

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Stricto sensu* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

KELVIN GOMES PICRO

**Estudo Químico da Casca do Fruto da *Pithecoctenium
crucigerum* (L.) A.H.Gentry (Bignoniaceae)**

ANÁPOLIS – GO
2018

KELVIN GOMES PICRO

**Estudo Químico da Casca do Fruto da
Pithecoctenium crucigerum (L.) A.H.Gentry
(Bignoniaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maísa Borges Costa

ANÁPOLIS - GO

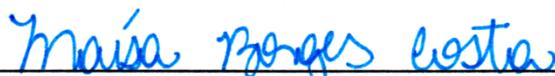
2018

**ESTUDO QUÍMICO DA CASCA DO FRUTO DA *Pithecoctenium crucigerum* (L.)
A.H.GENTRY (BIGNONIACEAE)**

KELVIN GOMES PICRO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 30/11/2018 por:



Prof. Dra. Maísa Borges Costa (Orientadora/UEG)



Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (UEG)



Prof. Dra. Joelma Abadia Marciano (UEG)

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente ao meu avô Francisco Picro, minha mãe e tias que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram no meu potencial, se esforçando para que eu conseguisse atingir meus objetivos e por entenderem meus momentos de ausência e estresse.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maísa Borges Costa, pelo exemplo de professora e por todos os ensinamentos, orientações, oportunidades, incentivos e a amizade. Por me tranquilizar nos momentos mais cruciais, sempre acompanhada de um “Calma Kelvin!”. Obrigado pela confiança e por ser uma segunda mãe.

A todos os professores do PPGQ e da graduação. Levo para sempre os seus ensinamentos.

A todos colegas de laboratório do LabSIMCO e outros laboratórios da UEG, por deixarem os dias de laboratório menos exaustivos. A Prof^a. Dr^a. Luciana Machado e Prof. Dr. Antônio Menezes por me ajudarem nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, por me aceitar como aluno e me dar oportunidades de realizar a minha pesquisa na UFSCar, sempre me orientando e auxiliando no que era necessário.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio pelos experimentos de ressonância magnética nuclear realizados no DQ-UFSCar.

A todos os amigos do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, Alana, Júlia, Carol, Diane, Luis, Marina, Marília, Taynara, Waléria, Luciano R., Dorai, Eli, Wilmer, Ueleton e os demais por transformarem dias tristes em alegres e as tarefas difíceis em fáceis, pelo acolhimento e sempre estarem dispostos a me ajudar. Amizades que levarei para sempre.

Ao Hugo, Alany, Jéssica, Leila, Érika e Flávia, sou extremamente grato pelos ensinamentos, ajuda, tempo cedido, calma e principalmente a amizade, sem vocês não teria um terço dos resultados que eu tenho.

Ao Marco Camillo, Eduardo, Guilherme, Gustavo, Ramos, Felipe e os demais integrantes do time de vôlei de São Carlos, por serem minha distração fora da vida de laboratório.

À minha amiga Laryssa Provensi, por dividir um apartamento e me aguentar durante o tempo de moradia em São Carlos.

À Priscila Gomes, por ser um exemplo de força e por sempre me escutar em todos os momentos que precisei de um ouvido, uma amizade e um café.

À Anna Carolina Evangelista, por não me abandonar em momento algum, sempre disposta a escutar minhas reclamações, sofrendo e comemorando junto, sua amizade é mais que valiosa para a minha essência.

Aos amigos que a vida fez questão de colocar no meu caminho, Rafael, Moacyr, Karyne, José Netto, Gabriel, Wandell, Michael e Júnior. Uma amizade que não se resume só à um fusca e um UNO. Vocês foram e serão essenciais em toda trajetória da minha vida, apoiando e sempre me aconselhando, sem vocês a caminhada seria mais difícil.

Aos amigos do time Vôlei Urban, por serem minha válvula de escape e pela companhia por fazer uma das coisas que mais me dar prazer na vida que é jogar vôlei.

À CAPES, pelo suporte financeiro na realização deste projeto e pelo programa de mobilidade, onde fui capaz de conhecer outro laboratório, agregando conhecimento e resultados ao trabalho.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

Estudos com espécies da família Bignoniaceae possibilitaram o isolamento de diversos compostos com potencial terapêutico. *Pithecoctenium crucigerum* (L.) A.H.Gentry, também conhecida popularmente como “pente-de-macaco”, é uma trepadeira lenhosa, cujo fruto possui uma casca seca e espinhos grossos. As sementes dessa espécie são utilizadas, em alguns grupos étnicos, no tratamento de algumas enfermidades como dores de cabeça e neuragia. Neste trabalho foi desenvolvido um estudo químico com a casca do fruto da *P. crucigerum* para investigação e isolamento de possíveis moléculas bioativas. O material foi coletado na Chácara Taquaral com as coordenadas 16°12'41" S e 49°27'31" W. Foi obtido extratos por maceração da casca: extrato hexânico (E.H), extrato diclorometânico (E.D), extrato acetato (E.A) e extrato hidroalcolico(E.OH). O estudo fitoquímico empregou técnicas cromatográficas para traçar um perfil químico, identificar, isolar e purificar compostos bioativos dos extratos. A triagem fitoquímica realizada nos extratos (E.H, E.D, E.A e E.OH) indicou a presença de taninos, flavonoides, naftoquinonas, terpenos, esteroides, saponinas e alcaloides. Nos extratos E.H e E.D foi possível a identificação de ácidos graxos e terpenos, nos E.A e E.OH e a fração metanólica do E.D, com auxílio da plataforma GNPS identificou-se flavonoides, triterpenos, iridoides, saponina, isocumarina e neolignana. De uma fração proveniente do E.A resultou-se no isolamento e elucidação estrutural de uma flavona, a diosmetina e de dois alcaloides indólicos, o indol-3-carboxaldeido e o indol-3-ácido carboxílico. Da fração do E.OH foi possível isolar e elucidar, o martinósideo, um fenilpropanoide glicolizado. Esse estudo contribuiu para o conhecimento de novas substâncias presentes nessa espécie.

Palavras Chave: *Pithecoctenium crucigerum*, Bignoniaceae, Metabólitos secundários, GNPS, CLAE

ABSTRACT

Studies with species of the family Bignoniaceae allowed the isolation of several compounds with therapeutic potential. *Pithecoctenium crucigerum* (L.) A.H.Gentry, also popularly known as "monkey comb", is a woody vine whose fruit has a dry bark and thick spines. The seeds of this species are used, in some ethnic groups, in the treatment of some diseases such as headaches and neuragia. In this work, a chemical study with the fruit shell of *P. crucigerum* was developed to investigate and isolate possible bioactive molecules. The extracts were obtained by maceration of the bark: hexane extract (EH), dichloromethane extract (ED), acetate extract (E.A) and hydroalcoholic extract (E. OH). The phytochemical study employed chromatographic techniques to trace a chemical profile, identify, isolate and purify bioactive compounds from the extracts. Phytochemical screening in the extracts (E.H, E.D, E.A and E.OH) indicated the presence of tannins, flavonoids, naphthoquinones, terpenes, steroids, saponins and alkaloids. In the extracts E.H and E.D it was possible to identify fatty acids and terpenes in E.A and E.OH and the methanolic fraction of E.D, with the aid of the GNPS platform, flavonoids, triterpenes, iridoids, saponin, isocoumarin and neolignan were identified. From a fraction from E.A resulted in the isolation and structural elucidation of a flavone, diosmetine and two indole alkaloids, indole-3-carboxaldehyde and indole-3-carboxylic acid. From the E.OH fraction it was possible to isolate and elucidate the martynoside, a glycosylated phenylpropanoid. This study contributed to the knowledge of new substances present in this species.

Keywords: *Pithecoctenium crucigerum*, Bignoniaceae, secondary metabolites, HPLC, GNPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>Pithecoctenium crucigerum</i>	16
Figura 2 - Representação das Estruturas químicas de alguns princípios ativos.	18
Figura 3 - Representação estrutural de alguns salicilatos.	19
Figura 4 - Via do ácido acético	22
Figura 5 - Naftoquinonas presentes na família Bignoniaceae	23
Figura 6 - Substâncias isoladas da raiz da espécie <i>Pyrostegia venusta</i>	24
Figura 7 - Casca do fruto “pente-de-macaco”	26
Figura 8 - Iridoides glicosilados isolados do caule da <i>P. crucigerum</i>	27
Figura 9 - Flavonoides isolados da semente do fruto por Casoti (2012)	28
Figura 10 - Metabólitos identificados na semente do Fruto da <i>P. crucigerum</i> por Trevisan e colaboradores.	29
Figura 11 - Cromatogramas TIC dos E.H e E.D	44
Figura 12 - Cromatograma de íons totais (TIC) do E.A e E.OH	47
Figura 13 - Metabólitos identificados através da plataforma GNPS	48
Figura 14 - Cromatograma da F.AcOEt 6 com a programação de coleta.	52
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H do composto F.A 6-1 (600 MHz, MeOD - d4)	53
Figura 16 - Expansões da região aromática e olefínica espectro de RMN ¹ H para a F.A 6-1 (600 MHz, MeOD - d4)	54
Figura 17 - Principais correlações observadas no gHMBC do F.A 6-1	54
Figura 18 - Espectro de RMN ¹ H do composto F.A 6-2 (600 MHz, MeOD - d4)	56
Figura 19 - Expansões da região aromática e olefínica espectro de RMN ¹ H para a F.A 6-2 (600 MHz, MeOD - d4)	57
Figura 20 - Principais correlações observadas no gHMBC do F.A 6-2	58
Figura 21 - Espectro de RMN ¹ H do composto F.A 6-3 (600 MHz, MeOD - d4)	59

Figura 22 - Expansões da região aromática e olefínica espectro de RMN ¹ H para a F.A 6-3 (600 mHz, MeOD - d4)	60
Figura 23 - Principais correlações observadas no gHMBC do F.A 6-3	60
Figura 24 - Programação para a purificação da F.OH 20-21.....	62
Figura 25 - Representação do espectro de RMN ¹ H para o composto C.OH 1 (500 mHz, 500 MHz, MeOD - d4).....	63
Figura 26 - Representação da expansão da região aromática e olefínica do espectro de RMN ¹ H para o composto C.OH 1 (500 mHz, 500 MHz, MeOD - d4)	63
Figura 27 - Representação da expansão da região de OCH ₃ , OCH ₂ , CH ₂ e H anomérico do espectro de RMN ¹ H para o composto C.OH1 (500 mHz, MeOD - d4)	64
Figura 28 - Principais correlações observadas no gHMBC do C.OH 1	65
Figura 29 - Mapas de contorno HSQC do composto F.A 6-1	73
Figura 30 - Mapas de contorno HMBC do composto F.A 6-1	73
Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução (MS/MS) do composto F.A 6-1 com o íon precursor de 323.19 [2M + H] ⁺	74
Figura 32 - Mapa de contorno Cosy do composto F.A 6-2.....	74
Figura 33 - Mapas de contorno HSQC do composto F.A 6-2.....	75
Figura 34 - Mapas de contorno HMBC do composto F.A 6-2.....	75
Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução (MS/MS) do composto F.A 6-2 com o íon precursor de 293.14 [2M + H] ⁺	76
Figura 36 - Mapas de contorno HSQC do composto F.A 6-3.....	76
Figura 37 - Mapas de contorno HMBC do composto F.A 6-3.....	77
Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução EM/EM do F.A 6-3, íon precursor <i>m/z</i> 301.06.	77
Figura 39 - Mapas de contorno HSQC do composto C.OH 1	78
Figura 40 - Mapas de contorno de HMBC do composto C.OH 1.....	78
Figura 41 - Espectro de massas de alta resolução EM/EM do C.OH 1, íon precursor <i>m/z</i> 653.51.	79

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Esquema de obtenção dos extratos.....	36
Fluxograma 2 - Procedimento cromatográfico para a partição do E.A.	39
Fluxograma 3 - Esquema do fracionamento do E.OH.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa dos extratos obtidos.....	42
Tabela 2 - Resultado da triagem fitoquímica realizada nos extratos	43
Tabela 3 - Compostos identificados do E.H por CG/EM	45
Tabela 4 - Compostos identificados do E.DC por CG/EM.....	45
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do F.A 6-1 (600 MHz, MeOD - d4).....	55
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do F.A 6-2 (600 MHz, MeOD - d4).....	58
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do F.A 6-3 (600 MHz, MeOD - d4).....	61
Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do C.OH 1 (500 MHz, MeOD - d4) comparados com Pendota (2015).....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características de alguns princípios ativos	20
Quadro 2 - Ações biológicas de algumas espécies da família Bignoniaceae...	25
Quadro 3 - Sistema de eluição e revelação da CCD.....	37
Quadro 4 - Método gradiente para a F.A 6.....	40
Quadro 5 - Gradiente para a F.OH 20-21.....	41
Quadro 6 - Metabólitos identificados da <i>P. crucigerum</i> através da combinação de redes moleculares - GNPS e EM/EM no modo positivo	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C-18	Octadecilsilano
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DDA	Aquisição dependente de dados
DQ/UFSCar	Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos
E.A	Extrato acetato da casca do fruto
E.D	Extrato diclorometânico da casca do fruto
E.H	Extrato hexânico da casca do fruto
E.OH	Extrato hidroalcolico da casca do fruto
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas/espectrometria de massas
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
IQ/UFG	Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOD- <i>d</i> 4	Metanol deuterado
QTOF	Acoplamento do quadrupolo ao analisador por tempo de voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TIC	Cromatograma de íons totais
UEG	Universidade Estadual de Goiás

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 - PRODUTOS NATURAIS	17
2.2 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	19
2.3 - FAMÍLIA BIGNONIACEAE.....	21
2.3.1 - <i>Pithecoctenium crucigerum</i>	25
2.4 - TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS e espectrômtricas	29
3 - OBJETIVOS	32
3.1 - OBJETIVO GERAL	32
3.2 - OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S).....	32
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 - COLETA, IDENTIFICAÇÃO E SECAGEM.....	35
4.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	35
4.3 - TRIAGEM FITOQUÍMICA	36
4.4 - ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA	37
4.5 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETANO (E.D)	38
4.6 - ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO	38
4.7 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ACETATO (E.A).....	39
4.7.1 - Purificação da F.A 6	39
4.8 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (E.OH)	40
4.8.1 - Purificação da F.OH 20-21	41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	42
5.2 - TRIAGEM FITOQUÍMICA	42
5.3 - ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CG-EM	43

5.4 - IDENTIFICAÇÃO POR UPLC-QTOF	46
5.5 - PURIFICAÇÃO DA F.A 6.....	52
5.5.1 - Elucidação estrutural do F.A 6-1.....	53
5.5.2 - Elucidação estrutural do F.A 6-2.....	55
5.5.3 - Elucidação estrutural do F.A 6-3.....	58
5.6 - PURIFICAÇÃO DA F.OH 20-21.....	61
5.6.1 - Elucidação estrutural do C.OH 1	62
6 - CONCLUSÃO	67
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICE.....	73

1 - INTRODUÇÃO

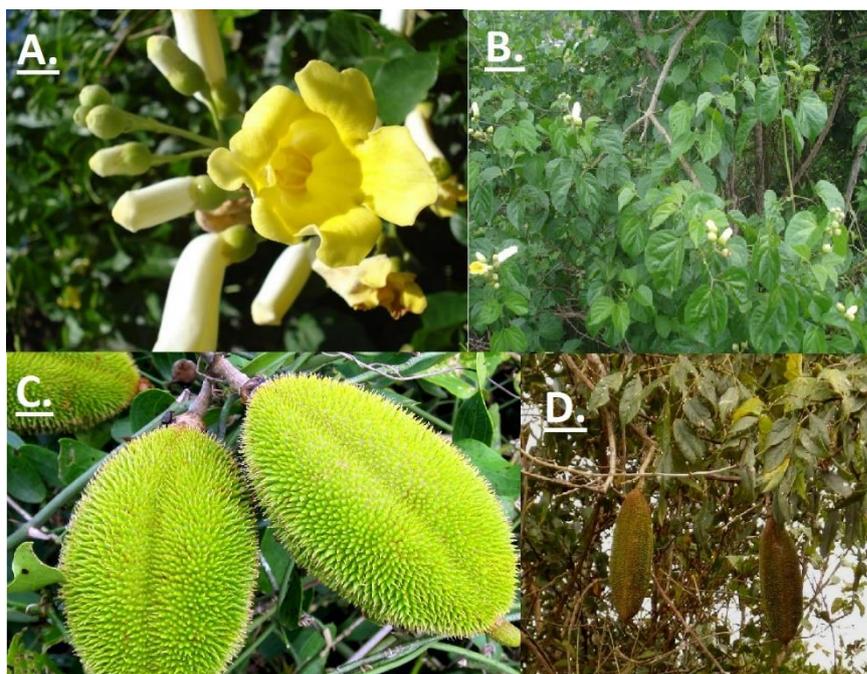
Os produtos naturais são utilizados na medicina desde a antiguidade como remédios para a cura de enfermidades e para a alimentação, simbolizando o único recurso de muitas comunidades e grupo étnicos (ARGENTA et al., 2011). São importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos é desenvolvida a partir de produtos naturais ou por síntese química dos mesmos. Com sua grande biodiversidade, o Brasil é uma das principais fontes dessas substâncias (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

As plantas sintetizam dois grupos de compostos, os metabólitos primários e os secundários. Os metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especiais, são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas (LOPEZ, 2006; GOTTLIEB; BORIN, 2012). Com o desenvolvimento das técnicas analíticas, foi possível separar e elucidar diversos metabólitos especiais, sendo estes utilizados na síntese de fármacos (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Algumas famílias botânicas se destacam pelos componentes isolados e pelo seu uso na medicina popular, um exemplo é a família Bignoniaceae, com destaque em sua espécie *Pithecoctenium crucigerum* (L.) A.H.Gentry.

Pithecoctenium crucigerum, com sinônimo de *Amphilophium crucigerum*, também conhecida como “pente-de-macaco” (Figura 1), é uma trepadeira lenhosa, com gavinhas robustas. Seu tronco (cipós) pode chegar a 10 cm de diâmetro, as flores são tubulosas de cor branco-amareladas. Os frutos são secos e tem a casca coberta por espinhos grossos, por isso a denominação popular (CARNEIRO, 2010;CASOTI; MANFRON; DE OLIVEIRA, 2016).

Figura 1 - Espécie *Pithecoctenium crucigerum*.



Legenda: A. (Flor); B. (Ramo); C. (Detalhe do Fruto); D. (Fruto).

Fonte (CARNEIRO, 2010).

Utilizada na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades como: dores de cabeça, inflamações, picadas de cobras, entre outras (BYE, 1979; ANKLI, 2000; FRANCO; FONTANA, 2005; GONZÁLEZ, 2014)

Poucos são os estudos relacionados a esta espécie, dentre os quais destacam-se alguns estudos fitoquímicos. Von Poser e colaboradores (2000) isolaram iridoides glicosilados do caule (LINO VON POSER et al., 2000; MARTIN et al., 2007). Casoti (2012) isolou dois flavonoides da semente do fruto, e De Prá e colaboradores (2016) identificaram alguns metabólitos secundários presentes na semente como iridoides, flavonoides, antraquinona e fenilpropanoides, por espectrometria de massas.

Com a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos, e um maior conhecimento sobre a espécie *P. crucigerum* este trabalho tem como objetivo, o estudo químico da casca do fruto desta espécie, visando à identificação de metabólitos secundários com potencial atividade biológica.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - PRODUTOS NATURAIS

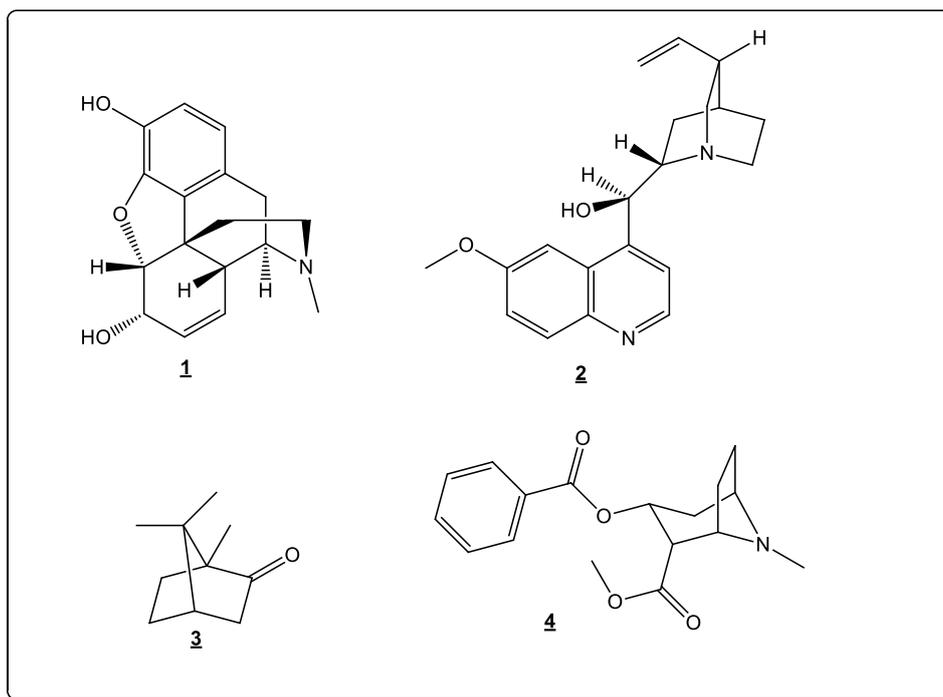
Os produtos naturais são uma das principais fontes químicas, comumente utilizados como materiais de partida para produtos farmacêuticos, defensivos agrícolas, entre outros. Proporcionam assim alternativas para a química medicinal, como síntese de novos análogos e descoberta de novas moléculas aplicáveis (KIRST, 2010; MISHRA; TIWARI, 2011).

A busca por fármacos oriundos de plantas é orientada por uma seleção criteriosa para a escolha das espécies que serão empregadas no estudo científico. Esta escolha é determinada por fatores que incluem desde uma escolha aleatória, com um gênero ou família específica, ou até mesmo pelo seu uso terapêutico já conhecido (LOPEZ, 2006). Os estudos envolvidos têm como objetivo, a descoberta de moléculas aplicáveis na síntese de fármacos (BRAZ FILHO, 2010).

Em algumas regiões, os produtos naturais são empregados em grande escala, sendo às vezes o único recurso terapêutico. Muitas espécies de plantas medicinais contêm moléculas bioativas que podem ser utilizadas como fitofármacos. Por esse motivo, são bastante comercializadas em feiras, na forma *in natura* ou como produtos derivados, tendo um valor mais acessível às pessoas de classes desfavorecidas economicamente (MACIEL et al., 2002; ARGENTA et al., 2011).

As plantas medicinais beneficiaram e ainda beneficiam a sociedade, credenciadas apenas pelo seu uso na terapêutica tradicional ao longo do tempo (FERREIRA; PINTO, 2010). Com os primeiros estudos sobre as plantas medicinais conseguiu-se isolar alguns princípios ativos eficazes, que são até hoje utilizados no tratamento de certas doenças, como por exemplo, a morfina **1**, quinina **2**, cânfora **3** e cocaína **4** (Figura 2) (MONTANARI; BOLZANI, 2001; COSTA, 2009).

Figura 2 - Representação das Estruturas químicas de alguns princípios ativos.

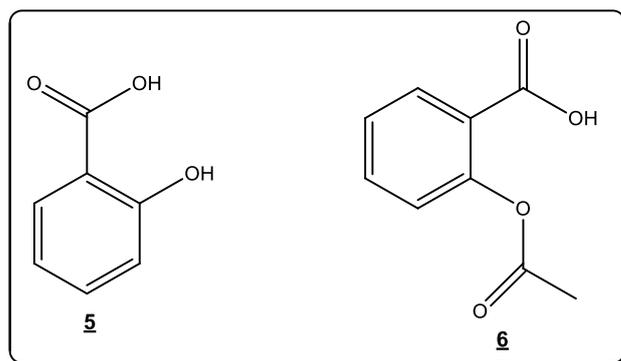


O isolamento de princípios ativos foi um passo decisivo para a criação da indústria farmacêutica. Os produtos naturais se constituíram na principal fonte de insumos para a preparação de medicamentos (COSTA, 2009). A identificação e isolamento de novos princípios ajuda a medicina na obtenção de protótipos para novos fármacos.

Inicialmente, os estudos com produtos naturais eram relacionados a um maior entendimento das plantas já utilizadas popularmente. Entretanto, este fator limitava o conhecimento de novas substâncias ativas (VIEGAS JR et al., 2006).

Com a importância das plantas para a medicina da época, houve uma aproximação das duas áreas, química e a medicina, o que tornou possível novas pesquisas para um amplo conhecimento de novas substâncias ativas, até hoje empregadas em medicamentos. Um marco importante para o desenvolvimento dos fármacos oriundos de produtos vegetais, foi o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix alba*, que posteriormente gerou o ácido salicílico **5** e, o ácido acetilsalicílico (AAS) **6** (Figura 3) (VIEGAS JR et al., 2006).

Figura 3 - Representação estrutural de alguns salicilatos.



O AAS 6, conhecido como aspirina, possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (COUTINHO et al., 2009), e foi o primeiro fármaco sintético resultante de uma modificação estrutural do ácido salicílico, através de reação de acetilação (VIEGAS JR et al., 2006).

A Aspirina® marcou o desenvolvimento de protótipos de fármacos e/ou fitofármaco, patenteado por uma grande indústria Alemã (Bayer) (BARREIRO; BOLZANI, 2009). As indústrias com desejos sociais e econômicos, reativaram interesses nos organismos vegetais para a produção de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas (BRAZ FILHO, 2010). Intensificaram buscas principalmente pelas substâncias com estruturas moleculares complexas, de difícil obtenção por processo sintético de baixo custo. Com o desenvolvimento dos métodos analíticos de separação e elucidação de novas substâncias químicas, foi possível identificar um número grande de metabólitos secundários (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

2.2 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem produtos químicos, os quais podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro grupo, os metabólitos primários, são macromoléculas essenciais às plantas, com funções vitais definidas, nesse grupo se encontram os lipídeos, protídeos e glicídeos. O segundo grupo, os metabólitos secundários, são micromoléculas que apresentam estruturas complexas e com variadas atividades biológicas (importantes para a área farmacêutica). Estes metabólitos secundários possuem funções variadas, como

por exemplo, defensivos da planta contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra os raios UV e a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (KREIS et al., 2017) .

Nos metabólitos secundários encontra-se variados princípios ativos, podendo ou não ser tóxicos. Alguns princípios ativos identificados são os alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, quinonas, lignanas, iridoides e óleos essenciais (Quadro 1) (LOPEZ, 2006; TUNDIS et al., 2008; SIMÕES et al., 2017).

Quadro 1 - Características de alguns princípios ativos

Princípio Ativo	Propriedades
<i>Alcaloides</i>	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais.
<i>Flavonoides</i>	Anti-inflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, antiedematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano.
<i>Taninos</i>	Adstringente e antimicrobiano (antidiarreico). Precipita proteínas
<i>Saponinas</i>	Apresentam frequentemente ação antifúngica e hipocolesterolemiantes
<i>Quinonas</i>	Atividades laxantes
<i>Lignanas</i>	Propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, antifúngica, antiviral, anticonvulsivante, antiespasmódica, antialérgica, entre outras.
<i>Iridoides</i>	Propriedades antimicrobianas e antifúngicas
<i>Óleos essenciais</i>	Bactericida, antiviral, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante e antiespasmódico.

Fonte: Adaptada de: (LOPEZ, 2006; TUNDIS et al., 2008; SIMÕES et al., 2017).

Alguns fatores podem variar a coordenação ou a taxa de produção dos metabólitos secundários, sendo estes a sazonalidade, índice pluviométrico, radiação UV, ritmo circadiano, composição atmosférica, temperatura, altitude, idade, entre outros. Estes fatores podem afetar na condição final dos metabólitos, sendo necessário um estudo para a determinação da época e condição de cultivo e a coleta da planta para ter uma concentração desejada e significativa do princípio ativo (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Esses princípios ativos são de grande importância para a terapêutica, por esse fator, estudos fitoquímicos vêm sendo realizados em plantas medicinais, especialmente em algumas famílias, por exemplo, a família Bignoniaceae que apresenta ocorrência de alguns metabólitos secundários com diversas atividades biológicas.

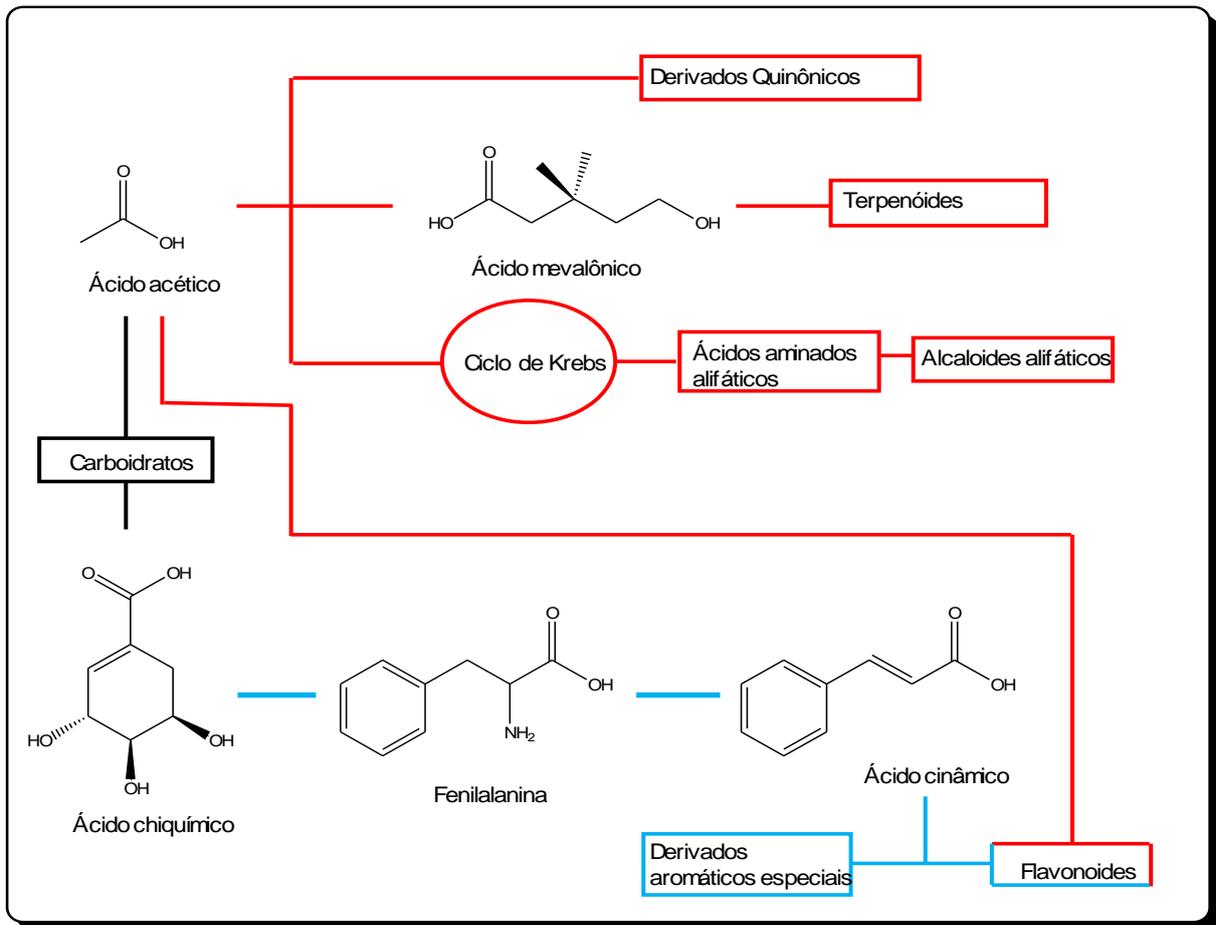
2.3 - FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae engloba cerca de 82 gêneros e 827 espécies, é encontrada principalmente na África e América do Sul. A família é dividida em oito tribos Tecomeae, Bignonieae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Tourrettieae, Oroxyleae, Coleeae e Schlegelieae. Sendo que apenas as três primeiras são encontradas no Brasil, facilmente identificadas pelo habitat e a estrutura dos frutos (MARTIN et al., 2007; CIPRIANI et al., 2012).

Os jacarandás [*Jacaranda brasiliana* (Lam.) Pers.] e ipês amarelo e roxo [*Tabebuia alba* (Cham.) Sandwith e *Tabebuia avellanedae* (Lor. ex Griseb.) Speg.] são os exemplos mais conhecidos da família Bignoniaceae. No Brasil, as plantas desta família ocorrem desde o norte até o sul do país, não dispendo de um único habitat, são encontradas no Cerrado, Mata Atlântica e região Amazônica (PAULETTI; DA SILVA BOLZANI; YOUNG, 2003).

O perfil químico dessa família baseia-se na ocorrência de quinonas, terpenoides, derivados aromáticos especiais e flavonoides. A biossíntese de seus metabólitos especiais está principalmente baseada na via do ácido acético (Figura 4) (CIPRIANI et al., 2012).

Figura 4 - Via do ácido acético

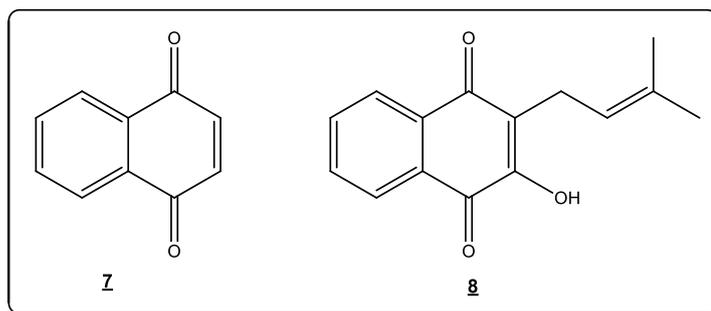


Linha vermelha: rota do acetado; Linha azul: rota do chiquimato.

Fonte: Adaptada de: (CIPRIANI, 2006)

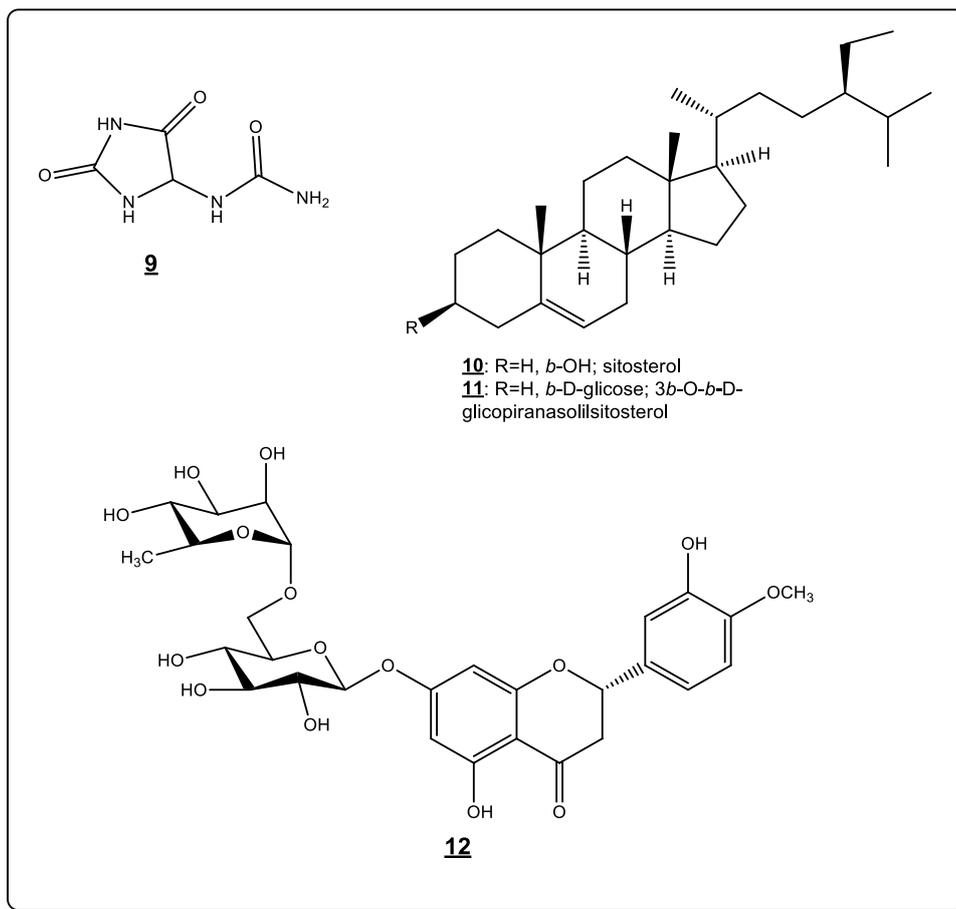
As naftoquinonas são substâncias químicas com mais evidências nessa família, apresentando várias atividades biológicas. Derivado da naftoquinona **7**, o lapachol **8** (Figura 5), ocorre em várias espécies da família e possui propriedades antitumoral, antiúlcera, antimicrobiana, anti-inflamatória, antimalárica, cercaricida e analgésica (MAZZA et al., 2000).

Figura 5 - Naftoquinonas presentes na família Bignoniaceae



Estudos envolvendo a espécie *Pyrostegia venusta* revelaram a presença de fenóis livres e grupos siringila, no qual no extrato bruto etanólico das raízes, foi possível identificar quatro substâncias em base de dados espectrais, como alantoina **9**, os esteroides β -sitosterol **10** e 3β -O- β -D-glicopiranosilsterol **11** e a flavanona hesperidina **12** (Figura 6). Com base nas substâncias isoladas, a raiz dessa planta é utilizada para o tratamento de vitiligo (FERREIRA et al., 2000).

Figura 6 - Substâncias isoladas da raiz da espécie *Pyrostegia venusta*



Várias espécies dessa família vêm sendo estudadas, visando propriedades biológicas. Uma revisão feita por Arruda (2009), detalhou as propriedades de algumas espécies, revisadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Ações biológicas de algumas espécies da família Bignoniaceae

Espécies	Ação Farmacológica
<i>Tecoma impetiginosa</i> Mart.	Atividade adstringente, diurética e anticancerígena
<i>Arrabidaea samydoides</i> (Cham.) Sandwith	Atividade antioxidante
<i>Catalpa catalpa</i> (L.) H. Karst.	Atividade anti-inflamatória
<i>Jacaranda decurrens</i> Cham.	Propriedades anti-infecciosas e depurativas do sangue
<i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) DC.	Usada como “amargo” no tratamento de dispepsias
<i>Kigelia africana</i> (Lam.) Benth.	Atividade contra <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Tabebuia avellanedae</i> var. paulensis Toledo	Adjuvante na terapia do câncer
<i>Pseudocalymma elegans</i> (Vell.) Kuhlm.	Paralisia muscular
<i>Martinella obovata</i> (Kunth) Bureau & K.Schum.	Atividades febrífuga e adstringente
<i>Jacaranda micrantha</i> Cham.	Atividade antirreumática
<i>Jacaranda obtusifolia</i> subsp. rhombifolia (G.F.W. Meyer) A.H. Gentry	Antissifilítica
<i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stellfeld ex de Souza	Antidepressiva, anti-infecciosa e vasodilatadora

Fonte: Adaptado de: (ARRUDA, 2009)

2.3.1 - *Pithecoctenium crucigerum*

Pithecoctenium crucigerum, sinônimo *Amphilophium crucigerum*, conhecida popularmente como “pente-de-macaco”, pertence à família Bignoniaceae. Uma trepadeira lenhosa, com flores tubulosas de cor branco-amareladas e podem chegar a 7 cm de comprimento. Facilmente reconhecida por apresentar gavinha ramificada 2 vezes. Os frutos são secos, com a casca coberta por espinhos grossos (Figura 7), por isso a denominação de “pente-de-macaco”. Encontrada em todo território brasileiro, não sendo uma espécie endêmica do Brasil (CARNEIRO, 2010; LOHMANN, 2015).

Figura 7 - Casca do fruto “pente-de-macaco”.



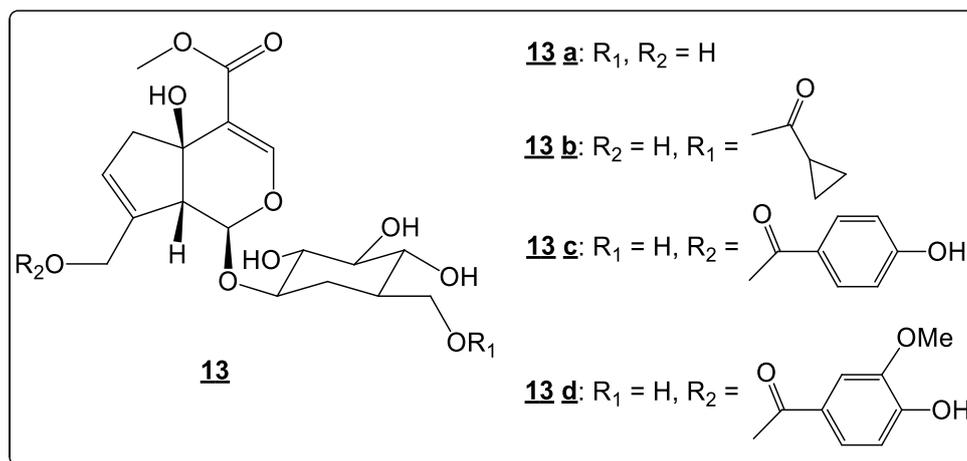
Fonte: Daniel Grasel - Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina

O primeiro relato medicinal dessa espécie foi descrito em uma coleção etnobotânica de 1978, de uma cidade do México (San Luis Potosi). Nela descreve-se que sementes, quando associadas a pedaços circulares de pele de cobra e posicionadas sobre as têmporas, eram utilizadas para alívio de dores de cabeça, além de serem comercializadas no mercado municipal com o nome popular de "goma de CastiUa" (BYE, 1979). De acordo com a medicina popular do povo Maia situado na Península de Iucatã, o caule e semente em pó junto com outras ervas são utilizados no tratamento local de picada de cobras (ANKLI, 2000).

Em um estudo etnofarmacológico realizado no Panamá, a *P. crucigerum* é utilizado na medicina popular para tratar dor de cabeça, dor nos olhos, febre e neuralgia (GONZÁLEZ, 2014). No Brasil, infusão das sementes e por uso oral é utilizada no tratamento do reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, depurativo e calmante (FRANCO; FONTANA, 2005).

Estudos fitoquímicos e de atividades biológicas realizados com essa espécie são poucos. Em levantamento bibliográfico, pode se destacar alguns estudos. Von Poser e colaboradores (2000) isolaram iridoides glicosilados **13** (Figura 8) do caule, e o extrato bruto metanólico e a fração diclorometânica, do mesmo, apresentaram atividades antioxidantes (MARTIN et al., 2007).

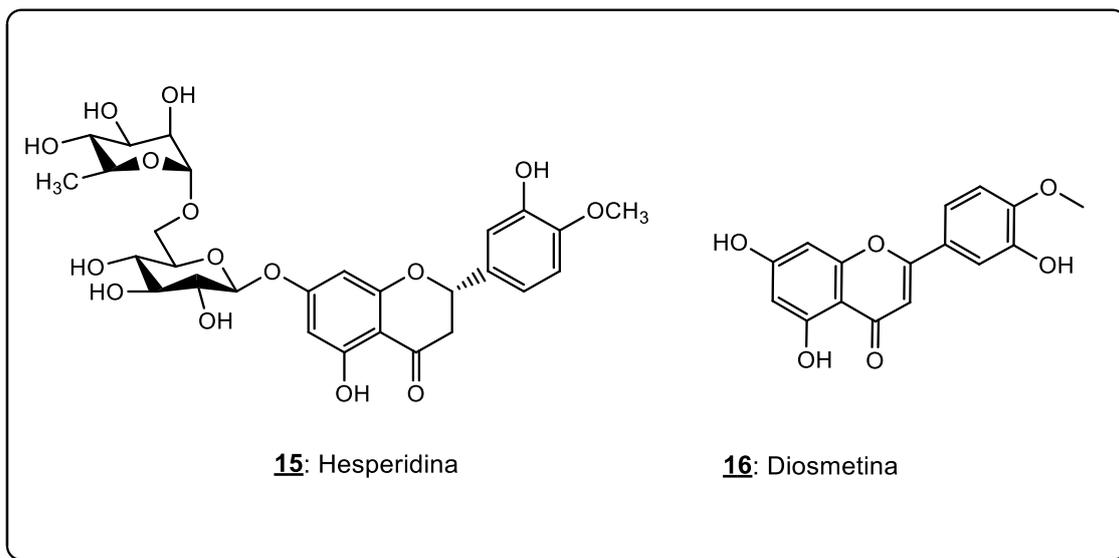
Figura 8 - Iridoides glicosilados isolados do caule da *P. crucigerum*.



Fonte: (MARTIN et al., 2007).

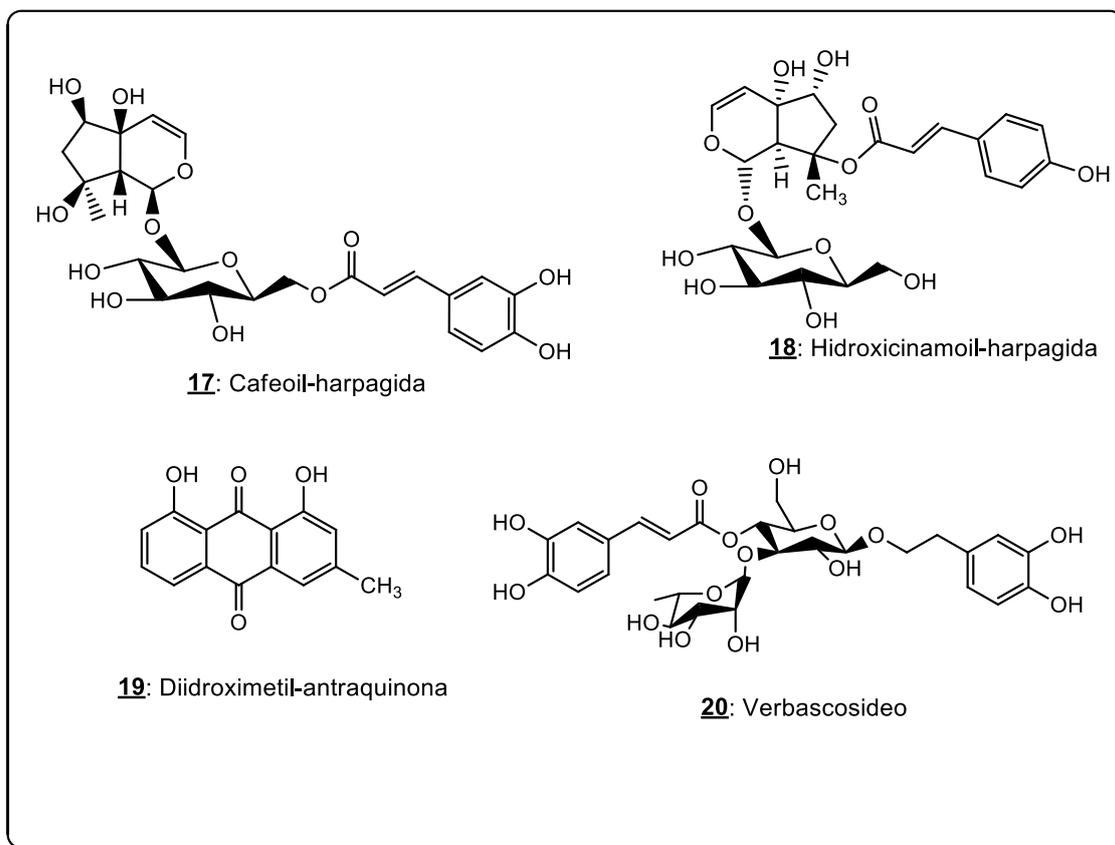
Casoti (2012) isolou e elucidou estruturalmente dois flavonoides provenientes da fração diclorometânica da semente do fruto, a hesperidina **15** e a diosmetina **16** (Figura 9). Ensaio biológicos deste extrato apresentaram atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (CASOTI, 2012).

Figura 9 - Flavonoides isolados da semente do fruto por Casoti (2012)



Recentemente, Prá e colaboradores (2017) realizaram análise fitoquímica do extrato hidroalcolico e da fração diclorometânica provenientes da semente do fruto. Estas análises foram desenvolvidas no equipamento de cromatografia líquida acoplado à um espectrômetro de massas, e identificaram 4 classes de metabólitos: flavonoides (Hesperidina **15** e Diosmetina **16**), Iridoides glicosilados (**17** e **18**), antraquinona (**19**) e fenilpropanoide (**20**) (Figura 10). Ensaio biológico caracterizou o efeito analgésico dessa espécie (PRÁ et al., 2017).

Figura 10 - Metabólitos identificados na semente do Fruto da *P. crucigerum* por Trevisan e colaboradores.



Por meio de técnicas cromatográficas, é possível traçar um perfil químico e posteriormente uma separação dos metabólitos especiais presentes nas cascas do fruto da espécie em estudo.

2.4 - TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTRÔMETRICAS

O estudo químico de uma espécie exige o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas, pela grande quantidade de compostos micromoleculares em um extrato. Por isso, são frequentemente utilizadas técnicas que conduzam à separação dos constituintes de uma amostra e juntamente com técnicas espectrométricas dando as informações dos compostos e o perfil metabólico da amostra. As técnicas de separação que mais se destacam é a cromatografia gasosa de alta resolução (GC) e a cromatografia

líquida (CL) de alta e de ultra-alta eficiência (CLAE e CLUE, respectivamente) (FUNARI et al., 2013).

Os equipamentos de cromatografia vêm sendo empregados de forma rotineira para a obtenção do perfil cromatográfico (também conhecido como impressões digitais) dos extratos vegetais como uma estratégia para a identificação e avaliação da qualidade dos fitoterápicos, por fornecer informações importantes quanto a quantidade e tipo de constituintes presentes. Portanto, é muito importante o desenvolvimento e a otimização de uma metodologia para criar impressões digitais (JI et al., 2005).

Equipamentos de cromatografia líquida acoplados a um espectrômetro de massas é de grande aplicabilidade, combinando separação e a análise de massas. Para uma identificação rápida de compostos sem a necessidade de isolamento e purificação, é utilizado o modo de desreplicação, que consiste na caracterização preliminar dos metabólitos já conhecidos por meio dos dados da massa molecular e perfil de fragmentação dos compostos, combinados com banco de dados (CASS; CASSIANO, 2015).

Em analisadores de massas de alta resolução existem vários experimentos típicos para fragmentações. Um desses experimentos é o de aquisição dependente de dados (DDA, data-dependent acquisition), nesse modo de aquisição o íon precursor é selecionado de acordo com parâmetros definidos pelo analista como: intensidade do íon, lista de inclusão de massas exatas, contribuição isotópica, defeito de massa etc. Esses íons selecionados são conduzidos a um segundo experimento de fragmentação (EM/EM). Então no mesmo experimento se obtém os íons precursores e íons produtos, possibilitando a aquisição rápida de dados sem a necessidade de etapas de otimização (CASS; CASSIANO, 2015).

No auxílio da desreplicação de metabólitos e obtenção de resultados com mais agilidade, surge a GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash2.jsp>), que é uma plataforma online e livre. Essa plataforma agrupa espectros baseados em suas similaridades, gerando uma rede molecular (*molecular networking*). A

plataforma armazena e analisa dados de espectrometria de massas, sendo uma biblioteca aberta para compartilhamento entre a comunidade científica, uma biblioteca espectral construída por seus próprios usuários, também congrega outras bibliotecas (*MassBank*, *ReSpect* e *NIST*), dispondo de milhares de espectros que aumenta a cada dia. A GNPS realiza a comparação de todos os espectros EM/EM, e automaticamente busca semelhanças espectrais, de forma a encontrar semelhanças com substâncias já presentes nos bancos de dados (WANG et al., 2016).

Para a utilização da GNPS, é necessário a utilização de alguns parâmetros de análises considerando o tipo de espectrômetro de massas utilizado. Deve-se determinar os valores de tolerância, tanto do íon precursor como do íon fragmento. Parâmetros mais avançados devem ser escolhidos, como o cosseno que vai de 0-1, sendo que 1 indica espectro idênticos, também é possível escolher o número mínimo de fragmentos comuns (*matches*), porém 6 é o número padrão. Todos os parâmetros citados são passíveis de alterações, dependendo do tipo de amostra e equipamento (WANG et al., 2016).

Juntamente com as técnicas cromatográficas, processos de extração ganharam um papel dominante na purificação de extratos vegetais. A maioria das aplicações utiliza extração em fase sólida (EFS). As impurezas indesejadas (como as clorofilas e graxas) são removidas por adsorção na fase estacionária ou com afinidade na fase móvel. Além da EFS como purificação da amostra antes da análise de CL ou CG, cartuchos acoplados a CL-RMN, ganharam uma crescente importância para a elucidação de estruturas, estratégias de projeção metabólica e de desreplicação (BUCAR; WUBE; SCHMID, 2013).

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico da casca do fruto de *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae).

3.2 - OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

- Identificar classes de metabólitos presentes nos extratos por prospecção fitoquímica;
- Identificar os metabólitos dos extratos mais apolares por cromatografia gasosa;
- Identificar os metabólitos presentes na espécie pela plataforma GNPS
- Elucidar as estruturas obtidas por técnicas espectrométricas (RMN 1D, 2D e massas)

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental foi executada no Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo (CCET) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), no Laboratório de Produtos Naturais no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e no Laboratório de Espectrometria do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Os reagentes e solventes P. A. (E. Merck, Aldrich Chemical Co., Fluka, Grupo Química, Vetec, Ecibra e Quimex) foram utilizados sem purificação prévia.

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada com placa de alumínio com 0,20 mm de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV₂₅₄ (Macherey-Nagel).

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório QUIMIS. Liofilizadas em liofilizador L101 LIOTOP.

Os cromatogramas oriundos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) UV/Vis e DAD foram obtidos em aparelho de CLAE Agilent Technologies modelo 1200, detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, detector de arranjos de diodos (DAD) G1315D, bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1322A e amostrador automático G1329A. Em coluna C18 150x4.60 mm, 5 μ (Gemini). Com fase móvel constituída por água deionizada e filtrada em membrana de 0,45 μ m (EZ-ParK® MILLIPORE), acetonitrila e metanol grau CLAE.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos de um UPLC Waters, com a bomba quaternária ACQUITY QSM, fonte de ionização: electrospray, analisador híbrido Q-TOF (Quadrupole – Time Of Flight);

Na escala preparativa, foi utilizado o cromatógrafo líquido Shimadzu DGU-20A5r com detector de arranjo de diodos (DAD), equipado com um controlador de sistema CDM-20A e coluna em fase reversa Shim-pack PREP-ODS 250x20mml. Software utilizado para processamento dos dados: LabSolutions.

Todas as amostras foram filtradas através de membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 20 μm .

A fonte electrospray foi operada em modo positivo, com nitrogênio com alto grau de pureza (>98%) foi usado como nebulizador de dessolvatação e gás de colisão (200 °C; 4 L.min⁻¹). A pressão do nebulizador foi mantida a 0,4 bar e a voltagem capilar ajustada a 4500 V. As condições do Q-TOF foram as seguintes: Deslocamento da placa terminal: -500 V; Funil 1: 200 Vpp; Funil 2: 200 Vpp; Hexapole RF: 200 Vpp; Colisão RF: 400 Vpp; Tempo de Transferência: 70 μs ; Armazenamento pré-pulso: 5 μs ; Quadrupolo de Energia Iônica: 5eV; Média de rolagem: 2 x 1Hz. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando um Software Bruker Compass Data Analysis (Bruker Daltonik, GmbH).

Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas CG-EM Shimadzu TQ 8030 triplo quadrupolo, coluna: Rtx-5MS, fonte de ionização: impacto eletrônico.

Foram utilizados 2 espectrômetros para a obtenção dos espectros de RMN.

NO Departamento de Química da UFSCar foi usado o equipamento: Bruker Avance III – 14,1 T (600 MHz para RMN ¹H), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) sonda BBI de 5 mm com ATMA®.

No Instituto de Química da UFG foi usado o espectrômetro Bruker Avance III (500 MHz para RMN ¹H, 11,7T), com sondas utilizadas (ATB e SW), 5 mm de diâmetro interno, à temperatura ambiente e com pulso de 45° para hidrogênio e carbono. Os deslocamentos químicos (δ) no RMN ¹H e de ¹³C, com metanol deuterado (MeOD), foram referenciados com tetrametilsilano (TMS) e com o resíduo de MeOD (δ 3,31 ppm), respectivamente.

4.1 - COLETA, IDENTIFICAÇÃO E SECAGEM

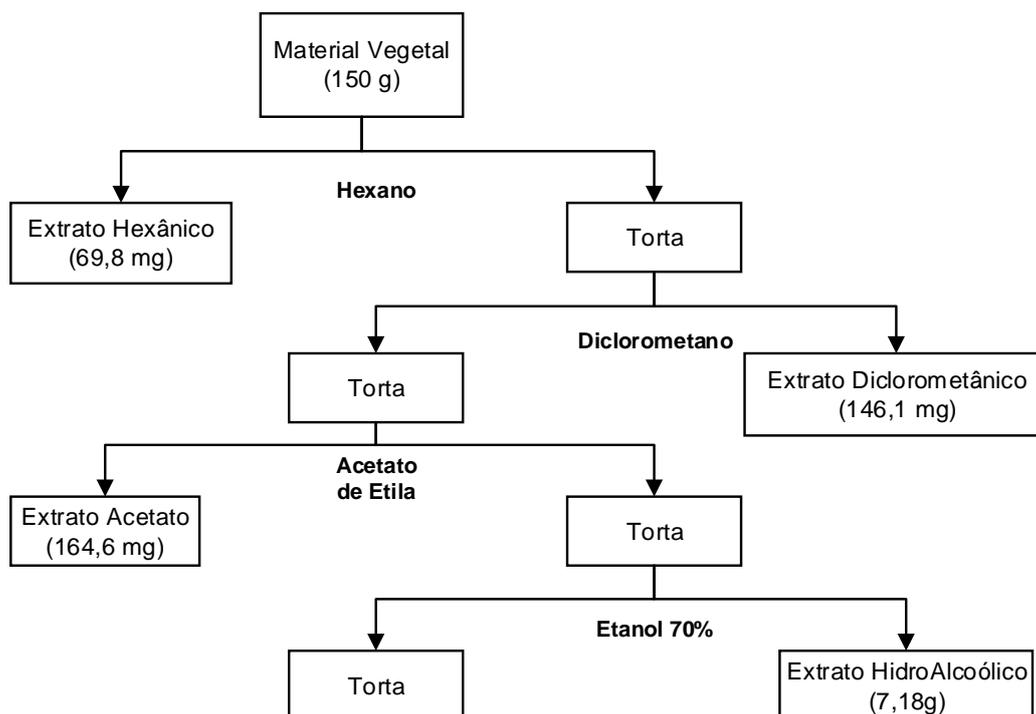
A coleta do fruto foi realizada às 09h00min, na Chácara Taquaral no município de Santa Rosa de Goiás (16°12'41"S e 49°27'31"W) e a identificação botânica da espécie foi selecionada por profissionais habilitados. Uma exsicata de nº 11990 foi depositada no herbário do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológica Henrique Santillo– CCET/UEG.

O material botânico foi seco a temperatura ambiente ao abrigo da luz solar direta e em seguida, foram separadas as cascas dos frutos de suas sementes. Em seguida, as cascas foram reduzidas a pó com o auxílio de um liquidificador doméstico.

4.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para obtenção dos extratos 150g das cascas dos frutos, secas e trituradas foram submetidas à extração exaustiva pelo método de remaceração, com o emprego de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool etílico 70%). O material vegetal permaneceu em contato com o respectivo solvente durante dois dias, no qual foram realizadas três extrações sucessivas de cada solvente. Obteve-se assim quatro extratos brutos (Fluxograma 1) (CHECHINEL FILHO, 1998), que foram concentrados em evaporador rotativo e secos em bomba de alto vácuo até massa constante.

Fluxograma 1 - Esquema de obtenção dos extratos



4.3 - TRIAGEM FITOQUÍMICA

Para a triagem fitoquímica foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), para identificação das classes de metabólitos secundários nos extratos. Utilizou-se o método de eluição e revelação proposto por Wagner et al. (1996) (Quadro 3), para taninos, geninas flavônicas, heterosídeos flavônicos, naftoquinonas, terpenos e esteroides, saponinas e alcaloides.

Quadro 3 - Sistema de eluição e revelação da CCD

Classe de Metabólitos	Sistema de Eluição	Reagente revelador
Taninos	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água. (100:11:11:27)	Ferricianeto de potássio 1%: cloreto férrico 2% (1:1)
Flavonoides	Clorofórmio:acetato de etila (60:40)	Solução etanólica de cloreto de alumínio 2%
Quinonas	Tolueno:acetona:clorofórmio (40:25:35)	Solução metanólica de KOH 5%
Terpenos e esteroides	Hexano:acetato de etila (1:1)	Vanilina sulfúrica
Saponinas	Clorofórmio:ácido acético:metanol:água (15:8:3:2)	Sulfato cérico
Alcaloides	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água:butanol (50:7:3:10:30)	Dragendorff

4.4 - ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Para conhecer o perfil químico dos compostos voláteis da casca do fruto da *P. crucigerum* foram feitas análises dos extratos hexânico (E.H) e diclorometânico (E.D) por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas.

Soluções de 1000 ppm dos extratos foram injetados no equipamento, tendo o injetor (com divisão de fluxo) programado a 250° (split 10) com temperatura inicial de 40 °C e final de 300 °C com aumento de 5 °C.min⁻¹. O gás de arraste foi o hélio com uma pressão de 74,9 kPa e velocidade linear de 40 cm.s⁻¹. A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C com corte do solvente em 3 minutos.

Os resultados obtidos foram comparados com a biblioteca espectral NIST 14 (National Institute of Standards and Technology), nessa versão da biblioteca contém 242,466 espectros, sendo esta a biblioteca espectral de massa mais amplamente utilizada no mundo.

4.5 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO DICLOROMETANO (E.D)

O E.D foi fracionado por filtração a pressão reduzida em sílica gel (60 g), com aumento de polaridade de solvente (hexano, diclorometânico, acetato de etila e metanol) sendo utilizado 100 mL de cada solvente. Obteve-se 4 frações: fração hexânica (F.HD), fração diclorometânica (F.DD), fração acetato (F.AD) e fração metanólica (F.MD).

4.6 - ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Para identificação de alguns metabólitos presentes nos extratos polares (E.A e E.OH) e também na F.MD, foi utilizado um equipamento de CLUE, o UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, fonte de ionização por eletrospray no modo positivo e com analisador híbrido Q-TOF.

A coluna utilizada foi uma ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7µm, os solventes utilizados foram água (0,1% ácido fórmico + 0,05% amônia) e acetonitrila (0,1% ácido fórmico) grau massas. A corrida começou com 3% de acetonitrila e foi para 50% em 8 minutos, posteriormente para 97% em 25 minutos e manteve-se esse percentual até 30 minutos, em um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹. As amostras foram preparadas em uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL.

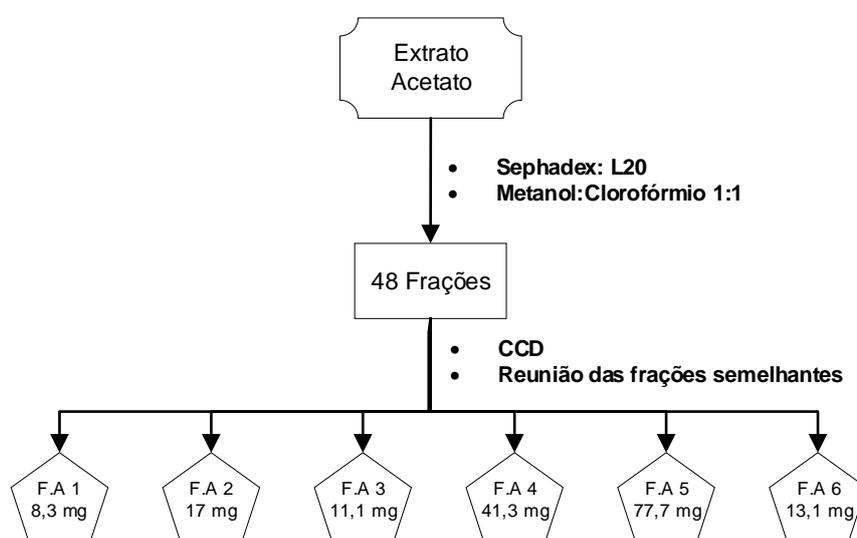
O experimento foi realizado no modo DDA, os íons precursores foram definidos por intensidade e submetidos à uma segunda fragmentação (MS/MS), assim foram obtidos os espectros com os íons precursores e os íons fragmentos.

Os dados foram convertidos para .mzXML, que é um formato compatível com a plataforma e em seguida foi realizado o envio (*upload*) dos mesmos para a plataforma GNPS no modo de desreplicação. Os parâmetros para a análises foram: variação do íon precursor em 0.5 Dalton, variação do íon fragmento em 0.02 Dalton, o número mínimo de íons fragmentos iguais (*matches*) foram 6 e o mínimo de cosseno 0.5. Os espectros foram comparados com os *matches* obtidos na literatura para uma maior confiabilidade.

4.7 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ACETATO (E.A)

O extrato bruto acetato de etila (164,6 mg) foi submetido a cromatografia em coluna, com o emprego de Sephadex LH-20 como fase estacionária, 56 cm de altura e 6 cm de diâmetro, eluída com Metanol:Clorofórmio (1:1). 48 frações foram coletadas, e posteriormente reunidas por semelhança observada na cromatografia em camada delgada CCD, no qual obteve-se no final 7 frações (Fluxograma 2).

Fluxograma 2 - Procedimento cromatográfico para a partição do E.A.



Estas frações, com concentração de 1 mg.mL^{-1} , foram submetidas à CLAE em um gradiente exploratório (água e metanol) começando com 5% de metanol e indo até 100% em 30 minutos, com comprimento de onda em 280 nm (melhor comprimento de onda observado no detector de DAD) e com um fluxo de 1 mL/min, para observar o perfil cromatográfico destas.

4.7.1 - Purificação da F.A 6

De acordo com o perfil cromatográfico, essa fração apresentou uma boa separação dos constituintes químicos na análise em modo gradiente exploratório. Assim, foi realizado uma otimização da condição cromatográfica para a purificação dos constituintes químicos presentes nessa fração no equipamento de CLAE-Uv. A análise foi conduzida em um método gradiente

(Quadro 4). A amostra foi preparada em uma concentração de 13,1 mg/mL, sendo 20 injeções com o volume de injeção de 50 μ L em cada injeção e com ajuda de um coletor automático foram isolados 3 compostos (F.A 6 1-3). Os compostos foram analisados por RMN de ^1H e ^{13}C , *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC.

Quadro 4 - Método gradiente para a F.A 6

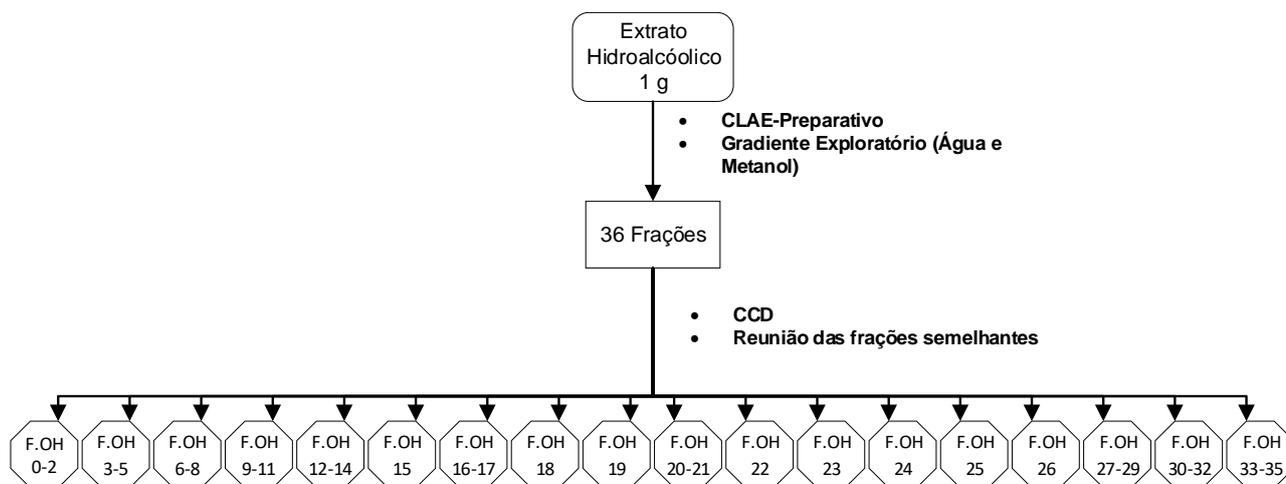
Tempo	Gradiente	
	(A) Água	(B) Metanol
0 min	80%	20%
20 min	60%	40%
21 min	50%	50%
41 min	30%	70%
42 min	0%	100%
45 min	0%	100%
46 min	80%	20%
60 min	80%	20%

4.8 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO (E.OH)

Para o E.OH optou-se por fazer um fracionamento bruto no equipamento CLAE-DAD em escala preparativa. 1 g do extrato foi solubilizado em 10 mL de metanol. Empregou-se um gradiente exploratório de 60 minutos com início de 5% de metanol à 100% em 50 minutos. A amostra foi eluída com metanol e água com o fluxo de 12 mL/min. Foram feitas 5 injeções de 2 mL cada, e obteve-se no final um total de 18 frações, concentradas em capela de exaustão.

Posteriormente, estas frações foram analisadas no CLAE-Uv com comprimento de onda em 280 nm um gradiente exploratório com metanol e água, para avaliar o perfil químico das mesmas. O esquema pode ser observado no Fluxograma 3.

Fluxograma 3 - Esquema do fracionamento do E.OH



4.8.1 - Purificação da F.OH 20-21

Com o cromatograma obtido do gradiente exploratório em metanol e água, verificou-se que essa fração continha poucos compostos, e que com a otimização do método teria uma melhor separação. A amostra foi preparada em uma concentração de 7,5 mg/mL, eluída com um gradiente com (A) água e (C) acetonitrila (Quadro 5) no fluxo de 1 mL/min. Foram 20 injeções de 50 μ L da amostra e com o auxílio de um coletor automático, isolando 1 composto.

Quadro 5 - Gradiente para a F.OH 20-21

Tempo	Gradiente	
	(A) Água	(C) Acetonitrila
0 min	70%	30%
10 min	70%	30%
12 min	0%	100%
17 min	0%	100%
19 min	70%	30%
30 min	70%	30%

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O preparo dos extratos vegetais pode ser realizado através de várias técnicas de extração. Neste trabalho optou-se por empregar o processo de remaceração utilizando solventes com aumento de polaridade, 150 g da casca triturada foi submetida à técnica com aumento de polaridade dos solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool etílico 70%) obtendo 4 extratos com as massas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Massa dos extratos obtidos

Extrato	Massa	Rendimento
E.H	69,8 mg	0,046%
E.D	146,1 mg	0,097%
E.A	164,6 mg	0,11%
E.OH	7,18 g	4,8%

5.2 - TRIAGEM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica preliminar realizada nos extratos, proporcionou traçar o perfil químico dos compostos presentes na casca da *P. crucigerum*. Os resultados foram obtidos através de análise qualitativa da coloração apresentada na CCD (no visível ou na câmera de UV em 264 nm) após a aplicação do reagente revelador, avaliou-se a presença dos grupos de metabólitos secundários em termos positivos e negativos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da triagem fitoquímica realizada nos extratos

Classe de Metabólito	Extratos			
	Hexânico	Diclorometânico	Acetato	Etanólico
Taninos	-	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+
Quinonas	-	+	+	-
Terpenos e esteroides	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-
Alcaloides	-	+	+	+

5.3 - ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CG-EM

Os resultados das análises dos extratos hexânico e diclorometânico por CG-EM estão demonstrados na figura 11 e nas tabelas 3 e 4, que demonstrou a existência de diversos compostos.

Figura 11 - Cromatogramas TIC dos E.H e E.D

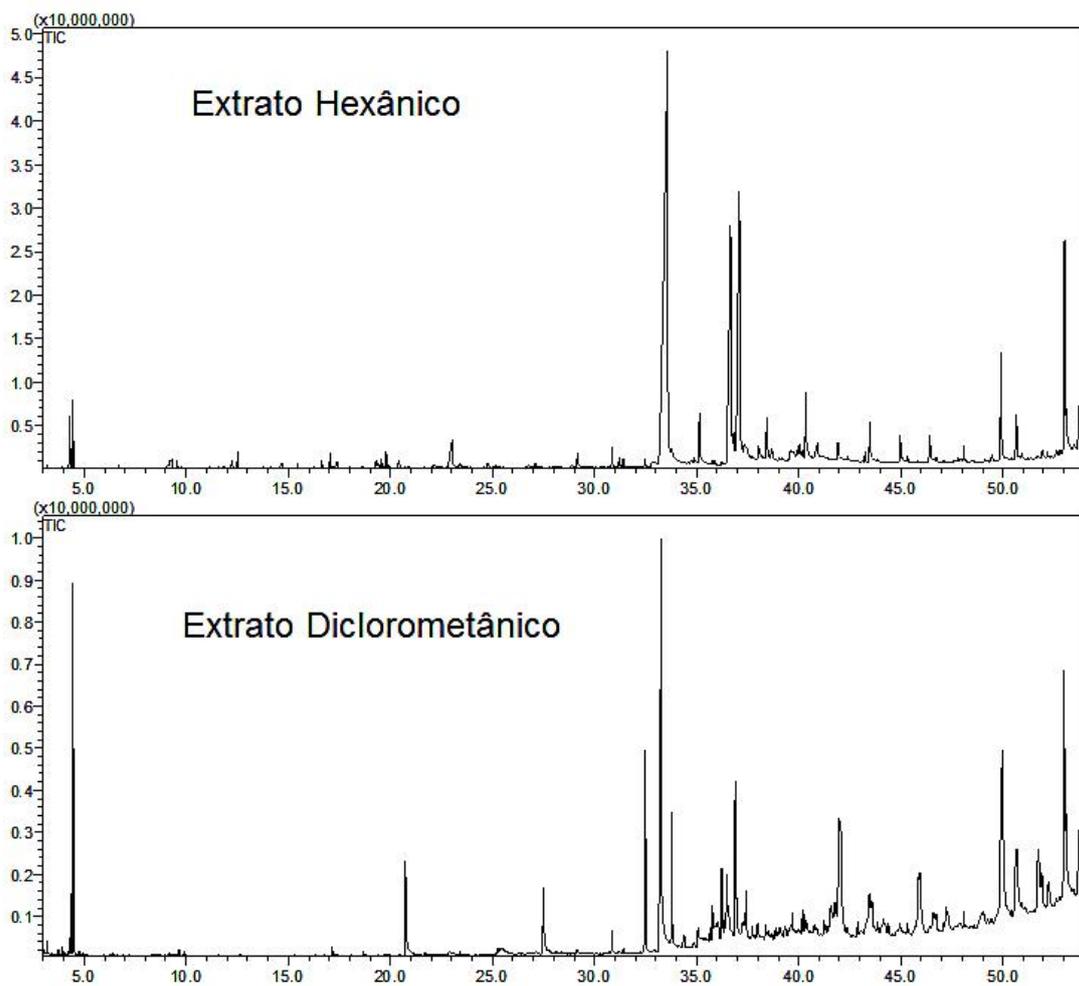


Tabela 3 - Compostos identificados do E.H por CG/EM

Nome	T.R. (min)*	M.M**	% Área
<i>Ácido caproico</i>	9.21	116	0.1
<i>3-Butoxi-2,4-dimetil-1-penteno</i>	12.22	170	0.16
<i>Ácido caprílico</i>	14.70	144	0.06
<i>Ácido nonanóico</i>	17.39	158	0.07
<i>2-metiltetracosano</i>	19.55	352	0.21
<i>2-undecanal</i>	19.79	168	0.34
<i>Ácido oleico</i>	36.63	282	15.41
<i>Ácido láurico</i>	24.77	200	0.08
<i>Ácido mirístico</i>	29.175	228	0.35
<i>6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona</i>	30.86	268	0.44
<i>Palmiato de metila</i>	32.47	270	0.13
<i>Ácido palmitoleico</i>	32.88	254	0.06
<i>Dipalmitato de ascorbilo</i>	33.54	652	43.40
<i>Ácido esteárico</i>	37.07	284	15.24
<i>Ácido licosanoico</i>	40.35	312	2.44
<i>Ácido beénico</i>	43.49	340	1.40
<i>Ácido tricosílico</i>	44.97	354	1.11
<i>Ácido lignocérico</i>	46.42	368	0.17
<i>(22-E)-Estigmasta-4,7,22-trien-3-ol</i>	49.91	410	3.50
<i>Acetato de estigmasterol</i>	50.66	454	0.26
<i>Estigmasterol</i>	53.01	412	9.67
<i>Clonasterol</i>	53.74	414	2.68

*T.R.= Tempo de retenção; **M.M.= Massa molecular

Tabela 4 - Compostos identificados do E.DC por CG/EM

Nome	T.R. (min)*	M.M**	% Área
<i>Pinanediol</i>	20.78	170	4.56
<i>Ácido 5-hidroxi-2-metil-hex-3-enóico</i>	27.53	144	3.95
<i>Palmiato de metila</i>	32.50	270	7.20
<i>Ácido palmítico</i>	33.28	256	27.85
<i>Palmiato de etila</i>	33.78	284	4.64
<i>Estearato de metila</i>	36.24	298	2.92
<i>Ácido esteárico</i>	36.90	284	7.04
<i>Stigmata-4,22-dien-3-ona</i>	42.01	410	10.12
<i>Sitostenona</i>	45.87	412	4.63
<i>Estigmasterol</i>	49.90	412	6.63
<i>Eter metílico de estigmasterol</i>	50.65	426	8.92
<i>Estigmatano-3,6-diona</i>	51.74	428	5.56
<i>Estigmasta-7,22-dien-3-ol</i>	53.71	412	5.98

*T.R.= Tempo de retenção; **M.M.= Massa molecular

Como esperado de extratos apolares, há uma grande quantidade de derivados lipídicos, o que inclui ácidos graxos, esteroides e triterpenos. Os ácidos graxos estão em maior quantidade nos extratos apolares dessa espécie.

Os triacilgliceróis dos ácidos cáprico e caprílico são classificados como triglicérides de cadeia média, úteis como fonte nutricional, usados também no tratamento e prevenção da dermatite amoniacal e úlceras por pressão, por formar uma barreira protetora para a pele. Importante também nos processos de inflamação celular, além de ajudar na regeneração dos tecidos (FERREIRA et al., 2012).

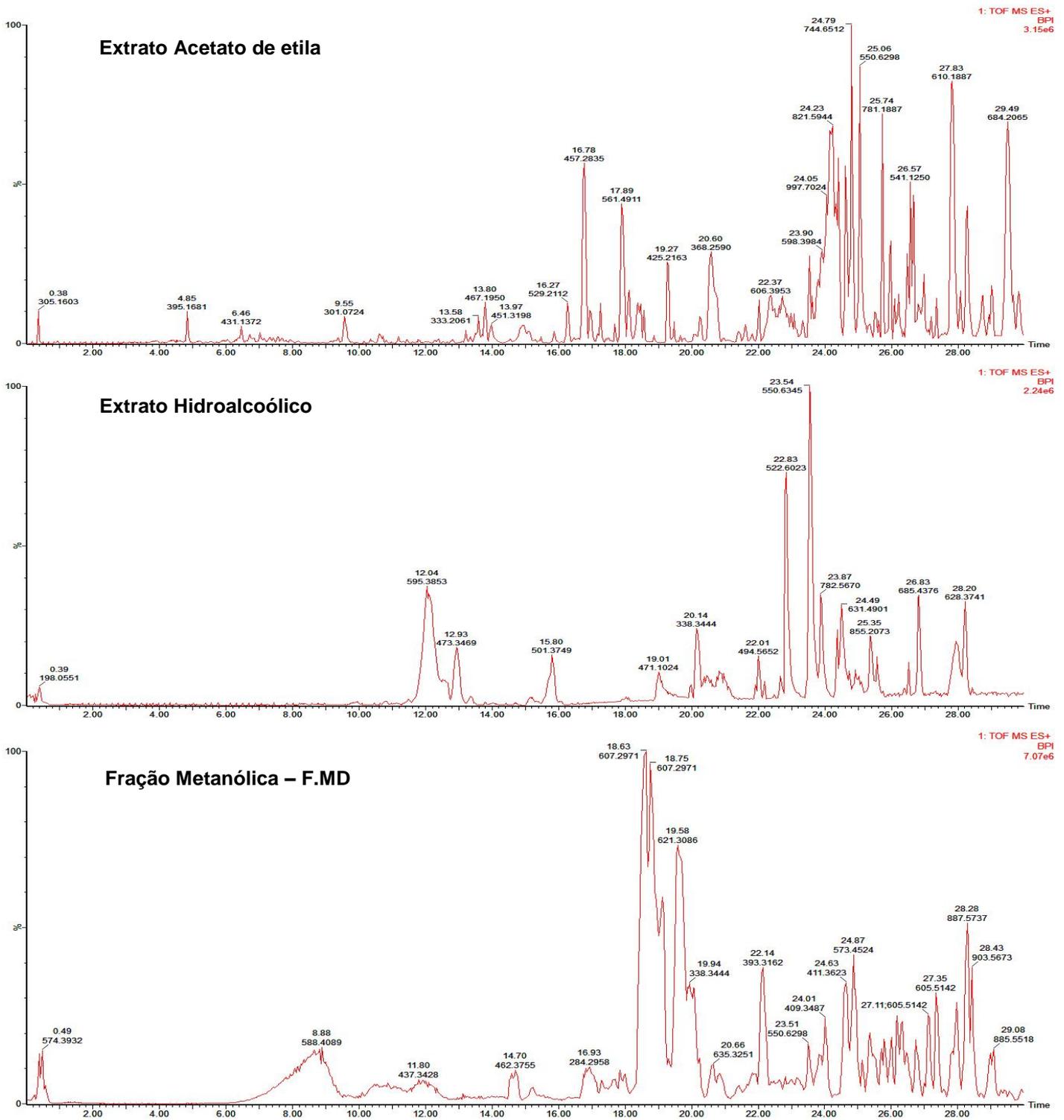
O palmiato de metila tem potencial de inibir macrófagos em geral e promissores anti-inflamatórios e possui efeito antifibrótico (EL-DEMERDASH, 2011). Identificados também foram os ácidos láurico e palmítico apresentam atividade antibacterianas e antivirais, e bastante utilizados na culinária por estarem presentes no óleo de coco (LIEBERMAN; ENIG; PREUSS, 2006).

O estigmasterol tem como propriedade a redução de colesterol. Um complexo composto de campesterol, estigmasterol e brassicasterol, é comercializado como um suplemento dietético, capazes de reduzir o colesterol em humanos em até 15% (MIETTINEN, 1980). Esse experimento mostrou a quantidade de compostos presentes nesses dois extratos, ricos de substâncias com propriedades farmacológicas.

5.4 - IDENTIFICAÇÃO POR UPLC-QTOF

Com as injeções dos extratos (E.A e E.OH) e da F.MD foi possível obter os cromatogramas de íons totais (TIC) (Figura 12), bem com as fragmentações dos íons precursores no modo de aquisição independente de dados (DDA).

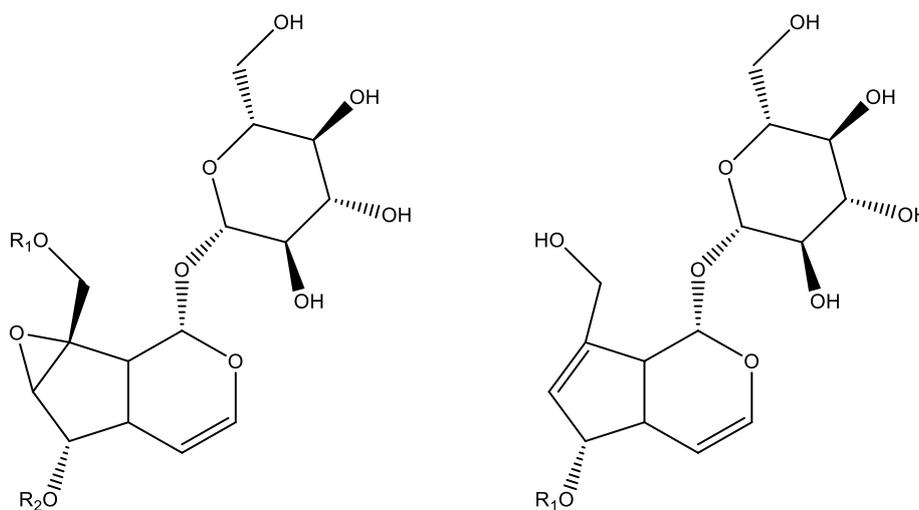
Figura 12 - Cromatograma de íons totais (TIC) do E.A e E.OH



Os dados foram submetidos na plataforma GNPS no modo de desreplicação, criando uma rede molecular de busca na biblioteca.

A espécie estudada, produz metabólitos referentes à classe dos iridoides glicosilados (**21**- 6- α -L-3"-caffeoilrharnopiranosilcatalpol; **22**- Scutellariosideo II; **23**- Scropheanosideo I), flavonoides (**24**- Hesperetina; **25**- Diosmetina; **26**- Diosmina; **27**- Acacetina; **28**- 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona; **29**- Padmina), isocumarina (**30**- Hidrangenol), triterpenos (**31**- Enoxolona; **32**- Ácido ursólico lactona; **33**- Ácido oleanóico), saponina (**34**- Ilexsaponina A) e uma neolignana (**35**- Isolicarina A). A identificação de cada uma dessas substâncias pode ser observada no quadro 10 no apêndice (pág. 79-81). As estruturas moleculares de cada classe identificadas estão na figura 13.

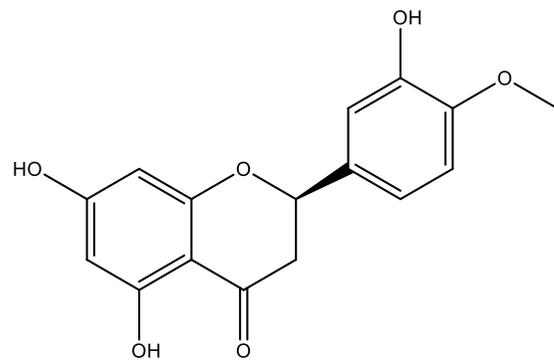
Figura 13 - Metabólitos identificados através da plataforma GNPS



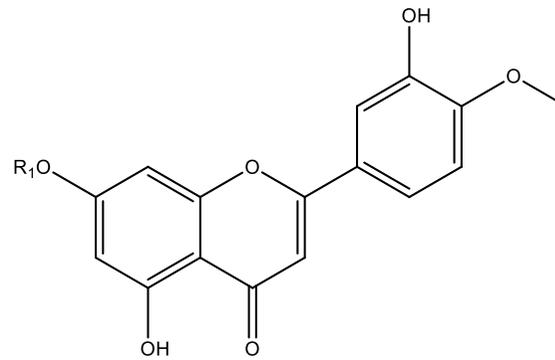
21: R₁ = H; R₂ = β -D-ramnose - ácido cafeico

22: R₁ = *p*-ácido cumárico; R₂ = H

23: R₁ = β -D-ramnose - ácido isoferúlico

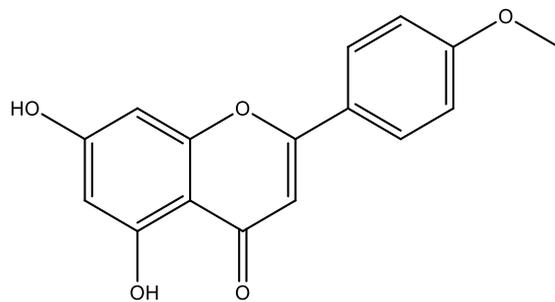


24

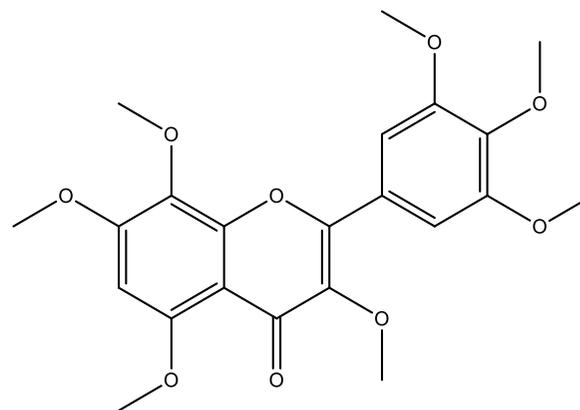


25: R₁ = H

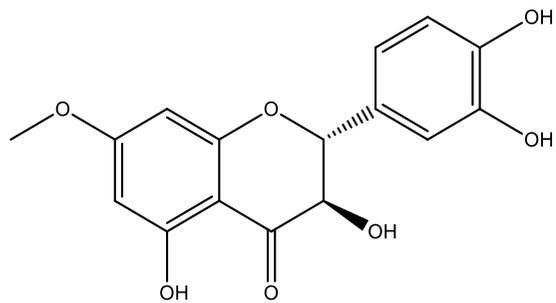
26: R₁ = β-D-glucose-D-ramnose



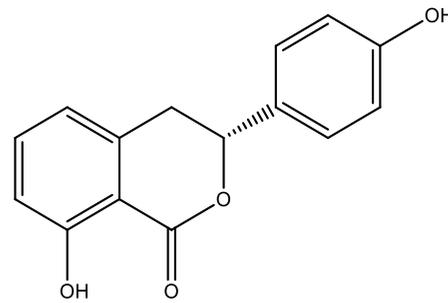
27



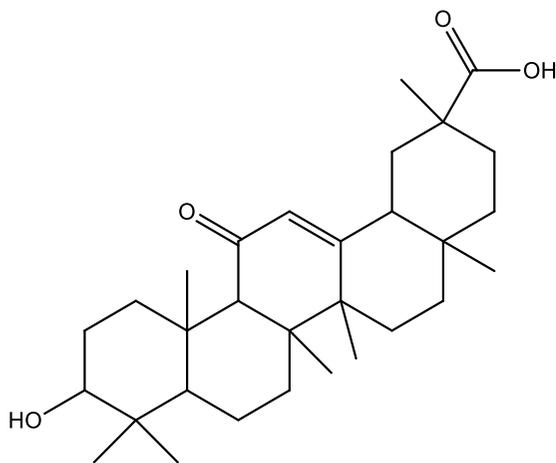
28



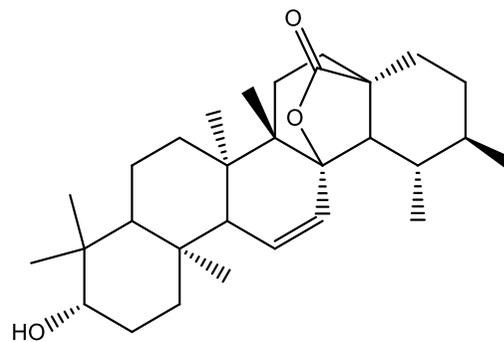
29



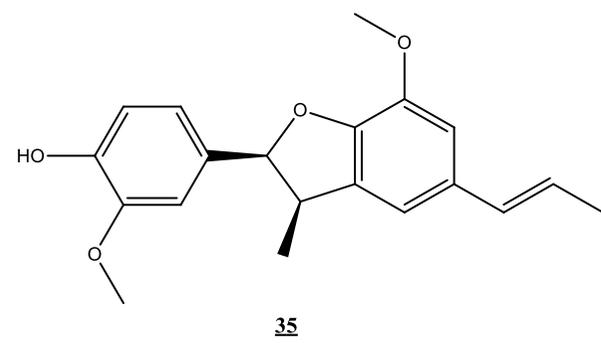
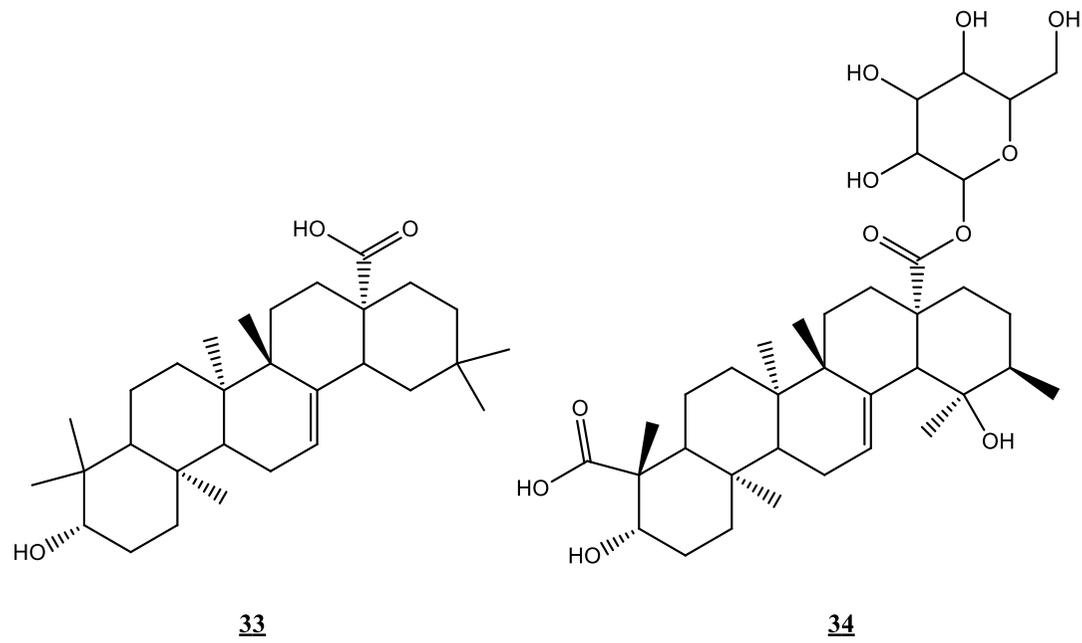
30



31



32



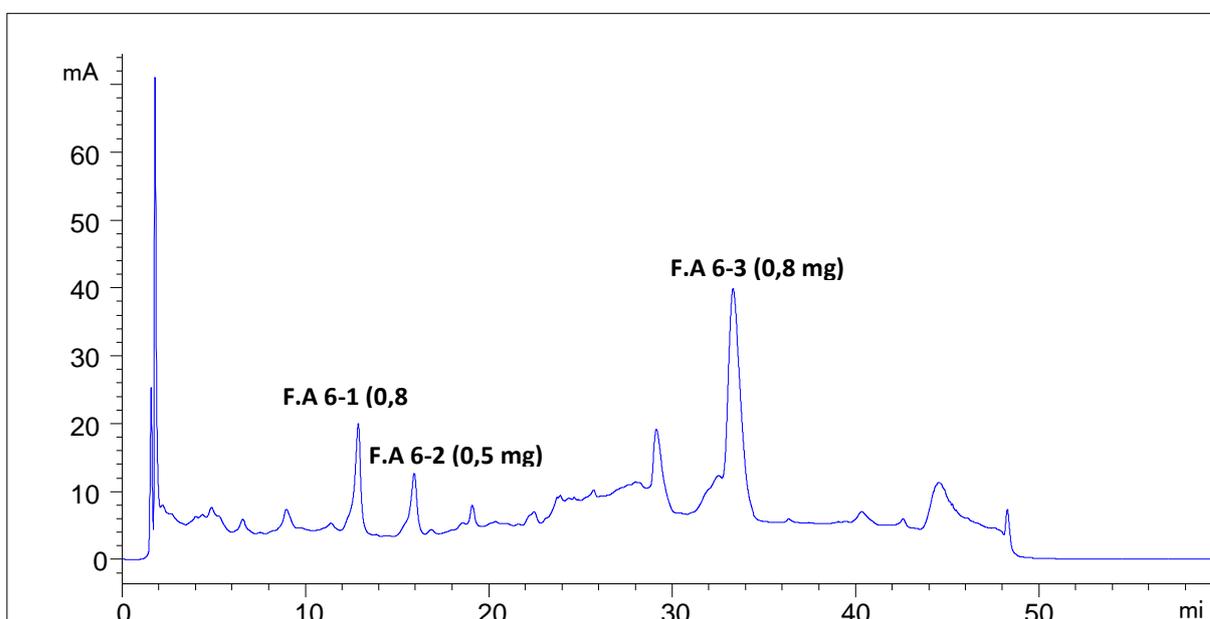
Pela análise do método de desreplicação foi possível a identificação de 15 metabólitos de classes variadas, com destaque para a quantidade de flavonoides, a presença de uma isocumarina e uma saponina que ainda não haviam sido identificadas nessa espécie.

O iridoide Scropheanosideo I (**23**) apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória (ABBAS, 2010). Também identificada, a dihidroisocumarina hidrangenol (**30**), possui atividades antifúngicas (NOZAWA et al., 1981) e o triterpeno enoxolona (**31**) também conhecido como ácido glicirretínico, apresenta diversas atividades farmacológicas como: anti-inflamatória, antiviral, antifúngica e antibacteriana (SALARI; KADKHODA, 2003).

5.5 - PURIFICAÇÃO DA F.A 6

Por meio das condições cromatográficas estabelecidas, foram obtidos 3 compostos com uma separação significativa (Figura 14) e com auxílio de um coletor automático, foram isolados os 3 compostos.

Figura 14 - Cromatograma da F.AcOEt 6 com a programação de coleta.



Obteve-se 3 compostos, o primeiro com o tempo de retenção próximo a 13 minutos, o segundo em 16 minutos e o terceiro em 34 minutos. Estes foram

submetidos às técnicas espectrométricas para a elucidação e identificação estrutural.

5.5.1 - Elucidação estrutural do F.A 6-1

Na análise do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do F.A 6-1 (Figura 15) e expansão (Figura 16), observou-se na região de anéis aromáticos, hidrogênios com sinais em δ_{H} 8.19 (*ddd*, $J = 7.4, 1.6, 0.8$ Hz, 1H), δ_{H} 7.42 ppm (*ddd*, $J = 8.0, 1.4, 0.8$ Hz, 1H) e δ_{H} 7.22 – 7.16 ppm (*m*, 2H), indicando ser um aromático dissustituído, com constante de acoplamento na posição *orto*, *meta* e *para*. Foi identificado um simpleto na região olefínica com deslocamento em δ_{H} 8.17 ppm (*s*, 1H).

Figura 15 - Espectro de RMN ^1H do composto F.A 6-1 (600 mHz, MeOD - d_4)

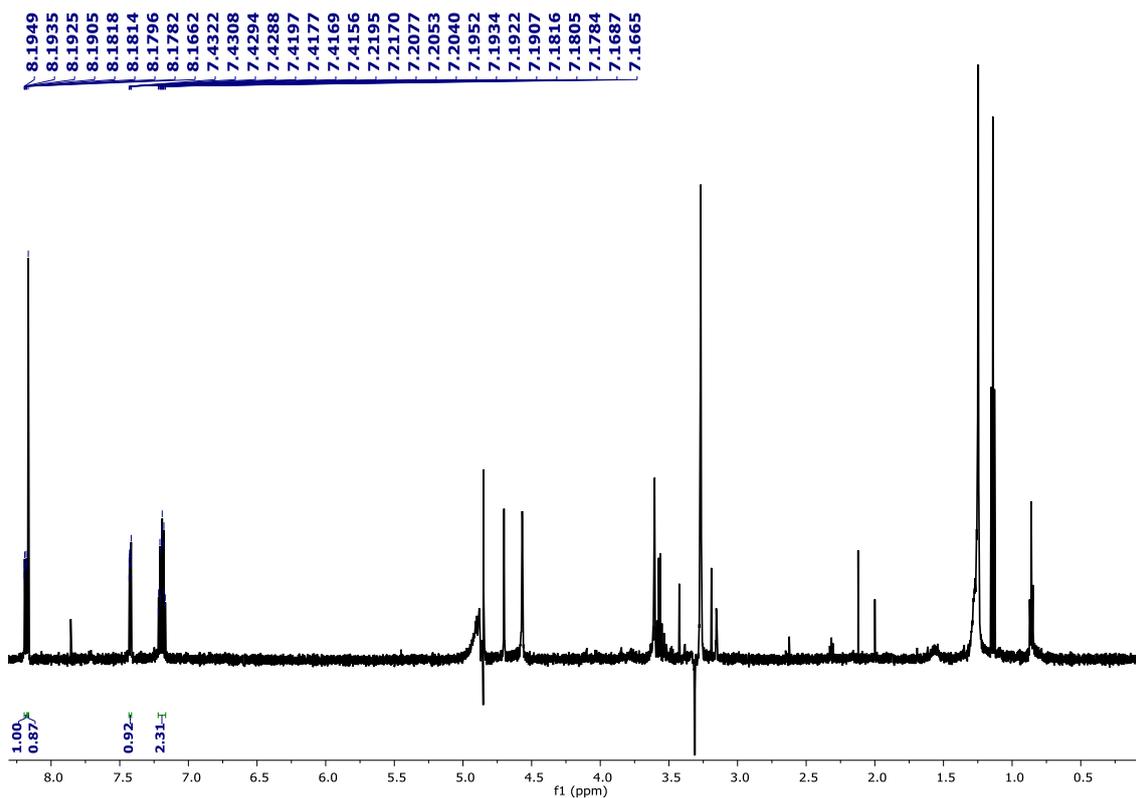
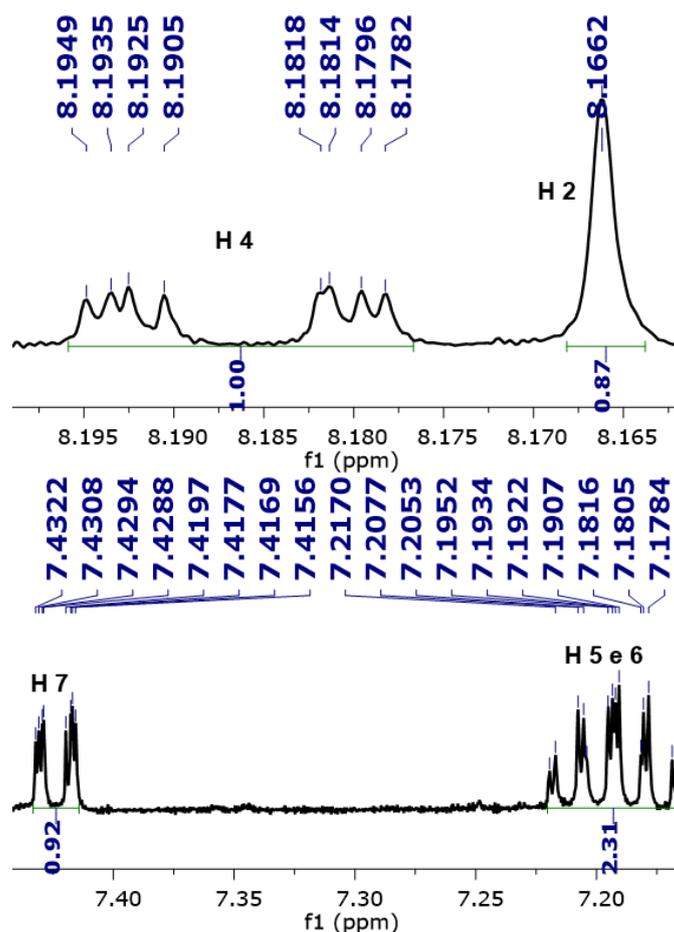


Figura 16 - Expansões da região aromática e olefínica espectro de RMN ^1H para a F.A 6-1 (600 MHz, MeOD - d_4)



As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos foram auxiliadas pelas correlações nos mapas de contornos gHSQC (Apêndice – Figura 29, pág. 72) e gHMBC (Apêndice – Figura 30, pág. 72) (Figura 17). Comparados com dados de André (2017), identificou-se o alcaloide indólico indol-3-ácido carboxílico, sendo apresentados na Tabela 5.

Figura 17 - Principais correlações observadas no gHMBC do F.A 6-1

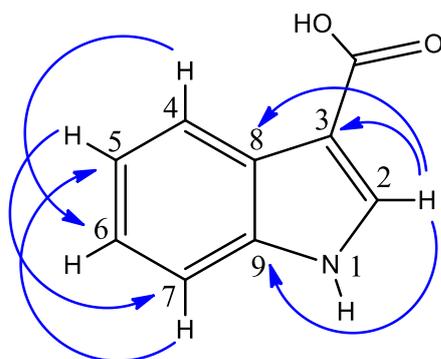


Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do F.A 6-1 (600 MHz, MeOD - d_4)

Posição	δ_{C} (isolado)	δ_{C} (ANDRÉ 2017)*	δ_{H} (isolado)	δ_{H} (ANDRÉ, 2017)*
COOH	-	171.9	-	-
1	-	-	-	-
2	133.1	132.5	8.17 s	7.87 s
3	114.0	112.7	-	-
4	121.9	121.9	8.19 <i>ddd</i> (7.4, 1.6, 0.8 Hz)	8.13 <i>d</i> (7.6 Hz)
5	122.5	122.4	7.22 – 7.16 <i>m</i>	7.14 <i>m</i>
6	123.5	123.3	7.22 – 7.16 <i>m</i>	7.14 <i>m</i>
7	112.1	111.8	7.42 <i>ddd</i> (8.0, 1.4, 0.8 Hz)	7.39 <i>d</i> (7.8 Hz)
8	137.3	138.3	-	-
9	126.1	128.1	-	-

* 500 MHz, MeOD - d_4 .

O espectro de massas no modo positivo (Apêndice – Figura 31, pág. 73), obteve-se um íon precursor, sendo um íon dimérico com m/z de 323.12 [$2\text{M} + \text{H}$] $^+$, confirmando a estrutura do indol-3-ácido carboxílico.

5.5.2 - Elucidação estrutural do F.A 6-2

Na análise do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do F.A 6-2 (Figura 18) e expansão (Figura 19), observou-se uma semelhança com o espectro do F.A 6-1, porém no F.A 6-2 continha um simpleto com deslocamento em δ_{H} 9.89 ppm, que indica ser um possível hidrogênio de aldeído. Na região aromática, os hidrogênios apresentavam sinais em δ_{H} 8.16 ppm (*dt*, $J = 7.7$, 1.1 Hz, 1H), δ_{H} 7.48 ppm (*dt*, $J = 8.3$, 1.0 Hz, 1H) e δ_{H} 7.30 – 7.23 ppm (*m*, 2H), o que orienta ser um aromático dissustituído, com constante de acoplamento na posição *para*. O que foi confirmado com o experimento 2D de *cosy* (Apêndice – Figura 34, pág 73). Também foi possível identificar um simpleto nessa região olefínica com deslocamento em δ_{H} 8.10 (s, 1H).

Figura 18 - Espectro de RMN ¹H do composto F.A 6-2 (600 MHz, MeOD - d4)

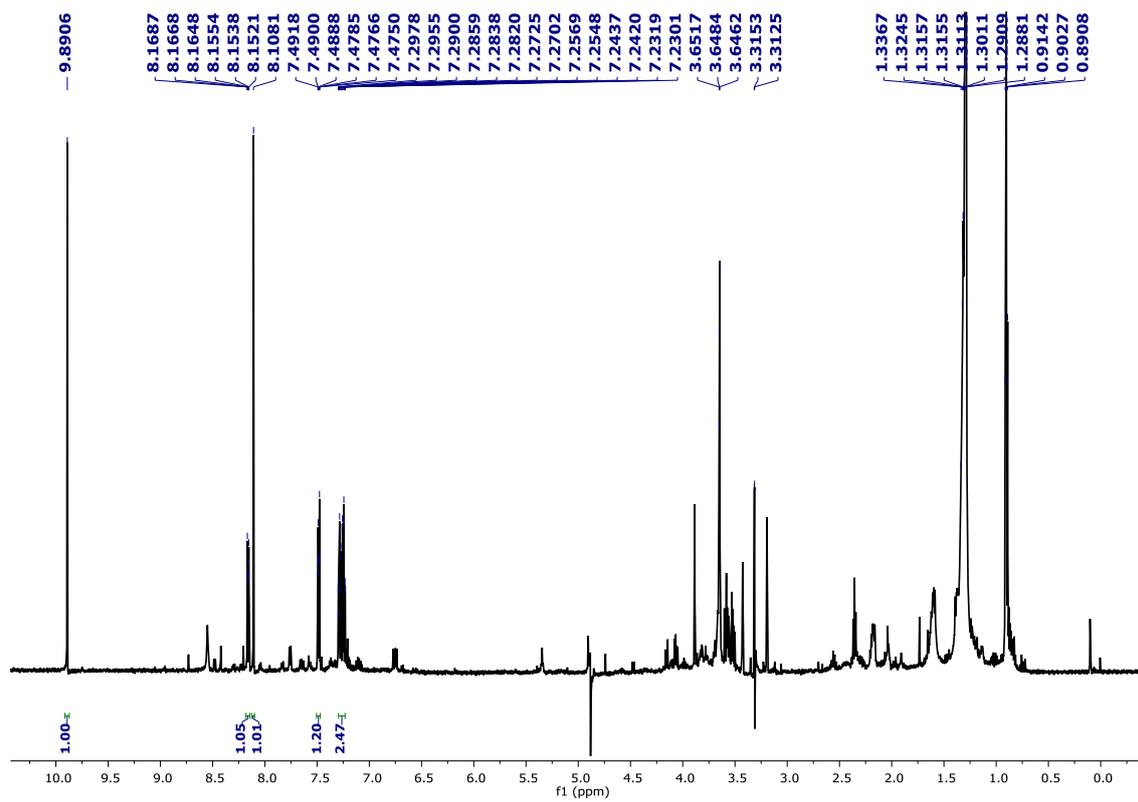
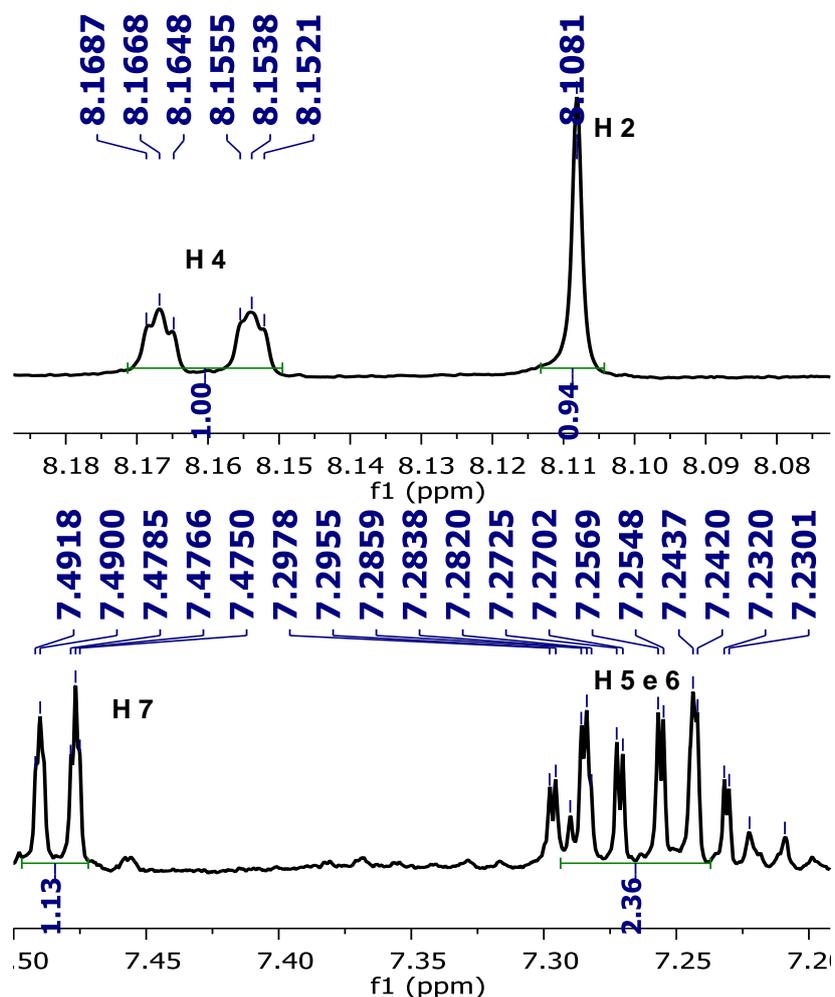


Figura 19 - Expansões da região aromática e olefínica espectro de RMN ^1H para a F.A 6-2 (600 MHz, MeOD - d_4)



As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos foram auxiliadas pelas correlações nos mapas de contornos gHSQC (Apêndice – Figura 33, pág. 74) e gHMBC (Apêndice – Figura 34, pág. 74) (Figura 20) e comparados com dados de André (2017), foi identificado o alcaloide indólico indol-3-carboxaldeído, sendo apresentado na Tabela 6.

Figura 20 - Principais correlações observadas no gHMBC do F.A 6-2

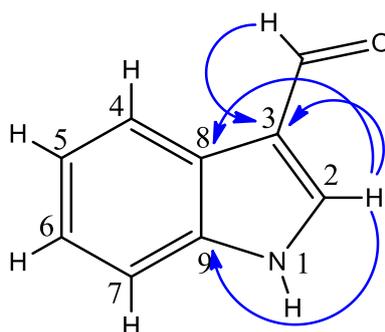


Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do F.A 6-2 (600 MHz, MeOD - d_4)

Posição	δ_{C} (isolado)	δ_{C} (ANDRÉ 2017)*	δ_{H} (isolado)	δ_{H} (ANDRÉ, 2017)*
CHO	-	187.5	9.89 s	9.89 s
1	-	-	-	-
2	139.5	140.0	8.10 s	8.10 s
3	119.8	120.2	-	-
4	122.1	122.5	8.16 dt (7.7, 1.1 Hz)	8.15 d (7.2 Hz)
5	123.3	123.8	7.30 – 7.23 m	7.29 – 7.23 m
6	125.1	125.1	7.30 – 7.23 m	7.29 – 7.23 m
7	112.8	113.3	7.48 dt (8.3, 1.0 Hz)	7.47 d (7.2 Hz)
8	125.3	-	-	-
9	138.5	139.1	-	-

* 500 MHz, MeOD - d_4 .

O espectro de massas indicou como íon precursor um íon dímero de m/z 293.14 $[2\text{M} + \text{H}]^+$ (Apêndice – Figura 35, pág. 75). Que confirma a estrutura do alcaloide indol-3-carboxaldeído.

5.5.3 - Elucidação estrutural do F.A 6-3

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4) do composto isolado (Figura 21) e expansão (Figura 22), identificou hidrogênios na região aromática, no qual com a análise das constantes de acoplamento identificando dois anéis aromáticos. O anel aromático **B** apresenta sinais em δ_{H}

7.50 ppm (*dd*, $J = 8.5, 2.3$ Hz, 1H), δ_H 7.40 ppm (*d*, $J = 2.3$ Hz, 1H) e 7.08 ppm (*d*, $J = 8.5$ Hz, 1H), que indica acoplamento *orto* e *meta*. O anel aromático **A** apresenta sinais em δ_H 6.45 ppm (*d*, $J = 2.1$ Hz, 1H) e δ_H 6.21 ppm (*d*, $J = 2.1$ Hz, 1H) com acoplamento em *meta*. Também é possível observar um sinal característico de hidrogênio olefínico em δ_H 6.59 (s, 1H) e sinal em δ_H 3.94 ppm (s, 3H) proveniente de uma metoxila.

Figura 21 - Espectro de RMN 1H do composto F.A 6-3 (600 mHz, MeOD - d4)

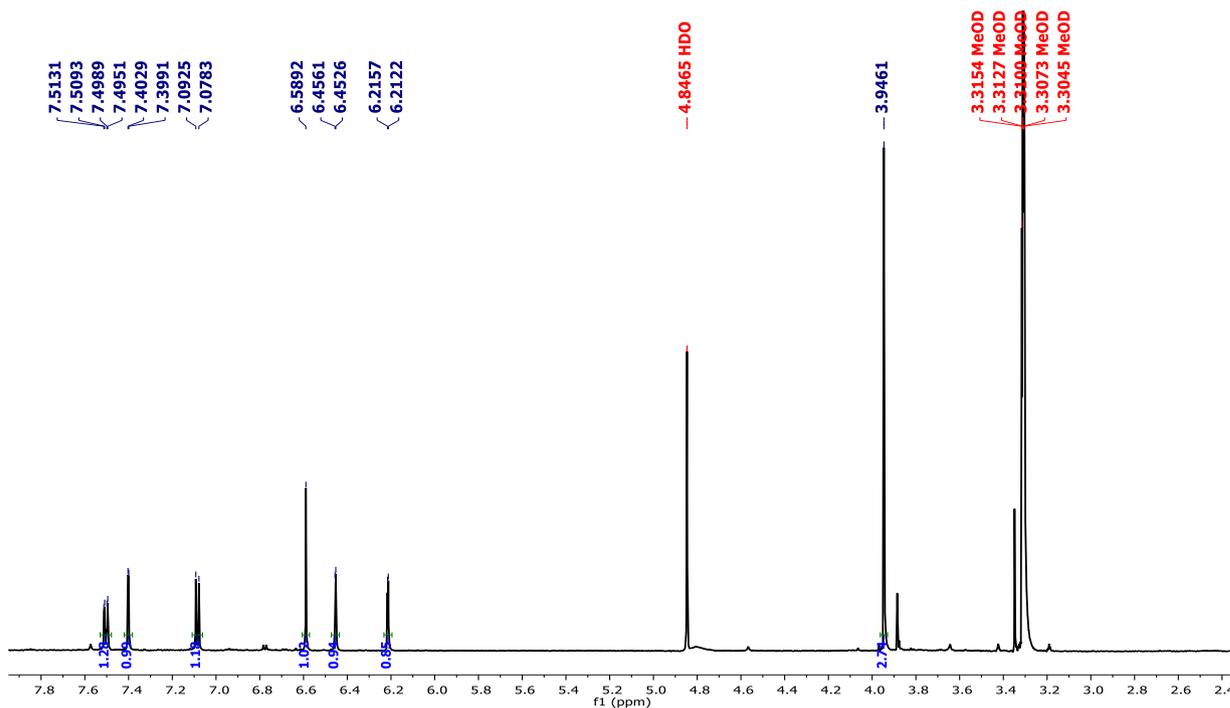
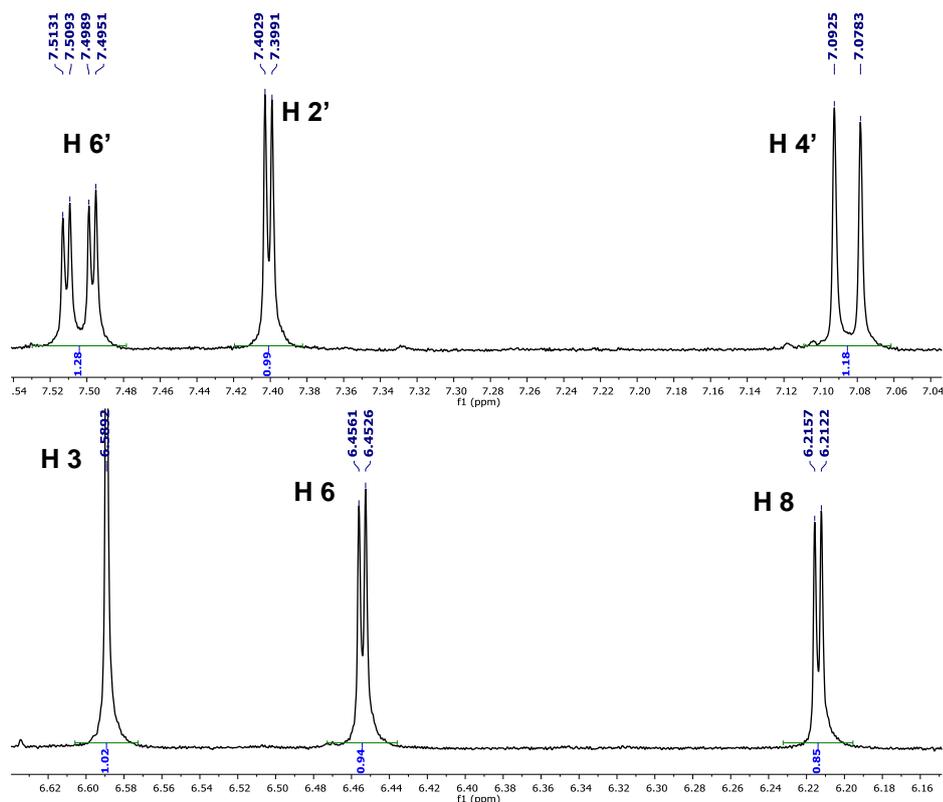


Figura 22 - Expansões da região aromática e olefínica espectro de RMN ^1H para a F.A 6-3 (600 MHz, MeOD - d4)



As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos foi auxiliada pelas correlações observadas no mapa de contornos *g*HSQC e *g*HMBC (Apêndice – Figura 36 e 47, pág 75 e 76) (Figura 23), comparados com a literatura (CASOTI, 2012) (Tabela 7). A partir da análise desses sinais e dos espectros de HSQC e HMBC, identificou-se a flavona diosmetina.

Figura 23 - Principais correlações observadas no *g*HMBC do F.A 6-3

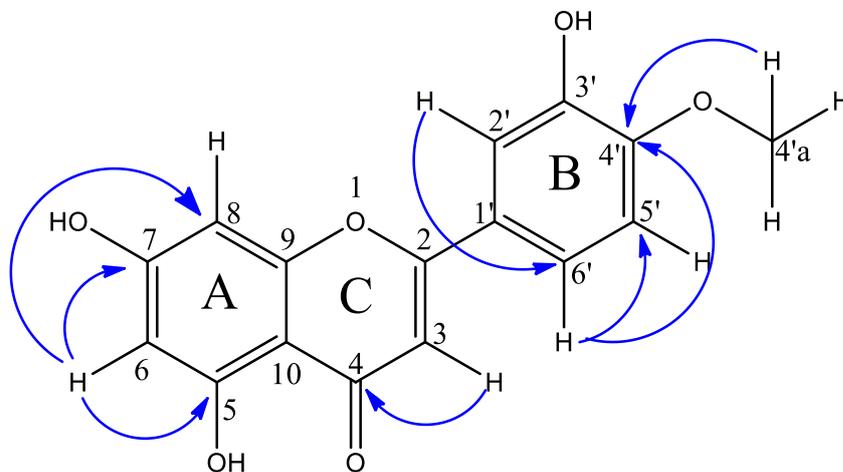


Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do F.A 6-3 (600 MHz, MeOD - d4)

Posição	δ_{C} (isolado)	δ_{C} (CASOTI, 2012)*	δ_{H} (isolado)	δ_{H} (CASOTI, 2012)*
1	-	-	-	-
2	164.5	164.6	-	-
3	103.1	104.0	6.59 s	6.76 s
4	182.4	182.1	-	-
5	158.0	161.9	-	-
6	93.8	99.3	6.45 <i>d</i> (2.1 Hz)	6.47 <i>d</i> (2.0 Hz)
7	-	164.6	-	-
8	98.9	94.3	6.21 <i>d</i> (2.1 Hz)	6.20 <i>d</i> (2.0 Hz)
9	-	157.7	-	-
10	104.0	104.1	-	-
1'	123.8	123.4	-	-
2'	112.6	113.4	7.40 <i>d</i> (2.3 Hz)	7.42 <i>d</i> (2.2 Hz)
3'	146.9	147.2	-	-
4'	151.4	151.6	-	-
4'a	55.1	56.2	3.94 s	3.80 s
5'	111.4	112.6	7.08 <i>d</i> (8.5 Hz)	7.09 <i>d</i> (8.6 Hz)
6'	118.5	119.1	7.50 <i>dd</i> (8.5 e 2.3 Hz)	7.55 <i>dd</i> (8.6 e 2.2 Hz)

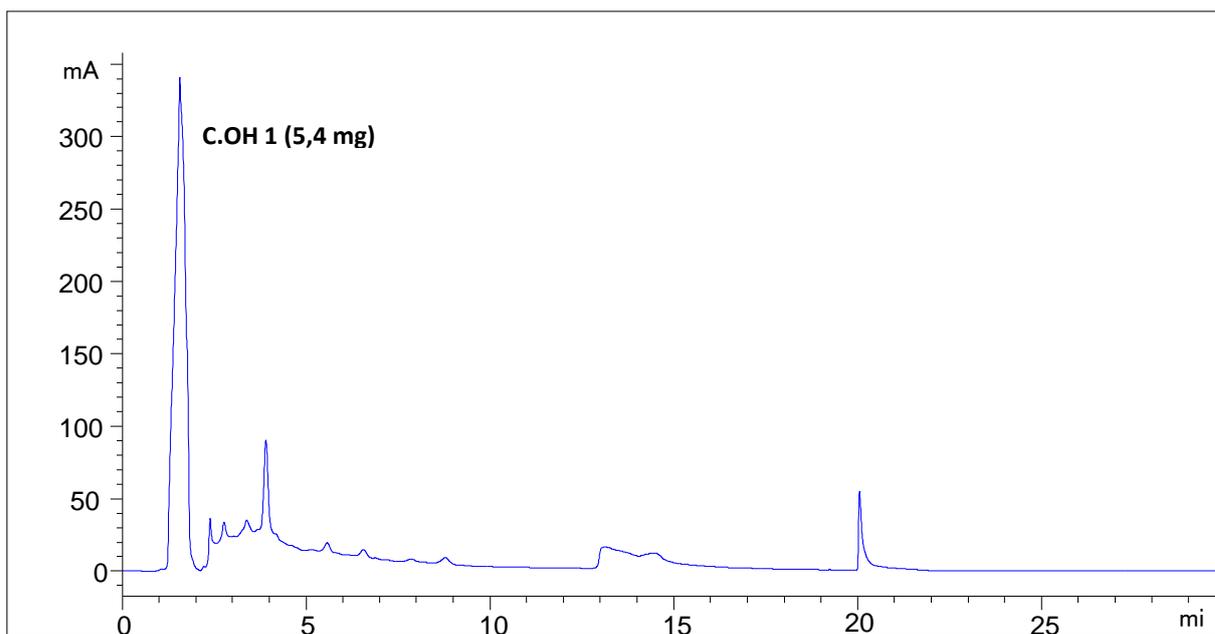
* 400 MHz, DMSO – d_6 .

Por meio do espectro de massas obtido no modo positivo (Apêndice – Figura 38, pág. 76), obteve um íon em m/z 301.06 $[\text{M}+\text{H}]^+$, assim pode determinar a fórmula molecular como $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

5.6 - PURIFICAÇÃO DA F.OH 20-21

A partir das condições cromatográficas e programação de coleta já estabelecidas no equipamento de CLAE-Uv com coletor automático isolou-se o composto C.OH 1 com um tempo de retenção próximo em 1,5 min (Figura 24).

Figura 24 - Programação para a purificação da F.OH 20-21



A fração isolada foi submetida às análises espectrométricas, RMN ^1H uni e bidimensional, e espectrometria de massas.

5.6.1 - Elucidação estrutural do C.OH 1

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, metanol- d_4) (Figura 25) e expansão (Figura 26 e 27) da amostra C.OH 1, apresentou um conjunto de sinais característicos de hidrogênios ligados a sistemas aromáticos e olefínicos, além de evidenciar hidrogênios anoméricos.

Figura 25 - Representação do espectro de RMN ^1H para o composto C.OH 1 (500 MHz, 500 MHz, MeOD - d4)

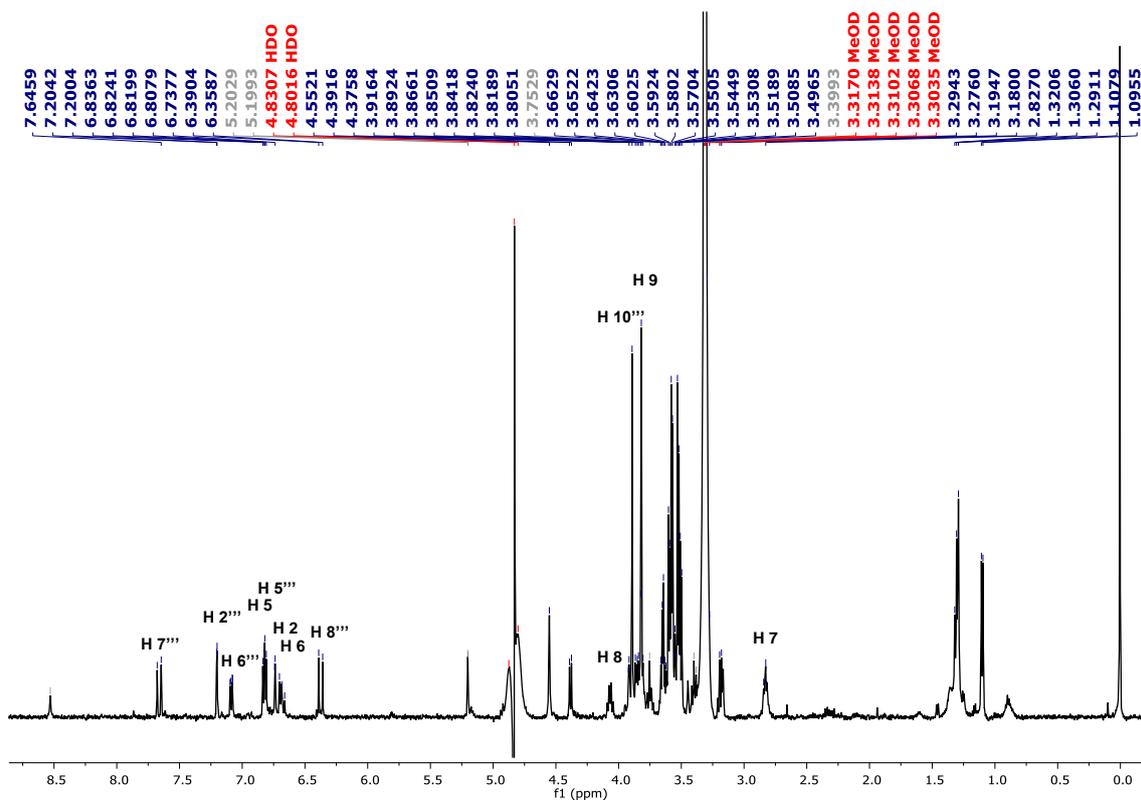


Figura 26 - Representação da expansão da região aromática e olefínica do espectro de RMN ^1H para o composto C.OH 1 (500 MHz, 500 MHz, MeOD - d4)

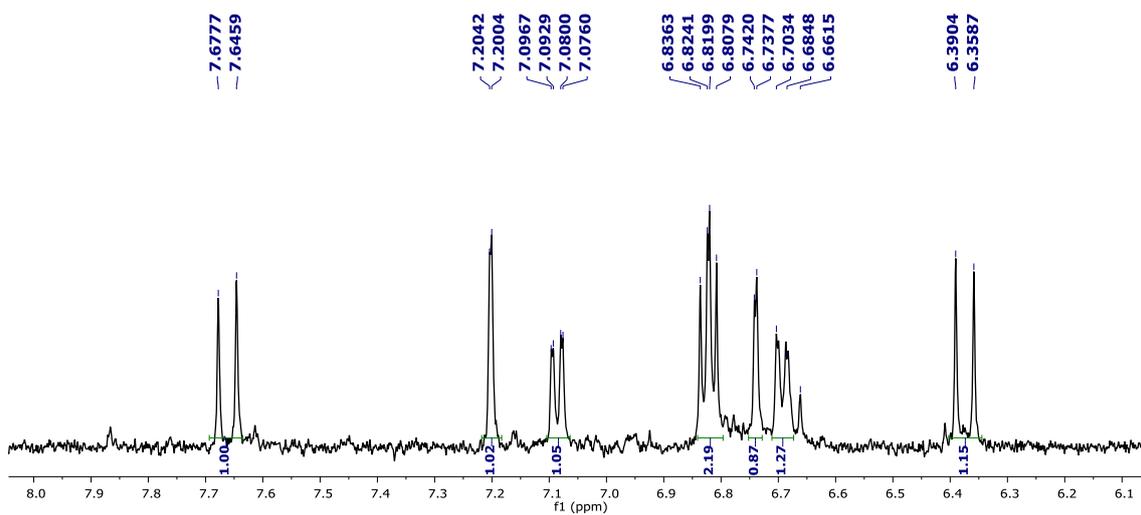
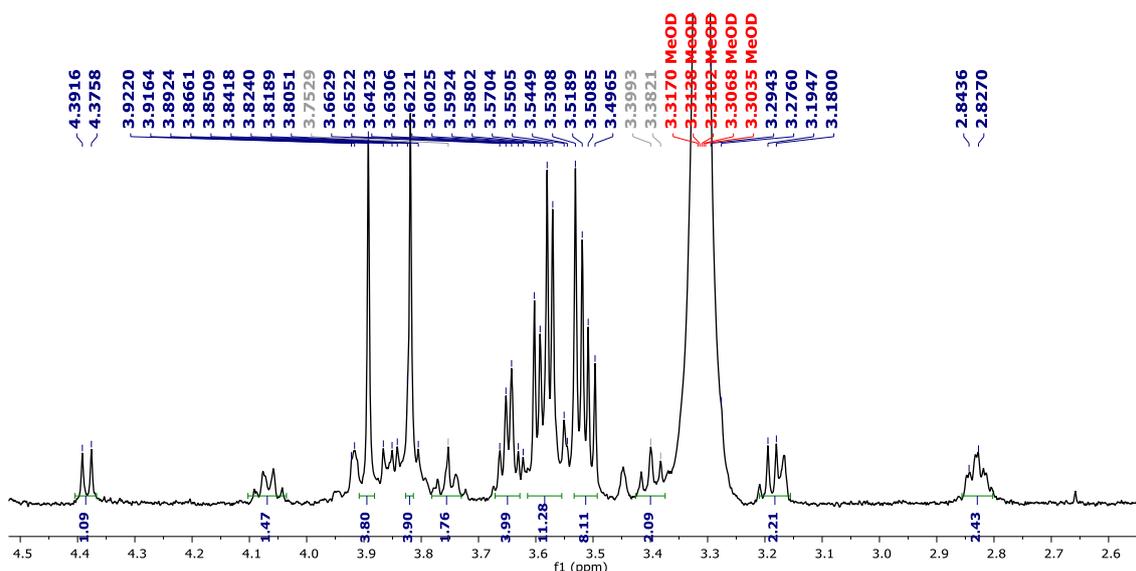


Figura 27 - Representação da expansão da região de OCH₃, OCH₂, CH₂ e H anomérico do espectro de RMN ¹H para o composto C.OH1 (500 MHz, MeOD - d₄)



São observados sinais de hidrogênios olefínicos em δ_H 7.66 ppm (*d*, $J = 16.0$ Hz, 1H) que se acopla em configuração *trans* com o hidrogênio em δ_H 6.37 ppm (*d*, $J = 16.0$ Hz, 1H). Devido aos valores de deslocamento químico dos hidrogênios olefínicos, possivelmente, este sistema está em conjugação com grupos de efeito ressonantes.

Na região de aromático foram identificados dois anéis aromáticos, um anel apresenta sinais em δ_H 7.20 ppm (*d*, $J = 2.0$ Hz, 1H), δ_H 6.81 ppm (*d*, $J = 8.1$ Hz, 1H) e δ_H 7.09 ppm (*dd*, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), as constante de acoplamento indicam hidrogênios em posições *orto* e *meta*, sendo trissubstituído. O outro anel aromático também trissubstituído apresenta sinais em δ_H 6.82 ppm (*d*, $J = 8.1$ Hz, 1H), δ_H 6.74 ppm (*d*, $J = 2.0$ Hz, 1H) e δ_H 6.69 ppm (*dd*, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H).

Os deslocamentos químicos em δ_H 5.2 ppm (*d*, $J = 1.7$ Hz, 1H) e δ_H 4.38 ppm (*d*, $J = 7.9$ Hz, 1H) confirmam a presença de duas unidades de monossacarídeos. O espectro também evidencia a presença de dois grupos metoxilas em δ_H 3.89 e δ_H 3.82 ppm, além de multipletos entre δ_H 3.4-4.0 ppm que estão relacionados aos grupos metilênicos dos anéis de glicose e ramnose. O deslocamento em δ_H 1.29 ppm refere-se ao grupo CH₃ ligado a ramnose.

As atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos foram auxiliadas pelas correlações nos mapas de contornos gHSQC (Apêndice – Figura 39, pág. 77) e gHMBC (Apêndice – Figura 40, pág. 77) (Figura 28) e comparados com dados de Pendota (2015), sendo apresentados na Tabela 8.

Figura 28 - Principais correlações observadas no gHMBC do C.OH 1

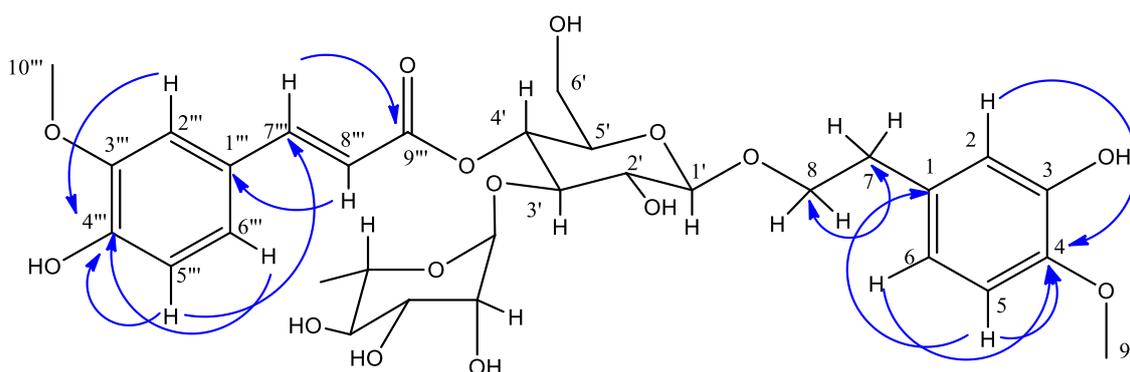


Tabela 8 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do C.OH 1 (500 MHz, MeOD - d₄) comparados com Pendota (2015).

Posição	δ_{C} (isolado)	δ_{C} (PENDOTA 2015)*	δ_{H} (isolado)	δ_{H} (PENDOTA 2015)*
Aglicona				
1	131.4	132.7	-	-
2	116.8	116.8	6.74 <i>d</i> (2.1 Hz)	6.77 <i>d</i> (2.0 Hz)
3	-	146.9	-	-
4	146.4	147.4	-	-
5	112.8	112.6	6.83 <i>d</i> (8.1 Hz)	6.85 <i>d</i> (8.2 Hz)
6	121.0	120.8	6.69 <i>dd</i> (8.0 e 2.0 Hz)	6.70 <i>dd</i> (8.1 e 2.0 Hz)
7	36.3	36.3	2.83 <i>t</i> (7.2 Hz)	2.82 <i>t</i> (7.4 Hz)
8	72.1	71.5	4.06 <i>dd</i> (16.9 e 7.6 Hz); 3.75 <i>m</i>	4.04 <i>dd</i> (17.0 e 7.2 Hz) 3.72 <i>dd</i> (17.4 e 7.7 Hz)
9	56.3	56.4	3.81 <i>s</i>	3.80 <i>s</i>
Glicose				
1'	104.3	103.9	4.38 <i>d</i> (7.9 Hz)	4.45 <i>d</i> (7.8 Hz)

2'	76.1	76.3	3.40 <i>t</i> (8.5 Hz)	3.45 <i>t</i> (8.4 Hz)
3'	81.3	79.6	3.82 <i>m</i>	3.89 <i>m</i>
4'	70.7	70.3	4.92 <i>m</i>	4.93 <i>t</i> (9.5 Hz)
5'	75.9	76.0	3.55 <i>m</i>	3.56 <i>m</i>
6'	64.4	62.4	3.57 <i>m</i>	3.57 <i>m</i>
Ramnose				
1''	102.7	101.9	5.20 <i>d</i> (1.1 Hz)	5.31 <i>d</i> (1.3 Hz)
2''	71.7	72.3	3.57 <i>m</i>	3.54 <i>d</i> (3.2 Hz)
3''	72.2	72.1	3.91 <i>m</i>	3.87 <i>m</i>
4''	-	73.7	-	3.33 <i>t</i> (9.3 Hz)
5''	70.4	69.5	3.60 <i>m</i>	3.65 <i>m</i>
6''	18.3	18.6	1.10 <i>d</i> (6.2 Hz)	1.13 <i>d</i> (6.2 Hz)
Ácido caféico				
1'''	126.4	127.5	-	-
2'''	111.6	111.4	7.20 <i>d</i> (2.0 Hz)	7.35 <i>d</i> (1.9 Hz)
3'''	148.6	148.8	-	-
4'''	-	150.3	-	-
5'''	116.5	116.1	6.81 <i>d</i> (8.1 Hz)	6.88 <i>d</i> (8.2 Hz)
6'''	124.2	124.3	7.09 <i>dd</i> (8.1 e 2.0 Hz)	7.16 <i>dd</i> (8.2 e 1.9 Hz)
7'''	147.2	146.8	7.66 <i>d</i> (16 Hz)	7.66 <i>d</i> (15.9 Hz)
8'''	115.0	115.4	6.37 <i>d</i> (16 Hz)	6.43 <i>d</i> (15.9 Hz)
9'''	167.2	167.2	-	-
10'''	56.6	56.4	3.89 <i>s</i>	3.92 <i>s</i>

*400 MHz, metanol - d₄.

No espectro de massas no modo positivo, obteve-se um íon molecular em m/z 653.51 $[M+H]^+$ (Apêndice - Figura 41, pág. 78), com a fórmula molecular $C_{31}H_{40}O_{15}$. Os dados espectrométricos foram conclusivos para a elucidação estrutural, podendo assim, confirmar a estrutura do fenilpropanoide glicolisado o martinósideo.

O isolamento e identificação do martinosideo e dos 2 alcaloides indólicos, contribui para o estudo fitoquímico, sendo a primeira vez relatados para essa espécie.

6 - CONCLUSÃO

O estudo realizado com a casca do fruto da *P. crucigerum* foi monitorado primeiramente por análises preliminares da composição química dos extratos. O perfil químico foi traçado através da triagem fitoquímica, que indicou a presença de uma variedade de metabólitos, com destaque para os E.D e E.A os quais apresentaram todas as classes de metabólitos investigados (Taninos, flavonoides, quinonas, terpenos e esteroides, saponinas e alcaloides).

Nos extratos E.H e E.D por meio do CG-EM compostos derivados de lipídeos, como ácidos graxos e também compostos da classe de terpenos.

A utilização de rede moleculares acelerou a desreplicação dos compostos presentes na casca de *P. crucigerum*, viabilizando a realização de identificação de 15 compostos, sendo estes 3 iridoides glicosilados, 6 flavonoides, 1 isocumarina, 3 triterpenos, 1 saponina e 1 leonignana, alguns novos para essa espécie.

Por meio do estudo fitoquímico foram isolados o flavonoide, diosmetina e dois alcaloides indólicos, o indol-3-carboxaldeido e o indol-3-ácido carboxílico, proveniente de uma fração do E.A e o isolamento do martinosideo, um fenilpropanoide glicosilado obtido de uma fração do E.OH. O martinosideo e os alcaloides indólicos, até o presente estudo, não foram isolados nessas espécies.

A análise da composição química da *P. crucigerum* contribuiu para o conhecimento químico desta espécie, uma vez que são poucos relatos descritos na literatura.

O potencial dessa espécie não pode ser descrito ainda por falta de testes biológicos, os quais podem ser realizados em trabalhos futuros.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, F. A. A. Phenylpropanoid and phenylethanoid glycosides from *Scrophularia xanthoglossa* and their antioxidative and antiinflammatory activities. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 7, n. 1, p. 57–64, 2010.

ANDRÉ, A.; WOJTOWICZ, N.; TOURÉ, K.; STIEN, D.; EPARVIER, V. New acorane sesquiterpenes isolated from the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* SNB-GSS07. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 13, p. 1269–1272, 2017.

ANKLI, A. S. **Research Collection Yucatec Mayan Medicinal Plants: Ethnobotany, Biological Evaluation and Phytochemical Study of *Crossopetalum gaumeri***. Zürich, 2000. 106p. Tese de doutorado - Swiss Federal Institute Of Technology Zurich.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, n. 1809–1636, p. 51–60, 2011.

ARRUDA, A. L. A. de. **Contribuição ao Estudo de Atividade Biológica de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae)**. Brasília, 2009. 136p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 525, 2013.

BYE, R. A. An 1878 ethnobotanical collection from San Luis Potosí: Dr. Edward Palmer's first major Mexican collection. **Economic Botany**, v. 33, n. 2, p. 135–162, 1979.

CARNEIRO, E., Pente-de-macaco. Disponível em: <<http://www.caliandradocerrado.com.br/2010/09/pente-de-macaco.html>>. Acesso em 24 de outubro de 2015.

CASOTI, R. **Study of pharmacognosy: *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill.** Santa Maria, 2012. 110p. Dissertação de Mestrado - Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2012.

CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CIPRIANI, F. A.; FIGUEIREDO, M. R.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2125–2131, 2012.

CIPRIANI, F.A. **Aspectos quimiotaxonômicos da família Bignoniaceae**. Rio de Janeiro, 2006. 291 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

COSTA, P. R. R. Natural products as starting point for the discovery of new bioactive compounds: Drug candidates with antiophidic, anticancer and antiparasitic properties. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 58–66, 2009.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova Na Escola**, n. 7, p. 21–25, 1998.

EL-DEMERDASH, E. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 3, p. 238–244, 2011.

FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V. de; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 3, p. 752–760, 2012.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v.23, n.1, pp.42-46, 2000.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia No Mundo Atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 538–552, 2010.

FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 10. ed. S.I. Livraria Vida, 2005.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GONZÁLEZ, L. A. M. **Plantas medicinales nativas de Panamá y su potencial para el tratamiento de las patologías de mayor impacto en el país**. Bogotá,

2014. 776 p. Dissertação de Mestrado - Facultad De Ciencias - Departamento De Biología - Pontificia Universidad Javeriana.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. DE M. B. Quantitative chemo-biology: A new paradigm? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105–2114, 2012.

JI, Y. B.; XU, Q. S.; HU, Y. Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, n. 1–2, p. 97–104, 2005.

KIRST, H. A. The spinosyn family of insecticides: Realizing the potential of natural products research. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 3, p. 101–111, 2010.

KREIS, W; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. de P; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 13, p.147-166.

LIEBERMAN, S.; ENIG, M. G.; PREUSS, H. G. A Review of Monolaurin and Lauric Acid. **Alternative & Complementary Therapies**, v. 12, n. 6, p. 310–315, 2006.

LOHMANN, L.G. 2015 Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112461>>. Acesso em 19 de dezembro de 2018.

LOPEZ, C. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente, Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19–27, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VIEGAS JR, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MARTIN, F.; HAY, A.; CORNO, L.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1307–1311, 2007.

MAZZA, M. C. M.; RODIGHIERI, H. R.; NAKASHIMA, T; ZILLER, S. R.; MAZZA, C. A. da S.; CONTO, A. J. de; SOARES, A. de O.; BAGGIO, A. J. **Potencial de aproveitamento medicinal de espécies do sub-bosque dos bracingais da região de Curitiba, PR**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 27p. (Embrapa Florestas. Documentos, 43)

MIETTINEN, T. A. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 10, n. 1, p. 27–35, 1980.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.

NOZAWA, K.; YAMADA, M.; TSUDA, Y.; KAWAI, K.; NAKAJIMA, S. Antifungal Activity of Oosponol, Oospolactone, Phyllodulcin, Hydrangenol, and Some Other Related Compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 2689–2691, 1981.

PAULETTI, P. M.; DA SILVA BOLZANI, V.; YOUNG, M. C. M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003.

PENDOTA, S. C.; ADEROGBA, M. A.; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial activity of extracts and an isolated compound from *Boscia albitrunca* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 96, p. 91–93, 2015.

POSER, G. L. V.; SCHRIPEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 4, p. 351–366, 2000.

PRÁ, S. D. T. de; FERRO, P. R.; MILIOLI, A. M.; RIGO, F. K.; CHIPINDO, O. J.; TREVISA, G. Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, n. October 2016, p. 283–297, 2017.

SALARI, M. H.; KADKHODA, Z. In vitro antibacterial effects of glycyrrhetic acid on periodontopathogenic and capnophilic bacteria isolated from adult periodontitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 9, p. 987–988, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. de P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, 2006.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 399–420, 2008.

UFRGS. **Flora digital do Rio Grande do Sul e Santa Catarina: *Amphilophium crucigerum***. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=8706>. Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2^a ed. New York: Springer, 1996.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

APÊNDICE

Figura 29 - Mapas de contorno HSQC do composto F.A 6-1

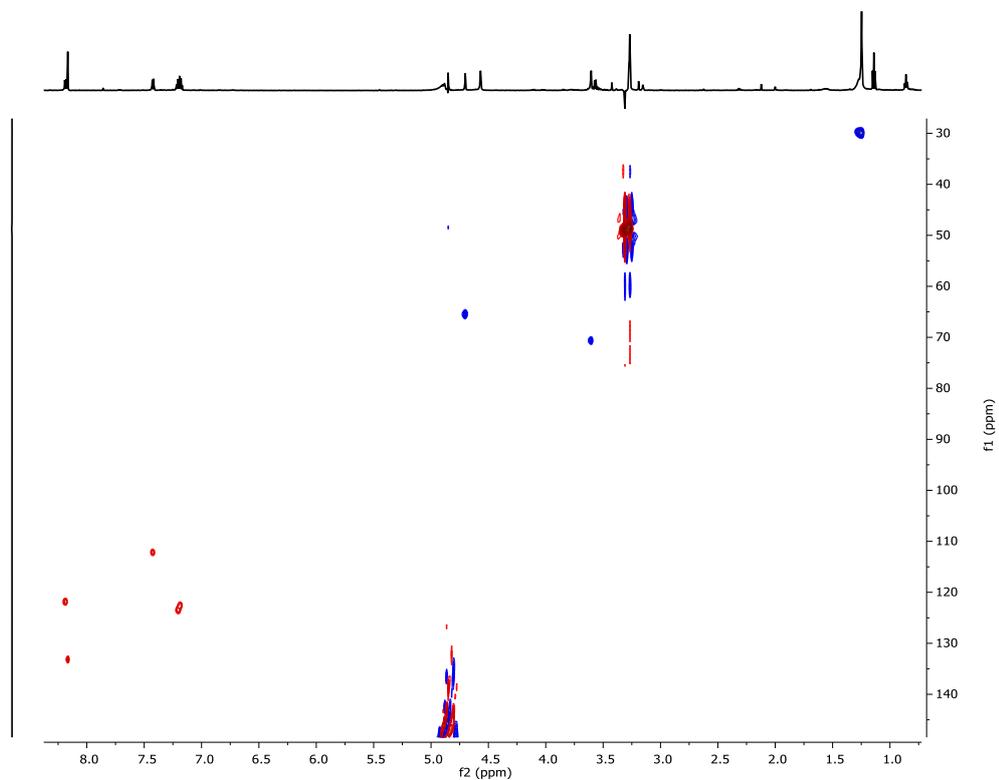


Figura 30 - Mapas de contorno HMBC do composto F.A 6-1

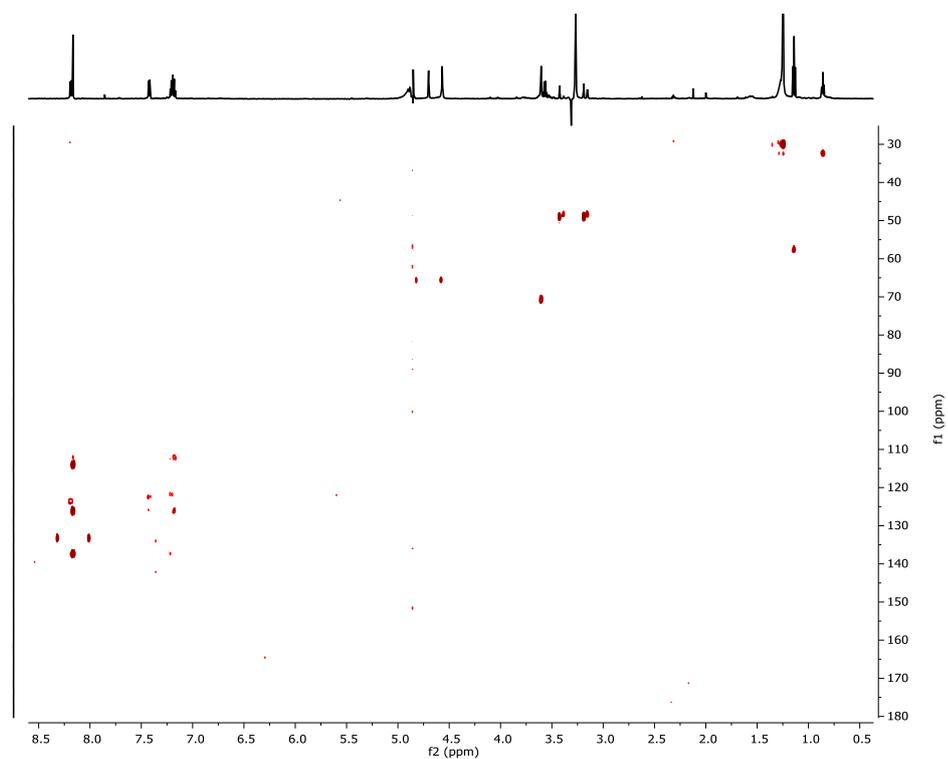


Figura 31 - Espectro de massas de alta resolução (MS/MS) do composto F.A 6-1 com o íon precursor de 323.19 [2M + H]⁺

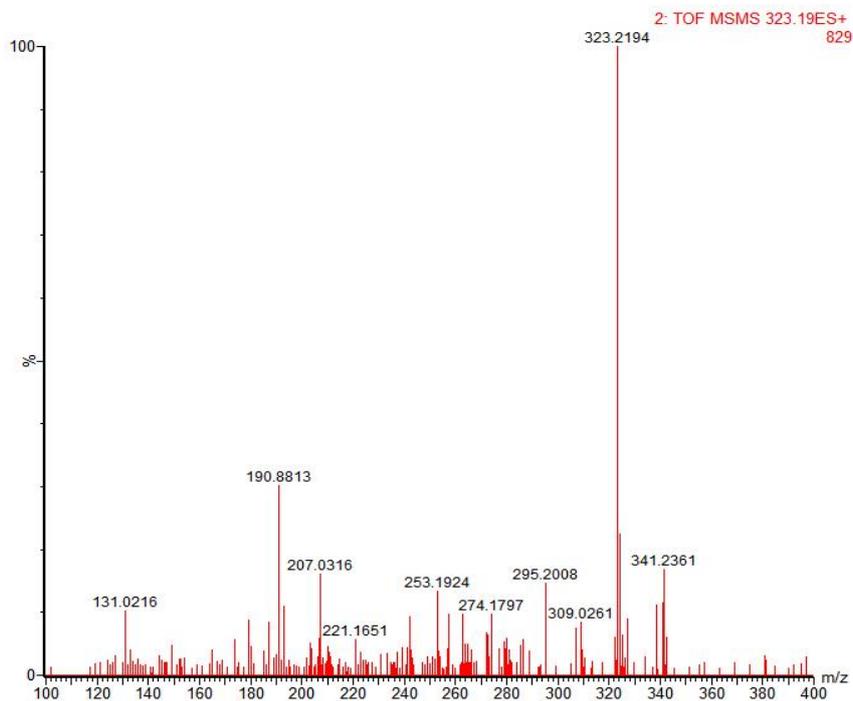


Figura 32 - Mapa de contorno Cosy do composto F.A 6-2

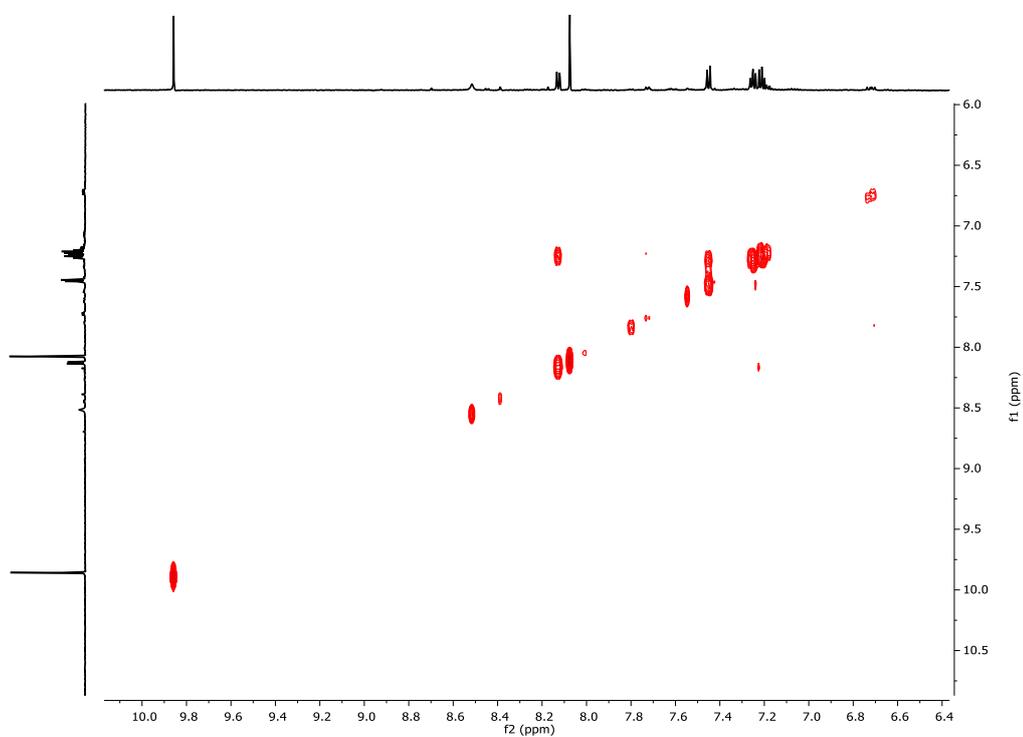


Figura 33 - Mapas de contorno HSQC do composto F.A 6-2

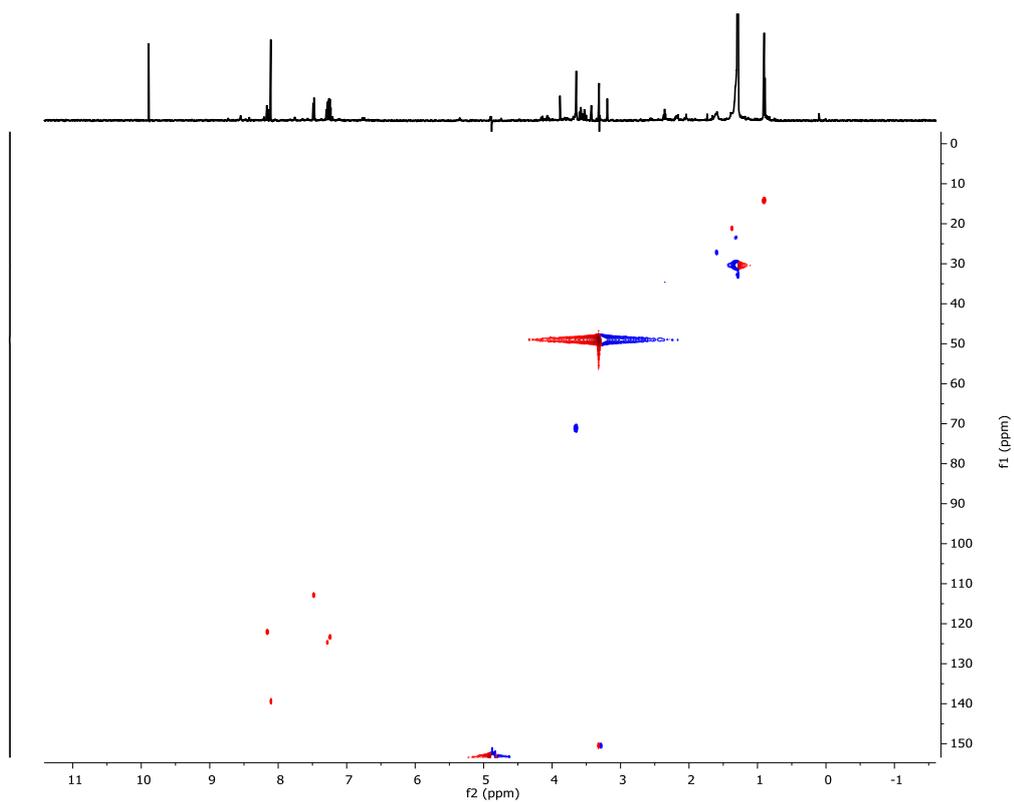


Figura 34 - Mapas de contorno HMBC do composto F.A 6-2

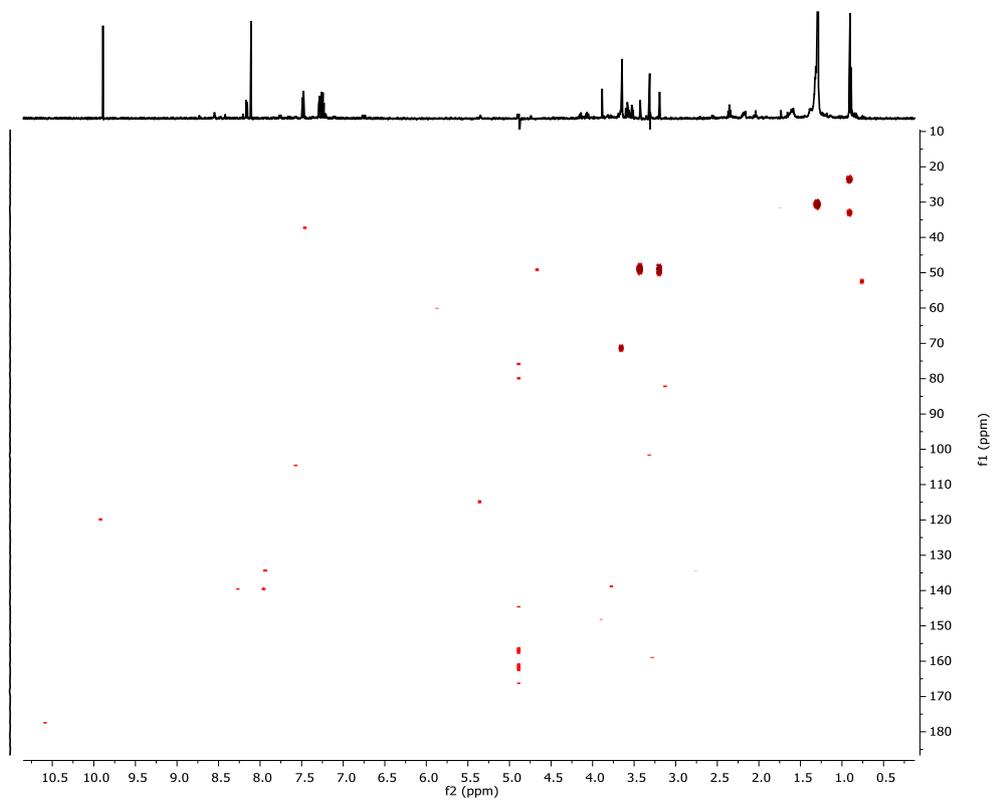


Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução (MS/MS) do composto F.A 6-2 com o íon precursor de 293.14 [2M + H]⁺

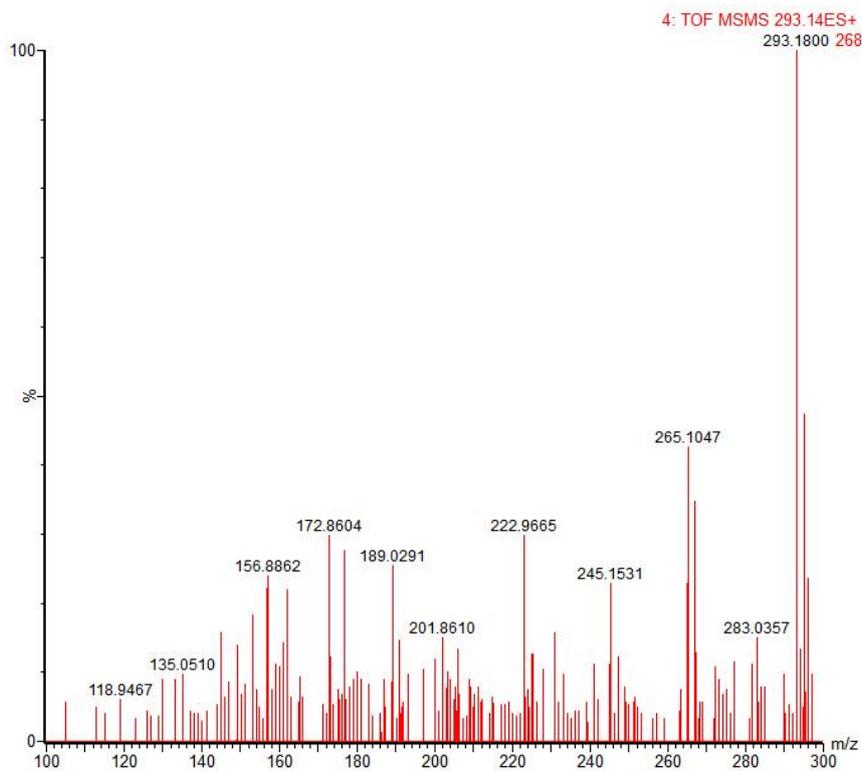


Figura 36 - Mapas de contorno HSQC do composto F.A 6-3

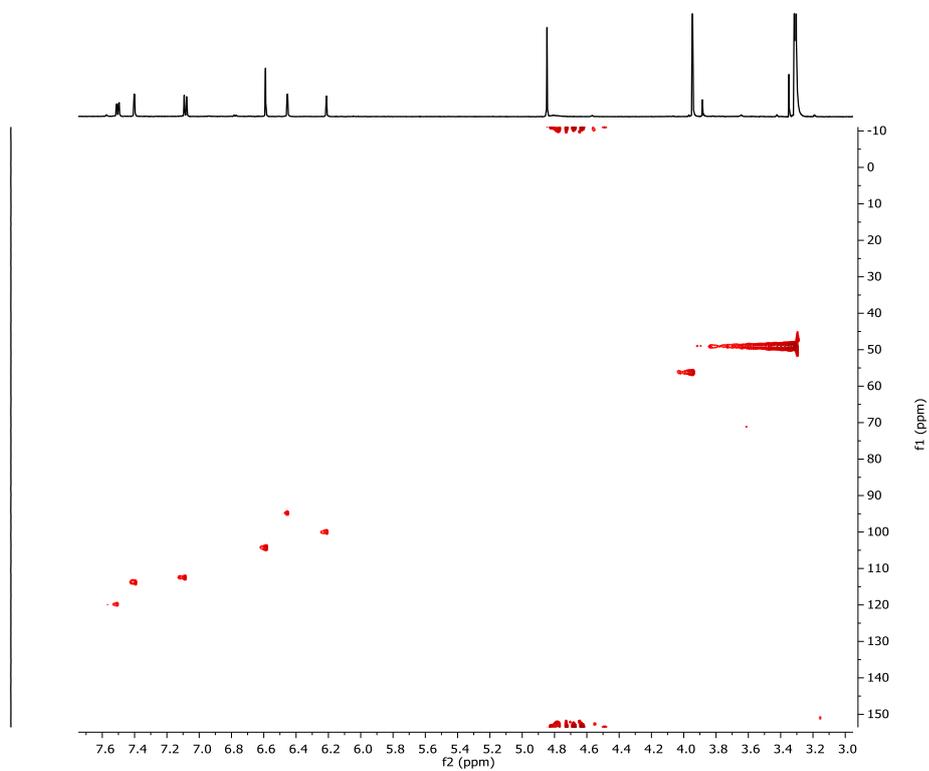


Figura 37 - Mapas de contorno HMBC do composto F.A 6-3

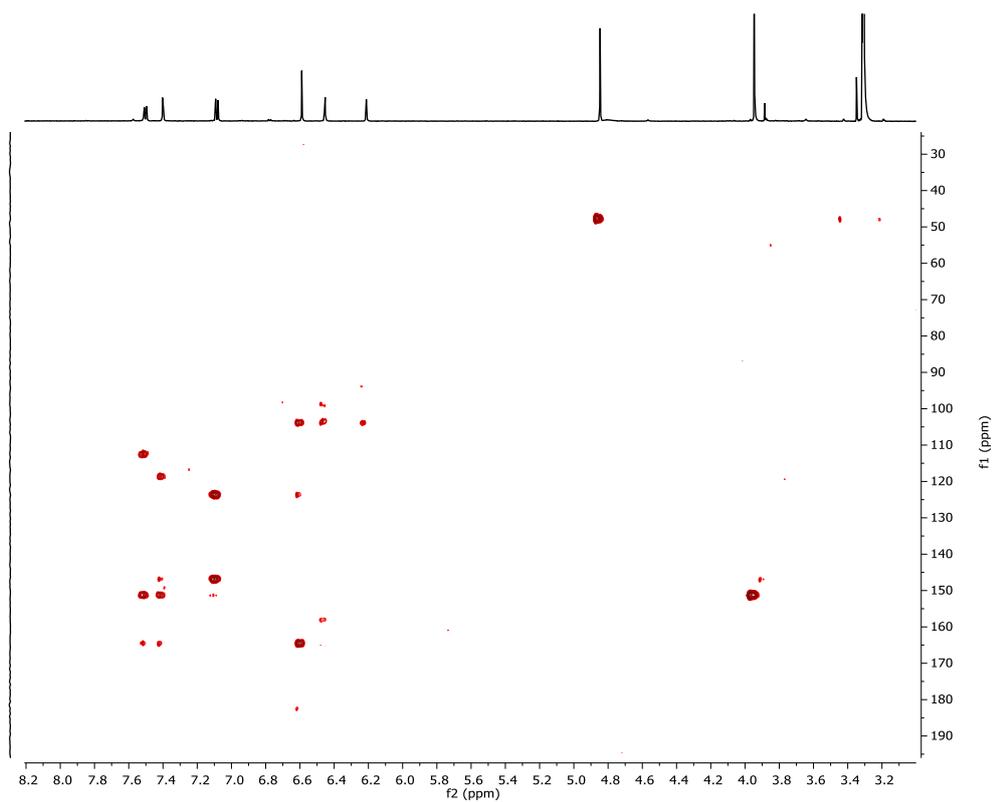


Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução EM/EM do F.A 6-3, íon precursor m/z 301.06.

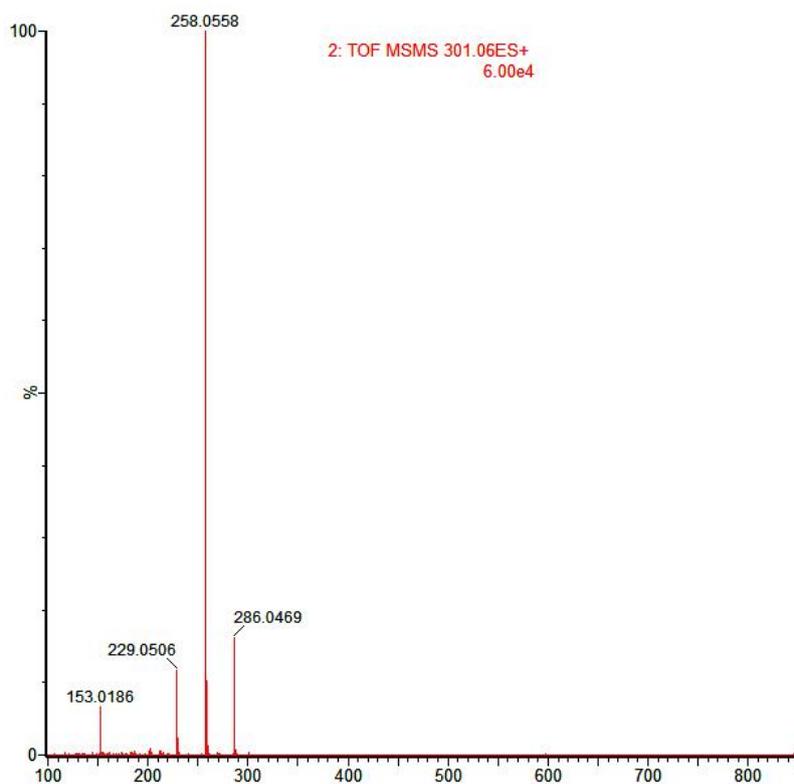


Figura 39 - Mapas de contorno HSQC do composto C.OH 1

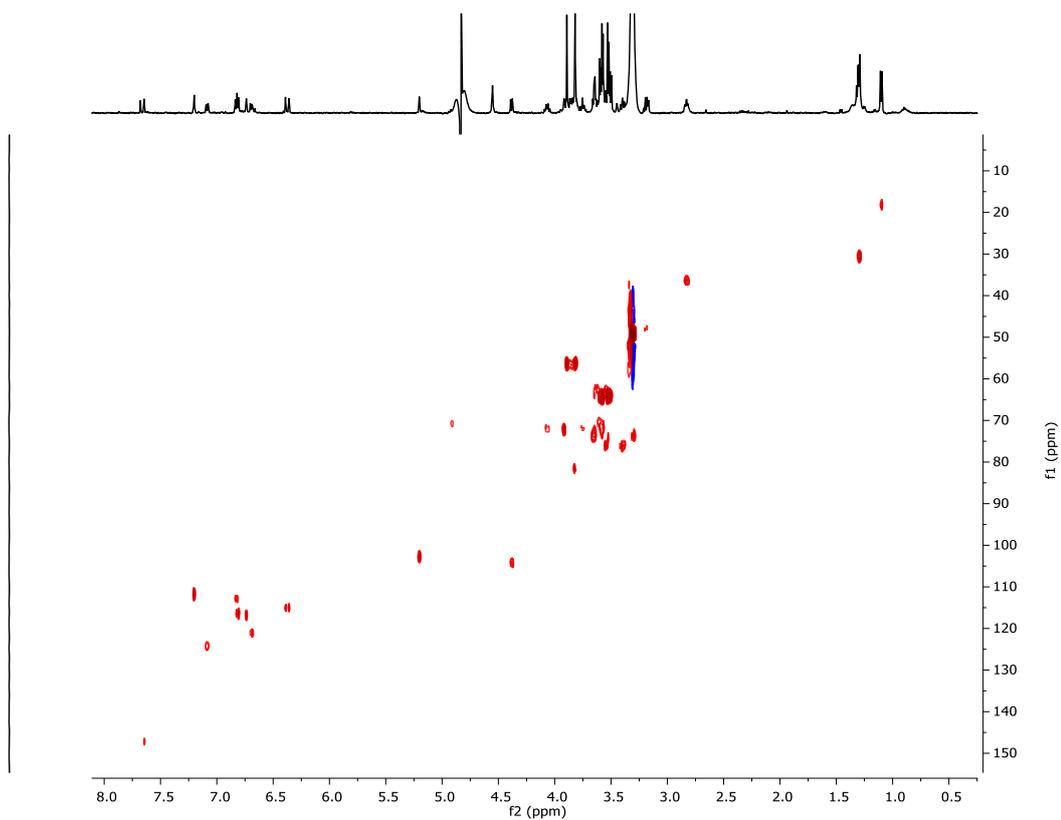


Figura 40 - Mapas de contorno de HMBC do composto C.OH 1

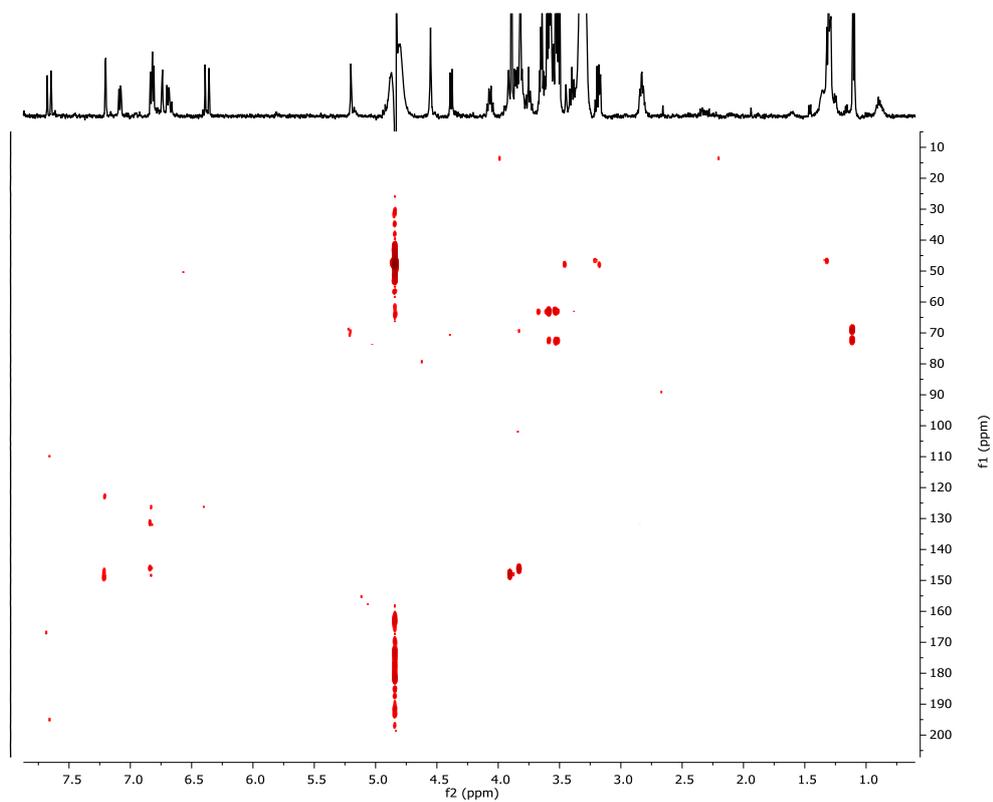
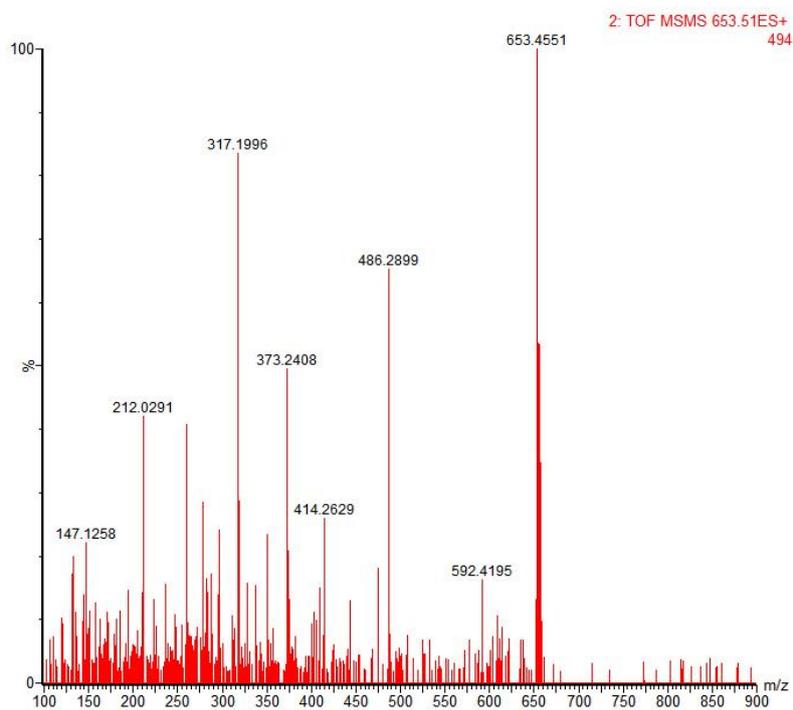


Figura 41 - Espectro de massas de alta resolução EM/EM do C.OH 1, íon precursor m/z 653.51.



Quadro 6 - Metabólitos identificados da *P. crucigerum* através da combinação de redes moleculares - GNPS e EM/EM no modo positivo

Número/Classe	Identificação	m/z Biblioteca	m/z Experimental	Aduto	Massa exata	EM/EM experimental
Iridoides						
21	6- α -L-(3"-caffeoil)rhamnopiranosilcatalpol	693.20	693.51	[M + Na]	670.617	693.4664 (100%); 643.3669 (3%); 516.6578 (2%); 278.2654 (5%); 207.1346 (4%); 175.0576 (5%); 147.1109 (6%)
22	Scutellariosideo II	531.15	531.40	[M + Na]	508.476	531.3871 (100%); 465.8432 (26%); 339.0784 (15%); 287.2312 (19%); 204.0904 (22%); 142.0814 (18%)
23	Scropheanosideo I	691.22	691.18	[M + Na]	668.645	691.1362 (100%); 283.0453 (2%); 268.9955 (2%); 209.0317 (1%)
Flavonoides						
24	Hesperetina	303.09	303.08	[M + H]	302.282	287.0510 (3%); 177.0553 (7%); 153.0212 (100%); 149.0597 (11%); 134.0597 (11%); 117.0376 (5%)
25	Diosmetina	301.06	301.07	[M + H]	300.266	286.0499 (16%); 258.0558 (100%); 229.0506 (11%); 153.0186 (6%)
26	Diosmina	609.19	609.21	[M + H]	608.549	595.3303 (9%); 553.7827 (6%); 518.9896 (8%); 340.3413 (5%); 301.0724 (100%); 286.0504 (16%); 258.0525 (5%)
27	Acacetina	285.08	285.06	[M + H]	284.267	285.0757 (4%); 270.0599 (8%); 242.0642 (100%); 153.0212 (27%)
28	5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona	471.11	471.12	[M + K]	432.425	333.1912 (5%); 303.4014 (10%); 242.2360 (9%); 172.1152 (100%);

						116.0528 (10%)
29	Padmatina	301.07	301.06	[M - H ₂ O + H]	318.281	301.0688 (64%); 286.0469 (100%); 258.0591 (25%); 223.0084 (10%); 172.8647 (13%); 153.0212 (10%)
Isocumarina						
30	Hidrangenol	257.08	257.06	[M + H]	256.257	239.0758 (25%); 228.0302 (26%); 211.0801 (30%); 201.0803 (45%); 165.0779 (100%); 153.0693 (38%); 133.8730 (50%); 128.0638 (22%)
Triterpenos						
31	Enoxolona	471.35	471.35	[M + H]	470.694	471.3466 (13%); 425.3513 (40%); 317.2179 (8%); 271.2107 (27%); 253.1997 (23%); 235.1673 (20%); 217.1584 (41%); 189.1650 (100%); 175.1526 (42%); 147.1183 (49%); 133.1027 (29%)
32	Ácido ursólico lactona	455.35	455.36	[M + H]	454.695	409.3487 (10%); 391.3311 (2%); 255.2151 (23%); 215.1797 (54%); 203.1797 (52%); 189.1650 (100%); 173.1337 (43%); 159.1175 (66%); 147.1183 (74%); 133.1050 (72%); 119.0888 (39%)
33	Ácido oleanóico	439.36	439.36	[M - H ₂ O + H]	456.711	319.0529 (6%); 253.1900 (9%); 203.1827 (100%); 189.1622 (58%); 147.1183 (72%); 135.1183 (38%); 119.0911 (25%)
Saponina						

34	Ilexsaponina A	687.37	687.39	[M + Na]	664.833	687.3613 (100%); 669.3508 (19%); 551.2922 (8%); 412.9527 (6%); 282.0620 (5%); 237.1664 (4%); 201.9891 (11%)
Neolignanas						
35	Isolicarina A	327.16	327.15	[M + H]	326.392	237.1097 (20%); 226.0824 (20%); 172.8620 (21%); 153.0718 (38%); 137.0605 (100%); 127.0543 (31%); 115.0546 (21%); 103.0616 (9%)