



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



KATHERINE XAVIER BASTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Hancornia speciosa*: ISOLAMENTO, ATIVIDADE
BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
EFICIÊNCIA ULTRA ELEVADA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

JOÃO PESSOA
2016

KATHERINE XAVIER BASTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Hancornia speciosa*: ISOLAMENTO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EFICIÊNCIA ULTRA ELEVADA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

JOÃO PESSOA

2016

KATHERINE XAVIER BASTOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Hancornia speciosa*: ISOLAMENTO, ATIVIDADE
BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
EFICIÊNCIA ULTRA ELEVADA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Aprovada em 14 de outubro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientador)

Profa. Dra. Silvana Maria Zucolotto Langassner
Universidade Federal do Rio Grande do Norte– Campus I
(Co-orientadora)

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Interno)

Profa. Dra. Danielly Albuquerque da Costa
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Externo)

Dedico este trabalho a minha família, em especial, à minha avó, Maria Neusa (*in memoriam*), que com muito amor sempre me apoiou e me motivou diante das minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida, pelas vezes que ELE segurou minha mão nas horas em que eu mais precisei, por ter me dado a força necessária para passar todo esses tempo distante de todos que me amam verdadeiramente e pela força dada quando tudo conspirou contra. Obrigada meu DEUS por ter caminhado comigo nesses dois anos de pós graduação não me deixando desviar do meu foco e por todas as bênçãos derramadas até hoje.

À minha família, principalmente a minha mãe Socorro Xavier e ao meu pai Cimar Bastos pelo amor, paciência, incentivo (mesmo sem saber o que realmente é esse trabalho), pelas palavras de conforto nos momentos necessário, por conseguir decifrar o que minha voz quer transmitir mesmo distante, e ao meu irmão Ibsen que sempre está vibrando em cada vitória comigo, pelas viagens que acompanhou pra eu assistir aula e por todo apoio dado.

À minha avó Maria Neusa Bastos (*in memorian*), que sempre me apoiou em todas as fases do estudo e felizmente/infelizmente hoje não se encontra na vida terrena para assistir esse momento. À senhora o meu infinito agradecimento.

Ao meu esposo Emídio Calixto, pela paciência, apoio, confiança e compreensão depositada em mim durante todo esse tempo de pós graduação distante. Você foi fundamental nesse processo.

À minha amiga Ana Paula Lopes pela amizade, companheirismo desde o início do curso de farmácia até os dias atuais, principalmente nessa reta final compartilhando felicidades e angústias, fornecendo todo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, um profissional excepcional, exemplo de pesquisador e de ser humano. Os seus ensinamentos ficarão pra sempre em minha memória. Obrigada pela oportunidade e por todas às vezes que estava sem saída e o senhor sempre chegava com a solução, o senhor foi peça fundamental para a concretização desse sonho.

À professora Silvana Zucolotto, que abriu as portas do seu laboratório na UFRN e me acolheu como uma mãe.

À professora Bárbara Viviana, por ter me dado a oportunidade de entrar nesse mundo da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva pelos ensinamentos passados.

Ao Dr. Vicente Carlos Oliveira Costa pela contribuição na parte espectroscópica.

Ao amigo Evandro Ferreira por sua grande ajuda, disponibilidade e apoio.

Ao técnico Raimundo Nonato por toda ajuda e ensinamentos necessários no laboratório de fitoquímica.

Às amigas Denise Leite, Gabrielle Sousa, Rayssa Marques, Ryldene Marques pela ajuda nos momentos de maiores dificuldades encontrados no dia a dia do laboratório, pelas conversas diárias.

À Yuri Mangueira e Ramon Leal que “chegaram junto” no último semestre de mestrado. A ajuda de vocês foi fundamental para concretização desse trabalho.

Aos amigos construídos na UFRN: Júlia Moraes, além de colega de pós, uma amiga pra vida toda, Elyson Salustino , às Lorenas Maria e Cunha e Estela Lourenço. Obrigada meus amigos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB).

Aos professores da pós-graduação por seus ensinamentos fundamentais para minha carreira profissional.

Ao Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (UFRN), em especial ao Prof. Leonardo Versieux pela identificação do material botânico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal da Paraíba.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

RESUMO

BASTOS, K. X. **Estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa*: isolamento, atividade biológica e caracterização por Cromatografia Líquida de Eficiência Ultra Elevada acoplada à Espectrometria de Massas**. 2016. 134 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Apocynaceae é uma família botânica que incluem entre 3700 e 5100 espécies, estando distribuídas praticamente no mundo todo, mas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil ocorrem aproximadamente 90 gêneros e 850 espécies, habitando diversas formações vegetais. Dentro dessa grande família botânica está o gênero *Hancornia*, que é considerado monotípico e, por isso, sua única espécie é *Hancornia speciosa* Gomes, abundante no cerrado nordestino. Diante disto, este trabalho tem como objetivo estudar fitoquimicamente *Hancornia speciosa* contribuindo com o conhecimento químico da espécie, além de avaliar a atividade antifúngica do extrato e compostos isolados. Para realização do estudo, o material vegetal, após secagem e pulverização, foi submetido a processos de extração e cromatografia para isolamentos dos constituintes químicos. Técnicas como Cromatografia Líquida de Alta eficiência e Cromatografia Líquida de Eficiência Ultra Elevada foram empregadas no trabalho. A estrutura química das substâncias foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e bidimensionais em comparações com dados da literatura. O fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica resultou no isolamento do cafeato de etila, da fase acetato de etila obteve-se a isoquercetrina, além da narigenina, e uma mistura do ácido 4,5-di-O-E- cafeoil-quínico com o ácido 3,5-di-O-E- cafeoil-quínico da fase butanólica. Todos esses compostos foram relatados pela primeira vez em *Hancornia speciosa*. A caracterização do extrato das folhas desta espécie por Cromatografia Líquida de Eficiência Ultra Elevada acoplada à Espectrometria de Massas forneceu ainda a identificação de vinte e quatro compostos. Já o estudo da atividade antifúngica do extrato forneceu um resultado positivo, porém o estudo dos compostos isolados não forneceu, não sendo capaz de inibir o crescimento das

cepas em estudo em nenhuma concentração testada. Este trabalho contribuiu evidenciando que esta espécie é bioprodutora de compostos fenólicos, como demonstrado neste estudo fitoquímico.

Palavras-chaves: *Hancornia speciosa*, compostos fenólicos, atividade antifúngica, UHPLC acoplado a Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

BASTOS, K. X. **Phytochemical study *Hancornia speciosa*: isolation, characterization and biological activity by Ultra-high Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry.** 2016. 134 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Apocynaceae is a botanical family that includes between 3700 and 5100 species are distributed almost worldwide, but mainly in tropical and subtropical regions. In Brazil there are about 90 genera and 850 species, inhabiting different vegetation types. Within this large botanical family is gender *Hancornia*, which is considered monotypic and therefore its unique species is *Hancornia speciosa* Gomes, and is abundant in the northeastern cerrado. In view of this, this paper aims to study fitoquimicamente *Hancornia speciosa* thus contributing to the expansion of the chemical knowledge of the species. In addition to evaluating the antifungal activity of the extract and isolated compounds. For the study, the plant material after drying and pulverizing, was subjected to extraction and chromatography processes for isolation of chemical constituents. Techniques such as Cromatografia Líquida de Alta Eficiência and Ultra-high Performance Liquid Chromatography were employed at work. The chemical structure of the substances was determined by ^1H Nuclear Magnetic Resonance, ^{13}C and dimensional comparisons with literature data. Chromatographic fractionation of the chloroform phase resulted in the isolation of caffeate acetate, the ethyl acetate phase gave the isoquercetrina beyond the narigenina, and a mix of acid 4,5-*O-E*-caffeoil-quinic acid with 3,5-di -*O-E*-caffeoil-quinic the butanol phase. All these compounds were first reported in *Hancornia speciosa*. Characterization of the extract of *Hancornia speciosa* leaves by Ultra-high Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry also provided the identification of twenty-four compounds. Since the study of the antifungal activity of the extracts provide a positive result, but compounds isolated did not provide a positive result, not being able to inhibit the growth of the strains in any concentration tested. This work

contributed indicating that this species is bioprodutora phenolic compounds, as demonstrated in this phytochemical study.

Keywords: *Hancornia speciosa*, phenolic compounds, antifungal activity, UHPLC coupled to Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de <i>Hancornia speciosa</i> no Brasil.	29
Figura 2. Aspecto visual da planta adulta de mangabeira (A), da flor e das folhas (B). Santa Rita- PB- 2015.....	30
Figura 3. Estrutura química e numeração padrão dos flavonoides.....	35
Figura 4. Via de metabolismo para obtenção dos flavonoides.	37
Figura 5. Cromatograma preparativo da Fração A4-6 de <i>Hancornia speciosa</i>	51
Figura 6. Representação do teste de microdiluição em caldo. Coluna 1 = controle de esterilidade do extrato. Coluna 2 – 9 = poços teste. Coluna 10 = controle de viabilidade do inóculo. Coluna 11 = controle do solvente. Poço 12 = controle de esterilidade do meio de cultura.....	55
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hs-1	57
Figura 8. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hs-1 na região de 7,7-6,0 ppm.	58
Figura 9. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Hs-1 na região de 4,7-0,9 ppm.	58
Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Hs-1	59
Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Hs-1 na região de 174-114 ppm.	59
Figura 12. Espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3) de Hs-1	60
Figura 13. Estrutura do cafeato de etila.....	60
Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2	63
Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 180-60 ppm.	63
Figura 16. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 126-74 ppm.	64
Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2	64
Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 180-146 ppm.	65
Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 128-90 ppm.	65

Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 92-54 ppm.	66
Figura 21. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-2	66
Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 8,4-5,1 ppm.	67
Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-2 na região de 3,9-3,05 ppm.	67
Figura 24. Espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, CD_3OD) de Hs-2	68
Figura 25. Estrutura da isoquercetrina.	68
Figura 26. Subestrutura I para Hs-3	69
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) de Hs-3	72
Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) de Hs-3 na região de 205-110 ppm.	72
Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) de Hs-3 na região de 105-15 ppm.	73
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de Hs-3	73
Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de Hs-3 na região de 7,3-5,4 ppm.	74
Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de Hs-3 na região de 3,5-1,9 ppm.	74
Figura 33. Estrutura do ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico.	76
Figura 34. Estrutura do ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoil-quínico.	76
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-4	78
Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-4 na região de 170-120 ppm.	78
Figura 37. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-4 na região de 118-66 ppm.	79
Figura 38. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de Hs-4 na região de 58-6 ppm.	79
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-4	80
Figura 40. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-4 na região de 7,6-6,7 ppm.	80

Figura 41. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-4 na região de 6,4-5,1 ppm.	81
Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Hs-4 na região de 4,4-1,8 ppm.	81

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção e particionamento do EHEB de <i>Hancornia speciosa</i>	43
Esquema 2. Fracionamento da fase clorofórmica de <i>Hancornia speciosa</i>	46
Esquema 3. Fracionamento da fase acetato de etila de <i>Hancornia speciosa</i>	47
Esquema 4. Processamento cromatográfico da fração N da CLV de <i>Hancornia speciosa</i>	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substâncias isoladas de <i>Hancornia speciosa</i>	30
Quadro 2. Cromatograma de íons totais obtido por ESI no modo negativo.	82
Quadro 3. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 0,35 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	83
Quadro 4. Fragmentos a partir do íon em m/z 191,0560 (A), Proposta de fragmentação (B).....	84
Quadro 5. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 0,68 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	85
Quadro 6. Fragmentos a partir do íon em m/z 315,0716 (A), Proposta de fragmentação (B).....	86
Quadro 7. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 0,85 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	87
Quadro 8. Fragmentos a partir do íon em m/z 315,0716 (A), Proposta de fragmentação (B).....	88
Quadro 9. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 1,30 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	89
Quadro 10. Fragmentos a partir do íon em m/z 315,0716 (A), Proposta de fragmentação (B).....	90
Quadro 11. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 1,64 e 3,36 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).	91
Quadro 12. Fragmentos a partir do íon em m/z 289,0712 (A), Proposta de fragmentação (B).....	92
Quadro 13. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 2,03 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).....	93
Quadro 14. Fragmento a partir do íon em m/z 353,0873 (A), Proposta de fragmentação (B).....	94
Quadro 15. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 2,17 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B), ácido caféico (C).....	95
Quadro 16. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,45 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).....	97

Quadro 17. Fragmentos a partir do íon em m/z 337,0922 (A), Proposta de Fragmentação (B).	98
Quadro 18. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,53 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).....	99
Quadro 19. Fragmentos a partir do íon em m/z 865,1958 (A), Proposta de fragmentação (B).....	100
Quadro 20. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 3,65 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	101
Quadro 21. Fragmentos a partir do íon em m/z 609,1449 (A), Proposta de fragmentação (B).....	102
Quadro 22. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 3,70 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	103
Quadro 23. Fragmentos a partir do íon em m/z 463,0877 (A), proposta de fragmentação (B).....	104
Quadro 24. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,72 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).....	105
Quadro 25. Fragmentos a partir do íon em m/z 433,0771 (A), proposta de fragmentação (B).....	106
Quadro 26. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,74 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).....	107
Quadro 27. Fragmentos a partir do íon em m/z 433,0771 (A), proposta de fragmentação (B).....	108
Quadro 28. Cromatograma do íon selecionado noTr em 3,80 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	109
Quadro 29. Fragmentos a partir do íon em m/z 435,1291 (A), proposta de fragmentação (B).....	110
Quadro 30. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,82 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), phloretina (C).	112
Quadro 31. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,84 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), Eriodictiol (C).....	113
Quadro 32. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,93 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), quercetina (C).	114

Quadro 33. Fragmentos a partir do íon em m/z 301,0350 (A), proposta de fragmentação (B).....	115
Quadro 34. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,93 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), luteolina (C).....	116
Quadro 35. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 4,04 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).	117
Quadro 36. Fragmentos a partir do íon em m/z 269,0452 (A), proposta de fragmentação (B).....	118
Quadro 37. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 4,06 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).....	119
Quadro 38. Fragmentos a partir do íon em m/z 285,0400 (A), proposta de fragmentação (B).....	120
Quadro 39. Propostas estruturais obtidas a partir de espectros de massas em alta resolução e/ou co-injeção de padrões de fenólicos com primeiro relato para <i>Hancornia speciosa</i>	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades farmacológicas de <i>Hancornia speciosa</i>	34
Tabela 2. Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fase clorofórmica de <i>Hancornia speciosa</i>	45
Tabela 3. Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fase butanólica de <i>Hancornia speciosa</i>	48
Tabela 4. Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fração N da CLV de <i>Hancornia speciosa</i>	49
Tabela 5. Sistema de gradiente utilizado na eluição do UHPLC.	53
Tabela 6. Dados de RMN de Hs-1 em CDCl ₃ a 500 MHz (<i>J</i> em Hz, δ em ppm).	57
Tabela 7. Dados de RMN de Hs-2 em CD ₃ OD a 500 MHz (<i>J</i> em Hz, δ em ppm). ...	62
Tabela 8. Dados de RMN de Hs-3 em DMSO a 500 MHz (<i>J</i> em Hz, δ em ppm).	71
Tabela 9. Dados de RMN de Hs-4 em CD ₃ OD a 500 MHz (<i>J</i> em Hz, δ em ppm). ...	77
Tabela 10. Caracterização de compostos fenólicos das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> por UHPLC/ MS/MS.	121

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ASD	Ágar Sabourouad Dextrose
BB	<i>Broad band</i>
°C	Grau Celsius
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CID	Dissociação induzida por colisão
CIM	Concentração inibitória mínima
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
CoA	Coenzima A
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO	Dimetilsufóxido deuterado
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EHEB	Extrato Hidro Etanólico Bruto
ESI	Ionização por eletrospray
EtOH	Etanol
Fr	Fração
g	Grama
g/L	Grama por litro
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertz
H ₂ O	Água
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kg	Quilograma
Kv	Quilovolt
MeOH	Metanol
<i>m</i>	Múltiplo

MS	Massas
mm	milímetros
mg	Miligrama
MS₂	Espectro de massas 2
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
MRM	Monitoramento múltiplo de reações
<i>m/z</i>	Massa carga
n-	Normal
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
pág.	Página
PB	Paraíba
pH	Potencial hidrogeniônico
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
Prof.	Professor
<i>q</i>	Quarteto
Rfs	Fatores de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
<i>s/</i>	Singleto largo
t	Tripleto
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UHPLC	<i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatograph</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
δ	Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
3.1 Considerações sobre a família Apocynaceae	27
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Hancornia</i> e espécie <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	28
3.3 Flavonóides	35
3.4 Cromatografia Líquida de Ultra eficiência	38
3.5 Importância da atividade antifúngica	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Estudo fitoquímico de <i>Hancornia speciosa</i>	42
4.1.1 Coleta do material botânico	42
4.1.2 Obtenção e particionamento do extrato hidro-etanólico bruto (EHEB)	42
4.1.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Hancornia speciosa</i> ...	44
4.1.4 Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Hancornia speciosa</i> ..	45
4.1.5 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>Hancornia speciosa</i>	47
4.1.6 Fracionamento cromatográfico da fase butanólica de <i>Hancornia speciosa</i>	48
4.1.7 Processamento cromatográfico da fração N da CLV de <i>Hancornia speciosa</i> ..	49
4.1.8 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de <i>Hancornia speciosa</i>	52

4.2 Obtenção dos dados de UHPLC/MS	52
4.3 Estudo da atividade antifúngica de <i>Hancornia speciosa</i>.....	53
4.3.1 Reativação das amostras	53
4.3.2 Preparo do inóculo.....	54
4.3.3 Triagem com as leveduras de referência.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Determinação estrutural de <i>Hs-1</i>	56
5.2 Determinação estrutural de <i>Hs-2</i>	61
5.3 Determinação estrutural de <i>Hs-3</i>	69
5.4 Determinação estrutural de <i>Hs-4</i>	75
5.5 Caracterização de constituintes químicos do extrato hidro-etanólico bruto das folhas de <i>Hancornia speciosa</i> por UHPLC-MS/MS.....	82
5.6 Ensaios de atividade antifúngica	124
6. CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS.....	126

1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas como remédio contra doenças representa uma importante conquista da humanidade, e há relatos da sua utilização na Mesopotâmia, que remota a 3 mil anos a.C. O emprego medicinal das plantas foi sendo adquirido durante o tempo, através de tentativa e erro, resultando na medicina tradicional. Grande parte da população recorre a remédios de base vegetal como terapia complementar e alternativa, ou, ainda, na atenção básica, no caso de países emergentes (FÜRST; ZÜNDORF, 2015).

Os vegetais fornecem complexas bibliotecas de componentes bioativos únicos, devido à grande diversidade estrutural, no entanto, não é a única razão pela qual os produtos naturais são de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. Uma importante característica adicional, é que muitas vezes eles possuem atividades biológicas altamente seletivas e específicas (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A evolução nos estudos de produtos naturais de plantas culminou no isolamento da primeira substância pura, morfina, comercializada pela Merck em 1826, e na obtenção do primeiro fármaco semi-sintético derivado de produtos naturais, o ácido acetilsalicílico (“aspirina”), pela Bayer, em 1899 (PEREIRA, 2012).

Além de serem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes farmacológicos, as plantas medicinais fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, como matéria-prima para a síntese de novos candidatos a fármaco (BRAZ FILHO, 2010).

Atualmente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é limitada, de modo que a medicina popular surge como uma solução alternativa para problemas de saúde, estando bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na América Latina, África e Ásia (MADEIRO, 2016).

O Ministério da Saúde atualmente disponibiliza opções terapêuticas e preventivas aos usuários do Sistema Único de Saúde, no programa de práticas

integrativas e complementares, e dentro desse contexto está o uso de plantas medicinais e fitoterápicos. Segundo Pereira (2016, apud FÜRST; ZÜNDORF, 2015), infelizmente, a etnofarmacologia esbarra na falta de dados clínicos e embasamento científico. A base racional para o uso de um grande número de remédios à base de plantas que estão no mercado ainda está longe de ser suficiente, ou cientificamente válido. Dessa forma, ainda temos muito o que avançar

Portanto, a busca por novas substâncias que tenham atividade biológica que possa vir a se tornar um medicamento, tem levado os pesquisadores ao desenvolvimento de novos estudos na área da química de produtos naturais que vem sendo uma ferramenta fundamental na descoberta de novos metabólitos.

Segundo Macêdo et al. (2015, apud Santos, 2009) para o cerrado do Nordeste do Brasil, especialmente na região semi-árida, animais e plantas são amplamente utilizados na medicina popular, tendo papel significativo para tratamento de doenças por populações humanas em áreas rurais e urbanas . Ainda segundo esse autor, apesar de todos os estudos etnobotânicos realizados no semiárido brasileiro, a maioria é voltado para o ecossistemas de caatinga, existindo uma carência de estudos focalizados para os cerrados disjuntos do Nordeste brasileiro.

Diante do exposto e devido à crescente valorização da biodiversidade do Brasil, ressaltando o interesse no estudo de plantas medicinais, com foco na busca de atender a todos os requisitos de qualidade na pesquisa de produtos naturais e, na oportunidade de identificação de produtos com potencial econômico, decidiu-se investigar fitoquimicamente *Hancornia speciosa*, utilizando métodos tradicionais além do emprego de técnicas analíticas seletivas e eficientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero *Hancornia* através do estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes e avaliar a atividade antifúngica desta espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar substâncias do extrato obtido das folhas de *Hancornia speciosa* pelo uso de métodos cromatográficos;
- Identificar metabólitos de *Hancornia speciosa* por métodos usuais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e bidimensionais;
- Caracterizar o extrato hidro-etanólico bruto obtido das folhas de *Hancornia speciosa* por Cromatografia Líquida de Eficiência Ultra Elevada acoplada à Espectrometria de Massas;
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato hidro-etanólico bruto e das substâncias isoladas de *Hancornia speciosa* contra as cepas *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida rugosa*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Apocynaceae

Sennblad e Bremer (1996) fizeram o primeiro estudo filogenético para Apocynaceae sensu lato, ao estudarem gêneros de Apocynaceae e Asclepiadaceae, verificaram uma proximidade filogenética entre as famílias, demonstrando a artificialidade das classificações propostas até o momento para Apocynaceae sensu stricto. Recentemente, Endress e Bruyns (2000) corroboraram com a união das duas famílias em Apocynaceae sensu lato e sugeriram a divisão da família em cinco subfamílias: Rauvolfioideae Kostel, Apocynoideae Burnett., Periplocoideae R. Br. ex Endl., Secamonoideae Endl. e Asclepiadoideae R. Br. ex Burnett.

Apocynaceae é uma família botânica que incluem entre 3700 e 5100 espécies, estando distribuídas praticamente no mundo todo, mas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (RAPINI, 2004). No Brasil ocorrem aproximadamente 90 gêneros e 850 espécies, habitando diversas formações vegetais (SOUZA; LORENZI, 2005).

Nessa família estão incluídas árvores fornecedoras de madeira de boa qualidade, como as perobas e guatambus e são ricas em látex e em substâncias utilizadas no tratamento do câncer (SOUZA; LORENZI, 2008). Como exemplo pode-se citar os alcalóides vimblastina e a vincristina produzidos pela *Vinca rosea* quimioterápicos no tratamento de câncer (VINCENTINI; OLIVEIRA, 1999). Schripsema e colaboradores (2004) relatam que as espécies de Apocynaceae destacam-se especialmente por serem reconhecidamente produtoras de substâncias bioativas como iridóides, glicosídeos cardioativos e alcalóides, especialmente os alcalóides indólicos.

As plantas pertencentes a esta família ainda são conhecidas pelo seu potencial como medicamento natural e alternativo, sendo algumas delas com ampla utilização na medicina popular (RAHMAN et al., 2004).

As Apocynaceae se caracterizam por apresentar grande variabilidade morfológica em seus órgãos florais, presença de vasos laticíferos e pela diversidade de substâncias resultantes do seu metabolismo secundário que, na maioria das vezes, possuem propriedades farmacológicas (MOURA et al., 1989).

3.2 Considerações sobre o gênero *Hancornia* e espécie *Hancornia speciosa* Gomes

O gênero *Hancornia* é considerado monotípico e, por isso, sua única espécie é *Hancornia speciosa* Gomes, sendo aceitas as seis variedades botânicas: *Hancornia speciosa* var. *maximiliani* A. DC.; *Hancornia speciosa* var. *cuyabensis* Malme; *Hancornia speciosa* var. *lundii* A. DC.; *Hancornia speciosa* var. *gardneri* (A. DC.) Müell. Arg.; *Hancornia speciosa* var. *pubescens* (Nees et Martius) Müell. Arg.; *Hancornia speciosa* Gomes (variedade típica) ou *Hancornia speciosa* Var. *speciosa* Gomes. (MONACHINO, 1945).

Conforme classificação de Cronquist (1988): A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é agrupada botanicamente nos seguintes táxons, Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, Ordem Gentianales, Família Apocynaceae e Gênero *Hancornia*.

No Brasil, os principais centros de diversidade genética associados à mangabeira são, segundo Giacometti (1992): a Costa Atlântica e Baixo Amazonas (principalmente Pará e Amapá), o Nordeste (Caatinga, sobretudo as áreas de tabuleiros de savanas e zonas de transição caatinga-cerrado), Brasil Central (Cerrado), Mata Atlântica (nas áreas de cerrados litorâneos e restingas dos setores) e Bahia/Espírito Santo/ Vale do Rio Doce (do litoral de Sergipe ao Espírito Santo). (Figura 1, pág. 29)

Figura 1. Distribuição de *Hancornia speciosa* no Brasil.



Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

A mangabeira é uma planta de porte médio, possui em média 2 a 10 m de altura e ainda pode chegar aos 15 m, apresentando copa irregular, tronco tortuoso, muito ramificado e áspero, ramos lisos e avermelhados, exsudando látex em toda sua extensão (SILVA JUNIOR, 2004). Os frutos são do tipo baga, de tamanho, formato e cores variados, normalmente, elipsoidais ou arredondados, amarelados ou esverdeados, com pigmentação vermelha ou sem pigmentação, polpa amarela

adocicada, rica em vitaminas, ferro e fósforo, cálcio e proteínas (GANGA et al., 2009). As sementes, recalcitrantes, são discóides, achatadas, de coloração castanho-clara e rugosas, com hilo central (MONACHINO, 1945). Suas folhas são decíduas de clima tropical, ocorrendo sobretudo, em áreas de vegetação aberta. Apresenta, normalmente, na região dos cerrados, floração durante o período de agosto a novembro, com pico em outubro e produção de frutos de setembro a novembro. (SILVA JÚNIOR; LÊDO, 2006), (Figura 2, pág, 30).

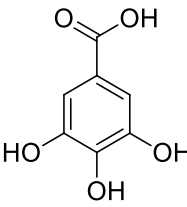
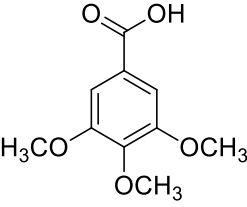
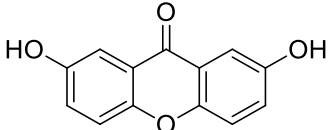
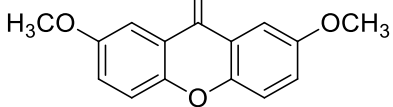
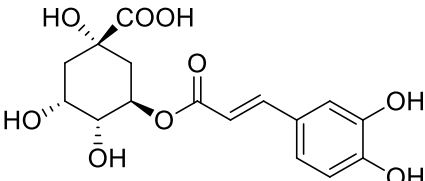
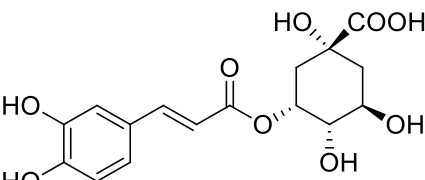
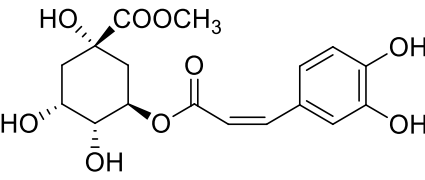
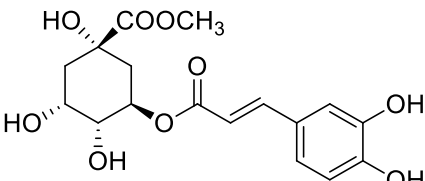
Figura 2. Aspecto visual da planta adulta de mangabeira (A), da flor e das folhas (B). Santa Rita- PB- 2015.

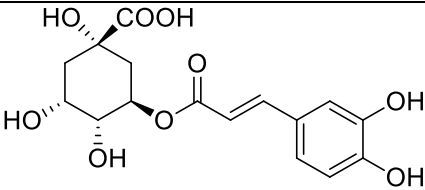
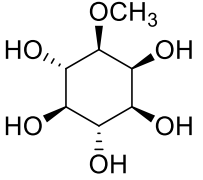
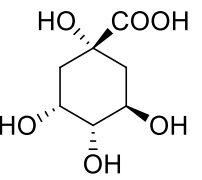
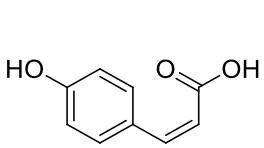
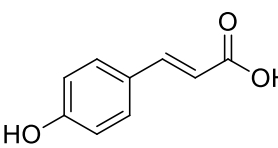
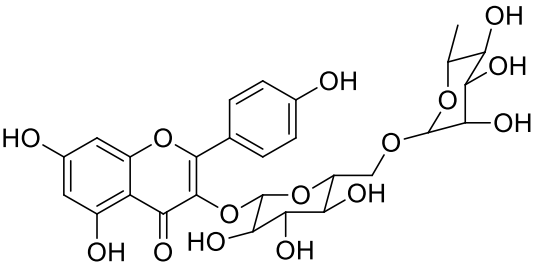
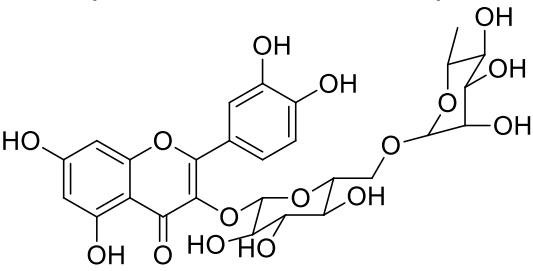
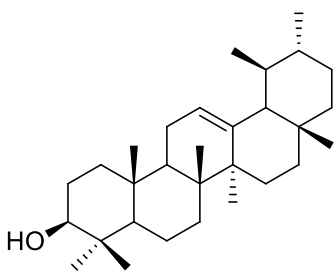
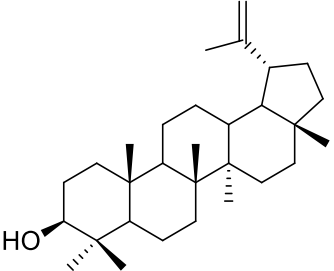


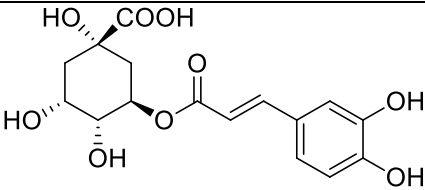
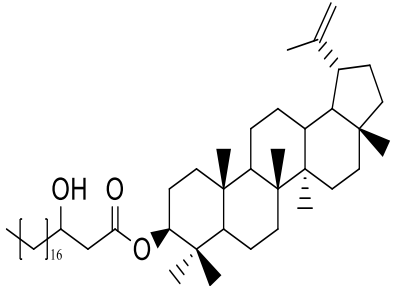
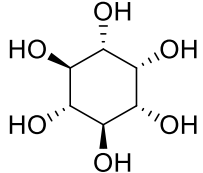
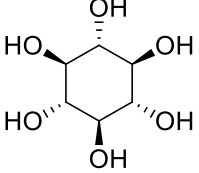
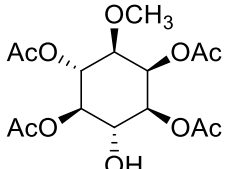
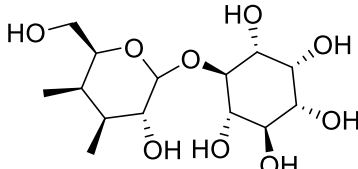
Fonte: Autor.

Hancornia speciosa já foi objeto de estudos fitoquímicos para muitos autores, como mostrado no Quadro 1(pág. 31).

Quadro 1. Substâncias isoladas de *Hancornia speciosa*.

Parte da planta	Substância isolada	Referência
Casca	 (ácido gálico)  (ácido sirínico)   (2,7-diidroxixantona) (2,7-dimetoxixantona)  (5-O-cafeoilquínico)  (3-O-cafeoilquínico)  (<i>cis</i>-clorogenato de metila)  (<i>trans</i>-clorogenato de metila)	RODRIGUES et al.,2006

	 (ácido clorogênico)	BARROS, 2008
Folhas	 (L-+)-bornesitol  (ácido quínico)  (ácido cis 4-hidroxi-cinâmico)  (ácido trans 4-hidroxi-cinâmico)  (canferol-3-o-rutinosídeo)  (rutina)  (α-amirina)  (lupeol)	ENDRINGER, 2007

	 (5- O- cafeoilquínico)  (3β-O-éster de ácido graxo)	
Folhas	 (myo-inositol)  (scylo-inositol)  (per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol)  (β-D galactosídeo-myo inositol)	ENDRINGER, 2009

São escassos os relatos na literatura de compostos isolados dos frutos da mangaba. Sampaio e Nogueira (2006) identificaram um total de 79 compostos voláteis entre aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas e monoterpenos.

Além dos estudos fitoquímicos, foram feitos também estudos para avaliar atividades farmacológicas de *Hancornia speciosa*. As atividades presentes nos estudos e a parte da planta estudada são descritas na Tabela 1(pág. 34).

Tabela 1. Atividades farmacológicas de *Hancornia speciosa*.

Parte da planta	Atividade	Referências
Látex	Citotóxica e genotóxica	RIBEIRO et al., 2014
	Potencial osteogênico	NEVES et al., 2016
	Avaliação de biocompatibilidade e atividade angiogênica	ALMEIDA et al., 2014
	Atividade antiinflamatória	MARINHO et al., 2011
Frutos	Atividade antioxidante e citotóxica	ASSUMPÇÃO et al., 2014
	Atividade antioxidante	ALMEIDA et al., 2011
	Efeito antimutagênico	LIMA et al. 2015.
Folhas	Atividade antimicrobiana	CARRAZZA et al., 2011
	Quimioprevenção do câncer	ENDRINGER et al., 2009
	Atividade tirosina cinase	SOUZA et al, 2012
	Efeito hipotensor induzida através da inibição da ECA e aumento do NO	SILVA et al., 2011
	Atividade anti TNF- α	CAMPANA et al., 2015
	Atividade anti hipertensiva	SILVA et al., 2016
	Avaliação das propriedades na cicatrização das feridas	GELLER et al. 2015
	Atividade anticolinesterásica	MARQUES et al., 2015
	Atividade antioxidante	MARQUES et al., 2015
	Atividade antiviral	BRANDÃO et al., 2011
Folhas	Atividade inibidora NF- κ B	ENDRINGER et al.,

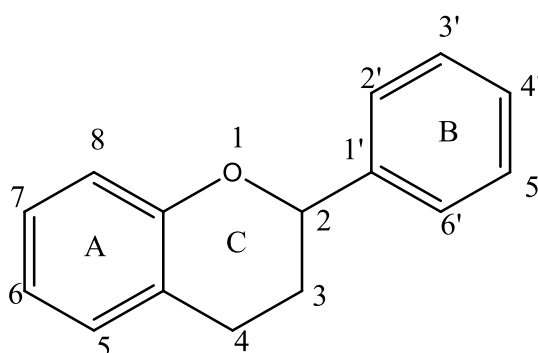
(composto isolado)		2009
Folhas, frutos, látex e raiz	Atividade citotóxica (células HCT8 MDA-MB-435, SF-295, HL 60)	RIBEIRO et al., 2012
Casca	Atividade gastroprotetora e ações anti- <i>Helicobacter- pylori</i>	MORAES, et al., 2008
Frações da partição	Antidiabético	PEREIRA et al., 2014

3.3 Flavonóides

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6. (HARBORNE et al., 1999).

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 3, pág. 35), (ANGELO et al. 2006).

Figura 3. Estrutura química e numeração padrão dos flavonoides.



Essa classe de compostos pode ainda se dividir, consoante as moléculas que constituam o anel C e pela posição da ligação ao anel B podendo obter -se deste modo, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas (ALMEIDA, 2012).

Machado et al. (2008), relata que a grande diversidade estrutural encontrada nos flavonóides ocorre em função das pequenas modificações químicas ocorridas na estrutura básica destes compostos, que podem ser por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações, condição esta que forma as diferentes classes de flavonóides.

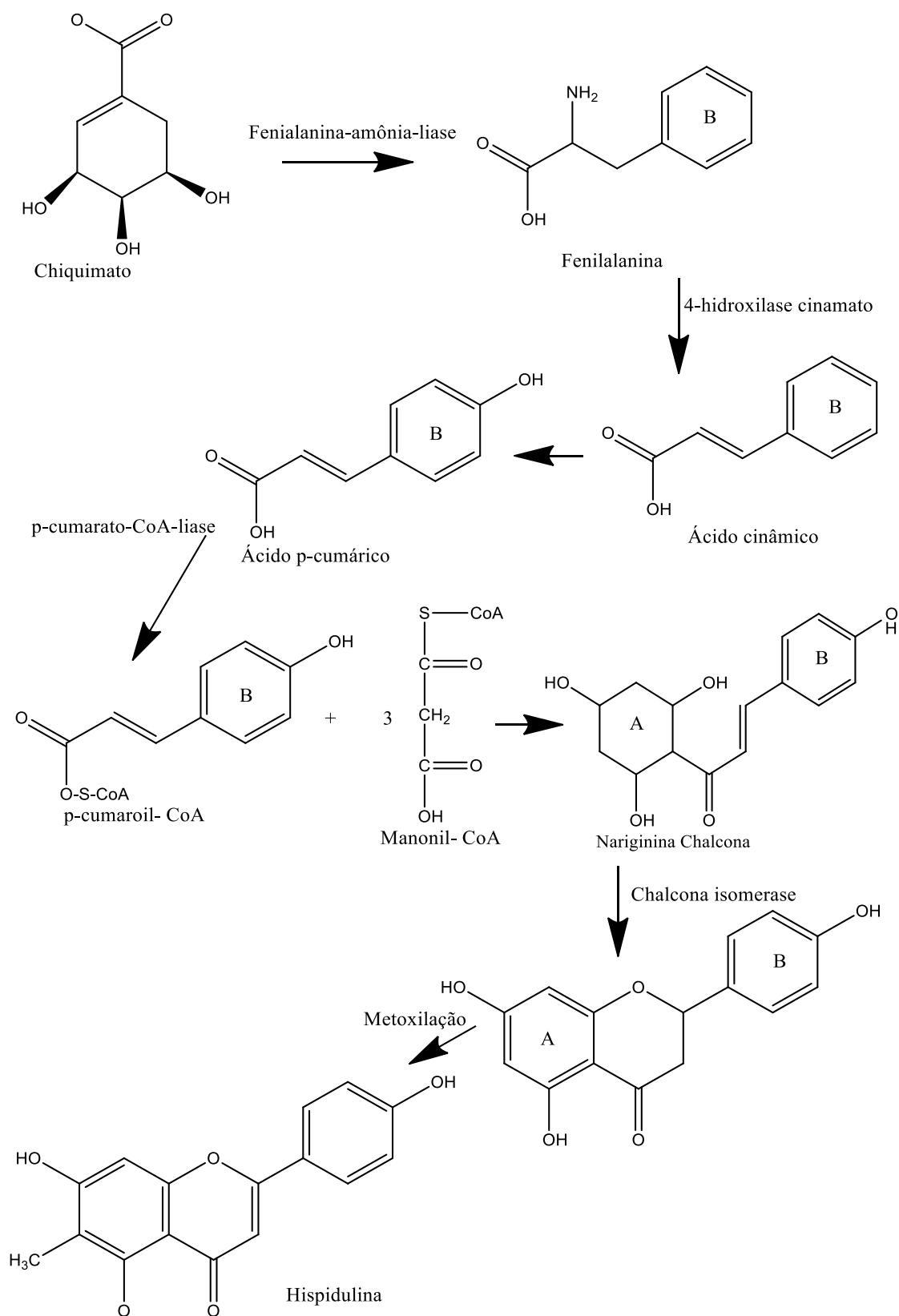
Três moles de malonil-coenzima A (CoA) condensam a partir do metabolismo da glicose, para formar o anel A, catalisada pela sintetase de chalcona. Anéis B e C também vêm de metabolismo da glicose, mas através do via do chiquimato através de fenilalanina, que é convertida em ácido cinâmico e em seguida a ácido cumárico. CoA e ácido cumárico três CoA malonil são condensados num único passo enzimático para formar naringenina chalcona. O anel C fecha e torna-se hidratado para forma 3-hidroxi-flavonóides (por exemplo, catequinas), 3,4-diol flavonóide (por exemplo, quercetina), e procianidinas (Figura 4, pág.37). (MERKEN; BEECHER, 2000).

Os flavonóides estão presentes nas plantas em diversas formas e com variadas funções, tais como pigmentos, atrativos ou repelentes de herbívoros, proteção contra radiação ultravioleta (UV), ainda apresentam efeitos alelopáticos, sendo capazes de inibir e/ou estimular o processo germinativo e o crescimento inicial de plantas e fungos (FEUCHT et al., 1994).

Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonóides são muito vastos, dentre eles destacam-se: ações antioxidantes (quercetina), anti-inflamatórias (quercetina, luteolina, galantina), anti-hepatóxica, antialérgica, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, fungistática, antiviróticos, entre outros (BERNARDES et al., 2010).

Por apresentarem uma grande diversidade de atividades biológicas benéficas para o ser humano, essa classe de compostos têm sido extensamente pesquisada. Dentre eles se destaca a rutina, um flavonóide com ampla distribuição no reino vegetal que por apresentar entre outras atividades biológicas a anticarcinogênica tem sido objeto de muito estudo em diversas áreas, podendo contribuir para o futuro tratamento de várias enfermidades entre elas o câncer (BECHO et al., 2009).

Figura 4. Via de metabolismo para obtenção dos flavonoides.



Fonte: Karam et. al, 2013

3.4 Cromatografia Líquida de Ultra eficiência

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC – *ultra-high pressure liquid chromatography* ou *ultra-high performance liquid chromatography*) desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de FE porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, em resposta à busca contínua por análises mais rápidas e eficientes. A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. Em vista disso, um equipamento adequado, capaz de operar a altas pressões, acima de 1000 bar (~ 15000 psi), é empregado para extrair um desempenho cromatográfico máximo dessa técnica, (MALDANER; JARDIM, 2012).

UHPLC (*ultra-high pressure liquid chromatography* ou *ultra-high performance liquid chromatography*) e UPLC (*ultra performance liquid chromatograph*) são técnicas de cromatografia líquida usadas para separar os diferentes componentes encontrados em misturas. A princípio, pode-se pensar que existe diferenças entre UHPLC e UPLC, mas na verdade são as mesmas técnicas, os dois termos são entendidos como sinônimos. Em 2004, Waters lançou a técnica conhecida como Ultra Performance LC (UPLC) com base em sub partículas porosas de 2 micra e registrou a sigla UPLC. Como fornecedores entraram no mercado com instrumentos semelhantes, UHPLC foi denominado como uma maneira de se referir a instrumentos semelhantes para UPLC, fixando UPLC Waters como uma marca comercial, (CHROMATOGRAPHY TODAY, 2014).

O acoplamento da cromatografia líquida de ultra eficiência à espectrometria de massas em modo *tandem* (UPLCMS/ MS, do inglês *mass spectrometry in tandem by high-performance liquid chromatography*), apresenta algumas vantagens em relação ao acoplamento com um HPLC, como: varreduras mais rápidas, maior sensibilidade em monitoramento múltiplo de reações (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*), melhor adequação as fontes de íons por APCI (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), análises mais rápidas e melhor

resolução, utilizando ciclos mais altos em resposta aos altos fluxos empregados. (MOLOGNONI, 2015).

O método de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa se baseia na separação físico-química dos componentes de uma amostra, que estão distribuídos entre a fase móvel líquida e a fase estacionária da coluna. Sua maior ou menor afinidade por uma dessas fases irá ocasionar diferentes tempos de retenção dessas substâncias, o que permite sua separação, identificação e determinar sua concentração, (SAVIANO, 2015)

Uma alternativa para estudos envolvendo produtos naturais em baixas concentrações é o uso desse tipo de cromatografia a qual mantêm os mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), porém utiliza colunas de 1-2,1mm de diâmetro interno e partículas abaixo de 2µm, já que o uso dessas pequenas partículas com fase móvel em alta velocidade linear aumenta a resolução e detecção diminui o tempo de análise, (GOUVEA, 2013).

Reichert e colaboradores (2015) em seu trabalho conseguiu identificar nove fungicidas em suco de laranja utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas. Essa metodologia foi usada também por Zhou e colaboradores (2016) que identificou sessenta e um constituintes, pertencentes à classe dos triterpenóides e flavonoides, de *Siraitiae fructus*. Já Li e colaboradores (2016) utilizaram o método para identificar derivados adicionais da benzofenona em *Garcinia paucinervis*. Tal técnica foi ainda bastante útil para a identificação e quantificação de compostos fenólicos em pêras (KOLNIAK- OSTEK, 2016). A cromatografia em fase líquida de ultra-eficiência permitiu à Yang e colaborações (2015) a análise e identificação de cinquenta e oito compostos em apenas vinte minutos de análise, identificando compostos fenólicos e diterpenóides. No trabalho de Wu (2016) o método mostrou-se com boa reprodutibilidade, sensibilidade e estabilidade para a quantificação de flavonoides glicosídeos em *Camellia sinensis*. Uma rápida triagem e identificação de antioxidantes fenólicos em *Hydrocotyle sibthorpioides* foi feita por Kumari e colaboradores (2015) o que permitiu a identificação de compostos tais como catequina, epicatequina, quercetina e ácido clorogênico. Já a análise quantitativa de derivados do ácido clorogênico por UPLC-MS/MS em frações antioxidante de *Taraxacum officinale* foi feita por Kenny e colaboradores (2015).

3.5 Importância da atividade antifúngica

O gênero *Candida* apresenta espécies frequentemente denominadas dimórficas, pois dependendo das condições ambientais, como pH, temperatura e reservas nutricionais, alteram seu fenótipo, passando de blastoconídeos para crescimento micelial, devido à formação de pseudohifas. Também pode se desenvolver como hifas verdadeiras e clamidoconídeos, sendo que todas as formas de crescimento apresentam interconversão, exceto clamidoconídeos. É caracterizada primariamente pela morfologia colonial em meio de cultura ágar Sabouraud, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa. Seu crescimento é favorecido em temperaturas variando de 20°C a 38°C. O pH ácido favorece sua proliferação, sendo que a faixa ideal de pH para seu crescimento varia de 2,5 até 7,5 (BARROSO, 2009).

As espécies de *Candida* spp. exigem fontes de nitrogênio e fontes de carbono, de preferência carboidratos simples como: D-glicose, sacarose, maltose, trealose, entre outros. Quando requisitados, estes carboidratos são fermentados ou assimilados, ou ambos, e os compostos nitrogenados são assimilados. Tais habilidades, fermentativa e assimilativa, representam a base para a diferenciação e identificação bioquímica de espécies de *Candida*. Por exemplo, *Candida glabrata* fermenta e assimila a glicose e apenas fermenta a trealose, *Candida guilliermondii* fermenta e assimila uma série de açúcares com exceção de maltose e lactose, que são apenas assimiladas. *Candida tropicalis* também possui a capacidade de fermentar e assimilar vários açúcares, exceto lactose e rafinose e *Candida krusei* apenas fermenta e assimila a glicose (CORREIA, 2016).

Papon e colaboradores (2013) subdividiram a candidíase em três principais grupos: candidíase superficial, com ocorrência na pele, pelo e unhas; candidíase de mucosas, envolvendo a orofaringe, esôfago e região vulvovaginal, e candidíase sistêmica, que incluem a candidemia e outras formas de candidíase invasiva.

Candida albicans, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* estão entre as principais espécies de *Candida* responsáveis pela candidíase sistêmica. Estas espécies são responsáveis por 90% dos casos em todo mundo, embora muitas espécies também estejam associadas a esta infecção, como *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida norvegensis*,

Candida dubiniensis, *Candida lipolytica*, *Candida pelliculosa*, *Candida dublinensis*, entre outras. O agente etiológico mais frequente ainda é *Candida albicans* representando cerca de 40 a 50% dos casos, (PFALLER et al., 2015)

Cada planta possui uma grande quantidade de compostos químicos com atividade biológica. Entre estas bioatividades, a propriedade antifúngica de muitas plantas medicinais têm sido descrita contra espécies de *Candida* clinicamente importante tanto *in vitro* como *in vivo* (MARTINS et al., 2015).

Devido à ocorrência de fatores indesejáveis, como o surgimento de resistência de algumas cepas aos anti-fúngicos convencionais principalmente em indivíduos imunodeprimidos e a presença de efeitos tóxicos destes, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicótica, tem crescido consideravelmente (MENEZES et al., 2009).

Neste contexto, é válida a investigação *in vitro* da atividade antifúngica do extrato de *Hancornia speciosa* e frações isoladas de tal planta, sobre a cepa padrão de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida rugosa* e *Trichosporon asahii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo fitoquímico de *Hanconia speciosa*

4.1.1 Coleta do material botânico

As folhas de *Hanconia speciosa* foram coletadas em novembro de 2015. A coleta foi realizada no município de Santa Rita, estado da Paraíba. A identificação botânica foi realizada pela Prof^o. Dr. Leonardo de Melo Versieux do Herbário da Universidade do Rio Grande do Norte. Uma exsicata foi depositada no Herbário da referida universidade apresentando-se como *Hanconia speciosa* – UFRN 20382.

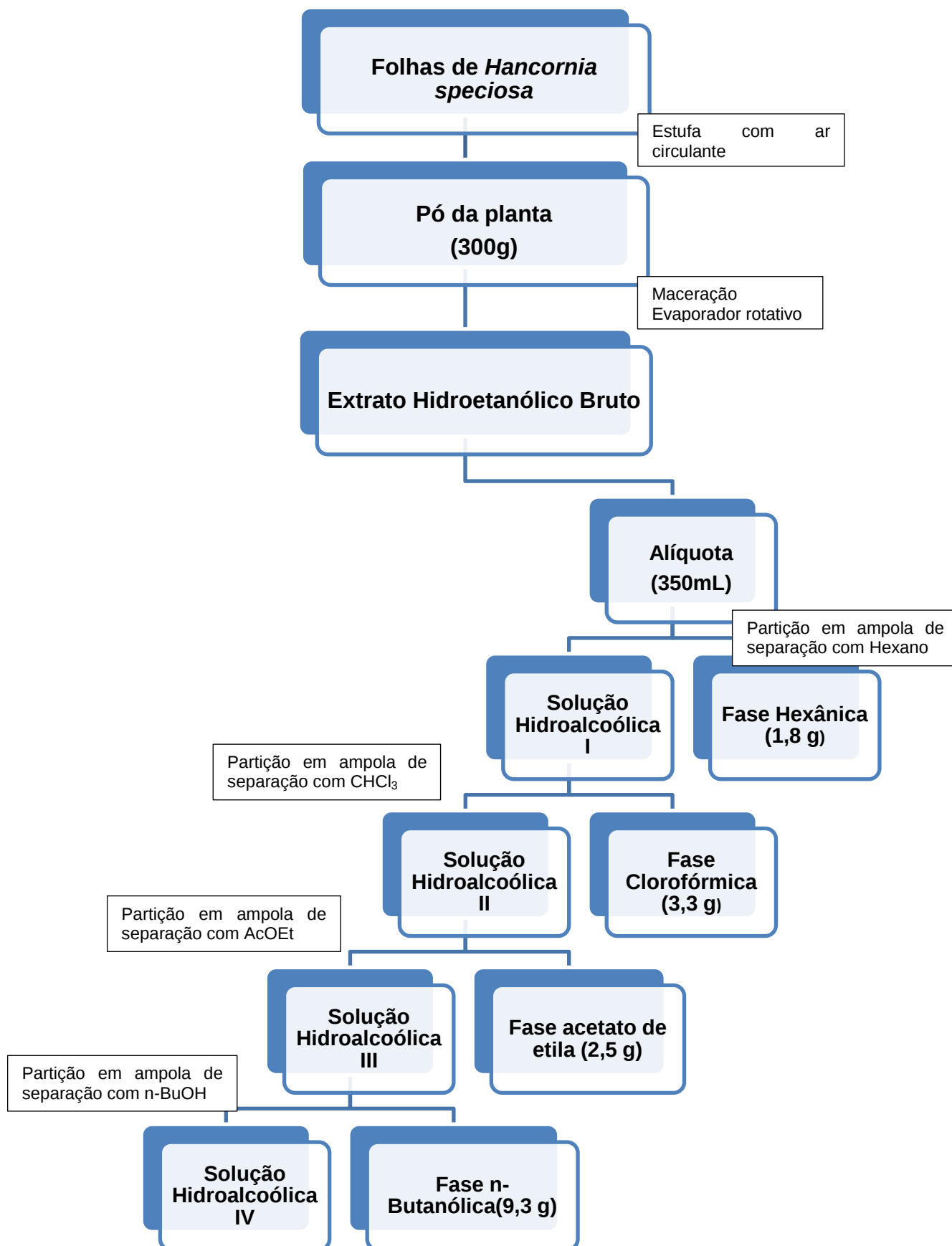
4.1.2 Obtenção e particionamento do extrato hidro-etanólico bruto (EHEB)

O material botânico foi desidratado utilizando uma estufa com ar circulante à temperatura de 45°C durante 72 horas. Após isto, o material (5 Kg) foi triturado em moinho mecânico obtendo-se o pó. Em seguida, 300 g do pó foi submetido a uma maceração com etanol:água na proporção de 7:3 por 7 dias, em bécker de vidro, filtrado, obtendo-se a solução extrativa. Essa solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente obtendo-se o extrato hidro-etanólico bruto (EHEB) (Esquema 1, pág. 43).

Uma alíquota do EHEB (350 mL) foi submetido a uma partição líquido-líquido (5:3 v/v, extrato:solvente) em uma ampola de separação, com os seguintes solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol.

As soluções obtidas no processo de partição foram submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após esse processo, os solventes foram evaporados em rotaevaporador a uma temperatura média de 35 °C, obtendo-se: 1,8 g de fase hexânica, 3,3 g da fase clorofórmica, 2,5 g da fase acetato de etila e 9,3 g da fase n-butanólica (Esquema 1, pág. 43).

Esquema 1. Obtenção e particionamento do EHEB de *Hancornia speciosa*.



4.1.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Hancornia speciosa*

Foram utilizados para o isolamento e a purificação dos constituintes químicos de *Hancornia speciosa* técnicas cromatográficas clássicas, como a cromatografia de adsorção e por exclusão molecular, ambas em cromatografia de coluna (CC). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel (ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,060 – 0,200 mm e 70 - 230 mesh), para cromatografia por adsorção, e Sephadex[®] LH-20 (AMERSHAM BIOSCIENCES), para cromatografia por exclusão molecular. Foi utilizada também a sílica C18 (SILICYCLE, de partículas de dimensões entre 40-63µm) além de colunas cilíndricas de vidro com comprimentos e diâmetros variáveis de acordo com a quantidade de amostra submetida à cromatografia, e solventes, como hexano (hex), acetato de etila (AcOEt), clorofórmio (CHCl₃) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias.

Além das técnicas clássicas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-HPLC (Shimatzu[®] com bomba LC-10AVVP, injeção manual, detector UV-Vis SPD-10AV e software CLASS-VP[®]) e a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência- UPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fischer Scientific) também foram utilizadas.

Foi utilizado cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) para realização da análise do processo de isolamento e purificação das frações obtidas. Para tanto, utilizou-se cromatofolhas de alumínio – sílica gel 60 F254 da MERCK.

Como revelador das substâncias na CCDA, foi utilizada à radiação ultravioleta (UV) através da exposição das cromatoplas, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, em aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01).

Reuniu-se as frações após análise da CCDA, de acordo com os semelhantes fatores de retenção (R_fs).

Para a eluição de placas cromatográficas, foram utilizados solventes orgânicos comerciais (hexano, acetato de etila, ácido fórmico, água e metanol) como fases móveis, em estado puro ou em misturas binárias, seguindo a uma ordem crescente de polaridade.

4.1.4 Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Hancornia speciosa*

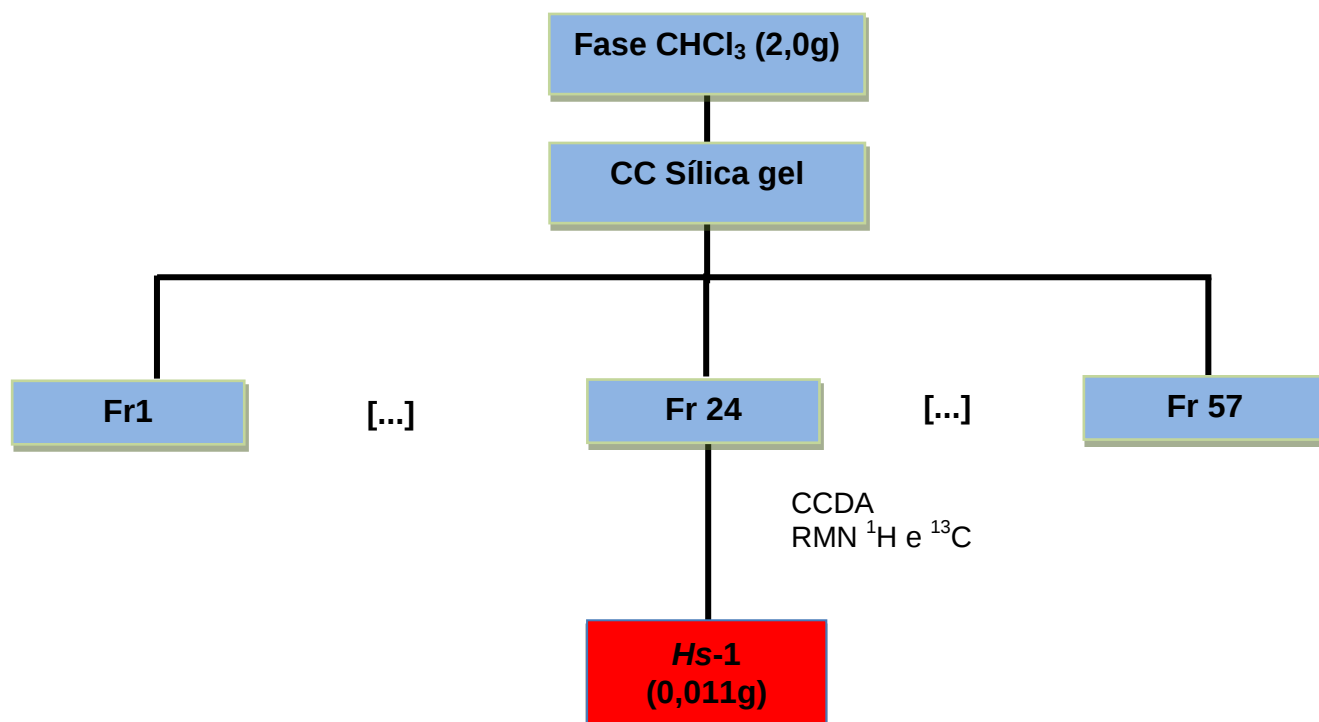
Uma alíquota da fase clorofórmica (2,0 g) foi submetida à CC utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

Foram obtidas 57 frações de 100 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo à temperatura média de 40°C. Em seguida, foram analisadas através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição e reveladas na luz UV (Tabela 2, pág. 45; Esquema 2, pág. 46). A Fr 24 revelou-se como uma mancha única após revelação na CCDA na luz UV, foi codificada como **Hs-1** (0,011 g) e encaminhadas para RMN ^1H e ^{13}C .

Tabela 2. Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fase clorofórmica de *Hancornia speciosa*.

Frações	Solventes	Proporção (%)
1	Hex	100
2-9	Hex:AcOEt	88:12
10-20	Hex:AcOEt	85:15
21-22	Hex:AcOEt	80:20
23-32	Hex:AcOEt	70:30
33-39	Hex:AcOEt	50:50
40	Hex:AcOEt	30:70
41	Hex:AcOEt	10:90
42-43	AcOEt	100
44	AcOEt:MeOH	95:5
45-46	AcOEt:MeOH	90:10
47	AcOEt:MeOH	80:20
48-50	AcOEt:MeOH	70:30
51-57	AcOEt:MeOH	60:40

Esquema 2. Fracionamento da fase clorofórmica de *Hancornia speciosa*.

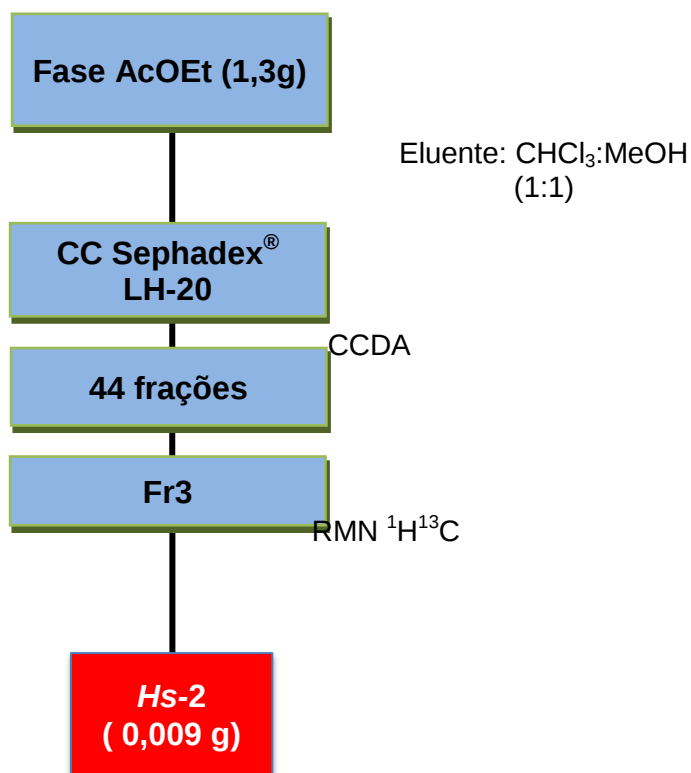


4.1.5 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Hancornia speciosa*

Uma alíquota da fase acetato de etila (1,3 g) foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária Sephadex® LH-20 e como fase móvel clorofórmio (CHCl₃) e metanol (MeOH) numa proporção de 50% de cada um na mistura (1:1).

Foram coletadas 44 frações que foram analisadas em CCDA utilizando diversos sistemas de eluição. Após revelação no UV, à Fr3 mostrou-se como uma mancha única e desta forma foi codificada como **Hs-2** (0,009 g) e encaminhada para RMN de ¹H e ¹³C. (Esquema 3, pág. 47).

Esquema 3. Fracionamento da fase acetato de etila de *Hancornia speciosa*.



4.1.6 Fracionamento cromatográfico da fase butanólica de *Hancornia speciosa*

Uma alíquota de 4,5 g da fase butanólica foi submetida à cromatografia líquida à vácuo (CLV) com 100 g de sílica desativada com solventes diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias, obedecendo um grau crescente de polaridade. Foram coletadas 22 frações (codificadas de A-V), que foram concentradas individualmente em rotaevaporador a temperatura média de 35 °C. (Tabela 3, pág. 48).

Tabela 3. Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fase butanólica de *Hancornia speciosa*.

Frações	Solventes	Proporção(%)
A	CH ₂ Cl ₂	100
B	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	50:50
C	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	45:55
D	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	40:60
E	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	35:65
F	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	30:70
G	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	25:75
H	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	20:80
I	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	15:85
J	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	10:90
K	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	5:95
L	AcOEt	100
M	AcOEt: MeOH	90:10
N	AcOEt: MeOH	80:20
O	AcOEt: MeOH	70:30
P	AcOEt: MeOH	60:40
Q	AcOEt: MeOH	50:50
R	AcOEt: MeOH	40:60
S	AcOEt: MeOH	30:70
T	AcOEt: MeOH	20:80

U	AcOEt: MeOH	10:90
V	MeOH	100

As frações foram analisadas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes e de acordo com seus R_f, após visualização na luz ultravioleta.

As frações de A a K foram eluídas utilizando como fase móvel Tolueno: acetato de etila: ácido fórmico na proporção 5:5:0,5. Já para as frações de M a Q foi utilizado acetato de etila: ácido fórmico: metanol: água na proporção 10: 0,5:0,6:0,2, enquanto que as últimas frações R a V por serem mais polares utilizou-se acetato de etila: ácido fórmico: água: metanol na proporção 10: 1,5:1,6:0,5, e quando reveladas utilizando reagente Natural A (difenilborato de aminoetanol), houve positividade para flavonoides nas frações M a Q.

4.1.7 Processamento cromatográfico da fração N da CLV de *Hancornia speciosa*

A fração N foi submetida a cromatografia em coluna utilizando como adsorvente sílica C18, e metanol para solubilizá-la na proporção de 1 g de amostra para 100 g de sílica. Partindo de 0,4 g da fração N foi possível obter 10 frações, codificadas de A-J. Como solventes foi utilizado água e metanol puros ou em misturas binárias, obedecendo a um grau decrescente de polaridade, (Tabela 4, pág. 49).

Tabela 4. Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fração N da CLV de *Hancornia speciosa*.

Frações	Solventes	Proporção(%)
A	H ₂ O: MeOH	90:10
B	H ₂ O: MeOH	80:20
C	H ₂ O: MeOH	70:30
D	H ₂ O: MeOH	60:40
E	H ₂ O: MeOH	50:50
F	H ₂ O: MeOH	40:60
G	H ₂ O: MeOH	30:70

H	H ₂ O: MeOH	20:80
I	H ₂ O: MeOH	10:90
J	MeOH	100

Cada fração apresentou um subconjunto de frações. A Fração A apresentou 16 frações, B- 16 frações, C- 10 frações, D- 9 frações, E- 9 frações, F- 9 frações, G, H, I e J apresentaram-se como frações únicas. Ressaltando que o critério de coleta das frações foi pela coloração aparente. As frações foram secas à temperatura ambiente e foram analisadas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes e de acordo com seus R_f, após visualização na luz ultravioleta. (Esquema 4, pág. 51).

A Fr A4-6 (0,226 g) mostrou na placa cromatográfica a presença de 3 bandas com fatores de retenção distintos. Dessa forma, essa fração foi submetida a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A análise por HPLC usando o método analítico utilizou acetonitrila e água milli-Q como solventes, com a concentração de acetonitrila variando de 5 a 30% num tempo de 60 minutos a uma vazão de 0,7 mL/min. A análise do cromatograma analítico permitiu escolher o melhor método para isolamento dos constituintes presentes na fração. Assim, na análise preparativa utilizou-se os mesmos solventes, porém a concentração de acetonitrila foi de 22% num tempo de corrida de 16 minutos a uma vazão de 2,0 mL/min.

No cromatograma da análise preparativa é possível visualizar o isolamento de 2 picos únicos, codificados como **Hs-3** (0,0206 g), e **Hs-4** (0,0187 g), que foram encaminhadas para o RMN ¹H e ¹³ C, (Figura 5, pág. 51).

Esquema 4. Processamento cromatográfico da fração N da CLV de *Hancornia speciosa*.

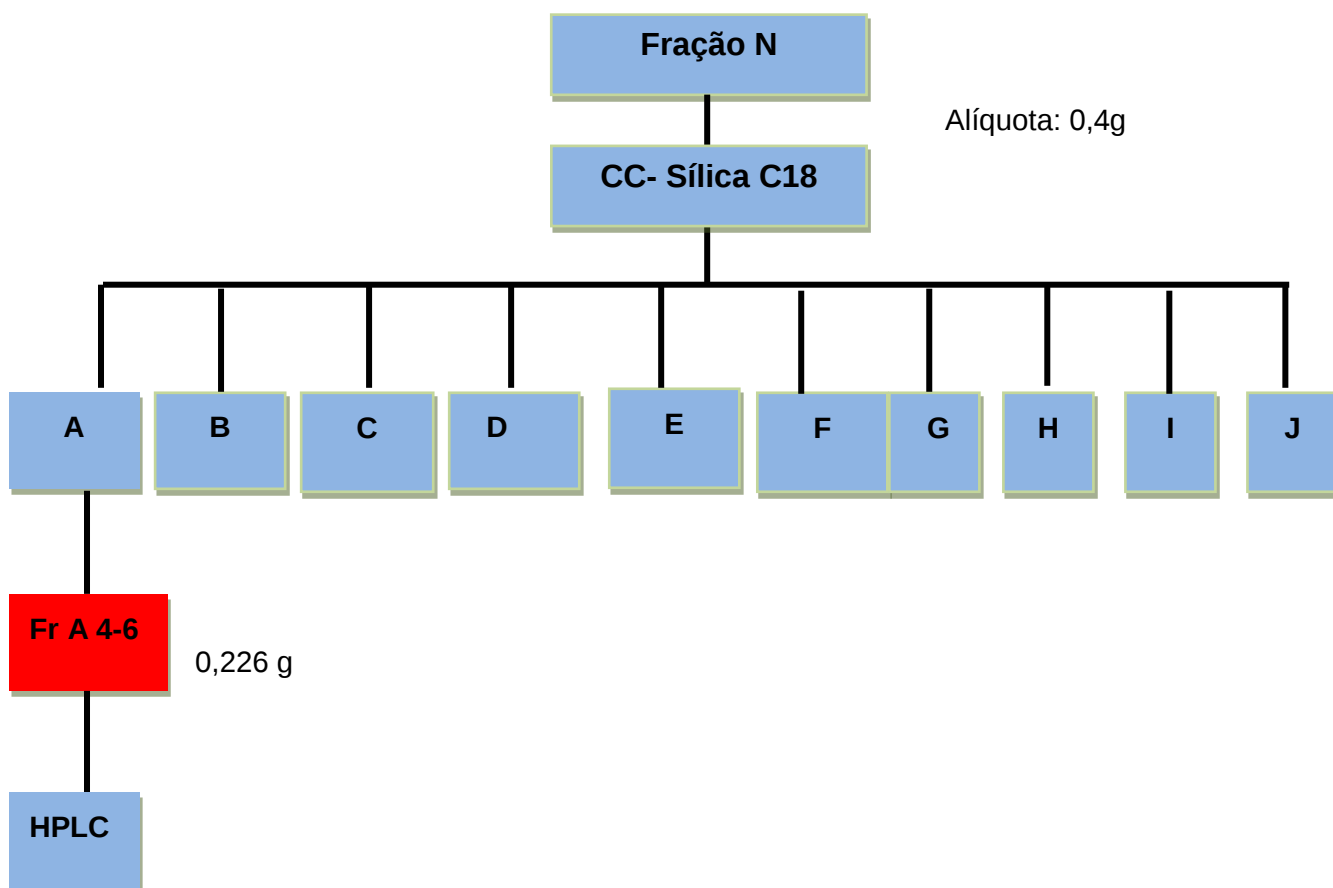
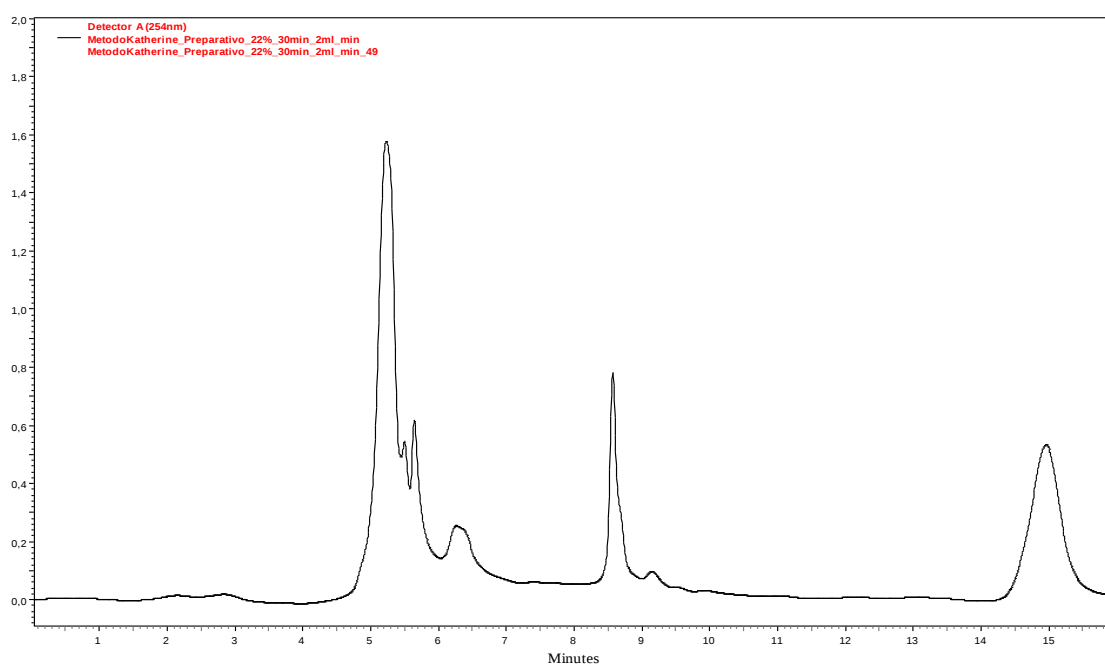


Figura 5. Cromatograma preparativo da Fração A4-6 de *Hancornia speciosa*.



4.1.8 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *Hancornia speciosa*

Os constituintes químicos foram estruturalmente determinados através do método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz, operando a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C , localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. As amostras foram preparadas utilizando o solvente: metanol deuterado (CD_3OD), dimetilsufóxido deuterado (DMSO) e clorofórmio deuterado (CDCl_3).

Os picos característicos de ^1H e ^{13}C dos solventes utilizados nas análises serviram como padrão interno durante a obtenção dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e as multiplicidades de RMN de ^1H indicadas segundo a convenção: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dl* (dubleto largo), *dd* (duplo dubleto), *t* (triplete), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

4.2 Obtenção dos dados de UHPLC/MS

As medidas foram feitas no modo Fullscan m/z 100-1000, com aquisição de dados dependente de MS^2 , no modo de íon negativo. O íon negativo em alta resolução ESI e o espectro MS^n induzido por dissociação por colisão (CID) foram obtidos em um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo Fisher- Germany) equipado com uma fonte de íons eletrospray aquecida (spray negativo, voltagem de 3kv, temperatura no capilar de 300° temperatura da fonte de 400° com resolução de 30.000). O nitrogênio foi usado como fonte de gás. O sistema de massas foi acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fischer Scientific) equipado com uma coluna em fase reversa C-18 com partículas de 1.9 μm , tamanho 175 Å e diâmetro interno 50 x 2,1 mm (HypersilGOLD, Thermo Fischer Scientific). A temperatura da coluna foi 45° e o detector por arranjo de diodos (220-600 nm, Thermo Fischer Scientific). A fase móvel foi H_2O (A: Fluka analytical, LC-MS Chromasolv) e ACN (B: Fluka Flukaanalytical, LC-MS Chromasolv) com 0,2 % de ácido fórmico usando um sistema gradiente como mostrado na Tabela 5 (pág. 53). O loop foi de 10 μL com um volume de injeção de 2

μL. O espectro de massas CID , que utilizou gás Hélio, foi obtido utilizando energias de colisão normalizadas de 35 a 45 %. O instrumento foi calibrado externamente com uma solução de calibração Pierce LTQ Velos ESI positivo (Produto número 88323) e Pierce ESI negativo da Thermo Fischer. Os dados foram avaliados usando um software Xcalibur 2.7 SP1.

Tabela 5. Sistema de gradiente utilizado na eluição do UHPLC.

	Tempo[min]	Fluxo [mL/min]	A	B
1	0.00	0.400	95	5
2	1.00	0.400	95	5
3	1.50	0.400	30	70
4	8.50	0.400	0	100
5	10.00	0.400	0	100
6	10.50	0.400	95	5
7	15.00	0.400	95	5

4.3 Estudo da atividade antifúngica de *Hancornia speciosa*

4.3.1 Reativação das amostras

As leveduras pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Micologia Médica e Molecular da UFRN, armazenadas em YPD caldo (“Yeast peptone dextrose”; extrato de levedura 10 g/L; dextrose 20g/L; peptona 20 g/L) adicionado de 20% de glicerol a -80 °C (Termo Scientific®) foram reativadas após 3 repiques sucessivos. Primeiramente, as leveduras foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD,Difco) a 37 °C por 48 horas e, em seguida, para a purificação dos isolados, essas foram repicadas para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo o meio cromogênico CHROMagar Candida® (Difco), sendo semeadas por esgotamento e incubadas a 37 °C por 48 horas. O terceiro repique foi realizado novamente em ASD, sob incubação a 37 °C por 24 horas.

4.3.2 Preparo do inóculo

Para cada leveduras pura, foi preparada uma suspensão em solução salina estéril 0,85%, agitando-a em vórtex, e ajustada visualmente com base no tubo 0,5 da escala de McFarland, que equivale à concentração de 1 a 5×10^8 UFC/mL. Foram realizadas duas diluições da suspensão: 1:50 em solução salina estéril e uma nova diluição de 1:20 em meio de cultura RPMI-1640.

4.3.3 Triagem com as leveduras de referência

As substâncias codificadas como **Hs-3** e **Hs-4** bem como o extrato hidroetanólico de *Hancornia speciosa* foram testados pelo ensaio de microdiluição em caldo frente às respectivas cepas de referência:

Candida albicans ATCC90028

Candida tropicalis ATCC13803

Candida dubliniensis CBS7987

Candida parapsilosis ATCC22019

Candida glabrata ATCC2001

Candida krusei ATCC6258

Candida rugosa ATCC10571

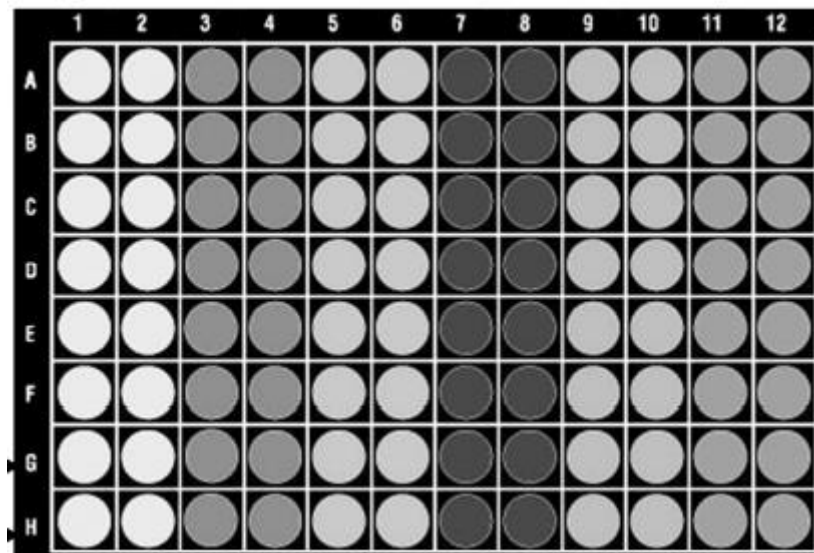
O método foi realizado conforme o recomendado para o teste de susceptibilidade de leveduras incluso no documento M27-A3, do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com algumas modificações.

Antes da realização do ensaio, foram preparadas as soluções do extrato hidroetanólico e das substâncias **Hs-3** e **Hs-4**, os quais foram inicialmente dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido) e posteriormente o volume completado com caldo RPMI-1640 estéril, de forma a produzir uma solução a 1 mg/mL contendo DMSO a 5% v/v. Após o preparo das soluções, essas foram filtradas em filtro de seringa com membrana de 0,22 μ m (KASVI), e em seguida iniciou-se o teste de microdiluição em microplacas estéreis de 96 poços. Primeiramente foram adicionados 100 μ L das soluções do extrato hidroetanólico e das substâncias **Hs-3** e **Hs-4**, separadamente, nos poços das colunas 1, 2 e 11. Em seguida, foram transferidos 100 μ L de caldo para os poços das colunas de 2 à 8 e 200 μ L para os poços da coluna 12. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta multicanal, foi realizada uma diluição seriada partindo da coluna 2, homogeneizando-se e

retirando-se 100 µL da mistura (meio + amostra) e adicionando-se ao poço da coluna seguinte. Este procedimento foi repetido até a coluna 9, desprezando-se os 100 µL restantes. Após a diluição seriada, foram adicionados 100 µL da solução contendo o inóculo das células de leveduras em cada poço, exceto nas colunas 1 e 12 (controle de esterilidade da amostra e do meio de cultura, respectivamente). Os poços das colunas 10 e 11 foram reservados para o controle de viabilidade do inóculo na ausência e presença do solvente de DMSO, respectivamente (Figura 6, pág. 55). Subsequentemente, as placas foram incubadas sob 37°C por 48 horas.

As leituras foram realizadas após o período de incubação, observando-se o crescimento nas respectivas diluições através de comparação visual. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração de amostra capaz de inibir visualmente o crescimento de cada cepa, tomando como referência o respectivo controle de viabilidade.

Figura 6. Representação do teste de microdiluição em caldo. Coluna 1 = controle de esterilidade do extrato. Coluna 2 – 9 = poços teste. Coluna 10 = controle de viabilidade do inóculo. Coluna 11 = controle do solvente. Poço 12 = controle de esterilidade do meio de cultura.



Fonte: SÁ, 2014.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural de *Hs-1*

A substância codificada como ***Hs-1*** foi isolada na forma de um sólido amorfo marrom com 0,011 g.

No espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em CDCl_3 (Figura 7, pág. 57) e suas expansões (Figura 8, pág. 58, Figura 9, pág. 58) foi possível observar dois dubletos em δ_{H} 7,56 ($J = 15,5$ Hz) e δ_{H} 6,24 ($J = 15,5$ Hz) atribuídos a hidrogênios olefínicos acoplando em trans. Observou-se ainda deslocamentos químicos em δ_{H} 6,85 (d , $J = 8,0$ Hz), δ_{H} 6,98 (dd , $J = 8,0$ e $1,5$ Hz) e δ_{H} 7,05 (s) condizentes com um padrão de hidrogenação em um anel aromático trissubstituído. Esses deslocamentos químicos descritos são semelhantes aos deslocamentos químicos do ácido caféico (STRAPASSON, 2014). No entanto, o espectro de *Hs-1* apresentou dois sinais a mais, em δ_{H} 4,24 (q , $J = 7,0$) e δ_{H} 1,29 (t , $J = 7,0$), sinais estes característicos de uma unidade etoxi. A integração desses deslocamentos químicos para 2 e 3 prótons, respectivamente sugerem que essa unidade esteja ligada ao ácido caféico.

No espectro de RMN de ^{13}C -BB a 125 MHz em CDCl_3 (Figura 10, pág. 59), foi possível observar a presença de 11 sinais. Destes, quatro foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, cinco a carbonos metínicos, um a carbono metilênico e um a carbono metílico. Os sinais δ_{C} 114,3 e δ_{C} 144,8 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-8 e C-7, respectivamente da unidade caféica. Observou-se também os sinais em δ_{C} 115,4, δ_{C} 115,7 e δ_{C} 122,3 que corroboraram para o anel trissubstituído e foram atribuídos a C-2, C-5 e C-6, respectivamente da unidade caféica. Observou-se ainda os sinais referentes ao etoxi, um carbono metilênico em δ_{C} 60,5 e um metílico em δ_{C} 14,3. Esses dois sinais juntamente com o deslocamento químico em δ_{C} 167,7 justifica a esterificação do ácido caféico com uma unidade etoxi. (Figura 11, pág. 59). No espectro de HMBC (Figura 12, pág. 60) foi observado um mapa de contorno do sinal em δ_{H} 4,24 (2H-1') com o sinal em δ_{C} 167,7 (C-9) confirmando essa esterificação. Após análises desses dados e comparação com dados da literatura, ***Hs-1*** foi determinado como sendo o éster etílico do ácido caféico (cafeato de etila) (Figura 13, pág. 60), substância relatada para várias espécies vegetais (BEZERRA,

2013; BRESSAN, 2014; MEIRA et al. 2008; SILVA, 2015;), porém aqui relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Tabela 6. Dados de RMN de **Hs-1** em CDCl_3 a 500 MHz (J em Hz, δ em ppm).

C	Hs-1		* STRAPASSON, 2014	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	---	127,5	---	127,6
2	7,05 (s)	115,4	7,05 (s)	114,5
3	---	143,8	---	143,9
4	---	146,3	---	146,4
5	6,85 (d, $J = 8,0$)	115,7	6,84 (d, $J = 8,0$)	114,7
6	6,98 (dd, $J = 8,0$ e 1,5)	122,3	6,96 (d, $J = 8,0$)	123,0
7	7,56 (d, $J = 15,5$)	144,8	7,56 (d, $J = 15,9$)	144,9
8	6,24 (d, $J = 15,5$)	114,3	6,24 (d, $J = 15,9$)	115,9
9	---	167,7	---	167,8
1'	4,24 (q, $J = 7,5$)	60,5	4,25 (q, $J = 7,1$)	60,6
2'	1,29 (t, $J = 7,5$)	14,3	1,33 (t, $J = 7,1$)	14,4

* Dados obtidos em CDCl_3

Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Hs-1**.

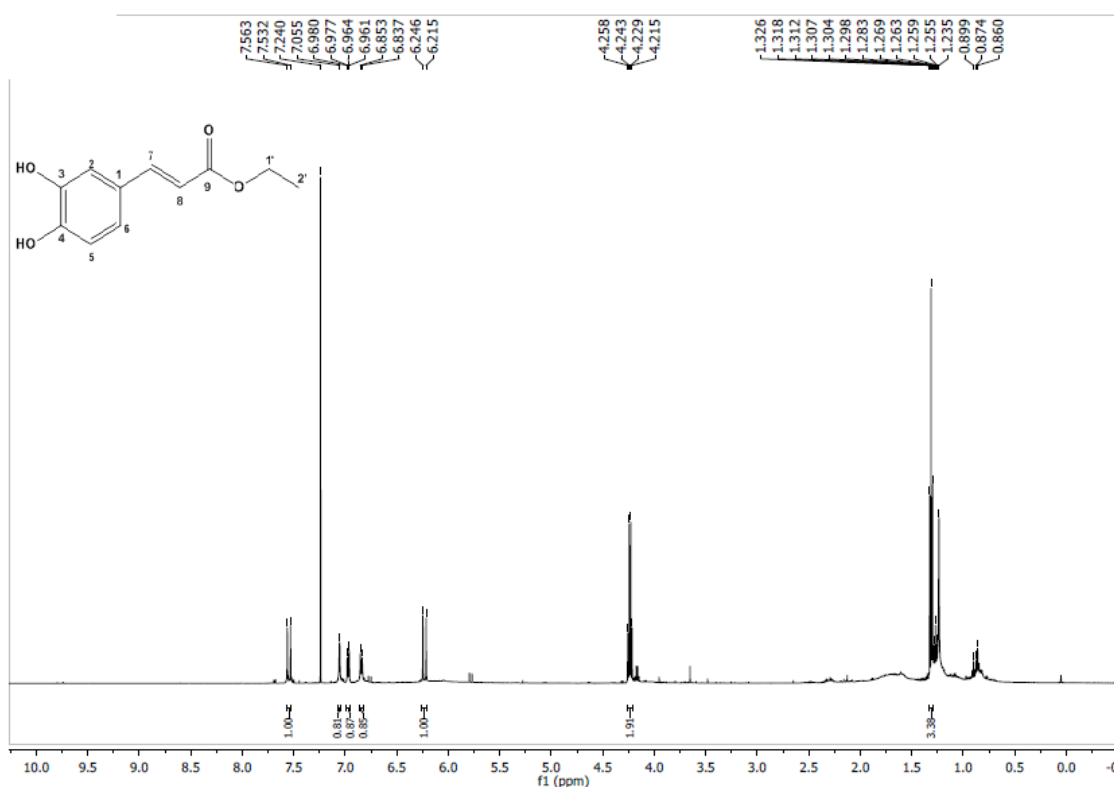


Figura 8. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **HS-1** na região de 7,7-6,0 ppm.

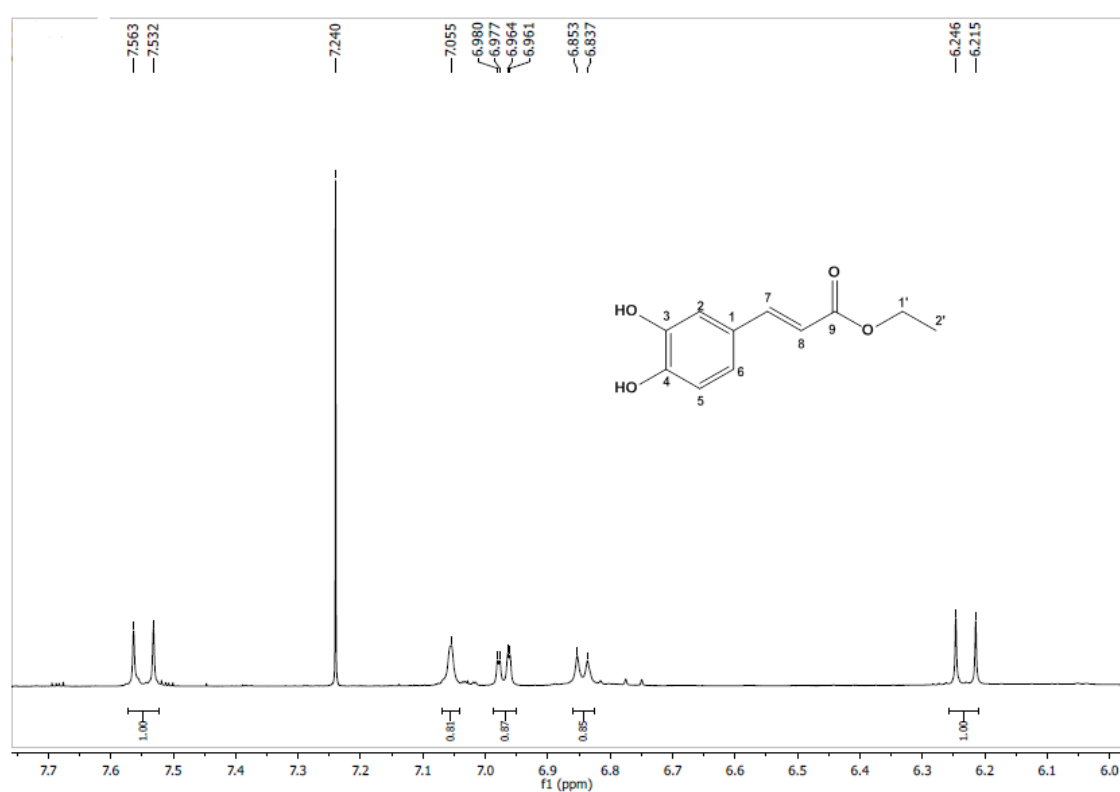


Figura 9. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **HS-1** na região de 4,7-0,9 ppm.

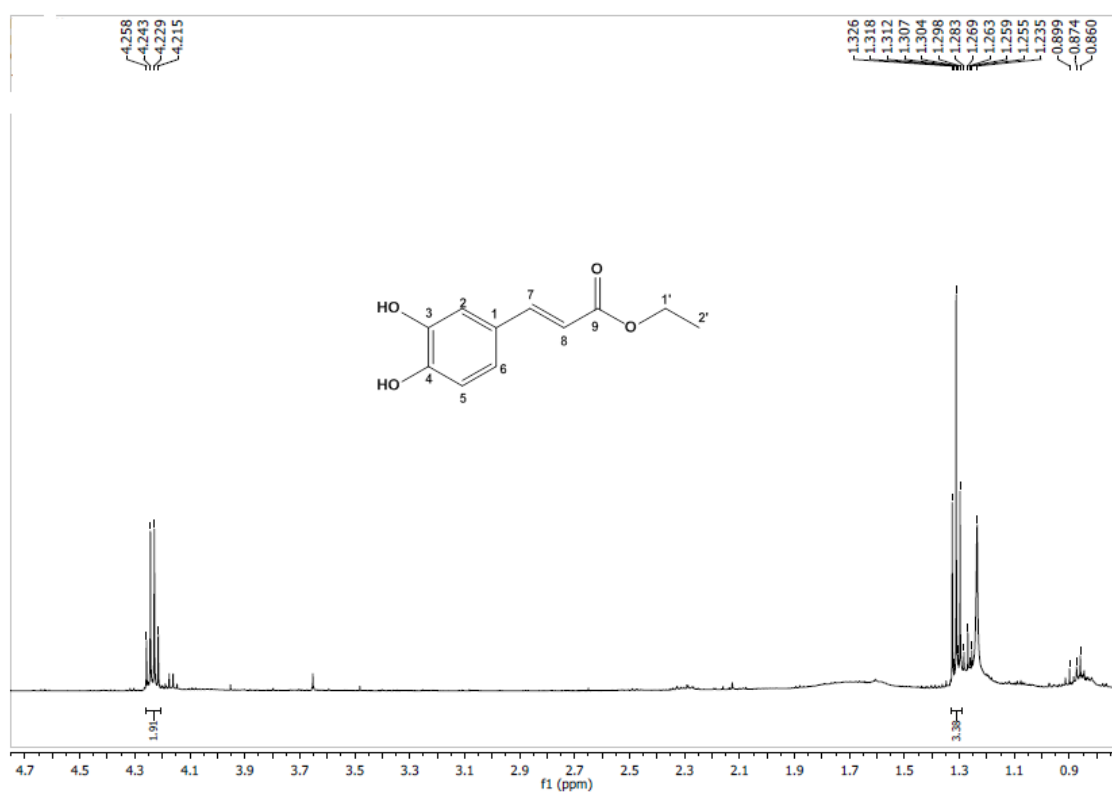


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de **Hs-1**.

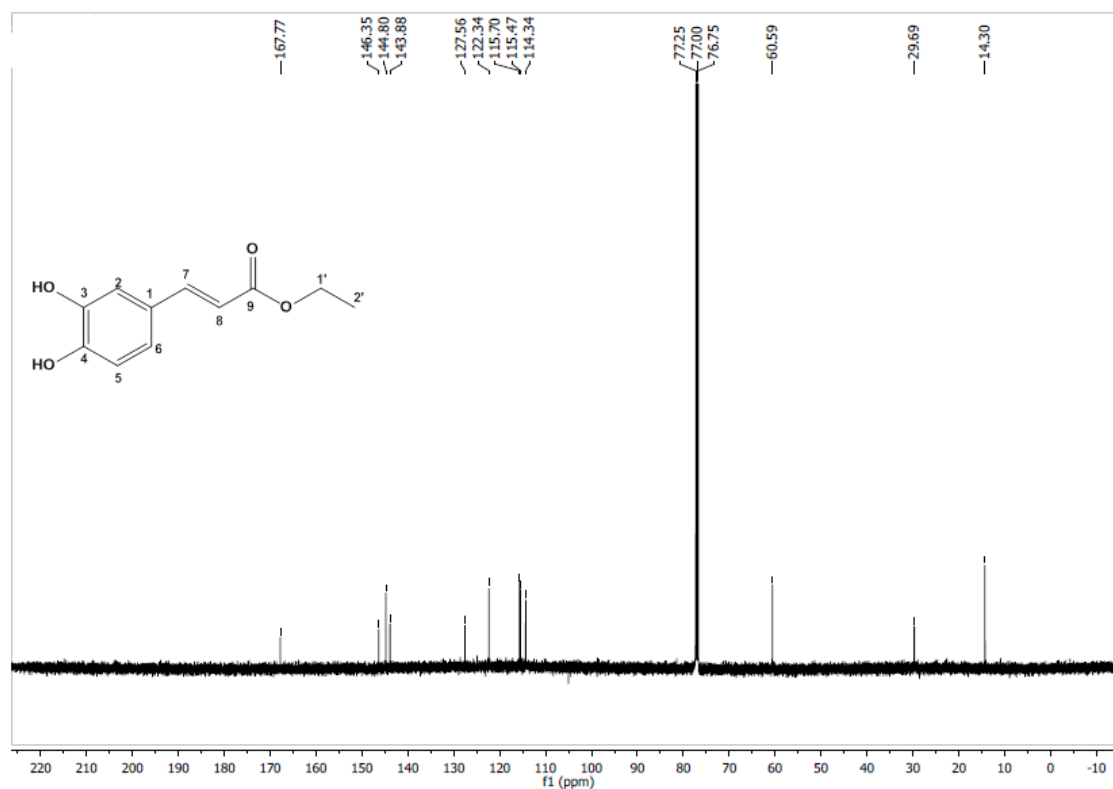


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de **Hs-1** na região de 174-114 ppm.

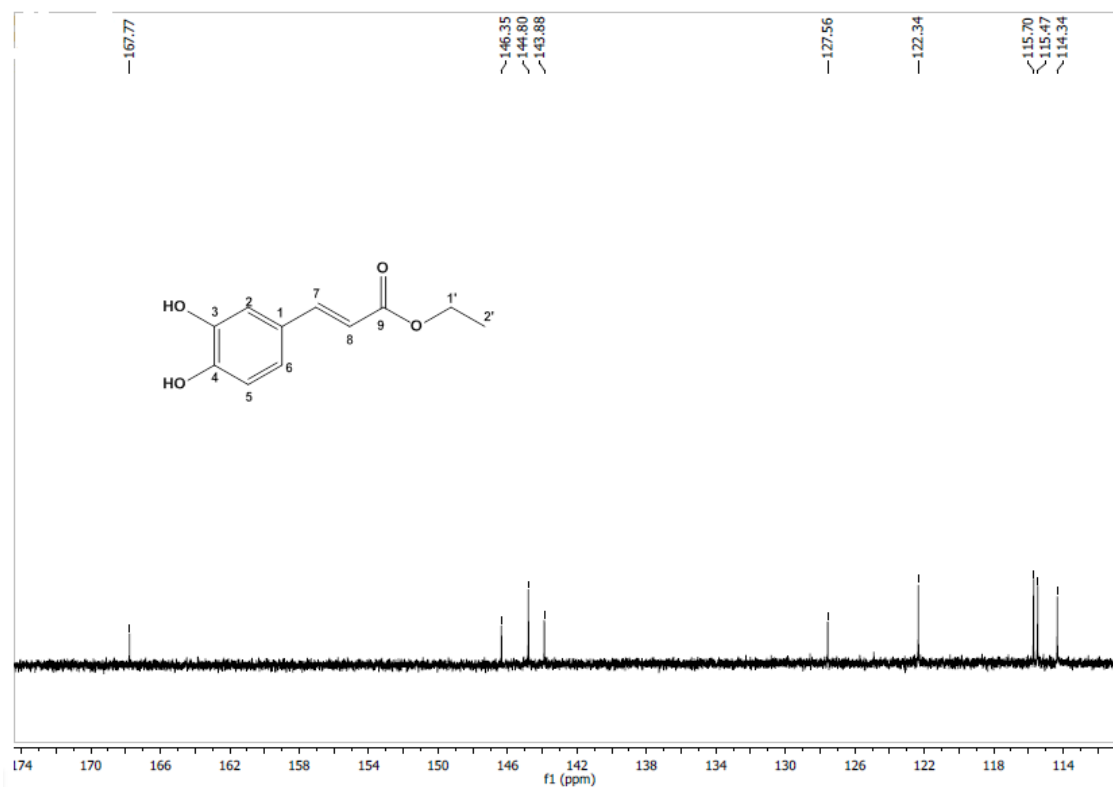


Figura 12. Espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3) de **Hs-1**.

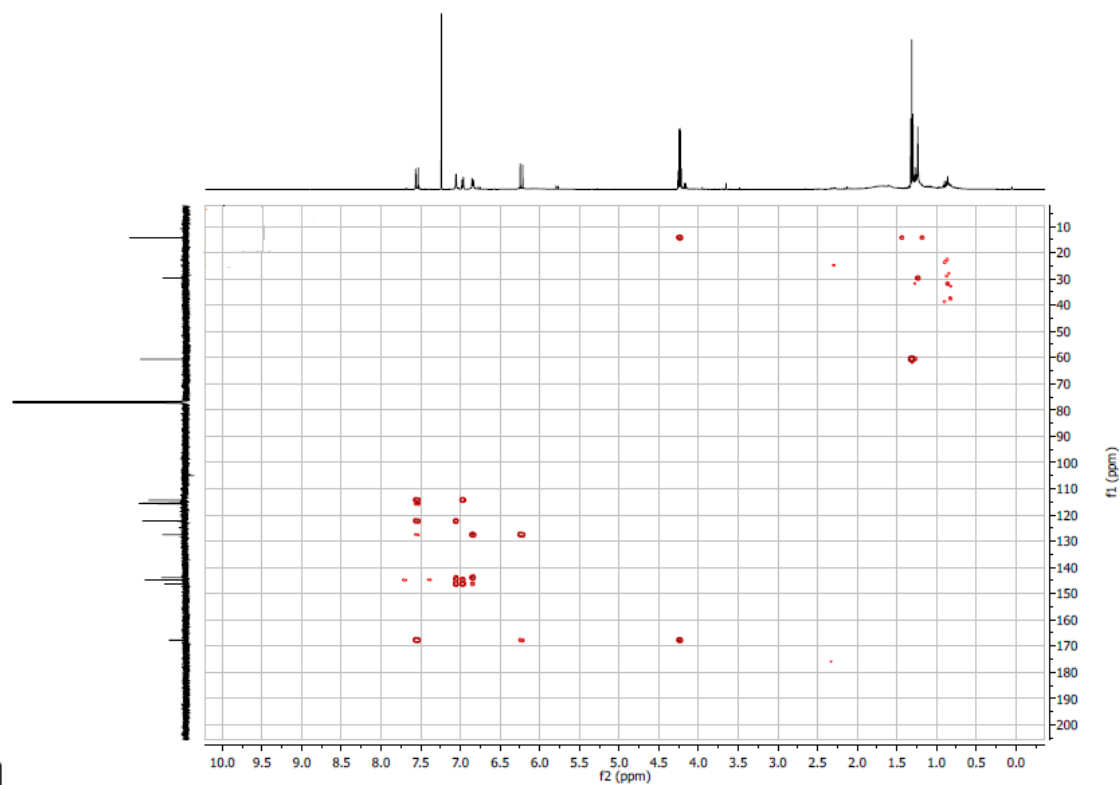
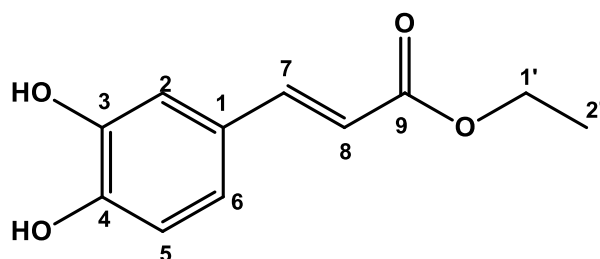


Figura 13. Estrutura do cafeato de etila.



5.2 Determinação estrutural de **Hs-2**

A substância codificada como **Hs-2** foi isolada na forma de um pó amarelo amorfo com 0,009 g.

O espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) (Figura 14, pág. 63) apresentou 15 sinais correspondentes a 15 átomos de carbono sp^2 , característicos da estrutura básica dos flavonoides. Nas expansões do espectro de RMN ^{13}C – BB (Figura 15, pág. 63; Figura 16, pág. 64) é possível observar os sinais em δ_{C} 62,4, δ_{C} 71,1, δ_{C} 75,6, δ_{C} 78,0 e δ_{C} 78,2, região característica de glicosídeo, (KALEGARI, 2014). Já o espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) (Figura 17, pág. 64) apresentou 21 sinais, e nas expansões desse espectro (Figura 18, pág. 65; Figura 19, pág. 65, Figura 20, pág. 66) foram observados sinais em δ_{C} 158,5, δ_{C} 158,9, δ_{C} 163,0 e em δ_{C} 166,4, os quais não foram visualizados no espectro de RMN ^{13}C – BB.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 21, pág. 66) e suas expansões (Figura 22, pág. 67; Figura 23, pág. 67), foram observados deslocamentos na região de 3-4 ppm, característicos de açúcares. (KALEGARI, 2014) Os hidrogênios em δ_{H} 6,88 (1H, $J = 8,5$ Hz) δ_{H} 7,69 (1H, $J = 2,0$) e em δ_{H} 7,58 (1H, $J = 2,5$ Hz, $J = 8,5$ Hz), correspondentes ao anel B, evidenciam a presença de um sistema ABX com os acoplamentos orto entre H5' e H6', e meta entre H2' e H6', enquanto que os prótons em δ_{H} 6,20 (1H, s) e δ_{H} 6,39 (1H, s) correspondem ao anel A, comprovando que **Hs-2** é um derivado da quercetina.

Para o glicosídeo, o hidrogênio anomérico está localizado em δ_{H} 5,20, e os carbonos em δ_{C} 104,2 (C1''), δ_{C} 78,2 (C5''), δ_{C} 78,2 (C3''), δ_{C} 75,6 (C2''), δ_{C} 71,2 (C4'') e δ_{C} 62,4 (C6'') os quais, comparados com os dados da literatura, indicam a presença de um grupo β -glucopiranosil, cuja ligação ao carbono 3 foi evidenciada pelo experimento HMBC (Figura 24, pág. 68). que correlaciona o sinal em δ_{H} 5,20 (H1'') com o carbono em δ_{C} 135,5 (C3), (LEE et al., 2007).

Os demais dados de RMN estão compilados na Tabela 7 (pág. 62). Após comparação dos dados espectrais obtidos com os dados da literatura foi possível identificar **Hs-2** como sendo a isoquercetrina (Figura 25, pág. 68) isolada pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Tabela 7. Dados de RMN de **Hs-2** em CD₃OD a 500 MHz (*J* em Hz, δ em ppm).

C	Hs-2		*KALEGARI, 2014	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	---	158,9	---	159,2
3	---	135,5	---	135,8
4	---	179,4	---	179,7
5	---	163,0	---	163,2
6	6,20 (1H, <i>sl</i>)	100,1	6,21 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	100,0
7	---	166,4	---	167,2
8	6,39 (1H, <i>dd</i> , <i>sl</i>)	94,9	6,40 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	94,8
9	---	158,5	---	158,6
10	---	105,5	---	105,8
1'	---	123,1	---	123,2
2'	7,69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	117,5	7,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	117,7
3'	---	145,8	---	146,1
4'	---	149,8	---	150,0
5'	6,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5)	116,0	6,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,3)	116,1
6'	7,58 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,5 e <i>J</i> = 8,5)	123,1	7,60 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,3 e <i>J</i> = 1,6)	123,4
1''	5,20 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0)	104,2	5,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6)	104,4
2''	3,49	75,6	3,48 (1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 8,8)	75,9
3''	3,44	78,2	3,43 (1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 8,8)	78,3
4''	3,34	71,1	3,35 (1H, <i>tl</i> , <i>J</i> = 9,3)	71,4
5''	3,22	78,0	3,22 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,7; 5,4 e 1,6)	78,5
6''	3,58 e 3,71	62,4	3,58 e 3,71	62,7

* Dados obtidos a 500 MHz em CD₃OD

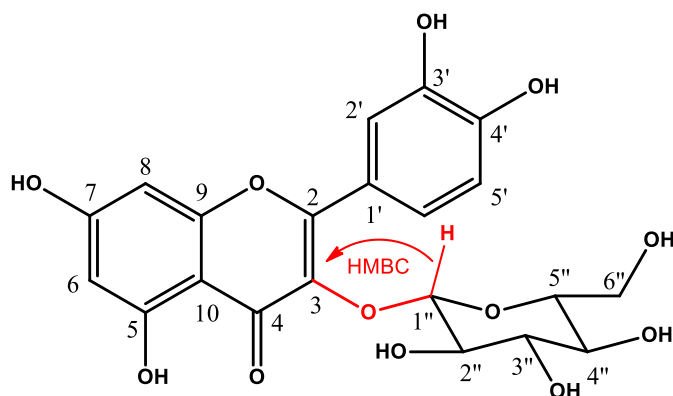


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2**.

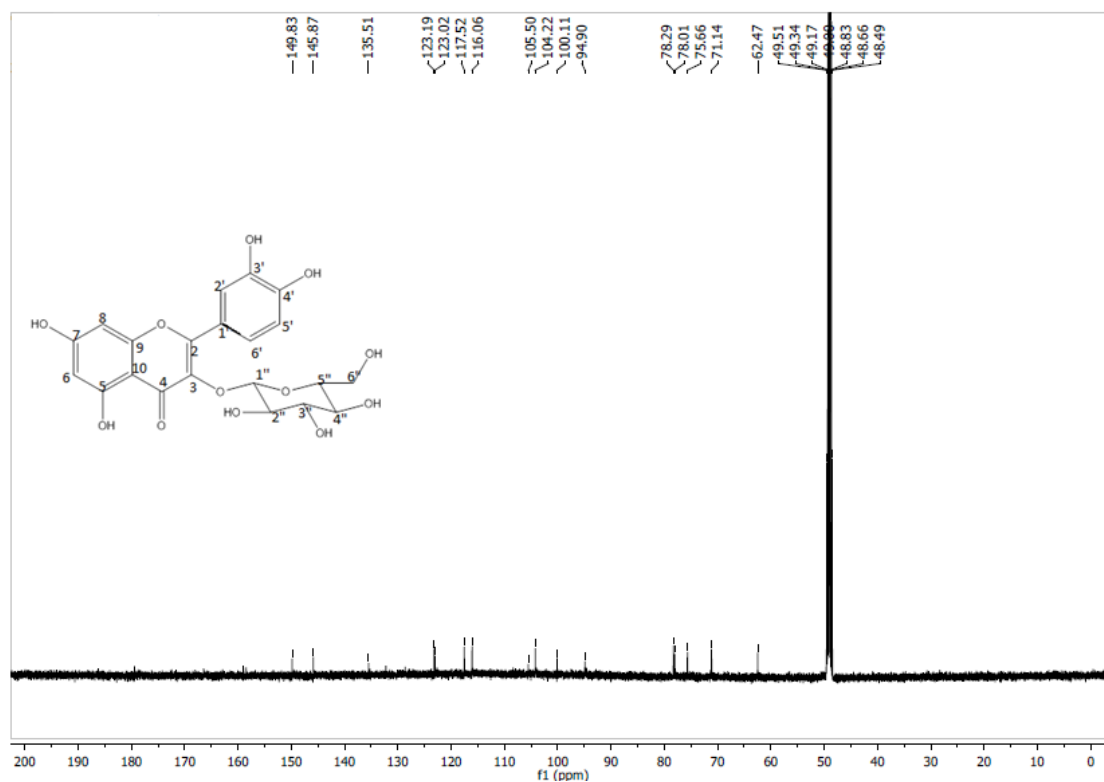


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 180-60 ppm.

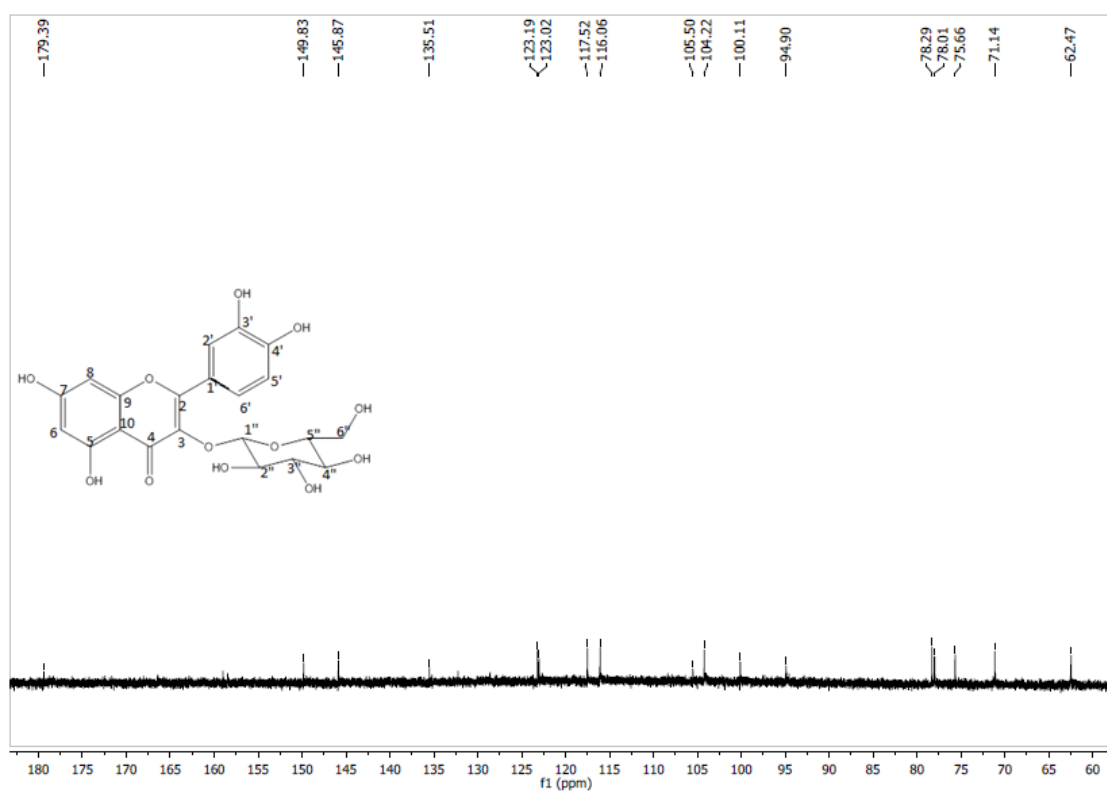


Figura 16. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 126-74 ppm.

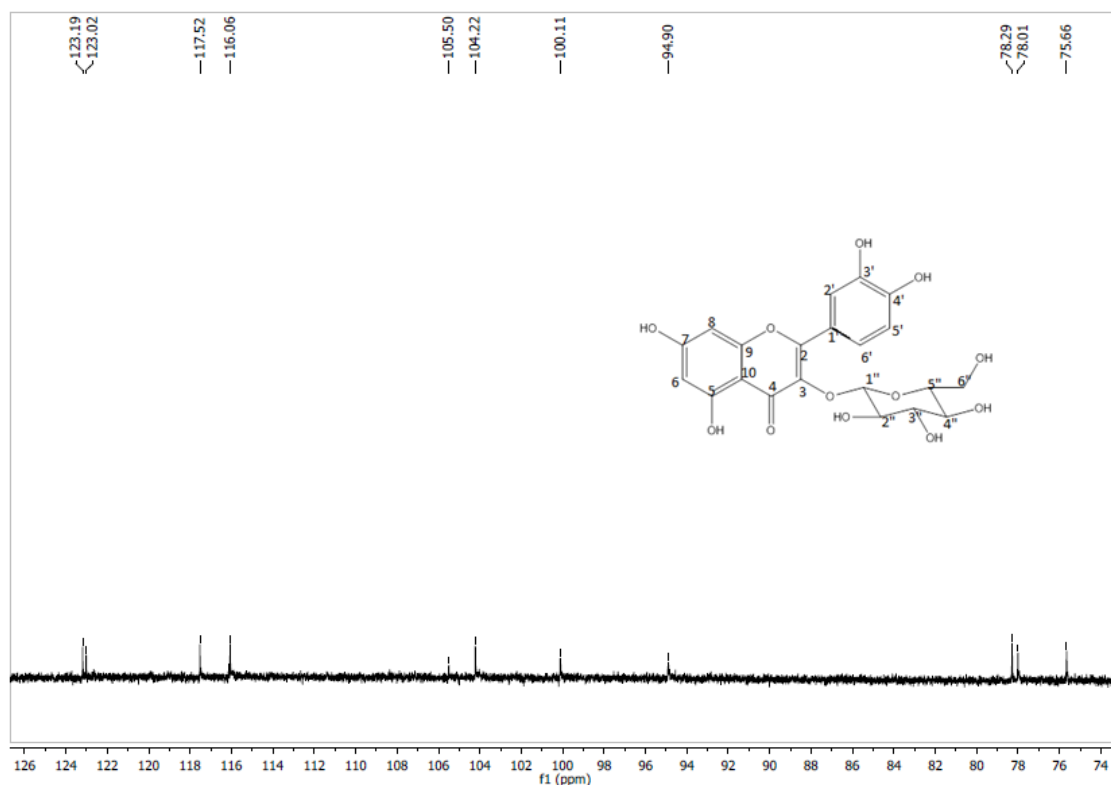


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2**.

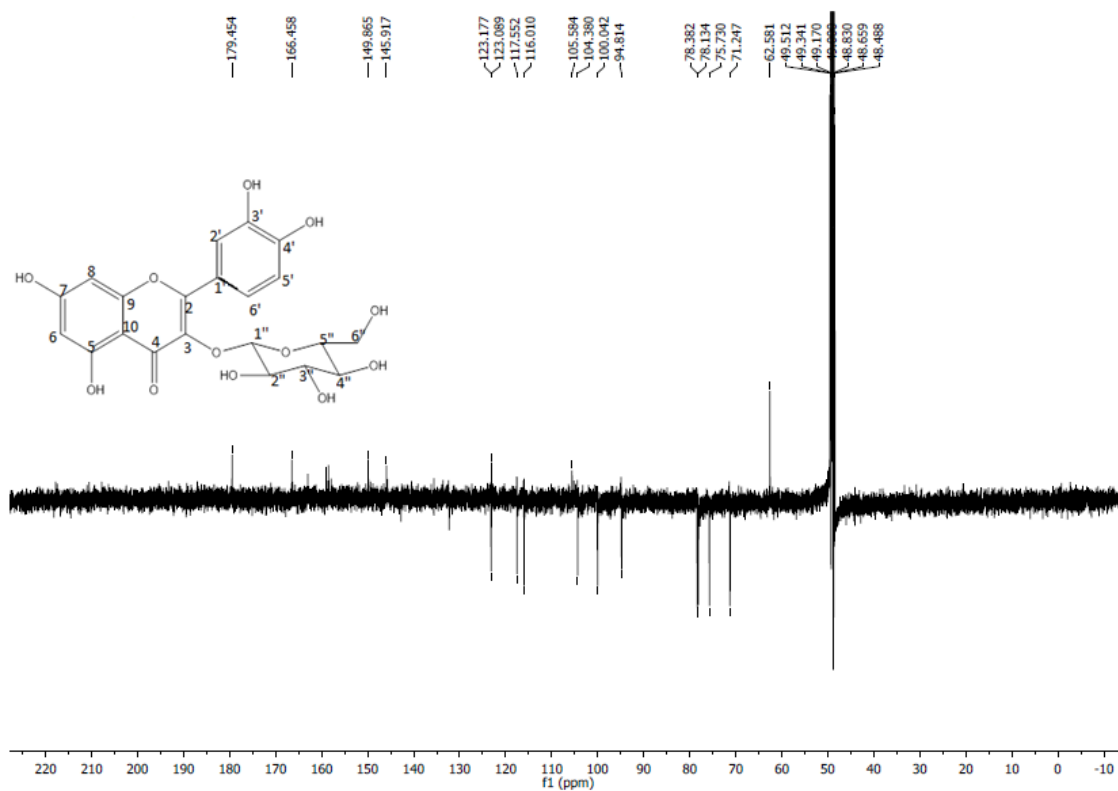


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 180-146 ppm.

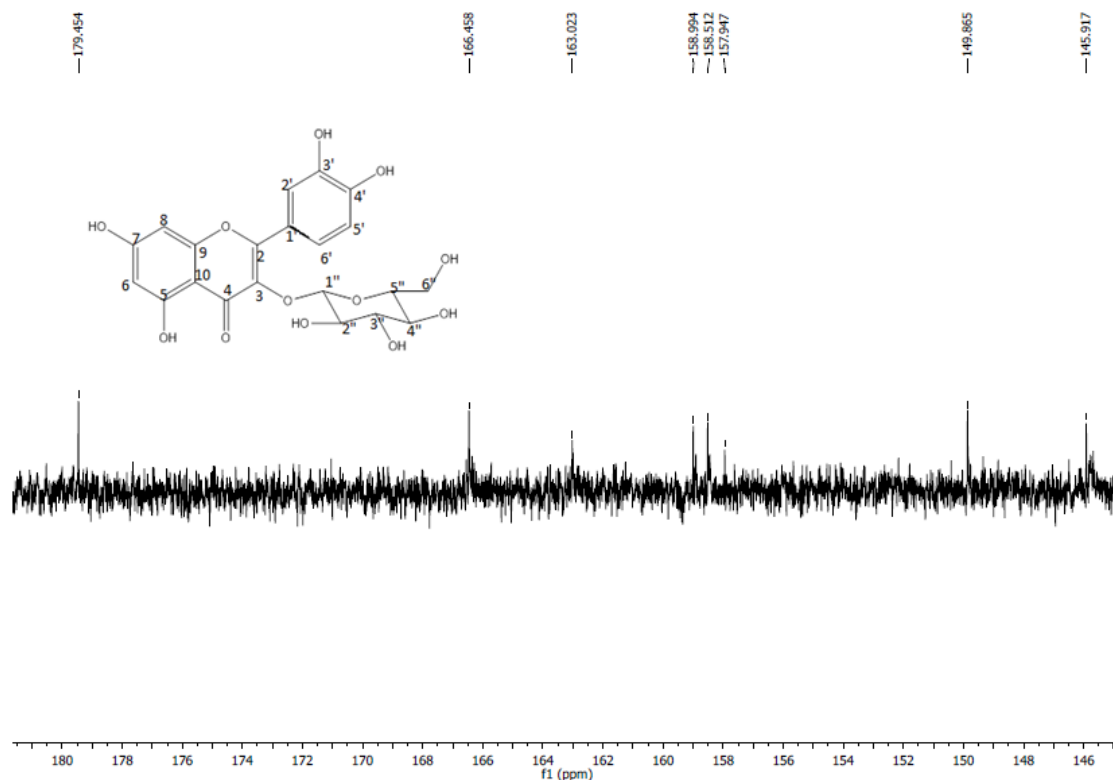


Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 128-90 ppm.

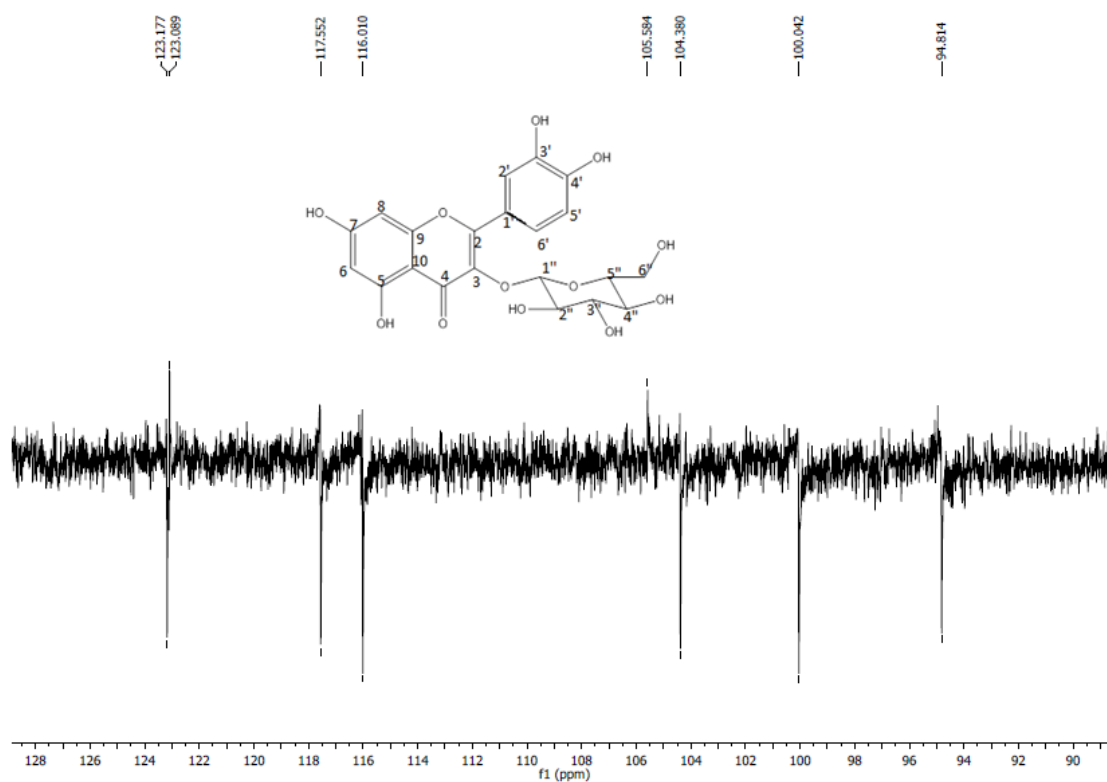


Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 92-54 ppm.

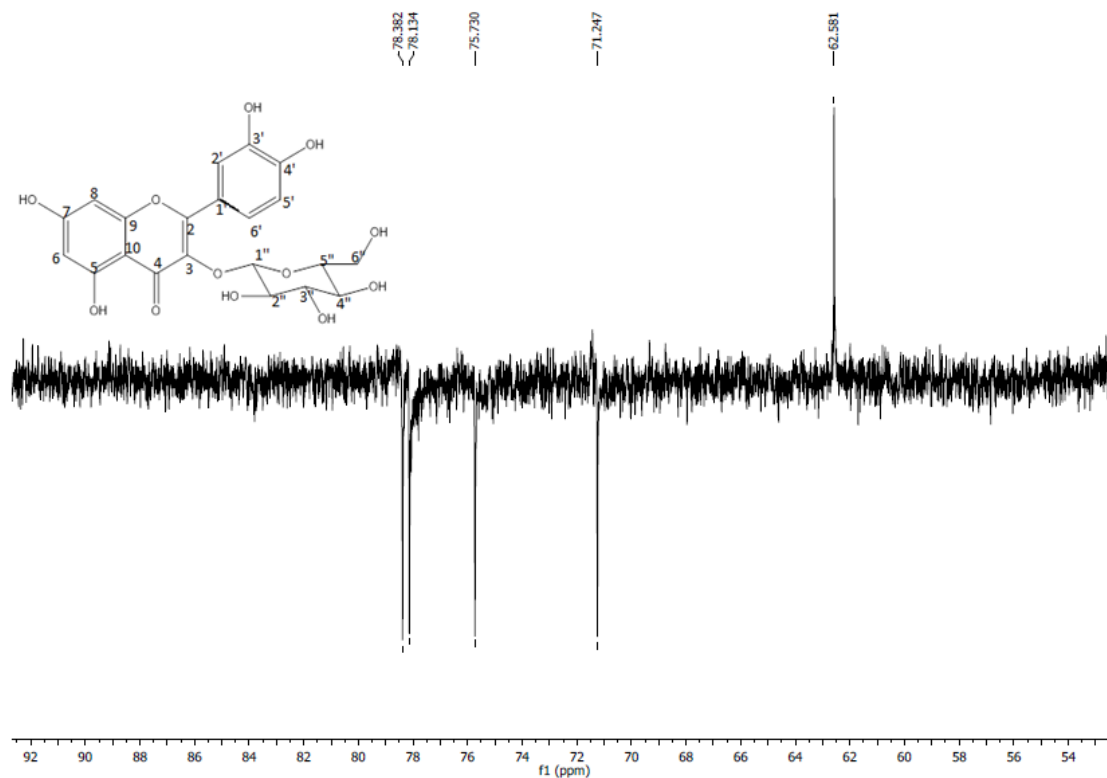


Figura 21. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-2**.

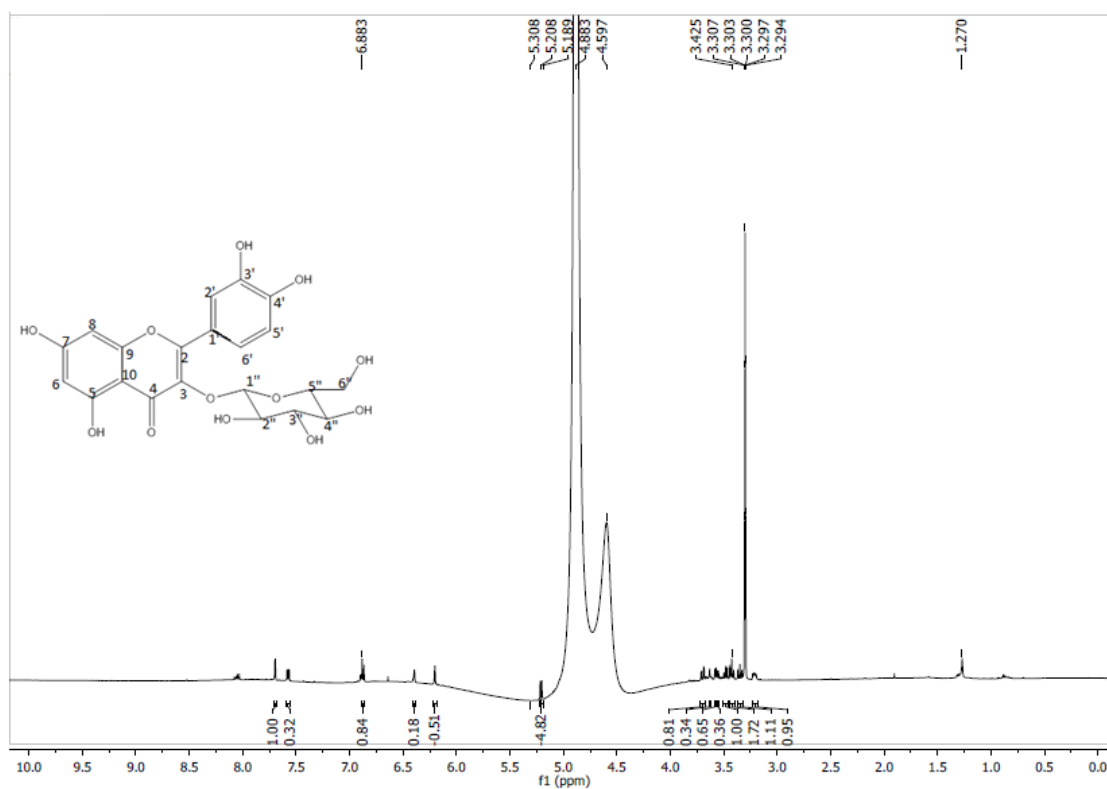


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 8,4-5,1 ppm.

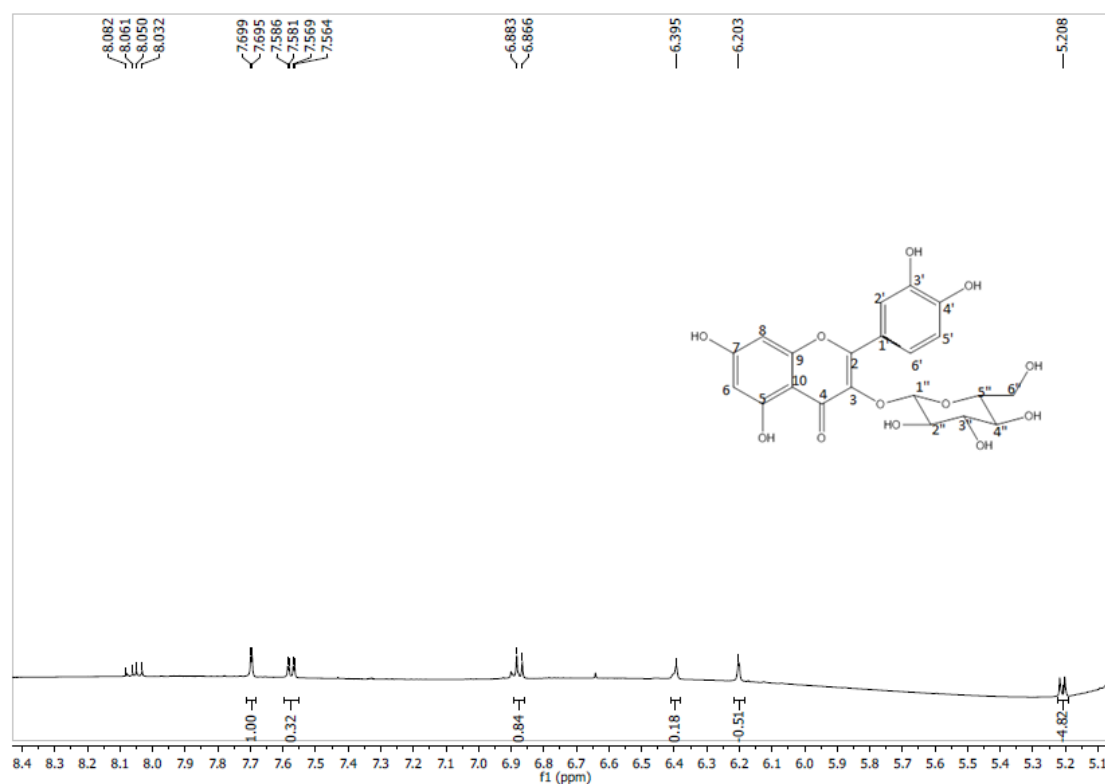


Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-2** na região de 3,9-3,05 ppm.

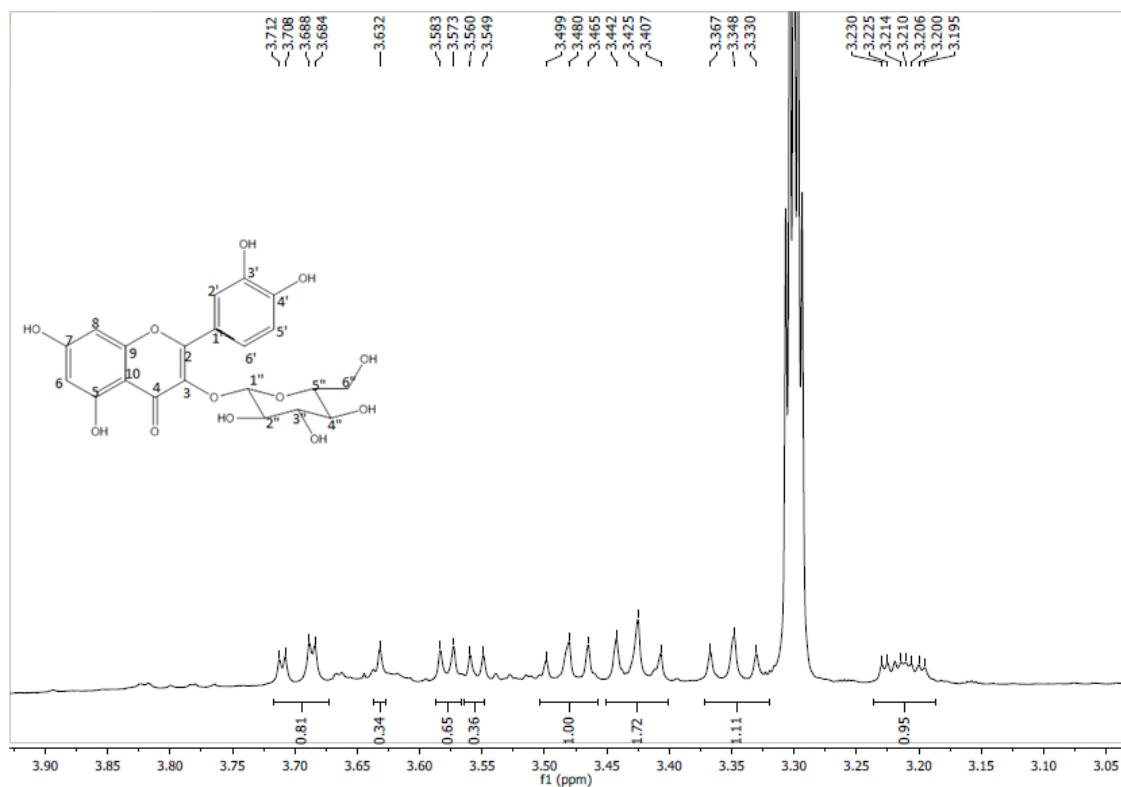


Figura 24. Espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, CD₃OD) de **Hs-2**.

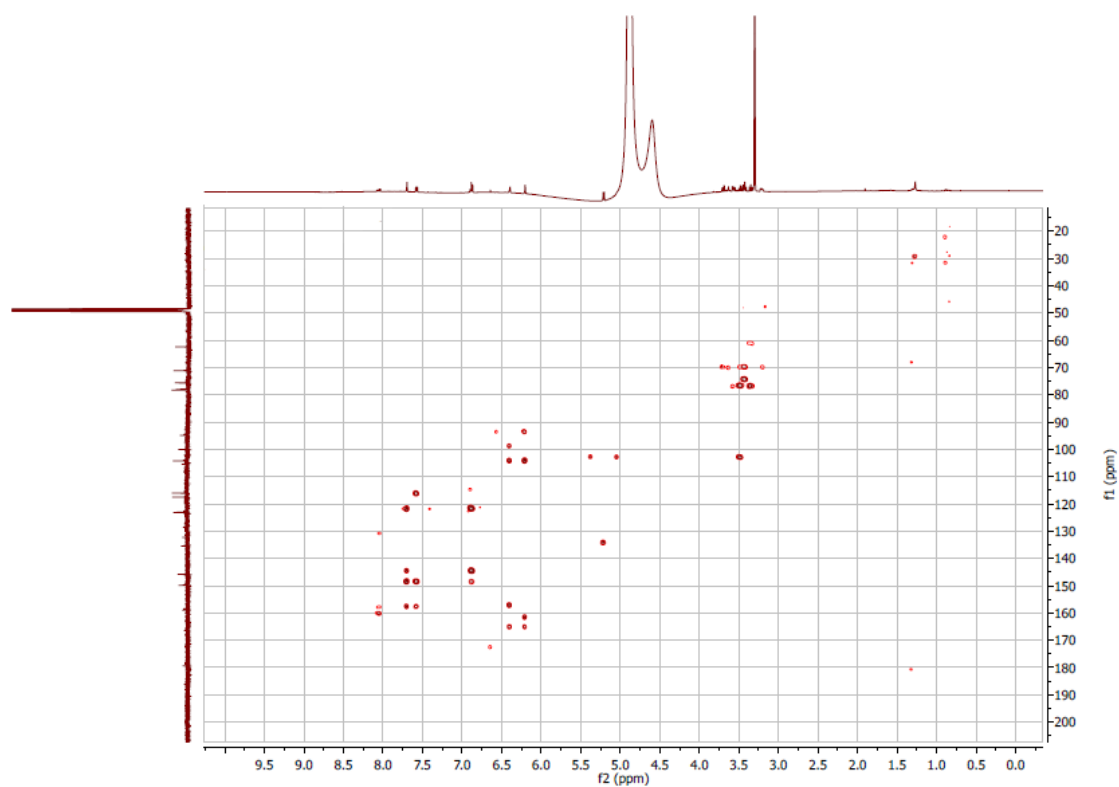
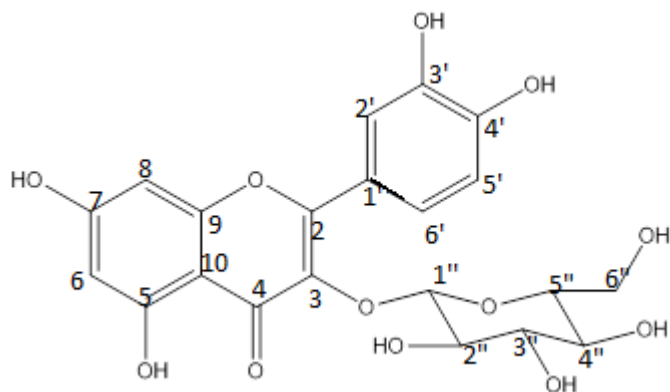


Figura 25. Estrutura da isoquercetrina.

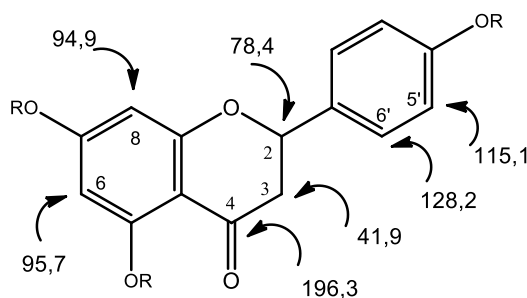


5.3 Determinação estrutural de *Hs-3*

A substância codificada como ***Hs-3*** foi isolada na forma de um pó amorfo branco com 0,0206 g.

No espectro de RMN de ^{13}C -APT a 125 MHz em DMSO (Figura 27, pág. 72) e suas expansões (Figura 28, pág. 72; Figura 29, pág. 73) foi possível observar a presença de 13 sinais correspondentes a 15 átomos de carbonos. Desses, sete foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, sete a carbonos metínicos e um a carbono metilênico (Tabela 8, pág. 71). A presença de 15 átomos de carbonos juntamente com os deslocamentos químicos em δ_c 196,3, δ_c 78,4 e δ_c 41,9, permitiram identificar ***Hs-3*** como sendo uma substância com esqueleto flavonoídico do tipo flavanona e esses deslocamentos químicos, quando comparados com a literatura, foram atribuídos a C-4, C-2 e C-3, respectivamente (FATOPE et al., 2003). Ainda nesse espectro foi possível observar os deslocamentos químicos em δ_c 95,7 e 94,9 que foram compatíveis com C-6 e C-8 do anel A tetrasubstituído da flavanona além de dois sinais intensos em δ_c 128,2 e δ_c 115,1, que foram atribuídos a C-2'/C-6' e C-3'/C-5', respectivamente, característicos de um anel B com padrão AA'BB' (FATOPE et al., 2003), (Figura 26, pág. 69).

Figura 26. Subestrutura I para ***Hs-3***.



Os deslocamentos químicos em δ_c 166,6, δ_c 163,4, δ_c 162,9 e δ_c 157,7, por comparação com a literatura foram atribuídos a C-7, C-5, C-9 e C-4', respectivamente. Com a ausência de sinais em δ_c ~52-60 determinou-se que todos os substituintes no esqueleto flavonoídico eram hidroxilas.

No espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em DMSO (Figura 30, pág. 73) e suas expansões (Figura 31, pág. 74; Figura 32, pág. 74) foi possível observar sinais em

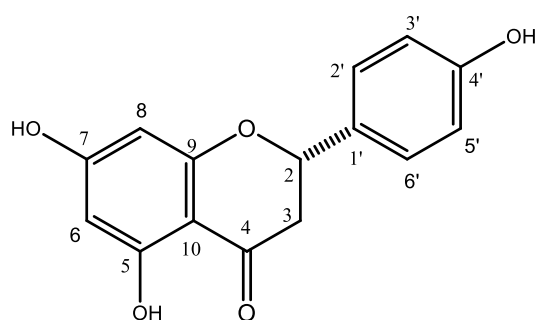
δ_H 12,13, característico de hidrogênio em ponte que foi atribuído a OH inserida na posição C-5. Observou-se ainda dois dubletos, em δ_H 7,31 ($J = 8,5$ Hz) com integral para dois hidrogênios e δ_H 6,80 ($J = 8,5$ Hz) com integral para dois hidrogênios que foram atribuídos a H-2'/H-6' e H-3'/H-5' compatíveis com o anel B do esqueleto flavonoídico do tipo AA'BB'. Observou-se ainda um sinal em δ_H 5,88 com integral para dois hidrogênios que foram atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, três duplo dubletos em δ_H 5,44 ($J = 3,0$; $J = 12,5$ Hz), δ_H 3,27 ($J = 12,5$; $17,0$ Hz) e δ_H 2,70 ($J = 17,0$; $3,0$ Hz) que foram atribuídos a H-2 e 2H-3, respectivamente, reforçando a proposta de estrutura da flavanona.

Após análises dos dados de RMN de 1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura, foi possível determinar **Hs-3** como sendo a 5,7,4'-trihidroxi-flavanona ou naringenina, sendo esse o primeiro relato para *Hancornia speciosa*.

Tabela 8. Dados de RMN de **Hs-3** em DMSO a 500 MHz (*J* em Hz, δ em ppm).

C	Hs-3		MO-1* - KYRIAKOU et al., 2012	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	5,44 (<i>dd</i> , 3,0; 12,5)	78,4	5,44 (<i>dd</i> , 3,0; 12,0)	78,9
3	3,27 (<i>dd</i> , 12,5; 17,0) 2,70 (<i>dd</i> , 3,0; 17,0)	41,9	3,25 (<i>dd</i> , 12,0; 17,0) 2,67 (<i>dd</i> , 3,0; 17,0)	42,4
4	----	196,3	----	196,9
5	----	163,4	----	164,2
6	5,88 (<i>s</i>)	95,7	5,88 (<i>s</i>)	96,6
7	----	166,6	---	167,3
8	5,88 (<i>s</i>)	94,9	5,88 (<i>s</i>)	95,5
9	-----	162,9	----	163,2
10	-----	101,7	----	102,6
1'	-----	128,8	----	128,6
2'	7,31 (<i>d</i> , 8,5)	128,2	7,31 (<i>d</i> , 8,0)	129,2
3'	6,80 (<i>d</i> , 8,5)	115,1	6,79 (<i>d</i> , 8,0)	115,9
4'	----	157,7	----	158,6
5'	6,80 (<i>d</i> , 8,5)	115,1	6,79 (<i>d</i> , 8,0)	115,9
6'	7,31 (<i>d</i> , 8,5)	128,2	7,31 (<i>d</i> , 8,0)	129,2
5-OH	12,13 (<i>s</i>)		12,14 (<i>s</i>)	

*Dados obtidos em DMSO



Naringenina

Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) de **Hs-3**.

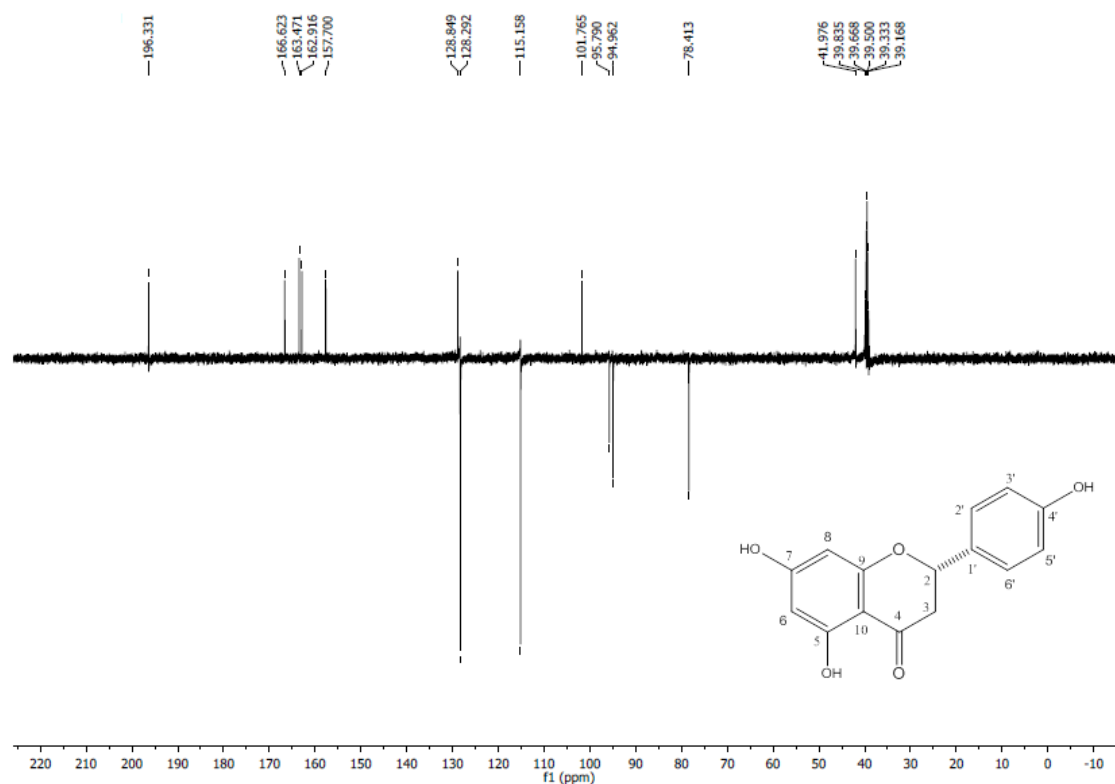


Figura 28. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) de **Hs-3** na região de 205-110 ppm.

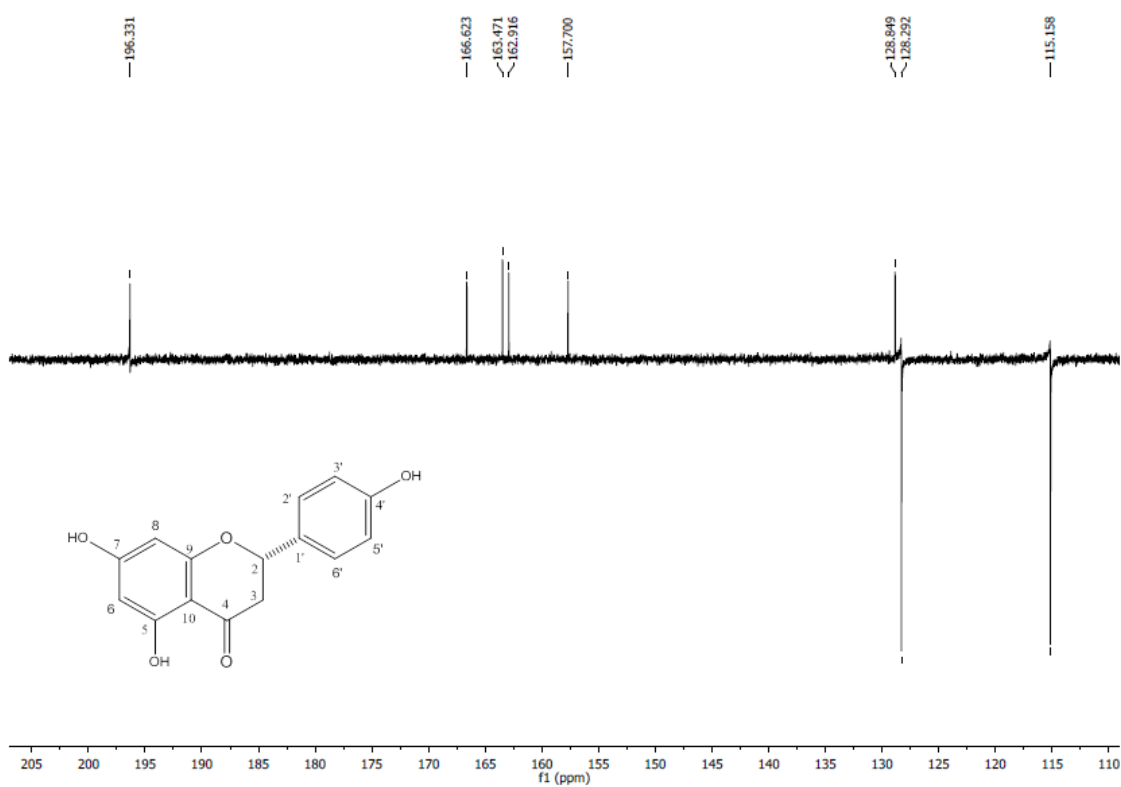


Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) de **Hs-3** na região de 105-15 ppm.

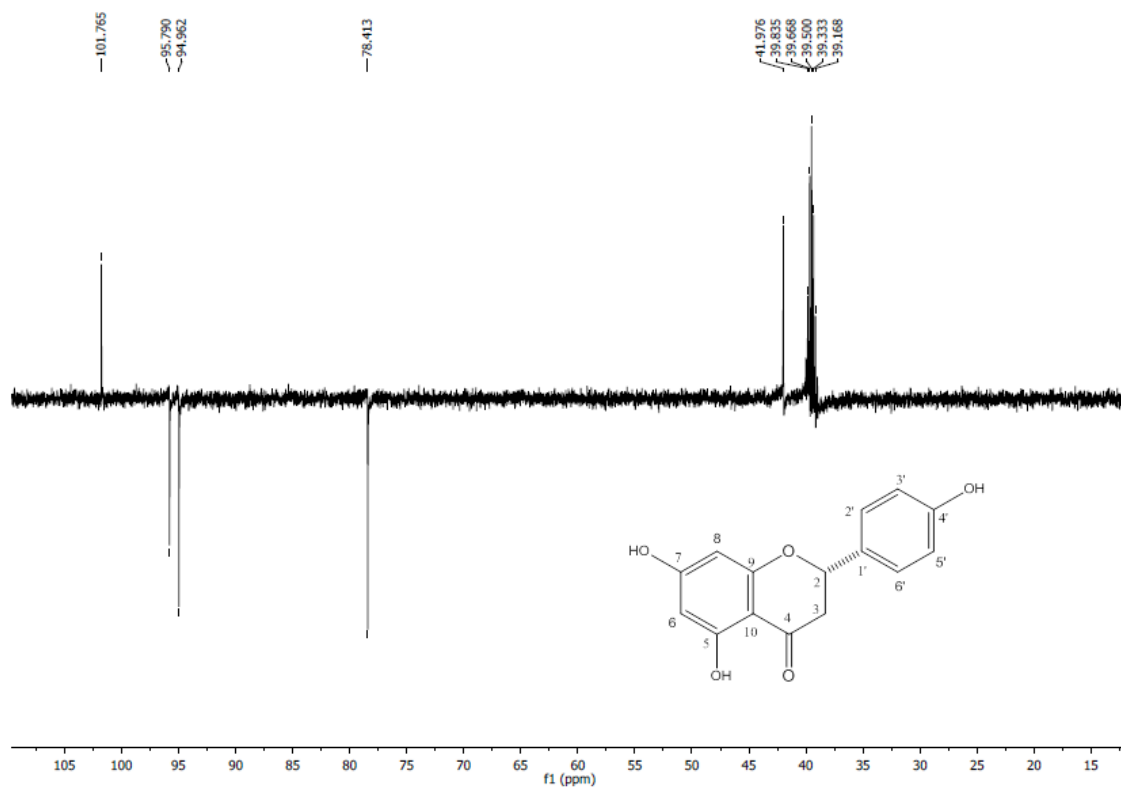


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de **Hs-3**.

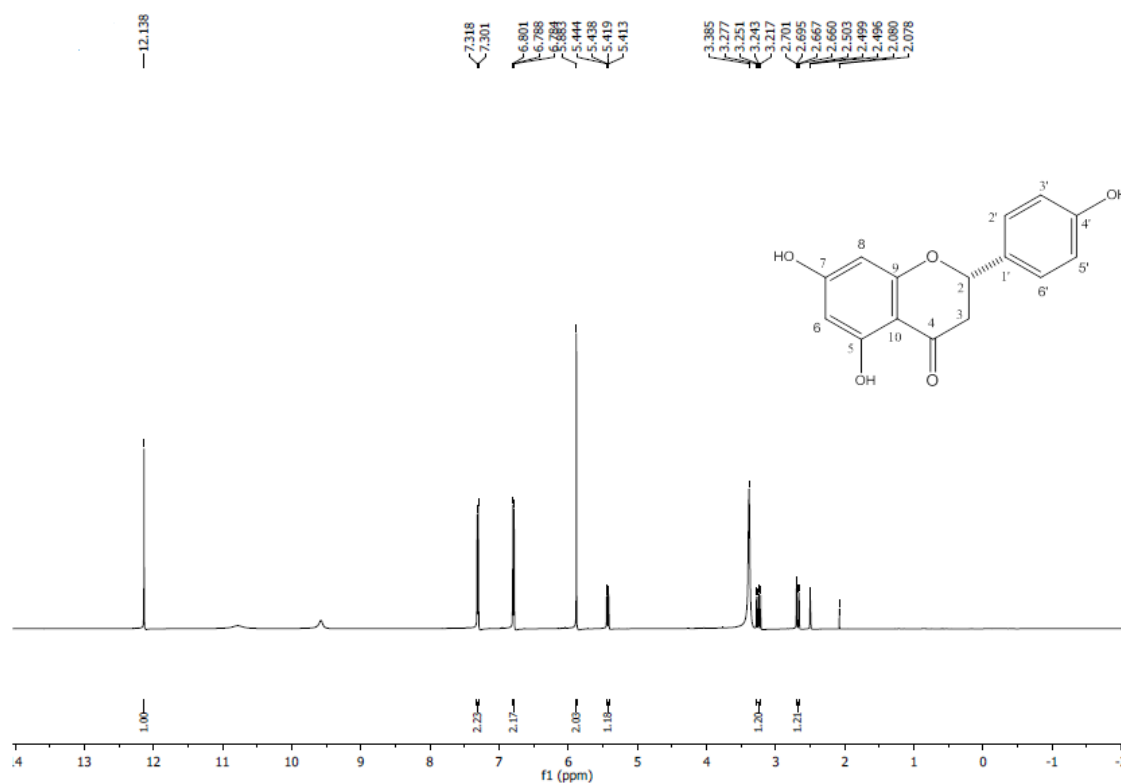


Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de **Hs-3** na região de 7,3-5,4 ppm.

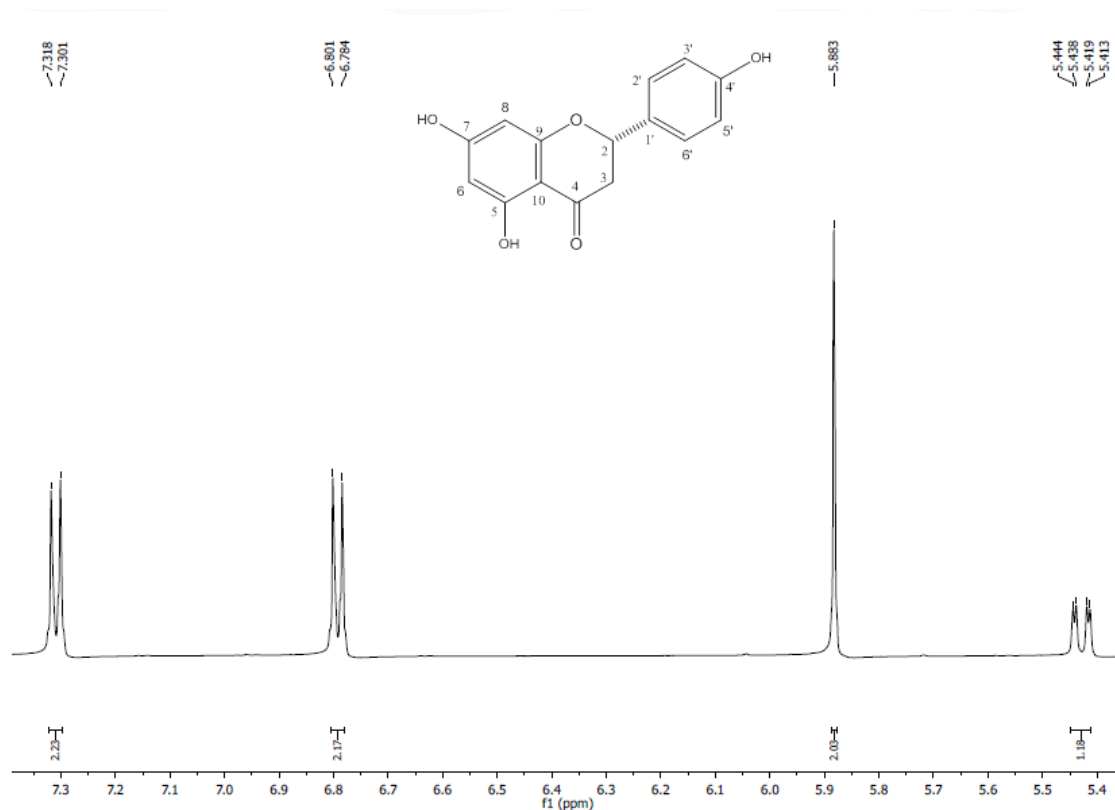
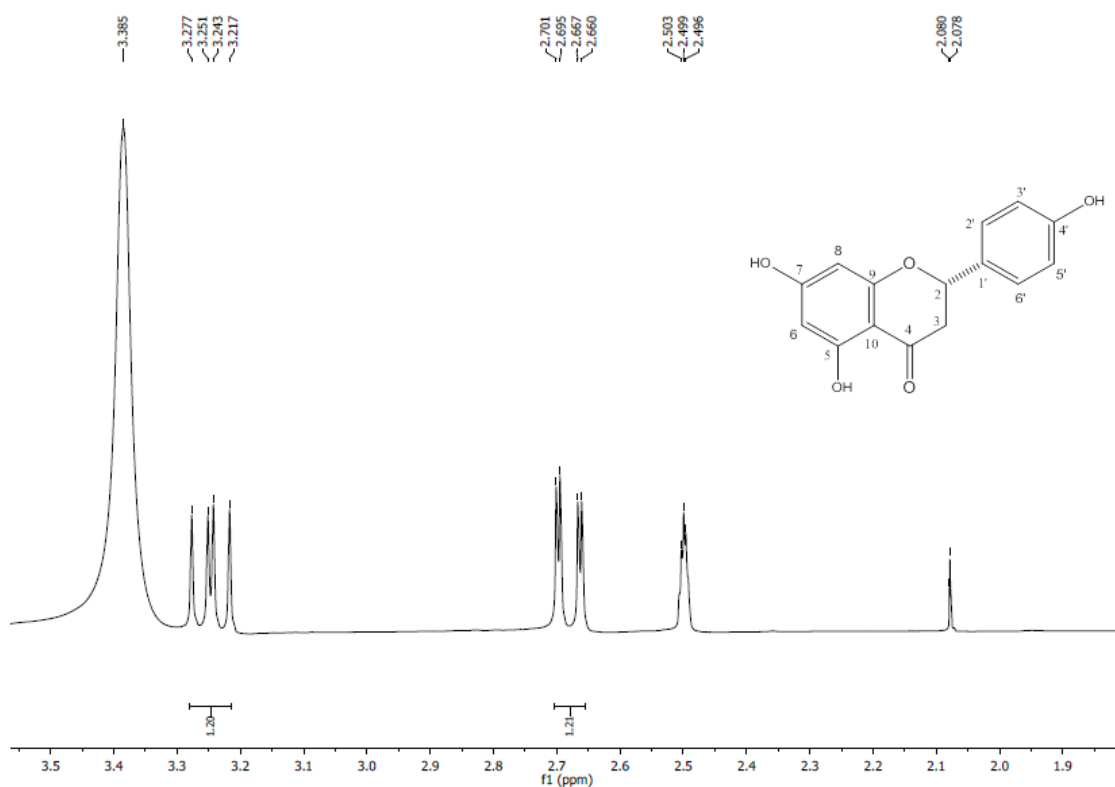


Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de **Hs-3** na região de 3,5-1,9 ppm.



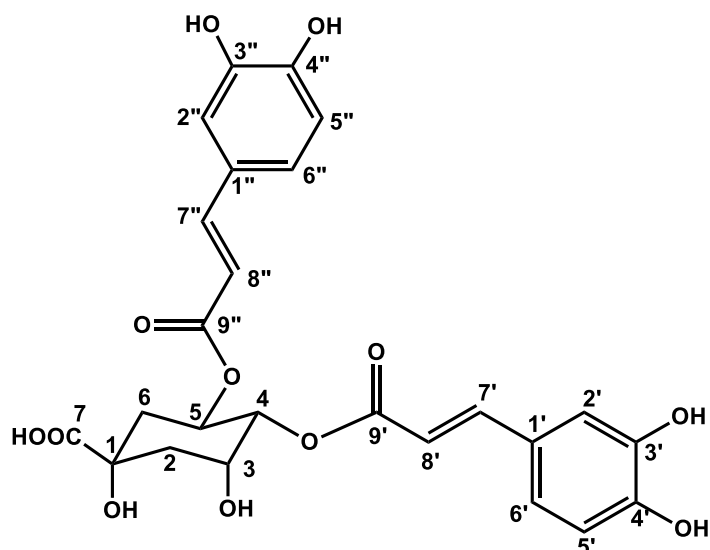
5.4 Determinação estrutural de **Hs-4**

A substância codificada como **Hs-4** foi isolada na forma de um pó marrom com 0,0187 g.

No espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) (Figura 35, pág. 78) e suas expansões (Figuras 36, pág. 78; Figura 37, pág. 79; Figura 38, pág. 79) foi possível observar a presença de 21 sinais correspondentes a 25 átomos de carbonos. Destes, 10 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 13 a carbonos metínicos e 2 a carbonos metilênicos. Os deslocamentos químicos observados em δ_{C} 168,6, δ_{C} 149,5, δ_{C} 147,5, δ_{C} 146,8, δ_{C} 127,7, δ_{C} 123,0, δ_{C} 116,4, δ_{C} 115,1 e δ_{C} 114,8, majoritários, sempre aos pares, comparados com a literatura foram consistentes com duas unidades cafeóilas (MEIRA et al., 2008). Os deslocamentos químicos em δ_{C} 177,7, δ_{C} 76,8, δ_{C} 70,3, δ_{C} 69,4, δ_{C} 40,4 e δ_{C} 38,7 foram compatíveis com a unidade de ácido quínico. Assim, após essa análise foi possível determinar **Hs-4** como sendo um derivado di-cafeoil do ácido quínico (Tabela 9, pág. 77).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 39, pág. 80) e suas expansões (Figuras 40, pág. 80; Figura 41, pág. 81; Figura 42, pág. 81) mostraram sinais para quatro dubletos em δ_{H} 6,19, δ_{H} 6,29, δ_{H} 7,51 e δ_{H} 7,59 característicos de hidrogênios olefínicos em configuração *trans* ($J = 16,0$ Hz). Observou-se também sinais em δ_{H} 6,98 (d, $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 6,74 (d, $J = 8,0$ Hz) e δ_{H} 6,89 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz) bem como δ_{H} 7,00 (d, $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 6,73 (d, $J = 8,0$ Hz) e δ_{H} 6,88 (dd, $J = 2,0$ e $8,0$ Hz), o que corrobora com dois sistemas AMX, indicando a presença de dois anéis aromáticos 1,3,4 trissubstituídos. Nesse mesmo espectro observou-se ainda, um multipletto entre δ_{H} 2,1-2,2, atribuído aos hidrogênios metilênicos do ácido quínico. Observou-se também sinais em δ_{H} 5,68 (ddd, $J = 5,5, 7,8$ e $8,1$ Hz) e δ_{H} 5,10 (dd, $J = 3,0$ e 10 Hz) sinais desprotegidos que corroboram com a di-esterificação da unidade de ácido quínico. Esses dados quando comparados com a literatura (BATISTA et al., 2014) foram consistentes com a di-esterificação nas posições C-4 e C-5 e foram atribuídos a H-5 e H-4, respectivamente e o sinal em δ_{H} 4,33 (m) foi atribuído a H-3. Os demais deslocamentos estão na (Tabela 9, Pág. 77). Assim, o composto majoritário presente em **Hs-4** foi determinado como sendo o ácido 4,5-di-O-E-cafeoil-quínico (Figura 33, pág. 76), relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Figura 33. Estrutura do ácido 4,5-di-*O-E*-cafeoil-quinico.



No espectro de RMN de ^1H foi possível observar sinais em menor intensidade, porém com o mesmo padrão de deslocamento químico para **Hs-4** com algumas diferenças a se destacar: δ_{H} em 5,46 (m), δ_{H} 5,40 (dd) e δ_{H} 3,94 (dd). Esses deslocamentos químicos comparados com a literatura fortalece tratar-se de um derivado do ácido cafeoil quinico, agora com a di-esterificação nas posições 3 e 5, onde os sinais em δ_{H} 5,46, δ_{H} 5,40 e δ_{H} 3,94 foram atribuídos a H-5, H-3 e H-4. Assim o composto em menor quantidade trata-se do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil-quinico (Figura 34, pág. 76), relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*. Os demais dados de RMN de ^1H são mostrados abaixo. (Tabela 9, Pág. 77).

Figura 34. Estrutura do ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoil-quinico.

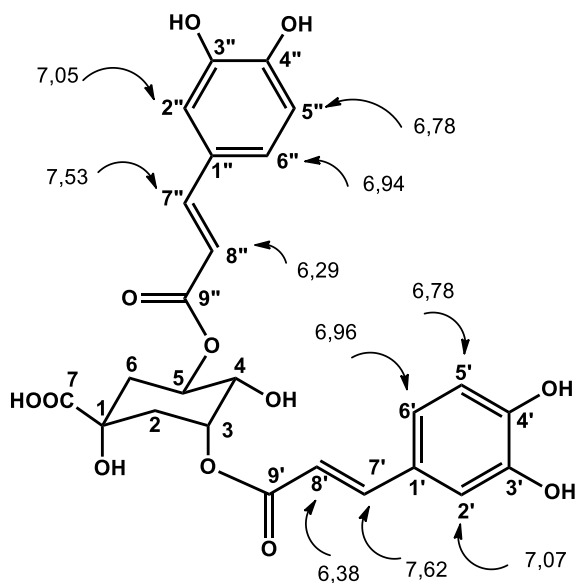


Tabela 9. Dados de RMN de **Hs-4** em CD₃OD a 500 MHz (*J* em Hz, δ em ppm).

C	Hs-4		BATISTA et al., 2014	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	---	75,7	---	76,2
2	2,2-2,02 (m)	38,7	2,35-2,05 (m)	39,4
3	4,33 (m)	69,4	4,36 (ddd)	69,3
4	5,10 (dd, <i>J</i> = 3,0 e 10,0)	76,8	5,11 (dd, <i>J</i> = 3,0 e 9,1)	75,8
5	5,68 (ddd, <i>J</i> = 5,5, 7,8 e 8,1)	69,0	5,61 (ddd, <i>J</i> = 5,3, 9,1 e 9,1)	69,1
6	2,2-2,02 (m)	40,4	2,35-2,05 (m)	38,4
7	---	177,7	---	177,7
1'	---	127,6	---	127,7
2'	6,98 (d, <i>J</i> = 2,0)	114,8	7,00 (d, <i>J</i> = 2,1)	115,1
3'	---	149,4	---	149,6
4'	---	149,5	---	147,3
5'	6,74 (d, <i>J</i> = 8,0)	116,4	6,73 (d, <i>J</i> = 8,1)	116,5
6'	6,89 (dd, <i>J</i> = 8,0 e 2,0)	123,0	6,90 (dd, <i>J</i> = 8,1 e 2,1)	123,2
7'	7,51 (d, <i>J</i> = 16,0)	147,0	7,51 (d, <i>J</i> = 15,9)	147,7
8'	6,27 (d, <i>J</i> = 16,0)	115,1	6,28 (d, <i>J</i> = 15,9)	115,1
9'	---	168,5	---	168,9
1''	---	127,7	---	127,8
2''	7,00 (d, <i>J</i> = 2,0)	115,1	7,02 (d, <i>J</i> = 2,1)	115,1
3''	---	149,8	---	149,5
4''	---	146,6	---	147,1
5''	6,73 (d, <i>J</i> = 8,0)	116,4	6,74 (d, <i>J</i> = 8,1)	116,5
6''	6,88 (dd, <i>J</i> = 8,0 e 2,0)	122,9	6,91 (dd, <i>J</i> = 8,1 e 2,1)	123,2
7''	7,59 (d, <i>J</i> = 16,0)	147,4	7,59 (d, <i>J</i> = 15,9)	147,7
8''	6,19 (d, <i>J</i> = 16,0)	114,8	6,18 (d, <i>J</i> = 15,9)	114,6
9''	---	168,6	---	168,5

* Dados obtidos a 300 MHz em CD₃OD

Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-4**.

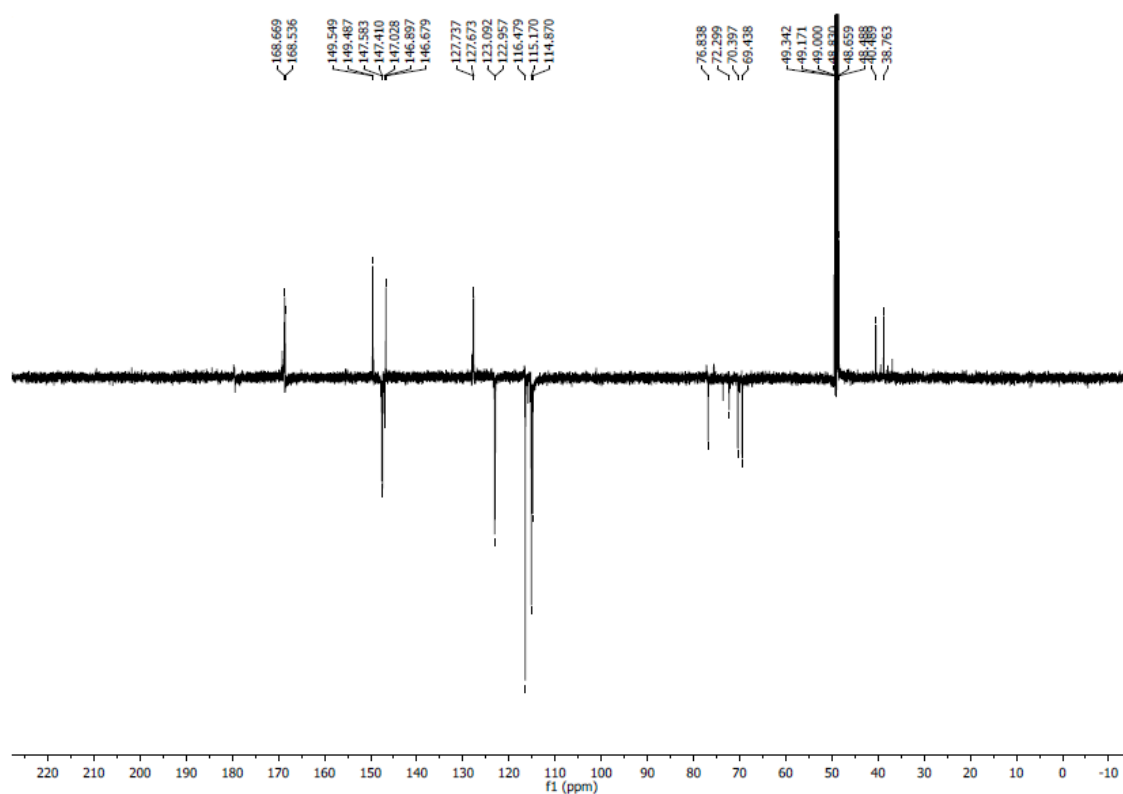


Figura 36. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-4** na região de 170-120 ppm.

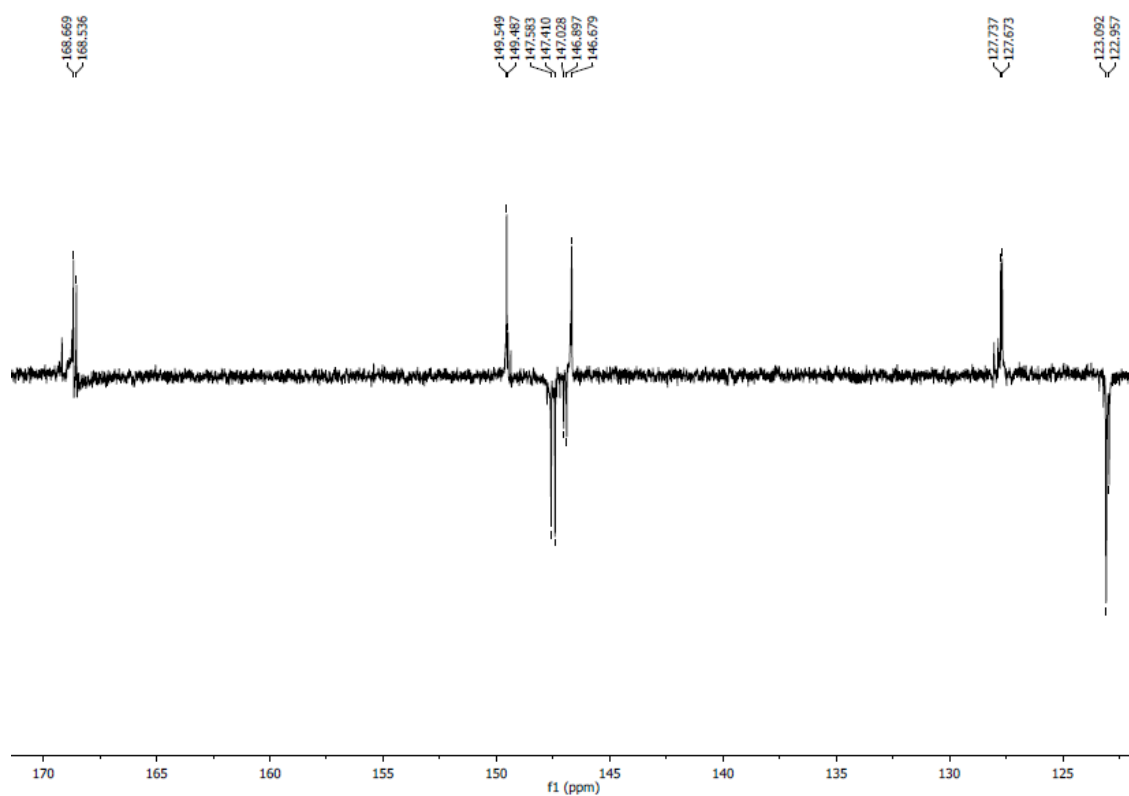


Figura 37. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-4** na região de 118-66 ppm.

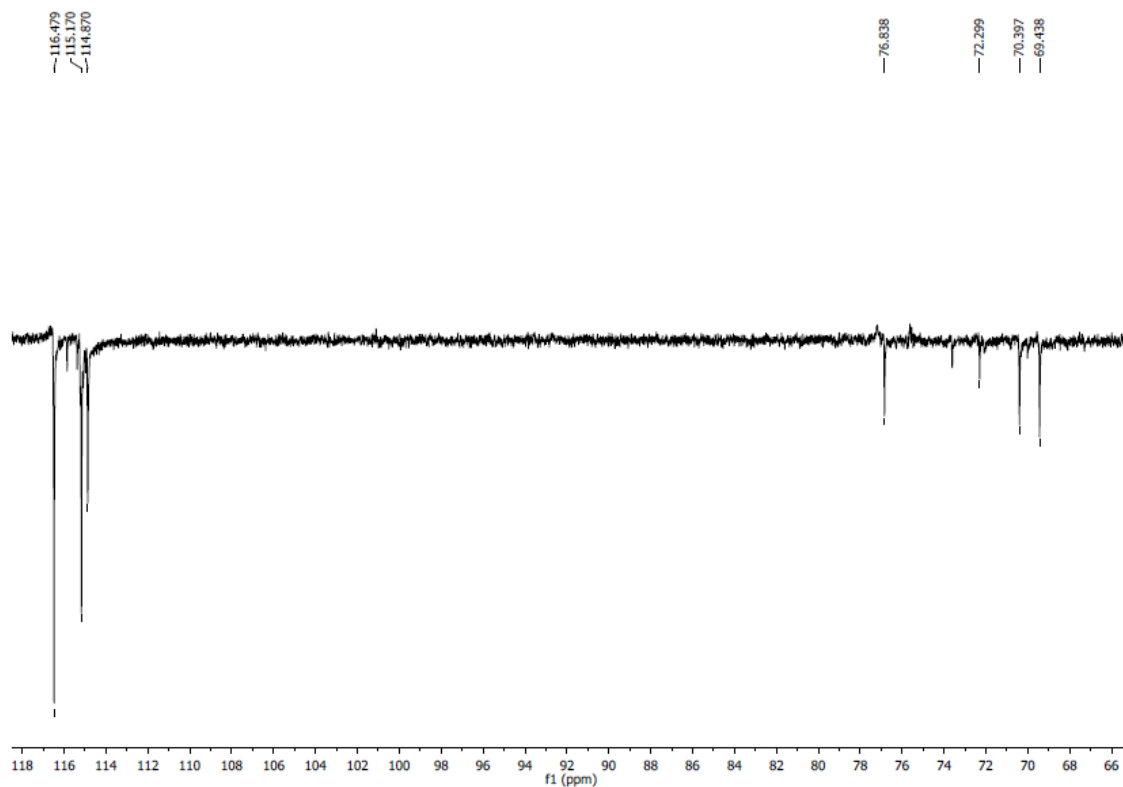


Figura 38. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3OD) de **Hs-4** na região de 58-6 ppm.

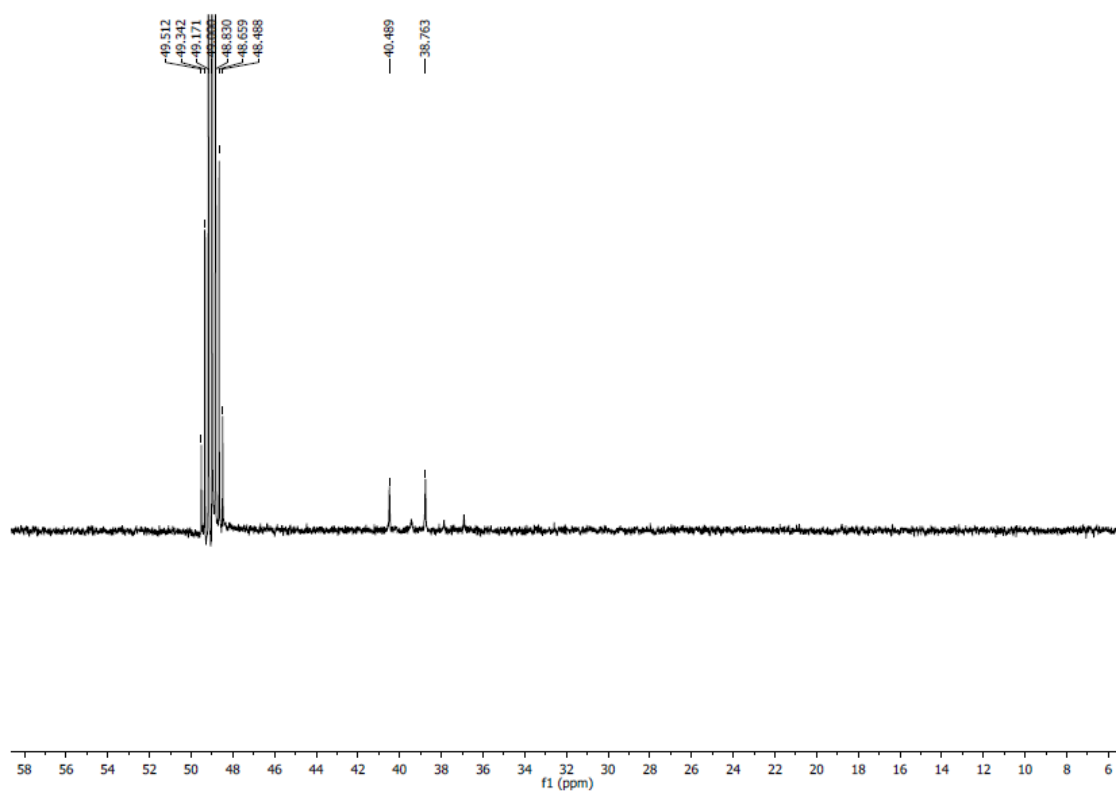


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-4**.

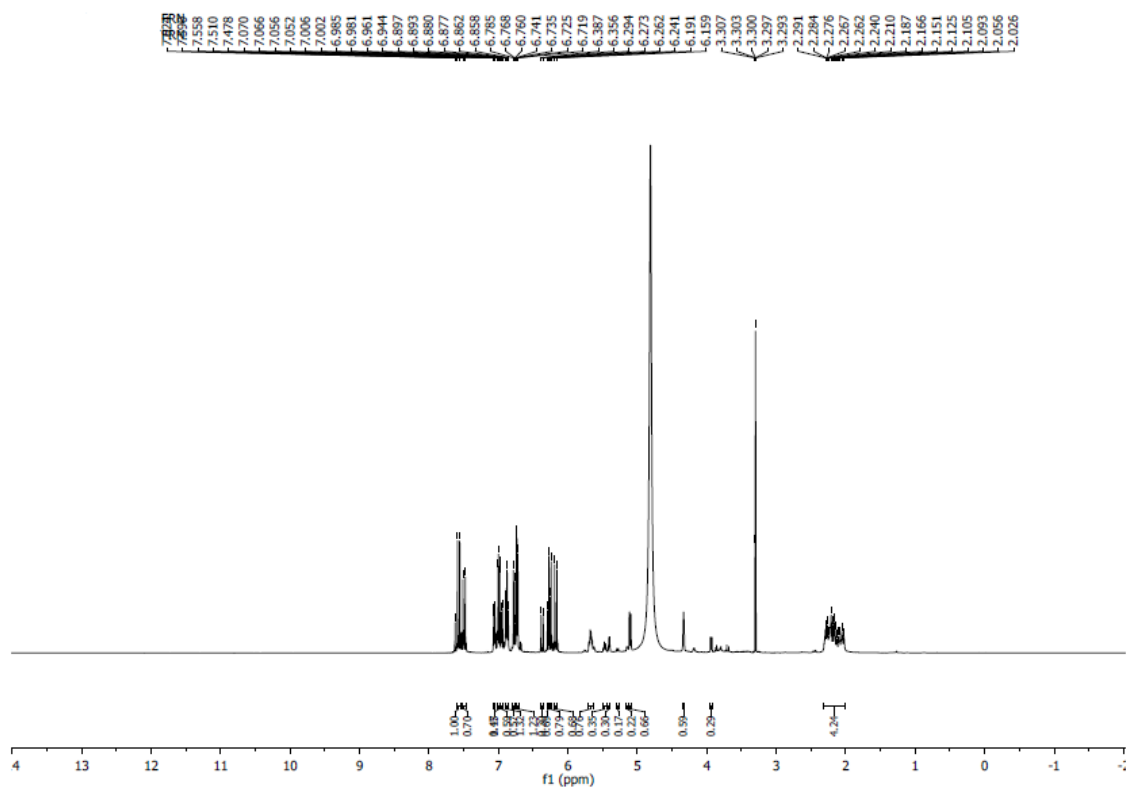


Figura 40. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-4** na região de 7,6-6,7 ppm.

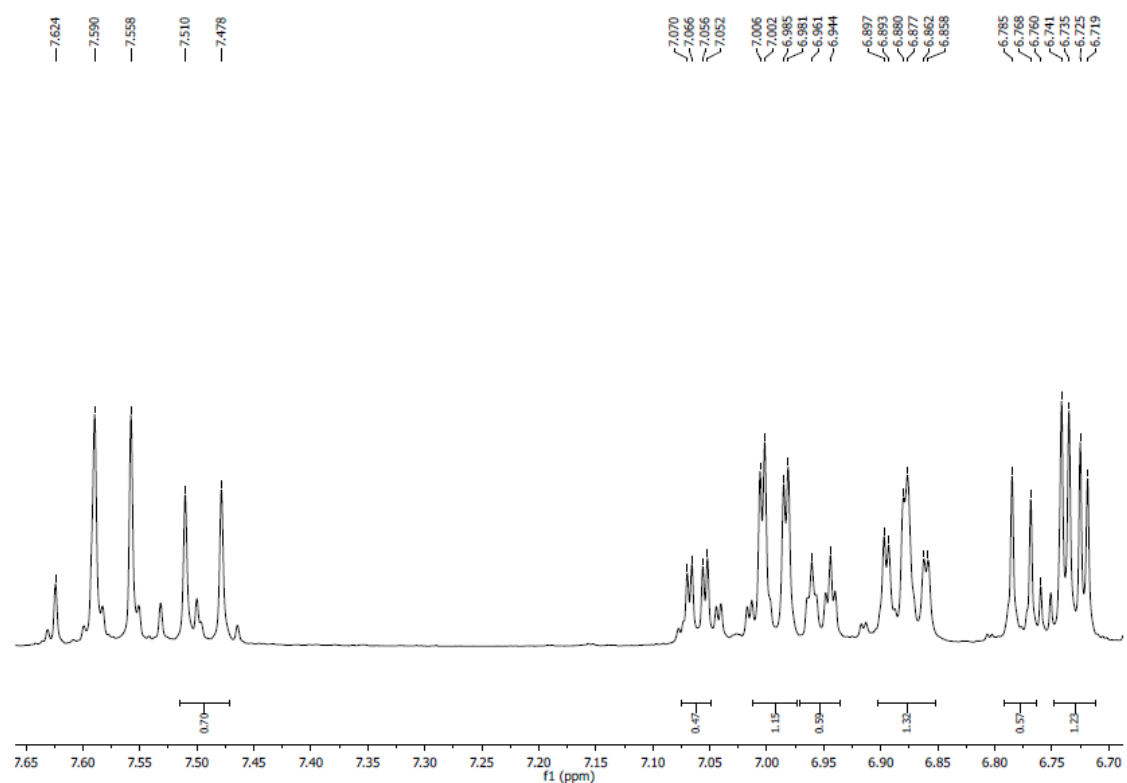


Figura 41. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-4** na região de 6,4-5,1 ppm.

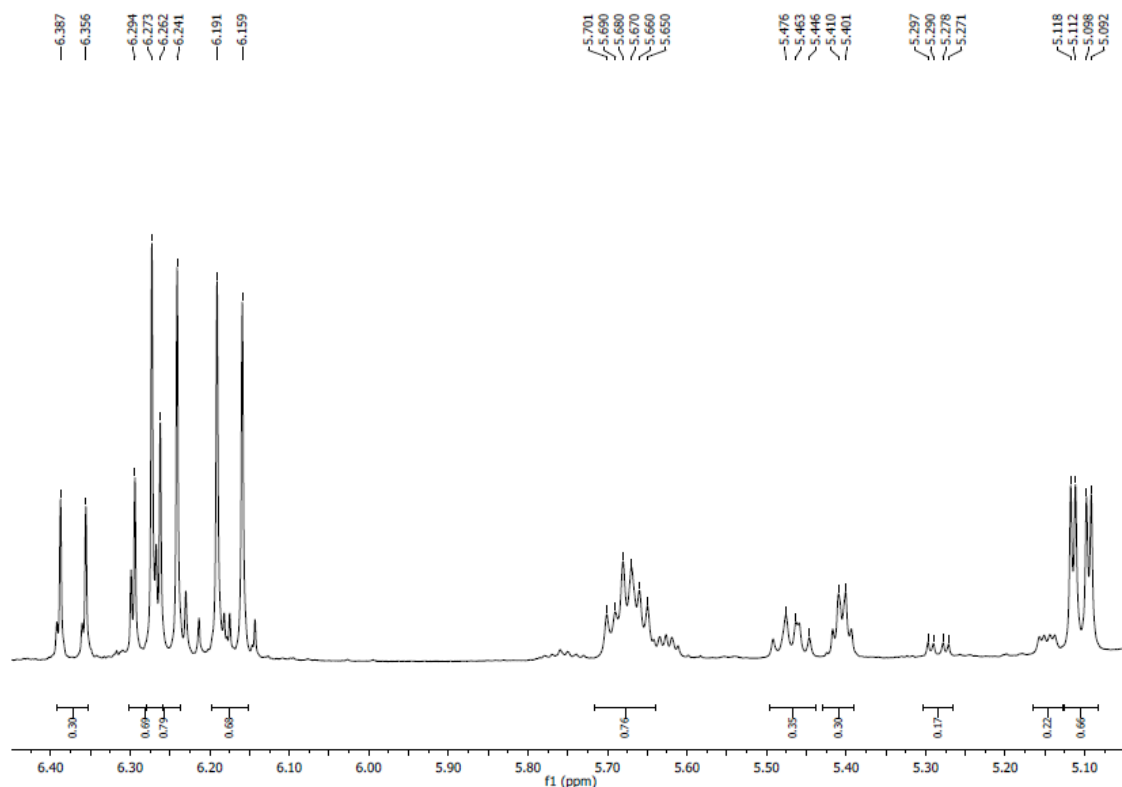
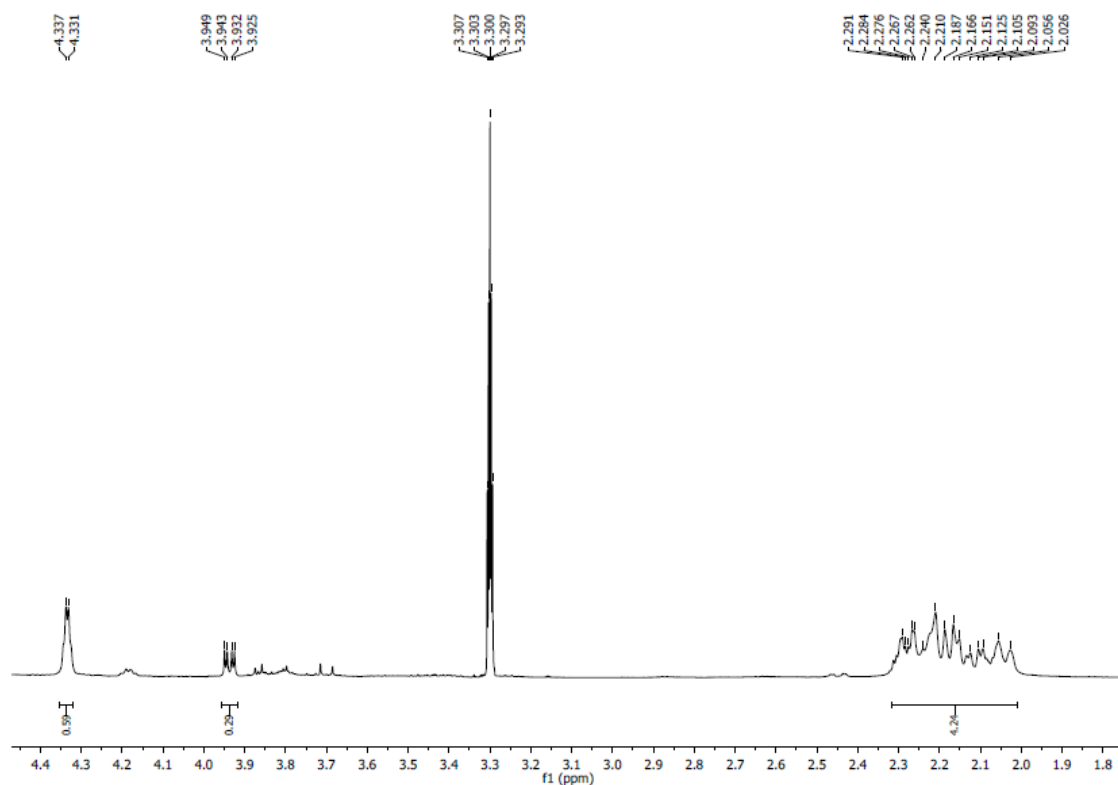


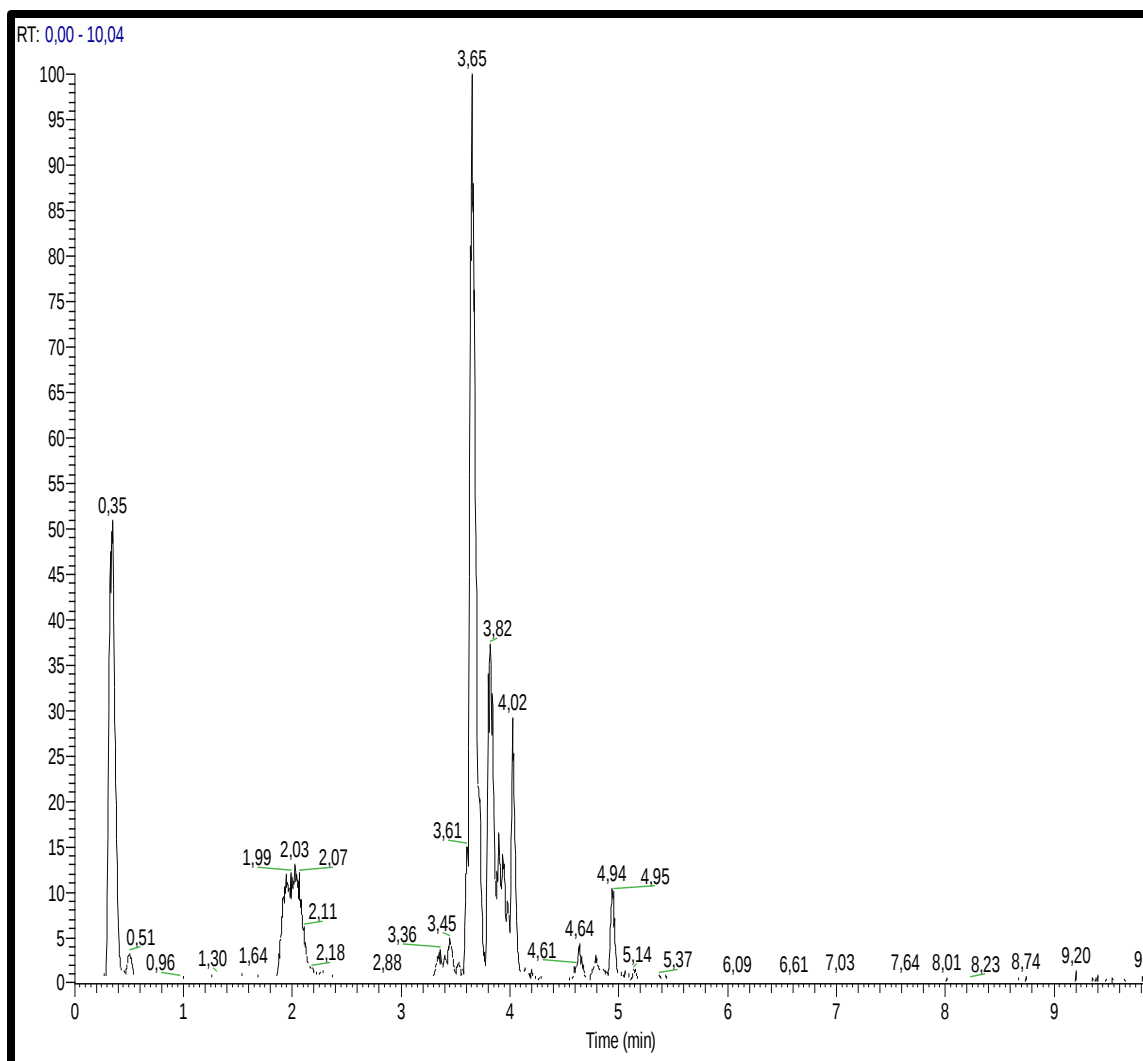
Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **Hs-4** na região de 4,4-1,8 ppm.



5.5 Caracterização de Constituintes Químicos do Extrato Hidro-Etanólico Bruto das folhas de *Hancornia speciosa* por UHPLC-MS/MS

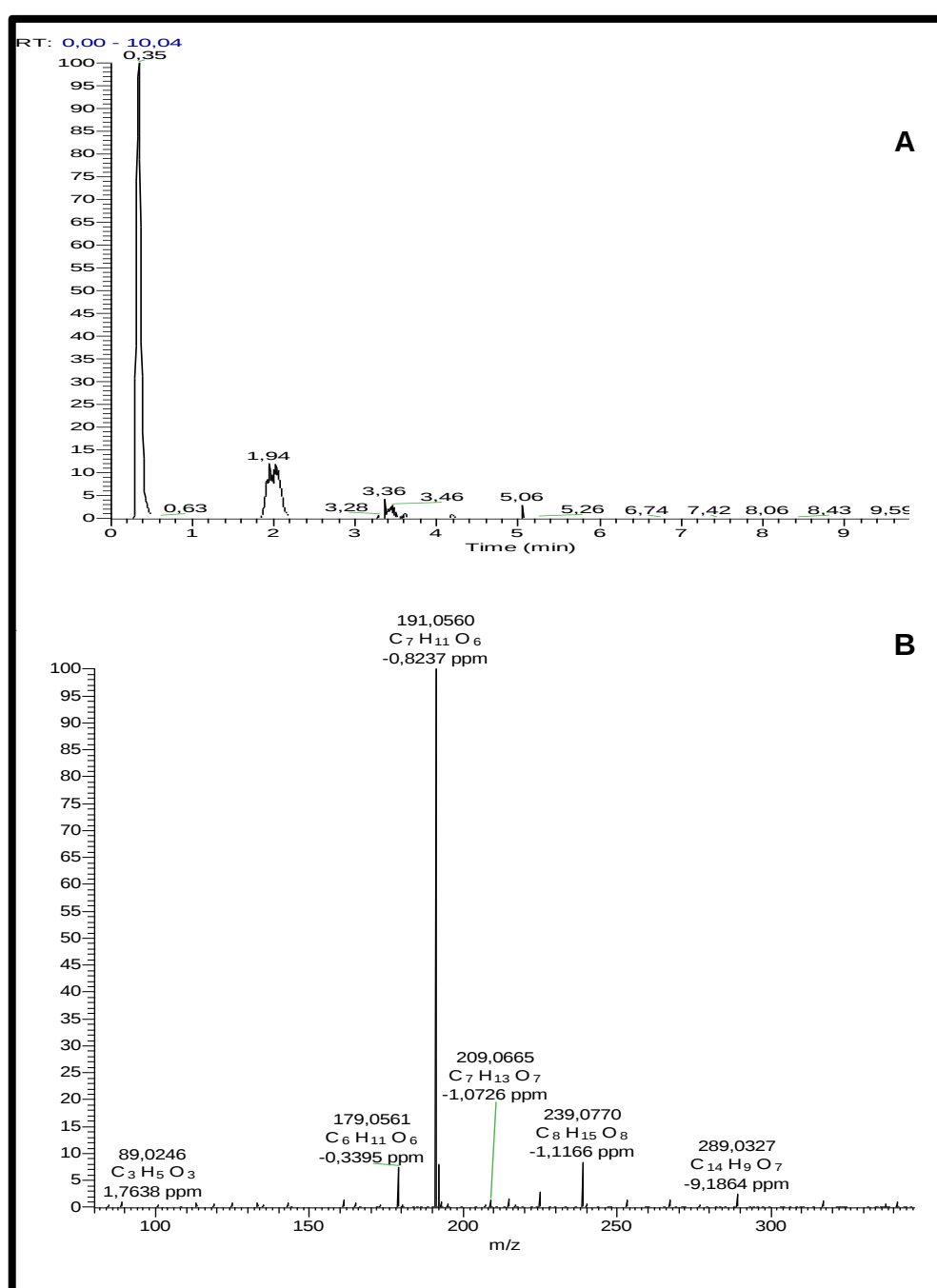
A caracterização dos constituintes químicos do extrato Hidro-etanólico de *Hancornia speciosa* foi feito por UHPLC/MS/MS. No Quadro 2 (pág. 82) é apresentado o cromatograma de íons totais obtido em alta resolução no modo Ionização por Eletrospray Negativo (ESI⁻). Os compostos foram identificados através de co-injeções com amostras padrões ou com base nos padrões de fragmentos obtidos comparados com dados da literatura. Assim, foi possível sugerir a estrutura de 24 compostos.

Quadro 2. Cromatograma de íons totais obtido por ESI no modo negativo.

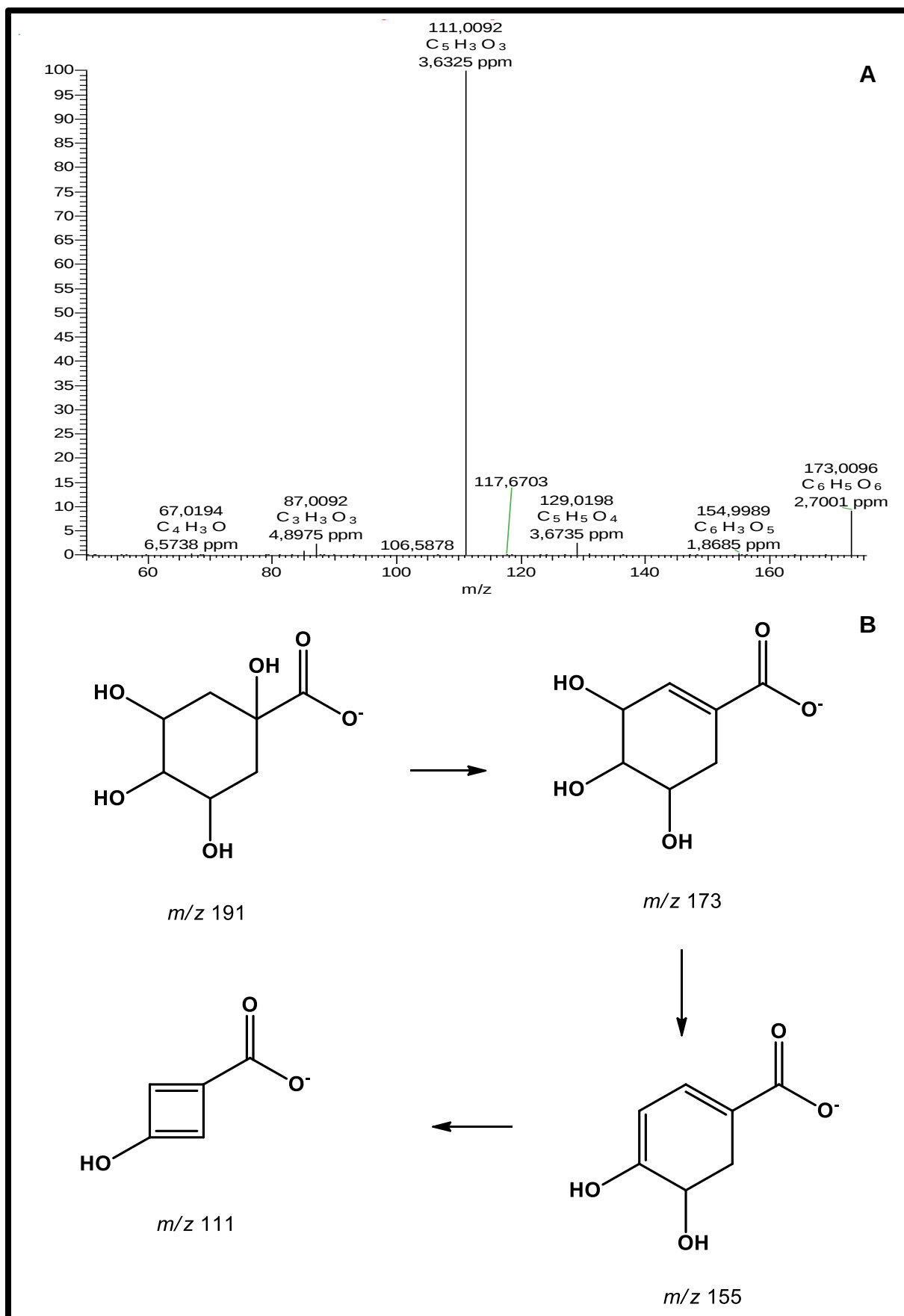


O composto **1** em Tr 0,35 foi identificado com base no íon obtido $[M-H]^-$ em m/z 191,0560 (Quadro 3, pág.83). Pesquisas na literatura remetem essa massa exata para a estrutura do ácido quínico (SANTOS et al.,2013). Os principais fragmentos gerados a partir desse íon foram 173 m/z e 155 m/z correspondentes ao $M-H_2O$. O fragmento em **111** foi justificado por uma reação de Retro-Diels-Alder a partir do fragmento em 155 (Quadro 4, pág. 84). Esse composto já foi relatado para *Hancornia speciosa*.

Quadro 3. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 0,35 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).

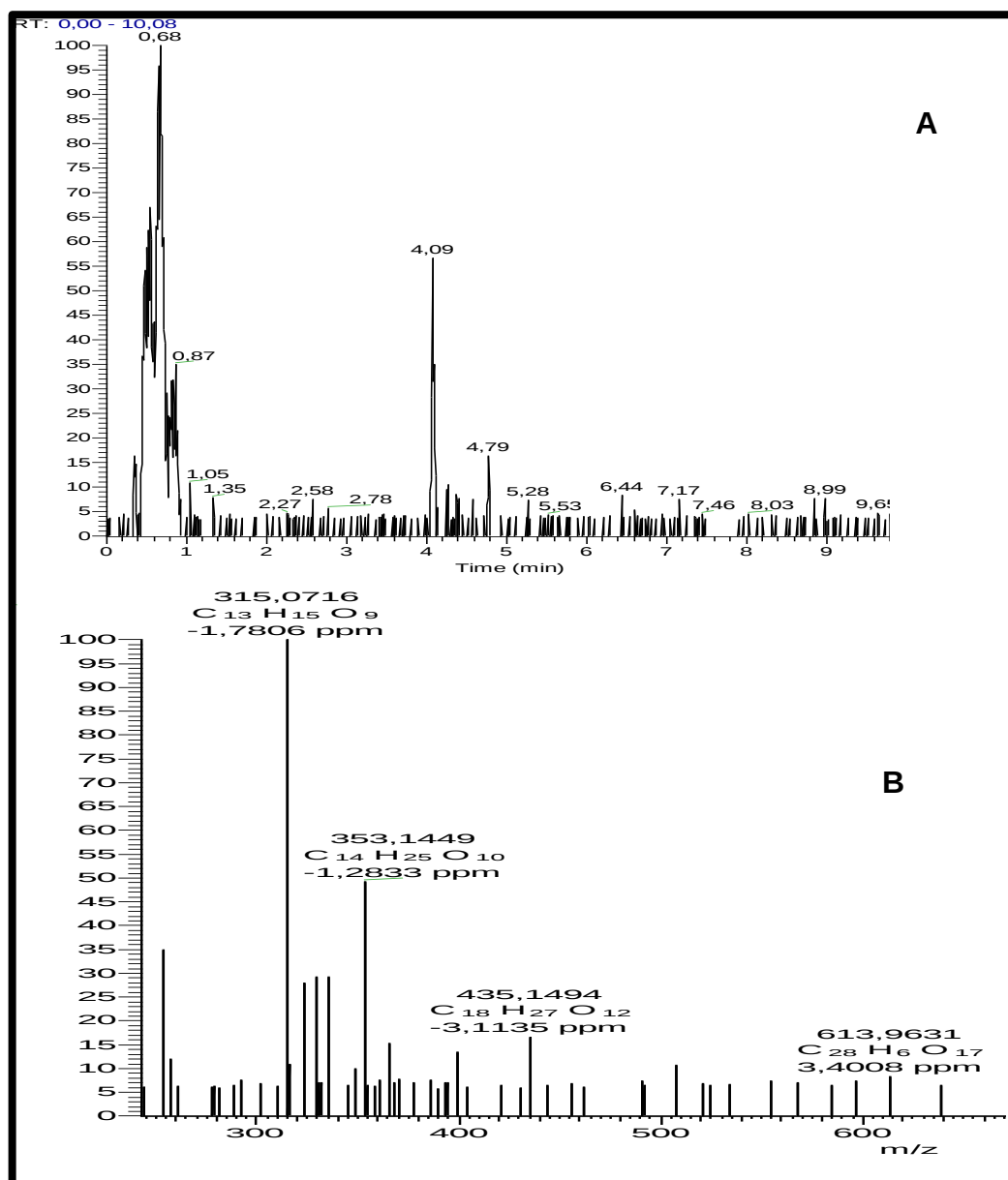


Quadro 4. Fragmentos a partir do íon em m/z 191,0560 (A), Proposta de fragmentação (B).

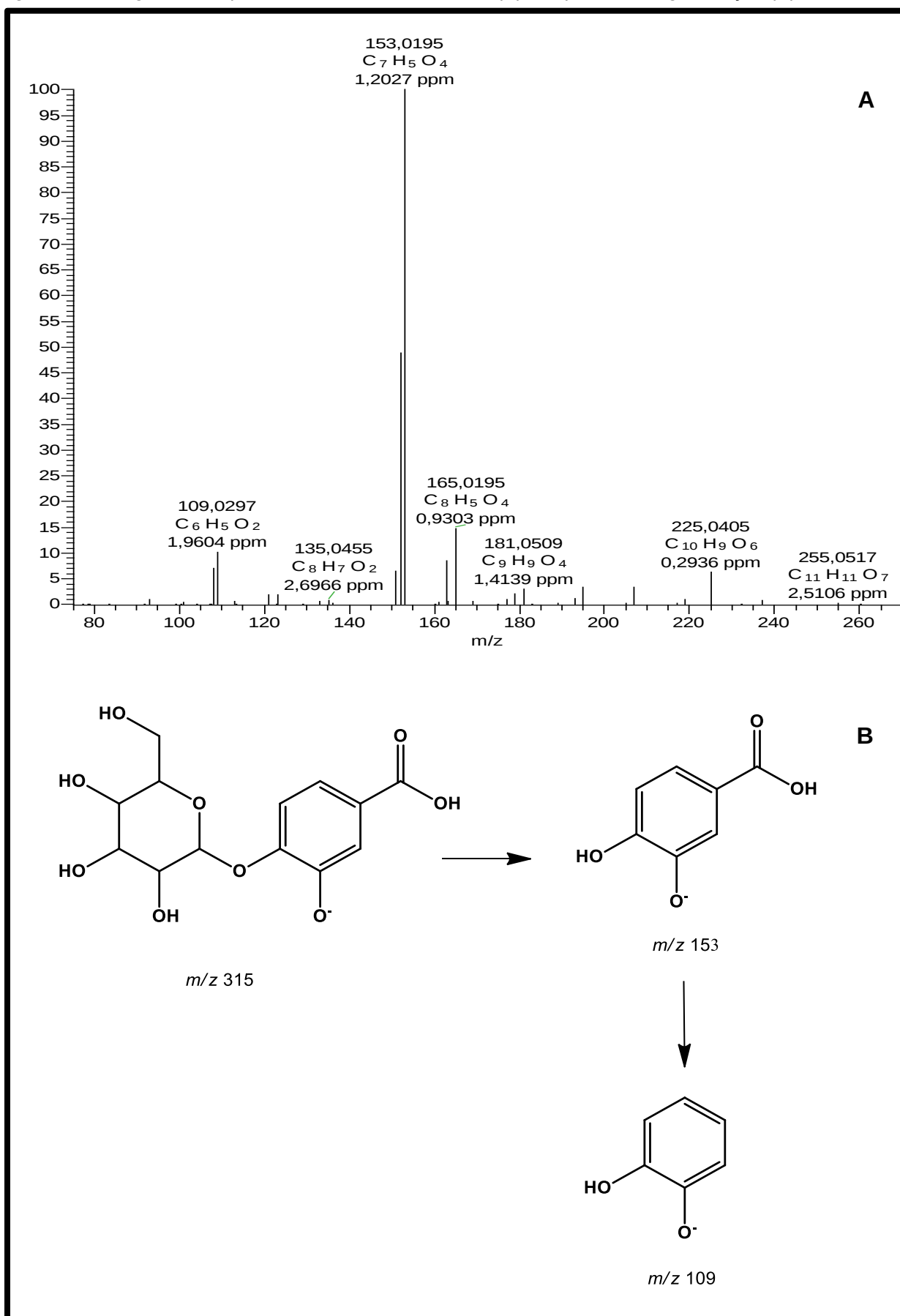


O composto **2** em Tr 0,68 min apresentou um espectro de massa com o pico do $[M-H]^-$ em m/z 315,0716 (Quadro 5, pág. 85). Pesquisas em banco de massas mostraram esses dados consistentes com a estrutura do ácido protocatecuico glicosídeo. Essa sugestão foi reforçada com a análise dos fragmentos formados a partir desse íon em m/z 153, originado a partir de uma hidrólise perdendo a unidade osídica, em 109 oriundo a partir do fragmento 153 perdendo uma unidade de CO_2 (Quadro 6, pág. 86) que corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (CÁDIZ-GURREA et al., 2013). Esse composto está sendo relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Quadro 5. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 0,68 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).

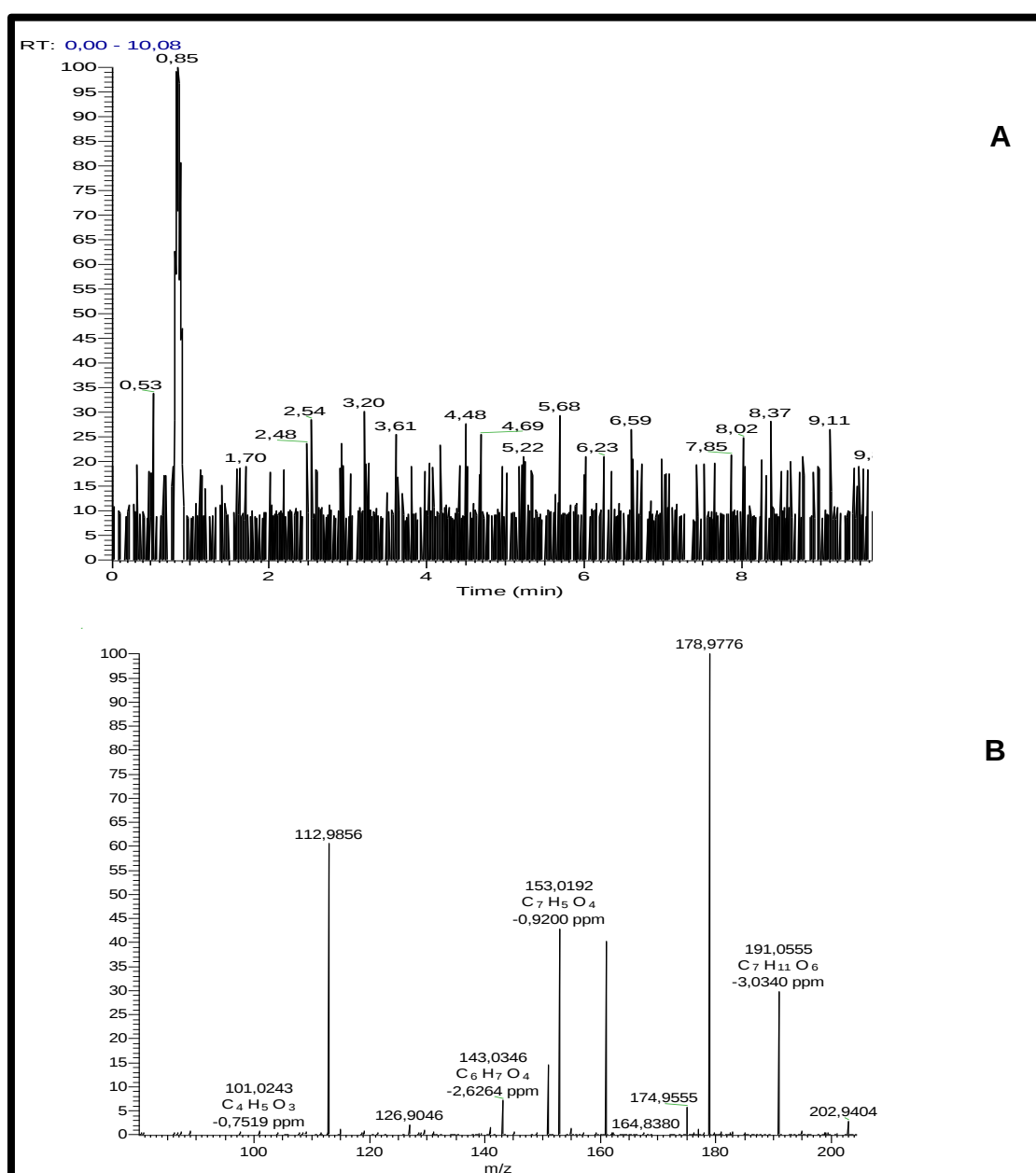


Quadro 6. Fragmentos a partir do íon em m/z 315,0716 (A), Proposta de fragmentação (B).

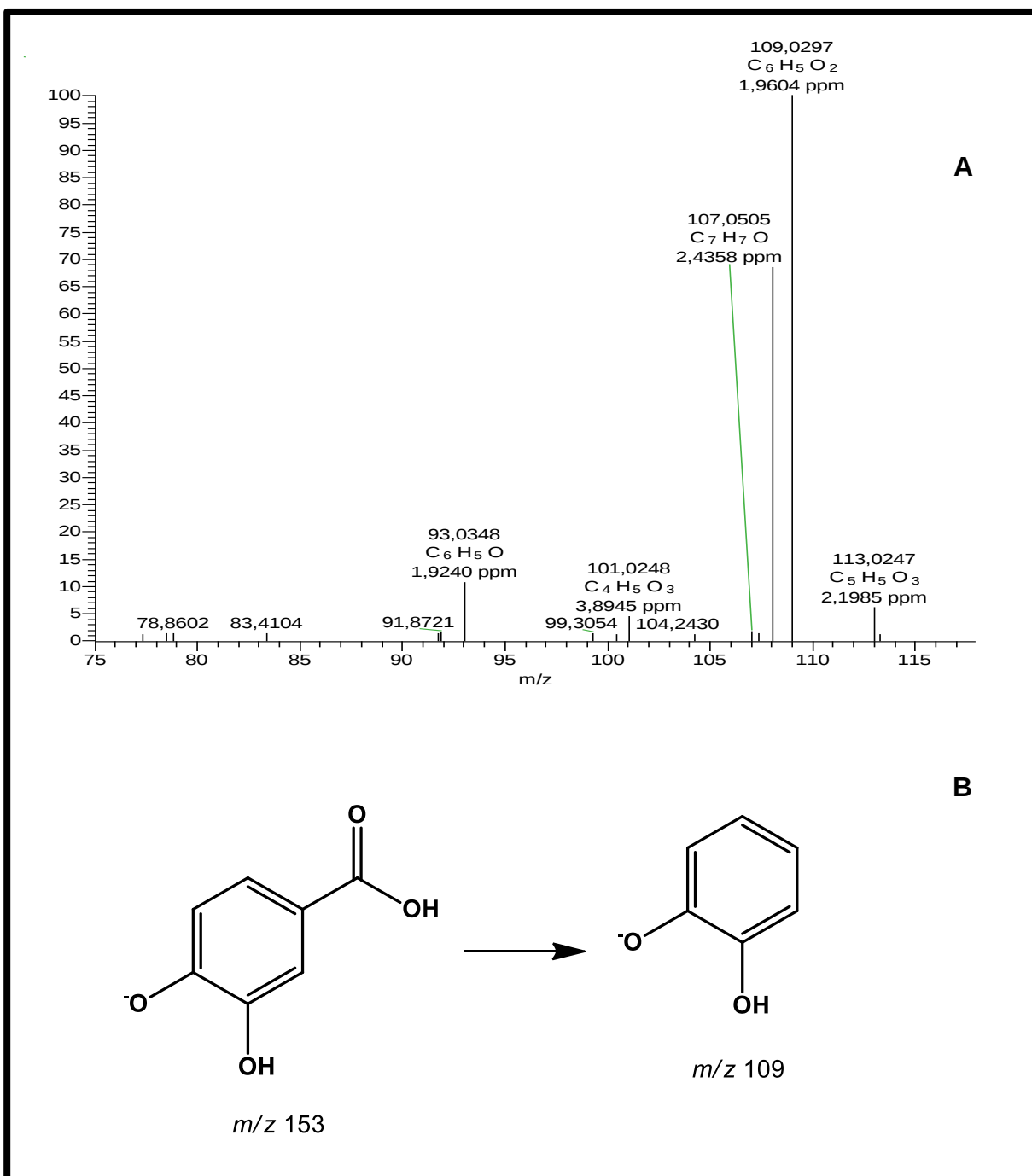


O composto **3** em Tr 0,85 min apresentou um espectro de massa com o pico $[M-H]^-$ em m/z 153,0193 (Quadro 7, pág. 87) consistente com a estrutura do ácido protocatecuico. Essa sugestão foi reforçada através da análise por co-injeção da amostra padrão desse composto. O fragmento formado a partir desse ion em m/z 109 (Quadro 8, pág. 88) corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (SANTOS et al., 2013). Esse composto está sendo relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Quadro 7. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 0,85 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).



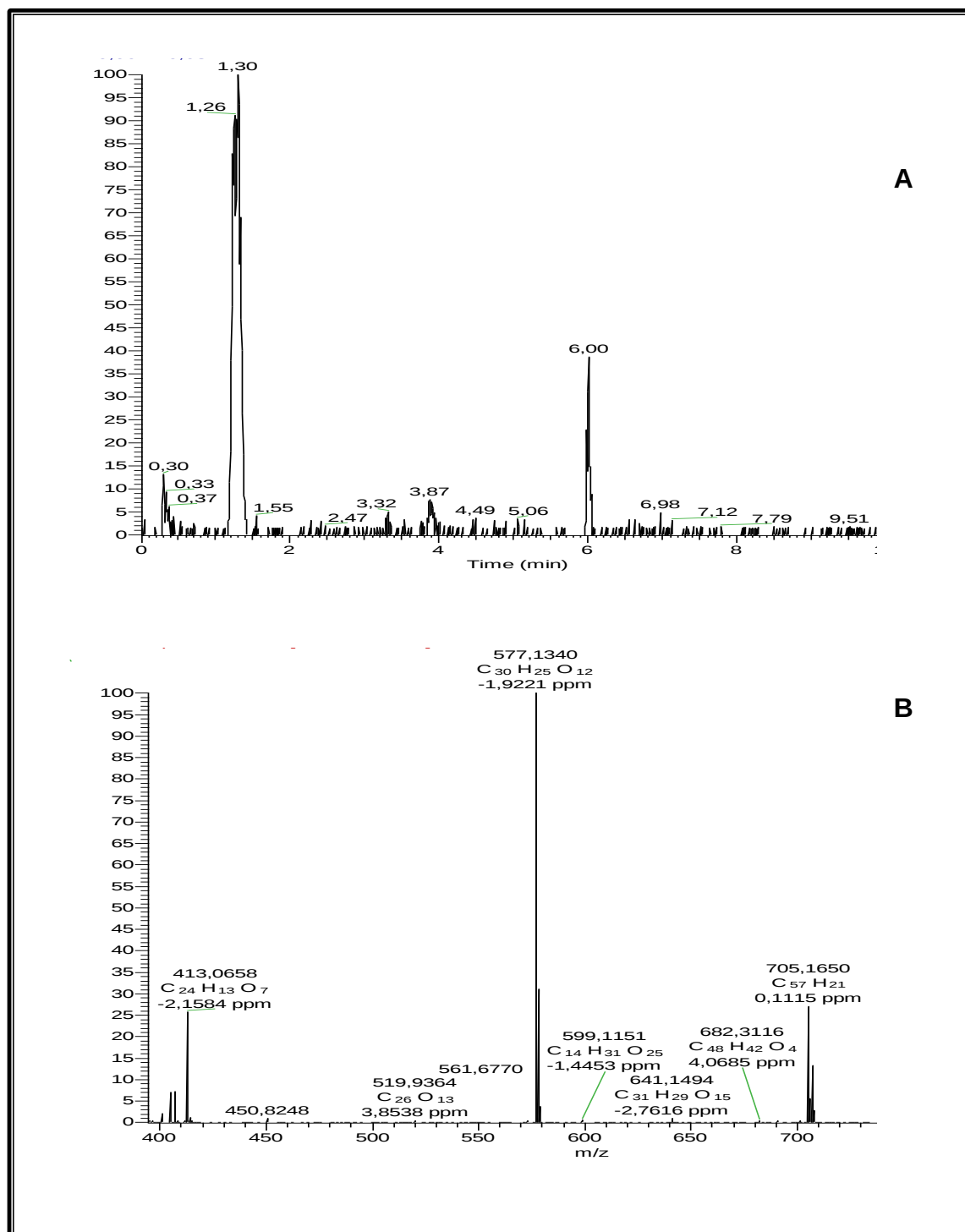
Quadro 8. Fragmentos a partir do íon em m/z 153,0193 (A), Proposta de fragmentação (B).



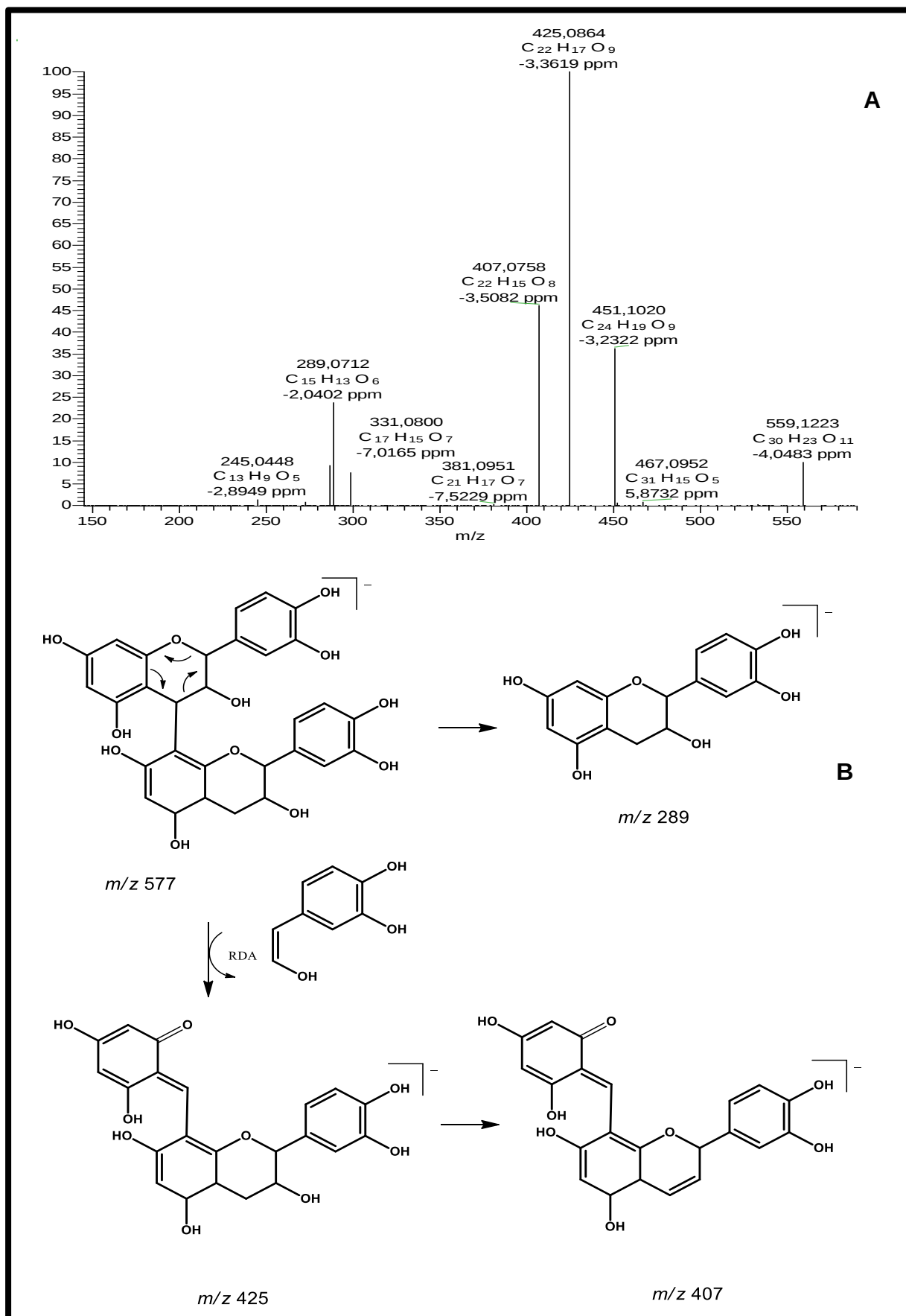
O Tr 1,30 min apresentou dois espectros com os íons moleculares diferentes. Um deles em m/z 343,1027 que não teve sua estrutura sugerida (composto **4**) e outro em m/z 577,1341 (Quadro 9, pág. 89), consistente com a estrutura do composto **5**, uma procianidina do tipo B. Essa sugestão foi reforçada com a co-injeção do padrão juntamente com os fragmentos em m/z 425 explicado a partir de uma reação de Retro Diels-Alder no anel C, 407, justificado a partir de uma

desidratação do fragmento em 425 e 289 que representa a unidade monomérica (Quadro 10, pág. 90). Esses dados corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (SANTOS et al., 2013). Esse composto já foi relatado para *Hancornia speciosa*.

Quadro 9. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 1,30 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).

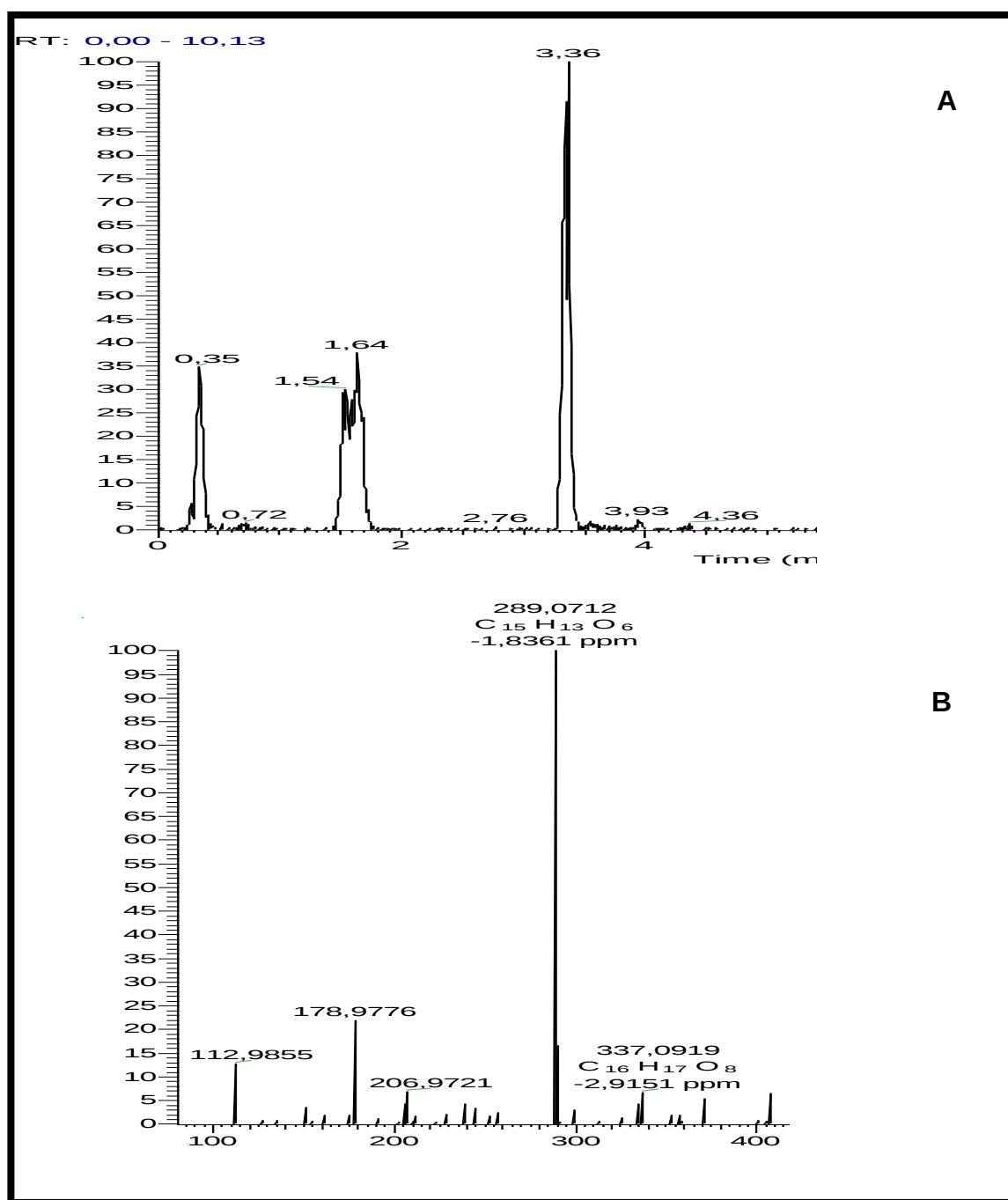


Quadro 10. Fragmentos a partir do íon em m/z 577,1340 (A), Proposta de fragmentação (B).

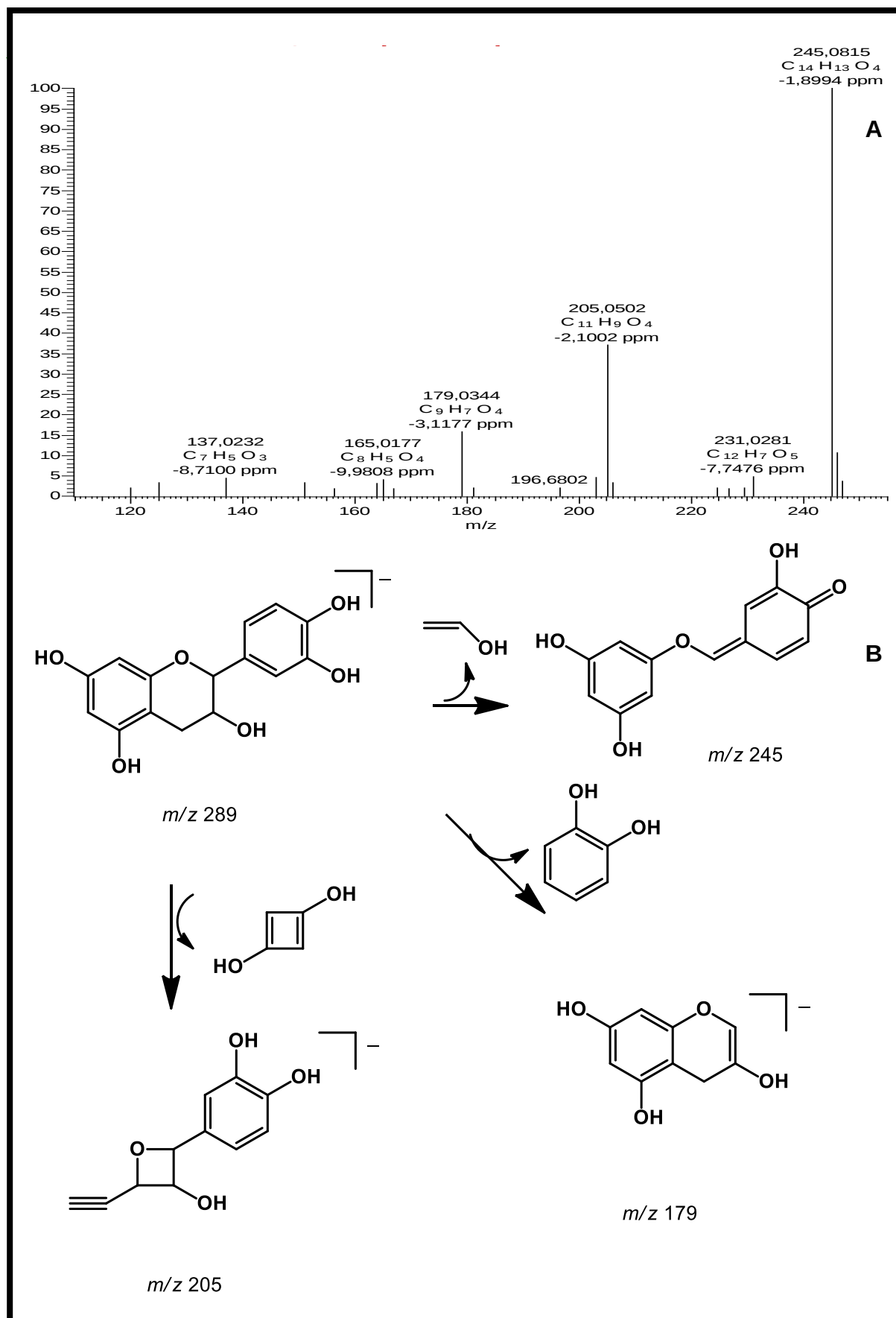


O tempo de retenção em 1,64 min (Quadro 11, pág. 91) apresentou o pico $[M-H]^-$ em m/z 289,0712. A identificação desse composto foi feita por co-injeção com padrões sugerindo que se tratava da Catequina (composto **6**) com os fragmentos em m/z 245 e m/z 205 oriundos a partir de uma fissão do anel heterocíclico e 179 originado a partir da perda de unidade catecol (Quadro 12, pág. 92).

Quadro 11. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 1,64 e 3,36 obtido no modo ESI negativo (**A**), Massa exata correspondente a esses picos (**B**).

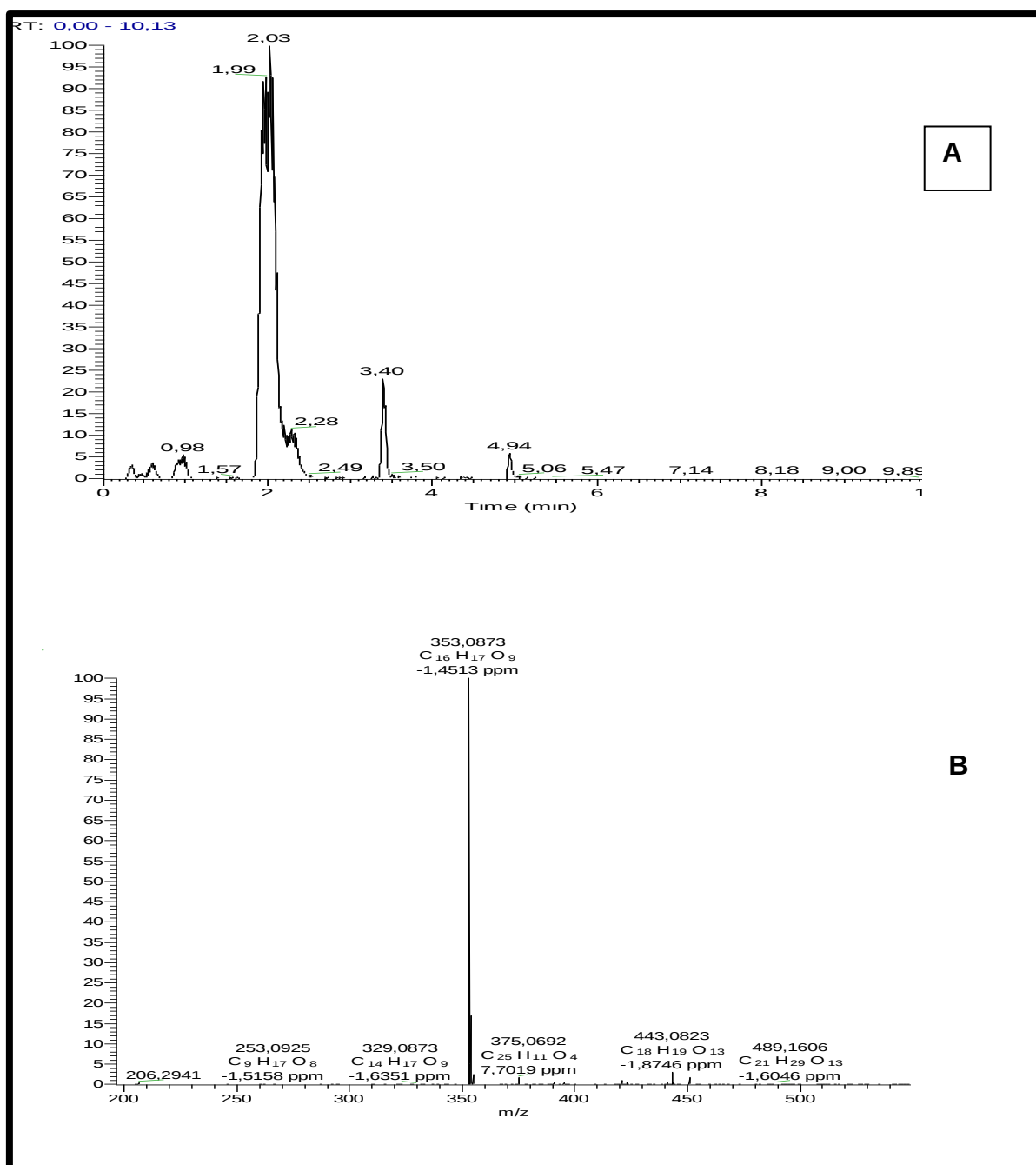


Quadro 12. Fragmentos a partir do íon em m/z 289,0712 (A), Proposta de fragmentação (B).

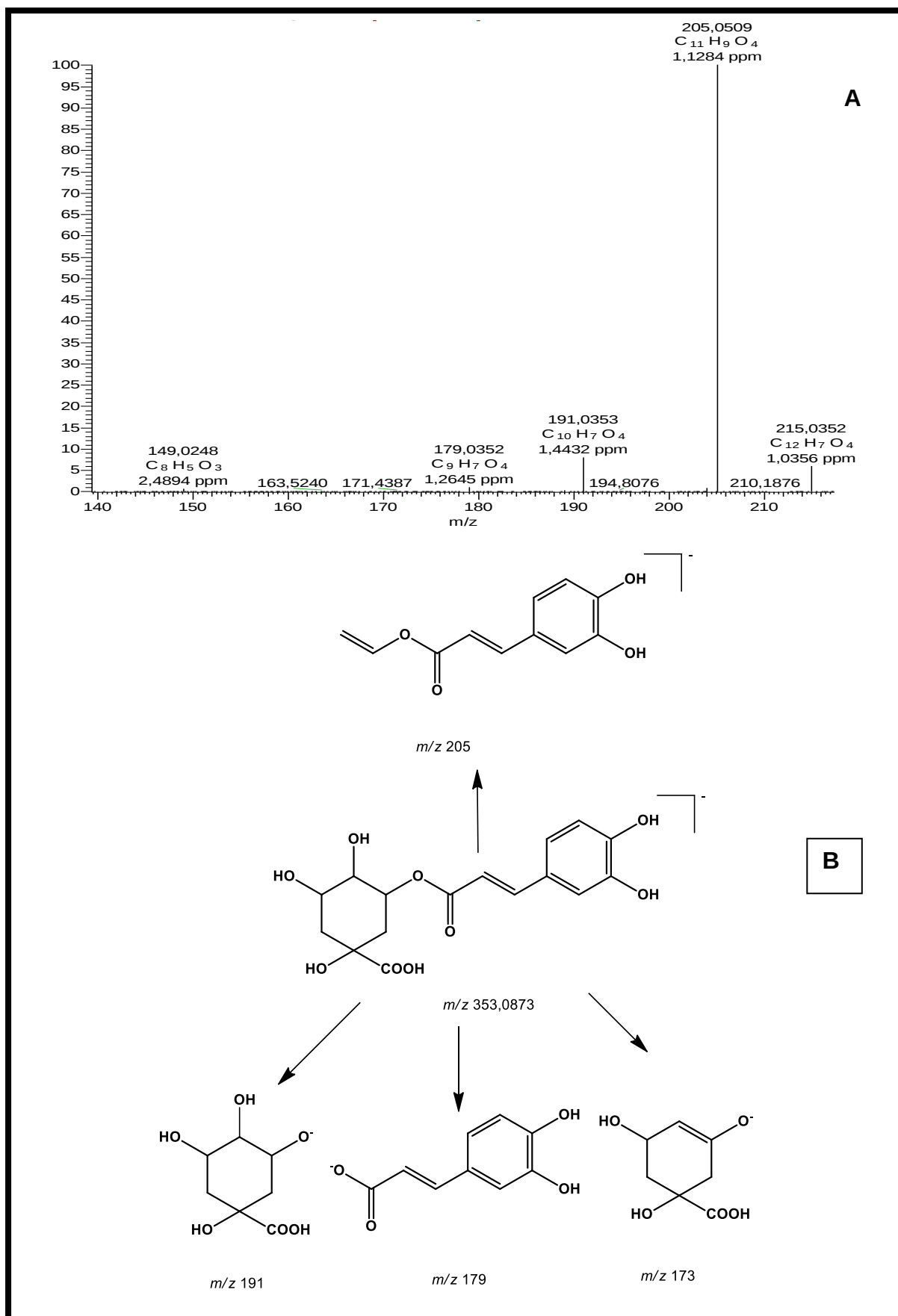


O tempo de retenção em 2,03 min apresentou o pico $[M-H]^-$ em m/z 353,0873. (Quadro 13, pág. 93). A identificação desse composto foi feita por co-injeção com padrões sugerindo que se tratava do ácido clorogênico (composto **7**), com fragmentos em m/z 205 originado a partir da cisão do anel, os fragmentos em m/z 191 e m/z 179 originado de cisão eletrolítica e m/z 173 originado de cisão eletrolítica seguida de desidratação. (Quadro 14, pág. 94).

Quadro 13. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 2,03 obtido no modo ESI negativo (**A**), Massa exata correspondente a esses picos (**B**).

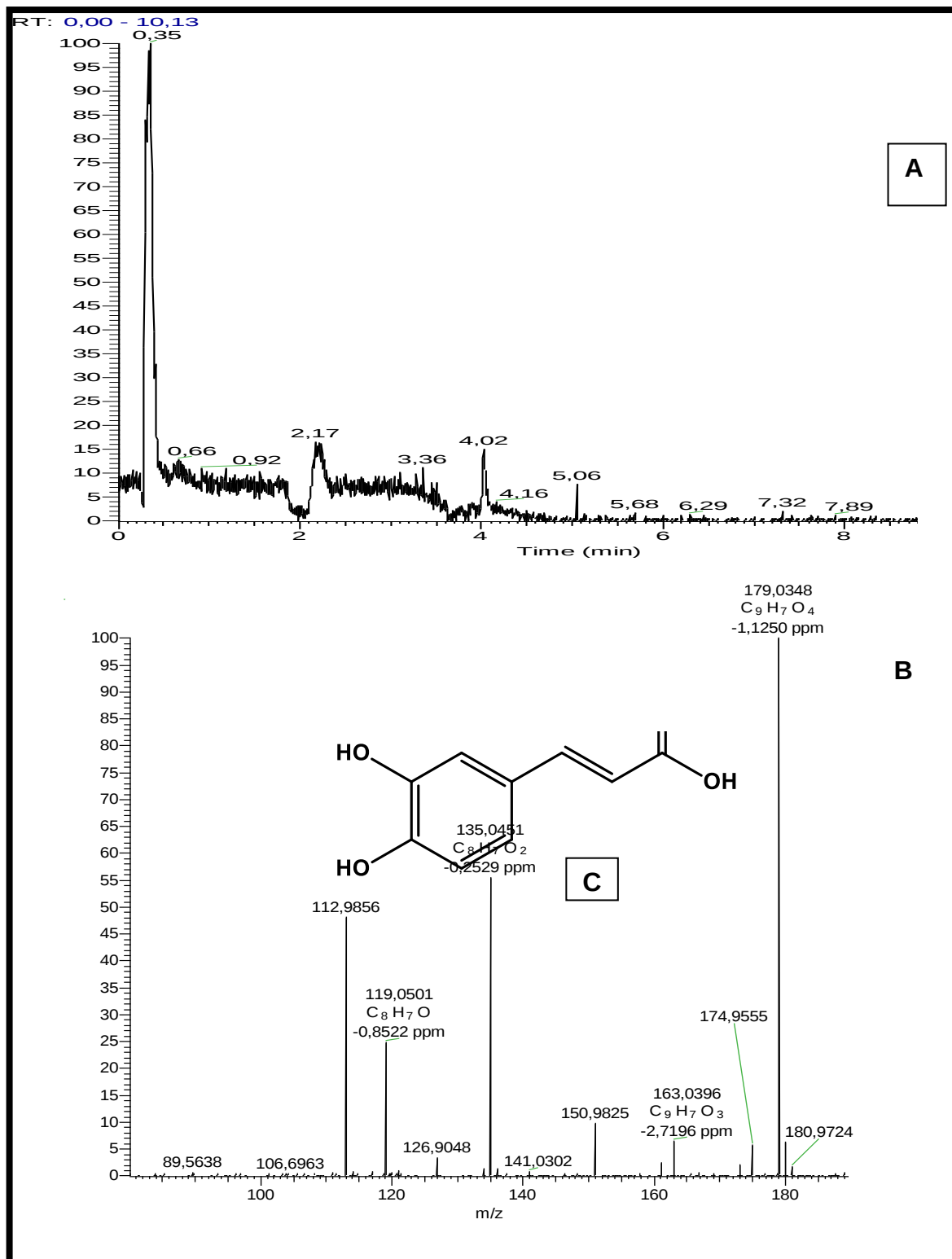


Quadro 14. Fragmento a partir do íon em m/z 353,0873 (A), Proposta de fragmentação (B).



O tempo de retenção em 2,17 min apresentou o pico $[M-H]^-$ em m/z 179,0348. (Quadro 15, pág. 95). A identificação desse composto foi feita por co-injeção com padrão e massa exata confirmando ser o ácido cafêico (composto **8**).

Quadro 15. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 2,17 obtido no modo ESI negativo (**A**), Massa exata correspondente a esses picos (**B**), ácido cafêico (**C**).



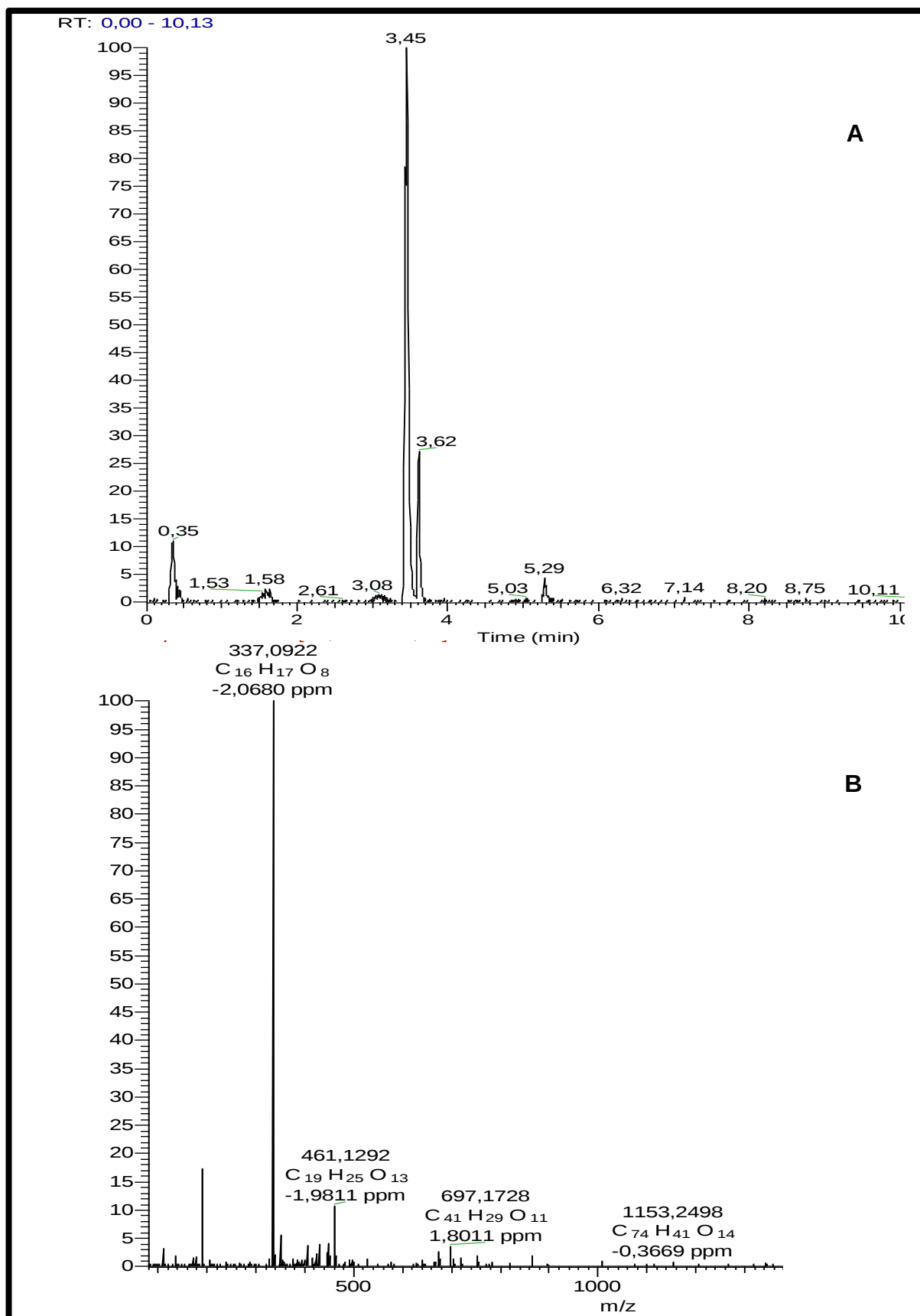
O pico com Tr em 2,88 mostrou o $[M-H]^-$ em m/z 577,1340 e com padrão de fragmentação semelhante ao pico com o Tr em 1,30, sugerindo também se tratar de uma procianidina do tipo B (composto **9**).

O pico com Tr em 3,36 mostrou o $[M-H]^-$ em m/z 289,0713 e por co-injeção foi identificado como sendo a epicatequina (composto **10**). O cromatograma já foi mostrado no Quadro 11 (pág. 91) e Quadro 12 (pág. 92), já que a catequina e epicatequina tem o mesmo padrão de fragmentação, porém com Tr diferentes e isso foi comprovado com a co-injeção dos padrões.

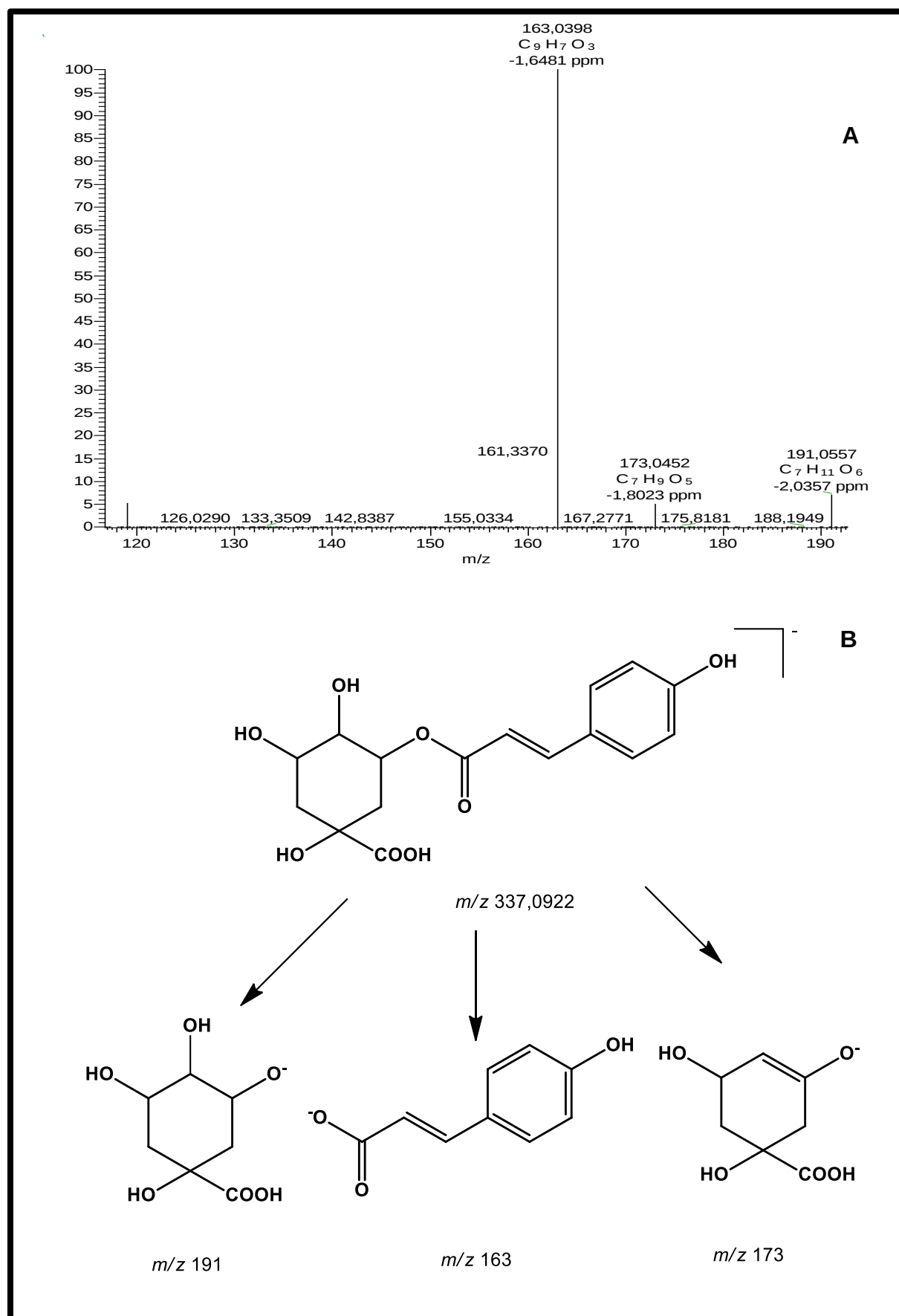
Os compostos de **6-10** já foram relatados para *Hancornia speciosa*.

O composto **11** em Tr 3,45 min apresentou um espectro de massa com o pico $[M-H]^-$ em m/z 337,0922 consistente com a estrutura do ácido cumaroilquínico (Quadro 16, pág. 97). Essa sugestão foi reforçada através da análise dos fragmentos em m/z 191 e 163 obtidos através de cisão heterolítica. O fragmento em 173 foi obtido por cisão heterolítica seguida de desidratação (Quadro 17, pág. 98). Esses dados corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (CHEN et. al, 2015). O composto 11 está sendo relatado pela primeira vez para *Hancornia speciosa*.

Quadro 16. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,45 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).

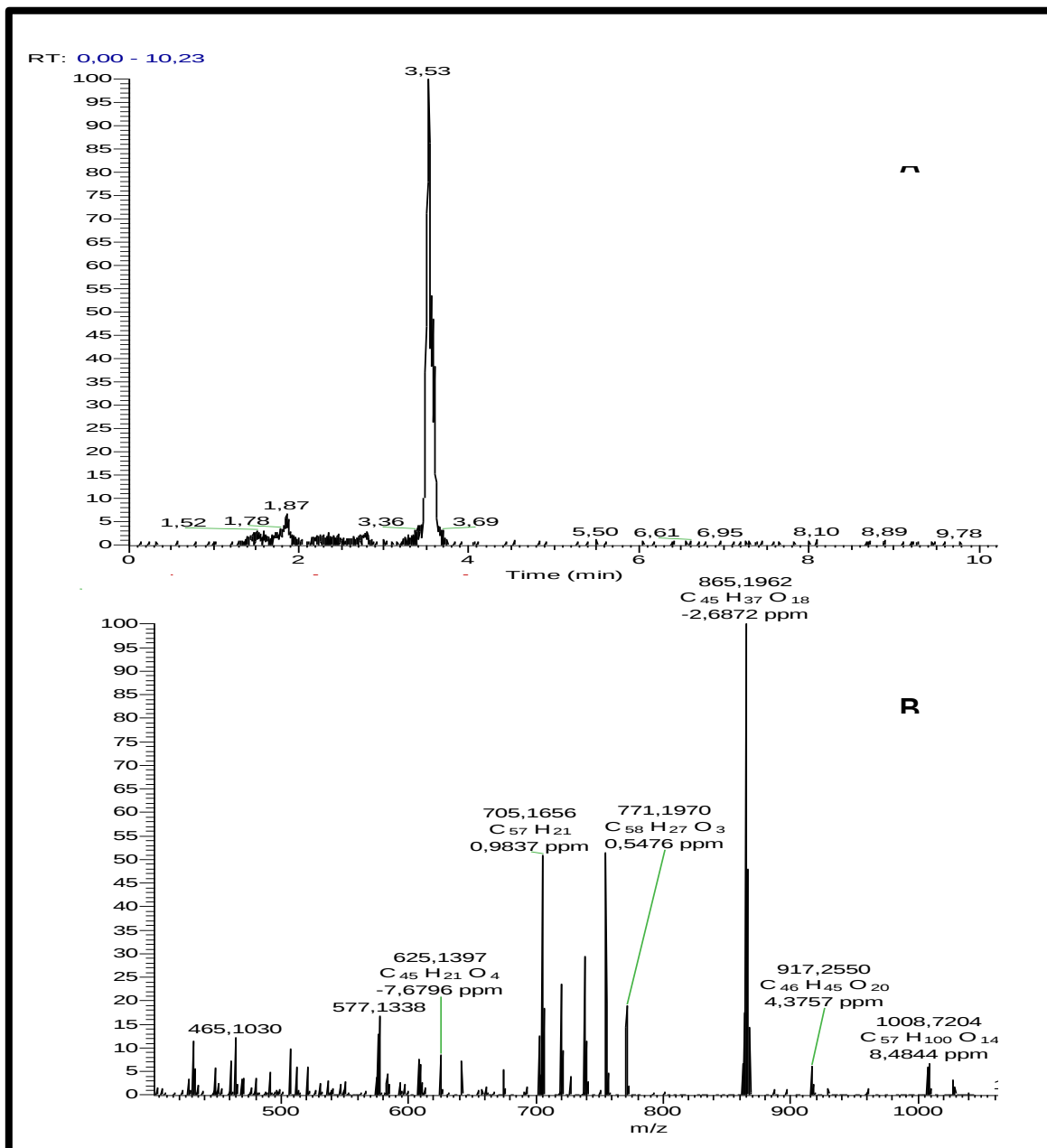


Quadro 17. Fragmentos a partir do íon em m/z 337,0922 (A), Proposta de Fragmentação (B).

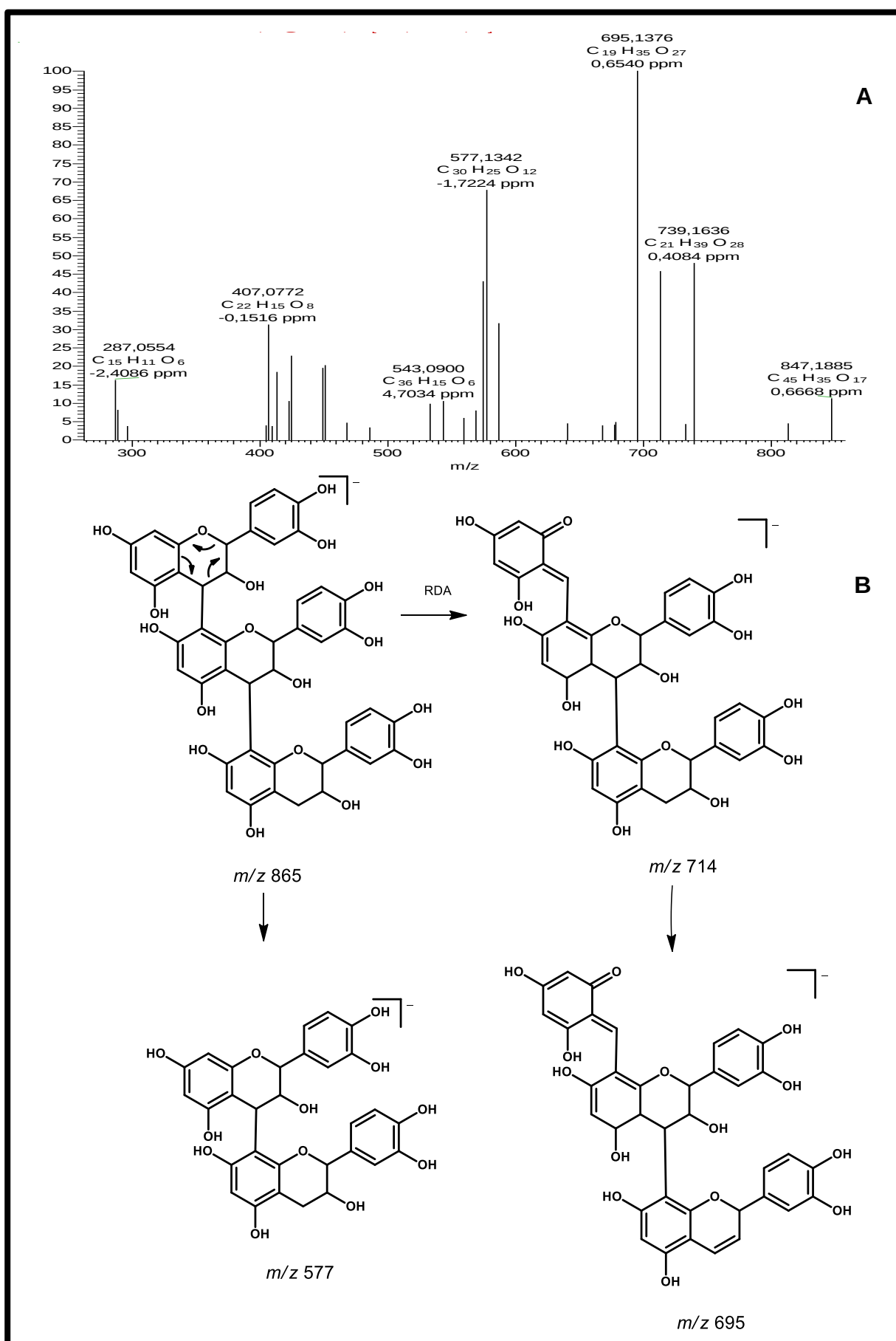


O composto **12** em Tr 3,53 min apresentou um espectro de massa $[M-H]^-$ em m/z 865,1958 (Quadro 18, pág. 99) consistente com a estrutura de uma proantocianidina do tipo C. Essa sugestão foi reforçada através da análise dos fragmentos em m/z 577 obtido a partir de uma cisão homolitica gerando a unidade dimerica e 695 gerado a partir de uma reação de Retro-Diels-Alder seguido de desidratação (Quadro 19, pág. 100). Esses dados corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (RODRIGUES et al.,2007). Esse é o primeiro relato de proantocianidina tipo C em *Hancornia speciosa*.

Quadro 18. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,53 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).



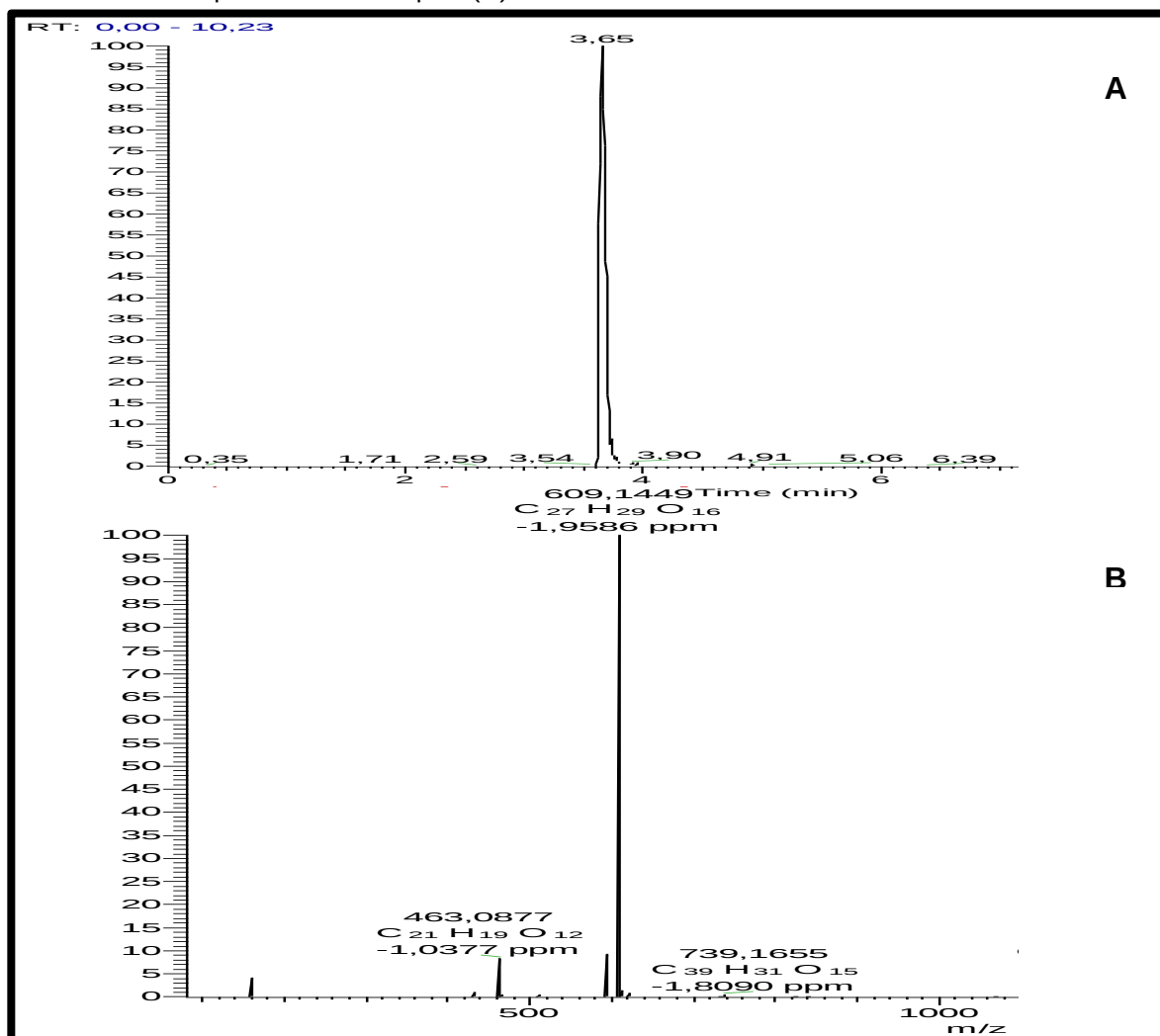
Quadro 19. Fragmentos a partir do íon em m/z 865,1958 (A), Proposta de fragmentação (B).



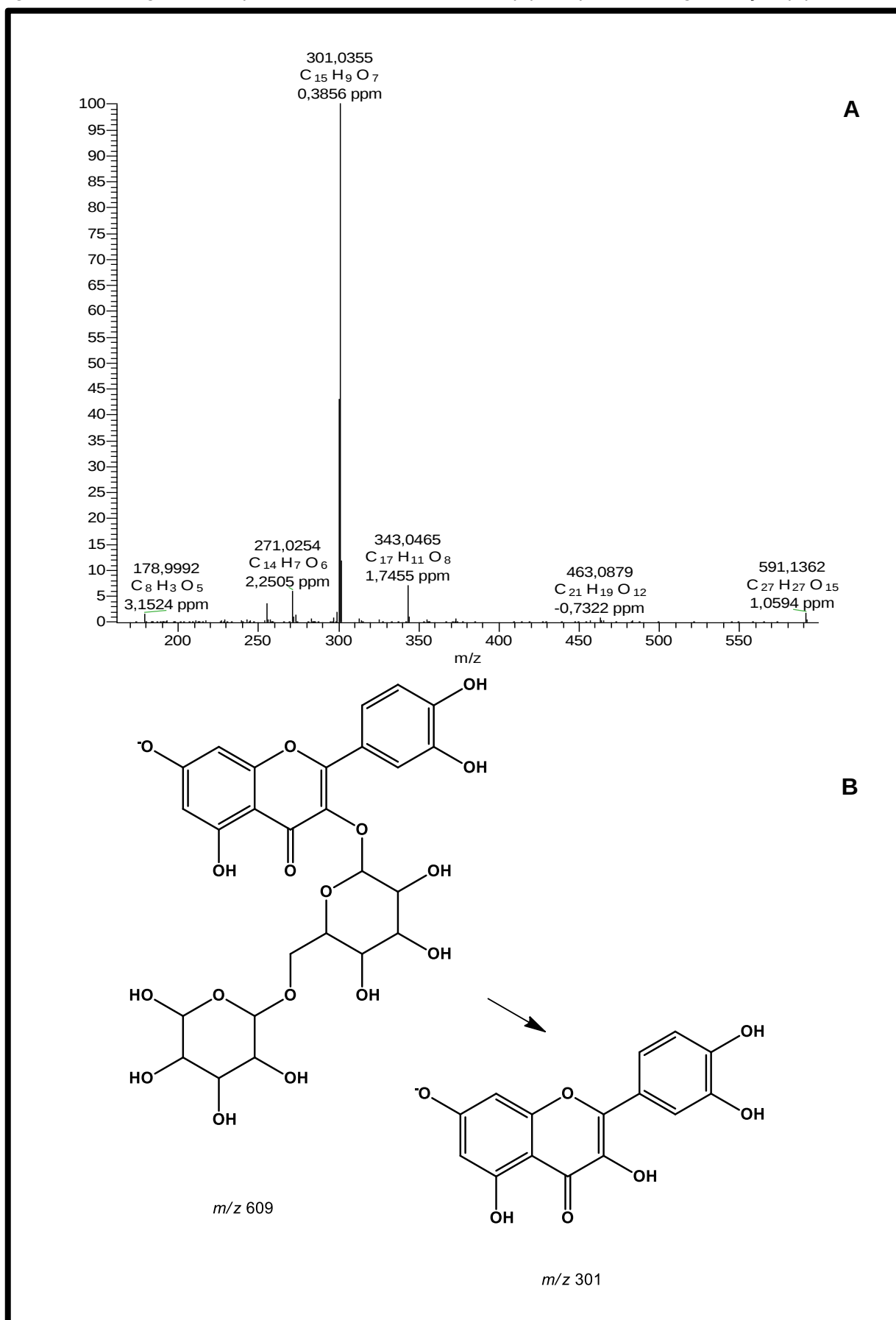
O composto **13** em Tr 3,56 min apresentou um espectro de massa com o pico $[M-H]^-$ em m/z 577,1340 com o mesmo padrão de fragmentação do composto **9** o que levou a sugerir que o composto **13** também é uma proantocianidina do tipo B. O composto em Tr 3,62 apresentou um espectro de massa com o pico do ion molecular em m/z 337,0924 (composto **14**) com o mesmo padrão de fragmentação do composto **11** o que levou a sugerir que o composto **14** é um isômero do ácido cumaroilquínico.

O tempo de retenção em 3,65 apresentou o pico $[M-H]^-$ em m/z 609,1449 (Quadro 20, pág. 101). A identificação desse composto foi feita por co-injeção com padrões juntamente com o fragmento em m/z 301 correspondente a perda da unidade rutinosideo por hidrolise (Quadro 21, pág. 102) sugerindo que se tratava da Rutina (composto **15**). Esse composto já foi relatado para *Hancornia speciosa*.

Quadro 20. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 3,65 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).

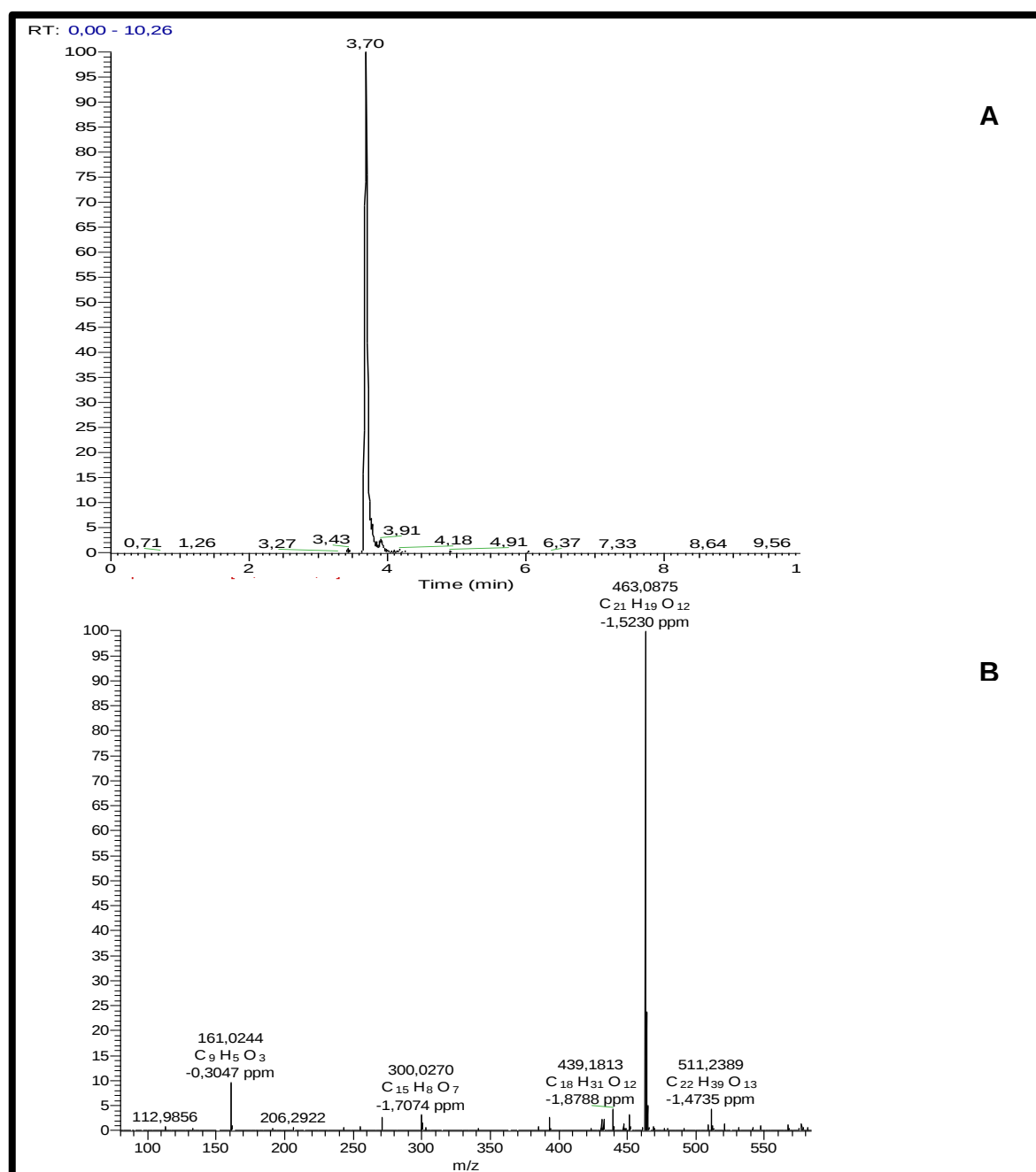


Quadro 21. Fragmentos a partir do íon em m/z 609,1449 (A), Proposta de fragmentação (B).

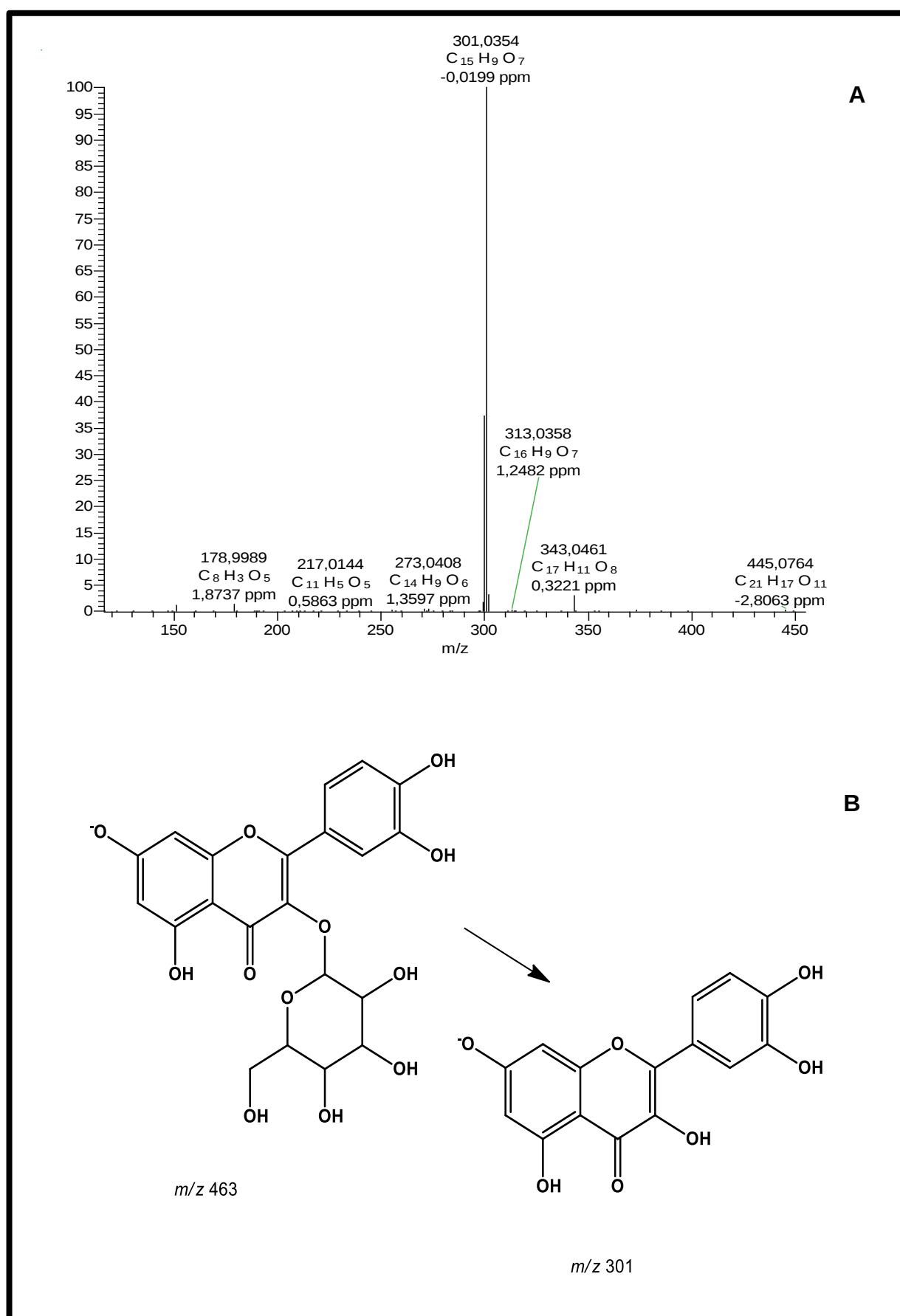


O composto **16** em Tr 3,70 min apresentou um espectro de massa com o pico $[M-H]^-$ em m/z 463,0875 (Quadro 22, pág. 103). consistente com a estrutura de uma quercetina hexosídeo. Essa sugestão foi reforçada através do fragmento em m/z 301 correspondente a perda da unidade osídica por hidrólise (Quadro 23, pág. 104). Esses dados corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (OSZMIANKI et al., 2015). Esse é o primeiro relato do composto **16** para *Hancornia speciosa*.

Quadro 22. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 3,70 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).

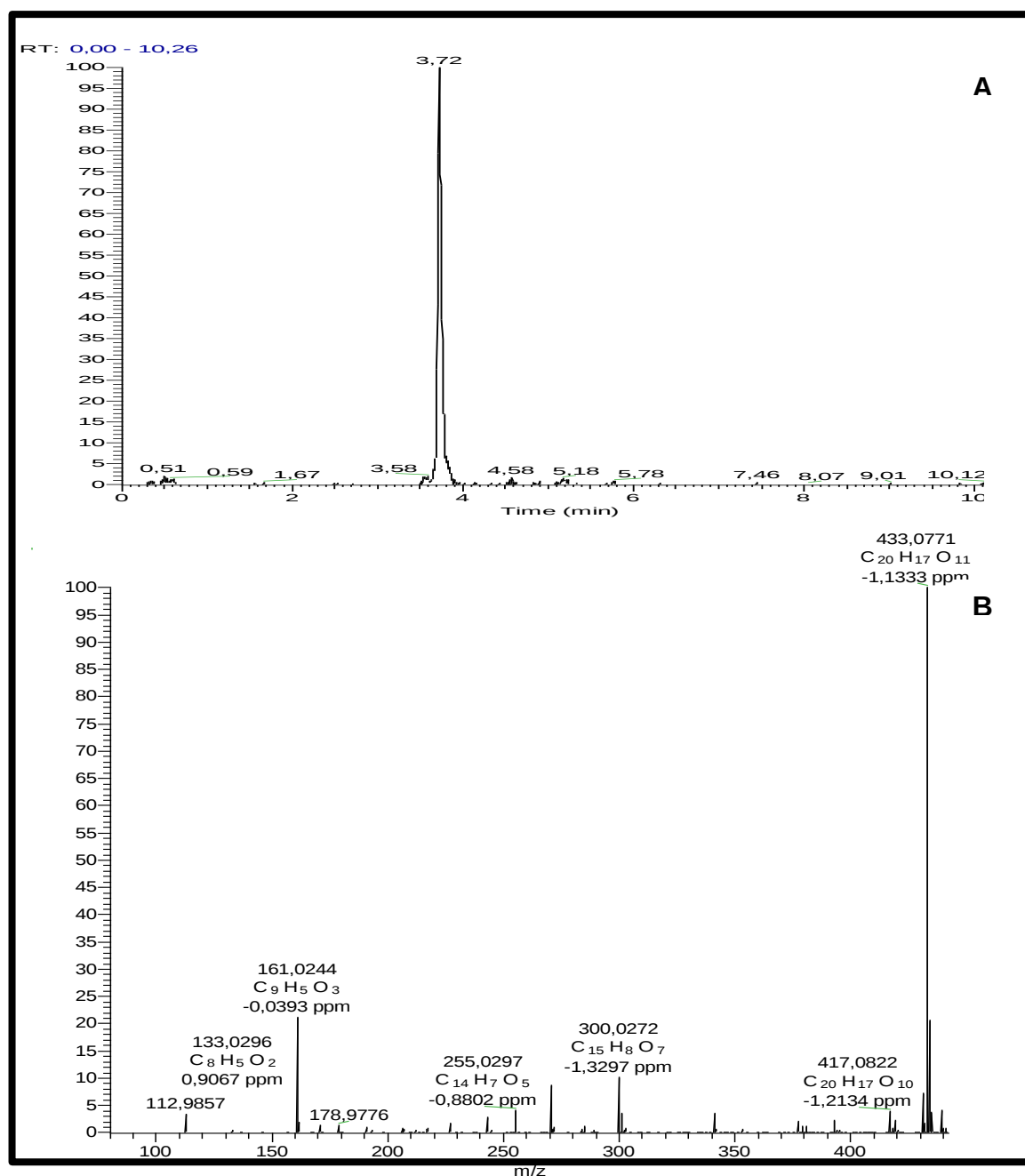


Quadro 23. Fragmentos a partir do íon em m/z 463,0877 (A), proposta de fragmentação (B).

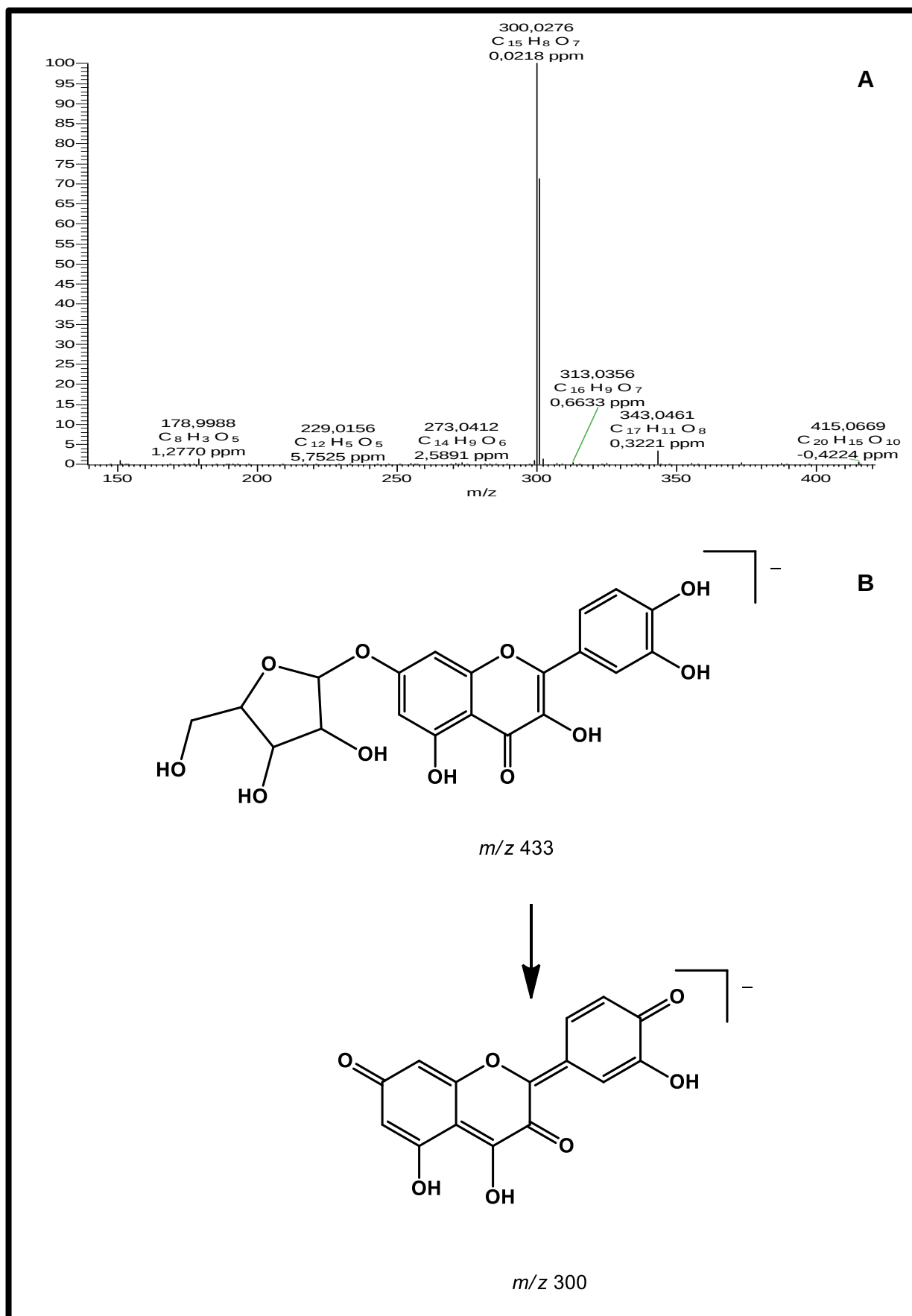


O composto **17** em Tr 3,72 min apresentou um espectro de massa com o pico $[M-H]^-$ em m/z 433,0771 (Quadro 24, pág. 105) consistente com a estrutura de uma quercetina pentosídeo. Essa sugestão foi reforçada através da análise do fragmento em m/z 300 obtido a partir da hidrólise e perda de hidrogênio formando uma estrutura do tipo quinonametídeo (Quadro 25, pág. 106). Esses dados corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (OSZMIANKI et al., 2015). O composto **17** está sendo relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Quadro 24. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,72 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).

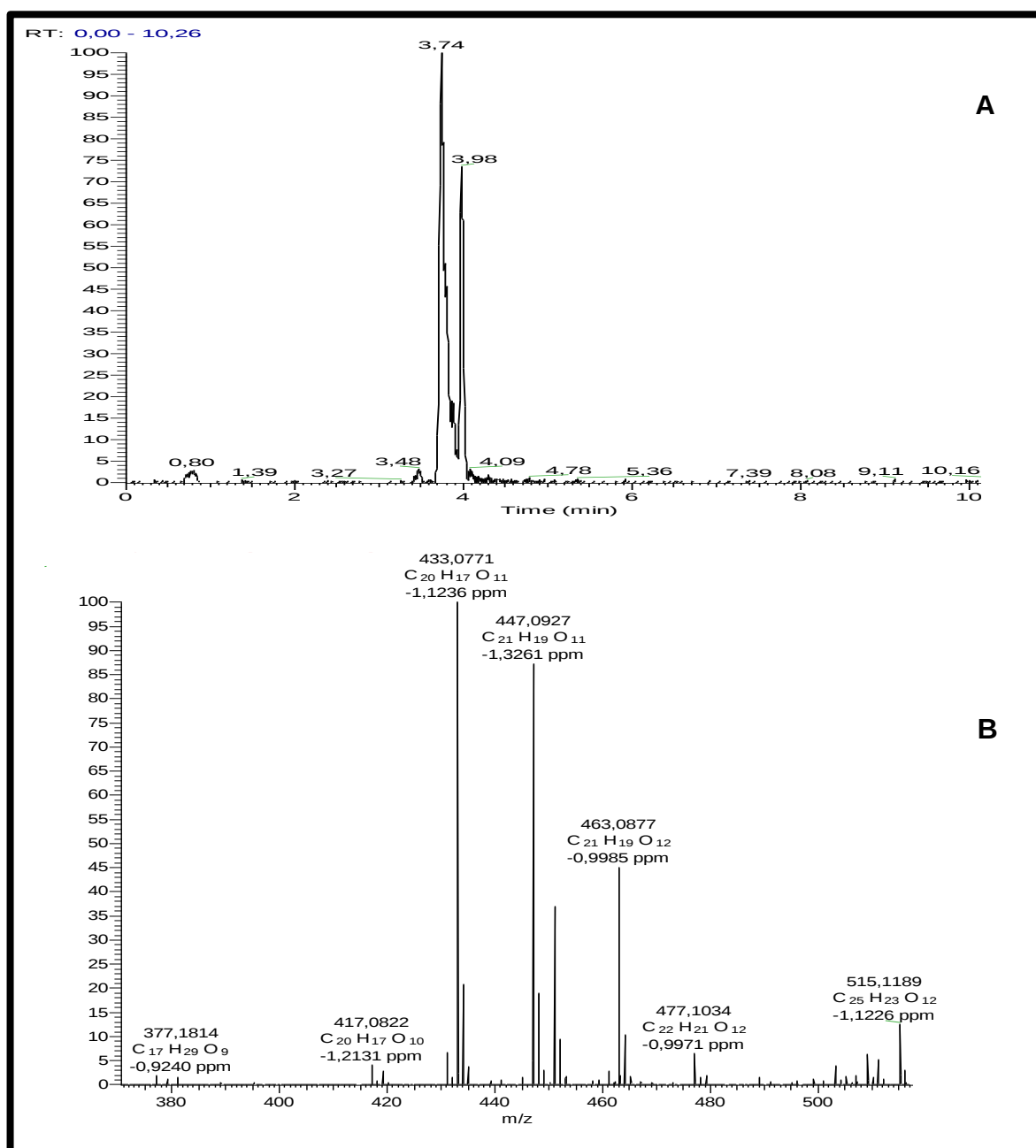


Quadro 25. Fragmentos a partir do íon em m/z 433,0771 (A), proposta de fragmentação (B).

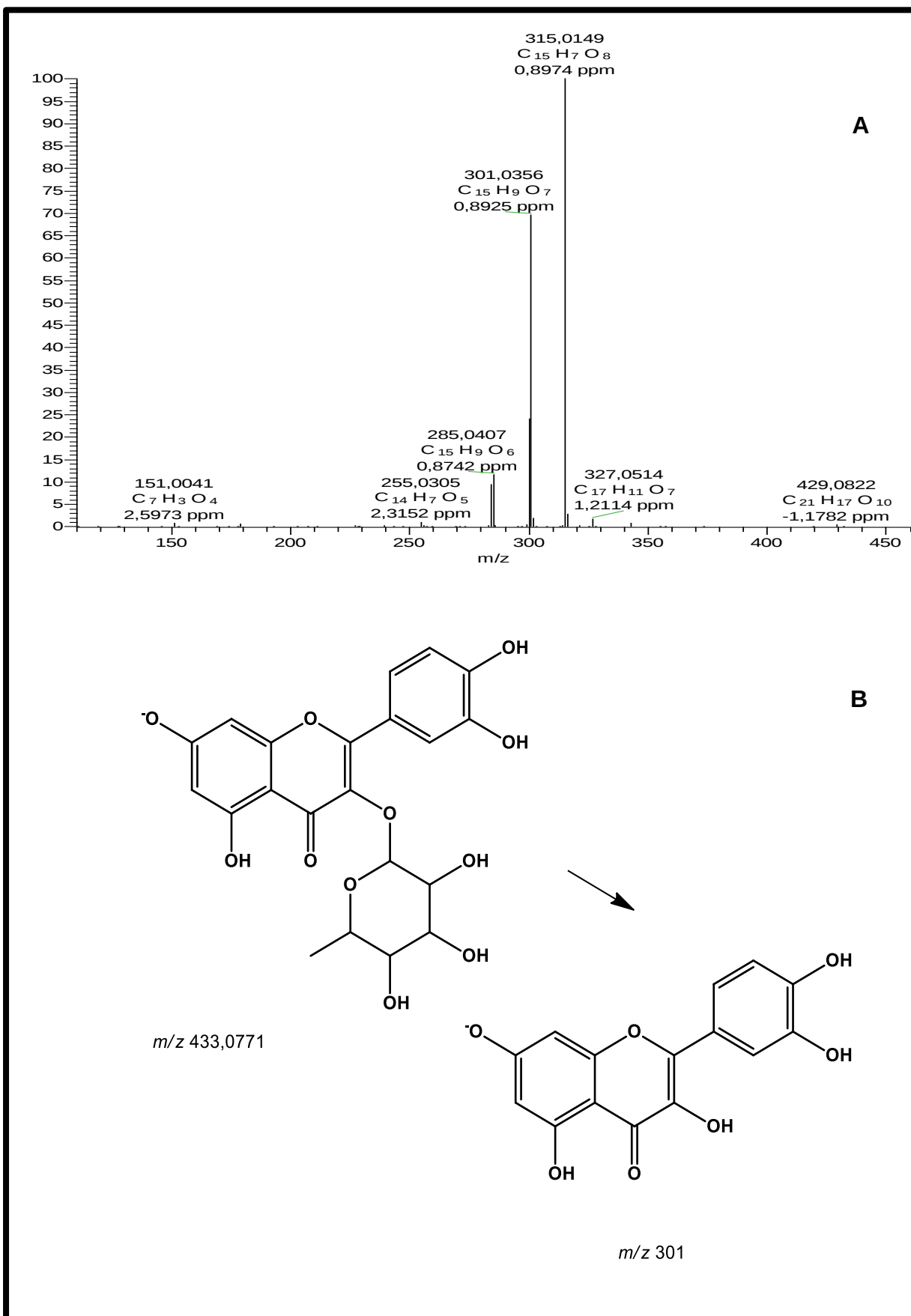


O composto **18** em Tr 3,74 min apresentou um espectro de massa com o pico do $[M-H]^-$ em m/z 447,0927 (Quadro 26, pág. 107). Pesquisas em bancos de dados remetem essa massa exata para a estrutura da quercetina-3-O-ramnosideo. Essa sugestão foi reforçada principalmente através da análise do fragmento em m/z 301 (Quadro 27, pág. 108) que corresponde a M-Ramnose. Esses dados corroboram com os dados da literatura para a estrutura sugerida (BARROS et al., 2013). O composto **18** está sendo relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Quadro 26. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,74 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esses picos (B).

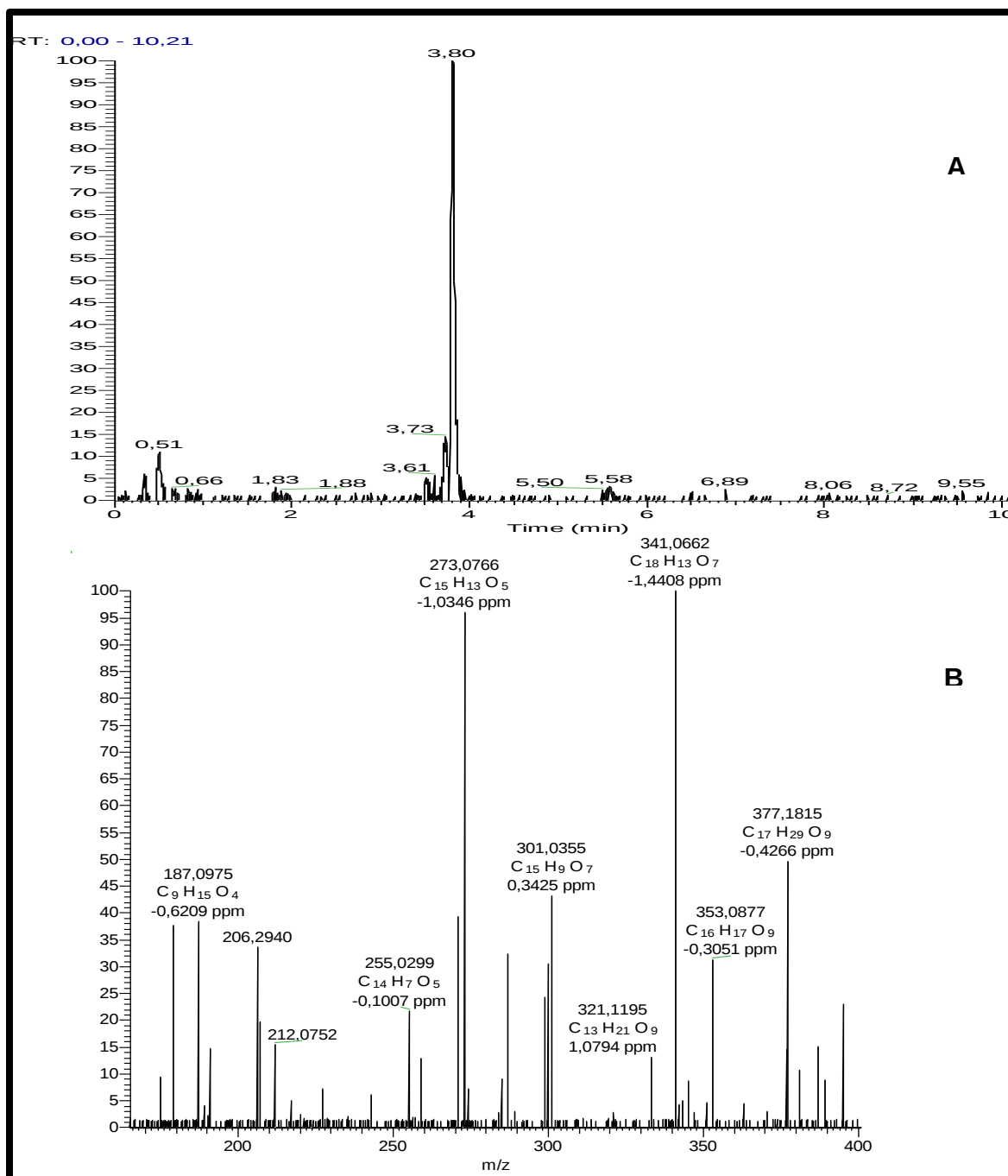


Quadro 27. Fragmentos a partir do íon em m/z 447,0927 (A), proposta de fragmentação (B).

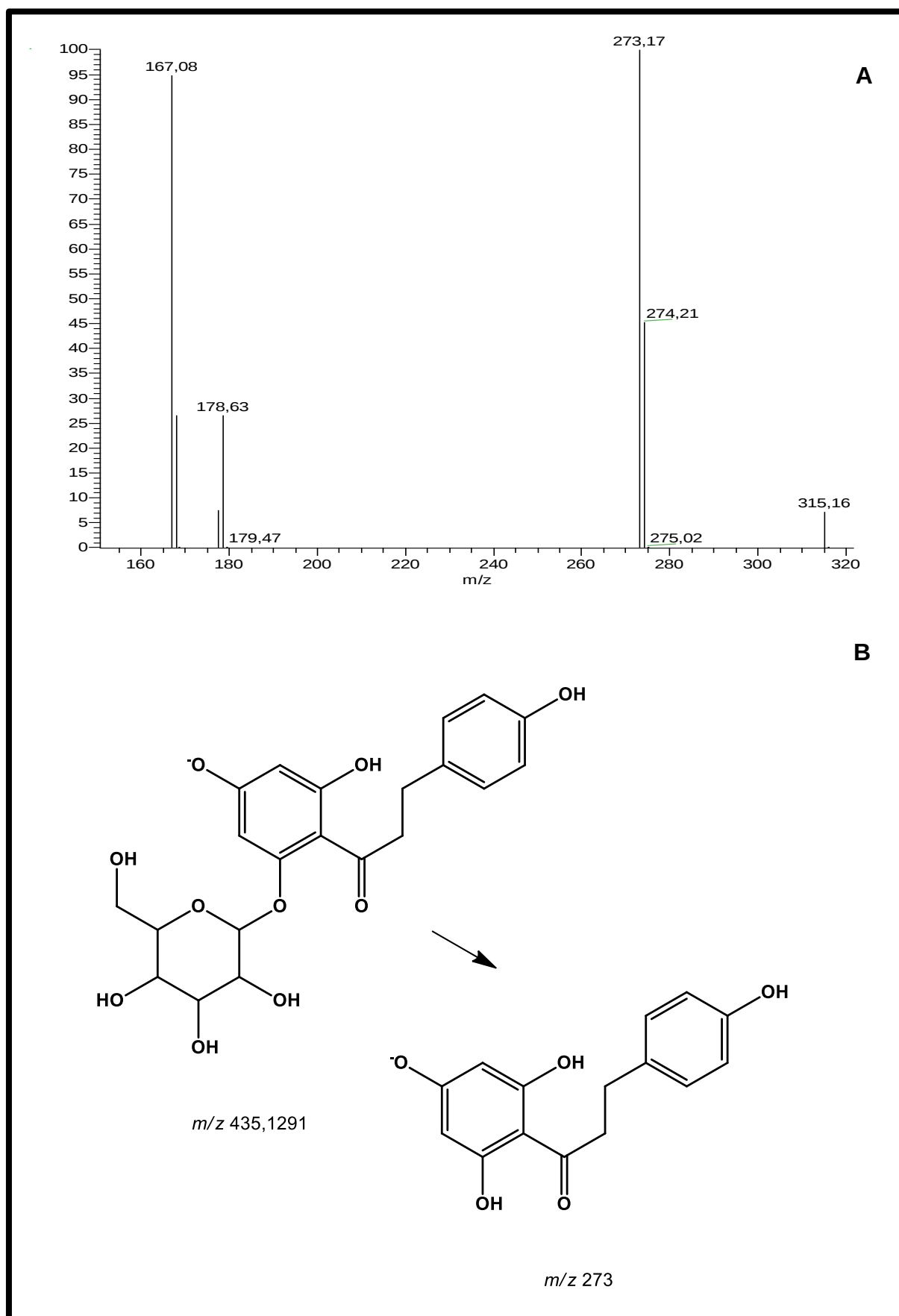


O Tr em 3,80 apresentou o pico $[M-H]^-$ em m/z 435,1291 (Quadro 28, pág. 109). Pesquisas em bancos de dados corroboram com essa massa exata para o composto **19**, uma chalcona glicosilada nomeada phlorizina. A identificação desse composto foi feita por co-injeção com padrão juntamente com o fragmento em m/z 273 (Quadro 29, pág. 110) que corresponde ao M-glicose. A phlorizina está sendo relatada pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

Quadro 28. Cromatograma do íon selecionado no Tr em 3,80 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).



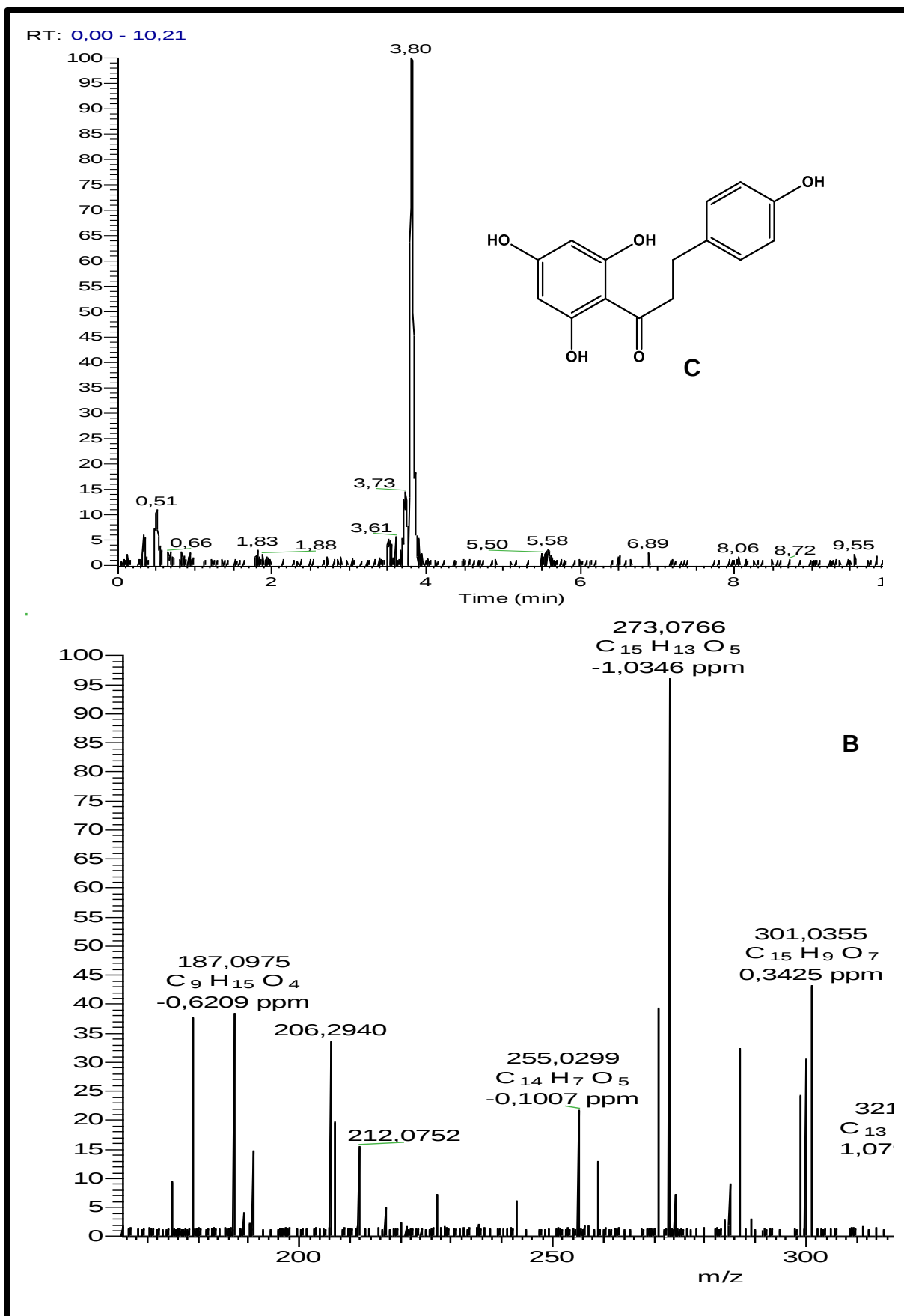
Quadro 29. Fragmentos a partir do íon em m/z 435,1291 (A), proposta de fragmentação (B).



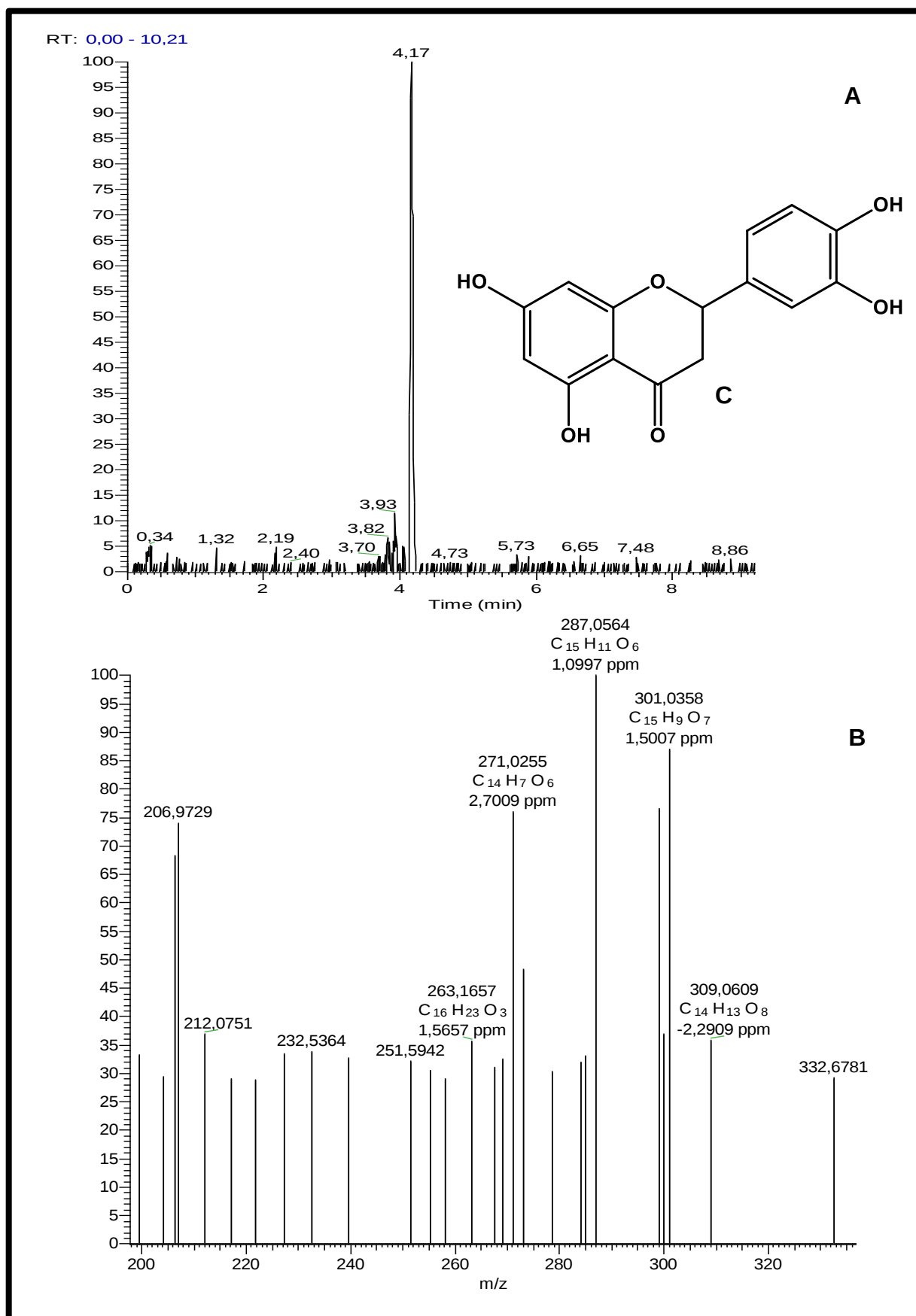
Os compostos em Tr 3,82 min (Quadro 30, pág. 112), 3,84 min (Quadro 31, pág. 113) 3,93 min (Quadro 32, pág. 114) 4,04 min (Quadro 35, pág. 117), e 4,06 min (Quadro 37, pág. 119) apresentaram espectros de massa com o pico do íon molecular em m/z 273,0764 (Quadro 30, pág. 112), 287,0559 (Quadro 31, pág. 113), 301,0551 (Quadro 33, pág. 115), 285,0402 (Quadro 34, pág. 116), 269,0450 (Quadro 36, pág. 118), e 285,0401 (Quadro 38, pág. 120) consistente com a estrutura de phloretina (composto **20**), eriodictiol (composto **21**), quercetina (composto **22**), luteolina (composto **23**), apigenina (composto **24**) e caempferol (composto **25**). Esses compostos foram identificados por co-injeção com padrões. Os respectivos cromatogramas e espectros de massa exata e fragmentos são mostrados nas figuras a seguir. Exceto o composto 22, os demais estão sendo relatado pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

A Tabela 10 (pág. 121).compila os dados das propostas de identificação. Dos 25 compostos, 13 estão sendo registrados pela primeira vez em *Hancornia speciosa* (Quadro 39, pág. 122).

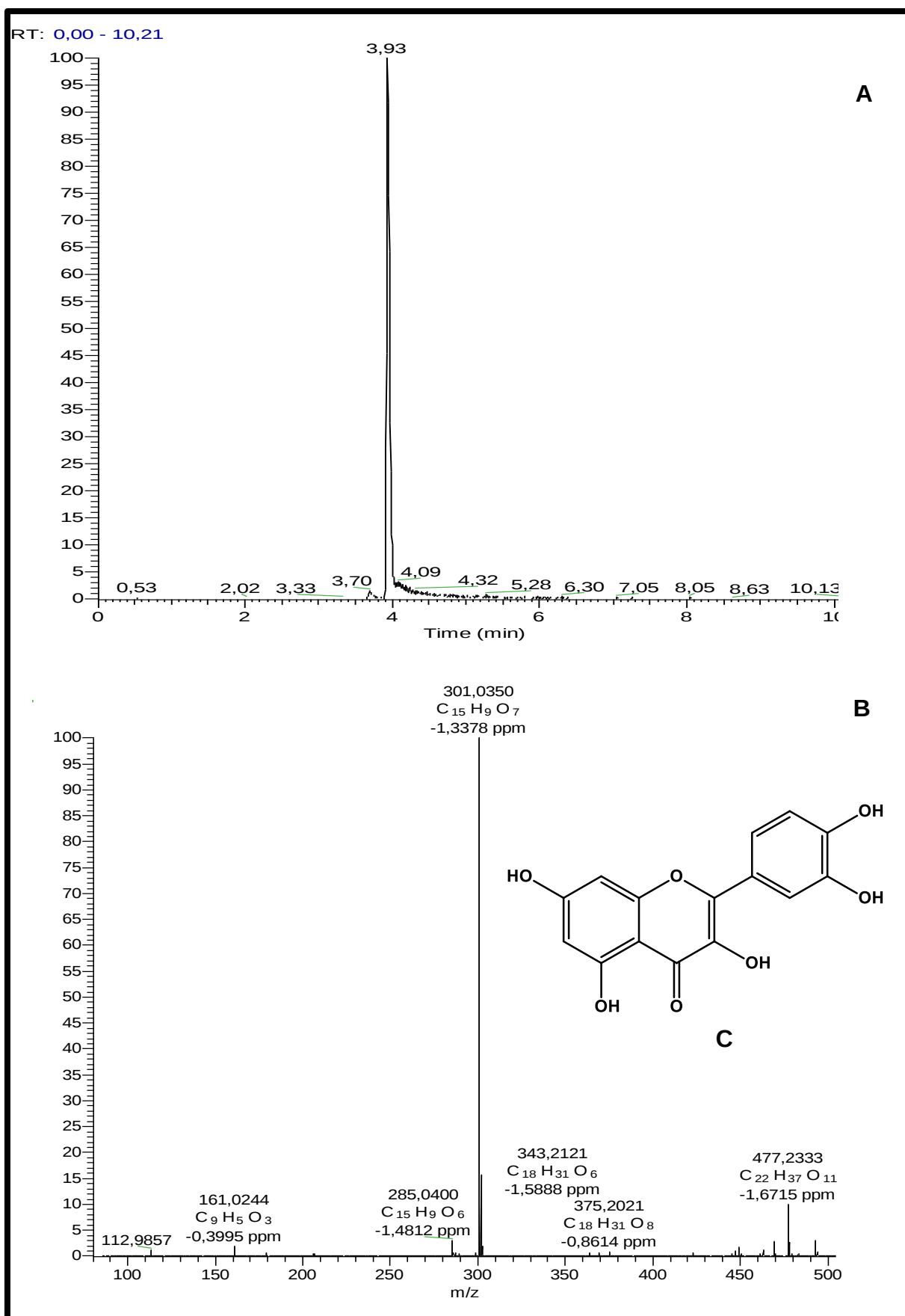
Quadro 30. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,82 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), phloretina (C).



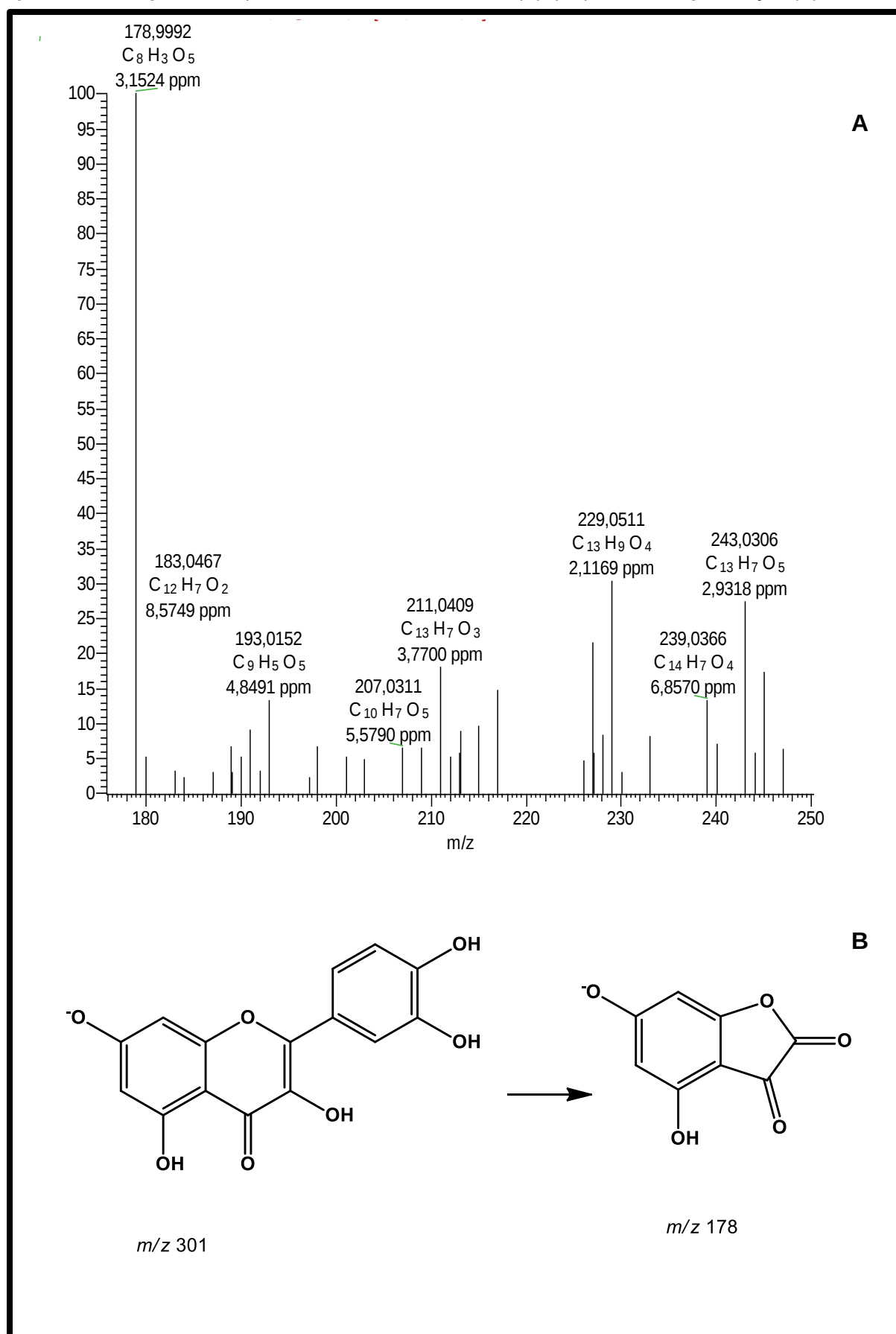
Quadro 31. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,84 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), Eriodictiol (C).



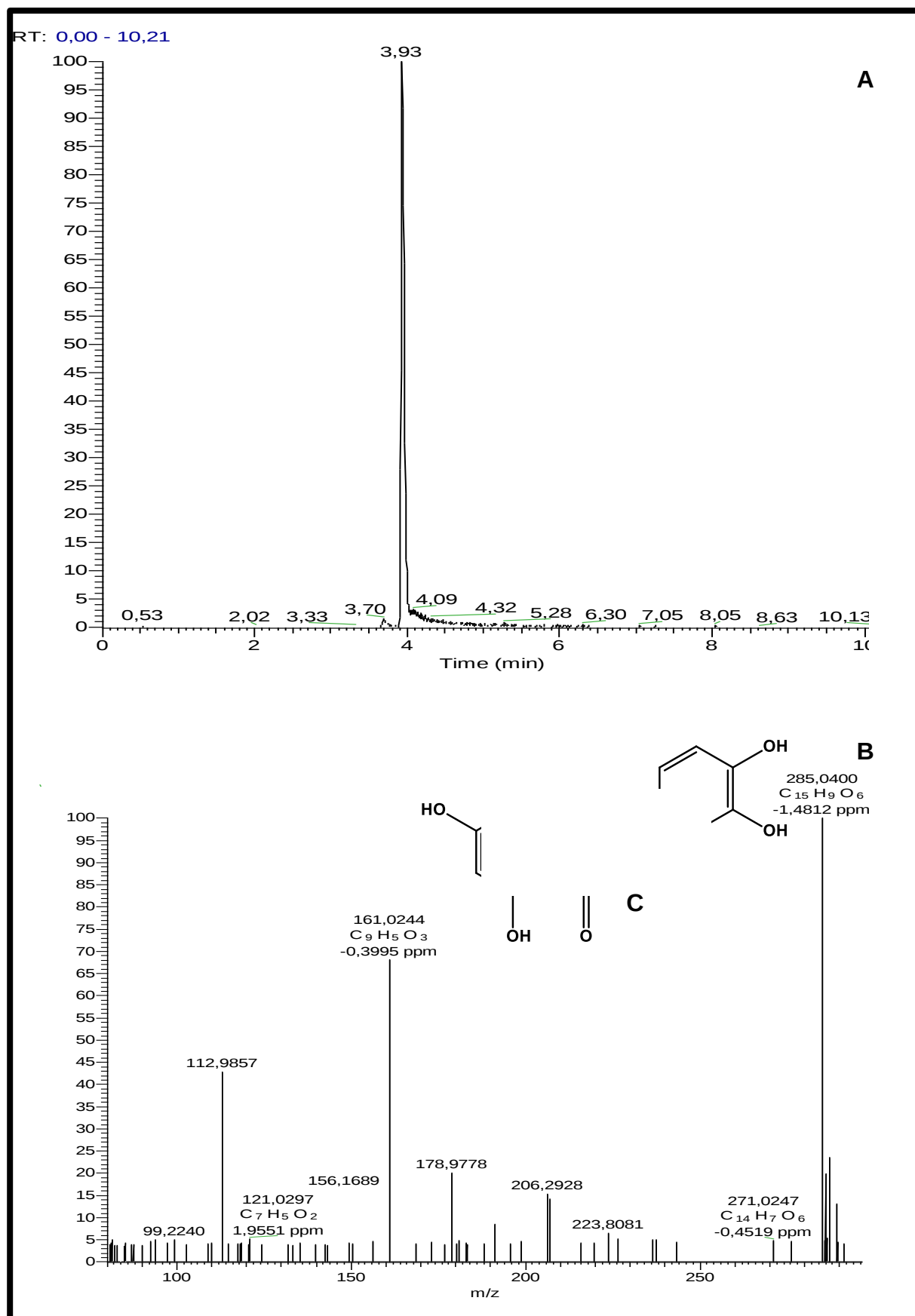
Quadro 32. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,93 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), quercetina (C).



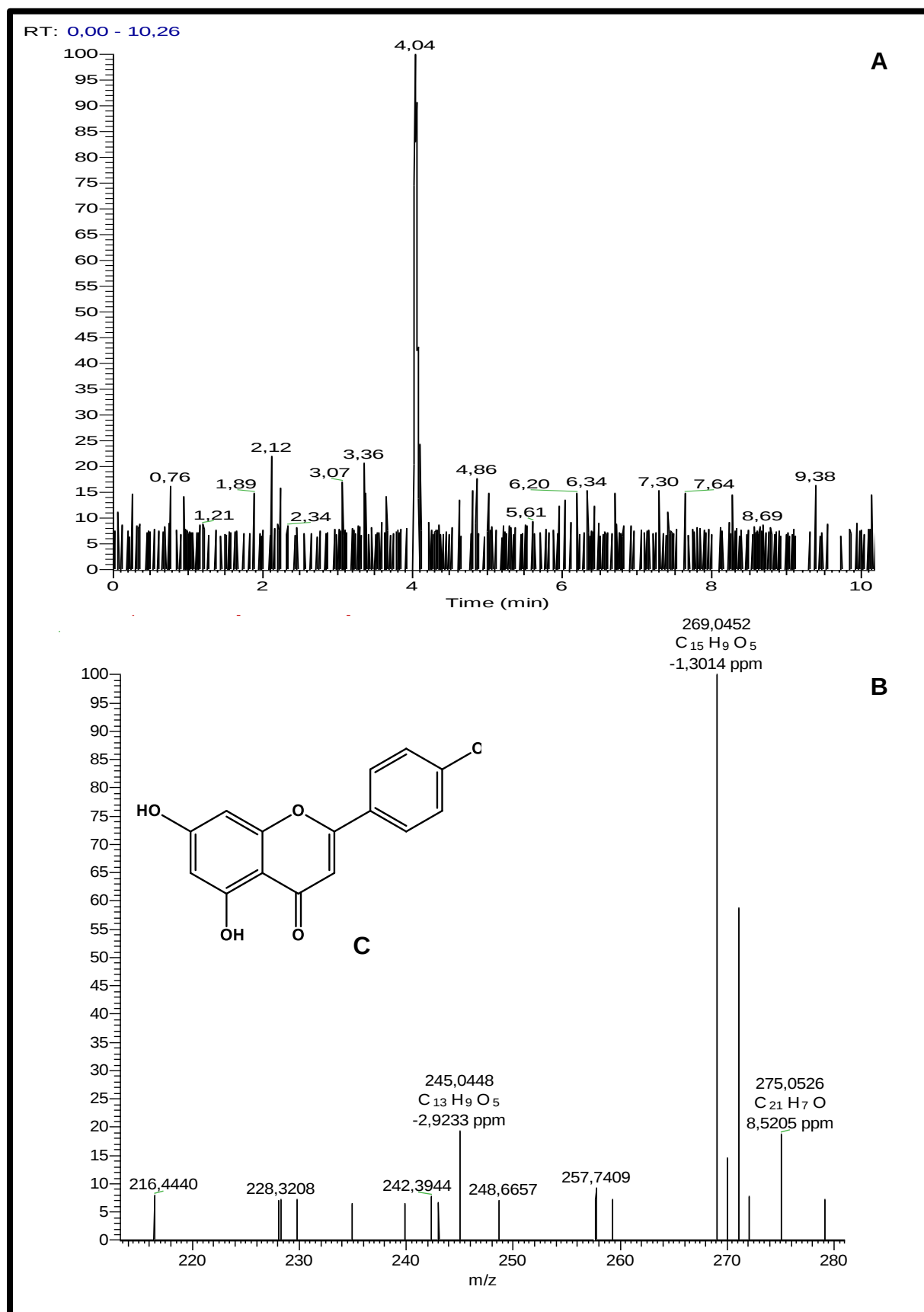
Quadro 33. Fragmentos a partir do íon em m/z 301,0350 (A), proposta de fragmentação (B).



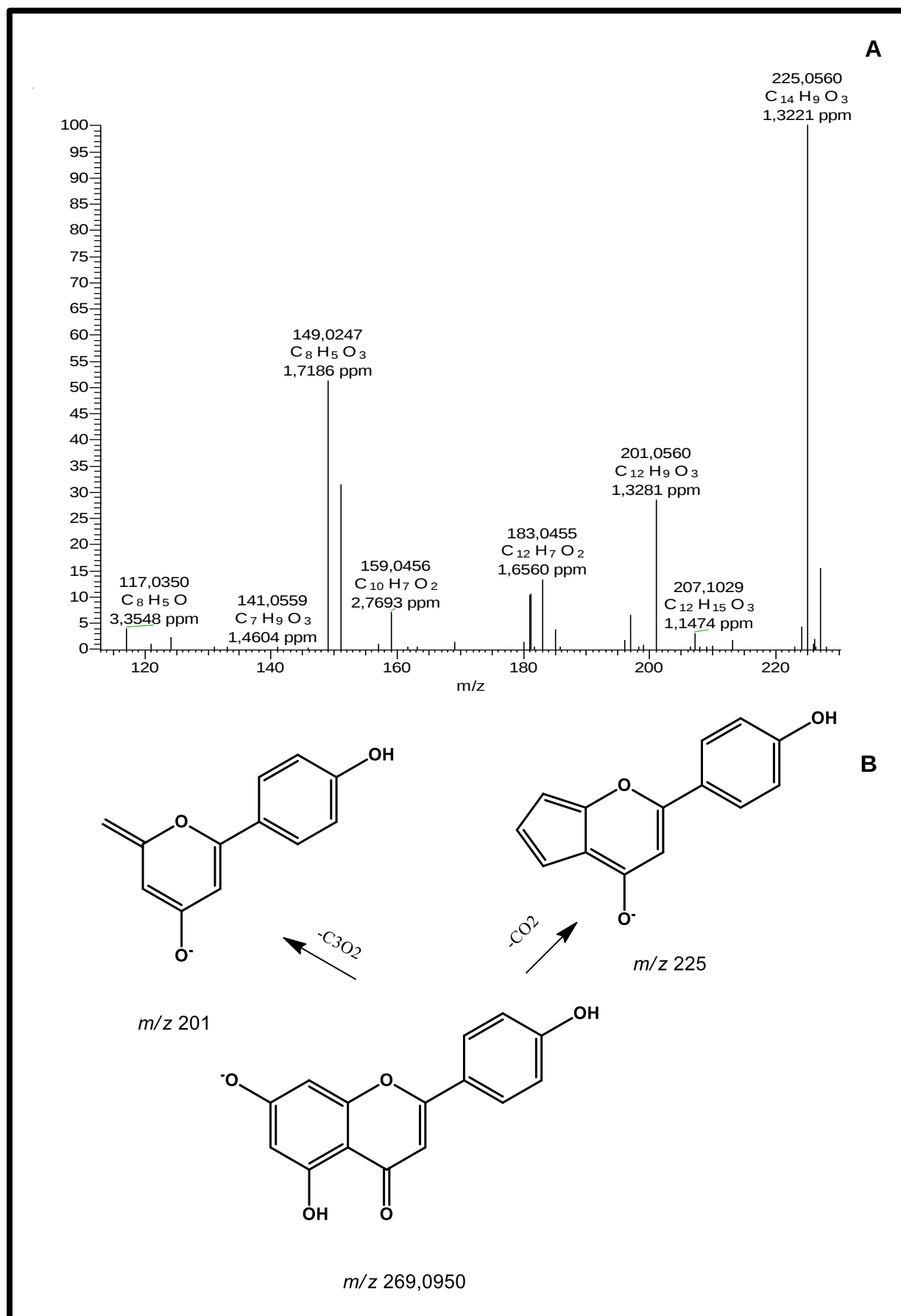
Quadro 34. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 3,93 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B), luteolina (C).



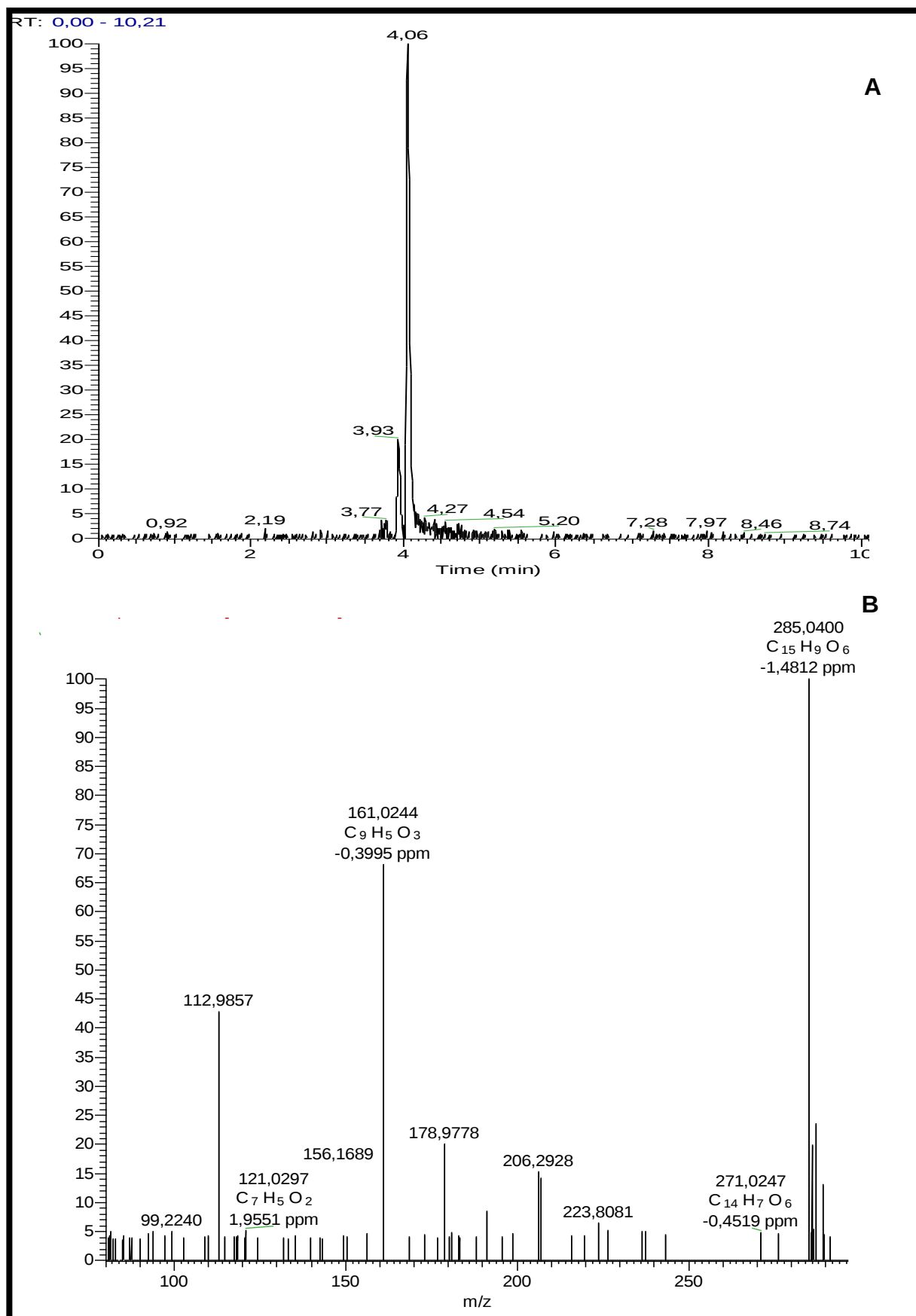
Quadro 35. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 4,04 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).



Quadro 36. Fragmentos a partir do íon em m/z 269,0452 (A), proposta de fragmentação (B).



Quadro 37. Cromatograma do íon selecionado nos Tr em 4,06 obtido no modo ESI negativo (A), Massa exata correspondente a esse pico (B).



Quadro 38. Fragmentos a partir do íon em m/z 285,0400 (A), proposta de fragmentação (B).

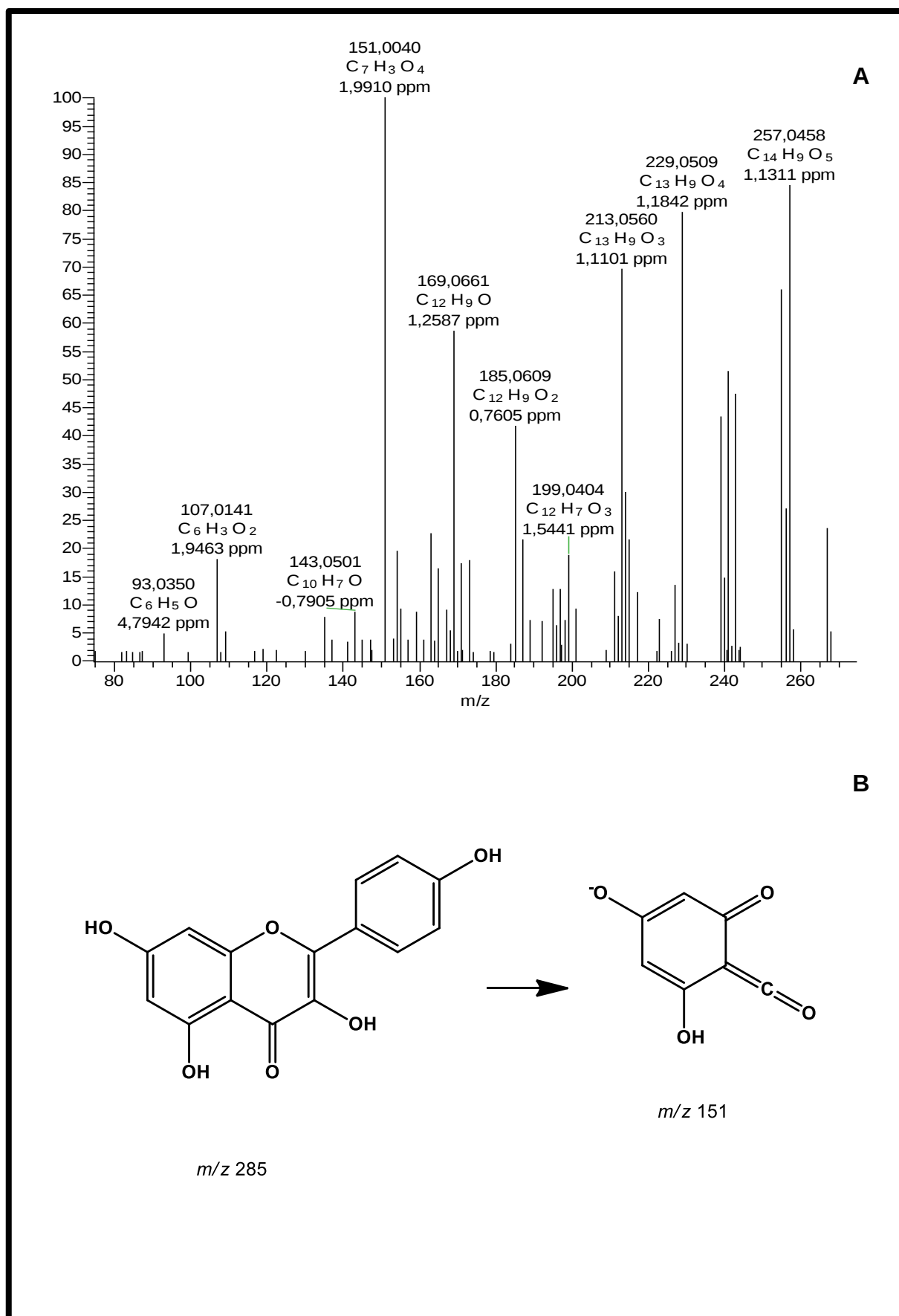
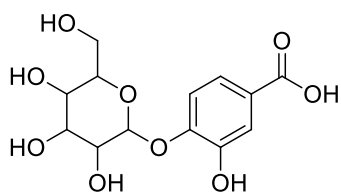


Tabela 10. Caracterização de compostos fenólicos das folhas de *Hancornia speciosa* por UHPLC/ MS/MS.

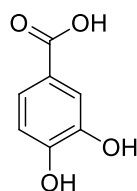
Pico	[M-H] ⁻ (m/z)	Tr (min)	UV (nm)	Formula Molecular	Erro	MS ⁿ (m/z)	Composto	Id.	Referência
1	191,0559	0,35	225, 263	C ₇ H ₁₁ O ₆	1,0	173,155,111,87	Ácido quínico	EM	SANTOS et al., 2013
2	315,0716	0,68	260, 369	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	1,6	225, 153, 109	Protocatecuico glicosilado	EM	CÁDIZ-GURREA et al., 2013
3	153,0193	0,85	264	C ₇ H ₆ O ₄	0	109	Ácido protocatecuico	Co	SANTOS et al., 2013
4	343,1027	1,30	264	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	1,9	?	Não identificado	--	
5	577,134	1,30	264	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	1,8	451, 425, 407, 289	Procianidina tipo B	EM	SANTOS et al., 2013
6	289,0712	1,64	298, 369	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1,8	245, 231, 205, 179	(+)-Catequina	Co	-
7	353,0873	2,03	248, 323	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1,5	233, 191, 179, 173	Ácido clorogênico	Co	-
8	179,0349	2,17	259, 370	C ₉ H ₈ O ₄	0,5		Ácido caféico	Co	-
9	577,1340	2,88	260, 370	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	1,8	451, 425, 407, 289	Proantocianidina tipo B		RODRIGUES et al.,2007
10	289,0713	3,36	264, 369	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1,6	245, 231, 205, 179	(-)-Epicatequina	Co	-
11	337,0922	3,45	298, 369	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	1,7	191, 173, 163	Ácido coumaroilquinico	EM	CHEN et al., 2015
12	865,1958	3,52	260, 370	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	3,6	695, 577	Proantocianidina tipo C	EM	RODRIGUES et al.,2007
13	577,1340	3,56	260, 370	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	1,8	451, 425, 407, 289	Proantocianidina tipo B	EM	RODRIGUES et al.,2007

14	337,0924	3,62	298, 369	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	1,5	191, 173, 163	Ácido coumaroilquinico	EM	CHEN et al., 2015
15	609,1453	3,65	285, 382	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1,3	591, 463, 447, 301	Rutina	Co	-
16	463,0877	3,70	259, 353	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	1,5	445, 301 , 273, 178	Quercetina hexosideo	Co	-
17	433,0770	3,72	269, 369	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	1,1	151, 255, 300	Quercetina pentosideo	EM	OSZMIANKI et al., 2015
18	447,0927	3,74	266, 346	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1,4	429, 301, 151, 285	Quercetina ramnosideo	EM	BARROS et al., 2013
19	435,1291	3,80	271, 340	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	1,4	315, , 273, 179	Phlorizina	EM	SANTOS et al., 2013
20	273,0764	3,82	272, 350	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	1,7	123, 125, 167, 179	Phloretina	Co	-
21	287,0559	3,84	358	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	0,7	135, 151, 169, 217	Eriodictiol	Co	-
22	301,0351	3,93	269, 354	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	0,9	273, 257, 178, 151	Quercetina	Co	-
23	285,0402	3,93	299, 385	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1,0	133, 151, 175	Luteolina	Co	-
24	269,0450	4,04	269, 336	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2,2	149, 159, 201, 225	Apigenina	Co	-
25	285,0401	4,06	231,360	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1,2	135, 151, 187	Caempferol	Co	-

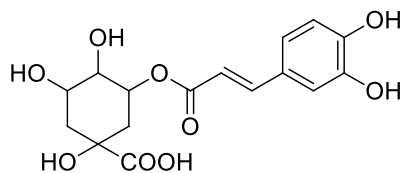
Quadro 39. Propostas estruturais obtidas a partir de espectros de massas em alta resolução e/ou co-injeção de padrões de fenólicos com primeiro relato para *Hancornia speciosa*.



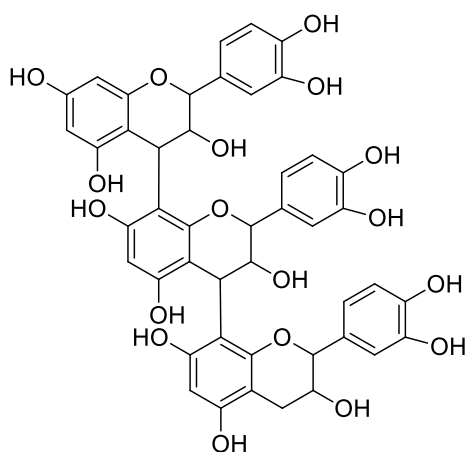
Ácido protocatecuico glicosídeo



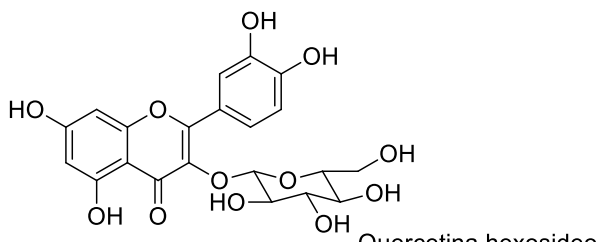
Ácido protocatecuico



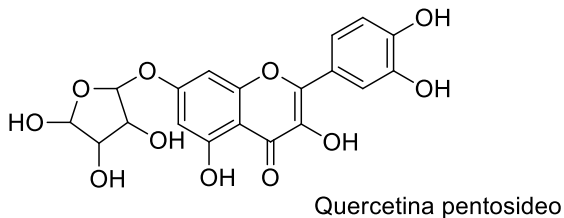
Ácido coumaroil quínico



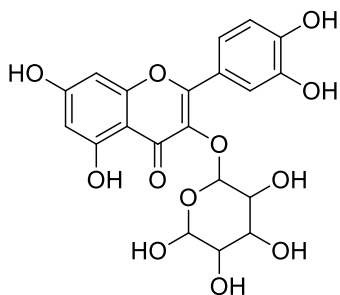
Procianidina do tipo C



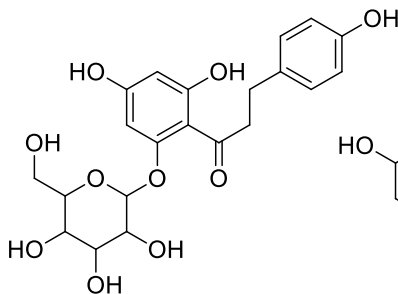
Quercetina hexosídeo



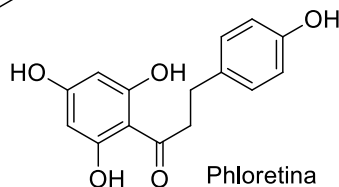
Quercetina pentosídeo



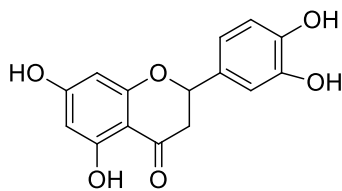
Quercetina 3-O-ramnosídeo



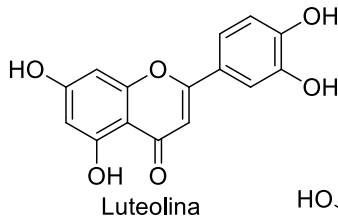
Phlorizina



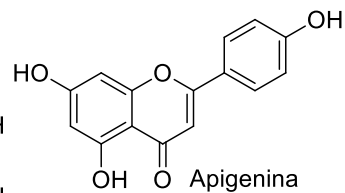
Phloretina



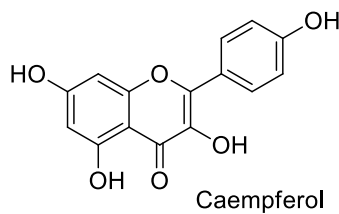
Eriodictiol



Luteolina



Apigenina



Caempferol

5.6 Ensaios de atividade antifúngica

O extrato hidroetanólico das folhas de *Hancornia speciosa* quando testado frente às oito cepas fúngicas: *Candida albicans* ATCC90028, *Candida tropicalis* ATCC13803, *Candida dubliniensis* CBS7987, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida glabrata* ATCC2001, *Candida krusei* ATCC6258 e *Candida rugosa* ATCC10571, foi capaz de inibir o crescimento apenas de *Candida krusei*, com uma concentração inibitória mínima de 2,5 µg/mL.

Já as substâncias codificadas como **Hs-3**, identificado como narigengina, e **Hs-4** correspondente a uma mistura do ácido 4,5-di-*O-E*- cafeoil-quínico com o ácido 3,5-di-*O-E*- cafeoil-quínico, quando submetidas ao mesmo teste, não apresentaram nenhuma atividade antifúngica, pois não foram capazes de inibir o crescimento das cepas relatadas anteriormente, dessa forma não foi possível estimar a concentração inibitória mínima dos compostos testados.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas, encontrando-se que uma grande variedade destes extratos possui potencial atividade sobre um vasto número de microorganismos, (BATISTA et al. 2013). Faz-se necessário buscar e caracterizar quimicamente os extratos e frações estudadas, para posteriormente identificar os componentes desses compostos e quais grupamentos químicos apresentam essa atividade sobre os microorganismos testados, (SANTOS et al. 2012).

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das folhas de *Hancornia speciosa* resultou no isolamento de três substâncias puras e uma mistura. Da fase clorofórmica foi isolado o cafeato de etila. Da fase acetato de etila foi isolado a isoquercetrina. Foram isolados ainda a narigenina, e uma mistura do ácido 4,5-di-*O-E*- cafeoil-quínico com o ácido 3,5-di-*O-E*- cafeoil-quínico da fase butanólica. Todos esses compostos foram relatados pela primeira vez em *Hancornia speciosa*.

A caracterização do extrato das folhas de *Hancornia speciosa* por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas forneceu como resultado a identificação de vinte e quatro compostos, sendo treze compostos com o primeiro relato para a espécie em estudo, o que foi de grande importância para o conhecimento do arsenal de constituintes que essa planta possui. Já o estudo da atividade antifúngica do extrato forneceu resultado positivo frente à cepa de *Candida krusei*, enquanto que o estudo dos compostos isolados não forneceu resultado positivo, não sendo capaz de inibir o crescimento das cepas em estudo em nenhuma concentração testada.

Apesar das substâncias relatadas nesta pesquisa já serem conhecidas na literatura, este trabalho contribuiu evidenciando que esta espécie é bioprodutora de compostos fenólicos, como demonstrado neste estudo fitoquímico.

Diante disto, o presente trabalho cumpriu com o objetivo que se fundamentou na ampliação do conhecimento fitoquímico do gênero *Hancornia*, através do estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa*.

REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L.O. **Derivados dos ácidos clorogênico, cafeico e cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição** / Luciana de Oliveira Adolpho- Santa Maria – RS. 2012.

ALMEIDA, L. H. **Qualidade de Morango e Framboesa, Efeito de diferentes práticas culturais, datas de Colheita e estabilidade durante Conservação sob Congelamento**/ Lílíana Henriques de Almeida – Lisboa- Portugal. 2012.

ALMEIDA, L.M.A.; FLORIANO, J.F.; RIBEIRO, T.P.; MAGNO, L.N.; DA MOTA, L.S.L.S.; MRUE.; F.; MELO-REIS, P.; JUNIOR, R,S.L.; GRAEFF, C.F.O.; GONÇALVES, P.J. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, p. 2153–2162, 2014.

ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C.; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, G.A.; LEMOS, T.L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p.2155–2159, 2011.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em Alimentos – Uma Breve Revisão, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 1- 9, 2006.

ASSUMPÇÃO, C.F.; BACHIEGA, P.; MORZELLE, M.C.; NELSON, D.L.; NDIAYE, E.A.; RIOS, A.O.; SOUZA, E.C.; Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.44, n.7, p.1297-1303, 2014.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): a review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, 2001.

BARROS, I.M.C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)** / Ivelone Maria de Carvalho Barros – Brasília- DF. 2008.

BARROS, L.; ALVES, C.T.; DUENAS, M.; SILVA, S.; OLIVEIRA, R.; CARVALHO, A.M.; HENRIQUES, M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R. Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC-DAD-ESI/MS and evaluation of antifungal properties. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 104-110, 2013.

BARROSO, K.M.A. **Avaliação da eficácia do fitoterápico a base de *Cymbopogon citratus* no tratamento da Candidose em usuários de prótese** / Keila Martha Amorim Barroso- João Pessoa –PB. 2009.

BATISTA, J. C.; SANTIN, S. M. O.; SCHUQUEL, I. T. A.; ARRUDA, L. L. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C.; Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química nova**, v. 37, n. 4, p.638-642, 2014.

BATISTA, R.S.A.; SILVA, G.S.; MACHADO, S.E.F.; VIEIRA, K.V.M. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida spp*. **Agropecuária Técnica**, v.34, n.1, p. 40-49, 2013.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.T. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, p. 21- 25, 2009.

BERNARDES, N.R.; PESSANHA, F.F.; OLIVEIRA, D.B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão Ciência e Cultura - **Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**, v. 6, n. 2, 2010.

BEZERRA, D.A.C. **Contribuição ao estudo químico de plantas tóxicas do semiárido: *Crotalaria vitelina* Ker Gawl e *Ipomoea philomega* (Vell.) House/** Denise Aline Casimiro Bezerra – João Pessoa –PB. 2013.

BRANDÃO, G.C.; KROONB, E.G.; SANTOS, J.R.; STEHMANN, J.R.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Antiviral Activity of Plants Occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 223-236, 2011.

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

BRESSAN, J. **Constituintes químicos, atividade antioxidante e citotóxica das partes aéreas de *Baccharis burchellii* Baker (Asteraceae)/** Jaqueline Bressan- Curitiba- PR. 2014.

CÁDIZ-GURREA, M.L.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; JOVEN, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatti* extract their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Research International**, v.50, p. 197-204, 2013.

CAMPANA, P.R.V.; MANSUR, D.S.; GUSMAN, G.S.; FERREIRA, D.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F.C. Anti-TNF- α Activity of Brazilian Medicinal Plants and Compounds from *Ouratea semiserrata*. **Phytotherapy Research**, 2015.

CARRAZZA, T.G.; CANABRAVA, H.A.N.; CARRAZZA, L.G.; SANT'ANA, D.S.; OLIVEIRA, M.T.; ALVES, L.R. Atividade antimicrobiana de extratos da Mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **Pubvet**, v. 5, n. 7, 2011.

CHEN, J.; MANGELINCKX, S.; HAN LU, H.; WANG, Z.; LI, W.; KIMPE, N. Profiling and Elucidation of the Phenolic Compounds in the Aerial Parts of

Gynura bicolor and *G. divaricata* Collected from Different Chinese Origins. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, 2015.

Chromatography Today, What is the difference between UHPLC and UPLC? Disponível em: http://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking_news/what_is_the_difference_between_uhplc_and_uplc/30754/>. Acesso em 19 de julho de 2016.

CLSI (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard third edition, M27-A3, Wayne, Pa, USA, 2008.

CORREIA, A.F. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida spp*** / Amabel Fernandes Correia –Brasília- DF- 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 670–3695, 2013.

CRONQUIST, A. The evolution in classification of flowering plants. **Bronx: The New York Botanical Garden**, p.555,1988.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae s.1. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.

ENDRINGER, D.C. **Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer** / Denise Coutinho Endringer-Belo Horizonte-MG. 2007.

ENDRINGER, D.C.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. NF-κB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v.16, p.1064–1069, 2009.

ENDRINGER, D.C.; VALADARES, Y.M.; CAMPANA, P.R.V.; CAMPOS, J.J.; GUIMARÃES, K.G.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C.. Evaluation of Brazilian Plants on Cancer Chemoprevention Targets In Vitro. **Phytotherapy Research**, 2009.

FATOPE, M.O.; AL-BURTOMANI, S.K.S.; OCHEI, J.O.; ABDULNOUR, A.O.; AL-KINDY, S.M.Z.; TAKEDA, Y. Muscanone: a 3-O-(1", 8", 14"-trimethylhexadecanyl) naringenin from *Commiphora wightii*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 1251-1255, 2003.

FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; CHRIST, E. Accumulation of flavonols in yellowing beech leaves from forest decline sites. **Tree Physiology**, v. 14, p. 403-412, 1994.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Evidence-Based Phytotherapy in Europe: Where Do We Stand?. **Planta Med**, v. 81, p. 962–967, 2015.

GANGA, R.M.D.; CHAVES, L.J.; NAVES, R.V. Parâmetros genéticos em progênies de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 395-404, 2009.

GELLER, F.C.; TEIXEIRA, M.R.; PEREIRA, A.B.D.; DOURADO, L.P.A.; SOUZA, D.G.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA SIMÕES, C.M.O. Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 1887–1893, 2015.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1., 1992, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1992. p. 13-27.

GOUVEA, D.R. **Estudo *in vitro* e *in vivo* dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart.(Asteraceae: Vernonieae) /** Dayana Rubio Gouvea -Ribeirão Preto- SP. 2013.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants. 2 ed. London: **Taylor & Francis**; 1999.

KALEGARI, M. **Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica, antimicrobiana e toxicológica de *Rourea indura* Planch. (Connaraceae)/** Milena K Alegari – Curitiba – PR. 2014.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.2, p. 28-286, 2013.

KENNY, O.; SMYTH, T.J.; HEWAGE, C.M.; BRUNTON, N.P. Quantitative UPLC-MS/MS analysis of chlorogenic acid derivatives in antioxidant fractionates from dandelion (*Taraxacum officinale*) Root. **International Journal of Food Science and Technology**, v.50, p.766–773, 2015.

KOLNIAK-OSTEK, J. Identification and quantification of polyphenolic compounds in ten pear cultivars by UPLC-PDA-Q/TOF-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.49, p.65–77, 2016.

KUMARI, S.; ELANCHERAN, R.; KOTOKY, J.; DEVI, R. Rapid screening and identification of phenolic antioxidants in *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v.203, p.521–529, 2016.

KYRIAKOU, E.; PRIMIKYRI, A.; CHARISIADIS, P.; KATSOURA, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; STAMATIS, H.; TZAKOS, A. G. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p.1739-1742, 2012.

LEE, DAE-YOUNG.; LYU, HA-NA.; KWAK, HO-YOUNG.; JUNG, LA-KOON.; LEE, YOUN-HYUNG.; KIM, DAE-KEUN.; CHUNG, IN-SIK. ; KIM, SUNG-HOON. ; BAEK, NAM-IN. Isolation of Flavonoids from the Fruits of *Cornus kousa* Burg. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 50, p. 144-147, 2007.

LI, P.; SENTHILKUMAR, H.A.; FIGUEROA, M.; WU, S.; FATA, J.E.; KENNELLY, E.J.; LONG, C. UPLC-QTOFMSE-Guided Dereplication of the Endangered Chinese Species *Garcinia paucinervis* to Identify Additional Benzophenone Derivatives. **Journal of Natural Products**. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00186. Acesso em: 6 jun. 2016.

LIMA, J. P. **Primeira avaliação do efeito antimutagênico *in vivo* da mangaba e identificação do seu perfil fenólico** / Juliana Pinto de Lima. Lavras- MG. 2015.

MACÊDO, D.G.; RIBEIRO, D.A.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; SOUZA, M.M.A. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.14, n.6, p.491-508, 2015.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T.D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n.1-2, p. 33-39, 2008.

MADEIRO, S.A.L.M. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas espécies de Rutaceae da flora paraibana/** Sara Alves Lucena Madeiro- João Pessoa –PB. 2016

MALDANER, I.; JARDIM, I.C.S.F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.3. p.197-207, 2012.

MARINHO, D.G.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory Activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p. 530–537, 2011.

MARQUES, S.P.D.; OLIVEIRA, I.R.; OWEN, R.W.; TREVISAN, M.T.S. Antioxidant Capacity, Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) and Acetylcholinesterase Inhibition by Extracts of the Leaves and Bark of *Hancornia speciosa* Gomes. **Human Journals August**, v.4, 2015.

MARTINS, N.B.L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida*. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MEIRA, M.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; ARAÚJO, S. V.; REGIS, T. L.; GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; Constituintes químicos de *Ipomoea subincana* MEISN. (Convolvulaceae). **Química nova**, v. 31, n. 4, p.751-754, 2008.

MENEZES, T.O.A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.F.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, n.3, p.184-91, 2009.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-99, 2000.

MOLOGNONI, L. **Desenvolvimento de metodologias para análise simultânea de ácido sórbico, natamicina, nisina e tilosina em produtos lácteos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas/** Luciano Molognoni- Florianópolis- SC. 2015.

MONACHINO, J. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa, Tucumán**, v.11, p.19-48. 1945.

MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T.M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C.H.; SOUZA BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.161–168, 2008.

MOURA, M.D.B.; AGRA, M.F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos Estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p. 273-279, 1989.

NEVES, J.S.; FRANCHIN, M.; ROSALEN, P.L.; OMAR, N.F.; SANTOS, M.A.; PASCHOAL, J.A.R.; NOVAES, P.D. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p.151–158, 2016.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; NOWICKA, P.; TELESZKO, M.; CEBULAK, T.; WOLANIN, M. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from Wild *Rubus* L. species. **Molecules**, v. 20, p. 4951-4966, 2015.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathogens**, v.9, n.9, p.1-4, 2013.

PEREIRA, A.B.D. **Contribuição para a padronização química de *Hancornia speciosa* Gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos/** Ana Bárbara Dias Pereira-Belo Horizonte – MG. 2012.

PEREIRA, A.C.; PEREIRA, A.B.; MOREIRA, C.L.; BOTION, L.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTE, S. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p.30–35, 2015.

PEREIRA, L.C.O. **Sesquiterpenos cariofilanos e outros constituintes químicos de *Evolvulus linarioides* MEISN (Convolvulaceae)**/ Laiane Caline Oliveira Pereira – João Pessoa- PB. 2016.

PFALLER, M.A.; RHOMBERG, P.R.; MESSER, S.A.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, n.4, p.303-13, 2015.

RAHMAN, M. A.; MOSSA, J. S.; AL-SAID, M.S.; AL- YAHVA, M.A. Medicinal plant diversity in the flora of saud Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**, v.75, n.2, p.149-161, 2004.

RAPINI, A. Apocynaceae (dogbane and milkweed family). In: SMITH, N. et al. (Ed.). Flowering plants of the Neotropics. **Princeton: Princeton University Press**. p. 23-26. 2004.

REICHERT, J.F.; PIZZUTTI, I.R.; DIAS, J.V.; CARDOSO, C.D. Determinação de nove fungicidas em suco de laranja por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem e extração mini-Luke. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n.4, p.251-259, 2015.

RIBEIRO, S.S.; JESUS, A.M.; ANJOS, C.S.; SILVA, T.B.; SANTOS, A.D.C.; JESUS, J.R.; ANDRADE, M.S.; SAMPAIO, T.S.; GOMES, W.F.; ALVES, P.B.; CARVALHO, A.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; PINHEIRO, M.L.B.; PRATA, A.P.N.; BLANK, A.F.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V.R.S.; COSTA, E.V.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P. Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Planta medica**, 2012.

RIBEIRO, T.P.; SOUSA, T.R.; ARRUDA, A.S.; PEIXOTO, N.; GONÇALVES, P.J.; ALMEIDA, L.M. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 76, n. 1, p. 245-249, 2016.

RODRIGUES, C.M.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA,C.A; VILLEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gomes. (Apocynaceae) In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 29, 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo, 2006.

RODRIGUES,C.M.; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L.C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS,W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray

ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 21, p. 1907–1914, 2007.

SÁ, S. de. **Fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg (Myrtaceae)** / Stone de Sá- Goiânia-GO-2014.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile componentes of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v.95, p.606-610, 2006.

SANTOS, K.T.J.; SILVA, W.C.; TORQUATO, H.F.V.; BESERRA, A.M.S-S.; ROGÉRIO SANTOS, R.A.N.; JUNIOR, I.F.S. Abordagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Cochlospermum regium* em Diferentes Metodologias (Bioautografia, Disco-Difusão e Microdiluição). **Uniciências**, v. 16, n. 1, p. 51-61, 2012.

SANTOS, S.A.O.; VILELA, C.; FREIRE, C.S.R.; NETO, C.P.; SILVESTRE, A.J.D.; Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. **Journal of Chromatography B**, v.938, p. 65– 74, 2013.

SAVIANO, A.M. **Métodos espectrofotométrico, RP-UPLC e microbiológico para determinação de linezolid em formas farmacêuticas/** Alessandro Morais Saviano- São Paulo- SP-Brasil. 2015.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROCICK, P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFSC, p. 819-846, 2004.

SENNBLAD, B.; BREMER, B. The familial and subfamilial re-lationships of Apocynaceae And Asclepiadaceae evaluated with rbcL data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 202, p.153–175, 1996.

SILVA JUNIOR, J. F. A cultura da Mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p1-192, 2004.

SILVA JUNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. (Eds.). A cultura da mangaba. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, Aracaju, p.57-74, 2006.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LIMA, M.P.; PESQUERO, J.L.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 709– 713, 2011.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**, v. 23, p.214–219, 2016.

SILVA, L.A.M. **Investigação fitoquímica da espécie *Vernonanthura tweediana* (Baker) H. Rob/** Layzon Antonio Lemos da Silva- Florianópolis - SC. 2015.

SOUZA, P.M.; ELIAS, S.T.; SIMEONI, L.A.; PAULA, J.E.; GOMES, S.M.; GUERRA, E.N.S.; FONSECA, Y.M.; SILVA, E.C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P.O. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. **Plos one**, v.7, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 703, 2008.

STRAPASSON, R.L.B. **Constituintes químicos e avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* (Asteraceae)**/ Regiane Lauriano Batista Strapasson- Curitiba- PR. 2014.

VICENTINI, A.; OLIVEIRA, A.A. Apocynacea e Asclepiadaceae. In: Flora da reserva Ducke. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**, v.1, p. 568-581, 1999.

WU, Y.; JIANG, X.; ZHANG, S.; DAI, X.; LIU, Y.; TAN, H.; GAO, L.; XIA, T. Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QQQ-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v.1017–1018, p.10–17, 2016.

YANG, ST.; WU,X.; RUI,W.; GUO,J.; FENG, Y.F. UPLC/Q-TOF-MS Analysis for Identification of Hydrophilic Phenolics and Lipophilic Diterpenoids from *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **Acta Chromatographica**, v.27, n.4, p.711–728, 2015.

ZHOU, G.; WANG, M.; LI, Y.; XU, R.; LI, X. Comprehensive analysis of 61 characteristic constituents from *Siraitiae fructus* using ultrahigh-pressure liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p.1–14, 2016.