados foram transportados até o laboratório em caixa térmica, onde foram congelados em nitrogênio líquido a fim de resguardar a amostra de uma potencial oscilação de temperatura inicial no liofilizador. Na sequência a fruta congelada foi liofilizada por 4 dias e triturada utilizando um pistilo e almofariz até a geração de um pó de polpa. Esse pó foi embalado a vácuo e armazenado em freezer (-18 °C) sob proteção da luz até o momento das análises.

### **4.3. Extração de compostos fenólicos**

#### **4.3.1 Extração dos compostos fenólicos extraíveis (FE) e não extraíveis (FNE)**

Os FE foram obtidos a partir de 0,50 g de amostra liofilizada. Essa amostra foi transferida para um almofariz contendo celite, onde com o auxílio de um pistilo e homogeneizada. Os compostos fenólicos foram extraídos exaustivamente com uma mistura metanol:água (8:2, v/v) acidificada com 0,1% de ácido fórmico (proporção massa/solvente de 1:50) através da agitação em vortex por 5 min à temperatura ambiente (22 °C). O extrato obtido foi centrifugado a 3000 g por 5 min (4 °C) e o sobrenadante foi recolhido. Esse processo foi repetido até a completa extração dos FE (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013). Um total de 8 extrações foram necessárias para a extração completa dos FE da amostra. O parâmetro utilizado para avaliar a presença de compostos fenólicos no extrato foi a reação dos compostos fenólicos com o reagente *Folin-Ciocalteu*. Os sobrenadantes das 8 extrações foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo (T < 30 °C) até a completa evaporação do metanol. Parte do extrato bruto foi liofilizado para ser utilizado na análise quantitativa e para a determinação da capacidade antioxidante.

O restante do extrato de FE foi submetido a um processo de limpeza e concentração por extração em fase sólida (SPE) para a análise qualitativa do extrato.

Essa etapa foi realizada conforme o método descrito por Bochi et. al (2015). O extrato acidificado com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (2 mL) foi carregado em um cartucho de SPE C-18 (Waters Corporation, Milford, MA, USA), previamente ativado com metanol e condicionado com água acidificada (0,1% (v/v) de ácido fórmico). Os compostos polares foram lavados com dois volumes de água acidificada (0,1% v/v de ácido fórmico). Na sequência, os compostos fenólicos foram eluídos com 2 mL de metanol acidificado (0,1% (v/v) de ácido fórmico).

O *pellet* derivado da extração exaustiva dos FE foi reservado para a extração dos FNE. A hidrólise ácida foi preferida pois os CF tendem a ser mais estáveis em meio ácido. O tempo ótimo para as hidrólises foi determinado em 30 minutos após testes feitos no laboratório em períodos que variaram de 24 horas (PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2018) até 15 minutos (HARBORNE, 1989), sendo que períodos prolongados de hidrólise geraram produtos de degradação com absorção à 420 nm com coloração marrom, enquanto tempos mais curtos geraram antocianidinas livres com absorção à 520 nm como esperado da despolimerização das proantocianidinas com coloração vermelho-rubi até violáceo. O *pellet* foi submetido à extração utilizando 40 mL de uma solução de metanol:HCl 12 M (6:4, v/v) na temperatura de 90 °C por 30 minutos sob refluxo (PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2018). O extrato obtido foi centrifugado a 3000 g por 5 min (4 °C). O sobrenadante obtido foi concentrado em evaporador rotativo a 90 °C até a completa evaporação do metanol e do ácido clorídrico. Para a análise quantitativa e de atividade antioxidante foi utilizado os extratos brutos sem purificação por SPE. Para a análise qualitativa dos FNE uma etapa de purificação por SPE foi realizada seguindo a mesma metodologia citada para os FE.

#### **4.4. Análise por HPLC-DAD-MS/MS**

A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos foi realizada em HPLC da marca Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com bombas quaternárias (LC-20AD), degaseificador *on-line* (DGU-20A5), injetor automático programado para injeção de 20 µL e detector DAD (Shimadzu, SPD-M20A) conectado em série a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador *micrOTOF-Q II* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Os compostos fenólicos foram separados em uma coluna Synergi Hydro-RP

(250 x 4,6 mm, 4  $\mu$ m) (Phenomenex, Torrance, CA) a 0,9 mL min<sup>-1</sup> a 29 °C, com fase móvel consistindo em água: ácido fórmico (99,5:0.5, v/v) (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico (99.5:0.5, v/v) (solvente B) em gradiente linear (Rodrigues et al, 2013). Os espectros UV-vis foram obtidos entre 200 e 600 nm.

As condições para a aquisição dos espectros de massas foram as seguintes: faixa de varredura de  $m/z$  100 a 1500, modo de ionização negativo, voltagem do capilar: 3000 V, temperatura e fluxo do gás secante: 310 °C e 8 L min<sup>-1</sup>, pressão do gás nebulizador: 30 psi, MS<sup>2</sup>: modo automático com a energia de fragmentação variando de 35 a 50 eV.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando duas abordagens: (1<sup>o</sup>) análise manual dos resultados e, (2<sup>o</sup>) análise dos resultados utilizando ferramentas de bioinformática.

Na identificação manual dos compostos fenólicos foram considerados as informações da ordem de eluição na coluna C<sub>18</sub>, perfil do espectro UV-vis, massa acurada e as características de fragmentação. Essas informações foram comparadas com os padrões analíticos disponíveis e também com dados da literatura (PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2018; RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2013).

Na segunda abordagem o *software SIRIUS* (<https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/>) foi utilizado para a identificação dos compostos fenólicos em padrões e nos extratos das frutas avaliadas (DÜHRKOP et al., 2019). Para que os dados obtidos no espectrômetro de massas possam ser usados no *SIRIUS* estes devem ser processados usando outros *softwares* como descrito em cada etapa abaixo:

- a) Etapa 1: exportação dos dados gerados no DataAnalysis (versão 4.2) para o formato mzML;
- b) Etapa 2: processamento da lista de picos do MS e MS/MS para um espectro centroide usando o algoritmo do MZMine (versão 2.38) seguida da exportação deste espectro para o formato mgf. O pré-requisito do *SIRIUS* é o uso de espectros centróides;
- c) Etapa 3: identificação dos compostos fenólicos utilizando o *software SIRIUS* (versão 4.0.1 Build 7) considerando as características do padrão isotópico e de fragmentação.

A identificação dos compostos fenólicos usando esta ferramenta de

bioinformática foi validada com o uso dos dados de MS de 12 padrões de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos foram quantificados por padronização externa utilizando as curvas analíticas de quatro padrões analíticos de compostos fenólicos (ácido gálico, catequina, rutina e ácido 5-cafeioilquínico. As curvas analíticas foram construídas a partir da análise de nove concentrações na faixa de 0,1 a 6 mg L<sup>-1</sup>. O método foi validado a partir da análise dos seguintes parâmetros de desempenho: linearidade (R<sup>2</sup>), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), repetibilidade, recuperação e efeito de matriz (dados não mostrados).

#### **4.5. Determinação da capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante dos extratos fenólicos das frutas foi realizada frente ao radical peroxila (ROO•). O ROO• foi gerado por decomposição térmica do AAPH a 37 °C. A capacidade de desativação do ROO• foi medida por fluorescência, através do monitoramento da queda da fluorescência, devido à oxidação da fluoresceína (RODRIGUES; MARIUTTI; FARIA; *et al.*, 2012). A reação foi conduzida em um volume final de 200 µL, tendo os seguintes reagentes (concentrações finais): AAPH (19,1 mM), fluoresceína (61,2 nM) e extrato em três concentrações (50, 70 e 100 mg L<sup>-1</sup>). As leituras de fluorescência foram executadas nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 ± 20 nm e 528 ± 20 nm, respectivamente, sob forma de cinética, com intervalos de 1 min, até o valor da fluorescência reduzir a 0,5 % da fluorescência inicial. Os resultados foram expressos em equivalente a trolox, obtidos através da construção de uma curva de analítica com trolox (12 – 96 µM).

#### **4.6. Análise estatística, gráficos e estruturas químicas**

As diferenças entre os valores da quantificação de compostos fenólicos e de capacidade antioxidante entre as frações foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5 % ( $p \leq 0,05$ ). A comparação entre as médias foi realizada pela aplicação do teste de Tukey. As análises foram realizadas através do programa Microsoft Excel®. Os gráficos de decaimento de fluorescência da fluoresceína foram construídos no programa Origin Lab v. 8.0. As estruturas químicas das moléculas de compostos fenólicos foram construídas no programa ACD/ChemSketch v. 2018.1.1.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Validação do *software SIRIUS* para identificação dos compostos fenólicos

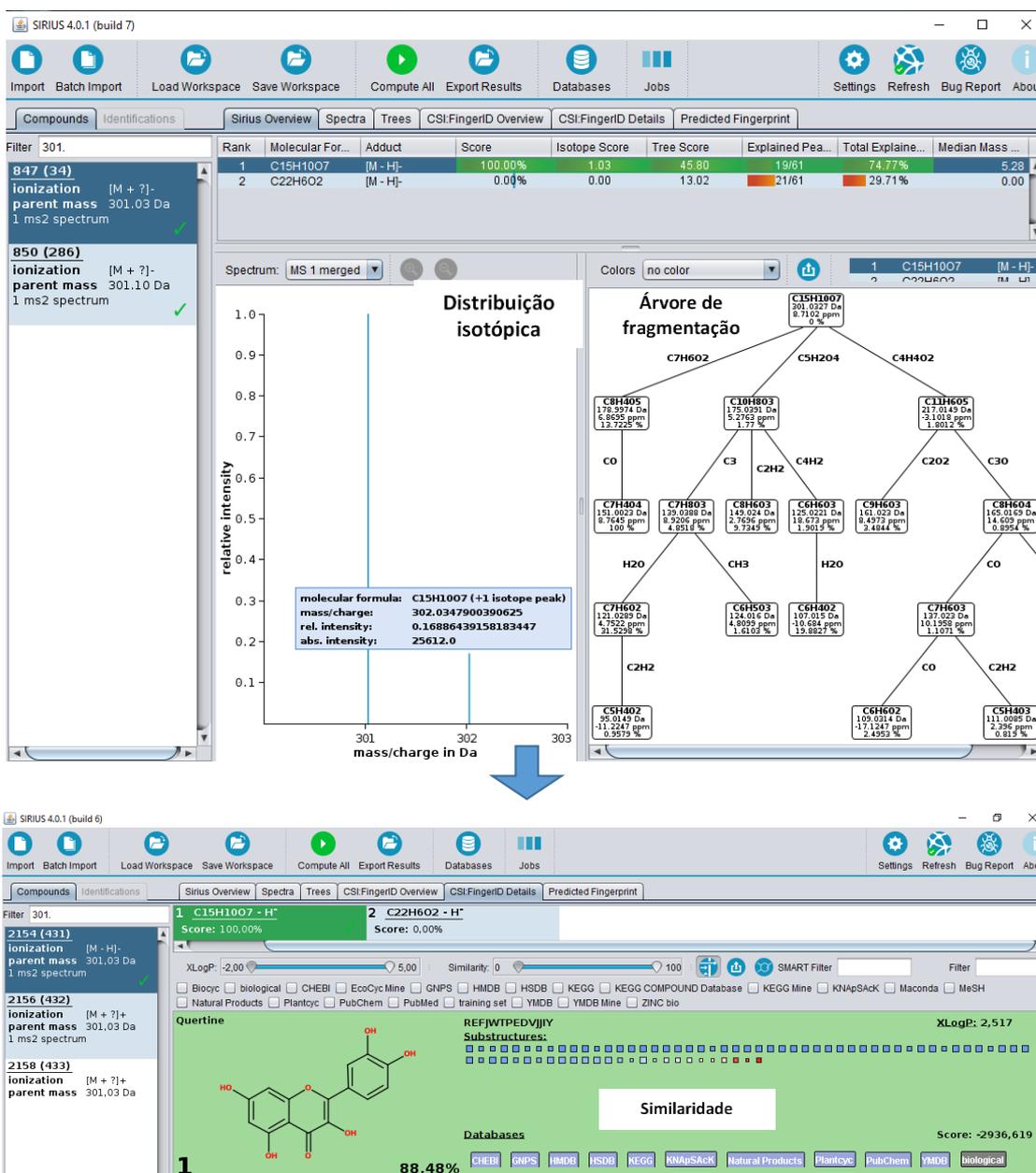
Uma validação do *software SIRIUS* foi realizada como uma primeira etapa antes da sua aplicação na identificação dos compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis das frutas estudadas neste trabalho. Essa validação consistiu na avaliação da capacidade do *software* identificar corretamente 12 padrões de compostos fenólicos. Como resultado, um valor de similaridade em unidade de porcentagem foi obtido. Esse valor indica o grau de similaridade entre as informações teóricas previstas para o padrão isotópico e de fragmentação e as informações experimentais obtidas. Com o uso do *SIRIUS* foi possível identificar corretamente todos os padrões testados, com um índice de similaridade entre 69% e 88% (Tabela 1) o que em si é um valor útil e que ajuda a elucidar as subestruturas da molécula candidata auxiliando muito a identificação, e juntamente em combinação com o ranking da molécula em relação às demais moléculas propostas, obtemos a confiabilidade da identificação, que no caso com dos padrões foi inequívoca.

Tabela 1. Validação do *software SIRIUS* na identificação de compostos fenólicos

Composto	Similaridade (%)	Ranking
Ácido Gálico	84,56	1
Ácido 5-cafeoilquinico	79,52	1
Ácido cafeico	86,48	1
(+) Catequina	84,44	1
Epigallocatequina galato	80,63	1
Rutina	88,39	1
Quercetina 3-glicosídeo	88,19	1
Ácido elágico	69,50	1
Daidzeína	82,88	1
Resveratrol	74,13	1
Quercetina	88,48	1
Kaempferol	78,10	1

Na Figura 16 é apresentado o resultado para o padrão de quercetina, no qual é possível visualizar a forma como os resultados são mostrados no *software SIRIUS*. Primeiramente, o *SIRIUS* usa os dados combinados do padrão isotópico do espectro de massas MS e do padrão de fragmentação do espectro MS/MS para determinar a fórmula molecular teórica do composto e para construir a árvore de fragmentação. Em uma segunda etapa, o *software* identifica a estrutura do composto através da comparação com bases de dados de estruturas moleculares utilizando um buscador da *web CSI:FingerID*.

Figura 16. Ilustração da aplicação do *SIRIUS* para a identificação do padrão de quercetina.



Fonte: próprio autor, 2019.

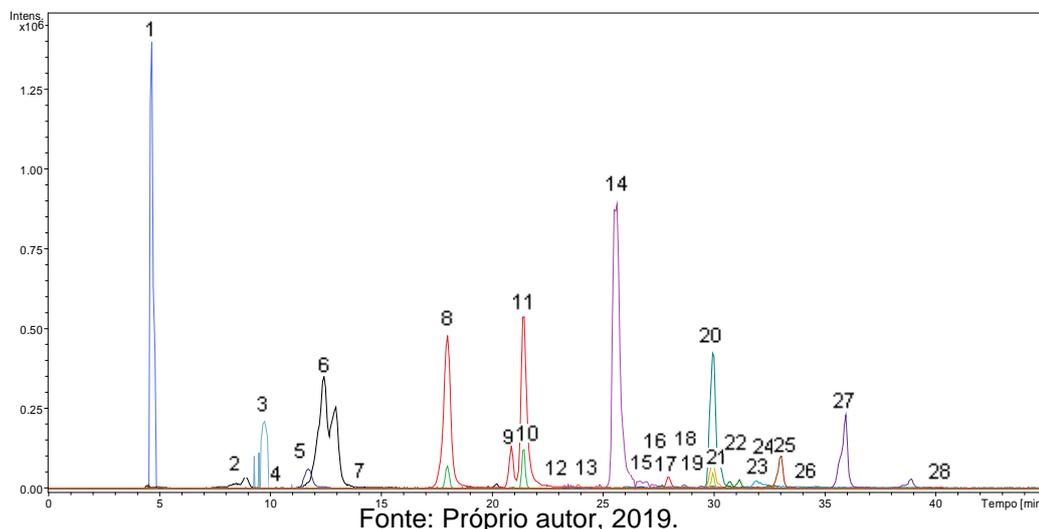
Com base na validação e também das informações disponíveis na literatura sobre a aplicação desse *software* na identificação de diferentes moléculas (DÜHRKOP, 2015), considera-se que o *SIRIUS* é uma ferramenta poderosa na identificação de compostos fenólicos em alimentos. Cabe destacar que, de acordo com a literatura consultada, esta é a primeira vez que o *software SIRIUS* foi aplicado para a identificação de compostos fenólicos em alimentos.

Conforme relatado no item 4.4, os compostos fenólicos presentes nas frutas foram identificados considerando os dados dos espectros de massas (MS e MS<sup>2</sup>), os quais foram analisados manualmente e pelo *software SIRIUS*. Para facilitar a consulta do leitor aos dados de MS, no Apêndice A estão apresentados todos os espectros de massas (MS e MS<sup>2</sup>) dos compostos fenólicos encontrados nesse trabalho. A discussão dos resultados de identificação dos compostos fenólicos será conduzida separadamente para cada fruta, sendo a discussão focada apenas na identificação daqueles compostos fenólicos encontrados pela primeira vez nos gêneros das frutas estudados e/ou que sejam quantitativamente relevantes.

## 5.2. Araçá-piranga

Vinte e oito compostos fenólicos foram separados e vinte e cinco tentativamente identificados (Figura 17 e 18; Tabela 2) na fração FE do araçá-piranga (*Eugenia multicostata*). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada manualmente, onde os resultados de massa acurada obtida e do padrão de fragmentação dos compostos foram comparados com o de padrões analíticos.

Figura 17. Cromatograma de íons extraídos dos FE araçá-piranga.



A confirmação dos compostos foi realizada utilizando o *SIRIUS*, obtendo-se um índice de similaridade acima de 60% (dos primeiros ranqueados) para a maioria dos CF encontrados no araçá-piranga, comparável aos valores encontrados para os padrões de referência.

O perfil de compostos fenólicos extraíveis do araçá-piranga (*Eugenia multicostata*) é caracterizado principalmente pela presença de derivados do ácido gálico, correspondendo a 17 dos 25 compostos encontrados, incluindo o ácido gálico (Tabela 2). A maioria dos derivados de ácido gálico estão esterificados com o ácido quínico formando mono, di, tri e tetragaloilquínico ácidos. Outro ácido hidroxibenzoico encontrado na FE do araçá-piranga foi o ácido elágico, somente na forma livre. Além dos ácidos hidroxicinâmicos, também foram identificados fenólicos classificados como flavonol, estando presentes 5 flavonóis glicosilados. Alguns resultados similares foram encontrados em frutas do gênero *Eugenia*, tais como a pitanga laranja, a pitanga vermelha e a pitanga roxa (DENARDIN et al., 2015). O composto majoritário, pico 1 (Figura 17), foi identificado como ácido quínico, que, apesar de não ser um CF, teve sua identificação realizada por ser molécula constituinte da maior parte dos taninos identificados na FE do araçá-piranga.

Os picos 12, 13 e 14 foram identificados como ácidos 3, 4, 5-tri-galoilquínico, 1,3,5-tri-galoilquínico e 1,3,4-tri-galoilquínico (MM = 648,096). Essas três moléculas possuem espectros de UV-vis e de massas (MS e MS<sup>2</sup>) idênticos, porém, possuem diferentes tempos de retenção. O ácido 1,3,4-tri-galoilquínico é o último isômero a eluir, visto que possui uma conformação geométrica que lhe dá uma caráter mais apolar em função da sua ligação em C1 e C4 (CLIFFORD et al., 2003). No seu espectro UV-vis foi encontrado um máximo de absorção a 275 nm, o que concorda com a sua estrutura química e com as informações da literatura (MARIUTTI et al., 2014). No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 647,0916 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou fragmentos a *m/z* 495,0811[M-H-152]<sup>-</sup>, 343,0676 [M-H-152-152]<sup>-</sup>, 325,0550 [M-H-152-152-18]<sup>-</sup>, 191,0530[M-H-152-152-152]<sup>-</sup> e 169,0133. Esse último fragmento corresponde à molécula de ácido gálico desprotonada. Os demais fragmentos apresentam a característica comum de perder um, dois e três resíduos de ácido gálico a *m/z* 152 [ácido gálico -18].

Os picos 8, 9 e 11 foram identificados como ácido 3,4-di-galoilquínico, ácido 3,5-di-galoilquínico e ácido 1,3-di-galoilquínico (MM = 496,085). Essas três moléculas possuem espectros de UV-vis e de massas (MS e MS<sup>2</sup>) idênticos, porém, possuem diferentes tempos de retenção. Isso está diretamente relacionado ao fato desses isômeros apresentarem diferentes polaridades. No seu espectro UV-vis foi encontrado um máximo de absorção a 272-273 nm, o que concorda com a sua estrutura química e com as informações da literatura (MARIUTTI et al., 2014). No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 495,0812 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou fragmentos a *m/z* 343,0705 [M-H-152]<sup>-</sup>, 325,0550 [M-H-152-18]<sup>-</sup> e 169,0133 [M-H-152-174]<sup>-</sup>. Esses fragmentos representam a perda consecutiva de um resíduo de ácido gálico, ácidos gálico mais uma molécula de H<sub>2</sub>O e o último é derivado da perda de um resíduo de ácido gálico mais um resíduo de ácido quínico.

O pico 20 foi identificado como miricetina 3-O-ramnosídeo (MM = 464,095). O seu espectro de UV-vis apresentou uma máximo de absorção a 348 nm, o que está de acordo com a sua estrutura química de flavonol glicosilado e também com informações da literatura (MARIUTTI et al., 2014). No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 463,0877 e o espectro MS<sup>2</sup> a *m/z* 317,0326 [M-H-146], que corresponde a perda de um resíduo de ramnose, mesmos dados relatados na literatura (ARAPITSAS, 2008). A identificação foi confirmada no *software SIRIUS* com um índice de similaridade de 93% para essa molécula. A miricetina 3-ramnosídeo foi encontrada em outras frutas do mesmo gênero do araçá-piranga, tais como pitanga (*Eugenia uniflora*) e na cagaita (*Eugenia dysenterica*) (DENARDIN et al., 2015; VILEGAS et al., 2019).

Tabela 2. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos extraíveis (FE) do araçá-piranga (*Eugenia multicostata*).

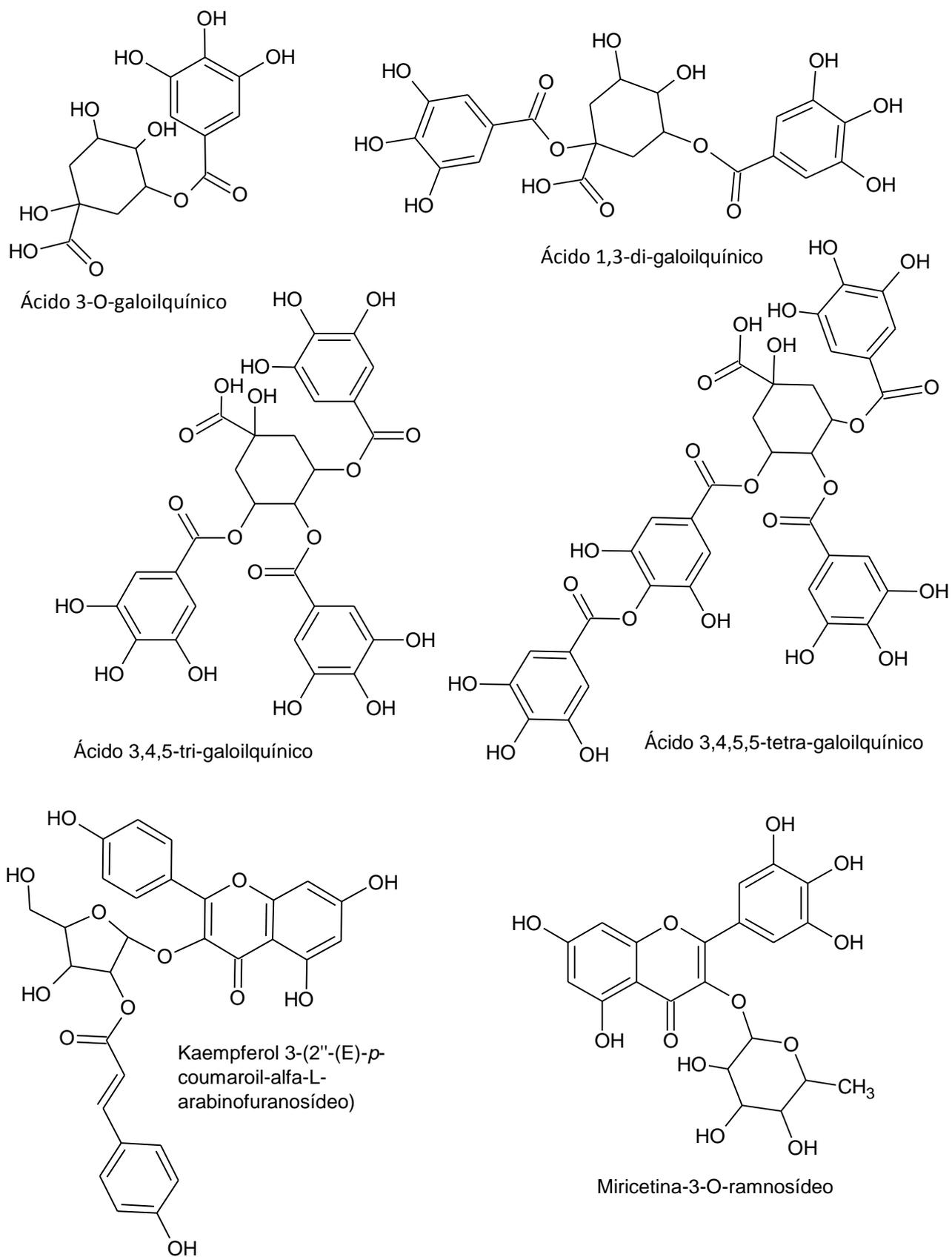
Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	Massa Exata	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) <sup>c</sup>	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Similaridade (%)	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
1	Ácido quínico	4,68	n.d <sup>d</sup>	192,0634	191,0613	2,93	59,44%	111,0073
2	Ácido 3-O-galoilquínico	8,90	275	344,0743	343,0717	0,36	72,50%	191,0557; 169,0129; 125,0236; 107,0131
3	5-O-Galoil glicosídeo	9,36	277	332,0743	331,0701	2,93	80,14%	169,0141; 151,0023; 125,0240; 123,0070
4	Ácido 5-O-galoilquínico	11,59	274	344,0743	343,0658	3,62	70,32%	191,0551; 169,0140; 125,0233; 107,0125
5	Ácido gálico	11,76	271	170,0215	169,0141	-4,45	82,27%	125,0231; 124,0178; 108,0222
6	Ácido 4-O-galoilquínico	12,90	273	344,0743	343,0710	2,57	68,98%	191,0562; 169,0138; 125,0238
7	4-O-Galoil-glicosídeo	13,95	277	332,0743	331,0653	3,91	81,75%	169,0113; 125,0228
8	Ácido 3,5-di-galoilquínico	17,40	272	496,0853	495,0784	-0,75	72,65%	343,0631; 325,0586; 279,0529; 191,0581; 173,0463; 169,0144; 155,0321
9	Ácido 1,3-di-galoilquínico	20,87	273	496,0853	495,0813	3,92	73,19%	343,0669; 325,0539; 191,0543; 169,0136
10	Di-galoil ardimerina	21,30	283	992,1706	991,1561	3,97	68,13%	495,0804; 343,0657; 325,0574; 169,0116
11	Ácido 3,4-di-galoilquínico	21,40	273	496,0853	495,0812	2,74	67,66%	343,0705; 325,0552; 169,0201
12	Ácido 3,4,5-tri-galoilquínico	23,44	276	648,0962	647,0851	-1,30	71,53%	495,0797; 343,0663; 325,0545; 169,0131
13	Ácido 1,3,5-tri-galoilquínico	24,80	283	648,0962	647,0858	4,89	73,11%	495,0797; 343,0652; 325,0550; 169,0106
14	Ácido 1,3,4-tri-galoilquínico	25,90	275	648,0962	647,0916	4,56	72,76%	495,0811; 343,0676; 325,0550; 191,0530; 169,0133
15	Ácido 2,3-Dihidroxi-6-(alfa-L-ramnopiranosiloxi)benzoic 2-(beta-D-glucopiranosiloxi)benzil ester	26,80	273	584,1893	583,1813	-0,79	68,22%	331,0695, 313,0601, 271,0455, 169,0154
16	2,3-bis[(3,4-dihidroxi benzoil)oxi]propil 3,4-dihidroxi benzoato	27,68	272	500,0954	499,0847	1,81	60,75%	311,0755; 295,108; 173,0439; 169,0159, 167,0334; 165,0206; 125,0263
17	Quercetina 5-O-glicosídeo	27,68	353	464,0954	463,0899	-3,87	59,16%	301,0393; 173,0444

Tabela 2. Continuação

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	Massa Exata	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) <sup>c</sup>	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Similaridade (%)	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
18	Ácido 3,4,5,5-tetra-galoilquínico	28,67	284	800,1072	799,1008	-1,10	59,44%	647,0937; 495,0826; 343,0637; 325,0613
19	Ácido 3,5,4,4-tetra-galoilquínico	28,74	284	800,1072	799,0938	5,30	62,13%	647,0941; 495,0825; 343,0718; 325,0535; 169,0116
20	Miricetina-3-O-ramnosídeo	29,68	348	464,0954	463,0877	-0,94	93,17%	317,0326; 316,0259
21	Oolonghomobisflavana A	29,95	349	928,169	927,1676	2,11	55,74%	463,0868; 316,0225
22	1,2,3,6-Tetra-galoil-glicosídeo	30,62	281	788,1072	787,0956	-0,38	85,45%	635,0935; 617,0819; 465,0703; 447,0571; 313,0748; 169,0160
23	Ácido elágico	31,76	366	302,0062	301,0004	-0,51	78,55%	299,9904; 273,0011; 245,0119; 229,0135; 201,0207; 173,0261; 157,0283; 129,0327
24	1,2,3,4,6-penta-O-galoil-glicosídeo	32,50	280	940,118	939,0900	-1,76	83,20%	770,0975; 769,0895; 617,0797; 599,0740; 447,0623; 429,0501; 169,0155; 125,0236
25	Quercetina 3-O-ramnosídeo	32,77	347	448,1005	447,0972	0,51	91,82%	301,0388; 300,0299
26	Quercetina 3-O-glicosídeo	34,56	358	464,0954	463,0900	0,43	80,03%	301,0382
27	Não identificado	38,48	270	584,2468	583,2460	-4,31	-	483,1893; 331,0669; 271,0477; 211,0267; 169,0153
28	Kaempferol 3-(2''-(E)- <i>p</i> -coumaroil-alfa-L-arabinofuranosídeo)	40,40	284	564,1267	563,1121	-2,29	65,63%	527,1383; 313,0469; 169,0104

<sup>a</sup> Numeração de acordo com o cromatograma de íon extraído da Figura 16. <sup>b</sup> Tempo de eluição em uma coluna C<sub>18</sub>. <sup>c</sup> Gradiente linear de água/metanol com 0.1% ácido fórmico. <sup>d</sup> Razão massa carga.

Figura 18. Estruturas químicas das moléculas identificadas da FE do araçá-piranga.

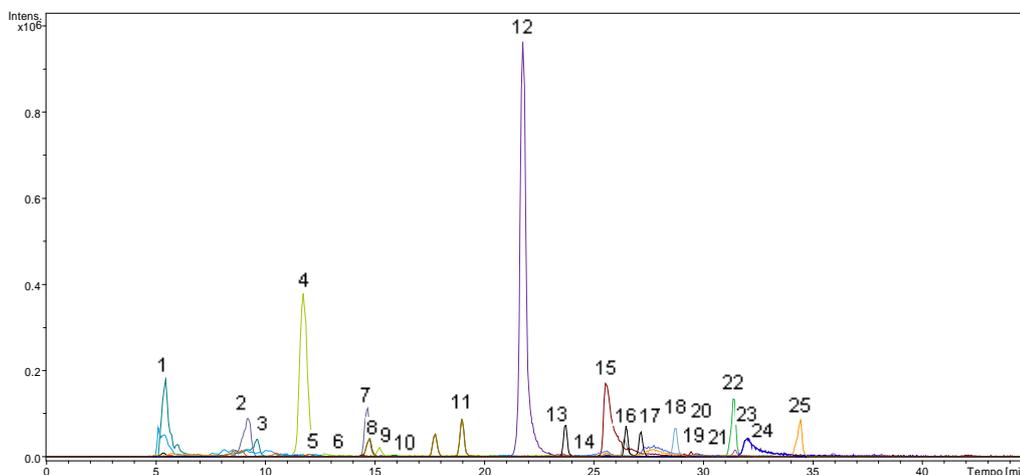


Fonte: Próprio autor, 2019.

Cabe enfatizar que cerca de 50% do número total de compostos fenólicos encontrados no araçá-piranga foram identificados pela primeira vez no gênero *Eugenia*, nomeadamente: ácidos 3,5-di-galoilquínico, 1,3-di-galoilquínico, di-galoil ardimerina, 3,4-di-galoilquínico, 3,4,5-tri-galoilquínico, 1,3,5-tri-galoilquínico, 1,3,4-tri-galoilquínico, 3,4,5,5-tetra-galoilquínico, 3,5,4,4-tetra-galoilquínico, Oolonghomobisflavana A, 1,2,4,6-tetra-galoil-glicosídeo, 1,2,3,4,6-penta-galoil-glicosídeo e kaempferol 3-(2''-(*E*)-*p*-coumaroil-  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo).

Vinte e cinco compostos fenólicos foram tentativamente identificados na fração dos FNE da araçá-piranga (Figura 19 e 20; Tabela 3). O perfil de compostos fenólicos da fração extraível é diferente da não extraível. Na fração FNE não foram encontrados os mono, di, tri e tetra galoilquínico ácidos, mas sim moléculas menores como os ácidos gálico e elágico livres ou metilados. Além disso, o perfil de FNE é caracterizado pela variedade de classes de compostos fenólicos, contendo flavonas, flavan-3-óis e flavanonas, glicosiladas ou esterificadas com ácidos hidrobenzóicos.

Figura 19. Cromatograma de íons extraídos dos FNE do araçá-piranga.



Fonte: Próprio autor, 2019.

O pico 12 foi identificado como ácido 3-O-metil-gálico (MM =184.0371), sendo o composto majoritário desta fração tanto em função da sua intensidade de sinal quanto de sua área do pico. Como características de absorção no UV-vis, apresentou absorção a 271 nm, condizente com o relatado na literatura para o cromóforo do ácido gálico (MARIUTTI et al., 2014). No modo de ionização negativo, o espectro de massas

mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  183,0292 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou fragmentos a  $m/z$  155,0006 [M-H-28]<sup>-</sup>, 140,0090 [M-H-43]<sup>-</sup>, 139,0024 [M-H-44]<sup>-</sup>, 136,9859 [M-H-28-18]<sup>-</sup>, 127,0022 [M-H-28-28]<sup>-</sup>, 124,0165 [M-H-43-16]<sup>-</sup>, 123,0076 [M-H-60]<sup>-</sup>, 111,0084 [M-H-44-28]<sup>-</sup>, 110,0034 [M-H-28-45]<sup>-</sup>, 106,0063 [M-H-43-16-18]<sup>-</sup>, 96,0209 [M-H-43-16-28]<sup>-</sup>, 95,0145 [M-H-60-28]<sup>-</sup>. Diversas fragmentações são características dessa molécula, tais como a perda de etileno ( $m/z$  28) resultando no fragmento a  $m/z$  155. Este, posteriormente, perde uma molécula de água ( $m/z$  18) gerando o fragmento a  $m/z$  136, uma molécula de monóxido de carbono ( $m/z$  28) gerando o fragmento a  $m/z$  127, e uma perda de um ânion de ácido fórmico, gerando o fragmento a  $m/z$  110. O fragmento  $m/z$  139 é explicado pela perda de um epóxido de etileno ( $m/z$  44), o que é mais provável do que uma perda de um resíduo de acetaldeído, visto que um éter cíclico é facilmente estabilizado em razão de sua conformação geométrica. Posteriormente, o íon  $m/z$  139, fragmentou gerando o íon de  $m/z$  111 em razão da perda de um resíduo de monóxido de carbono ( $m/z$  28). O fragmento  $m/z$  140 é explicado pela perda de um resíduo de metilcarbonila ( $m/z$  43), provavelmente sobre a forma de radical acetil, gerando posteriormente com a perda de um resíduo de gás carbônico ( $m/z$  28) o íon  $m/z$  111. O fragmento  $m/z$  123 é explicado pela perda de um resíduo de ácido acético ( $m/z$  60) e finalmente o íon  $m/z$  95 por uma posterior perda de um resíduo de monóxido de carbono ( $m/z$  28).

A fim de tornar válida a identificação de alguns desses fragmentos é necessário salientar que os íon  $m/z$  140 e  $m/z$  139, bem como os íons  $m/z$  124 e  $m/z$  123,  $m/z$  111 e  $m/z$  110,  $m/z$  96 e  $m/z$  95 não são isótopos um dos outros, uma vez que como pode ser verificado nas árvores de fragmentação respectivas, as abundâncias relativas desses íons entre si não correspondem à abundância isotópica dessas moléculas na natureza, como por exemplo, o íon  $m/z$  139 possui abundância relativa menor do que o íon  $m/z$  140, o que seria impossível sendo que as formas isotópicas dos átomos que compõem esses íons é sempre mais rara do que a forma monoisotópica destes, isto se dá também com os demais íons citados. A explicação mais provável para a existência desse composto (ácido 3-O-metil-gálico) nessa concentração é justamente o fato dele estar fortemente ligado à matriz por uma ligação covalente, justificando sua aparição somente após hidrólise com ácido forte.

Tabela 3. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos não extraíveis (FNE) do araçá-piraga (*Eugenia multicostata*).

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	Massa Exata	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Similaridade (%)	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
1	8-hidroxiluteolina 7-xilosídeo	5,20	265	434,0849	433,0699	2,36	61,15%	157,0110; 129,0194; 110,9750
2	Luteolina 8-O-glicosídeo	8,66	n,d <sup>d</sup>	448,1005	447,0881	-0,20	73,03%	321,0764; 295,0923; 265,0879; 203,0571; 179,0008; 140,0085; 125,0206; 113,0256
3	Herbacetina 8-xilosídeo	9,05	275	434,0849	433,0716	6,66	62,58%	157,0111; 113,0260
4	Ácido gálico	11,35	270	170,0215	169,0135	-1,77	78,00%	125,0255; 124,0173; 123,009; 101,0242
5	Epicatequina-epicatequina-galoil-epicatequina	11,74	270	1018,2167	1017,2071	3,99	50,81%	569,1310; 365,0678; 189,0372; 175,0231; 157,0109; 139,0044; 129,0209; 113,0245
6	Hisbiketina 3,7,8,4'-tetrametil éter	12,06	270	390,0950	389,0818	4,00	62,90%	191,0011
7	Naringenin 5-glucoronida	14,55	271	448,1005	447,0869	0,99	65,72%	321,0754; 295,0922; 265,0876; 203,0571; 179,0018; 140,0101; 125,0224; 113,0256
8	Ácido 3,4-Dihidrobenzoico 3-O-glucuronida-dimetil-diéster	14,69	274	358,0899	357,0787	5,30	66,34%	273,0247; 169,0121; 151,0043; 139,0027; 125,0224; 107,0136
9	Ácido 2,3,5-trihidroxibenzóico	15,29	284	170,0215	169,0113	3,11	86,22%	125,0251; 97,0292
10	Epicatequina-galoil-epicatequina -catequina	15,83	271	1018,2167	1017,2134	4,72	51,33%	569,1259; 365,0653; 171,0276; 157,0128; 139,0030; 129,0178
11	Ácido dihidroxibenzóico 3-glucoronida	18,96	275	358,0899	357,0779	2,04	67,72%	169,0121; 125,0225
12	Ácido 3-O-Metil-gálico	21,33	271	184,0371	183,0292	3,92	72,90%	155,0006; 140,0090; 139,0024; 136,9859; 127,0022; 124,0165; 123,0076; 111,0084; 110,0034; 106,0063; 96,0209; 95,0145
13	4,;6'-O-(S)-hexahidroxi-difenil-salicina	23,45	275	588,1115	587,0968	1,47	61,31%	497,0586; 329,0303; 167,0342; 125,0252

Tabela 3. Continuação

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>c</sup>	Massa Exata	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Similaridade (%)	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
14	3-O-galoil-taxifolina	24,28	274	456,0692	455,0583	2,37	63,64%	329,0276; 303,0145; 285,0324; 273,0391; 125,0234
15	Morina	25,30	273/343	302,0426	301,0327	3,62	81,94%	285,0012; 283,0266; 273,0039; 257,0083; 245,0089; 229,0124; 191,0330; 137,0244
16	Ácido 3-O-Metil elágico	25,49	342	316,0219	315,0115	2,13	68,52%	299,0173; 125,0229
17	3-carboxil-plantagosídeo	26,59	275	510,1009	509,0871	3,34	64,04%	357,0771; 339,0693; 169,0121; 125,0210
18	Ácido Vanílico	28,55	275	168,0422	167,0336	0,80	73,01%	124,0166; 107,0127
19	Taxifolina	29,14	276	304,0583	303,0491	3,02	72,52%	217,0508; 167,0350; 109,0286
20	1,2,6-Tri-galoil-glicosídeo	29,21	277	636,0962	635,0936	2,85	66,20%	349,0512; 285,0368; 197,0429; 165,0171; 151,0019; 125,0255
21	Quercetina	29,46	n,d	302,0426	301,0349	3,95	84,18%	283,9958; 245,0105; 217,0444; 125,0251
22	Ácido metil 3,4,5-tri-galoil quínico	31,09	275	662,0907	661,0902	-2,80	62,22%	509,0893; 491,0837; 339,0713; 169,0113
23	Amurensisina	31,37	275	440,0743	439,0629	1,34	66,36%	395,0763; 313,0346; 309,0738; 269,0438; 257,0437; 137,0233; 125,0234
24	Ácido Elágico	32,00	350	302,0062	300,9973	3,95	81,42%	283,9956; 257,0096; 245,0100; 229,0134; 201,0192; 185,0223; 173,0220; 157,0333; 129,0345
25	Hovenetina	34,04	271	334,0688	333,0602	6,56	69,19%	197,0431; 165,0174; 137,0242

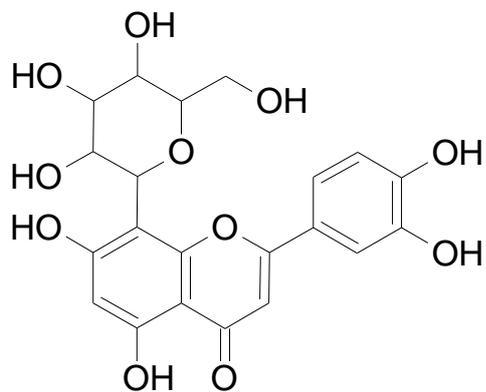
<sup>a</sup> Numeração de acordo com o cromatograma de íon extraído da Figura 16. <sup>b</sup>Tempo de eluição em uma coluna C<sub>18</sub>. <sup>c</sup>Gradiente linear de água/metanol com 0.1% ácido fórmico. <sup>d</sup> Razão massa carga.

O pico 4 foi identificado como ácido gálico (MM=170,0215) sendo o segundo composto mais abundante tanto em razão da área do pico quanto de intensidade de sinal. Como características do UV-vis apresentou absorção a 270 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 169,0135 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou fragmentos característicos como a perda de dióxido de carbono gerando o íon *m/z* 125,0255 [M-H-44]<sup>-</sup>, mas também apresentou perdas de um resíduo de ânion de ácido fórmico gerando o íon 124,0173[M-H-45]<sup>-</sup>, e de um resíduo de íon de ácido fórmico 123,0090[M-H-46]<sup>-</sup>.

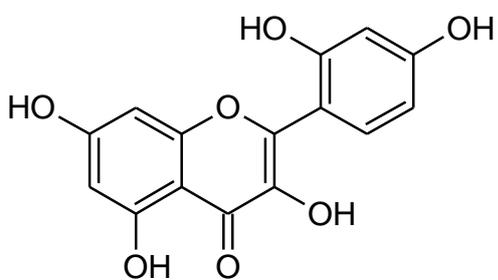
O pico 15 foi identificado como morina (MM=302,0426). Este é o terceiro composto mais abundante tanto em razão de sua intensidade de sinal quanto em razão de sua área do pico. Como características do UV-vis, apresentou absorção a 273 e a 343 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 301,0327 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou fragmentos referentes a uma perda de hidroxila sob a forma de água gerando o íon 283,0266[M-H-18]<sup>-</sup>. Uma perda de um resíduo de etileno gerando o íon *m/z* 273,0039[M-H-28]<sup>-</sup> com posterior perda de um resíduo de monóxido de carbono gerando o íon *m/z* 245,0089[M-H-28-28]<sup>-</sup>. Outros fragmentos significativos para essa molécula inclui a perda de um resíduo de metano gerando o íon *m/z* 285,0012[M-H-16]<sup>-</sup>, que por sua vez perde monóxido de carbono gerando o íon *m/z* 257,0083[M-H-16-28]<sup>-</sup>, seguida de nova perda de monóxido de carbono gerando o íon *m/z* 229,0124[M-H-16-28-28]<sup>-</sup>.

O pico 23 foi identificado como ácido metil 3,4,5-tri-galoil quínico (MM=662,0907). Este composto é característico por ser um ácido fenólico análogo aos tri-galoil-quínicos, diferenciado pela presença de um grupo metila, logo este composto foi liberado da matriz através do processo de hidrólise. Como características do UV-vis, apresentou absorção a 275 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 661,0902 e o espectro MS<sup>2</sup> a *m/z* 510,0897[M-H-151]<sup>-</sup>, 509,0893[M-H-152]<sup>-</sup>, 491,0837[M-H-152-18]<sup>-</sup>, 339,0713[M-H-152-170]<sup>-</sup>, 303,0426, 169,0113. Os picos *m/z* 510 e *m/z* 509 representam a perda de um resíduo de ácido gálico. O íon *m/z* 491 foi possivelmente formado a partir da perda de uma hidroxila sob a forma de água por parte do íon *m/z* 509. O íon *m/z* 339 foi possivelmente formado por uma perda

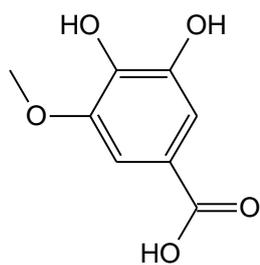
Figura 20. Estruturas químicas das moléculas identificadas da FNE do araçá-piranga.



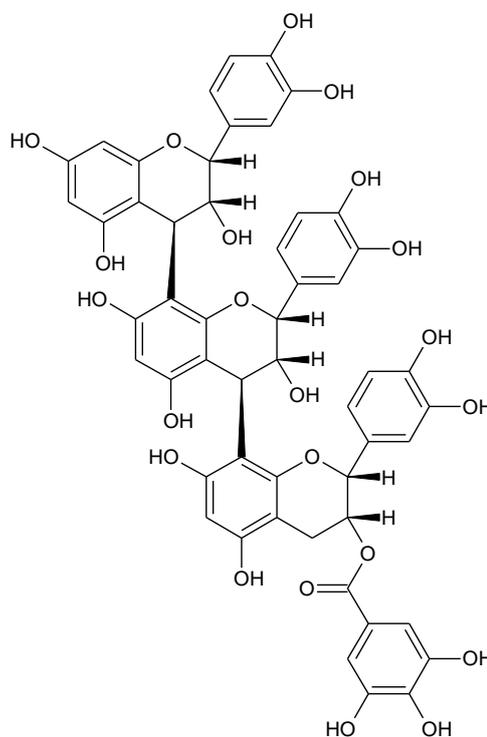
Luteolina 8-O-glicosídeo



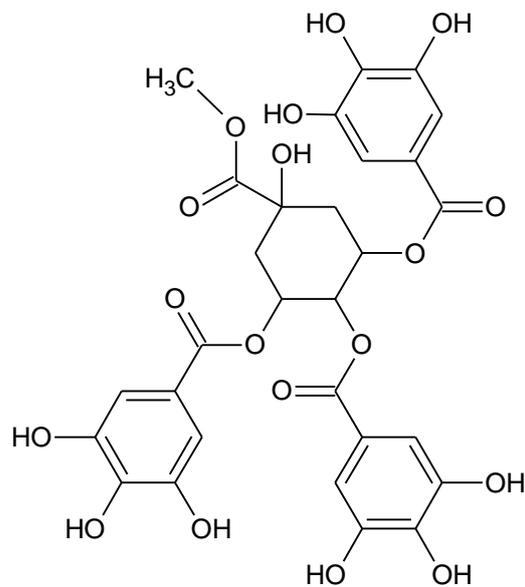
Morina



Ácido 3-O-metil-gálico



Epicatequina-epicatequina-galoil-epicatequina



Ácido metil 3,4,5-trigaloilquínico

Fonte: Próprio autor, 2019.

neutra de ácido gálico a partir do íon  $m/z$  509. O íon mais abundante é representado por  $m/z$  169 que é um fragmento estável de ácido gálico.

Os picos 5 e 10 foram identificados como epicatequina-galoil-epicatequina-catequina e epicatequina-epicatequina-galoil-epicatequina (MM=1018,2167). Como características do UV-vis, apresentaram absorção a 270 nm. Ambos os espectros apresentaram as mesmas características espectroscópicas, sendo diferenciadas em tempo de retenção por características puramente geométricas. Enquanto o pico 5 consiste em um oligômero composto exclusivamente por epicatequinas e um ácido gálico ligado em C3 da catequina 3, o pico 10 consiste em oligômero de duas epicatequinas ligadas a uma catequina e um ácido gálico ligado em C3 da epicatequina 2. Essas diferenças estruturais que ocorrem com galocatequinas já são suficientes para diferenciar esses isômeros. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  1017,2071 e o espectro  $MS^2$  a  $m/z$  569,1310  $[M-H-448]^-$ , 365,0678  $[M-H-448-204]^-$  como principais fragmentos em comum.

Os teores de compostos fenólicos nas frações FE e FNE estão apresentados na Tabela 4. A maior concentração de compostos fenólicos está na fração FE, a qual representa 81% do total de compostos fenólicos. Os poucos estudos disponíveis na literatura apresentam grande variação na proporção dessas frações em frutas. Por exemplo, para a tangerina observou-se que os CFNE representam cerca de 40% dos fenólicos totais (m/m), enquanto que para o repolho roxo essa relação foi de 76% (m/m) (Esparza-Martínez et al., 2016; Gonzales et al., 2015).

Em geral, os valores relatados na literatura para o teor de fenólicos totais em frutas do gênero *Eugenia* (pitangas laranja, vermelha e roxa) (DENARDIN et al., 2015) são muito superiores ao valor encontrado para o araçá-piranga. A hipótese é que essa diferença nos teores encontrados esteja relacionada as diferenças entre as espécies, local de produção e também devido ao método analítico utilizado para quantificar o teor de compostos fenólicos. Na maioria desses trabalhos a quantificação foi realizada utilizando o método *Folin Ciocalteu*, o qual é susceptível a um grande número de interferentes presentes nos extratos e está sendo questionado quanto a sua utilização como um método para quantificação de compostos fenólicos (Granato et al., 2018).

Tabela 4. Teores de compostos fenólicos extraíveis (FE) e não extraíveis (FNE) no araçá-piranga.

Classe de composto fenólico	Composto fenólico identificado	Concentração <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de fruta liofilizada)		
		FE	FNE	Percentual aproximado sobre o total (%)
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 3-O-galoilquinico	28,2 $\pm$ 2,8	< LD	0,4
Ácido hidroxibenzóico	5-O-Galoil glicosídeo	500,1 $\pm$ 5,1	< LD	7,5
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 5-O-galoilquinico	635,3 $\pm$ 17,6	< LD	9,5
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 4-O-galoilquinico	370,9 $\pm$ 19,7	< LD	5,6
Ácido hidroxibenzóico	Di-galoil ardimarina	992,9 $\pm$ 19,4	< LD	14,9
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 3,4-di-galoilquinico	39,0 $\pm$ 0,3	< LD	0,6
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 1,3,4-tri-galoilquinico	2325,0 $\pm$ 49,3	< LD	34,9
Flavonol	Miricetina-3-O-ramnosídeo	442,3 $\pm$ 8,6	< LD	6,6
Flavonol	Quercetina 3-O-ramnosídeo	91,4 $\pm$ 10,7	< LD	1,4
Flavonol	8-hidroxluteolina 7-xilosídeo	< LD. <sup>b</sup>	9,1 $\pm$ 2,1	0,1
Flavonol	Luteolina 8-O-glicosídeo	< LD	35,3 $\pm$ 1,5	0,5
Ácido hidroxibenzóico	Ácido gálico I	< LD	168,3 $\pm$ 2,5	2,5
	Hisbicetina 3,7,8,4'-tetrametil éter	< LD	10,6 $\pm$ 6,7	0,2
Ácido hidroxibenzóico	Ácido dihidroxibenzóico 3-gluconida	< LD	16,5 $\pm$ 26,6	0,3
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 3-O-Metil-gálico	< LD	927,1 $\pm$ 4,2	14,0
	3-carboxil-plantagosídeo	< LD	39,5 $\pm$ 0,1	0,6
Ácido hidroxibenzóico	Ácido metil 3,4,5-tri-galoil quinico	< LD	28,5 $\pm$ 10,9	0,4
	<b>Total</b>	5425 $\pm$ 133	123,5 $\pm$ 55	
	<b>Compostos fenólicos totais</b>	<b>6659 <math>\pm</math> 188</b>		<b>100 <math>\pm</math> 2,8</b>

<sup>a</sup> Os compostos fenólicos foram quantificados em equivalentes a ácido gálico e quercetina. <sup>b</sup> < LD.: Abaixo do limite de detecção do método; onde ácido gálico = 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e Rutina = 0,37  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Na fração FE do araçá-piranga o composto majoritário foi o ácido 1,3,4-trigaloilquínico, o qual representa 43% (m/m) da concentração total de compostos fenólicos dessa fração. Cabe destacar que é a primeira vez que esse composto fenólico é relatado em frutas do gênero *Eugenia*. Alguns trabalhos demonstraram que o ácido 1,3,4-trigaloilquínico possui a capacidade de inibir a replicação do vírus HIV em linfócitos H9 infectados com pouca citotoxicidade (NONAKA et al., 1990).

O segundo composto majoritário da fração FE do araçá-piranga foi a di-galoilardimerina, o qual representa 18% do total de compostos fenólicos desta fração. Esta molécula já foi relatada na planta de *Ardisia japonica*, sendo no mesmo estudo testada como inibidora de RNase H do HIV-1 e do HIV-2 *in vitro* (DAT et al., 2007).

O terceiro e o sexto compostos majoritários da fração FE do araçá-piranga foram, respectivamente, os ácidos 5-O-galoilquínico e o 4-O-galoilquínico, sendo nesta fração ainda encontrado o ácido 3-O-galoilquínico em menor quantidade. Efeitos antidepressivos e estimulatórios foram encontrados em um estudo *in vivo* através da estimulação de canais iônicos no cérebro de ratos (DIMPFL et al., 2007).

O quarto composto majoritário da fração FE do araçá-piranga foi o ácido 5-O-Galoil glicosídeo também conhecida como glucogalina um precursor do ácido elágico em frutas. Um estudo avaliou se a glucogalina ofereceu proteção contra várias anormalidades induzidas pela hiperglicemia em células epiteliais de pigmento da retina, tendo resultados positivos no uso desse composto como agente terapêutico contra a degeneração da retina no olho diabético, evitando a morte das células de pigmento de retina (CHANG et al., 2015).

Na fração FNE do araçá-piranga o composto majoritário foi o ácido 3-O-metilgálico, o qual representou 75% do total de compostos fenólicos dessa fração (LEE; CHAN; MITCHELL, 2017). Este molécula diferencia-se do ácido gálico por possuir uma metila em C3, sítio utilizado pela molécula para realizar ligação covalente com a matriz que só pode ser rompida por meio da hidrólise, o que explica sua inexistência na FE do araçá-piranga. Um estudo verificou o potencial do ácido 3-O-metilgálico em prevenir osteoporose (BAEK et al., 2017). Verificou-se que essa molécula suprimiu significativamente a formação de osteoclastos através do bloqueio da sinalização de Akt e Btk-PLC $\gamma^2$ -Ca $^{2+}$ . Um outro estudo sugeriu que o ácido 3-O-metilgálico é um promissor agente no tratamento contra obesidade (JEON; RAHMAN; KIM, 2016), onde foi demonstrado que a sinalização de p-catenina desempenha um papel distinto

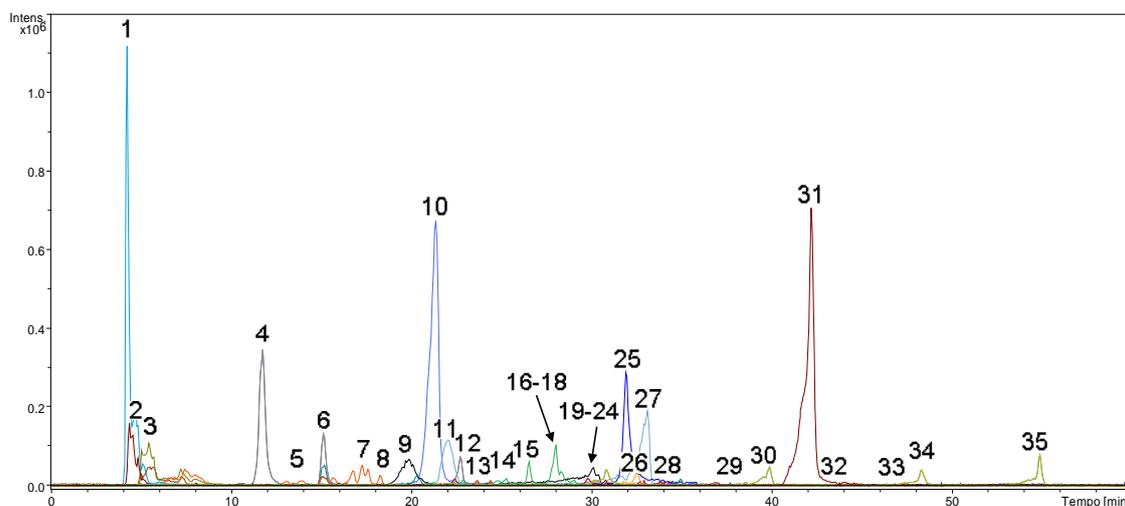
na inibição da diferenciação de adipócitos 3T3-L1 mediada pelo ácido 3-O-metil-gálico. Foi observado que a expressão de  $\beta$ -catenina diminuiu após a indução hormonal adipogênica. A incubação das células diferenciadoras com uma concentração fisiológica desse composto fenólico durante a indução hormonal adipogênica preveniu significativamente a degradação da  $\beta$ -catenina ao ativar componentes de sinalização Wnt como Wnt1, Wnt10b, Fzd1, Fzd2, Lrp5, Lrp6, Dvl1 e Dvl2. Além destes efeitos, outros estudos sugerem que o ácido 3-O-metil-gálico possui atividade anti-inflamatória (CORREA et al., 2016), antibacteriana (K. MISHRA et al., 2016), antioxidante (RAHMAN; JEON; KIM, 2016) e anticarcinogênica (AFSAR et al., 2016).

### 5.3. Pixirica

Um total de 35 compostos fenólicos foram tentativamente identificados (Figura 21 e 22; Tabela 5) na fração FE da pixirica. Os espectros de massas (MS e MS<sup>2</sup>) dos compostos fenólicos são apresentados no Apêndice A. A confirmação da identidade desses compostos foi realizada utilizando o *SIRIUS*, onde para a maioria dos compostos fenólicos encontrados na pixirica a pontuação de similaridade foi superior a 70%.

A fração FE apresentou um grande número de ácidos fenólicos derivados do elágico e de flavonoides, notadamente flavonóis. Alguns resultados similares foram encontrados em frutas da *Clidemia rubra* (GORDON et al., 2011) principalmente no que diz respeito a presença de flavonóis. A presente discussão focará nos compostos majoritários identificados pela primeira vez em frutas do gênero *Leandra* e também naqueles compostos fenólicos não relatados em frutas da espécie *Clidemia rubra* (também conhecida como pixirica). O nome das moléculas presentes nos picos 32, 33 e 34 foram escritos com uma chave de código IclKey, maiores detalhes para estes epimatabólitos podem ser conferidos em <http://minedatabase.mcs.anl.gov/#/home> utilizando as chaves fornecidas.

Figura 21. Cromatograma de íons extraídos dos FE da pixirica.



Fonte: Próprio autor, 2019.

O pico 1 foi identificado como bergapteno (MM=216,0422) sendo o composto mais abundante em razão da intensidade de sinal e possível precursor aromático desta fruta. Como características espectroscópicas no UV-vis, apresentou um máximo de absorção a 310 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  215,0340 e o espectro  $MS^2$  mostrou fragmentos característicos, como a perda de furano gerando o íon  $m/z$  147,0100  $[M-H-68]^-$ .

Os compostos presentes nos picos 4, 6 e 12 foram identificados como o ácido gálico, ácido 2,3,5-trihidroxibenzoico e ácido 2,3,6-trihidroxibenzoico (MM=170,0215). Essas três moléculas são isômeros, possuindo características muito similares de absorção no UV-vis, com máximo de absorção entre 275-285, o que é compatível com a sua estrutura química. A única diferença é o seu tempo de eluição na coluna C18, o qual foi utilizado para a identificação desses isômeros. No modo de ionização negativo, o espectro de massas dessas moléculas mostrou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  169,0119 e o espectro  $MS^2$  mostrou como fragmentos principais a  $m/z$  125,0223  $[M-H-44]^-$ ,  $[M-H-45]^-$  e  $[M-H-44-28]^-$ , os quais correspondem a perda de uma molécula de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), a perda de formato e a perda de  $CO_2$  e monóxido de carbono (CO), respectivamente.

Tabela 5. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos extraíveis (FE) da pixirica (*Leandra leavigata*).

Pico	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>b</sup>	Massa Exata	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) <sup>c</sup>	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Similaridade (%)	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
1	Bergapteno	4,23	310	216,0422	215,0340	4,42	56,16%	149,0436; 113,0251; 101,0207; 99,0104
2	7-Hidroxi flavanona beta-D-glucopiranosídeo	7,22	260	402,1314	401,1241	0,11	61,17%	169,0084; 151,0022; 139,0061; 125,0217
3	Marinoide D	7,22	258	554,1635	553,1546	3,59	69,43%	356,1299; 355,1217; 323,0928; 193,0659
4	Ácido Gálico	11,41	275	170,0215	169,0119	0,74	84,92%	125,0223; 124,0175; 97,0311
5	Metil galato 3-O-beta-D-glucopiranosídeo	12,95	281	346,0899	345,0805	-0,50	75,44%	169,0106; 151,0013; 125,0243
6	Ácido 2,3,5-Trihidroxibenzóico	15,11	283	170,0215	169,0122	-3,61	62,42%	125,0238; 97,0282
7	Metil galato 4-O-beta-D-glucopiranosídeo	15,51	283	346,0899	345,0786	-0,47	78,96%	169,0107; 151,0022; 125,0243
8	2-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxipropil 3,4,5-trihidroxibenzoato	15,98	290	380,0743	379,0722	0,78	61,98%	293,0338; 275,0145; 169,0116;
9	Quercitina-3-galactosídeo	19,01	372 / 276	464,0954	463,0879	0,43	79,63%	301,0227; 300,0226; 275,0159; 169,0136; 125,0212
10	Ácido Valoneico	20,42	290	474,0434	473,0317	2,24	58,72%	421,0313; 300,9978; 271,0168; 249,0383
11	Luteolina 3"-glicosídeo	21,50	280	448,1005	447,0902	-0,85	84,40%	371,1154; 300,0644; 267,0289; 242,0223; 191,0143
12	Ácido 2,3,6-Trihidroxibenzóico	22,24	276	170,0215	169,0136	5,97	76,65%	124,0146
13	Ácido Valoneico Bilactona	22,37	370	470,0121	469,0014	3,62	67,00%	300,9951; 169,0114
14	Ácido Elágico 4-O-beta-D-glucopiranosídeo	23,65	360	464,0590	463,0556	-2,86	62,34%	301,0016; 275,0209; 167,0365; 125,0251
15	Nobotanina D	25,26	280	786,0915	785,0769	-0,28	79,47%	615,0582; 300,9968; 275,0168
16	Miricetina-pentosídeo	25,66	280	464,0954	463,0863	4,09	80,67%	316,0191
17	Nobotanina D	26,47	280	786,0915	785,0761	-2,18	83,85%	615,0597; 300,9968; 275,0160
18	Miricetina-pentosídeo	27,61	279	464,0954	463,0848	4,02	82,08%	316,0191

Tabela 5. Continuação

Pico	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>b</sup>	Massa Exata	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) <sup>c</sup>	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Similaridade (%)	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
19	Nobotanina D	27,68	278	786,0915	785,0734	0,94	83,48%	615,0572; 300,9965; 275,0165
20	Miricetina-pentosídeo	28,55	279	464,0954	463,0848	2,87	85,28%	316,0172; 300,0198
21	Ácido Valoneico Bilactona	29,76	350	470,0121	469,0015	0,84	65,44%	300,9951; 299,9864; 169,0114
22	Miricetina-pentosídeo	29,97	276	464,0954	463,0866	3,81	85,16%	316,0191; 300,0190
23	Rutina	30,10	351	610,1322	609,1197	2,13	84,94%	463,0898; 301,0351; 285,0367; 125,0245
24	Miricetina pentosilglucoronida	31,04	290	478,0747	477,0659	2,82	77,61%	315,0111; 300,9983; 299,9913; 168,0061; 125,0234
25	Ácido Elágico	31,51	366	302,0062	300,9959	-1,38	79,84%	285,0069; 283,9994; 282,9858; 273,0002; 257,0064; 245,0106; 229,0134; 217,0147; 201,0203; 189,0199; 185,0243; 183,0127; 173,0247; 157,0288; 125,0250
26	Kaempferol 3-(6"-p-coumarilgalactosídeo)	32,45	n,d	594,1373	593,1210	-0,08	80,63%	447,0933; 315,0848; 285,0346; 284,0274; 125,0224
27	Quercetina-ramnosídeo	32,78	256/348	448,1005	447,0982	-0,21	95,41%	301,0365
28	Ácido metil-elágico-ramnopiranosídeo	34,30	n,d	462,0798	461,0743	-1,01	71,03%	316,0309; 315,0111; 300,9976
29	Quercetina 3-O-(6"-O-p-coumaroil)-glicosídeo	38,47	n,d	610,1322	609,1228	1,62	74,43%	445,0364; 300,9972; 269,0407
30	Ácido 3,3',4'-tri-O-metil-elágico	38,94	371	344,0532	343,0440	1,19	74,43%	328,0179; 327,0083; 312,9944; 297,9708; 284,9999; 269,0022; 254,9914; 183,0090
31	Quercetina	40,14	357	302,0426	301,0268	-0,38	88,19%	251,0234; 151,0009; 121,0297
32	MHVNBOWEJFCLI	41,89	n,d	628,1428	627,1362	0,86	72,44%	463,0457; 301,0001; 275,0163; 257,0082; 247,0266; 166,9971
33	GLTBXVDDJQCGAJ	47,10	n,d	610,1322	609,1236	2,25	72,71%	445,0374; 345,9911; 300,9905
34	DHBWKBBASFXRFB	48,39	n,d	610,1322	609,1233	3,52	71,84%	445,0364; 300,9972; 269,0467
35	Ácido 3,4,4'-tri-O-metil-elágico	53,94	371	344,0532	343,0630	1,34	75,57%	328,0204; 312,9991; 297,9753; 285,0037; 269,9794

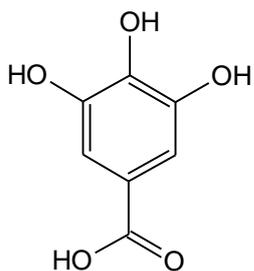
<sup>a</sup> Numeração de acordo com o cromatograma de íon extraído da Figura 18. <sup>b</sup> Tempo de eluição em uma coluna C<sub>18</sub>. <sup>c</sup> Gradiente linear de água/metanol com 0.1% ácido fórmico. <sup>d</sup> Razão massa carga.

O pico 9 foi identificado como quercetina 3-O-galactosídeo (MM=464,0954). Apresentou máximos de absorção a 276 e 372 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 463,0879 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou como fragmento principal a *m/z* 301,0227 [M-H-180]<sup>-</sup> referente a perda de uma hexose. Um segundo composto derivado da quercetina é o pico 27, que foi identificado como quercetina ramnosídeo (MM=448,1005). Como características do UV-vis apresentou absorção a 256 e 348 nm. Apresentou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 447,0982 e como fragmento principal a *m/z* 301,0365 [M-H-146]<sup>-</sup> referente a perda de um resíduo de ramnose.

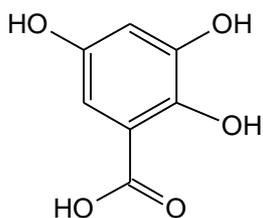
O pico 10 foi identificado como ácido valonoico (MM=474,0434), um tanino hidrolisável derivado do ácido gálico, sendo o segundo composto mais abundante em razão da intensidade de sinal. Como características do UV-vis, apresentou máximo de absorção a 290 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 473,0317 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou como fragmentos principal a perda de um resíduo de dihidroshikimato gerando o íon *m/z* 300,9978 [M-H-172]<sup>-</sup>, o qual corresponde ao ácido hexahidroxidifênico após sofrer lactonação. Cabe destacar, que não trata-se do ácido elágico, apesar de possuir uma massa acurada similar a ele, visto que nessa estrutura não há formação de dois anéis lactonas. O pico 13 foi identificado como ácido valonoico bilactona (MM=470,0121) um tanino hidrolisável derivado de ácido elágico, diferenciando-se do composto anterior (pico 10) pela formação de anéis lactonas. A presença dos dois anéis lactonas acarreta um efeito batocrômico em relação ao máximo de absorção do ácido valonoico, sendo que a molécula passa a ter uma máximo de absorção a 370 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 469,0014 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou como fragmentos principais a perda de um resíduo de ácido gálico gerando a *m/z* 300,9951 [M-H-169]<sup>-</sup> e um fragmento de ácido gálico desprotonado 169,0114 [M-H-300]<sup>-</sup>.

Os picos 15, 17 e 19 foram identificados como três isômeros de nobotanina D (MM=786,0915). Todos apresentaram características máximo de absorção no UV-vis entre 278 e 280 nm, o que é compatível com o fato dessa molécula ser um tanino formado por ácido gálico. Esta molécula só foi identificada

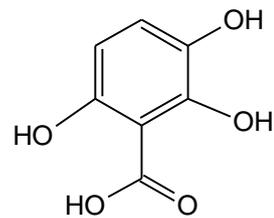
Figura 22. Estruturas químicas das moléculas identificadas da FE da pixirica.



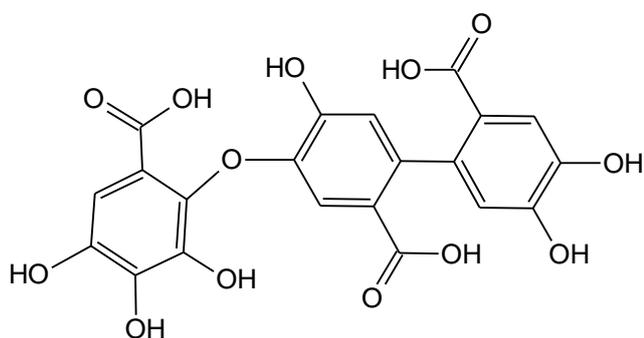
Ácido gálico



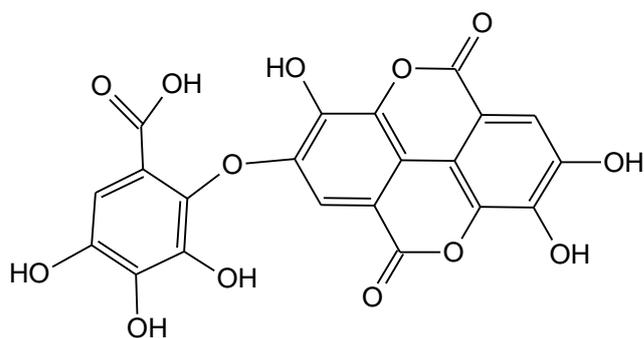
2,3,5-trihidroxi-benzóico



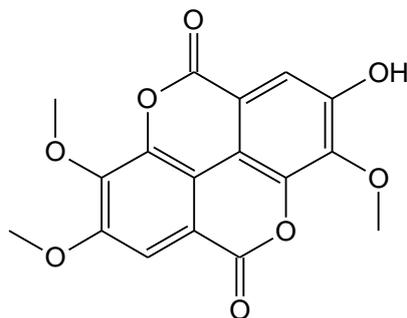
2,3,6-trihidroxi-benzóico



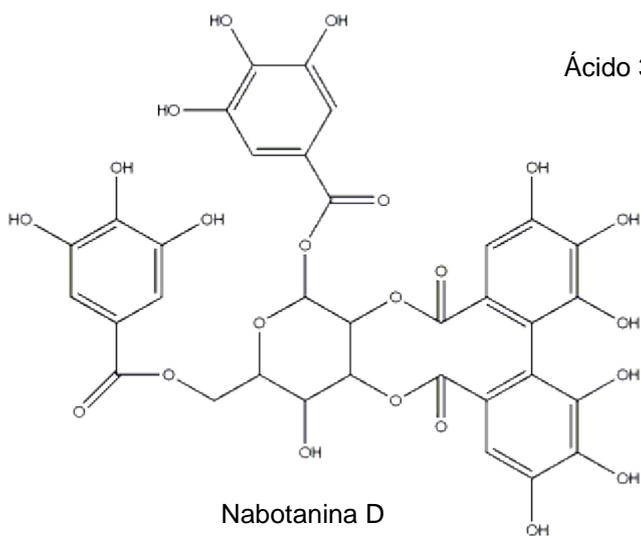
Ácido valoneico



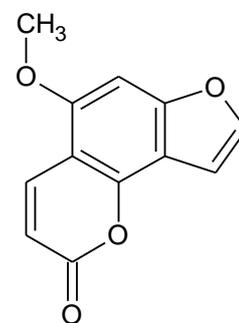
Ácido valoneico bilactona



Ácido 3,3',4'-tri-O-metil-elágico



Nabotanina D



Bergapteno

Fonte: Próprio autor, 2019.

previamente em extratos das folhas de *Monochaetum multiflorum* e *Tibouchina multiflora*, ambas pertencentes à família das *Melastomataceae* assim como a pixirica, o que dá consistência às identificações propostas pelo *SIRIUS*. No modo de ionização negativo todos os compostos apresentaram a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  785,0734 e o espectro  $MS^2$  mostrou como fragmentos a  $m/z$  615,0597  $[M-H-170]^-$  e 275,0160  $[M-H-170-340]^-$ , os quais correspondem a perda de uma molécula de ácido gálico e duas moléculas de ácido gálico ligados a hexose, respectivamente.

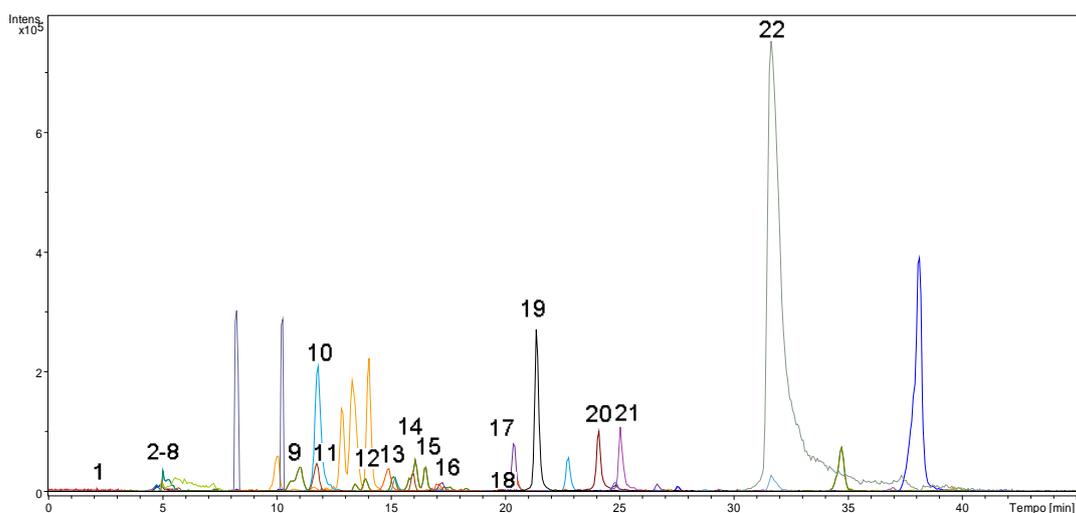
O pico 25 foi identificado como ácido elágico (MM=302,0062). Apresentou máximo de absorção a 366 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  300,9959 e o espectro  $MS^2$  mostrou como fragmentos principais a  $m/z$  285,0069  $[M-H-16]^-$ , referente a perda de um oxigênio provavelmente da ligação éster após a abertura do anel lactona;  $m/z$  283,9994  $[M-H-17]^-$  a uma perda de uma hidroxila;  $m/z$  282,9858  $[M-H-18]^-$  formado pela perda de uma molécula de água;  $m/z$  273,0002  $[M-H-28]^-$  fragmento gerado pela perda de monóxido de carbono;  $m/z$  257,0064  $[M-H-16-28]^-$  após uma perda de monóxido de carbono do íon  $m/z$  285; o íon  $m/z$  245,0106  $[M-H-28-28]^-$  fragmento gerado por uma segunda perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  273; o íon  $m/z$  229,0134  $[M-H-16-28-28]^-$  gerado por uma segunda perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  257; o íon  $m/z$  217,0147  $[M-H-28-28-28]^-$  fragmento gerado por uma segunda perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  245; o íon  $m/z$  201,0203  $[M-H-16-28-28-28]^-$  gerado por uma segunda perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  229; o íon 189,0199  $[M-H-28-28-28-28]^-$  fragmento gerado por uma segunda perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  217; o íon 185,0243  $[M-H-16-28-28-44]^-$  gerado da perda de dióxido de carbono a partir do íon  $m/z$  229; o íon  $m/z$  173,0247  $[M-H-16-28-28-28-28]^-$  gerado por uma segunda perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  201 o íon  $m/z$  157,0288  $[M-H-16-28-28-44-28]^-$  gerado por perda de monóxido de carbono a partir do íon  $m/z$  185. Nota-se que esta molécula em particular pela facilidade de perda de resíduos no modo de ionização negativo possui mais de um caminho de fragmentação distinto.

Os compostos presentes nos picos 30 e 35 foram identificados como ácido 3,3',4'-tri-O-metil-elágico e ácido 3,4,4'-tri-O-metil-elágico respectivamente (MM=344,0532). Como características de absorção no UV-vis apresentaram máximos de absorção a 371 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas

mostrou a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  a  $m/z$  343,0440. O espectro  $MS^2$  ficou idêntico para ambas as moléculas, sendo os fragmentos majoritários a  $m/z$  328,0179  $[M-H-15]^-$ , 312,9991  $[M-H-15-15]^-$ , 297,9753  $[M-H-15-15-15]^-$ , 269.9794  $[M-H-15-15-15-28]^-$ , os quais correspondem a perda de uma metila, duas metilas, três metilas e três metilas mais uma molécula de monóxido de carbono.

Um total de 23 compostos fenólicos foram tentativamente identificados na fração dos FNE da pixirica (Figura 23 e 24; Tabela 6). A fração FNE da pixirica é caracterizada principalmente pela presença de taninos, derivados principalmente de ácidos gálico e elágico. Além disso, algumas proantocianidinas e derivados de miricetina e luteolina foram encontrados nessa fração.

Figura 23. Cromatograma de íons extraídos dos FNE da pixirica.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Tabela 6. Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos fenólicos não extraíveis (FNE) da pixirica (*Leandra leavigata*).

Pico	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	λ <sub>max</sub> (nm) <sup>b</sup>	Massa Ext <sup>a</sup>	[M-H] <sup>-</sup> (m/z) <sup>c</sup>	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Pontuação CSI:FingerID	MS/MS (-) (m/z) <sup>d</sup>
1	Maritimetina 6-O-(3'',4'',6''-tri-O-acetilglucosídeo)	4,76	287	574,1322	573,1170	4,28	56,95%	193,0290; 175,0150; 157,0063
2	Ácido 6-(3,4-dihidroxifenoxi)-2,3,4,5-tetrahidroxi-6-oxohexanoico	4,96	277	318,0586	317,0574	-1,72	37,95%	231,0179; 192,9976; 165,0041; 164,0000
3	Prostaldina A	4,96	277	394,0688	393,0629	4,79	53,80%	275,0124; 274,0039
4	6-(2-hidroxi-5-carboxifenil)-apigenina	4,96	277	406,0688	405,0696	4,63	65,04%	321,0771; 278,0606; 277,0341; 193,0267; 113,0267; 110,9722
5	Maritimetina 6-O-(3'',4'',6''-tri-O-acetilglucosídeo)	5,03	n,d	574,1322	573,1160	2,67	56,86%	383,0723; 193,0290; 157,0063
6	Ácido múcico dimetil-éster-2-O-galato	5,10	n,d	390,0798	389,0758	1,14	55,56%	357,0493; 340,0433; 273,0225; 167,0346; 125,0252
7	7-O-Galoil-sedoheptulose	5,50	277	362,0849	361,0795	3,29	53,75%	325,0571; 273,0032; 239,0548; 245,0108; 189,0179
8	3',5,5',7-Tetrahidroxi-4',6-dimetoxiflavona	10,62	297	346,0688	345,0715	7,76	73,41%	169,0048; 151,0029; 138,9966; 125,0183
9	Ácido Gálico	11,49	270	170,0215	169,0062	4,35	82,59%	151,0030; 125,0240; 124,0150; 95,0149
10	Epicatequina-(4beta->8)-3-O-galoilepicatequina-(4beta->8)-catequina	11,62	270	1018,2167	1017,2080	2,79	52,55%	968,2105; 967,2111; 569,1257; 379,0791; 175,0179; 171,0229; 157,0071; 113,0224
11	Laciniatina	13,44	297	346,0688	345,0722	7,53	76,19%	169,0023; 150,9956; 139,0045; 125,0187
12	Miricetina 7,4'-dimetil-eter	15,12	297	346,068	345,0743	6,92	78,92%	169,0072; 150,9959; 138,9974; 125,0190
13	Epicatequina-(4beta->8)-3-O-galoilepicatequina-(4beta->8)-catequina	15,99	270	1018,2167	1017,2131	2,87	49,30%	967,2188; 569,1238; 189,0317; 175,0188; 171,0242; 157,0072
14	5,7,3',4'-Tetrahidroxi-6,5'-dimetoxiflavona	16,13	297	346,068	345,0758	6,92	77,57%	169,0060; 150,9961; 138,9976; 125,0192

Tabela 6. Continuação

Pico	Composto	$t_R$ (min) <sup>a</sup>	$\lambda_{max}$ (nm) <sup>b</sup>	Massa Ext <sup>a</sup>	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> ) <sup>c</sup>	Desvio médio absoluto de massa (ppm)	Pontuação CSI:FingerID	MS/MS (-) ( <i>m/z</i> ) <sup>d</sup>
15	2-O-galoilpunicalina 1	17,25	280/340	934,0712	933,0424	1,92	71,75%	631,0476; 425,0095; 300,9919; 298,9753
16	2-O-galoilpunicalina 2	20,35	280/340	934,0712	933,0537	3,69	70,49%	631,0471; 425,0038; 300,9919; 299,9808; 298,9747
17	1-O-galoil-6-O-luteoil-alfa-glicosídeo	20,62	290	634,0806	633,0612	0,19	70,43%	482,0523; 481,0484; 463,0383; 300,9924; 275,0039; 169,0068
18	Metil-alnusina	21,22	270	948,0868	947,0636	3,29	56,83%	915,0397; 871,0479; 613,0372; 569,0480; 467,0190; 300,9915
19	Ácido Elágico galoil-pentosídeo	23,91	372	596,0438	595,0275	4,88	64,83%	579,0049; 523,0084; 521,9980; 504,9991; 503,9945; 475,9944; 449,9802; 303,0059; 300,9905; 299,9806; 298,9754
20	Casuarictina	24,78	359	936,0868	935,0662	0,23	67,64%	633,0608; 571,0670; 481,0564; 365,0270; 300,9927; 275,0119; 169,0070
21	2-O-galoilpunicalina 3	26,66	280/340	934,0712	933,0501	-2,48	67,97%	631,0502; 425,0075; 300,9894; 299,9798; 298,9747
22	Ácido Elágico	31,55	372	302,0062	300,9925	5,77	77,17%	283,9893; 257,0016; 245,0025; 229,0078; 183,0077; 129,0310

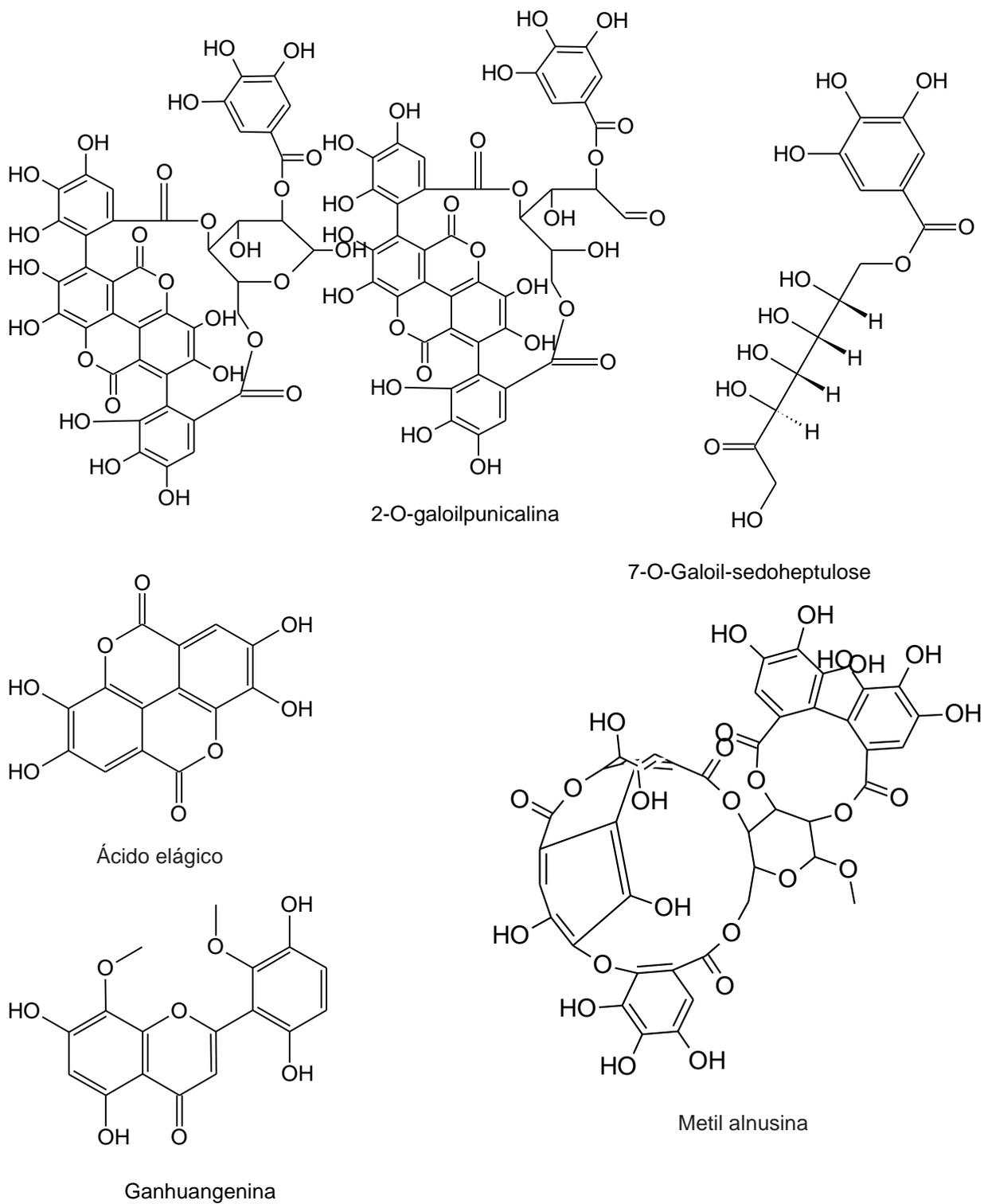
<sup>a</sup> Numeração de acordo com o cromatograma de íon extraído da Figura 19. <sup>b</sup>Tempo de eluição em uma coluna C<sub>18</sub>. <sup>c</sup>Gradiente linear de água/metanol com 0.1% ácido fórmico. <sup>d</sup> Razão massa carga.

O composto presente nos picos 15, 16 e 21 foram identificados como 2-O-galoilpunicalina (MM=934,0712) também conhecida como Arjunina, um tanino derivado de ácido gálico e ácido elágico. Apresentou dois máximos de absorção a 280 e 340 nm, condizendo com sua estrutura composta por ácido gálico e elágico ligados em C2 do ácido gálico sem conjugação com o ácido elágico. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  933,0424 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou como fragmentos principais:  $m/z$  631,0476[M-H-302]<sup>-</sup> 425,0095 [M-H-302-206]<sup>-</sup> e 300,9919 [M-H-302-206-124]<sup>-</sup>. O fragmento  $m/z$  625 é gerado pela perda de uma molécula de ácido elágico, seguido do íon  $m/z$  425 que em sequência ocorre pela perda de um resíduo estabilizado de ácido glucoascórbico, e finalmente o fragmento  $m/z$  301 correspondente ao íon de ácido elágico estável após o íon  $m/z$  425 perder um resíduo de ácido gálico descarboxilado.

O composto presente no pico 19 foi identificado como Ácido Elágico galoil-pentosídeo (MM=596,0438). Apresentou máximo de absorção a 372 nm. No modo de ionização negativo, o espectro de massas mostrou a molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> a  $m/z$  595,0275 e o espectro MS<sup>2</sup> mostrou como fragmentos principais:  $m/z$  579,0049 [M-H-16]<sup>-</sup>, 523,0084 [M-H-16-56]<sup>-</sup>,  $m/z$  300,9905.

O composto presente no pico 22 foi identificado como Ácido Elágico, sendo este o composto com maior intensidade de sinal e área do pico. Seu padrão de fragmentação e de absorção já foi amplamente discutido no pico 25 da FE da pixirica. Todos os demais compostos foram encontrados pela primeira vez em frutas do gênero *Leandra* até onde chega o conhecimento do autor.

Figura 24. Estruturas químicas das moléculas identificadas da FNE da pixirica.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Os teores de compostos fenólicos nas frações FE e FNE estão apresentados na Tabela 7. A concentração total dos CF está distribuída de forma equalitária entre as frações com uma diferença insignificante entre elas ( $p < 0,05$ ). Considerações iniciais sobre as diferenças entre frações em outros alimentos já foram consideradas na análise efetuada no araçá-piranga.

O composto majoritário na FE da pixirica é o Bergapteno. Um estudo *in-vivo* com larvas de peixe-zebra revelaram a eficácia do Bergapteno em combater espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) em locais onde foram induzidas contusões nas caudas dessas larvas evitando processos inflamatórios nos mesmos (YANG et al., 2018). O Bergapteno apresentou atividade antitumoral em uma variedade de tipos de células, de forma expressiva induzindo processos autofágicos em células de câncer de mama aumentando a expressão de Beclin1, PI3KIII, UVRAG e AMBRA e pela conversão de LC3-I para LC3-II (DE AMICIS et al., 2015). Outro estudo apontou o Bergapteno como potente agente inibidor de câncer colo-retal (LIN et al., 2019); como sequestrante de células tumorais pulmonares grandes (CHIANG et al., 2019); como supressor de genes osteoclastogênicos em pelo menos dois estudos independentes (CHEN et al., 2019; HAM et al., 2019) e como possível inibidor da enzima acetilcolinesterase precursora do mal de Alzheimer (KARAKAYA et al., 2019).

O segundo composto majoritário na FE da pixirica é o ácido valoneico. Quantidades expressivas deste composto foram encontradas na casca e polpa do romã (FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011) e da castanha japonesa e da castanha persa (LI et al., 2006). Atividade antioxidante elevada desta molécula ( $3302.1 \pm 285.7 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ ) foi relatada em taninos comerciais de *Castanea sativa* utilizando o método ORAC (CARDULLO et al., 2018).

Tabela 7. Teores de compostos fenólicos extraíveis (FE) e não extraíveis (FNE) da pixirica

Classe de composto fenólico	Composto fenólico	Concentração <sup>a</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de fruta liofilizada)		
		FE	FNE	Percentual aproximado sobre o total (%)
Coumarina	Bergapteno	767,6 $\pm$ 63,2	< LD	37,7
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Valoneico	84,9 $\pm$ 20,0	< LD	4,1
Flavonol	Luteolina 3'-glicosídeo	79,1 $\pm$ 10,7	< LD	3,9
Flavonol	Quercetina-ramnosídeo	72,7 $\pm$ 4,5	< LD	3,5
	Não identificado	38,1 $\pm$ 1,4	< LD	1,9
Ácido hidroxibenzóico	Ácido 6-(3,4-dihidroxifenoxi)-2,3,4,5-tetrahidroxi-6-oxohexanoico	< LD	99,5 $\pm$ 7,3	4,8
Flavonol	6-(2-hidroxi-5-carboxifenil)-apigenina	< LD	80,5 $\pm$ 3,7	3,9
Ácido hidroxibenzóico	Ácido múcico dimetil-éster-2-O-galato	< LD	24,0 $\pm$ 5,4	1,2
Ácido hidroxibenzóico	Ganhuangenina 1	< LD	40,3 $\pm$ 2,0	1,9
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Gálico	< LD	125,7 $\pm$ 9,0	6,1
Ácido hidroxibenzóico	Ganhuangenina 3	< LD	97,5 $\pm$ 12,7	4,7
Ácido hidroxibenzóico	Metil alnusina	< LD	1,7 $\pm$ 1,1	0,1
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Elágico galoil-pentosídeo	< LD	5,2 $\pm$ 1,0	0,2
Ácido hidroxibenzóico	Ácido Elágico	< LD	533,8 $\pm$ 3,9	26,0
	<b>Total</b>	1042 $\pm$ 100	1008 $\pm$ 46	
	<b>Compostos fenólicos totais</b>	<b>2051 <math>\pm</math> 146</b>		<b>100 <math>\pm</math> 7,1</b>

<sup>a</sup> Os compostos fenólicos foram quantificados em equivalentes a ácido gálico e quercetina. <sup>b</sup> < LD.: Abaixo do limite de detecção do método; onde ácido gálico = 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e Rutina = 0,37  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

O terceiro composto majoritário na FE da pixirica é a Luteolina 3'-glicosídeo. Uma revisão apurou o estado da arte da pesquisa referente a ação da luteolina como agente anticarcinogênico, bem como apoptogênico, em células cancerosas pela promoção ou interrupção de vários mecanismos de sinalização inter e intra celulares (IMRAN et al., 2019). Além desse resultado estudos apontam possíveis efeitos

benéficos da luteolina: como agente terapêutico para prevenção de inflamações em pacientes com espectro autista (MARCHEZAN et al., 2019); prevenindo a deterioração das cartilagens em modelos *in-vivo* tendo possível efeito preventivo contra osteoartrite (FEI et al., 2019); gerenciador de hipercolesterolemia através de sua ação antioxidante (CHEURFA et al., 2019); agente antiviral testado *in-vitro* contra Influenza A incluindo os subtipos A/Jiangxi/312/2006 (H3N2) e A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1) por interferir no processo de complexão da capa proteica do vírus com a interface da célula hospedeira (YAN et al., 2019).

Na fração FNE da pixirica o composto majoritário foi o ácido elágico. Os efeitos do ácido elágico como agente promotor da saúde humana é conhecida a bastante tempo, e seus efeitos anticarcinogênicos e como quelante de metais extensivamente estudados (MAAS; GALLETTA; STONER, 2019). Como agente antioxidante é possível que seu efeito seja superior ao da vitamina E (AHANGARPOUR; SAYAHI; SAYAHI, 2019). Melhora a toxicidade da cisplatina em carcinogênese quimicamente induzida através de sua ação antioxidante (GOYAL; KOUL; RANAWAT, 2019). Estudos sugerem que o ácido elágico possui ação cardiovascular e apresenta benefícios nefrológicos, principalmente no que tange complicações inflamatórias decorrentes da Diabetes mellitus (LADDHA; KULKARNI, 2019).

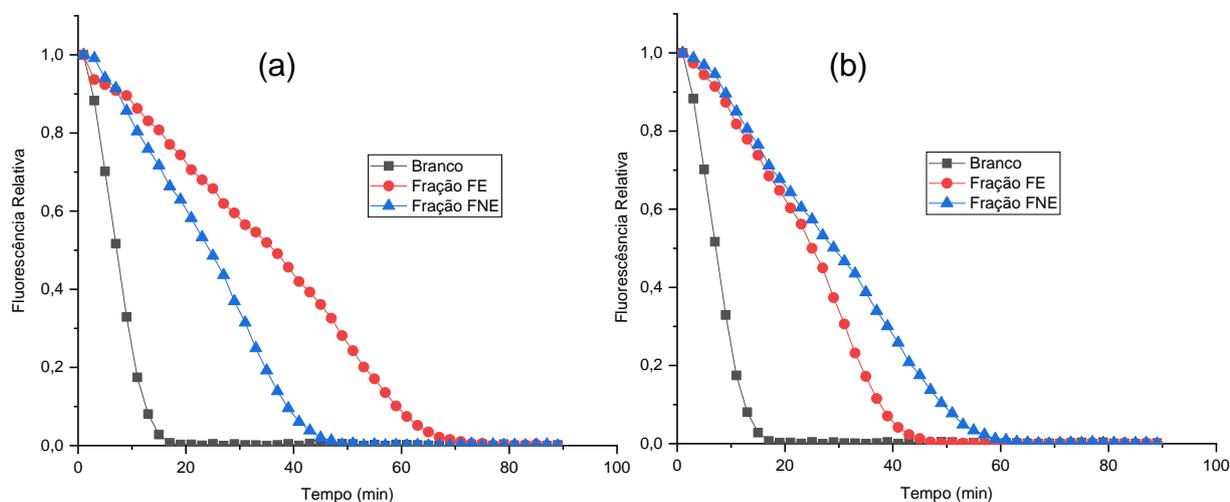
#### 5.4. Capacidade antioxidante

Ambas as frações FE e FNE do araçá-piranga e pixirica foram capazes de desativar o ROO<sup>•</sup> (Figura 24). O extrato de araçá-piranga apresentou uma capacidade antioxidante total 12% superior ao extrato da pixirica (Tabela 8), uma diferença pequena uma vez que o araçá-piranga possui cerca de 3 vezes a concentração de CF totais em relação à pixirica. A contribuição das frações para a capacidade antioxidante total foi diferente para as frutas. Por exemplo, no araçá-piranga a fração FE foi a principal responsável pela capacidade antioxidante encontrada para a fruta. Em contrapartida, conforme pode ser observado na Tabela 8, apesar da fração FNE da pixirica representar metade do total de compostos fenólicos da fruta, a sua capacidade antioxidante corresponde a quase 65% da capacidade antioxidante total encontrada. Esse resultado indica que os compostos fenólicos presentes na fração FNE da pixirica, tendo o ácido elágico como majoritário, possuem uma elevada capacidade de desativar o radical o ROO<sup>•</sup>. A elevada capacidade do ácido elágico de desativar o radical peroxila foi previamente demonstrada através da determinação da constante de reação entre o ácido elágico e o radical peroxila, que foi na ordem de 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Além disso, o ácido elágico também apresenta capacidade de desativar outras espécies reativas, tais como radical peroxila (HO<sup>•</sup>), radical dióxido de nitrogênio e o ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)(PRIYADARSINI et al., 2002).

Os compostos fenólicos desativam essas espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) por três mecanismos, nomeadamente: (a) transferência de hidrogênio (HAT), (b) transferência de elétrons (SET) e (c) formação de adutos (ANOVAR et al., 2009). Assim, a capacidade antioxidante dos extratos analisados está relacionada com as diferentes classes de compostos fenólicos presentes, bem como com a sua concentração no extrato.

Os valores de capacidade antioxidante encontrados (Tabela 8) são similares aos relatados para extratos de tangerina (ESPARZA-MARTÍNEZ et al., 2016) e castanha-do-pará (JOHN; SHAHIDI, 2010). Tanto o araçá-piranga quanto a Pixirica apresentaram pelo menos 1.9 vezes mais atividade antioxidante que a maioria dos vegetais de uso comum (OU et al., 2002) para os FE.

Figura 25. Curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo, sendo (a) extratos do araçá-piranga e (b) extratos da pixirica.



Fonte: Próprio autor, 2019.

Tabela 8. Capacidade antioxidante dos extratos de FE e FNE do araçá-piranga e pixirica

Extrato	Capacidade de desativar o ROO* ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ de extrato liofilizado)	
	Araçá-piranga	Pixirica
FE	644,2 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	310,8 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>
FNE	323,4 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	551,4 $\pm$ 13,8 <sup>b</sup>
Capacidade antioxidante total (FE+FNE)	967,6 $\pm$ 1,5	862,2 $\pm$ 11,7

**Nota:** Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Diversas variedades de mirtilo tiveram sua capacidade antioxidante medida em seus FE: *Vaccinium corymbosum* 182,8  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado; *Vaccinium corymbosum* L. 105,0  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado; *Vaccinium ashei* 206,5  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado; *Vaccinium angustifolium* 116,4  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  (PRIOR et al., 1998). De forma geral tanto a pixirica quanto o araçá-piranga apresentaram pelo menos 1,7 vezes mais atividade antioxidante que as espécies de mirtilo apresentadas comparando apenas as FE, do que podemos concluir que tanto o araçá-piranga quanto a pixirica possuem elevada atividade antioxidante se comparados com frutas e vegetais de uso difundido.

## 6. CONCLUSÃO

A aplicação da espectrometria de massa de alta resolução associada ao *software SIRIUS* permitiu identificar com sucesso mais de 100 compostos fenólicos presentes nas frutas araçá-piranga e pixirica – destes, a maior parte relatadas pela primeira vez em seus respectivos gêneros – com alto grau de similaridade, obtendo valores semelhantes aos obtidos a partir da validação com padrões. Isso demonstra o potencial desta ferramenta como auxiliar na identificação de compostos fenólicos em alimentos. Cabe destacar que cerca da metade desses compostos fenólicos foram encontrados na fração de fenólicos não extraíveis, a qual é uma fração pouco explorada na maioria dos estudos sobre compostos fenólicos em alimentos. Assim, os resultados deste trabalho associados aqueles previamente publicados na literatura indicam que essa fração não pode ser ignorada, pois representa uma proporção significativa tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo dos compostos fenólicos.

Com relação aos objetivos propostos, os mesmos foram atingidos, sendo identificados 25 CF na FE e 25 CF na FNE do araçá-piranga, e 35 CF na FE e 22 na FNE da pixirica. O composto majoritário da fração FE do araçá-piranga foi o ácido 1,3,4-tri-galoilquínico ( $2325,0 \pm 49,3 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada) e da fração FNE foi o ácido 3-O-metil-gálico ( $927,1 \pm 4,2 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada). O composto majoritário da fração FE da pixirica foi o bergapteno ( $767,6 \pm 63,2 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada) e da fração FNE foi o ácido elágico ( $533,8 \pm 3,9 \mu\text{g g}^{-1}$  de fruta liofilizada). Quanto a capacidade em desativar o  $\text{ROO}^{\bullet}$  do araçá-piranga os valores para as frações FE e FNE foram respectivamente  $644,2 \pm 5,9$  e  $323,4 \pm 4,4 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado, enquanto para a FE e FNE da pixirica os valores foram respectivamente  $310,8 \pm 2,1$  e  $551,4 \pm 13,8 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de extrato liofilizado.

O araçá-piranga e a pixirica estão entre as primeiras frutas nativas do Brasil a ter sua fração de FNE estudada. O conhecimento do perfil de FNE de demais frutas brasileiras é essencial para o conhecimento da capacidade antioxidante real das mesmas e de seus possíveis efeitos benéficos à saúde, fato este concluído para as frutas do araçá-piranga e da pixirica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSAR, Tayyaba et al. Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: Involvement of multiple signal transduction pathways. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 23077, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23077>>

AHANGARPOUR, Akram; SAYAHI, Majed; SAYAHI, Miaad. **The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study** *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 2019.

ANDERSEN, Øyvind M.; JORDHEIM, Monica. Anthocyanins. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. [s.l: s.n.]. p. 1–12.

ANOUAR, E. et al. New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: A combined theoretical and experimental approach. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s. l.], 2009.

APEL, Miriam A. et al. Essential Oils from *Eugenia* Species—Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 135–138, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2004.9698675>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

ARAPITSAS, Panagiotis. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 1041–1045, 2008.

BAEK, Jong et al. Methyl Gallate Inhibits Osteoclast Formation and Function by Suppressing Akt and Btk-PLC $\gamma$ 2-Ca $^{2+}$  Signaling and Prevents Lipopolysaccharide-Induced Bone Loss. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 581, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/581>>

BOCHI, Vivian Caetano; GODOY, Helena Teixeira; GIUSTI, M. Monica. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 176, p. 234–243, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.041>>

BRAS, R.; BIOCÍ. Floristics and structure of the tree component in a Seasonal Forest remnant, Chiapetta, Rio Grande do Sul State, Brazil. **ARTICLE Revista Brasileira de Biociências Brazilian Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 344–353, 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1135>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

CALLEGARO, R. M. et al. Natural regeneration of arboreal species in different communities in a remnant of mixed ombrophylous forest . **Ciencia Rural**, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, v. 45, n. 10, p. 1795–1801, 2015. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84941754549&doi=10.1590%2F0103-8478cr20131098&partnerID=40&md5=51afe17f8558545db83e3027fa0b2aac>>

CARDULLO, Nunzio et al. A mass spectrometry and 1 H NMR study of hypoglycemic and antioxidant principles from a *Castanea sativa* tannin employed in oenology. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 268, p. 585–593, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618310902>>

CHANG, Kun-Che et al. Aldose reductase inhibition alleviates hyperglycemic effects on human retinal pigment epithelial cells. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 234, p. 254–260, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.007>>

CHEN, Guiping et al. Bergapten suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomy-induced osteoporosis via suppression of NF- $\kappa$ B and JNK signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], 2019.

CERNUSHEVICH, Igor V.; LOBODA, Alexander V.; THOMSON, Bruce A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], 2001.

CHEURFA, M. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant properties of *Olea europaea* L. leaves from Chlef province, Algeria using in vitro, in vivo and in silico approaches. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], 2019.

CHIANG, Shyh-Ren et al. Bergapten induces G1 arrest of non-small cell lung cancer cells, associated with the p53-mediated cascade. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.9810>>

CLIFFORD, Michael N. et al. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.

CORREA, Luana Barbosa et al. Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 1554–1566, 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b01115>>

CROZIER, Alan; JAGANATH, Indu B.; CLIFFORD, Michael N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

DA SILVA PINTO, Marcia; LAJOLO, Franco Maria; GENOVESE, Maria Inés. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, [s. l.], 2008.

DAT, Nguyen Tien et al. A Dimeric Lactone from *Ardisia japonica* with Inhibitory Activity for HIV-1 and HIV-2 Ribonuclease H. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 839–841, 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np060359m>>

DAVIES, K. M.; SCHWINN, K. E.; GOULD, K. S. Anthocyanins. In: **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. [s.l.: s.n.].

DE AMICIS, Francesca et al. Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells. **Molecular Cancer**, [s. l.], 2015.

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

DIMPFEL, Wilfried et al. Theogallin and  $\gamma$ -theanine as active ingredients in decaffeinated green tea extract: II. Characterization in the freely moving rat by means of quantitative field potential analysis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 59, n. 10, p. 1397–1403, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.59.10.0010>>

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, Gloria; MARINA, María Luisa; PLAZA, Merichel. **Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants** **Journal of Chromatography A**, 2017.

DÜHRKOP, Kai. SIRIUS Documentation. [s. l.], 2015.

DÜHRKOP, Kai et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 299–302, 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41592-019-0344-8>>

ESPARZA-MARTÍNEZ, Francisco J. et al. Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], 2016.

FEI, Junliang et al. Luteolin inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], 2019.

FERREIRA KINUPP, Valdely; BERGMAN, Ingrid; DE BARROS, Inchausti. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas Protein and mineral contents of native species, potential vegetables, and fruits. [s. l.], v. 281, n. 22, p. 846–857, 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/20761/000693232.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

FERRERES, Federico; LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 312–321, 2004.

FISCHER, Ulrike A.; CARLE, Reinhold; KAMMERER, Dietmar R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 127, n. 2, p. 807–821, 2011.

FREITAS, Elisete Maria De et al. Floristic diversity in areas of sandy soil grasslands in Southwestern Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 112–130, 2010. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1316>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

GERRISH, G.; MUELLER-DOMBOIS, D. Behavior of native and non-native plants in two tropical rain forests on Oahu, Hawaiian Islands. **Phytocoenologia**, [s. l.], v. 8, p. 237–295, 1980.

GLOVER, Beverley J.; MARTIN, Cathie. Anthocyanins. **Current biology : CB**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. R147--50, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401890%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096098221200022X>>

GORDON, André et al. Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae). **Food Research International**, [s. l.], 2011.

GOYAL, Yasmeen; KOUL, Ashwani; RANAWAT, Pavitra. Ellagic acid ameliorates cisplatin toxicity in chemically induced colon carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], 2019.

GRINGS, Martin; BRACK, Paulo. Árvores na vegetação nativa de Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul. **Iheringia. Série Botânica.**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 5–22, 2009. Disponível em: <<https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/130>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

GUTIERREZ-OROZCO, Fabiola; FAILLA, Mark L. Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: A critical review of the current evidence. **Nutrients**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 3163–3183, 2013.

HADDOCK, Elizabeth A. et al. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants. Part 1. Introduction. Naturally occurring galloyl esters. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, [s. l.], 1982.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, JOHN M. C. **Free Radicals in Biology & Medicine**. [s.l: s.n.]. v. 5 ed

HAM, Ju et al. Methoxsalen and Bergapten Prevent Diabetes-Induced Osteoporosis by the Suppression of Osteoclastogenic Gene Expression in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 2019.

HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics**. London: Academic Press Ltd., 1989.

HERRERO, Miguel et al. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 49–69, 2012.

IMRAN, Muhammad et al. **Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review****Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2019.

JACOBO-VELÁZQUEZ, Daniel A.; CISNEROS-ZEVALLOS, Luis. Recent Advances in Plant Phenolics. **Molecules**, [s. l.], 2017.

JEON, Miso; RAHMAN, Naimur; KIM, Yong-Sik. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays a distinct role in methyl gallate–mediated inhibition of adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 479, n. 1, p. 22–27, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.178>>

JOHN, Jenny A.; SHAHIDI, Fereidoon. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, [s. l.], 2010.

K. MISHRA, Rohit et al. Pharmaco-Phylogenetic Investigation of Methyl Gallate Isolated from *Acacia nilotica* (L.) Delile and Its Cytotoxic Effect on NIH3T3 Mouse Fibroblast. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 540–548, 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=17&issue=6&spage=540>>

KARAKAYA, Songul et al. Molecular docking studies of coumarins isolated from extracts and essential oils of *Zosima absinthifolia* Link as potential inhibitors for Alzheimer's disease. **Molecules**, [s. l.], 2019.

KINUPP, Valdely Ferreira. Plantas Alimentícias Não-Convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. [s. l.], p. 590, 2007. a.

KINUPP, Valdely Ferreira. **Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007b. [s. l.], 2007. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

KINUPP, Valdely Ferreira; BARROS, Ingrid Bergman Inchausti De. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, Sp. Vol. 28, n. 4 (out./dez. 2008), p. 846-857**, [s. l.], 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/20761>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

KOLECKAR, Vit et al. Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 436–447, 2008.

KOZIKOWSKI, Alan P.; TÜCKMANTEL, Werner; GEORGE, Clifford. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 2. Establishment of interflavan linkage regio- and stereochemistry by oxidative degradation of an O-alkylated derivative of procyanidin B2 to (R)-(-)-2,4-diphenylbutyric acid. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], 2000.

LA BARBERA, Giorgia et al. **Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages***Food Research International*, 2017.

LADDHA, Ankit P.; KULKARNI, Yogesh A. **Tannins and vascular complications of Diabetes: An update***Phytomedicine*, 2019.

LEE, Jihyun; CHAN, Bronte Lee Shan; MITCHELL, Alyson E. Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 215, p. 301–310, 2017.

LI, Li et al. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 2006.

LIN, Ching Pin et al. Bergapten induces G1 arrest and pro-apoptotic cascade in colorectal cancer cells associating with p53/p21/PTEN axis. **Environmental Toxicology**, [s. l.], 2019.

MAAS, John L.; GALLETTA, Gene J.; STONER, Gary D. Ellagic Acid, an Anticarcinogen in Fruits, Especially in Strawberries: A Review. **HortScience**, [s. l.], 2019.

MARCHEZAN, Josemar et al. **Immunological dysfunction in autism spectrum disorder: A potential target for therapy***NeuroImmunoModulation*, 2019.

MARIUTTI, Lilian R. B. et al. The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International**, [s. l.], v. 64, p. 618–625, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.032>>

MIKICH, Sandra Bos; SILVA, Sandro Menezes. Floristic and phenological study of zoochoric species of semideciduous seasonal forest remnants in the mid-west region of Parana State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 89–113, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062001000100010&script=sci\\_arttext&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062001000100010&script=sci_arttext&lng=es)>. Acesso em: 11 abr. 2017.

MOJIOL, Andy Russel et al. Common Medicinal Plants Species Found at Burned and Unburned Areas of Klias Peat Swamp Forest, Beaufort, Sabah Malaysia. **Journal of Sustainable Development**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2014.

MONKS, Noel R. et al. Anti-tumour screening of Brazilian plants. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], 2002. a.

MONKS, Noel R. et al. Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 603–616, 2002. b. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1076/phbi.40.8.603.14658%5Cnhttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037000761&partnerID=tZOtx3y1>>

MULLEN, William et al. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn. **Phytochemistry**, [s. l.], 2003.

MÜLLER, Sandra Cristina; WAECHTER, Luiz. Introdução Em florestas tropicais e subtropicais , estudos Material e métodos Argentina Santa Uruguai Oceano Atlântico. [s. l.], v. 2, p. 395–406, 2001.

NABAVI, Seyed Fazel et al. **Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review** **Brain Research Bulletin**, 2015.

NEGI, J. S. et al. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. **Journal of Applied Chemistry**, [s. l.], 2013.

NONAKA, Gen-ichiro et al. Anti-Aids Agents, 2: Inhibitory Effect of Tannins on HIV Reverse Transcriptase and HIV Replication in H9 Lymphocyte Cells. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 587–595, 1990. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50069a008>>

OU, Boxin et al. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 3122–3128, 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0116606>>

PEREIRA, David M. et al. Phenolics: From chemistry to biology. **Molecules**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 2202–2211, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Fruit peels as sources of non-extractable polyphenols or macromolecular antioxidants: Analysis and nutritional implications. **Food Research International**, [s. l.], v. 111, p. 148–152, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918303806>>

PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; TORRES, Josep Lluís. **Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art** **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011.

PÉREZ-RAMÍREZ, Iza F. et al. Comprehensive Characterization of Extractable and Nonextractable Phenolic Compounds by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight of a Grape/Pomegranate Pomace Dietary Supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 661–673, 2018. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b05901>>

PRIYADARSINI, K. Indira et al. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 2002.

RAHMAN, Naimur; JEON, Miso; KIM, Yong-Sik. Methyl gallate, a potent antioxidant inhibits mouse and human adipocyte differentiation and oxidative stress in adipocytes through impairment of mitotic clonal expansion. **BioFactors**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 716–726, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1310>>

REGINATO, Marcelo; GOLDENBERG, Renato. Taxonomic notes on Leandra (Melastomataceae, Miconieae). **Hoehnea**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 201–206, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2236-89062012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2236-89062012000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 15 abr. 2017.

ROBOZ, John. **Mass Spectrometry for the Novice**. [s.l: s.n.].

RODRIGUES, Eliseu; MARIUTTI, Lilian R. B.; MERCADANTE, Adriana Z. Carotenoids and phenolic compounds from Solanum sessiliflorum, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 2013.

RS, Sapiranga-. Lei municipal nº 5900, de 13/05/2016. [s. l.], 2016.

SAURA-CALIXTO, Fulgencio; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara (EDS.). **Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health**. [s.l: s.n.].

SAURA-CALIXTO, Fulgencio; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara. **Non-extractable Polyphenols and Carotenoids**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2018. b.

SLÁMOVÁ, Kristýna; KAPEŠOVÁ, Jana; VALENTOVÁ, Kateřina. “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-Catalyzed Modifications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 2126, 2018.

STALMACH, Angélique. Bioavailability of Dietary Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids. In: **Polyphenols in Human Health and Disease**. [s.l: s.n.].

SWAMP, Peat et al. Common Medicinal Plants Species Found at Burned and Unburned Areas. [s. l.], p. 109–115, 2010.

TARASCOU, I. et al. The hidden face of food phenolic composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 501, n. 1, p. 16–22, 2010.

TEIXEIRA, Nayane et al. Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. **Food Research International**, [s. l.], p. #pagerange#, 2019.

THOMPSON, James M. **Mass spectrometry**. [s.l: s.n.].

TRUFELLI, Helga et al. **An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry** *Mass Spectrometry Reviews*, 2011.

VICENTE, Oscar; BOSCAIU, Monica. Flavonoids: Antioxidant compounds for plant defence... and for a healthy human diet. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 14–21, 2018.

VILEGAS, Wagner et al. Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 2019.

VITALE, Daniela Cristina et al. **Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability.** **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, 2013.

WISER, Susan K. et al. Invasive trees and shrubs: Where do they come from and what we should expect in the future? **Biological Invasions**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 1639–1658, 2013. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.05.001>%5Cn<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17550874.2011.594101>%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843401>%5Cn<http://www.jstor.org/stable/2259737>%5Cn<http://dx.doi.org/10.1038/nature11056>%5Cn<http://dx.d>>

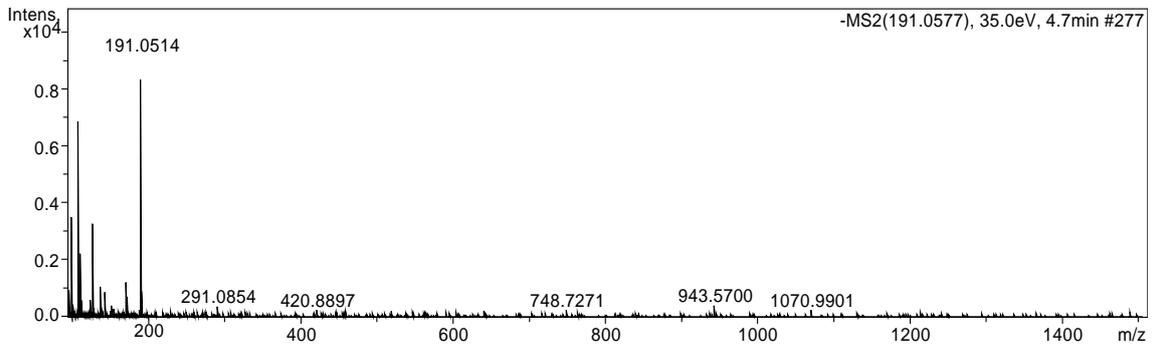
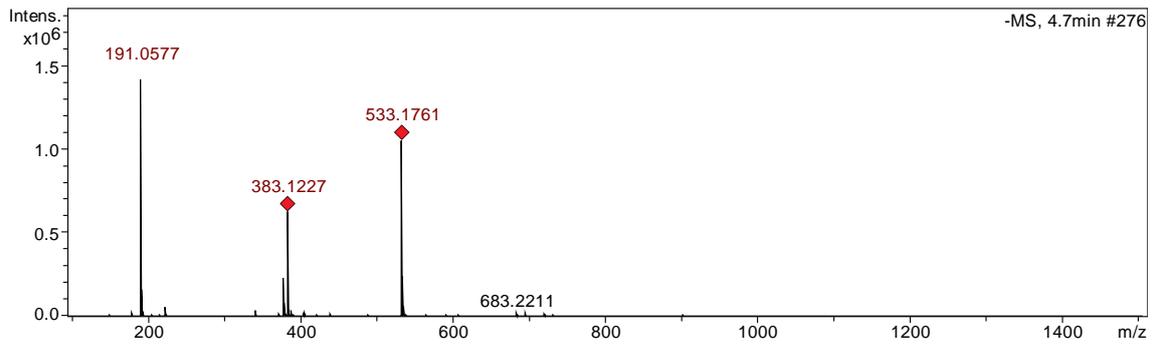
YAN, Haiyan et al. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. **Journal of Natural Medicines**, [s. l.], 2019.

YANG, Yi et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an in vivo zebrafish model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 496, n. 2, p. 763–769, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X18300779>>

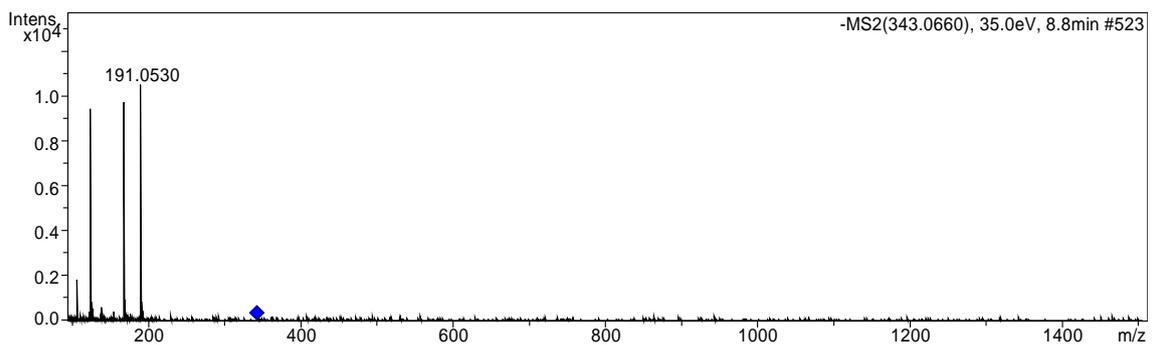
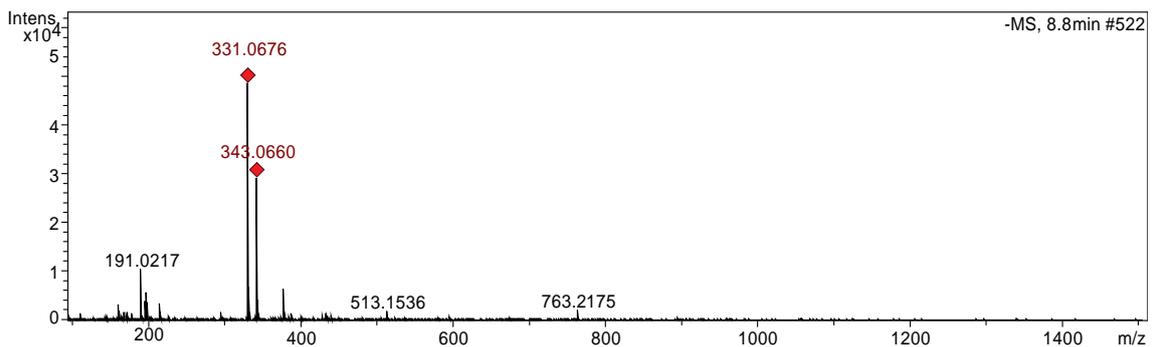
## APÊNDICE A

### Espectros de massas da fração FE do araçá-piranga

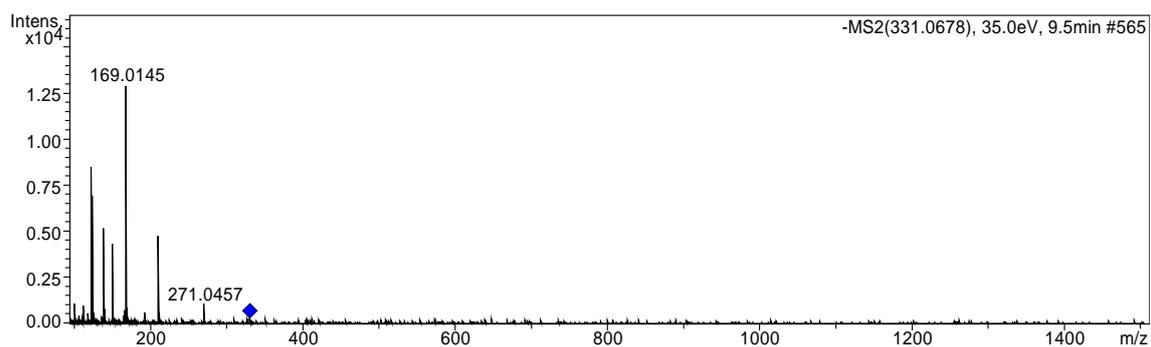
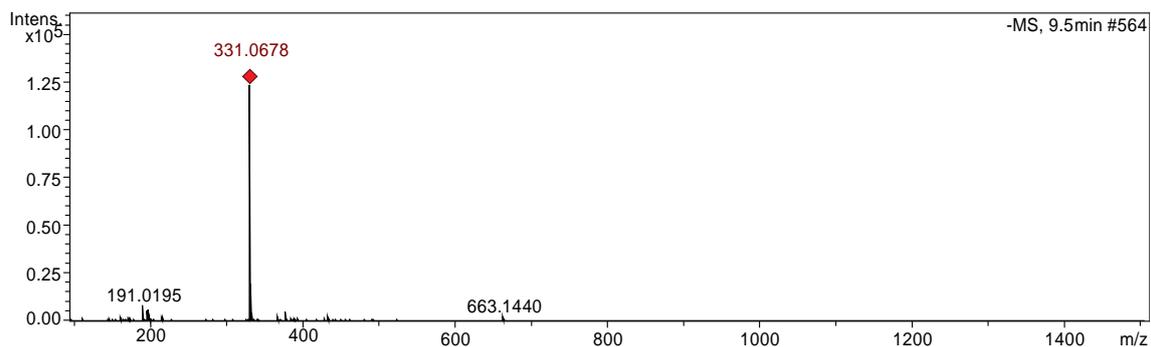
#### Ácido quínico



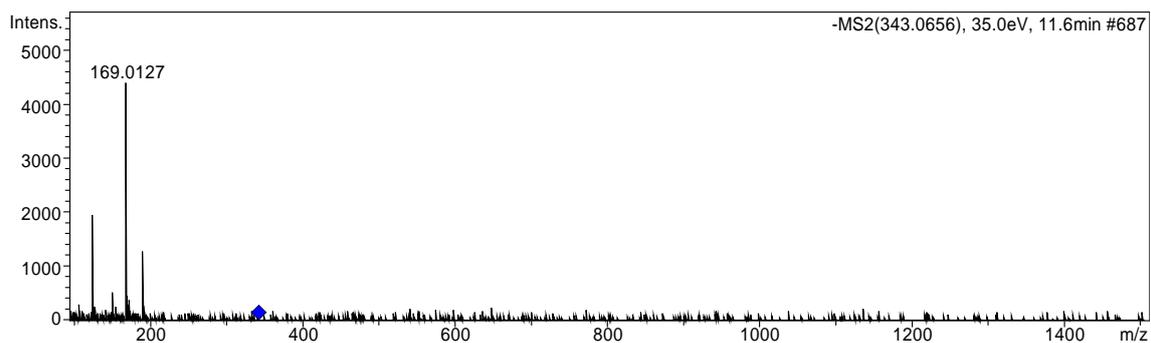
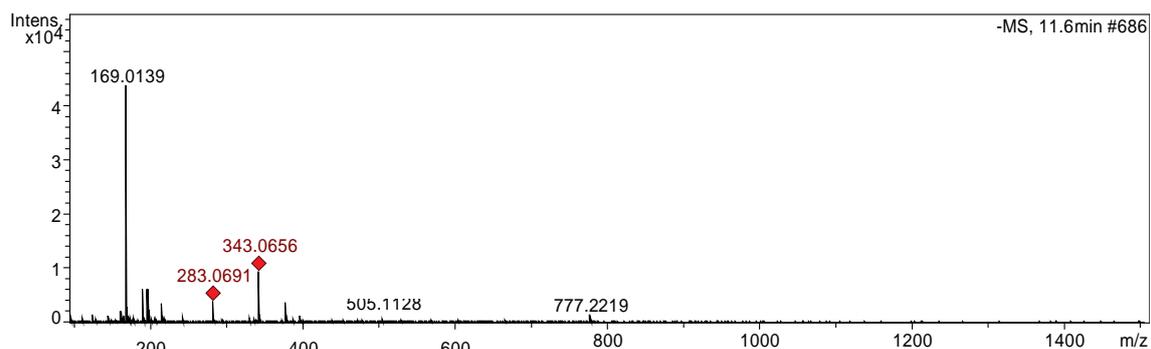
#### Ácido 3-O-galoilquínico



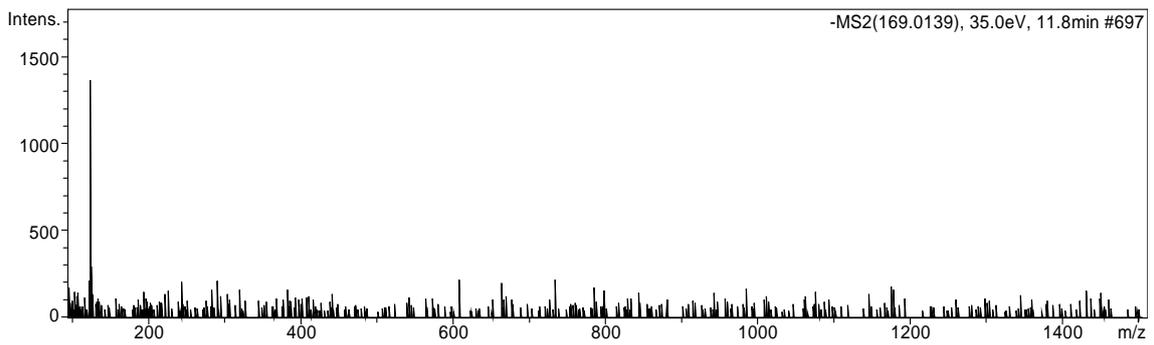
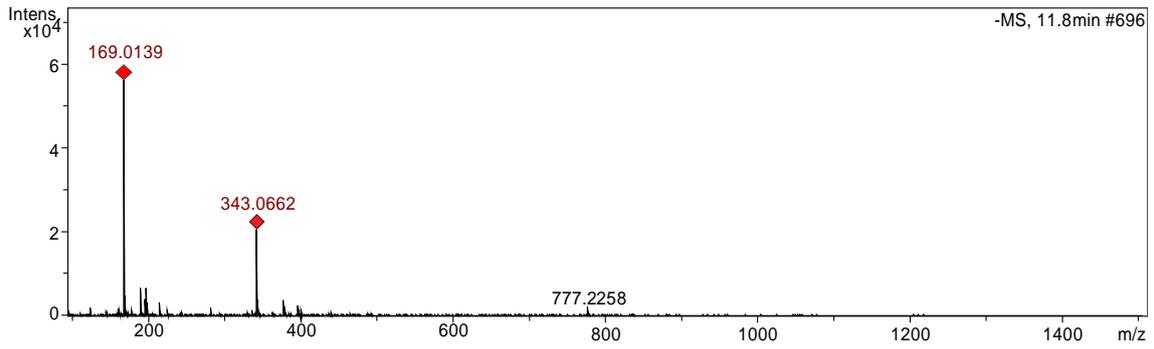
## 5-O-Galoil glicosídeo



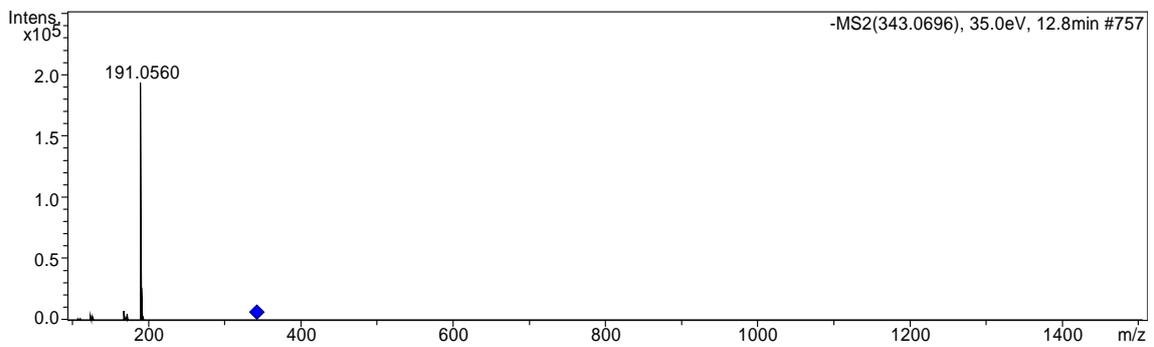
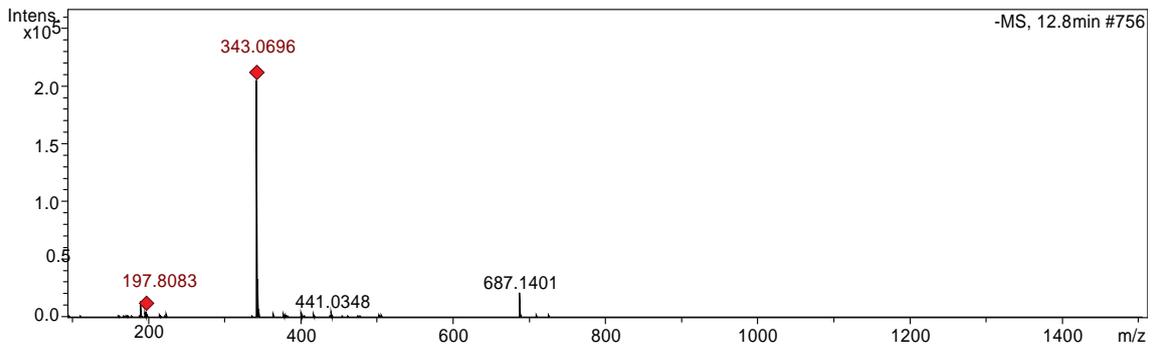
## Ácido 5-O-galoilquínico



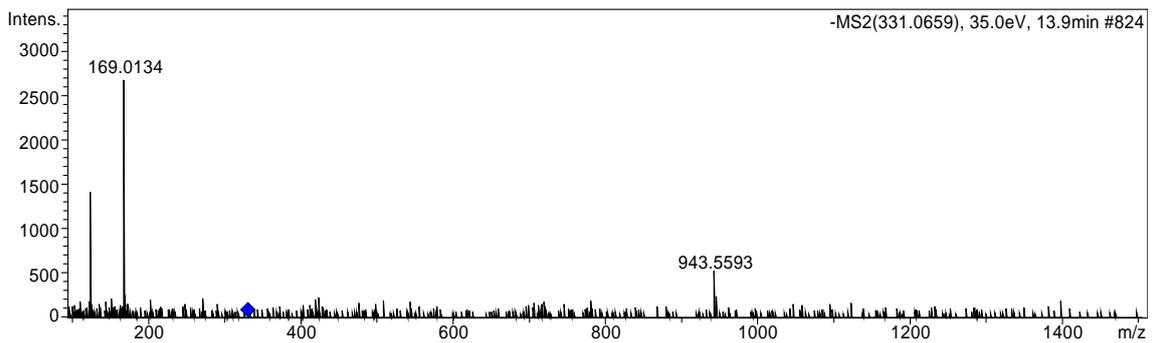
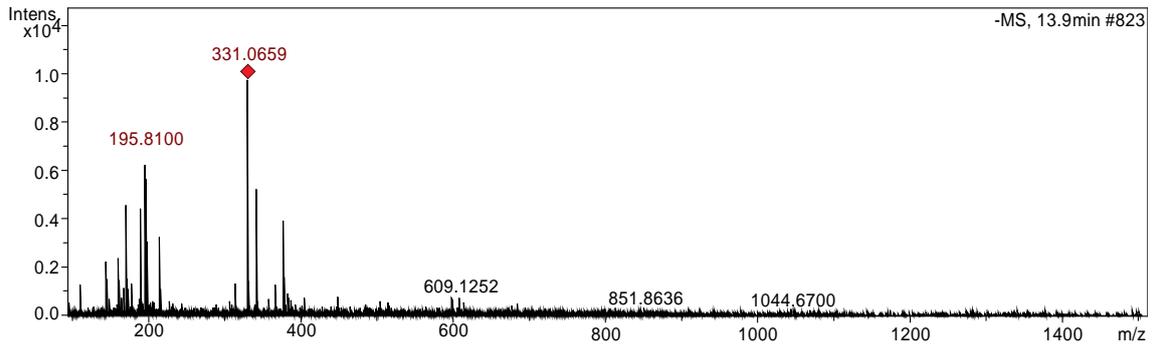
## Ácido gálico



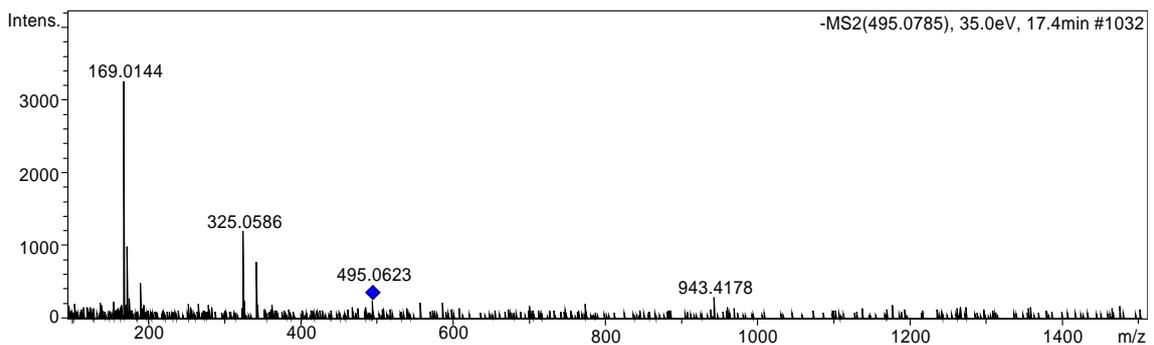
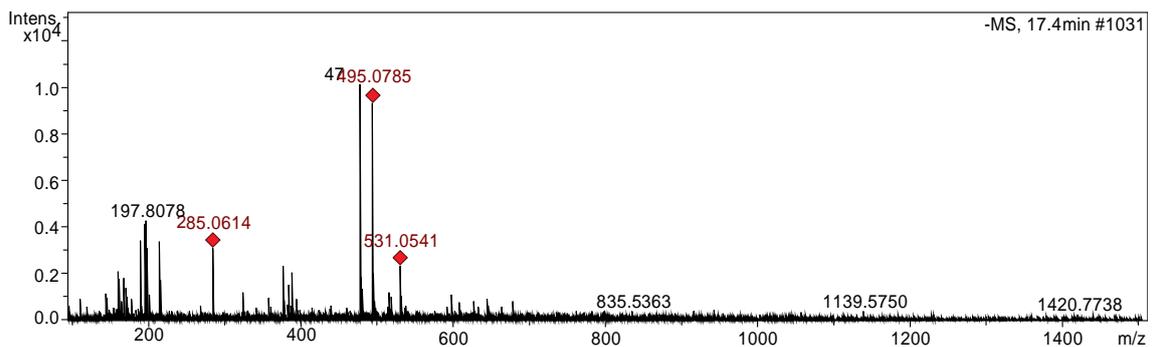
## Ácido 4-O-galoilquínico



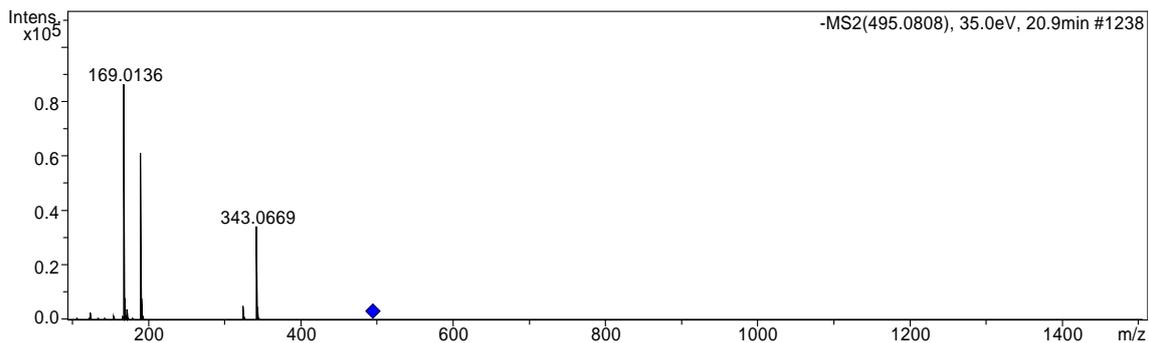
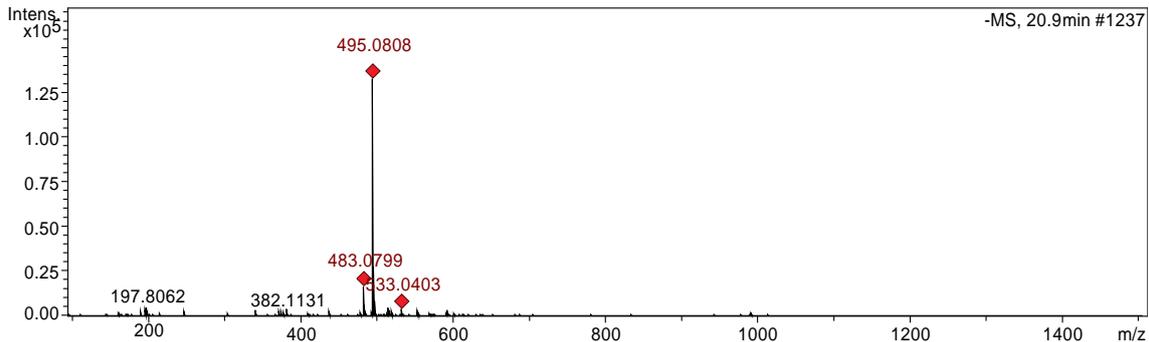
## 4-O-Galoil-glicosídeo



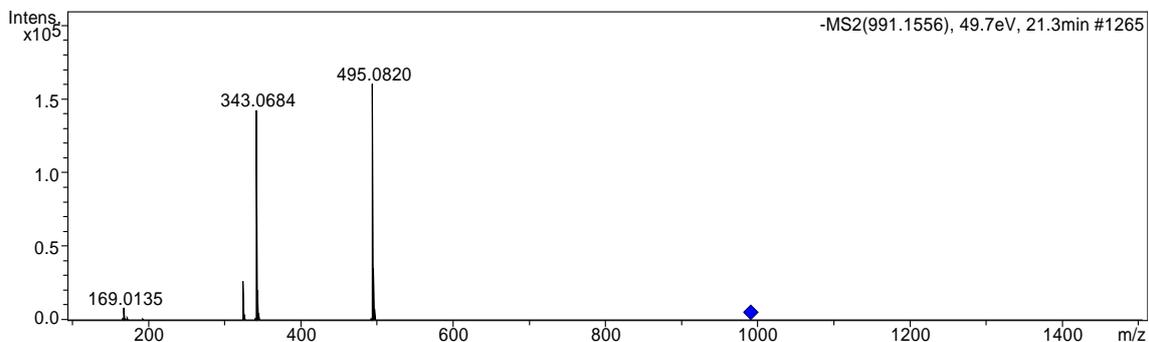
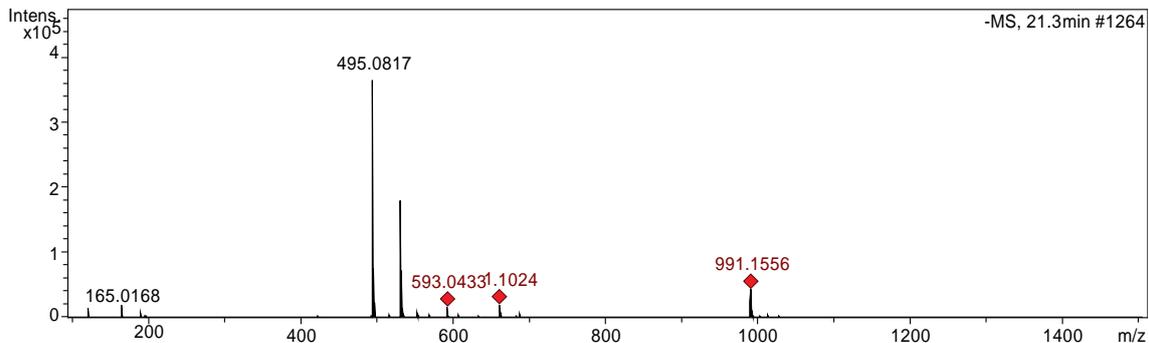
## Ácido 3,5-di-galoilquínico



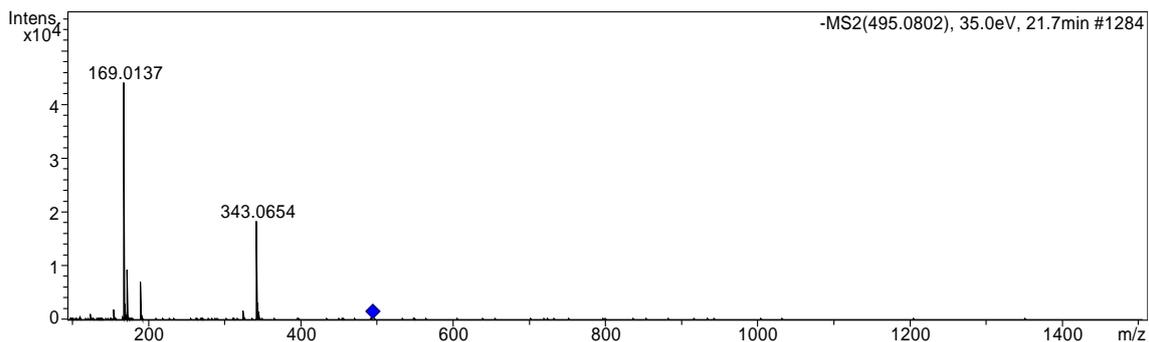
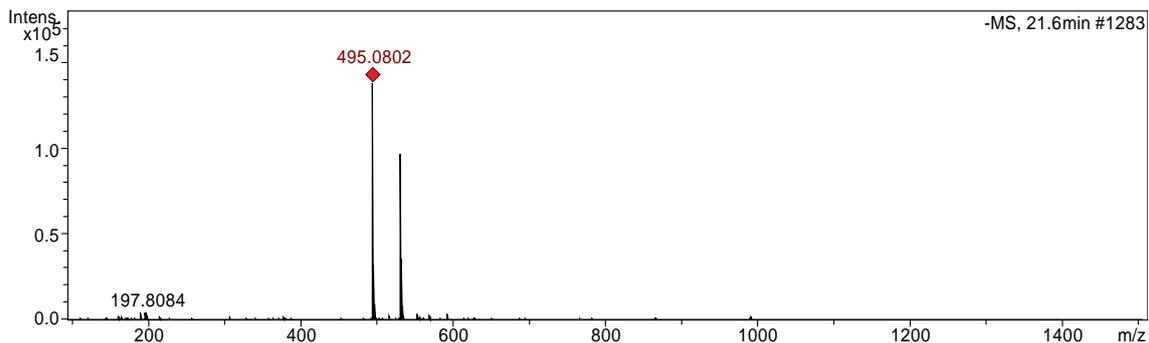
### Ácido 1,3-di-galoilquínico



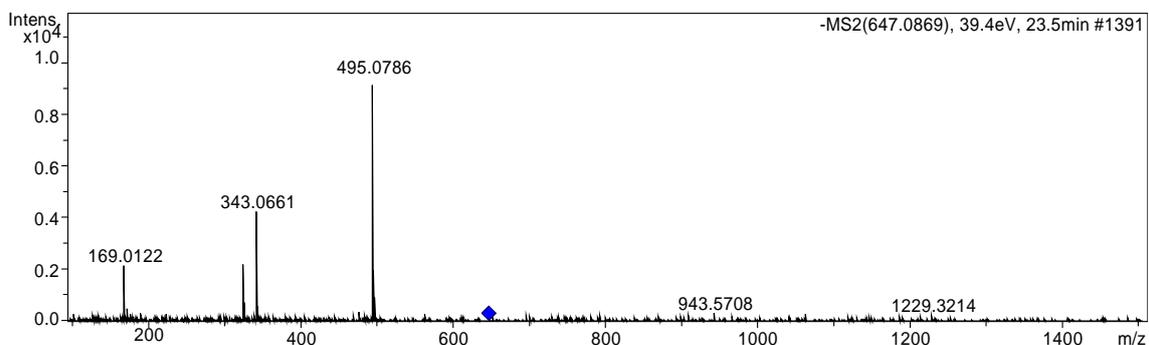
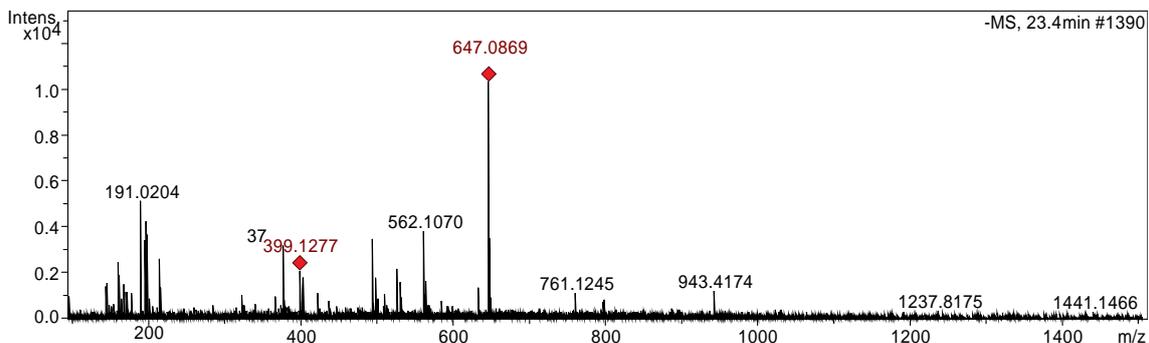
### Di-galoil ardimerina



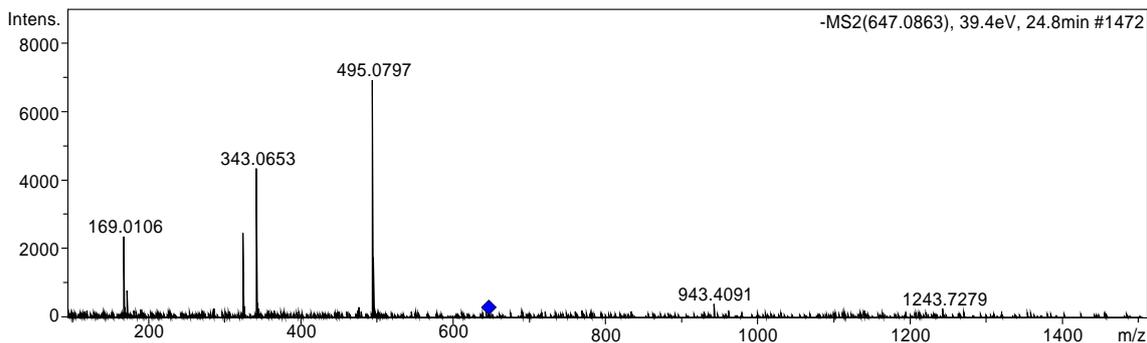
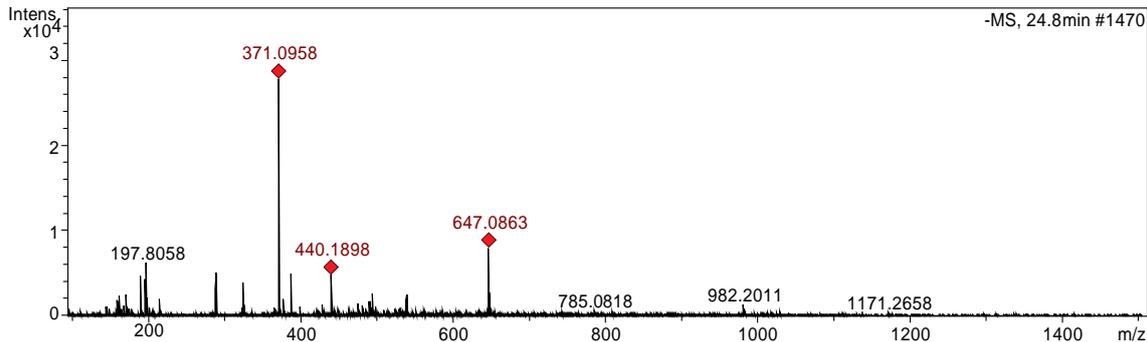
### Ácido 3,4-di-galoilquínico



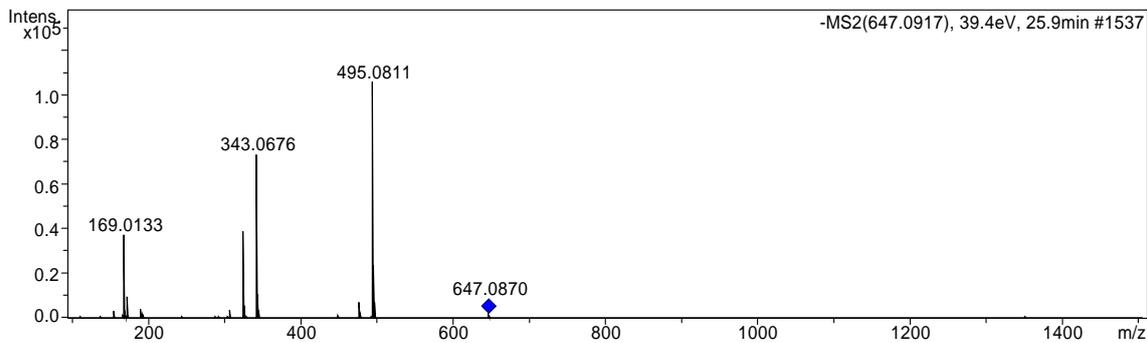
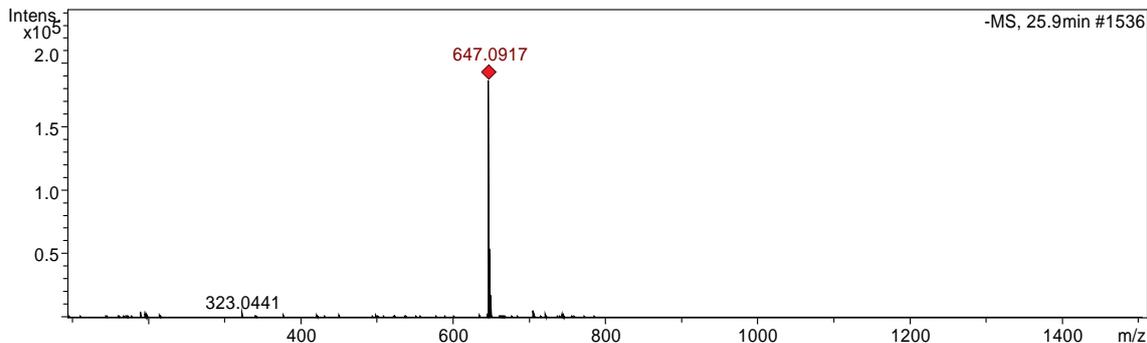
### Ácido 3,4,5-tri-galoilquínico



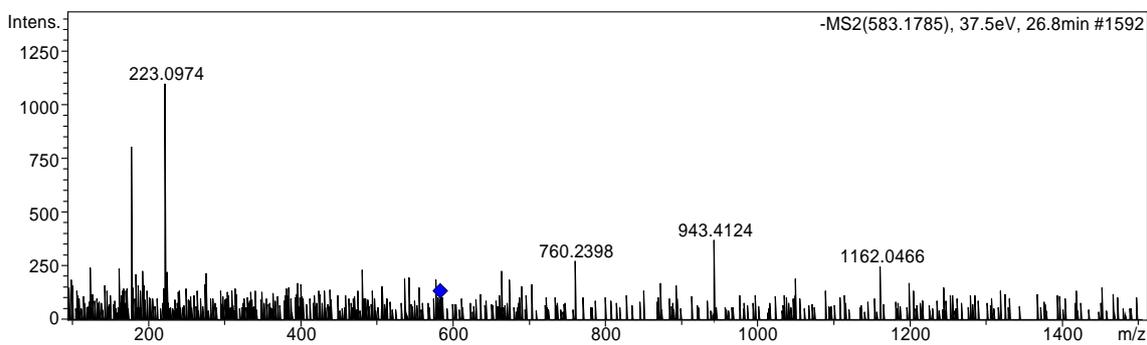
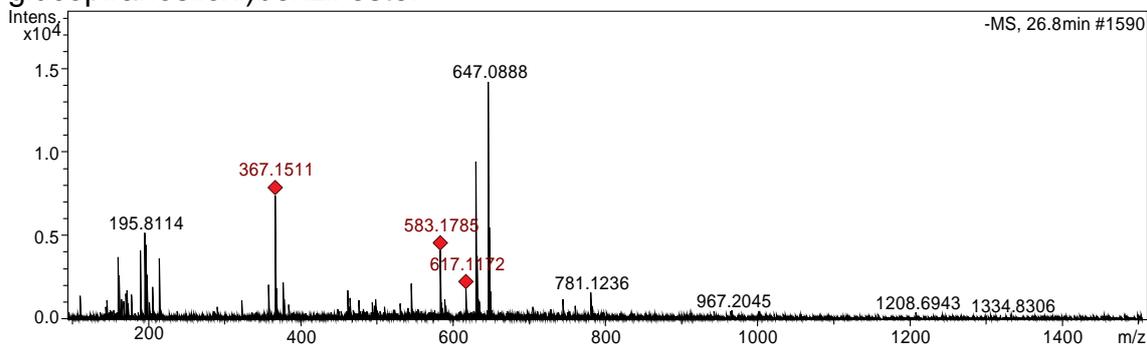
### Ácido 1,3,5-tri-galoilquínico



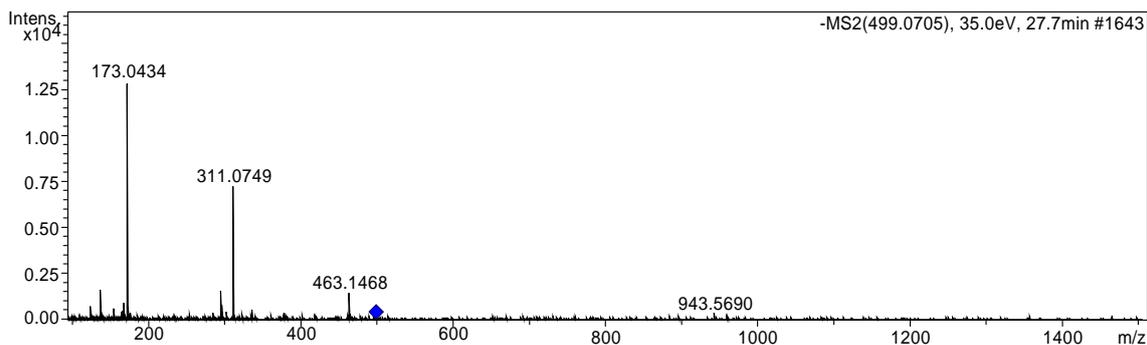
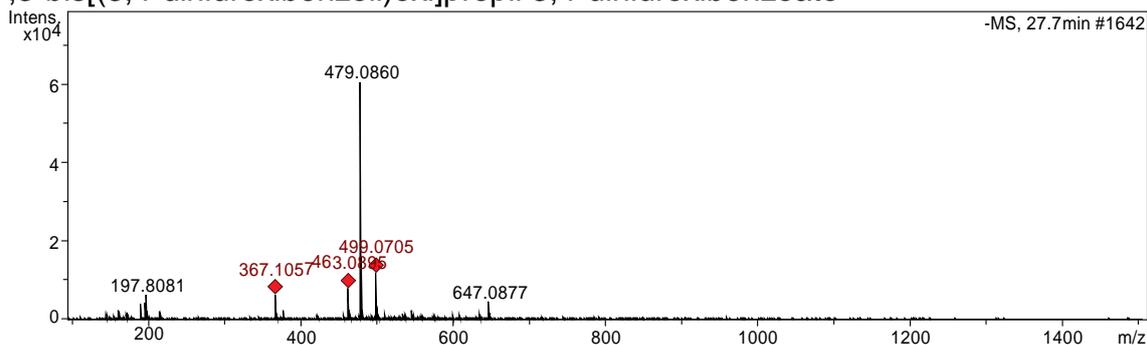
### Ácido 1,3,4-tri-galoilquínico



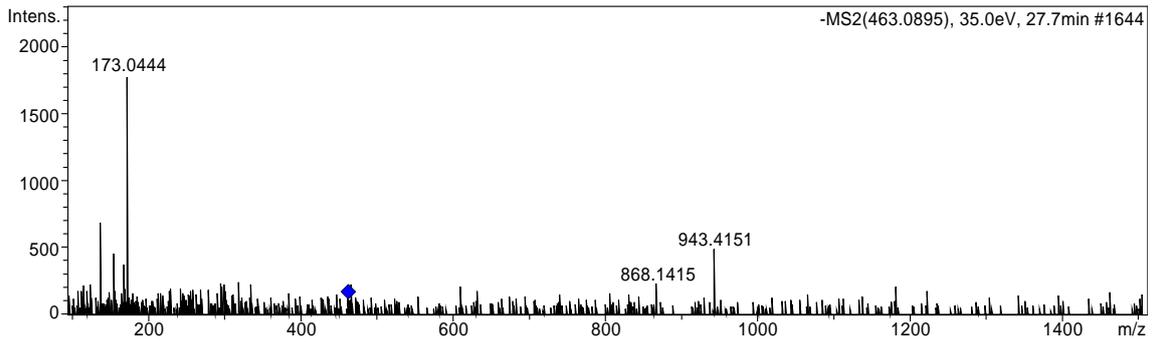
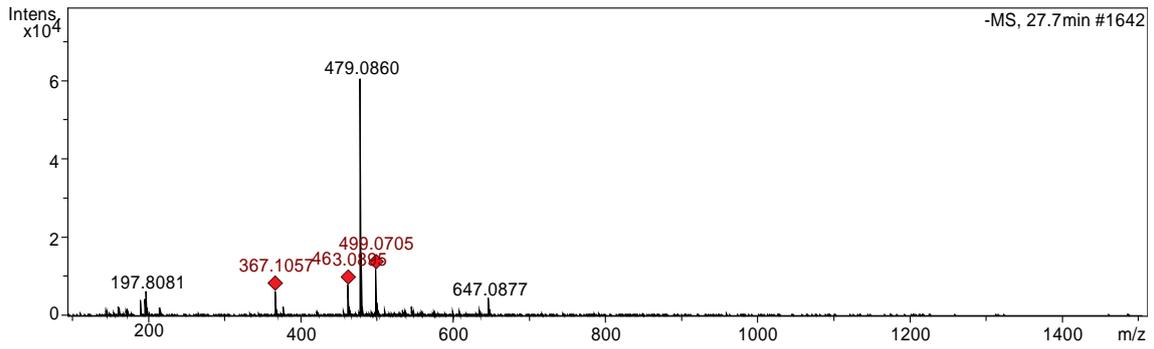
Ácido 2,3-Dihidroxi-6-(alfa-L-ramnopiranosiloxi)benzoic 2-(beta-D-glucopiranosiloxi)benzil ester



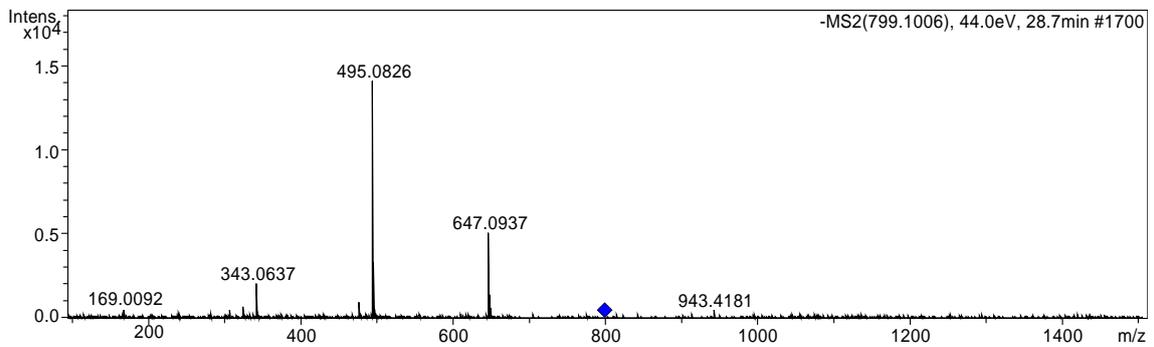
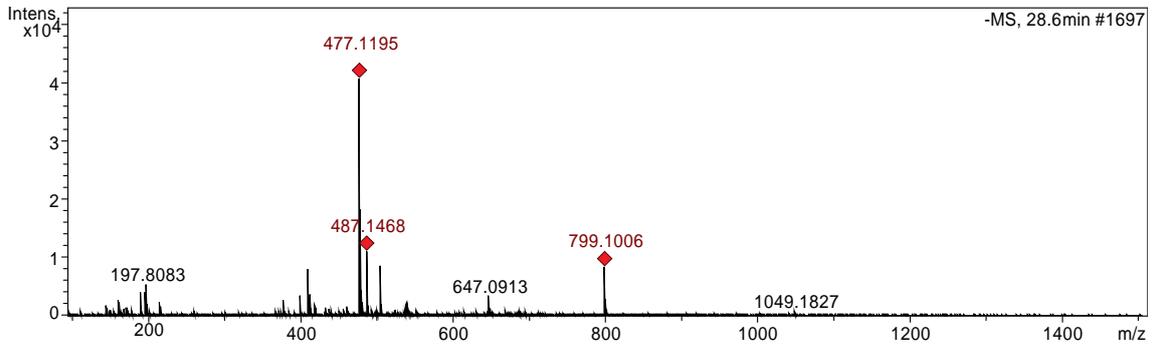
,3-bis[(3,4-dihidroxi benzoil)oxi]propil 3,4-dihidroxi benzoato



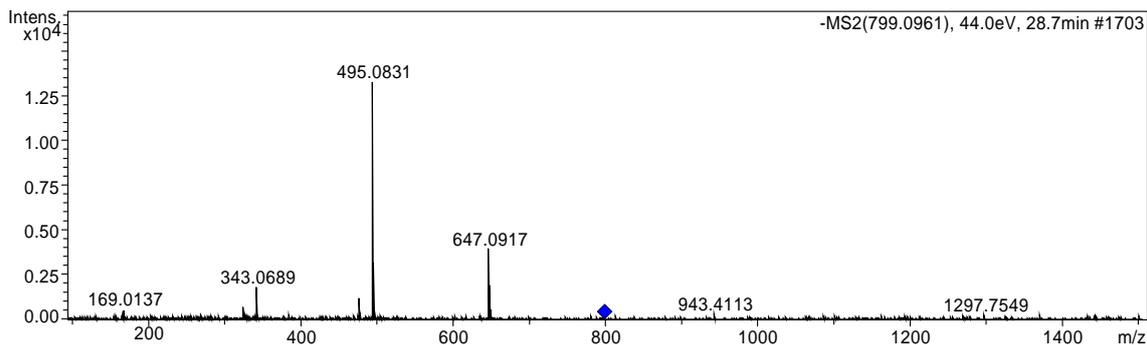
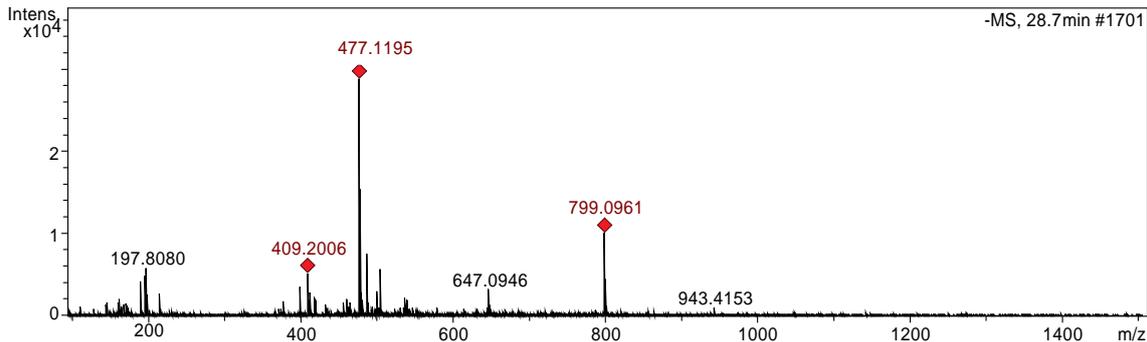
### Quercetina 5-O-glicosídeo



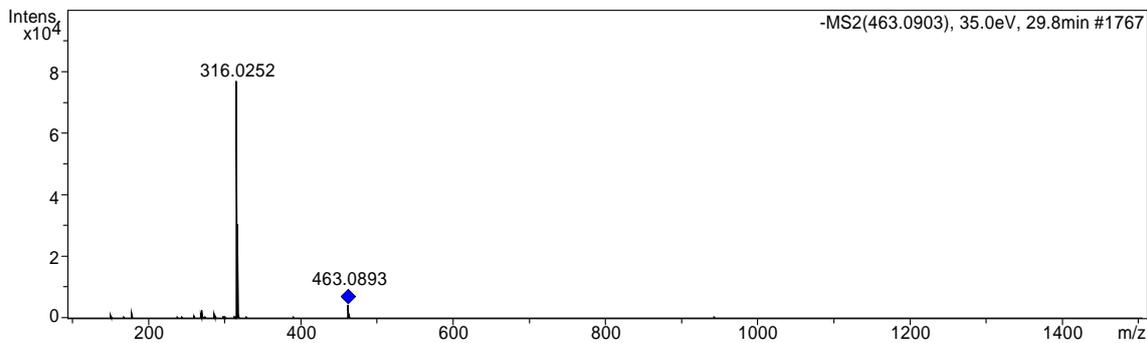
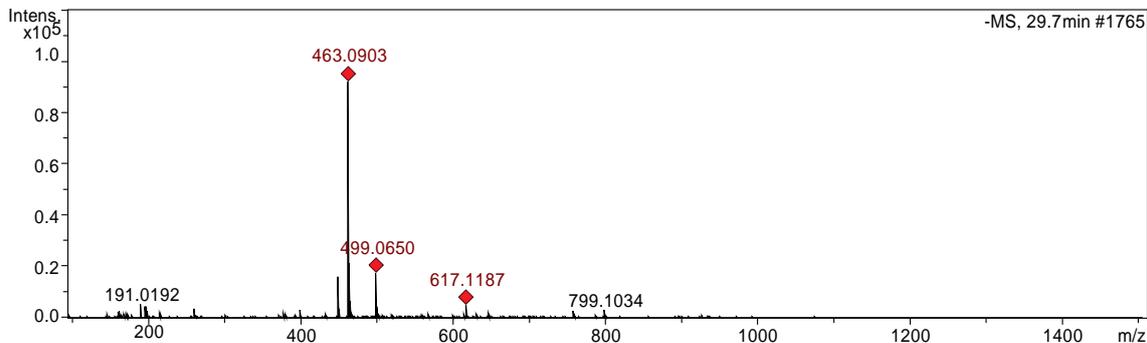
### Ácido 3,4,5,5-tetra-galoilquínico



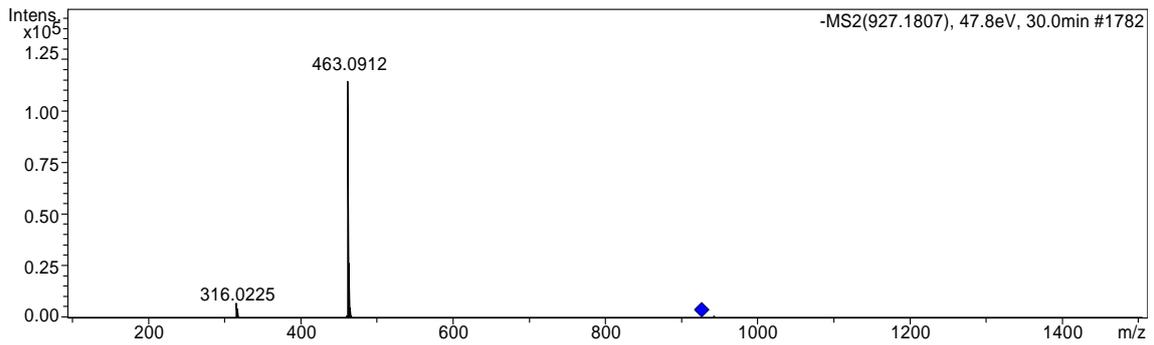
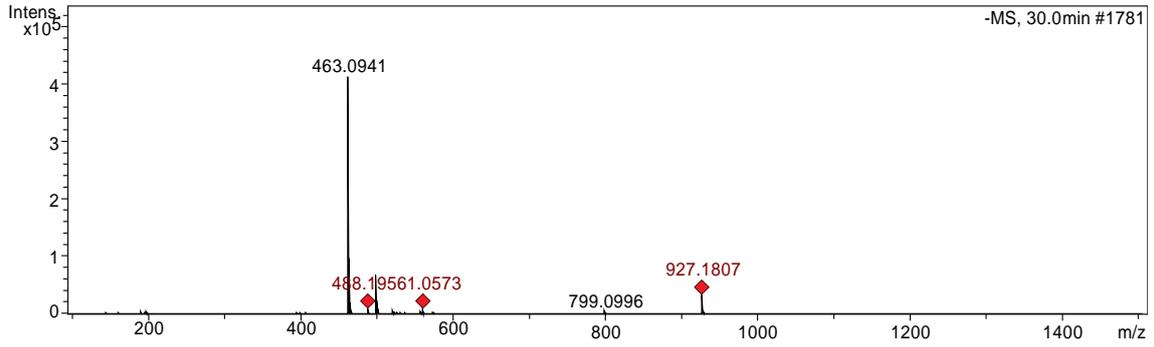
### Ácido 3,5,4,4-tetra-galoilquínico



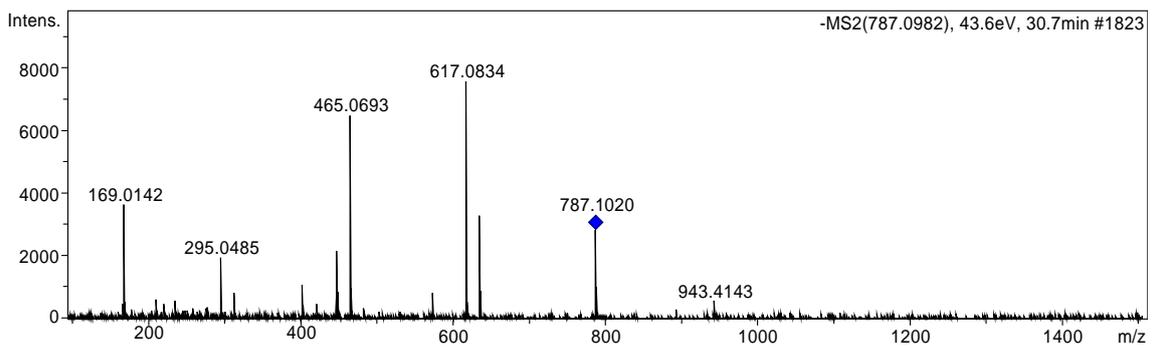
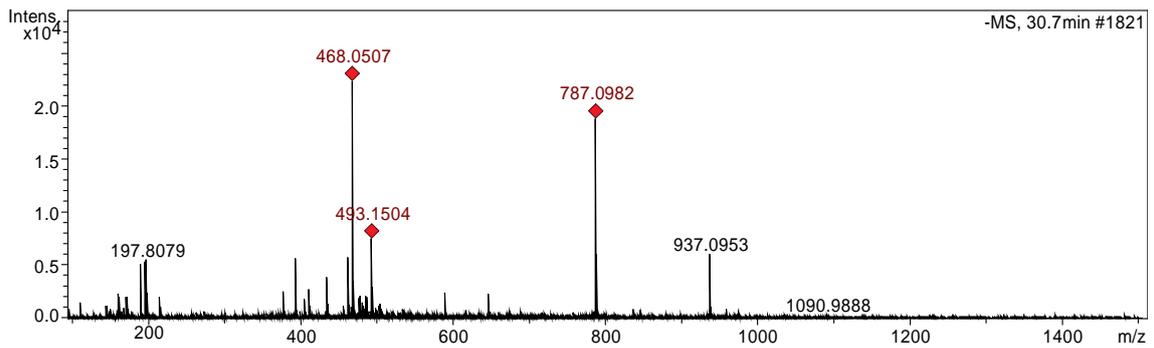
### Miricetina-3-O-ramnosídeo



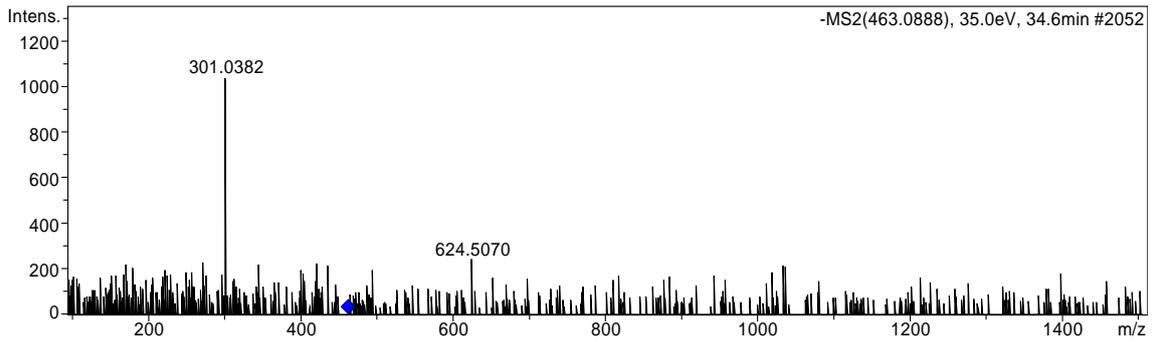
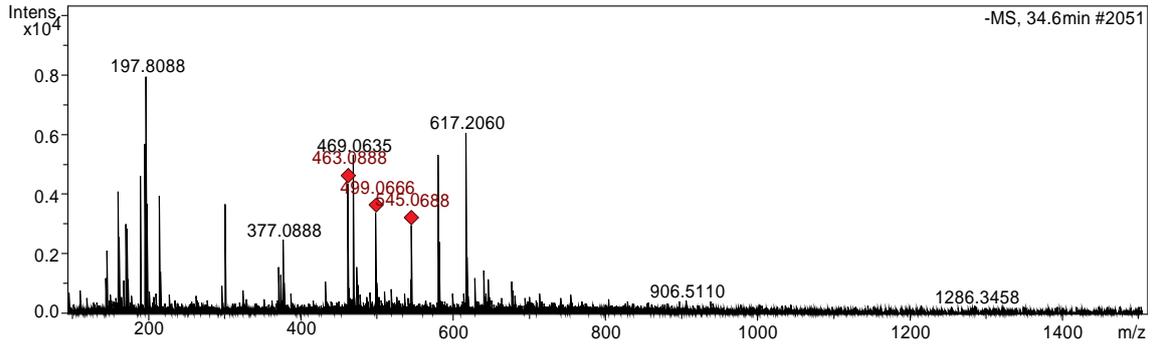
## Oolonghomobisflavana A



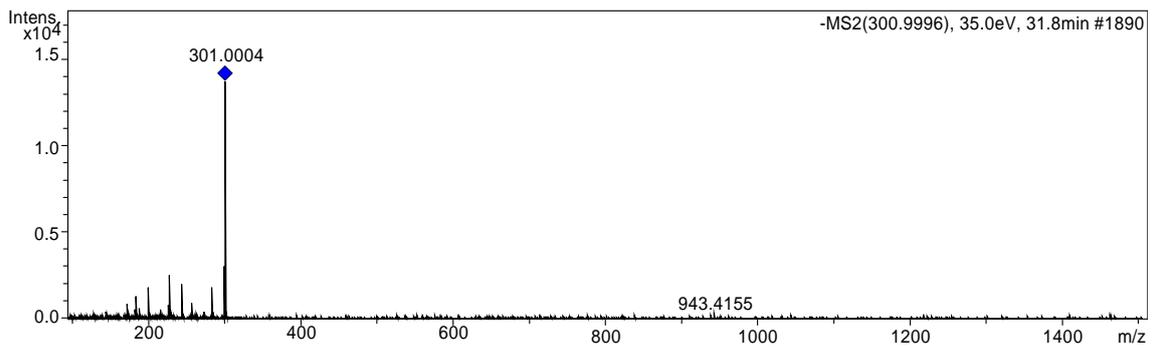
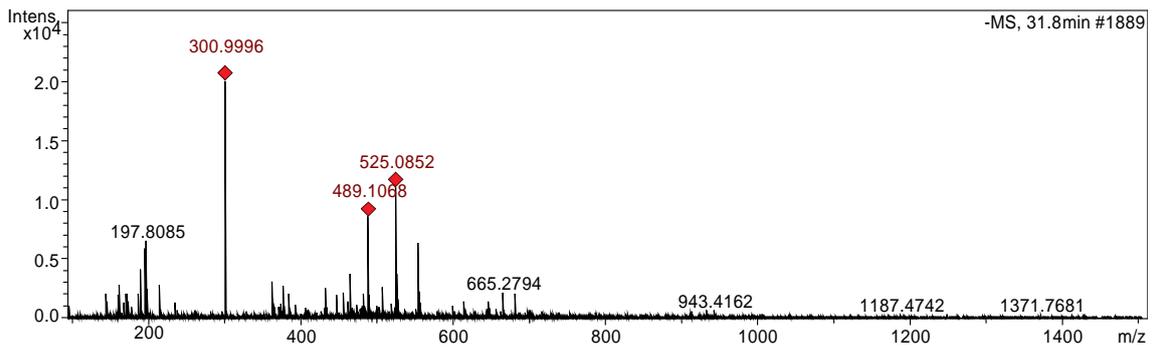
## 1,2,4,6-Tetra-galoil-glicosídeo



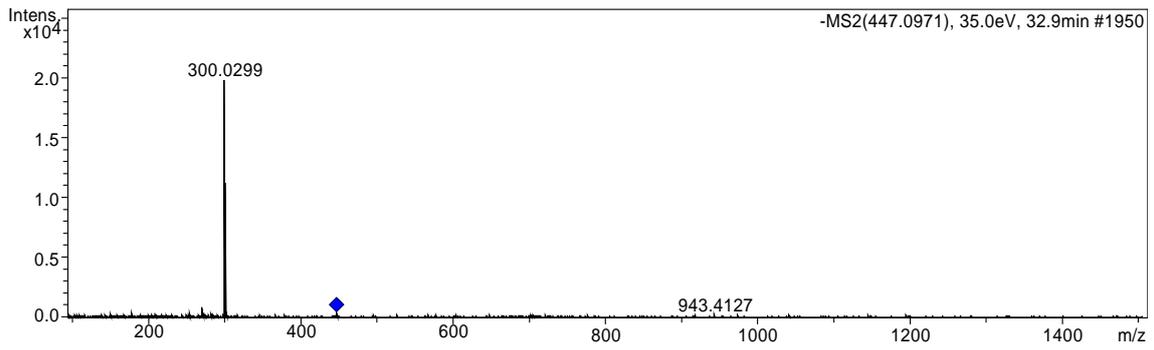
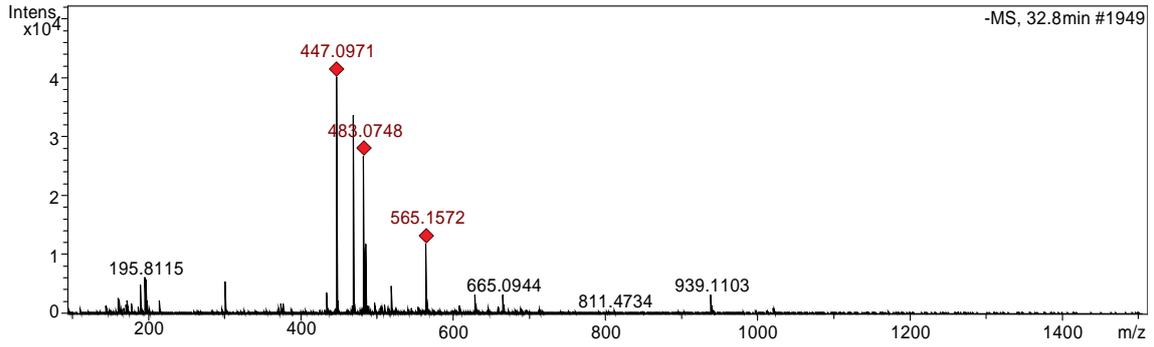
## Quercetina 3-O-glicosídeo



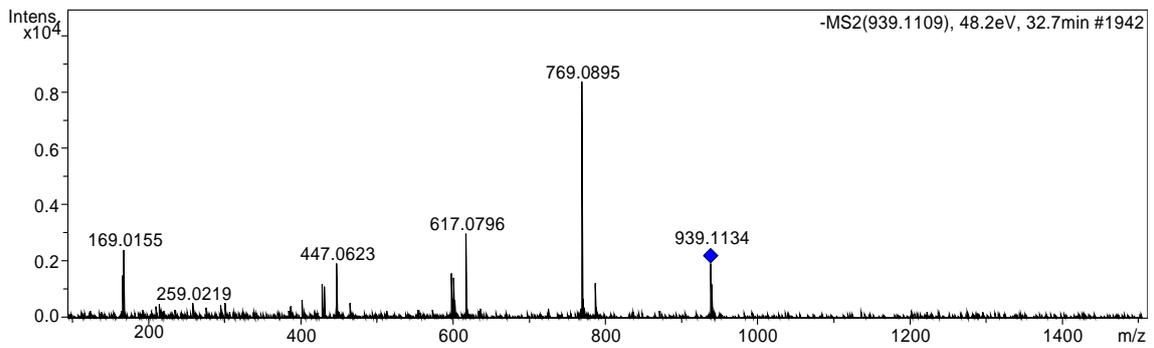
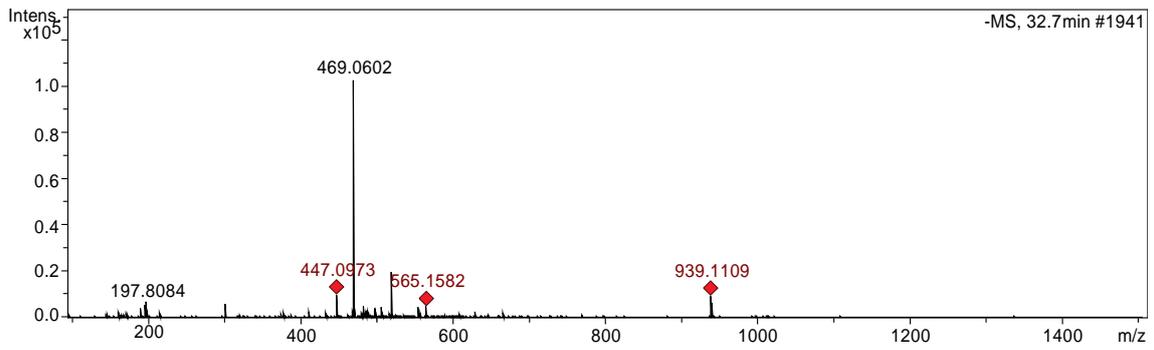
## Ácido eláxico



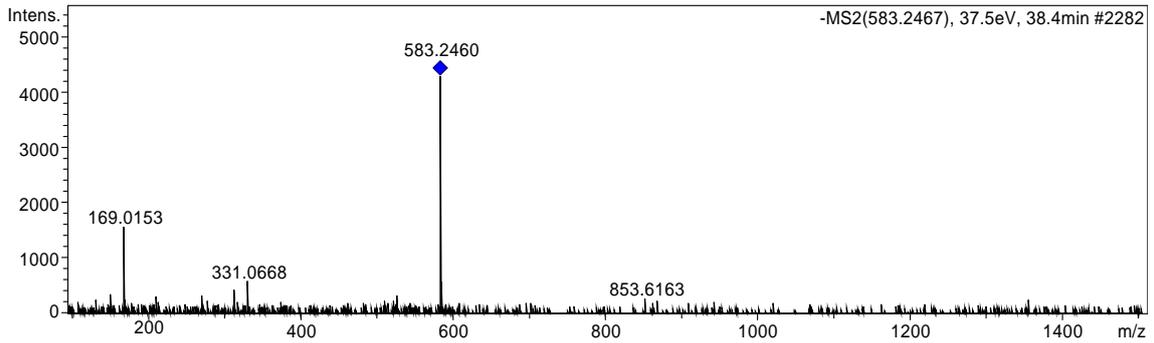
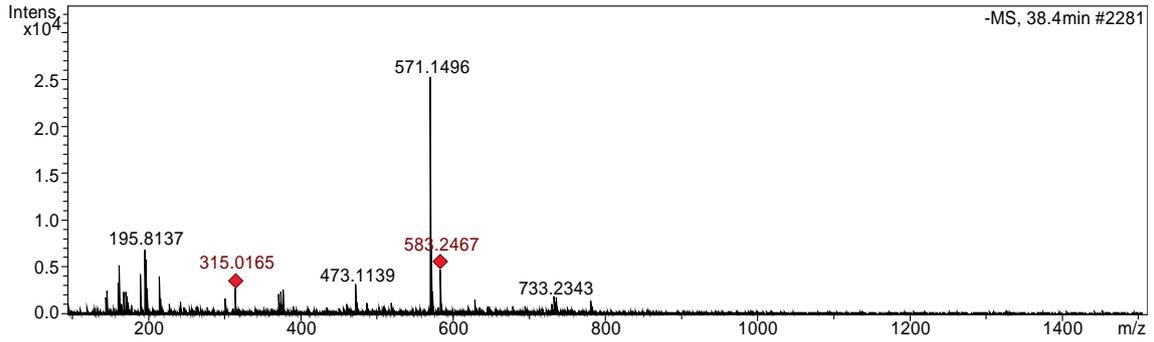
### Quercetina 3-O-ramnosídeo



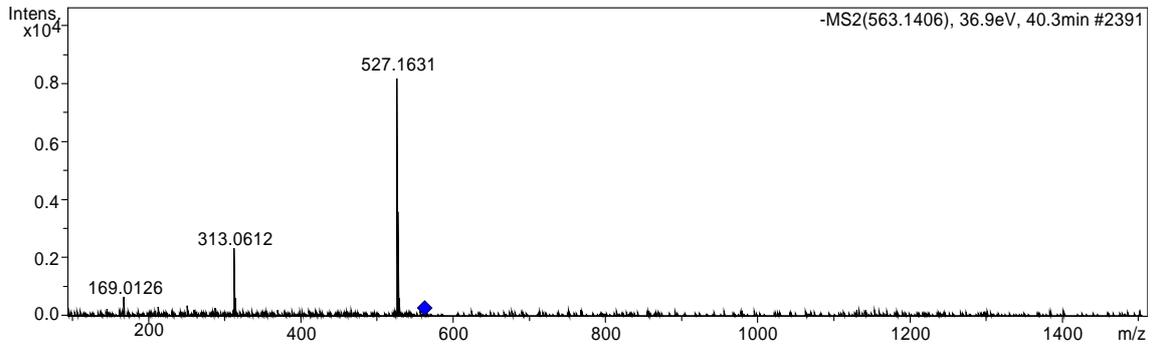
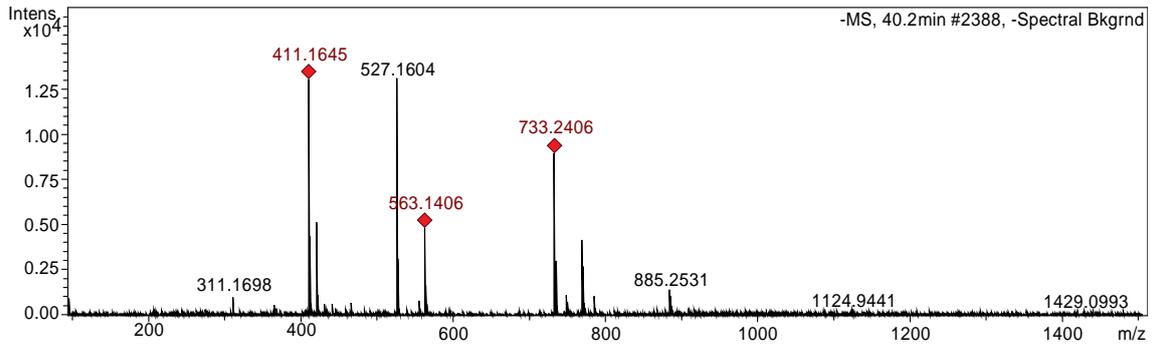
### 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-glicosídeo



Não identificado

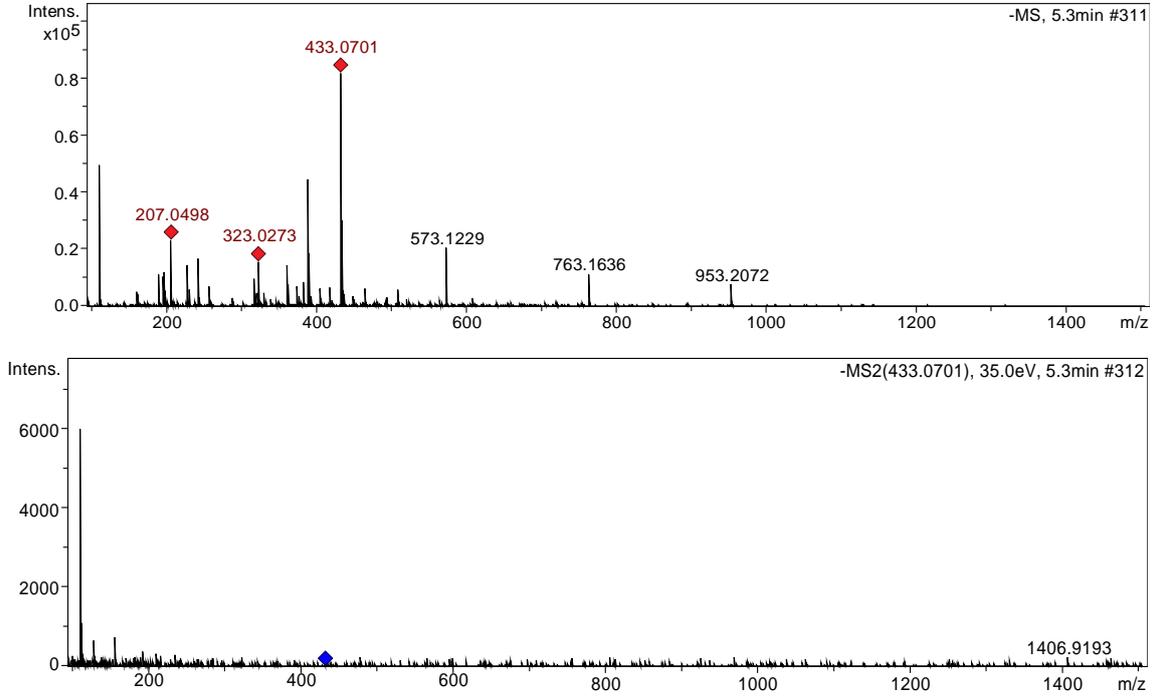


Kaempferol 3-(2''-(E)-*p*-coumaroil-alfa-L-arabinofuranosídeo)

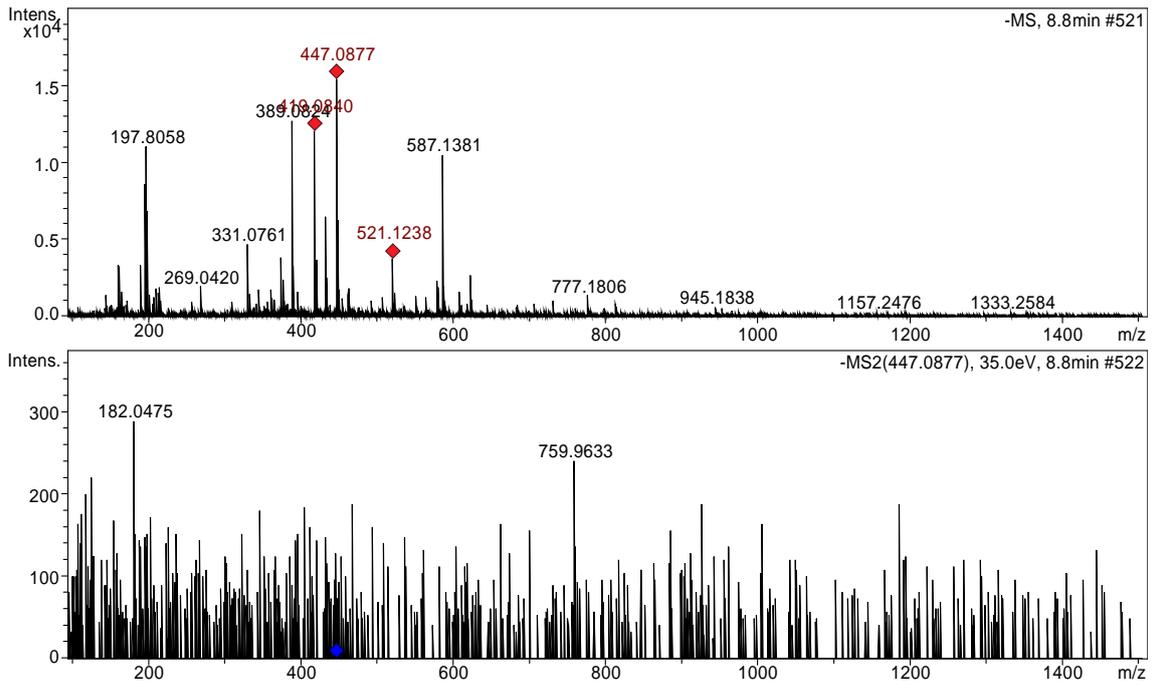


# Espectros de massas da fração FNE do araçá-piranga

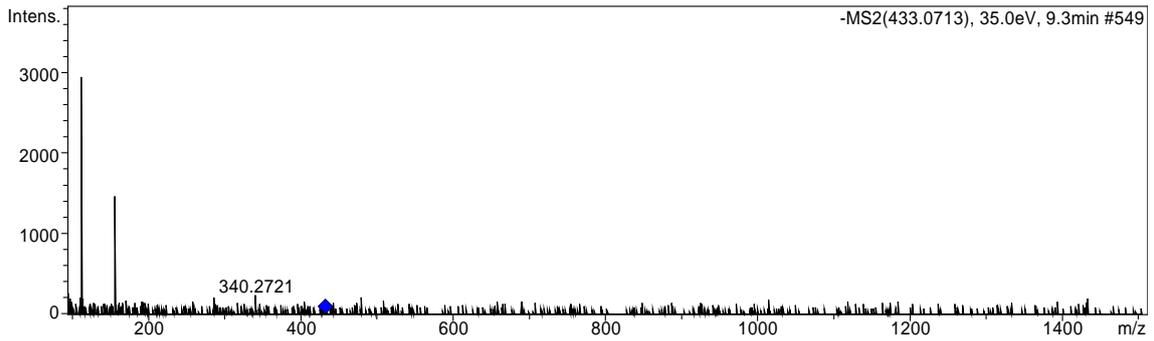
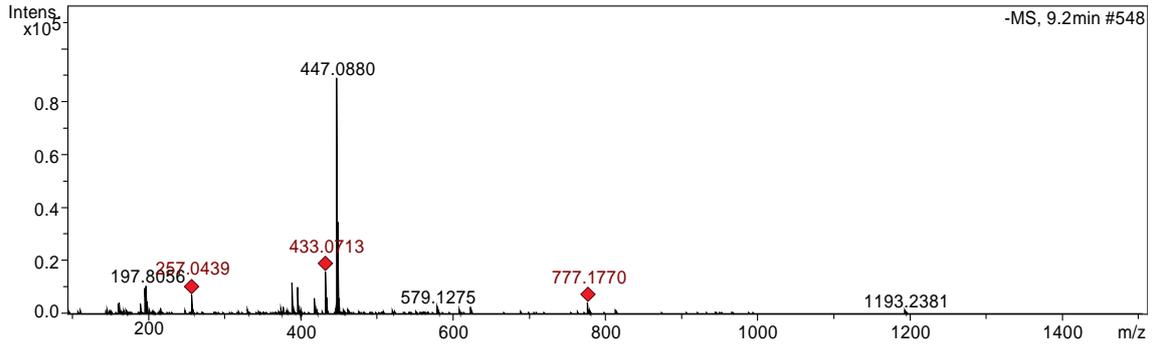
## 8-hidroxluteolina 7-xilosídeo



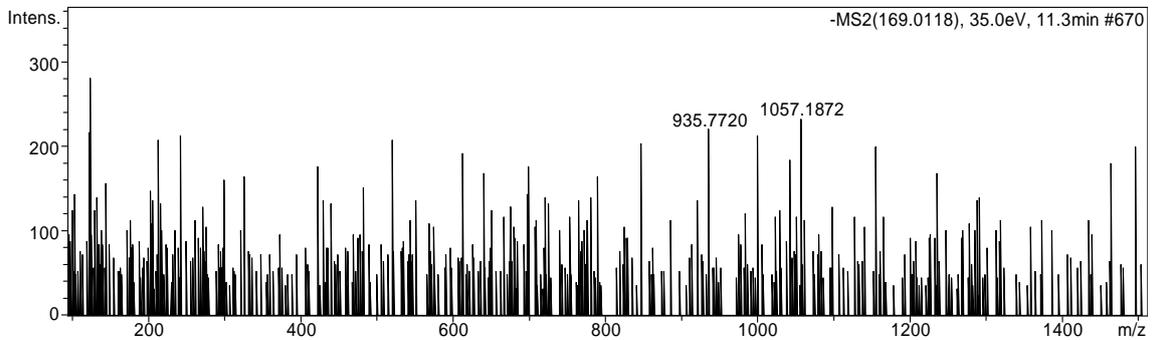
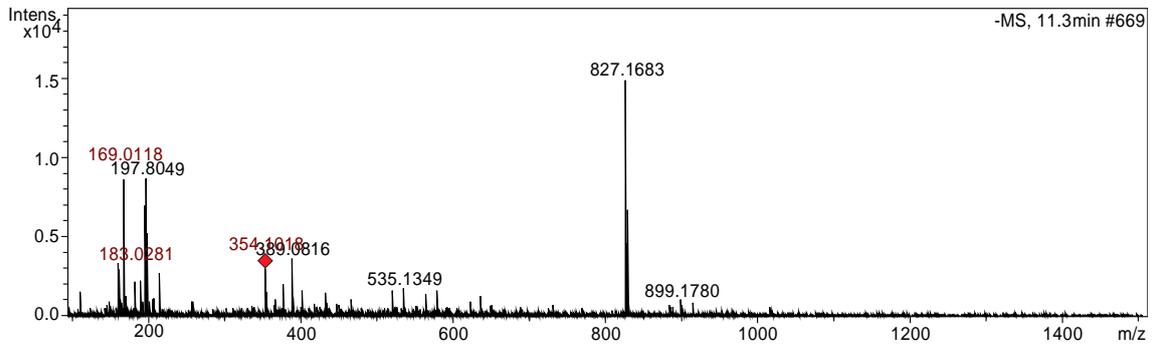
## Luteolina 8-O-glicosídeo



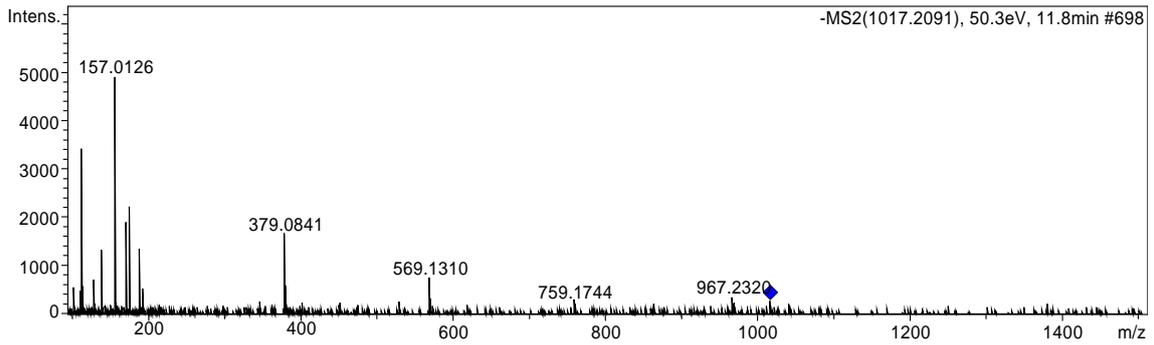
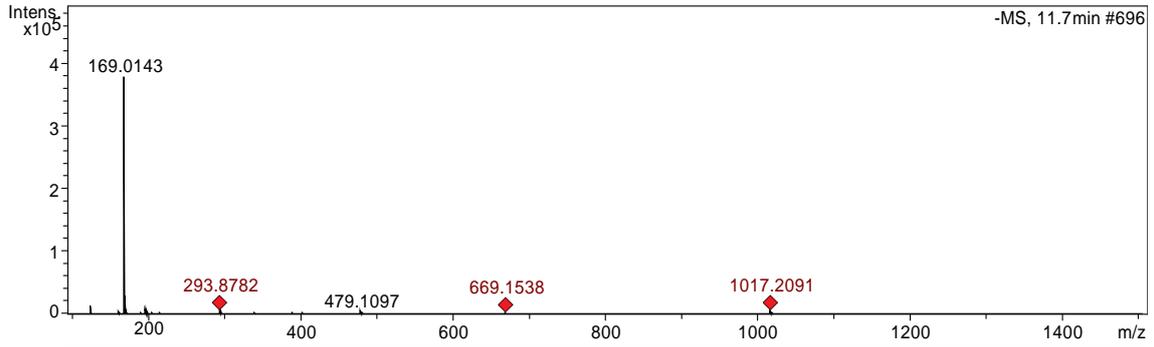
## Herbacetina 8-alfa-L-arabinopiranosídeo



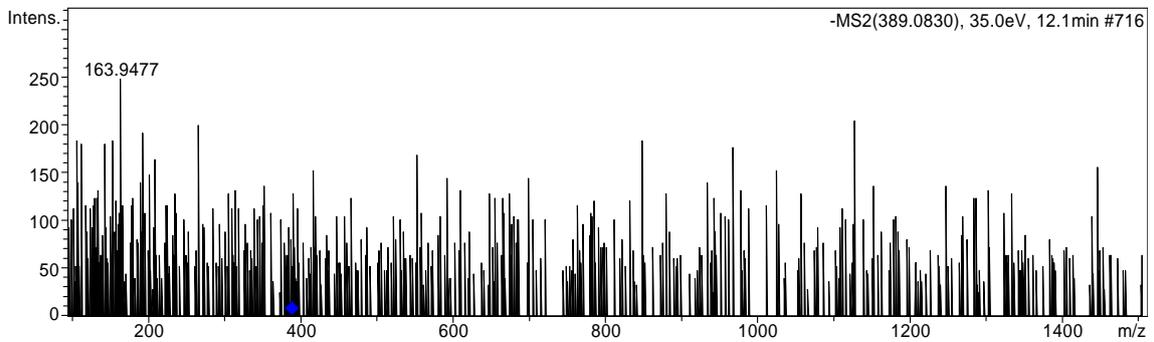
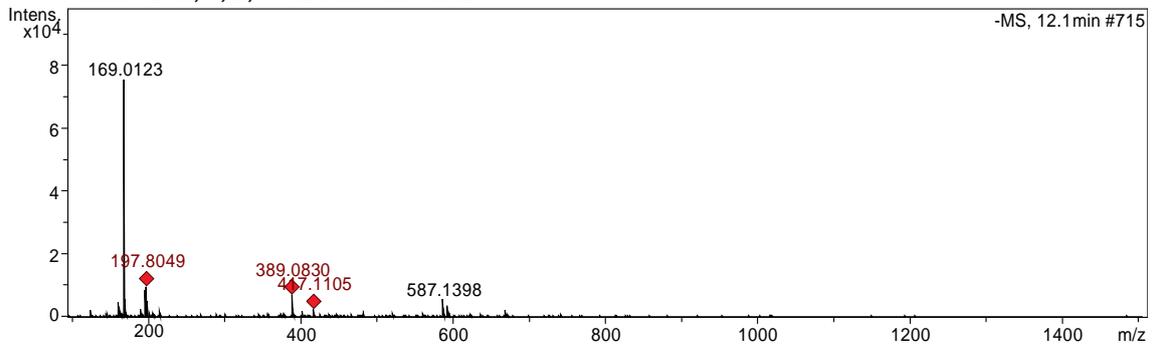
## Ácido gálico



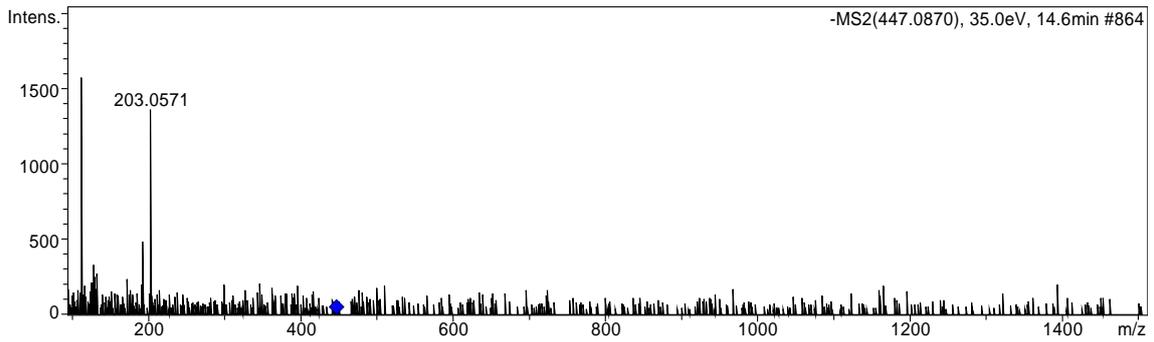
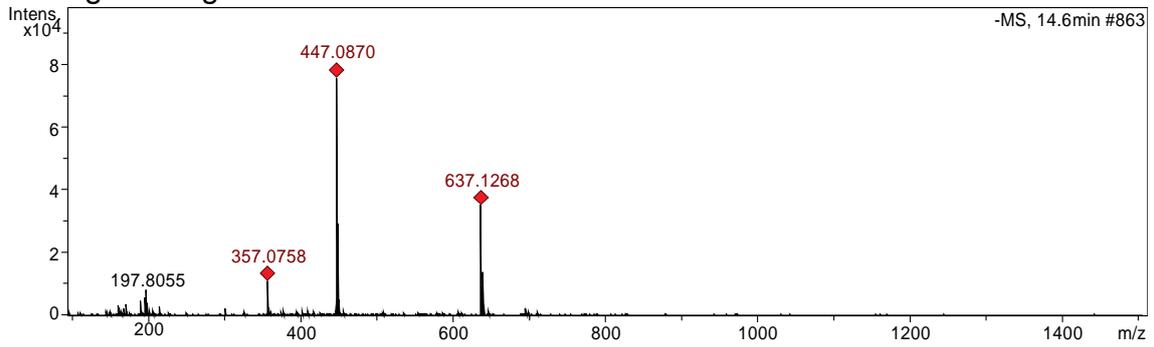
### Epicatequina-galoillicatequina-catequina



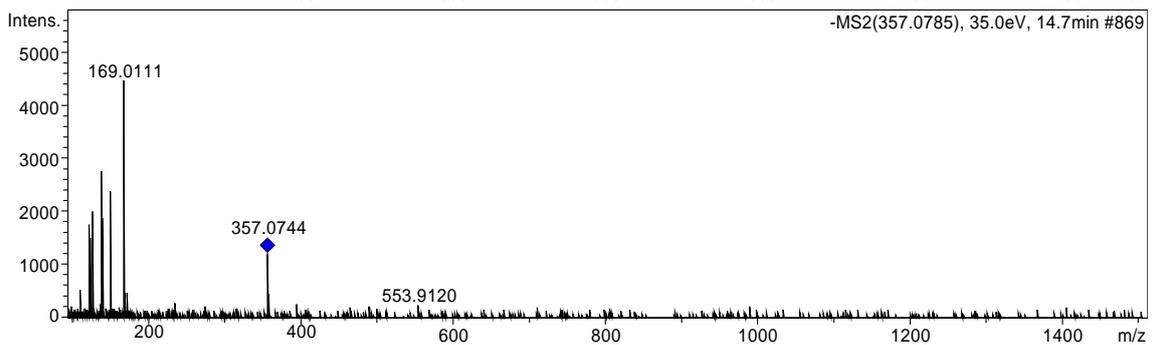
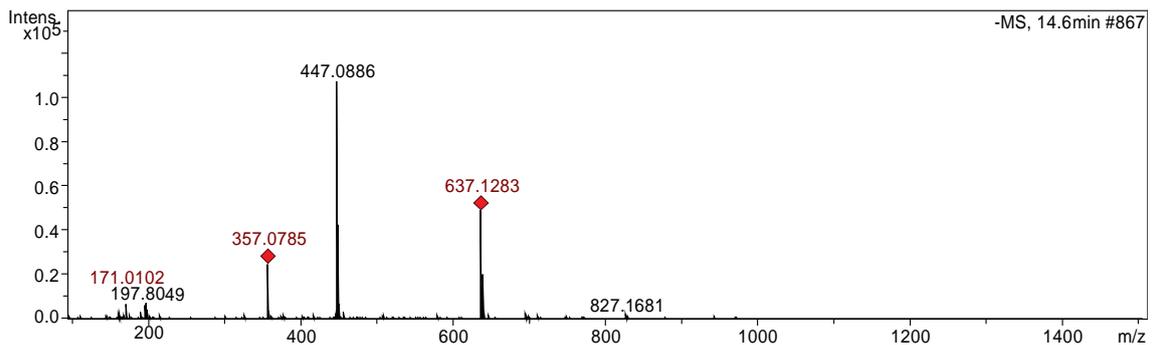
### Hibicetina 3,7,8,4'-tetrametil éter



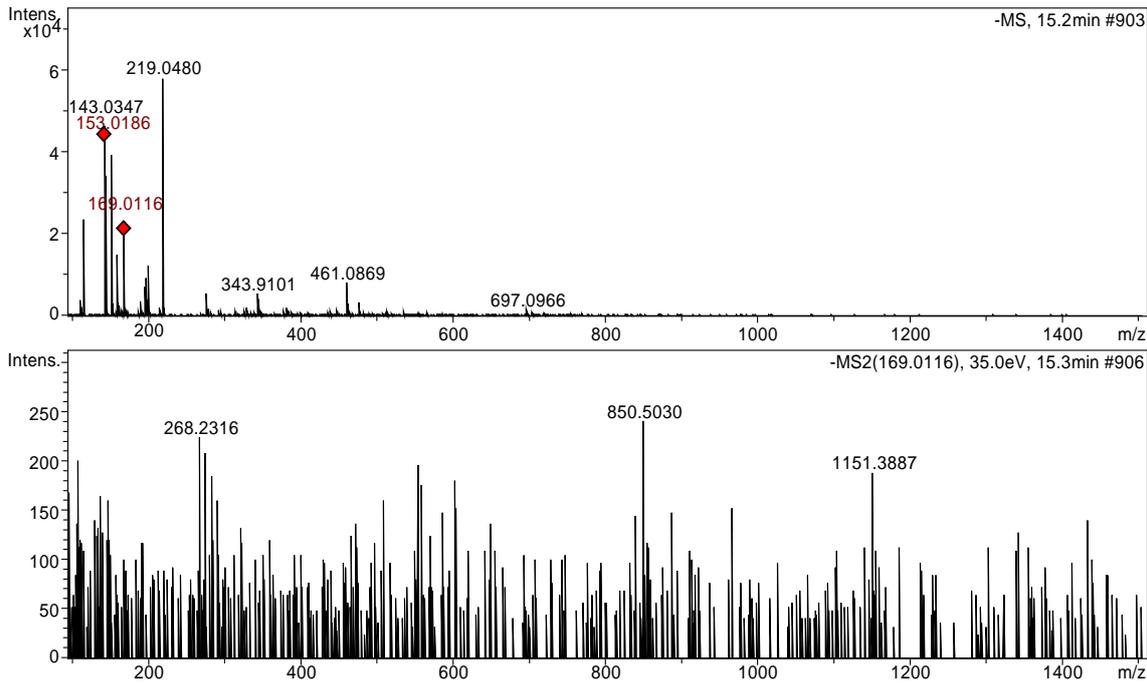
### Naringenin 5-glucorinida



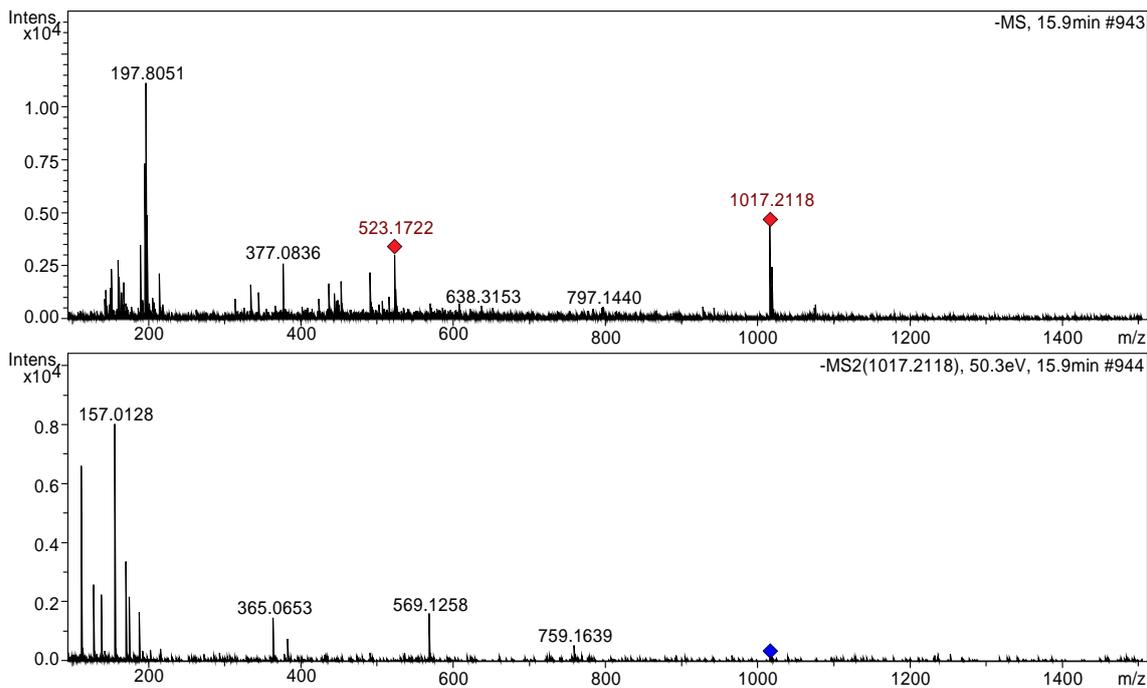
### Ácido 3,4-Dihidrobenzoico 3-O-glucuronida-dimetil-diester



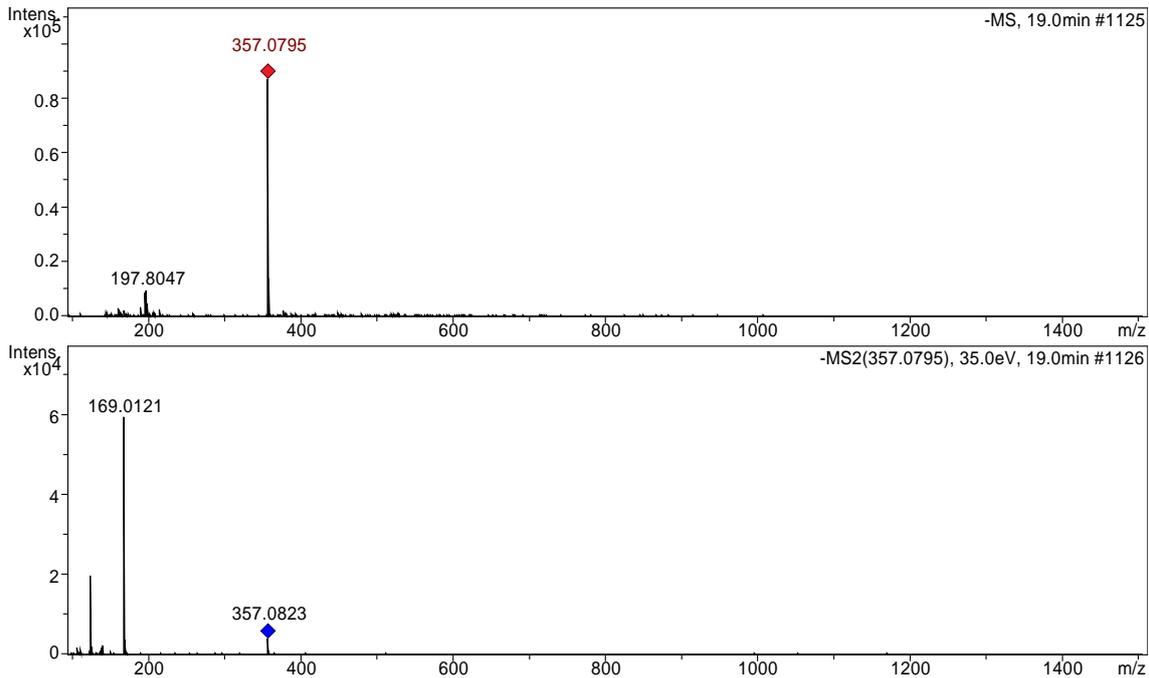
### Ácido 2,3,5-trihidroxibenzóico



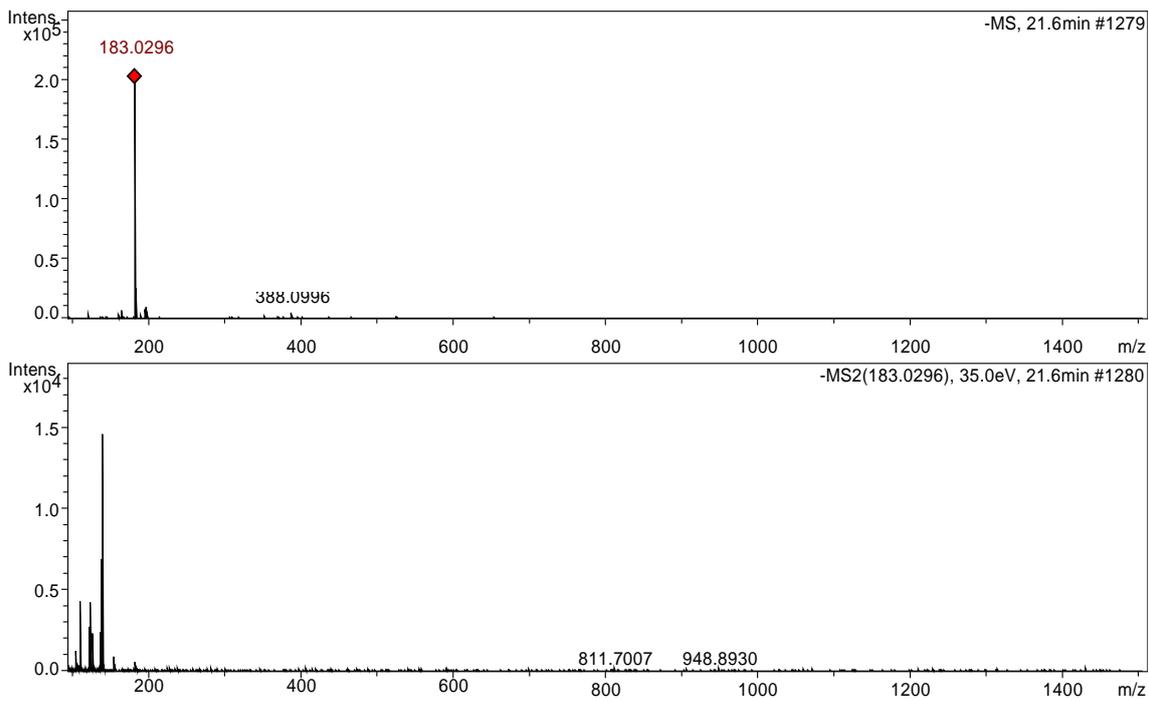
### Epicatequina-galoil-epicatequina –catequina



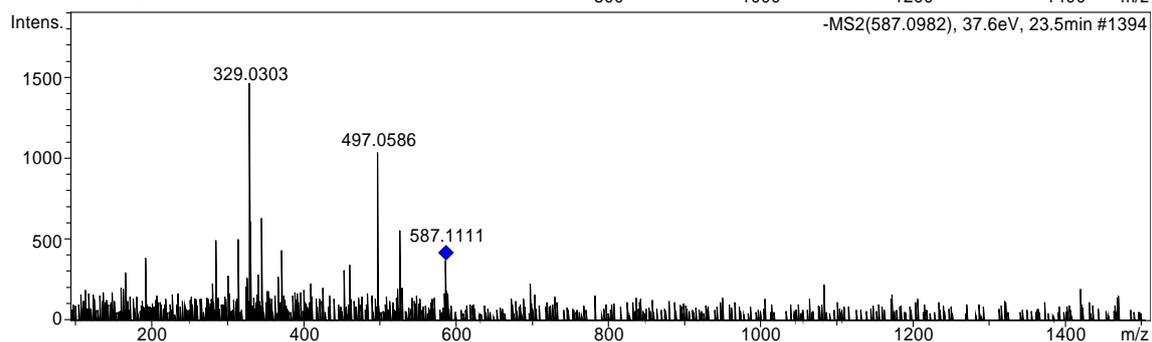
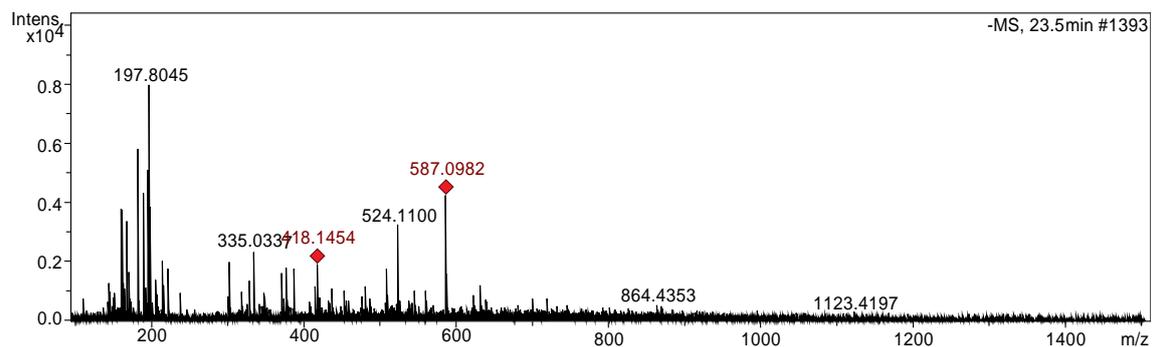
### Ácido dihidroxibenzóico 3-glucoronida



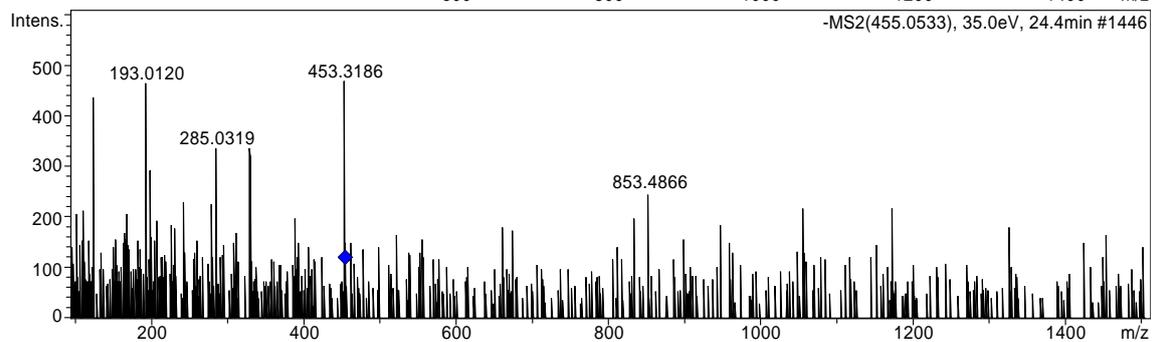
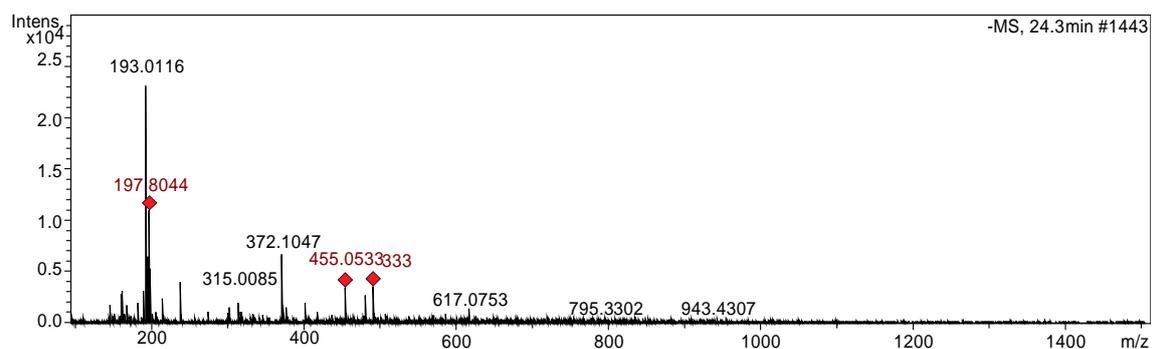
### Ácido 3-O-Metil-gálico



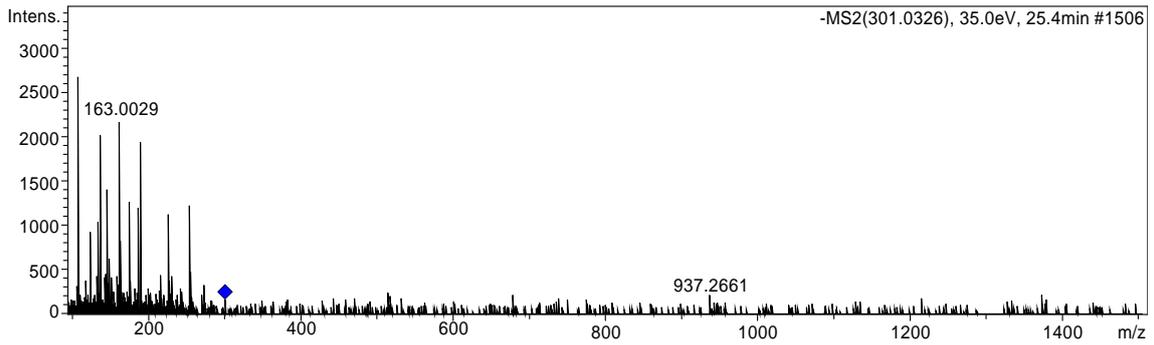
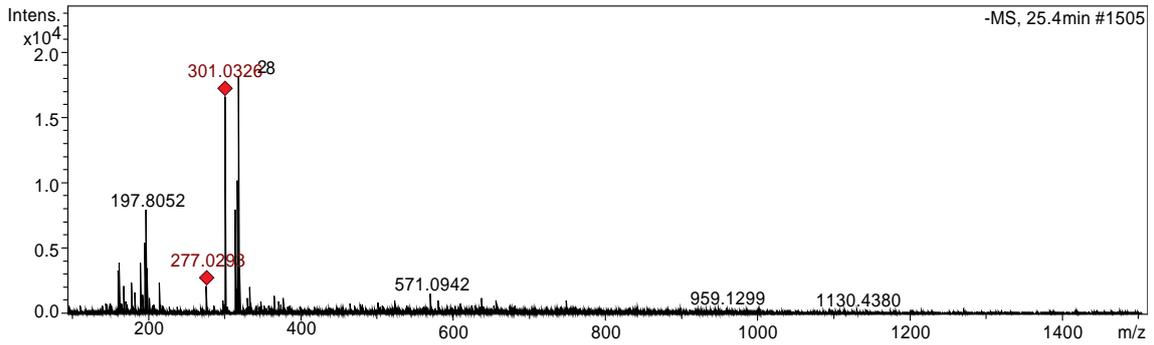
### 4',6'-O-(S)-hexahidroxi-difenil-salicina



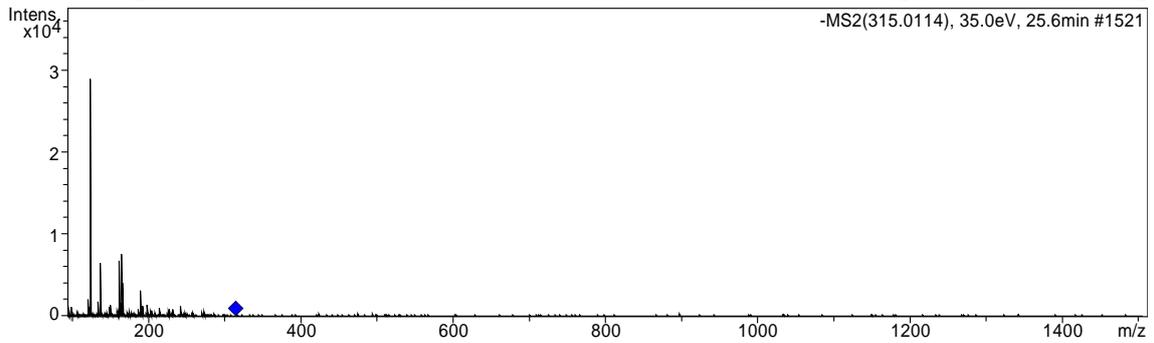
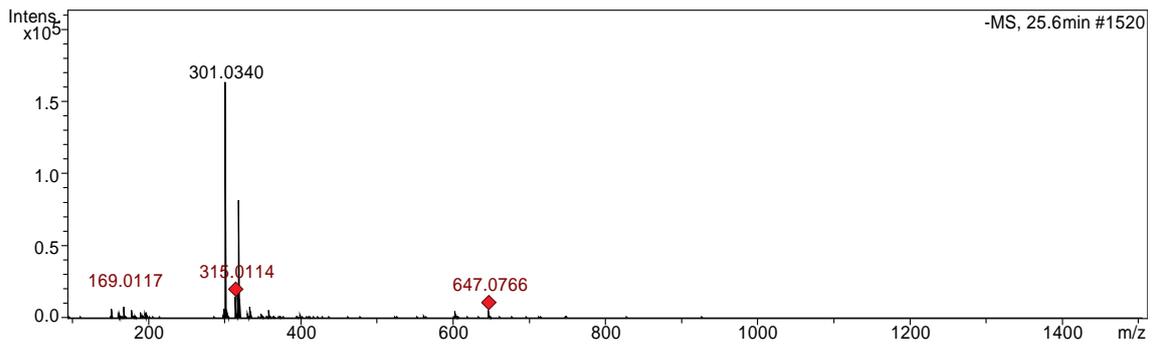
### 3-O-galoil-taxifolina



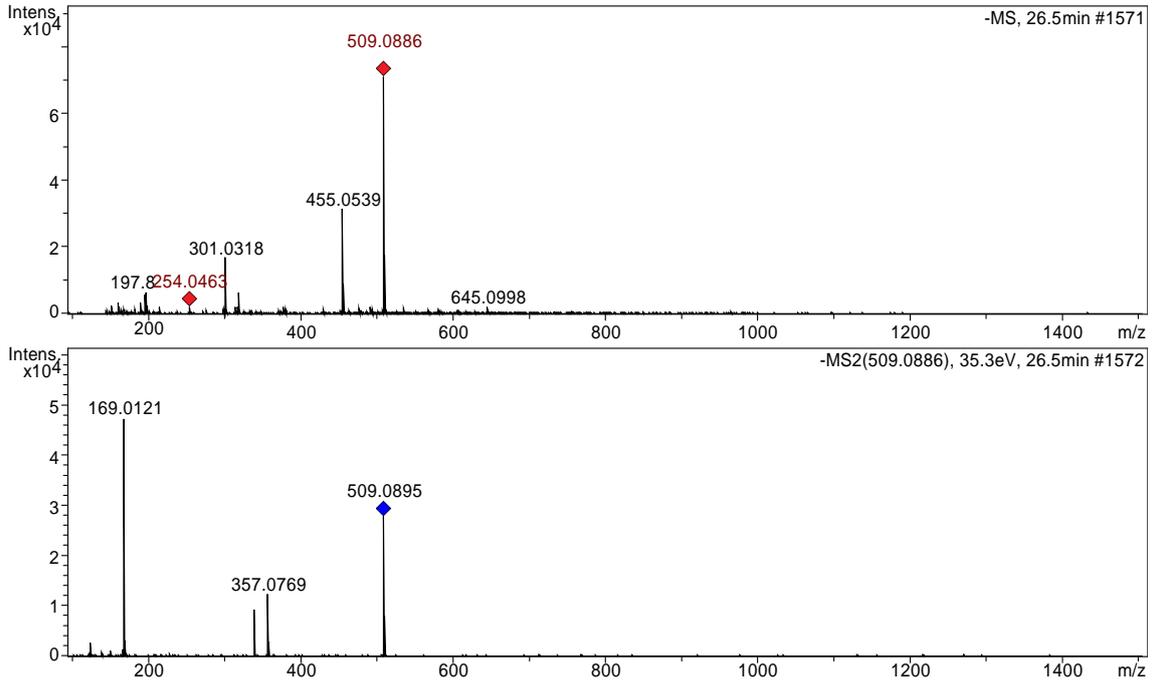
## Morina



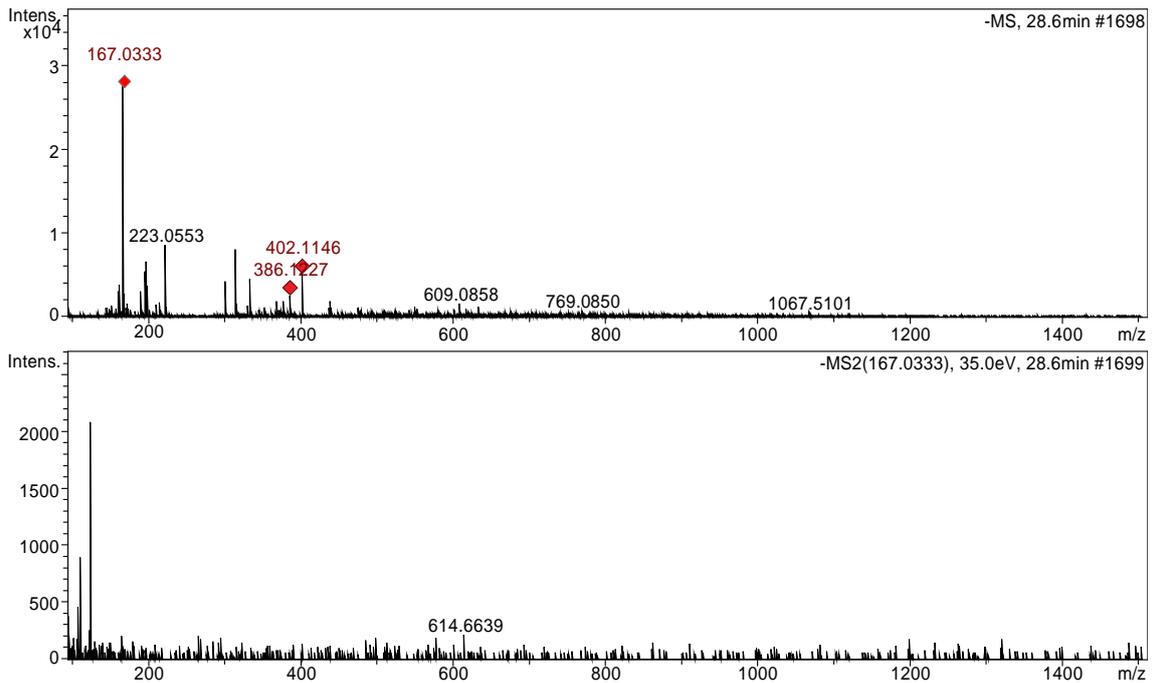
## Ácido 3-O-Metil elágico



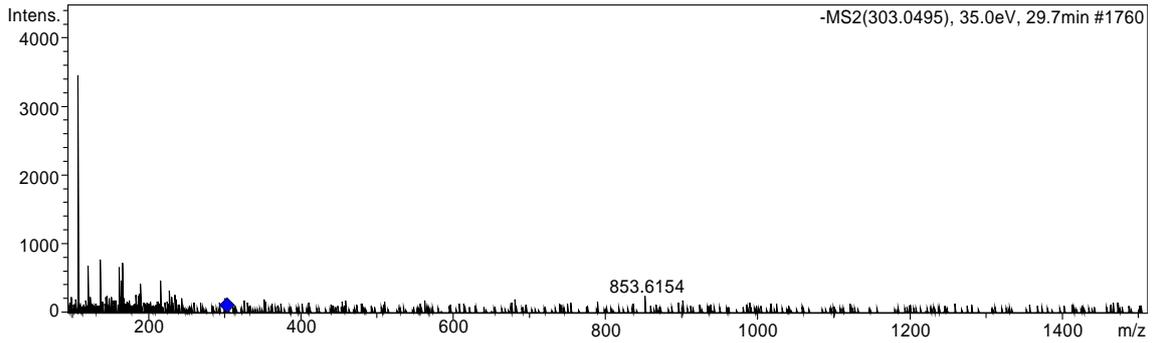
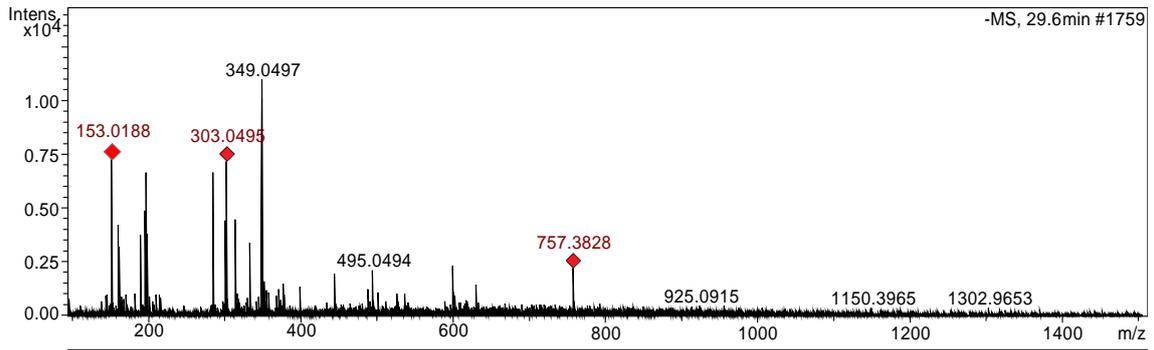
### 3-carboxil-plantagosídeo



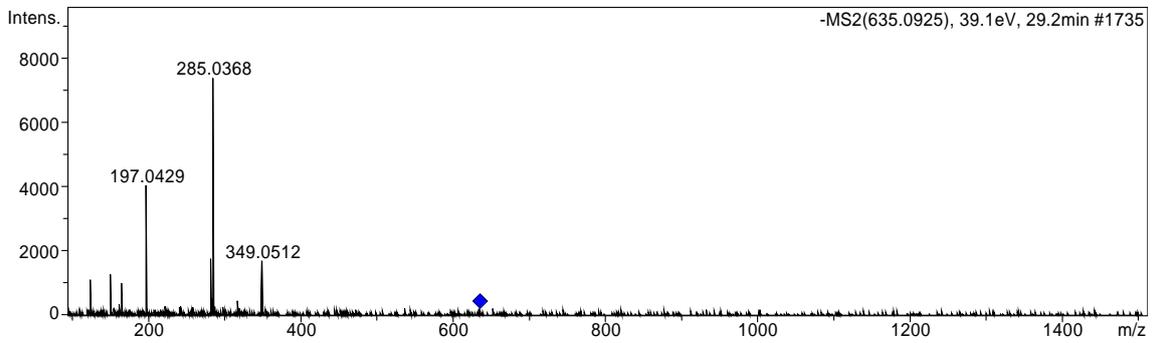
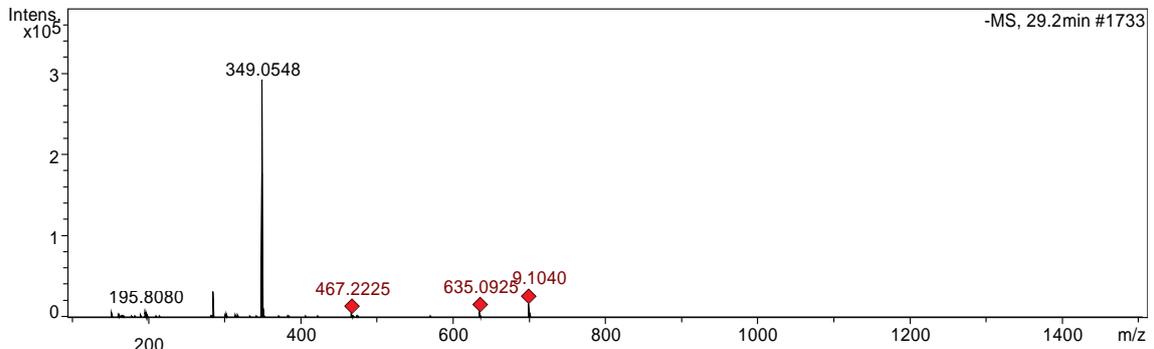
### Ácido Vanílico



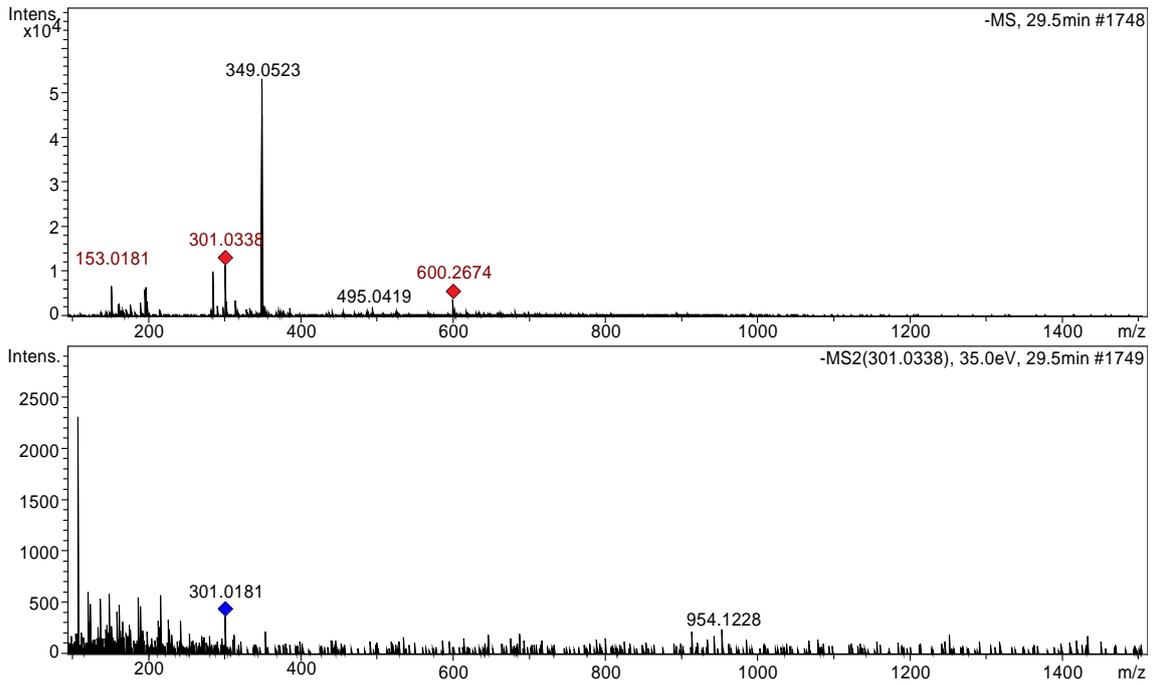
# Taxifolina



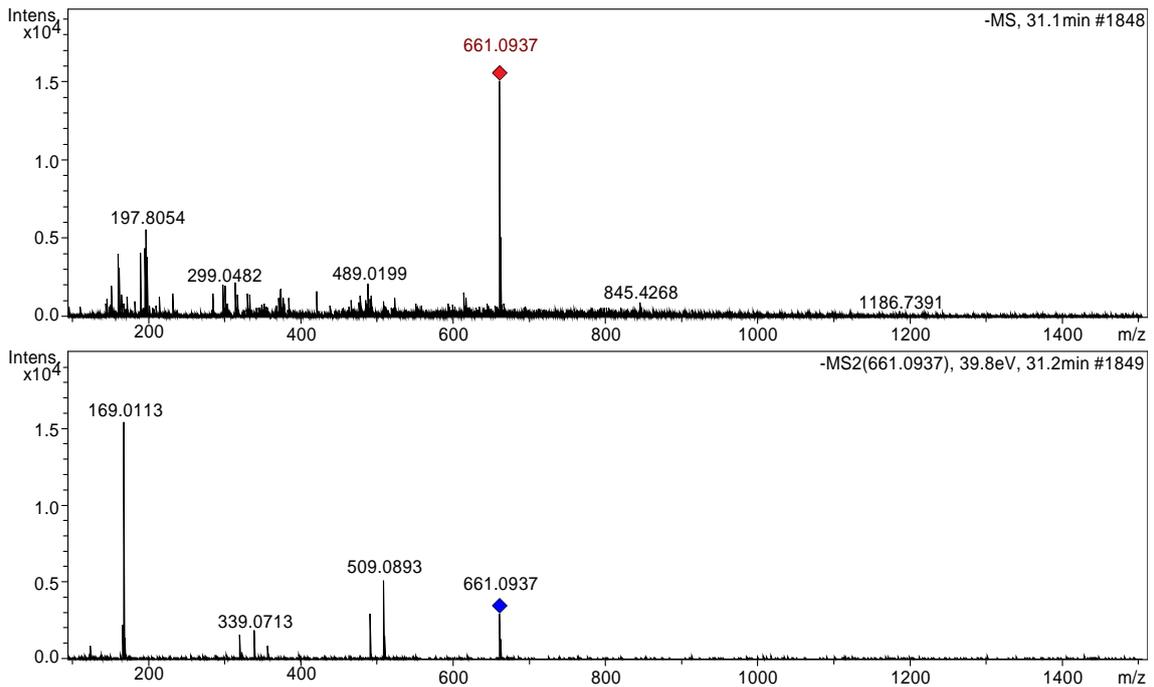
# 1,2,6-Tri-galoi-glicosídeo



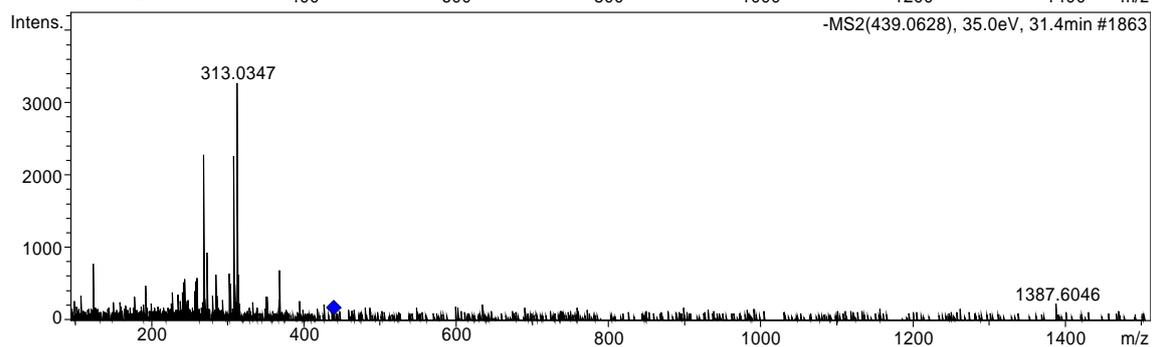
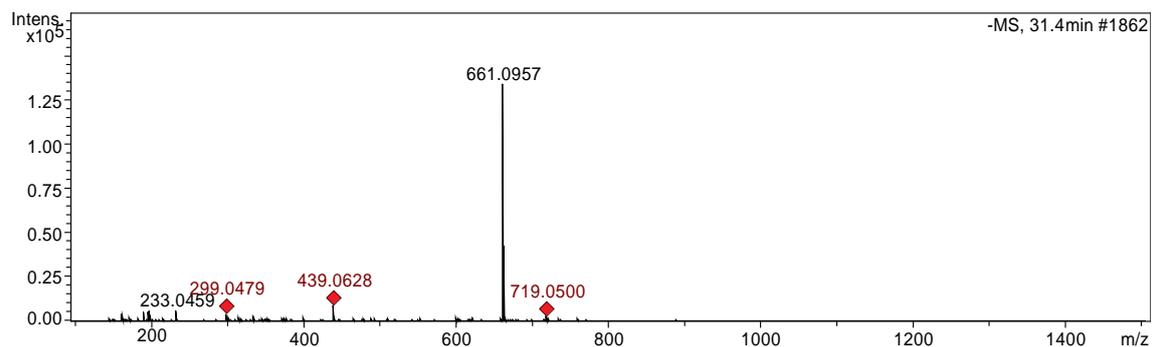
# Quercetina



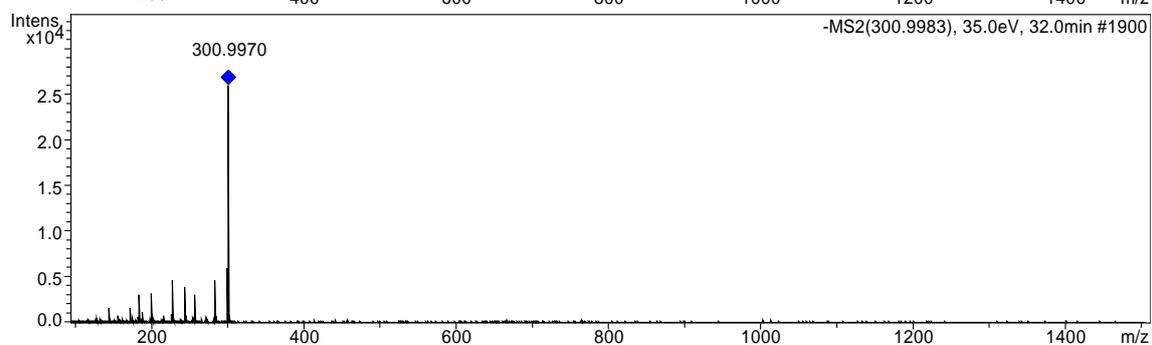
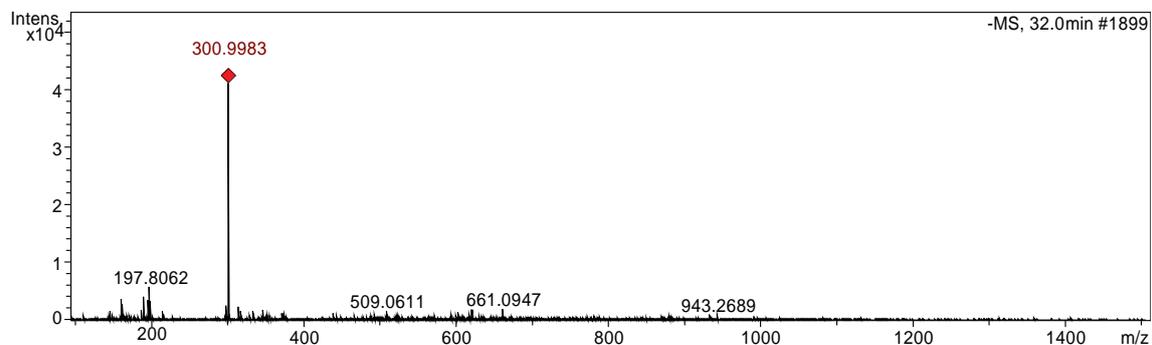
# Ácido metil 3,4,5-tri-galoilquínico



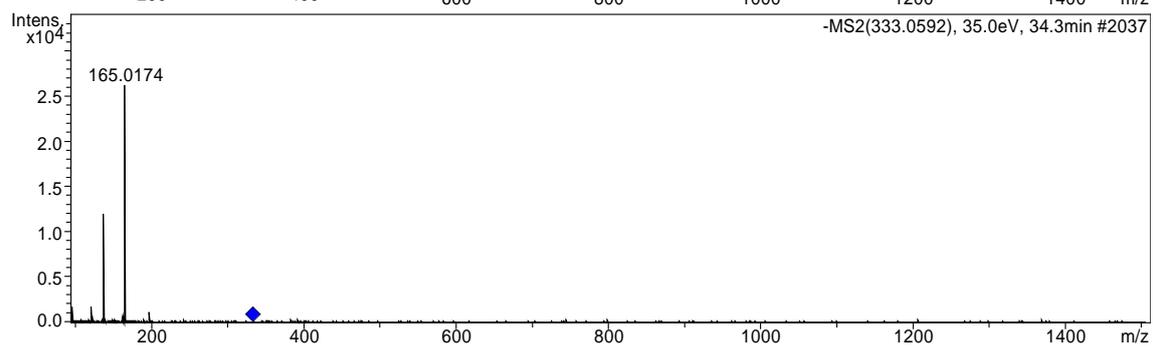
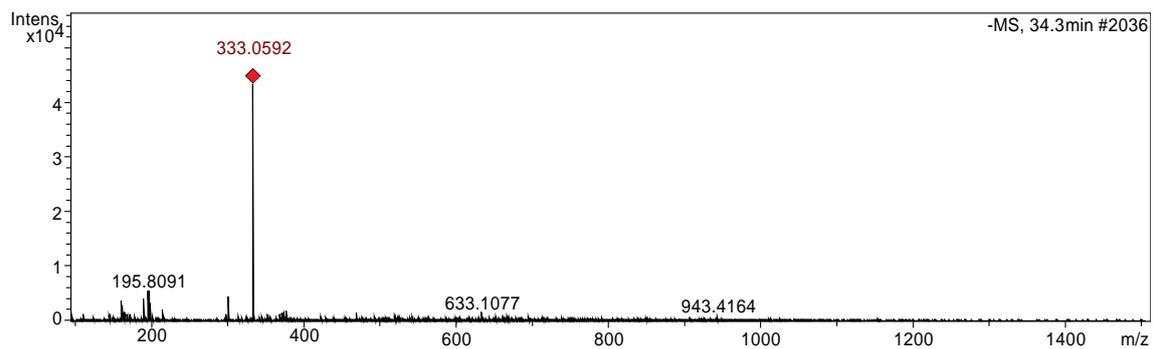
## Amurensisina



## Ácido Elágico

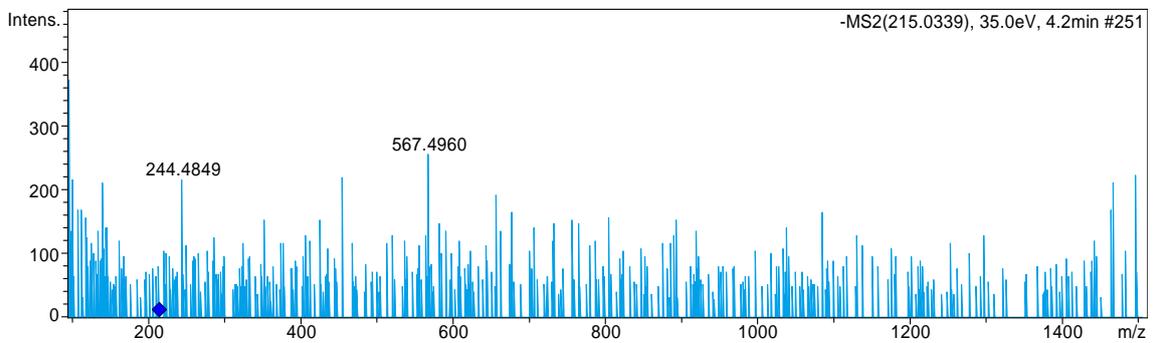
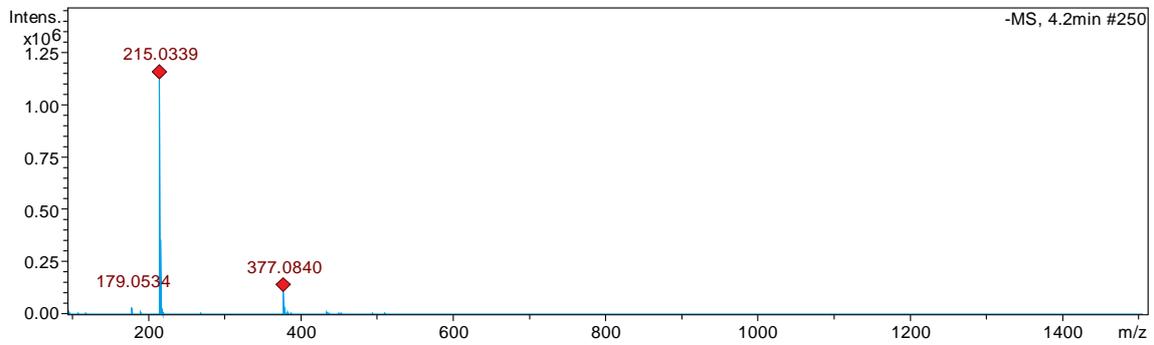


# Hovenetina

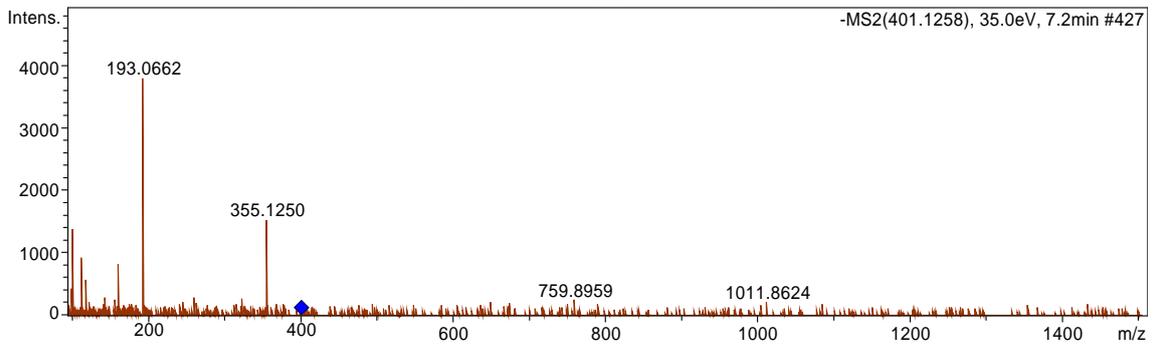
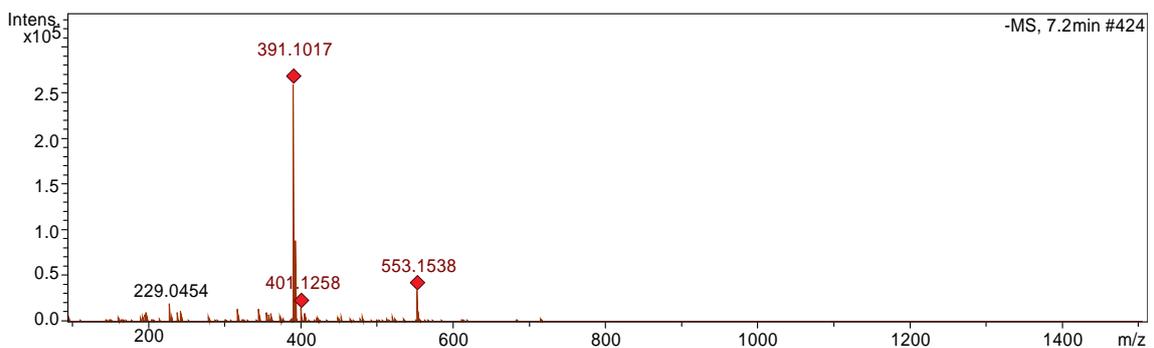


## Espectros de massas da fração FE da pixirica

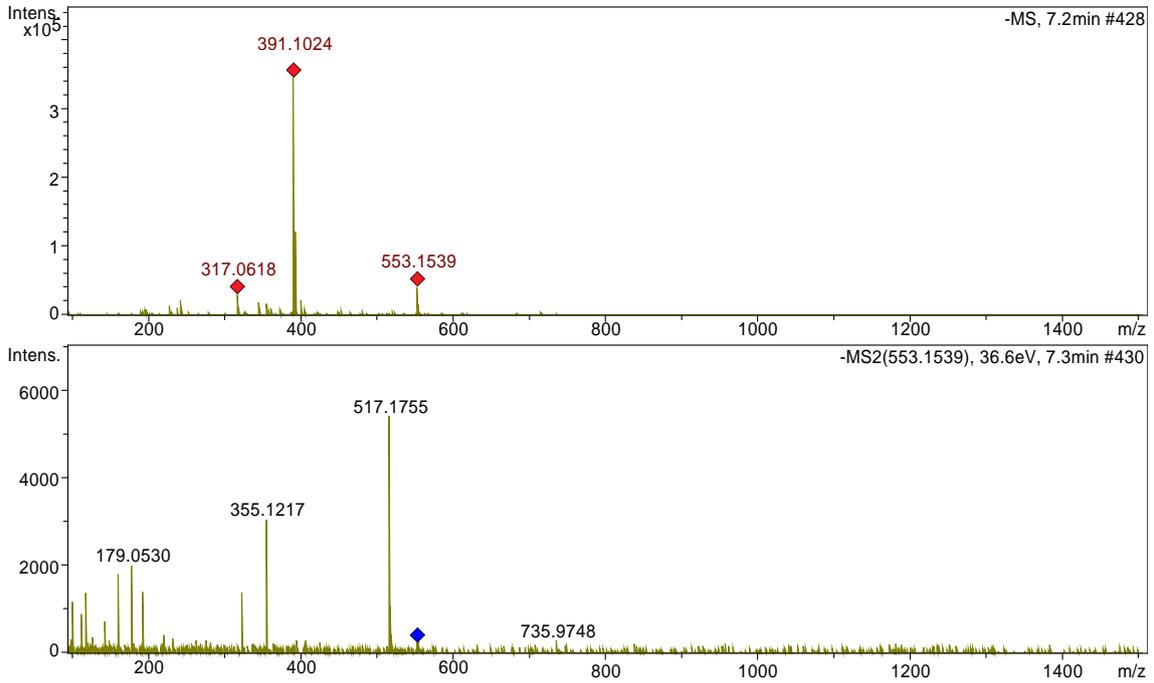
### Bergapteno



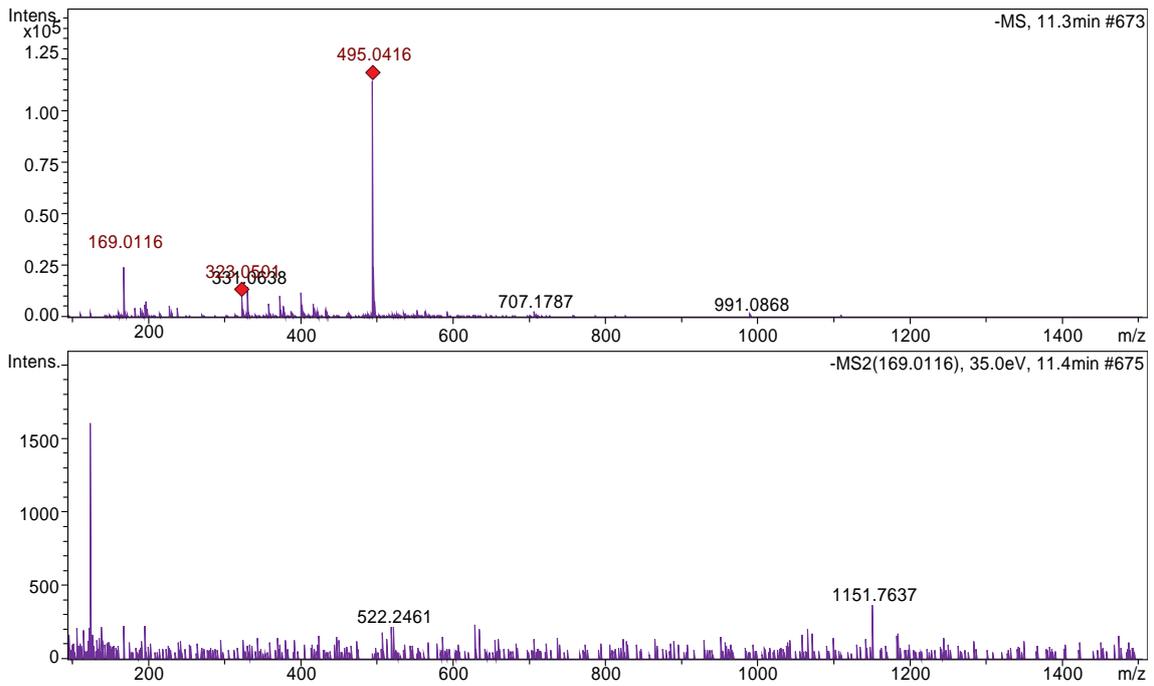
### 7-Hidroxi flavanona beta-D-glucopiranosídeo



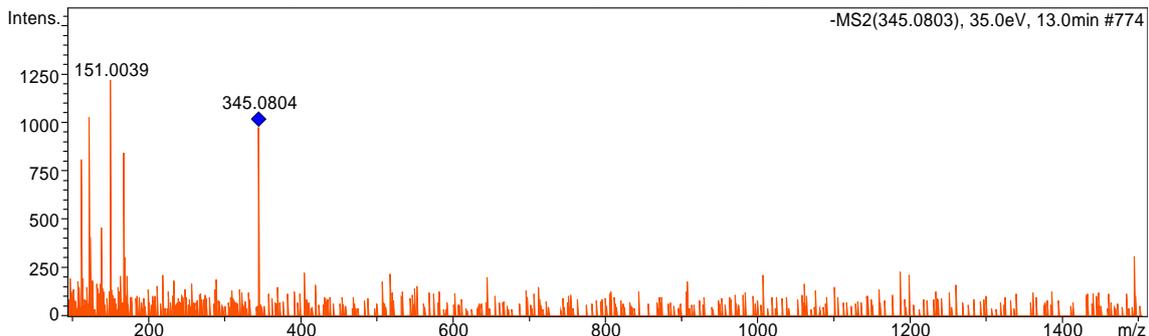
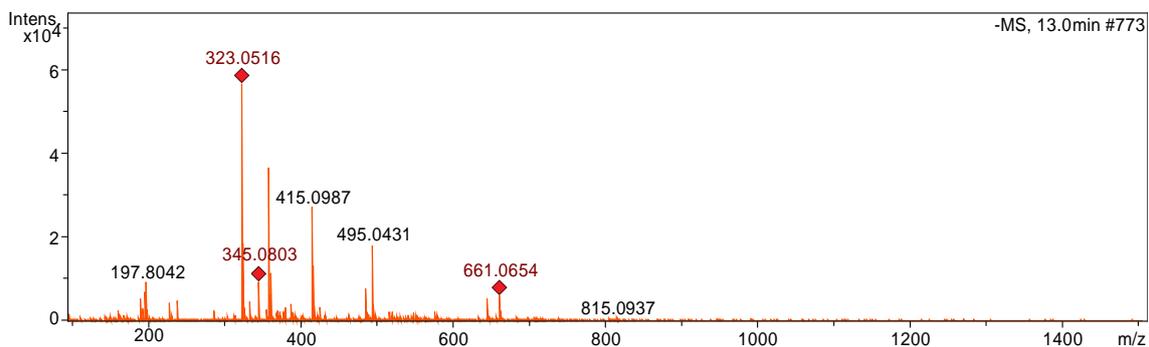
## Marinoide D



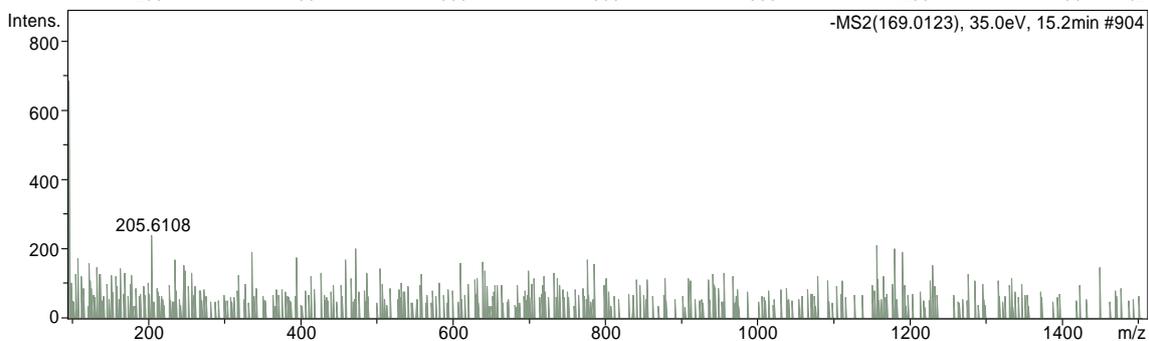
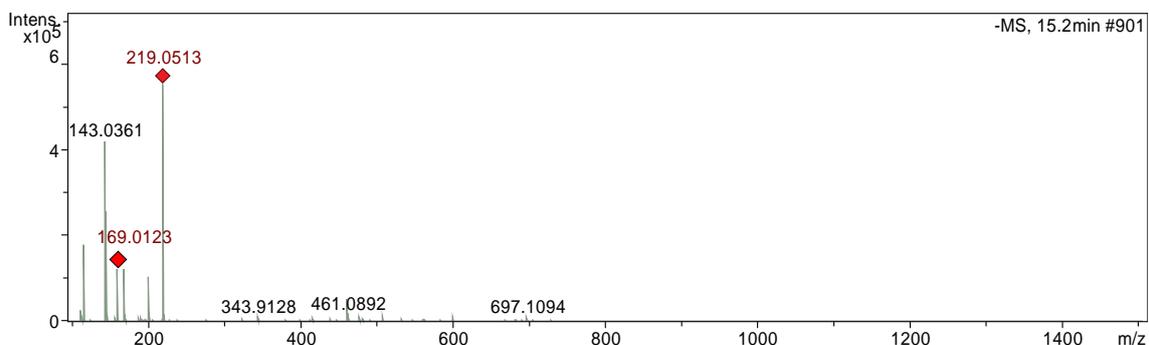
## Ácido Gálico



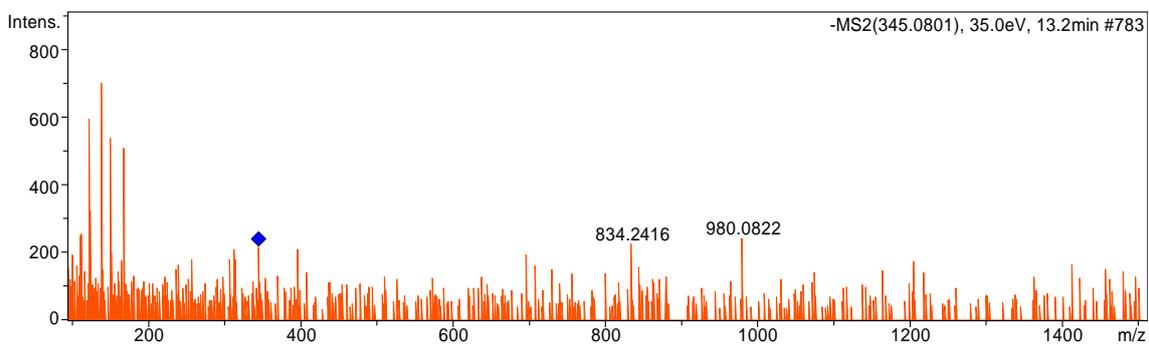
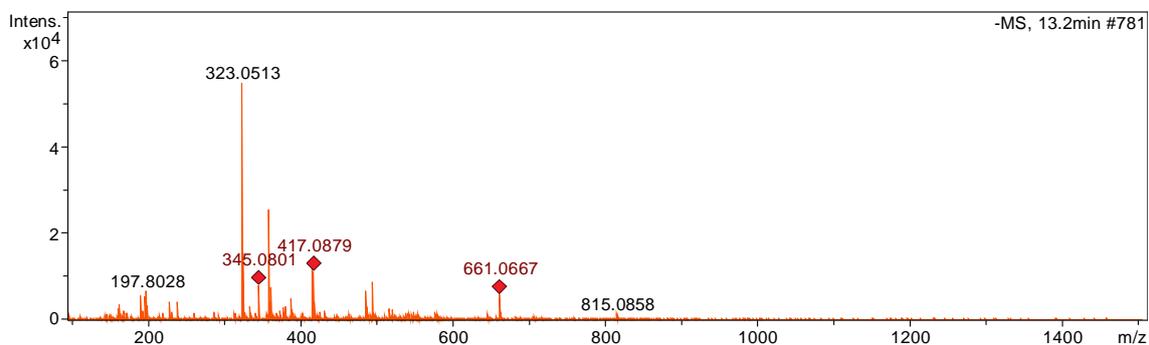
### Metil galato 3-O-beta-D-glucopiranosídeo



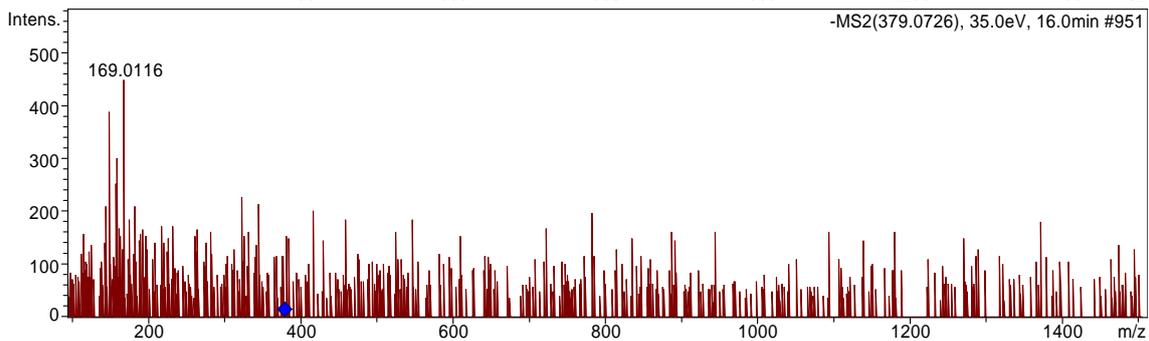
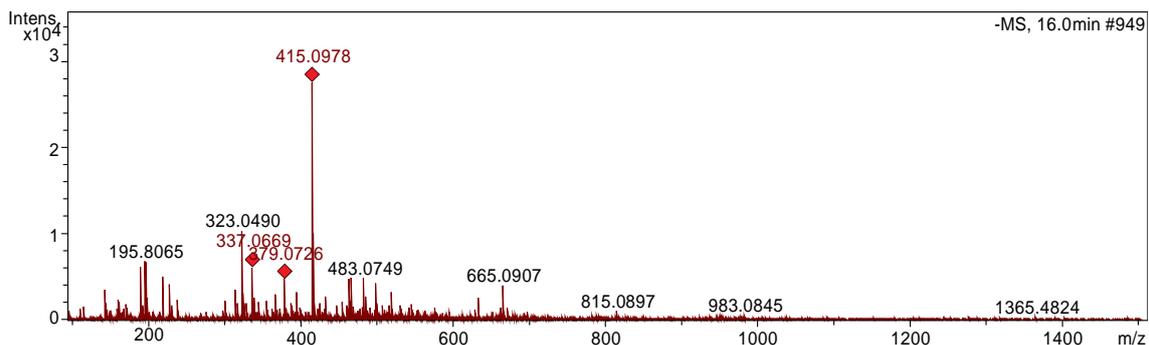
### Ácido 2,4,5-Trihidroxibenzóico



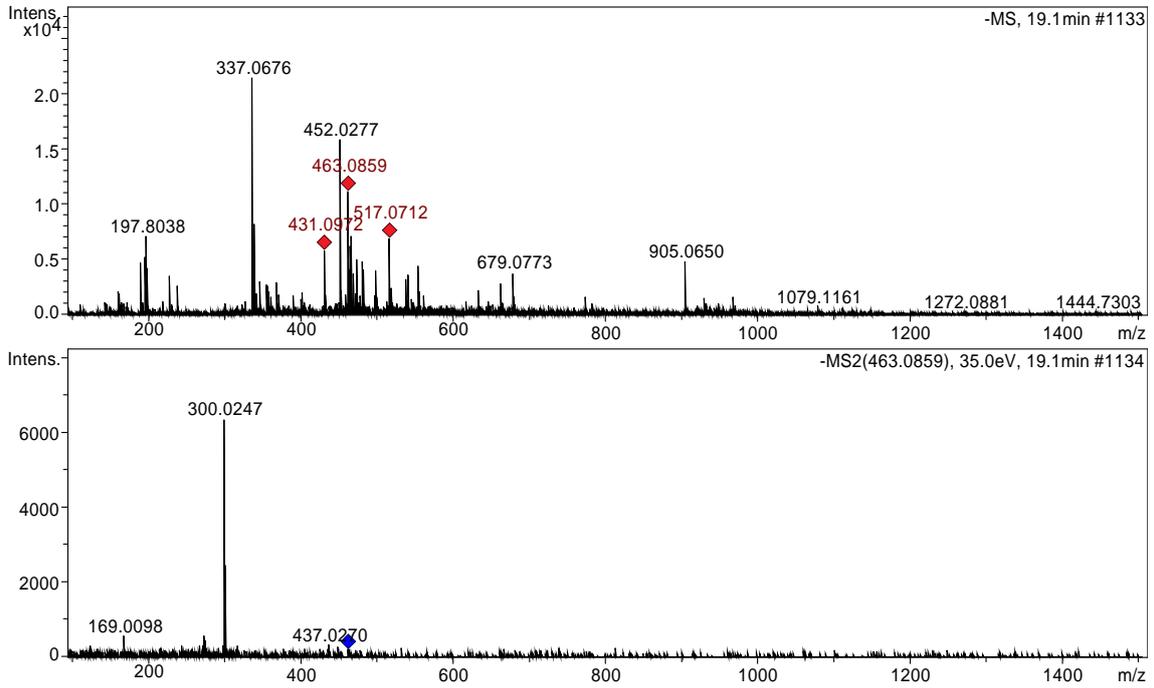
## Metil galato 4-O-beta-D-glucopiranosídeo



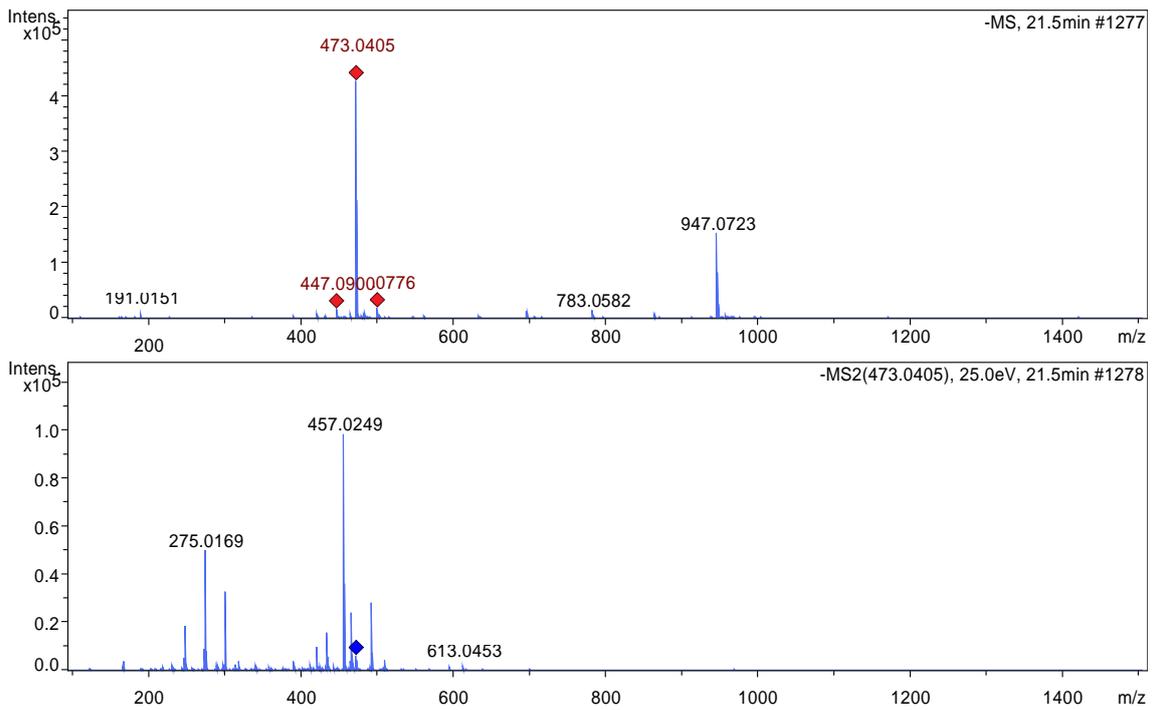
## 2-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxipropil 3,4,5-trihidroxibenzoato



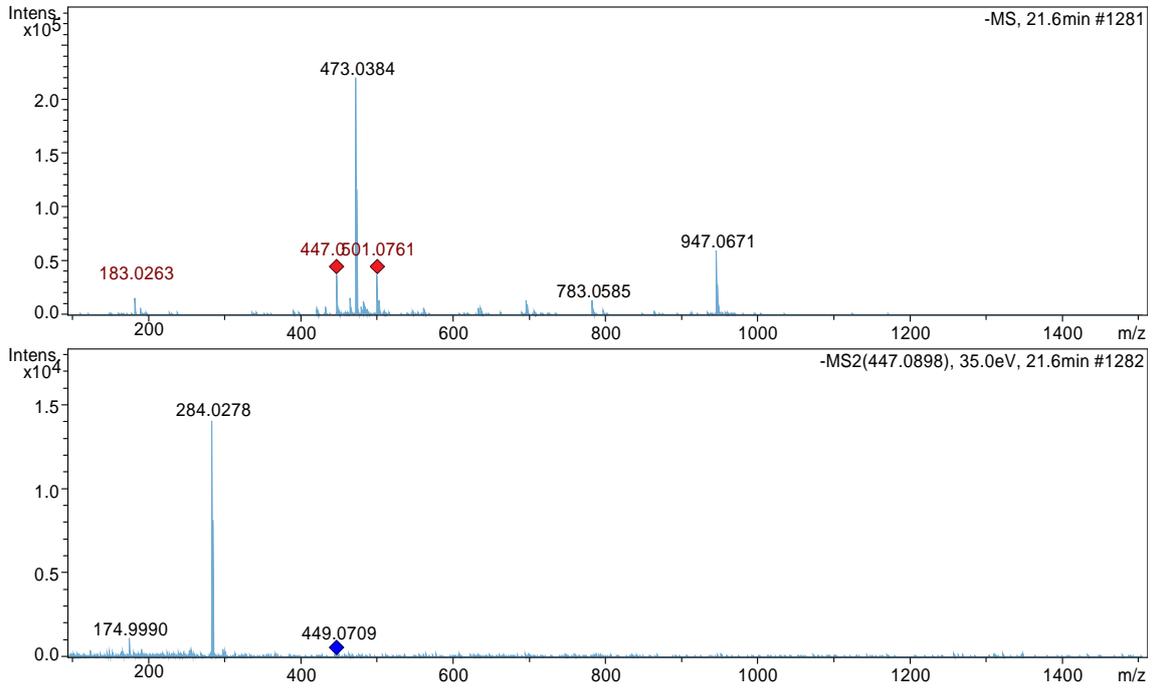
## Quercetina-3- galactosídeo



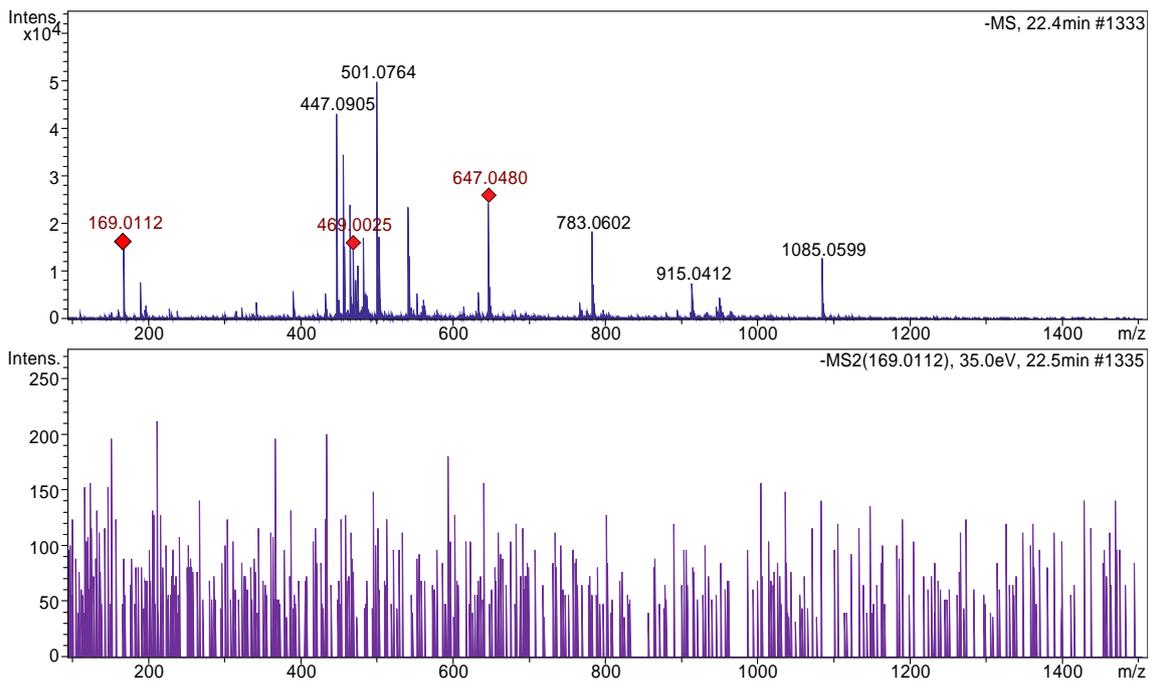
## Ácido Valoneico



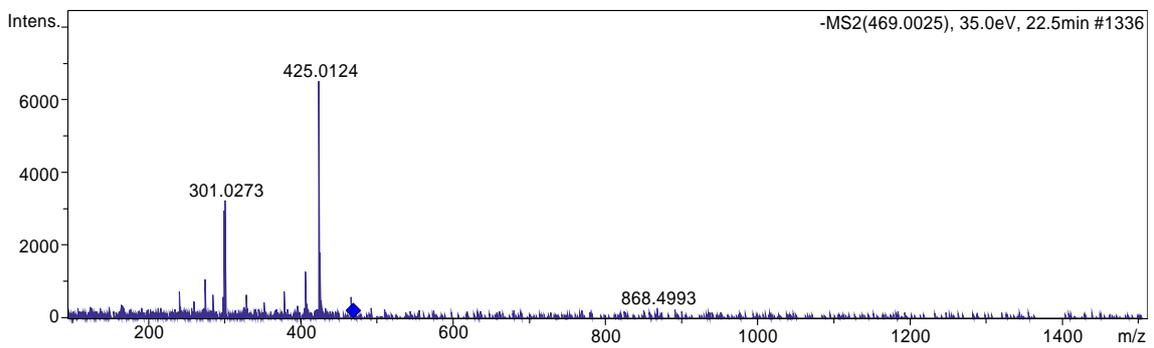
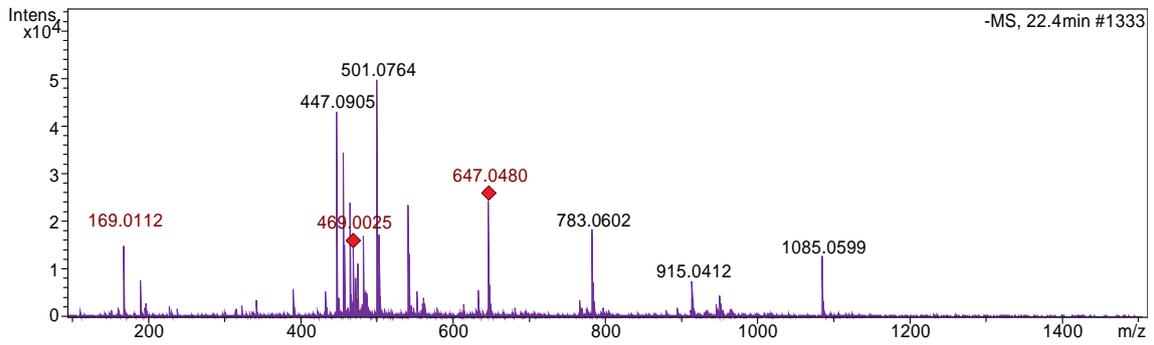
## Luteolina 3'-glicosido



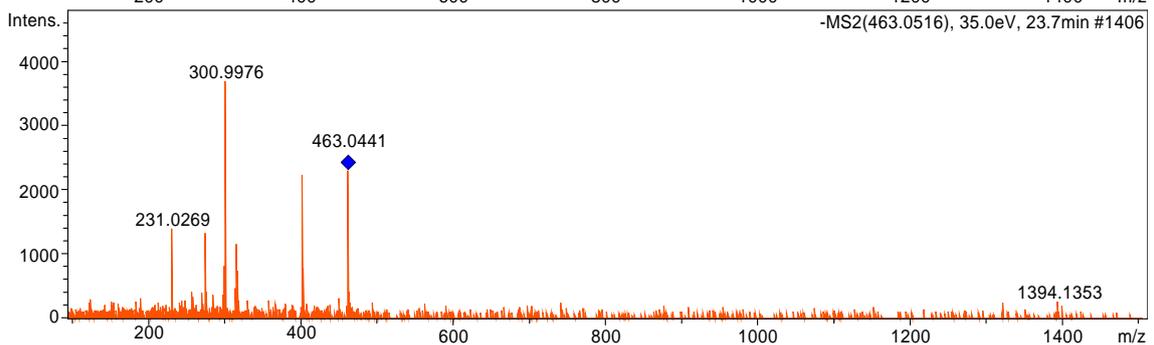
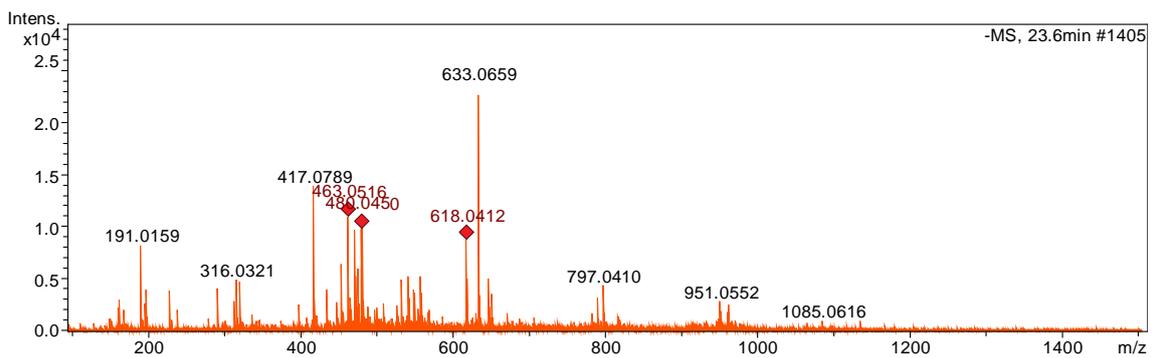
## Ácido 2,4,5-Trihidroxibenzóico



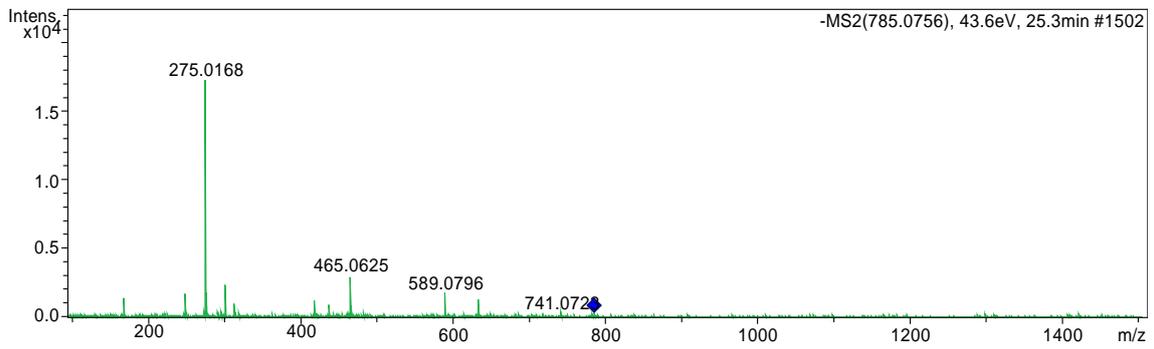
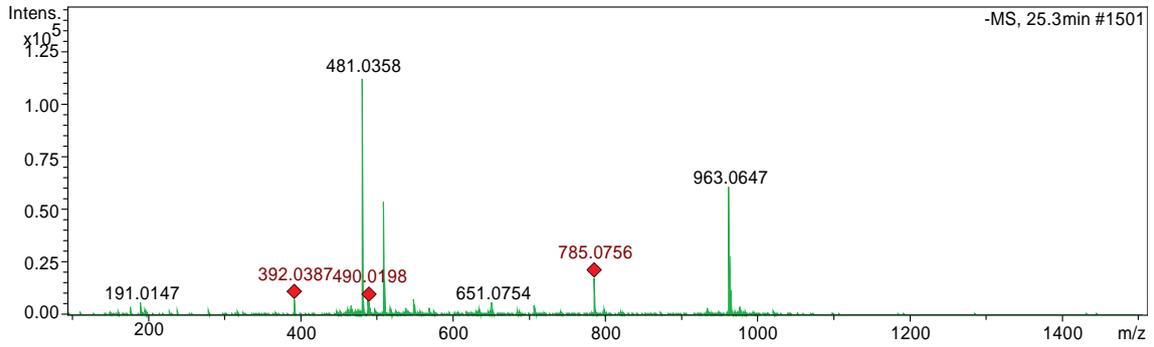
## Ácido Valoneico Bilactona



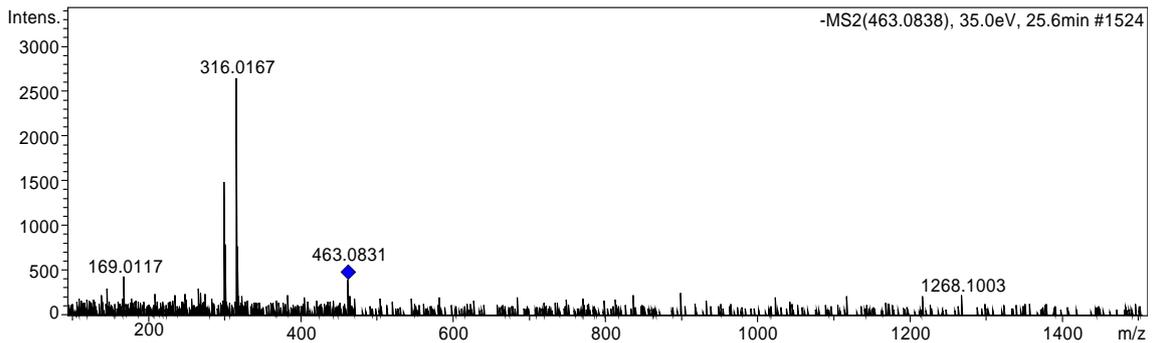
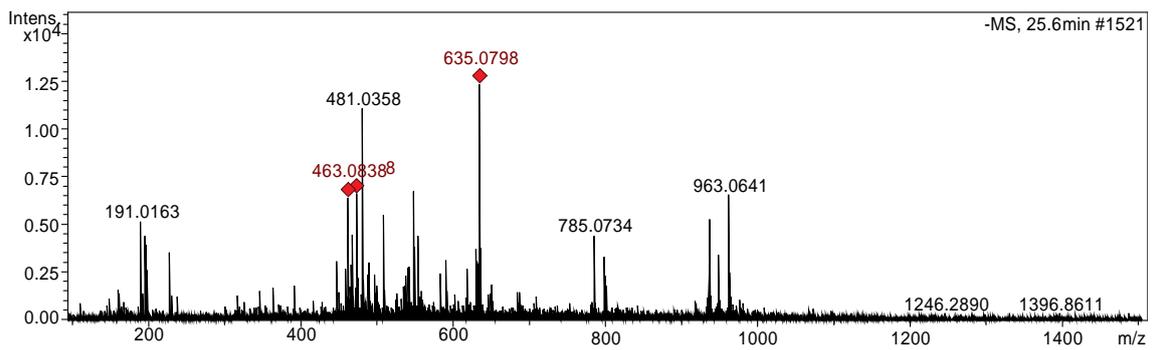
## Ácido Elágico 4-O-beta-D-glucopiranosídeo



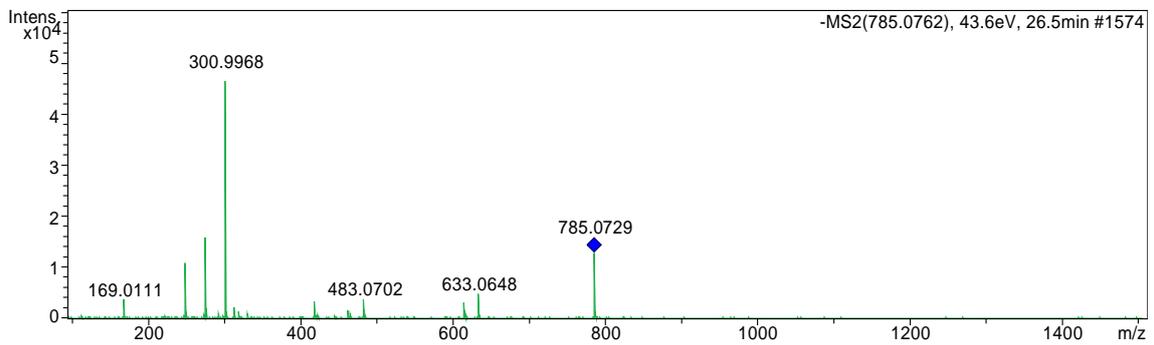
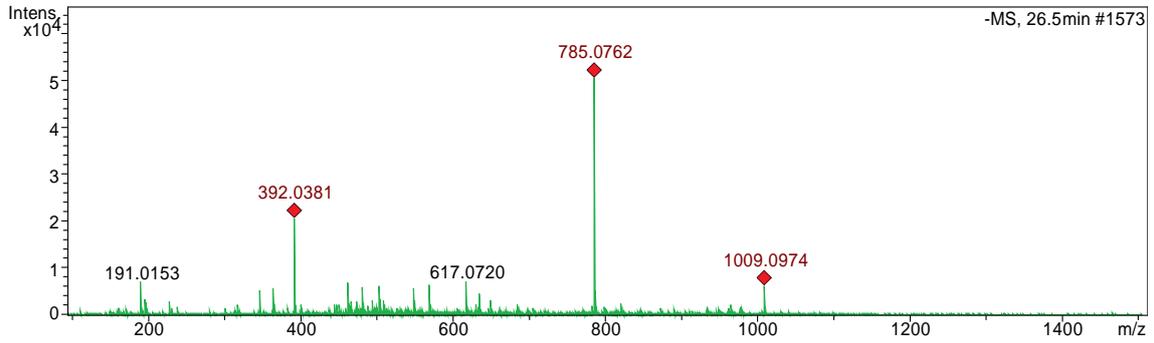
## Nobotanina D



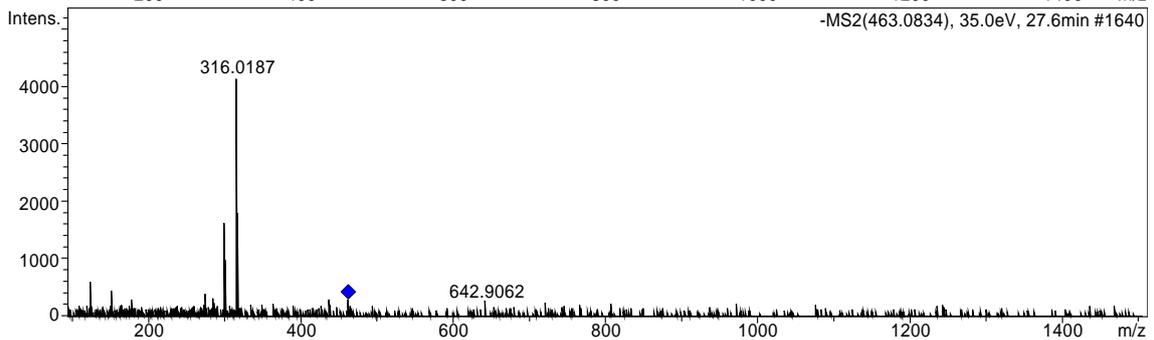
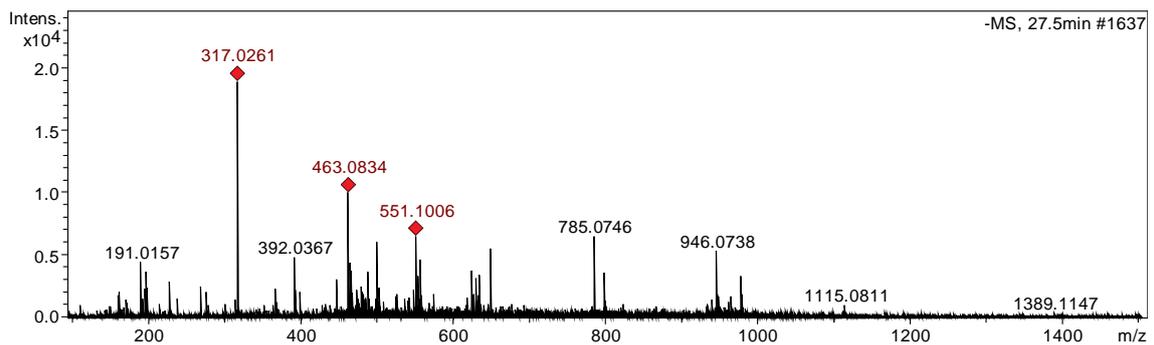
## Miricetina-pentosídeo



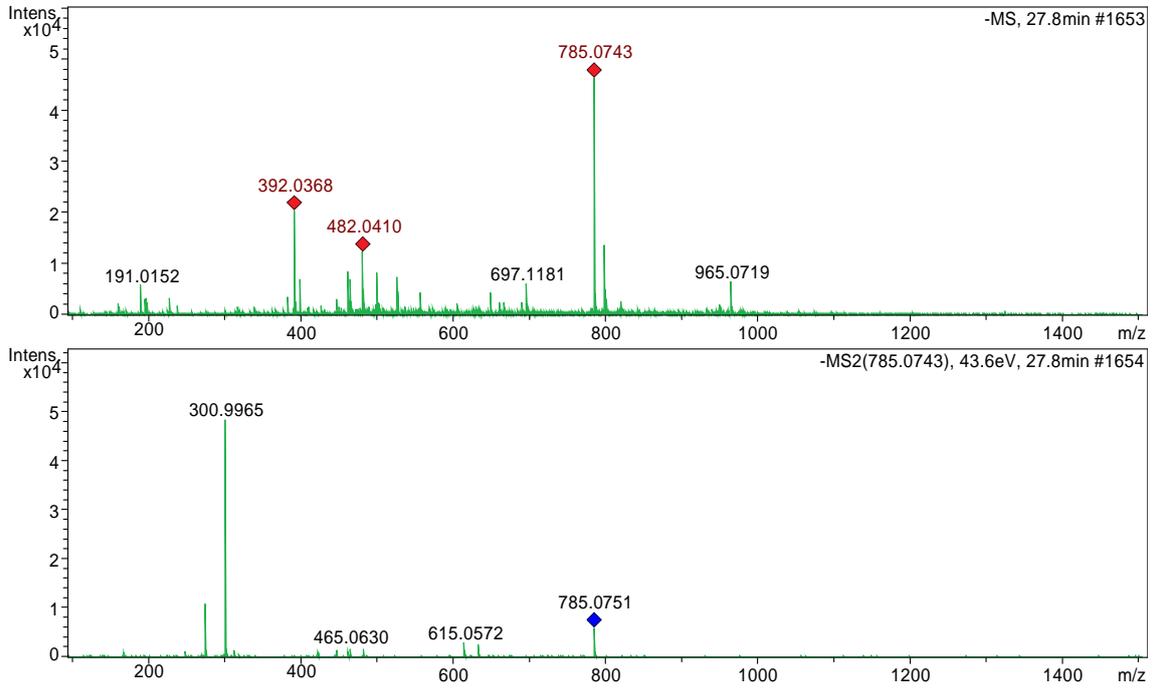
## Nobotanina D



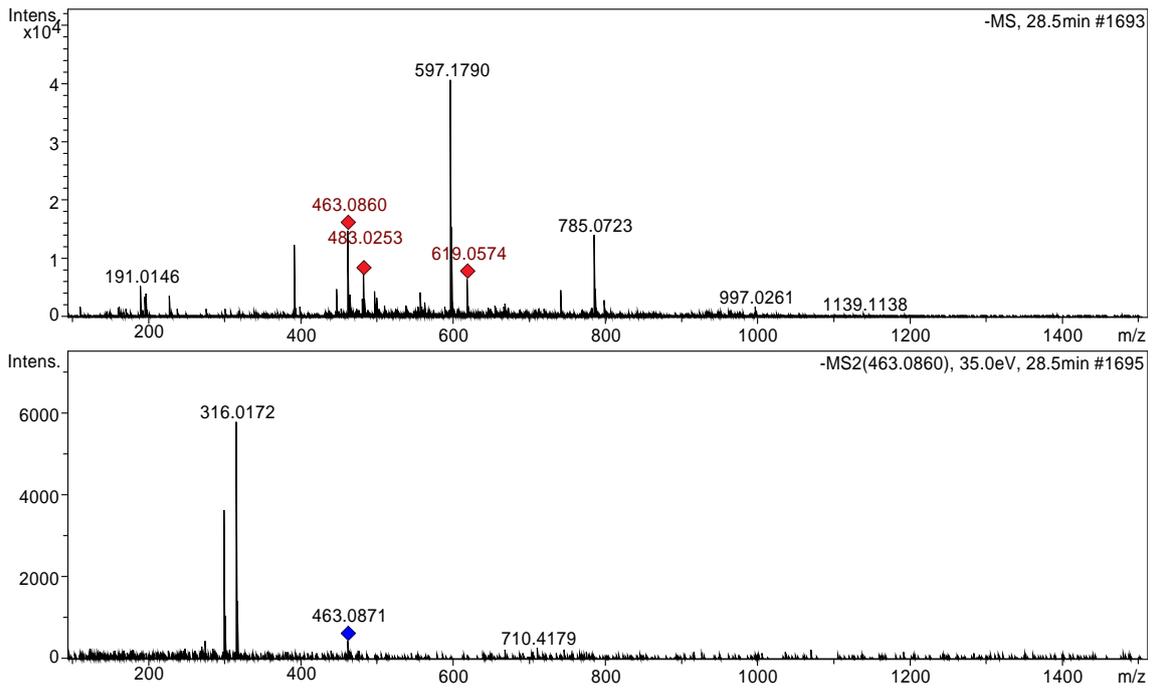
## Miricetina-pentosídeo



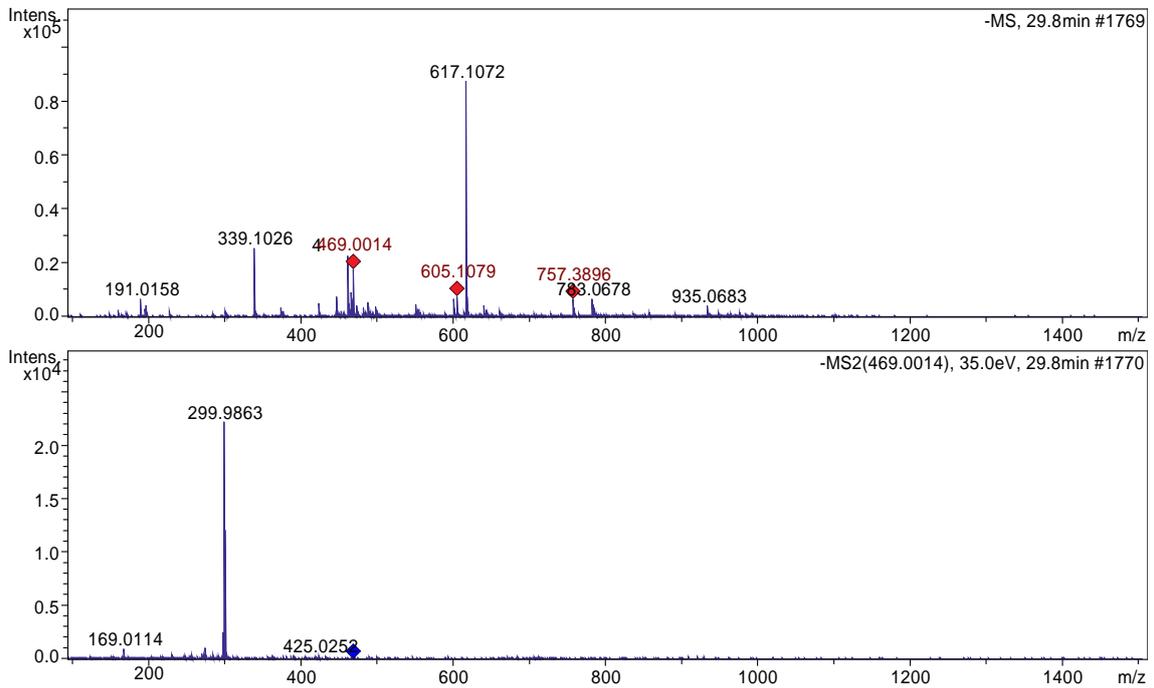
## Nobotanina D



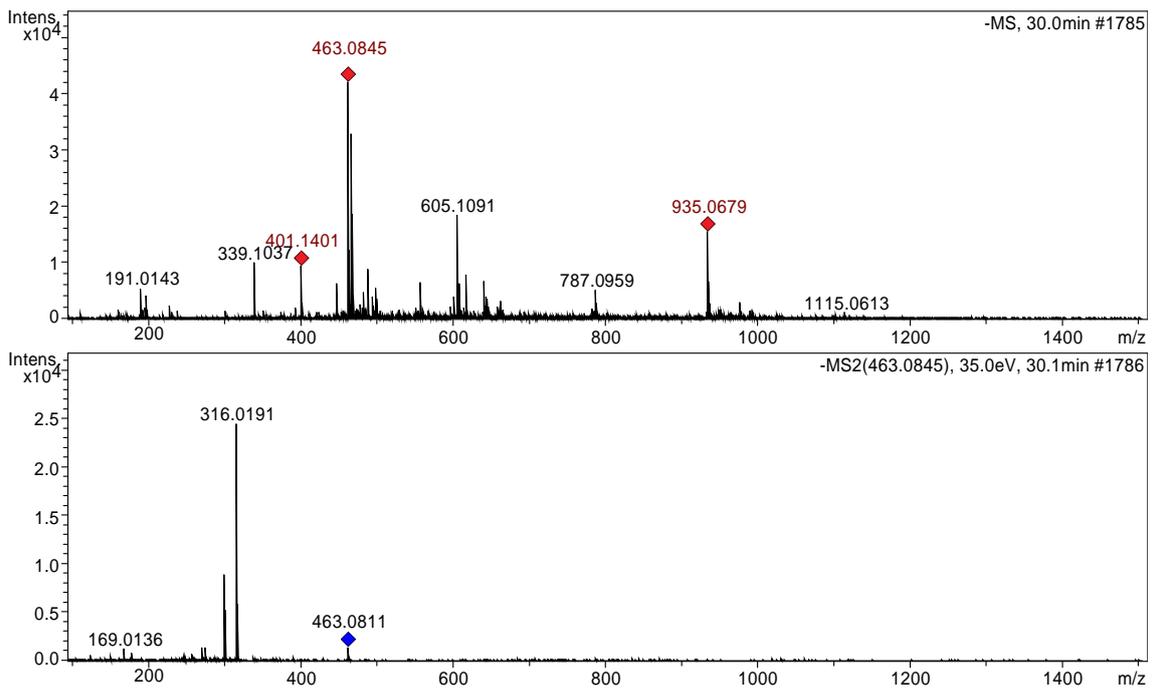
## Miricetina-pentosídeo



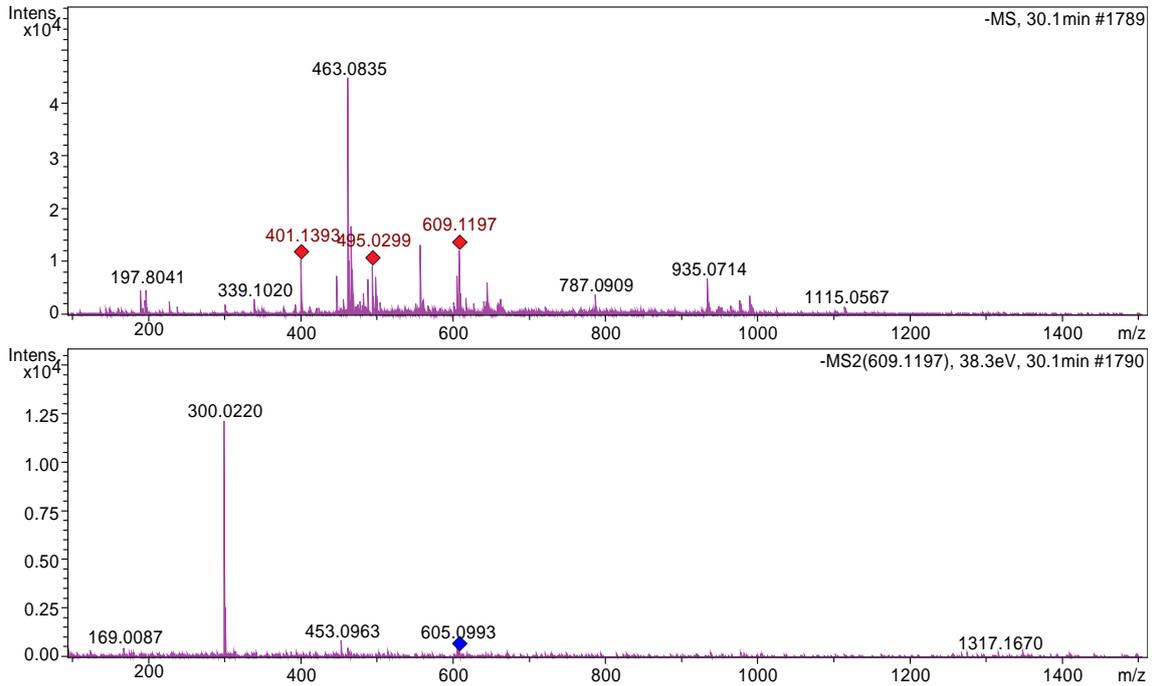
## Ácido Valoneico Bilactona



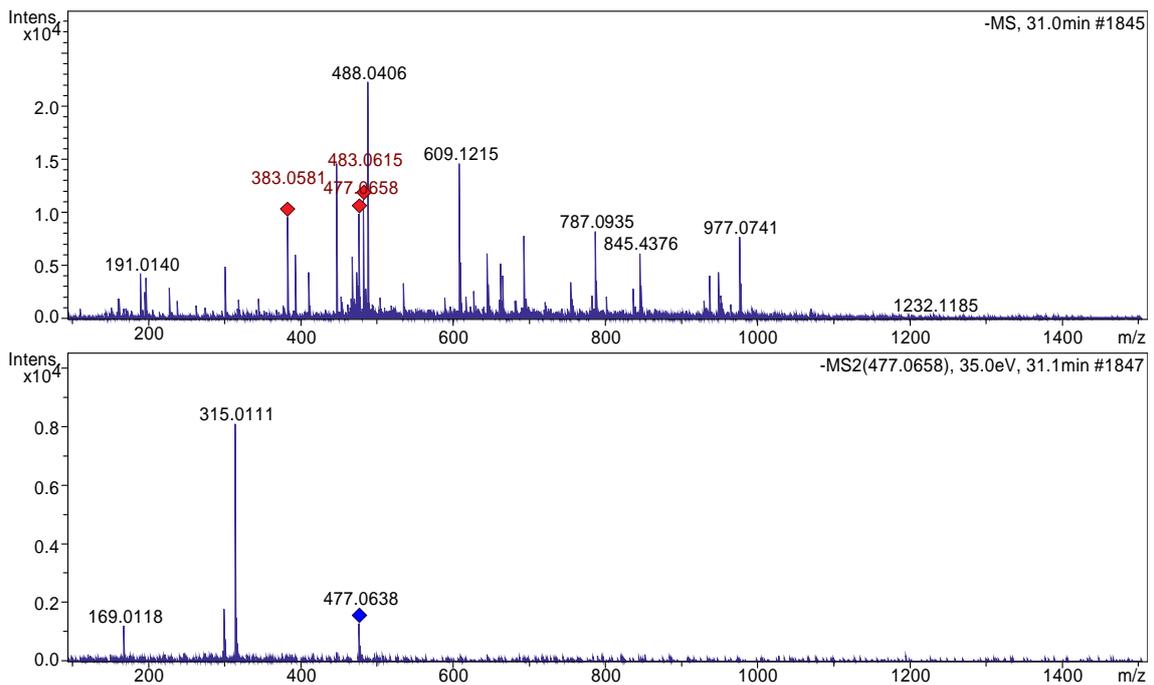
## Miricetina-pentosídeo



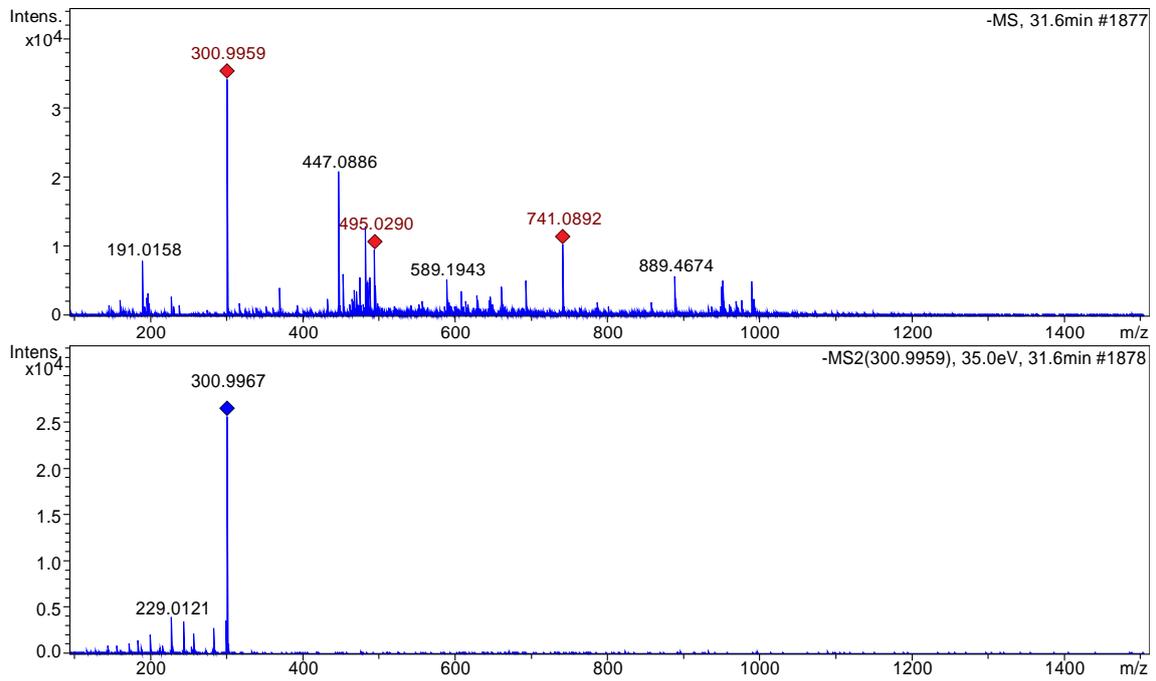
## Rutina



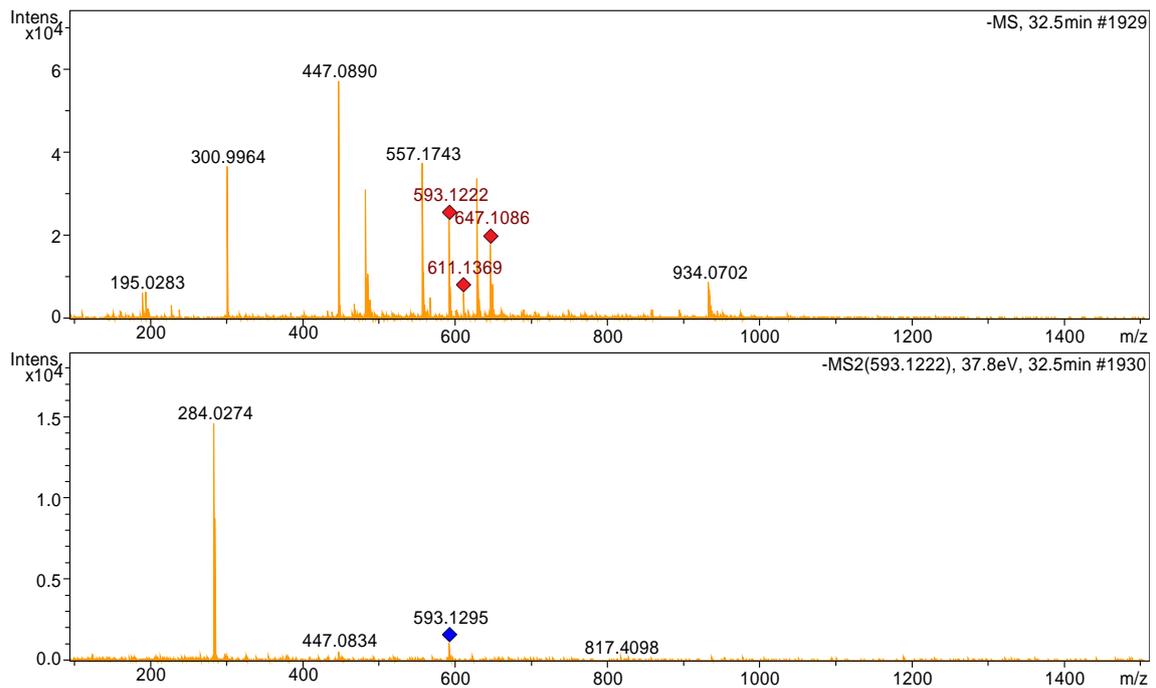
## Miricetina pentosilglucoronida



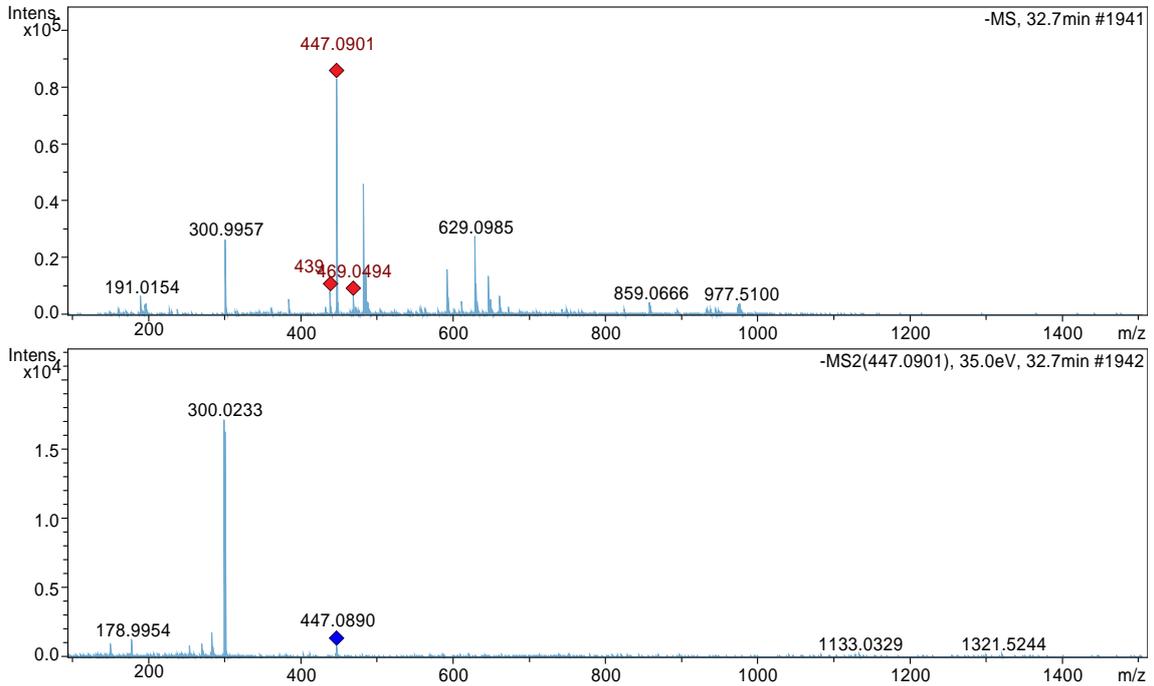
## Ácido Elágico



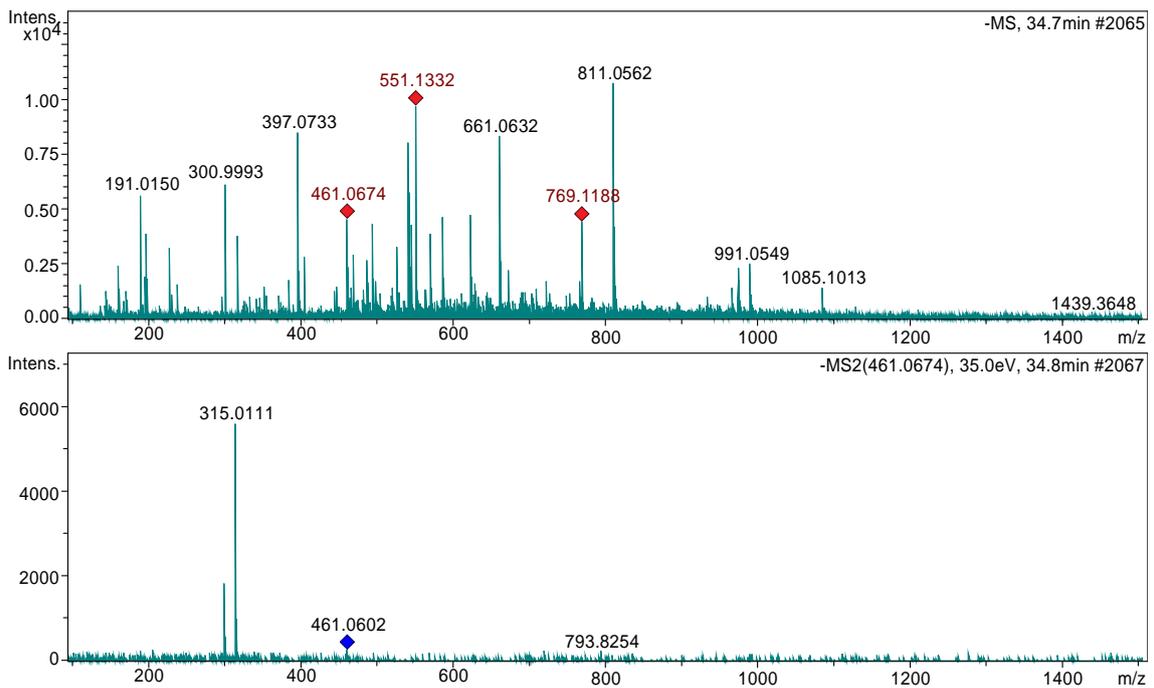
## Kaempferol 3-(6''-p-coumarilgalactosídeo)



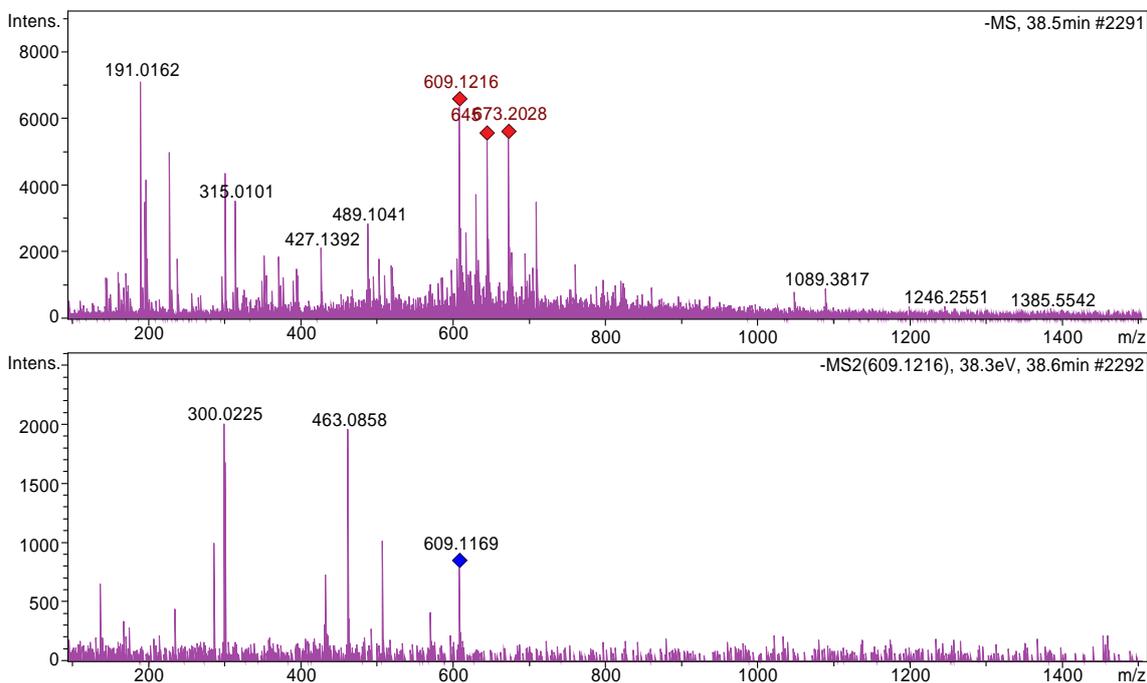
## Quercetina-ramnosídeo



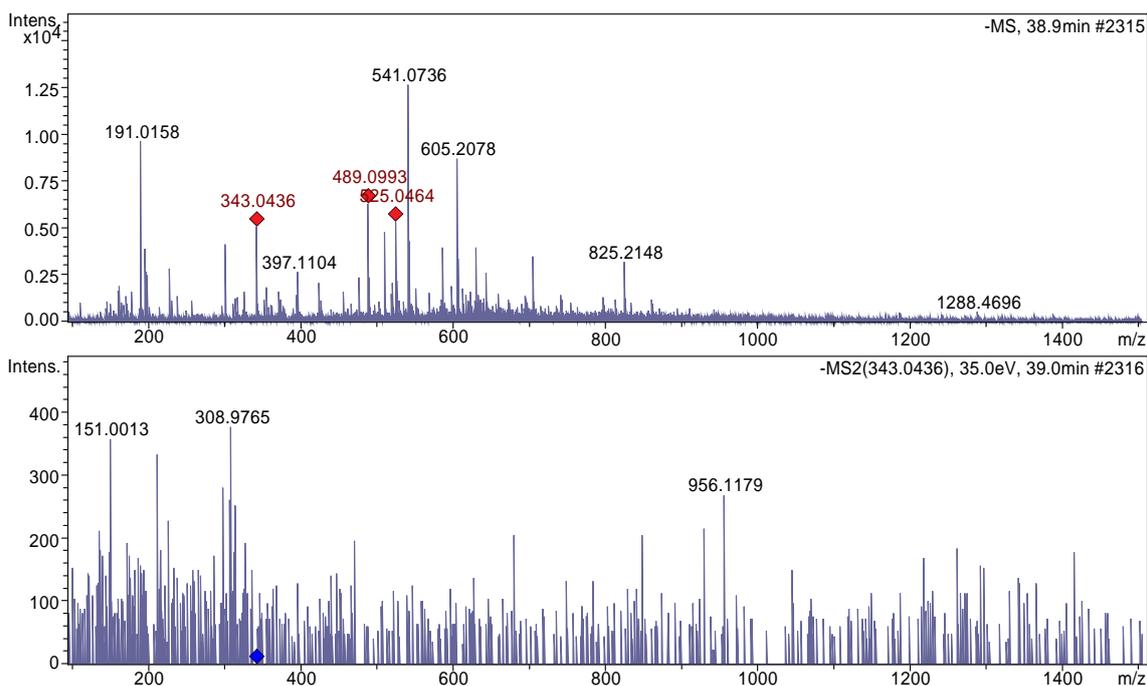
## Ácido metil-elágico-ramnopiranosídeo



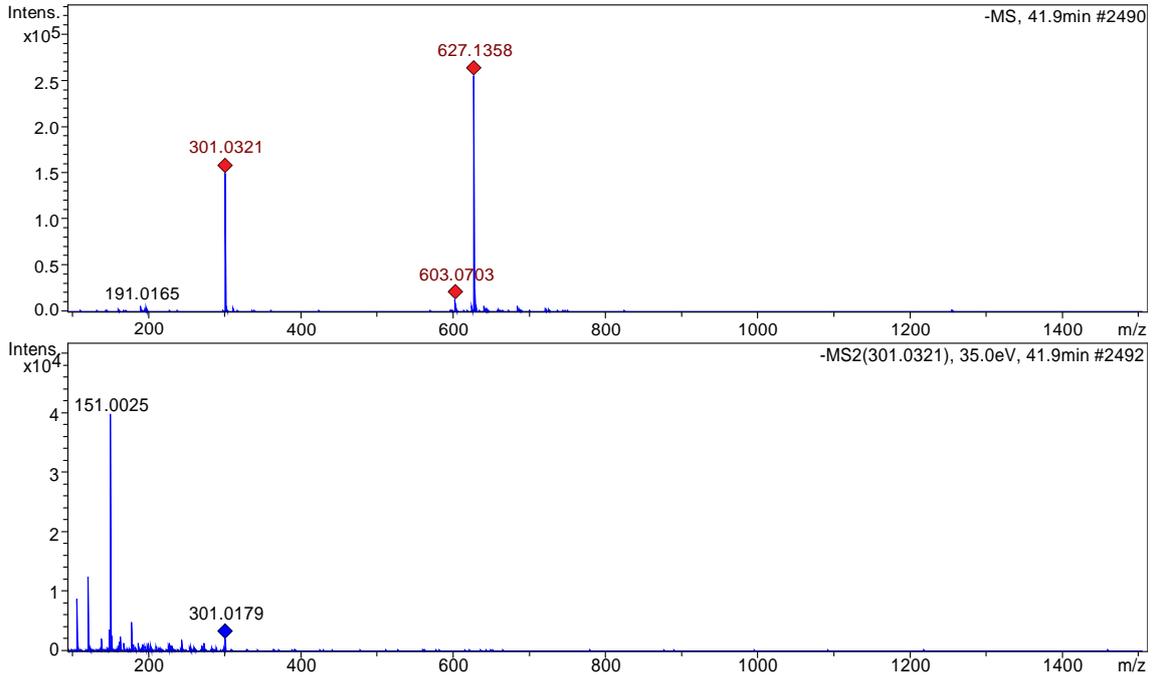
### Quercetina 3-O-(6"-O-p-coumaroil)-glicosídeo



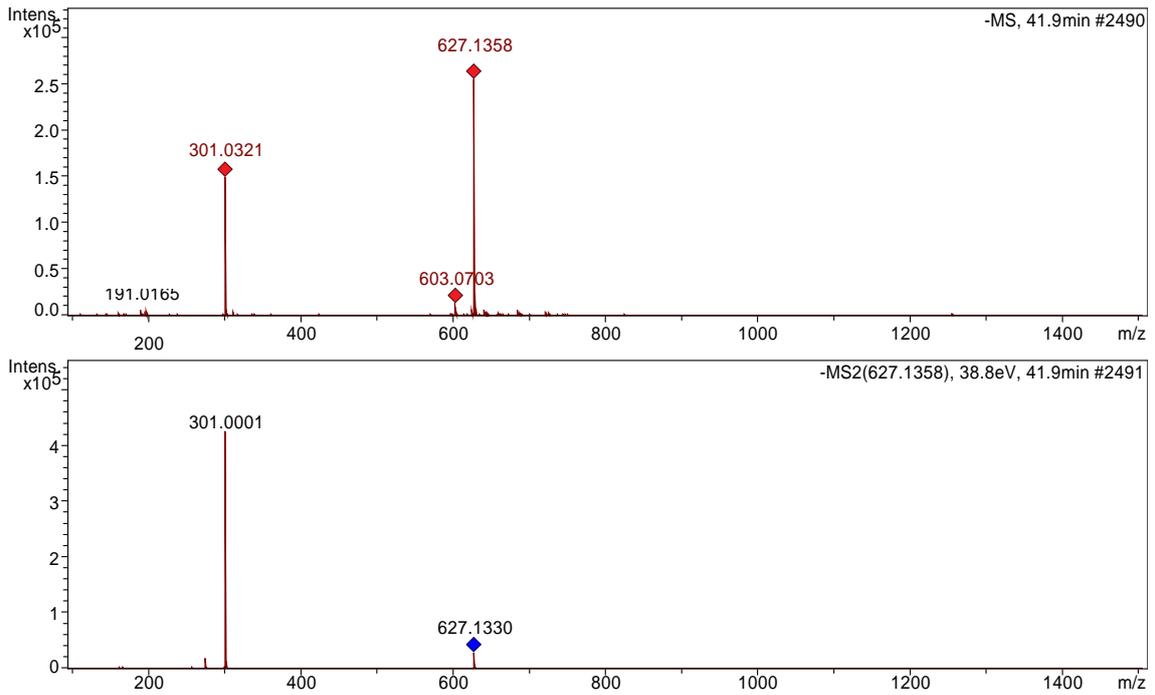
### Ácido 3,3',4'-tri-O-metil-elágico



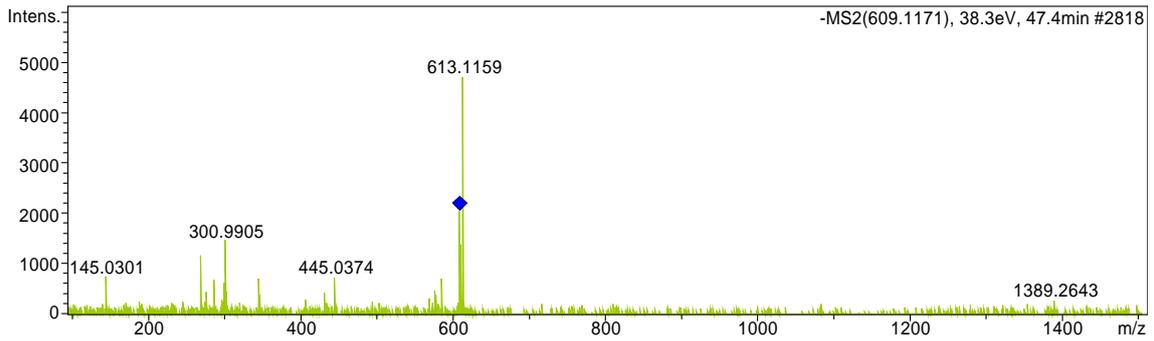
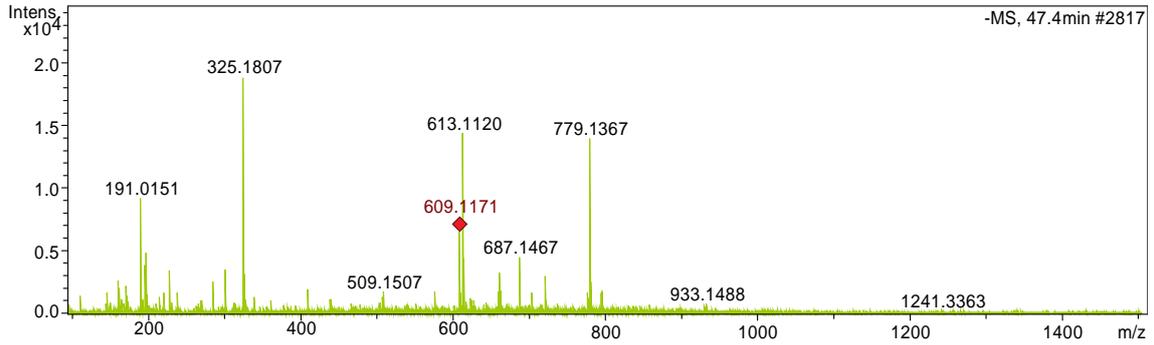
# Quercetina



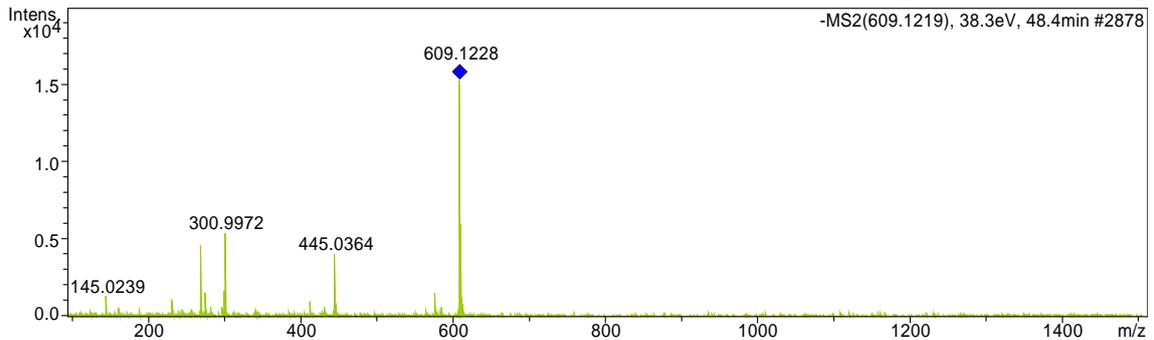
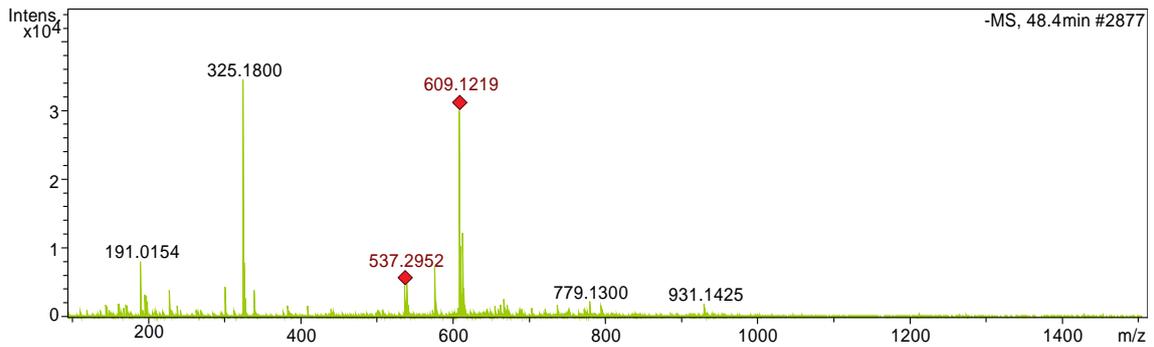
# MHVNBOWEJFCLI



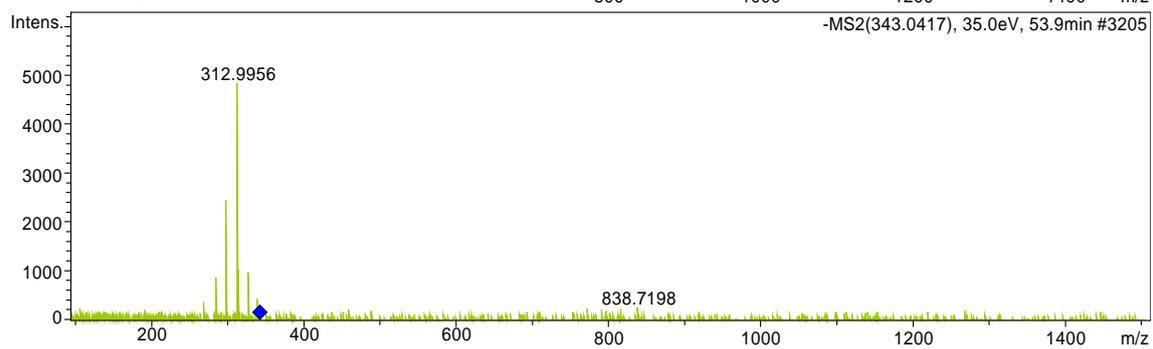
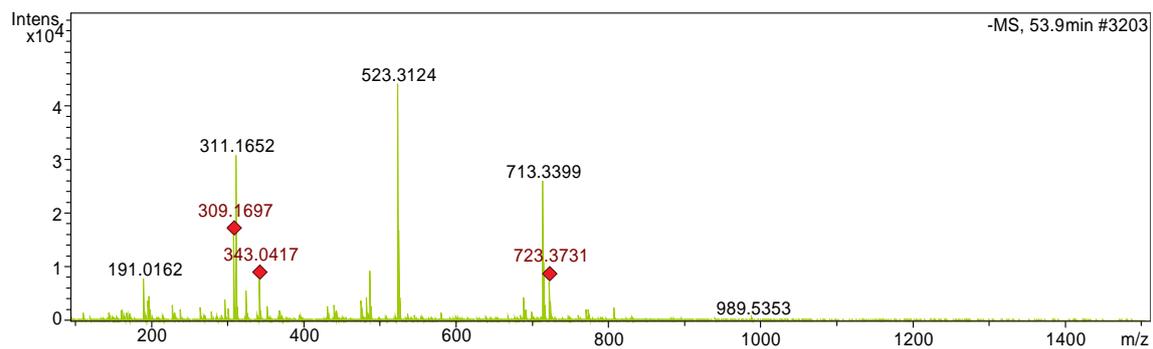
GLTBXVDDJQCGAJ



DHBWKBBASFXRFB

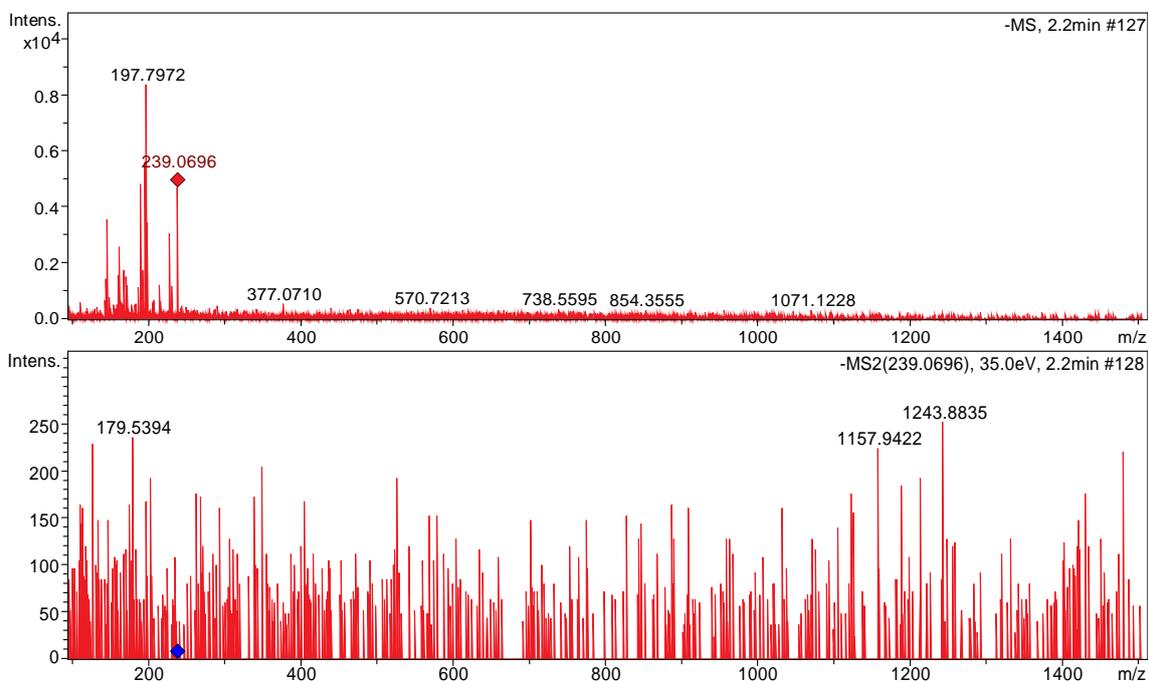


# Ácido 3,4,4'-tri-O-metil-elágico

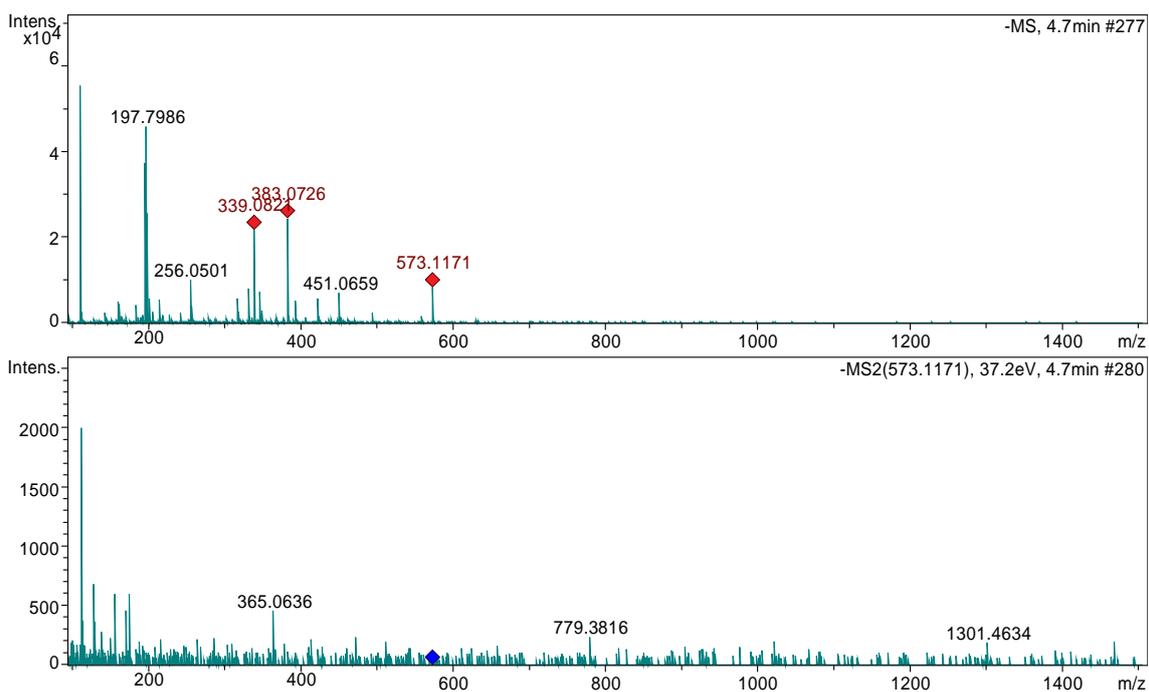


## Espectros de massas da fração FNE da pixirica

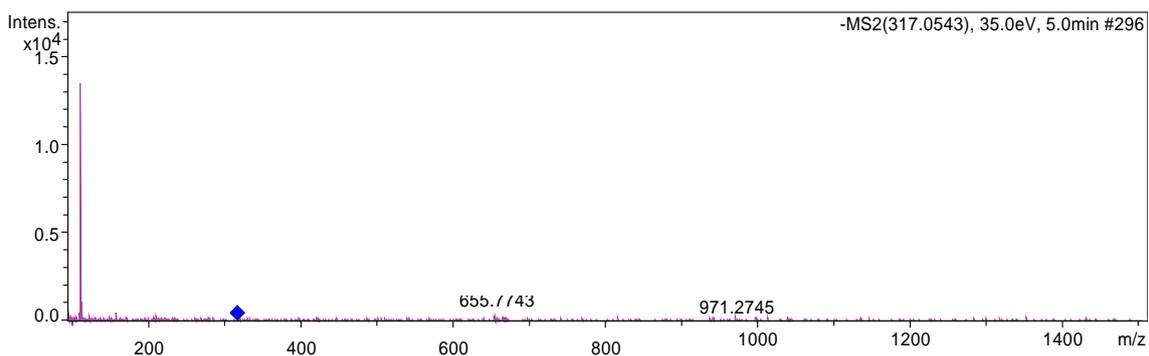
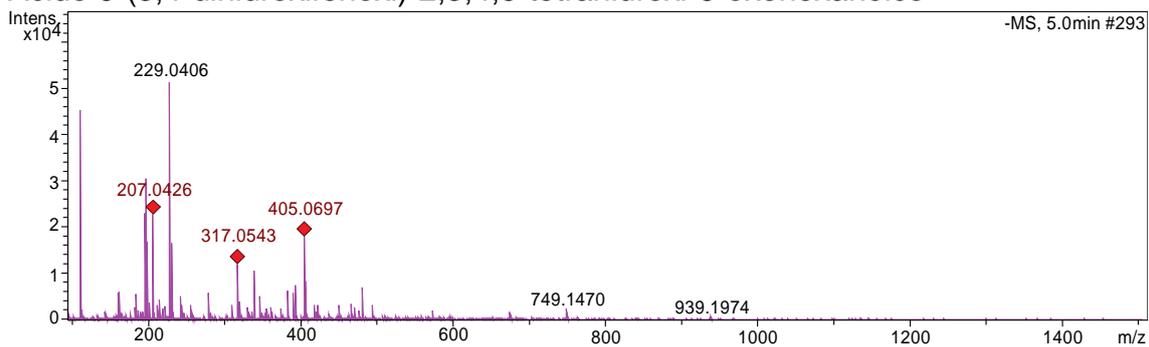
### 8-hidroxi-2-fenil-chroman-4-one



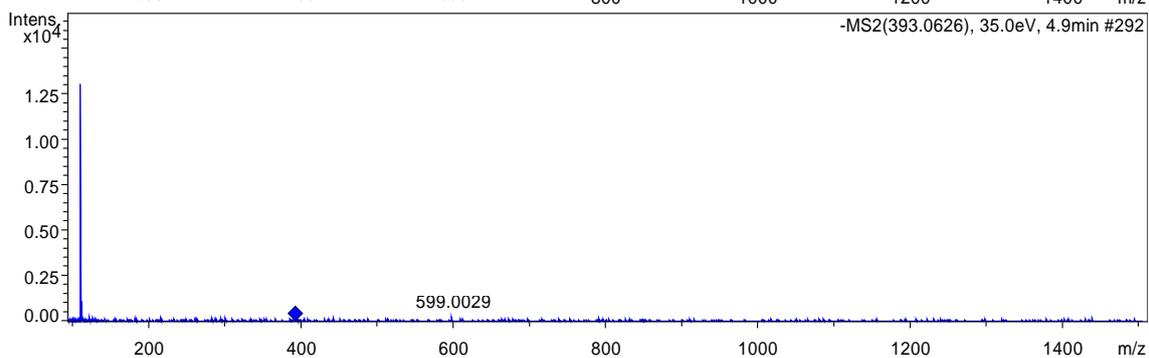
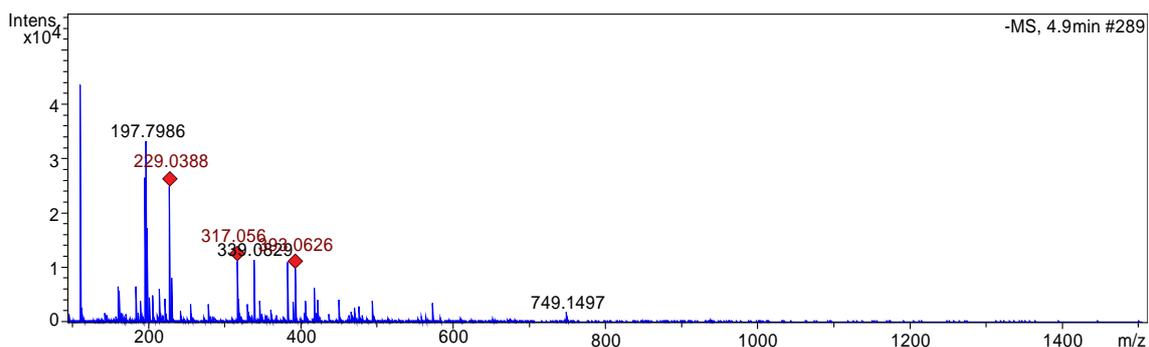
### Maritimetina 6-O-(3'',4'',6''-tri-O-acetilglucosídeo)



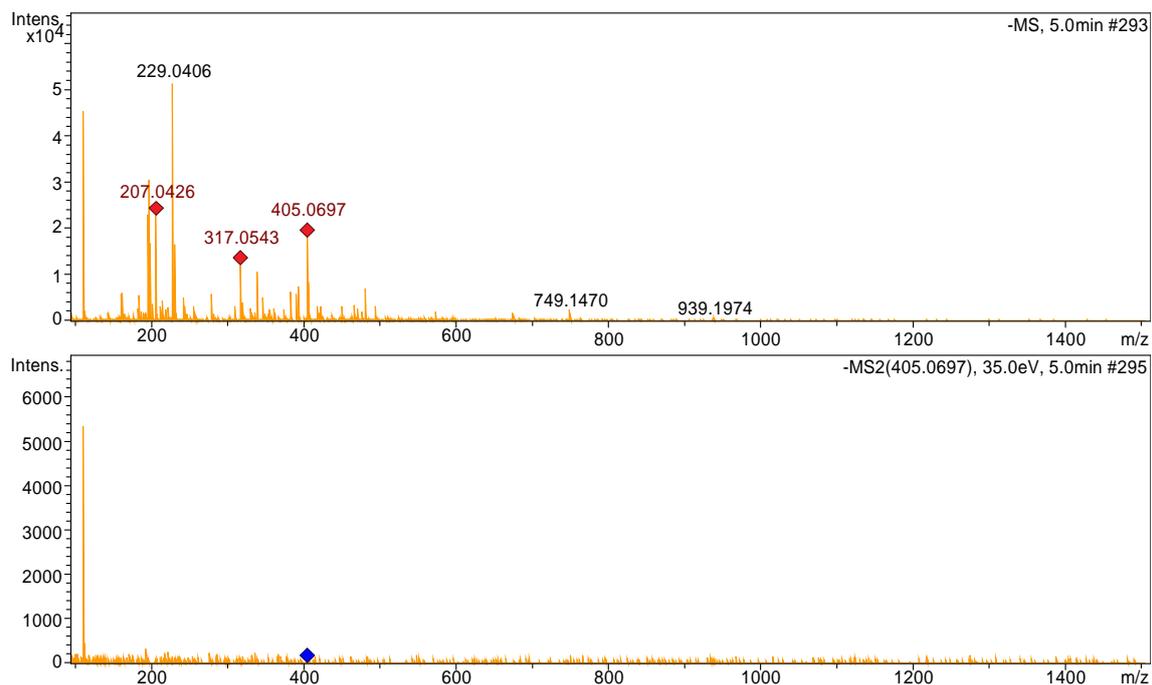
### Ácido 6-(3,4-dihidroxifenoxi)-2,3,4,5-tetrahidroxi-6-oxohexanoico



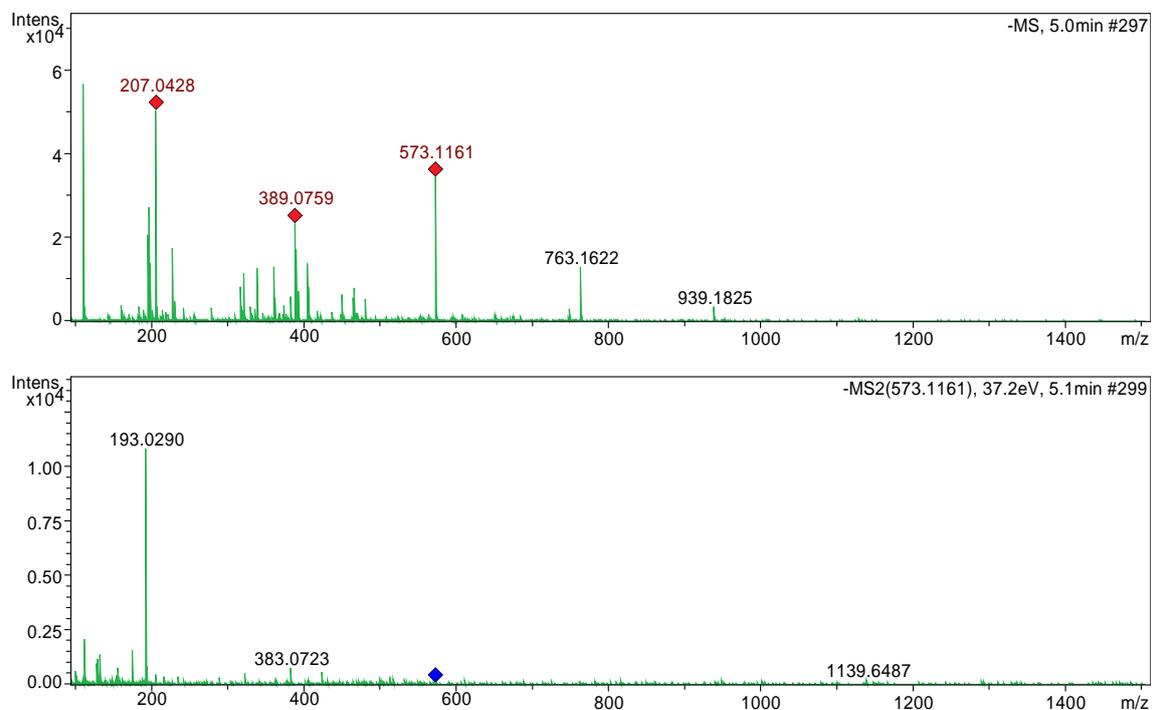
### Prostálidina A



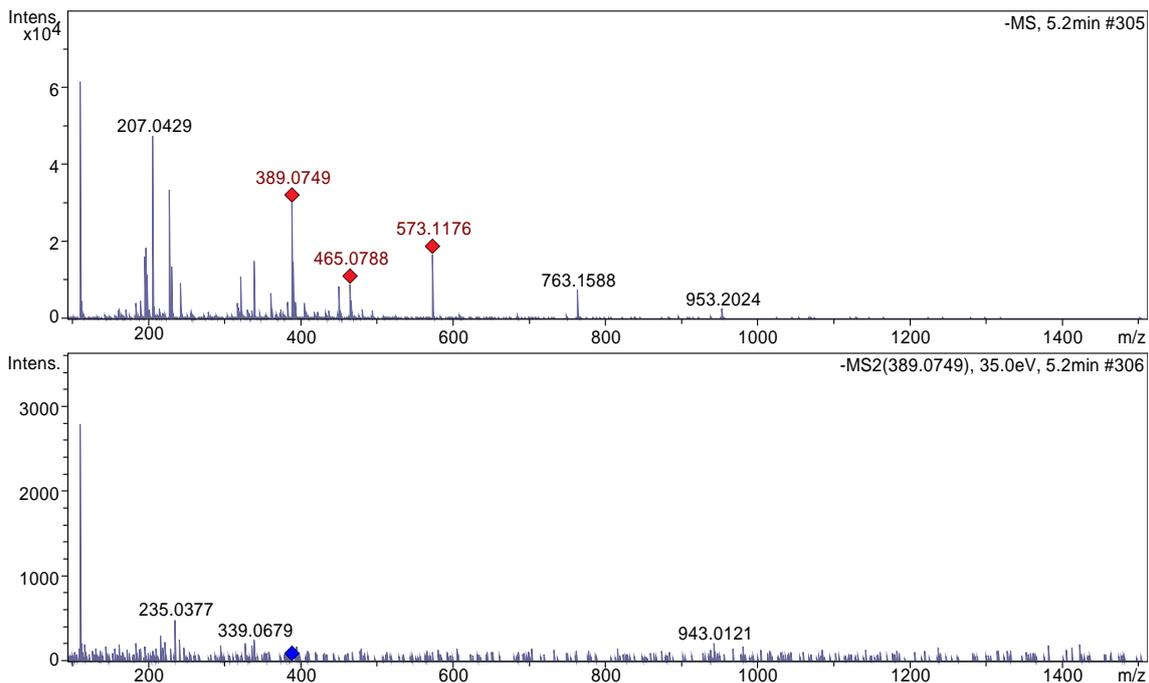
### 6-(2-hidroxi-5-carboxifenil)-apigenina



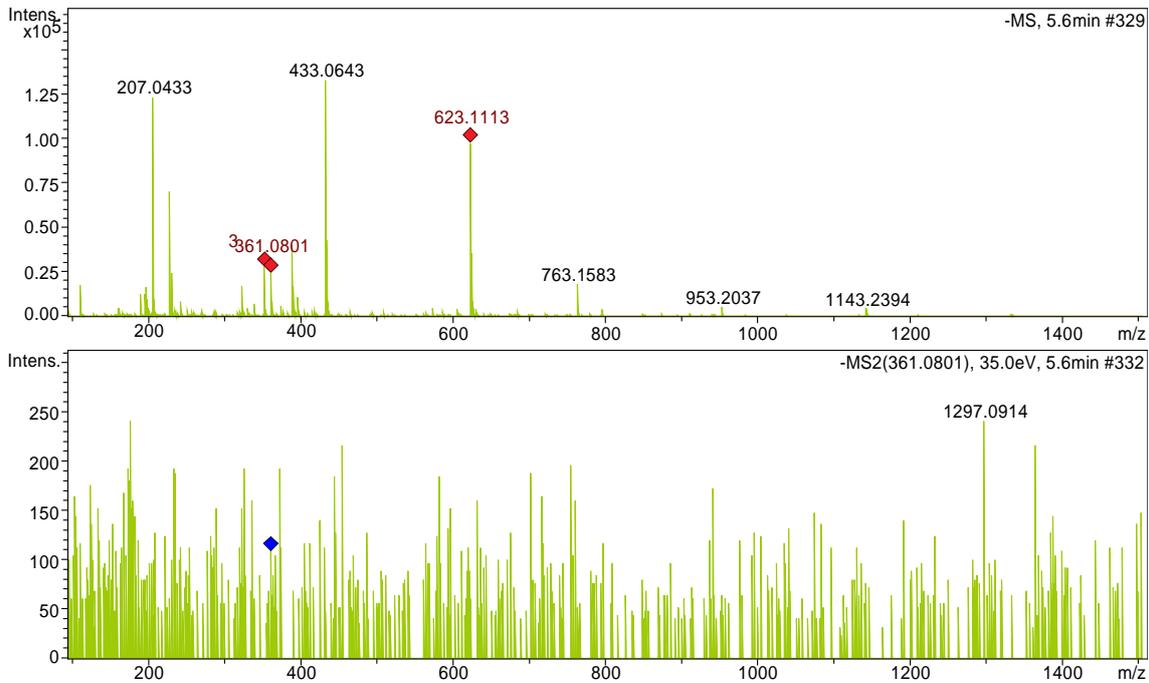
### Maritimetina 6-O-(3'',4'',6''-tri-O-acetilglucosídeo)



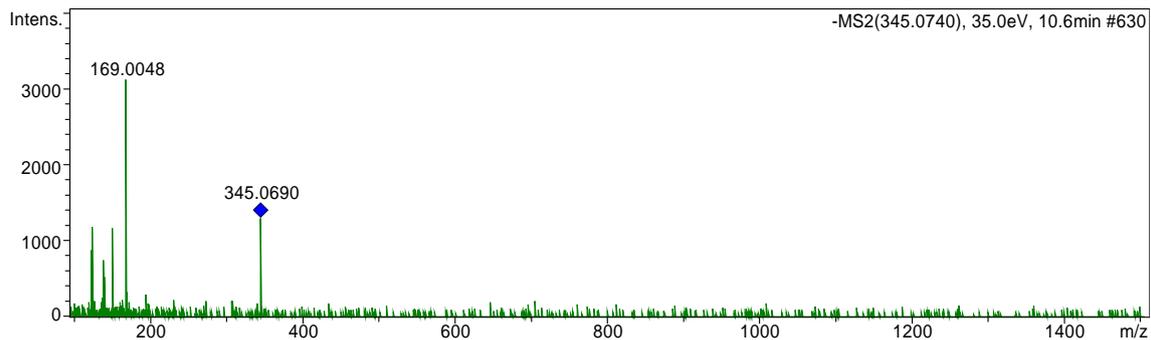
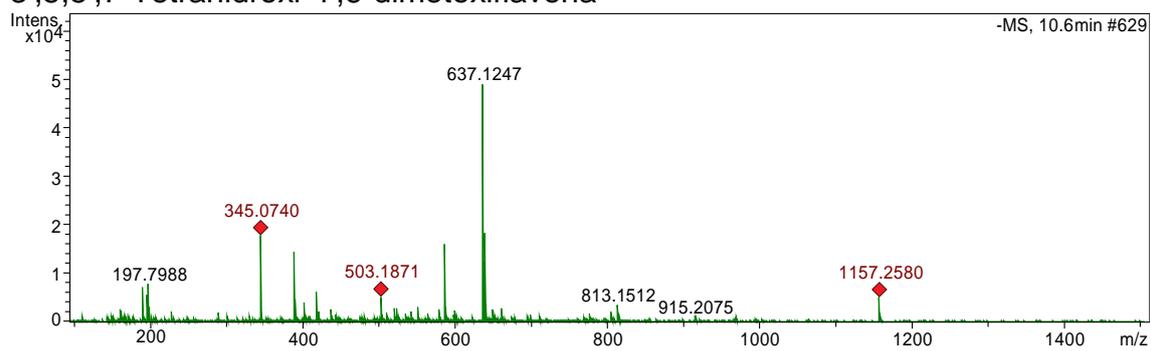
### Ácido místico dimetil-éster-2-O-galato



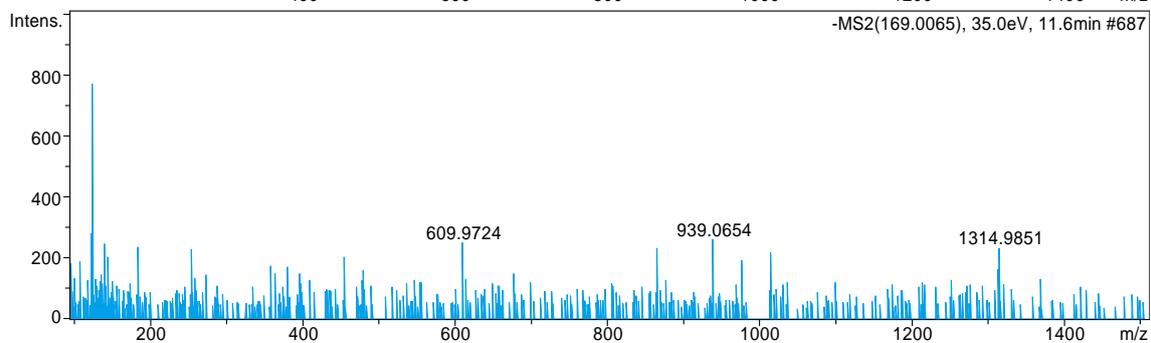
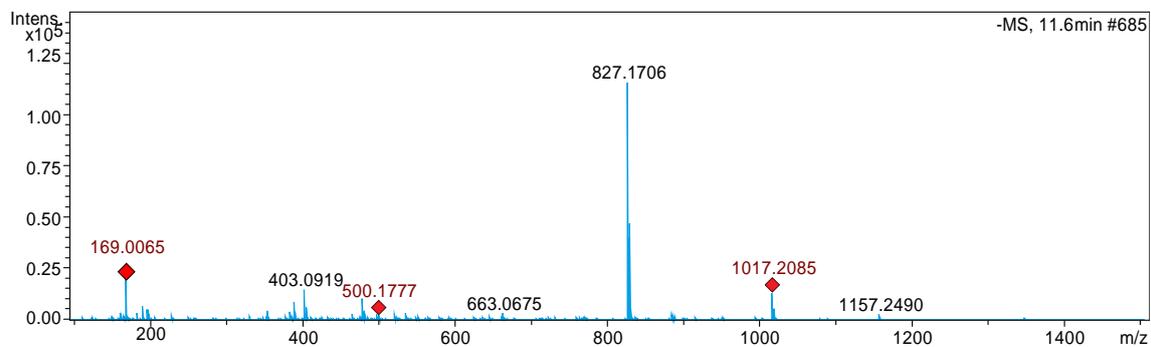
### 7-O-Galoil-sedoheptulose



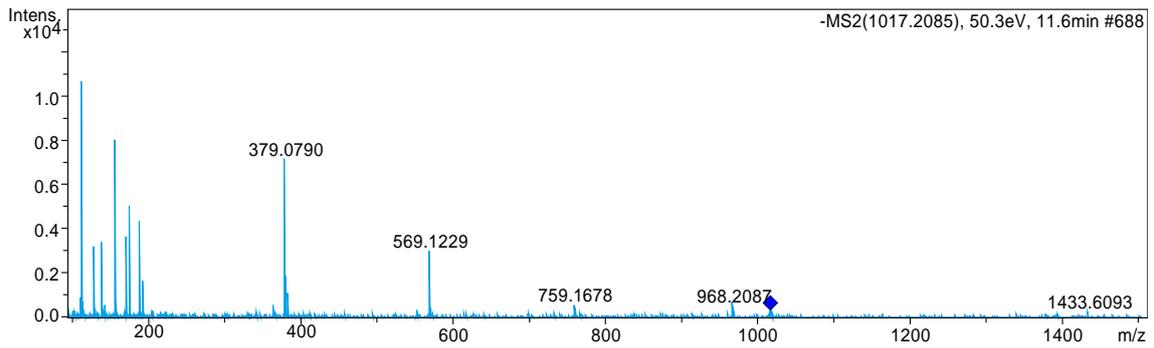
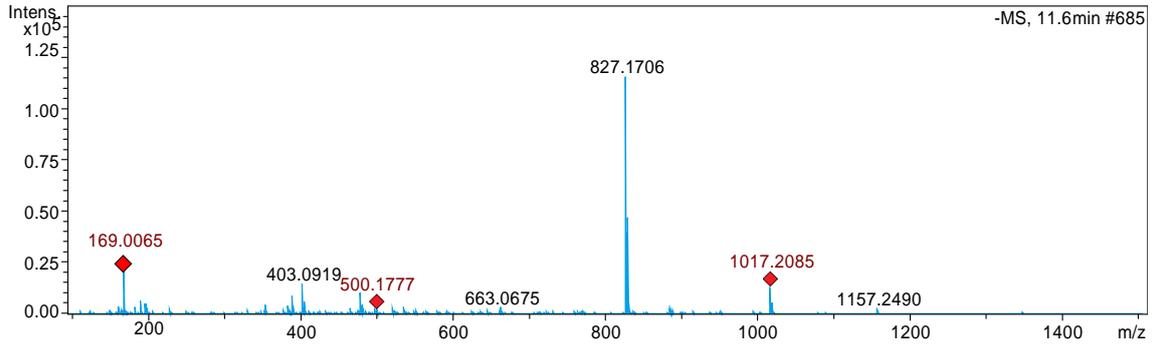
### 3',5,5',7-Tetrahydroxi-4',6-dimetoxiflavona



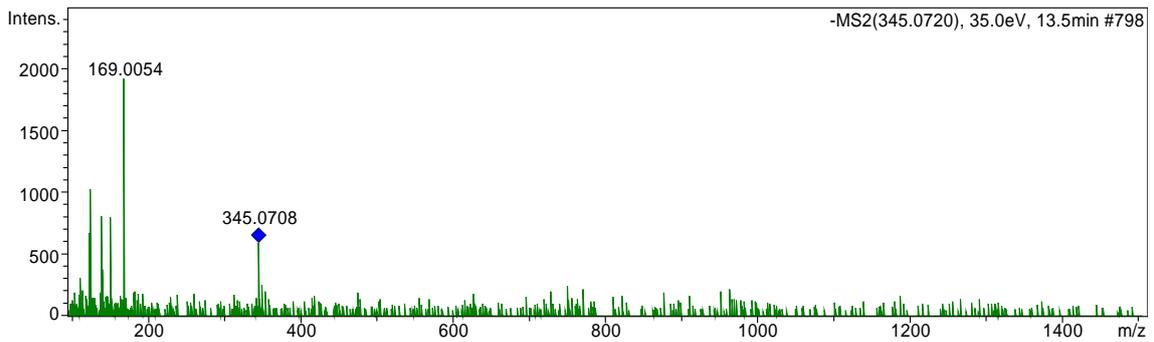
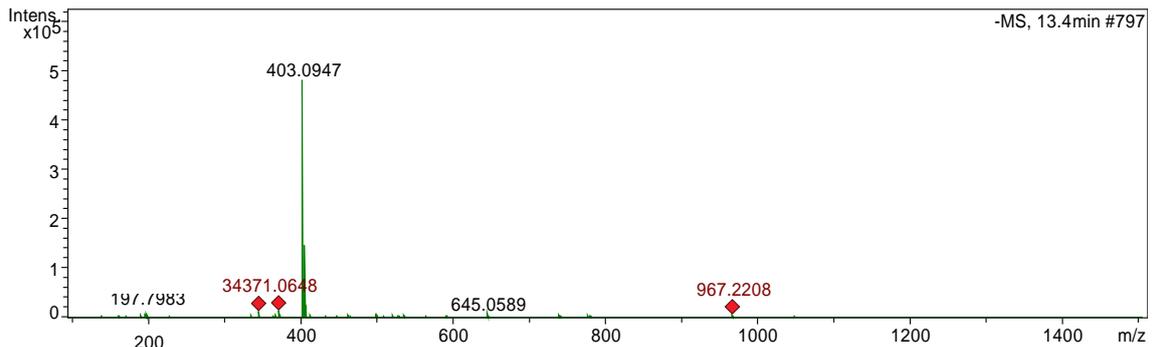
### Ácido Gálico



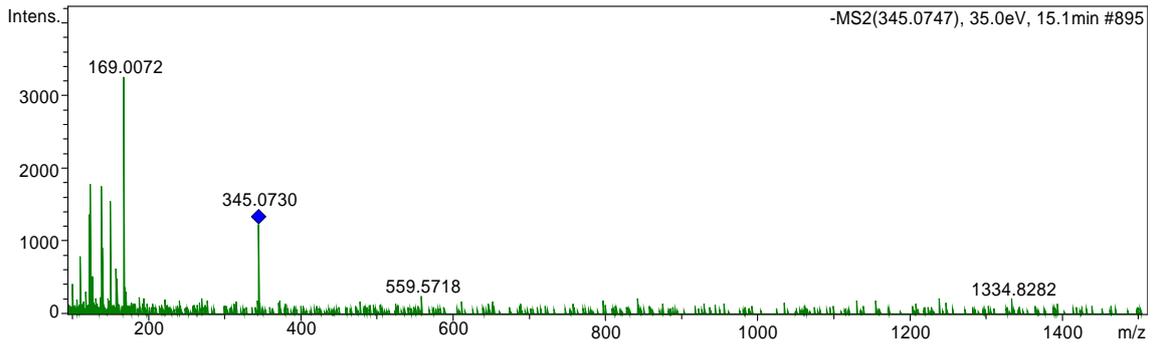
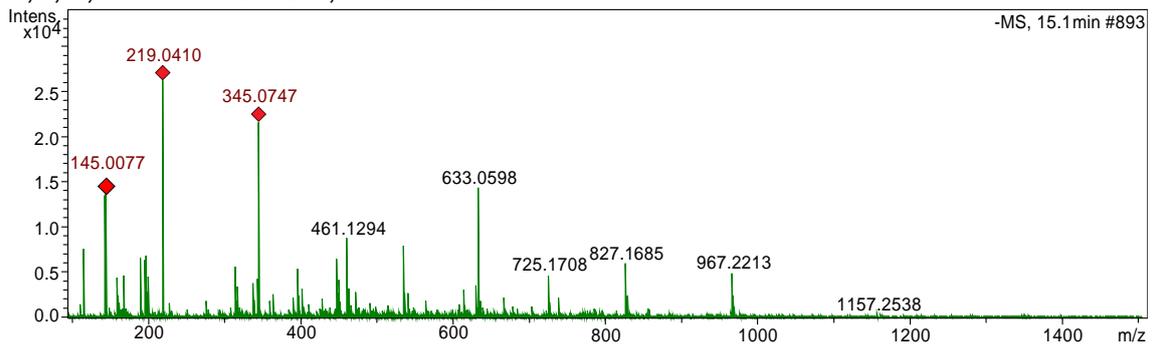
### Epicatequina-(4beta->8)-3-O-galoilepicatequina-(4beta->8)-catequina



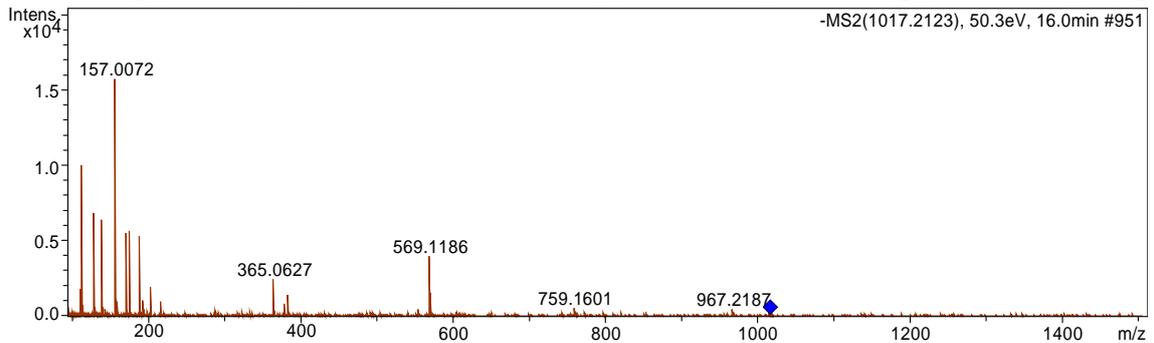
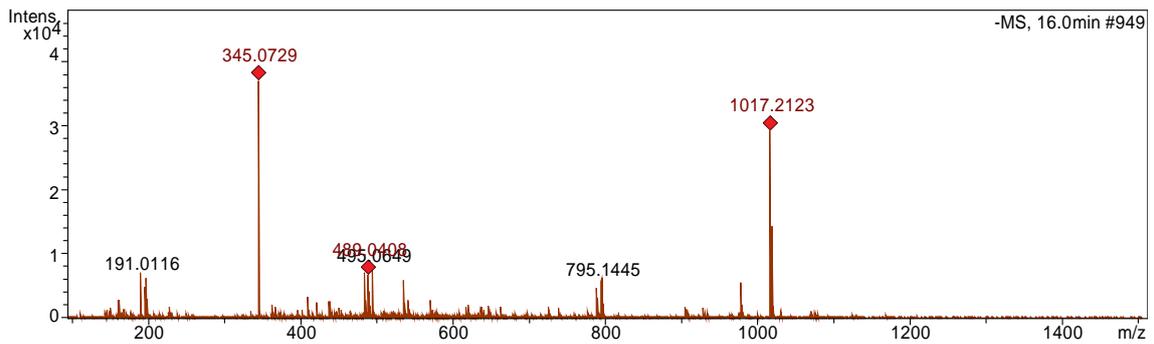
### Laciniatina



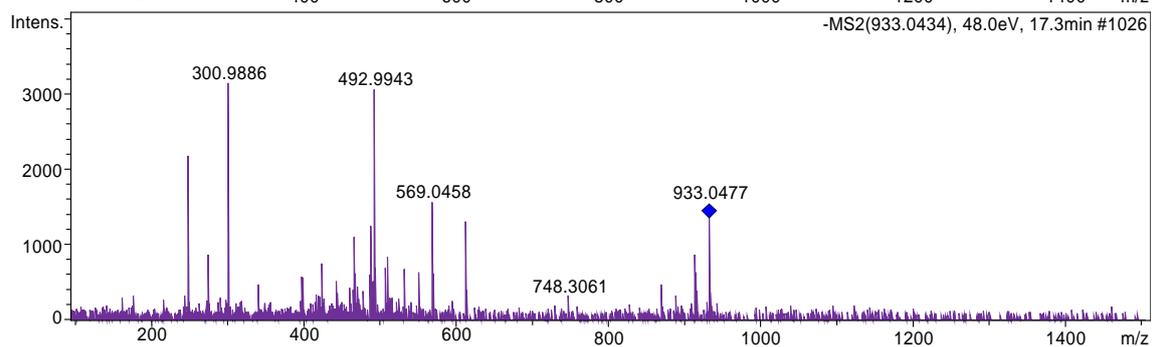
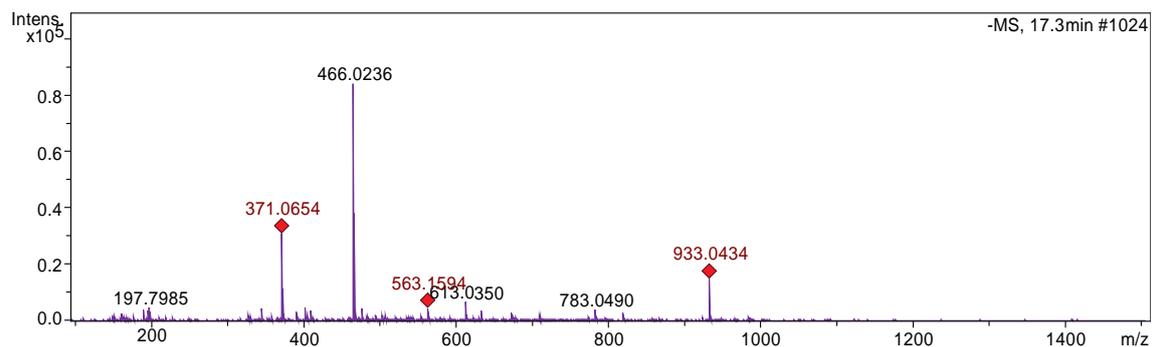
### 5,7,3',4'-Tetrahydroxi-6,5'-dimetoxiflavona



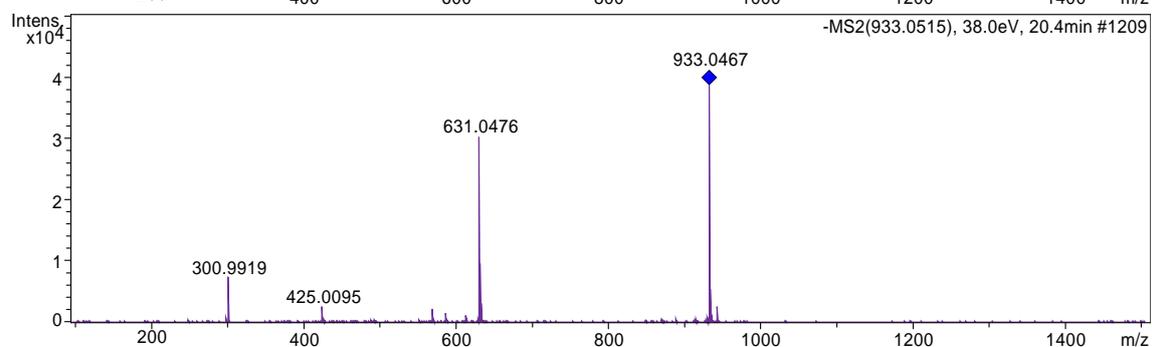
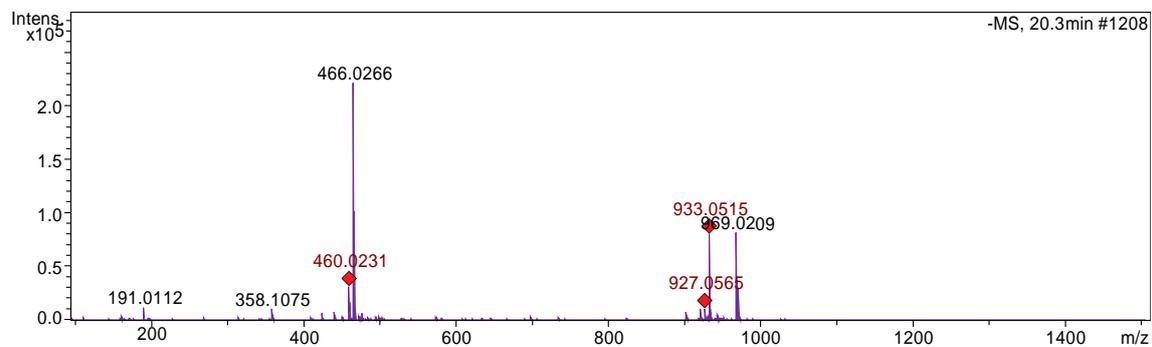
### Epicatequina-(4beta->8)-3-O-galoilepicatequina-(4beta->8)-catequina



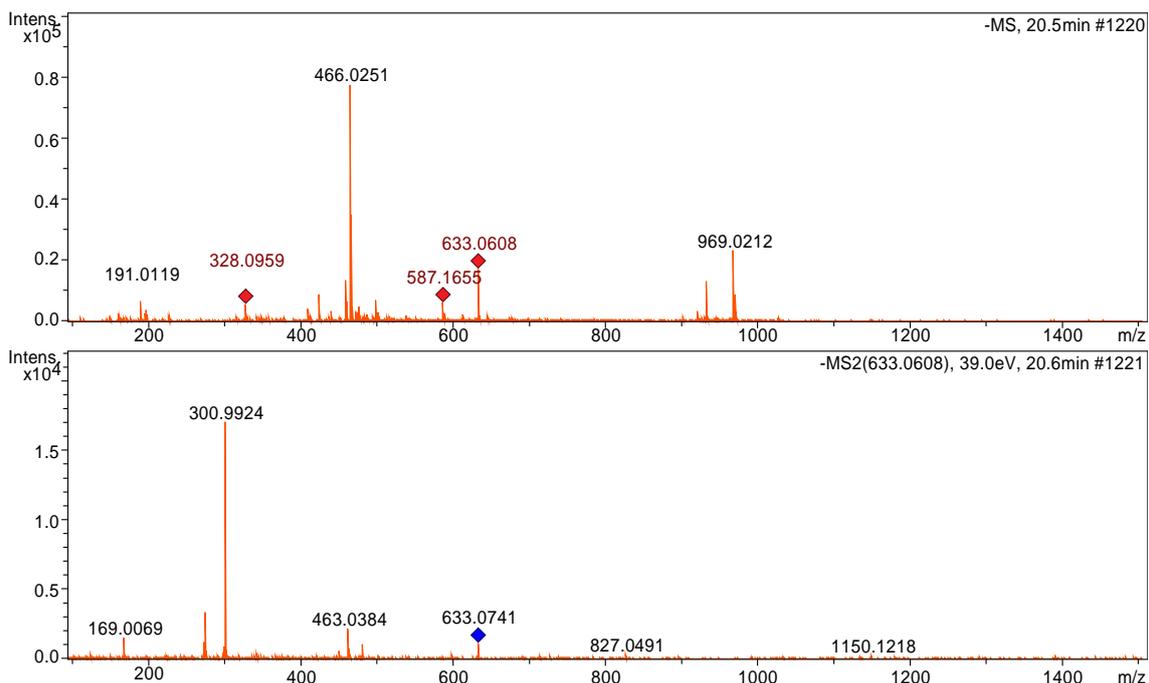
## 2-O-galoilpunicalina 1



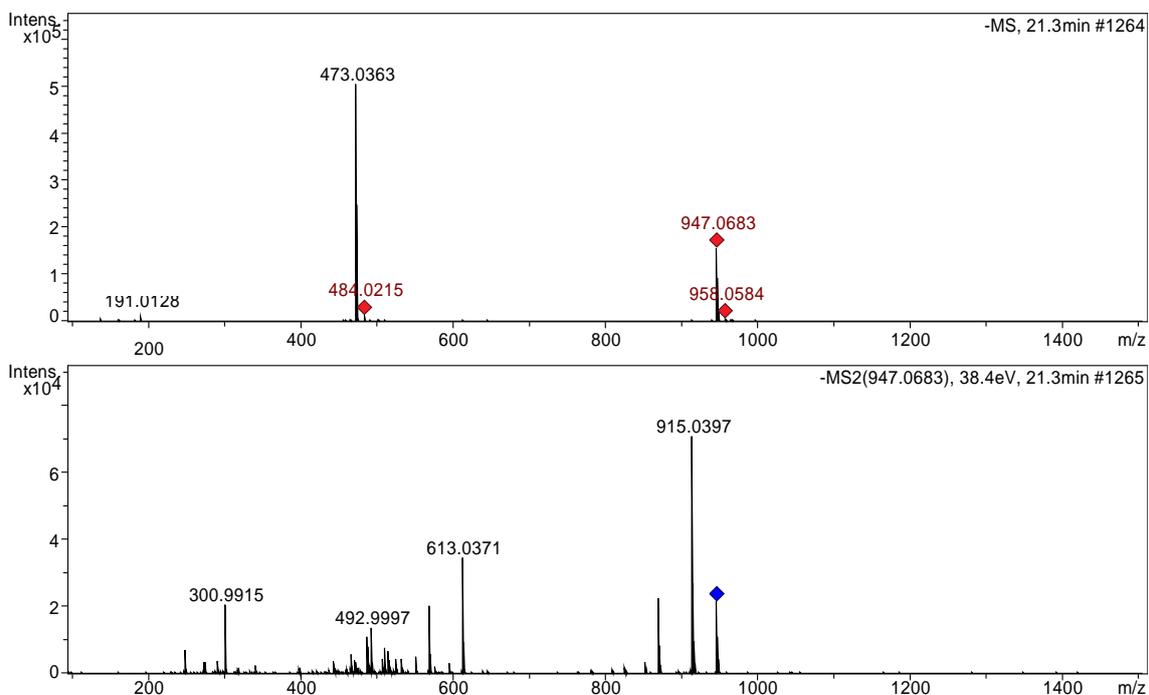
## 2-O-galoilpunicalina 2



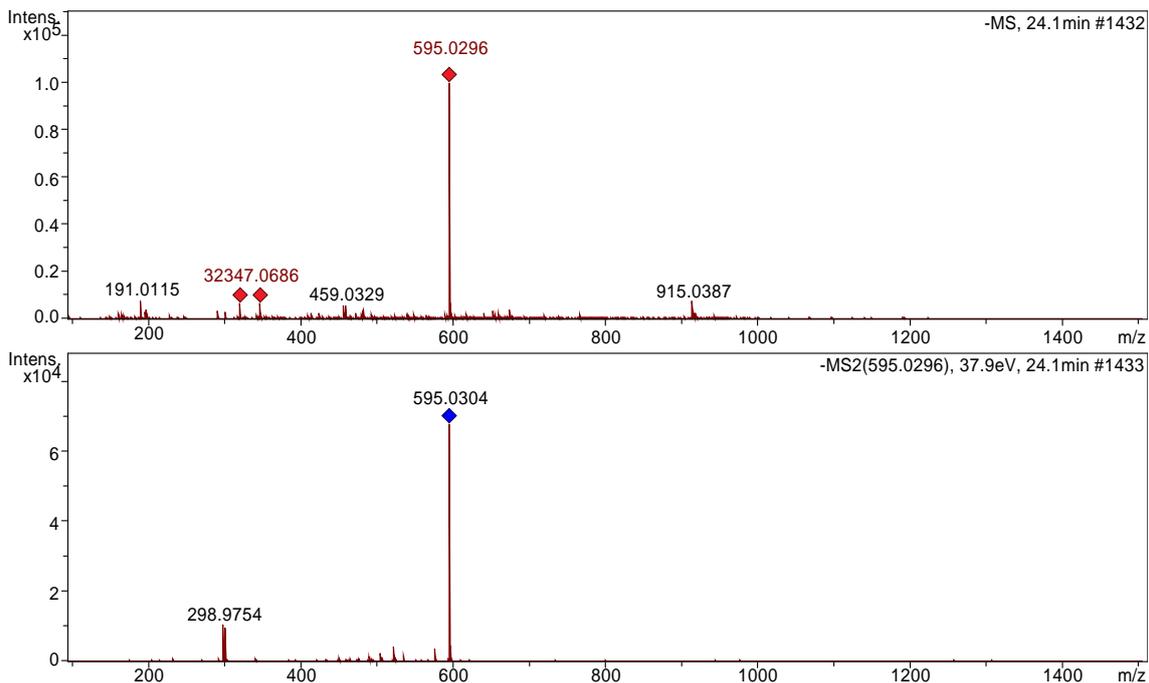
# 1-O-galoi-6-O-luteoil-alfa-glicosídeo



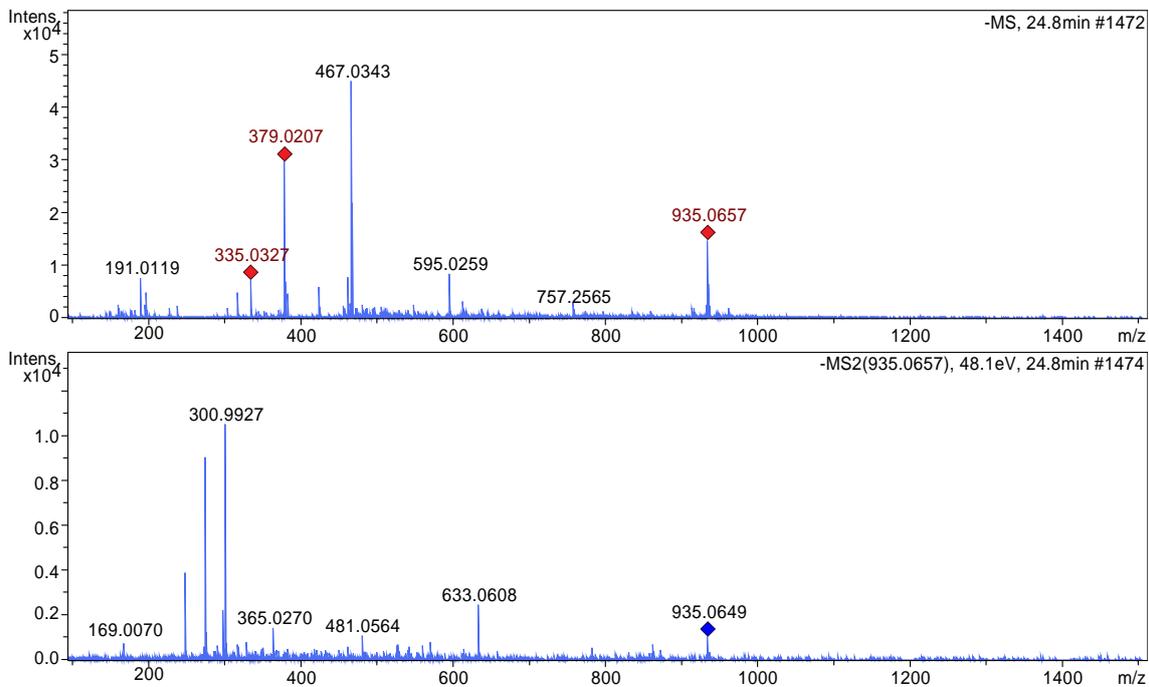
# Metil-álnusina



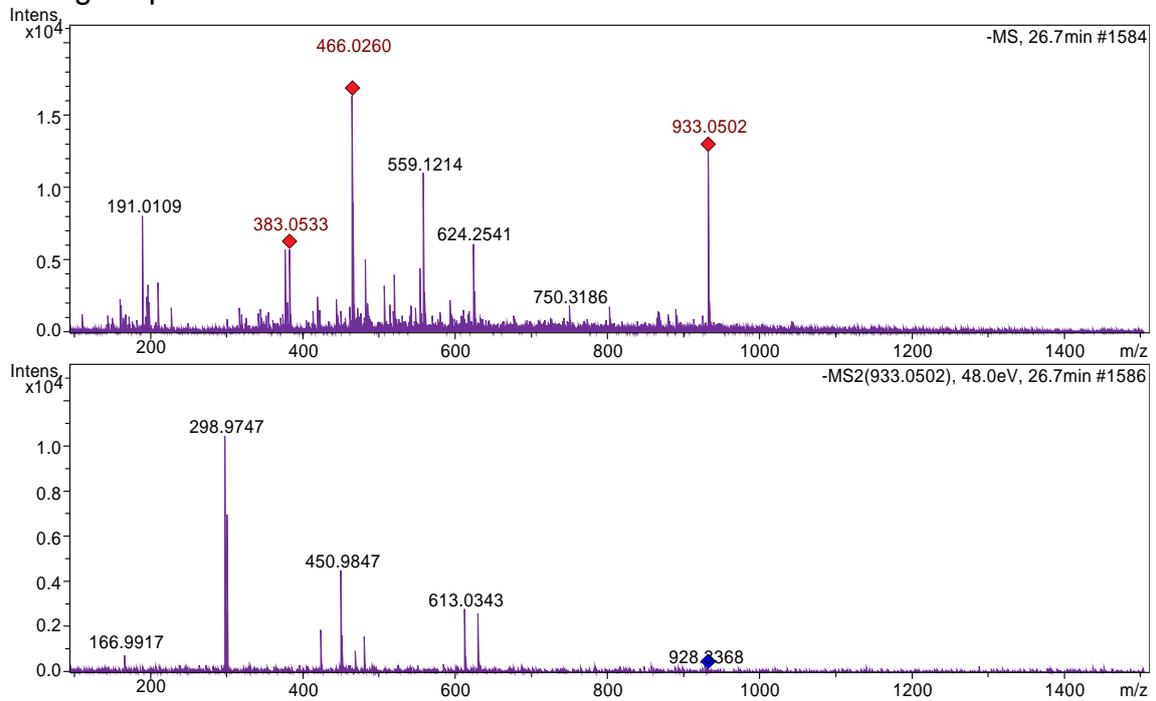
## Ácido Elágico galoil-pentosídeo



## Casuarictina



## 2-O-galoilpunicalina 3



## Ácido Elágico

