

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PERFIL METABÓLICO DE *Syzygium malaccense* POR CROMATOGRÁFIA
CONTRACORRENTE COM ACOPLAMENTO *off-line* À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR

Aline Gomes Lopes Pinheiro

Rio de Janeiro

2020



PERFIL METABÓLICO DE *Syzygium malaccense* POR CROMATOGRÁFIA
CONTRACORRENTE COM ACOPLAMENTO *off-line* À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR

Aline Gomes Lopes Pinheiro

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Fernanda das Neves Costa

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Garrett da Costa

Rio de Janeiro

2020



INSTITUTO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS

Bloco H, CCS, 21941-902, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, R.J.

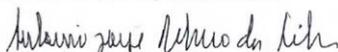
Tel./Fax (021) 2562-6791 / 2562-6512 e-mail: posgrad@ipn.ufrj.br

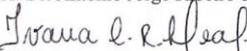


UFRJ

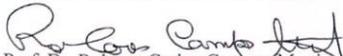
ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE ALINE GOMES LOPES PINHEIRO. Às treze horas do dia vinte e dois de janeiro de dois mil e vinte, no auditório Paulo Lacaz do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, reuniram-se os membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado da estudante **Aline Gomes Lopes Pinheiro** do Programa de Pós Graduação em Química de Produtos Naturais, orientada pela Professora Doutora: Fernanda das Neves Costa - IPPN/UFRJ e coorientada pelo Prof. Dr. Rafael Garrett da Costa - IQ/UFRJ sobre o trabalho intitulado: "**Perfil metabólico de *Syzygium malaccense* por cromatografia contracorrente com acoplamento off-line à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear**". Banca composta pelos doutores: Prof. Antonio Jorge Ribeiro da Silva - IPPN/UFRJ, Prof.^a Ivana Correa Ramos Leal - FF/UFRJ, Prof.^a Marcela Cristina de Moraes - IQ/UFF, Prof. Roberto Carlos Campos Martins - IPPN/UFRJ e Prof. André Mesquita Marques - Farmanguinhos/FIOCRUZ (Titulares) e Prof. Fernando Cotinguiba da Silva - IPPN/UFRJ e Prof. Gabriel Rocha Martins - INT (Suplentes). A Presidente da Banca Examinadora, Professora Doutora Fernanda das Neves Costa abriu os trabalhos, convidando **Aline Gomes Lopes Pinheiro** a dar início a sua exposição oral, tendo para isso cinquenta minutos. Após exposição oral de 40 min a estudante foi arguida pela Banca Examinadora durante 3 horas. Ao final da arguição, a Presidente agradeceu à Banca e solicitou aos presentes um intervalo de quinze minutos para avaliação da candidata. A Banca Examinadora ~~aprovou~~ a candidata, considerando-a ~~apta~~ a receber o título de Doutora em Ciências. Esta é a centésima sexagésima terceira Tese de Doutorado do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que vai devidamente assinada pelos examinadores e pela Doutoranda.

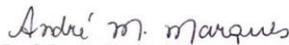
Rio de Janeiro, 22 de janeiro de 2020.


Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva


Prof.ª Dr.ª Ivana Correa Ramos Leal


Prof.ª Dr.ª Marcela Cristina de Moraes


Prof. Dr. Roberto Carlos Campos Martins


Prof. Dr. André Mesquita Marques


Aline Gomes Lopes Pinheiro

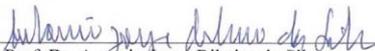
ALINE GOMES LOPES PINHEIRO
(AUTORA)

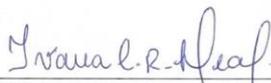
PROF.^a FERNANDA DAS NEVES COSTA
(ORIENTADORA)

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós Graduação em Química de Produtos Naturais, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

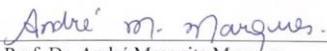

Presidente, Prof.^a Dr.^a Fernanda das Neves Costa


Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva


Prof.^a Dr.^a Ivana Correa Ramos Leal


Prof.^a Dr.^a Marcela Cristina de Moraes


Prof. Dr. Roberto Carlos Campos Martins


Prof. Dr. André Mesquita Marques

Rio de Janeiro
Janeiro/2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda minha espiritualidade, que me guiou até aqui, me dando sabedoria e saúde;

À memória de minha mãe, Dona Cleide, que infelizmente não pôde presenciar de forma física a conclusão desta etapa em minha vida, mas tenho a certeza de que está comigo, me guardando e me guiando sempre;

Ao meu pai, Sr. Edson, por ser um pai amoroso, por ser meu maior incentivador a seguir nessa carreira acadêmica. E mesmo sem a oportunidade de estudar, entende com tamanha propriedade a importância da educação na vida das pessoas;

Ao meu parceiro de vida, Diego Pinheiro, ao qual poderia escrever páginas e páginas para exaltar todo o carinho, dedicação, cuidado e paciência direcionados a mim. Por sempre apoiar minhas escolhas e posicionamentos, pelos conselhos e orientações, por ser realmente e sem sombra de dúvidas o meu porto seguro. Amo você;

Aos meus irmãos Wellington e Adriana por toda a dádiva da convivência entre irmãos, por nossas diferenças que nos ensinam tanto e pela ajuda e apoio nesse período longe de casa;

Às minhas cunhadas Letícias. Letícia Mitsugui pelas conversas, pela companhia e pelos sobrinhos maravilhosos; Letícia Matias e marido Kim Rocha sempre dispostos a me ajudar, não esquecerei da presença de vocês nos momentos difíceis que passei durante esses anos;

Aos meus sogros, Dona Vera e Sr. João por me receberem em sua família de forma tão carinhosa e pela disposição em colaborar com a minha pesquisa;

Aos meus sobrinhos Caio Hideki e Vitor Akio, e meu enteado Davi Pinheiro que são bênçãos na minha vida;

À família “Souza Pereira” por me acompanhar desde o Ensino Médio, e por me proporcionar umas das pessoas mais importantes na minha vida, minha grande amiga Márcia. E também à Luciene pelo apoio e hospedagem no Rio de Janeiro, pelos passeios e pela companhia agradável;

Aos amigos, Shelly Braum, Luanna Cristina, Edvan Mouzer, Adriano Navarro, Monique Sousa e Kenner Adolfo pelas noites descontraídas e por toda amizade durante esses anos;

Ao grupo das “Princesas” por todo apoio, conversas, distrações e confidencialidades ao longo desses anos;

À equipe PROPESP – IFRO responsável pelo projeto DINTER em Química, principalmente aos envolvidos diretamente, Gilmar Alves, Gisele Caroline e Michele Noé;

Ao *campus* Cacoal, principalmente ao diretor geral e amigo pessoal, Davys Sleman pelo apoio incondicional nessa jornada acadêmica;

Ao técnico em laboratório Bruno Henrique por todo apoio e colaboração;

Aos amigos do laboratório André Athayde, Aline Wuillda, Gabriella Cruz e Marília Souza pelas conversas e conhecimentos compartilhados;

A todos os professores do IPPN que acolheram os “alunos DINTER” e fizeram parte deste projeto;

A todos os técnicos do IPPN, principalmente ao Jônatas Milato e João Paulo;

À professora Gilda Leitão, ao professor Raphael Salles e aos colegas do lab. Fito CCC, pelo primeiro contato com a cromatografia contracorrente;

Aos colegas do IFRO que embarcaram nesta empreitada DINTER, e principalmente aos que chegaram até aqui comigo: Camila Abrão, José Assis, Luís Fernando e Renato Zan;

À minha orientadora Prof^a. Fernanda Neves por toda dedicação, acolhimento e ensinamentos tanto científico quanto de vida que levarei comigo e não me esquecerei de toda a generosidade dispensada a mim durante esses anos;

Ao meu coorientador Prof^o. Rafael Garrett por toda paciência em seus ensinamentos;

Ao Prof^o. Ricardo Borges pelas análises de RMN e colaboração no que foi preciso.

Dedico à minha família.

RESUMO

PINHEIRO, Aline Gomes Lopes. **Perfil metabólico de *Syzygium malaccense* por cromatografia contracorrente com acoplamento *off-line* à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.** Rio de Janeiro, 2020. Tese (doutorado em Química de Produtos Naturais) – Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais Walter Mors, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Syzygium malaccense (L.) Merr. & L. M. Perry (sinónimias: *Eugenia malaccensis*, *Jambos malaccensis*) é uma planta nativa da Malásia, que pode atingir de 12 a 20 m de altura, com tronco reto, copa densa e formato piramidal. É popularmente conhecida como jambeiro e seu fruto como “jambo vermelho”. No Brasil, é encontrada, principalmente, nas regiões Norte, Nordeste e regiões quentes do Sudeste. Os estudos sobre o perfil químico da *S. malaccense*, são relativamente escassos. Porém, sabe-se que as folhas do jambeiro apresentam substâncias como flavonoides, ácidos fenólicos e triterpenos. As substâncias fenólicas são responsáveis pelas características antioxidantes descritas para a espécie, bem como os flavonoides miricetina e miricitrina são os responsáveis pelo fator anti-hiperglicêmico relatado. Neste trabalho, obteve-se o perfil metabólico de *S. malaccense* por meio da cromatografia em contracorrente (CCC), que é uma técnica de partição líquido-líquido na qual a fase estacionária é retida no aparelho usando apenas força centrífuga. O princípio fundamental da separação envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis. Devido à ampla faixa de polaridade dos compostos da amostra, foi empregado um sistema de solvente trifásico (SST) com modo de eluição em gradiente. Poucos SSTs são descritos na literatura devido às combinações limitadas de solventes que formem três fases estáveis em uma proporção de volumes convenientes. O SST *n*-hexano-acetato de etila-acetonitrila-água 2:1:1:1 (v/v/v/v) utilizando eluição em modo gradiente por etapas gerou 120 frações. As frações ímpares foram submetidas a espectrometria de massas de alta resolução sequencial (HRMS/MS) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando nos modos positivo e negativo na faixa de varredura de *m/z* 100–2000 e também por ressonância magnética nuclear (RMN), como forma de detecção através do acoplamento *off-line*. Os resultados obtidos por HRMS/MS foram processados pelos *softwares* MS-Dial e MZmine para a identificação das substâncias. As frações obtidas foram analisadas no modo de injeção de fluxo na sequência de recuperação do CCC. Estudos de desreplicação para os dados de espectrometria de massas foram realizados comparando os dados de MS e MS/MS com os disponíveis em bancos de dados públicos (MoNA) e comerciais (NIST MSMS), bem como com as substâncias previamente já isoladas descritas na literatura para o gênero *Syzygium*. Essa metodologia permitiu o fracionamento rápido e a detecção de 81 substâncias. Os dados de RMN forneceram confirmação de estruturas e a posição de substituintes. Foi possível classificar os metabólitos identificados nas folhas de *S. malaccense* como flavonoides, ácidos orgânicos, terpenoides e lipídeos como principais classes de compostos encontrados. A combinação de purificação preparativa por gradiente CCC e análises analíticas de frações ESI-HRMS/MS e RMN facilita e inova o estudo fitoquímico pelo fracionamento de substâncias com diferentes polaridades e identificação de substâncias em uma mistura complexa de forma simultânea.

Palavras-chave: HSCCC, ESI-HRMS/MS, RMN, *Syzygium malaccense*, Myrtaceae, Sistema de solventes trifásico, Eluição em modo gradiente.

ABSTRACT

PINHEIRO, Aline Gomes Lopes. **Metabolite profiling of *Syzygium malaccense* by countercurrent chromatography coupling off-line mass-spectrometry and nuclear magnetic resonance.** Rio de Janeiro, 2020. Thesis (PhD in Chemistry of Natural Products) – Walter Mors Institute of Research on Natural Products, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Syzygium malaccense (L.) Merr. & L. M. Perry (synonyms: *Eugenia malaccensis*, *Jambos malaccensis*) is a plant native to Malaysia, which can reach 12 to 20 m in height, with a straight trunk, dense crown and pyramidal shape. It is popularly known as jambeiro and its fruit as “red jambo”. In Brazil, it is found mainly in the North, Northeast and warm regions of the Southeast. Studies on the chemical profile of *S. malaccense* are relatively scarce. However, it is known that the leaves of the jambeiro contain substances such as flavonoids, phenolic acids and triterpenes. Phenolic substances are responsible for the antioxidant characteristics described for the species, as well as the flavonoids myricetin and myricitrin are responsible for the reported anti-hyperglycemic factor. In this work, metabolite profiling of *S. malaccense* was performed by countercurrent chromatography (CCC). CCC is a liquid-liquid partition technique in which the stationary phase was retained in the apparatus using centrifugal force only. The fundamental principle of separation involves the partition of a solute between two immiscible liquid phases. Due to the wide polarity range of sample compounds, it was possible to use a three-phase solvent system (TPSS) mimicking a gradient elution mode. Few TPSSs were described because of the limited combinations of solvents that form three stable phases in a convenient volume percentage. The TPSS *n*-hexane–ethyl acetate–acetonitrile–H₂O (2:1:1:1, v/v) was used in a normal phase gradient elution mode to fractionate and generated 120 fractions. The odd fractions were analyzed in flow injection mode in the sequence of CCC recovery by a high-resolution tandem mass spectrometer (HRMS) with an electrospray ion source operating in both positive and negative modes in the scan-range of *m/z* 100–2000 and by a NMR equipment (Bruker). Mass spectrometry dereplication studies were performed comparing MS and MS/MS data to those available in public (MoNA) and commercial (NIST MSMS) databases as well as previously isolated compounds from *Syzygium* genus. This methodology enabled the rapid fractionation and detection of 81 compounds. NMR data provided confirmation of structures and substitution position, in some cases. It was possible to classify *S. malaccense* existing substances like flavonoids, organic acids, terpenoids and glycerides as major compound classes. The combination of preparative purification by gradient CCC and analytical ESI-HRMS/MS and NMR fractions analyses facilitates and innovates the phytochemical study by the simultaneous fractionation of different polarity compounds and identification of substances in a complex mixture simultaneously.

Keywords: HSCCC, ESI-HRMS-MS/MS, NMR, *Syzygium malaccense*, Myrtaceae, three-phase solvent system, gradient elution.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – (A) árvore jambeiro (*S. malaccense*) evidenciando sua forma piramidal e o "tapete vermelho" formado pelas pétalas de suas flores (B) flor do jambeiro (SILVA Jr.; LIMA, 2010). 34
- Figura 2** – (A) folhas do jambeiro, (B) fruto jambo-vermelho e (C) parte interna do jambo-vermelho (polpa branca, carnuda e uma semente). Fonte: A autora. 35
- Figura 3** – Estrutura básica C6-C3-C6 dos flavonoides..... 38
- Figura 4** – (a) unidade isoprênica; (b) isopreno; (c) difosfato de isopentenila; (d) difosfato de dimetilalila. 40
- Figura 5** – Esquema do sistema de equilíbrio hidrostático utilizado em CCC. Figura adaptada (FRIESEN, 2016)..... 45
- Figura 6** – Bombeamento da FM pelos cartuchos, passando pela FE na direção centrífuga se for a fase mais densa (modo descendente) ou na direção centrípeta se for a menos densa (modo ascendente). “g” evidencia o eixo gravitacional. Figura adaptada (FRIESEN, 2016). 45
- Figura 7** – Esquema para o sistema de equilíbrio hidrodinâmico utilizado e m CCC: (A) visão do equipamento e (B) visão do funcionamento da coluna espiral tipo J (ITO, 2005b). 46
- Figura 8** – Esquema de um equipamento com equilíbrio hidrodinâmico mostrando a distribuição das fases líquidas na coluna em espiral do equipamento com sistema hidrodinâmico em diferentes momentos do movimento (I, II, III e IV), bem como as zonas alternadas de mistura e sedimentação. Figura adaptada (ITO, 2005b). 47
- Figura 9** – Esquema do processo de separação por HSCCC de 15 padrões de substâncias em uma coluna PTFE ($V_c = 40\text{ml}$) em um sistema de equilíbrio hidrodinâmico utilizando SST. Substâncias simbolizadas pelos círculos c om numeração de 1 a 15. Fase estacionária composta pelas IP e LP. Processo 1 – eluição da UP como fase móvel, Processo 2 e 3 – eluição da IP como fase móvel e processo 4 – LP como fase móvel (processo de extrusão) (YANAGIDA et al., 2007). 49

Figura 10 – Componentes de um espectrômetro de massa. Figura adaptada (PAVIA et al., 2015; GROSS, 2011).	52
Figura 11 – Esquema representativo da ionização por <i>electrospray</i> . Figura adaptada (BARNEJEE; MAZUMDAR, 2012).	54
Figura 12 – Esquema do espectrômetro de massas modelo <i>Q-Exactive Plus</i> , Thermo Scientific. Figura adaptada (LUGÃO, 2012).	55
Figura 13 – Destaque em cinza para localização do município de Cacoal no estado de Rondônia, Brasil. Fonte: (SILVA; KATSURAGAWA, 2011).	60
Figura 14 – Gráfico de correlação entre as etapas da corrida e a fase móvel utilizada. Fase estacionária = fase inferior do SST, primeira etapa FM = fase superior do SST, segunda etapa FM = fase intermediária do ST, terceira etapa = extrusão. Fluxo utilizado = 2,5 mL/min. Cada etapa utilizou o volume equivalente a coluna utilizada (98 mL) (Vc).	63
Figura 15 – Modo de eluição para separação dos constituintes do extrato bruto de folhas de <i>S. malaccense</i>	64
Figura 16 – Placas de testes dos sistemas de eluentes (1) AcOEt-Acetona-H ₂ O, 25:15:10 (v/v), (2) BuOH-Ac. Acético-H ₂ O, 5:1:4 (v/v) e (3) BuOH-Ac. Acético-H ₂ O, 4:1:5 (v/v), observadas por UV de onda longa e curta e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v).	66
Figura 17 – Placa eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H ₂ O, 25:15:10 (v/v) observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v), evidenciando as bandas cromatográficas majoritárias.	67
Figura 18 – Cromatograma CLAE do EBFJ obtido no comprimento de onda $\lambda = 365$ nm, evidenciando aproximadamente cinco picos majoritários (1-5). Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 5%; 30 min – 50%; 33 min – 100%; 37 min – 100%; 40 min – 5% e 45 min – 5%.	68

Figura 19 – Espectros de UV para os picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma por CLAE do EBFJ.	68
Figura 20 – Sistema de solventes trifásico H formando apenas duas fases e sistemas de solventes trifásicos: E, F, G, I, J formando uma espécie de emulsão na fase intermediária (setas vermelhas indicam a emulsão formada).	70
Figura 21 – Sistemas de solventes trifásicos: B, C, L, com proporções inadequadas para ser um candidato a sistema de solventes para particionamento CCC.	71
Figura 22 – Sistemas de solventes trifásicos que mais se enquadram nos preceitos de escolha de sistema de solventes a serem usados em particionamentos por CCC: A, D e K.	71
Figura 23 – Partição ideal dos analitos entre as fases do sistema trifásico. UP = fase superior, IP = fase intermediária e LP = fase inferior.	72
Figura 24 – Placa CCD eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H ₂ O, 25:15:10 (v/v), observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v). Na identificação de cada ponto na placa CCD, a letra maiúscula indica o SST correspondente e as letras minúsculas s (fase superior), m (fase intermediária) e i (fase inferior). Nesta placa estão disponíveis os SSTs de A-I.	73
Figura 25 – Placa CCD eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H ₂ O, 25:15:10 (v/v), observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v). Na identificação de cada ponto, a letra maiúscula indica o SST correspondente e as letras minúsculas s (fase superior), m (fase intermediária) e i (fase inferior).	73
Figura 26 – Placa CCD resumo com os SSTs A, D e K e suas respectivas fases (superior, intermediária e inferior), eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H ₂ O, 25:15:10 (v/v), observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v).	74
Figura 27 – Cromatograma CLAE das fases superiores dos SSTs A (STAS), D (STDS) e K (STKS) no comprimento de onda $\lambda = 280$ nm. Eluição em modo gradiente, sendo o solvente	

A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10µl e concentração da amostra 2,5 mg/ mL. 74

Figura 28 – Cromatogramas obtidos por CLAE das fases intermediárias dos SSTs A (STAM), D (STDM) e K (STKM) no comprimento de onda $\lambda = 280$ nm. Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10µl e concentração da amostra 2,5 mg/ mL. 75

Figura 29 – Cromatogramas obtidos por CLAE das fases inferiores dos SSTs A (STAI), D (STDI) e K (STKI) no comprimento de onda $\lambda = 280$ nm. Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10µl e concentração da amostra 2,5 mg/ mL..... 75

Figura 30 – CCD com as frações ímpares obtidas por CCC do EBFJ a partir do SST A. Sistema de eluição utilizado (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v). Revelada por luz UV de onda curta e longa e revelação química com vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v) e aquecimento. Pontos destacados na CCD para demonstração da complexidade do extrato. 79

Figura 31 – CCD com as frações ímpares obtidas por CCC do EBFJ a partir do SST D. Sistema de eluição utilizado (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v). Revelada por luz UV de onda curta e longa e revelação química..... 80

Figura 32 – CCD com as frações ímpares obtidas por CCC do EBFJ a partir do SST K. Sistema de eluição utilizado (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v). Revelada por luz UV de onda curta e longa e revelação química..... 81

Figura 33 – Gráfico do “*cromatograma de massas*” obtido por injeção em fluxo das frações obtidas no particionamento CCC do EBFJ no espectrômetro de massas. 83

Figura 34 – (A) “ <i>cromatograma de massas</i> ” obtido no modo negativo, com destaque para o minuto ~102 que equivale a fração 47 do fracionamento por CCC; (B) espectro de massas equivalente a fração 47; (C) espectro de massas MS/MS relativo ao íon m/z 331,04573 [M-H] ⁻ . (D) “ <i>cromatograma de massas</i> ” obtido no modo positivo, com destaque para o minuto ~102 que equivale a fração 47 do fracionamento por CCC; (B) espectro de massas equivalente a fração 47; (C) espectro de massas MS/MS relativo ao íon m/z 333,05998 [M+H] ⁺	84
Figura 35 – Estruturas moleculares dos triterpenoides pentacíclicos: ácido ursólico e ácidos oleanólico.	85
Figura 36 – (A) Espectro de massas MS/MS, modo positivo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial, do ácido oleanólico e/ou ursólico.	86
Figura 37 – Ácidos graxos octadecanoides, insaturados, contendo grupos hidroxilas ou hidroperóxidos identificados no EBFJ.	86
Figura 38 – (A) Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial referente à substância 13-HODE. (B) Expansão do espectro MS/MS referente à substância 13-HODE.	87
Figura 39 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial referente à substância 13-HOTrE.	88
Figura 40 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial referente à substância 9-HPODE.	88
Figura 41 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial referente à substância 9-HpOTrE.	89
Figura 42 – Estrutura molecular e espectro de massas MS/MS, modo negativo, da substância ácido malíngico.	89
Figura 43 – Estruturas moleculares dos ácidos anacárdicos.	90
Figura 44 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial do ácido anacárdico (C15:0).	91

Figura 45 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo do ácido anacárdico (C17:3).	91
Figura 46 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo do ácido anacárdico (C17:1).	92
Figura 47 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo do ácido anacárdico (C15:1).	92
Figura 48 – Estruturas moleculares das substâncias 9-Epiblumenol B e Blumenol C hexosídeo.....	93
Figura 49 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial do 9-Epiblumenol B.	93
Figura 50 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, do Blumenol C hexosídeo.	94
Figura 51 – Estruturas moleculares dos ácidos monocarboxílicos alifático (ácido e-metilbut-2-enoico) e aromático (ácido benzoico).	95
Figura 52 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial, do ácido 3-metil-but-2-enoico (ácido senecioico).	95
Figura 53 – Estruturas químicas dos ácidos monocarboxílicos de cadeia cíclica.	95
Figura 54 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial, do ácido 3-dehidrochiquímico.....	96
Figura 55 – Espectros de massas MS/MS do ácido chiquímico (superior) e ácido 3-dehidroquínico (inferior).	97
Figura 56 – Estruturas químicas dos ácidos dicarboxílicos alifáticos identificados.	98
Figura 57 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial, do ácido tartárico.	98
Figura 58 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do tartarato de metila.	99
Figura 59 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do tartarato de dimetila.	100
Figura 60 – Espectros de massas MS/MS, modo negativo, do tartarato de dietila.	100

Figura 61 – Espectros de massas MS/MS do ácido etil-málico.	101
Figura 62 – Espectros de massas MS/MS do malonato de dietila.....	101
Figura 63 – Espectros de massas MS/MS dos ácidos: (A) málico, (B) hidroxiglutárico, (C) maleico e (D) mesacônico.	102
Figura 64 – Estruturas moleculares dos ácidos tricarbóxicos identificados no EBFJ.	103
Figura 65 – Espectros de massas MS/MS, modo negativo, obtidos pelo <i>software</i> MS-Dial dos ácidos: (A) aconítico, (B) cítrico e (C) isocítrico.	104
Figura 66 – Espectro de massas MS/MS da substância citrato de isopropila, m/z 235 $[M+H]^+$	105
Figura 67 – Estrutura química da substância 4-hidroxibenzaldeído.....	105
Figura 68 – Estruturas químicas de algumas substâncias fenólicas identificadas no EBFJ.	106
Figura 69 – Espectros de massas MS/MS, no modo negativo, das substâncias (A) ácido 4-hidroxibenzoico e (B) ácido protocatecuico.....	107
Figura 70 – Espectros de massas MS/MS, no modo negativo, obtidos pelo <i>software</i> MS-Dial das substâncias (A) 2,3-dihidroxibenzoato e (B) 2,5-dihidroxibenzoato.....	108
Figura 71 – Ácidos fenólicos referentes aos hidroxibenzoicos.	109
Figura 72 – Espectros MS/MS do ácido gálico.	109
Figura 73 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, das substâncias: galato de metila (superior) e galato de etila (inferior).	110
Figura 74 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido galoilelágico.....	111
Figura 75 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido elágico.	111
Figura 76 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, do ácido metilelágico.....	112

Figura 77 – Estruturas químicas dos ácidos hidroxicinâmicos e derivados identificados no EBFJ.....	113
Figura 78 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, obtido pelo <i>software</i> MS-Dial do ácido <i>p</i> -cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico).	113
Figura 79 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, do ácido coutárico.	114
Figura 80 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido cafeico.	114
Figura 81 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido ferúlico.....	115
Figura 82 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido fertárico.....	116
Figura 83 – Estrutura molecular da antocianidina delphinidina.	117
Figura 84 – Espectro de massas da substância delphinidina.	117
Figura 85 – Estruturas moleculares da quercetina e derivados glicosilados.	118
Figura 86 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, da quercetina.	118
Figura 87 – Espectros de massas MS/MS obtidos no modo negativo pelo <i>software</i> MS-Dial das substâncias: quercetina-7- <i>O</i> -ramnosídeo (superior) e quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (inferior).	119
Figura 88 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo do derivado da quercetina-3- <i>O</i> -raminosídeo.	120
Figura 89 – Estruturas químicas da miricetina e seu derivado glicosilado miricitrina (miricetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo).	120
Figura 90 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo <i>software</i> MS-Dial nos modo de ionização negativo (A) e positivo (B) da miricetina.....	121
Figura 91 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo <i>software</i> MS-Dial nos modo de ionização negativo (A) e positivo (B) da miricitrina.	122

Figura 92 – Espectro de massas ampliado do íon precursor m/z 463,08801 para visualizar o íon m/z 317,0318.....	122
Figura 93 – Estruturas químicas das substâncias mearnsetina e mearnsitrina.	123
Figura 94 – Espectros de massas MS/MS obtidos nos modos de ionização negativo (A) e positivo (B) referentes a identificação da substância mearnsetina.	124
Figura 95 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização negativo da substância mearnsitrina (mearnsetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo).	124
Figura 96 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização positivo da substância mearnsitrina (mearnsetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo).	125
Figura 97 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização negativo referente ao derivado de mearnsetina I.	125
Figura 98 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização positivo referente ao derivado de mearnsetina II.	126
Figura 99 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo referente ao derivado de mearnsitrina I.....	127
Figura 100 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo referente ao derivado de mearnsitrina II.....	127
Figura 101 – Estruturas químicas das substâncias: europetin 3- <i>O</i> -ramnosídeo e europetin 3- <i>O</i> -galactosídeo.	128
Figura 102 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância europetin-3- <i>O</i> -ramnosídeo.	128
Figura 103 – Espectro de massas MS/MS obtidos no modo positivo para a substância europetin-3- <i>O</i> -galactosídeo.	129
Figura 104 – Estruturas moleculares de monoglicerídeos identificados no EBFJ.	130

Figura 105 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo <i>software</i> MS-Dial no modo positivo para as substâncias, (A) monolinolenina, (B) monolinoleína e (C) palmitoil-glicerol.....	131
Figura 106 – Estruturas intermediárias na síntese dos lipídios complexos identificados no EBFJ.....	132
Figura 107 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância fosforilcolina.....	132
Figura 108 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo <i>software</i> MS-Dial no modo positivo para as substâncias (A) glicerilfosforilcolina e (B) colina.	133
Figura 109 – Estrutura químicas dos lipídios alquil fosfocolina identificados no EBFJ.....	133
Figura 110 – Espectros de massas MS/MS obtidos no modo positivo pelo <i>software</i> MS-Dial para as substâncias, (A) oleoil-glicerol-fosfocolina (oleoil lisolecitina), (B) 1-estearoil-glicerol-3-fosfocolina e (C) 1-palmitoil-glicerol-3-fosfocolina.	134
Figura 111 – Estrutura químicas de lipídios identificados no EBFJ.	135
Figura 112 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância 1-(2-metoxi-octadecanil)-glicerol-3-fosfoserina.	136
Figura 113 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância linoleoil-glicerol-fosfoetanolamina.	136
Figura 114 – Espectro de massas MS/MS obtido pelo MS-Dial, no modo negativo, para substância palmitoil-glicerol-3-fosfoetanolamina.	137
Figura 115 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância palmitoil-glicerol-3-fosfato.	138

LISTA DE ESQUMSAS

Esquema 1 – Biossíntese do ácido chiquímico. Figura adaptada (DEWICK, 2012).	36
Esquema 2 – Formação do ácido cinâmico e ácido <i>p</i> -cumárico a partir de fenilalanina e tirosina. Figura adaptada (DEWICK, 2012).....	37
Esquema 3 – Esquema representativo de uma possível rota metabólica para a biossíntese do ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico. Figura adaptada (BATISTA et al., 2018).	37
Esquema 4 – Representação esquemática simplificada da biossíntese de substâncias precursoras das subclasses dos flavonoides. Figura adaptada (DEWICK, 2012).	39
Esquema 5 – Produção de diferentes terpenos a partir da condensação de unidades IPP e DMAPP. Figura adaptada (DEWICK, 2012).	41
Esquema 6 – Formação do esqualeno a partir do farnesil pirofosfato. Figura adaptada (DEWICK, 2012).....	42
Esquema 7 – Ciclização do 2,3-óxido esqualeno. Figura adaptada (DEWICK, 2012).	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Série de sistemas de eluentes testados na CCD do extrato bruto das folhas de <i>S. malaccense</i>	61
Tabela 2 – Sistemas de solvente trifásicos testados.....	61
Tabela 3 – Resumo do desempenho dos SSTs testados quanto a formação de fases e proporção de volume entre as fases.	70
Tabela 4 – Relação entre retenção das fases estacionárias e sistemas de solventes trifásicos	77
Tabela 5 – Identificação estrutural de substâncias em suas respectivas frações e os experimentos de RMN realizados.....	138
Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN para a mearnsetina.	140
Tabela 7 – Dados espectroscópicos de RMN para a quercetina.....	141
Tabela 8 – Dados espectroscópicos de RMN para a miricetina.	142
Tabela 9 – Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a mearnsetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo.	143
Tabela 10 – Dados espectroscópicos de RMN para a quercetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo.	144
Tabela 11 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido 4-hidroxicinâmico	145
Tabela 12 – Dados espectroscópicos de RMN para galato de etila.....	146
Tabela 13 – Dados espectroscópicos de RMN para ácido metilelágico.	146
Tabela 14 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido gálico.....	147
Tabela 15 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido tartárico.....	148
Tabela 16 – Dados espectroscópicos de RMN para o tartarato de dimetila.....	148

Tabela 17 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido málgico.....	149
Tabela 18 – Resumo da pesquisa bibliográfica sobre substâncias químicas de algumas espécies do gênero <i>Syzygium</i>	159
Tabela 19 – Proposta de identificação das substâncias químicas presentes nas folhas de <i>Syzygium malaccense</i>	172

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da mearnsetina (fração 47).	180
Espectro 2 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da mearnsetina (fração 47).	181
Espectro 3 – Espectro de RMN HMBC em CD_3OD (800MHz) da mearnsetina (fração 47).	182
Espectro 4 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da fração 81 para visualização dos sinais referentes a quercetina.	183
Espectro 5 – Espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da quercetina (fração 81)... ..	184
Espectro 6 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) de mistura de miricetina (representado por myr) e ácido 4-hidroxicinâmico (representado por cin) (fração 49).	185
Espectro 7 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da miricetina (fração 49).	186
Espectro 8 – Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnsetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).	187
Espectro 9 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnsetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).	188
Espectro 10 – Espectro de RMN HMBC em CD_3OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnsetina-3- <i>O</i> - β -ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).	189

Espectro 11 – Expansão de espectro de RMN HMBC em CD ₃ OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnsetina-3- <i>O</i> -β-ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).	190
Espectro 12 – Expansão de espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (800MHz) da fração 83 para visualização dos sinais referentes a quercetina-3- <i>O</i> -β-ramnosídeo (representada por “quer”) em mistura.	191
Espectro 13 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD ₃ OD (800MHz) da fração 83 para visualização dos sinais referentes a quercetina-3- <i>O</i> -β-ramnosídeo (representada por quer) em mistura.	192
Espectro 14 – Expansão de espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (800MHz) da fração 89 para visualização dos sinais referentes ao ácido tartárico (representada por tart) em mistura.	193
Espectro 15 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD ₃ OD (800MHz) da fração 89 para visualização dos sinais referentes ao ácido tartárico (representada por “tart”) em mistura.	195
Espectro 16 – Expansão de espectro de RMN HMBC em CD ₃ OD (800MHz) da fração 89 para visualização dos sinais referentes ao ácido tartárico (representada por tart) em mistura.	196
Espectro 17 – Expansão de espectro de RMN de ¹ H em CD ₃ OD (800MHz) de mistura de galato de etila (representado por et gallic), ácido malíngico (representado por mal) e ácido elágico (representado por ellagic) (fração 51).	197
Espectro 18 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD ₃ OD (800MHz) de mistura de galato de etila (representado por et gallic), ácido malíngico (representado por mal) e ácido elágico (representado por ellagic) (fração 51).	198
Espectro 19 – Expansão de espectro de RMN HMBC em CD ₃ OD (800MHz) do ácido elágico (representado por ell) em mistura (fração 51).	199

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOMe	Acetato de metila
APCI	Ionização química à pressão atmosférica, do inglês <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado / metanol- <i>d</i> 4
CI	Ionização química, do inglês <i>chemical ionization</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector por arranjo / feixe de diodos
DAHP	Ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato, do inglês <i>3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate</i>
d.i.	Diâmetro interno
DMAPP	Difosfato de dimetilalila ou pirofosfato de dimetilalila, do inglês <i>dimethylallyl diphosphate (dimethylallyl pyrophosphate)</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado / dimetilsulfóxido- <i>d</i> 6
DXP	1-desoxilulose 5-fosfato, do inglês <i>1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (deoxyxylulose phosphate)</i>
EBFJ	Extrato bruto de folhas do jambeiro (<i>Syzygium malaccense</i>)
EI	Ionização por elétrons, do inglês <i>electron ionization</i>
EIC	Cromatograma de íons extraídos, do inglês <i>extracted ion chromatogram</i>
ELL	Extração líquido-líquido
ELSD	Detector por espalhamento de luz evaporativo, do inglês <i>Evaporative light scattering detector</i>

MS	Espectrômetro de Massas/Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial – fragmentação de íons
ESI	Ionização por electrospray, do inglês <i>electrospray ionization</i>
FAB	Bombardamento de átomos rápidos, do inglês <i>Fast atom bombardment</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase Móvel
FWHM	Largura do pico à meia altura, do inglês <i>full width at half maximum</i>
Hex	<i>n</i> -Hexano
HSCCC	Cromatografia contracorrente de alta velocidade, do inglês <i>High Speed-Counter Current Chromatography</i>
IP	Fase intermediária do sistema de solvente trifásico, do inglês <i>intermediate phase</i>
IPP	Difosfato de isopentenila ou pirofosfato de isopentenila, do inglês <i>isopentenyl diphosphate (isopentenyl pyrophosphate)</i>
<i>K</i>	Coefficiente de partição
LP	Fase inferior do sistema de solvente trifásico, do inglês <i>lower phase</i>
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistido por matriz
MEV	Via do mevalonato
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
MeOH	Metanol
MTBE	Metil- <i>terc</i> -butil-éter
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida), do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)</i>
P.A.	Grau analítico de solventes
PLL	Partição líquido-líquido
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

- RP-18 Tipo de coluna para CLAE com fase estacionária inversa
- SIMS Espectrometria de massas de íon secundário, do inglês *secondary ion mass spectrometry*
- SSB Sistema de solventes bifásico
- SST Sistema de solventes trifásico
- t_R Tempo de retenção
- TMS Tetrametilsilano
- UP Fase superior do sistema de solvente trifásico, do inglês *upper phase*
- UV Ultravioleta
- V_c Volume da Coluna
- v/v Volume a volume

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	31
1.1. Plantas Medicinais	31
1.2. Árvores Frutíferas como Plantas Medicinais	32
1.3. <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L. M. Perry	33
1.4. Metabólitos Descritos para <i>Syzygium malaccense</i>	35
1.4.1. Ácidos fenólicos.....	35
1.4.2. Flavonoides.....	38
1.4.3. Triterpenos.....	39
1.5. Cromatografia Contracorrente.....	43
1.5.1. Vantagens da CCC	44
1.5.2. Histórico e tipos de CCC.....	44
1.5.3. Escolha do sistema de solventes	47
1.5.4. Sistema de solventes trifásico em CCC.....	48
1.5.5. Eluição em modo gradiente em CCC.....	50
1.6. Técnicas Analíticas Associadas à CCC na Análise de Produtos Naturais.....	51
1.6.1. Espectrometria de massas.....	52
2. OBJETIVOS	56
2.1. Objetivo Geral	56
2.2. Objetivos Específicos	56
3. METODOLOGIA	57
3.1. Solventes	57
3.2. Equipamentos	57

3.2.1. Cromatografia em camada delgada	57
3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	57
3.2.3. Cromatografia contracorrente de alta velocidade	58
3.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	58
3.2.5. Espectrometria de massas	58
3.3. Pesquisa Bibliográfica	59
3.4. Estudo Fitoquímico.....	59
3.4.1. Coleta do material botânico e obtenção do extrato bruto	59
3.4.2. Análises preliminares do extrato bruto.....	60
3.5. Fracionamento do Extrato Bruto de Folhas de <i>Syzygium malaccense</i> por CCC..	61
3.5.1. Teste de partição para seleção de sistema de solvente trifásico	61
3.5.2. Preparo do sistema de solventes e planejamento do gradiente para CCC	62
3.5.3. Determinação da retenção de fase estacionária em CCC com SST.....	62
3.5.4. Separação dos constituintes do extrato bruto de folhas de <i>S. malaccense</i> por CCC.....	63
3.6. Análises das Frações Obtidas por CCC	64
3.7. Identificação das substâncias por RMN e MSMS	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Pesquisa Bibliográfica	66
4.2. Estudo Fitoquímico.....	66
4.2.1. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico de folhas de <i>S. malaccense</i> e análise preliminar por CCD e CLAE	66
4.3. Fracionamento do Extrato Bruto de Folhas de <i>Syzygium malaccense</i> por CCC..	69
4.3.1. Teste de partição para seleção de sistema de solvente trifásico com eluição em modo gradiente.....	69
4.3.2. Análises CLAE dos sistemas de solvente trifásicos.....	74

4.3.3. Determinação da retenção de fase estacionária em CCC com SST.....	76
4.3.4. Separação dos constituintes do extrato bruto de folhas de <i>S. malaccense</i> por CCC.....	77
4.3.5. CCD das frações obtidas por CCC.....	77
4.3.6. Análise por espectrometria de massas das frações obtidas do EBFJ por CCC.....	82
4.3.7. Substâncias identificadas divididas por classe de metabólitos	85
4.3.8. Determinação estrutural de substâncias por RMN.....	138
5. CONCLUSÕES.....	150
BIBLIOGRAFIA	151
APÊNDICES	159
APÊNDICE A – Pesquisa bibliográfica das substâncias químicas de algumas espécies do gênero <i>Syzygium</i>	159
APÊNDICE B – Resultados obtidos por MS das frações por HSCCC.....	172
APÊNDICE C – Espectros de RMN ¹ H, HSQC e HMBC referentes às substâncias identificadas.....	180

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais

Todos os organismos precisam transformar e interconverter um vasto número de compostos orgânicos para que possam viver, crescer e se reproduzir (DEWICK, 2012). As plantas produzem uma quantidade imensurável de substâncias com estruturas químicas complexas que não apresentam funções bem definidas para os organismos produtores. Porém, para o ser humano, essas substâncias classificadas como metabólitos especiais (metabólitos secundários), podem apresentar relevante potencial terapêutico (KREIS; MUNKERT; de PÁDUA, 2017).

De acordo com uma estimativa aproximada, de 200.000 a 1.000.000 metabólitos secundários diferentes são produzidos no reino vegetal. Muitos desses metabólitos exibem atividade e toxidez, principalmente, contra predadores. Acredita-se que são resultado estratégico das plantas para se adaptarem e sobreviverem em diferentes nichos ecológicos, condições ambientais e invasões bióticas em seu habitat. Além disso, desenvolveram ao longo do tempo para que a planta possa alcançar o equilíbrio de adaptação em condições desfavoráveis que elas tendem a enfrentar (RAI; SAITO; YAMAZAKI, 2017).

Este processo desenvolvido pelas plantas, de sintetizar metabólitos especializados para enfrentar quaisquer desafios em relação ao seu crescimento e sobrevivência, são úteis para o ser humano, pois, há milhares de anos, são utilizados em fragrâncias, alimentos, como pigmentos, inseticidas e substâncias terapêuticas (FACCHINI et al., 2012)

O conhecimento empírico sobre plantas medicinais representa muitas vezes o único recurso terapêutico viável de algumas comunidades e/ou grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades ou manutenção da saúde é tão antigo quanto a espécie humana, e tem sido uma base para a descoberta e desenvolvimento de fitoterápicos modernos (FACCHINI et al., 2012).

Nos dias atuais, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades do mundo, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais. Várias práticas da medicina tradicional, como a *Ayurveda* (“ciência da vida”, conhecimento médico popular da Índia), *Siddha medicine* (medicina antiga da Índia), *Unani medicine* (sistema de medicina

antigo originado na Grécia), medicina tradicional chinesa, medicina tradicional japonesa, entre outras, levaram à descoberta de fármacos modernos prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (RAI; SAITO; YAMAZAKI, 2017).

A busca por novas formas terapêuticas contribui, ainda que indiretamente, para o despertar do interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002; RAI; SAITO; YAMAZAKI, 2017; FACCHINI et al., 2012).

1.2. Árvores Frutíferas como Plantas Medicinais

Os frutos em geral são abundantes quanto à presença de diferentes substâncias bioativas, incluindo fitoquímicos (ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, taninos, lignanas e estilbenos), vitaminas, minerais e fibras alimentares desempenham um papel importante na saúde humana, devido às propriedades medicinais, como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos, além de efeitos preventivos contra várias doenças crônicas (KARASAWA; MOHAN, 2018).

Pesquisas sobre ingestão de frutas tropicais vermelhas e pretas têm relatado efeitos positivos na saúde e no desenvolvimento humano. Estes frutos são fontes naturais de substâncias bioativas, principalmente antocianinas e substâncias fenólicas, o que lhes conferem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, outras partes da planta como casca, folha, flor e raízes também possuem propriedades benéficas para os seres humanos (GARZÓN et al., 2017; KARASAWA; MOHAN, 2018).

A região tropical da América do Sul produz uma quantidade considerável de frutas nativas e exóticas que podem interessar à indústria alimentícia devido ao seu valor nutricional e terapêutico, sabores agradáveis e variedade de cores. Entre estes frutos tropicais exóticos com propriedades fitoterápicas, está o jambo-vermelho, espécie *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry (BATISTA et al., 2017).

A polpa e casca frescas do jambo-vermelho apresentaram substâncias bioativas com interesse nutricional e farmacológico. A polpa é uma fonte rica de fibras solúveis e açúcares redutores; a casca contém fibras insolúveis, lipídios e antocianinas; as sementes também podem ser destacadas pelo poder antioxidante lipofílico e hidrofílico; e, finalmente, as folhas

que fornecem grandes quantidades de catequinas, quercetina e carotenoides, que possuem grande capacidade antioxidante (BATISTA et al., 2017).

1.3. *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry

O gênero *Syzygium*, com cerca de 1200 espécies, é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae. É composto por plantas do tipo árvores perenes ou arbustos, originários da África, difundido para o sul e sudeste da Ásia, sul da China, Malásia, Austrália e Nova Caledônia. Algumas espécies do gênero *Syzygium* são importantes por suas propriedades medicinais e aromáticas, e são amplamente cultivadas por seus frutos comestíveis (Soh, 2017).

Uma das espécies deste gênero mais cultivadas é a *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia). Isto se deve, principalmente, pela produção do óleo de cravo-da-índia, que é um óleo essencial amplamente empregado nas indústrias de alimentos, perfumaria e farmacêutica (NAIR, 2017).

Outras espécies populares deste gênero que são amplamente cultivadas por serem fonte de alimentos, incluem *S. aqueum* (jambo-branco), *S. cumini* (jamelão, jambolão, azeitona-preta), *S. jambos* (jambo-amarelo), *S. malaccense* (jambo-vermelho, jambo-roxo) e *S. samarangense* (jambo-rosa). Existem também várias outras espécies pouco conhecidas de *Syzygium* com grandes perspectivas de cultivo para usos comestíveis e medicinais (NAIR, 2017).

A espécie *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry (sinónímias: *Eugenia malaccensis*, *Jambos malaccensis*), é uma planta original da Malásia. No Brasil é encontrada, principalmente, nas regiões Norte, Nordeste e regiões quentes do Sudeste. A planta pode atingir de 12 a 20 m de altura, com tronco reto, a copa é densa e possui formato piramidal (SILVEIRA et al., 2017). Entre os meses de agosto a fevereiro se dá a época da florada. Os frutos desenvolvem-se desta data até a época de colheita, que compreende o período de janeiro a maio. As flores são hermafroditas, actinomorfas, diclamídeas, apopétalas ou dialipétalas, com numerosos estames vermelhos; ao caírem no solo formam um tapete vermelho, dando-lhe um aspecto de árvore ornamental (**Figura 1**) (OLIVEIRA et al., 2006; COSTA et al., 2006; FALCÃO; PARALUPPI; CLEMENT, 2002).

O fruto é drupáceo piriforme e quando maduro, apresenta coloração da casca variando de vermelho a roxo-purpúreo, possui uma só semente, polpa espessa, branca, suculenta, de sabor levemente acidificado (**Figura 2**). Além de ser uma planta fornecedora de frutos comestíveis, a espécie é empregada, na medicina popular. Suas folhas são utilizadas para

combater dores de cabeça e fígado (SILVA et al., 2011), são usadas no tratamento de doenças gastrintestinais (MELO et al., 2009), no tratamento de processos inflamatórios (Noreen, 1998), além de possuir potencial antioxidante e anti-hiperglicêmico (BATISTA et al., 2017; ARUMUGAM et al., 2014). Estudos farmacológicos demonstraram que o extrato aquoso das folhas possui forte inibição das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (OLIVEIRA et al., 2006).



Figura 1 – (A) árvore jambeiro (*S. malaccense*) evidenciando sua forma piramidal e o "tapete vermelho" formado pelas pétalas de suas flores (B) flor do jambeiro (SILVA Jr.; LIMA, 2010).



Figura 2 – (A) folhas do jambeiro, (B) fruto jambo-vermelho e (C) parte interna do jambo-vermelho (polpa branca, carnuda e uma semente). Fonte: A autora.

1.4. Metabólitos Descritos para *Syzygium malaccense*

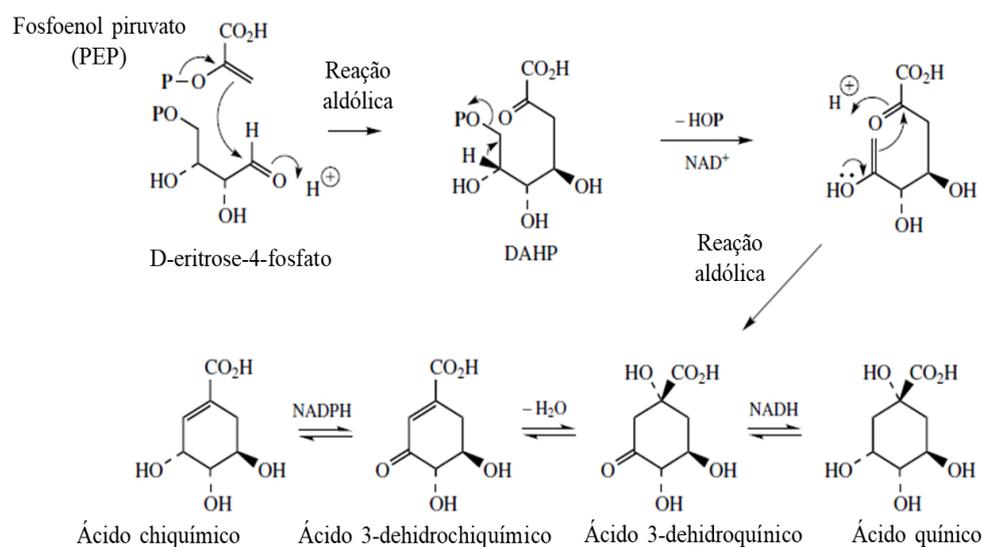
São relativamente escassos os estudos sobre o perfil químico da *S. malaccense* na literatura. Nas folhas do jambeiro, estudos relatam a presença majoritária de flavonoides, ácidos fenólicos e triterpenos (ARUMUGAM et al., 2014; BATISTA et al., 2017; NOREEN et al., 1998). Substâncias fenólicas são responsáveis pelas características antioxidantes descritas para a espécie, bem como os flavonoides, miricetina e miricitrina são os responsáveis pelo fator anti-hiperglicêmico relatado no uso das folhas de *S. malaccense* (ARUMUGAM et al., 2014; ARUMUGAM et al., 2016).

1.4.1. Ácidos fenólicos

As substâncias fenólicas possuem em suas estruturas químicas um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados, podendo estar na forma livre ou de derivados ésteres, éteres, glicosídeos entre outros grupos funcionais (LOBO; LOURENÇO, 2007). Estas substâncias estão presentes em vegetais e frutos e são provenientes do metabolismo secundário das plantas. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos. O primeiro grupo é composto pelos ácidos que possuem sete átomos de carbono (esqueleto carbônico C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo grupo é formado pelos ácidos que possuem nove átomos de carbono (esqueleto carbônico C6-C3) (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

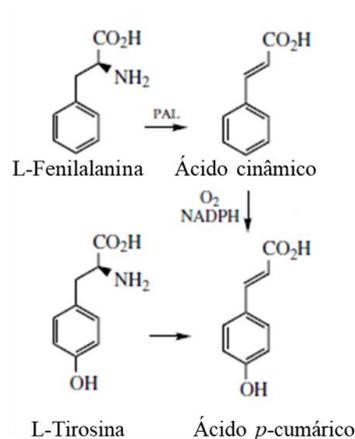
Os ácidos fenólicos são produtos aromáticos provenientes da via do ácido chiquímico. A via biossintética para formação do ácido chiquímico envolve a adição de uma molécula de

fosfoenol piruvato a um açúcar (*D*-eritrose-4-fosfato), por meio de uma reação aldólica, originando um derivado ácido com 7 carbonos, o ácido 3-desoxi-*D*-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP), seguindo por reações complexas que envolvem a eliminação de um grupo fosfato e uma reação aldólica intramolecular, gerando o intermediário, o ácido 3-dehidroquinico. Todas essas reações ocorrem sob catálise enzimática. Quando o ácido 3-dehidroquinico sofre uma redução por meio da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), forma-se o ácido quinico, e através da eliminação de água forma-se o ácido 3-dehidrochiquímico e este forma o ácido chiquímico por meio de uma redução NADPH (**Esquema 1**) (DEWICK, 2012; LOBO; LOURENÇO, 2007).



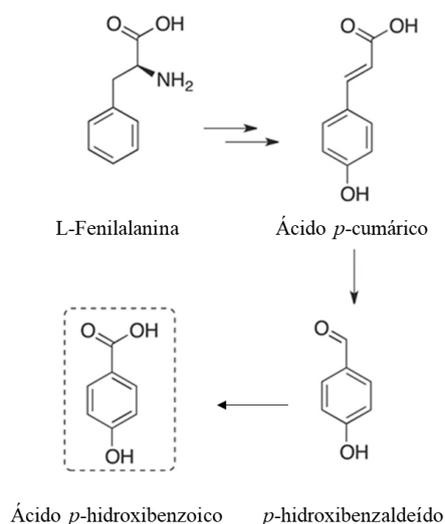
Esquema 1 – Biossíntese do ácido chiquímico. Figura adaptada (DEWICK, 2012).

Os aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina, também provenientes da via do ácido chiquímico, são os blocos de construção básicos para a formação do esqueleto carbônico C6-C3, sendo precursores de uma ampla gama de produtos naturais. A biossíntese de substâncias fenólicas inicia com a desaminação da fenilalanina para gerar o ácido cinâmico, o qual é convertido em ácido *p*-cumárico. No caso da tirosina, com a desaminação, ocorre a produção do ácido *p*-cumárico (ácido hidroxicinâmico) (**Esquema 2**) (DEWICK, 2012).



Esquema 2 – Formação do ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico a partir de fenilalanina e tirosina. Figura adaptada (DEWICK, 2012).

Alguns ácidos benzoicos simples, como ácido *p*-hidroxibenzoico, podem ser formados diretamente a partir de intermediários do início da via do chiquimato. Em uma proposta de rota biossintética, o ácido *p*-cumárico pode atuar como precursor do ácido *p*-hidroxibenzoico. Neste caso, o ácido *p*-cumárico sofre uma clivagem na ligação dupla e perde dois carbonos da cadeia lateral, formando o *p*-hidroxibenzaldeído que, por ação enzimática, forma o ácido *p*-hidroxibenzoico (**Esquema 3**) (BATISTA et al., 2018).



Esquema 3 – Esquema representativo de uma possível rota metabólica para a biossíntese do ácido *p*-hidroxibenzoico. Figura adaptada (BATISTA et al., 2018).

1.4.2. Flavonoides

Os flavonoides são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal. Ocorrem, principalmente, em sua forma livre (aglicona ou genina) ou como derivados glicosilados. Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, como por exemplo: proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais para a polinização; antioxidante; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).

Podem-se encontrar flavonoides sob diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui a unidade básica C15 que consiste em dois anéis benzênicos (fenilas), A e B, conectados por uma cadeia de três carbonos, formando a unidade C6-C3-C6. Nas estruturas tricíclicas, as unidades são chamadas núcleos A, B e C, e os átomos de carbono recebem a numeração simples em A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (**Figura 3**) (DEWICK, 2012; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).

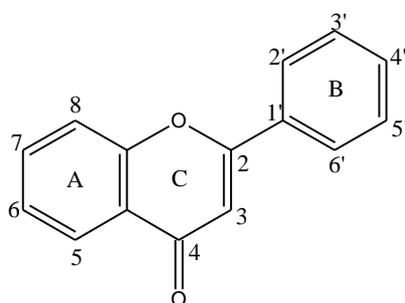
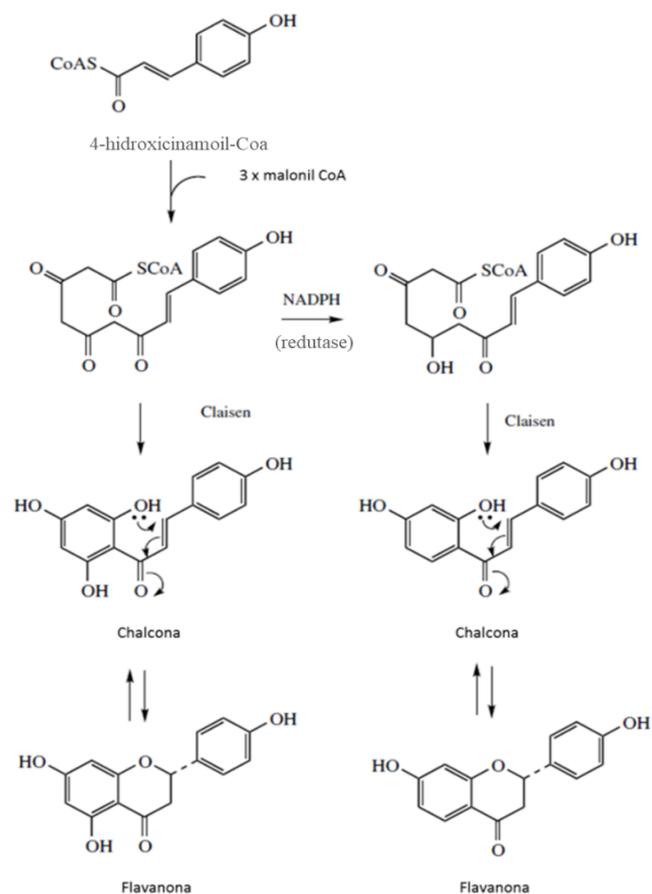


Figura 3 – Estrutura básica C6-C3-C6 dos flavonoides.

Os flavonoides têm origem biossintética mista através do precursor 4-cinamoil-CoA (proveniente da via do chiquimato) sofrendo extensão da cadeia usando 3 moléculas de malonil-CoA (provenientes da via do acetato). A estrutura formada, um policetídeo, organiza-se enzimaticamente propiciando uma condensação de Claisen, que formará a chalcona, agindo como precursora das subclasses dos flavonoides (**Esquema 4**) (DEWICK, 2012; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).



Esquema 4 – Representação esquemática simplificada da biossíntese de substâncias precursoras das subclasses dos flavonoides. Figura adaptada (DEWICK, 2012).

1.4.3. Triterpenos

Os terpenoides compõem uma classe de metabólitos secundários que possuem como bloco construtores básicos as unidades bioquimicamente ativas do isopreno (C5), normalmente, ligadas entre si pela ordem “cabeça-a-cauda” (ligação 1-4), o que caracteriza a chamada “regra do isopreno” (**Figura 4**) (DEWICK, 2012; ESCHENMOSER; ARIGONI, 2005).

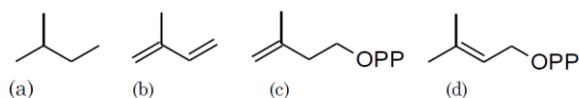
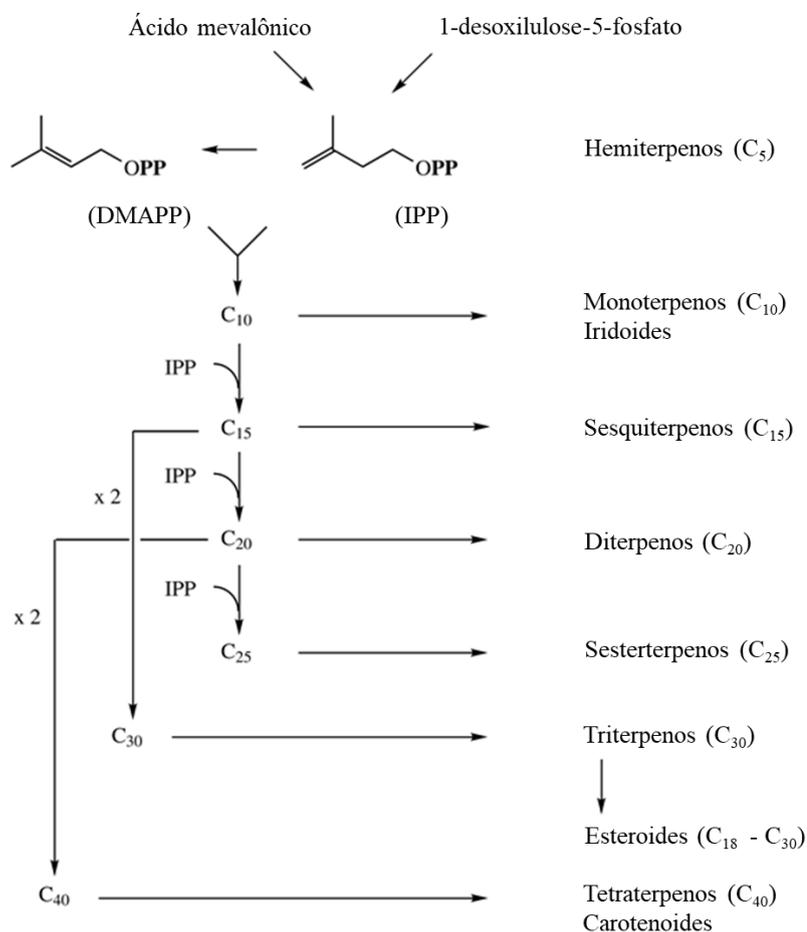


Figura 4 – (a) unidade isoprênica; (b) isopreno; (c) difosfato de isopentenila; (d) difosfato de dimetilalila.

Esse bloco de construção dos terpenos utiliza como matéria-prima o difosfato de isopentenila (IPP), que é um isopreno na forma ativa que está em equilíbrio com o seu isômero, o difosfato de dimetilalila (DMAPP). Esses últimos, por meio de duas rotas metabólicas distintas – via do mevalonato (MEV) e via do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP) – originam os diferentes terpenos a partir de sucessivas condensações dessas unidades isopreno (IPP E DMAPP), realizadas por meio da reação do tipo cabeça-cauda (terpenos regulares) ou cabeça-cabeça (**Esquema 5**) (FELIPE; BICAS, 2017).

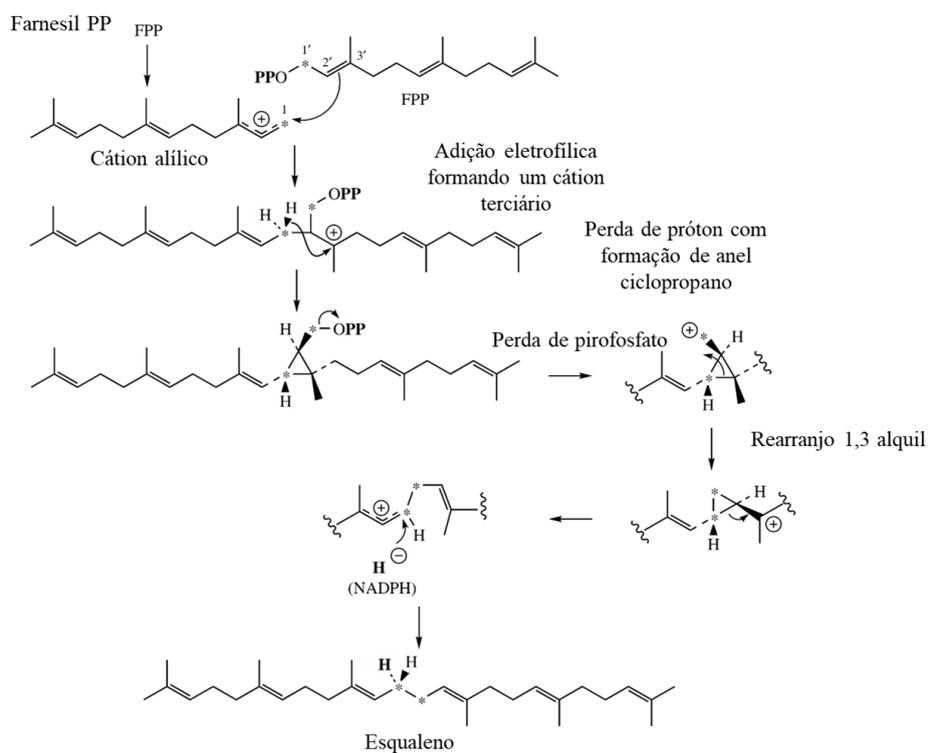


Esquema 5 – Produção de diferentes terpenos a partir da condensação de unidades IPP e DMAPP. Figura adaptada (DEWICK, 2012).

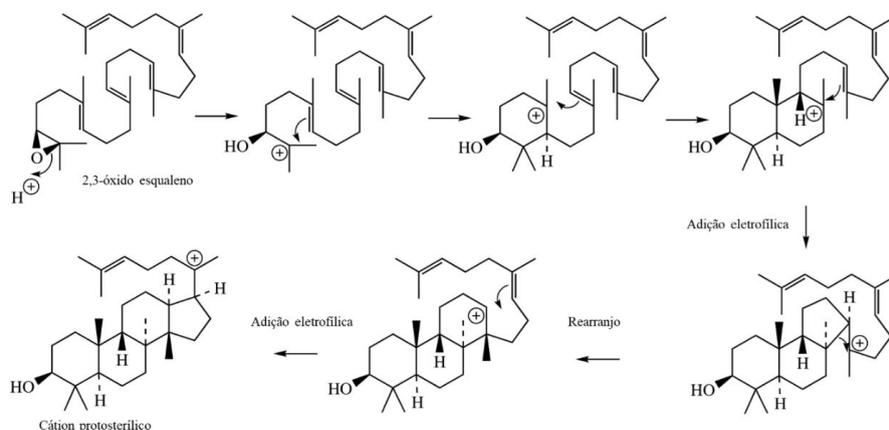
Os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno que sua estrutura possui: hemiterpenos (C-5), monoterpenos (C-10), sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), sesterterpenos (C-25), triterpenos (C-30) e tetraterpenos (C-40) (DEWICK, 2012; KREIS; MUNKERT; de PÁDUA, 2017).

O precursor dos triterpenos é o esqualeno, que contém uma cadeia de 30 carbonos formada a partir da condensação cabeça-cabeça de duas unidades de pirofosfato de farnesila (C15) que é sintetizado pela via do ácido mevalônico (**Esquema 6**). A ciclização do esqualeno

ocorre a partir do intermediário 2,3-epóxido de escaleno. A clivagem do epóxido por protonação dá origem a uma ciclização concertada, formando os cátions. Posteriormente a molécula de escaleno reage com O_2 e NADPH para gerar o 2,3-oxidoesqualeno, que adquire dobradura específica para sofrer uma série de ciclizações e rearranjos e gerar os triterpenos, que tem como precursor o cátion protosterílico (**Esquema 7**).



Esquema 6 – Formação do esqualeno a partir do farnesil pirofosfato. Figura adaptada (DEWICK, 2012).



Esquema 7 – Ciclização do 2,3-óxido esqualeno. Figura adaptada (DEWICK, 2012).

1.5. Cromatografia Contracorrente

Cromatografia contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem o uso de uma matriz de suporte sólido (ITO; BOWMAN, 1970). CCC pode ser comparada a uma versão automatizada de extração líquido-líquido (ELL), devido às repetidas partições do analito entre duas fases líquidas imiscíveis em agitação contínua (WINTERHALTER, 2007).

Em CCC, tanto a fase estacionária (FE) quanto a fase móvel (FM) são líquidas, obtidas por meio de uma mistura de solventes, formando no mínimo, um sistema de solventes bifásico (SSB) previamente equilibrado. Na maioria dos tipos de CCC, uma das fases líquidas do SSB é retida na coluna por força centrífuga, e esta fase atua como FE, enquanto a outra fase líquida, a FM passa pela FE por meio de bombeamento para dentro do equipamento (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994; MICHEL; DESTANDAU; ELFAKIR, 2013).

O princípio fundamental de separação é definido pela partição de um soluto entre as duas fases líquidas imiscíveis. A proporção relativa de distribuição de soluto entre cada uma das fases do sistema de solvente é determinada pelo seu respectivo coeficiente de partição (K) (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994). Em CCC, K é calculado pela razão entre a concentração de soluto na FE e a concentração do soluto na FM.

$$K = \frac{\text{Concentração de soluto na FE}}{\text{Concentração de soluto na FM}}$$

1.5.1. Vantagens da CCC

Em comparação a outras técnicas cromatográficas utilizadas para o isolamento e purificação de produtos naturais, a CCC apresenta algumas vantagens (CONWAY, 1990; MICHEL; DESTANDAU; ELFAKIR, 2013):

- A ausência de suporte sólido evita a adsorção irreversível de amostras, havendo recuperação total da amostra;
- É uma técnica versátil, pois os sistemas de solventes utilizados nas separações podem ser compostos por uma diversidade de solventes em inúmeras proporções, e qualquer uma das fases pode ser utilizada como fase estacionária;
- A diversidade na composição do sistema de solventes colabora com a partição de amostras de diferentes polaridades;
- A eluição pode ser feita em modo normal ou inverso, isocrático ou gradiente; separações podem ser feitas utilizando diferentes temperaturas, fluxo e rotação;
- Eficiência e rapidez – Relação de massa de amostra e quantidade de solvente (carregamento de amostra alto com baixo consumo de solvente);
- É necessário somente investimento inicial da compra do equipamento, as colunas são resistentes e duráveis, os sistemas de solventes utilizados nas separações são, em sua maioria, aquosos, além dos baixos custos de manutenção;
- Previsibilidade e reprodutibilidade – A retenção das substâncias é determinada pelo coeficiente de partição, além do aumento de escala e transferência de métodos serem bastante simplificados.

1.5.2. Histórico e tipos de CCC

Desde a introdução da CCC em 1970, a técnica passou por uma rápida evolução (ITO; BOWMAN, 1970). Nas técnicas modernas de CCC, introduzidas na década de 1980, campos de força centrífuga são usados para manter a fase estacionária retida dentro da coluna. Essas técnicas usam colunas com equilíbrio hidrostático e hidrodinâmico (COSTA; LEITÃO, 2010).

Em equipamentos hidrostáticos, o campo de força gravitacional é constante ao longo de toda a coluna e derivado do mecanismo de rotação em torno de um único eixo. A coluna consiste em câmaras/cartuchos ou tubos conectados em série, fixos ao rotor e conectados por

duto e duas juntas de vedação rotativas (selos mecânicos) como entrada e saída da FM (**Figura 5**) (COSTA; LEITÃO, 2010). A FM é bombeada pelos cartuchos, passando pela FE na direção centrífuga se é a mais densa (modo descendente) ou na direção centrípeta se é a menos densa (modo ascendente) (**Figura 6**) (SCHWIENHEER; MERZ; SCHMSBECKER, 2015).

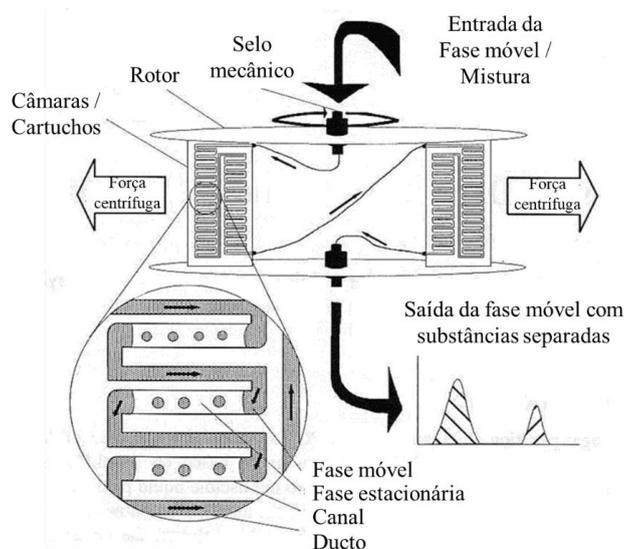


Figura 5 – Esquema do sistema de equilíbrio hidrostático utilizado em CCC. Figura adaptada (FRIESEN, 2016).

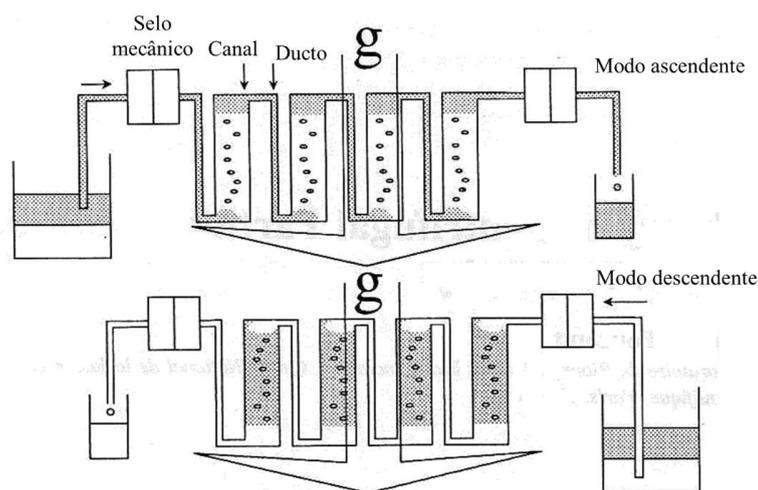


Figura 6 – Bombeamento da FM pelos cartuchos, passando pela FE na direção centrífuga se for a fase mais densa (modo descendente) ou na direção centrípeta se for a menos densa (modo ascendente). “g” evidencia o eixo gravitacional. Figura adaptada (FRIESEN, 2016).

Em equipamentos com sistema hidrodinâmico, são utilizados dois eixos de rotação que geram um campo gravitacional variável ao longo da coluna tubular espiralada. Este campo gravitacional é resultante da combinação dos movimentos síncronos de centrifugação e de rotação em torno do próprio eixo do suporte em que a coluna está envolta. Este movimento, similar ao movimento planetário, é chamado de “tipo J” (**Figura 7**) (ITO, 2005a; BÜTTENBENDER; SIMON; VOLPATO, 2018). O movimento planetário evita torcer o conjunto de tubos de fluxo, permitindo a eluição contínua através de uma coluna rotativa sem risco de vazamento e contaminação (**Figura 7**) (ITO, 2005b).

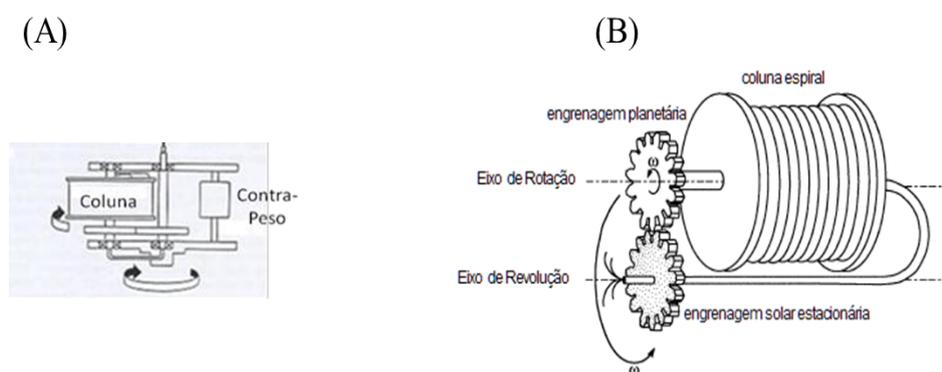


Figura 7 – Esquema para o sistema de equilíbrio hidrodinâmico utilizado e m CCC: (A) visão do equipamento e (B) visão do funcionamento da coluna espiral tipo J (ITO, 2005b).

Neste sistema, consegue-se reter uma maior quantidade de FE dentro da coluna cromatográfica, melhorando a resolução das separações. Devido ao movimento planetário das bobinas do aparelho, o campo centrífugo muda de intensidade e direção, fazendo com que zonas alternadas de mistura e sedimentação apareçam na bobina, ajudando assim o processo de separação (**Figura 8**) (COSTA; LEITÃO, 2010).

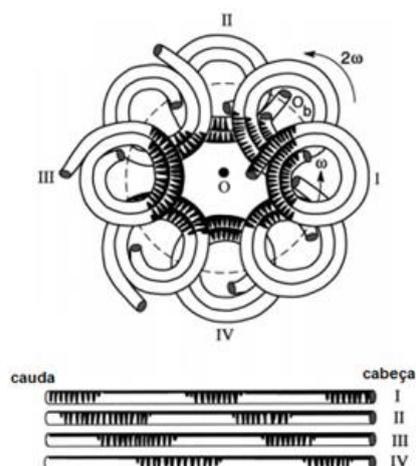


Figura 8 – Esquema de um equipamento com equilíbrio hidrodinâmico mostrando a distribuição das fases líquidas na coluna em espiral do equipamento com sistema hidrodinâmico em diferentes momentos do movimento (I, II, III e IV), bem como as zonas alternadas de mistura e sedimentação. Figura adaptada (ITO, 2005b).

1.5.3. Escolha do sistema de solventes

A eluição de analitos em matrizes adsortivas ou em suportes sólidos revestidos com fase líquida é realizada com apenas uma fase, enquanto que em CCC é utilizado sistema de solventes bifásico para a partição. A etapa da escolha do sistema de solvente é crucial para o êxito das separações em CCC. O sistema de solventes adequado deve contemplar algumas condições básicas, como por exemplo (ITO, 2005b):

- Formação de, pelo menos, duas fases;
- A amostra deve ser estável e solúvel no sistema;
- O tempo de separação das fases após agitação deve ser inferior a 30s para garantir uma retenção satisfatória da fase estacionária;
- As fases do sistema de solventes devem ter volumes próximos para evitar desperdício de solvente.

Para otimizar o tempo de escolha do sistema de solventes, alguns passos podem ser seguidos nesta etapa (COSTA; LEITÃO, 2010; ITO, 2005b):

- Busca de sistemas de solventes já descritos na literatura utilizados para a classe de substâncias a qual deseja isolar;

- Utilização de tabelas de sistemas de solventes, onde o mesmo sistema de solventes é obtido em diferentes proporções com mudança sutil de polaridade até a adaptação a amostra;
- Utilização de diagramas ternários que indicam a composição exata das fases estacionária e móvel e permitem o preparo independente de cada uma;
- Utilização de “melhor solvente”, onde se escolhe o solvente no qual a amostra é totalmente solúvel e então este será repartido entre outros dois solventes imiscíveis entre si e miscíveis no “melhor solvente”.

1.5.4. Sistema de solventes trifásico em CCC

A maioria dos sistemas de solventes bifásicos (SSB) são restritos a separação de substâncias em uma faixa estreita de polaridade. Os extratos de plantas geralmente são matrizes complexas com uma ampla faixa de polaridade. Uma alternativa para o fracionamento dessas matrizes utilizando CCC é a utilização de sistemas de solventes trifásicos (SSTs).

O uso de SSTs em fracionamentos por CCC já foi relatado na literatura (YANAGIDA et al., 2007; SHINOMIYA; ITO, 2006; SHIBUSAWA et al., 2006; SHIBUSAWA et al., 2003). Nos primeiros trabalhos utilizando SST, a eluição foi realizada nos mesmos moldes de eluição convencional do SSB. Gradualmente, tenta-se utilizar as três fases do SST de forma mais efetiva possível.

O trabalho pioneiro na aplicação de SST em cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), propôs a utilização de um SST composto por *n*-hexano – acetato de metila – acetonitrila – água nas proporções 1:1:1 (v/v/v) para a separação de taninos condensados compostos por oligômeros de catequina com diferentes graus de polimerização presentes na maçã. O grupo utilizou apenas as fases: inferior (**LP**) e a intermediária (**IP**), como fases estacionária e móvel, respectivamente, neste estudo não foram utilizadas as três fases do sistema no processo de separação (SHIBUSAWA et al., 2003). Com o desenvolvimento dos SST, o mesmo grupo constatou que as misturas de solventes orgânicos e aquosos, como: *n*-hexano-acetato de metila-acetonitrila-água; *n*-hexano-acetato de etila-acetonitrila-água e *n*-hexano-éter metil *t*-butílico-acetonitrila-água, em proporções de volume específicos, podem formar sistemas de solventes trifásicos (SHIBUSAWA et al., 2006). No mesmo ano, o sistema solvente trifásico composto por *n*-hexano – éter metil *t*-butílico – acetonitrila – água (5: 5: 7,5: 5 – v/v/v) foi aplicado na separação de vitaminas hidro e

lipossolúveis (SHINOMIYA; ITO, 2006). Neste caso, a **IP** foi utilizada como fase estacionária, e a **LP** como fase móvel, obtendo a separação das vitaminas hidrossolúveis e, em seguida, as vitaminas lipossolúveis foram eluídas após a troca da **LP** para fase superior (**UP**) como fase móvel, invertendo a direção da eluição (SHINOMIYA; ITO, 2006).

Um sistema solvente trifásico composto de *n*-hexano – acetato de metila – acetonitrila – água (4: 4: 3: 4 – v/v/v/v) foi aplicado com sucesso para a separação de 15 padrões de substâncias com uma ampla faixa de hidrofobicidade utilizando HSCCC em uma única etapa (YANAGIDA et al., 2007). Neste trabalho, foram utilizadas como fase estacionária, simultaneamente, as fases **IP** e **LP** do SST, sendo que, as fases foram bombeadas ao mesmo tempo para dentro da coluna com vazão de 1mL/min, mantendo um volume proporcional de 7:3 – **IP**: **LP**. E após o preenchimento e equilíbrio da coluna com as duas fases do SST, a primeira fase móvel foi bombeada para dentro da coluna em modo de eluição normal (sentido “cauda-cabeça”) (Figura 9).

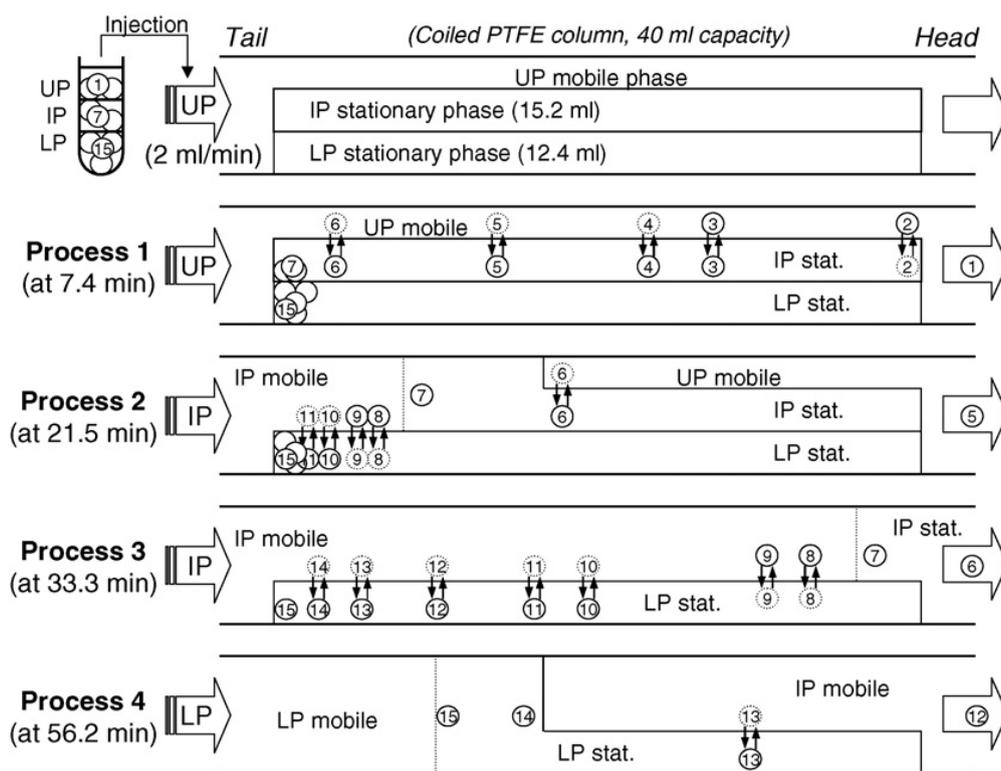


Figura 9 – Esquema do processo de separação por HSCCC de 15 padrões de substâncias em uma coluna PTFE ($V_c = 40\text{ml}$) em um sistema de equilíbrio hidrodinâmico utilizando SST. Substâncias simbolizadas pelos círculos com numeração de 1 a 15. Fase estacionária composta pelas IP e LP. Processo 1 – eluição da UP como fase

móvel, Processo 2 e 3 – eluição da IP como fase móvel e processo 4 – LP como fase móvel (processo de extrusão) (YANAGIDA et al., 2007).

Em outro trabalho, um SST composto por *n*-hexano – éter metil *t*-butílico – acetonitrila – trietilamina a 0,5% (2: 2: 3: 2 – v/v/v/v) foi aplicado eficientemente para separar metabólitos secundários com uma ampla faixa de polaridade da espécie *Dicranostigma leptopodum* (planta ornamental, também utilizada pela medicina tradicional chinesa, no tratamento de inflamações). A separação foi iniciada enchendo a coluna com uma mistura da **IP** e **LP** como fase estacionária, e em seguida, a primeira fase, utilizada como fase móvel foi a **UP** para separar os compostos hidrofóbicos. Em seguida, a fase móvel foi trocada para a **IP** para eluir os compostos moderadamente hidrofóbicos e, finalmente, os compostos polares ainda retidos na coluna, na fase estacionária, foram fracionados eluindo a coluna com a **LP**. O total de 12 picos foi eluído em um processo de 110 minutos, dentre eles, oito substâncias foram identificadas com alto grau de pureza (LIU et al., 2015).

1.5.5. Eluição em modo gradiente em CCC

Os extratos de plantas são matrizes complexas geralmente purificadas pelo uso de gradientes em várias técnicas cromatográficas. Na eluição por gradiente, a força da FM é aumentada, enquanto a composição da FE é mantida constante (LEITÃO; COSTA, 2015). Em cromatografia líquida, por exemplo, a eluição em modo gradiente é amplamente utilizada com o objetivo de melhorar a resolução e reduzir o tempo de separação (YIN et al., 2010; WU; LIANG; BERTHOD, 2013).

CCC é uma ferramenta eficaz na purificação de produtos naturais como pode ser observado em exemplos encontrados na literatura (LU et al., 2009; SALA et al., 2005; COSTA et al., 2019). Geralmente, as separações utilizando CCC são realizadas em modo de eluição isocrático, uma vez que, qualquer alteração em uma das fases de um SSB em equilíbrio, induzirá alterações de composição da outra fase. Logo, não é tão fácil realizar eluição em modo gradiente em CCC quanto em cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), por exemplo, pois as alterações na composição da FM podem alterar a FE (YIN et al., 2010; LEITÃO; COSTA, 2015; IGNATOVA et al., 2011).

Apesar de ser uma tarefa difícil, a utilização de gradiente em CCC é útil quando os componentes da amostra possuem uma ampla faixa de retenção; quando apresentam grande diferença de hidrofobicidade; quando a amostra não pode ser purificada por apenas um

sistema de solventes ou ainda quando o sistema de solvente usado para dissolver a amostra e separar as substâncias não é o mesmo (LEITÃO; COSTA, 2015).

São descritas na literatura duas formas de aumento da força da fase móvel através da modificação da composição da fase móvel: o modo gradiente linear que é proporcional ao tempo e o gradiente não linear que é feito em etapas (WU; LIANG; BERTHOD, 2013).

O gradiente linear se mostra mais brando, pois a mudança de uma fase móvel por outra é gradativa. Já o gradiente em etapas é mais brusco, devido a inserção de uma nova fase móvel em um sistema em equilíbrio. Algum tempo de reequilíbrio hidrodinâmico é necessário em ambos os casos e os resultados obtidos são bastante semelhantes. O gradiente em etapas possui a vantagem de ser mais facilmente modelado e utilizar aparatos mais simples (WU; LIANG; BERTHOD, 2013; LEITÃO; COSTA, 2015; COSTA et al., 2013).

1.6. Técnicas Analíticas Associadas à CCC na Análise de Produtos Naturais

Nos últimos anos, técnicas cromatográficas multidimensionais e estratégias de acoplamentos tem surgido para melhorar a eficiência da separação e identificação de substâncias. Técnicas cromatográficas hifenadas à espectrometria de massas (MS) podem identificar e/ou determinar a presença de analitos em matrizes complexas sem a necessidade de isolamento prévio (MICHEL; DESTANDAU; ELFAKIR, 2013).

Para que o acoplamento ocorra, é necessário que as características de cada instrumento sejam consideradas, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A CCC acoplada a técnicas analíticas fornece uma nova perspectiva ao trabalho fitoquímico devido a possibilidade de separação em escala preparativa e identificação simultâneas das substâncias isoladas. Além disso, a associação da CCC com a MS para aquisição contínua de dados estruturais provou ser uma ferramenta versátil para triagem rápida e detecção efetiva de produtos naturais (GUTZEIT; WINTERHALTER; JERZ, 2007). Por ser uma técnica cromatográfica com FM e FE totalmente líquidas, não ocorre quimissorção dos analitos e o particionamento em escala preparativa leva à recuperação completa das frações sem perda de analitos, então, a combinação do CCC preparatório com MS poderia melhorar a eficiência durante o processo de identificação de substâncias químicas em um extrato bruto de planta (COSTA et al., 2019).

1.6.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada tanto na análise qualitativa, como na identificação de substâncias químicas e/ou quantitativa, em que se deseja saber a quantidade de uma determinada substância em uma amostra.

A técnica se baseia na conversão de moléculas ou átomos presentes em íons na fase vapor, que ocorre na região da fonte de ionização, e posterior análise e separação dos íons no analisador de massas através de um método de ionização apropriado. Estes íons são, posteriormente, separados no espectrômetro de massas de acordo com a razão massa (m) / carga (z) (m/z). Os íons separados são detectados e registrados como sinais em um espectro de massas. O espectro de massa é um gráfico que relaciona a abundância (intensidade) relativa ou absoluta dos sinais de cada íon (eixo y) com os valores de m/z (eixo x) (GROSS, 2011).

O espectrômetro de massa é constituído, basicamente, por cinco componentes: unidade de entrada da amostra, onde ocorre a introdução da amostra do ambiente laboratorial (1 atm) para a pressão mais baixa do espectrômetro de massa; a fonte de ionização, onde as moléculas neutras da amostra são transformadas em íons; o analisador de massas, onde ocorre a separação dos íons de acordo com suas razões m/z ; detector, onde são gerados os sinais elétricos relacionado a chegada dos íons; e o sistema de dados, onde os sinais são registrados e processados (**Figura 10**) (PAVIA et al., 2015).



Figura 10 – Componentes de um espectrômetro de massa. Figura adaptada (PAVIA et al., 2015; GROSS, 2011).

Métodos de Ionização

Os métodos de ionização disponíveis, podem ser divididos entre: ionização em fase gasosa, eletroionização – ionização por elétrons (EI) e ionização química (CI); ionização por dessorção – bombardeamento de átomos rápidos (FAB), espectrometria de massas de íon secundário (SIMS) e ionização por dessorção a laser assistido por matriz (MALDI); e

ionização em *spray* – ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). Dentre os métodos de ionização descritos acima, dois deles serão comentados nessa seção, um por ser historicamente o mais comum e o outro por ser o utilizado neste trabalho.

O método mais simples e comum de converter a amostra em íons é a EI, em que um feixe de elétrons de alta energia (70 eV) é gerado a partir de um filamento aquecido. Assim que esses elétrons atingem o fluxo de moléculas da amostra, ocorre uma colisão que retira um elétron da camada de valência da molécula, criando um cátion radical. A maioria das moléculas da amostra não é ionizada, mas é continuamente sugada por bombas de vácuo conectadas à câmara de ionização e algumas moléculas são convertidas em íons negativos por meio da absorção de elétrons. Logo após, são criados feixes de íons que são então direcionados para o analisador de massas. O feixe de elétrons usado na ionização das moléculas possui energia superior à necessária para somente ionizar as moléculas. Como consequência, a EI apresenta vantagens na MS para pequenas moléculas orgânicas, o excesso de energia cinética transmitida para a molécula leva a uma fragmentação significativa das ligações químicas, gerando espectros com muitos fragmentos. A vantagem é que a fragmentação é reprodutível e pode-se usar diversos bancos de dados para auxiliar na identificação dos compostos. Uma das desvantagens é que a amostra deve ser relativamente volátil para que consiga entrar em contato com o feixe de elétrons na câmara de ionização. Esses fatores dificultam a análise de substâncias polares e com alta massa molecular e biomoléculas (PAVIA et al., 2015).

Na ESI, a solução contendo as moléculas da amostra é pulverizada na ponta de um tubo capilar metálico contendo um potencial de alta voltagem em sua superfície. As pequenas gotículas carregadas presentes no aerossol vão secando pelo uso de gás e aquecimento até chegar na entrada do espectrômetro de massas. Com a diminuição do tamanho das gotas, ocorre um aumento da densidade de cargas até que forças repulsivas eletrostáticas exercidas sobre a tensão superficial das gotículas as dividem em gotículas menores, consecutivamente até que íons sem solventes sejam ejetados da fase condensada para a fase gasosa (**Figura 11**) (KEBARLE; VERKERK, 2009). Os íons podem ser formados por moléculas protonadas $[M+H]^+$, no modo positivo de ionização, ou desprotonadas $[M-H]^-$, no modo negativo, além da possibilidade de formação de dímeros, $[2M+H]^+$ ou adutos, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H_2O+H]^+$, $[M-H_2O-H]^-$, entre outros (PAVIA et al., 2015; GROSS, 2011).

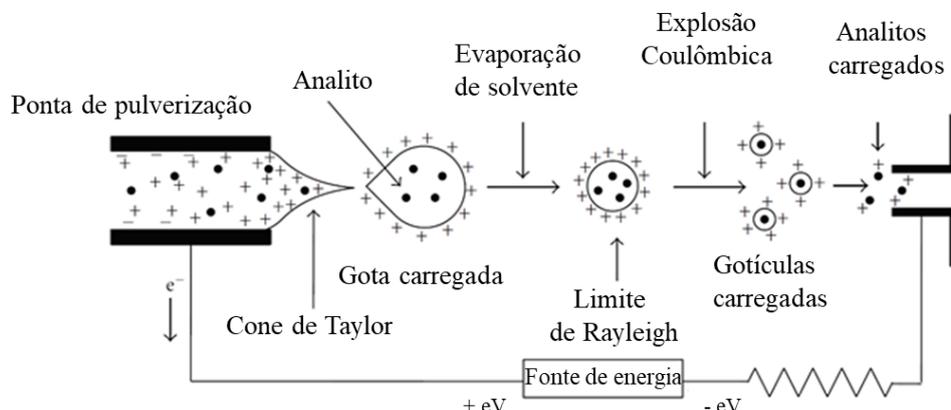


Figura 11 – Esquema representativo da ionização por *electrospray*. Figura adaptada (BARNEJEE; MAZUMDAR, 2012).

Analizador de massas

Após a ionização, o feixe de íons é direcionado para o analisador de massas. Assim como existem vários métodos de ionização, também estão disponíveis diversos tipos de analisadores de massas, podendo ser divididos entre baixa ou alta resolução. A resolução pode ser definida como a capacidade do analisador de massas em discriminar íons adjacentes e/ou resolver um único íon e geralmente é expressa em termos de FWHM (*full width at half maximum* - largura do pico à meia altura) (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).

O Orbitrap é um analisador de massas de alta resolução e exatidão do tipo armadilha de íons que consiste em dois eletrodos externos e um eletrodo central, que permitem que ele atue como analisador e detector. Os íons que entram no Orbitrap são capturados e oscilam em torno do eletrodo central e entre os dois eletrodos externos. Íons diferentes oscilam em diferentes frequências, resultando em sua separação. Medindo as frequências de oscilação induzidas por íons nos eletrodos externos, os espectros de massa dos íons são adquiridos usando a detecção de corrente de imagem (**Figura 12**) (MAKAROV; SCIGELOVA, 2010).

Neste trabalho foi utilizado um equipamento híbrido do tipo quadrupolo-orbitrap, o que permite realizar experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), devido à presença da célula de colisão HCD, adicionando mais funcionalidade ao sistema (LUGÃO, 2012).

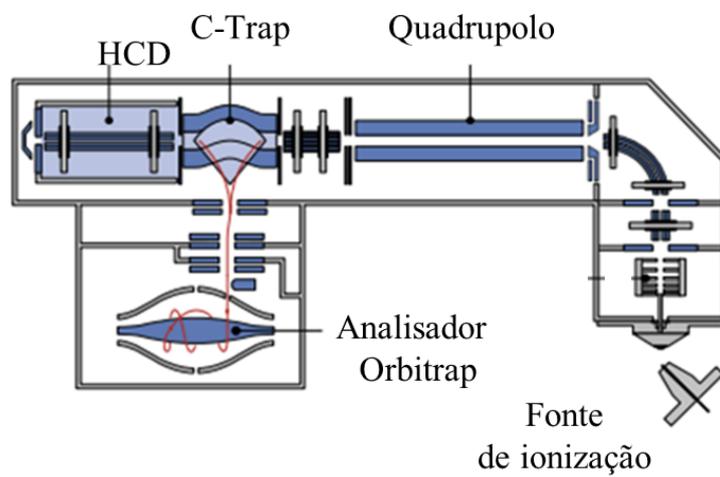


Figura 12 – Esquema do espectrômetro de massas modelo *Q-Exactive Plus*, Thermo Scientific. Figura adaptada (LUGÃO, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter perfil metabólico do extrato hidroetanólico das folhas de *Syzygium malaccense*.

2.2. Objetivos Específicos

Elaborar um banco de dados químico, com base na literatura, relacionando as substâncias já isoladas e identificadas em *S. malaccense*, bem como de outras espécies do gênero *Syzygium*;

Obter o extrato bruto hidroetanólico de folhas de *S. malaccense*;

Caracterizar o extrato bruto de folhas de *S. malaccense* por meio de diferentes técnicas cromatográficas;

Obter um sistema de solventes trifásico para o fracionamento do extrato bruto hidroetanólico de folhas de *S. malaccense* por cromatografia contracorrente em modo gradiente;

Realizar o fracionamento do extrato bruto hidroetanólico de folhas de *S. malaccense* por cromatografia contracorrente;

Identificar as substâncias do extrato bruto hidroetanólico de folhas de *S. malaccense* por meio do acoplamento *off-line* à espectrometria de massas e à ressonância magnética nuclear.

3. METODOLOGIA

3.1. Solventes

Para a obtenção de extrato bruto, das partições líquido-líquido e da realização da cromatografia em camada delgada, foram utilizados solventes em grau analítico (P.A.) (Tedia[®], Brasil). Para as análises em cromatografia líquida, cromatografia contracorrente e espectrometria de massas foram utilizados solventes em grau espectroscópico (Tedia[®], Brasil). Para ressonância magnética nuclear foram utilizados solventes deuterados: metanol-*d*4 (CD₃OD) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., EUA), e dimetilsulfóxido-*d*6 (DMSO-*d*6) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., EUA).

As soluções aquosas foram preparadas com água destilada e purificada pelo sistema de purificação de água Milli-Q[®] (18.2MΩ) (Merck[®] Millipore, Direct-Q 5, Alemanha). Todas as misturas de solventes foram feitas volume a volume (v/v).

3.2. Equipamentos

3.2.1. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placa de gel de sílica com 0,2 mm de espessura com suporte de alumínio (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm, Merck[®], Alemanha). A eluição foi feita em cuba de vidro com as paredes laterais internas recobertas com papel de filtro para aumentar a saturação do meio com os vapores do solvente. A visualização das substâncias em CCD foi feita em câmara de radiação ultravioleta (Solab, SL-204, Brasil) no comprimento de onda curta ($\lambda=254$ nm) e longa ($\lambda=365$ nm) e reveladas quimicamente com solução de vanilina 10% em etanol (v/v) seguida da solução ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v) com aquecimento em chapa aquecedora (Novatecnica[®], NT 103, Brasil).

3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada no cromatógrafo Agilent 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com uma bomba Quat Pump VL (modelo G1316), um detector de feixe de diodos (D.A.D.) 1260

(modelo G4212B). Coluna Agilent Poroshell HPH C-18 (partículas de 2,7 μm de tamanho, 2,1 x 100 mm d.i) (Agilent Technologies, EUA).

3.2.3. Cromatografia contracorrente de alta velocidade

O fracionamento por HSCCC foi realizado no equipamento Quattro HTPrep (AECS[®], Bridgend, Reino Unido). Este equipamento contém duas bobinas, cada uma contendo duas colunas de politetrafluoretileno (PTFE). A primeira bobina contém uma coluna com capacidade de 26 mL (1,0 mm d.i.) e outra com capacidade de 224 mL (3,2 mm d.i.). A segunda bobina contém uma coluna com capacidade de 95 mL (2,0 mm d.i.) e outra com capacidade de 98 mL (2,0 mm d.i.). Sua rotação é ajustável de 0 a 865 rpm com eixo de rotação horizontal. Foi utilizada uma válvula de injeção de baixa pressão (IDEX Health & Science LLC, modelo V-451, EUA) com alça de injeção de 10 mL para introdução da amostra no sistema cromatográfico. O equipamento foi conectado a uma bomba de fluxo constante Jasco PU-2089S Plus (Jasco, Japão) e a um coletor de frações modelo 2110 (Bio-rad, EUA).

3.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN das frações ímpares provenientes do HSCCC foram obtidos utilizando o espectrômetro Avance III (Bruker, EUA) à 27 °C, operando a 800 MHz para ^1H . Os δ foram expressos em ppm em referência ao sinal do metanol-*d*4 (CD_3OD) em 3,31 e 49,15 ppm para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Os espectros foram processados pelo *software* MestReNova.

Os espectros unidimensionais de ^1H foram adquiridos com o experimento noesypr1D. Já para os espectros bidimensionais HSQC (editado para multiplicidade) e HMBC (para J_{CH} de 8Hz) foram usados os experimentos hsqcetdgtpp3 e hmbcetgpl3nd, respectivamente. Estes foram adquiridos de algumas frações selecionadas a partir dos resultados dos espectros 1D.

3.2.5. Espectrometria de massas

As análises por MS foram realizadas em espectrômetro de massas de alta resolução e exatidão modelo *QExactive Plus* (Thermo Scientific) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operando nos modos de ionização positivo e negativo. Os parâmetros de

ionização da fonte foram: voltagem do *spray* 3,6 kV; temperatura capilar de 300 °C; *S-lens RF level* de 50%, vazão igual a 35 e 10 de *sheath* e *auxiliary gas*, respectivamente. As frações foram analisadas na faixa de varredura de *m/z* 100 a 2000 combinado com experimentos de MS/MS usando métodos de aquisição dependente de dados (DDA top 3) com energia de colisão variável de 15-45 V. Foi realizada uma injeção em fluxo das amostras, sem separação cromatográfica, onde uma alíquota de 10 µL foi injetada usando o injetor automático TriPlu RSH Autosampler (Thermo Scientific) em uma vazão de 150 µL.mL⁻¹ de MeOH:H₂O proporcionada pelo sistema cromatográfico Dionex UltiMate 3000. O processamento dos espectros foi realizado no *software* Thermo Xcalibur Qual Browser, no MS-Dial e no MZMine. Estes dois últimos foram utilizados para obter os dados deconvoluídos dos cromatogramas de íons extraídos (EIC) e para uso de bancos de dados para identificação de substâncias conhecidas. Os dados de MS e MS/MS do *MassBank of North America* (MoNA) e do NIST MSMS 2014, bem como o levantamento de dados sobre as substâncias previamente isolados do gênero *Syzygium* (APÊNDICE A) foram utilizados na identificação das substâncias. As propostas de identificação foram admitidas a partir de um desvio de até 5 ppm do valor de massa molecular monoisotópica e calculada para confirmação.

3.3. Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa bibliográfica consistiu em listar as substâncias previamente isoladas e identificadas, preferencialmente da espécie *Syzygium malaccense*, mas também das espécies *S. aqueum*, *S. cumini*, *S. grande*, *S. guineense*, *S. jambos*, e *S. samarangense*. A pesquisa foi realizada nas plataformas de busca científica: *SciFinder*, *ScienceDirect*, *Google Scholar* e Periódicos CAPES/MEC, utilizando as palavras de busca: nome da espécie + *chemistry* ou *phytochemistry* ou *ethnopharmacology*. Foram excluídos artigos referentes a caracterização de compostos voláteis.

3.4. Estudo Fitoquímico

3.4.1. Coleta do material botânico e obtenção do extrato bruto

As folhas de *Syzygium malaccense* foram coletadas em outubro de 2017, no município de Cacoal – Rondônia, Norte do Brasil na área da Amazônia Legal. Mapa demonstrado na **Figura 13**.

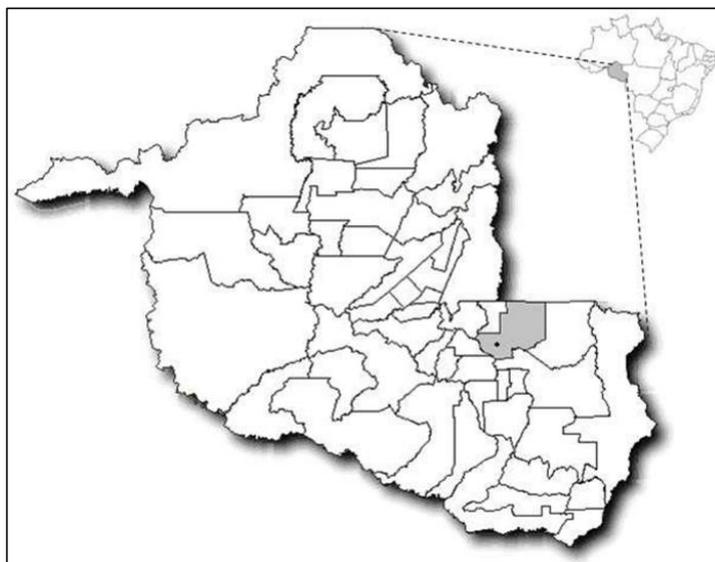


Figura 13 – Destaque em cinza para localização do município de Cacoal no estado de Rondônia, Brasil. Fonte: (SILVA; KATSURAGAWA, 2011).

As folhas de *S. malaccense* (604,38 g) foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C (Solab, modelo SL-102) e trituradas manualmente. As folhas secas e trituradas (168,66 g) foram submetidas a maceração estática a frio com uma solução de etanol-água na proporção de 7:3 (v/v) com três trocas de solvente, sendo uma troca a cada 24 horas. O extrato bruto obtido foi concentrado com o auxílio de um evaporador rotativo equipado com banho de aquecimento (Fisatom, modelo 802) a 40°C para a retirada dos solventes, sob pressão reduzida (bomba de vácuo Tecnal, modelo TE058). A água remanescente foi retirada posteriormente por liofilização (Liotop, modelo L101).

3.4.2. Análises preliminares do extrato bruto

As análises preliminares do extrato bruto das folhas de *S. malaccense* (EBFJ) foram feitas por CCD e por CLAE.

Para as análises em CCD, após a aplicação do extrato na placa, foram testadas algumas séries de eluentes, de acordo com a **Tabela 1**. A eluição foi realizada com a fase orgânica dos sistemas eluentes descritos. Além da revelação física por radiação UV ($\lambda = 254$ e 365 nm),

usou-se solução de vanilina 10% em etanol (v/v) seguida de ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v) e posterior aquecimento em chapa aquecedora.

Tabela 1 – Série de sistemas de eluentes testados na CCD do extrato bruto das folhas de *S. malaccense*.

Sistema Eluente	Solventes	V/V/V
(1)	Acetato de etila – acetona – H ₂ O	25:15:10
(2)	Butanol – ácido acético – H ₂ O	5:1:4
(3)	Butanol – ácido acético – H ₂ O	4:1:5

A análise por CLAE utilizou coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 5%; 30 min – 50%; 33 min – 100%; 37 min – 100%; 40 min – 5% e 45 min – 5%. Utilizou-se vazão de 0,3 mL/min, volume de injeção de 5 µl e concentração da amostra 2 mg/mL, diluída em metanol.

3.5. Fracionamento do Extrato Bruto de Folhas de *Syzygium malaccense* por CCC

3.5.1. Teste de partição para seleção de sistema de solvente trifásico

O teste para seleção do sistema de solvente trifásico (SST) para CCC foi realizado em frascos de vidro. Foram adicionados 10 mg de amostra em 8 mL dos sistemas de solvente previamente equilibrados, seguidos de agitação manual e decantação das fases. No total, 12 sistemas de solventes (A-L) foram testados para o EBFJ (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Sistemas de solvente trifásicos testados

SST	Solventes – v/v			
	HEX	AcOEt	ACN	H ₂ O
A	2	1	1	1
B	2	2	3	2
C	3	1	1	1
	HEX	MTBE	ACN	H ₂ O
D	1	1	2	1
E	2	1	3	2
F	2	2	3	2
G	2	3	3	2
H	3	5	5	3
	HEX	CHCl ₃	ACN	H ₂ O
I	5	1	5	5
	HEX	AcOMe	ACN	H ₂ O
J	4	4	3	4
K	2	1	1	1
L	1	1	2	1

[AG1] Comentário: Modificar isso aqui. É CH₂Cl₂

Os parâmetros utilizados para escolha do SST ideal a ser utilizado na amostra estão de acordo com os trabalhos desenvolvidos anteriormente (ITO, 2005b), bem como alguns trabalhos do grupo de pesquisa voltados para escolha de sistema de solventes em modo gradiente (COSTA et al., 2013; COSTA et al., 2015).

Dentre esses parâmetros, avaliou-se primeiramente se a combinação dos solventes formava três fases em proporções razoáveis (igualitárias) entre elas. Quando testado com a amostra, os SSTs formados deveriam fornecer valores adequados de coeficiente de partição (K) para o conjunto de analitos. O valor de K de cada amostra foi determinado visualmente por CCD e CLAE.

A análise por CLAE também foi utilizada para fornecer um perfil cromatográfico das três fases dos melhores SSTs para a amostra EBFJ o que possibilitaria a comparação entre cada fase (superior, intermediária e inferior) dos SSTs com melhor desempenho. O método utilizado no EBFJ foi otimizado para a utilização nas análises CLAE de cada fase dos SSTs. A análise por CLAE utilizou coluna com fase estacionária inversa (RP-18) e eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se vazão de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e concentração da amostra 2,5 mg/mL.

Os SSTs mais promissores foram submetidos a corrida em branco para teste de retenção de fase estacionárias.

3.5.2. Preparo do sistema de solventes e planejamento do gradiente para CCC

Os sistemas de solventes selecionados para a separação por CCC (A, D e K, **Tabela 2**) foram misturados nas proporções definidas (volume total de 1000 mL para cada SST) e equilibrados em funil de separação a temperatura ambiente. As fases superior, intermediária e inferior foram separadas pouco antes de serem utilizadas e desgaseificadas em aparelho de ultrassom (Cristófoli, China) por 15 min. A amostra foi diluída em 5 mL da fase inferior.

3.5.3. Determinação da retenção de fase estacionária em CCC com SST.

A determinação da retenção da fase estacionária (S_f) é a medida proporcional da quantidade de fase estacionária deslocada em relação ao volume total da coluna após estabelecimento do equilíbrio hidrodinâmico:

$$S_f = \frac{\text{Volume da coluna} - \text{Volume de fase estacionária deslocado} \times 100}{\text{Volume da coluna}}$$

No caso da eluição em modo gradiente, a retenção foi calculada para cada etapa a fim de se verificar a interferência da troca da fase móvel (**Figura 14**).

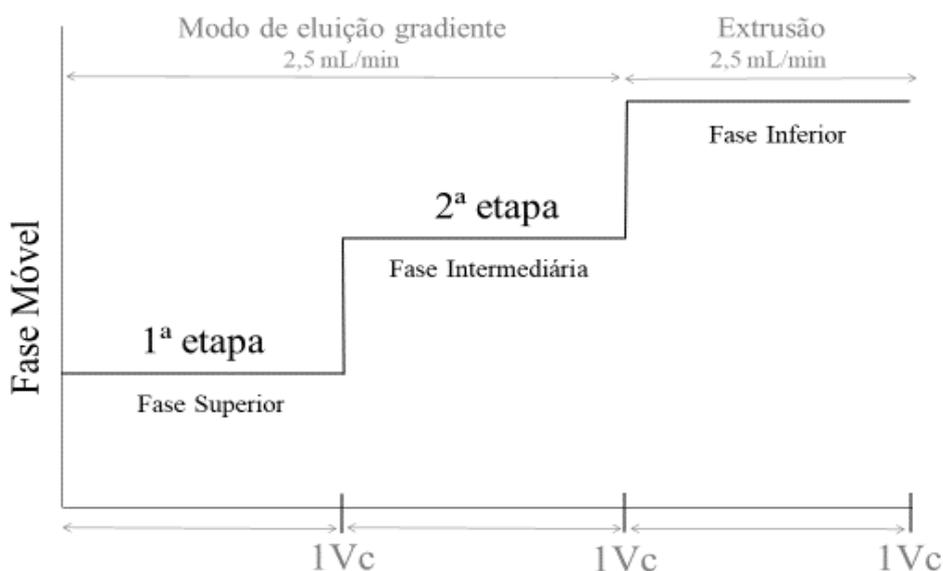


Figura 14 – Gráfico de correlação entre as etapas da corrida e a fase móvel utilizada. Fase estacionária = fase inferior do SST, primeira etapa FM = fase superior do SST, segunda etapa FM = fase intermediária do ST, terceira etapa = extrusão. Fluxo utilizado = 2,5 mL/min. Cada etapa utilizou o volume equivalente a coluna utilizada (98 mL) (V_c).

3.5.4. Separação dos constituintes do extrato bruto de folhas de *S. malaccense* por CCC

O fracionamento do extrato bruto de folhas de *S. malaccense* foi realizado de acordo com os parâmetros descritos no item 3.5.2, utilizando os SSTs A, D e K (**Tabela 2**), com modo de eluição em gradiente (**Figura 15**).

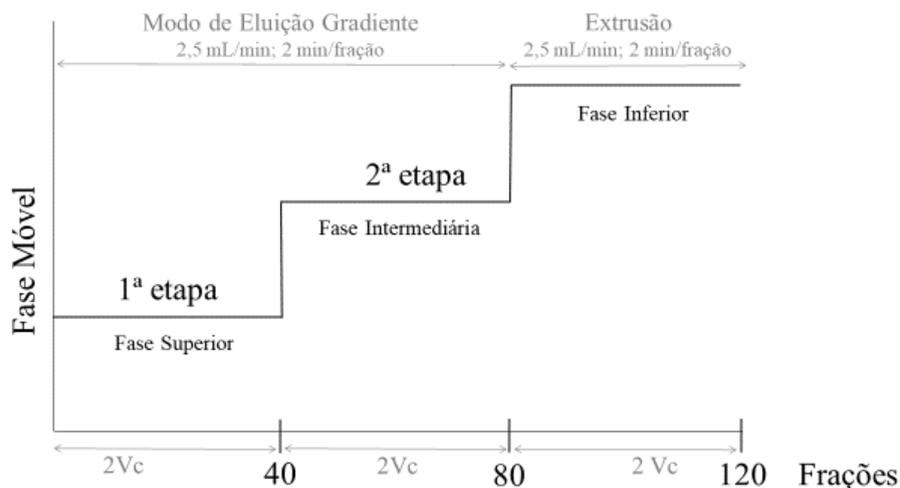


Figura 15 – Modo de eluição para separação dos constituintes do extrato bruto de folhas de *S. malaccense*.

3.6. Análises das Frações Obtidas por CCC

As frações obtidas do particionamento do EBFJ por CCC utilizando os SSTs A, D e K (total de 120 frações para cada SST) tiveram o solvente evaporado utilizando o equipamento *Speed-vac* (Thermo Fisher). As frações ímpares foram selecionadas para análise em CCD. As frações iniciais correspondentes a primeira etapa do gradiente (frações 03 – 39) foram solubilizadas em quantidades iguais de hexano e aplicadas utilizando capilar volumétrico na placa CCD. O mesmo foi feito para as frações da segunda etapa do gradiente (frações 43 – 79), porém utilizando uma solução contendo MeOH-AcOEt 1:1 (v/v) para solubilizá-las. As frações da extrusão (frações 81 – 119) foram solubilizadas em uma solução contendo MeOH-H₂O 1:1 (v/v).

Para as análises de MS e RMN, as frações ímpares do SST A foram selecionadas. As frações secas foram ressuspenidas em 600 µL de solução MeOH-AcOEt 1:1 (v/v) (primeira e segunda etapas do gradiente) ou 600 µL de solução MeOH-H₂O 1:1 (v/v) (extrusão). Após solubilizadas, alíquotas de 400 µL foram retiradas de cada fração e acondicionadas em vials para posterior análises de RMN, o restante de cada fração (alíquotas de 200 µL) foram destinadas as análises de MS. As alíquotas nos vials, tanto para RMN e MS foram secas novamente e posteriormente solubilizadas nas mesmas concentrações de acordo com a necessidade das análises.

3.7. Identificação das substâncias por RMN e MSMS

A determinação estrutural de algumas substâncias foi realizada através de métodos instrumentais de RMN de ^1H e técnicas bidimensionais (HSQC e HMBC), confirmadas por dados de MS/MS.

Os dados obtidos em MS foram processados nos *softwares* MS-DIAL e MZmine. Esses *softwares* permitem comparação com bancos de dados disponíveis e são ferramentas úteis no auxílio da identificação de substâncias.

Os dados obtidos foram comparados a dados da literatura. Numeração das substâncias entre parênteses é relativa a organização da tentativa de identificação descrita no

APÊNDICE B. As estruturas propostas como tentativas de identificações estão organizadas de acordo com as frações da CCC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pesquisa Bibliográfica

Foram relatadas 99 substâncias em 49 referências para as espécies: *S. aqueum*, *S. cumini*, *S. grande*, *S. guineense*, *S. jambos*, *S. malaccense* e *S. samarangense* (APÊNDICE A). Dessas 99, 28 foram descritas para a espécie *S. malaccense*. Dentre as quase 1200 espécies do gênero *Syzygium*, a pesquisa nas plataformas de buscas de trabalhos acadêmicos direcionou para as espécies citadas acima, devido a estas espécies serem cultivadas principalmente por oferecerem frutos comestíveis, além de apresentarem estudos farmacológicos e interesse na medicina popular (NAIR, 2017).

4.2. Estudo Fitoquímico

4.2.1. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico de folhas de *S. malaccense* e análise preliminar por CCD e CLAE

A massa do material vegetal (folhas) coletado foi de 604,38 g. Foi obtido um total de 168,66 g de material após secagem em estufa, gerando 29,04 g de extrato bruto seco. O processo extrativo apresentou rendimento de 17%.

A análise preliminar do extrato bruto foi realizada por CCD I método simples, rápido e econômico de detecção visual. Dentre os sistemas de eluentes testados, o que mostrou melhor desempenho foi o sistema (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v), apresentando melhor separação das substâncias (Figura 16).

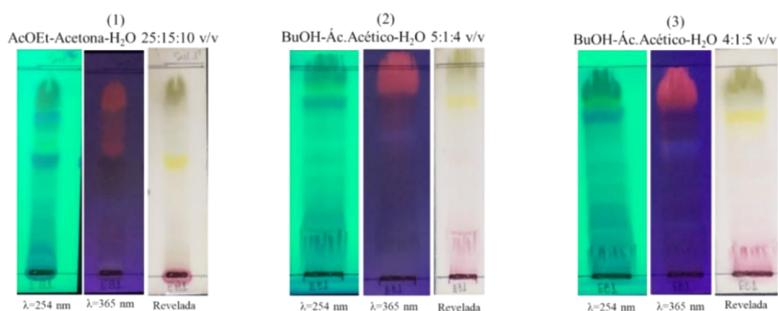


Figura 16 – Placas de testes dos sistemas de eluentes (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v), (2) BuOH-Ac. Acético-H₂O, 5:1:4 (v/v) e (3) BuOH-Ac. Acético-H₂O, 4:1:5 (v/v), observadas por UV de onda longa e curta e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v).

A placa de CCD, eluída com o sistema (1), apresentada com mais detalhes na **Figura 17**, exibiu aproximadamente nove manchas majoritárias quando reveladas com radiação UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). As manchas escuras azuladas (3, 6, 7, 8 e 9) são características de fenilpropanoides, as manchas de coloração esverdeada (1 e 4) características de clorofilas e as manchas amareladas (2 e 5) são características de flavonoides (WAGNER; BLADT, 2001).

Quando reveladas sob radiação UV no comprimento de onda longo ($\lambda = 365 \text{ nm}$) é possível observar manchas de coloração vermelho alaranjada (10 e 11) características de clorofila e a mancha de coloração azul fluorescente (13), característica de ácidos fenólicos (WAGNER; BLADT, 2001). A mancha escura (12) provavelmente equivale a mancha (6) visualizada por radiação UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Com os reveladores químicos e posterior aquecimento em placa, foi possível observar as colorações: esverdeada (14) característica de clorofila, amarelo escuro (15) evidenciando presença de flavonoides e a coloração violeta avermelhada (marsala) (16), característica da presença de açúcares (WAGNER; BLADT, 2001).

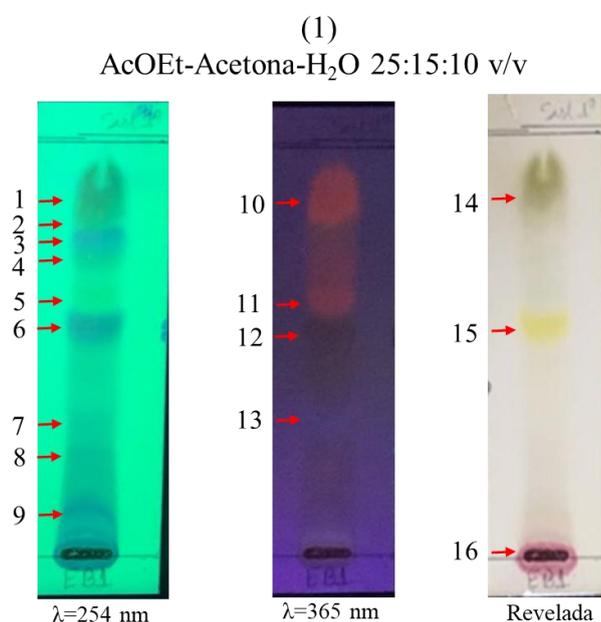


Figura 17 – Placa eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v) observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v), evidenciando as bandas cromatográficas majoritárias.

O cromatograma obtido por CLAE (**Figura 18**) apresentou aproximadamente cinco sinais majoritários quando observados no comprimento de onda $\lambda = 365$ nm (t_R (min) = 12,008 (1); 13,975 (2); 16,225 (3); 17,424 (4) e 37,643 (5)), cujos espectros de UV foram compatíveis com flavonoides, mais especificamente da classe flavonol (**Figura 19**), com exceção do pico (5) que foi inconclusivo sobre a classe da substância por UV-vis.

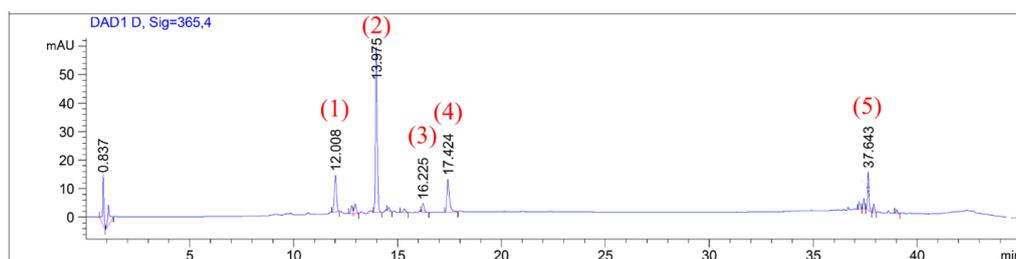


Figura 18 – Cromatograma CLAE do EBFJ obtido no comprimento de onda $\lambda = 365$ nm, evidenciando aproximadamente cinco picos majoritários (1-5). Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 5%; 30 min – 50%; 33 min – 100%; 37 min – 100%; 40 min – 5% e 45 min – 5%.

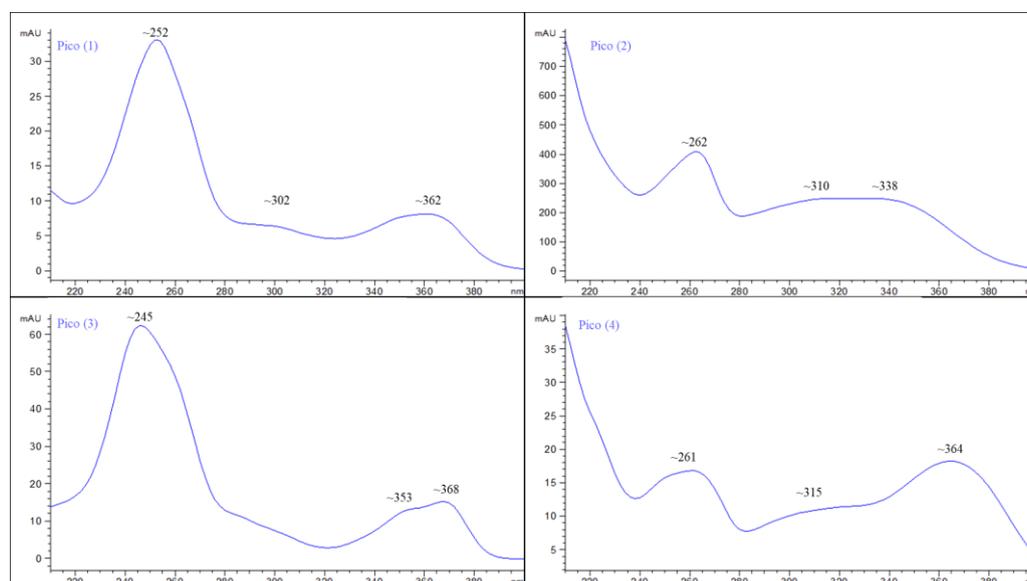


Figura 19 – Espectros de UV para os picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma por CLAE do EBFJ.

Estudos sobre identificação de flavonoides por espectrofotometria de UV mostram que, flavonas e flavonóis podem exibir duas faixas de absorção principais: a faixa I (320-385 nm) representa a absorção do anel B em conjugação com o anel C, enquanto a banda II (250-

285 nm) corresponde à absorção do anel A (MAHMOUD et al., 2001; YAO et al., 2004). Grupos funcionais ligados aos flavonoides podem causar uma alteração na absorção, como por exemplo, de ~367 nm no kaempferol (grupos hidroxila nas posições 3,5,7,4'), para ~371 nm na quercetina (grupos hidroxila nas posições 3,5,7,3',4') e para ~374 nm na miricetina (grupos hidroxila nas posições 3,5,7,3', 4', 5') (YAO et al., 2004; LIN; HARNLY, 2007). A ausência da hidroxila na posição 3 nas flavonas, as distingue dos flavonóis. Assim, a faixa I absorve em um comprimento de onda menor em 20 a 30 nm, como exemplo, quando comparada ao kaempferol, a apigenina (sem a hidroxila na posição 3) apresenta ~337 nm na faixa I. As flavanonas têm um anel C heterocíclico saturado, sem conjugação entre os anéis A e B e, conforme determinado por suas características espectrais de UV, estas exibem um máximo de absorção mais intenso que os outros flavonoides já citados na faixa II, sendo entre 270 e 295 nm, como exemplos: ~288 nm (naringenina) e ~285 nm (taxifolin) e apenas um ombro para a faixa I em 326 e 327 nm. A faixa II aparece como um sinal (270 nm) em substâncias com um anel B monossustituído, mas como dois sinais ou um sinal (258 nm) com um ombro (272 nm) quando um di-, tri- ou o- anel B substituído está presente (YAO et al., 2004; LIN; HARNLY, 2007).

4.3. Fracionamento do Extrato Bruto de Folhas de *Syzygium malaccense* por CCC

Os extratos brutos sem tratamento prévio foram injetados diretamente no CCC, abreviando etapas de purificação antes do fracionamento.

4.3.1. Teste de partição para seleção de sistema de solvente trifásico com eluição em modo gradiente

Poucos SSTs são apresentados devido as combinações limitadas de solventes que formam três fases estáveis em uma porcentagem de volume conveniente (SHINOMIYA; ITO, 2006; SHIBUSAWA et al., 2006; YANAGIDA et al., 2007). Dentre as possibilidades de SSTs adequados, na **Tabela 3** está descrito um resumo do desempenho dos SSTs testados quanto a formação de fases e proporção de volume entre as fases. Percebe-se que os SST são sempre formados por *n*-hexano, acetonitrila e água juntamente com um quarto solvente, responsável pela formação da terceira fase.

Tabela 3 – Resumo do desempenho dos SSTs testados quanto a formação de fases e proporção de volume entre as fases.

SST	Solventes – v/v				Formação de fases	Proporção entre as fases (superior / meio / inferior)
	HEX	AcOEt	ACN	H ₂ O		
A	2	1	1	1	Três	2 / 1 / 1
B	2	2	3	2	Três	2 / 6 / 1
C	3	1	1	1	Três	4 / 1 / 1
	HEX	MTBE	ACN	H ₂ O		
D	1	1	2	1	Três	1,5 / 1,5 / 1
E	2	1	3	2	Três	2 / 1 / 5
F	2	2	3	2	Três	1,5 / 1,5 / 1
G	2	3	3	2	Três	2 / 1,5 / 1
H	3	5	5	3	Duas	2 / - / 1
	HEX	CHCl ₃	ACN	H ₂ O		
I	5	1	5	5	Três	1 / 1 / 2
	HEX	AcOMe	ACN	H ₂ O		
J	4	4	3	4	Três	0,5 / 1,5 / 1
K	2	1	1	1	Três	1,5 / 1 / 1
L	1	1	2	1	Três	0,5 / 3 / 0,5

[AG2] Comentário: Tá errado. É CH₂Cl₂

Dentre os SST testados, apenas o sistema H não formou três fases. Os sistemas E, F, G, I, J, apesar de formarem as três fases, quando a amostra foi adicionada, desenvolveram uma espécie de emulsão na fase intermediária, sendo portanto, descartados (**Figura 20**). Nos SSTs E, F e G, pertencentes ao mesmo grupo de solventes (HEX – MTBE – ACN – H₂O), verifica-se que o aumento da proporção do solvente MTBE pode ser a causa da formação de emulsão.

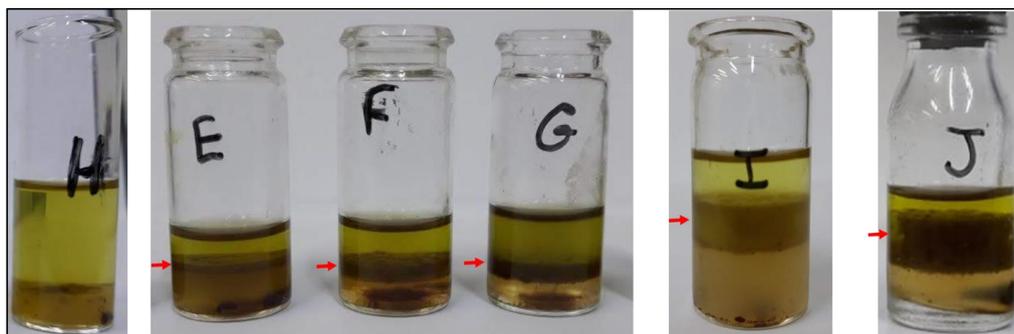


Figura 20 – Sistema de solventes trifásico H formando apenas duas fases e sistemas de solventes trifásicos: E, F, G, I, J formando uma espécie de emulsão na fase intermediária (setas vermelhas indicam a emulsão formada).

Os SSTs B, C, L, não se mostraram adequados à utilização pelo fato de formarem fases com volumes bastante distintos (**Figura 21**). Os SSTs B e C pertencem ao mesmo grupo de solventes (HEX – AcOEt – ACN – H₂O), e em comparação ao SST A, no caso do SST B, o aumento dos solventes AcOEt – ACN – H₂O favoreceu a formação da fase intermediária, indicando afinidade de polaridade entre a combinação proporcional dos solventes, já no caso do SST C, com o aumento apenas do solvente HEX, verifica-se o aumento apenas da fase superior, o que indica que não há muita interação deste solvente com o restante do sistema.

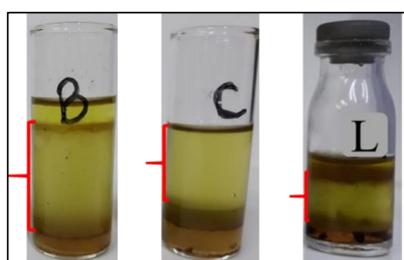


Figura 21 – Sistemas de solventes trifásicos: B, C, L, com proporções inadequadas para ser um candidato a sistema de solventes para particionamento CCC.

Com essas observações preliminares da composição das fases, pode-se dizer que dentre os SSTs testados, os que mais se enquadram nos preceitos de escolha de sistema de solventes a serem usados em particionamentos por CCC são: A, D e K (**Figura 22**) (ITO, 2005b).

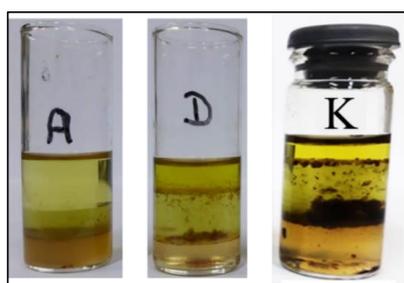


Figura 22 – Sistemas de solventes trifásicos que mais se enquadram nos preceitos de escolha de sistema de solventes a serem usados em particionamentos por CCC: A, D e K.

Para a próxima etapa no processo de escolha do SST, sabe-se que a separação bem sucedida no CCC requer que o sistema de solventes forneça uma faixa adequada de partição

das substâncias entre as fases (SHINOMIYA; ITO, 2006). Idealmente, para a utilização em modo gradiente, a partição das substâncias entre as fases está demonstrada na **Figura 23**.

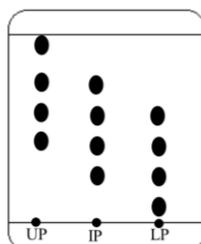


Figura 23 – Partição ideal dos analitos entre as fases do sistema trifásico. UP = fase superior, IP = fase intermediária e LP = fase inferior.

Na **Figura 24** e **Figura 25**, pode-se obter visualmente pela CCD a partição das substâncias entre as fases. Os SSTs que apresentam melhor partição entre as fases são o A, D e K, corroborando os resultados preliminares. A **Figura 26** apresenta os três sistemas mencionados para melhor visualizar deste resultado. Verifica-se que o particionamento das substâncias nas fases desses três SSTs é semelhante.

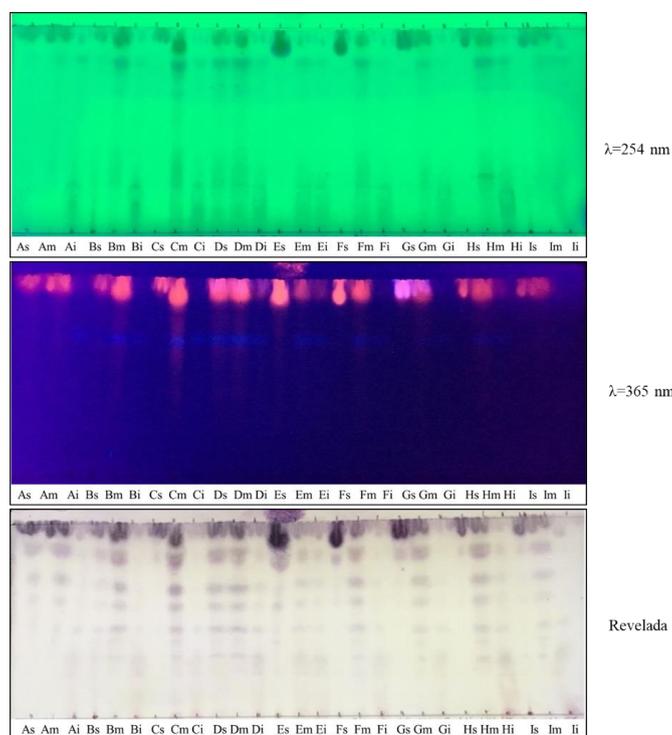


Figura 24 – Placa CCD eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v), observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v). Na identificação de cada ponto na placa CCD, a letra maiúscula indica o SST correspondente e as letras minúsculas s (fase superior), m (fase intermediária) e i (fase inferior). Nesta placa estão disponíveis os SSTs de A-I.

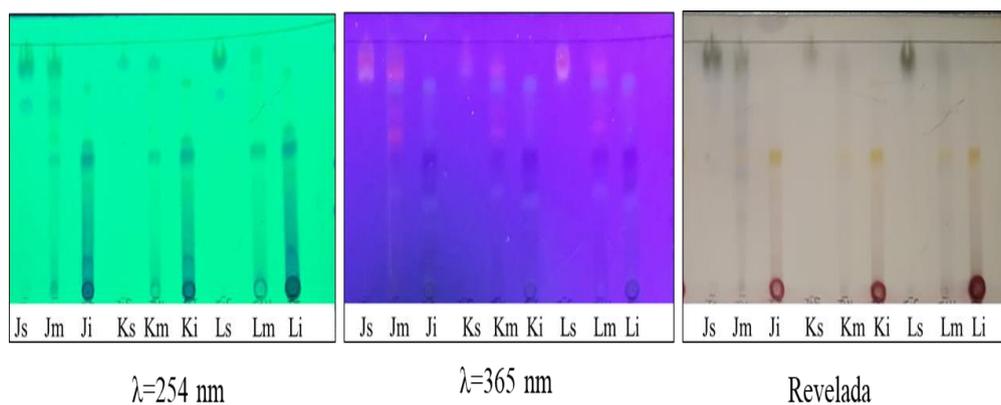


Figura 25 – Placa CCD eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v), observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v). Na identificação de cada ponto, a letra maiúscula indica o SST correspondente e as letras minúsculas s (fase superior), m (fase intermediária) e i (fase inferior).

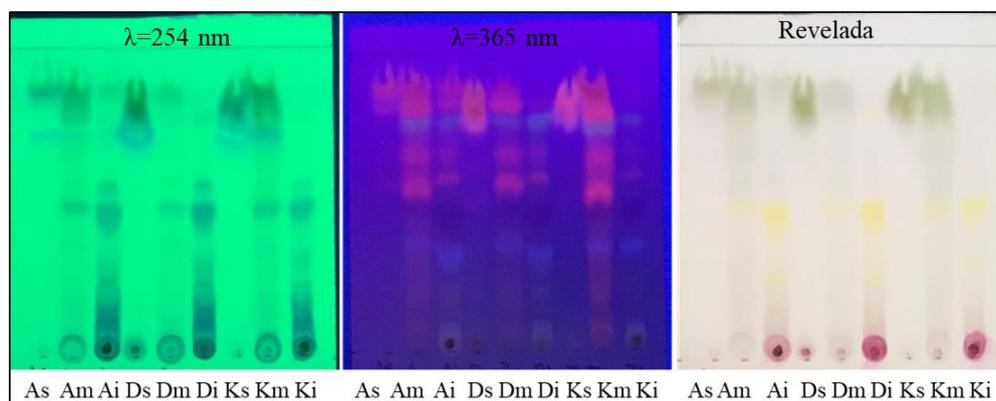


Figura 26 – Placa CCD resumo com os SSTs A, D e K e suas respectivas fases (superior, intermediária e inferior), eluída com o sistema de eluente (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v), observada por luz UV de onda curta e longa e por revelador de solução de vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v).

4.3.2. Análises CLAE dos sistemas de solvente trifásicos

Os resultados dos perfis cromatográficos obtidos por CLAE das fases superior (**Figura 27**), intermediária (**Figura 28**) e inferior (**Figura 29**) de cada sistema de solventes trifásico, quando comparadas, indicaram similaridade em relação a polaridade das substâncias retidas em cada uma das fases.

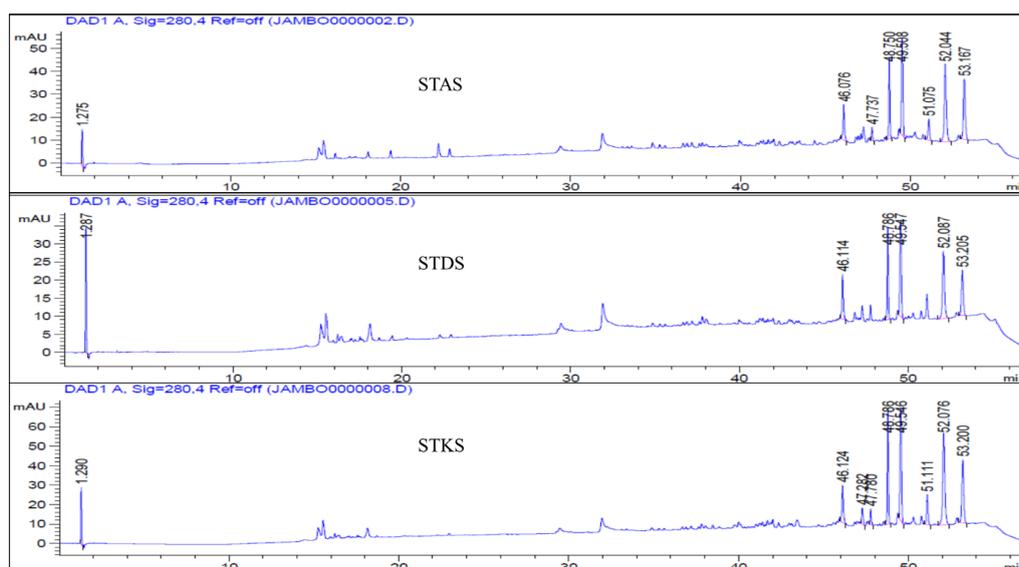


Figura 27 – Cromatograma CLAE das fases superiores dos SSTs A (STAS), D (STDS) e K (STKS) no comprimento de onda $\lambda = 280\text{ nm}$. Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido

fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10 μ l e concentração da amostra 2,5 mg/ mL.

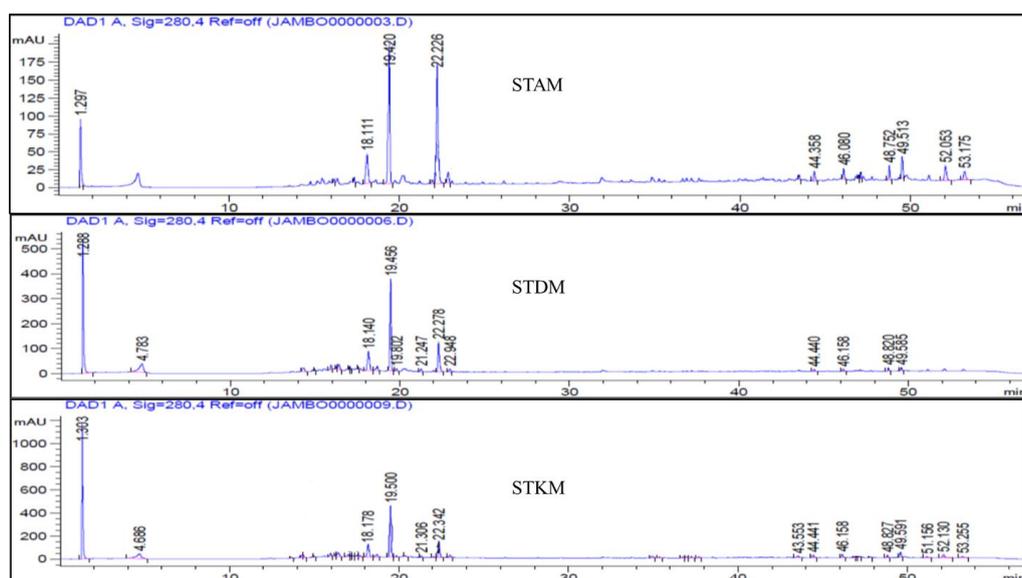


Figura 28 – Cromatogramas obtidos por CLAE das fases intermediárias dos SSTs A (STAM), D (STDm) e K (STKM) no comprimento de onda $\lambda = 280$ nm. Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10 μ l e concentração da amostra 2,5 mg/ mL.

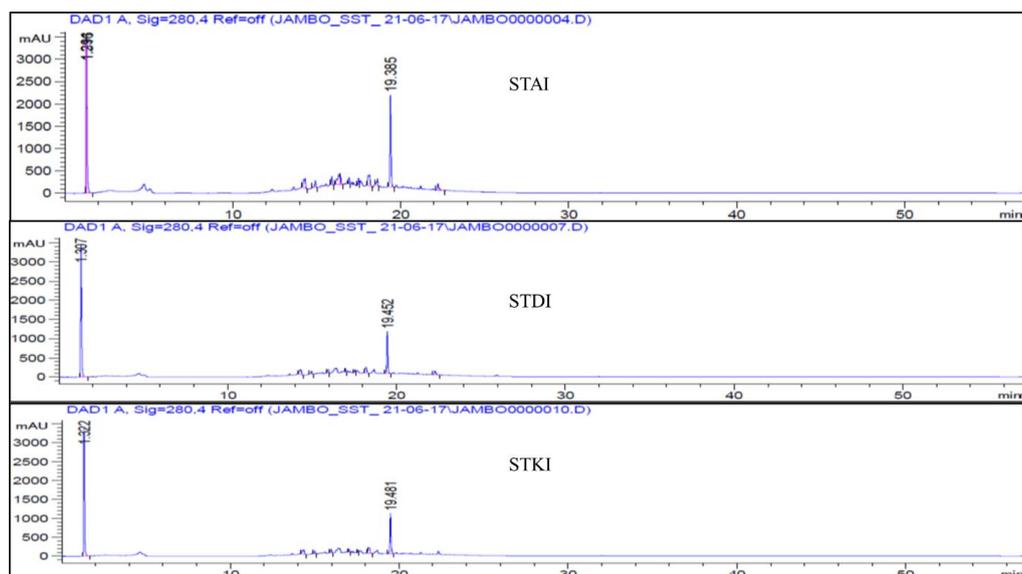


Figura 29 – Cromatogramas obtidos por CLAE das fases inferiores dos SSTs A (STAI), D (STDi) e K (STKi) no comprimento de onda $\lambda = 280$ nm. Eluição em modo gradiente, sendo o solvente A: água com 0,1% de ácido

fórmico e solvente B: acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente do solvente B foi: 0 min – 0%; 5 min – 5%; 45 min – 100%; 50 min – 100%; 52 min – 0% e 57 min – 0%. Utilizou-se fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 10 µl e concentração da amostra 2,5 mg/ mL.

4.3.3. Determinação da retenção de fase estacionária em CCC com SST

A retenção da fase estacionária desempenha um papel importante no número de pratos teóricos e na resolução do processo cromatográfico por CCC. A fase estacionária preenche a maior parte do volume total da coluna, sendo indicado, retenções acima de 70% (ITO, 2005a; ITO, 2005b).

Apesar destes SSTs (A) *n*-hexano–acetato de etila–acetonitrila–água (2:1:1:1 v/v/v/v), (D) *n*-hexano–éter metil *t*-butílico–acetonitrila–água (1:1:2:1 v/v/v/v) e (K) *n*-hexano–acetato de metila–acetonitrila–água (2:1:1:1 v/v/v/v), apresentarem boa partição de substâncias entre as fases quando avaliados por CCD e CLAE, com a realização do teste de retenção da fase estacionária, pode-se observar que o sistema A consegue reter a fase estacionária no equipamento ao longo de toda a corrida de forma mais satisfatória que os outros SSTs (Tabela 4).

Tabela 4 – Relação entre retenção das fases estacionárias e sistemas de solventes trifásicos

SST	Retenção FE (%) ^a	Retenção FE corrigida (%) ^b	Retenção FE corrigida II (%) ^c
	Fase Móvel = FS	Fase Móvel = FS	Fase Móvel = FM
A	79,6	74,5	69,4
D	87,8	83,6	42,9
K	82,7	77,5	36,7

^a Porcentagem de volume de FE retida na coluna cromatográfica (volume total da coluna = 98ml);

^b Porcentagem de volume de FE retida na coluna após a injeção de 5 ml de amostra em branco;

^c Porcentagem de volume de FE retida na coluna cromatográfica após a troca de Fase Móvel.

4.3.4. Separação dos constituintes do extrato bruto de folhas de *S. malaccense* por CCC

O fracionamento do EBFJ foi realizado com os SSTs A, D e K, com eluição por gradiente não linear segundo os parâmetros da **Figura 15**. Foram recolhidas em tubo de ensaio, o total de 120 frações com volume de 5 mL cada, para cada SST. As 40 primeiras frações são referentes a primeira etapa do gradiente, primeira FM = fase superior do SST. As frações 41-80, são referentes a segunda etapa do gradiente, FM = fase intermediária do SST e as frações 81-120 são oriundas do processo de extrusão da fase estacionária.

4.3.5. CCD das frações obtidas por CCC

Apesar da diferença entre os SST A, D e K, quanto à retenção de fase estacionária, optou-se por realizar a análise utilizando os três sistemas para verificação da distribuição das substâncias do extrato bruto ao longo do gradiente. Devido à similaridade entre as frações “vizinhas”, apenas as frações ímpares foram analisadas (**Figura 30**, **Figura 31** e **Figura 32**): frações 3 a 39 relativas à primeira etapa do gradiente, frações 41 a 79 relativas a segunda etapa do gradiente e frações 83 a 119 relativas a extrusão da fase estacionária.

O SST A apresentou boa distribuição das substâncias ao longo de toda a análise, ou seja, nas três etapas (**Figura 30**). A primeira etapa do gradiente e a etapa de extrusão poderiam ter sido ligeiramente encurtadas, visto que a partir da fração 25 e da fração 105 (respectivamente para a primeira etapa e para a extrusão) não é mais observada a eluição de nenhuma substância.

No SST D (**Figura 31**), a FM das etapas 1 e 2 se mostraram muito fortes, havendo eluição de substâncias sem muita especificidade, ocasionando uma separação menos eficiente quando comparada ao SST A.

Ao contrário do SST D, no SST K (**Figura 32**), a FM utilizada na etapa 1 não teve força para eluir as substâncias. Na etapa 2, as substâncias tendo mais afinidade pela FM, com menos especificidade que no SST D, acarretando numa separação cromatográfica pouco eficiente.

Pode-se notar o melhor desempenho da separação cromatográfica no SST A em relação aos D e K que concentram, praticamente, todas as substâncias entre as frações relativas à fase intermediária do sistema de solvente. No SST A, é possível verificar substâncias de diferentes polaridades distribuídas por quase toda análise cromatográfica. Então, as frações deste SST A foram escolhidas para as análises por MS e RMN.

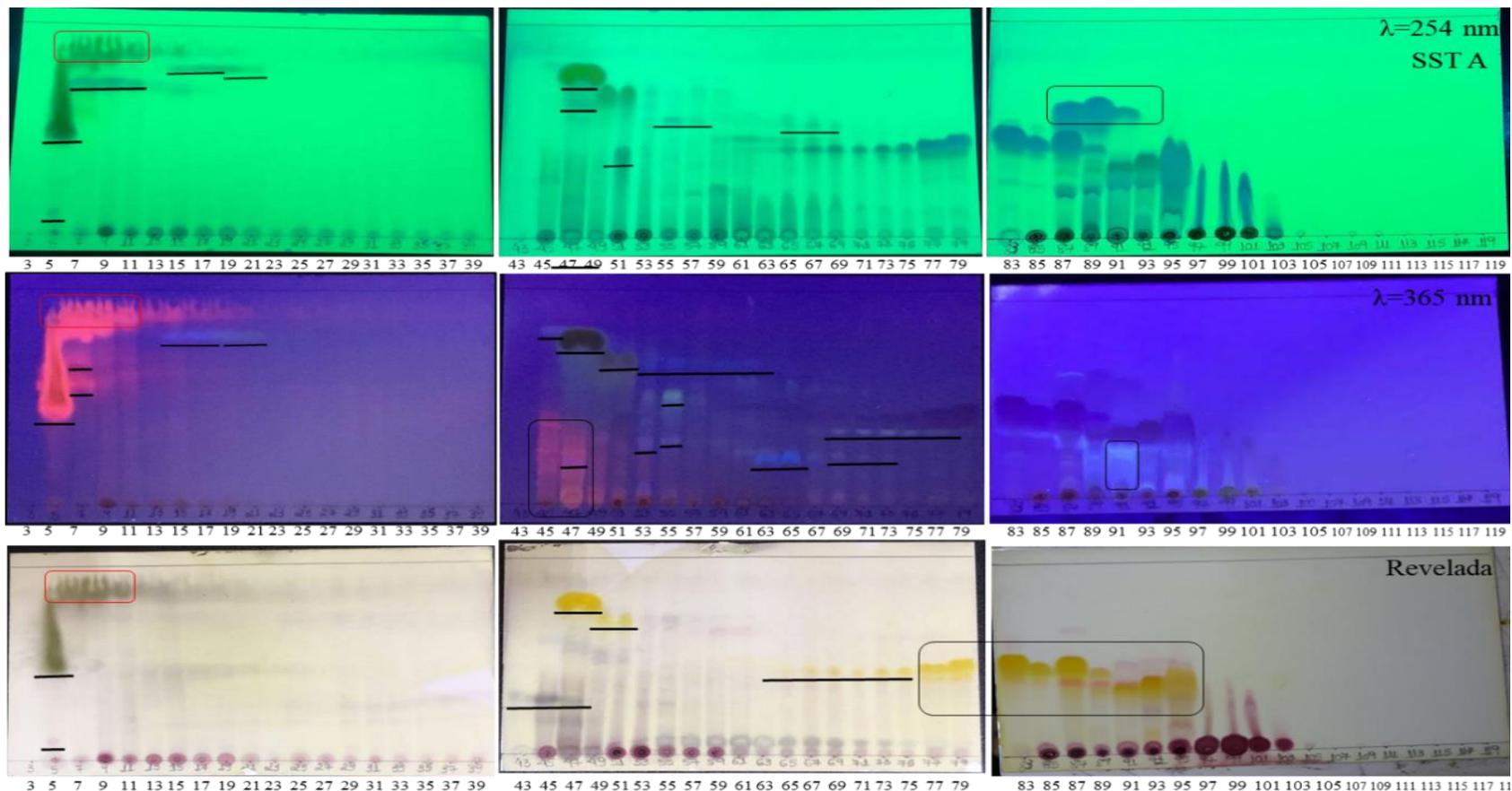


Figura 30 – CCD com as frações ímpares obtidas por CCC do EBFJ a partir do SST A. Sistema de eluição utilizado (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v). Revelada por luz UV de onda curta e longa e revelação química com vanilina 10% em etanol (v/v) e ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v) e aquecimento. Pontos destacados na CCD para demonstração da complexidade do extrato.

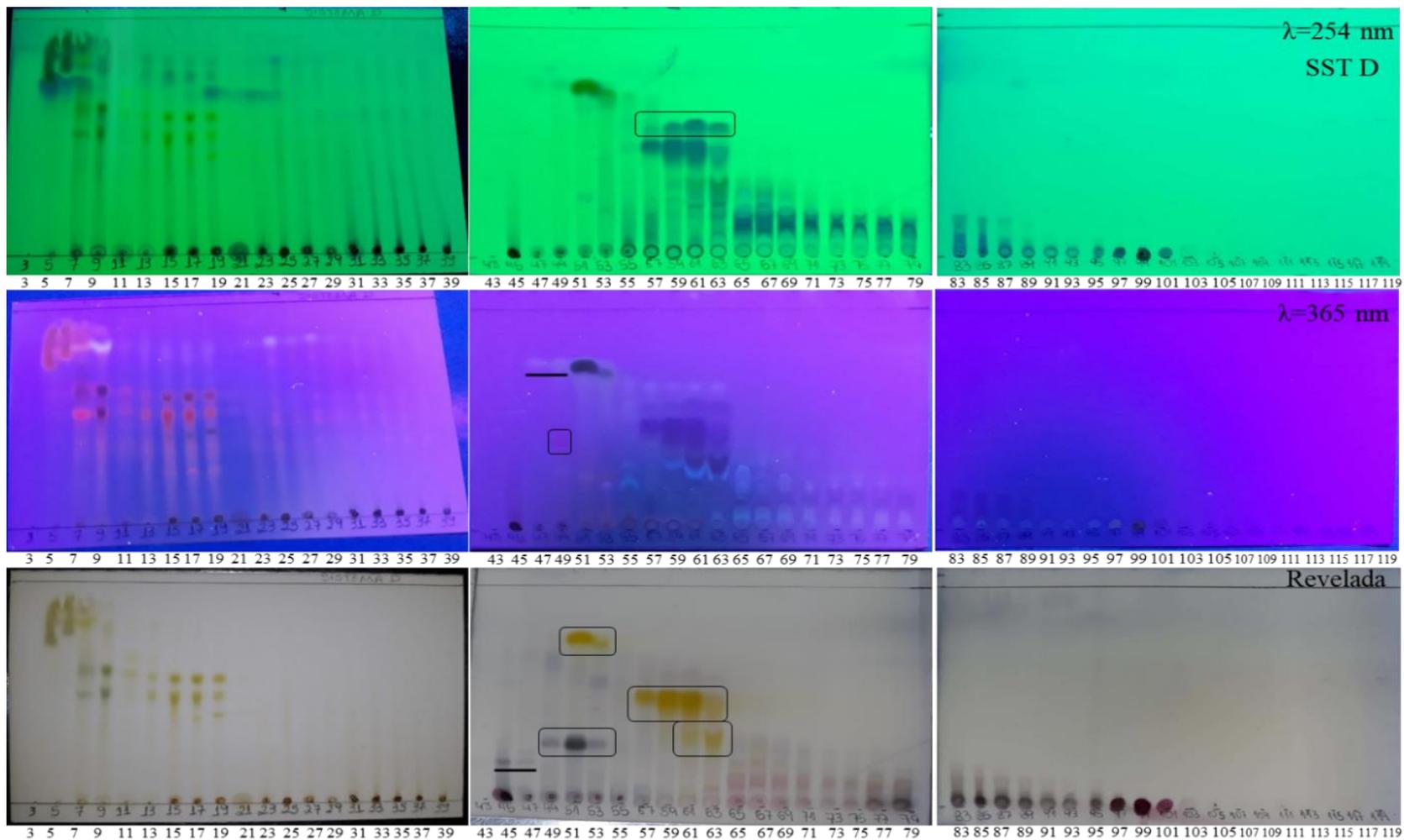


Figura 31 – CCD com as frações ímpares obtidas por CCC do EBFJ a partir do SST D. Sistema de eluição utilizado (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v). Revelada por luz UV de onda curta e longa e revelação química.

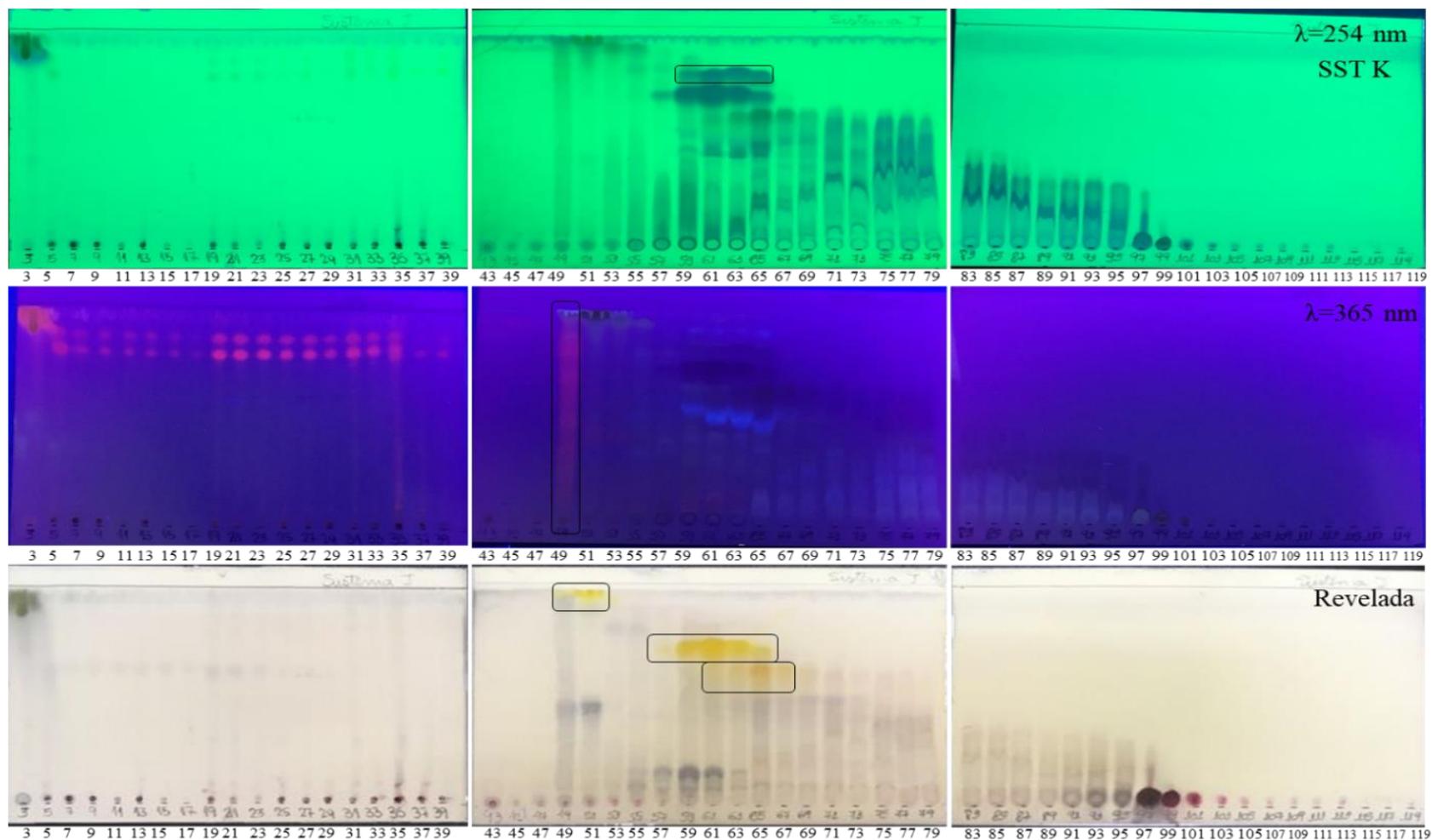


Figura 32 – CCD com as frações ímpares obtidas por CCC do EBFJ a partir do SST K. Sistema de eluição utilizado (1) AcOEt-Acetona-H₂O, 25:15:10 (v/v). Revelada por luz UV de onda curta e longa e revelação química.

4.3.6. Análise por espectrometria de massas das frações obtidas do EBFJ por CCC

As frações ímpares obtidas a partir do fracionamento de EBFJ por CCC foram injetadas no espectrômetro de massas gerando informações estruturais acerca das substâncias contidas em cada uma dessas frações. Após análise, pôde-se concluir que essas substâncias pertencem a diferentes grupos de metabólitos secundários vegetais e a maioria delas foi caracterizada como substâncias fenólicas.

O

APÊNDICE B apresenta uma tabela com 90 substâncias identificadas tentativamente com base nos dados de HRMS ESI-MS/MS, além de descrever as substâncias nas respectivas frações obtidas por HSCCC. Outros dados como: m/z detectada, modos de ionização e aduto, fórmula molecular, erro em ppm, íons fragmentos por MS/MS, e as referências (*software* ou literatura) utilizadas no processo de caracterização, também são encontrados nesta tabela.

As substâncias foram identificadas primeiramente por meio de dados de MS com interpretação dos espectros de MS e MS/MS por comparação à dados encontrados na literatura e à dados obtidos por meio de processamento dos espectros nos softwares MS-Dial e MZmine.

O acoplamento *off-line* de CCC-MS/MS permitiu a obtenção de um gráfico de tempo contínuo (min) de injeção em fluxo das frações ímpares x intensidade do sinal de cada amostra detectada pela MS. Esse gráfico foi denominado de “*cromatograma de massas*”. Com isso, foi possível observar o perfil de todo o fracionamento obtido por HSCCC (**Figura 33**). Com o obtido por injeção em fluxo das amostras no espectrômetro de massas é possível observar o espectro de massas *full*, bem como MS-MS/MS de determinados íons no particionamento CCC em um único arquivo (**Figura 34**).

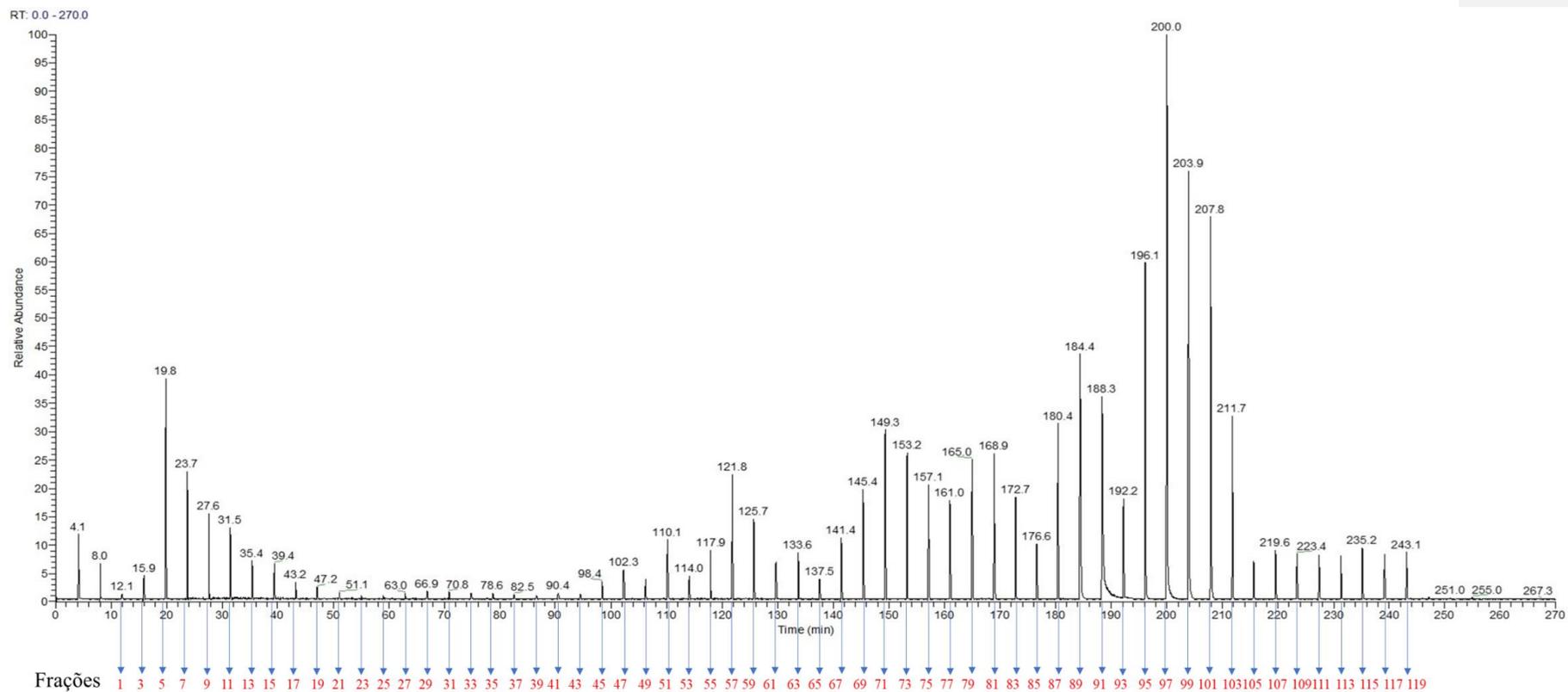


Figura 33 – Gráfico do “*cromatograma de massas*” obtido por injeção em fluxo das frações obtidas no particionamento CCC do EBFJ no espectrômetro de massas.

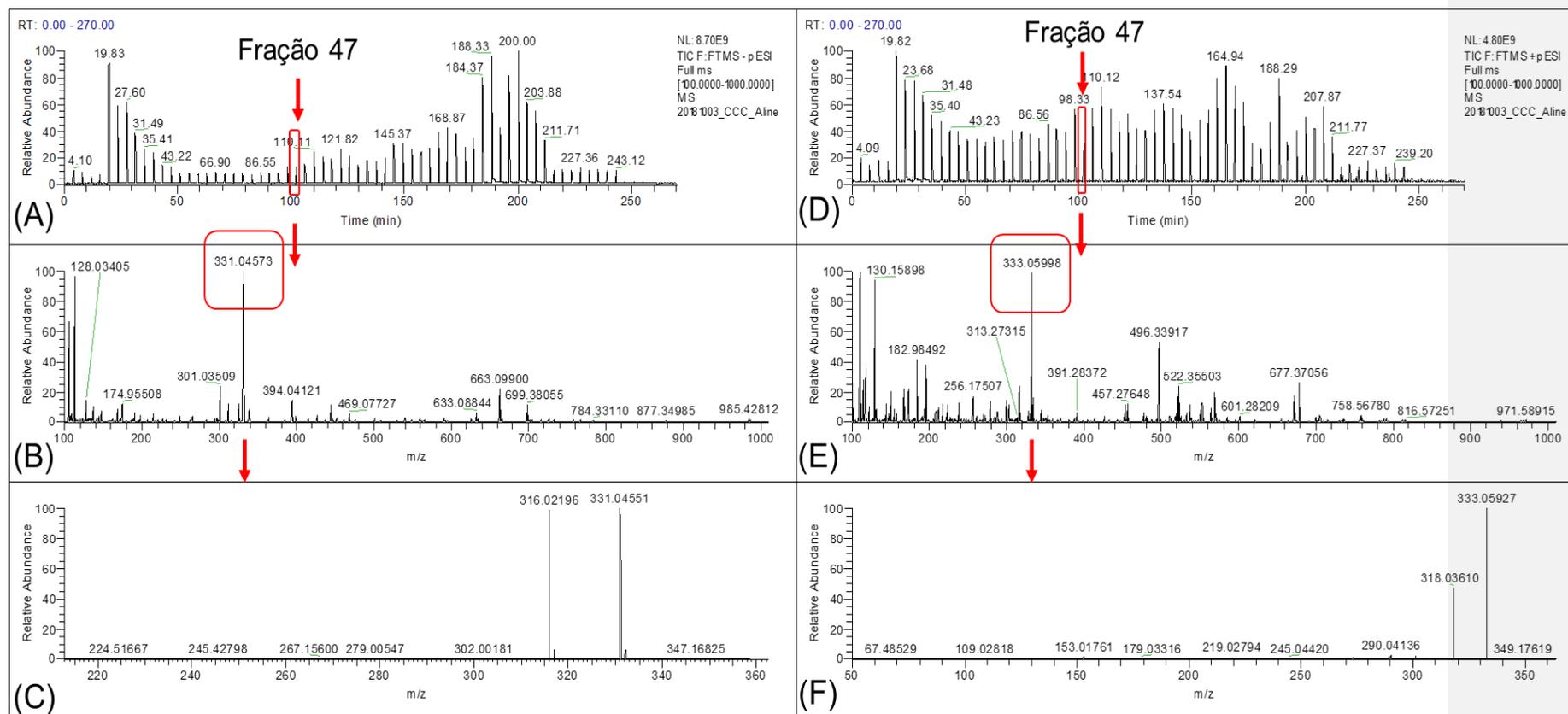


Figura 34 – (A) “cromatograma de massas” obtido no modo negativo, com destaque para o minuto ~102 que equivale a fração 47 do fracionamento por CCC; (B) espectro de massas equivalente a fração 47; (C) espectro de massas MS/MS relativo ao íon m/z 331,04573 [M-H]⁻. (D) “cromatograma de massas” obtido no modo positivo, com destaque para o minuto ~102 que equivale a fração 47 do fracionamento por CCC; (E) espectro de massas equivalente a fração 47; (F) espectro de massas MS/MS relativo ao íon m/z 333,05998 [M+H]⁺.

4.3.7. Substâncias identificadas divididas por classe de metabólitos

Terpenos

Na fração 5, entre outras substâncias, foram identificados por tentativa os seguintes triterpenos pentacíclicos isômeros já relatados no gênero *Syzigium* (SAMY et al., 2014; DJOUKENG et al., 2005): ácido oleanólico e/ou ácido ursólico (**Figura 35**). Estas substâncias diferem estruturalmente apenas quanto posição de dois grupos metila. O ácido oleanólico apresenta duas metilas geminais ligadas ao C20 e no caso do ácido ursólico, as metilas estão vicinais, ligadas ao C19 e ao C20. Não foi possível diferenciá-los apenas pelos dados de MS/MS.

A identificação do ácido oleanólico e/ou ursólico foi proposta pelo *software* MS-Dial com o íon molecular m/z 439,35727 $[M+H-H_2O]^+$. As fragmentações geraram os íons m/z 421,3503 $[M+H-2H_2O]^+$ e m/z 393,3541 $[M+H-2H_2O-CO]^+$ (**Figura 36**), formados após as perdas de H_2O e CO , respectivamente.

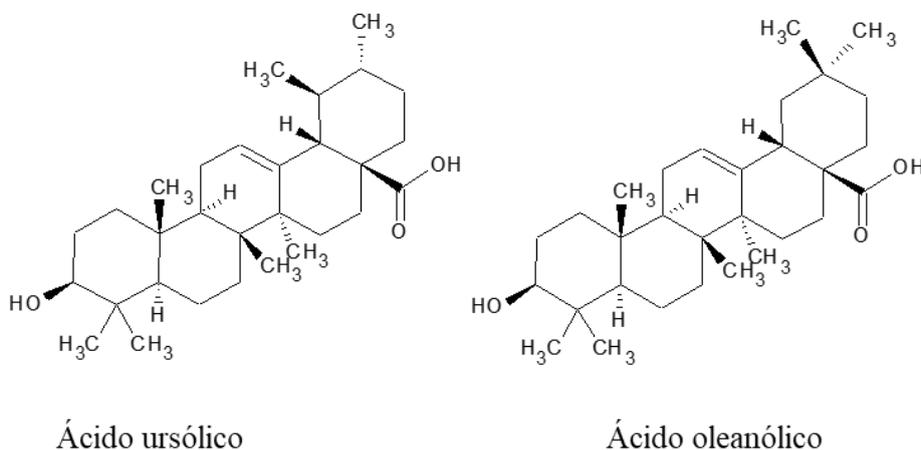


Figura 35 – Estruturas moleculares dos triterpenoides pentacíclicos: ácido ursólico e ácidos oleanólico.

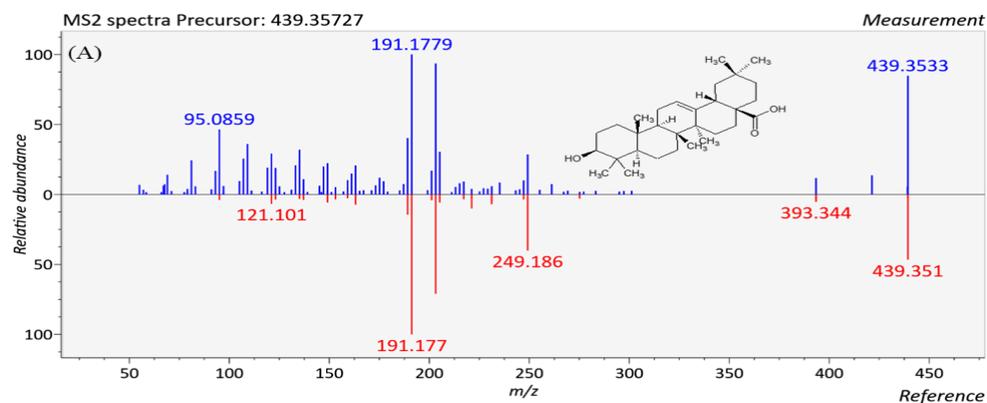


Figura 36 – (A) Espectro de massas MS/MS, modo positivo, obtido pelo *software* MS-Dial, do ácido oleanólico e/ou ursólico.

Ácidos graxos

Com base nos dados presentes nas bibliotecas, algumas sugestões de estruturas foram propostas para ácidos graxos.

Ácidos graxos octadecanoides, insaturados, contendo grupos hidroxilas ou hidroperóxidos (**Figura 37**) foram identificados por tentativa entre as frações 05 e 07.

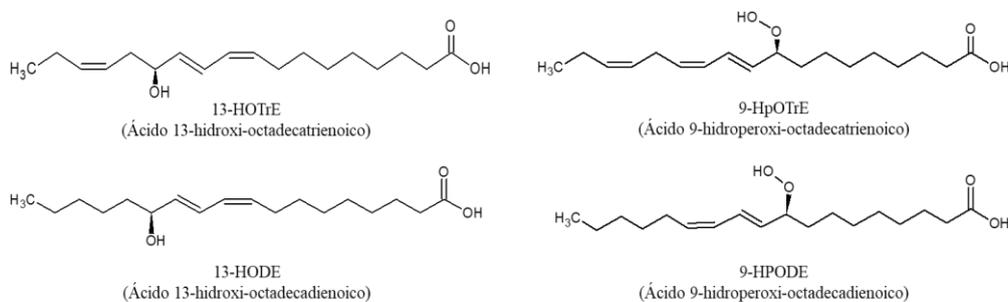


Figura 37 – Ácidos graxos octadecanoides, insaturados, contendo grupos hidroxilas ou hidroperóxidos identificados no EBFJ.

O ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE) foi identificado pelo íon m/z 295,22708 $[M-H]^-$, as perdas de 18 Da e 44 Da geraram, respectivamente, os íons m/z 277,2182 $[M-H-H_2O]^-$ e m/z 251,2375 $[M-H-COO]^-$ (**Figura 38**).

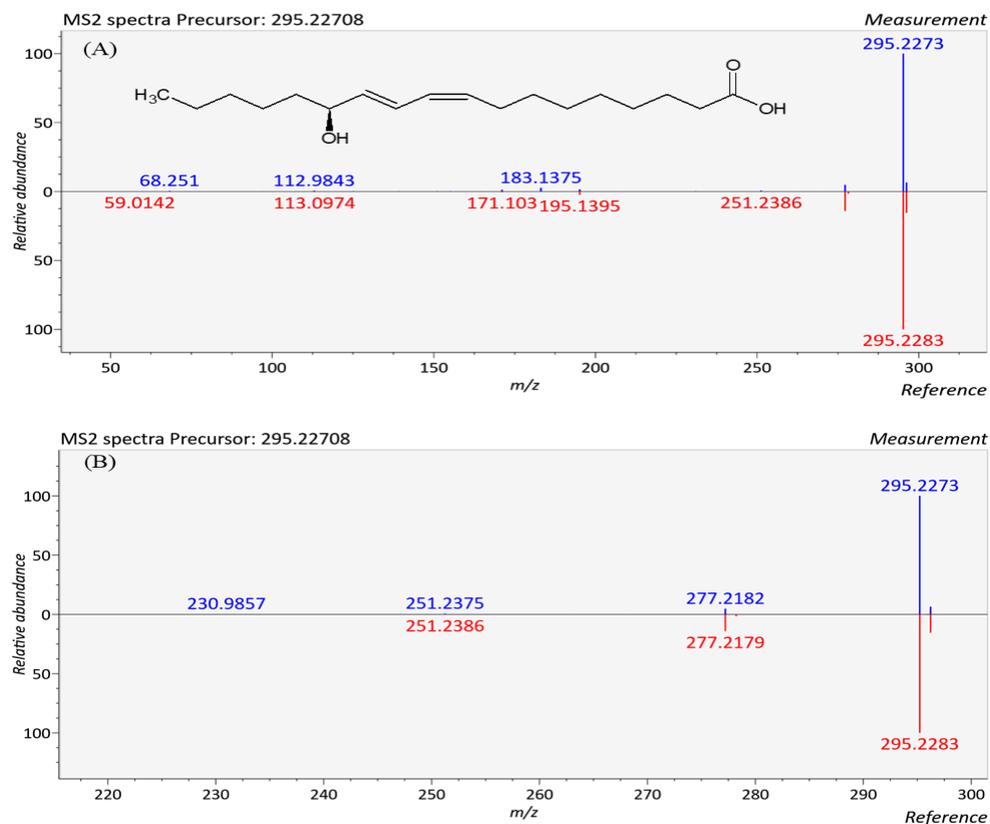


Figura 38 – (A) Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial referente à substância 13-HODE. (B) Expansão do espectro MS/MS referente à substância 13-HODE.

E o ácido 13-hidroxi-octadecatrienoico (13-HOTrE) foi identificado pelo íon m/z 293,21240 $[M-H]^-$, as fragmentações com perdas de 18 Da e 58 Da geraram, respectivamente, os íons m/z 275,2030 $[M-H-H_2O]^-$ e m/z 235,1702 $[M-H-CH_2COO]^-$ (**Figura 39**).

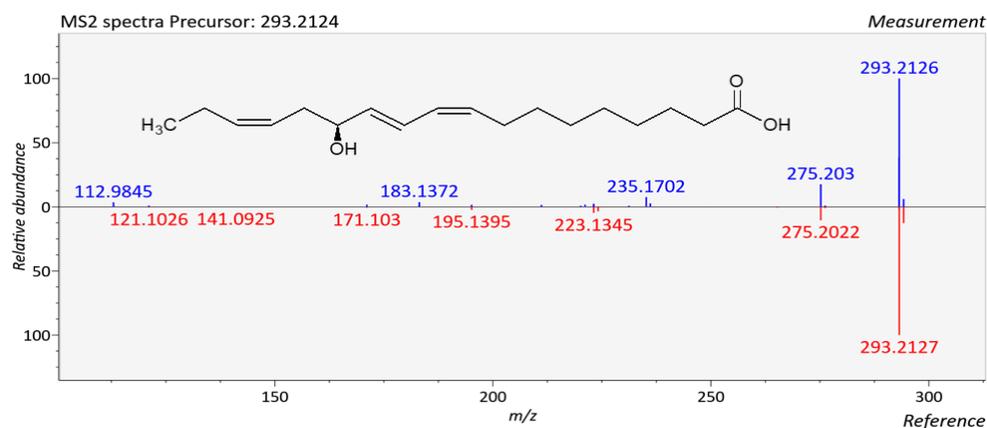


Figura 39 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial referente à substância 13-HOTrE.

Os ácidos hidroxiperóxido: ácido 9-hidroperoxi-octadecadienoico (9-HPODE) e ácido 9-hidroperoxi-octadecatrienoico (9-HpOTrE) foram identificados pelos íons m/z 311,22318 [M-H]⁻ (**Figura 40**) e m/z 309,20749 [M-H]⁻ (**Figura 41**), respectivamente. Estes ácidos apresentam fragmentações semelhantes, com perda de água (-18 Da) e do grupo carboxílico (-44 Da). Com essas perdas, o 9-HPODE forma os íons m/z 293,2126 [M-H-H₂O]⁻ e m/z 249,2217 [M-H-COO]⁻ e o 9-HpOTrE forma os íons m/z 291,1947 [M-H-H₂O]⁻ e m/z 247,2066 [M-H-COO]⁻.

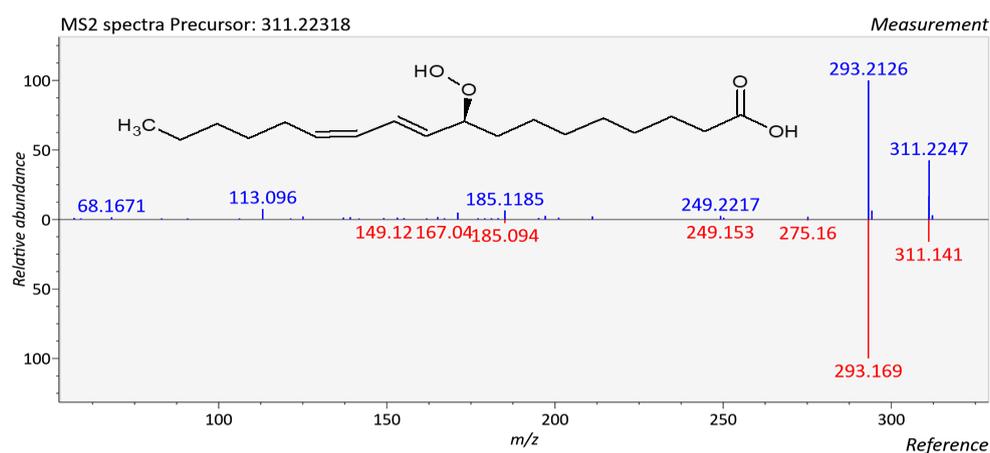


Figura 40 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial referente à substância 9-HPODE.

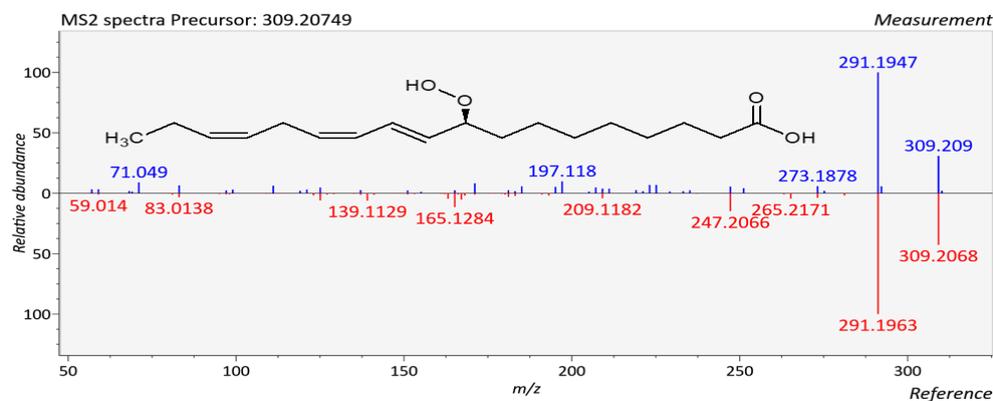


Figura 41 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial referente à substância 9-HpOTrE.

A identificação dos ácidos graxos octadecanoides: 13-HODE, 13-HOTrE, 9-HPODE e 9-HpOTrE foi proposta pelo *software* MS-Dial. Este é o primeiro relato de identificação destas substâncias na espécie *S. malaccense* e no gênero *Syzygium*.

A identificação do ácido malíngico foi proposta pelo *software* MZmine, com íon molecular m/z 327,21768 $[M-H]^-$ e apresentou perdas sucessivas de -18 Da, referentes a clivagem das hidroxilas em forma de água. A **Figura 42** demonstra a estrutura molecular e o espectro de massas MS/MS do ácido malíngico. Este é o primeiro relato de identificação do ácido malíngico na espécie *S. malaccense* e no gênero *Syzygium*.

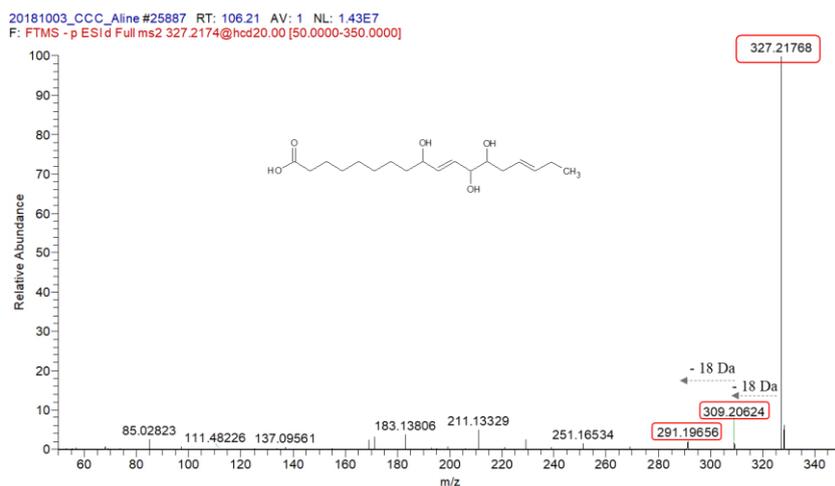


Figura 42 – Estrutura molecular e espectro de massas MS/MS, modo negativo, da substância ácido malíngico.

Ácidos anacárdicos

Os ácidos anacárdicos são uma mistura de ácidos salicílicos substituídos com cadeia alquílica, majoritariamente composta por 15 ou 17 átomos de carbono. Esta cadeia lateral longa favorece o caráter lipídico dessas substâncias. O grau de insaturação pode variar entre cadeia saturada e cadeias mono, di ou tri-insaturadas (ERŞAN et al., 2016; SEONG et al., 2014).

Os ácidos anacárdicos são encontrados, principalmente, na família Anacardiaceae (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é um exemplo de espécie que contém ácidos anacárdicos, e estes estão presentes em maior quantidade no líquido da casca da castanha do caju (MORAIS et al., 2017). Outro exemplo descrito na literatura de espécie contendo ácidos anacárdicos é *Pistacia vera* L. (pistache), estas substâncias foram isoladas das cascas dos frutos (ERŞAN et al., 2016). Várias atividades biológicas são descritas para os ácidos anacárdicos (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006), dentre estas, atividade moluscicida (MENDES et al., 1990), antioxidante e antifúngica (MORAIS et al., 2017).

Algumas estruturas moleculares dos ácidos anacárdicos estão representadas na **Figura 43**, este é o primeiro relato na literatura de identificação destas substâncias na espécie *S. malaccense* e no gênero *Syzygium*.

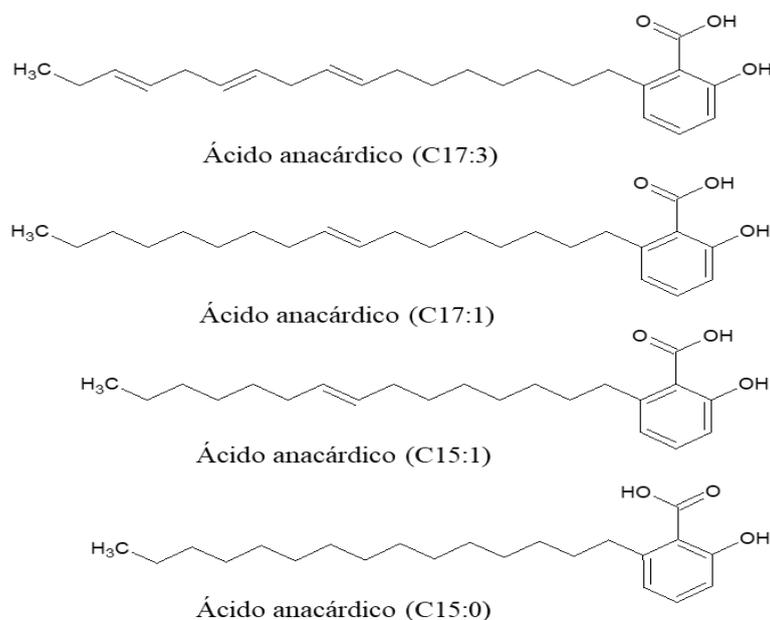


Figura 43 – Estruturas moleculares dos ácidos anacárdicos.

O ácido anacárdico (C15:0) foi identificado pelo MS-Dial a partir do íon m/z 347,25952 [M-H]⁻ com perda de -44 Da, referente à clivagem do grupo carboxílico, formando o íon fragmento m/z 303,2681 [M-H-COO]⁻ (Figura 44).

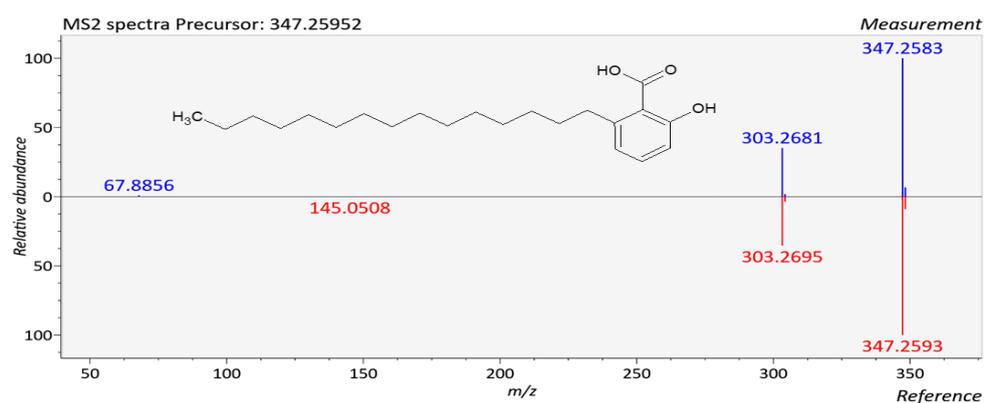


Figura 44 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial do ácido anacárdico (C15:0).

Por similaridade de fragmentação e busca na literatura, foram propostos: o ácido anacárdico (C17:3), ácido anacárdico (C17:1) e o ácido anacárdico (C15:1). O íon m/z 369,24326 [M-H]⁻, fragmentando em m/z 325,25357 [M-H-COO]⁻, foi proposto como identificação do ácido anacárdico (C17:3) (Figura 45).

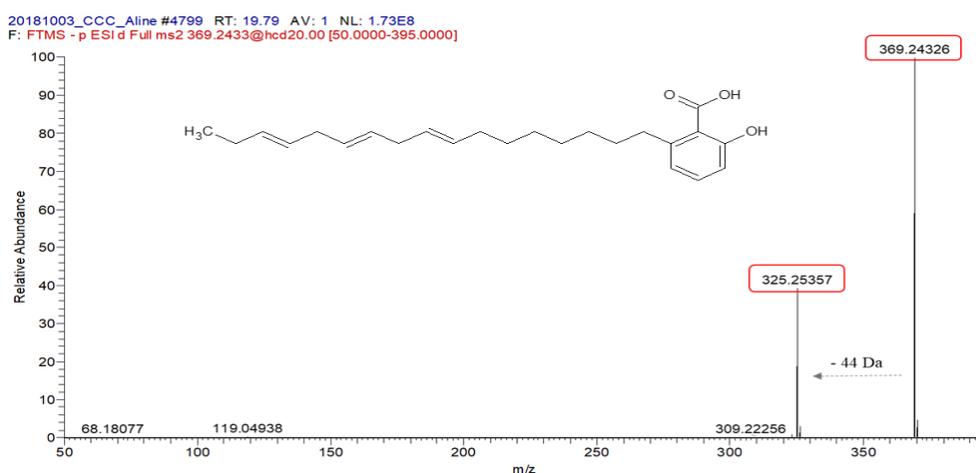


Figura 45 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo do ácido anacárdico (C17:3).

O ácido anacárdico (C17:1) identificado pelo íon m/z 373,27460 [M-H]⁻ e íon de fragmentação de m/z 329,28479 [M-H-COO]⁻ (Figura 46) e o ácido anacárdico (C15:1) identificado com íon m/z 345,24338 [M-H]⁻, fragmentando em m/z 301,25342 [M-H-COO]⁻ (Figura 47). A perda de - 44 Da, comum a todos os ácidos anacárdico citados corresponde à clivagem do grupo carboxílico (ERŞAN et al., 2016).

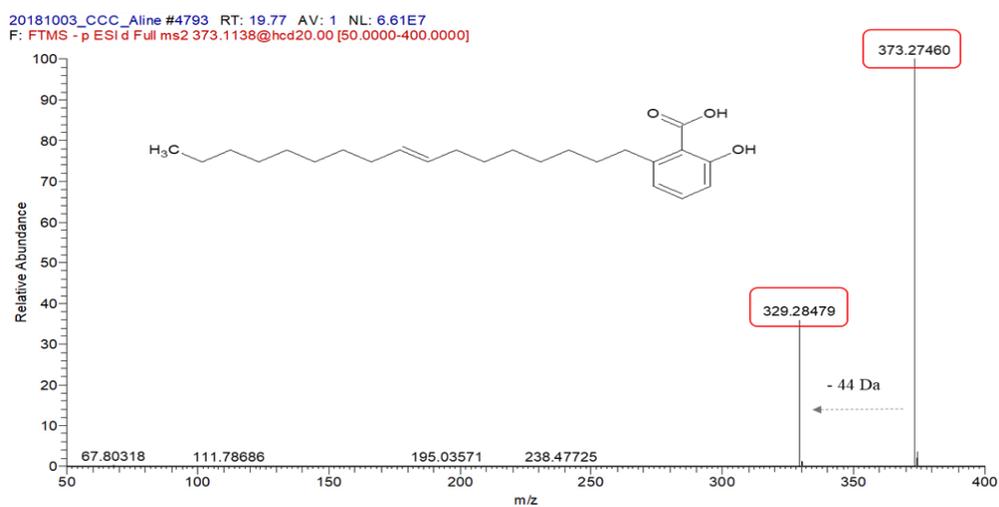


Figura 46 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo do ácido anacárdico (C17:1).

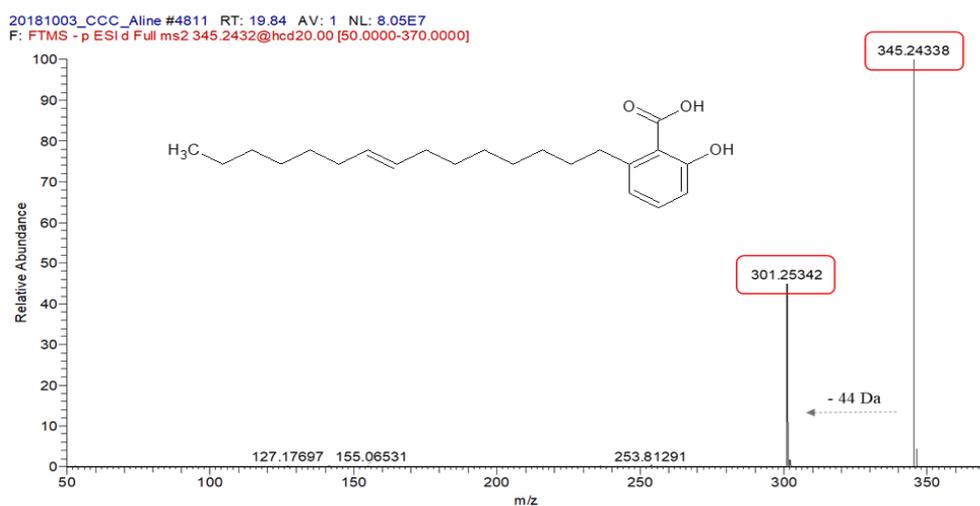


Figura 47 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo do ácido anacárdico (C15:1).

Norisoprenoides

Foram identificados por tentativa dois norisoprenoides (**Figura 48**), o 9-Epiblumenol B com íon m/z 209,15324 $[M+H-H_2O]^+$, de acordo com o espectro de massas MS/MS obtido pelo *software* MS-Dial demonstrado na **Figura 49** as perdas sucessivas de -18 Da, relativas a água, geraram os íons m/z 191,1430 $[M+H-2H_2O]^+$ e m/z 173,1314 $[M+H-3H_2O]^+$. O norisoprenoide glicosilado Blumenol C hexosídeo foi identificado pela presença do íon m/z 373,18350 $[M+H]^+$, com perda inicial de -162 Da relativo a hexose, gerando o íon m/z 211,16884 $[M+H-162]^+$, e perdas sucessivas de -18 Da, relativas a água, geraram os íons m/z 193,15840 $[M+H-162-H_2O]^+$ e m/z 175,14784 $[M+H-162-2H_2O]^+$ (**Figura 50**). Este é o primeiro relato na literatura de identificação destas substâncias na espécie *S. malaccense* e no gênero *Syzygium*.

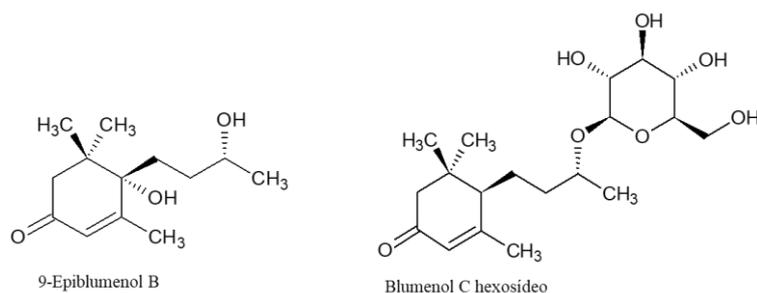


Figura 48 – Estruturas moleculares das substâncias 9-Epiblumenol B e Blumenol C hexosídeo.

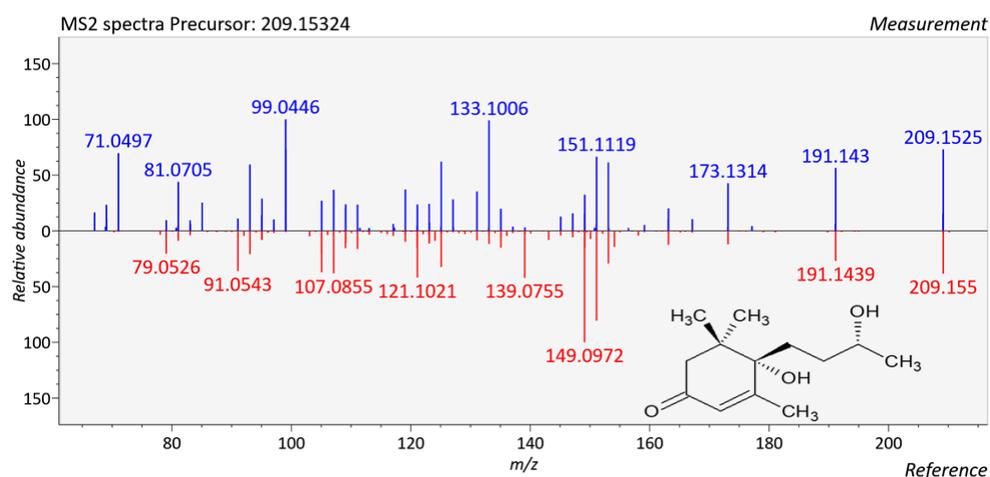


Figura 49 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, obtido pelo *software* MS-Dial do 9-Epiblumenol B.

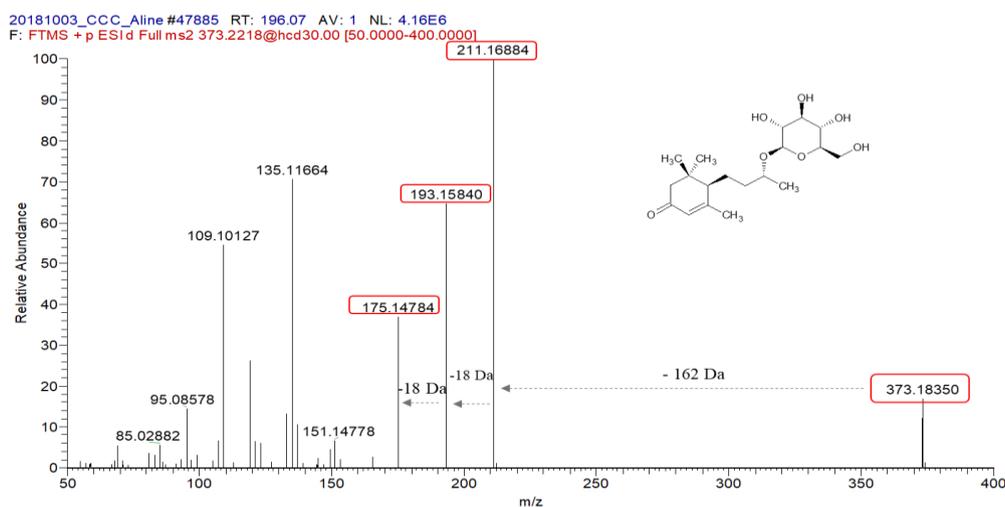


Figura 50 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, do Blumenol C hexosídeo.

Derivados de ácidos carboxílicos

Os ácidos carboxílicos foram identificados por tentativa tanto pelo *software* MS-Dial quanto por buscas na literatura e bancos de dados disponíveis *on-line* para espectrometria de massas com base na similaridade de fragmentação. O *software* MZmine auxiliou na identificação de algumas substâncias, porém com identificação, em sua maioria, sem espectros de fragmentação.

Como ácido monocarboxílico alifático foi identificado o ácido 3-metil-but-2-enoico (ácido seneciico) (**Figura 51**) pelo *software* MS-Dial, o espectro de massas MS/MS é apresentado na **Figura 52**. Para o ácido 3-metil-but-2-enoico, o espectro de massas MS/MS apresentou íon molecular protonado m/z 101,05997 $[M+H]^+$ e fragmentação com perda de -42 Da $[M+H-42]^+$, possivelmente referente a perda de C_3H_6 (PAVIA et al., 2015) correspondente na molécula a CH_3CCH_3 , gerando o íon m/z 59,0496, equivalente ao resíduo $COOHCH+H$ $[58+H]^+$. Como ácido monocarboxílico aromático tem-se o ácido benzoico (**Figura 51**), identificado apenas com dados de MS, com íon m/z 121,02824 $[M-H]^-$. Esta substância foi considerada por se tratar de um precursor da rota metabólica de outras substâncias identificadas no EBFJ, bem como por estar descrita na literatura para a espécie *S. malaccense* (BATISTA et al., 2017).

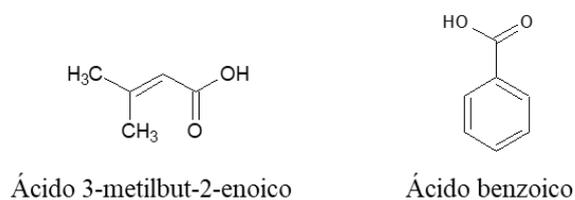


Figura 51 – Estruturas moleculares dos ácidos monocarboxílicos alifático (ácido e-metilbut-2-enoico) e aromático (ácido benzoico).

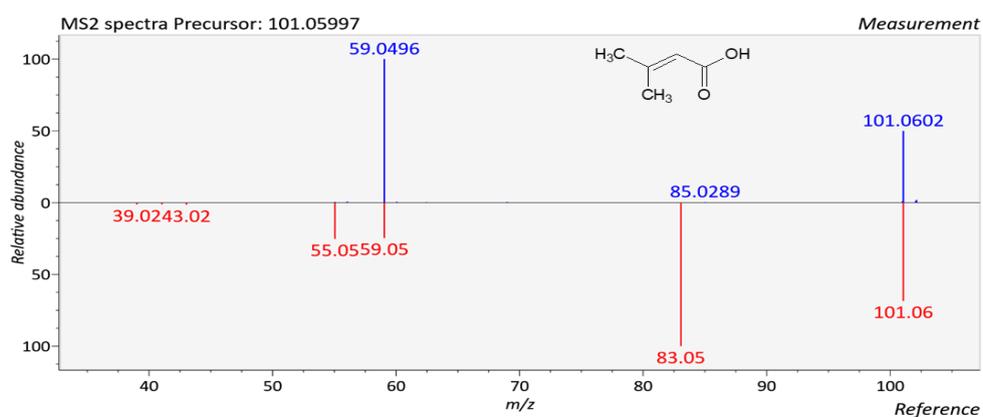


Figura 52 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, obtido pelo *software* MS-Dial, do ácido 3-metil-but-2-enoico (ácido seneciico).

Foram identificados os ácidos monocarboxílicos de cadeia cíclica ou poliol cíclico: o ácido chiquímico, o ácido 3-dehidrochiquímico, o ácido 3-dehidroquinico e o ácido quinico (**Figura 53**).

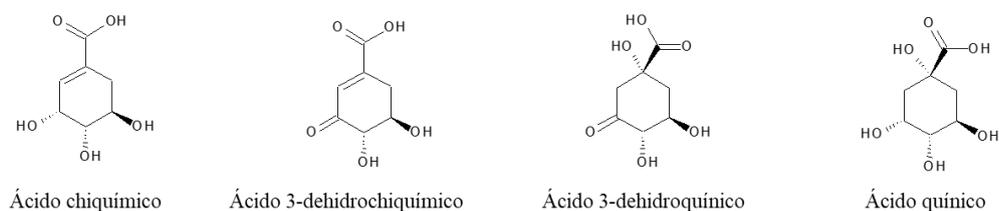


Figura 53 – Estruturas químicas dos ácidos monocarboxílicos de cadeia cíclica.

O ácido 3-dehidrochiquímico foi identificado pelo MS-Dial (**Figura 54**), demonstrando íon molecular m/z 153,01804 $[M-H-H_2O]^-$ com perda de -44 Da referente ao grupo carboxila, gerando o íon m/z 109,0287 $[M-H-H_2O-COO]^-$. Partindo da existência dessa

substância, buscou-se pelos outros ácidos carboxílicos cíclicos citados. Os ácidos chiquímico e 3-dehidroquínico apresentaram fragmentação característica de ácido carboxílico (**Figura 55**) e o ácido quínico foi identificado apenas por MS, íon m/z 193,0705 $[M+H]^+$ (WHEELER, 2016).

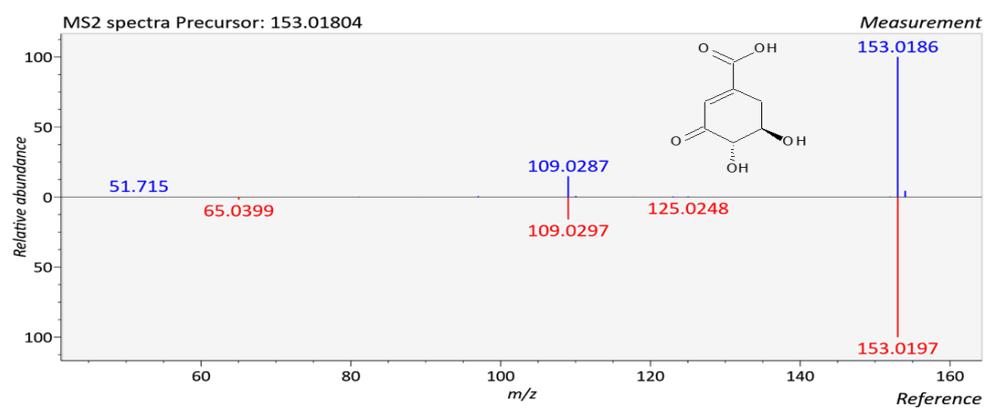


Figura 54 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial, do ácido 3-dehidrochiquímico.

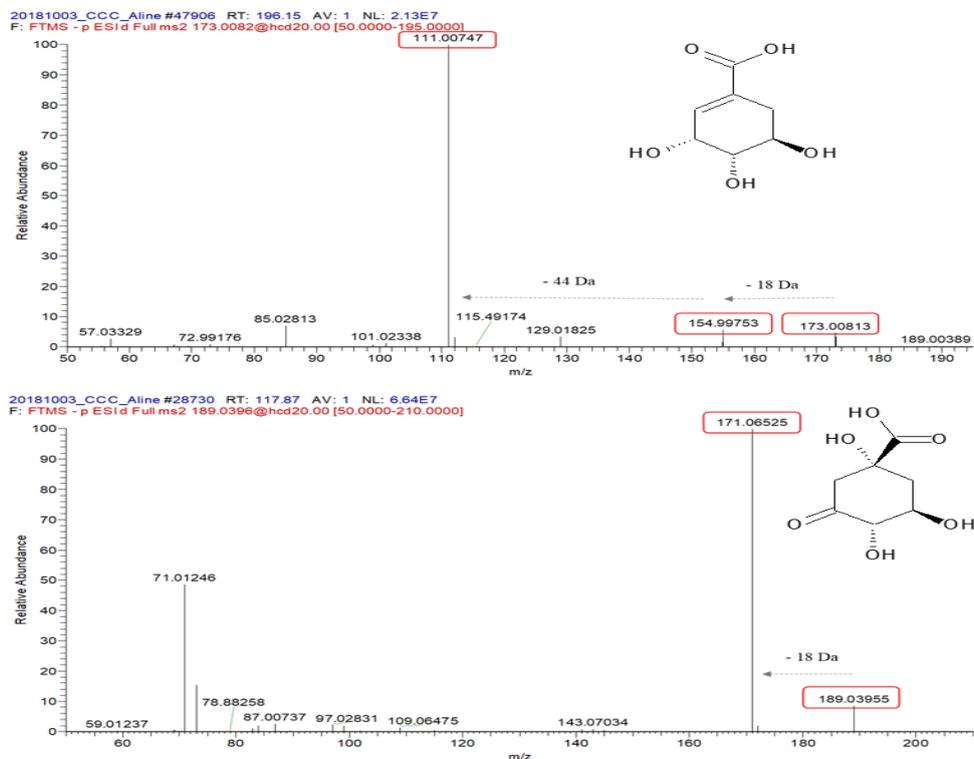


Figura 55 – Espectros de massas MS/MS do ácido chiquímico (superior) e ácido 3-dehidroquínico (inferior).

Entre os ácidos dicarboxílicos alifáticos, foram identificados: o ácido tartárico e seus derivados, tartarato de metila, tartarato de dimetila e tartarato de dietila; o ácido succínico; o ácido málico e seu derivado, ácido etil-málico; o ácido hidroxi-glutárico; o ácido maleico; o ácido mesacônico e o ácido malônico e seu derivado malonato de dietila (**Figura 56**). Estas substâncias ainda não foram descritas na literatura para a espécie *S. malaccense*.

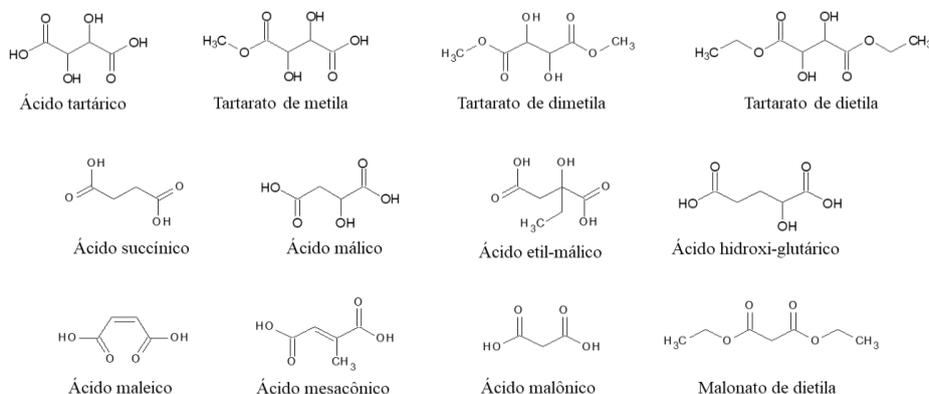


Figura 56 – Estruturas químicas dos ácidos dicarboxílicos alifáticos identificados.

Dentre as substâncias: ácido tartárico, tartarato de metila, tartarato de dimetila e tartarato de dietila, apenas a primeira foi identificada pelo MS-Dial, as demais foram identificadas por busca na literatura. No espectro de massas MS/MS do ácido tartárico (**Figura 57**), o íon molecular m/z 149,00793 $[M-H]^-$ perde $-OH$ em forma de água $[M-H-H_2O]^-$ e gera um sinal pouco abundante em m/z 130,9974, com a perda do grupo carboxila ($-COOH$) $[M-H-44]^-$ gera um sinal em m/z 105,0184 (PAVIA et al., 2015). No caso de ácidos carboxílicos, o rearranjo de McLafferty produz um pico em m/z 60, para esta substância, considerando o $[M-H]^-$, tem-se um pico em m/z 59,0126.

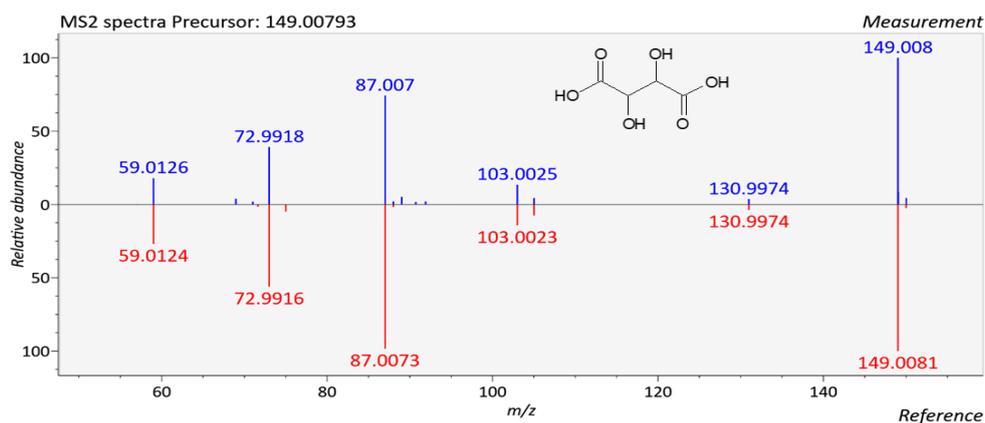


Figura 57 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial, do ácido tartárico.

Para os ésteres do ácido tartárico: tartarato de metila, tartarato de dimetila e tartarato de dietila, o padrão de fragmentação apresentado auxiliou na identificação dessas substâncias,

bem como a observação de sinais de íon molecular pouco abundantes nos espectros de massas (PAVIA et al., 2015).

No caso do tartarato de metila, íon molecular m/z 163,02379 $[M-H]^-$ (**Figura 58**), apresenta perda de -32 Da referente ao grupo metoxila ($-OCH_3$), gerando o íon m/z 130,99739 ou perda de -60 Da referente a $-COOHCH_3$, gerando o íon m/z 103,00237 referente aos resíduos do ácido tartárico.

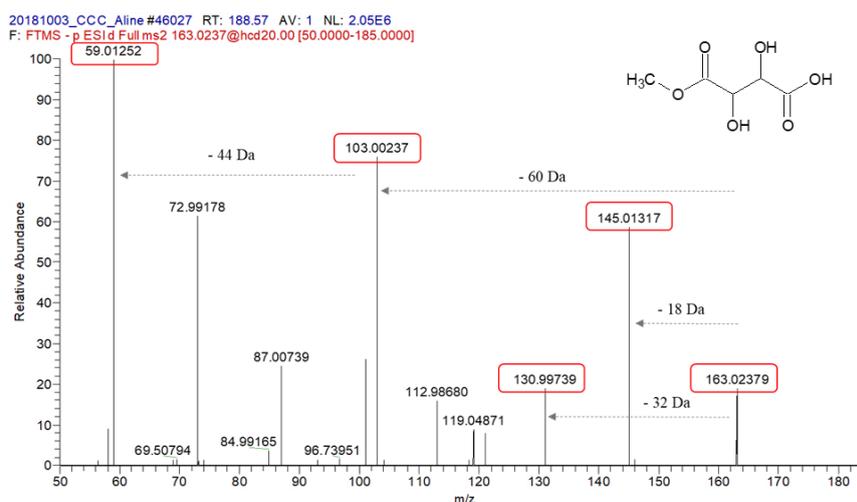
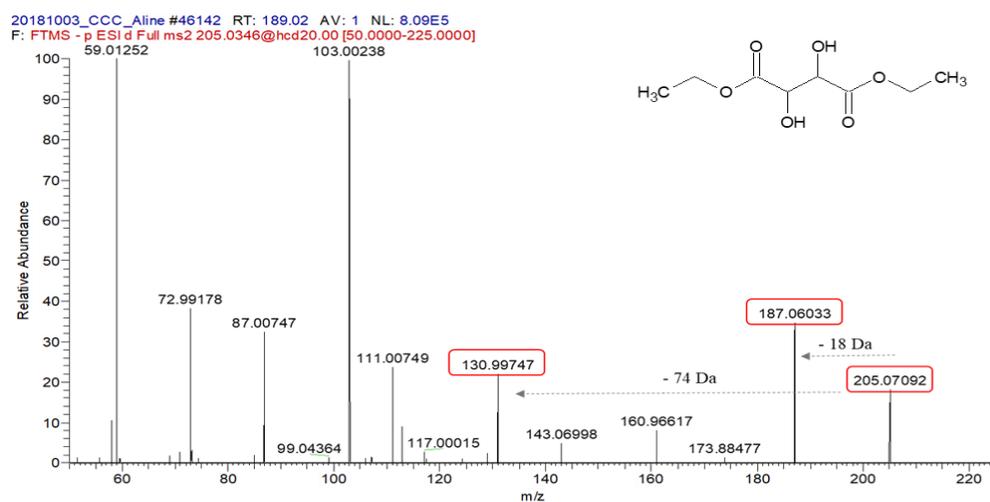
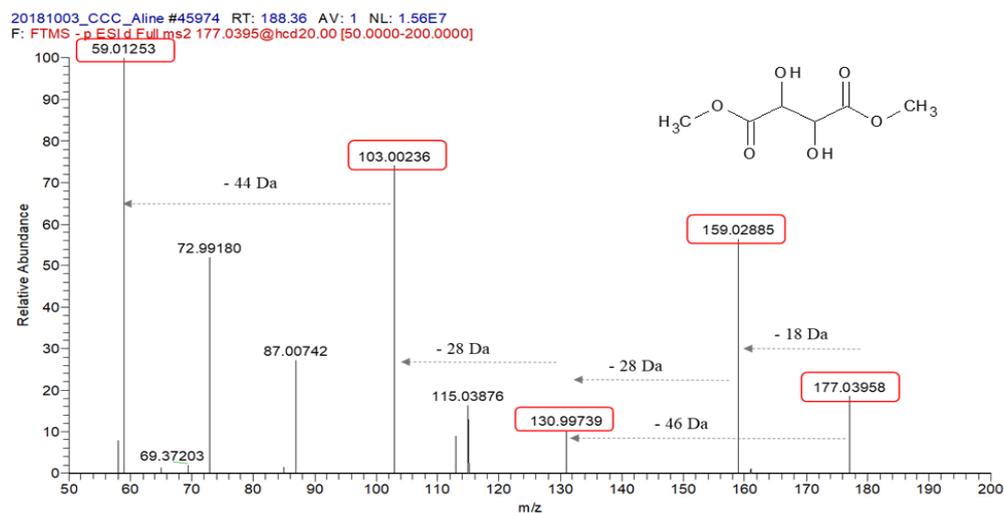


Figura 58 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do tartarato de metila.

O padrão de fragmentação se desdobra para o tartarato de dimetila, íon molecular m/z 177,03958 $[M-H]^-$ (**Figura 59**), porém com perda inicial de -46 Da dos grupos metila e metoxila, gerando o íon m/z 130,99739 $[M-H-46]^-$ referente ao resíduo do ácido tartárico e o tartarato de dietila com íon molecular m/z 205,07092 $[M-H]^-$ com perda -74 Da dos grupos etila e etoxila, resultando no íon m/z 130,99747 $[M-H-74]^-$, referente aos resíduos do ácido tartárico (**Figura 60**).



O ácido etil-málico com íon molecular m/z 161,04450 $[M-H]^-$ apresenta fragmentos formados pela perda de -18 Da e clivagem do grupo carboxila na forma neutra (-45 Da), resultando nos íons m/z 143,03387 $[M-H-H_2O]^-$ e m/z 115,03903 $[M-H-H_2O-COOH]^-$, respectivamente (Figura 61).

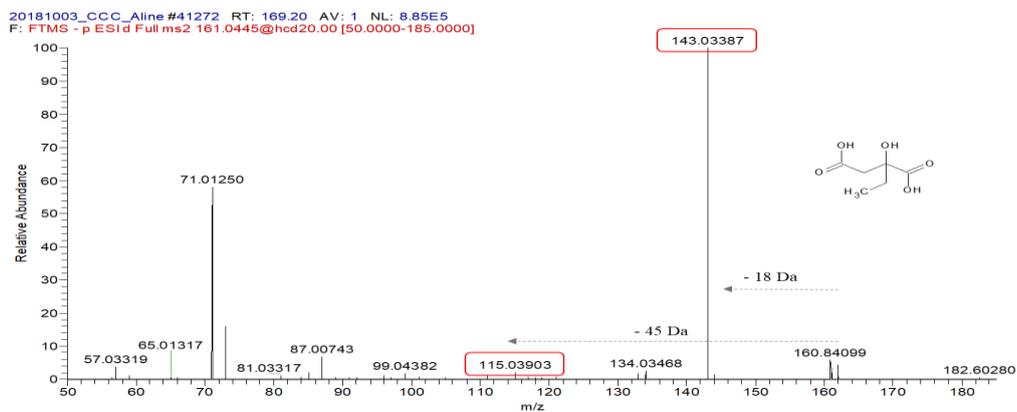


Figura 61 – Espectros de massas MS/MS do ácido etil-málico.

O ácido malônico com íon m/z 103,00236 $[M-H]^-$ foi confirmado apenas pelo MS e seu derivado malonato de dietila, íon molecular m/z 159,06578 $[M-H]^-$ foi identificado por meio de buscas em banco de dados para o referido íon. As perdas equivalem aos dois grupos etil da molécula, sendo uma perda neutra de -29 Da, gerando o pico base m/z 130,98244 $[M-H-CH_2CH_2]^-$ e perda -28 Da, formando o pico m/z 102,98741 $[M-H-CH_2CH_2]^-$ (Figura 62).

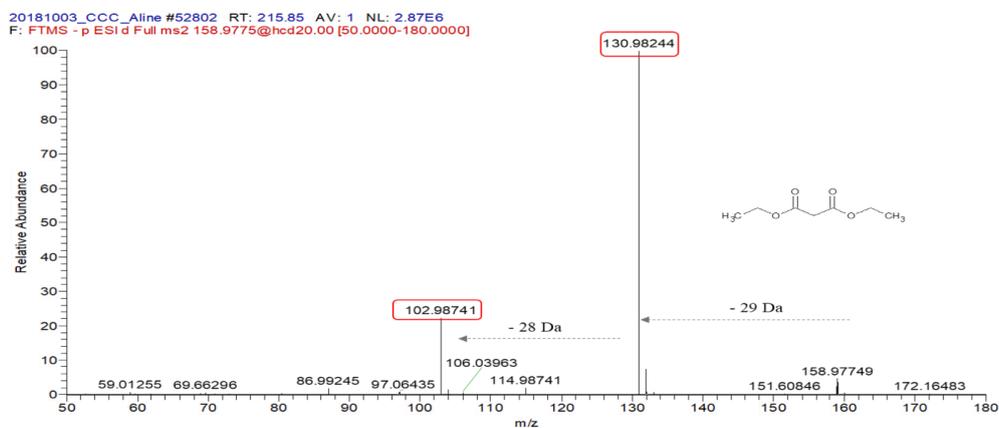


Figura 62 – Espectros de massas MS/MS do malonato de dietila.

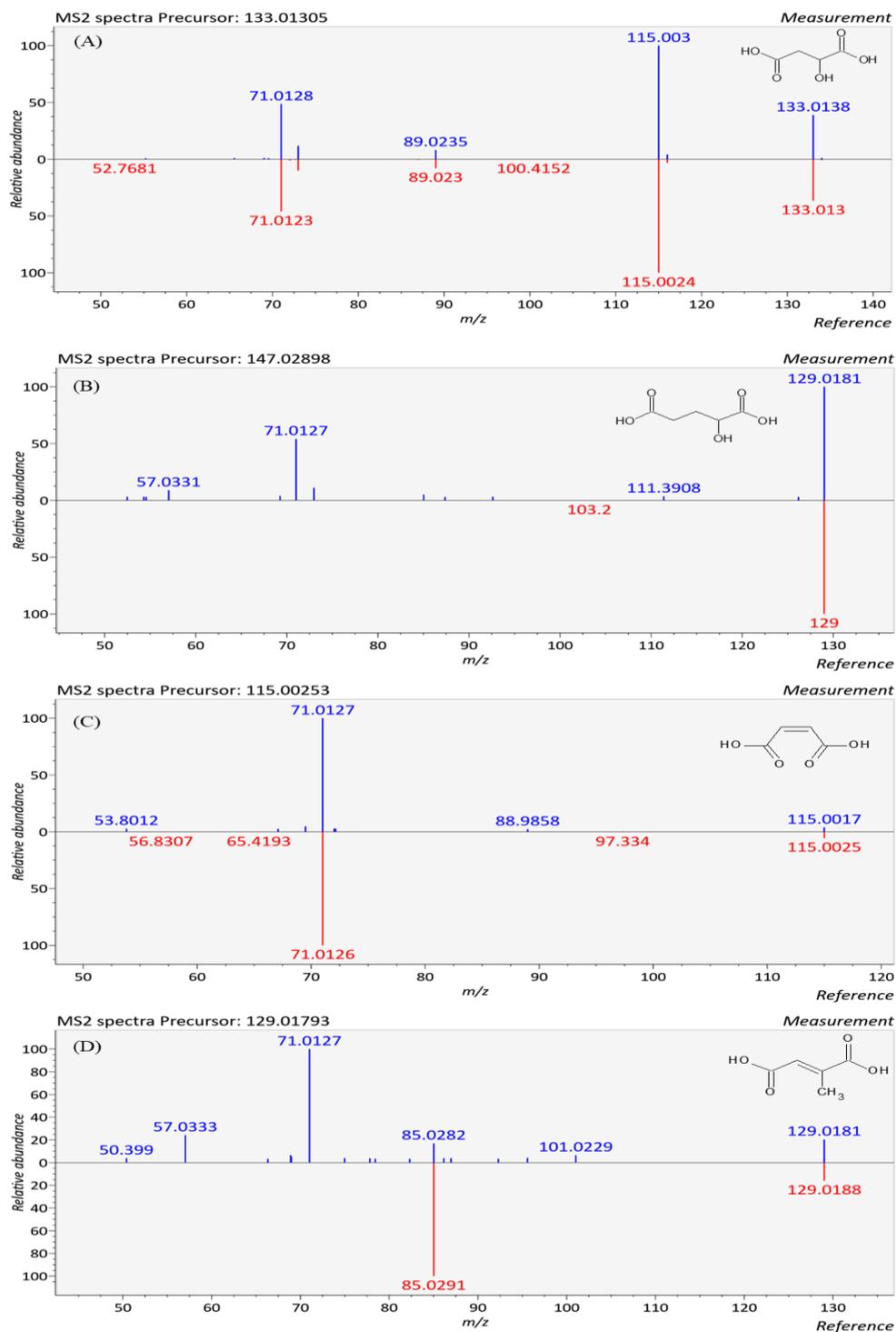


Figura 63 – Espectros de massas MS/MS dos ácidos: (A) málico, (B) hidroxi-glutárico, (C) maleico e (D) mesacônico.

O ácido succínico, identificado apenas por MS, foi proposto pelo *software* MZmine, com íon m/z 117,01800 [M-H]⁻, este ácido está presente no metabolismo primário da planta é o precursor de outras substâncias identificadas no EBFJ. Os ácidos: málico, hidroxi-glutárico, maleico e mesacônico foram identificados pelo MS-Dial, apresentando fragmentos formados pela clivagem do grupo carboxila (-44 Da) e/ou perda de água (-18 Da), além de possuírem em comum o íon m/z 71,0127 (**Figura 63**).

Também foram identificados ácidos tricarboxílicos, como o ácido aconítico, o ácido cítrico e seu isômero, o ácido isocítrico, e o éster citrato de isopropila, representados na **Figura 64**, com exceção do citrato de isopropila que teve sua proposta de identificação pelo MZmine, todos os outros ácidos citados foram identificados pelo MS-Dial. Estas substâncias ainda não foram descritas na literatura para a espécie *S. malaccense*.

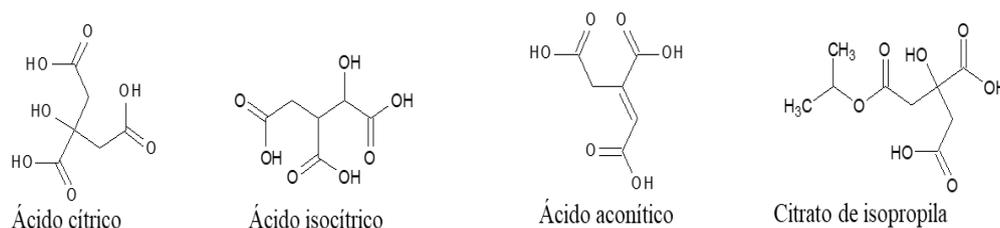


Figura 64 – Estruturas moleculares dos ácidos tricarboxílicos identificados no EBFJ.

A diferença dos ácidos cítrico e isocítrico para o aconítico é a presença de uma hidroxila a mais. Os ácidos: cítrico e isocítrico estão identificados pelo íon m/z 191,01913 [M-H]⁻, apresentando perdas de -18 Da, referente a clivagem do grupo hidroxila em forma de água, gerando o íon m/z 173,0078 [M-H-18]⁻.

O ácido aconítico foi identificado pelo íon m/z 173,00832 [M-H]⁻, apresenta perda de -44 Da referente a clivagem do grupo carboxílico, gerando o íon m/z 129,0180 [M-H-COO]⁻, com posterior perda de -18 Da, formando o íon m/z 111,0071 [M-H-COO-H₂O]⁻, este padrão de fragmentação também é observado para os ácidos cítrico e isocítrico (**Figura 65**).

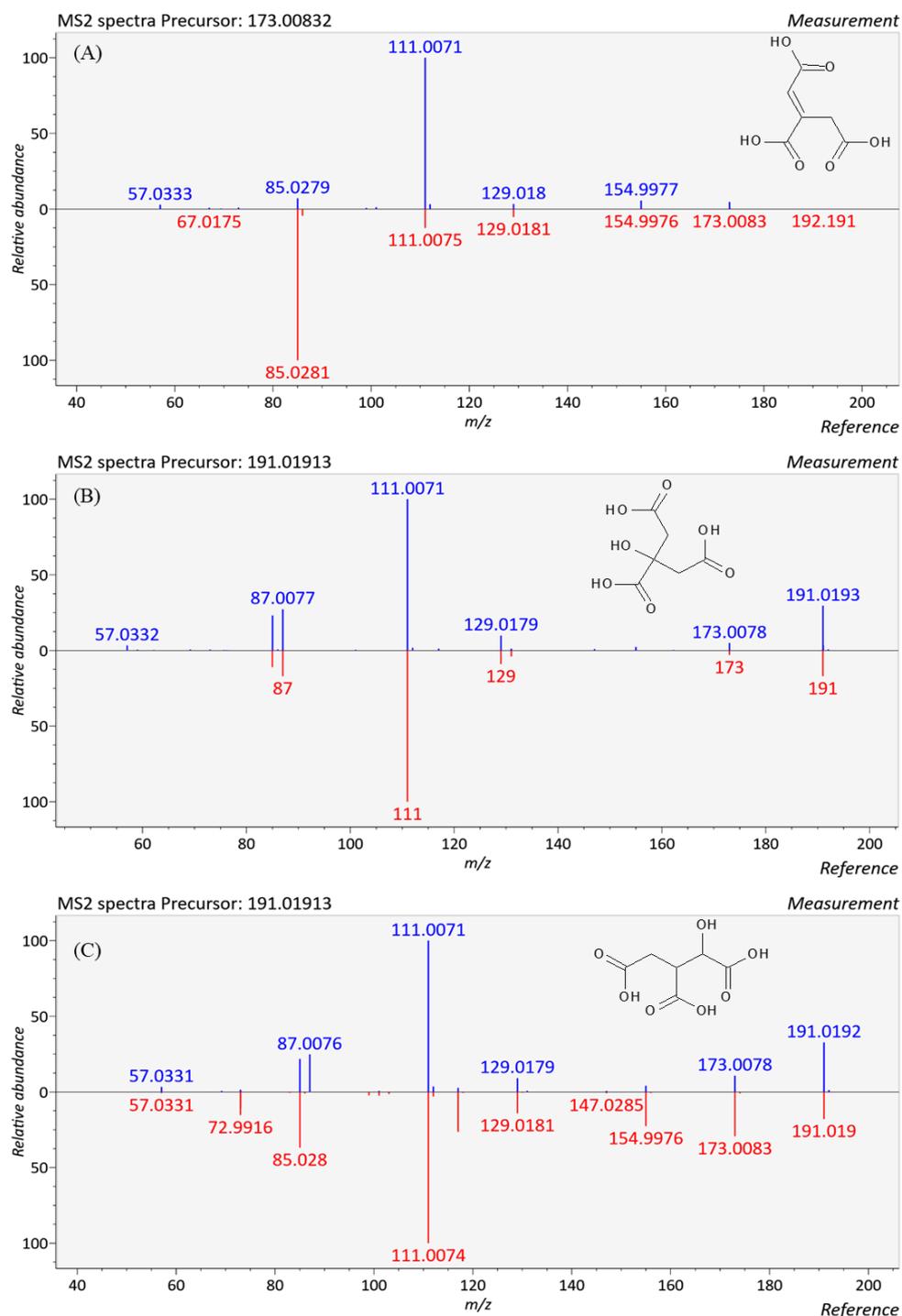


Figura 65 – Espectros de massas MS/MS, modo negativo, obtidos pelo *software* MS-Dial dos ácidos: (A) aconítico, (B) cítrico e (C) isocítrico.

O citrato de isopropila foi identificado pelo íon molecular m/z 235,16838 $[M+H]^+$, apresentando perda inicial de -60 Da equivalente ao grupo isopropílico, gerando o resíduo do ácido cítrico com íon m/z 175,05966 $[M+H-CH_2COOH]^+$ (**Figura 66**).

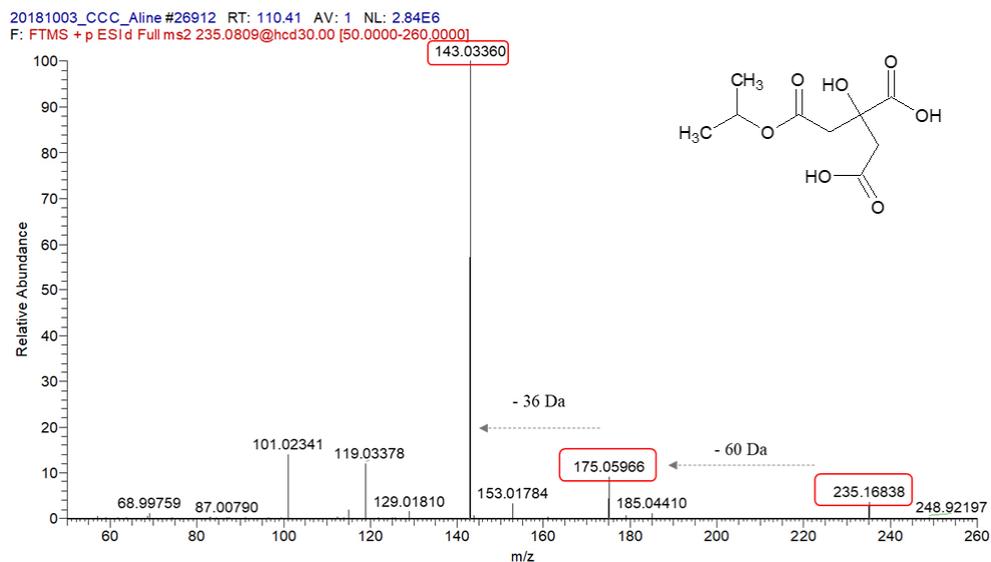
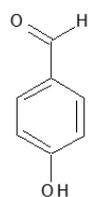


Figura 66 – Espectro de massas MS/MS da substância citrato de isopropila, m/z 235 $[M+H]^+$.

Substâncias fenólicas

O 4-hidroxibenzaldeído já relatado como substância identificada no gênero *Syzygium*, teve sua proposta de identificação apenas por MS com o íon m/z 121,02831 $[M-H]^-$ (**Figura 67**).



4-hidroxibenzaldeído

Figura 67 – Estrutura química da substância 4-hidroxibenzaldeído.

Da classe dos ácidos fenólicos foram identificados alguns ácidos hidroxibenzoicos (estrutura comum, C6-C1) e ácidos hidroxicinâmicos, os quais constituem-se por compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos, incluindo o grupo carboxila (estrutura comum C6-C3). A **Figura 68** apresenta alguns ácidos hidroxibenzoicos identificados no fracionamento por CCC do EBFJ, bem como as bases conjugadas, 2,3-dihidroxi benzoato e 2,5-dihidroxi benzoato. Não há relatos da identificação destas substâncias na espécie *S. malaccense*.

Com base na literatura, foi possível comparar os espectros de massas MS/MS correspondentes ao ácido 4-hidroxibenzoico e propor uma tentativa de identificação a partir do íon molecular m/z 137,02316 $[M-H]^-$, com perda de -44 Da equivalente a clivagem do grupo carboxílico, formando o íon m/z 93,03318 $[M-H-COO]^-$. O mesmo ocorre com a tentativa de identificação do ácido protocatecuico, a partir do íon molecular m/z 153,01822 $[M-H]^-$ com perda de -44 Da equivalente a clivagem do grupo carboxílico, formando o íon m/z 109,02821 $[M-H-COO]^-$ (**Figura 69**).

As bases conjugadas, 2,3-dihidroxi benzoato e 2,5-dihidroxi benzoato foram identificadas pelo MS-Dial. O 2,3-dihidroxi benzoato foi identificado pelo íon m/z 153,01804 $[M-H]^-$ e o 2,5-dihidroxi benzoato foi identificado pelo íon m/z 153,01848 $[M-H]^-$, ambos apresentam fragmentação com perda de -44 Da referente a clivagem do grupo carboxílico, formando o íon m/z 109,0286 $[M-H-COO]^-$ (**Figura 70**).

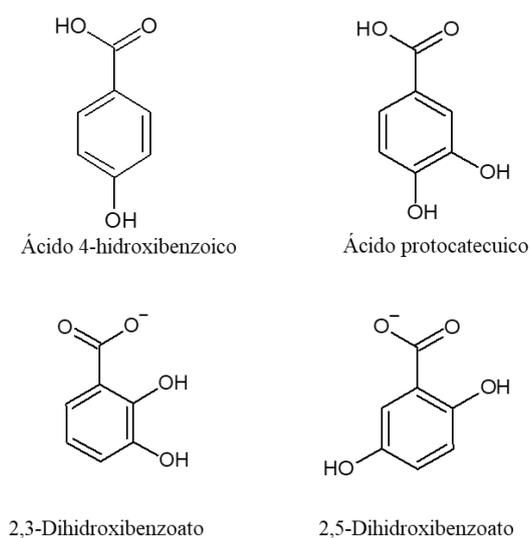


Figura 68 – Estruturas químicas de algumas substâncias fenólicas identificadas no EBFJ.

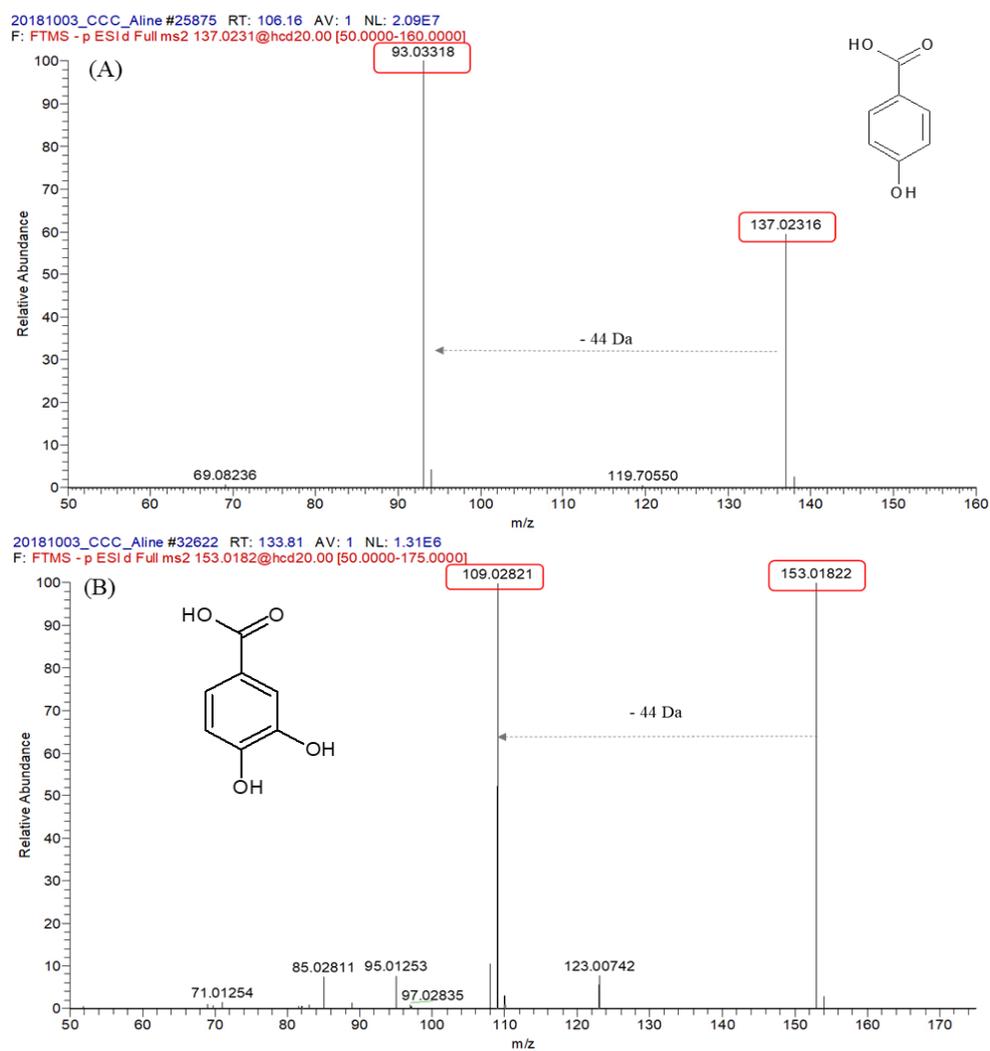


Figura 69 – Espectros de massas MS/MS, no modo negativo, das substâncias (A) ácido 4-hidroxibenzoico e (B) ácido protocatecuico.

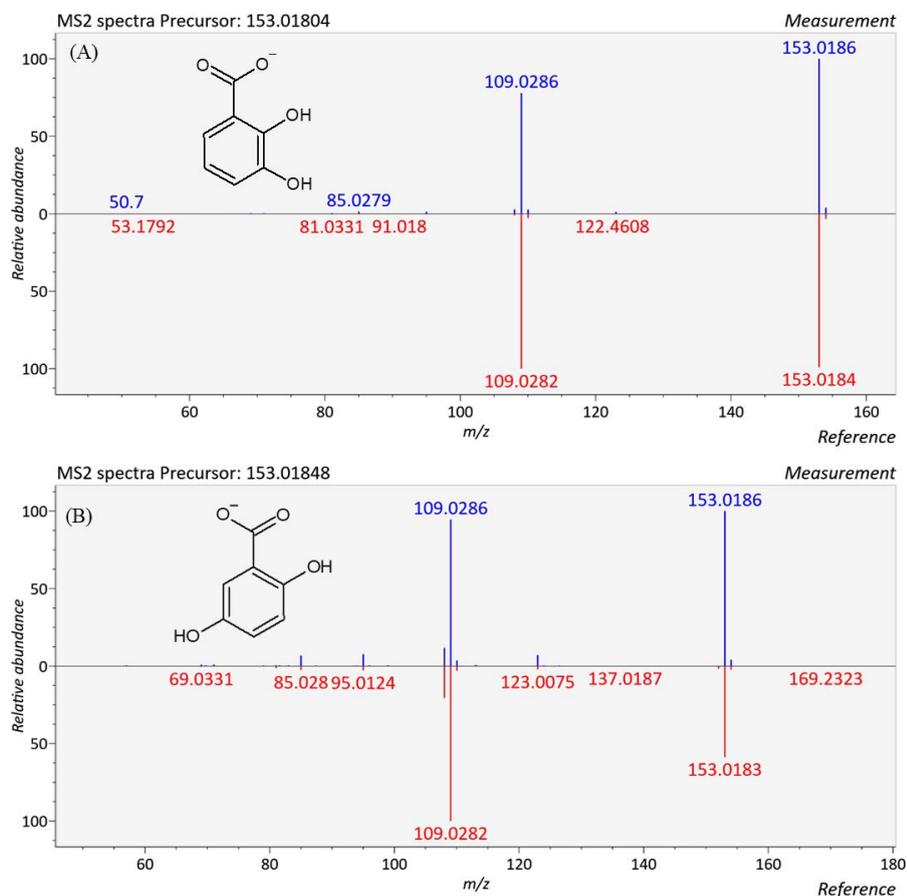


Figura 70 – Espectros de massas MS/MS, no modo negativo, obtidos pelo *software* MS-Dial das substâncias (A) 2,3-dihidroxibenzoato e (B) 2,5-dihidroxibenzoato.

Foram identificados, o ácido gálico e seus derivados: galato de metila, galato de etila, ácido galoilelágico, ácido elágico e seus derivados: o ácido metilelágico e o ácido dimetilelágico (**Figura 71**). Alguns trabalhos científicos relatam a presença de ácidos fenólicos, na espécie *S. malaccense*, como por exemplo, o ácido gálico, ácido elágico e o ácido metilelágico (ARUMUGAM et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2006; REYNERTSON et al., 2008; LOWRY, 1968). As substâncias: galato de metila, galato de etila, ácido galoilelágico e ácido dimetilelágico, foram identificadas pela primeira vez para a espécie *S. malaccense* e no gênero *Syzygium*.

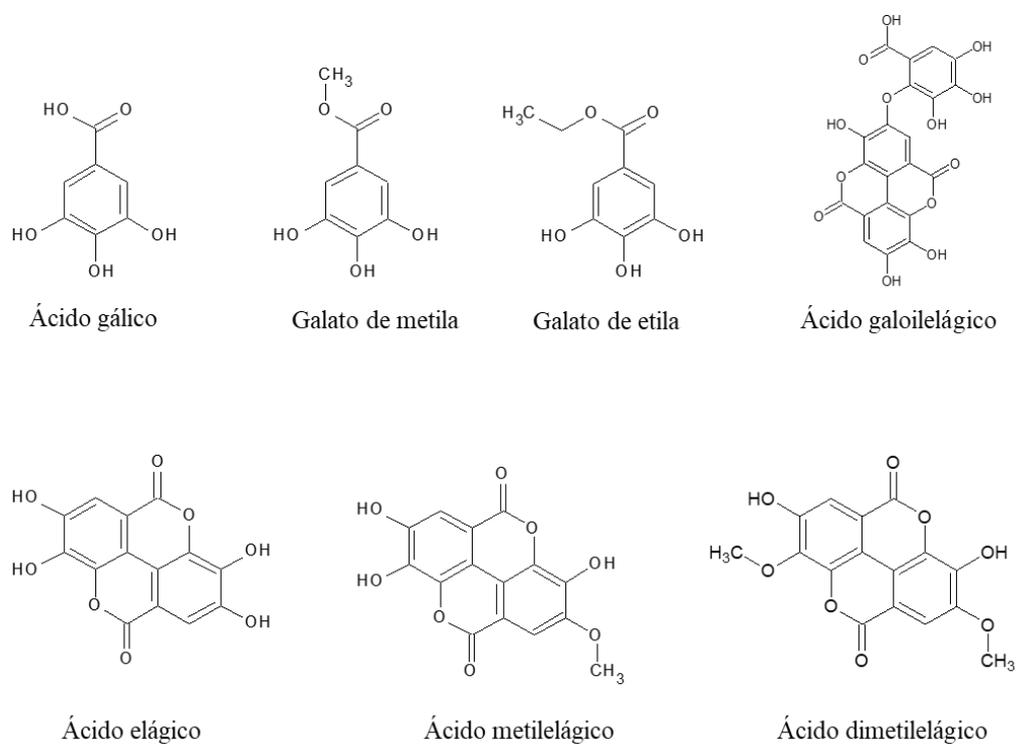


Figura 71 – Ácidos fenólicos referentes aos hidroxibenzoicos.

A identificação dos ácidos fenólicos se deu pelo padrão de fragmentação apresentado: ácido gálico, identificado pelo MS-Dial (**Figura 72**), com íon m/z 169,01350 $[M-H]^-$ e perda de -44 Da referente a clivagem do grupo carboxílico, gerando o íon m/z 125,0230 $[M-H-44]^-$.

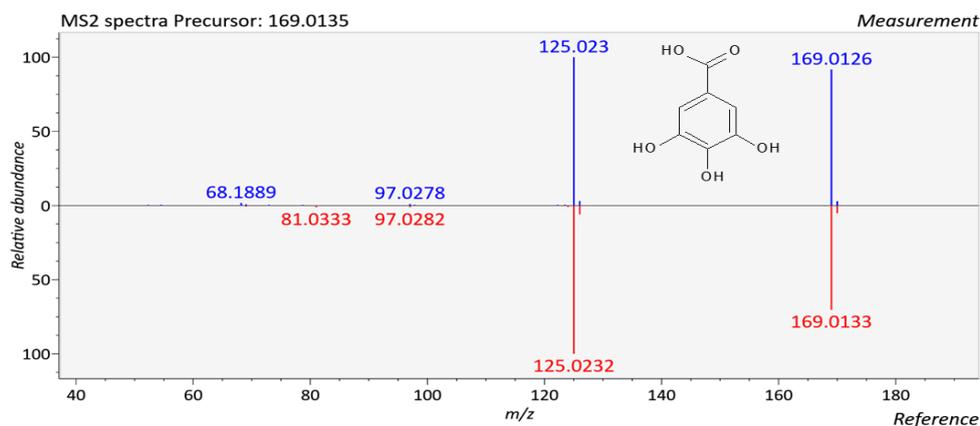


Figura 72 – Espectros MS/MS do ácido gálico.

O galato de metila foi identificado pelo íon m/z 183,02888 $[M-H]^-$ com perda neutra de -15 Da referente ao grupo metila, formando o íon m/z 168,00537 $[M-H-CH_3]^-$ configurando a presença de resíduo do seu precursor ácido gálico. O galato de etila foi identificado pelo íon m/z 197,04471 $[M-H]^-$ com perda de -28 Da referente a etila, gerando o íon m/z 169,01315 $[M-H-CH_2CH_2]^-$, configurando o resíduo do seu precursor ácido gálico (**Figura 73**).

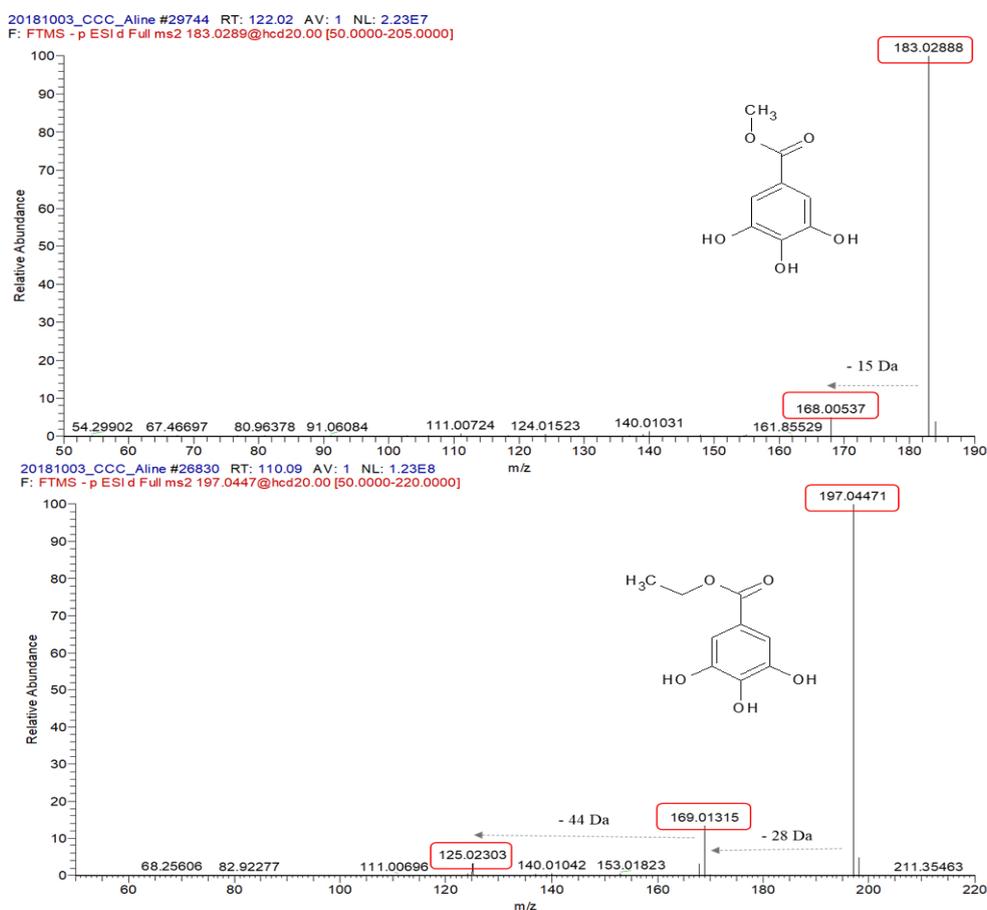


Figura 73 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, das substâncias: galato de metila (superior) e galato de etila (inferior).

O ácido galoilelágico foi identificado pelo íon m/z 469,00473 $[M-H]^-$, com a perda de -44 Da referente ao grupo carboxílico, gerou o íon m/z 425,01514 $[M-H-COO]^-$ e com a perda de -125 Da, gerou o íon m/z 299,99103 $[M-H-COO-125]^-$, referente a perda do grupo galoil e formação do íon equivalente ao resíduo do ácido elágico (**Figura 74**).

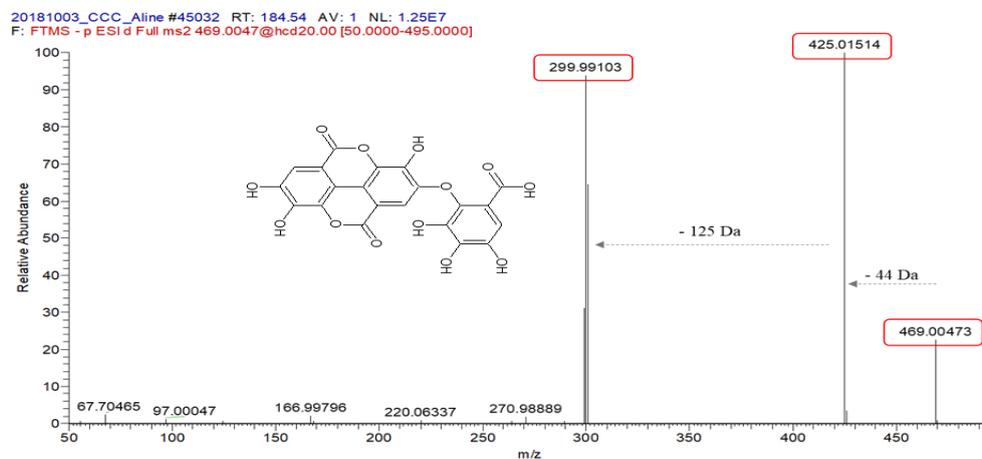


Figura 74 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido galoilégico.

A proposta de identificação do ácido elágico se deu pelo íon m/z 300,99899 $[M-H]^-$, apresentando perda de -44 Da referente ao grupo carboxílico, gerando o íon m/z 257,00818 $[M-H-COO]^-$ (Figura 75).

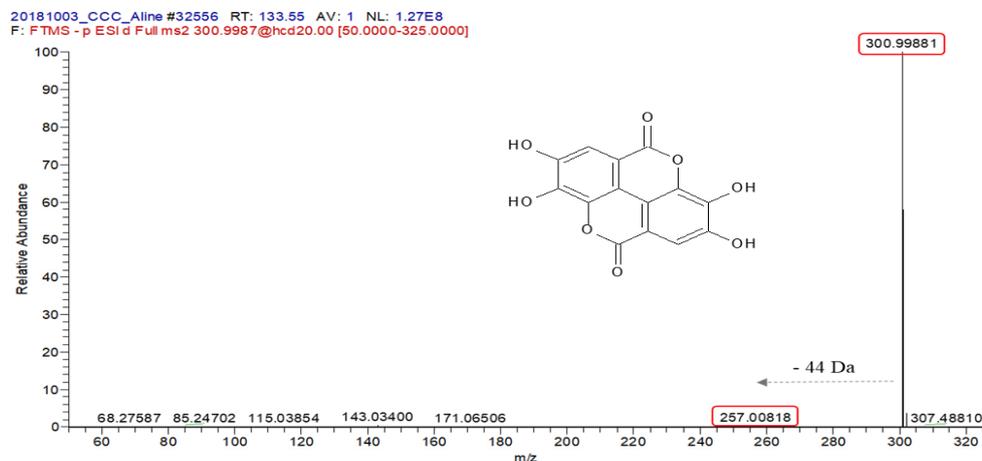


Figura 75 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido elágico.

O ácido metilelágico foi identificado pelo íon m/z 315,01456 $[M-H]^-$ com perda neutra de -15 Da, característico de perda de metila, formando o íon m/z 299,99088 $[M-H-15]^-$ referente ao seu precursor ácido elágico (Figura 76). O ácido dimetilelágico não apresentou espectro de fragmentação MS/MS, apenas íon MS, identificado pelo íon m/z 329,02994 $[M-H]^-$.

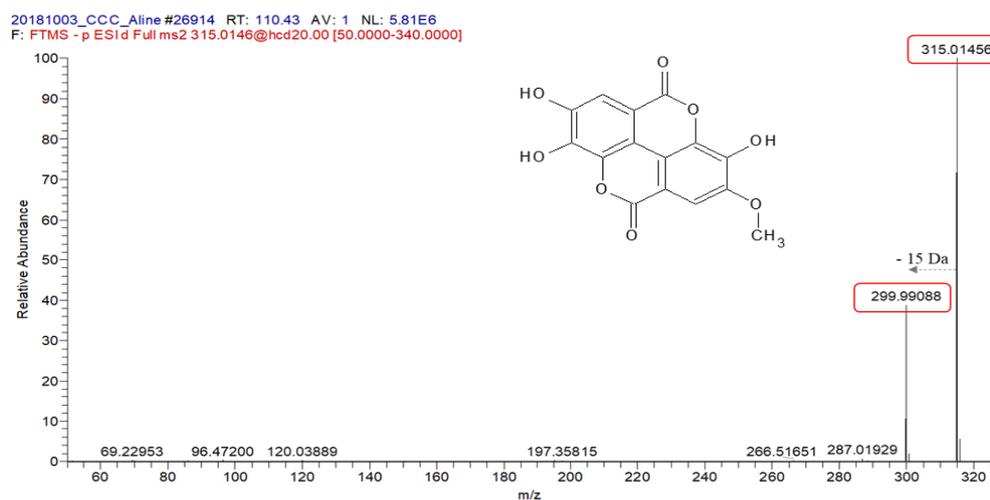


Figura 76 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, do ácido metileláxico.

Ácidos hidroxicinâmicos

Dentre os ácidos fenólicos encontrados, destaca-se a presença dos ácidos hidroxicinâmicos, tais como o ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) e um derivado éster com o ácido tartárico: o ácido coutárico (ácido *p*-cumaroil-tartárico), ácido cafeico, ácido ferúlico e um derivado éster com ácido tartárico: o ácido fertárico (ácido feruloil-tartárico) (Figura 77). Entre essas substâncias, apenas o ácido *p*-cumárico já foi identificado na espécie *S. malaccense*, as demais foram identificadas pela primeira vez neste trabalho.

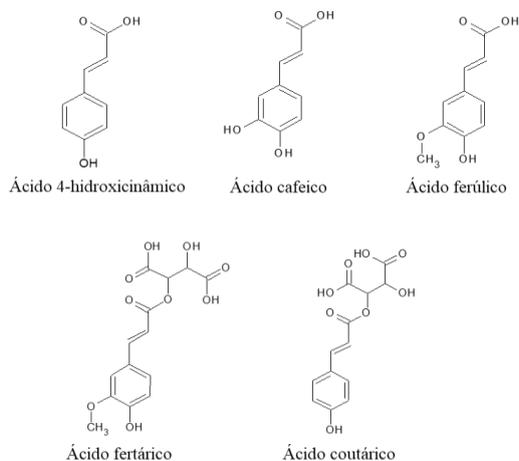


Figura 77 – Estruturas químicas dos ácidos hidroxicinâmicos e derivados identificados no EBFJ.

O ácido 4-hidroxicinâmico foi proposto pelo MS-Dial, identificado pelo íon molecular m/z 163,03891 [M-H]⁻ que apresenta perda de -44 Da referente a clivagem do grupo carboxílico, formando o íon m/z 119,0483 [M-H-COO]⁻ (**Figura 78**). O seu derivado éster, o ácido coutárico, foi identificado com base na literatura (Maier, et al., 2006) e pela presença do íon m/z 295,04572 [M-H]⁻, a perda de -132 Da referente ao resíduo do ácido tartárico, gerou o íon m/z 163,03914 [M-H-132]⁻ que é alusivo ao ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) (**Figura 79**).

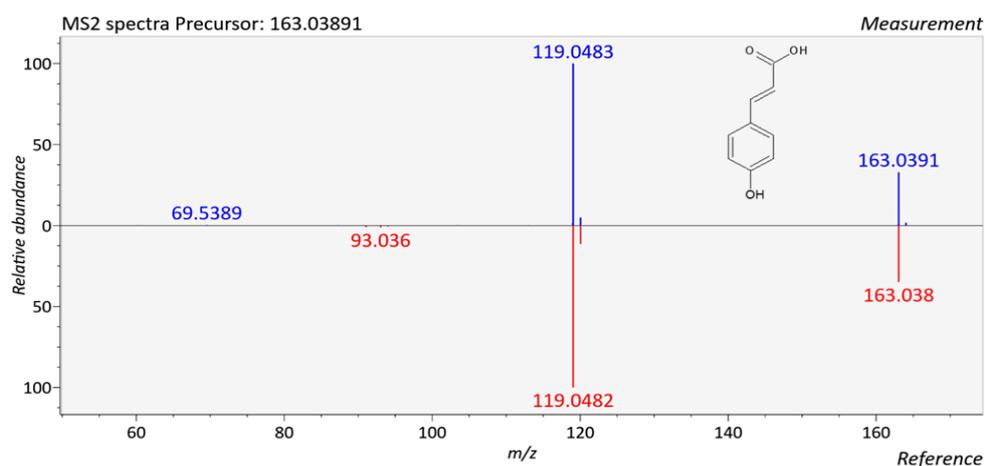


Figura 78 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, obtido pelo *software* MS-Dial do ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico).

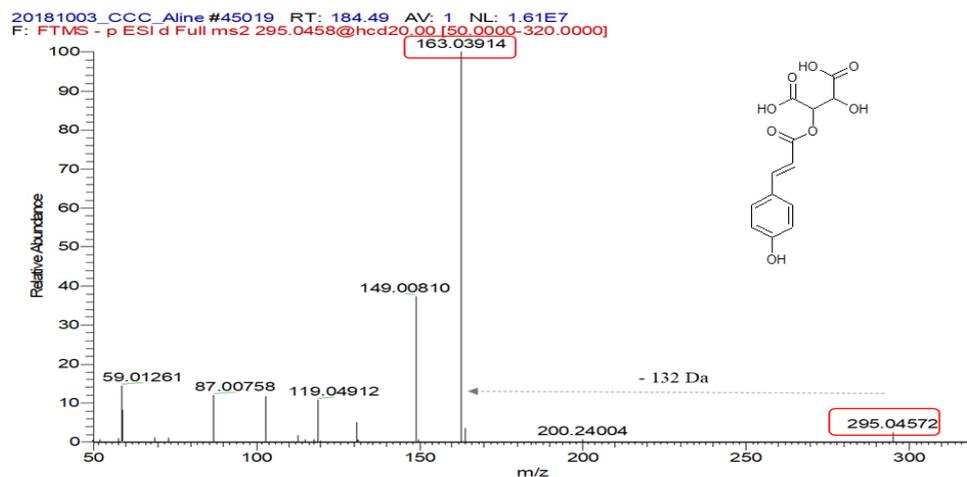


Figura 79 – Espectro de massas MS/MS, no modo negativo, do ácido coutárico.

O ácido cafeico foi caracterizado pelo íon molecular m/z 179,03418 $[M-H]^-$ com perda neutra de -45 Da referente a um grupo carboxila, gerando o íon m/z 134,98680 $[M-H-COOH]^-$ (Figura 80).

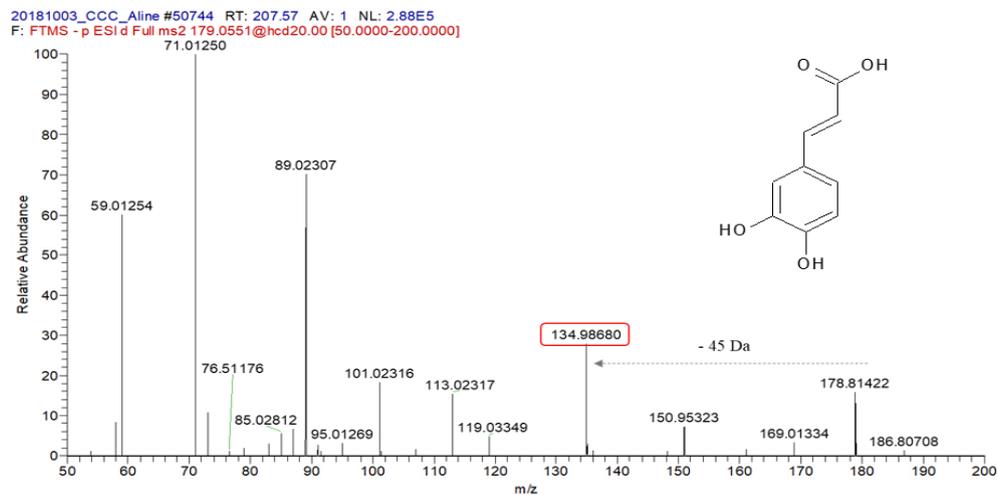


Figura 80 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido cafeico.

O ácido ferúlico foi identificado pelo íon molecular m/z 193,04967 $[M-H]^-$, com a perda de -44 Da do grupo carboxílico, gerou o íon m/z 149,09587 $[M-H-COO]^-$, apresentou também fragmento com perda neutra de -15 Da referente ao grupo metila, resultando no íon

m/z 178,02626 $[M-H-15]^-$ e perda de -32 Da referente ao grupo metoxila, gerando o íon m/z 161,02328 $[M-H-32]^-$ (Figura 81).

O éster correspondente, o ácido fertárico foi identificado pelo íon molecular m/z 325,03735 $[M-H]^-$, com perda do resíduo do ácido tartárico -132 Da, formando o íon m/z 193,04982 $[M-H-132]^-$ e posteriormente, sofre a perda de -44 Da referente ao grupo carboxílico, formando o íon m/z 149, $[M-H-132-COO]^-$ (Figura 82).

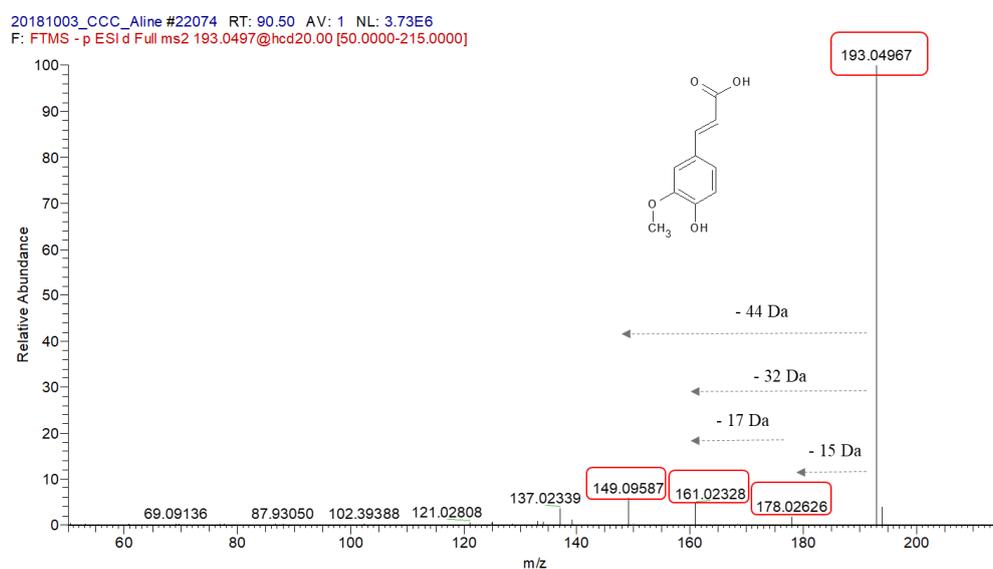


Figura 81 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido ferúlico.

20181003_CCC_Aline #45002 RT: 184.42 AV: 1 NL: 4.34E7
F: FTMS -p ESI d Full ms2 325.0371@hcd20.00 [50.0000-350.0000]

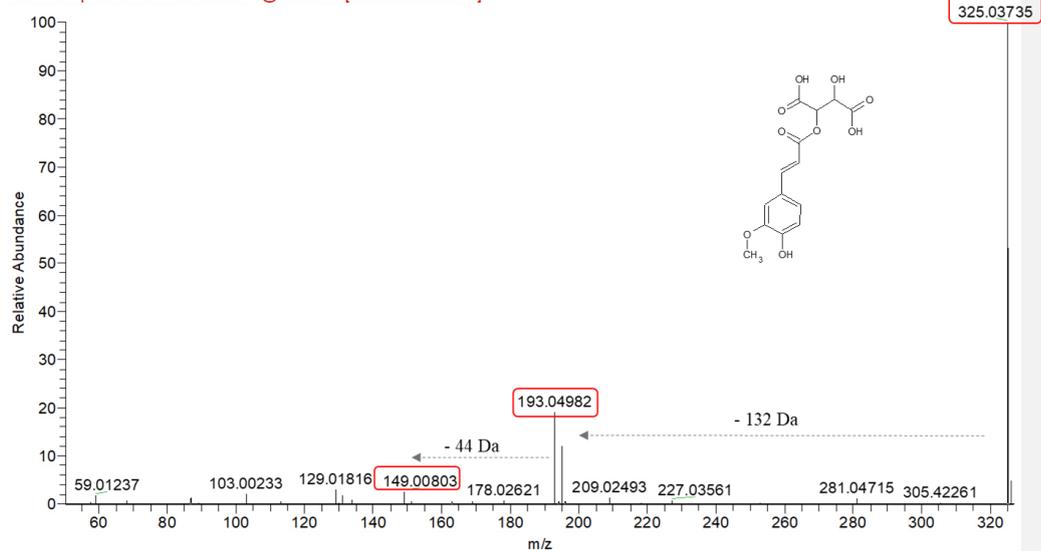


Figura 82 – Espectro de massas MS/MS, modo negativo, do ácido fertárico.

Flavonoides

Também foram encontradas no fracionamento CCC, substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides, ou seja, aquelas que apresentam como esqueleto básico C6-C3-C6.

A antocianidina delfinidina (**Figura 83**) foi identificada pelo íon molecular m/z 303,04935 $[M]^+$, com perda inicial de -18 Da referente a clivagem do grupo hidroxila em forma de água, gerando o íon m/z 285,03897 $[M-H_2O]^+$ e perda de -28 Da referente a $-CO$, gerando o íon m/z 257,04419 $[M-H_2O-CO]^+$ (**Figura 84**). Este é o primeiro relato de identificação desta substância para a espécie *S. malaccense*.

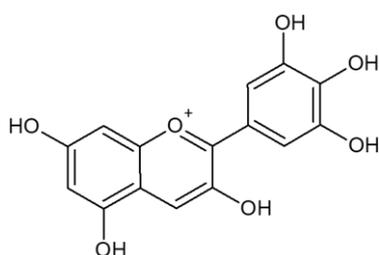


Figura 83 – Estrutura molecular da antocianidina delfinidina.

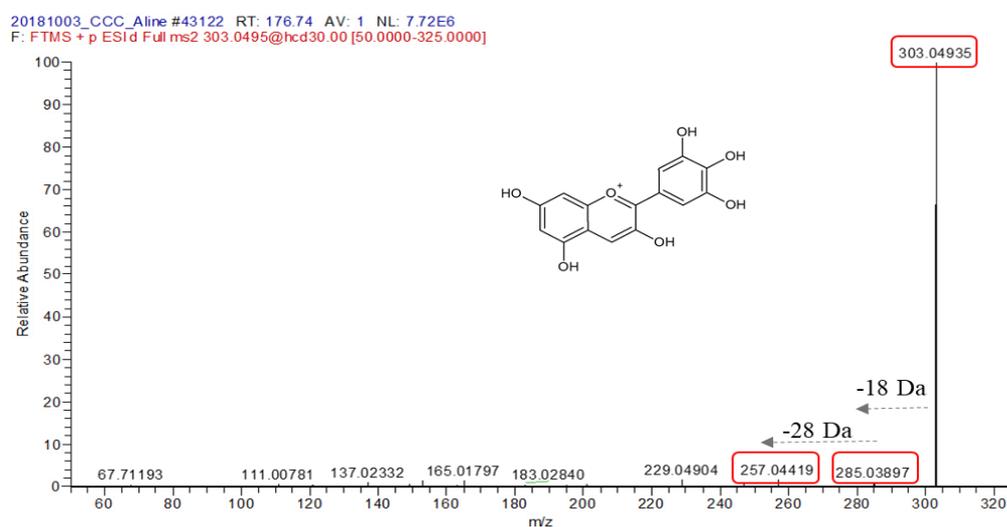


Figura 84 – Espectro de massas da substância delfinidina.

O flavonol quercetina, derivados isômeros glicosilados: quercetina-7-*O*-ramnosídeo e quercetina-3-*O*-ramnosídeo e um derivado de quercetina-7-*O*-ramnosídeo foram identificados

no EBFJ, as estruturas moleculares dessas substâncias estão demonstradas na **Figura 85**. Estas substâncias já foram descritas para a espécie *Syzygium malaccense* (BATISTA et al., 2017; NOREEN et al., 1998; REYNERTSON, 2008), com exceção do derivado de quercetina-7-*O*-ramnosídeo que não teve sua estrutura definida na literatura.

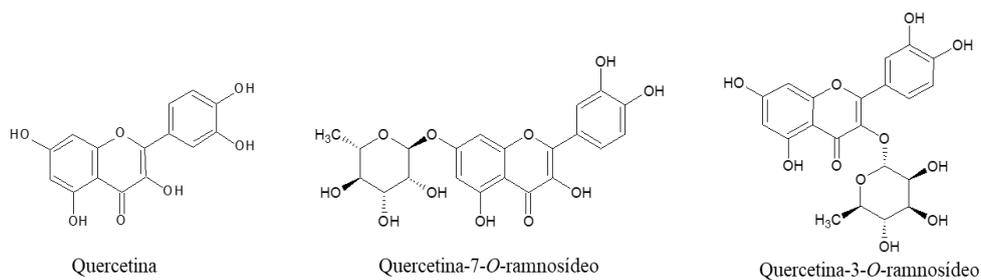


Figura 85 – Estruturas moleculares da quercetina e derivados glicosilados.

A proposta de identificação para quercetina se deu pelo íon molecular m/z 303,04926 $[M+H]^+$ que apresenta perda de -18 Da referente ao grupo hidroxila, gerando o íon m/z 285,03891 $[M+H-H_2O]^+$ e duas perdas consecutivas de -28 Da referentes a $-CO$, gerando respectivamente os íons m/z 257,04395 $[M+H-H_2O-CO]^+$ e m/z 229,04900 $[M+H-H_2O-2CO]^+$.

20181003_CCC_Aline #41227 RT: 169.03 AV: 1 NL: 1.34E7
F: FTMS + p ESId Full ms2 303.0495@hcd30.00 [50.0000-325.0000]

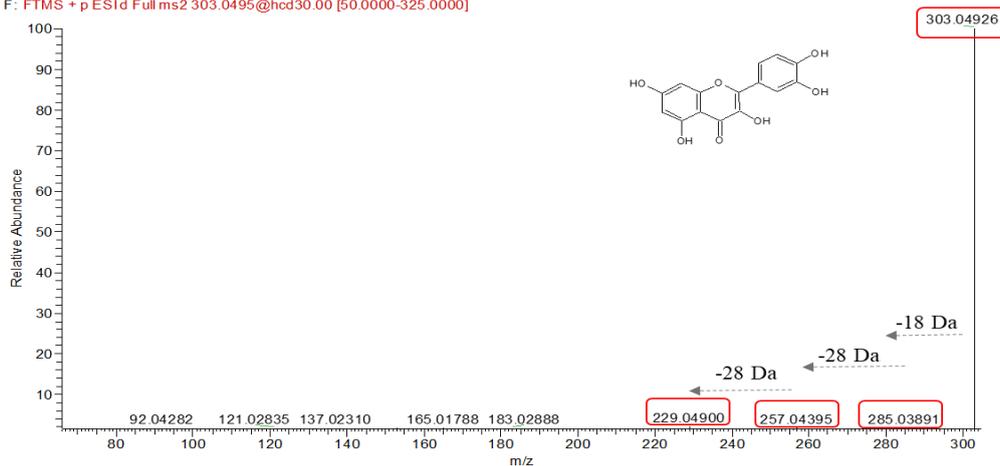


Figura 86 – Espectro de massas MS/MS, modo positivo, da quercetina.

Com o auxílio do *software* MS-Dial foram propostos duas estruturas como derivados isômeros glicosilados da quercetina: quercetina-7-*O*-ramnosídeo e quercetina-3-*O*-ramnosídeo, representados pelo íon m/z 447,0936 [M-H]⁻ e m/z 447,09366 [M-H]⁻ respectivamente, ambos com perda de -146 Da, referente a ramnose, gerando o íon m/z 301,0364 [M-H-146]⁻ (**Figura 87**).

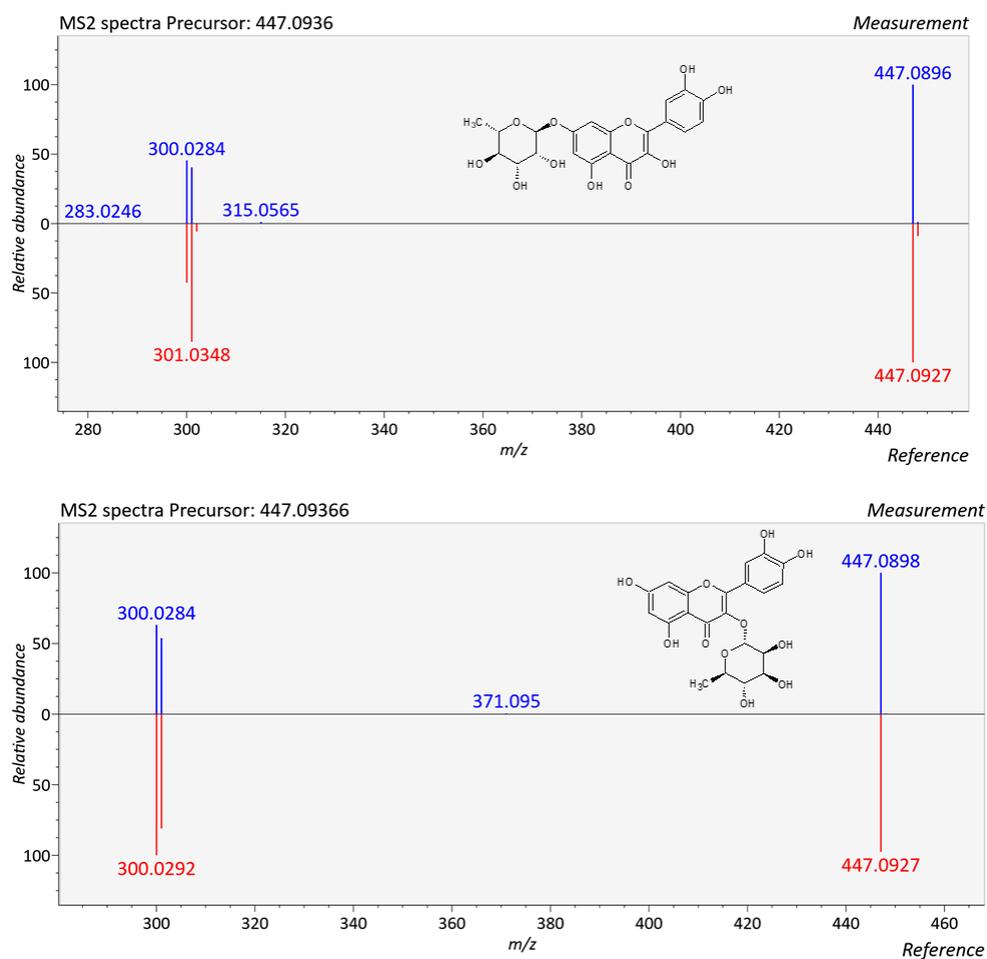


Figura 87 – Espectros de massas MS/MS obtidos no modo negativo pelo software MS-Dial das substâncias: quercetina-7-*O*-ramnosídeo (superior) e quercetina-3-*O*-ramnosídeo (inferior).

Um derivado da quercetina-3-*O*-ramnosídeo foi proposto pelo íon m/z 653,16821 [M-H]⁻ (estrutura não elucidada) com uma perda inicial de -206 Da, gerando o pico base m/z 447,09335 [M-H-206]⁻ referente ao resíduo da substância precursora (**Figura 88**).

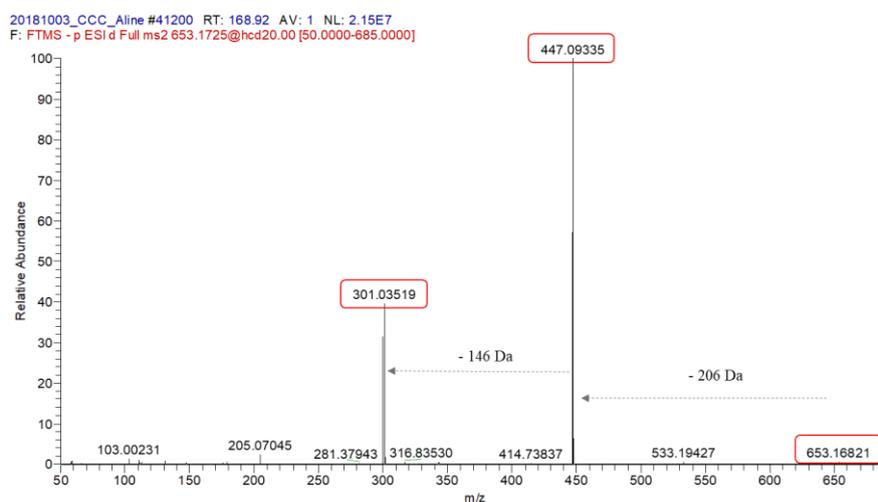


Figura 88 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo do derivado da quercetina-3-*O*-ramnosídeo.

Também foram identificadas por tentativa a substância miricetina e seu derivado glicosilado miricitrina (miricetina-3-*O*- β -ramnosídeo) (**Figura 89**). Estas substâncias já foram identificadas na espécie *S. malaccense* (ARUMUGAM et al., 2014; NOREEN et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006).

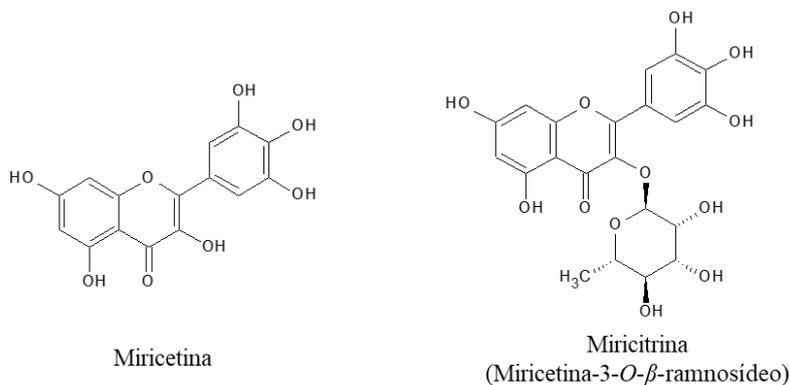


Figura 89 – Estruturas químicas da miricetina e seu derivado glicosilado miricitrina (miricetina-3-*O*- β -ramnosídeo).

A miricetina foi identificada com auxílio do MS-Dial pelo pico base/ion molecular m/z 317,03058 $[M-H]^-$ e m/z 319,04434 $[M+H]^+$ (**Figura 94**).

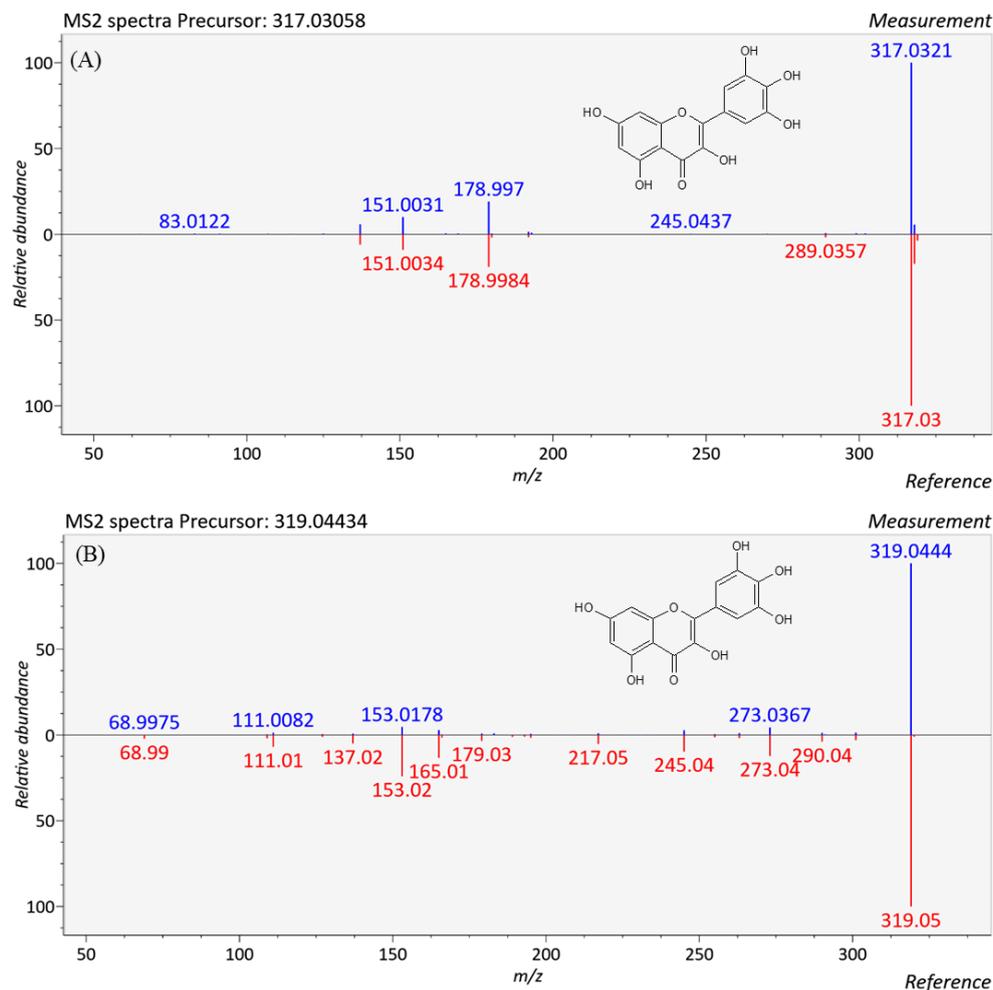


Figura 90 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo *software* MS-Dial no modo de ionização negativo (A) e positivo (B) da miricetina.

A miricitrina também foi identificada com auxílio do MS-Dial, apresentando como íons moleculares m/z 463,08801 $[M-H]^-$ e m/z 465,10324 $[M+H]^+$ (**Figura 91**). Fragmentos com perda de -146 Da correspondendo à quebra da ligação do grupo ramnosídeo com a aglicona, gerando os íons m/z 317,0318 $[M-H-146]^-$ (A **Figura 92** apresenta o espectro de massas ampliado do íon precursor m/z 463,08801 para visualizar o referido íon) e m/z 319,0447 $[M+H-146]^+$, referentes aos resíduos de miricetina.

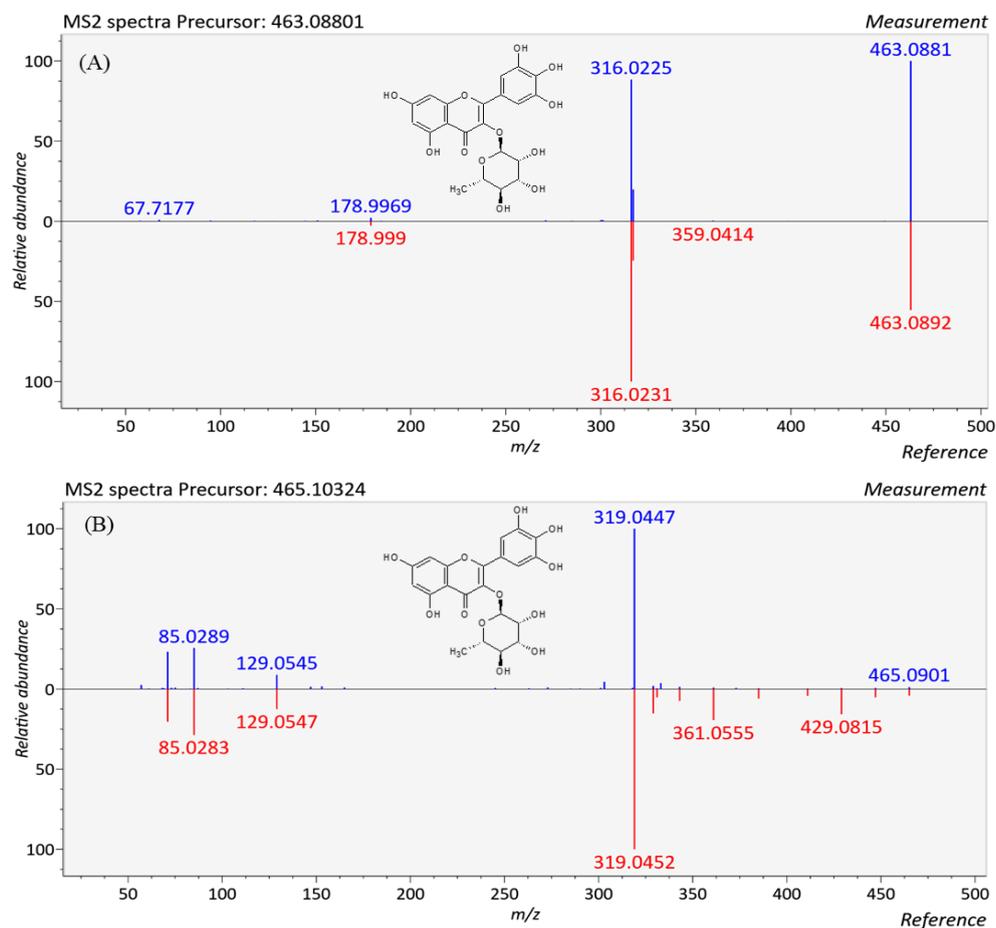


Figura 91 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo software MS-Dial no modo de ionização negativo (A) e positivo (B) da miricitrina.

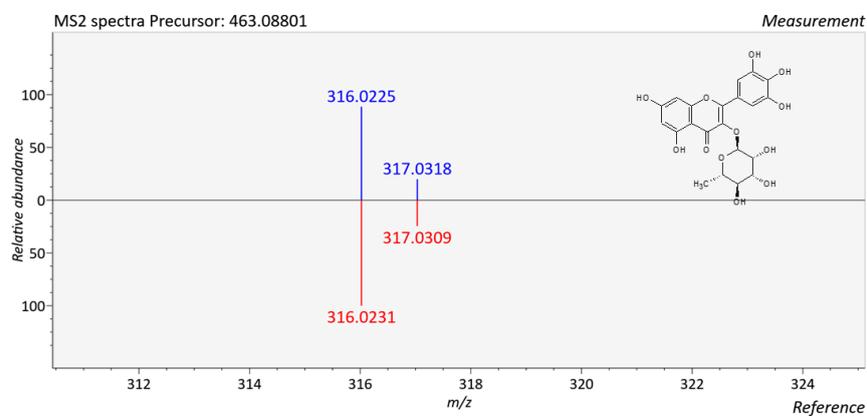


Figura 92 – Espectro de massas ampliado do íon precursor m/z 463,08801 para visualizar o íon m/z 317,0318.

A mearnsetina, também conhecida como miricetina 4'-*O*-metil éter foi identificada no EBFJ, bem como dois derivados desta substância que não tiveram suas estruturas elucidadas. Um derivado glicosilado, a mearnsitrina ou mearnsetina-3-*O*- β -ramnosídeo (miricetina 4'-*O*-metil éter 3-*O*- β -ramnosídeo) também foi identificado, bem como dois derivados desta substância, sem a estrutura elucidada. As estruturas químicas estão representadas na **Figura 93**. Neste grupo de substância verificou-se que apenas a mearnsetina e a mearnsitrina já foram identificadas para a espécie *S. malaccense* (OLIVEIRA et al., 2006; NOREEN et al., 1998).

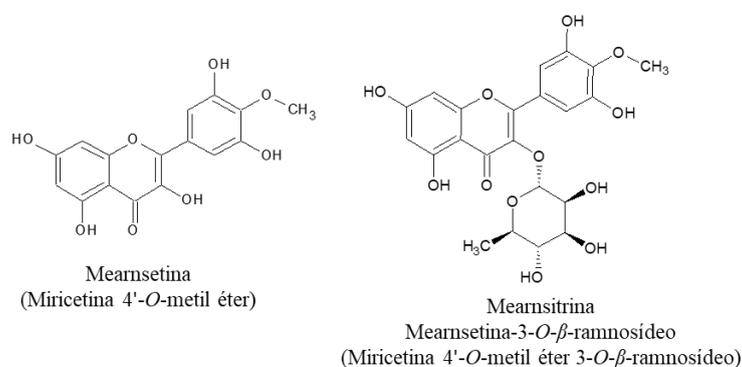


Figura 93 – Estruturas químicas das substâncias mearnsetina e mearnsitrina.

A mearnsetina foi identificada pelos m/z 331,04565 [M-H]⁻ e 333,05948 [M+H]⁺, ambos os íons apresentam em seus respectivos espectros, perda de -15 Da, gerando os íons m/z 316,02203 [M-H-15]⁻ ou na forma de ionização positiva, o íon m/z 318,03610 [M+H-15]⁺, esta perda inicial é referente à quebra do grupo metila no anel B aromático ligado ao carbono oxigenado na posição 4' da substância (**Figura 94**).

A mearnsitrina (mearnsetina-3-*O*- β -ramnosídeo) foi identificada pelo íon m/z 477,1044 [M-H]⁻ (**Figura 95**) e m/z 479,11724 [M+H]⁺ (**Figura 96**). Apresentam perda de -146 Da, geraram os íons m/z 331,0449 [M-H-146]⁻ e 333,05966 [M+H-146]⁺, correspondendo à quebra da ligação do grupo ramnosídico com a aglicona e em seguida a perda de -15 Da, gerando os íons m/z 316,0226 [M-H-146-CH₃]⁻ e m/z 318,03611 [M+H-146-CH₃]⁺, que são referentes à quebra do grupo metila no anel B aromático ligado ao carbono oxigenado na posição 4', caracterizando a presença do padrão de fragmentação da mearnsetina.

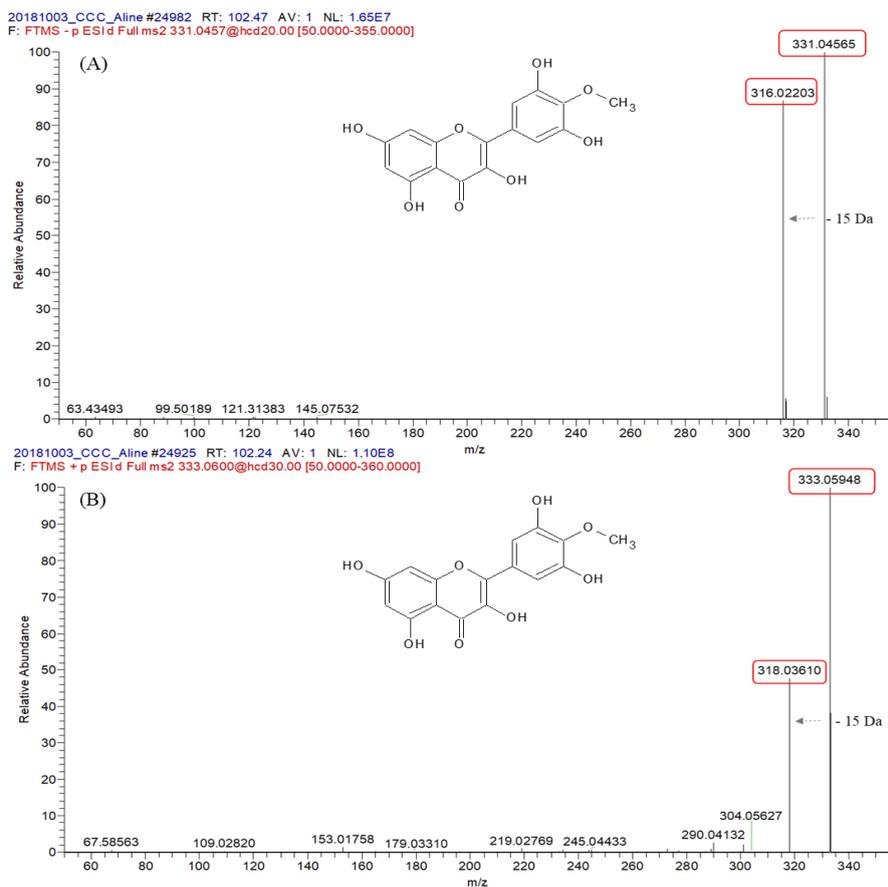


Figura 94 – Espectros de massas MS/MS obtidos nos modos de ionização negativo (A) e positivo (B) referentes a identificação da substância mearnssetina.

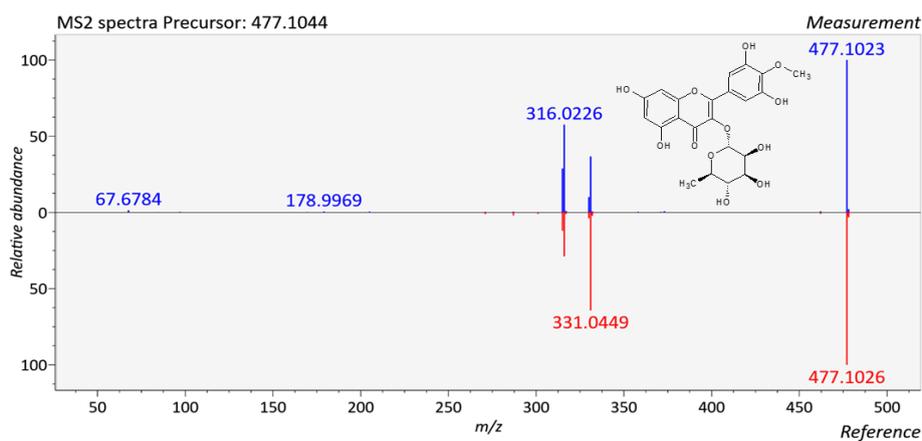


Figura 95 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização negativo da substância mearnsitrina (mearnssetina-3-*O*- β -ramnosídeo).

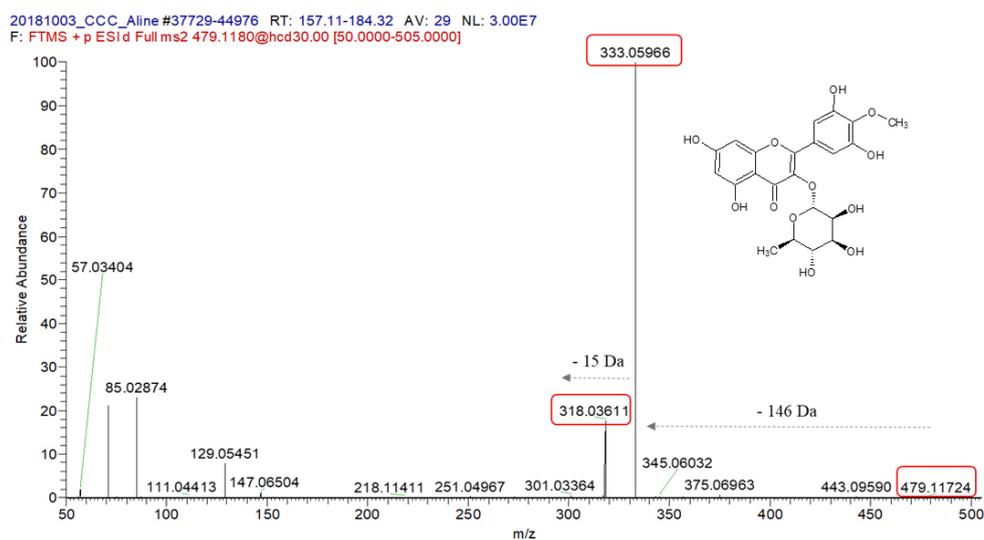


Figura 96 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização positivo da substância mearnsetrina (mearnsetina-3-*O*- β -ramnosídeo).

Foram identificados dois íons que podem ser derivados de mearnsetina. Foram denominados como derivado de mearnsetina I e II. O derivado de mearnsetina I teve sua proposta de identificação pelo presença do íon molecular m/z 469,0047 [M-H]⁻ com perda inicial de -138 Da, gerando o íon m/z 331,004578 [M-H-138]⁻, com perda de -15 Da equivalente ao grupo metila, formando o íon m/z 316,02222 [M-H-138-CH₃]⁻, a fragmentação indica a presença de resíduo de mearnsetina (**Figura 97**).

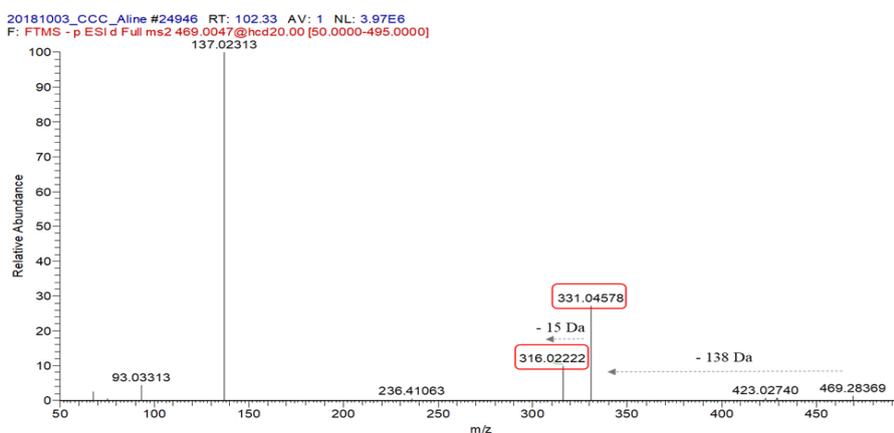


Figura 97 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização negativo referente ao derivado de mearnsetina I.

O derivado de mearnsetina II, tem como íon molecular m/z 465,1025 $[M+H]^+$, com perda de -132 Da (característico de pentose), gerando o íon m/z 333,05988 $[M+H-132]^+$ e posterior perda de -15 Da equivalente ao grupo metila, formando o íon m/z 318,03656 $[M+H-132-CH_3]^+$, novamente, a fragmentação indica a presença de resíduo de mearnsetina (**Figura 98**).

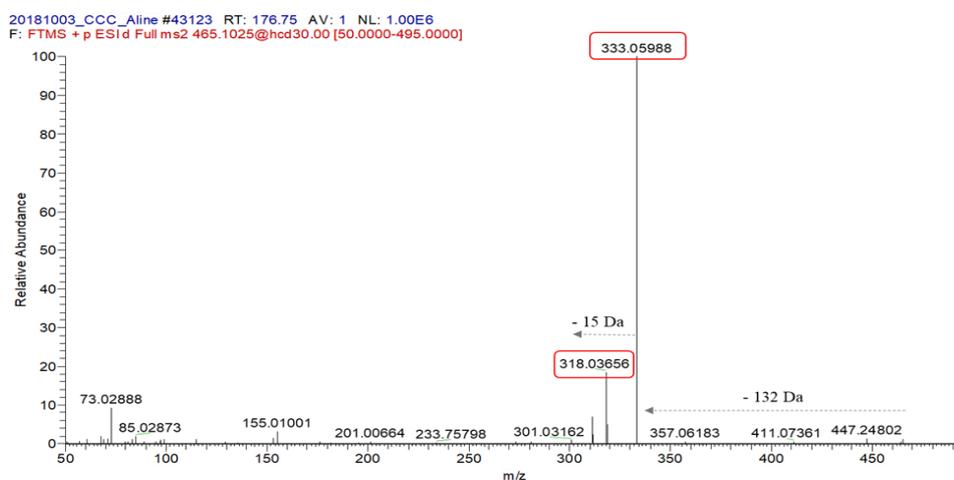


Figura 98 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo de ionização positivo referente ao derivado de mearnsetina II.

Foram identificados dois íons que podem ser derivados da substância mearnsitrina. Foram denominados como derivado de mearnsitrina I e II. O derivado de mearnsitrina I foi identificado pelo íon m/z 683,18011 $[M-H]^-$, com perda de -206 Da, gerando o íon m/z 477,10333 $[M-H-206]^-$, íon referente ao resíduo mearnsitrina, seguido dos fragmentos correspondentes, -146 Da correspondente do grupo ramnosídeo, formando o íon m/z 331,04599 $[M-H-206-146]^-$ e, em seguida, a perda de -15 Da, gerando o íon m/z 316,02200 $[M-H-206-146-15]^-$ (**Figura 99**).

O derivado de mearnsitrina II foi identificado pelo íon m/z 523,1093, com perda de -46 Da, gerando o íon m/z 477,10410 $[M-H-46]^-$, íon referente ao resíduo mearnsitrina $[M-H]^-$, seguido da fragmentação correspondente a substância precursora, detalhada no espectro de massas apresentado na **Figura 100**.

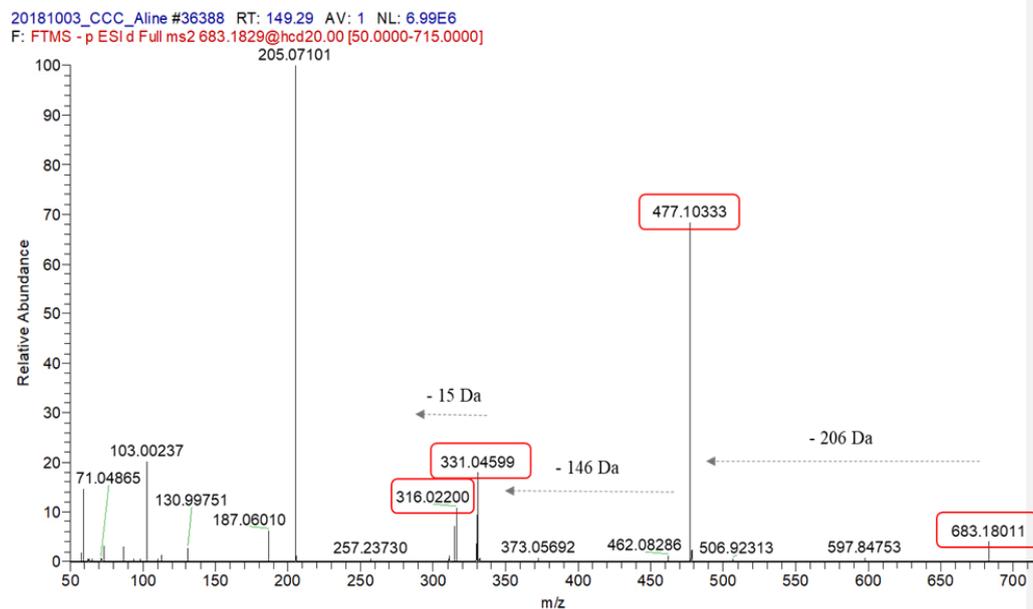


Figura 99 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo referente ao derivado de meansitrina I.

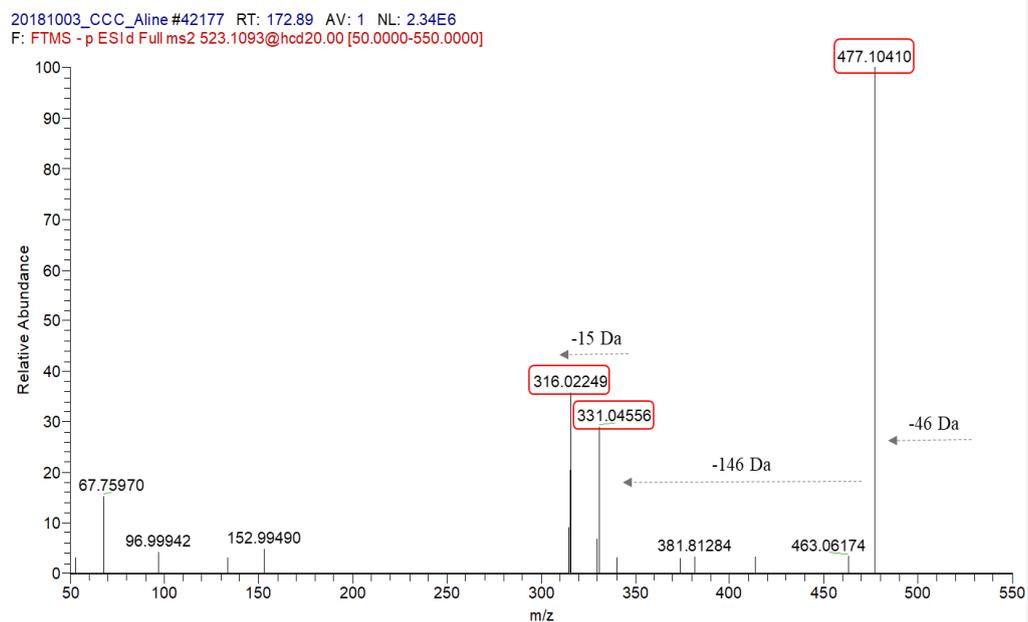


Figura 100 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo referente ao derivado de meansitrina II.

O íon m/z 477,10366 $[M-H]^-$ foi proposto como identificação da substância europetin-3-*O*-ramnosídeo (**Figura 101**) com perda de -146 Da, relacionada a ramnose, gerando o íon da aglicona m/z 331,04602 $[M-H-146]^-$ e posterior perda de -15 Da referente ao grupo metila, formando o íon m/z 316,02219 $[M-H-146-CH_3]^-$ (**Figura 102**). A substância europetin 3-*O*-galactosídeo (**Figura 101**) também foi identificada com auxílio do MS-Dial, pelo íon m/z 495,11307 $[M+H]^+$, com perda de -162 Da referente a galactose, formando o íon m/z 333,06100 $[M+H-162]^+$ e -15 Da referente ao grupo metila, íon formado m/z 318,033641 $[M+H-162-CH_3]^+$ (**Figura 103**). Entre estas duas substâncias, o europetin-3-*O*-ramnosídeo já foi relatado como substância identificada no gênero *Syzygium*, sendo as duas inéditas para a espécie *S. malaccense*.

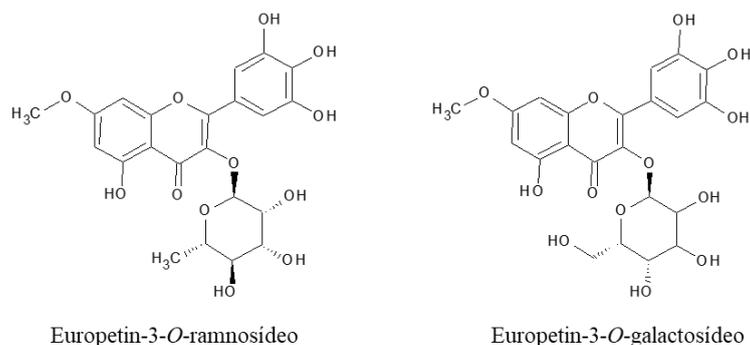


Figura 101 – Estruturas químicas das substâncias: europetin 3-*O*-ramnosídeo e europetin 3-*O*-galactosídeo.

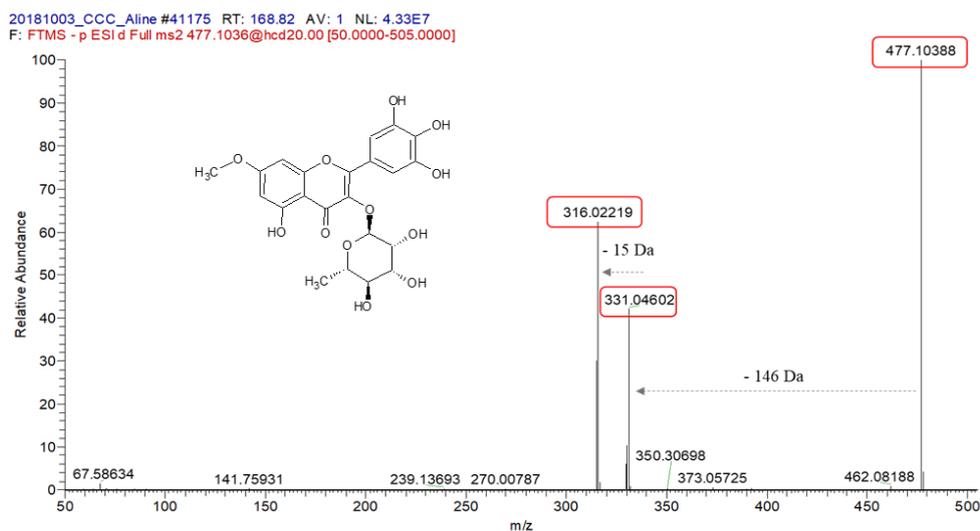


Figura 102 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância europetin-3-*O*-ramnosídeo.

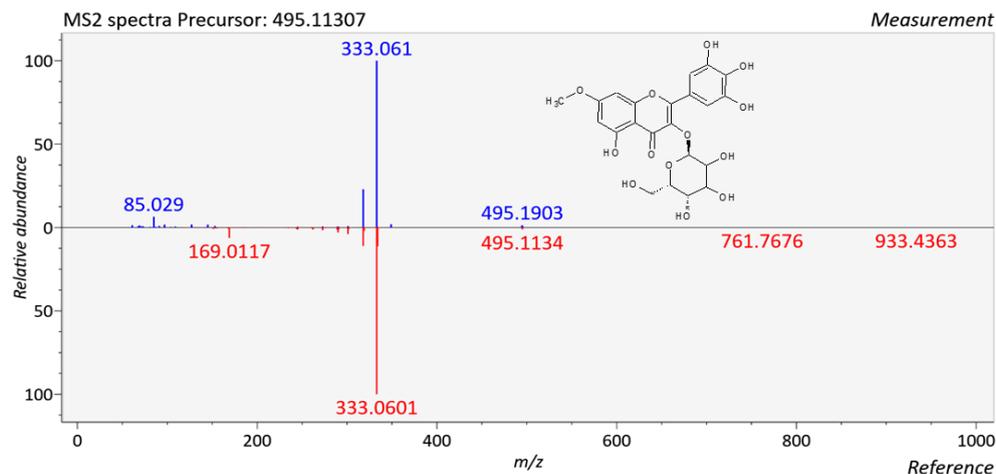


Figura 103 – Espectro de massas MS/MS obtidos no modo positivo para a substância europetin-3-*O*-galactosídeo.

Lipídios

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a identificação de lipídios para a espécie *S. malaccense* ou até mesmo no próprio gênero *Syzygium*. Sendo assim, este é o primeiro relato de identificação destes lipídios para a referida espécie.

Os monoglicérides, monolinolenina m/z 353,26846 $[M+H]^+$, monolinoleína m/z 355,2843 $[M+H]^+$ e palmitoil-glicerol m/z 331,2843 $[M+H]^+$ (**Figura 104**) foram identificados pelo MS-Dial. Este grupo de substâncias apresentou um padrão de fragmentação com perda inicial de -18 Da, referente a clivagem do grupo hidroxila em forma de água e com perda de -74 Da, referente a clivagem do resíduo glicerol ($-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{O}$), de acordo com os espectros de massas apresentados na **Figura 105**.

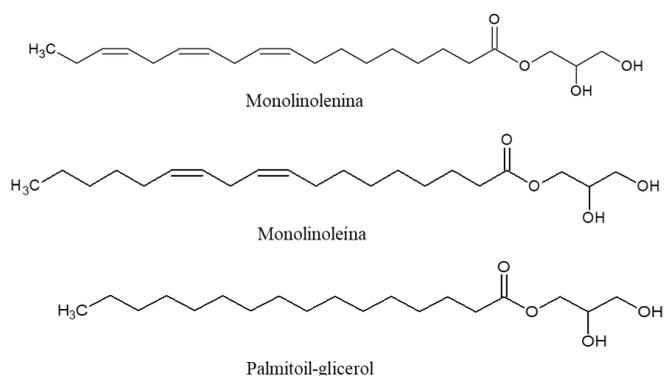


Figura 104 – Estruturas moleculares de monoglicérides identificados no EBFJ.

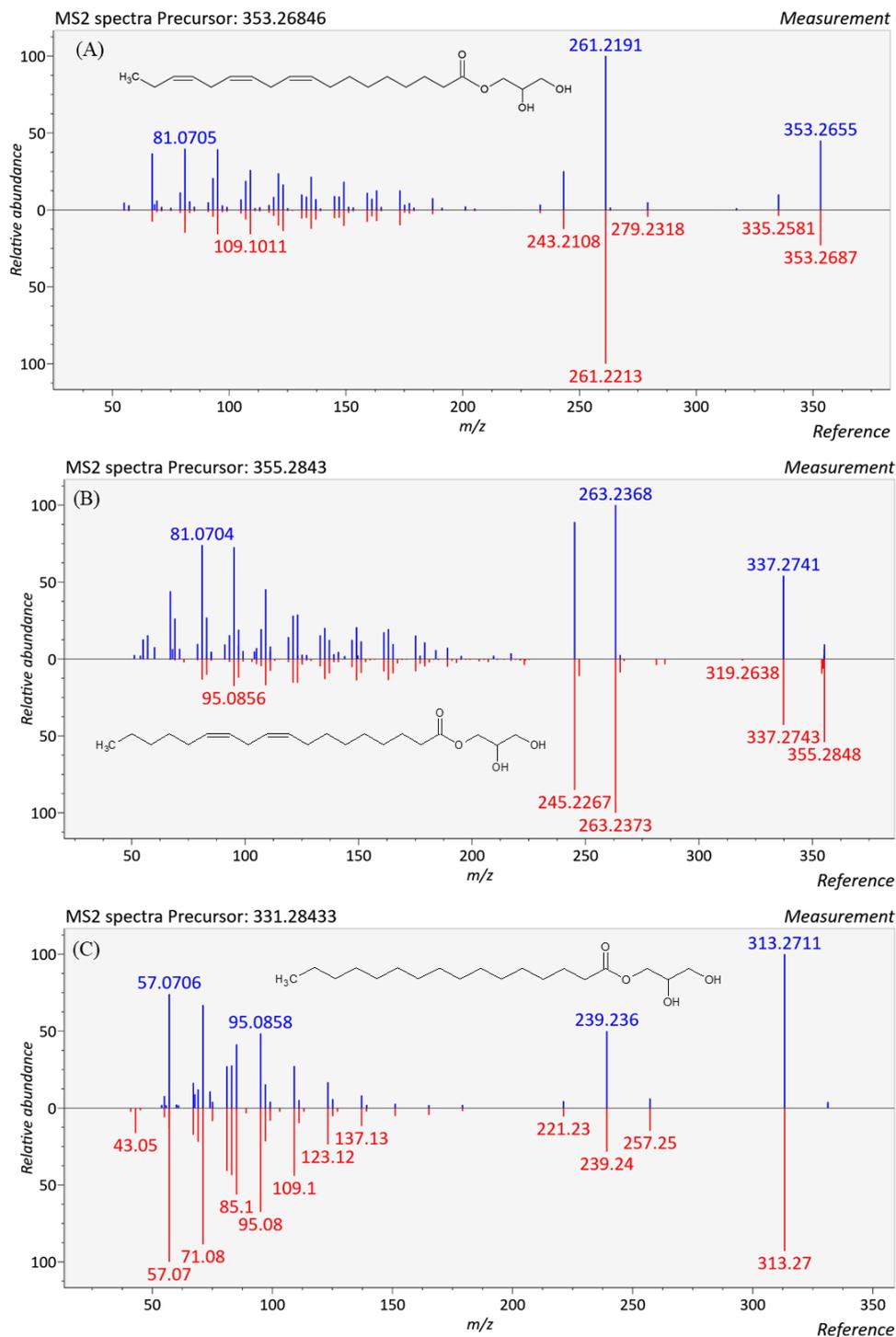


Figura 105 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo *software* MS-Dial no modo positivo para as substâncias, (A) monolinolenina, (B) monolinoleína e (C) palmitoil-glicerol.

Os grupos, glicerilfosforilcolina, fosforilcolina e colina (**Figura 106**) foram identificados pelos *softwares* MZmine e MS-Dial. Estas estruturas são intermediárias na síntese dos lipídios complexos identificados no EBFJ. A fosforilcolina foi identificada pelo íon m/z 183,02888 $[M]^-$, com perda de -15 Da referente ao grupo metila, gerando o íon m/z 168,00529 $[M-CH_3]^-$ (**Figura 107**). O espectro de massas MS/MS da substância colina apresenta íon molecular m/z 104,10732 $[M]^+$, com fragmentos referentes perda da hidroxila, gerando o íon m/z 87,0442 e perda de -27 Da, referente a perda do grupo etil, gerando o íon m/z 60,0812 $[M-27]^+$ que é correspondente do resíduo $-N^+(CH_3)_3$. Os fragmentos descritos para a colina foram observados no espectro de massas MS/MS da glicerilfosforilcolina m/z 258,10965 $[M]^+$ (**Figura 108**).

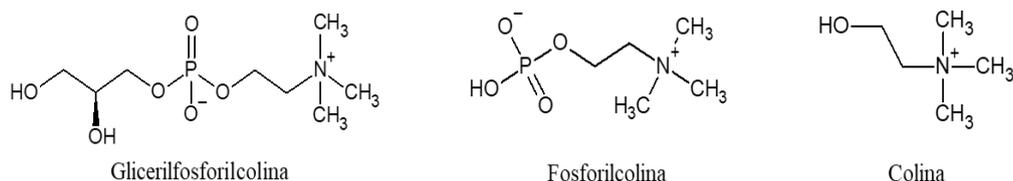


Figura 106 – Estruturas intermediárias na síntese dos lipídios complexos identificados no EBFJ.

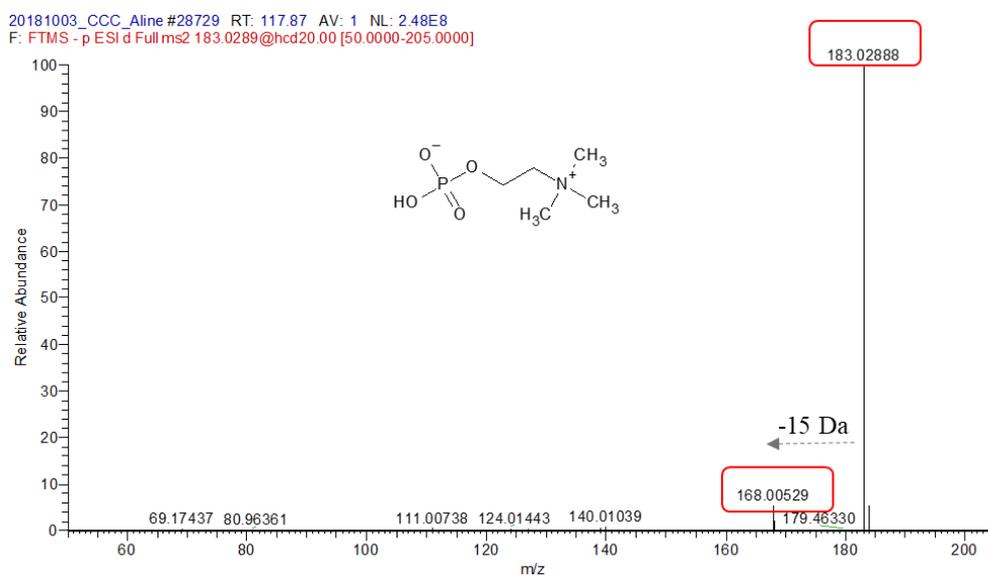


Figura 107 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância fosforilcolina.

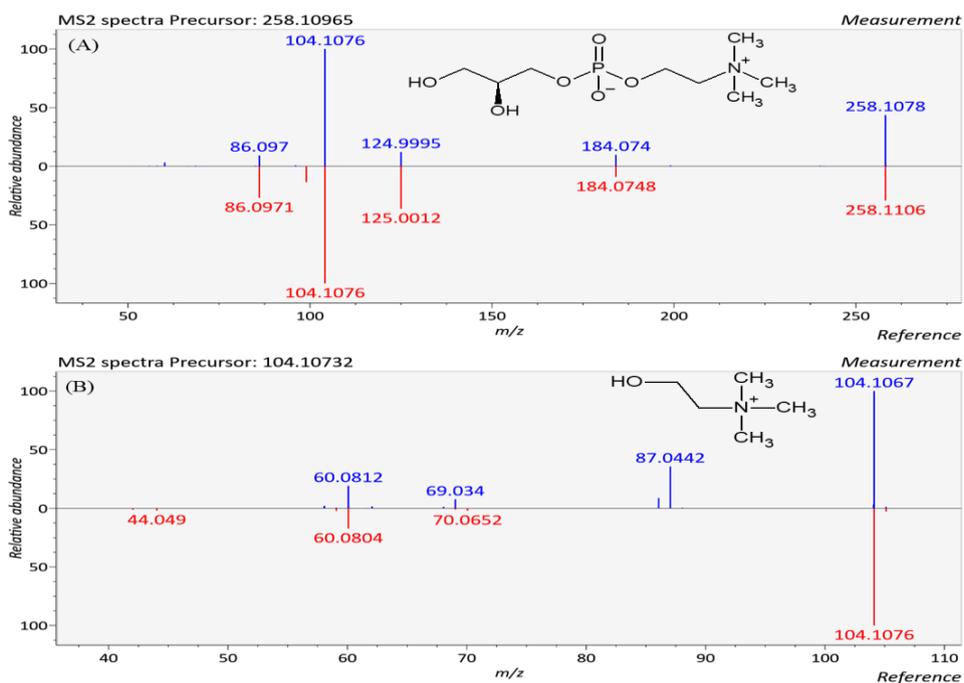


Figura 108 – Espectros de massas MS/MS obtidos pelo *software* MS-Dial no modo positivo para as substâncias (A) glicerilfosforilcolina e (B) colina.

Os lipídios alquil fosfocolina demonstrados na **Figura 109**: oleoil-glicerol-fosfocolina (Oleoil lisolecitina), íon molecular m/z 522,35614 $[M+H]^+$, 1-estearoil-glicerol-3-fosfocolina m/z 524,37231 $[M+H]^+$ e 1-palmitoil-glicerol-3-fosfocolina m/z 496,34045 $[M+H]^+$ foram identificados pelo MS-Dial. Os espectros de massas desses três lipídios apresentaram o seguinte padrão de fragmentação, perda inicial de -18 Da, equivalente clivagem da hidroxila em forma de água e fragmentação do grupo alquil-glicerol correspondente ao tamanho da cadeia alquila com formação do pico base m/z 184,07 equivalentes ao resíduo de fosfocolina e íon m/z 104,10 equivalentes ao resíduo de colina (**Figura 110**).

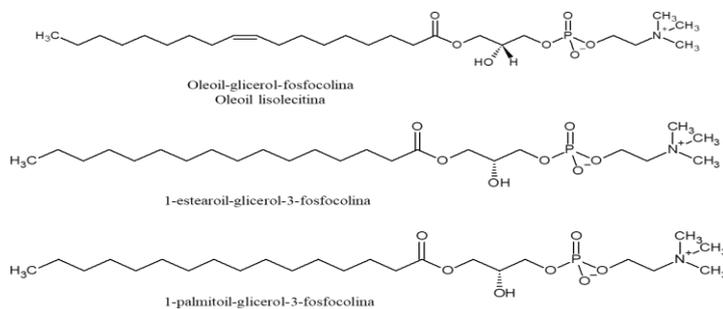


Figura 109 – Estrutura químicas dos lipídios alquil fosfocolina identificados no EBFJ.

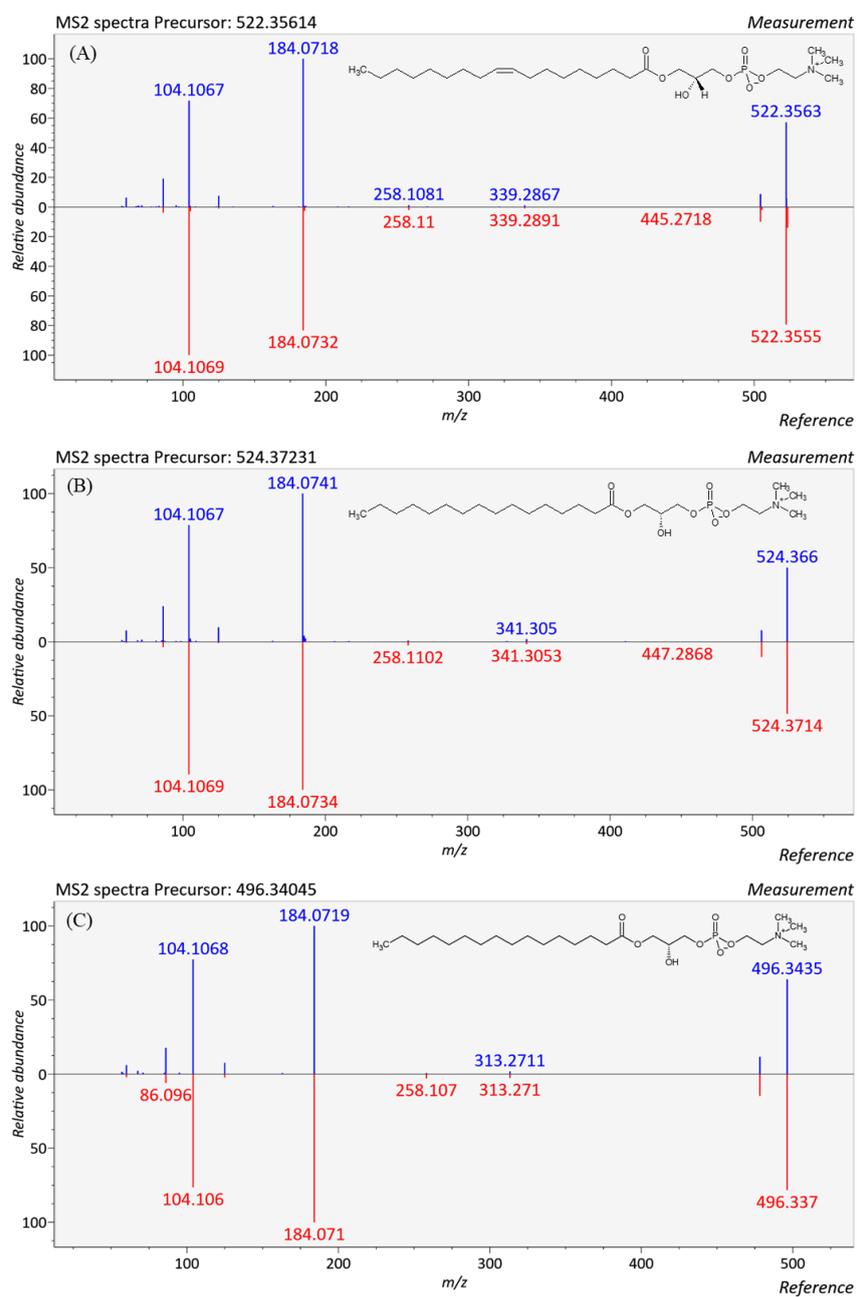


Figura 110 – Espectros de massas MS/MS obtidos no modo positivo pelo *software* MS-Dial para as substâncias, (A) oleoil-glicerol-fosfocolina (oleoil lisolectina), (B) 1-estearoil-glicerol-3-fosfocolina e (C) 1-palmitoil-glicerol-3-fosfocolina.

Outros lipídios mais complexos também foram identificados, como por exemplo, o 1-(2-metoxi-octadecanil)-glicerol-3-fosfoetanolamina, o linoleoil-glicerol-fosfoetanolamina (liso fosfatidiletanolamina (C18:2)), o palmitoil-glicerol-3-fosfoetanolamina e o palmitoil-glicerol-3-fosfato, suas estruturas químicas estão demonstradas na **Figura 111**.

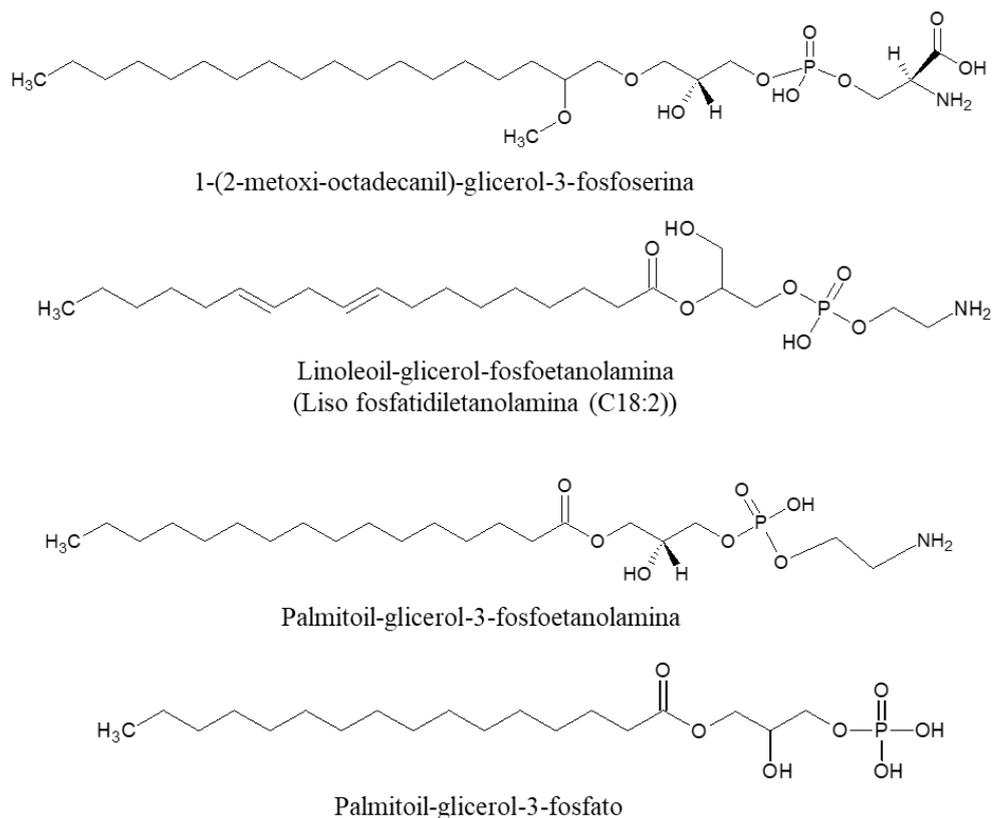


Figura 111 – Estrutura químicas de lipídios identificados no EBFJ.

O 1-(2-metoxi-octadecanil)-glicerol-3-fosfoetanolamina foi identificado pelo íon m/z 540,33044 $[M-H]^-$ com perda inicial de -60 Da referente aos grupos carboxila e amina, gerando o íon m/z 480,30908 $[M-H-60]^-$ ou perda de -106 Da, correspondente a perda do grupo α -aminoácido serina, gerando o íon m/z 434,78885 $[M-H-106]^-$ e posterior perda de -225 Da referente ao grupo alquil ($CH_3(CH_2)_{15}$), gerando o íon m/z 255,23265 $[M-H-60-225]^-$ (**Figura 112**).

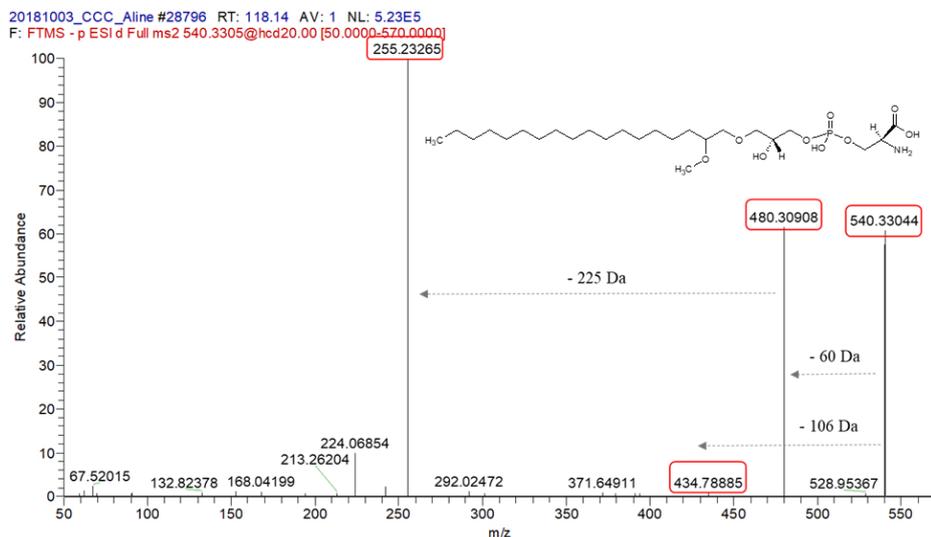


Figura 112 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância 1-(2-metoxi-octadecanil)-glicerol-3-fosfoserina.

A substância linoleoil-glicerol-fosfoetanolamina foi identificada pelo íon m/z 476,27802 [M-H]⁻, apresentou perda de -197 Da, referente a clivagem do glicerol-fosfoetanolamina, gerando o íon m/z 279,23279 [M-H-197]⁻ que é referente ao resíduo do ácido linoleico (**Figura 113**).

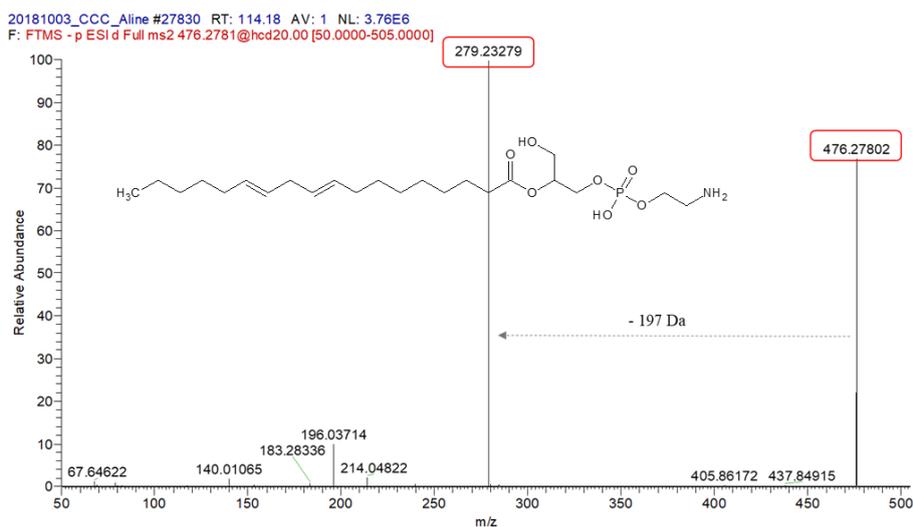


Figura 113 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância linoleoil-glicerol-fosfoetanolamina.

O palmitoil-glicerol-3-fosfoetanolamina identificado pelo MS-Dial com o íon m/z 452,27795 $[M-H]^-$, fragmenta com perda de -197 Da referente ao glicerol-fosfoetanolamina, gerando o íon m/z 255,2313 $[M-H-197]^-$ referente ao resíduo do ácido palmítico (**Figura 114**).

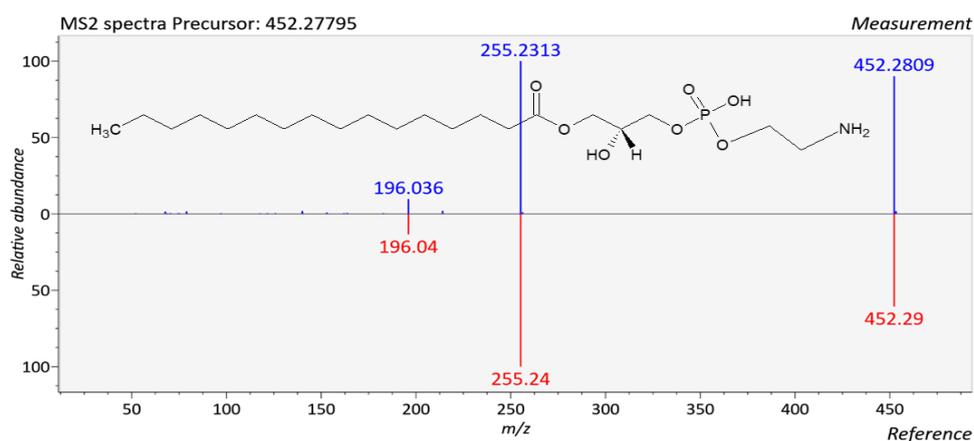


Figura 114 – Espectro de massas MS/MS obtido pelo MS-Dial, no modo negativo, para substância palmitoil-glicerol-3-fosfoetanolamina.

O palmitoil-glicerol-3-fosfato, identificado pelo íon m/z 409,23584 $[M-H]^-$, fragmenta com perda de -82 Da referente a clivagem do grupo $-POOH$, gerando o íon m/z 326,39560 $[M-H-82]^-$, ou perda de -154 Da referente ao grupo glicerolfosfato, gerando o íon m/z 255,23402 referente ao resíduo do ácido palmítico (**Figura 115**).

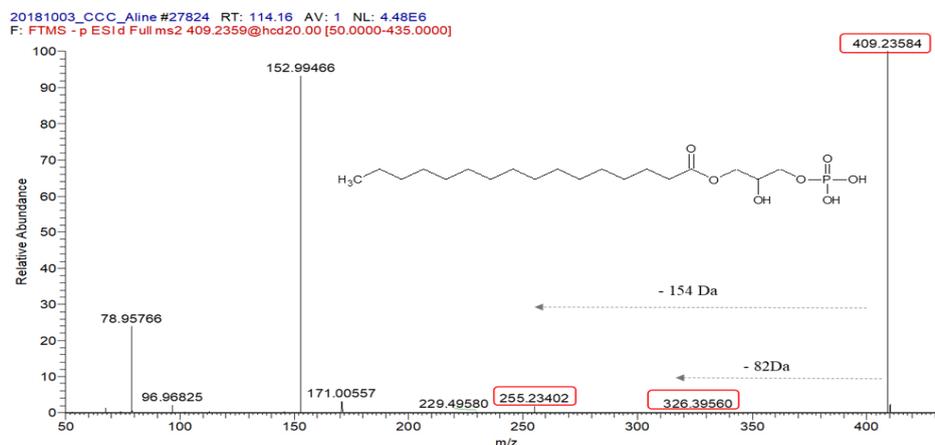


Figura 115 – Espectro de massas MS/MS obtido no modo negativo para a substância palmitoil-glicerol-3-fosfato.

4.3.8. Determinação estrutural de substâncias por RMN

O estudo químico das folhas da espécie *S. malaccense* resultou na identificação por tentativa, baseada nas sugestões dos compostos presentes nas bibliotecas do MS-DIAL e MZmine, de 81 substâncias por espectrometria de massas. Mesmo se tratando de misturas, foi possível a confirmação estrutural de algumas das substâncias por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A **Tabela 5** mostra algumas das substâncias identificadas nas suas respectivas frações. Além dos espectros de RMN de ^1H , os espectros bidimensionais HSQC e HMBC foram importantes na confirmação estrutural.

Tabela 5 – Identificação estrutural de substâncias em suas respectivas frações e os experimentos de RMN realizados.

Fração	Experimentos de RMN			Proposta de identificação
	^1H	HSQC	HMBC	
47	X	X	X	Mearnsetina
49	X	X		Miricetina
	X			Ácido 4-hidroxicinâmico
51	X	X	X	Miricetina
	X	X		Galato de etila
	X	X	X	Ácido metil elágico
	X	X		Ácido malíngico

81	X	X	X	Mearnsetina 3- <i>O</i> - β -ramnosídeo
	X	X		Quercetina
83	X	X	X	Mearnsetina 3- <i>O</i> - β -ramnosídeo
	X	X		Ácido gálico
	X	X		Quercetina 3- <i>O</i> - β -ramnosídeo
87	X	X	X	Mearnsetina 3- <i>O</i> - β -ramnosídeo
	X	X	X	Ácido gálico
	X	X	X	Tartarato de dimetila
89	X	X	X	Ácido gálico
	X	X	X	Ácido tartárico
	X	X	X	Tartarato de dimetila

Dentre as substâncias identificadas, estão a mearnsetina (**17**); o ácido 4-hidroxicinâmico (**22**); galato de etila (**26**); ácido malíngico (**27**); ácido metilelágico (**28**); quercetina (**49**); mearnsetina-3-*O*- β -ramnosídeo (**51**); quercetina-3-*O*- β -ramnosídeo (**53**); ácido gálico (**58**); tartarato de dimetila (**61**); ácido tartárico (**62**) e a miricetina (**71**) (numeração das substâncias correspondente a descrita no

APÊNDICE B.

Dados espectroscópicos de RMN de flavonóis

- Caracterização do anel A

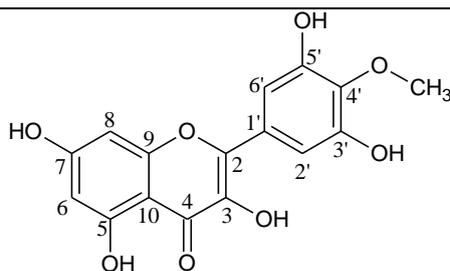
Nos espectros de RMN ^1H dos flavonóis (**17**), (**49**) e (**71**) foi possível observar sinais desblindados próximos a 7 ppm, característicos de hidrogênios em sistema aromático (Pavia, Lampman, Kriz, & Vyvyan, 2015). Os três flavonóis apresentaram dois sinais para átomos de hidrogênio localizados no anel A, com deslocamentos químicos de aproximadamente δ_{H} 6,18 (*d*) e δ_{H} 6,39 (*d*). As constantes de acoplamentos verificadas (*J*) sugerem interação *spin-spin* entre os hidrogênios, gerando uma interação do tipo *meta* ($J = 2,0$ Hz) correspondendo aos hidrogênios H-6 (δ_{H} 6,18 – 6,21) e H-8 (δ_{H} 6,38 – 6,39), característico de anel A de um flavonoide 5,7-diidroxilado (Chung et al., 2004).

- Caracterização do anel B

Os espectros de RMN ^1H dos flavonóis (**17**), (**49**) e (**71**) indicaram a presença de sinais característicos de um sistema aromático (Anel B) substituído. A ausência de sinais do H-3 e H-4 relativos ao anel C, devido as substituições nessas posições, auxiliou na caracterização dos flavonóis.

O flavonol (**17**), caracterizado como mearnsetina, apresentou sinal de metoxila em δ_{H} 3,88 ppm (s), integrando para os três hidrogênios da metila, também se observa um sinal em δ_{H} 7,34 (s) integrado para dois hidrogênios (H-2' e H-6'), indicando substituições nas posições 3', 4' e 5' no anel B e também simetria do anel (**Tabela 6**). Espectros referentes a mearnsetina estão demonstrados no **APÊNDICE C (Espectro 1 – RMN de ^1H ; Espectro 2 – HSQC e Espectro 3 – HMBC)**.

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN para a mearnsetina.



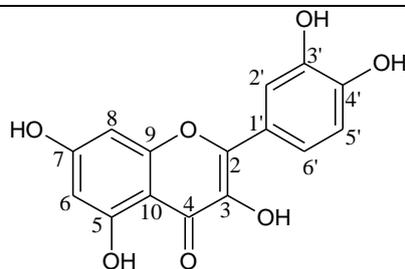
Mearnsetina (17)				
H/C	Dados obtidos		(OLIVEIRA et al., 2006)	
	δ_{H} (ppm) / J (Hz) (CD_3OD , 800MHz)	δ_{C} (ppm) HMBC HSQC*	δ_{H} (ppm) / J (Hz) (CDCl_3 , 400 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 100 MHz) ^{13}C -APT
2	-	150,33	-	147,27
5	-	164,34 (H-8 e H-6)	-	162,82
6	6,19 (d , $J = 2,0$)	99,22* 97,98 (H-8)	6,37 (d , $J = 2,0$)	99,58
7	-	161,02 (H-6)	-	166,07
8	6,39 (d , $J = 2,0$)	94,22* 92,97 (H-6)	6,56 (d , $J = 2,0$)	94,68
9	-	157,16 (H-8)	-	158,54
10	-	103,21 (H-8 e H-6)	-	104,83
1'	-	126,67 (H-2')	-	128,27
2'	7,31 (s)	108,48* 107,24	7,49 (s)	108,90

3'	-	145,64 (H-2')	-	151,95
4'	-	137,24 (H-2') 136,83 (-OCH ₃)	-	138,73
5'	-	145,64 (H-2')	-	151,95
6'	7,31 (s)	107,24 (H-2')	7,49 (s)	108,90
-OCH ₃	3,88 (s)	60,67*	4,05 (s)	61,11

*Sinais obtidos por HSQC.

Para a substância (**49**), caracterizada como quercetina, na região dos hidrogênios aromáticos foi possível observar dois dupletos em δ_H 6,92 ($J = 8,3$ Hz) e δ_H 7,34 ($J = 2,1$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3' e H-6' respectivamente, e um duplo duplete em δ_H 7,31 ($J = 8,2$ e 2,1 Hz) atribuído a H-2'. Pode-se observar por estes sinais, os acoplamentos do tipo *meta* entre H-2' e H-6' e do tipo *orto* entre H-3' e H-2', estes resultados demonstram um anel B característico de flavonoides substituídos em C-5' e C-4' (**Tabela 7**). Espectros referentes a quercetina estão demonstrados no **APÊNDICE C (Espectro 4 – RMN de ¹H e Espectro 5 – HSQC)**.

Tabela 7 – Dados espectroscópicos de RMN para a quercetina.



Quercetina (49)				
H/C	Dados obtidos		(KALEGARI et al., 2011)	
	δ_H (ppm) / J (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_C (ppm) HSQC*	δ_H (ppm) / J (Hz) (CD ₃ OD, 300 MHz)	δ_C (ppm) (CD ₃ OD, 75 MHz)
6	6,21 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	-	6,17 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	99,10
2'	7,34 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	116,78*	7,72 (<i>d</i> , $J = 2,1$)	115,9
3'	6,92 (<i>d</i> , $J = 8,3$)	116,22*	6,80 (<i>d</i> , $J = 8,4$)	116,1
6'	7,32 (<i>dd</i> , $J = 8,3$ e 2,1)	122,69*	7,6 (<i>dd</i> , $J = 8,7$ e 2,1)	121,6

*Sinais obtidos por HSQC.

A substância (**71**), encontrada na fração 49 em mistura de substâncias fenólicas, foi caracterizada como miricetina. Esta apresentou um sinal em δ_H 7,34 (s) integrado para dois hidrogênios (H-2' e H-6'), indicativo de que ocorre substituições simétricas no anel B, devido à rotação livre, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios em C-2' e C-6'. Logo propõe-se um anel B substituído nas posições 3', 4' e 5' (**Tabela 8**). O flavonol miricetina é comum em espécies do gênero *Syzygium*, inclusive na espécie *S. malaccense* (Oliveira et al., 2006). Espectros referentes a miricetina estão demonstrados no **APÊNDICE C (Espectro 6 – RMN de 1H e Espectro 7 – HSQC)**.

Tabela 8 – Dados espectroscópicos de RMN para a miricetina.

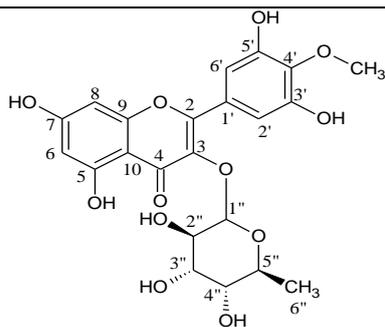
Miricetina (71)				
H/C	Dados obtidos		(OLIVEIRA et al., 2006)	
	δ_H (ppm) / J (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_C (ppm) HSQC*	δ_H (ppm) / J (Hz) (CDCl ₃ , 400 MHz)	δ_C (ppm) (CDCl ₃ , 100 MHz) ¹³ C-APT
6	6,18 (d, J = 2,0)	97,40*	6,37 (d, J = 2,0)	99,28
8	6,38 (d, J = 2,0)	92,61*	6,56 (d, J = 2,0)	94,64
2'/6'	7,34 (s)	106,71*	7,53 (s)	108,78

*Sinais obtidos por HSQC.

Os dados dos espectros de RMN uni e bidimensionais (**Espectro 8 – RMN de 1H ; Espectro 9 – RMN HSQC e Espectro 10 / Espectro 11 – RMN HMBC**) confirmaram que a substância (**51**) trata do flavonol glicosilado, mearnsetina-3-*O*- β -ramnosídeo (miricetina 4'-*O*-metil-3-ramnosídeo), devido aos sinais já apresentados característicos da aglicona mearnsetina e à presença do sinal em δ_H 0,96 ppm e o sinal em δ_C 18,46 ppm (correlacionado ao H-6'') e δ_C 71,72 ppm (correlacionado ao H-1''), típicos de presença de ramnose. O espectro HMBC mostra que a glicosilação ocorrendo em C-3, dado ao acoplamento J^3 do hidrogênio anomérico em δ_H 5,31 ppm (H-1'') com o carbono (C-3) em δ_C 135,54 ppm

(Tabela 9). A substância (51) também conhecida por mearnsitrina, já foi descrita para as folhas das espécies *S. malaccense* (Noreen, Serrano, Perera, & Bohlin, 1998).

Tabela 9 – Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a mearnsetina-3-*O*- β -ramnosídeo.



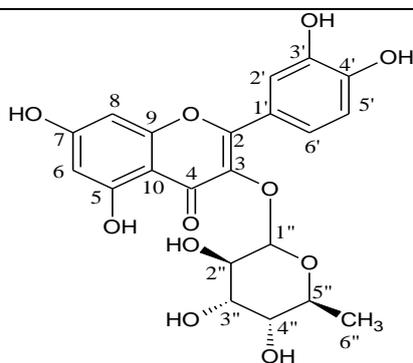
Mearnsetina 3- <i>O</i> - β -ramnosídeo (51)				
H/C	Dados obtidos		(NOREEN et al., 1998)	
	δ_{H} (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_{C} (ppm) HMBC / HSQC*	δ_{H} (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CD ₃ OD, 270 MHz)	δ_{C} (ppm) HMBC
3	-	135,34 (H-1'')	-	136,72 (H-1'')
5	-	164,63 (H-6, H-8)	-	163,16 (H-6)
6	6,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	94,60* 98,53 (H-8)	6,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	99,94 (H-8)
7	-	161,70 (H-6)	-	166,10 (H-6, H-8)
8	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	93,39 (H-6)	6,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	94,80 (H-6)
9	-	157,27 (H-8)	-	158,54 (H-8)
10	-	104,82 (H-8) 104,82 (H-6)	-	105,95 (H-6, H-8)
1'	-	125,61 (H-2')	-	126,99
2'/6'	6,89 (<i>s</i>)	109,61* 109,61 (H-2') 157,27 (H-2')	6,89 (<i>s</i>)	109,83 (H-6'')
3'/5'	-	150,52 (H-2')	-	151,83 (H-2')
4'	-	138,0 (-OCH ₃) 138,01 (H-2')	-	139,36 (H-2', H-6')
-OCH ₃	3,88 (<i>s</i>)	60,87*	3,88 (<i>s</i>)	60,93
1''	5,31 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,7)	103,54*	5,32 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,7)	103,64
2''	4,56*	73,64*	4,24 (<i>m</i>)	71,86
3''	4,50*	74,31*	3,33 – 3,85 (<i>m</i>)	72,00
4''	4,48*	74,25*	-	73,24
5''	4,23*	71,72*	3,33 – 3,85 (<i>m</i>)	72,09

		70,65 (H-6'')		
6''	0,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,6)	17,56* 18,46 (H-6'') 71,72 (H-1'')	0,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,8)	17,69

*Sinais obtidos por HSQC.

Os dados dos espectros de RMN uni e bidimensionais (**Espectro 12**– RMN de ^1H e **Espectro 13** – RMN HSQC) indicam que a substância (**53**) se trata da quercetina-3-*O*- β -ramnosídeo, devido aos sinais já apresentados característicos da aglicona quercetina, e à presença do sinal em δ_{H} 0,94 ppm e o sinal em δ_{C} 17,14 (C-6''), típicos do grupo metila da ramnose. O espectro HMBC mostra por exclusão que a glicosilação ocorre no C-3, visto que os deslocamentos químicos das outras hidroxilas se mantiveram compatíveis com os valores de hidroxilas livres. A quercetina-3-*O*- β -ramnosídeo, também conhecida por quercitrina, já foi descrita para as folhas das espécies *S. malaccense* (Noreen, Serrano, Perera, & Bohlin, 1998; Reynertson, Yang, Jiang, Basile, & Kennelly, 2008) (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Dados espectroscópicos de RMN para a quercetina-3-*O*- β -ramnosídeo.



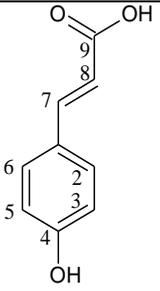
Quercetina 3- <i>O</i> - β -ramnosídeo (53)				
H/C	Dados obtidos		(SANTOS et al., 2017)	
	δ_{H} (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_{C} (ppm) HSQC*	δ_{H} (ppm) / <i>J</i> (Hz) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	δ_{C} (ppm) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)
6	6,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,1)	99,86*	6,23 (<i>d</i>)	99,2
2'	7,34 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,8)	116,88*	7,33 (<i>d</i>)	116,0
5'	6,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,3)	116,32*	6,90 (<i>d</i>)	115,9
6'	7,32 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 2,2 e 8,7)	122,74*	7,28 (<i>dd</i>)	121,6
1''	5,35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,7)	103,64*	5,29 (<i>d</i>)	102,2
6''	0,94*	14,00*	0,85 (<i>d</i>)	17,9

*Sinais obtidos por HSQC.

Dados espectroscópicos de RMN de ácidos orgânicos

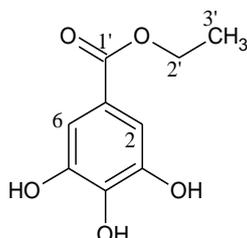
O espectro de RMN ^1H (**Espectro 6**), auxiliou na identificação da substância ácido 4-hidroxicinâmico (**22**), também conhecido como ácido *p*-cumárico, um fenilpropanoide precursor da biossíntese dos flavonoides. Os sinais apresentados são compatíveis com substâncias aromáticas, devido a sinais na região δ_{H} 6,20-7,50 ppm. A presença de dois dupletos em δ_{H} 7,41 (*d*, $J = 8,6$) e δ_{H} 6,78 (*d*, $J = 8,6$) correspondem a hidrogênios com acoplamento em *orto* entre si e são referentes aos hidrogênios do grupo fenila; sinais em δ_{H} 7,47 (*d*, $J = 15,9$) e δ_{H} 6,30 (*d*, $J = 15,9$) indicam hidrogênios ligados a carbono sp^2 (H-7 e H-8), com acoplamento do tipo *trans* (**Tabela 11**), dados comparados a literatura (Souza Filho & Pereira, 2005).

Tabela 11 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido 4-hidroxicinâmico



Ácido 4-hidroxicinâmico (22)		
H/C	Dados obtidos	(SOUZA FILHO; PEREIRA, 2005)
	δ_{H} (ppm) / J (Hz) (CD_3OD , 800MHz)	δ_{H} (ppm) / J (Hz) (CD_3OD , 300 MHz)
2/6	7,41 (<i>d</i> , $J = 8,6$)	7,42 (<i>d</i> , $J = 8,5$)
3/5	6,78 (<i>d</i> , $J = 8,6$)	6,79 (<i>d</i> , $J = 8,5$)
7	7,47 (<i>d</i> , $J = 15,9$)	7,56 (<i>d</i> , $J = 15,8$)
8	6,30 (<i>d</i> , $J = 15,9$)	6,28 (<i>d</i> , $J = 15,8$)

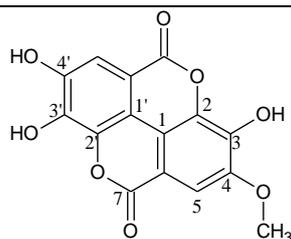
O espectro de RMN ^1H (**Espectro 17**), referente a substância galato de etila (**26**) apresenta um simpleto em δ_{H} 7,04 ppm referente a dois hidrogênios aromáticos equivalentes (H-2 e H-6). Através do espectro de HSQC (**Espectro 18**), foi possível verificar a correlação H-C entre H-2 e C2 (δ_{C} 109,9 ppm). Não foi possível visualizar os sinais referentes aos hidrogênios H-2' e H-3' por estarem em regiões congestionadas do espectro (**Tabela 12**). Estes dados foram comparados a literatura (Oliveira et al., 2006).

Tabela 12 – Dados espectroscópicos de RMN para galato de etila.

Galato de etila (26)				
H/C	Dados obtidos		(OLIVEIRA et al., 2006)	
	δ_H (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_C (ppm) HSQC	δ_H (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CDCl ₃ , 200 MHz)	δ_C (ppm) (CDCl ₃ , 50 MHz)
2/6	7,04 (<i>s</i>)	109,95*	7,04 (<i>s</i>)	109,93

*Sinais obtidos por HSQC.

O espectro de RMN ¹H (**Espectro 17**), referente a substância ácido metilêlágico (**28**) apresenta um simpleto em δ_H 7,58 ppm referente ao hidrogênio aromático (H-5). Através do espectro de HSQC (**Espectro 18**), foi possível verificar a correlação H-C entre H-5 e C-5 (δ_C 112,6 ppm). Através do espectro HMBC (**Espectro 19**) foi possível visualizar a correlação H-C entre H-5 e C-7 (δ_C 170,31 ppm) (**Tabela 13**). Estes dados foram comparados a literatura (Oliveira et al., 2006).

Tabela 13 – Dados espectroscópicos de RMN para ácido metilêlágico.

Ácido metilêlágico (28)				
H/C	Dados obtidos		(nmrdb)	
	δ_H (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_C (ppm) HMBC / HSQC*	δ_H (ppm) / <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)
5	7,58 (<i>s</i>)	112,60*	7,51 (<i>s</i>)	113,6
7	-	170,31 (H-2)	7,43 (<i>s</i>)	159,5
-OCH ₃	3,65 (<i>s</i>)	52,05*	3,86 (<i>s</i>)	60,90

*Sinais obtidos por HSQC.

Para a identificação estrutural do ácido gálico (**58**) foram utilizadas as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (**Espectro 8**– RMN de ^1H ; **Espectro 9** – HSQC e **Espectro 10 / Espectro 11**– HMBC) e por comparação com dados da literatura já descritos para folhas da espécie *S. malaccense* (Oliveira et al., 2006). O espectro de RMN ^1H apresenta sinal na região de hidrogênios aromáticos, na forma de um simpleto intenso em δ_{H} 7,06 ppm, atribuído aos dois hidrogênios equivalentes H-2 e H-6. No espectro HSQC é possível observar os hidrogênios H-2 e H-6 com correlações a J^1 , com o sinal em δ_{C} 110,18 ppm, relativos aos C-2 e C-6. No espectro HMBC observou-se a correlação entre o sinal de H-2 e H-6 com os valores equivalentes aos δ_{C} 108,95 ppm, dados descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido gálico.

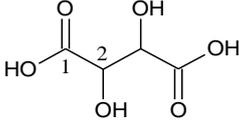
Ácido gálico (58)				
H/C	Dados obtidos		(OLIVEIRA et al., 2006)	
	δ_{H} (ppm) / J (Hz) (CD_3OD , 800MHz)	δ_{C} (ppm) HMBC / HSQC*	δ_{H} (ppm) / J (Hz) (CD_3OD , 250 MHz)	δ_{C} (ppm) (CD_3OD , 62,9 MHz)
1	-	120,73 (H-2)	-	122,05
2/6	7,06 (s)	108,95 (H-2, H-6) 110,18*	7,09 (s)	110,42
3/5	-	144,99 (H-2)	-	146,41
–COOH	-	169,09 (H-2)	-	170,50

*Sinais obtidos por HSQC.

Para a identificação estrutural do ácido tartárico (**62**) foram utilizadas as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (**Espectro 14** – RMN de ^1H ; **Espectro 15** – HSQC e **Espectro 16** – HMBC). O espectro de ^1H apresenta o sinal simpleto em δ_{H} 4,56 ppm característico de hidrogênio ligado a carbono geminal a hidroxila e

vicinal a carboxila. O espectro HSQC apresenta correlação H-C (δ_c 73,2 ppm). O espectro HMBC apresenta correlação H-C a J^2 (δ_c 174,2 ppm) (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido tartárico.



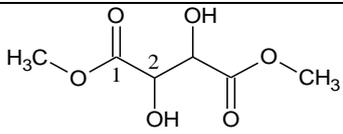
Ácido tartárico (**62**)

H/C	Dados obtidos		(NILSSON et al., 2004)	
	δ_H (ppm) / J (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_c (ppm) HMBC HSQC*	δ_H (ppm) / J (Hz) (800MHz)	δ_c (ppm)
1	-	174,20 (H-2)	-	-
2	4,56 (s)	73,92*	4,41 (s)	-

*Sinais obtidos por HSQC.

Para a identificação estrutural do tartarato de dimetila (**61**) foram utilizadas as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de ¹H, HSQC e HMBC (**Espectro 8**– RMN de ¹H; **Espectro 9** – HSQC e **Espectro 10** / **Espectro 11**– HMBC). Igual a substâncias anterior, o espectro de ¹H apresenta simpleto em δ_H 4,52 ppm característico de hidrogênio ligado a carbono geminal a hidroxila e vicinal a carboxila. O espectro HSQC apresenta correlação H-C δ_c 73,2 ppm e para –OCH₃ correlação H-C δ_c 52,62 ppm. O espectro HMBC apresenta correlação H-C a J^2 (δ_c 171,94 ppm). As metoxilas aparecem como um simpleto intenso em δ_H 3,78 ppn. (**Tabela 16**)

Tabela 16 – Dados espectroscópicos de RMN para o tartarato de dimetila.



Tartarato de dimetila (**61**)

H/C	Dados obtidos		(nmrdb)	
	δ_H (ppm) / J (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_c (ppm) HMBC HSQC*	δ_H (ppm) / J (Hz)	δ_c (ppm)
1	-	171,94	-	-
2	4,52 (s)	72,43	4,8 (s)	-

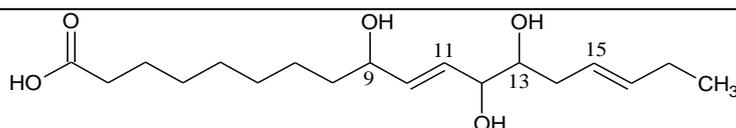
		73,64*		
-OCH ₃	3,78 (s)	52,62*	3,74 (s)	-

*Sinais obtidos por HSQC.

O espectro de RMN ¹H (**Espectro 17**), referente a substância ácido málingico (**27**) apresenta dois grupos de sinais: C-9, C-12 e C-13 sinais de hidrogênios vicinais a hidroxila (δ_{H} 3,74, 3,76 e 3,71 ppm, respectivamente) e C-10, C-11, C-15 e C-16 (δ_{H} 5,37, 5,36, 5,34 e 5,32 ppm, respectivamente) característico de carbono *sp*². Os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos *sp*³ (H2-H8, H-17 e H-18) não puderam ser assinalados por terem caído em uma região congestionada do espectro.

Através do espectro de HSQC (**Espectro 18**), foi possível verificar a correlação H-C entre H-9 e C-9 (δ_{C} 71,27 ppm), H-11 e C-11 (δ_{C} 130,73 ppm), H-12 e C-12 (δ_{C} 70,08 ppm), H-13 e C-13 (δ_{C} 74,45 ppm) e H-15 e C-15 (δ_{C} 128,87 ppm) (**Tabela 17**).

Tabela 17 – Dados espectroscópicos de RMN para o ácido málingico.



Ácido málingico (27)				
H/C	Dados obtidos		(nmrdb)	
	δ_{H} (ppm) / <i>J</i> (Hz) (CD ₃ OD, 800MHz)	δ_{C} (ppm) HSQC*	δ_{H} (ppm) / <i>J</i> (Hz)	δ_{C} (ppm)
9	3,74 (m)	71,27*	4,0 (dt, <i>J</i> = 7,41 e 7,33)	69,90
10	5,37 (m)	-	5,48 (dd, <i>J</i> = 15,67 e 7,41)	136,0
11	5,36 (m)	130,73*	5,61 (dd, <i>J</i> = 15,67 e 7,43)	131,20
12	3,76 (m)	70,08*	4,0 (dd, <i>J</i> = 7,43 e 4,59)	74,70
13	3,71 (m)	74,45*	3,79 (td, <i>J</i> = 6,23 e 4,59)	70,40
15	5,34 (m)	128,87*	5,38 (dt, <i>J</i> = 15,65 e 7,37)	126,0
16	5,32 (m)	-	5,36 (dt, <i>J</i> = 15,65 e 6,93)	135,30

*Sinais obtidos por HSQC.

5. CONCLUSÕES

A partir da elaboração do banco de dados químico relacionando as substâncias já isoladas e identificadas em *Syzygium malaccense*, observa-se que a espécie contém metabólitos secundários fenólicos, majoritariamente, flavonoides e derivados.

O trabalho ampliou o conhecimento em relação à utilização de sistemas trifásicos em HSCC, bem como em relação a aplicação deste no modo de eluição gradiente em etapas. O sistema de solventes trifásico (A) Hex – AcOEt – ACN – H₂O 2:1:1:1 (v/v), apresentou baixa perturbação da fase estacionária durante a mudança de fase móvel (etapas) do gradiente. Um reequilíbrio hidrodinâmico e que a introdução de uma nova fase móvel a cada etapa provavelmente não causou o comprometimento da retenção da fase estacionária garantindo a eficiência do processo cromatográfico.

Por meio do acoplamento *off-line* da cromatografia contracorrente à espectrometria de massas, conclui-se que o uso destas técnicas associadas gera uma nova perspectiva de trabalho na identificação de substâncias em extratos vegetais com a vantagem da possibilidade do isolamento em escala preparativa.

A partir das análises por HRMS-ESI-MS/MS foram identificadas 81 substâncias ao longo das frações do particionamento por CCC. Algumas dessas substâncias tiveram as estruturas confirmadas por experimentos de RMN do tipo uni e bidimensional.

Conclui-se que a cromatografia contracorrente é uma técnica vantajosa nas etapas de separação de produtos naturais, e seu poder de resolução de misturas complexas pode ainda ser aumentado quando combinado com outras técnicas cromatográficas.

Este trabalho representa uma importante contribuição para o conhecimento do perfil químico do extrato hidroetanólico das folhas da espécie *S. malaccense* o que corrobora com o complemento de dados já existentes na literatura.

BIBLIOGRAFIA

- Arumugam, B.; Manaharan, T.; Heng, C. K.; Kuppusamy, U. R.; Palanisamy, U. D. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT - Food Science and Technology**, 59, 707-712, 2014.
- Arumugam, B.; Palanisamy, U. D.; Chua, K. H.; Kuppusamy, U. R. Potential antihyperglycaemic effect of myricetin derivatives from *Syzygium malaccense*. **Journal of Functional Foods**, 22, 325-336, 2016.
- Barnejee, S.; Mazumdar, S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, 1-41, 2012.
- Batista, A. G.; da Silva, J. K.; Cazarin, C. B.; Biasoto, A. C.; Sawaya, A. C.; Prado, M. A.; Maróstica Júnior, M. R. Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. **LWT - Food Science and Technology**, 76, 284-291, 2017.
- Batista, A. N.; Batista Jr., J. M.; Souza-Moreira, T. M.; Valentini, S. R.; Kato, M. J.; Zanelli, C.; Furlan, M. Biosynthetic insights into *p*-hydroxybenzoic acid-derived benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 29(5), 1105-1114, 2018.
- Büttenbender, S. L.; Simon, E. S.; Volpato, N. M. Cromatografia contracorrente: princípios e aplicações. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 1-9, 2018.
- Chakravarty, A. K.; Das, B.; Sarkar, T.; Masuda, K.; Shiojima, K. Ellagic acid derivatives from the leaves of *Eugenia jambos* Linn. **Indian Journal of Chemistry**, 12, 1316-1318, 1998.
- Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, E. C. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos ms alimentos. **Química Nova**, 31(3), 623-636, 2008.
- Chung, S.-K.; Kim, Y.-C.; Takaya, Y.; Terashima, K.; Niwa, M. Novel flavonol glycoside, 7-*O*-methyl meansitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 4664-4668, 2004.
- Conway, W. D. **Counter-Current Chromatography: apparatus, theory and applications**. New York: VCH Publishers Inc., 1990.
- Correia, S. de J.; David, J. P.; Daivid, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, 29(6), 1287-1300, 2006.
- Costa, F. das N.; Leitão, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, 33, 336-347, 2010.
- Costa, F. das N.; Jerz, G.; Figueiredo, F. de S.; Winterhalter, P.; Leitão, G. G. Solvent system selectivities in countercurrent chromatography using *Salicornia gaudichaudiana* metabolites

as practical example with off-line electrospray mass-spectrometry injection profiling. **Journal of Chromatography A**, 1385, 20-27, 2015.

Costa, F. das N.; Borges, R. M.; Leitão, G. G.; Jerz, G. Preparative mass-spectrometry profiling of minor concentrated metabolites in *Salicornia gaudichaudiana* Moq by high-speed countercurrent chromatography and off-line electrospray mass-spectrometry injection. **Journal of Separation Science**, 42, 1528-1541, 2019.

Costa, F. das N.; Garrard, I.; Silva, A. J.; Leitão, G. G. Changes in the mobile phase composition on a stepwise counter-current chromatography elution for the isolation of flavonoids from *Siparuna glycyarpa*. **Journal of Separation Science**, 36, 2253-2259, 2013.

Costa, R. S.; Oliveira, I. V.; Môro, F. V.; Martins, A. B. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28(1), 117-120, 2006.

Dewick, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach** (3 ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2012.

Djoukeng, J. D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A. L.; Bouda, H.; Lontsi, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 101, 283-286, 2005.

Erşan, S.; Üstündağ, O. G.; Carle, R.; Schweiggert, R. M. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64(26), 5334-5344, 2016.

Eschenmoser, A.; Arigoni, D. Revisited after 50 years: The 'stereochemical interpretation of the biogenetic isoprene rule for the triterpenes'. **Helvetica Chimica Acta**, 88, 3011-3050, 2005.

Facchini, P. J.; Bohlmann, J.; Covello, P. S.; De Luca, V. R. M.; Page, J. E.; Martin, V. J. Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. **Trends in Biotechnology**, 30(3), 127-131, 2012.

Falcão, M. de A.; Paraluppi, N. D.; Clement, C. R. Fenologia e produtividade do jambo (*Syzygium malaccensis*) na Amazônia central. **Acta Amazonica**, 32(1), 3-8, 2002.

Fang, N.; Yu, S.; Prior, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 3579-3585, 2001.

Faria, A. F.; Marques, M. C.; Mercadante, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, 126, 1571-1578, 2011.

Felipe, L. O.; Bicas, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, 39(2), 120-130, 2017.

Friesen, J. B. **Introduction to countercurrent chromatography: instruments**. 05 dez. 2016. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/uiccenapt/introduction-to-countercurrent-chromatography-instruments?next_slideshow=2>. Acesso em 03 de nov de 2019.

Gao, S.; Zhan, Q.; Li, J.; Yang, Q.; Li, X.; Chen, W.; Sun, L. LC–MS/MS method for the simultaneous determination of ethyl gallate and its major metabolite in rat plasma. **Biomedical Chromatography**, 24, 472-478, 2010.

Garzón, G. A.; Narváez-Cuenca, C. E.; Vincken, J. P.; Gruppen, H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, 217, 364-372, 2017.

Gross, J. H. **Mass Spectrometry**. 2 ed. Heidelberg: Springer, 2011. 780 p.

Gutzeit, D.; Winterhalter, P.; Jerz, G. Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols. **Journal of Chromatography A**, 1172, 40-46, 2007.

HMDB – **Human Metabolome Database**. Canadian Institutes of Health Research, Canada Foundation for Innovation and The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). Canada, 2018. Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/>>. Acesso em: dez. de 2019.

Ignatova, S.; Sumner, N.; Colclough, N.; Sutherland, I. Gradient elution in counter-current chromatography: A new layout for an old path. **Journal of Chromatography A**, 1218, 6053-6060, 2011.

Ito, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1065, 145-168, 2005a.

Ito, Y. Origin and evolution of the coil planet centrifuge: A personal reflection of my 40 Years of CCC research and development. **Separation & Purification Reviews**, 34, 131-154, 2005b.

Ito, Y.; Bowman, R. L. Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support. **Journal of Chromatographic Science**, 8, 315-323, 1970.

Kalegari, M.; Miguel, M. D.; Dias, J.; Lordello, A. L.; Lima, C. P.; Miyazaki, C. M.; Miguel, O. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 47(3), 635-642, 2011.

Karasawa, M. M.; Mohan, C. Fruits as prospective reserves of bioactive compounds: A review. **Natural Products and Bioprospecting** (8), 335-346, 2018.

Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, 28, 898-917, 2009.

Kreis, W.; Munkert, J.; Pádua, R. M. de. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. *In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Mello, J. C. P. de; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

Leitão, G. G.; Costa, F. das N. Gradiente elution in countercurrent chromatography. **Planta Medica**, 81, 1592-1596, 2015.

Lin, L. Z.; Harnly, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 1084-1096, 2007.

Liu, Y.; Chen, X.; Liu, J.; Di, D. Three-phase solvent systems for the comprehensive separation of a wide variety of compounds from *dicranostigma leptopodum* by high-speed counter-current chromatography. 38, 2015.

Lobo, A. M.; Lourenço, A. M. Metabolitos derivados do ácido xiquímico. *In: Lobo, A. M.; Lourenço, A. M. Biossíntese de Produtos Naturais*. Lisboa: IST Press, 2007.

Lowry, J. B. The distribution and potential taxonomic value of alkylated ellagic acids. **Phytochemistry**, 7, 1803-1813, 1968.

Lu, Y.; Berthod, A.; Hu, R.; Ma, W.; Pan, Y. Screening of complex natural extracts by countercurrent chromatography using a parallel protocol. **Analytical Chemistry**, 81(10), 4048-4059, 2009.

Lugão, J. F. **Fundamentos da tecnologia do analisador de massas Orbitrap e suas aplicações**. Analítica, 2012. Disponível em: <https://www.analiticaweb.com.br/newsletter/18/colacro/apresentacao_fundamentos_orbitrap.pdf>. Acesso em: 19 de nov. de 2019.

Maciel, M. A.; Pinto, A. C.; Veiga Júnior, V. F.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3), 429-438, 2002.

Mahmoud, I. I.; Marzouk, M. S.; Moharram, F. A.; El-Gindi, M. R.; Hassan, A. M. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, 58, 1239-1244, 2001.

Maier, T.; Sanzenbacher, S.; Kammerer, D. R.; Berardini, N.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Schieber, A. Isolation of hydroxycinnamoyltartaric acids from grape pomace by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1128, 61-67, 2006.

Makarov, A.; Scigelova, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217, 3938-3945, 2010.

Manaharan, T.; Appleton, D.; Cheng, H. M.; Palanisamy, U. D. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. **Food Chemistry**, 132, 1802-1807, 2012.

Marston, A.; Hostettmann, K. Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives. **Journal da Chromatography A**, 658, 315-341, 1994.

Melo, R. R. de; Araújo, E. R. de; Silva, A. A. da; Randau, K. P.; Ximenes, E. C. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 90(4), 298-302.

Mendes, N. M.; Oliveira, A. B. de; Guimarães, J. E.; Pereira, J. P.; Katz, N. Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alquil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 23(4), 217-224, 1990.

Michel, T.; Destandau, E.; Elfakir, C. New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: Focus on coupling strategy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 2013.

MoNA – **MassBank of North America**. Disponível em: <<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>>. Acesso em: dez. de 2019.

Morais, S. M.; Silva, K. A.; Araujo, H.; Vieira, I. G.; Alves, D. R.; Fontenelle, R. O.; Silva, A. M. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals - MDPI**, 10(31), 1-10, 2017.

Nair, A. G.; Krishnan, S.; Ravikrishna, C.; Madhusudanan, K. P. New and rare flavonol glycosides from leaves of *Syzygium samarangense*. **Fitoterapia**, 70, 148-151, 1999.

Nair, K. N. **The genus *Syzygium* - *Syzygium cumini* and other underutilized species**. Boca Raton: CRC Press, 2017.

Narduzzi, L. **IRIS open pub**. 2014. Disponível em: <<https://openpub.fmach.it/retrieve/handle/10449/33659/34865/>>. Acesso em: 08 de dez. de 2019.

Nilsson, M. D.; Almeida, C.; Delgadillo, I.; Goodfellow, B. J.; Gil, A. M.; Morris, G. A. High-resolution NMR and diffusion-ordered spectroscopy of port wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 3736-3743, 2004.

nmrdb.org. Banfi, D.; Patiny, L. www.nmrdb.org: Resurrecting and processing NMR spectra on-line *Chimia*, 2008, 62(4), 280-281. Disponível em: <http://www.nmrdb.org/new_predictor/index.shtml?v=v2.103.0>. Acesso em: dez. de 2019.

Noreen, Y.; Serrano, G.; Perera, P.; Bohlin, L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. **Planta Medica**, 64, 520-524, 1998.

Nunes, P. C.; Aquino, J. S.; Rockenbach, I. I.; Stamford, T. L. Physico-chemical characterization, bioactive compounds and antioxidant activity of malay apple [*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry]. **PLoS ONE**, 6, 1-11, 2016.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Yazaki, K.; Ashida, M. Ellagitannins of the Casuarinaceae, Stachyuraceae and Myrtaceae. **Phytochemistry**, 21(12), 2871-2874, 1982.

Oliveira, A. M.; Humberto, M. M.; Silva, J. M.; Rocha, R. F.; Sant'ana, A. E. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, 618-624, 2006.

Oliveira, D. M. de; Bastos, D. H. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, 34(6), 1051-1056, 2011.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. **Introdução à espectroscopia** (4^a ed.). São Paulo: Cengage Learning, 2015.

Peixoto, F. M.; Fernandes, I.; Gouvêa, A. C.; Santiago, M. C.; Borguini, R. G.; Mateus, N.; Ferreira, I. M. Simulation of in vitro digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jaboticaba, jmelão and jambo fruits. **Journal of Functional Foods**, 24, 373-381, 2016.

Rai, A.; Saito, K.; Yamazaki, M. Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants. **Plant Journal**, 90(4), 764-787, 2017.

Reynertson, K. A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, 109, 883-890, 2008.

Sala, E.; Fulcrand, H.; Poncet-LeGrand, C.; Meudec, E.; Köhler, N.; Winterhalter, P.; Cheynier, V. Isolation of flavanol-anthocyanin adducts by countercurrent chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, 43, 488-493, 2005.

Saldanha, L. L.; Vilegas, W.; Dokkedal, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, 18, 8402-8416, 2013.

Samy, M. N., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H., & Kamel, M. S. (2014). One new flavonoid xyloside and one new natural triterpene rhamnoside from the leaves of *Syzygium grande*. *Phytochemistry Letters*, 10, 86-90.

Santos, A. E. dos; Barreto Júnior, C. B.; Kuster, R. M. Flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. **Revista Virtual de Química**, 9(3), 1303-1317, 2017.

Santos, S. A.; Freire, A. S.; Domingues, M. R.; Silvestre, A. J.; Pascoal Neto, C. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography - mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 9386-9393, 2011.

Schwieenheer, C.; Merz, J.; Schembecker, G. Investigation, comparison and design of chambers use dincentrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. **Journal of Chromatography A**, 1390, 39-49, 2015.

Seong, Y-A.; Shin, P-G.; Yoon, J-S.; Yadunandam, A. K.; Kim, G-D. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma a549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 68(2), 369-377, 2014.

Shibusawa, Y.; Yamakawa, Y.; Noji, R.; Yanagida, A.; Shindo, H.; Ito, Y. Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1133, 119-125, 2006.

Shibusawa, Y.; Yanagida, A.; Shindo, H.; Ito, Y. Separation of apple catechin oligomers by CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**[®], 26(9 & 10), 1609-1621, 2003.

Shinomiya, K.; Ito, Y. Countercurrent chromatographic separation of biotic compounds with extremely hydrophilic organic-aqueous two-phase solvent systems and organic-aqueous three-phase solvent systems. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 29, 733-750, 2006.

Silva Jr., M. C.; Lima, R. M. C. *Syzygium malaccense*. 2010. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/13681880375/in/photostream/>>. Acesso em: 20 de nov. de 2019.

Silva, A. C.; Katsuragawa, T. H. Ocorrência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase na região Sudeste de Rondônia, Brasil. **UNINGÁ Review**, 8, 13-20, 2011.

Silva, A. G.; Lima, R. A.; Silva, P. L. da; Souza, A. C. de. Uso, conservação e diversidade de plantas aromáticas, condimentares e medicinais na comunidade Vila Princesa, Porto Velho-RO. **Revista Pesquisa & Criação**, 10(2), 2011.

Silveira, G. F.; Melo, M. P.; Teixeira, J. W. M.; Viana, D. C.; Silva, J. D. C.; Beserra Jr, J. E. A. First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudofusicoccum stromaticum* causing dieback in *Syzygium malaccense* tree in Brazil. **Forest Pathology**, 48, 2017.

Simirgiotis, M. J.; Adachi, S.; To, S. Y.; Reynertson, K. A.; Basile, M. J.; Gil, R. R.; Kennelly, E. J. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, 107, 813-819, 2008.

Slowing, K.; Söllhuber, M.; Carretero, E.; Villar, A. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. **Phytochemistry**, 37, 255-258, 1994.

Soh, W. K. Taxonomy of *Syzygium*. In: Nair, K. N. **The genus *Syzygium* - *Syzygium cumini* and other underutilized species**. Boca Raton: CRC Press, 2017.

Souza Filho, A. P.; Pereira, A. A. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, 23(1), 25-32, 2005.

Srivastava, R.; Shaw, A. K.; Kulshreshtha, D. K. Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. **Phytochemistry**, 38, 687-689, 1995.

Tsukui, A. H. V. P.; Garrett, R.; Scholz, M. B.; Eberlin, M. N.; Bizzo, H. R.; Rezende, C. M. Direct-infusion electrospray ionization-mass spectrometry analysis reveals atractyligenin

derivatives as potential markers for green coffee postharvest discrimination. **LWT - Food Science and Technology**, 103, 205-211, 2019.

Veigas, J. M.; Narayan, M. S.; Laxman, P. M.; Neelwarne, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, 105, 619-627, 2007.

Wagner, H.; Bladt, S. **Plants Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas** (2 ed.). Berlin: Springer, 2001.

Wheeler, R. E. Targeted metabolomics on the shikimate and aromatic amino acid biosynthetic pathways. West Lafayette, Indiana, Estados Unidos. 2016. Disponível em: <https://docs.lib.purdue.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1892&context=open_access_theses>. Acesso em: 19 de nov. 2019.

Winterhalter, P. Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. **Trends in Food Science & Technology**, 18, 507-513, 2007.

Wu, S.; Liang, J.; Berthod, A. Comparing two models of gradient elution in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1274, 77-81, 2013.

Yanagida, A.; Yamakawa, Y.; Noji, R. O.; Shindo, H.; Ito, Y.; Shibusawa, Y. Comprehensive separation of secondary metabolites in natural products by high-speed counter-current chromatography using a three-phase solvent system. **Journal of Chromatography A**, 1151, 74-81, 2007.

Yang, L. L.; Lee, C. Y.; Yen, K. Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, 157, 65-75, 2000.

Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomás-Barberán, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, 59, 113-122, 2004.

Yin, L.; Li, Y.; Lu, B.; Jia, Y.; Peng, J. Trends in counter-current chromatography: Applications to natural products purification. **Separation & Purification Reviews**, 39, 33-62, 2010.

Zhang, C.; Ma, Y.; Gao, F.; Zhao, Y.; Cai, S.; Pang, M. The free, esterified, and insoluble-bound phenolic profiles of *Rhus chinensis* Mill. fruits and their pancreatic lipase inhibitory activities with molecular docking analysis. **Journal of Functional Foods**, 40, 729-735, 2018.

Zhang, X.; Li, F.; Lv, H.; Wu, Y.; Bian, G.; Jiang, K. On the origin of the methyl radical loss from deprotonated ferulic and isoferulic acids: Electronic excitation of a transient structure. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 24, 941-948, 2013.

Zuanazzi, J. A.; Montanha, J. A.; Zucolotto, S. M. Flavonoides. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Mello, J. C. P. de; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Pesquisa bibliográfica das substâncias químicas de algumas espécies do gênero *Syzygium*.Tabela 18 – Resumo da pesquisa bibliográfica sobre substâncias químicas de algumas espécies do gênero *Syzygium*.

<i>Syzygium malaccense</i>							
Substância	Parte da planta	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da) ^a	<i>m/z</i> – referência	[M-H] ⁻ Teórico	[M+H] ⁺ Teórico	Referências
Miricetina 3-glucosídeo	Folha	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480.090393	[M-H] ⁻ 479.0836	479.08257	481.09822	ARUMUGAM et al., 2014
Miricetina 3- α -L-arabinofuranosídeo	Folha	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	450.079834	[M-H] ⁻ 449.0735	449.07201	451.08766	ARUMUGAM et al., 2014
Miricetina 3-O-L-ramnosídeo	Folha	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095490	[M-H] ⁻ 463.0891	463.08766	465.10331	ARUMUGAM et al., 2014; NOREEN et al., 1998
Ácido gálico	Folha	C ₇ H ₆ O ₅	170.021530	-	169.0137	171.02935	ARUMUGAM et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2006
Miricetina	Folha	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.037567	-	317.02975	319.0454	OLIVEIRA et al., 2006
Mearnsetina	Folha	C ₁₆ H ₁₂ O ₈	332.053223	-	331.0454	333.06105	OLIVEIRA et al., 2006
Ácido acetil-ursólico	Caule	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	498.370911	-	497.36309	499.37874	OLIVEIRA et al., 2006

Cianidina 3,5-diglicosídeo	Casca do fruto / Fruto	$C_{27}H_{31}O_{16}$	611.160645	$[M]^+$ 611	610.15339	612.16904	NUNES et al., 2016; BATISTA et al., 2017; PEIXOTO et al., 2016
Cianidina 3-glucosídeo	Casca do fruto / Fruto	$C_{21}H_{21}O_{11}$	449.107849	$[M]^+$ m/z 449	448.10057	450.11622	NUNES et al., 2016; BATISTA et al., 2017; PEIXOTO et al., 2016; REYNERTSON et al., 2008
Peonidina-3-glucosídeo	Casca do fruto	$C_{22}H_{23}O_{11}$	463.123474	$[M]^+$ m/z 463	462.11622	464.13187	NUNES et al., 2016; BATISTA et al., 2017
Ácido <i>p</i> -cumárico	Fruto Folha	$C_9H_8O_3$	164.047348	-	163.03952	165.05517	BATISTA et al., 2017
Ácido benzoico	Fruto Folha	$C_7H_6O_2$	122.036781	-	121.02896	123.04461	BATISTA et al., 2017
(-)-Epicatequina galato	Fruto Folha	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442.089996	-	441.08218	443.09783	BATISTA et al., 2017
(+)-Catequina	Fruto Folha	$C_{15}H_{14}O_6$	290.079041	-	289.07122	291.08687	BATISTA et al., 2017; NOREEN et al., 1998
(-)-Epicatequina	Fruto Folha	$C_{15}H_{14}O_6$	290.079041	-	289.07122	291.08687	BATISTA et al., 2017

Procianidina A2	Fruto	$C_{30}H_{24}O_{12}$	576.126770	-	575.11896	577.13461	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Procianidina B1	Fruto	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.142456	-	577.13461	579.15026	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Procianidina B2	Fruto	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.142456	-	577.13461	579.15026	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Isoramnetina-3-O-glucosídeo	Fruto	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478.111115	-	477.10331	479.11896	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Isoquercitrina	Fruto	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.095490	-	463.08766	465.10331	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Quercetina	Fruto	$C_{15}H_{10}O_7$	302.042653	-	301.03483	303.05048	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Kaempferol-3-O-glucosídeo	Fruto	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.100555	-	447.09274	449.10839	BATISTA et al., 2017
	Folha						
Rutina	Fruto	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.153381	-	609.14557	611.16122	BATISTA et al., 2017;
	Folha						REYNERTSON et al., 2008
Ácido elágico	Caule	$C_{14}H_6O_8$	302.006256	-	300.99845	303.0141	LOWRY, 1968;
							REYNERTSON et al., 2008

Fruto							
Ácido 3- <i>O</i> -metilelágico	Caule	C ₁₅ H ₈ O ₈	316.021912	-	315.0141	317.02975	LOWRY, 1968
Ácido 3,3'- <i>di-O</i> -metilelágico	Caule	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	330.037567	-	329.02975	331.0454	LOWRY, 1968
Mearnsitrina	Folha	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478.111126	-	477.10331	479.11896	NOREEN et al., 1998
Quercitrina	Folha	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100555	-	447.09274	449.10839	NOREEN et al., 1998; REYNERTSON et al., 2008
	Fruto						
<i>Syzygium aqueum</i>							
Substância	Parte da planta	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da) ^a	<i>m/z</i> – referência	[M-H] ⁻ Teórico	[M+H] ⁺ Teórico	Referências
4-Hydroxybenzaldehyde	Folha	C ₇ H ₆ O ₂	122.036781	[M-H] ⁻ 121.0377 [M+H] ⁺ 123.0536	121.02896	123.04461	MANAHARAN et al., 2012
Myrecetin-3- <i>O</i> -rhamnoside	Folha	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095490	[M-H] ⁻ 463.0902 [M+H] ⁺ 465.1061	463.08766	465.10331	MANAHARAN et al., 2012
Europetin-3- <i>O</i> -rhamnoside	Folha	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478.111115	[M-H] ⁻ 463.0902	477.10331	479.11896	MANAHARAN et al., 2012

				[M+H] ⁺ 465.1061			
Phloretin	Folha	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274.084137	[M-H] ⁻ 273.1210	273.0763	275.09195	MANAHARAN et al., 2012
				[M+H] ⁺ 275.1367			
Myrigalone-G	Folha	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	286.120514	[M-H] ⁻ 285.1237	285.11269	287.12834	MANAHARAN et al., 2012
				[M+H] ⁺ 287.1328			
Myrigalone-B	Folha	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	300.136169	[M-H] ⁻ 299.1442	299.12834	301.14399	MANAHARAN et al., 2012
				[M+H] ⁺ 301.1610			

Syzygium jambos

Substância	Parte da planta	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da) ^a	m/z – referência	[M-H]- Teórico	[M+H] ⁺ Teórico	Referências
1-O-galloyl castalagin	Folha	C ₄₈ H ₃₀ O ₃₀	1086.08219		1085.0744	1087.09	YANG, LEE e YEN, 2000
Casuarinin	Folha	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936.086853		935.07907	937.09472	YANG, LEE e YEN, 2000; OKUDA et al., 1982

quercetin 3-O-b-D-xylopyranosyl (1-2) a-L-rhamnopyranoside	Folha						SLOWING et al., 1994
myricetin 3-O-b-D-xylopyranosyl (1-2) a-L-rhamnopyranoside	Folha						SLOWING et al., 1994
3,3',4'-tri-O-methylellagic acid-4- O-β-D-glucopyranoside	Folha						CHAKRAVARTY et al., 1998
3,4,3'-Tri-O-methylellagic acid	Folha	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	344.053223				CHAKRAVARTY et al., 1998
Pedunculagin	Folha	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	784.075928				OKUDA et al., 1982
Tellimagrandin I	Folha	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	786.091553				OKUDA et al., 1982
Strictinin	Folha	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	634.080627				OKUDA et al., 1982
Casuarictin	Folha	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	936.086853				OKUDA et al., 1982
2,3-HHDP-glucose	Folha	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	482.069641				OKUDA et al., 1982

Syzygium grande

Substância	Parte da planta	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da) ^a	m/z – referência	[M-H]- Teórico	[M+H] ⁺ Teórico	Referências
Myricetin 4'-methyl ether 3-O-b-D-xylopyranoside	Folha	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-	[M+Na] ⁺ 487.0841	463.08766	465.10331	SAMY et al., 2014
Grandoside	Folha	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	-	[M+Na] ⁺	601.41043	603.42608	SAMY et al., 2014

625.4070

Myricetin 4-methyl ether 3-O-a-L-rhamnopyranoside	Folha	-	-	-	-	-	SAMY et al., 2014
Myricetrin	Folha	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₇	-	-	657.10918	659.12483	SAMY et al., 2014
Myricetin 3-O-b-Dglucopyranoside	Folha	-	-	-	-	-	SAMY et al., 2014
Ursolic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360352	-	455.35252	457.36817	SAMY et al., 2014
Quadranside IV	Folha	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	650.403015	-	649.39518	651.41083	SAMY et al., 2014
Friedelin	Folha	C ₃₀ H ₅₀ O	426.386169	-	425.37834	427.39399	SAMY et al., 2014
b-sitosterol	Folha	C ₂₉ H ₅₀ O	414.386169	-	413.37834	415.39399	SAMY et al., 2014
b-sitosterol glucoside	Folha	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	576.438965	-	575.43117	577.44682	SAMY et al., 2014
Betulin	Folha	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.381073	-	441.37326	443.38891	SAMY et al., 2014
Phenethyl D-rutinoside	Folha	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₀	430.183899	-	429.176075	431.191725	SAMY et al., 2014
Officinoside B	Folha	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	388.209717	-	387.2019	389.21755	SAMY et al., 2014
Crotalionside C	Folha	C ₁₉ H ₃₂ O ₈			387.2019	389.21755	SAMY et al., 2014
n-butyl-b-Dfructopyranoside	Folha	C ₁₀ H ₂₀ O ₆			235.118165	237.133815	SAMY et al., 2014

Syzygium guineense

Substância	Parte da	Fórmula	Massa monoisotópica	m/z - Artigo	[M-H]-	[M+H]+	Referências
------------	----------	---------	------------------------	--------------	--------	--------	-------------

	planta	molecular	(Da) ^a		Teórico	Teórico	
Betulinic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360352	[M-H] ⁻ 455	455.35252	457.36817	DJOUKENG et al., 2005
Oleanolic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360352	[M-H] ⁻ 455	455.35252	457.36817	DJOUKENG et al., 2005
2-hydroxyoleanolic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.355255	[M-H] ⁻ 471	471.34744	473.36309	DJOUKENG et al., 2005
2-hydroxyursolic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.355255	[M-H] ⁻ 471	471.34744	473.36309	DJOUKENG et al., 2005
Arjunolic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488.350189	[M-H] ⁻ 487	487.34235	489.358	DJOUKENG et al., 2005
Asiatic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488.350189	[M-H] ⁻ 487	487.34235	489.358	DJOUKENG et al., 2005
Terminolic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	504.345093	[M-H] ⁻ 503	503.33727	505.35292	DJOUKENG et al., 2005
6-hydroxyasiatic acid	Folha	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	504.345093	[M-H] ⁻ 503	503.33727	505.35292	DJOUKENG et al., 2005
Arjunolic acid 28-b-glucopyranosyl ester	Folha	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	-	[M-H] ⁻ 649	649.39518	651.41083	DJOUKENG et al., 2005
Asiatic acid 28-b-glucopyranosyl ester	Folha	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	-	[M-H] ⁻ 649	649.39518	651.41083	DJOUKENG et al., 2005
<i>Syzygium samarangense</i>							
Substância	Parte da planta	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da) ^a	m/z - Artigo	[M-H]- Teórico	[M+H] ⁺ Teórico	Referências
Methyl 3-epi-betullinate	Partes aéreas	C ₃₁ H ₅₀ O ₃	470.376007	[M] ⁺ 470	469.36817	471.38382	SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995

Methyl 3-epi-betulinat derivative (1a)	Partes aéreas	C ₃₃ H ₅₂ O ₄	512.386536	[M] ⁺ 512	511.37874	513.39439	SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995
Methyl 3-epi-betulinat derivative (1b)	Partes aéreas	C ₃₁ H ₄₈ O ₄			483.34744	485.36309	SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995
Betulin	Partes aéreas	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.381073		441.37326	443.38891	SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995
2',6'-dihydroxy-4'-methoxy-3',5'- dimethyl chalcone	Partes aéreas	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298.120514	[M] ⁺ 298	297.11269	299.12834	SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995
4'-6'-dihydroxy-2'-methoxy-3',5',- dimethyl chalcone	Partes aéreas	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298.120514	[M] ⁺ 298	297.11269	299.12834	SRIVASTAVA, SHAW e KULSHRESHTHA, 1995
Mearnsitrin	Folha	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478.111126	[M+H] ⁺ 479 [M+Na] ⁺ 501	477.10331	479.11896	NAIR et al., 1999
2'-Methyl-5'-O-galloylmyricetin- 3-O-a-L-rhamnopyranoside	Folha						NAIR et al., 1999
2',4'-dihydroxy-3'5'-dimethyl- 6'methoxylchalcone	Semente	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298.120514	[M-H] ⁻ 297	297.11269	299.12834	SIMIRGIOTIS et al., 2008
2',4'-dihydroxy-3'-methyl-6'- methoxylchalcone	Semente	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	284.104858	[M-H] ⁻ 283			SIMIRGIOTIS et al., 2008
Stercurensin					283.097035	285.112685	
2',4'-dihydroxy-6'-	Semente	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.089203	[M-H] ⁻ 269	269.081385	271.097035	SIMIRGIOTIS et al., 2008

methoxychalcone							
cardamonin							
Reynoutrin	Polpa fruto	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	434.084900	[M-H] ⁻ 433	433.07709	435.09274	SIMIRGIOTIS et al., 2008
Hyperin	Polpa fruto	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095490	[M-H] ⁻ 4633	463.087655	465.103305	SIMIRGIOTIS et al., 2008
Myricitrin	Polpa fruto	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095490	-	463.08766	465.10331	SIMIRGIOTIS et al., 2008
Quercitrin	Polpa fruto	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.100555	-	447.09274	449.10839	SIMIRGIOTIS et al., 2008
Quercetin	Polpa fruto	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042653	-	301.03483	303.05048	SIMIRGIOTIS et al., 2008
Guaijaverin	Polpa fruto	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	434.084900	[M-H] ⁻ 433	433.07709	435.09274	SIMIRGIOTIS et al., 2008
(S)-Pinoцемbrin	Polpa fruto	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.073547	[M-H] ⁻ 255	255.06574	257.08139	SIMIRGIOTIS et al., 2008
Gallic acid	Semente	C ₇ H ₆ O ₅	170.021530	[M-H] ⁻ 169	169.0137	171.02935	SIMIRGIOTIS et al., 2008
	Polpa fruto						
Ellagic acid	Semente	C ₁₄ H ₆ O ₈	302.006256	[M-H] ⁻ 301	300.99845	303.0141	SIMIRGIOTIS et al., 2008
	Polpa fruto						
<i>Syzygium cumini</i>							
Substância	Parte da planta	Fórmula molecular	Massa monoisotópica (Da) ^a	m/z - Artigo	[M-H]- Teórico	[M+H] ⁺ Teórico	Referências
Delphinidin-diglucoside	Casca do	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₇	627.155579	[M] ⁺ 627	626.14831	628.16396	VEIGAS et al., 2007; FARIA, MARQUES e

	fruto / Fruto						MERCADANTE, 2011; PEIXOTO et al., 2016
Petunidin-diglucoside	Casca do fruto / Fruto	$C_{28}H_{33}O_{17}$	-	$[M]^+$ 641	640.16396	642.17961	VEIGAS et al., 2007; FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011; PEIXOTO et al., 2016
Malvidin-diglucoside	Casca do fruto	$C_{29}H_{35}O_{17}$	-	$[M]^+$ 655	654.17961	656.19526	VEIGAS et al., 2007; FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011; PEIXOTO et al., 2016
Cyanidin 3,5-diglucoside	Casca do fruto / Fruto	$C_{27}H_{31}O_{16}$	611.160645	$[M]^+$ 611	610.15339	612.16904	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011; PEIXOTO et al., 2016
Peonidin 3,5-diglucoside	Fruto	$C_{28}H_{33}O_{16}$	625.176331	$[M]^+$ 625	624.16904	626.18469	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011; PEIXOTO et al., 2016
Delphinidin 3-glucoside	Fruto	$C_{21}H_{21}O_{12}$	465.102753	$[M]^+$ 465	464.09548	466.11113	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Delphinidin acetyl-diglucoside	Frutas	$C_{29}H_{33}O_{18}$	-	$[M]^+$ 669	668.15887	670.17452	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Cyanidin 3-glucoside	Fruto	$C_{21}H_{21}O_{11}$	449.107849	$[M]^+$ 449	448.10057	450.11622	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011

Petunidin 3-glucoside	Fruto	$C_{22}H_{23}O_{12}$	479.118408	$[M]^+$ 479	478.11113	480.12678	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Malvidin 3-glucoside	Fruto	$C_{23}H_{25}O_{12}$	493.134064	$[M]^+$ 493	492.12678	494.14243	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Galloyl-glucose ester	Fruto	$C_{13}H_{16}O_{10}$	332.074341	$[M+Na]^+$ 355 $[M-H]^-$ 331	331.066525	333.082175	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Gallic acid	Fruto	$C_7H_6O_5$	170.021530	$[M-H]^-$ 169	169.0137	171.02935	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Dihydromyricetin diglucoside	Fruto			$[M+Na]^+$ 667 $[M+H]^+$ 645 $[M-H]^-$ 643			FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Dihydroquercetin diglucoside	Fruto			$[M+Na]^+$ 651 $[M-H]^-$ 627			FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Methyl-dihydromyricetin diglucoside	Fruto			$[M+Na]^+$ 681 $[M-H]^-$ 657			FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Dimethyl-dihydromyricetin diglucoside	Fruto			$[M+Na]^+$ 695 $[M-H]^-$ 671			FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Myricetin glucoside	Fruto	$C_{21}H_{20}O_{13}$	480.090393	$[M+Na]^+$ 503	479.08257	481.09822	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011

				[M+H] ⁺ 481			
				[M-H] ⁻ 479			
Myricetin pentoside	Fruto	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	450.079834	[M-H] ⁻ 449	449.072005	451.087655	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Myricetin rhamnoside	Fruto	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095490	[M-H] ⁻ 463	463.08766	465.10331	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Myricetin acetyl-rhamnoside	Fruto	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	506.106041	[M-H] ⁻ 505	505.09822	507.11387	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Myricetin	Fruto	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.037567	[M+H] ⁺ 319	317.02975	319.0454	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
				[M-H] ⁻ 317			
<i>cis</i> -Neoxanthin ou <i>cis</i> -violaxanthin	Fruto	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600.417847	[M+H] ⁺ 601	599.410035	601.425685	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
<i>cis</i> -Lutein	Fruto	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568.428040	[M+H] ⁺ 569	567.42021	569.43586	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
<i>trans</i> -Lutein	Fruto	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568.428040	[M+H] ⁺ 569	567.42021	569.43586	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
<i>trans</i> -zeaxanthin	Fruto	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568.428040	[M+H] ⁺ 569	567.42021	569.43586	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Phytoene	Fruto	C ₄₀ H ₆₄	544.500793	[M+H] ⁺ 545	543.492975	545.508625	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011

<i>trans</i> -b-cryptoxanthin	Fruto	C ₄₀ H ₅₆ O	552.433105	[M+H] ⁺ 553	551.42529	553.44094	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
Phytofluene	Fruto	C ₄₀ H ₆₂	542.485168	[M+H] ⁺ 543	541.477325	543.492975	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
15- <i>cis</i> -b-Carotene	Fruto	C ₄₀ H ₅₆	536.438232	[M+H] ⁺ 537	535.430375	537.446025	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
13- <i>cis</i> -b-Carotene	Fruto	C ₄₀ H ₅₆	536.438232	[M+H] ⁺ 537	535.430375	537.446025	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
<i>trans</i> -a-carotene	Fruto	C ₄₀ H ₅₆	536.438232	[M+H] ⁺ 537	535.430375	537.446025	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
<i>trans</i> -b-carotene	Fruto	C ₄₀ H ₅₆	536.438232	[M+H] ⁺ 537	535.430375	537.446025	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011
9- <i>cis</i> -b-Carotene	Fruto	C ₄₀ H ₅₆	536.438232	[M+H] ⁺ 537	535.430375	537.446025	FARIA, MARQUES e MERCADANTE, 2011

^a Massa monoisotópica (Da) adquirida pelos *sites* ChemSpider e PubChem.

APÊNDICE B – Resultados obtidos por MS das frações por HSCCC

Tabela 19 – Proposta de identificação das substâncias químicas presentes nas folhas de *Syzygium malaccense*.

Nº	Fração CCC	Tentativa de identificação	<i>m/z</i> observada Espécie ionizada	Massa monoisotópica	Fórmula molecular	Erro (ppm)	RDB	Fragmentações MS/MS	Referência
----	---------------	----------------------------	--	------------------------	----------------------	---------------	-----	------------------------	------------

			(Da)	obtida			(int. relativa %)		
1/2	5	Ácido oleanólico e/ou ursólico	439,35587 [M+H-H ₂ O] ⁺	456,360352	C ₃₀ H ₄₇ O ₂	-3,950	7,5	203,17894 (88) 191,17900 (100)	MS-DIAL MZmine
3	5	13-HOTrE (Ácido 13-hidroxi-octadecatrienoico)	293,21216 [M-H] ⁻	294,219482	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	3,543	4,5	275,20187 (18)	MS-DIAL
4	5	9-HpOTrE (Ácido 9-hidroperoxi-octadecatrienoico)	309,20734 [M-H] ⁻	310,214417	C ₁₈ H ₂₉ O ₄	4,218	4,5	291,19653 (100) 197,11731 (10)	MS-DIAL
5	5	Ácido anacárdico (C17:3)	369,24326 [M-H] ⁻	370,250793	C ₂₄ H ₃₃ O ₃	2,271	8,5	325,25357 (41)	HMDB
6	5	Ácido anacárdico (C17:1)	373,27469 [M-H] ⁻	374,282104	C ₂₄ H ₃₇ O ₃	2,595	6,5	329,28491 (40)	ERŞAN et al., 2016
7	5	Ácido anacárdico (C15:1)	345,24332 [M-H] ⁻	346,250793	C ₂₂ H ₃₃ O ₃	1,014	6,5	301,25345 (39)	ERŞAN et al., 2016
8	7	Ácido anacárdico (C15:0)	347,25900 [M-H] ⁻	348,266449	C ₂₂ H ₃₅ O ₃	2,674	5,5	303,26889 (35) 67,88535 (1)	MS-DIAL
9	7	9-HPODE (Ácido 9-hidroperoxi-octadecadienoico)	311,22318 [M-H] ⁻	312,230072	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	4,801	3,5	293,21219 (100) 113,09582 (7)	MS-DIAL
10	7	13-HODE (Ácido 13-hidroxi-octadecadienoico)	295,22763 [M-H] ⁻	296,235138	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	2,773	3,5	277,21698 (5) 183,1826 (3)	MS-DIAL
11	7	9-Epiblumenol B	209,15298 [M+H-H ₂ O] ⁺	226,156891	C ₁₃ H ₂₁ O ₂	-2,995	3,5	125,09597 (84) 99,04420 (100)	MS-DIAL
12	19	Ácido benzoico	121,02824 [M-H] ⁻	122,036781	C ₇ H ₅ O ₂	-1,371	5,5	-	BATISTA et al., 2017
13	41	Ácido ferúlico	193.04967	194,057907	C ₁₀ H ₉ O ₄	0,698	6,5	178.02626 (2)	ZHANG et al., 2013

			[M-H] ⁻					161.02328 (5)	
14	45	Ácido dimetilelágico	329,02994 [M-H] ⁻	330,037567	C ₁₆ H ₉ O ₈	2,268	12,5	-	LOWRY, 1968
15	45	Monolinolenina	353,26782 [M+H] ⁺	352,261353	C ₂₁ H ₃₇ O ₄	-3,863	3,5	261,22067 (100) 81,07022 (37)	MS-DIAL
16	47	Mearnsetina (Miricetina 4'-metil éter)	333,05948 [M+H] ⁺	332,053223	C ₁₆ H ₁₃ O ₈	-4,690	10,5	318.03610 (46)	OLIVEIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2011
			331,04565 [M-H] ⁻		C ₁₆ H ₁₁ O ₈	0,779	11,5	316.02203 (87)	
17	47	Derivado de mearnsetina I	469,0047 [M-H] ⁻	-	-	-	-	331,04578 (27) 137,02313 (100)	-
18	47	Oleoil-glicerol-fosfocolina	522,35388	521,348145	C ₂₆ H ₅₃ O ₇ NP	-3,990	1,5	184.07291 (100)	MS-DIAL
		Oleoil lisolecitina	[M+H] ⁺					104.10706 (70)	
19	47	Palmitoil-glicerol-3-fosfoetanolamina	452,27820 [M-H] ⁻	453,285553	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ NP	1,075	1,5	255,23268 (100) 196,03717 (10)	MS-DIAL
20	49	Ácido 4-hidroxicinâmico (Ácido <i>p</i> -cumárico)	163,03893 [M-H] ⁻	164,047348	C ₉ H ₇ O ₃	-3,613	6,5	119,04892 (100)	MS-DIAL
21	49	Palmitoil-glicerol	331,28433 [M+H] ⁺	330,277008	C ₁₉ H ₃₉ O ₄	-1,523	0,5	313,27274 (100) 57,07048 (75)	MS-DIAL
22	49	Ácido 4-hidroxibenzoico	137,02316 [M-H] ⁻	138,031693	C ₇ H ₅ O ₃	-1,172	5,5	93,03318 (100)	MONA
23	51	Citrato de isopropila	235,08090 [M+H] ⁺	234,073959	C ₉ H ₁₅ O ₇	-3.733	2,5	143,03360 (100) 101,02341 (14)	MZmine
24	51	Galato de etila	197,04471 [M-H] ⁻	198,052826	C ₉ H ₉ O ₅	1,320	5,5	169.01315 (14) 125.02303 (3)	GAO et al., 2010 RMN
25	51	Ácido málingico	327,21765	328,224976	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	3,207	3,5	309,20673 (3)	MZmine

			[M-H] ⁻					291,19583 (2)	RMN
26	51	Ácido metilelágico	315,01456 [M-H] ⁻	316,021912	C ₁₅ H ₇ O ₈	1,046	12,5	299,99084 (40)	LOWRY, 1968 RMN
27	51	1-estearoil-glicerol-3-fosfocolina	524,36902 [M+H] ⁺	523,363770	C ₂₆ H ₅₅ O ₇ NP	1,327	0,5	184,07294 (100) 104,10707 (76)	MS-DIAL
28	53	Palmitoil-glicerol-3-fosfato	409,23602 [M-H] ⁻	410,243341	C ₁₉ H ₃₈ O ₇ P	1,234	1,5	152,99466 (94) 78,95766 (24)	MZmine
29	53	1-palmitoil-glicerol-3-fosfocolina	496.3405; [M+H] ⁺	495,332489	C ₂₄ H ₅₁ O ₇ NP	-1.741	0,5	184,07297 (100) 104,10712 (70)	MS-DIAL
30	53	Linoleoil-glicerol-fosfoetanolamina (Liso fosfatidiletanolamine (C18:2))	476,27802 [M-H] ⁻	477,285553	C ₂₃ H ₄₃ O ₇ NP	0,643	3,5	279,23279 (100) 196,03714 (10)	MZmine
31	49	1-(2-metoxi-octadecanil)-glicerol-3- fosfoserina	540,3306 [M-H] ⁻	541,337969	C ₂₅ H ₅₁ O ₉ NP	0,105	1,5	480,30908 (58) 255,23259 (100)	MZmine
32	55	Fosforilcolina	183.0660 [M] ⁻	183,066040	C ₅ H ₁₄ O ₄ NP	-0,024	0	168,00516 (5) 124,01534 (1)	MZmine
33	55	Ácido 3-dehidroquínico	189,03955 [M-H] ⁻	190,047745	C ₇ H ₉ O ₆	0,981	3,5	171,06525 (100) 71,01246 (50)	-
34	57	Monolinoleína	355,28380 [M+H] ⁺	354,27701	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	-2,884	2,5	263,23642 (100) 245,22580 (93)	MS-DIAL
35	57	Galato de metila	183,02888 [M-H] ⁻	184,037170	C ₈ H ₇ O ₅	0,438	5,5	140,01031 (1) 111,00724 (1)	ZHANG et al., 2018
36	61	Ácido elágico	300,99899 [M-H] ⁻	302,006256	C ₁₄ H ₅ O ₈	3,643	12,5	235,26173 (1) 143,03326 (1)	LOWRY, 1968
37/ 38	61	2,3-Dihidroxibenzoato e/ou 2,5- Dihidroxibenzoato	153,01822 [M-H] ⁻	153,019333	C ₇ H ₅ O ₄	-0,099	5,5	109,02820 (80) 85,02824 (1)	MS-DIAL
39	63	Ácido protocatecuico	153,01823	154,026611	C ₇ H ₅ O ₄	-0,034	5,5	109,02819 (95)	FANG, YU e PRIOR,

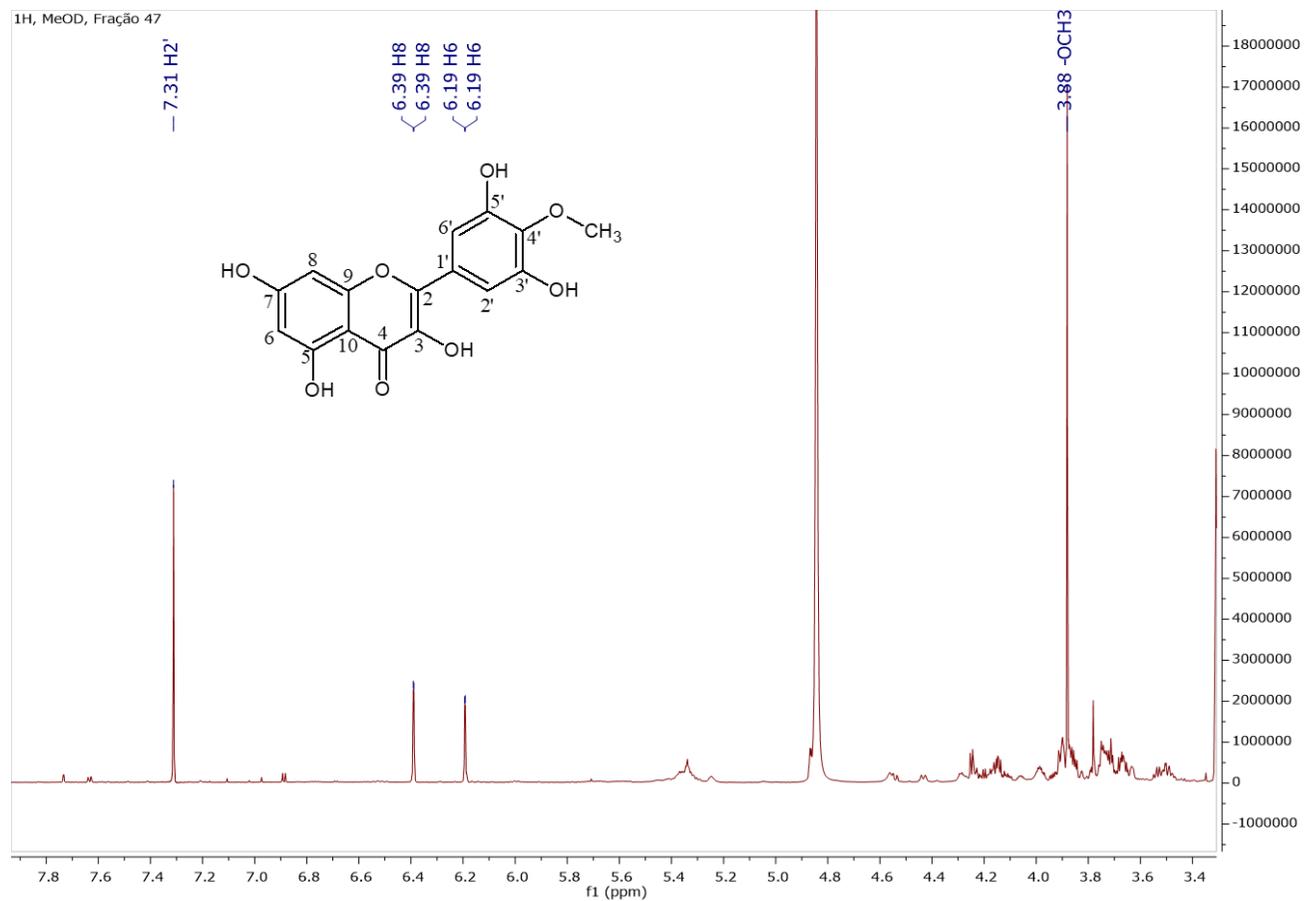
			[M-H]						2001; SANTOS et al., 2011.
40	67	4-hidroxibenzaldeido	121,02831 [M-H] ⁻	122,036781	C ₇ H ₅ O ₂	-0,793	5,5	-	MANAHARAN et al., 2012
41	69	Ácido 3-dehidrochiquímico	153,01823 [M-H-H ₂ O] ⁻	172,037170	C ₇ H ₅ O ₄	-0,034	5,5	109,02820 (15)	MS-DIAL
42	79	Europetin-3- <i>O</i> -ramnosídeo	477,10388 [M-H] ⁻	478,11113	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	1,214	12,5	331,04602 (42) 316,02225 (62)	MANAHARAN et al., 2012
43	81	Ácido etil-málico	161,04500 [M-H] ⁻	162,052826	C ₆ H ₉ O ₅	3,416	2,5	143,03389 (100) 71,01250 (62)	MZmine
44	81	Derivado de quercetina ramnosídeo	653,1725 [M-H] ⁻	-	-	-	-	447,09335 (100) 301,03519 (38)	-
45	81	Derivado de mearnsitrina I	683,18549 [M-H] ⁻	-	-	-	-	477,10422 (40) 205,07115 (100)	-
46	81	Quercetina	303,04926 [M+H] ⁺	302,042653	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	-4,018	10,5	257,04395 (2) 229,04900 (2)	MS-DIAL
47	83	Derivado de mearnsitrina II	523,1093 [M-H] ⁻	-	-	-	-	477,10410 (100) 331,04556 (29)	-
48	83	Mearnsitrina Mearnsitrina-3- <i>O</i> -β-ramnosídeo (Miricetina 4'- <i>O</i> -metil éter 3- <i>O</i> -β-ramnosídeo)	479,11724 [M+H] ⁺ 477,10400 [M-H] ⁻	478,11113	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂ C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	-3,571 1,465	11,5 12,5	333,05966 (100) 318,03611 (18) 331,04587 (55) 316,02237 (100)	MS-DIAL
49	83	Quercetina-7- <i>O</i> -ramnosídeo e/ou Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	449,10876 [M+H] ⁺ 447,09384 [M-H] ⁻	448,100555	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	0,832 2,469	11,5 12,5	303,04932 (100) 71,04966 (30) 301,03519 (39) 300,02740 (43)	MS-DIAL

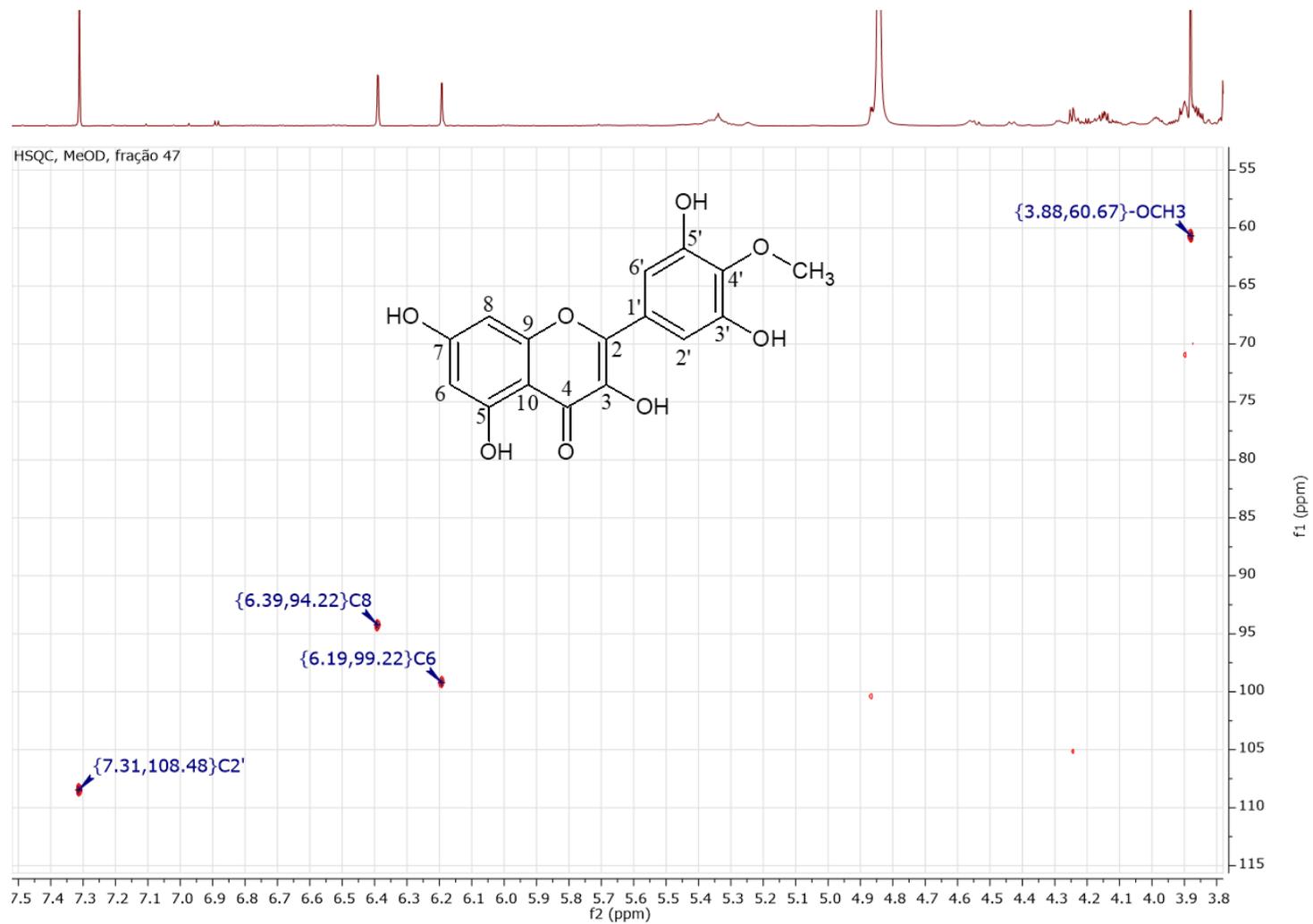
50	85	Derivado de mearnsetina II	465,1025 [M+H] ⁺	-	-	-	-	333,05988 (100) 318,03656 (18)	-
51	85	Delphinidin	303,04935 [M] ⁺	303,049927	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	-2,208	10,5	178,99742 (15) 151,00237 (18)	MS-DIAL
52	89	Ácido galoilelágico	469,00473 [M-H] ⁻	470,012146	C ₂₁ H ₉ O ₁₃	2,054	17,5	425,01514 (100) 299,99103 (98)	NARDUZZI, 2014
53	89	Ácido fertárico (ácido feruloil-tartárico)	325,05652 [M-H] ⁻	326,063782	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	3,420	8,5	193,04982 (19) 129,01816 (3)	MAIER et al., 2006
55	89	Ácido gálico	169,01329 [M-H] ⁻	170,021530	C ₇ H ₅ O ₅	0,830	5,5	125,2300 (100)	MS-DIAL
57	89	Tartarato de metila	163,02373 [M-H] ⁻	164,032089	C ₅ H ₇ O ₆	-2,532	2,5	103,00227 (63) 59,01251 (100)	RMN
58	89	Tartarato de dimetila	179,0549 [M+H] ⁺ 177,03958 [M-H] ⁻	178,047745	C ₆ H ₁₁ O ₆ C ₆ H ₉ O ₆	-0,360 -1,880	2,5 2,5	119,03383 (100) 73,02882 (31) 103,00236 (74) 59,01253 (100)	RMN
59	89	Ácido tartárico	149,00803 [M-H] ⁻	150,016434	C ₄ H ₅ O ₆	-0,231	2,5	87,00745 (97) 72,99183 (48)	MS-DIAL
60	91	Tartarato de dietila	205,07097 [M-H] ⁻	206,079041	C ₈ H ₁₃ O ₆	-1,185	2,5	103,00236 (100) 59,01250 (80)	HMDB
61	91	Ácido quínico	193,0705 [M+H] ⁺	192,063385	C ₇ H ₁₃ O ₆	-0,852	1,5	-	MZmine
62	91	Ácido succínico	117,01800 [M-H] ⁻	118,026611	C ₄ H ₅ O ₄	-2,010	2,5	-	MZmine
63	89	Ácido coutárico (Ácido <i>p</i> -cumaroil-tartárico)	295,04572 [M-H] ⁻	296,053223	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	2,970	8,5	163,03914 (100) 149,00819 (43)	MAIER et al., 2006

64	91	Ácido chiquímico	173,04518 [M-H] ⁻	174,052826	C ₇ H ₉ O ₅	4,219	3,5	154,99753 (5) 111,00747 (100)	HMDB
65	91	Ácido maleico	115,00224 [M-H] ⁻	116,010956	C ₄ H ₄ O ₄	-3,001	3,5	88,98571 (2) 71,01250 (100)	MS-DIAL
66	91	Ácido hidroxi-glutárico	147,02950 [M-H] ⁻	148,037170	C ₅ H ₇ O ₅	4,762	2,5	129,01820 (100) 71,0124 (54)	MS-DIAL
67	91	Ácido málico	133,01305 [M-H] ⁻	134,021530	C ₄ H ₅ O ₅	-4,873	2,5	115,00243 (100) 71,01252 (44)	MS-DIAL
68	93	Miricetina	319,04401 [M+H] ⁺	318,037567	C ₁₅ H ₁₁ O ₈	-4,332	10,5	273,03876 (4) 153,01791 (5)	MS-DIAL
69	93	Miricitrina (Miricetina-3- <i>O</i> -β-ramnosídeo)	465.1026 [M+H] ⁺	464,095490	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-0,199	11,5	319,04410 (100) 85,02872 (26)	MS-DIAL
			463,08859 [M-H] ⁻		C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	2,028	12,5	316,02231 (76) 178,9969 (2)	
70	93	Ácido mesacônico	129,01811 [M-H] ⁻	130,026611	C ₅ H ₅ O ₄	-0,970	3,5	85,02792 (12) 71,01249 (100)	MS-DIAL
71	95	Blumenol C-hexosídeo	373,2218 [M+H] ⁺	372,214803	C ₁₉ H ₃₃ O ₇	-0,750	3,5	211,16884 (100) 135,11664 (70)	HMDB
72	95	Ácido aconítico	173,00813 [M-H] ⁻	174,016434	C ₆ H ₅ O ₆	0,379	4,5	154,99753 (5) 111,00747 (100)	MS-DIAL
73/ 74	95	Ácido isocítrico e/ou ácido cítrico	191,01897 [M-H] ⁻	192,027008	C ₆ H ₇ O ₇	-1,086	3,5	111,00746 (100) 87,00736 (25)	MS-DIAL
75	95	Europetin-3- <i>O</i> -galactoside	495,1131 [M+H] ⁺	494,106049	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₃	-1,546	11,5	333,05975 (100) 318,033641 (22)	MS-DIAL
76	97	Colina	104,10732 [M] ⁺	104,107539	C ₅ H ₁₄ ON	0	-0,5	87,04440 (36) 60,08135 (18)	MS-DIAL

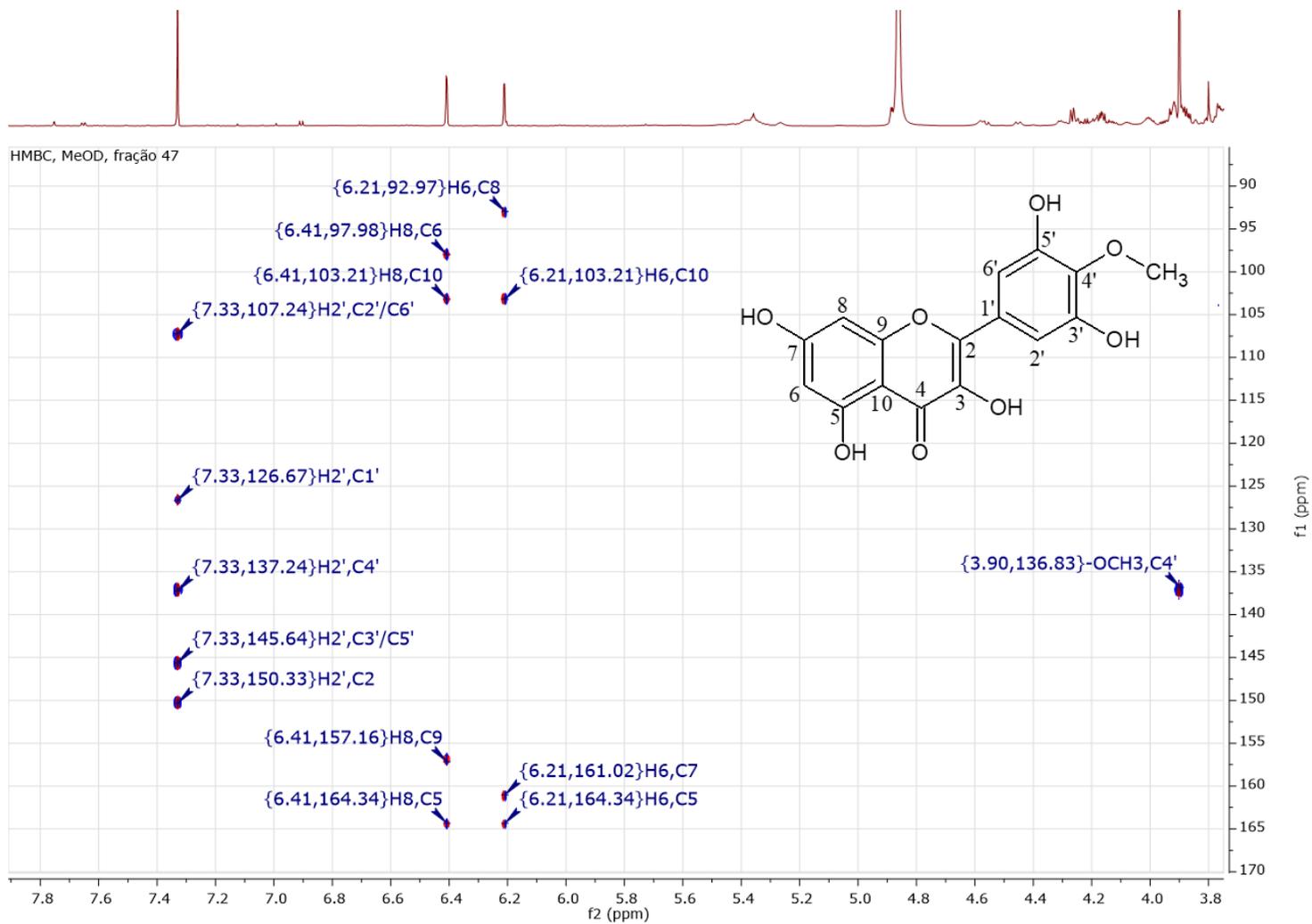
77	97	Ácido malônico	103,00236 [M-H] ⁻	104,010956	C ₃ H ₃ O ₄	-2,185	2,5	-	HMDB
78	99	Ácido 3-metil-but-2-enoico (ácido seneciico)	101,05988 [M+H] ⁺	100,052429	C ₅ H ₉ O ₂	1,721	1,5	59,04975 (100)	MS-DIAL
79	101	Ácido cafeico	179,03418 [M-H] ⁻	180,042252	C ₉ H ₇ O ₄	-1,417	6,5	134,98677 (2) 71,01251 (100)	TSUKUI et al., 2019
80	103	Glicerilfosforilcolina	258,10950 [M] ⁺	257,102814	C ₈ H ₂₁ O ₆ NP	-2,668	-0,5	104,10709 (100) 124,99969 (11)	MS-DIAL
81	105	Malonato de dietila	159,06578 [M-H] ⁻	160,073563	C ₇ H ₁₁ O ₄	0,291	2,5	130,98244 (100) 102,98741 (21)	HMDB

^aMassa monoisotópica (Da) adquirida pelo *sites* ChemSpider e PubChem.

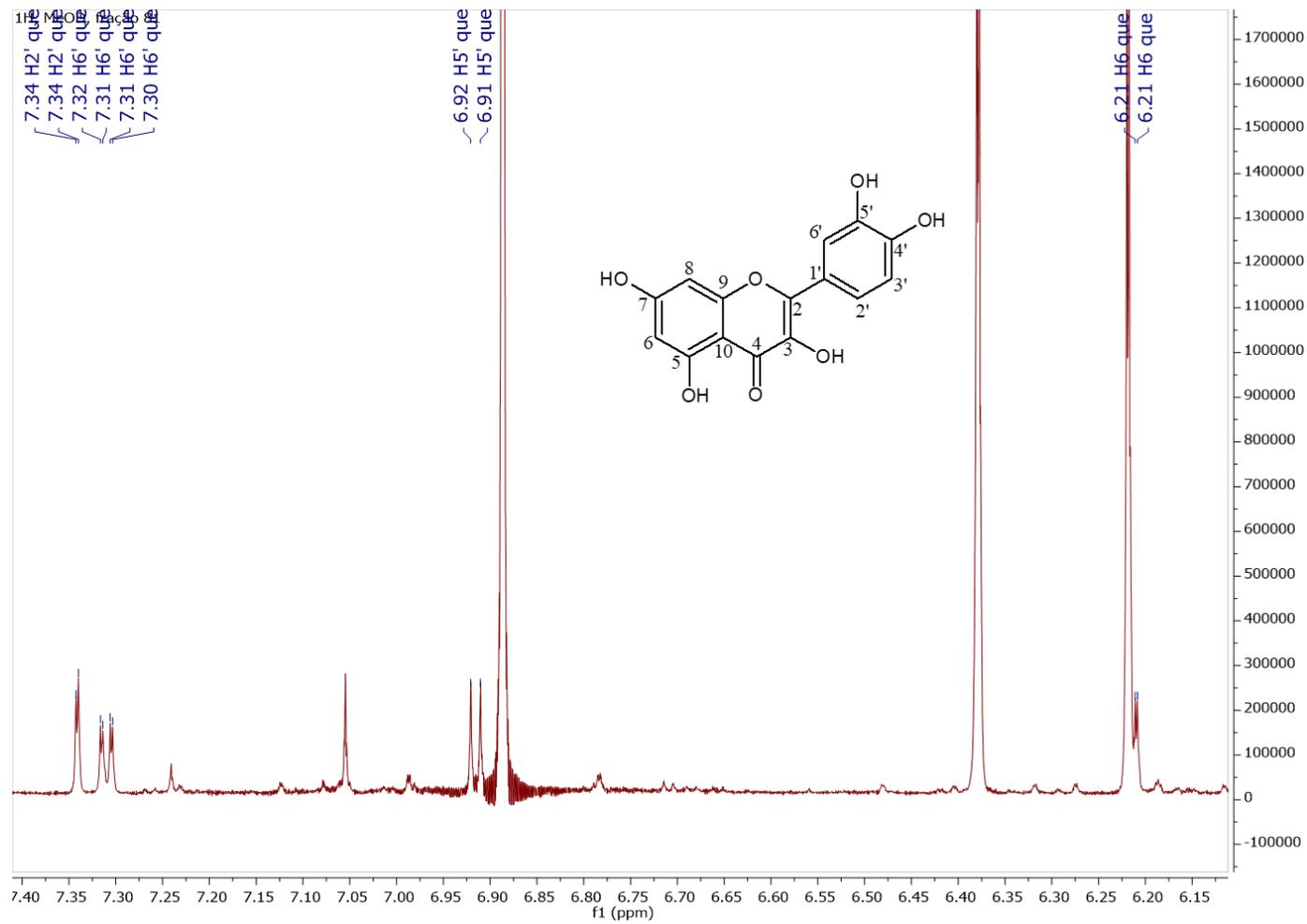
APÊNDICE C – Espectros de RMN ^1H , HSQC e HMBC referentes às substâncias identificadas.**Espectro 1** – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da mearnsetina (fração 47).



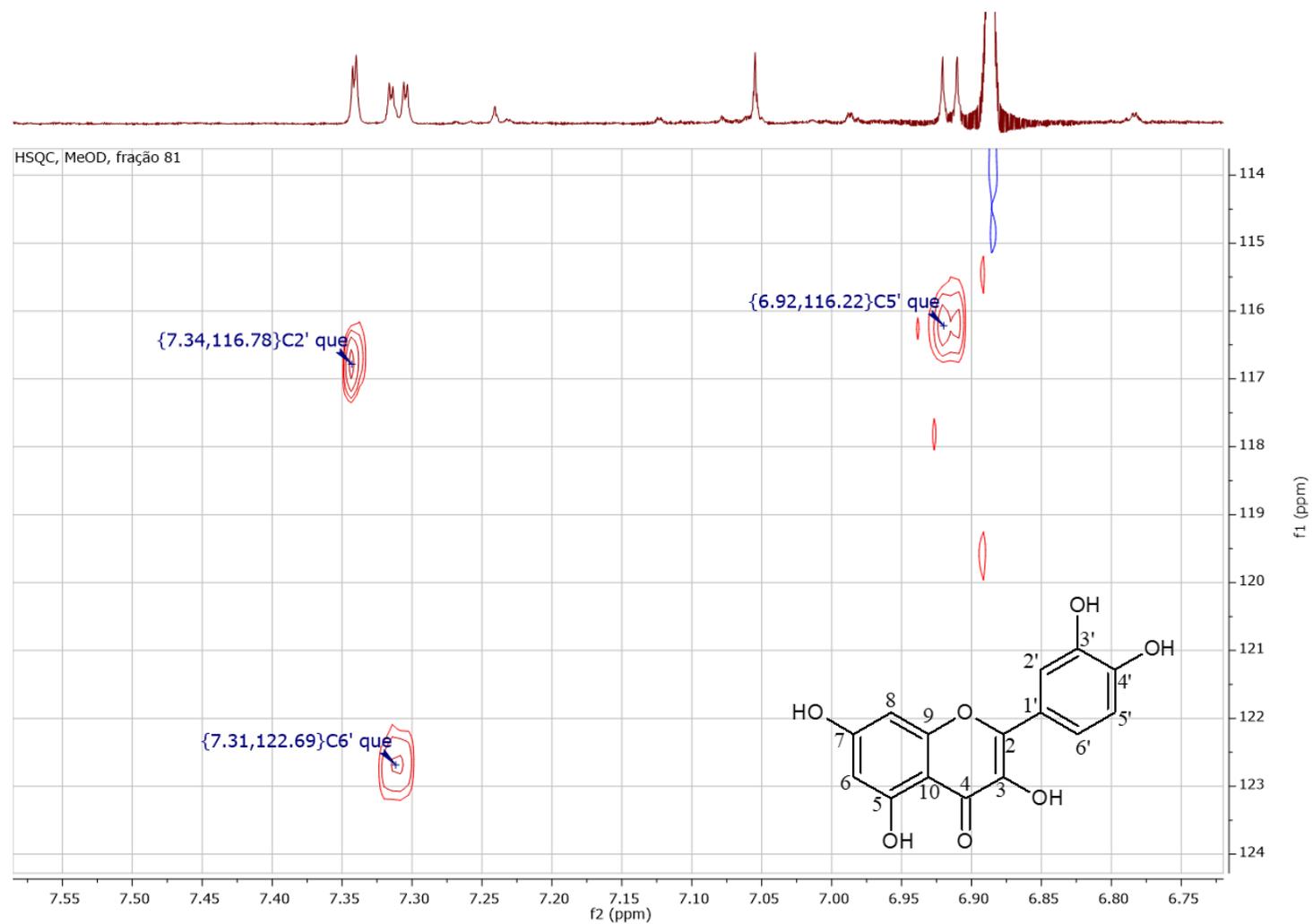
Espectro 2 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da mearnssetina (fração 47).



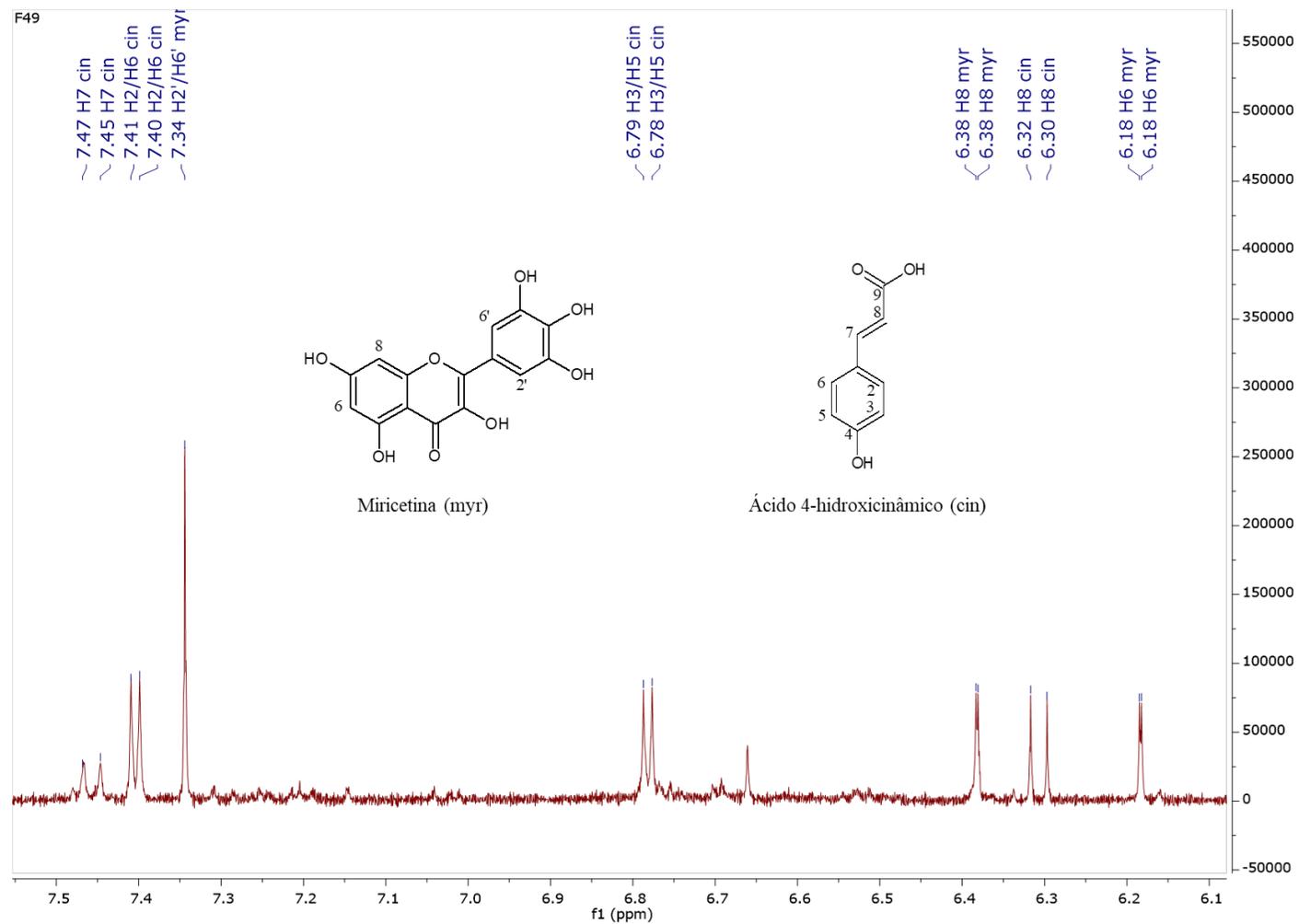
Espectro 3 – Espectro de RMN HMBC em CD₃OD (800MHz) da mearnsetina (fração 47).



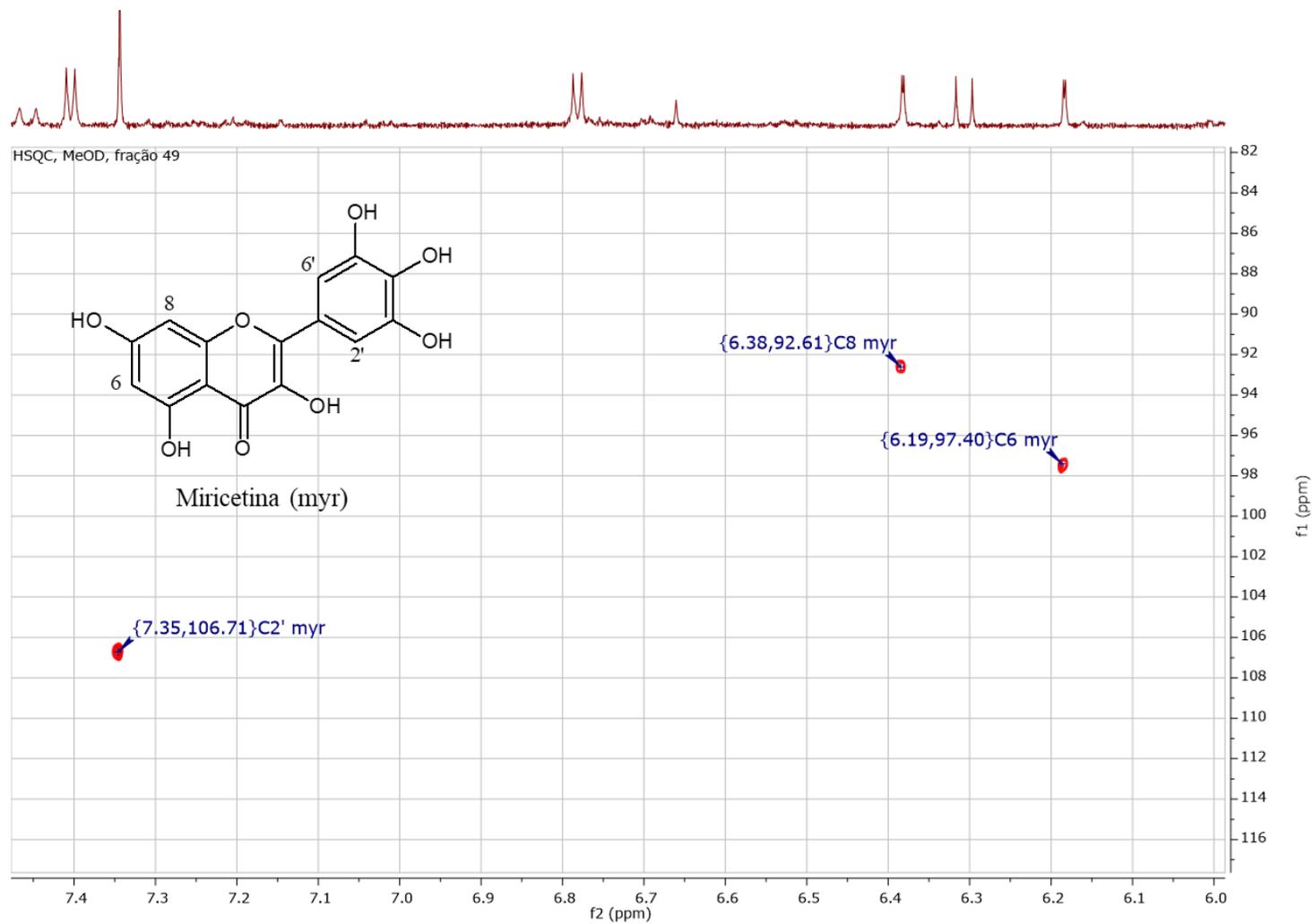
Espectro 4 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da fração 81 para visualização dos sinais referentes a quercetina.



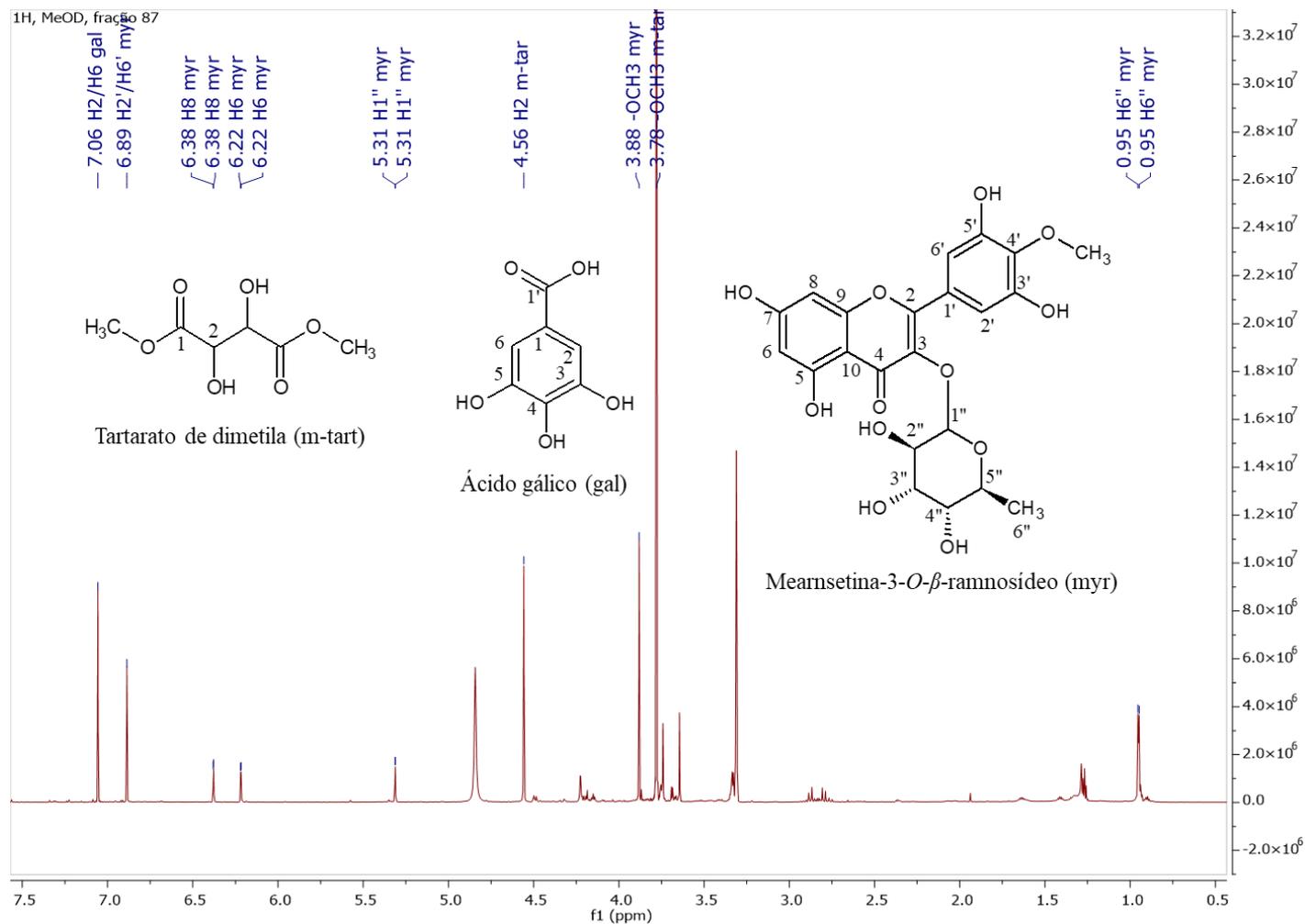
Espectro 5 – Espectro de RMN HSQC em CD₃OD (800MHz) da quercetina (fração 81).



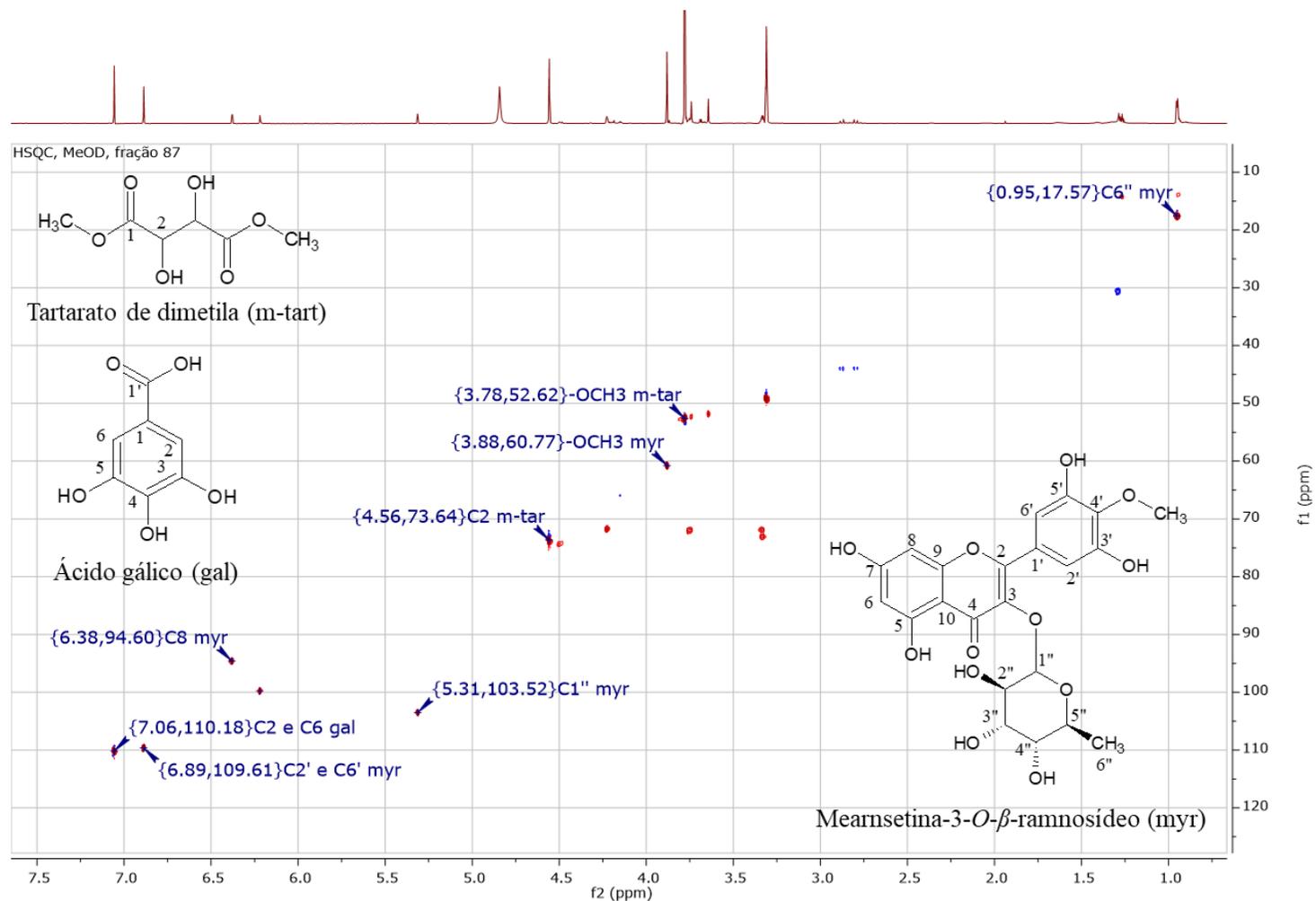
Espectro 6 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) de mistura de miricetina (representado por myr) e ácido 4-hidroxicinâmico (representado por cin) (fração 49).



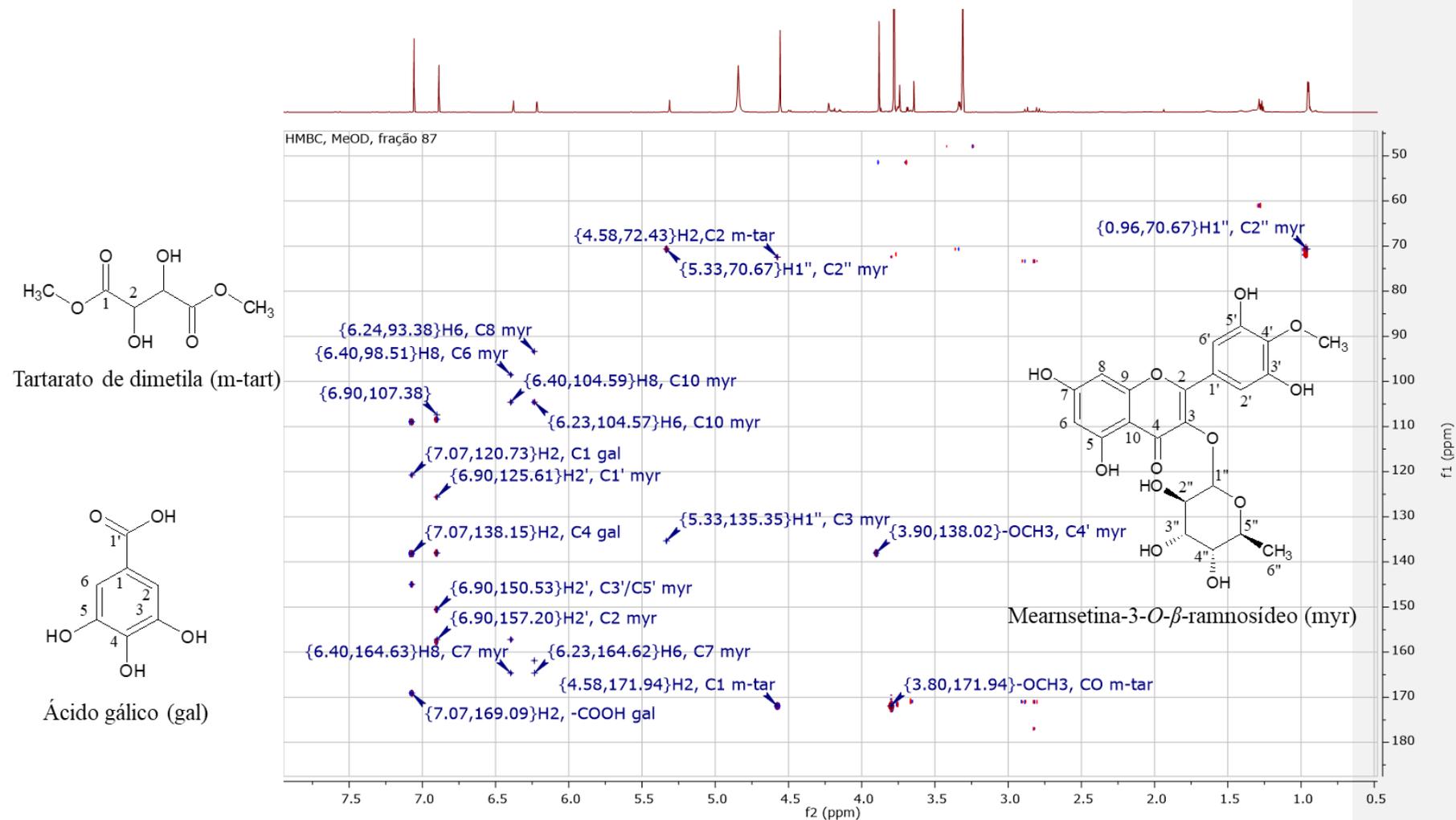
Espectro 7 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD₃OD (800MHz) da miricetina (fração 49).



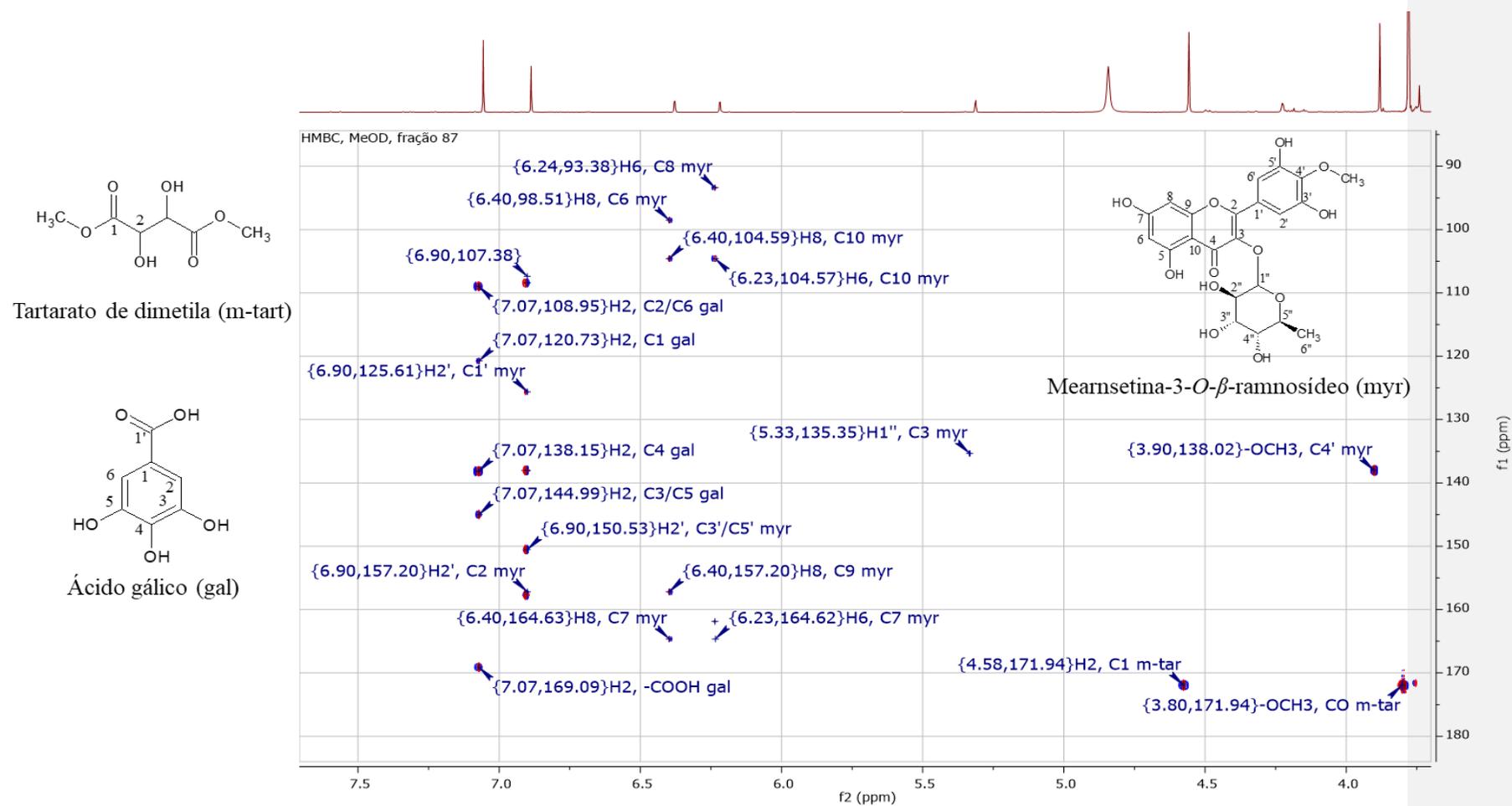
Espectro 8 – Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnssetina-3-O-β-ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).



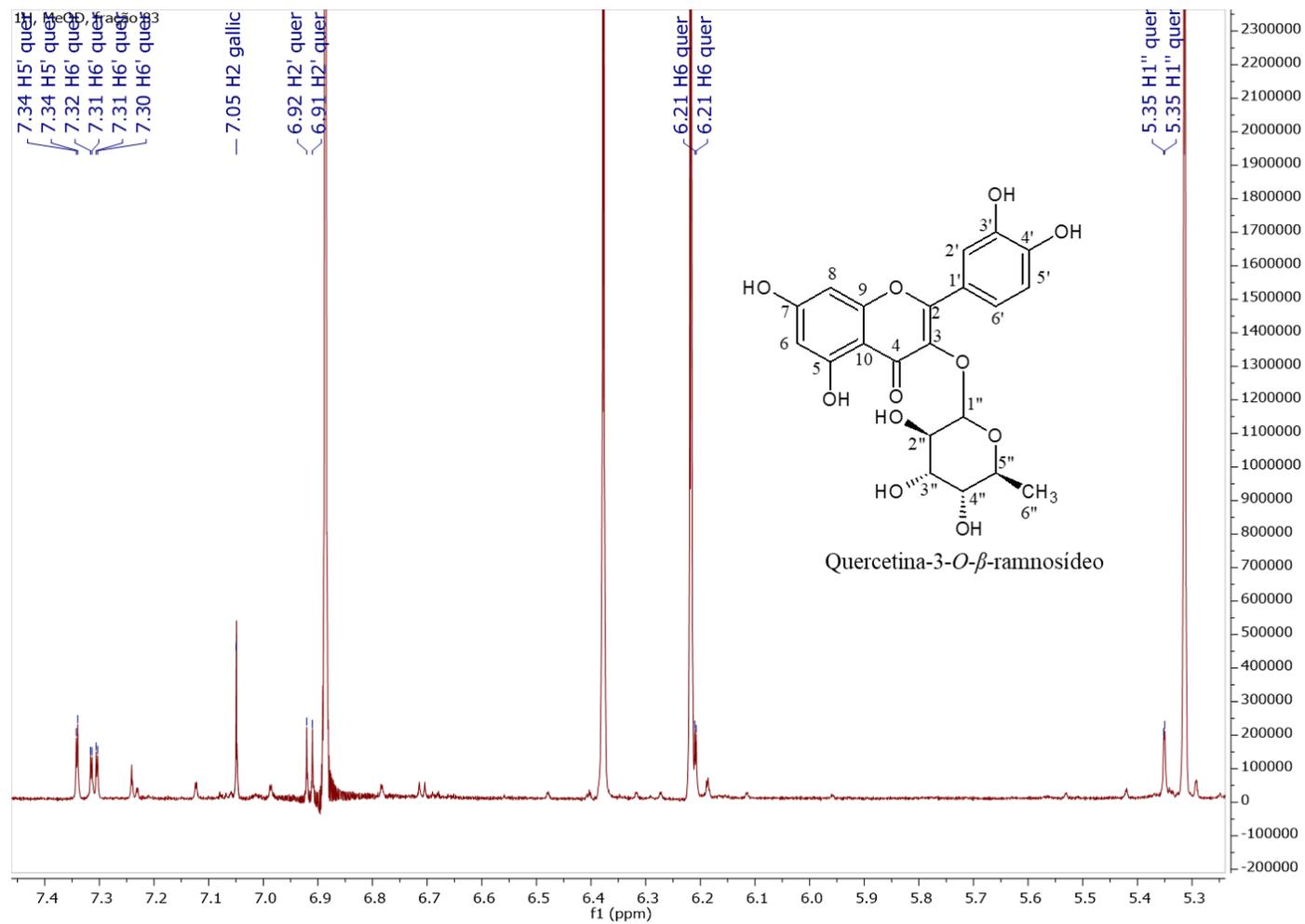
Espectro 9 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD₃OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnssetina-3-*O*- β -ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).



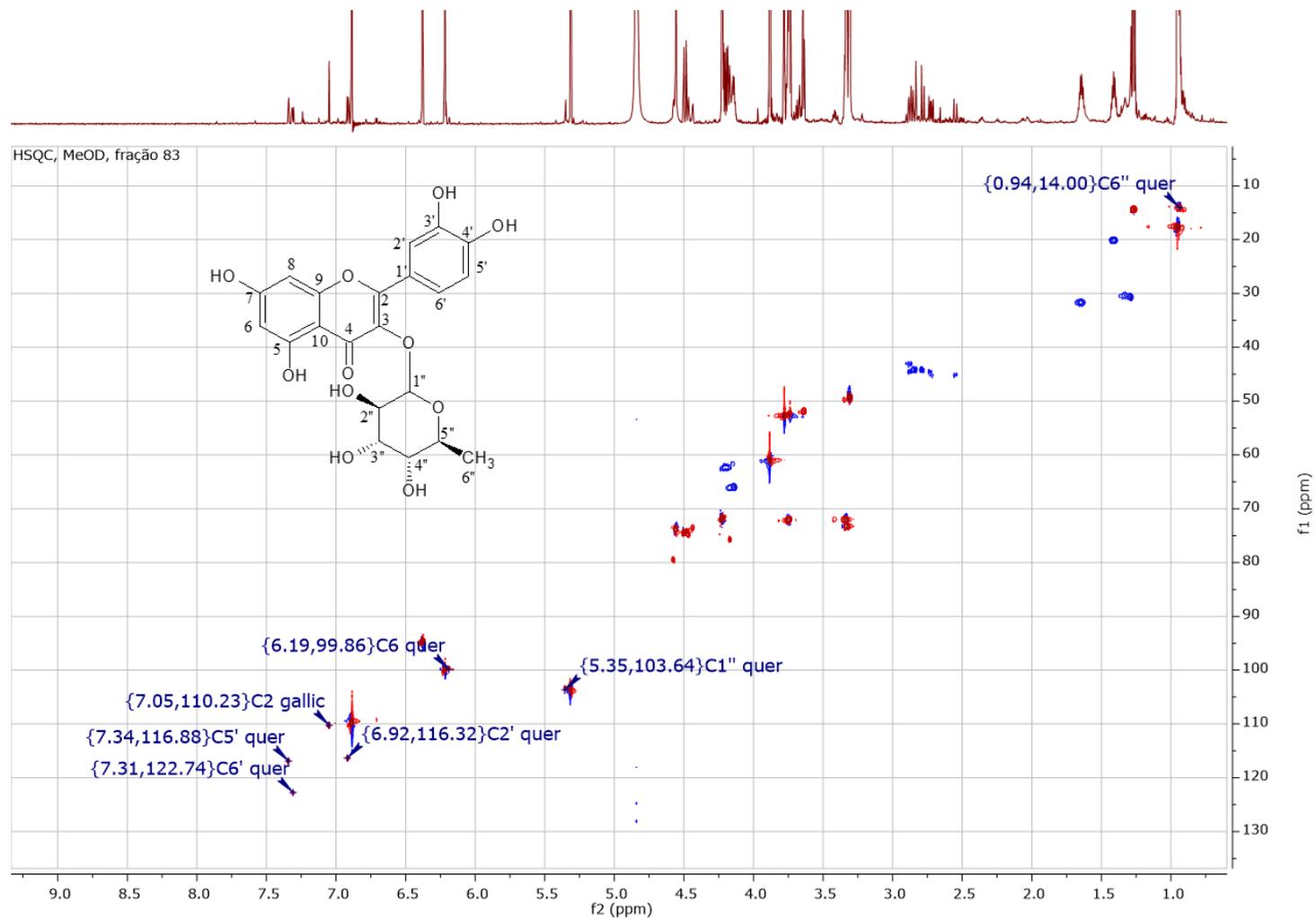
Espectro 10 – Espectro de RMN HMBC em CD_3OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnssetina-3-*O*-β-ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).



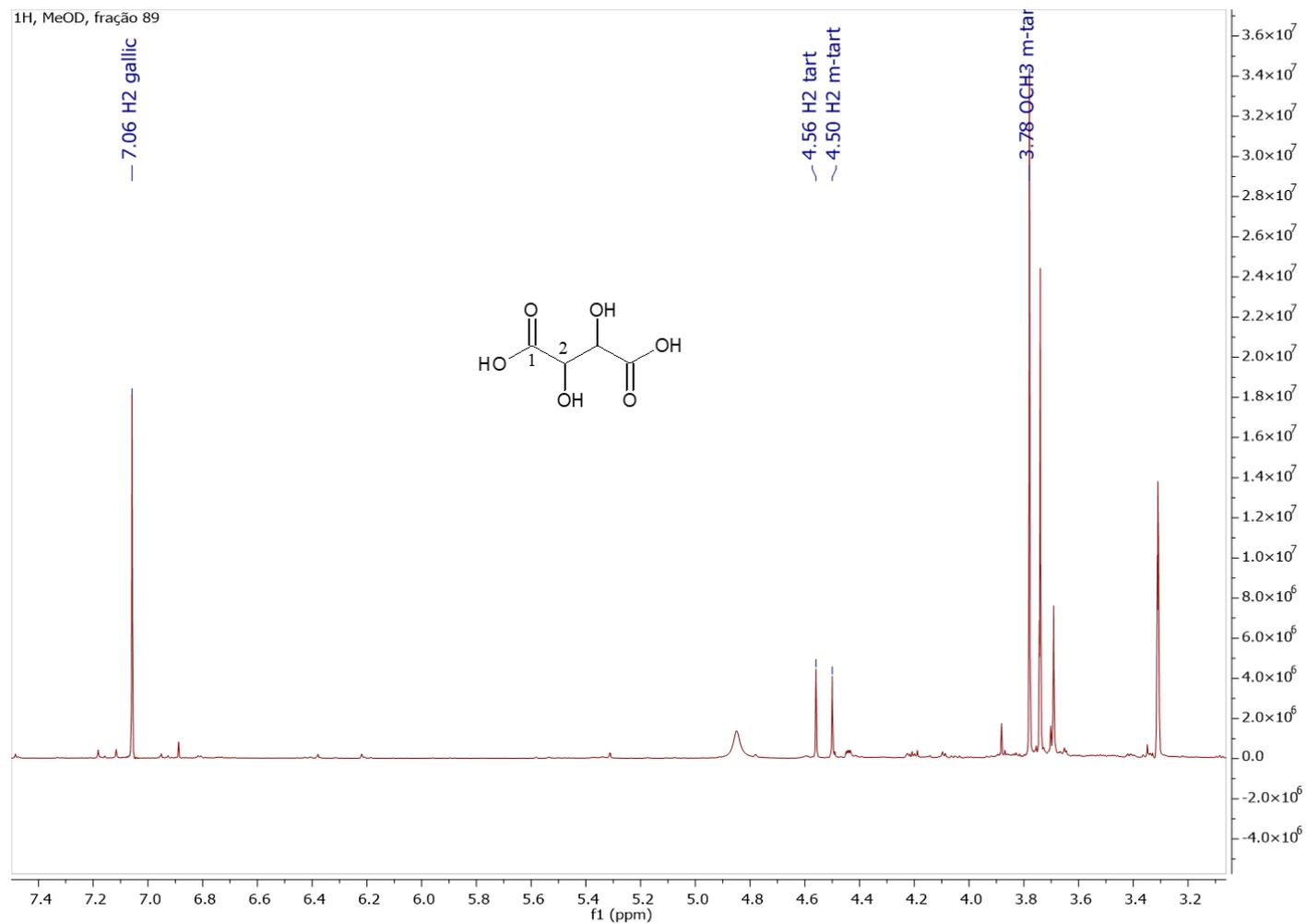
Espectro 11 – Expansão de espectro de RMN HMBC em CD₃OD (800MHz) da fração 87 para mistura de mearnssetina-3-O-β-ramnosídeo (representada por myr), ácido gálico (representado por gal) e tartarato de dimetila (representado por m-tart).



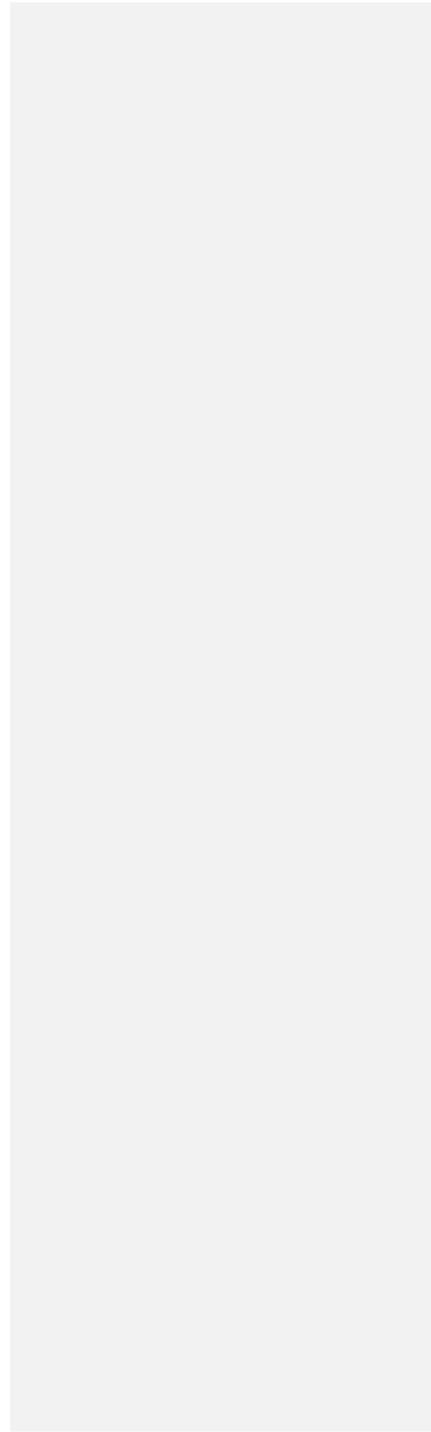
Espectro 12 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da fração 83 para visualização dos sinais referentes a quercetina-3-*O*- β -ramnosídeo (representada por “quer”) em mistura.

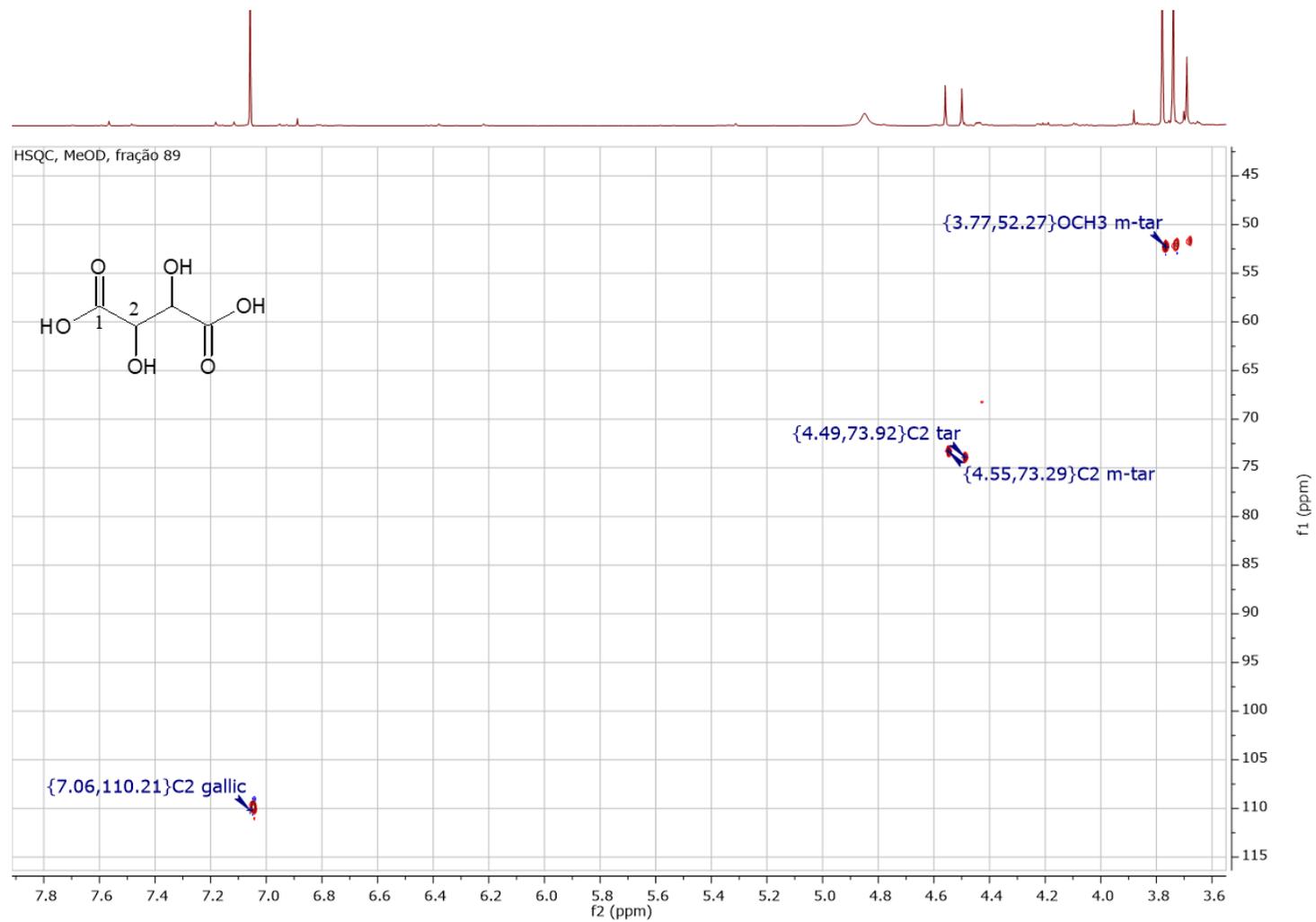


Espectro 13 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da fração 83 para visualização dos sinais referentes a quercetina-3- O - β -ramnosídeo (representada por quer) em mistura.

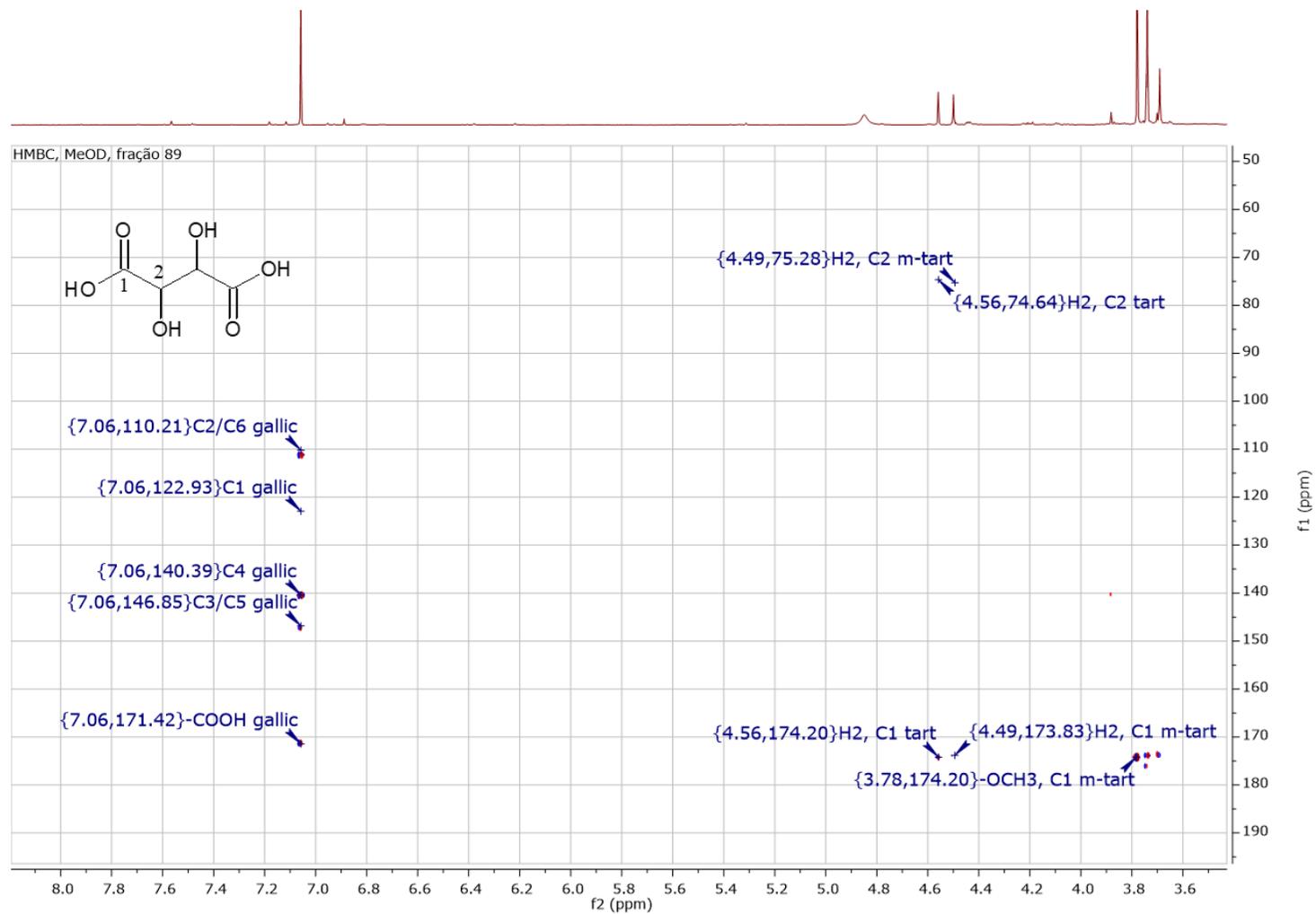


Espectro 14 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) da fração 89 para visualização dos sinais referentes ao ácido tartárico (representada por tart) em mistura.

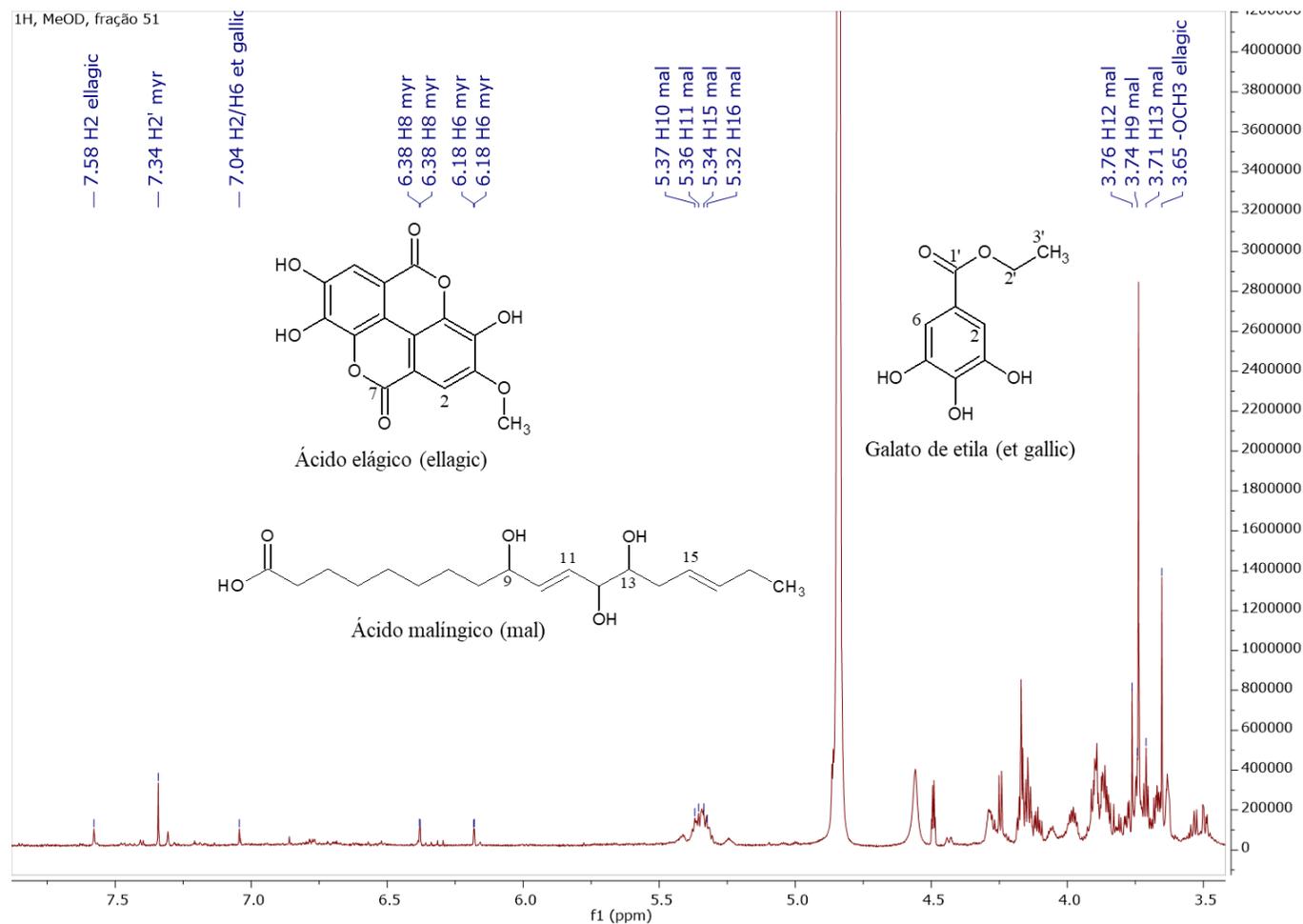




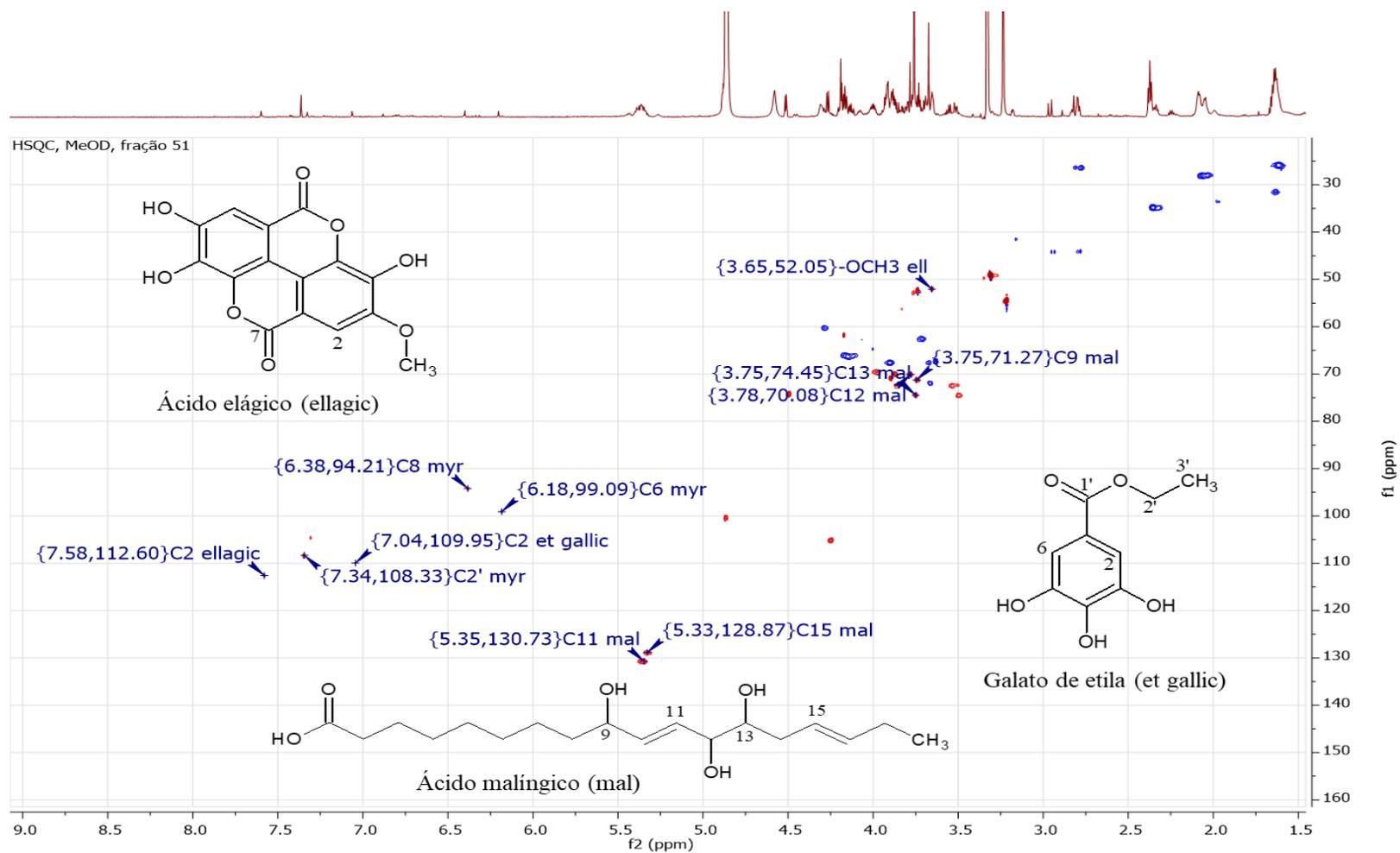
Espectro 15 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) da fração 89 para visualização dos sinais referentes ao ácido tartárico (representada por “tart”) em mistura.



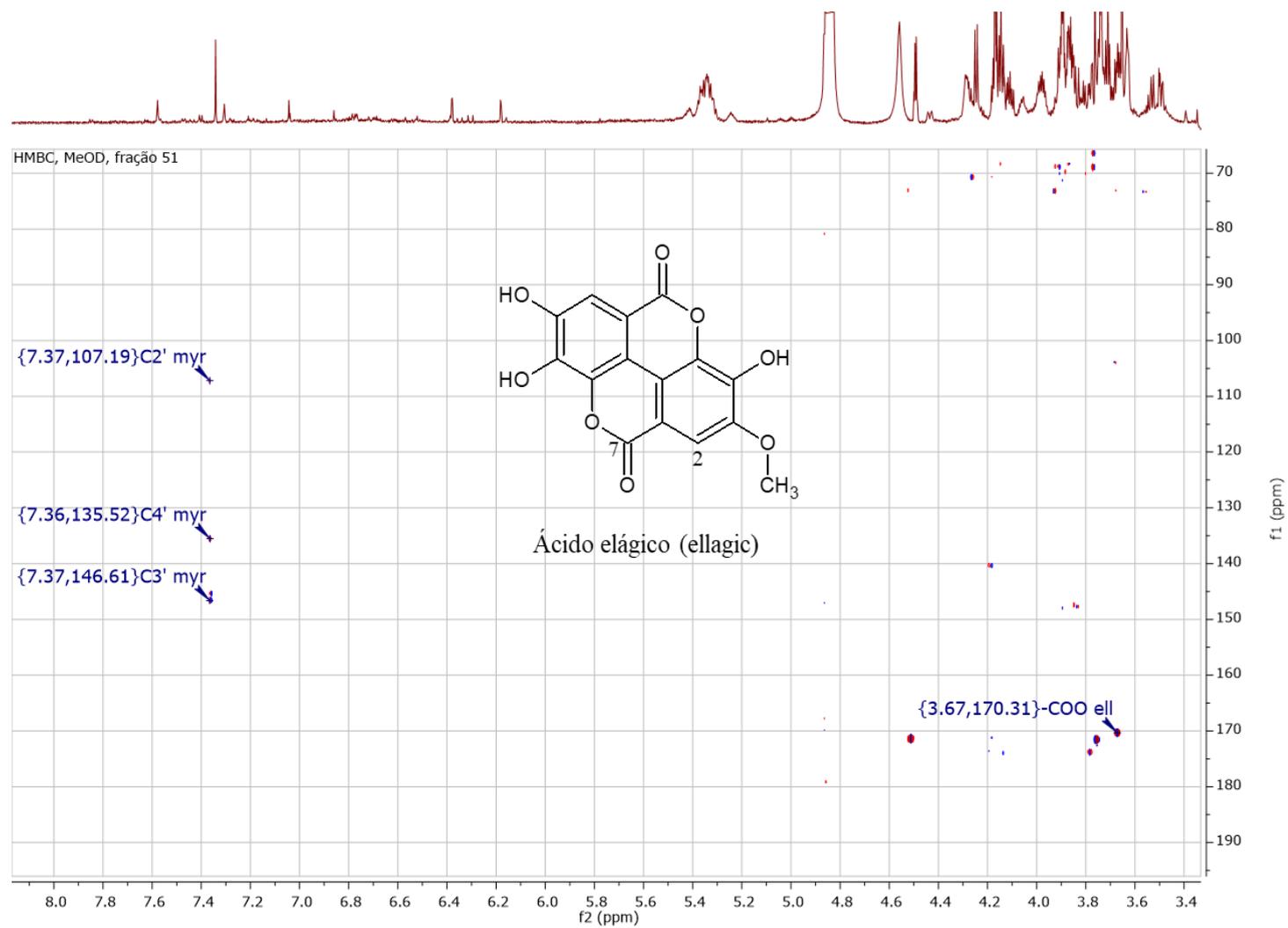
Espectro 16 – Expansão de espectro de RMN HMBC em CD_3OD (800MHz) da fração 89 para visualização dos sinais referentes ao ácido tartárico (representada por tart) em mistura.



Espectro 17 – Expansão de espectro de RMN de ^1H em CD_3OD (800MHz) de mistura de galato de etila (representado por et gallic), ácido málico (representado por mal) e ácido elágico (representado por ellagic) (fração 51).



Espectro 18 – Expansão de espectro de RMN HSQC em CD_3OD (800MHz) de mistura de galato de etila (representado por et gallic), ácido málico (representado por mal) e ácido elágico (representado por ellagic) (fração 51).



Espectro 19 – Expansão de espectro de RMN HMBC em CD₃OD (800MHz) do ácido elágico (representado por ell) em mistura (fração 51).