



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

SAMUEL PEDRO DANTAS MARQUES

**Nova proposta para rápida formação/combate dos Produtos de Glicação
Avançada (AGEs) e propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa*
Gomes**

**Fortaleza
2017**

SAMUEL PEDRO DANTAS MARQUES

NOVA PROPOSTA PARA RÁPIDA FORMAÇÃO/COMBATE DOS PRODUTOS DE
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE
HANCORNIA SPECIOSA GOMES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Maria Teresa Salles Trevisan.

Co-orientador: Robert Wyn Owen

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M321n Marques, Samuel Pedro Dantas.

Nova proposta para rápida formação/combate dos Produtos de Glicação Avançada (AGEs) e propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes / Samuel Pedro Dantas Marques. – 2017.

191 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

Coorientação: Prof. Dr. Robert Wyn Owen.

1. Produtos de glicação avançada. 2. Captura de compostos dicarbonílicos. 3. *Hancornia speciosa* Gomes. 4. Potencial antioxidante/anti-hipertensivo. 5. Acetilcolinesterase. I. Título.

SAMUEL PEDRO DANTAS MARQUES

NOVA PROPOSTA PARA RÁPIDA FORMAÇÃO/COMBATE DOS PRODUTOS DE
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE
HANCORNIA SPECIOSA GOMES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Maria Teresa Salles Trevisan.

Aprovada em: 05/05/ 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rose Maria Carlos
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

- A força positiva superior que nos rege, chamada de Deus, Allah, Buda, Jah, Oxalá, Jeová, Brâman, Olorun e tantas outras denominações.
- A todos os integrantes (funcionários e professores) da Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará.
- A Funcap e CNPQ (programa ciência sem fronteiras) por todo apoio e fomento.
- A minha mãe (Vera Dantas) e minha avó (Dona Maria Luíza – “Marina”), fontes de inspiração, motivação, persistência, resistência, amor e exemplo.
- A minha orientadora Maria Teresa, por toda confiança, apoio, parceria, ensinamentos, cordialidade e disponibilidade prestada.
- Aos professores Edy Brito, Marcos Carlos, Renato Azevedo, Rose Maria e Nágila Maria pela colaboração e contribuições.
- Aos meus filhos (Isaac Marques e João Pedro) que catalisam diariamente a minha energia, motivando-me a seguir sempre em frente, buscando construir um futuro melhor.
- Ao meu pai Armando Júnior, colaborador direto nesta pesquisa e que me mostrou a real expressão da “certeza do inacabamento”.
- A minha companheira e pré-noiva, Nayara Lima, parceira em todos os momentos, bons e difíceis, mas sempre me mostrando a luz ao final do túnel.
- Aos companheiros e colaboradores de laboratório, Irvila Ricarte, Carlos Eduardo (lorão), Ricardo Farias, Mairtom e Rose.
- Ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte e do Ceará (IFRN/IFCE), todos os professores do departamento de Química (campus Macau) e a turma TSP.
- A todos os amigos (personagens) moradores da eterna babilônia, Macau-RN, por todo o apoio, brincadeiras, parceria e amizade sincera. Em especial Jatífófu.

- Aos amigos Ueceanos, pedras fundamentais nesta caminhada desde 2003, quando tudo começou.
- Aos colegas e professores do Centro Alemão de Pesquisa do Câncer (DKFz), Robert Owen, Andrea Breuer, Haifa, Jolantha Beyerle, Shariq Ansari, RomaKurilov, por toda receptividade e ensinamentos.
- Aos colegas e amigos/irmãos que fiz na maravilhosa cidade de Heidelberg: Carol Hillebrand, Miguel, Rafael Huff, Daniel Putto, Victória Ponce, Jandyson Machado, Marcelle Passos, Marília, Modou, Gerd, Martina e seu pai. Em especial: Carlos Santos, Danilo Lustosa, Adriana Jou e Cristian Albornoz.
- Ao meu grande amigo e irmão Gilvanir Júnior que esta pesquisa me possibilitou reencontrar (Amsterdã) após tantos anos e Assis Rabino.
- A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

RESUMO

Este estudo relata o desenvolvimento de metodologias para formação e possibilidades de combate dos Produtos de Glicação Avançada (AGEs), assim como a avaliação da constituição química e propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG). No que se refere a obtenção dos AGEs, considerando procedimentos *in vitro*, as metodologias atuais necessitam de um período de incubação de até 4 semanas. Os métodos desenvolvidos neste trabalho, possibilitaram a redução significativa do tempo de reação (48 horas-ensaios com glicose e frutose) (3 horas-ensaios com glioxal e metilglioxal), em virtude do acoplamento ao sistema de geração de radicais livres denominado hipoxantina/xantinaoxidase. Assim, as metodologias apresentadas neste trabalho, consistiram em promover a reação entre soluções de açúcares (glicose, frutose), ou compostos dicarbonílicos (metilglioxal, glioxal), com solução proteica de albumina de soro bovino (BSA), utilizando diferentes meios reacionais. A enzima xantinaoxidase (XO), foi adicionada ao sistema com o intuito de promover a formação dos AGEs em ambiente reacional com excesso de radicais livres hidroxila ($\cdot\text{OH}$). A presença em excesso destes radicais durante a glicação e glicooxidação da proteína, parecem ter promovido a oxidação da cadeia de resíduos de aminoácidos da mesma, bem como dos açúcares, originando assim derivados α -dicarbonílicos (glioxal e metilglioxal) de forma mais rápida, o que possibilitou a redução tão significativa do tempo de formação dos AGEs. A maior reatividade da frutose frente a glicose, para originar os AGEs, se apresentou em todas as condições avaliadas. A capacidade de diferentes espécies químicas em combater o processo de glicação, atuando como agentes capturadores de espécies α -dicarbonílicas, se mostrou efetivo para aminoguanidina (padrão indicado pela literatura), extratos metanólicos das folhas de HSG e o flavonóide rutina. A rutina, apresentou-se mais ativa para captura de espécies dicarbonílicas que o próprio padrão indicado pela literatura, em virtude da formação de adutos mono e/ou dissubstituídos mais estáveis. A mensuração da formação/combate dos AGEs, foi determinada através de espectrofluorimetria. A análise qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (HPLC-DAD-ESI-MS) dos extratos metanólicos de HSG, exibiram grande variedade de compostos polifenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), confirmando o potencial como fonte de compostos bioativos. Nas folhas e caule, observou-se maior número de compostos polifenólicos quando comparados

aos frutos. Foram identificadas pela primeira vez em HSG as seguintes espécies: ácido vanílico glicosídeo, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácido para-hidroxibenzóico, vanilina, ácido *trans-para*-cumárico, ácido *cis-para*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico quinato, ácido *trans*-ferúlico, ácido *cis*-ferúlico, ácido *cis*-etil-clorogênico, ácido *trans*-etil-clorogênico, quercetina, quercetina pentosídeo, quercetina glicosídeo, quercetina ramnosídeo, quercetina galactosídeo, quercetina ramnogalactosídeo, quercetina ramnoglicocumarato, quercetina ramnogalactocumarato, canferol ramnoglicosídeo, canferol ramnogalactosídeo, canferol ramnoglicocumarato, canferol ramnogalactocumarato, isoramnetina ramnoglicosídeo e afzelequina-C-glicosídeo. No que se refere aos valores do potencial antioxidante e inibição da angiotensina I (efeito anti-hipertensivo), os extratos das folhas e caule se mostraram mais ativos, apresentando valores de IC₅₀ promissores, quando comparado a forma sintética da vitamina E (Trolox). A capacidade dos extratos de HSG em inibir a ação da enzima acetilcolinesterase, que está relacionada ao tratamento do Alzheimer se mostrou bastante significativa para o extrato hexânico do caule (EHC). O fracionamento do mesmo, levou a obtenção de uma mistura como fração mais ativa. Através da utilização de ressonância magnética e dados da literatura, foi identificada a presença de lupeol nesta fração.

Palavras-chave: Produtos de glicação avançada. Captura de compostos dicarbonílicos. *Hancorniaspeciosa* Gomes. Potencial antioxidante/anti-hipertensivo. Aceticolinesterase.

ABSTRACT

This study reports the development of methodologies for formation and combat possibilities to Advanced Glycation Products (AGEs), and evaluate the chemical constitution and pharmacological properties of *Hancornia speciosa* Gomes (HSG). Regarding the obtaining of the AGEs, considering in vitro procedures, the current methodologies need an incubation period of up to 4 weeks. The methods developed in this work allowed a significant reduction of the reaction time (48 hours-glucose and fructose tests) (3 hours-tests with glyoxal and methylglyoxal), due to the coupling to the free radical generation system called hypoxanthine/xanthine oxidase. Thus, the methodologies presented in this work consisted in promoting the reaction between sugar solutions (glucose, fructose), or dicarbonyl compounds (methylglyoxal, glyoxal), with bovine serum albumin (BSA) protein solution, using different reaction media. The enzyme xanthine oxidase (XO) was added to the system in order to promote the formation of AGEs in a reaction environment with excess hydroxyl free radicals ($\cdot\text{OH}$). The presence of these radicals in excess during the glycation and glycooxidation of the protein indicate to have promoted the oxidation of the chain of amino acid residues thereof, as well as sugars, thus giving α -dicarbonyl derivatives (glyoxal and methylglyoxal) more rapidly, the which made possible the significant reduction of the time of formation of the AGEs. The higher reactivity of fructose to glucose, to producer AGEs, was present in all conditions evaluated. The ability of different chemical species to combat the glycation process, acting as capture agents of α -dicarbonyl species, was shown to be effective for aminoguanidine (standard indicated in the literature), methanolic extracts of HSG leaves and rutin. The rutin was more active for the capture of dicarbonyl species than the standard indicated by the literature, due to the formation of more stable mono and/or disubstituted adducts. The measurement of the formation/combat of AGEs was determined by spectrofluorimetry. The qualitative analysis by high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC-DAD-ESI-MS) of HSG methanolic extracts showed a great variety of polyphenolic compounds (phenolic acids and flavonoids), confirming the potential as a source of bioactive compounds. In the leaves and bark, the greatest number of polyphenolic compounds were verified when compared to the fruits. The following species were identified for the first time in HSG: vanillic acid glucoside, 3,4-dihydroxybenzoic acid, para-hydroxybenzoic acid, vanillin, *trans-para*-coumaric acid;

cis-para-coumaric acid, *trans*-ferulic acid quinate, *trans*-ferulic acid, *cis*-ferulic acid, *cis*-ethyl chlorogenic acid, *trans*-ethyl chlorogenic acid, quercetin, quercetin pentoside, quercetin glucoside, quercetin rhamnoside, quercetin galactoside, quercetin rhamnogalactoside, quercetin rhamnoglucocoumarate, quercetin rhamnogalactocoumarate, kaempferol rhamnoglucoside, kaempferol rhamnogalactoside, kaempferol rhamnoglucocoumarate, kaempferol rhamnogalactocoumarate, isorhamnetin rhamnoglucoside, afzelechin-C-glucoside. For the values of the antioxidant potential and inhibition of angiotensin I (antihypertensive effect), leaves and bark extracts were more active, presenting promising IC₅₀ values when compared to the synthetic form of vitamin E (Trolox). The capacity of HSG extracts to inhibit the action of the enzyme acetylcholinesterase, which is related to Alzheimer treatment, has been shown to be quite significant for the hexane bark extract (EHC). The fractionation of the same, led to obtaining a mixture as a more active fraction. Through the use of magnetic resonance and literature data, the presence of lupeol in this fraction was identified.

Keywords:Advanced Glycation Compounds. RCS trapping. *Hancorniaspeciosa* Gomes. Antioxidant/antihypertensive potential. Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática para geração de AGEs em meio reacional com excesso de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$).....	26
Figura 2 - Diferentes partes de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes (mangabeira).....	27
Figura 3 - Ilustração da formação de ligações cruzadas entre os AGEs e determinação de hemoglobina glicada (dosagem média de glicose sanguínea.....)	32
Figura 4 - Efeitos potenciais dos AGEs no desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas.....	33
Figura 5 - Estrutura química de alguns AGEs e espécies dicarbonílicas reativas (RCS), já conhecidos pela literatura atual.....	34
Figura 6 - Caminho catabólico para formação de MG <i>in vivo</i> a partir de açúcares, gorduras e proteínas.....	35
Figura 7 - Representação esquemática para a reação de Maillard.....	36
Figura 8 - Simplificação mecanística para a reação de <i>Maillard</i>	37
Figura 9 - Formação dos AGEs (<i>in vivo</i> e nos alimentos) e sua relação com o envelhecimento humano.....	38
Figura 10 - Captura de metilglioxal por resveratrol, originando adutos mono e dissubstituídos (capturadores de RCS).....	44
Figura 11 - Mapa ilustrativo da ocorrência e distribuição de HSG (mangabeira) no Brasil.....	45
Figura 12 - Aplicações terapêuticas referendadas para os frutos de HSG (mangaba) e principais compostos já identificados nos mesmos.....	46
Figura 13 - Aplicações terapêuticas referendadas para o látex de HSG.....	48
Figura 14 - Aplicações terapêuticas referendadas para as folhas de HSG e principais compostos já identificados nas mesmas.....	49

Figura 15 - Aplicações terapêuticas referendadas para os frutos de HSG (mangaba) e principais compostos já identificados nos mesmos.....	50
Figura 16 - Esquema representativo do ensaio antioxidante hipoxantina/xantina oxidase.....	64
Figura 17 -Fluxogramas representativos dos principais processos desenvolvidos para a formação dos AGEs: (17a) sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose (17b) sistema hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO.....	65
Figura 18 -Esquema reacional desenvolvido para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose, utilizando diferentes meios avaliados sem a presença da enzima xantina/oxidase (XO).....	66
Figura 19 -Esquema reacional desenvolvido para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose, utilizando a enzima XO em tampão fosfato adicionado de ácido salicílico (tampão A).....	67
Figura 20 -Fluxogramas representativos para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose: (20a) procedimento com tampão fosfato em diferentes composições (20b) procedimento com tampão fosfato puro (tampão C).....	68
Figura 21 -Fluxograma representativo para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose em diferentes temperaturas (37 e 90 °C) e períodos de incubação (48 horas e 7 dias), na presença e ausência da enzima XO.....	70
Figura 22 -Fluxograma representativo para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO utilizando 3 horas de incubação na presença da enzima XO.....	71
Figura 23 -Fluxograma representativo do processo desenvolvido para o combate a formação dos AGEs, utilizando aminoguanidina via sistemas hipoxantina/xantina-BSA-glicose e MG/GO.....	72
Figura 24 - Mapa indicativo da localização do ponto de coleta de HSG, no município de São José de Mipibu, Rio Grande do Norte.....	74

Figura 25 - Fluxogramas para os processos de obtenção dos extratos (25a) soxhlet (25b) extração a frio.....	77
Figura 26 - Fluxograma ilustrativo para o fracionamento dos extratos de HSG (folhas, caule e frutos) via coluna SPE (C ₁₈).....	78
Figura 27 - Cromatógrafo semi-preparativo acoplado a injetor/coletor automático de amostras, utilizado para o fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas, caule e frutos de HSG.....	80
Figura 28 - Estrutura química do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico), forma solúvel e sintética da vitamina E.....	81
Figura 29 - Representação esquemática para captura (redução) do radical livre DPPH que promove a descoloração da solução e diminuição da absorbância.....	81
Figura 30 - Representação para reação de redução do complexo de Fe ³⁺ /TPTZ via ensaio FRAP.....	82
Figura 31 - Reação de formação dos radicais AAPH, a partir de uma fonte geradora sintética.....	83
Figura 32 - Fluxograma esquemático para o ensaio antioxidante hipoxantina/xantinaoxidase.....	86
Figura 33 - Representação esquemática para o sistema regulador da pressão normal (arterial) e capacidade anti-hipertensiva de fármacos inibidores de ECA (IECAS).....	87
Figura 34 - Reação de formação do ácido hipúrico a partir de hipuril-histidil-leucina, catalisada pela enzima conversora da angiotensina I (ECA).....	88
Figura 35 - Fluxograma para o ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (capacidade anti hipertensiva).....	89
Figura 36 - Fluxograma representativo do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase (tratamento <i>alzheimer</i>).....	91

Figura 37 -Formação dos AGEs utilizando glicose a 37 °C sem adição da enzima XO - método clássico . (37a) em diferentes meios avaliados utilizando uma semana de incubação (37b) em tampão fosfato (pH= 6,6-Tampão A) adicionado de ácido salicílico em diferentes períodos de incubação.....	93
Figura 38 -Formação dos AGEs utilizando glicose (37 °C) em diferentes composições do tampão fosfato (pH= 6,6) com adição da enzima XO, em 24 e 48 horas de incubação.....	95
Figura 39 - Fluorescência intrínseca em diferentes concentrações de tampão fosfato puro (pH= 6,6): (39a) ácidos 2,3 e 2,5 dihidroxibenzoico (DHBA); (39b) isômeros constitucionais do ácido cumárico.....	95
Figura 40 -Formação dos AGEs utilizando glicose (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com diferentes períodos de incubação (24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas).....	96
Figura 41 - Formação dos AGEs utilizando glicose e frutose na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (41a) 48 horas de incubação a 37 °C (41b) 48 horas - 90°C, 1 semana – 37 ° sem XO.....	97
Figura 42 - Representação esquemática da taxa de conversão de glicose e frutose em suas formas mais abundantes fechadas, para a forma aberta quando em solução aquosa.....	98
Figura 43 - Formação dos AGEs utilizando diferentes açúcares (glicose, frutose, galactose) na presença e ausência da enzima XO, em tampão fosfato puro (pH= 6,6) com 24 horas de incubação a 37 °C.....	99
Figura 44 -Fluorescência intrínseca em diferentes concentrações de tampão fosfato puro (pH= 6,6) para metilglioxal (MG) e glioxal (GO).....	100
Figura 45 -Formação dos AGEs utilizando MG e GO (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6) utilizando 3 horas de incubação.....	101

Figura 46 -Formação dos AGEs utilizando MG (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com 1 horas de incubação e variando-se a concentração de BSA (0-4 mg/mL).....	102
Figura 47 - Representação esquemática para a estrutura proposta do aduto monosubstituído principal, formado pela reação entre aminoguanidina (capturadores de RCS) e compostos α -dicarbonílicos (MG e GO).....	103
Figura 48 - Primeira etapa da reação de formação do antisséptico Ambazone®:	103
Figura 49 - Representação esquemática para as estruturas de ressonância da aminoguanidina e seu estado híbrido.....	104
Figura 50 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações de aminoguanidina (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (50a) procedimento com glicose - 48 horas (50b) procedimento com MG - 3 horas (50c) procedimento com GO - 3 horas.....	104
Figura 51 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações de Rutina (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (51a) procedimento com glicose - 48 horas (51b) procedimento com MG - 3 horas (51c) procedimento com GO - 3 horas.....	104
Figura 52 -Representação esquemática proposta para as estruturas de ressonância obtidas pela reação entre rutina e MG (capturadores de RCS), baseado nos dados demonstrados por Sang et al., 2007.	108
Figura 53 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações de ácido clorogênico com glicose (37 °C), na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6) com 48 horas de incubação.	109
Figura 54 - Combate a formação dos AGEs, utilizando 5 mg de diferentes extratos metanólicos de HSG com glicose (37 °C), na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com 48 horas de incubação.	110
Figura 55 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações do extrato metanólico das folhas de HSG (37 °C) na presença e ausência da enzima XO	

em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (55a) procedimento com glicose - 48 horas (55b) procedimento com MG - 3 horas (55c) procedimento com GO - 3 horas.....	111
Figura 56 - Combate a formação dos AGEs, utilizando 5 mg de diferentes frações (obtidas via SPE C ₁₈) do extrato metanólico das folhas de HSG com glicose (37 °C), somente na presença da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com 48 horas de incubação.....	112
Figura 57 - Cromatogramas do extrato metanólico do caule, frutos e folhas de HSG identificados por HPLC-ESI-MS (frações SPE) em diferentes comprimentos de onda.....	114
Figura 58 -Quadro ilustrativo das principais espécies identificadas no extrato metanólico das folhas de HSG.....	125
Figura 59 -Quadro ilustrativo das principais espécies identificadas no extrato metanólico do caule de HSG.....	126
Figura 60 -Quadro ilustrativo das principais espécies identificadas no extrato metanólico dos frutos de HSG.....	124
Figura 61 - Estrutura química do triterpeno lupeol.....	131
Figura 62 -Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de EHC (136-146).....	132
Figura 63 -Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de EHC (136-146).....	132
Figura 64 -Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) de EHC (136-146).....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Açúcares redutores e algumas das suas fontes alimentares.....	40
Tabela 2 - Resumo de algumas das principais metodologias já desenvolvidas para obtenção dos AGEs, considerando procedimentos <i>in vitro</i> , disponíveis na literatura.	40
Tabela 3 -Principais técnicas de identificação (qualitativa e quantitativa) de AGES, suas vantagens e limitações.....	42
Tabela 4 - Lista em ordem alfabética para os compostos já identificados nos frutos de HSG, segundo a literatura.....	52
Tabela 5 - Lista em ordem alfabética para os compostos já identificados no caule de HSG, segundo a literatura.....	54
Tabela 6 - Lista em ordem alfabética para os compostos já identificados nas folhas de HSG, segundo a literatura.....	56
Tabela 7 - Rendimentos dos extratos das folhas, caules e frutos por soxhlet e extração a frio.....	113
Tabela 8 - Lista de compostos identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (HPLC-ESI-MS), nas diferentes partes avaliadas de HSG (folhas, caule e frutos).....	118
Tabela 9 - Capacidade antioxidante (DPPH, FRAP, ORAC, XANTINA) dos extratos metanólicos de folhas, caules e frutos de HSG.....	124
Tabela 10 -Percentual de conversão da enzima conversora da angiotensina I (ECA) para os extratos de HSG.....	127
Tabela 11 -IC ₅₀ para os extratos metanólicos das folhas e caule de HSG.....	127
Tabela 12 - Inibição da enzima acetilcolinesterasepor extratos etanólico e hexânicos de folhas e caule de <i>Hancorniaspeciosa</i> Gomes.....	129

Tabela 13 - Deslocamento químico de RMN ^{13}C de EHC (136-146) comparados com os dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994).....	130
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs – Produtos de Glicação Avançada

ALEs - Produtos avançados de lipoxidação

BSA - Albumina de Soro Bovino

HSA - Albumina de Soro Humano

XO – Enzimaxantina oxidase

RCS – Espécies carbonílicas reativas

RCS Trapping – Capturadores de RCS

GO - Glioxal

MG - Metilglioxal

EGCG - Epigallocatequina-3-galato

MOLD – Dímero de lisina derivado de metilglioxal

GOLD – Dímero de lisina derivado de glioxal

CEL – N^ε-(carboxietil) lisina

CML – N^ε-(carboximetil) lisina

DKFZ – Centro Alemão de Pesquisa do Câncer

HSG – *Hancornia speciosa* Gomes

SPE C₁₈ - Sílica de octadecil-modificada, CHROMABOND (45 mL/5000 mg)

FRAP- Ferric Reducing Antioxidant Power

ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity

DPPH - 1,2-difenil picril-hidrazil

DHBA – Ácido dihidróxibenzóico

ECA - Enzima conversora da angiotensina I

IECAs – Inibidores da enzima conversora da angiotensina I

LEC – Líquido extra celular

RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

m/z: Relação massa carga

GC – Cromatografia gasosa

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

MALDI - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC/MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

HPLC-IES-MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por “eletrospray”

AA2% - Solução de Ácido Acético a 2% (v/v)

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-S- triazina

APPH - 3,3'-azo-bis-(2-amidinopropano)-diidrocloreto

AchE - Enzima Acetilcolinesterase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	30
2.1	Geral	30
2.2	Específicos	30
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1	Compostos de glicação avançada (AGEs)	31
3.1.1	<i>Definições e conceitos gerais</i>	31
3.1.2	<i>Processo de Formação dos AGEs (mecanismo de maillard e fatores que afetam a formação dos AGEs)</i>	36
3.1.3	<i>Métodos de obtenção, identificação (qualitativa e quantitativa) e combate a formação dos AGEs</i>	40
3.2	Propriedades farmacológicas de <i>Hacornia speciosa</i> Gomes (HSG)	44
3.2.1	<i>Características botânicas e econômicas de (HSG)</i>	44
3.2.2	<i>Aplicações terapêuticas</i>	47
3.2.3	Compostos identificados em <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	51
3.2.3.1	<i>Frutos</i>	51
3.2.3.2	<i>Caule</i>	53
3.2.3.3	<i>Folhas</i>	55
4	METODOLOGIA	59
4.1	Lista de reagentes	59
4.1.1	<i>Formação/combate dos AGEs</i>	60
4.1.2	<i>Propriedades farmacológicas de HSG</i>	60
4.2	Formação e combate dos compostos de glicação avançada (AGEs)	63
4.2.1	<i>Descrição geral dos métodos desenvolvidos para a formação e combate dos produtos de glicação avançada (AGEs)</i>	63
4.2.3	<i>Formação de AGEs induzido pelo sistema hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO</i>	70
4.2.4	<i>Métodos para combater a formação dos produtos de glicação avançada (AGEs)</i>	71
4.3	Propriedades farmacológicas e identificação química de HSG	74

4.3.1	Material botânico	74
4.3.2	Preparo dos extratos	75
4.3.2.1	<i>Extração via soxhlet (a quente)</i>	75
4.3.2.2	<i>Extração a frio</i>	75
4.3.3	Fracionamento cromatográfico dos extratos via SPE	77
4.3.4	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” (HPLC-IES-EM)	79
4.3.5	Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (HPLC-semi-preparativo)	79
4.3.6	Potencial antioxidante	80
4.3.6.1	<i>Ensaio antioxidante frente ao radical livre DPPH</i>	81
4.3.6.2	<i>Potencial antioxidante FRAP (ferric reducing antioxidant power)</i>	82
4.3.6.3	<i>Potencial antioxidante ORAC (oxygen radical absorbance capacity)</i>	83
4.3.6.4	<i>Avaliação da atividade antioxidante frente a enzima hipoxantina/xantina oxidase</i>	84
4.3.7	Ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (ACE)	86
4.3.8	Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase	90
4.3.9	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN ¹³C)	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1	Formação e combate dos produtos de glicação avançada (AGEs)	93
5.1.1	Formação de AGEs induzido pelo sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose	93
5.1.2	Formação de AGEs induzido pelo sistema HX/XO-BSA-MG-GO	100
5.1.3	Inibição de AGEs utilizando extratos e frações de HSG, e composto puros identificados em HSG	102
5.1.3.1	<i>Inibição utilizando aminoguanidina</i>	102
5.1.3.2	<i>Inibição utilizando o flavonóide rutina</i>	105
5.1.3.3	<i>Inibição utilizando ácido clorogênico</i>	109
5.1.3.4	<i>Inibição utilizando extratos e frações HSG</i>	110

5.2	Propriedades farmacológicas de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes (HSG)	113
5.2.1	<i>Rendimento dos extratos</i>	113
5.2.2	<i>Análise qualitativa e quantificação dos compostos polifenólicos observados nos extratos de HSG por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-ESI-MS)</i>	114
5.2.3	<i>Capacidade antioxidante</i>	124
5.2.4	<i>Inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA)</i>	126
5.2.5	<i>Inibição frente a enzima acetilcolinesterase (AChE)</i>	127
5.2.6	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C)</i>	129
6	CONCLUSÕES	134
	REFERÊNCIAS	137
	ANEXOS	152

1. INTRODUÇÃO

A população mundial atravessa um período de mudanças significativas no que diz respeito ao aumento da expectativa de vida e a oferta de opções terapêuticas voltadas para os agravos que acometem predominantemente pessoas idosas. No campo da química, a evidência e elucidação do stress oxidativo provocado pela ação de espécies reativas de oxigênio nos organismos, mais conhecidas como radicais livres, contribuiu significativamente para compreensão de diversas patologias associadas ao processo de envelhecimento. O entendimento acerca dos efeitos produzidos pelos radicais livres, nos seres humanos, estimulou por exemplo, o incremento do consumo de alimentos com capacidade antioxidante, tais como frutas e verduras em sua dieta (HALVORSEN et al., 2006).

Não obstante, os estudos recentes apontam que, além dos radicais livres, existe outro grupo de substâncias que contribuem de forma direta para desencadear e/ou agravar patologias associadas ao envelhecimento, sendo denominados **Produtos de Glicação Avançada** (AGEs). Pesquisas têm revelado uma relação crucial entre a formação dos AGEs (glicação das proteínas) e diversas enfermidades relacionadas com a idade, tais como: diabetes, aterosclerose, doenças renais e neurodegenerativas como o mal de Alzheimer (URIBARRI et al., 2007; VLASSARA; URIBARRI, 2014; LOSSO, 2016; GAUTIERI et al., 2017). A formação dos AGEs, *in vivo*, provoca modificações não enzimáticas na estrutura das proteínas, afetando as funções das mesmas de inúmeras maneiras e ocasionando ou agravando as patologêses acima mencionadas (TUNDER, 2017).

A produção endógena (*in vivo*) e exógena (nos alimentos) de AGEs, é explicada por meio do mecanismo reacional que confere aroma e cor aos alimentos quando processados, também conhecido como “reação de *Maillard*”. Esta, consiste numa série complexa de reações químicas paralelas e subsequentes, que originam uma enorme classe de compostos, descritas em 1912 pelo bioquímico francês Louis Camille Maillard (YU; WANG; SUN, 2014).

A reação de *Maillard* ocorre durante o processamento de alimentos, com respectiva formação dos AGEs. Inicialmente ocorre uma reação de

condensação, na qual os grupamentos carbonílicos de açúcares redutores (ou α -dicarbonílicos formados por sua fragmentação), sofrem um ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligante de grupos amino, presentes em proteínas ou resíduos de aminoácidos (arginina, lisina, etc). Esta condensação, produz uma carbinolamina intermediária que após sofrer desidratação origina as bases de Schiff. Em seguida, através de isomerização e reações de oxidação, as bases de Schiff, se convertem em espécies mais estáveis chamadas compostos de Amadori. Ao depender do pH do meio, os compostos de Amadori podem entrar em equilíbrio tautomérico ou originar os AGEs (LEDL; SCHLEICHER, 1990; HIDALGO; ZAMORA, 2005; FAN et al., 2006; YU; WANG; SUN, 2014).

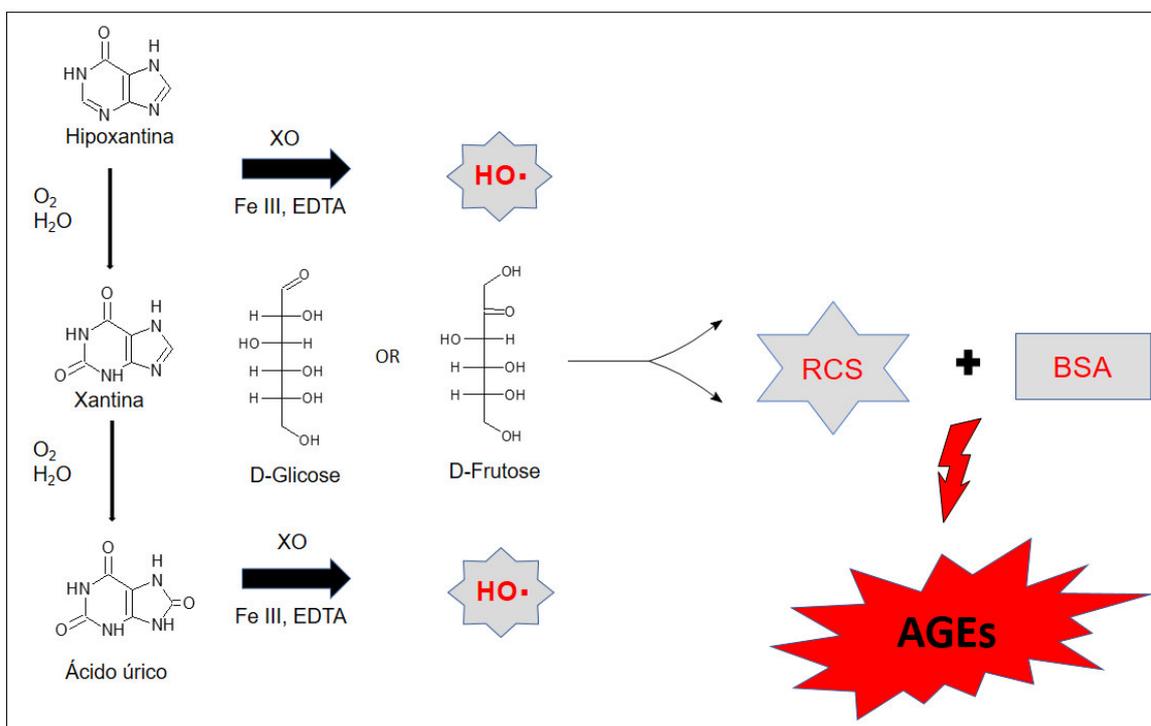
Outra via reacional para a formação dos AGEs, é a fragmentação dos açúcares, promovida por radicais livres e reações de oxidação. Nesta, os açúcares redutores podem gerar compostos α -dicarbonílicos (RCS), principalmente glioxal e metilglioxal, que são capazes de reagir mais rapidamente com os aminoácidos ou proteínas. Os produtos de Amadori, através de fissão oxidativa ou fragmentação retro-aldólica, podem originar novos resíduos de proteínas para reagir com os compostos α -dicarbonílicos e assim aumentar a quantidade de AGEs. Ao depender do pH do meio, os compostos de Amadori podem ainda sofrer enolização e originar outros compostos α -dicarbonílicos. Durante processos inflamatórios, por meio da ação das enzimas mieloperoxidase e NADPH oxidase, ocorre a formação em excesso de compostos dicarbonílicos (RCS), promovendo um estado bioquímico conhecido como stress dicarbonílico. A presença em excesso destas espécies dicarbonílicas favorecem ainda mais a formação de AGEs no organismo humano (POULSEN et al., 2013; VISTOLI et al., 2013; BARBOSA et al., 2016).

Quimicamente os AGEs são adutos proteicos ligados covalentemente (fluorescentes e não fluorescentes) ou produtos de ligações cruzadas entre resíduos de aminoácidos distintos. Diversas técnicas podem ser utilizadas para identificação e quantificação dos AGEs, dentre elas destacam-se: a espectrofluorimetria, cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrômetro de massas e ELISA (VINSON; HOWARD, 1996; YU; WANG; SUN, 2014; BARBOSA et al., 2016).

Estudos vêm sendo realizados nas últimas duas décadas com o intuito de produzir os AGEs *in vitro* e assim elucidar suas principais vias de formação, estruturas químicas e efeitos biológicos. Os procedimentos atualmente disponíveis na literatura para obtenção dos AGEs, necessitam de até 4 semanas para sua formação, utilizando vias reacionais não enzimáticas (BOUSOVA et al., 2011; JIANG et al., 2013).

Sabe-se que o processo de geração de AGEs, *in vivo*, ocorre em meio a produção concomitante de radicais livres que promovem precocemente o processo de glicação das proteínas. Apesar de tal evidência, até o presente momento foram realizados um número muito reduzido de estudos relacionando a geração de radicais livres com a formação de AGEs, mesmo estando ambos relacionados ao stress oxidativo e conseqüentemente com o envelhecimento precoce (HIRAMOTO et al., 1995; YIM et al., 1995; MASAKI; OKANO; SAKURAI, 1999; SPITELLER, 2008; KAZI et al., 2017). Portanto, pretende-se com esta pesquisa, promover a formação de AGEs em meio com excesso de radicais livres (hidroxila), visando reduzir significativamente o período de incubação para obtenção dos mesmos considerando procedimentos *in vitro* (figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática para geração de AGEs em meio reacional com excesso de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$).

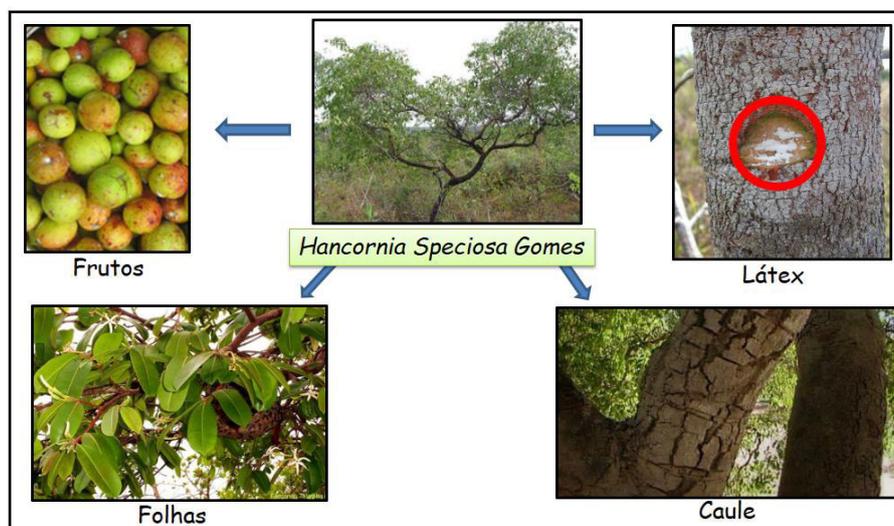


Fonte: Autor, 2017.

Diversos autores propuseram metodologias de combate à formação dos AGEs, analisando a capacidade de compostos químicos naturais e sintéticos em atuarem como capturadores de espécies α -dicarbonílicas (capturadores de RCS) e assim minimizarem o stress dicarbonílico. Guanidinas (aminoguanidina), catequinas (epigalocatequina), protoantocianidinas, resveratrol e curcuminas estão entre algumas das classes de substâncias com capacidade de combater a formação dos AGEs por atuarem como varredores de espécies α -dicarbonílicos (SHAO et al., 2008; TAN et al., 2008; LO; HSIAO; CHEN, 2011; PENG et al., 2011; HU et al., 2012; WANG; HO, 2012; TANG et al., 2013). Apesar de algumas metodologias de combate a formação dos AGEs já terem sido desenvolvidas, o potencial de plantas e compostos naturais em combater os AGEs permanece ainda bastante inexplorado neste aspecto.

A Mangabeira (figura 2), nome popular atribuído para *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynacea), é uma espécie tipicamente brasileira que se reproduz melhor em solos arenosos. A mangabeira é uma fruteira nativa de várias regiões e ecossistemas do Brasil, ocorrendo desde o Amapá e o Pará, passando pelos tabuleiros da costa marítima e também nas baixadas litorâneas de vários estados do Nordeste, onde é mais abundante principalmente em regiões litorâneas, chegando até o Espírito Santo e passando por toda a região de Cerrado brasileiro. Existe também em países vizinhos como Paraguai, Bolívia, Peru e Venezuela (LEDERMAN et al., 2003).

Figura 2 - Diferentes partes de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira).



Fonte: Autor, 2017.

As folhas e o látex possuem, segundo estudos atuais, diversas ações farmacológicas e atuam como agentes antimicrobianos, quimiopreventivos e anticancerígenos. Essas possibilidades estão ancoradas na identificação de compostos tais como: rutina, bornesitol, ácido quinínico, entre outros (ENDRINGER, 2007; SILVA et al., 2011). Rodrigues *et al.* (2007) afirmam que o caule da mangabeira apresenta diversos compostos fenólicos, entre eles flavonóides tais como as proantocianidinas.

Os frutos (figura 2), conhecidos como mangaba, são muito apreciados na região Nordeste devido ao seu agradável sabor e aroma, sendo bastante consumidos *in natura* ou sob a forma de sucos, sorvetes e picolés. Atualmente sua polpa é comercializada para a produção de sucos e outros produtos alimentícios como sorvetes, picolés, geléias, xaropes e doces. A mangaba é colocada entre as frutas consideradas ricas em vitamina C (ALMEIDA et al., 2011) e apresenta entre seus constituintes químicos diversos flavonóides (LIMA, 2015; LIMA et al., 2015).

Alguns estudos foram desenvolvidos visando a sua utilização sob a forma de passas, em virtude dos efeitos medicinais já referendados pelo saber popular com indicação em situações de convalescência de úlceras gástricas, bem como para o desenvolvimento de cosméticos (VIEIRA, 1994; FRANCO et al., 2003).

A literatura revela diversos trabalhos acerca de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG), porém em sua maioria tratam de análises acerca das folhas e caule, sendo principalmente o látex pouco estudado.

Ferreira et al. (2007), concluíram que constituintes do extrato etanólico das folhas da mangabeira apresentam elevado poder de inibição da enzima de conversão da angiotensina I, o que reafirma o seu uso popular no controle da hipertensão arterial através de metodologia utilizando pulmões de coelho.

Portanto este trabalho objetivou reduzir significativamente o tempo de reação para formação dos AGEs, acoplando e adaptando os procedimentos já existentes na literatura (reações entre açúcares – glicose, frutose- ou compostos dicarbonílicos com solução proteica de albumina de soro bovino – BSA), ao sistema de geração de radicais livres denominado

hipoxantina/xantinaoxidase(figura 1). Também foram avaliadas a capacidade de diferentes classes e compostos químicos (aminoguanidina, ácido clorogênico e rutina), bem como de extratos metanólicos das folhas, caule e frutos de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG) em combater o processo de glicação das proteínas atuando como agentes capturadores de espécies α -dicarbonílicas.

Algumas propriedades farmacológicas de HSG (potencial antioxidante, anti-hipertensivo, capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase) e a composição química dos seus extratos metanólicos, também foram investigadas nesta pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1- Geral:

Desenvolver metodologias para redução significativa do tempo de obtenção e possibilidades de combate aos produtos de glicação avançada (AGEs) e avaliar a composição química e propriedades farmacológicas dos extratos de folhas, caule e frutos de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG).

2.2 - Específicos:

- Desenvolver metodologia para formação dos produtos de glicação avançada (AGEs) utilizando açúcares (glicose, frutose e galactose) e compostos dicarbonílicos (glioxal e metilglioxal), acoplados ao sistema de geração de radicais livres hipoxantina/xantinaoxidase;
- Avaliar a capacidade de compostos puros (aminoguanidina, rutina, ácido clorogênico) e extratos metanólicos de HSG em combater a formação dos AGEs, atuando como agentes varredores de compostos dicarbonílicos;
- Estudar a composição química dos extratos metanólicos do caule, folhas e frutos de *Hancornia speciosa* Gomes em busca de metabólitos com ação terapêutica;
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos e compostos puros identificados a partir de ensaios químicos (FRAP, ORAC e DPPH) e enzimático (Hipoxantina/xantina oxidase);
- Avaliação da inibição da enzima conversora da angiotensina I, com relação a atividade anti-hipertensiva dos extratos;
- Verificar o poder inibitório dos extratos frente a enzima acetilcolinesterase com relação a doença de Alzheimer.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica está dividida em dois capítulos principais (3.1 e 3.2), que versam acerca dos conceitos e aspectos gerais dos AGEs e características de HSG respectivamente.

3.1 Compostos de Glicação Avançada (AGEs)

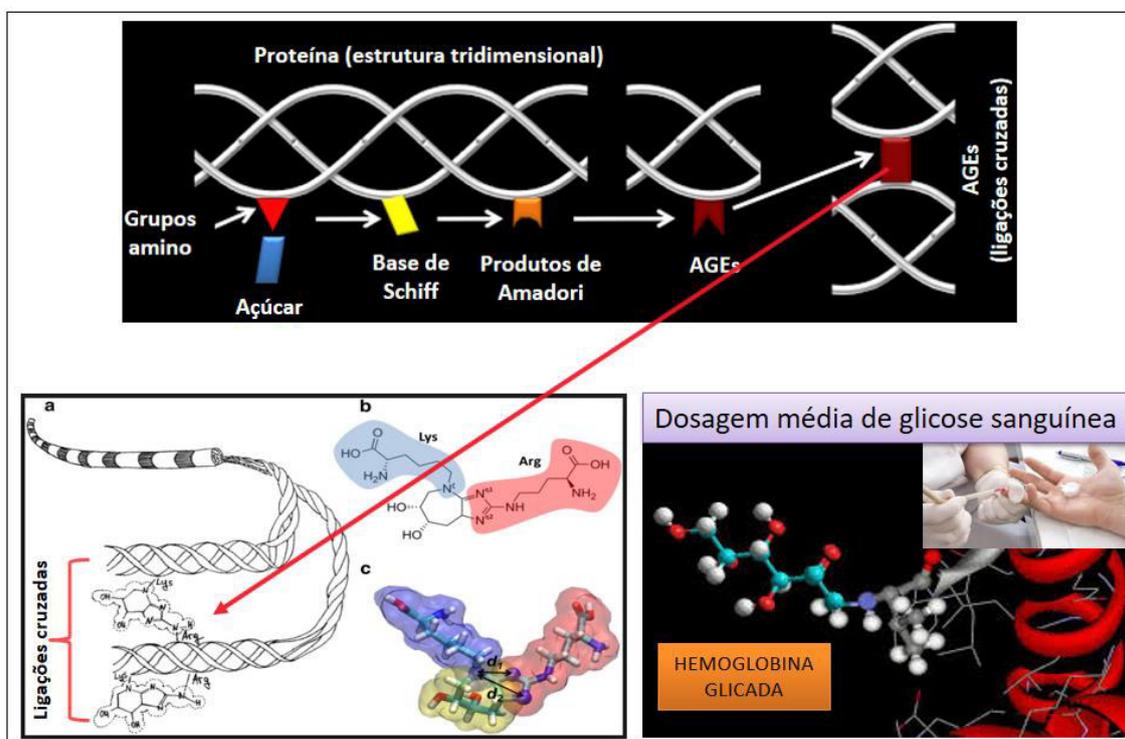
3.1.1 Definições e conceitos gerais

A descrição química da reação entre açúcares redutores com os aminoácidos, foi realizada pelo médico e químico francês Louis Camille Maillard (1878- 1936) em 1912. Tal descoberta promoveu a compreensão do fenômeno de escurecimento dos alimentos, que ocorre durante os processos de estocagem e processamento dos mesmos. Este conjunto complexo de reações originam uma vasta variedade de espécies químicas, que acabam por conferir aroma, flavor, cor e a aparência aos alimentos. Porém, apesar da incorporação destes aspectos positivos aos alimentos, também são originados neste processo inúmeras espécies químicas que são nocivas à saúde humana, dentre elas os chamados **Produtos de Glicação Avançada** (AGEs). O conjunto de reações que explicam a formação dos AGEs é conhecido como reação de *Maillard* (LOSSO, 2016; GAUTIERI et al., 2017; KASI et al., 2017).

Inúmeras pesquisas realizadas no decorrer das duas últimas décadas vêm demonstrando uma relação crucial entre a formação dos AGEs e inúmeras patologias, principalmente associadas ao envelhecimento. Este conjunto de substâncias estão correlacionadas a inúmeros fatores pró-oxidativos e pró-inflamatórios, gerando alterações metabólicas no organismo humano e assim agravando inúmeras doenças crônicas degenerativas tais como: o mal de alzheimer, diabetes *mellitus*, aterosclerose, insuficiência renal, hipertensão e distúrbios urinários. Devido a estas evidências, o interesse científico e o número de estudos publicados acerca deste tema têm se intensificado nas duas últimas décadas, visando esclarecer os mecanismos reacionais e características destes compostos, bem como formas de combatê-los (YU; WANG; SUN, 2014; LOSSO, 2016; TUNDEY, 2017; VILLA et al., 2017).

Maillard descobriu que quando um açúcar redutor, tal como glicose ou frutose, está na presença de uma proteína (por exemplo o colágeno), considerando a temperatura normal corpórea (36,5 °C), estes realizam ligações cruzadas (figura 3) para originar espécies complexas que estão relacionadas ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas, particularmente a diabetes (MAILLARD, 1912). Os avanços nas pesquisas acerca dos AGEs, possibilitaram por exemplo, o desenvolvimento de metodologia para determinação da dosagem média de glicose sanguínea com maior exatidão, para pacientes com quadros diabéticos (quantificação de hemoglobina glicada) (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 - Ilustração da formação de ligações cruzadas entre os AGEs e determinação de hemoglobina glicada (dosagem média de glicose sanguínea).

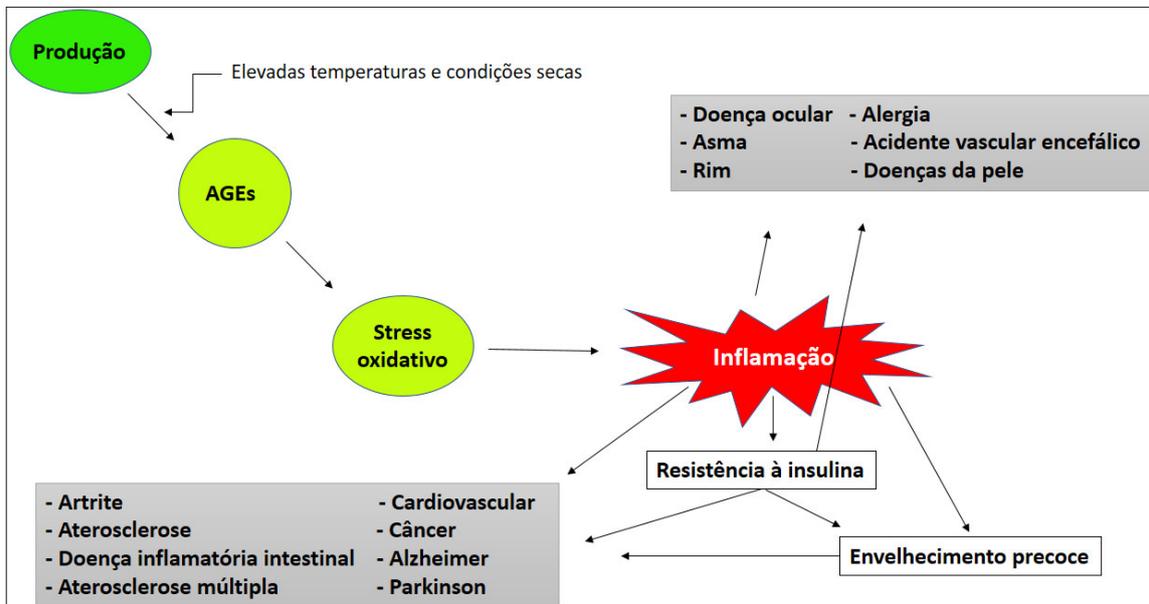


Fonte: Figuras extraídas, traduzidas e adaptadas pelo autor de: www.google-science-fair.com (2017).

A ilustração 4 demonstra de maneira didática a relação de risco potencial entre os AGEs e o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, a partir da ingestão de dieta rica em AGEs. Por volta de 10% da quantidade de AGEs ingerida torna-se biodisponível. Os AGEs biodisponíveis podem interagir com inúmeros receptores, desencadeando reações em cadeia que aceleraram o

stress oxidativo, produzindo quadros inflamatórios e o desenvolvimento de ampla variedade de patologias associadas ao envelhecimento precoce (THORNALLEY, 2007; LIAO et al., 2012; LOSSO, 2016; PASTINO et al., 2017).

Figura 4 - Efeitos potenciais dos AGEs no desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas.



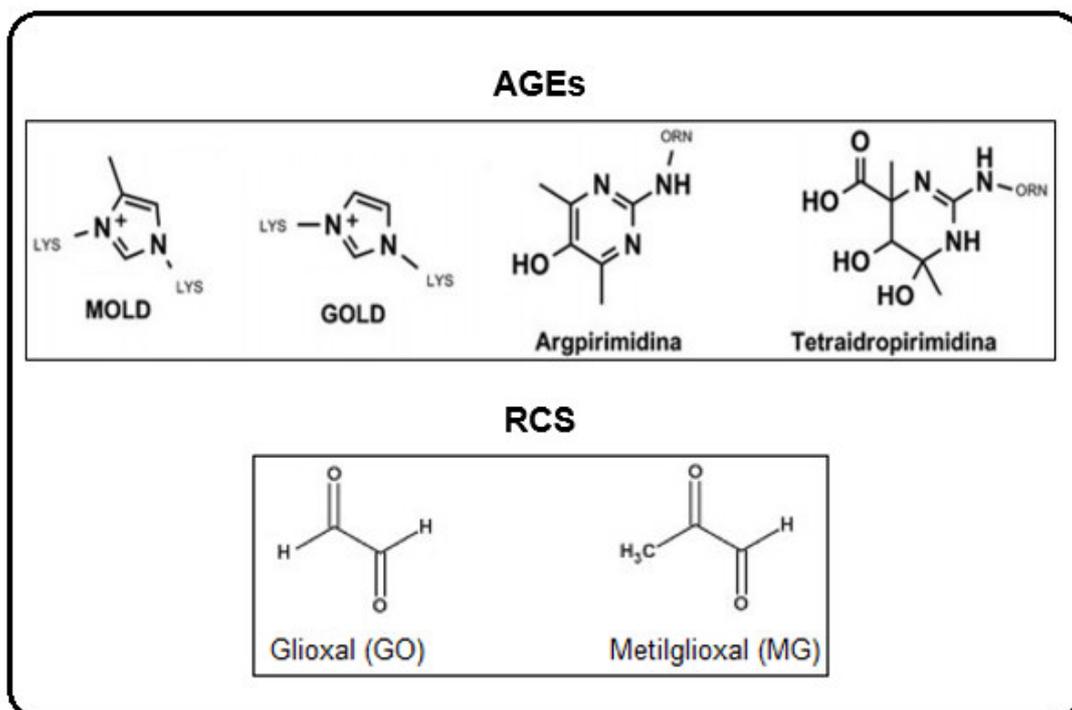
Fonte: Traduzido de Losso, 2016.

A reação não enzimática das proteínas com açúcares redutores (glicose e frutose), é a fase inicial para formação das bases de Schiff que conduzem aos estáveis produtos de Amadori, através de reações de oxidação e de desidratação, que irão posteriormente se converter nos AGEs. Os Produtos de Glicação Avançada (AGEs) são espécies químicas formadas por ligações cruzadas (entre os açúcares e as proteínas) e adutos, fluorescentes e não fluorescentes. A estrutura química de alguns AGEs já identificados estão apresentadas abaixo (figura 5). Os compostos denominados por MOLD (dímero de lisina derivado de metilglioxal) e GOLD (dímero de lisina derivado de glioxal) são adutos oriundos de resíduos da lisina, enquanto argpirimidina e a tetraidropirimidina originados da arginina (URIBARRI, 2007; YU; WANG; SUN, 2014).

Além dos açúcares, compostos dicarbonílicos produzidos pelo metabolismo humano, tais como glioxal (GO) e metilglioxal (MG), também reagem com as proteínas para formar os AGEs. Estas espécies dicarbonílicas reativas (RCS) são consideradas os precursores dos AGEs, pois reagem mais

rapidamente com os grupamentos amino presentes nas proteínas, ou resíduos de aminoácidos, através de reações de condensação. Esta maior reatividade justifica-se pelo fato destas espécies apresentarem maior número de grupamentos carbonílicos e menor impedimento espacial (quando comparados aos açúcares glicose e frutose), para sofrerem o ataque nucleofílico do par de elétrons não ligante, existentes nas estruturas dos grupamentos amino.

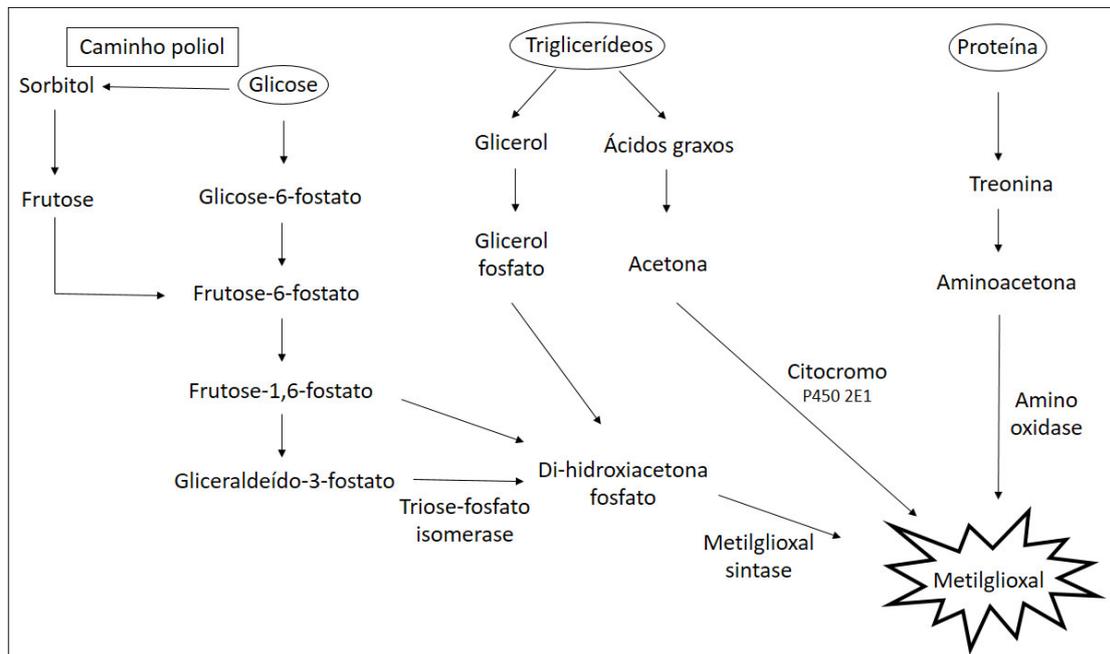
Figura 5 - Estrutura química de alguns AGEs e espécies dicarbonílicas reativas (RCS), já conhecidos pela literatura atual.



Fonte: Adaptado de Yu; Wang; Sun, 2014; Barbosa et al., 2016.

A ilustração 6 demonstra a rota reacional para a formação de metilglioxal (MG) *in vivo*, através das reações catabólicas de carboidratos, lipídeos e proteínas. Nesta, é possível observar que a obtenção de MG e outras espécies dicarbonílicas reativas (RCS), pode se dar através do catabolismo dos açúcares, oxidação das proteínas e também degradação de lipídeos. Quando as RCS são originadas a partir de lipídeos (triglicerídeos), os adutos ou produtos de ligações cruzadas são denominados: **produtos avançados de lipoxidação (ALEs)** (VISTOLI et al., 2013; Barbosa et al., 2016).

Figura 6 - Caminho catabólico para formação de MG *in vivo* a partir de açúcares, gorduras e proteínas.



Fonte: Traduzido de Yu; Wang; Sun, 2014.

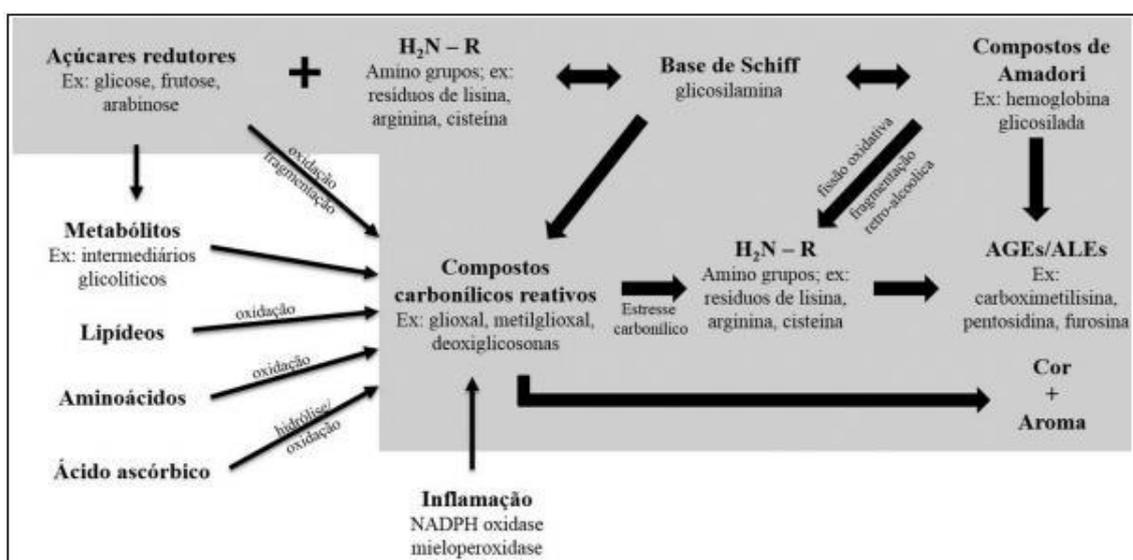
A presença em excessos destas espécies dicarbonílicas promovem um estado conhecido como stress dicarbonílico, potencializado durante processos inflamatórios. Os RCS reagem mais rapidamente com as proteínas e assim aceleram o processo de glicação, maximizando a formação/agravamento das patologias mencionadas. Grande parte das pesquisas atuais buscam identificar espécies (principalmente oriundas de fontes naturais) que possam atuar como agentes varredores de espécies dicarbonílicas e assim promover a captura destes compostos (capturadores de RCS), minimizando o processo de glicação das proteínas.

No próximo subtópico deste capítulo (3.1.2) toda a descrição mecânica da sequência reacional conhecida como reação de *Maillard*, será minuciosamente apresentada, enfatizando os aspectos mais importantes para a formação dos AGEs *in vivo* e durante as etapas de processamento e estocagem dos alimentos.

3.1.2 Processo de Formação dos AGEs (mecanismo de *Maillard* e fatores que afetam a formação dos AGEs).

A figura 7 demonstra esquematicamente a reação de Maillard, com formação dos AGEs/ALEs e incorporação de cor e aroma aos alimentos. Percebe-se duas rotas principais de formação destes compostos. Na primeira ocorre a reação direta de açúcares redutores (em sua forma aberta) com os grupos amino das proteínas, originando as bases de Schiff que se convertem nos compostos de Amadori. Por fim, os compostos de Amadori originam os AGEs/ALEs. Na segunda possibilidade, inúmeras classes de compostos bioquímicos (açúcares, lipídeos, aminoácidos e vitaminas) e as próprias bases de Schiff, geram compostos carbonílicos reativos (RCS), que reagem mais rapidamente com os grupamentos amino. Nota-se que os grupamentos amino podem também ser originados a partir dos compostos de Amadori através de fissão oxidativa e fragmentação retro-aldólica.

Figura 7- Representação esquemática para a reação de Maillard.



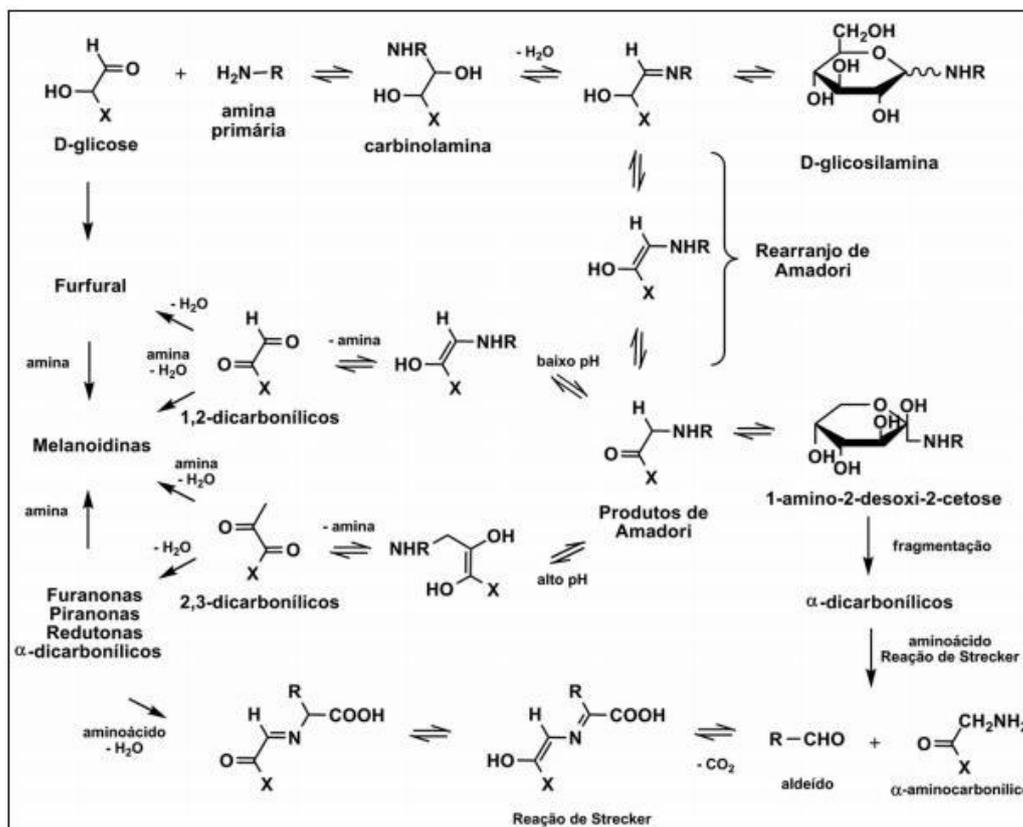
Fonte: Barbosa et al., 2016

Adicionalmente a ilustração mostra que *in vivo*, no decurso de processos inflamatórios, por ação das enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase, são produzidos no organismo elevada quantidade de RCS, gerando um quadro conhecido por **stress dicarbonílico**. Este excesso de RCS acelera significativamente o processo de glicação.

A ilustração seguinte (figura 8) apresenta a sequência de reações paralelas e subsequentes constituintes do mecanismo da reação de Maillard. Nesta, verifica-se as duas rotas principais de obtenção dos AGEs anteriormente mencionadas. Inicialmente ocorre o ataque nucleofílico do par de elétron não ligante do átomo de nitrogênio (existente nas proteínas ou resíduos de aminoácidos) à carbonila existente no açúcar (aldose ou cetose) em sua forma aberta, originando uma carbinolamina intermediária que sofre desidratação, levando a formação das bases de Schiff (imina), que por ser instável, pode ciclizar ou entrar em equilíbrio tautomérico (imina-enamina) e originar os produtos de Amadori que são mais estáveis (Rearranjo de Amadori).

Dependendo do pH e da temperatura, os compostos de Amadori podem sofrer ciclização ou entrar em equilíbrio tautomérico (aldo-enólico, ceto-enólico). Porém, em ambos os casos se tem a obtenção das espécies dicarbonílicas reativas, que como já mencionado são os precursores para a formação dos AGEs e ALEs.

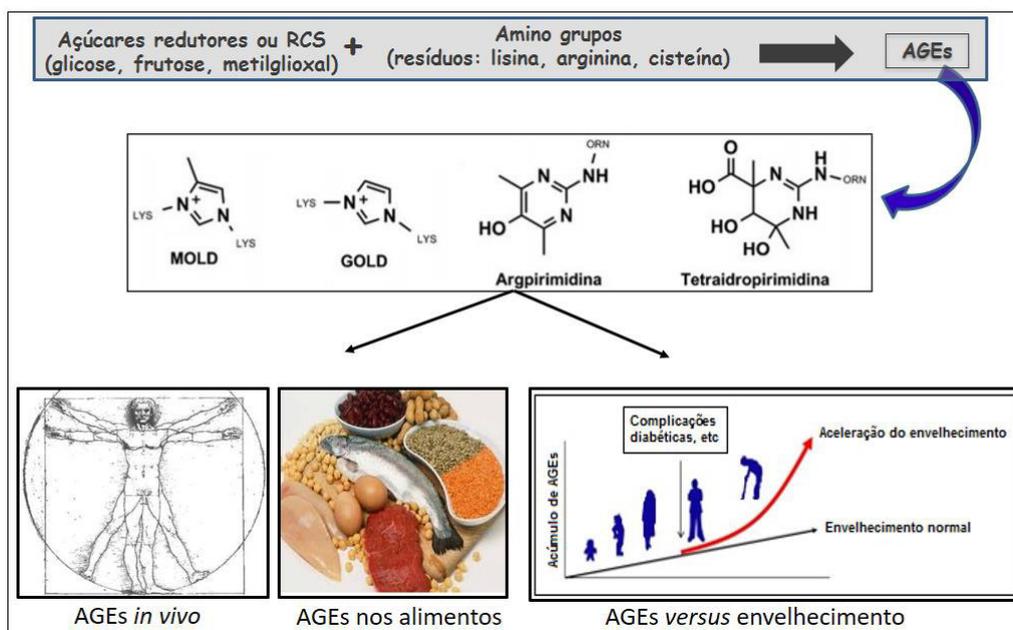
Figura 8 - Simplificação mecanística para a reação de *Maillard*.



Portanto observa-se que vários fatores podem promover o deslocamento dos inúmeros equilíbrios apresentados na figura 8. Considerando a formação dos AGEs *in vivo*, a estrutura química do açúcar e da proteína, o pH do meio, a temperatura corpórea e a formação dos RCS, são os principais fatores que favorecem o processo de glicação das proteínas (BARBOSA et al., 2016).

Além da formação endógena (*in vivo*), a reação de Maillard também ocorre em alimentos, animais ou vegetais, principalmente durante o seu processamento ou cozimento, promovendo assim a formação dos AGEs. A elevação da temperatura durante o cozimento acelera significativamente a formação dos AGEs e durante processos com condições secas, a velocidade da reação é ainda maior. Assim os procedimentos de assar, grelhar, fritar, torrar e até mesmo refogar os alimentos, promovem a obtenção de cor e sabor, que melhoram a palatabilidade dos alimentos, mas aumentam significativamente a formação dos AGEs que contribuem para acelerar o processo de envelhecimento (CHEN; SMITH, 2015; LOSSO, 2016; SMITH et al., 2017). A figura 9 ilustra de maneira didática a formação dos AGEs (*in vivo* e nos alimentos) e a relação entre seu acúmulo no organismo humano com o envelhecimento precoce, principalmente em indivíduos com quadros diabéticos ou hiperglicêmicos.

Figura 9 -Formação dos AGEs (*in vivo* e nos alimentos) e sua relação com o envelhecimento humano.



Fonte: Figuras extraídas, traduzidas e adaptadas pelo autor de: www.researchgate.net (2017).

Nos alimentos, a reação de Maillard é melhor ilustrada em inúmeros produtos consumidos diariamente, tais como: pão, pizza, lasanha, café torrado, bacon, ovo, queijos, carnes em geral (processadas), leite, manteiga, amendoim e algumas frutas, devido a elevada concentração de proteínas, açúcares e espécies geradoras de RCS. Além dos alimentos, o elevado consumo de bebidas industrializadas que apresentam elevada concentração de açúcares (principalmente xarope de frutose), tais como: refrigerantes, sucos, energéticos, iogurtes e cervejas escuras, também promovem maior formação de AGEs (MAJS, 2006).

Ressalta-se que durante o processamento dos alimentos, a formação dos AGEs ocorre no próprio alimento, ou seja, não são originados produtos de ligações cruzadas com as proteínas do organismo humano. Entretanto, a formação (nos alimentos) e o acúmulo de AGEs potencialmente nocivos, tais como: N^ε-(carboximetil) lisina (CML) e N^ε-(carboxietil) lisina (CEL), a partir da ingestão de dieta rica nestas espécies, estão diretamente relacionados ao stress oxidativo e predisposição as patologêses já mencionadas. A determinação do teor de CML e CEL, apresenta-se como uma ferramenta importante para avaliar o teor de AGEs em alimentos (HE et al., 2014; BRINGS et al., 2017).

O caramelo é um dos corantes mais amplamente utilizados pelas indústrias, para conferir flavor a chicletes, sobremesas, sorvetes, refrigerantes e bebidas carbonatadas. Este é obtido através de um processo conhecido por caramelização, no qual o açúcar é aquecido a temperaturas superiores a 149 °C (acima do seu ponto de fusão), em condições alcalinas (pH= 9) ou ácidas (pH= 3). A caramelização pode ocorrer na ausência ou presença de água e a formação dos AGEs ocorre simultaneamente ao processo, em virtude das condições de pH e degradação térmica da frutose, que aumentam significativamente o número de RCS (LEE; LEE, 1997).

Notóriamente pessoas com dietas ricas em açúcar, ou quadros diabéticos (hiperglicemia), apresentam uma maior predisposição ao desenvolvimento ou agravos das patologias associadas a formação dos AGEs. A tabela 1 apresenta alguns açúcares contidos em alimentos e que estão relacionados a formação da reação de Maillard.

Tabela 1 - Açúcares redutores e algumas das suas fontes alimentares.

Açúcar (nomenclatura)	Fonte alimentar encontrado
Glicose (dextrose)	Grãos, frutas e vegetais
Frutose	Xarope de milho e bordo, melancia, maioria das frutas
Xilose	Espiga de milho, casca de noz e semente de algodão
Maltose	Malte, quiabo, xarope de maltose
Galactose	Mucilagens, pectina, lactose
Lactose	Leite bovino, equíno, humano e camelo

Fonte: Adaptado e traduzido de Losso, 2016.

3.1.3 Métodos de obtenção, identificação (qualitativa e quantitativa) e combate a formação dos AGEs

Como mencionado anteriormente, as rotas sintéticas de obtenção dos AGEs *in vitro*, consistem em promover a reação de espécies geradoras de RCS (açúcares e compostos dicarbonílicos) com proteínas ou aminoácidos puros. Como meio reacional, utiliza-se principalmente tampão fosfato salino em diferentes valores de potencial hidrogenônico (pH), geralmente próximos a condição fisiológica.

Nestas metodologias, os períodos de incubação utilizados estão compreendidos em até 4 semanas, sendo a reação realizada na ausência de luz. A tabela 2 apresenta os principais reagentes, meios reacionais, condições de temperaturas e períodos incubação utilizados, para a formação dos AGEs, considerando o referencial teórico utilizado na presente pesquisa.

Tabela 2 -Resumo de algumas das principais metodologias já desenvolvidas para obtenção dos AGEs, considerando procedimentos *in vitro*, disponíveis na literatura.

Procedimento	Período / temperatura de incubação	Autor(es)
Reação entre D-glicose (300 mg/mL) com BSA (160 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato (50 mM, pH= 7,4).	30 dias/ 37 °C	Masaki; Okano; Sakurai, 1999.
Reação entre MG (5 mM) e albumina de soro humano (HSA - 10 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato (100 mM, pH= 7,4).	7 dias / 37 °C	Tang et al., 2013.

Reação entre D-glicose (250 mM) com BSA (40 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato (50 mM, pH= 7,4).	21 dias/ 37 °C	Joglekar; Panaskar; Arvindekar, 2014.
Reação entre MG e GO (10-100 mM) com BSA (40% m/v) dissolvidos em tampão fosfato (100 mM, pH= 7,4).	14 e 21 dias / 37 °C	Navarro; Morales, 2015.
Reação entre D-glicose (36 mg/mL) com BSA (5 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato (2 M, pH= 6,8).	30 horas/ 60 °C	Chen; Virk; Chen, 2016.
Reação entre ribose (500 mM) ou MG (50 mM) com BSA (10 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato (100 mM, pH= 7,4).	3 dias/ 37 °C	Abdallah et al., 2017.

Fonte: Autor, 2017.

Apesar das evidências experimentais do acúmulo de AGEs no organismo humano, ainda não existem técnicas específicas para detecção destes compostos *in vivo*, como por exemplo kits para indivíduos com diabetes. Assim o aprimoramento das técnicas existentes, bem como a produção de novas metodologias que possibilitem a identificação e quantificação dos mesmos é um tema de extrema relevância. Atualmente os métodos comumente mais utilizados são: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS; GC-MS), ELISA e espectrofotometria de fluorescência.

Os métodos cromatográficos são os usualmente mais utilizados para identificar e quantificar os AGEs produzidos *in vitro*. Por apresentarem características estruturais bastante diversificadas, durante o desenvolvimento do método, devem ser consideradas diferenças nos procedimentos de preparo, separação e detecção da amostra, com base nas propriedades estruturais de cada AGE específico. Utiliza-se detector com excitação na faixa de comprimento de onda entre 300-360 nm e emissão em 380-450 nm (NEMET; VARGA; TURK, 2004). Na cromatografia líquida de alta performance (HPLC), as análises são usualmente realizadas com colunas de fase reversa (C₁₈), utilizando como eluentes soluções aquosas de ácidos, ou tampão combinado com metanol ou acetonitrila.

As técnicas mais robustas e precisas para identificação dos AGEs, envolvem o acoplamento dos métodos cromatográficos com a espectrometria de massas. Apesar de apresentarem um alto custo operacional (equipamentos e

profissionais especializados), a integração destes dois métodos permite a análise com alta especificidade das proteínas, possibilitando avaliar os diferentes tipos de modificação provocados pelos AGEs. Na espectrometria de massas, a principal técnica utilizada para provocar a ionização da amostra é a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) com analisador por tempo de voo.

As análises por espectrofluorimetria apresentam baixa especificidade por identificarem apenas os AGEs fluorescentes. Esta característica fluorescente de inúmeros AGEs, foi observada inicialmente por Monnier e colaboradores em 1986 e reafirmada em trabalho desenvolvido por Lapolla et al., 2004. A medição da intensidade da fluorescência é realizada com excitação em 370 nm e emissão em 440 nm. Este é um dos métodos mais amplamente utilizados para identificação de AGEs, sendo expressa em intensidade de fluorescência (VILLA et al., 2017). A tabela 3 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos métodos utilizados na identificação dos AGEs.

Considerando todas as inúmeras patogêneses agravadas e desencadeadas pela formação e acúmulo de AGEs no organismo humano, inúmeros estudos, vem sendo realizadas ao longo destas últimas duas décadas, com o intuito de identificar alternativas de combate a formação de AGEs, utilizando procedimentos *in vitro*. A maior parte destas pesquisas vem sendo conduzidas com o objetivo de identificar espécies químicas (naturais ou sintéticas) que possam capturar espécies dicarbonílicas reativas (capturadores de RCS), tais como metil-glioxal (MG), atuando como agentes varredores (scavengers agentes) destas espécies e minimizando o stress dicarbonílico (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; SERO et al., 2013; JOGLEKAR et al., 2013; JOGLEKAR et al., 2014; SHAKAMBARI; ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2015; PRASANNA; SARASWATHI, 2017; SHEN; XU; SHENG, 2017).

Tabela 3 -Principais técnicas de identificação (qualitativa e quantitativa) de AGES, suas vantagens e limitações.

Métodos	Vantagens	Limitações
Espectrofotometria de fluorescência	Maior facilidade de acesso à instrumentalização	Não específico; AGEs/ALEs não fluorescentes não são detectados
HPLC-UV	Maior facilidade de acesso à	Necessidade de derivatização com o-ftaldialdeídos para a análise de produtos não fluorescentes, ex:

	instrumentalização; capaz de detectar analitos fluorescentes, ex: pentosidina	carboximetil-lisina (CML); baixa retenção de analitos hidrofílicos (CML e CEL- carboxietil-lisina) em colunas de fase reversa; limites de detecção altos para a análise de AGEs/ALEs em matrizes biológicas
ELISA	Prático; rápido; preserva a composição das amostras sob investigação	Baixa especificidade de alguns anticorpos; possibilidade de interferências de componentes da matriz na interação antígeno- -anticorpo; necessidade de validação do teste para cada matriz a ser analisada; “contaminação” por adutos glicação em proteínas bloqueadoras utilizadas em alguns kits
GC-MS	Alta especificidade	Necessidade de analistas especializados; A necessidade de derivatização para a volatilização e detecção de alguns analitos, como a CML, torna os protocolos analíticos mais complexos e custosos
LC-MS/MS	Alta sensibilidade; alta especificidade, baixos limites de detecção; método robusto	Necessidade de analistas especializados; alto custo dos instrumentos; necessidade de extensa manipulação para a purificação (extração, hidrólise, delipidação) das amostras e a resolução dos analitos; adição de padrões internos para cada analito sob investigação
MALDI-TOF MS	Análise de proteínas intactas; mínima manipulação das amostras; detecção simultânea de diferentes tipos de modificação	Necessidade de analistas especializados; Alto custo dos instrumentos; a incorporação incompleta de açúcares às proteínas pode resultar em mudanças de massas características dos produtos de Amadori (Δm 162 Da)

Fonte: Barbosa et al., 2016.

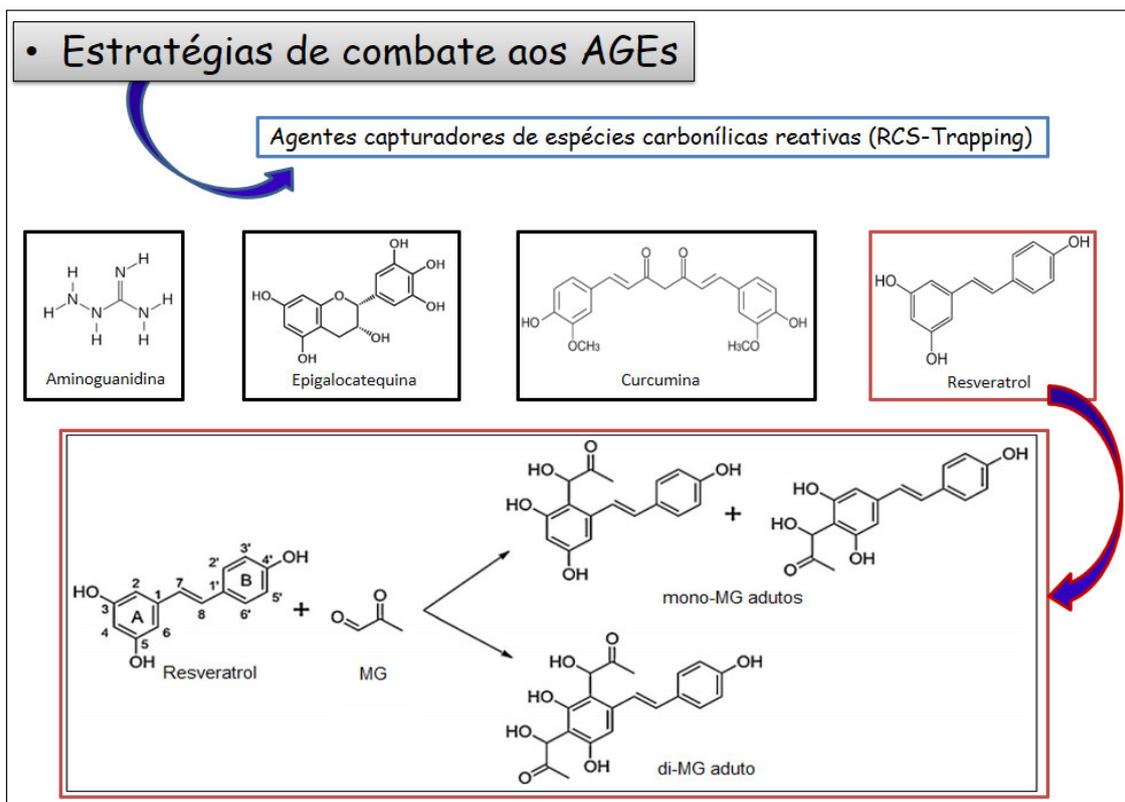
Nilsson (1999) e Thornalley (2003) demonstraram que aminoguanidina (AG), atua como agente capturador de espécies dicarbonílicas (RCS), provocando a inibição do processo de glicação das proteínas. Esta capacidade de atuar como capturador destes compostos (capturadores de RCS) é justificada devido a formação de adutos substituídos, derivados de 3-amino-1,2,4-triazina.

A eficiência de algumas classes de compostos químicos tais como flavonóides (catequinas, epicatequinas, protoantocianidinas) e curcuminas, em inibir o processo de glicação, foram comprovadas por: Lo et al., 2006; Shao et al., 2008; Tan et al., 2008; Peng et al., 2011; Hu et al., 2012; Wang; Ho, 2012.

Sang et al., 2007 e Tang et al., 2013, propuseram que epigallocatequina-3-galato (EGCG) e resveratrol podem facilmente capturar MG e GO (capturadores de RCS), em condições de pH neutro ou levemente alcalino, originando adutos mono e disubstituídos. A ilustração 10 mostra a formação

destes adutos, a partir da reação do resveratrol com metil-glioxal. Nesta, evidencia-se a reação de condensação ocorrendo nas posições 2 e 4 do anel aromático A do resveratrol. A maior reatividade destas posições é evidenciada pelo aumento da nucleofilicidade destes carbonos (2,4), em virtude do efeito de ressonância ativado pelas hidroxilas fenólicas, frente a uma reação de condensação.

Figura 10 - Captura de metilglioxal por resveratrol, originando adutos mono e disubstituídos (capturadores de RCS).



Fonte: Traduzido e adaptado de Tang et al., 2013.

3.2 Propriedades farmacológicas de *Hacornia speciosa* Gomes (HSG)

3.2.1 Características botânicas e econômicas de HSG

AMangabeira é uma plantanativado Brasil de natureza endêmica. Pertence a família Apocinaceae que tem como característica peculiar a presença de látex em todas suas partes (caule, folhas, raiz e frutos). Trata-se de uma árvore de porte médio, geralmente com tamanho compreendido entre 2 a 10 metros ao depender da região onde se encontra. A literatura revela a existência

de seis variações genéticas naturais que tem sido descritas ao depender da região de ocorrência (GANGA et al., 2010; VIEIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

Se distribui espontaneamente por praticamente todas as regiões do Brasil (excetuando-se a região sul), sendo o centro-oeste e a região nordeste as áreas de maior ocorrência. No centro-oeste, sua maior incidência se dá nas regiões de cerrado, abrangendo todos os estados. Na região norte está presente por todo o estado do Tocantins e em algumas pequenas áreas do Pará, Amapá, Rondônia e Amazonas. No Sudeste pode ser encontrada em São Paulo e boa parte do território de Minas Gerais. No Nordeste, encontra-se principalmente na parte litorânea e em regiões compreendidas entre a zona da mata e o litoral, conhecidas como agreste, se estendendo desde o Espírito Santo até o estado do Maranhão. A figura abaixo indica o mapa de distribuição por todo o território brasileiro (VIEIRA, 2011).

Figura 11 -Mapa ilustrativo da ocorrência e distribuição de HSG (mangabeira) no Brasil.



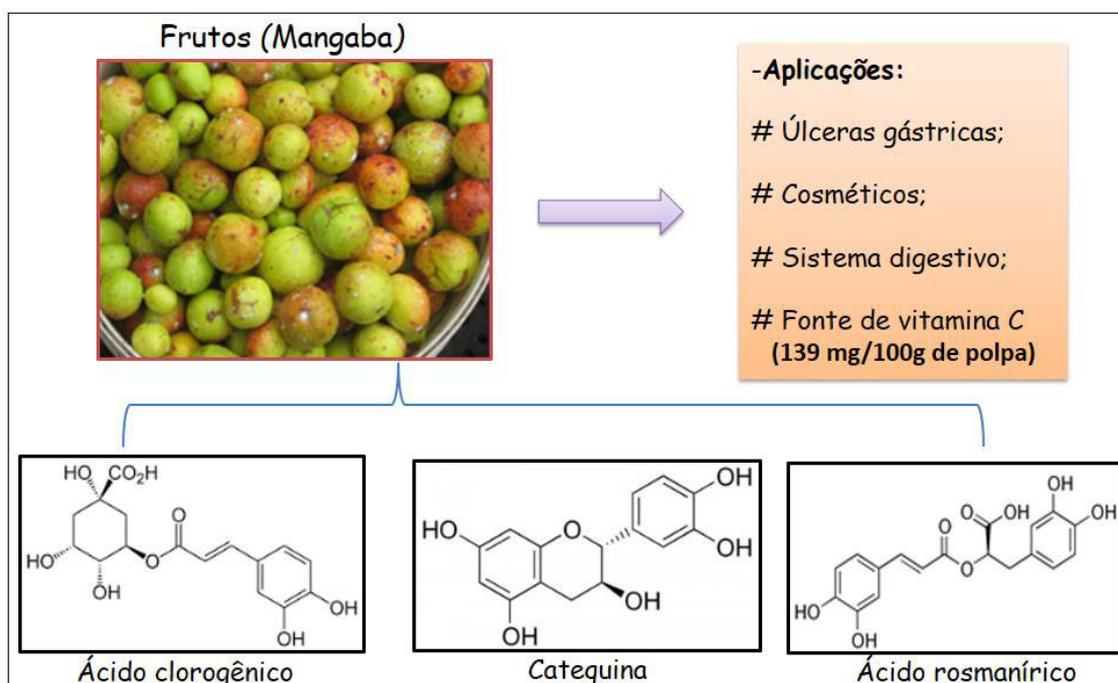
Fonte: Vieira, 2011.

A mangabeira se desenvolve principalmente em solos arenosos e irregulares, pobres em nutrientes, com clima tropical, de baixo índice pluviométrico e elevada temperatura. O período de floração depende da região de ocorrência, no cerrado ocorre normalmente entre agosto e novembro, com

pico de produção dos frutos em outubro. Já na região Nordeste os processos de floração e frutificação ocorrem duas vezes ao ano (SILVA; LEDO, 2006).

Os frutos são denominados de mangaba e sua etimologia deriva da cultura indígena que significa “coisa boa de comer”. Estes tem formato circular irregular com tamanho entre 2 - 6 cm. A coloração predominante dos frutos é amarelado (quando maduros) com manchas avermelhadas e propriedades organolépticas bem características, tais como o sabor doce e odor agradável devido a presença de inúmeros compostos orgânicos voláteis (FREITAS, 2012).

Figura 12 - Aplicações terapêuticas referendadas para os frutos de HSG(mangaba) e principais compostos já identificados nos mesmos.



Fonte: Autor, 2017.

Estudos realizados na **Embrapa Agroindústria Tropical**, demonstraram elevado teor de ácido ascórbico em seus frutos reafirmando o que já se reconhecia pelo uso popular. Moura et al. (2002), quantificaram o teor de ácido ascórbico na mangaba, sendo este de 139 mg/100g de polpa. A mangaba é bastante apreciada nas regiões de ocorrência e consumidos na forma *in natura* ou como sucos, geléias e sorvetes, sendo no Nordeste onde ocorre a mais elevada produção. Além da comercialização dos produtos industrializados é muito comum a venda dos frutos em feiras livres e nas estradas da região

Nordeste, principalmente na Paraíba, Espírito Santo, Sergipe e Rio Grande do Norte.

Na cidade de Aracajú (Sergipe) existe um projeto denominado catadoras de mangaba, financiado pela Petrobrás e governo federal, através do qual diversas famílias obtem sua sobrevivência a partir da coleta e beneficiamento dos frutos da mangabeira. Junior et al. (2008), apontaram que o processo de beneficiamento da mangaba pode contribuir para geração de renda em diversas comunidades extrativistas através do processamento da polpa pela agroindústria.

Porém, apesar de todo o potencial econômico que pode ser alavancado através da mangabeira, esta vem sofrendo significativa redução de seus pomares naturais em virtude da especulação imobiliária, produção de outras culturas e formação de áreas para pasto do gado. Atualmente, a mangabeira é considerada uma das plantas nativas do Brasil mais ameaçadas de extinção (SILVA et al., 2011). Além dos problemas mencionados, sua dificuldade em reproduzir-se, devido a ausência de agentes dispersores naturais, é outro problema enfrentado para a sobrevivência da espécie, sendo, segundo Oliveira et al. (2014), a produção de mudas em larga escala a forma mais viável para recompor a mata nativa e respectiva formação de pomares para promover a prática extrativista comercial.

3.2.2 Aplicações terapêuticas

A medicina popular referenda diversas aplicações terapêuticas para *Hancornia speciosa* Gomes, principalmente para o caule, látex e as folhas. A revisão bibliográfica demonstra um pequeno número de publicações com estudos acerca do látex e da fruta de HSG.

Os frutos são usados como fonte alimentar e de vitamina C, além de promoverem melhora do sistema digestivo (GAVILANES; BRANDÃO,1992).Lima (2015), em estudo com a polpa da fruta de HSG, revelou elevado potencialantimutagênicodapolpa de mangaba bem como seus constituintes químicos, entre eles diversos antioxidantes tais como flavonóides. Este estudo reforça a utilização dos frutos devido ao seu alto potencial

antioxidante e com um alimento funcional com aplicabilidade na indústria de alimentos.

O látex apresenta elevada qualidade e foi largamente utilizado na produção de borracha durante a segunda guerra mundial para exportação. Possui aplicação popular no combate a infecções provocadas por fungos, úlcera, espinhas, verrugas e tuberculose (POTT; POTT, 1994; VIEIRA, 1994). Apresentou elevado potencial anti-inflamatório quando testado em ratos e sem a verificação de efeito tóxico (MARINHO et al., 2011). Santos et al. (2007) demonstraram que o látex também apresenta atividade antimicrobiana em ensaio utilizando diferentes microorganismos.

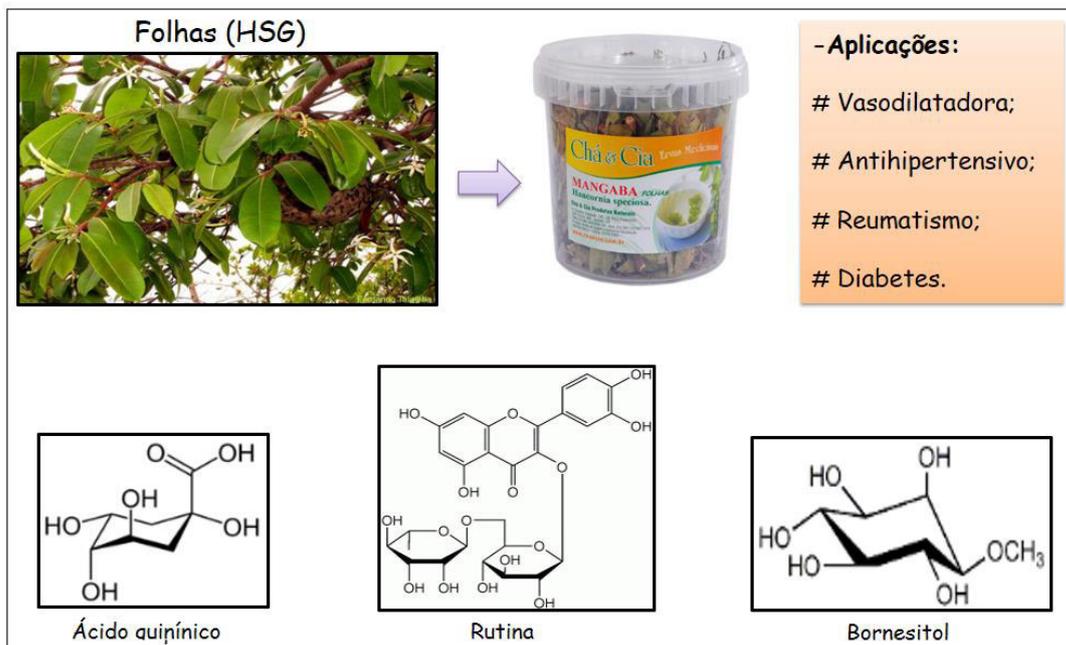
Figura 13 - Aplicações terapêuticas referendadas para o látex de HSG.



Fonte: Autor, 2017.

Suas folhas também são empregadas para o tratamento no controle da pressão arterial (hipertensão) bem como para combater o reumatismo (BRITTO; BRITTO, 1982). Muitos dos efeitos pré-ditos pela sabedoria popular encontram ancoragem na literatura científica moderna, tal como a utilização para o tratamento hipertensivo. Pesquisas revelaram que os extratos etanólicos das folhas de HSG exercem elevada atividade vasodilatadora através da inibição da enzima conversora da angiotensina I e também por meio da ativação de um mecanismo dependente da produção de óxido nítrico (SERRA et al., 2005; FERREIRA et al. 2007). Os autores atribuíram tal capacidade vasodilatadora a presença do flavonóide rutina.

Figura 14 - Aplicações terapêuticas referendadas para as folhas de HSG e principais compostos já identificados nas mesmas.



Fonte: Autor, 2017.

Em trabalho similar, Campana et al. (2009) concluíram que os extratos etanólicos das folhas de HSG promovem a vasodilatação dependente do endotélio em preparações utilizando aorta de ratos, e tal efeito ocorre devido a um aumento na biodisponibilidade do monóxido de nitrogênio (NO) devido sua atividade antioxidante. Estes autores atribuíram esta atividade a presença de proantocianidinas detectadas por cromatografia líquida de alta performance com arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Silva et al. (2011) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de HSG possui capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina I similar ao próprio captopril, medicamento largamente utilizado no tratamento de problemas contra a hipertensão. Em pesquisa recente, Silva et al. (2016) reafirmaram a elevada capacidade antihipertensiva do extrato metanólico das folhas de HSG.

Pereira et al. (2015) verificaram a elevada potencialidade de HSG no tratamento de diabetes. O extrato etanólico das folhas de *Hancornia speciosa* foi fracionado utilizando técnicas cromatográficas e estas frações foram

avaliadas em ensaios α -glicosidase, em efeito hiperglicêmico e captação de glicose. As frações mostraram-se ativas para inibição da α -glicosidase e aumento da captação de glicose.

A patologia neurodegenerativa do Alzheimer atinge principalmente a população idosa. Atualmente um promissor meio para o tratamento desta doença é aumentar o nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase (FILHO et al., 2006). Os extratos hexânicos e etanólicos do caule e folha da mangabeira foram avaliados frente a reação de conversão da enzima acetilcolinesterase. O extrato hexânico do caule apresentou-se como o mais ativo para esta conversão. Este último foi fracionado, sendo a fração mais ativa identificada por ressonância magnética nuclear (RMN) que indicou a presença do triterpeno lupeol (MARQUES et al., 2015).

Figura 15 - Aplicações terapêuticas referendadas para os frutos de HSG(mangaba) e principais compostos já identificados nos mesmos.

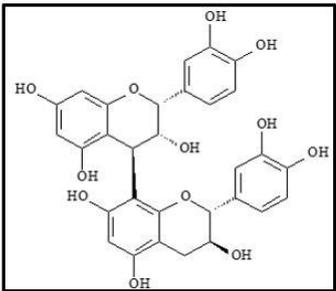
Caule (HSG)



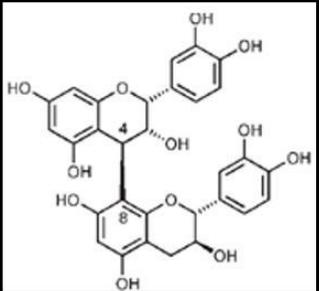


- Aplicações:

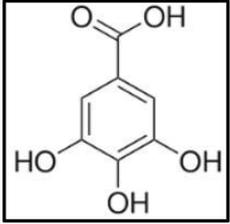
- # Inflamações;
- # Problemas estomacais;
- # Sistema hepático;
- # Emagrecimento;
- # Gastroprotetor;
- # Diabetes.



Procianidina



Epicatequina



Ácido gálico

Fonte: Autor, 2017.

A infusão do caule é utilizada em diversos tipos de tratamento, entre eles: inflamações, problemas estomacais, agente hipertensivo, doenças que

acometem o fígado e regimes de emagrecimento (FERREIRA, 1980). Hirschmann; Arias (1990), também apontam o uso popular do mesmo no controle da diabetes, inflamações da pele e doenças relacionadas ao sistema hepático.

Também foi demonstrada a eficácia do efeito gastroprotetor pela ingestão da infusão do caule de HSG em experimentos realizados com ratos. A infusão mostrou-se ativa na eliminação de úlceras devido o estímulo a produção de muco e sem provocar efeito tóxico (MORAES et al., 2008).

A investigação acerca do potencial de extratos hexânicos-metanólicos das folhas, caule, frutos e látex contra tumores específicos in vitro (carcinoma do cólon, melanoma, glioblastoma e leucemia promielocítica), indicou que os mesmos não possuem tal característica (MESQUITA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012).

3.2.3 Compostos identificados em *Hancornia speciosa* Gomes

Aqui será apresentado o resultado acerca da revisão bibliográfica dos compostos que já foram identificados, até o presente momento, em *Hancornia speciosa* Gomes em várias partes da planta. Estes estão apresentados nas tabelas abaixo (separadas por partes da planta), em ordem alfabética, indicando suas nomenclaturas, estruturas químicas e referência bibliográfica.

3.2.3.1 Frutos

A maior parte dos estudos com o fruto da mangabeira (mangaba) se referem a características nutricionais e capacidade antioxidante. Foram identificadas apenas quatro publicações acerca da constituição química dos mesmos. A tabela 4 demonstra, em ordem alfabética os compostos identificados.

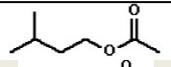
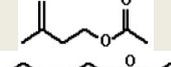
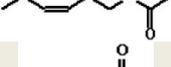
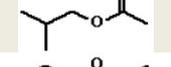
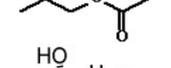
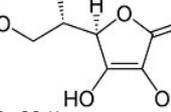
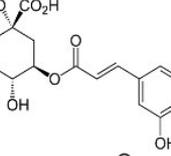
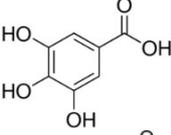
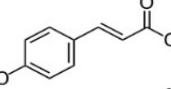
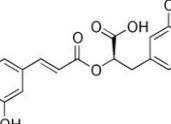
Lima et al. (2015) avaliaram a capacidade antimutagênica da mangaba em ratos. Nesta pesquisa verificou o perfil fenólico da polpa dos frutos, coletados na cidade de Curvelo no estado de Minas Gerais, utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Neste estudo foram identificados flavonóides e compostos fenólicos distintos, sendo o ácido clorogênico a substância majoritária. Os autores concluem que a mangaba não apresenta toxicidade e

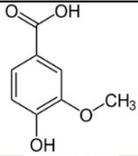
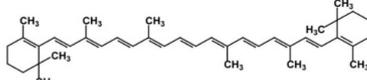
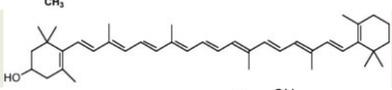
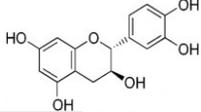
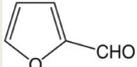
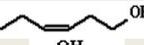
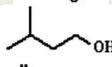
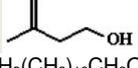
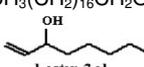
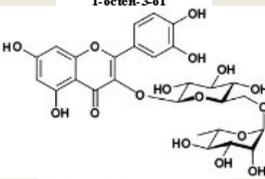
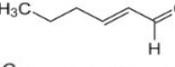
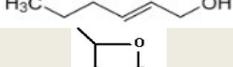
evidenciam seu potencial antimutagênico. Os mesmos enfatizam que os frutos de HSG podem ser utilizados como alimento funcional e de aplicabilidade generalizada na indústria alimentícia.

O elevado poder antioxidante dos frutos estão ancorados na presença dos polifenólicos, bem como devido ao seu elevado teor de ácido ascórbico, conforme evidencia estudo realizado por Rufino et al. (2010). Esta pesquisa revela que a mangaba é considerada como um fruto rico em vitamina C.

A presença de terpenóides (β -caroteno e β -criptoxantina) foi mostrado em estudo realizado por Cardoso et al. (2014), e a análise do óleo essencial dos frutos em diferentes estados de maturação, revelou a presença de diversos ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas que contribuem para o seu flavor característico (SAMPAIO, 2008).

Tabela 4 - Lista em ordem alfabética para os compostos já identificados nos frutos de HSG, segundo a literatura.

Nomenclatura	Estrutura	Referência
Acetato de isopentila		Sampaio, 2008
Acetato de 3-metil-3-buten-1-ila		Sampaio, 2008
Acetato de (Z)-hexen-1-ila		Sampaio, 2008
Acetato de isobutila		Sampaio, 2008
Acetato de n-propila		Sampaio, 2008
Ácido ascórbico		Rufino et al., 2010
Ácido clorogênico		Lima et al., 2015
Ácido gálico		Lima et al., 2015
Ácido-orto-cumárico		Lima et al., 2015
Ácido rosmanírico		Lima et al., 2015

Ácido vanílico		Lima et al., 2015
Benzenoetanol		Sampaio, 2008
β-caroteno		Cardoso et al., 2014
β-criptoxantina		Cardoso et al., 2014
Catequina		Lima et al., 2015
Furfural		Sampaio, 2008
Hexadecanal	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHO}$	Sampaio, 2008
1-hexanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{OH}$	Sampaio, 2008
(Z)-3-hexenol		Sampaio, 2008
3-hidroxi-2-butanona		Sampaio, 2008
3-metil-butanol		Sampaio, 2008
3-metil-3-buten-1-ol		Sampaio, 2008
Octadecanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{OH}$	Sampaio, 2008
1-octen-3-ol		Sampaio, 2008
Rutina		Lima et al., 2015
<i>trans</i> -2-hexenal		Lima et al., 2015
<i>trans</i> -hex-3-en-1-ol		Lima et al., 2015
2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano		Sampaio, 2008

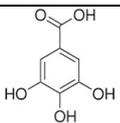
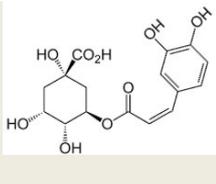
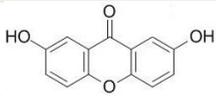
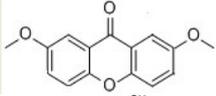
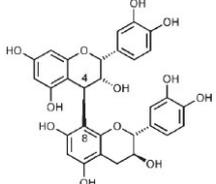
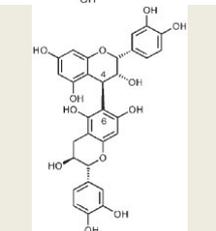
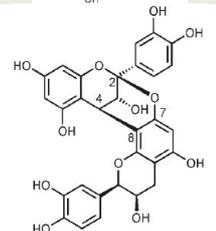
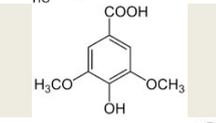
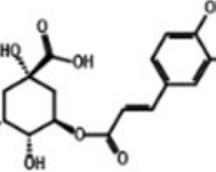
Fonte: Autor, 2017.

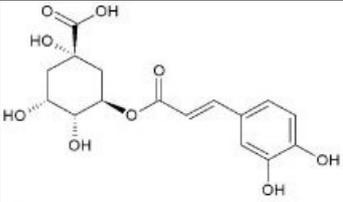
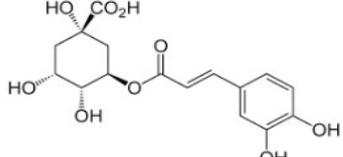
3.2.3.2 Caule

Apenas duas publicações foram encontradas acerca da constituição química do caule de HSG. Utilizando cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS), Rodrigues et al. (2006) demonstraram a presença de diversos compostos polifenólicos, conforme mostrado na tabela 5, bem como de protoantocianidinas do tipo A e B e seus respectivos dímeros, analisando infusão hidroalcolica de amostras obtidas na cidade de Palmas no estado do Tocantins (RODRIGUES et al., 2007). A metodologia utilizada permitiu a identificação direta das protoantocianidinas sem

a necessidade de isolamento dos compostos. Os resultados apresentados nesta pesquisa corroboram com a utilização de infusões de caule de HSG no tratamento de distúrbios grásticos referendado pelo uso tradicional.

Tabela 5 - Lista em ordem alfabética para os compostos já identificados no caule de HSG, segundo a literatura.

Nomenclatura	Estrutura	Referência
ácido gálico		Rodrigues et al., 2006
Ácido <i>cis</i> -clorogênico		Rodrigues et al., 2006
2,7-diidroxixantona		Rodrigues et al., 2006
2,7-dimetoxixantona		Rodrigues et al., 2006
epicatequina-(4 β → 8)-catequina		Rodrigues et al., 2007
epicatequina-(4 β → 6)-catequina e dímeros de protoantocianidinas (tipo A)		Rodrigues et al., 2007
epicatequina-(2 β → 7; 4 β → 8)-epicatequina		Rodrigues et al., 2007
4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico)		Rodrigues et al., 2006
3-O-cafeoilquínico		Rodrigues et al., 2006

Ácido 5-O-cafeoilquínico		Rodrigues et al., 2006
Ácido <i>trans</i> -clorogênico		Rodrigues et al., 2006

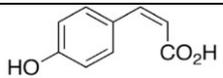
Fonte: Autor, 2017.

3.2.3.3 Folhas

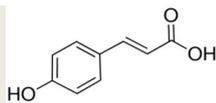
As maiores quantidades de compostos, bem como o número de publicações, se referem aos constituintes das folhas de HSG. Em busca de identificar os constituintes químicos das folhas de HSG responsáveis pelo seu elevado potencial de atividade anti-hipertensiva e quimiopreventiva do câncer, Endringer (2007) isolou e identificou diversos compostos utilizando técnicas cromatográficas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O biomonitoramento do extrato bruto das folhas possibilitou a identificação de diversos constituintes polifenólicos, sendo rutina o principal constituinte. Os autores atribuem a rutina, bornestinol e ácido quínico os efeitos anti-hipertensivos e quimiopreventivos (FERREIRA et al., 2007; ENDRINGER; PEZZUTO; BRAGA, 2009).

Santos et al. (2006) analisando o resíduo seco do hidrodestilado de folhas de HSG identificou éteres cíclicos (óxido de *trans*-linalol, óxido de *cis*-linalol), álcoois (α -terpinol, linolol, geraniol) e fenóis bifuncionais (eugenol, (E)-isoeugenol) utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas. Com a mesma técnica, Sampaio (2008) verificou a composição de compostos voláteis nas folhas HSG utilizando seu óleo essencial. Concluiu que as folhas secas apresentam como constituinte majoritário (E)-3-hexenol (68,6%) que diminuem para 13,3% após dez dias de secagem ocorrendo aumento significativo de monoterpenos oxigenados como genariol (54,7%).

Tabela 6 - Lista em ordem alfabética para os compostos já identificados nas folhas de HSG, segundo a literatura.

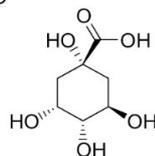
Nomenclatura	Estrutura	Referência
Ácido <i>cis</i> -4-hidroxi-cinâmico		Endringer, 2007

Ácido *trans*-4-hidroxi-cinâmico



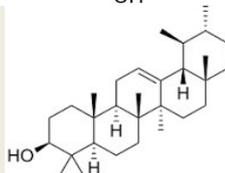
Endringer, 2007

Ácido quinínico



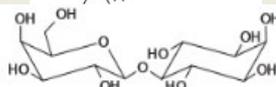
Endringer, 2007

α -amirina



Endringer, 2007

b-D-galactoside-myo-inositol



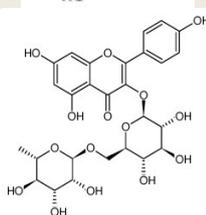
Endringer; Pezzuto; Braga, 2009

L-(+)-bornesitol



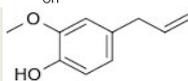
Endringer; Pezzuto; Braga, 2009

canferol-3-O-rutinosídeo



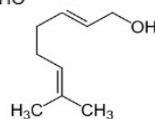
Endringer, 2007

eugenol



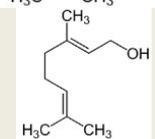
Santos et al., 2006

(E) Geraniol



Sampaio, 2008

geraniol



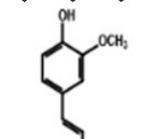
Santos et al., 2006

1-hexanol



Sampaio, 2008

(E)-isoeugenol



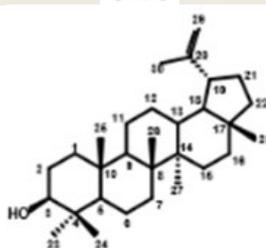
Santos et al., 2006

linolol

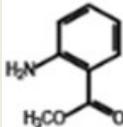
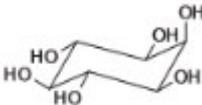
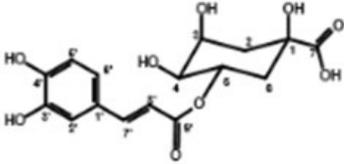
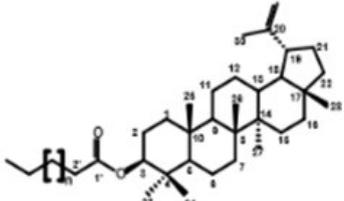
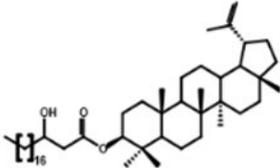
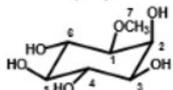
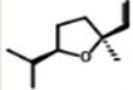
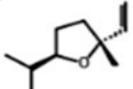
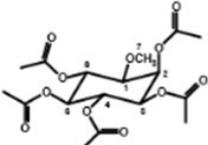
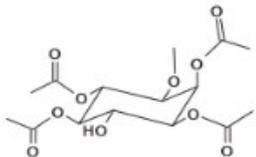
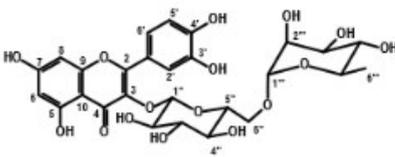
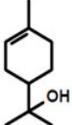


Santos et al., 2006

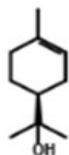
Lupeol



Endringer, 2007

metil-antranilato		Santos et al., 2006
myo-inositol		Endringer; Pezzuto; Braga, 2009
5-O-cafeoilquínico		Endringer, 2007
3β-O-éster do lupeol		Endringer, 2007
3β-O-(3'-hidroxi-eicosanoil)-lupeol		Endringer, 2007
O-metil-mio-inositol		Endringer, 2007
óxido de <i>cis</i> -linalol		Santos et al., 2006
óxido de <i>trans</i> -linalol		Santos et al., 2006
2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1L-1-O-metil-mio-inositol		Endringer, 2007
per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol		Endringer; Pezzuto; Braga, 2009
Rutina		Endringer, 2007 Ferreira et al., 2007
scyllo-inositol		Endringer et al., 2009
α-terpineol		Sampaio, 2008

α -terpinol



Santos et al., 2006

Fonte: Autor, 2017.

4. METODOLOGIA

A descrição de todo o procedimento metodológico desenvolvido está apresentada abaixo. Este tópico da pesquisa está subdividido em dois capítulos, além da lista dos principais reagentes utilizados (4.1). O primeiro capítulo (4.2) versa acerca dos processos desenvolvidos para formação/combate dos AGEs, enquanto o segundo (4.3) refere-se às propriedades farmacológicas e constituição química dos extratos metanólicos das folhas, caules e frutos de *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida como mangabeira. A obtenção dos extratos (a frio) e o ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio), sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Salles Trevisan, enquanto os demais procedimentos foram realizados no Centro Alemão de Pesquisa do Câncer (DKFZ), localizado na cidade de Heidelberg-Alemanha, com orientação do Prof. Dr. Robert Wyn Owen e da técnica de laboratório Andrea Breuer.

4.1 Listade reagentes

4.1.1 Formação/combate dos AGEs

- Solução de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 (1 mol.L^{-1}) – Sigma Aldrich

- **TAMPÃO A** (pH= 6,6);

Para a obtenção deste tampão, 73,0 mg de EDTA (Sigma Aldrich); 32,7 mg de $FeCl_3.6H_2O$ (Sigma Aldrich); 20,5 mg de hipoxantina (Sigma Aldrich) e 138,0 mg de ácido salicílico (Sigma Aldrich) foram transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e adicionados 19,05 mL (1 mol.L^{-1}) K_2HPO_4 e 30,95 mL (1 mol.L^{-1}) KH_2PO_4 , sendo o conjunto aferido com água bidestilada e mantido sob agitação por 3 horas.

- **TAMPÃO B** (pH= 6,6);

O tampão B foi produzido de maneira idêntica ao tampão A, porém substituindo-se as 138,0 mg de ácido salicílico por igual quantidade de ácido cinâmico (Sigma Aldrich).

- **TAMPÃO C** (pH= 6,6);

O tampão C possui a mesma composição do tampão A, porém excetuando-se as 138 mg de ácido salicílico.

4.1.2 Propriedades farmacológicas de HSG

- **Ensaio antioxidante DPPH;**

I) Preparo da solução estoque de DPPH(100 µg/mL);

(A) Solução estoque: Foram pesados 3,94 mg de DPPH (Sigma-Aldrich), que foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume aferido com metanol. A solução estoque de DPPH 100 µg/mL foi mantida em freezer a -5°C, em vidro âmbar.

(B) Solução de trabalho: A solução estoque de DPPH foi submetida a sucessivas diluições, nas concentrações compreendidas entre 1 a 100 µg/mL.

- **Ensaio antioxidante FRAP;**

Para a realização deste método, foram preparadas as seguintes soluções:

I) Tampão de acetato (300 mmol.L⁻¹, pH 3,6): 3,1 g de acetato de sódio tri-hidratado foram transferidos para um balão volumétrico de 1 L e, em seguida, adicionaram-se 16,78 mL de ácido acético glacial. O balão foi aferido com água bidestilada, sendo a solução estocada a 4°C até o momento do uso.

II) HCl 40 mmol.L⁻¹: Transferiram-se 3,34 mL de ácido clorídrico concentrado para um balão volumétrico de 1 L e aferiu-se o volume com água bidestilada. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

III) TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mmol.L⁻¹ em HCl 40 mmol.L⁻¹: 31,2 mg de TPTZ foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com HCl (40 mmol/L).

IV) FeCl₃.6H₂O 20 mmol/L: 540 mg de FeCl₃.6H₂O foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água bidestilada.

V) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$: 27,8 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado para 100 mL com água bidestilada. A partir da solução estoque de 1.000 mmol/L , foram feitas diluições (500 a 50 mmol.L^{-1}), para o preparo das curvas de calibração.

VI) Reagente FRAP: 25 mL do tampão de acetato (pH 3,6), 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol.L^{-1}), homogeneizado e armazenado a 4°C até o momento do uso.

VII) Preparo das amostras: As amostras foram analisadas nas concentrações 25 a 1.000 mg/L e os compostos puros, nas concentrações de $1,0$ a $0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$.

- Ensaio antioxidante ORAC

Para a realização deste ensaio, foi necessário o preparo das seguintes soluções:

I) Tampão ORAC (75 mM di-hidrogenofosfato de potássio, pH 7,4): 40,1 mL de K_2HPO_4 (1 mol.L^{-1}) em 9,9 mL de KH_2PO_4 (1 mol.L^{-1}) foram transferidos para um balão volumétrico de 500 mL, sendo completado o volume com água destilada.

II) Fluoresceína (A) Solução-estoque ($0,042 \text{ mmol.L}^{-1}$): 1,4 mg de fluoresceína foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL de cor âmbar e o volume foi completado para 100 mL com o tampão ORAC. A solução foi armazenada a 5°C . (B) Solução de trabalho ($0,21 \mu\text{mol.L}^{-1}$): 100 μL da solução-estoque de fluoresceína foram transferidos para um Erlenmeyer de 50 mL e, em seguida, foram adicionados 20 mL do tampão ORAC.

III) Trolox (A) Solução-estoque (10 mmol.L^{-1}): 25,03mg de Trolox foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado para 10 mL com DMSO. Alíquotas de 20 mL foram armazenadas em frascos tipo Eppendorf de 1 mL a -20°C . (B) Solução de trabalho ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$): As alíquotas de 20 μL da solução-estoque foram descongeladas e diluídas com 980 μL do tampão ORAC.

IV) AAPH $19,1 \text{ mmol.L}^{-1}$: 103,5 mg de AAPH solubilizados em 2 mL no tampão ORAC.

V) Preparo das amostras: As amostras foram analisadas em uma concentração única de 1.000 mg/L para os extratos e 1.000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para os compostos puros.

- Ensaio antioxidante hipoxantina/xantinaoxidase

Para a realização deste ensaio, foi necessário o preparo das seguintes soluções:
I) Tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,6: 38 mL de K_2HPO_4 1 mol.L^{-1} e 61,9 mL de KH_2PO_4 1 mol.L^{-1} foram transferidos para um balão volumétrico de 1L, que foi completado com água bidestilada.

II) Tampão do ensaio: 73,0 mg de EDTA; 32,7 mg de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$; 20,5 mg de hipoxantina e 138,0 mg de ácido salicílico foram transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e adicionados 19,05 mL 1 mol/L K_2HPO_4 e 30,95 mL 1 mol/L KH_2PO_4 , sendo o conjunto mantido sob agitação por 3 horas.

III) Preparo das amostras: As soluções de extratos na concentração de 10 mg/mL foram dissolvidas em metanol.

- Ensaio de inibição da enzima conversora da Angiotensina I

I) Preparo do HHL 5 mmol.L^{-1} : 21,95 mg do hipuril-histidil-leucina (Sigma-Adrich) foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com o tampão comercialmente disponível de 50 mmol.L^{-1} Tris-HCl (pH=8,3) contendo 0,3 mol.L^{-1} NaCl.

II) Preparo da enzima (100 mili U): A enzima ECA, concentrada em 2U, foi diluída para 2 mL de 50 mmol.L^{-1} Tris-HCl (pH=8,3), contendo 0,3 mol/L NaCl, sendo então divididos em frascos de Eppendorf e reservados na geladeira a -20°C .

III) Preparo do padrão positivo captopril (2 ng/mL): Pesou-se 0,02 mg de captopril, solubilizou-se em 5 mL de 50 mmol.L^{-1} Tris-HCl (pH=8,3), contendo 0,3 mol/L NaCl, realizando-se diluições sucessivas até a obtenção de 2×10^{-6} mg/mL.

- Ensaio de inibição da enzima Acetilcolinesterase

I) 50 mmol.L^{-1} Tris/HCl (pH= 8): Dissolvem-se 6,1 g de Tris (hidroximetil metilamina) em aproximadamente 700 mL de água destilada, ajustando o pH com a solução concentrada de HCL e completando o volume para 1 L

II) 50 mmol.L⁻¹Tris/HCl (pH= 8), contendo 0,1 mol/L de NaCl e 0,02 mol.L⁻¹ de MgCl₂.6H₂O: Utilizar 250 mL da solução (I) e adicionar 1,46 g de NaCl e 1,015 g de MgCl₂.6H₂O.

III) 1 mmol.L⁻¹ de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB ou Reagente de Ellman): 19,82 mg em 50 mL da solução (III).

IV) 1 mmol.L⁻¹ de iodeto de acetiltiocolina (ACTI): 14,46 mg em 50 mL de água millipore.

V) Preparo da enzima: A enzima AChE (Sigma Aldrich) seca foi dissolvida na solução tampão (I), para o preparo de uma solução estoque 1.000 U/mL, deixando-se a solução por 20 minutos. Em seguida, sob agitação, por mais um período de 10-15 minutos, para obtenção de uma solução homogênea.

VI) Preparo das amostras: Os extratos na concentração de 10 mg/mL, no solvente orgânico de interesse, e os compostos puros nas concentrações de 1 mg/mL.

4.2 Formação e combate dos compostos de glicação avançada (AGEs)

4.2.1 Descrição geral dos métodos desenvolvidos para a formação e combate dos produtos de glicação avançada (AGEs)

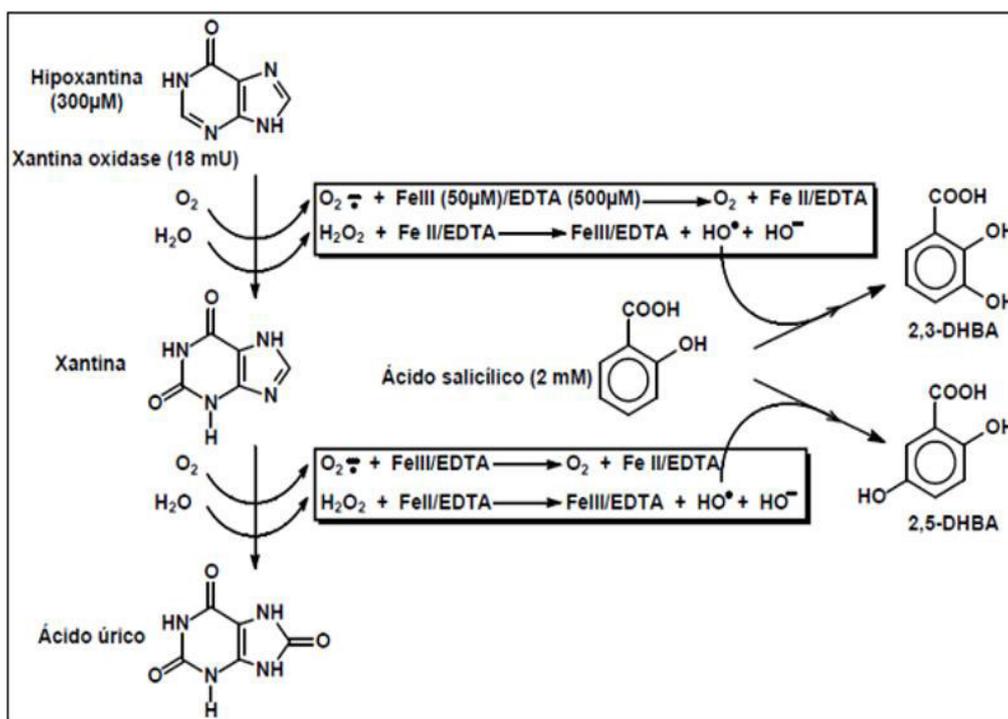
A descrição de Maillard demonstra que a reação entre os açúcares redutores em sua forma aberta (ou de compostos carbonílicos gerados na oxidação destes) com proteínas ou resíduos de aminoácidos, originam os compostos de Amadori que se convertem nos AGEs. Portanto, as metodologias apresentadas neste trabalho, consistem em inicialmente promover a reação de soluções de açúcares (glicose, frutose e galactose), com solução proteica de albumina de soro bovino (BSA) em diferentes meios reacionais. Posteriormente as soluções de açúcares, foram substituídas por compostos dicarbonílicos (glioxal-GO e metilglioxal-MG), adicionando ao sistema a enzima xantinaoxidase (XO), para promover a formação dos AGEs em meio reacional com excesso de radicais livres hidroxila ($\cdot\text{OH}$).

O sistema hipoxantina/xantinaoxidase é um método que promove a formação de radicais livres, devido ao processo de oxidação da hipoxantina à

ácido úrico, catalisado pela enzima xantina oxidase, conforme descrito e adaptado por Owen (2000) e colaboradores.

A ilustração deste processo está demonstrado na figura 16, na qual observa-se que medida que a hipoxantina sofre oxidação, o oxigênio e peróxido de hidrogênio produzidos, reagem com complexos de ferro/EDTA originando radicais livres do tipo hidroxila (HO^\bullet). Esta metodologia é utilizada para avaliar a capacidade de espécies químicas em atuar como antioxidantes em competição com o ácido salicílico, que ao reagir com os radicais hidroxila, origina os ácidos 2,3 e 2,5-dihidróxibenzoico (DHBA).

Figura 16 - Esquema representativo do ensaio antioxidante hipoxantina/xantina oxidase.

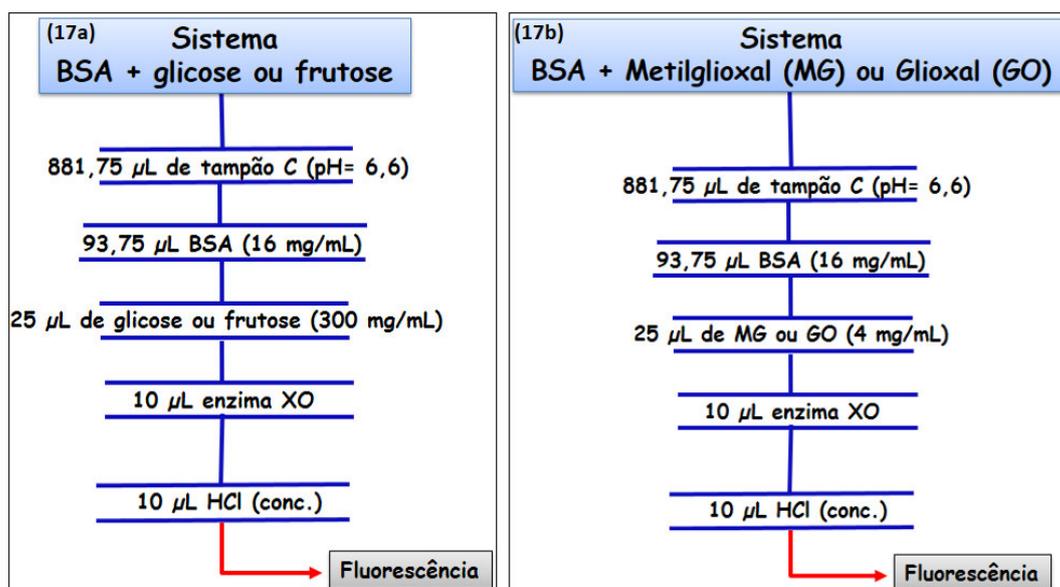


Fonte: Barreto, 2007.

A presença em excesso destes radicais durante a glicação e glicooxidação da proteína, pode promover a oxidação da cadeia de resíduos de aminoácidos da mesma, bem como dos açúcares e assim formar derivados dicarbonílicos de forma mais rápida, diminuindo significativamente o tempo do processo de glicação das proteínas. A formação qualitativa dos AGEs foi verificada através de mensuração por espectrofluorimetria, com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 350 a 450 nm respectivamente.

Os procedimentos finais desenvolvidos para obtenção dos AGEs utilizando a via reacional com os açúcares (glicose e frutose) ou com compostos dicarbonílicos metilglioxal (MG) e glioxal (GO), foram denominados respectivamente sistemas: Hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose e Hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO. Os fluxogramas abaixo representam graficamente os procedimentos acima descritos. No método em que os açúcares foram substituídos pelos compostos dicarbonílicos (glioxal e metilglioxal) reduziu-se o período de incubação de 48 para 3 horas. Os ensaios para combater a formação dos AGEs, incluíram os dois métodos (açúcares e compostos dicarbonílicos), porém adicionando diferentes concentrações de extratos de plantas e compostos puros ao sistema cujo processo será detalhado nos itens seguintes.

Figura 17 - Fluxogramas representativos dos principais processos desenvolvidos para a formação dos AGEs: (17a) sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose (17b) sistema hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO.



Fonte: Autor, 2017.

4.2.2 Formação de AGEs induzido pelo sistema Hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose

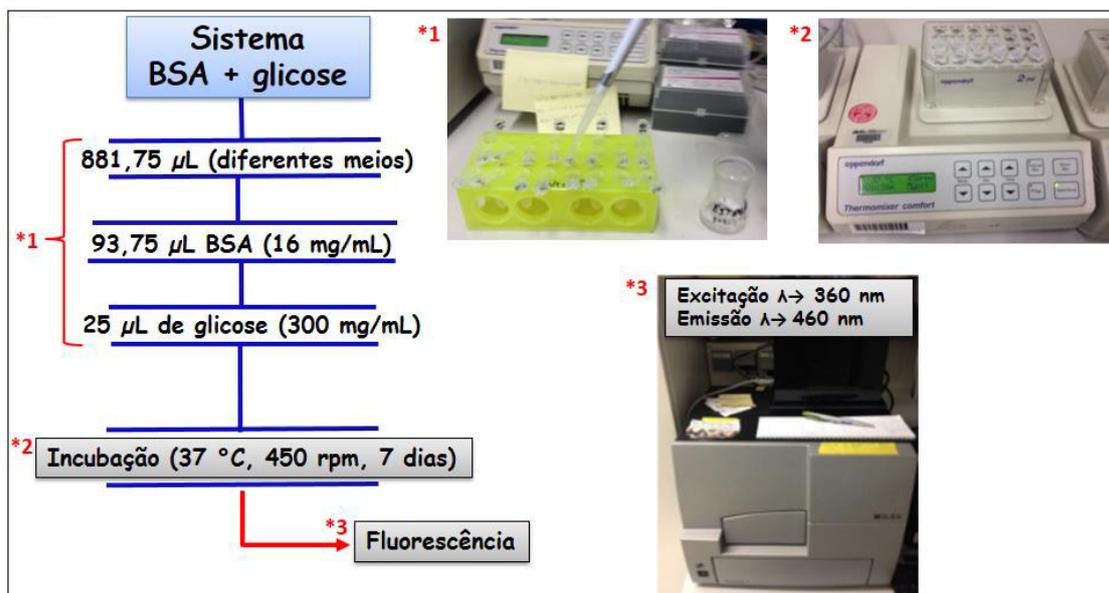
Para avaliar a formação dos AGEs, inicialmente foram testados quatro diferentes meios reacionais: solução de KH_2PO_4 (1 mol.L^{-1}), K_2HPO_4 (1 mol.L^{-1}), tampão Tris-HCl + $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl (pH 8,3), e tampão fosfato (**tampão A**) adicionado de ácido salicílico (500mL de solução: $19,05 \text{ mL } 1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$,

30,95 mL 1mol.L⁻¹ KH₂PO₄, 73 mg EDTA, 32,7 mg FeCl₃, 20,5 mg hipoxantina, 138 mg ácido salicílico, pH=6,6).

A mistura reacional continha 93,75 µL de albumina de soro bovino-BSA (16 mg/mL - Sigma Aldrich), 25 µL glicose (300 mg/mL - Sigma Aldrich) e 881,75 µL dos diferentes meios mencionados, introduzidos em eppendorfss (2,0 mL) previamente identificados. Todos os reagentes mencionados foram dissolvidos no meio (solução ou tampão) em análise.

A incubação ocorreu na ausência de luz, a 37 ° C, sob agitação constante (450 rpm) durante uma semana, que é o período de incubação utilizado na maioria dos procedimentos disponíveis atualmente na literatura. A medida da intensidade da fluorescência total dos AGEs foi realizada pela leitura de microplacas em um espectrofotômetro de fluorescência Cytoflour (Perspective Biosystems, Minnesota, USA) com excitação e emissão máxima em 360 e 460 nm respectivamente. As amostras foram produzidas em duplicata e a mensuração da fluorescência foi realizada em triplicata (figura 18).

Figura 18 -Esquema reacional desenvolvido para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose, utilizando diferentes meios avaliados sem a presença da enzima xantina/oxidase (XO).

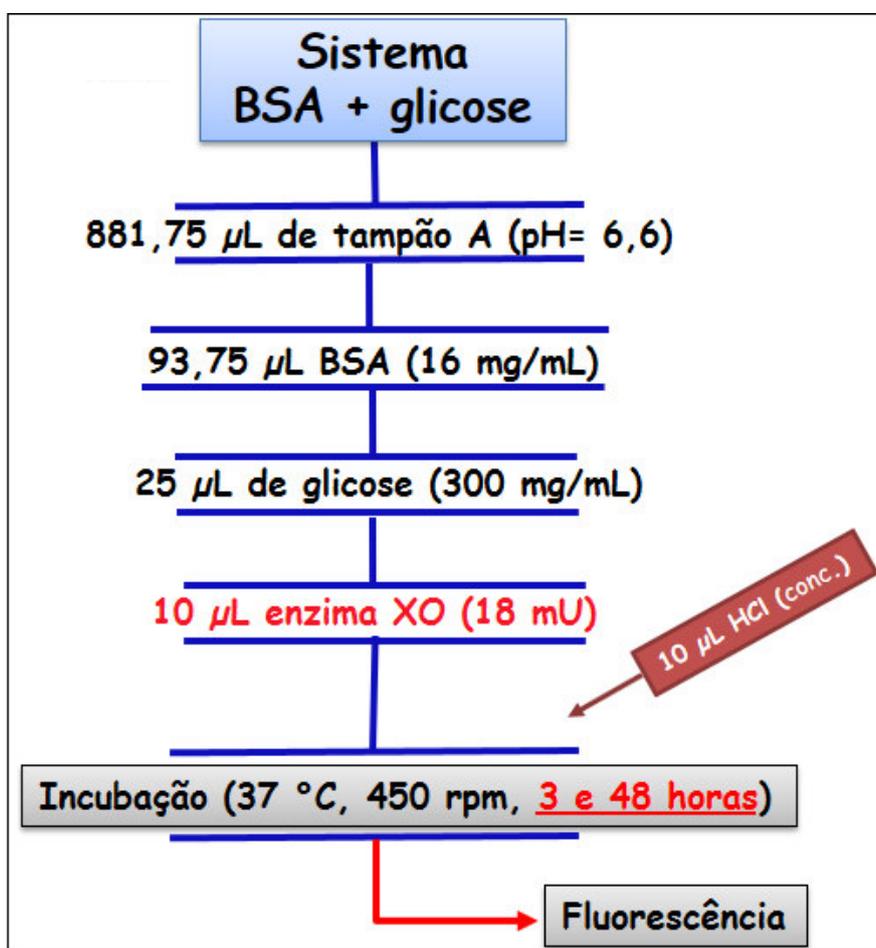


Fonte: Autor, 2017.

Após a verificação da formação dos AGEs em todos os meios avaliados, por meio de espectrofluorimetria, repetiu-se o mesmo procedimento descrito

anteriormente, porém adicionando-se 10 μL da enzima xantinaoxidase (18mU-Sigma Aldrich) às amostras, utilizando-se desta vez apenas o tampão fosfato acrescido de ácido salicílico pH= 6,6 (tampão A) como meio reacional (figura 19). Os períodos de incubação utilizados para estes procedimentos foram de 3 e 48 horas, sendo a finalização da reação, realizada através da adição de 10 μL de ácido clorídrico concentrado (Roth). A fluorescência das amostras foi mensurada conforme descrição anterior.

Figura 19 -Esquema reacional desenvolvido para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose, utilizando a enzima XO em tampão fosfato adicionado de ácido salicílico (tampão A).

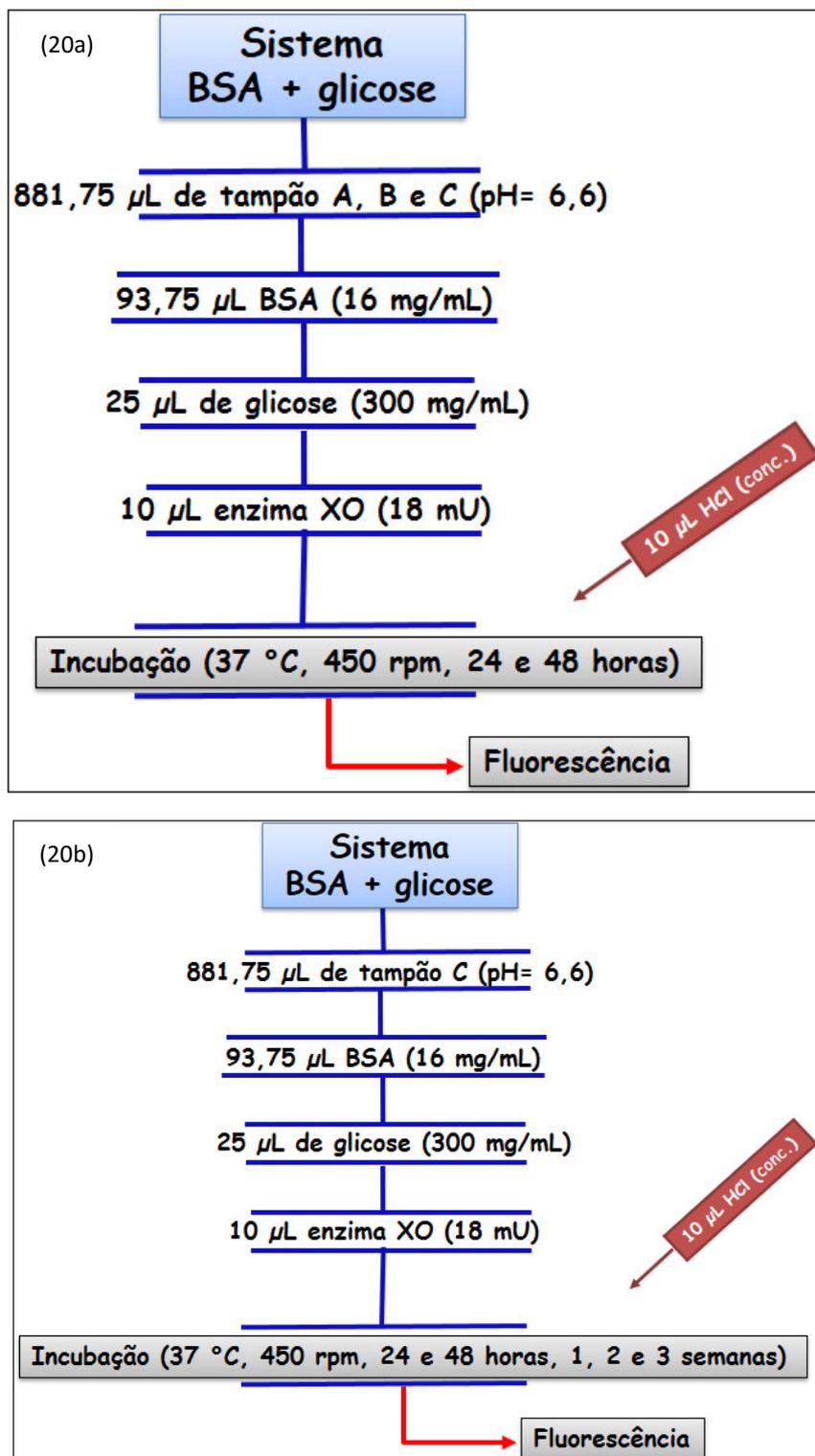


Fonte: Autor, 2017.

Após a verificação da eficácia do acoplamento do meio contendo a enzima xantinaoxidase (que promove a geração de radicais livres), este procedimento foi repetido utilizando-se 24 e 48 horas de incubação, porém, apenas com o tampão fosfato (pH= 6,6) em três distintas constituições (puro, com ácido cinâmico -AC- e com ácido salicílico – AS) como meio reacional. Foram

produzidos controles sem a presença da enzima XO, para posterior comparação da fluorescência (figura 20a).

Figura 20 -Fluxogramas representativos para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose: (20a) procedimento com tampão fosfato em diferentes composições (20b) procedimento com tampão fosfato puro (tampão C).

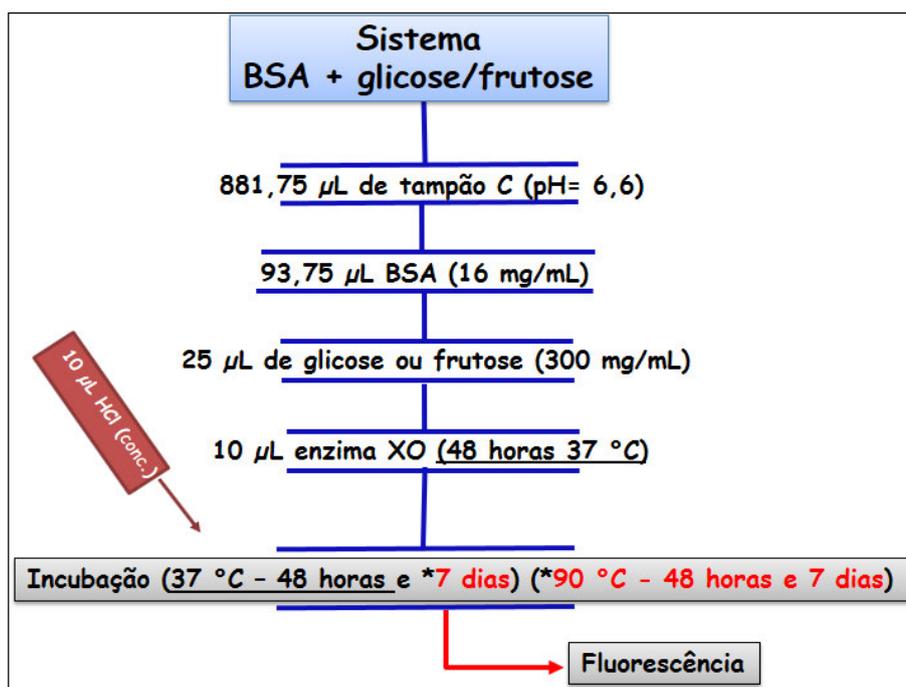


Fonte: Autor, 2017.

Devido a formação de compostos fluorescentes oriundos da reação dos ácidos salicílico e cinâmico com os radicais hidroxila, que promoveram interferências na mensuração da fluorescência dos AGEs, apenas o tampão fosfato puro (tampão C) foi utilizado para o prosseguimento dos demais experimentos. Estes foram realizados em diferentes intervalos de tempo (24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas) seguindo a metodologia anteriormente descrita (com enzima). Em todos os ensaios foram realizados controles sem a presença da enzima para posterior comparação (figura 20b).

Como forma de avaliar a reatividade de diferentes açúcares, foi realizada a substituição da mesma quantidade de glicose por frutose (300 mg/mL). Inicialmente o período de incubação foi de 48 horas (37 °C), sendo as amostras produzidas na presença e ausência da enzima XO. Este procedimento foi repetido com diferentes períodos de incubação e temperatura: uma semana (37 °C) e 48 horas (90 °C), sem a presença da enzima XO (figura 21). Devido ao elevado consumo de derivados de leite, também foi avaliada a formação de AGEs, substituindo glicose e frutose, por igual quantidade de galactose (Sigma-Aldrich), porém com apenas 24 horas de incubação (37 °C).

Figura 21 -Fluxograma representativo para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose em diferentes temperaturas (37 e 90 °C) e períodos de incubação (48 horas e 7 dias), na presença e ausência da enzima XO.



Fonte: Autor, 2017.

4.2.3 Formação de AGEs induzido pelo sistema Hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO

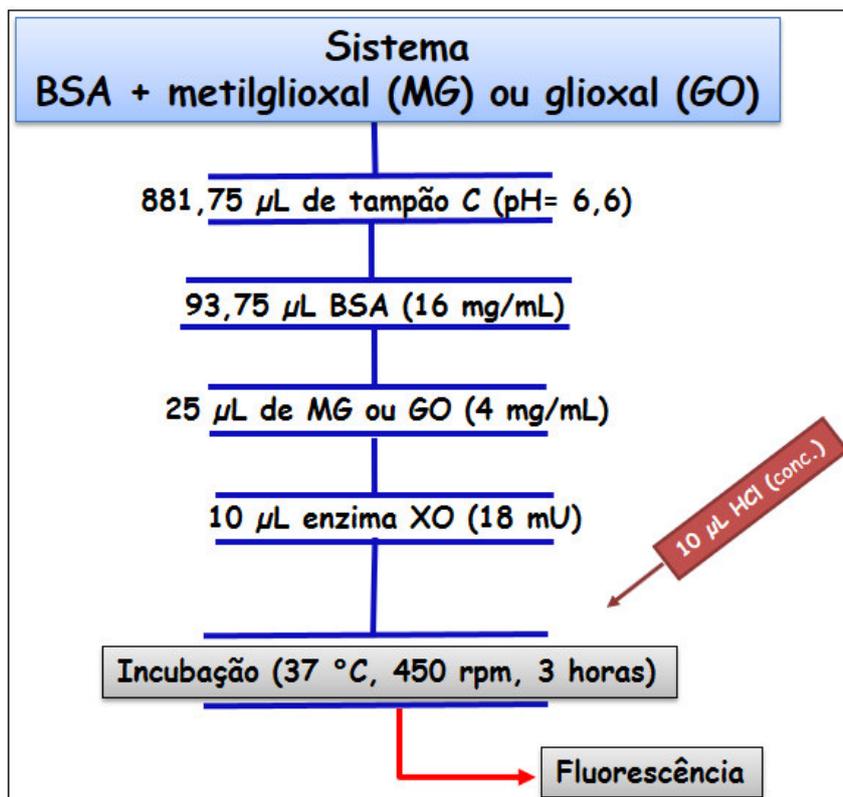
A reação entre os compostos dicarbonílicos tais como metilglioxal (MG) e glioxal (GO), com as proteínas ou resíduos de aminoácidos, promove o processo de glicação de maneira mais rápida que os açúcares em sua forma aberta. Quando em excesso no organismo humano (principalmente no decorrer de processos inflamatórios), estas espécies dicarbonílicas (MG e GO), geram um processo bioquímico conhecido como “stress dicarbonílico” que produz efeitos danosos ao ser humano em virtude do aumento dos AGEs.

Assim a metodologia proposta, consiste basicamente no mesmo procedimento descrito para glicose e frutose (açúcar+BSA+tampão+enzima), porém substituindo as soluções dos açúcares por igual quantidade (25 μ L) de GO e MG (Sigma-Aldrich) na concentração de 4,0 mg/mL, dissolvidos no tampão C (pH= 6,6).

Inicialmente foi determinada a fluorescência intrínseca de MG e GO utilizando uma curva de calibração, compreendida entre 0 e 400 mg de ambos, por mililitro de tampão C (pH= 6,6).

Em eppendorfs de 2,0 mL, foram adicionados 93,75 μ L de BSA (16 mg/mL), 25 μ L das soluções de MG e GO (4 mg/mL) e 881,75 μ L de tampão C (pH= 6,6). As amostras foram produzidas em duplicata e analisadas na presença e ausência de 10 μ L da enzima XO (18mU). Estas foram incubadas a 37 °C, sob 450 rotações por minuto, durante 3 horas. Foram produzidos controles substituindo o BSA por igual quantidade de tampão C (pH= 6,6), para verificação da fluorescência intrínseca de MG e GO na mistura reacional. O procedimento de finalização da reação (adição de 10 μ L de HCl concentrado) e determinação da fluorescência ocorreu do mesmo modo que nos ensaios com glicose e frutose. A ilustração 22 demonstra um esquema representativo para os métodos desenvolvidos.

Figura 22 -Fluxograma representativo para a formação dos AGEs via sistema hipoxantina/xantina-BSA-MG/GO utilizando 3 horas de incubação na presença da enzima XO.



Fonte: Autor, 2017.

Visando avaliar a linearidade dos processos com e sem a presença da enzima XO, foi realizado teste similar ao anterior, no qual variou-se a concentração da proteína (BSA 0 – 4 mg/mL) mantendo em 4 mg/mL a concentração de MG. As amostras foram avaliadas na presença e ausência da enzima XO, durante uma hora de incubação a 37 °C. Com este experimento buscou-se também, verificar a reprodutibilidade do método utilizando a enzima XO.

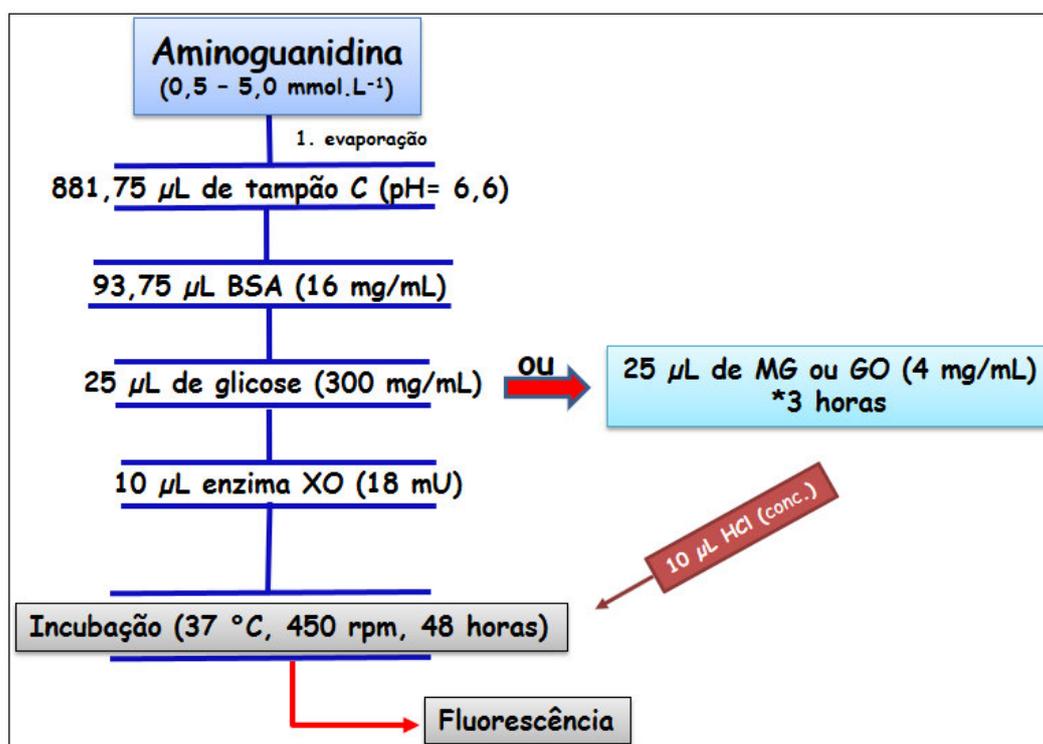
4.2.4 Métodos para combater a formação dos produtos de glicação avançada (AGEs)

Os procedimentos com glicose, MG e GO foram repetidos com o intuito de analisar a capacidade de diferentes classes de compostos (guanidinas, flavonóides e ácidos fenólicos) e extratos de plantas no combate a formação dos AGEs. Para isto, inseriu-se à mistura reacional, diferentes compostos puros (aminoguanidina, rutina e ácido clorogênico), bem como extratos metanólicos

das folhas, caules e frutos de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG) em concentrações variadas. Com esta técnica buscou-se evidenciar uma possível ação destas espécies químicas, como agentes de varredura dos compostos 1-2 dicarbonílicos (MG e GO), atuando como capturadores (capturadores de RCS) destas espécies, para formar adutos e assim diminuir a quantidade de AGEs formados (NILSSON,1999; THORNALLEY, 2003; LO et al., 2006; PENG et al., 2008; SHAO et al., 2008).

Como controle positivo para os métodos desenvolvidos com o intuito de combater a formação dos AGEs, foi utilizado cloridrato de aminoguanidina ($\text{CH}_6\text{N}_4\cdot\text{HCl}$) com 98% de pureza (Sigma Aldrich). Foram preparadas soluções metanólicas em diferentes concentrações ($0,5 - 5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Posteriormente foram adicionados 1 mL das referidas soluções aos eppendorfss (2,0 mL), seguida da remoção do solvente por evaporação a vácuo. Após completa evaporação do solvente, adicionou-se a todas as amostras a mesma composição reacional dos procedimentos desenvolvidos com glicose (48 horas) e com MG/GO (3 horas).

Figura 23 -Fluxograma representativo do processo desenvolvido para o combate a formação dos AGEs, utilizando aminoguanidina via sistemas hipoxantina/xantina-BSA-glicose e MG/GO.



Os mesmos procedimentos foram repetidos, porém substituindo aminoguanidina pelo flavonóide rutina e também por ácido clorogênico (Sigma Aldrich) em diferentes concentrações (250 – 2000 μ M).

Por fim, os extratos metanólicos das folhas, caule e frutos de HSG foram avaliados. Preparou-se soluções metanólicas (10 mg/mL) de todos os extratos mencionados e inseriu-se 0,5 mL (5 mg de extrato) destas, em eppendorfss de 2,0 mL, sendo o solvente removido por evaporação a vácuo. Logo após, a mistura reacional foi inserida no sistema (procedimento com glicose 48 horas) e as amostras avaliadas com e sem a presença da enzima XO.

Tendo em vista os resultados obtidos para os extratos de HSG, apenas o extrato metanólico das folhas foi considerado significativo, sendo escolhido para análise mais minuciosa. Os procedimentos para esta verificação foram os mesmos (glicose e MG/GO), porém utilizando diferentes quantidades do referido extrato (2,5 – 20 mg).

Foram ainda avaliadas, frações do extrato metanólico das folhas obtidas por fracionamento utilizando coluna SPE C₁₈ (CHROMABOND, 45 mL/5000 mg), em diferentes gradientes de eluição: ácido acético (2%); hexano; 5%, 10%, 25% e 50% de MeOH em ácido acético (2%). O objetivo foi identificar quais classes de substâncias, presentes em HSG, apresentavam maior atividade em combater os AGEs. Este ensaio ocorreu apenas com glicose, utilizando 5,0 mg das frações, somente com a enzima XO.

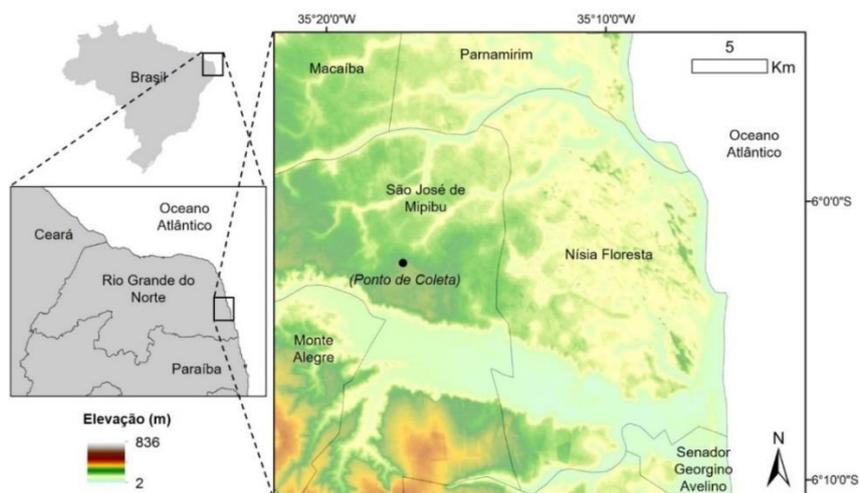
Em todos os procedimentos realizados (compostos puros ou extratos), as amostras foram centrifugadas (13000 rpm por 5 minutos) antes da determinação da fluorescência.

4.3 Propriedades farmacológicas e identificação química de HSG

4.3.1 Material Botânico

Amostras de caule (1750 g), folhas (1200 g) e frutos (1,150 g) foram coletadas pelo Administrador Rural aposentado (IDEMA-RN), Armando Marques Júnior, em 07 de abril de 2014 e 15 de abril de 2015, no distrito de Lagoa do Mato, localizado na cidade de São José de Mipibú situada na região agreste do estado do Rio Grande do Norte. O material coletado foi georreferenciado por um transceptor GPS, e estão localizados em um terreno pertencente a prefeitura municipal do município mencionado (Figura 24), sob coordenadas $6^{\circ}02'12.84''\text{S}$ e $35^{\circ}17'15.60''\text{O}$.

Figura 24 -Mapa indicativo da localização do ponto de coleta de HSG, no município de São José de Mipibu, Rio Grande do Norte.



Fonte: Autor, 2017.

A identificação e numeração do material vegetal colhido está depositado no Herbário Prisco Bezerra pertencente a Universidade Federal do Ceará (UFC), sob número de exsicata: 55710. A identificação foi realizada pela técnica Sarah Sued Gomes, pertencente ao Departamento de Biologia da UFC.

Como padrão comparativo foram obtidas amostras de caule (510 g) e folhas (450 g) de HSG fornecidas pela EMBRAPA-Ceará. Os materiais colhidos em sua totalidade não passaram por lavagem prévia e foram secos em uma estufa ventilada a 50°C , por 96 h. Foi realizada ainda uma triagem do material coletado com posterior moagem das folhas e frutos em um processador de

lâminas, enquanto os caules foram processados em uma forrageira previamente limpa.

4.3.2 Preparo dos extratos

Para obtenção dos extratos de folhas e caules foram utilizados dois métodos de extração: via soxhlet (a quente) e extração a frio, enquanto que nos frutos apenas a extração a quente foi utilizada.

4.3.2.1 Extração via soxhlet (a quente)

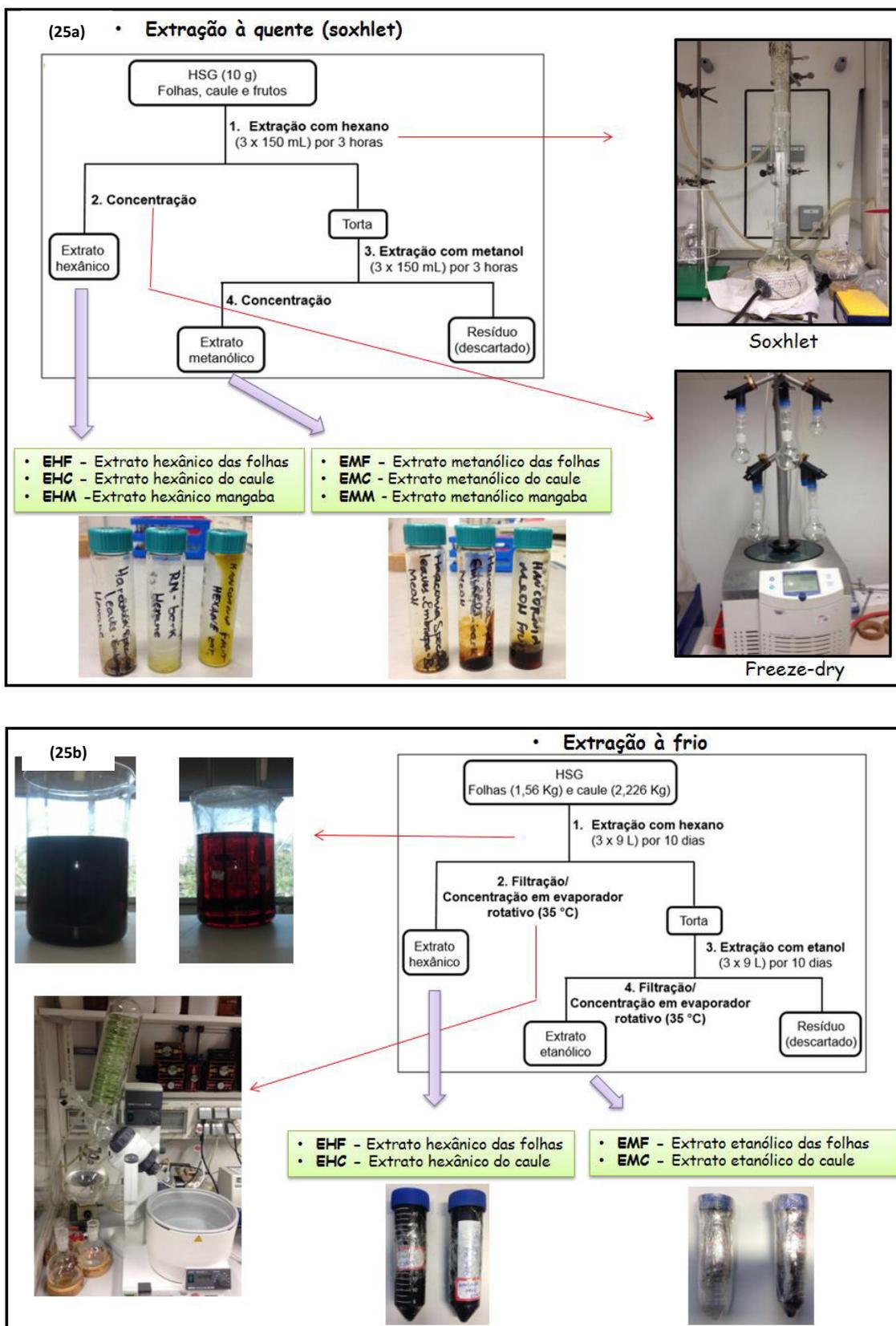
Os extratos das folhas, caule e frutos foram obtidos utilizando um sistema soxhlet (100 mL). Neste, adicionou-se 10 gramas secas e trituradas, dos materiais anteriormente mencionados em um tubo de celulose (25 x 100 mm), que foram inseridos no sistema contendo inicialmente 150 mL de hexano (Sigma-Aldrich) num balão de fundo redondo que foi aquecido com o auxílio de uma manta aquecedora. O sistema permaneceu em funcionamento por 3 horas. O solvente foi removido em evaporador rotativo sob pressão reduzida e posteriormente seco em speed vácuo. O procedimento foi repetido por três vezes com hexano e em seguida realizado da mesma maneira com metanol (Sigma-Aldrich), sendo então obtidos os extratos hexânicos e metanólicos das folhas, caules e frutos de HSG. Após a secagem total dos extratos foram calculados os rendimentos.

4.3.2.2 Extração a frio

Depois de totalmente secos e triturados, foram adicionados 1,56 kg das folhas e 2,226 Kg dos caules de HSG em dois recipientes de vidro nos quais foram submetidos à extração a frio com hexano (3x 9 L) e em seguida com etanol (3 x 9 L). Durante cada extração o material permaneceu em suspensão nos solventes durante 10 dias. As soluções obtidas foram filtradas e logo após concentradas por evaporação rotativa sob pressão reduzida a 35 °C, sendo mantidas em banho-maria até eliminação completa dos solventes.

As ilustrações abaixo (figuras 25a, 25b) demonstram simplificada os dois procedimentos de extração realizados.

Figura 25 - Fluxogramas para os processos de obtenção dos extratos (25a) soxhlet (25b) extração a frio.



Fonte: Autor, 2017.

4.3.3 Fracionamento cromatográfico dos extratos via SPE

500 mg dos extratos metanólicos das folhas, caules e frutos de HSG foram fracionados utilizando coluna SPE C₁₈ (Sílica de octadecil-modificada, CHROMABOND, 45 mL/5000 mg). Inicialmente utilizando tubos de falcon, os extratos foram dissolvidos em 50 mL de solução contendo ácido acético a 2% (AA 2%) com o auxílio de um agitador magnético e ultrassom. A dissolução inicial em ácido acético foi escolhida para promover uma melhor dissolução das espécies polares presentes no extrato. Em seguida, após 3 minutos de agitação com o auxílio de um vortex (Genie – 2), o sistema foi centrifugado por 20 minutos a 5000 RPM. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de falcon com o auxílio de uma pipeta descartável e o precipitado descartado.

Em seguida a coluna SPE foi inserida num sistema de vácuo e ativada através da lenta eluição de 50 mL de metanol (Sigma-Aldrich) e posteriormente o mesmo volume de água bidestilada.

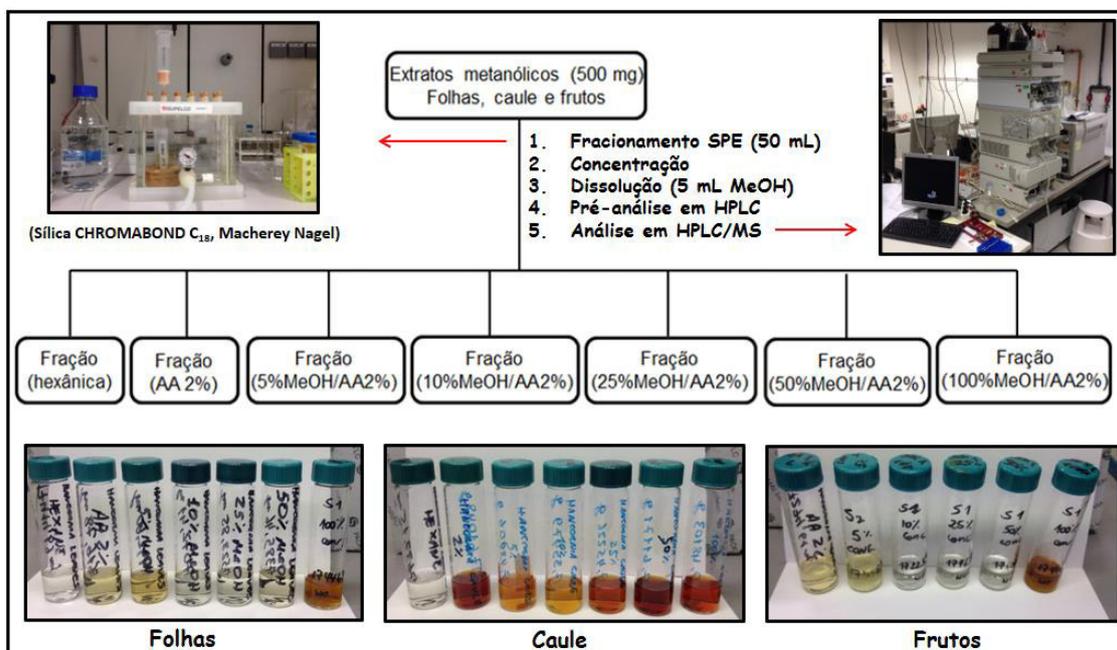
Após ativação, as soluções contendo os extratos (AA 2%) foram aplicadas ao cartucho, e em seguida eluidas lentamente através das colunas. Assim foram obtidas 7 frações distintas usando gradiente de eluição com 50 mL de hexano, 5% de metanol em ácido acético 2%, 10% de metanol em ácido acético 2%, 25% de metanol em ácido acético 2%, 50% de metanol em ácido acético 2% e 100% de metanol.

A fração hexânica foi reservada e as demais foram pré-analisadas em HPLC. Em seguida as frações obtidas foram secas por speed vácuo e após finalizado este processo foram todas redissolvidas em 3 mL de metanol e analisadas novamente em HPLC-MS (figura 26).

Após análise inicial em HPLC, para o isolamento dos compostos de interesse do extrato etanólico do caule, utilizou-se a técnica de extração por solventes. Inicialmente, com o auxílio de um agitador magnético, cinco gramas do extrato do caule foram dissolvidos em 200 mL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 6%, para remoção de compostos com menor acidez (taninos e alguns ácidos fenólicos). Após homogeneização, a solução obtida foi inserida num funil de decantação de 500 mL e adicionado 100 ml de diclorometano

(CH₂Cl₂) seguido de agitação. Este procedimento com diclorometano foi repetido por três vezes sendo sempre a fase inferior removida do funil.

Figura 26 - Fluxograma ilustrativo para o fracionamento dos extratos de HSG (folhas, caule e frutos) via coluna SPE (C₁₈).



Fonte: Autor, 2017.

Em seguida a fase superior foi transferida para um béquer de 500 mL e o sistema foi conectado a um pHmetro digital. Foi adicionada quantidade suficiente de ácido clorídrico (HCl) a 37% até pH= 4, com o intuito de restaurar a forma ácida dos compostos, após extração básica com bicarbonato de sódio a 6%. Esta solução retornou para o funil de separação e passou por extrações com acetato de etila (3 x 100 mL) sendo removida a fase inferior. Por fim removeu-se a água com adição de sulfato de sódio anidro e o solvente foi vaporizado com rotaevaporador rotativo (BARRETO et al., 2008). O material obtido foi fracionado via SPE conforme descrito anteriormente.

4.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” (HPLC-IES-EM)

As amostras de folhas, caules e frutos de HSG foram analisadas em um cromatógrafo líquido Hewlett Packard série 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com coluna de fase reversa (C-18) com dimensões de 25 x 0,46 cm (Phenomenex Ltd, Aschaffenberg, Alemanha) e

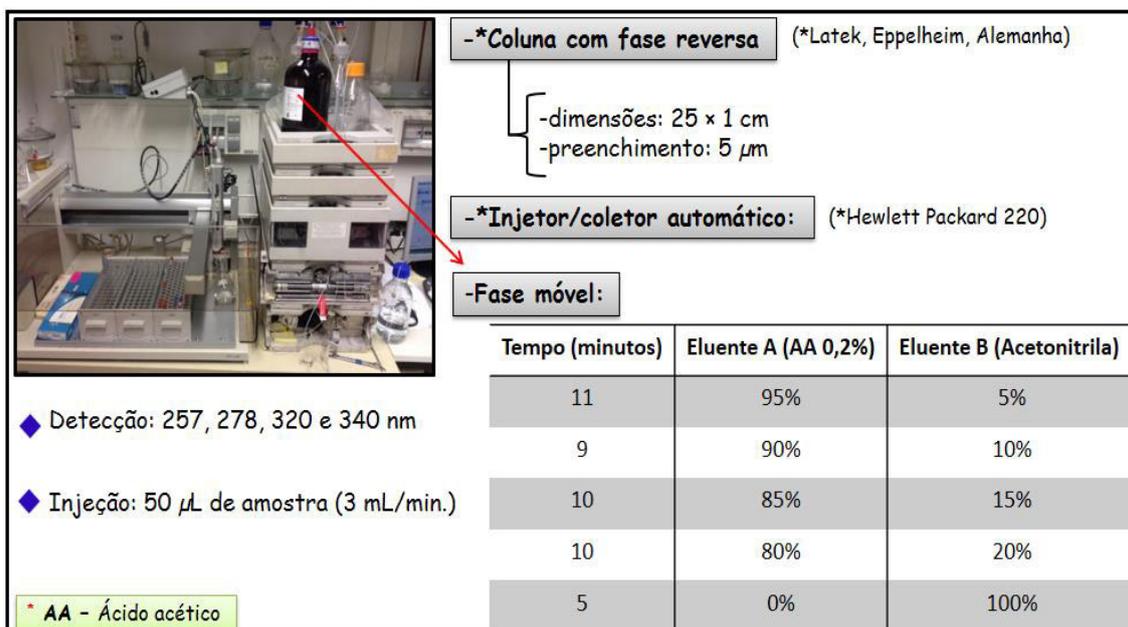
acoplado a um espectrômetro de massas de quadrupolo simples Hewlett Packard série 1101 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) operando com ionização por “electrospray”. Os espectros de massas foram gerados no modo negativo. A taxa de fluxo de solvente foi de 1 mL/min e injeção de 10 µL, os compostos foram detectados nos comprimentos de onda 257, 278, 320 e 340 nm à temperatura ambiente. A fase móvel consistiu em solução 2% de ácido acético em água (solvente A) e metanol (solvente B) com o seguinte perfil de gradiente: inicialmente 95% de A por 2,0 min; para 75% de A durante 10min; para 60% de A durante 10 min; para 50% de A durante 10min; para 100% de A durante 10 min; para 0% de A durante 5 min e continuando com 0%B de até o final do experimento.

O segundo método consistiu de uma fase móvel de 2% de ácido acético em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) seguindo o seguinte perfil de gradiente: inicialmente 95% de A por 10 min; para 90% de A durante 1min; para 60% de A durante 9 min; para 80% de A durante 10min; para 60% de A durante 10 min; para 0% de A durante 5 min e continuando com 0% de até o final do experimento. Os espectros de massas no modo de ionização negativo foram gerados sob as seguintes condições: voltagem do fragmentador = 100 V, voltagem do capilar = 2500 V, pressão do nebulizador = 30 psi, temperatura do gás secante = 350 °C, faixa de detecção de massas 100 – 1500 D.

4.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semi-preparativa (HPLC-semi-preparativo)

As purificações cromatográficas semi-preparativas para as amostras de folhas, caule e frutos de HSG foram realizadas em um cromatógrafo líquido Hewlett Packard série 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com coluna de fase normal (sílica) (Latek, Eppenheim, Alemanha) com dimensões de 25 x 1 cm (Latek, Eppenheim, Alemanha) e acoplado a um injetor/coletor de amostras automático Hewlett Packard 220 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A detecção foi realizada com um detector de arranjo de diodos (UV) nos comprimentos de onda 257, 278, 320 e 340nm, fluxo de solvente foi 3 mL/min, e injeção de 50µL (figura 27). Cada fração colhida foi agrupada e o solvente removido via speed vácuo.

Figura 27 -Cromatógrafo semi-preparativo acoplado a injetor/coletor automático de amostras, utilizado para o fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas, caule e frutos de HSG.



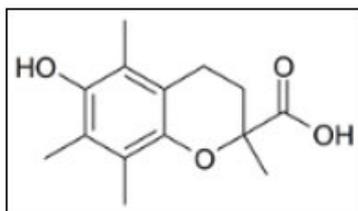
Fonte: Autor, 2017.

Para a purificação dos compostos selecionados nos extratos na espécie de *Hancornia speciosa* Gomes, a fase móvel utilizada consistiu de solução aquosa 0,2% de ácido acético (solvente A) e acetonitrila (solvente B), utilizando a seguinte gradiente de eluição, com um tempo total de experimento de 45 minutos: 95%A:5%B por onze minutos, 90%A:10%B por nove minutos, 85%A:15% B por dez minutos, 80% A: 20% B por dez minutos e 0% A: 100% B até o tempo final do experimento.

4.3.6 Potencial Antioxidante

Em todos os ensaios realizados para avaliação do poder antioxidante dos extratos e alguns compostos puros identificados em HSG, foi utilizado Trolox®, forma sintética e solúvel da vitamina E, como padrão comparativo, por se tratar de um composto com ação antioxidante significativa e já conhecida (TREVISAN et al., 2006).

Figura 28-Estrutura química do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico), forma solúvel e sintética da vitamina E.

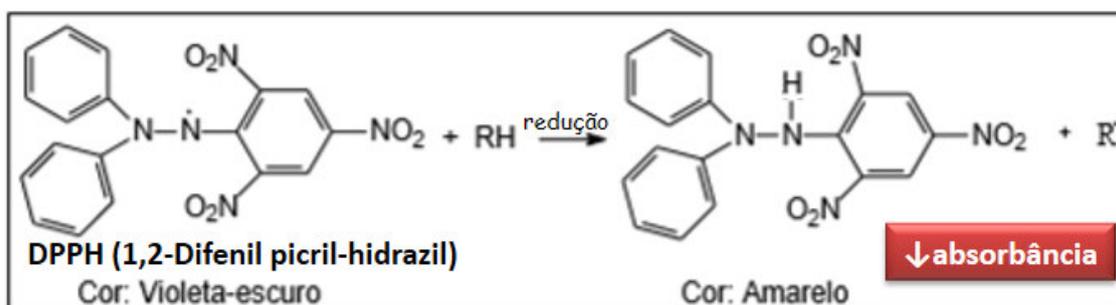


Fonte: <http://www.wikiwand.com/en/Trolox>

4.3.6.1 Ensaio Antioxidante frente ao radical livre DPPH

O método utilizado para determinação do potencial DPPH utilizou metodologia proposta por Silva et al. (2006). Trata-se de um método colorimétrico que analisa a capacidade quantitativa das espécies em capturar os radicais livres DPPH (1,2-difenil picril-hidrazil), oriundos de uma fonte sintética, promovendo assim o decréscimo da absorbância a 515nm. A técnica baseia-se na diminuição da absorbância causada pela redução do radical DPPH, por ação de uma espécie antioxidante, que promove o descoramento da solução de violeta para amarelo (figura 29).

Figura 29 - Representação esquemática para captura (redução) do radical livre DPPH que promove a descoloração da solução e diminuição da absorbância.



Fonte: adaptado de Oliveira, 2015.

Os extratos de HSG (folhas, caules e frutos) e compostos purificados foram diluídos em metanol nas concentrações 0,01-1,0 mmol.L⁻¹. 20 µL de diferentes concentrações dos extratos e dos compostos puros foram adicionados em placas de 96 poços em duplicata. A reação foi iniciada após a adição 180 µL da solução de DPPH (20 µg/mL em metanol). Todo este procedimento foi realizado em ambiente com pouca luminosidade.

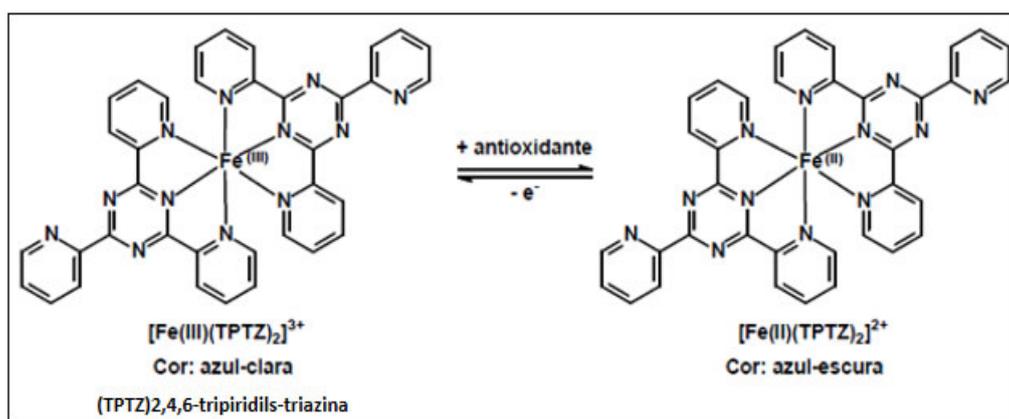
A absorbância foi mensurada após 10 minutos do início da reação, em um equipamento Universal micro plate reader (Elx 800 Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) versus uma solução controle de DPPH.

A concentração de DPPH foi calculada a partir de uma curva padrão de DPPH entre 1-1000 $\mu\text{g/mL}$ medidas simultaneamente. Para o cálculo da determinação do IC_{50} (Concentração provinda da inibição de 50% do radical livre DPPH) de cada amostra foi utilizado o programa Table curve (Jandel Scientific, Chicago, IL). Portanto quanto menor o valor de IC_{50} , maior será o potencial antioxidante apresentado pela espécie analisada.

4.3.6.2 Potencial Antioxidante FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Método baseado na capacidade dos metabólitos em promover a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} . Quando este processo ocorre na presença do 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ), ocorre inicialmente a formação de um complexo de $\text{Fe}^{3+}/\text{TPTZ}$ que apresenta coloração azul clara. Com a formação de $\text{Fe}^{2+}/\text{TPTZ}$ (redução provocada por espécies antioxidantes) a solução adquire coloração azul escura, conforme demonstrado na figura 29. Para determinação deste parâmetro utilizou-se metodologia proposta por Pulido et al., (2000).

Figura 30 - Representação para reação de redução do complexo de $\text{Fe}^{3+}/\text{TPTZ}$ via ensaio FRAP.



Fonte: adaptado de Oliveira, 2015.

Os extratos metanólicos e compostos puros de HSG foram inicialmente diluídos nas concentrações de 0,01-1,0 mmol.L^{-1} . Dez μL das diferentes concentrações foram incubadas com 30 μL de água bidestilada e 300 μL do reagente FRAP consistindo 25 mL tampão de acetato (300 mmol.L^{-1} de acetato

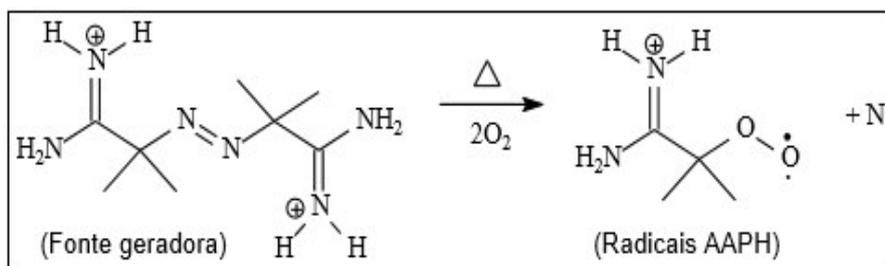
de sódio, pH=3,6), 2,5 mL TPTZ (10 mmol.L⁻¹ TPTZ em 40 mmol.L⁻¹ de HCl) e 2,5mL de cloreto férrico (FeCl₃) a 37°C antes de mensurar. Todos os reagentes foram preparados no momento da realização do experimento. Também foi utilizada uma curva analítica de sulfato ferroso (0,01-1,0 mmol.L⁻¹) e os resultados expressos em mM de Fe²⁺/L.

A reação foi mensurada a 595nm, em um equipamento Universal micro plate reade (Elx 800 Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) depois de um tempo de um tempo de repouso de 5 minutos. Usando a curva de regressão linear foi calculado os valores de concentração equivalente (EC), valores são dados para a concentração do antioxidante (μmol.L⁻¹), para a absorbância equivalente a 1 mmol.L⁻¹ da solução de Fe⁺². Logo, quanto menor o valor de EC maior será o potencial antioxidante da espécie em análise.

4.3.6.3 Potencial Antioxidante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Esta metodologia proposta por Huang et al. (2002), determina a capacidade dos metabólitos com potencial antioxidante em sequestrar radicais peroxilas que são gerados por uma fonte radicalar de APPH [di-hidrocloro de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)] e tendo a fluoresceína (0,21 μmol.L⁻¹ em tampão ORAC) como indicador redox. O princípio da técnica baseia-se na reação dos radicais peroxil gerados com a fluoresceína, promovendo o decaimento da fluorescência em virtude da transformação do indicador em outras substâncias não fluorescente. Quanto maior a capacidade antioxidante da espécie avaliada, menor será a conversão da fluoresceína, ocorrendo assim a preservação da fluorescência.

Figura 31 - Reação de formação dos radicais AAPH, a partir de uma fonte geradora sintética.



Fonte: adaptado de Oliveira, 2015.

Uma solução estoque de Trolox em DMSO (10 mmol.L^{-1}), foi diluída na solução tampão de ORAC para um concentração de $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. A solução tampão de ORAC contém 75 mmol.L^{-1} de fosfato hidrogeno dissódico $\text{pH}=7,4$. Todos os reagentes foram preparados e imediatamente utilizados.

Dez μL das soluções das amostras, tampão e Trolox foram colocadas em placas de 96 poços em quadruplicata, juntamente com $170 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de fluoresceína ($0,21 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) e incubadas por 10 minutos à $37 \text{ } ^\circ\text{C}$. A reação foi iniciada ao adicionar $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de APPH ($51,75 \text{ mg/mL}$) recém preparada no tampão ORAC.

O declínio da fluoresceína foi medida a 37°C de 2 em 2 minutos, até completar 122 minutos, utilizando uma leitora de microplaca de fluorescência Cytoflour 4000 (excitação em $530/25 \text{ nm}$, emissão em $585/30 \text{ nm}$) (Perspective Biosystems, Minnesota, USA).

A quantificação do ORAC foi obtida, ao final da reação, usando a equação de regressão entre a concentração do Trolox e da “área sob a curva” (AUC), expressa em unidades de ORAC, onde 1 unidade de ORAC equivale ao declínio produzido por $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trolox. Quanto menor o número de unidades ORAC, maior será a ação antioxidante da espécie avaliada.

A queda na fluorescência indica a extensão da conversão do agente redox (fluoresceína), em outras espécies químicas não fluorescentes, provocada pela sua reação com os radicais peroxil gerados a partir da fonte de APPH. O efeito protetor de uma amostra contendo antioxidante é mensurado pelo cálculo da área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra comparando-se com a de uma amostra “branco”, sem nenhuma substância antioxidante presente, apenas contendo o tampão ORAC. O ensaio ORAC permite o monitoramento do tempo e do grau de inibição durante o andamento da reação.

4.3.6.4 Avaliação da Atividade Antioxidante frente a enzima Hipoxantina/Xantina oxidase

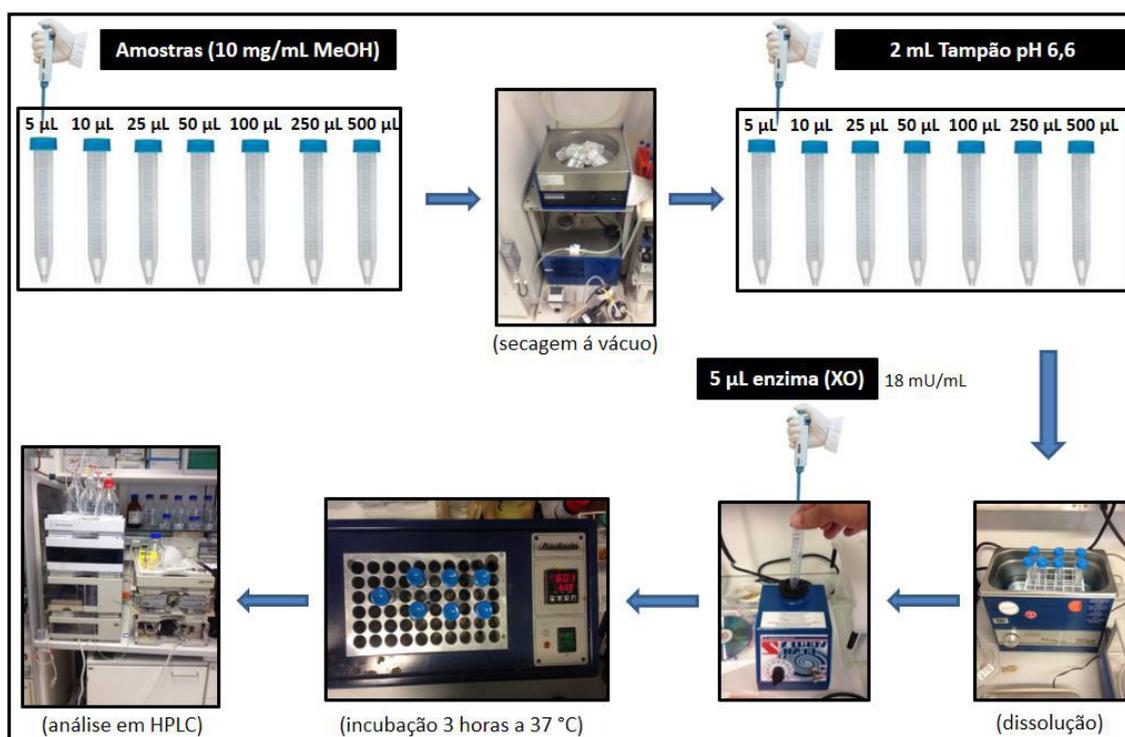
Para o ensaio da hipoxantina/xantina oxidase utilizou-se o método descrito e adaptado por Owen et al., (2000). Este método avalia a capacidade de espécies com poder antioxidante em competir com o ácido salicílico na

captura dos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), gerados no processo de oxidação da hipoxantina a ácido úrico, por ação da enzima xantina oxidase, conforme demonstrado anteriormente na figura 16 (pag. 54) durante descrição da metodologia para obtenção dos AGEs.

Soluções dos extratos metanólicos de folhas, caule e frutos de HSG (10 mg/mL) foram dissolvidos em metanol. Em seguida utilizando tubos plásticos do tipo Falcon de 10 mL adicionou-se quantidades diferentes da solução dos extratos previamente preparados: 5 μL , 10 μL , 25 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL e 500 μL , todos em duplicata. Após secagem total utilizando secagem à vácuo, adicionou-se 2,0 mL de solução tampão fosfato (pH=6.6) adicionado de ácido salicílico (500mL de solução: 19,05 mL 1M K_2HPO_4 , 30,95 mL 1M KH_2PO_4 , 73 mg EDTA, 32,7 mg FeCl_3 , 20,5 mg hipoxantina, 138 mg ácido salicílico). Utilizando um ultra som, os extratos foram completamente dissolvidos no tampão. Após a completa solubilização, adicionou-se a enzima xantina oxidase (5 μL) nas diferentes frações e os tubos foram incubados a 37 °C durante três horas numa chapa aquecedora. Após a incubação foram adicionados 10 μL de ácido clorídrico concentrado para finalizar a reação. Retirou-se uma alíquota de 1,0 mL das amostras que foram centrifugadas por 5 minutos à 13000 rpm. Posteriormente retirou-se 100 μL do sobrenadante para injeção (20 μL) no HPLC (figura 32).

A análise da mistura reacional foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e foi conduzida no aparelho Hewlett-Packard (HP) 1090, com os seguintes parâmetros: o detector UV foi ajustado a 325 nm para a detecção dos produtos da reação (ácidos 2,5-diidroxibenzóico e 2,3-diidroxibenzóico) produzidos pelo ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) ao ácido salicílico. Desta forma, quanto menor for a formação dos ácidos 2,5-diidroxibenzóico e 2,3-diidroxibenzóico (oriundos da reação dos radicais hidroxila com o ácido salicílico) maior será atividade antioxidante da espécie em análise.

Figura 32 - Fluxograma esquemático para o ensaio antioxidante hipoxantina/xantinaoxidase.



Fonte: Autor, 2017.

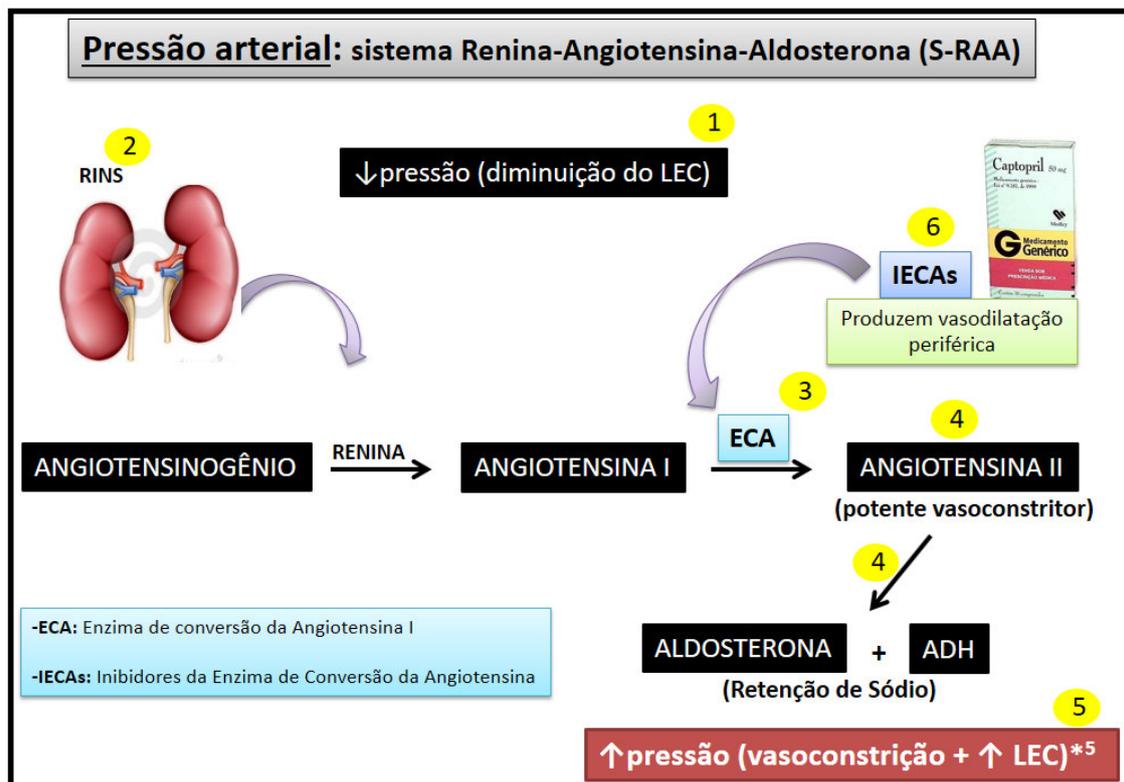
A fase móvel utilizada consistiu em solução aquosa 2% de ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B), seguindo o seguinte gradiente e tempo de eluição total de 45 min: inicialmente 95% A: 5% B por dois minutos, 75% A: 25% B por oito minutos, 60% A: 40% B por dez minutos, 50% A: 50% B por dez minutos e 0% A: 100% B até o tempo final do experimento. A taxa de fluxo da fase móvel foi 1,0 mL/minuto. As quantidades de difenóis produzidos foram calculadas a partir de curvas padrões de ambos difenóis- ácidos 2,5-diidroxibenzóico e 2,3-diidroxibenzóico- construídas a partir de cromatogramas obtidos a 325 nm, em concentrações de 0 a 1 mmol.L⁻¹. O tratamento dos dados foi realizado com um software HP Chemstation em um PC.

4.3.7 Ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (ACE)

A capacidade de inibição da enzima conversora da angiotensina I, está relacionada a eficácia de um determinado material em atuar como medicamento anti-hipertensivo. Dentro deste contexto, a “pressão normal” (pressão arterial) do

organismo humano é mantida pelo sistema: Renina-Angiotensina-Aldosterona (S-RAA), conforme indicado na ilustração 33. Quando ocorre uma queda da pressão normal, em virtude da diminuição do líquido extra-celular (LEC), o sistema S-RAA é ativado (1). Assim, os rins estimulam a formação de renina, que catalisa a conversão do substrato angiotensinogênio em angiotensina I (2). A angiotensina I é transformada em um potente vasoconstritor, a angiotensina II (3), por ação das enzimas conversoras da angiotensina I (ECA). Em seguida, a angiotensina II produz aldosterona e ADH, promovendo a retenção de sódio (4). A vasoconstrição somada a retenção de sódio, re-estabelecem o volume do LEC, provocando desta maneira, a reestabilização da “pressão normal” (5).

Figura 33 - Representação esquemática para o sistema regulador da pressão normal (arterial) e capacidade anti-hipertensiva de fármacos inibidores de ECA (IECAs).



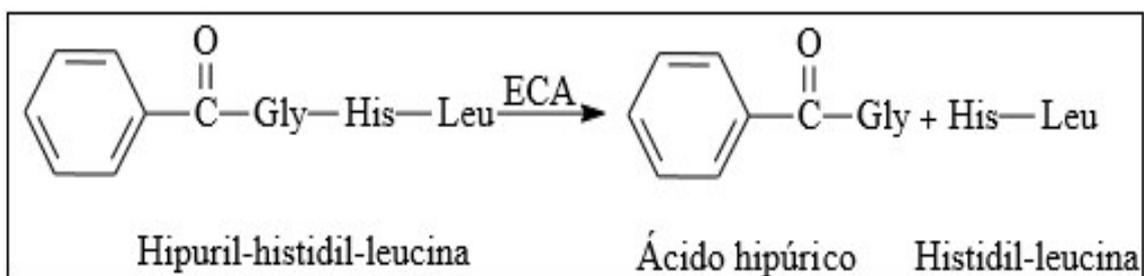
Fonte: autor, 2017.

Porém, considerando indivíduos com quadros hipertensivos, estes já possuem a pressão arterial naturalmente elevada. Assim, os principais fármacos disponíveis atualmente no mercado (por exemplo o Captopril®), consistem em espécies químicas que atuam como inibidores das enzimas de conversão da

angiotensina I (IECAs), produzindo vasodilatação periférica e conseqüentemente redução da pressão arterial (6).

O ensaio da inibição da enzima de conversão da angiotensina I, foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por Lahogue et al., (2010). Este ensaio baseia-se na formação de ácido hipúrico a partir do substrato hipuril-histidil-leucina (HLL), por ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) isolada de pulmões de coelho. Caso uma amostra tenha a capacidade de inibir a ação desta enzima, não ocorrerá a formação de ácido hipúrico. Desta forma, quanto menor for a formação de ácido hipúrico, maior será a capacidade anti-hipertensiva da espécie avaliada.

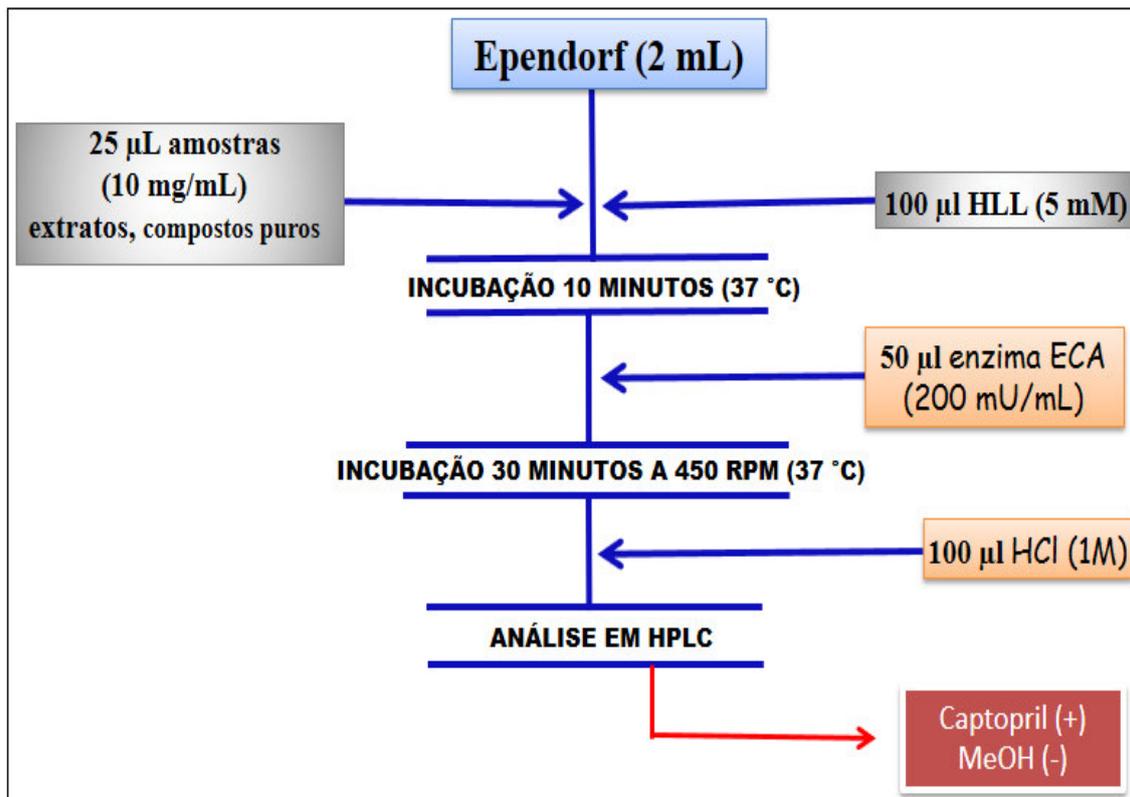
Figura 34 - Reação de formação do ácido hipúrico a partir de hipuril-histidil-leucina, catalisada pela enzima conversora da angiotensina I (ECA).



Fonte: adaptado de Oliveira, 2015.

O substrato hipuril-histidil-leucina HHL (5 mmol.L^{-1} -2,15 mg/mL) foi dissolvido em 50 mmol.L^{-1} do tampão Tris-HCl (pH 8,3) contendo $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl. $50 \mu\text{L}$ das soluções dos extratos etanólicos de folhas, caule e frutos de HSG (10mg/mL) e compostos puros isolados (1mg/mL) foram adicionadas as soluções de substrato ($100\mu\text{L}$) e incubados a 37°C por 10 minutos. A solução da enzima de ACE ($200 \text{ milliunidades/mL}$) em 50 mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 8.3 contendo $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl, adicionado e incubado a 37°C por 30 minutos, com agitação contínua a 450 rpm. A reação foi finalizada ao adicionar ácido clorídrico (HCl) 1 mol.L^{-1} ($100 \mu\text{L}$). Somente para as amostras de folhas e caule foram calculados os valores referentes ao IC_{50} , tendo em vista que somente estas apresentaram inibição da enzima maior que 60%.

Figura 35 - Fluxograma para o ensaio de inibição da enzima conversora da angiotensina I (capacidade anti hipertensiva).



Fonte: autor, 2017.

O medicamento anti-hipertensivo Captopril foi usado como controle positivo na concentração de 2ng/mL e metanol (Sigma-Aldrich) utilizado como controle negativo. Após incubação e adição de HCl as amostras foram analisadas em HPLC de fase reversa nas seguintes condições: Injeção de 5µL, fluxo 1mL/minuto e pressão máxima de 400 bar, com um tempo de 17 minutos de eluição. A fase móvel utilizada consistiu em solução aquosa 0,05% de ácido ácido trifluoroacético (solvente A) e 0,05% ácido trifluoroacético em acetonitrila (solvente B). Utilizou-se o seguinte gradiente de eluição: inicialmente 95% A:5% B, variando B para 60% em 10 minutos, mantendo assim por 2 minutos e em seguida B retornando para 5% em 1 minuto, mantido desta maneira durante 4 minutos. Para detecção utilizou-se um arranjo de diodos (DAD) ajustado para o comprimento de onda 228nm.

4.3.8 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase

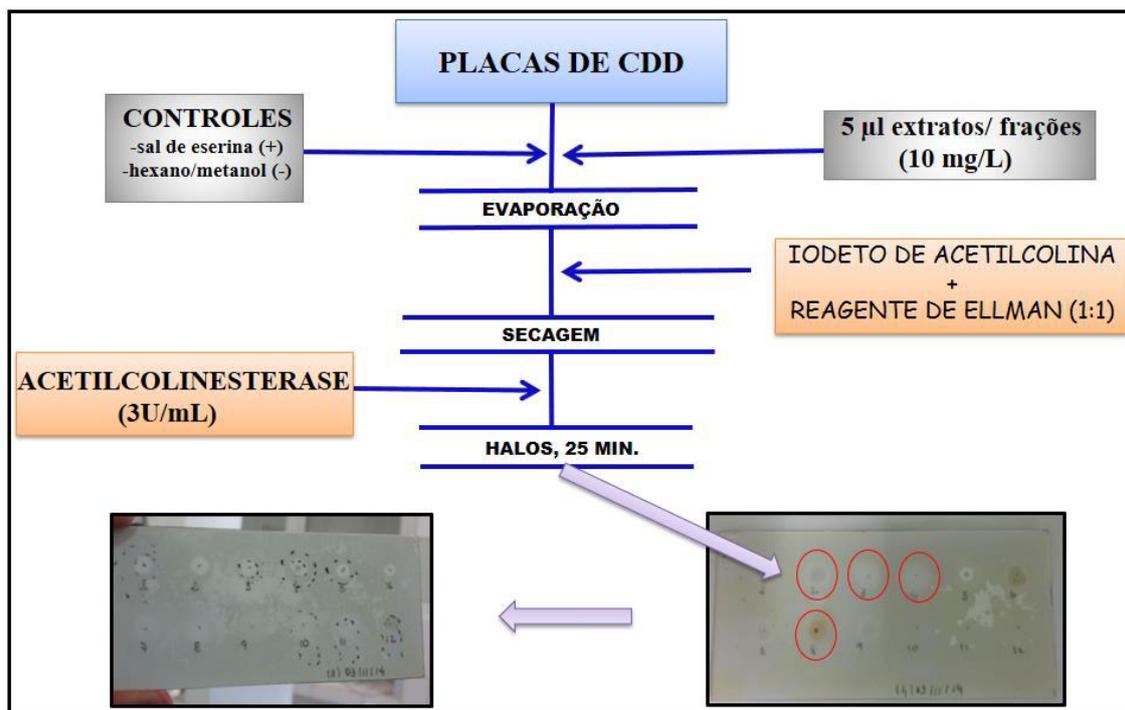
Este procedimento experimental baseia-se no ensaio descrito por Ellman et al.(1961), que foi adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001). Trata-se de um método colorimétrico e que pode ser aplicado de maneira qualitativa e quantitativa. Nesta pesquisa utilizou-se apenas a forma qualitativa. Esta metodologia é um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica. Segundo a literatura materiais com a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase podem atuar como possíveis produtos farmacológicos no tratamento da doença de Alzheimer (TREVISAN et al., 2003; DUNCAN et al., 2013).

A metodologia consistiu em retirar uma alíquota de 5µl dos extratos (hexânicos e metanólicos) das folhas, caule e frutos de HSG na concentração 10 mg/ml seguido da aplicação dos mesmos em uma cromatoplaça com o auxílio de uma pipeta automática. Após completa evaporação do solvente, foi borrifado sob a cromatoplaça, uma mistura (1:1) contendo iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2 –nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L⁻¹). O sistema foi deixado em repouso por cerca de 3 minutos para a secagem da placa.

Logo após a secagem foi borrifada a enzima acetilcolinesterase na concentração de unidades por mililitro (3U/ml). Após 10 minutos, ocorreu o surgimento de uma coloração amarela nas amostras inativas, porém, onde ocorreu inibição da enzima, verificou-se a formação de um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras, estes foram demarcados com um lápis grafite para posterior determinação dos seus tamanhos. Após 25 minutos a coloração desapareceu.

Como controle positivo, foi utilizado solução do padrão sal de eserina (2mg/ml) e como controle negativo foram utilizados solventes (hexano e metanol). O procedimento está representado simplificadaamente no fluxograma abaixo (figura 36).

Figura 36 - Fluxograma representativo do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase (tratamento *alzheimer*).



Fonte: autor, 2017.

Após os testes com os extratos puros, o extrato hexânico do caule (EHC), por ser o mais ativo, foi fracionado utilizando cromatografia em coluna aberta de sílica gel (CCD) e coluna filtrante, com diferentes gradientes de eluição, sendo as diversas frações obtidas, avaliadas seguindo a mesma metodologia acima descrita. A fração mais ativa foi analisada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) visando identificar a substância responsável pela ação inibitória.

4.3.9 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) foram realizadas pelo técnico-químico Herbert de Sousa Magalhães, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) na Universidade Federal do Ceará (UFC), para a fração mais ativa frente inibição da enzima acetilcolinesterase. Os espectros unidimensionais e bidimensionais para a fração mais ativa frente a inibição da enzima

acetilcolinesterase (136-146), foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, operando na frequência do hidrogênio a 300 e 500 MHz, e na frequência do carbono a 75 e 125 MHz, respectivamente. Na dissolução da amostra, foi utilizado o solvente triclorometano deuterado CDCl_3 .

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de RMN ^1H , pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do solvente deuterado utilizado: triclorometano. Para os espectros de RMN ^{13}C , os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos picos dos carbonos-13 do solvente: triclorometano.

Os conceitos de multiplicidades dos sinais dos espectros de RMN ^1H foram representados a partir da convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete), sl (singleto largo) e dd (duplo-dublete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C foi determinado através da técnica Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT), com ângulo de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , sendo descrito segundo a convenção: C (carbono não hidrogenado); CH (carbono metínico); CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela comparação do espectro DEPT 135° do espectro RMN ^{13}C .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

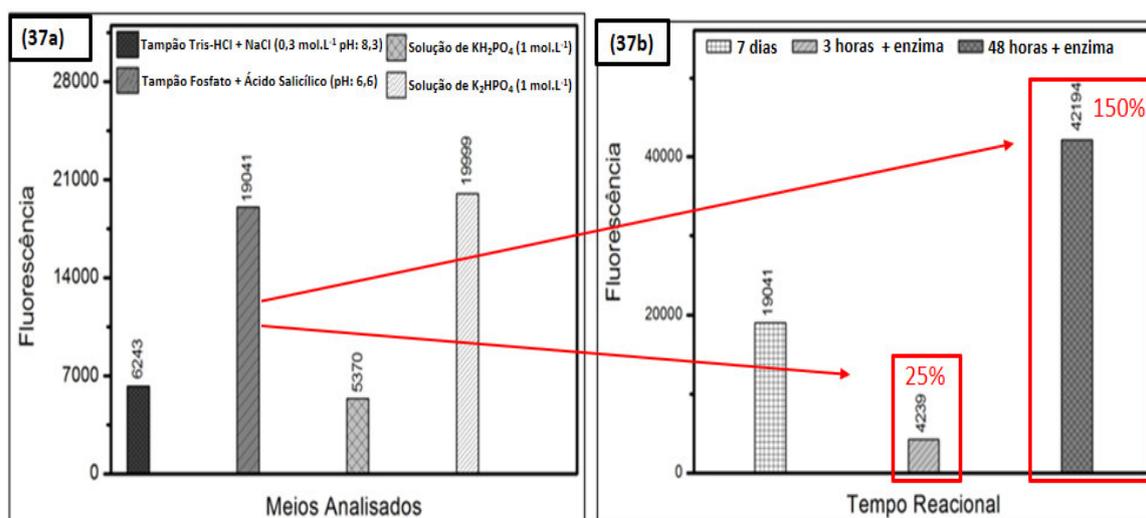
Assim como a revisão bibliográfica e a metodologia, a discussão dos resultados foi dividida em dois capítulos (5.1 e 5.2). O primeiro trata dos resultados acerca da formação e combate dos Produtos de Glicação Avançada (AGEs), enquanto o segundo dos dados referentes ao potencial farmacológico e constituição química de HSG.

5.1 Formação e combate dos produtos de glicação avançada (AGEs)

5.1.1 Formação de AGEs induzido pelo sistema Hipoxantina/xantina-BSA-glicose/frutose

Para introduzir o sistema de geração de radicais livres ao procedimento de formação de AGEs, inicialmente foram testados diferentes meios, utilizando sempre a mesma concentração de glicose e BSA, durante uma semana de incubação. Os resultados podem ser observados na figura 37a, na qual se verifica a formação dos AGEs em todos os meios testados, em virtude do aumento da fluorescência. Os dados demonstram ainda, que a solução de K_2HPO_4 (1 mol.L^{-1}) e o tampão fosfato (pH= 6,6) com ácido salicílico apresentaram fluorescência bem mais elevada que os demais meios avaliados.

Figura 37 -Formação dos AGEs utilizando glicose a 37°C sem adição da enzima XO - **método clássico**. (37a) em diferentes meios avaliados utilizando uma semana de incubação (37b) em tampão fosfato (pH= 6,6-Tampão A) adicionado de ácido salicílico em diferentes períodos de incubação.



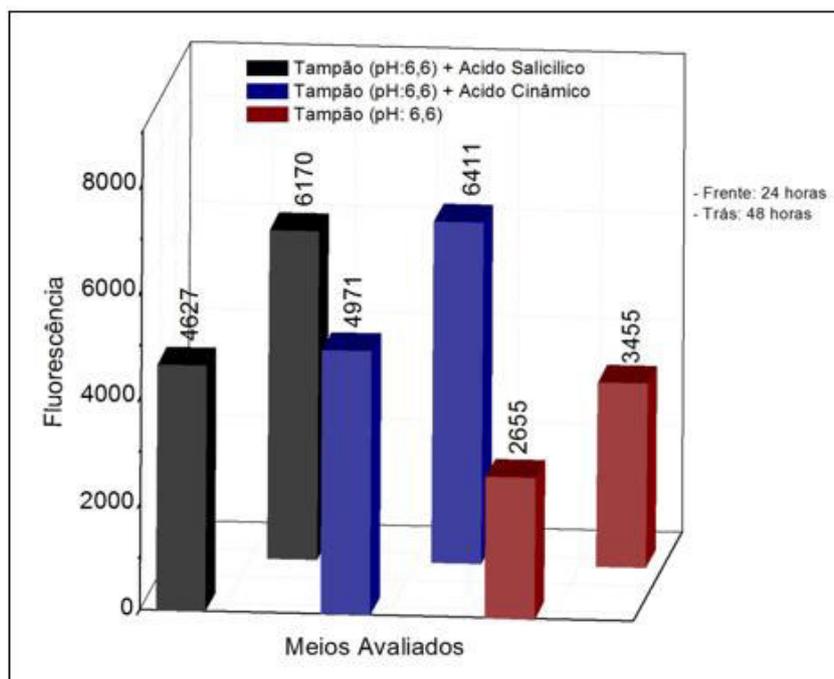
Fonte: Autor, 2017.

A presença de Fe^{+3} no tampão fosfato pH 6,6 (tampão feito pela combinação de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , EDTA, FeCl_3 e ácido salicílico) parece não exercer nenhum efeito catalítico ao processo de oxidação da glicose e dos produtos de *Amadori*, que levam a formação dos AGEs, tendo em vista o elevado valor de fluorescência verificado para a solução de K_2HPO_4 (1 mol.L^{-1}), na qual não existe o metal Fe^{+3} .

Os resultados para as experiências realizadas com a adição de enzima xantina oxidase (XO) após 3 e 48 horas de incubação, utilizando o tampão fosfato (pH= 6,6) com ácido salicílico, estão apresentados na figura 37b. Observa-se a eficácia do acoplamento do sistema de geração de radicais livres para formação de AGEs, considerando que com apenas 48 horas de reação (utilizando a enzima XO), já se verifica um aumento superior a 150% na formação dos AGEs (em virtude do aumento da fluorescência) quando comparado aos métodos atualmente utilizados, que necessitam de no mínimo uma semana para produzir tais resultados. Salienta-se ainda que, o procedimento com enzima, realizado em apenas 3 horas, já possui em torno de 25% da intensidade de fluorescência produzida por meio dos métodos tradicionais.

A comparação das diferentes composições do tampão fosfato pH 6,6 (com ácido salicílico, ácido cinâmico e puro) no procedimento com glicose utilizando 24 e 48 horas de incubação (figura 38), revelou um aumento significativo da fluorescência nas amostras em que se utilizou os ácidos salicílico e cinâmico. Esta elevação pode ser explicada pela formação de compostos fluorescentes, oriundos da reação entre os radicais hidroxila e os ácidos salicílico e cinâmico (formação de 2,3 e 2,5-ácido diidroxibenzóico -DBHA- e os isômeros constitucionais do ácido cumárico), conforme demonstrado por Owen e colaboradores (2000). Assim para evitar interferências na mensuração dos AGEs, apenas o tampão fosfato puro (pH= 6,6), sem a presença dos ácidos salicílico e cinâmico, foi utilizado nos demais procedimentos.

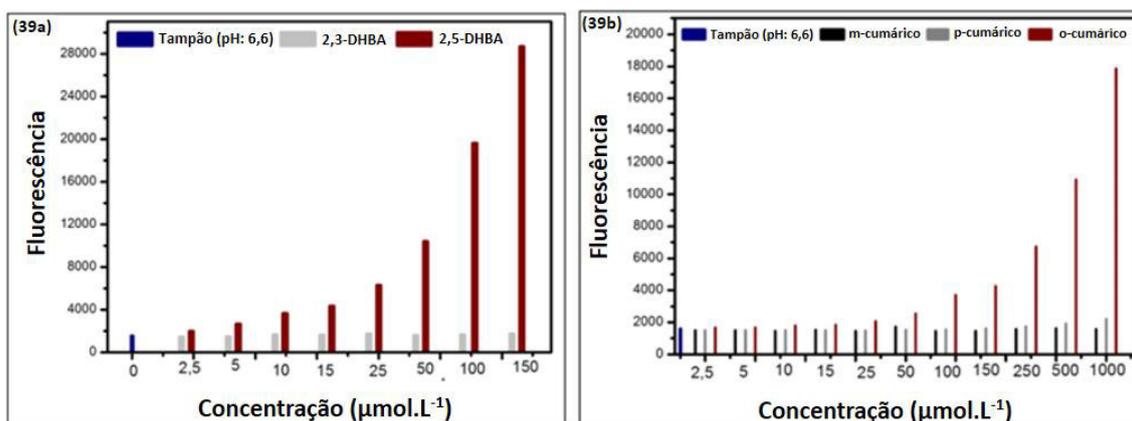
Figura 38 - Formação dos AGEs utilizando glicose (37°C) em diferentes composições do tampão fosfato (pH= 6,6) com adição da enzima XO, em 24 e 48 horas de incubação.



Fonte: autor, 2017.

A figura 39 comprova a elevada fluorescência para o composto 2,5-DBHA e ácido-ortocumárico que se formam na reação dos ácidos salicílico e cinâmico com os radicais hidroxila, conforme mencionado anteriormente.

Figura 39 - Fluorescência intrínseca em diferentes concentrações de tampão fosfato puro (pH= 6,6): (39a) ácidos 2,3 e 2,5 dihidroxibenzoico (DHBA); (39b) isômeros constitucionais do ácido cumárico.

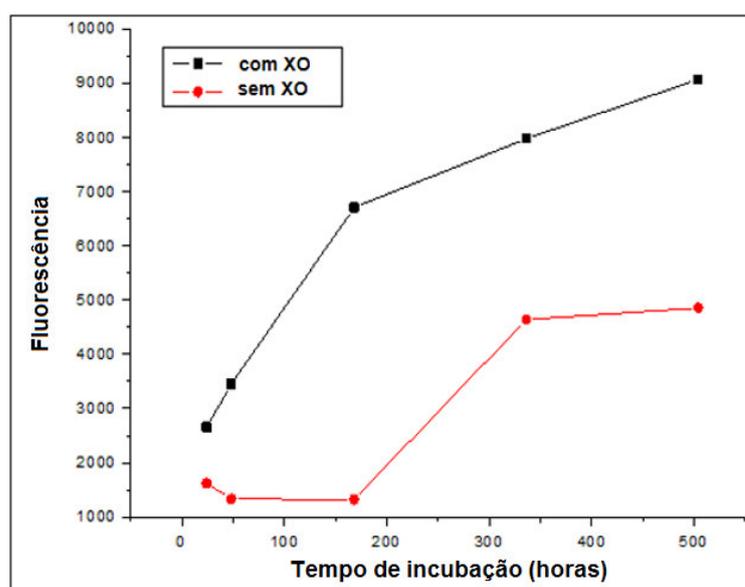


Fonte: autor, 2017.

A análise da reação ocorrendo na presença e ausência de XO, em diferentes intervalos de tempo (24, 48 horas, 1 semana, 2 semanas e 3 semanas), com utilização de glicose, está demonstrada na figura 40. Nesta

evidencia-se que a presença dos radicais livres acelera a formação dos AGEs, tendo em vista que em todos os intervalos avaliados, observou-se, no mínimo, a duplicação da fluorescência nas amostras em que se adicionou a enzima XO. A análise específica do procedimento com 1 semana de incubação (168 horas), revelou o aumento da fluorescência em mais de 500% (para as amostras com XO).

Figura 40 -Formação dos AGEs utilizando glicose (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com diferentes períodos de incubação (24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas).



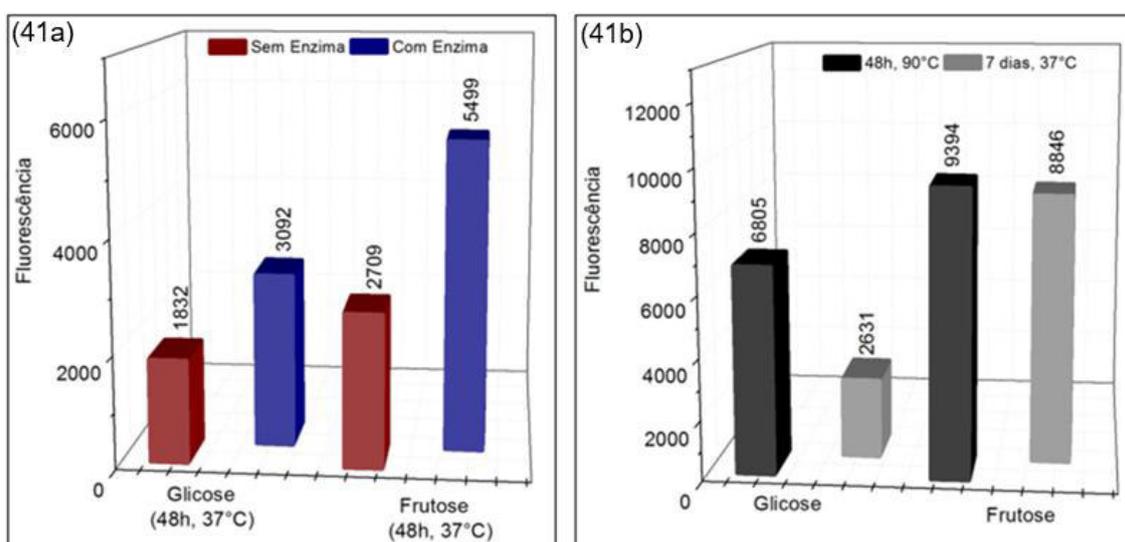
Fonte: autor, 2017.

Nos ensaios em que a glicose foi substituída por frutose (figuras 41a, 41b), verificou-se aumento expressivo na formação dos AGEs em comparação ao método com glicose. Este resultado se repetiu nas diferentes condições reacionais analisadas indicando que a frutose (cetose) é mais reativa para formação de AGEs que a glicose (aldose).

Sabe-se, com base nos estudos teóricos da química orgânica, que os grupamentos carbonílicos de aldeídos são mais reativos que os das cetonas, se considerarmos uma reação de condensação que origina as bases de Schiff, com posterior formação dos AGEs (conforme descreve a reação de *Maillard*). A reatividade mais acentuada das aldoses pode ser justificada pelo caráter mais eletrofílico do carbono carbonílico do aldeído, tendo em vista que este apresenta

um número de efeitos indutivos receptores de elétrons menor do que uma cetona. Além disso, a carbonila de um aldeído possui, em torno de si, um menor impedimento espacial, facilitando a sua reação com o nucleófilo. Porém, o que se verifica em procedimentos experimentais e no metabolismo humano (*in vivo* e *in vitro*), é exatamente o contrário, ou seja: a formação de AGEs aumenta significativamente quando se substitui glicose (aldose) por frutose (cetose) sendo esta afirmação confirmada nos resultados obtidos neste trabalho.

Figura 41 -Formação dos AGEs utilizando glicose e frutose na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (41a) 48 horas de incubação a 37 °C (41b) 48 horas - 90°C, 1 semana – 37 ° sem XO.



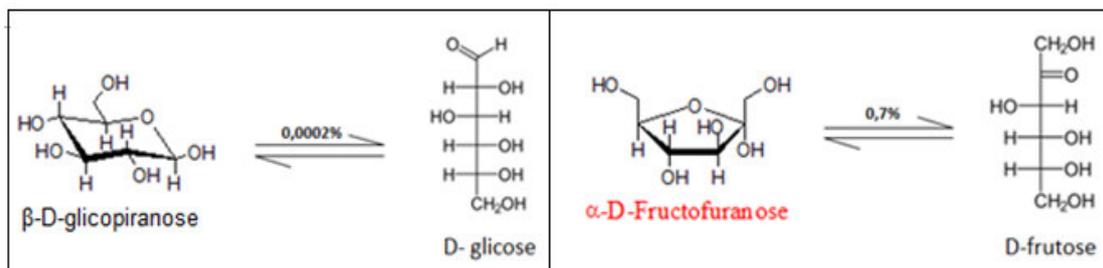
Fonte: autor, 2017.

Esses dados nos levam a questionar qual o fator determinante para explicar a maior reatividade da frutose, frente a glicose para formação dos AGEs. A literatura indica que esta diferença de reatividade se deve à quantidade destas espécies em sua forma aberta conforme observa-se na figura 42. Os dados bibliográficos demonstram que quando em solução, a quantidade de frutose em sua forma aberta é de aproximadamente 3500 vezes superior a glicose (BARBOSA, et al., 2016). Para explicar esta enorme diferença nas quantidades da forma aberta entre frutose e glicose algumas considerações são importantes:

I - em sua forma cíclica a glicose forma um ciclo de seis membros (anel piranosídico) com conformação em cadeira, sendo a β -D-glicose a conformação mais estável e portanto mais abundante (64%);

II - a frutose cicliza originando preferencialmente anéis piranosídicos, tal como a glicose. Além disso anéis furanosídicos também são originados (ciclos com 5 membros), sendo estes anéis menos estáveis e que produzem maior quantidade da forma aberta (SOLOMONS; FRYHLE, 2005; BRUICE, 2006).

Figura 42 - Representação esquemática da taxa de conversão de glicose e frutose em suas formas mais abundantes fechadas, para a forma aberta quando em solução aquosa.



Fonte: autor, 2017.

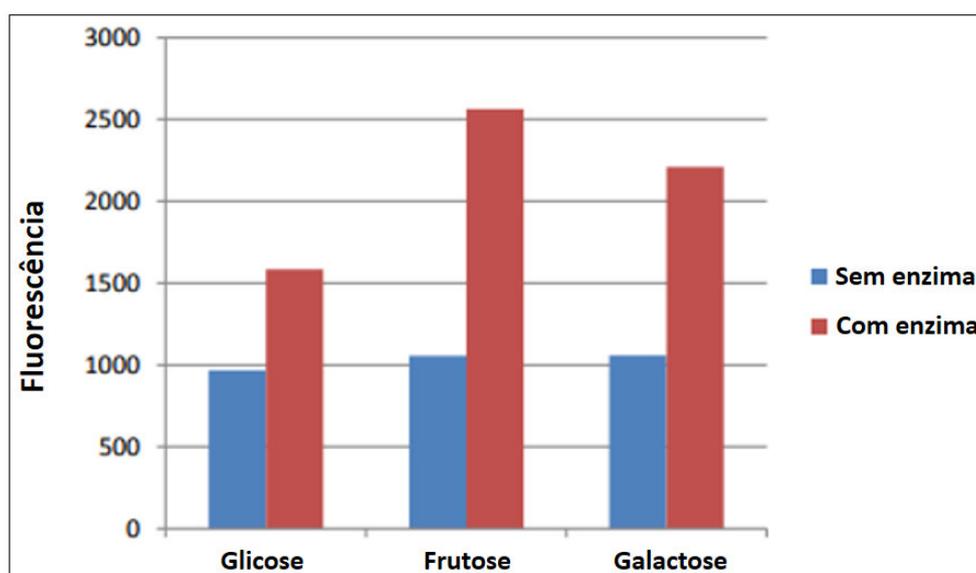
A partir da análise e comparação das estruturas químicas de glicose e frutose em suas formas cíclicas mais abundantes, é possível afirmar que em anéis piranosídicos (tais como o da glicose) os ângulos existentes entre as ligações c-c-c são de aproximadamente de $109^{\circ}28'$, como é esperado para um carbono sp^3 . Entretanto, os anéis furano, são menores que os piranosídicos. A diminuição do número de membros da estrutura cíclica, promove redução nos ângulos das ligações c-c-c (aproximadamente 105°), gerando assim uma maior tensão angular. Somando-se à tensão angular, o elevado grau de sobreposição dos grupos ligados aos carbonos do anel furano, produz tensão torsional e estérica, tornando-o menos estável (SOLOMONS; FRYHLE, 2005; BRUICE, 2006). Logo este conjunto de situações, justifica a maior quantidade de estruturas na forma aberta para frutose quando comparada a glicose e dessa forma podem justificar a maior formação de AGEs nos ensaios com frutose.

A figura 41b demonstra ainda que o processo de cozimento dos alimentos também contribui de maneira significativa para formação dos AGEs, pois todos os experimentos realizados a 90°C (com glicose e frutose) apresentaram praticamente o dobro da fluorescência quando comparados aos métodos realizados a 37°C . Isto indica que o processo de cozimento aumenta significativamente a quantidade de AGEs nos alimentos, o que corrobora com

algumas teorias ligadas ao vegetarianismo que defendem o consumo de alimentos crus como forma de preservação da saúde. A defesa do consumo de alimentos crus está embasada em parte pela presença de espécies antioxidantes, nestes alimentos, bem como por evitarem a formação de AGEs proveniente do processo de cozimento.

O procedimento realizado com 24 horas de incubação utilizando glicose, frutose e galactose (figura 43), reafirmam a discussão acima apresentada. Inicialmente observa-se a formação dos AGEs com todos açúcares testados (devido ao aumento da fluorescência), novamente a frutose se mostrou mais reativa. A figura 43 ainda evidencia que a galactose promove um aumento na fluorescência superior a glicose em praticamente 40%. Sabe-se que β -D-glicose e β -D-galactose são epímeros em C-4, isto é, são diastereoisômeros que diferem apenas na configuração do carbono 4 de suas cadeias. Sendo assim, teremos que na glicose a hidroxila do carbono 4 se encontra em posição equatorial, enquanto que na galactose, em posição axial. Logo as repulsões mais acentuadas existente na galactose (1,3 diaxial), justificam sua menor estabilidade e originam mais espécies de cadeia aberta (quando em solução) do que a glicose.

Figura 43 -Formação dos AGEs utilizando diferentes açúcares (glicose, frutose, galactose) na presença e ausência da enzima XO, em tampão fosfato puro (pH= 6,6) com 24 horas de incubação a 37 °C.



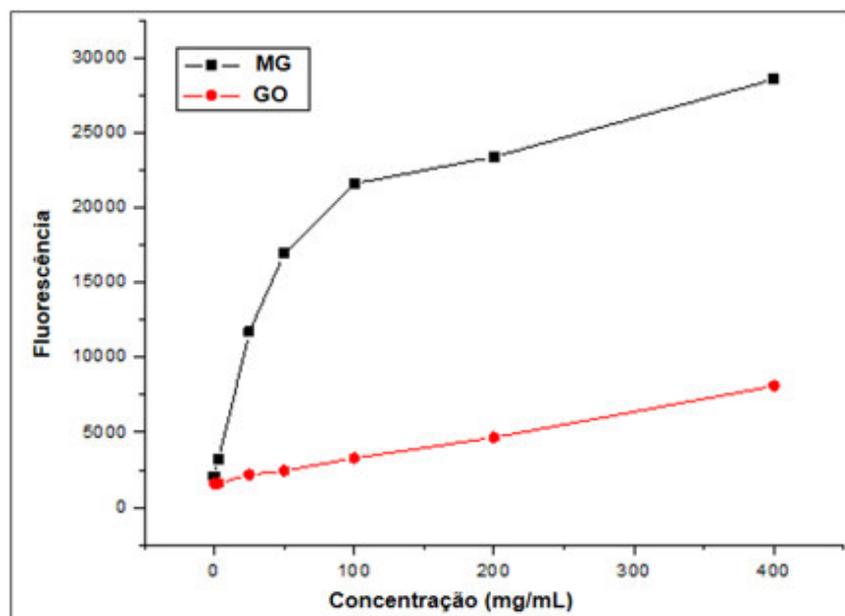
Fonte: Autor, 2017.

Os dados obtidos apontam o papel crítico e danoso que estes açúcares podem provocar a saúde humana (frutose e galactose). A frutose é um dos monossacarídeos de elevada ocorrência em nossa dieta, principalmente em decorrência da adição do xarope de frutose às bebidas industrializadas (BARBOSA et al., 2016). A galactose é encontrada principalmente no leite e produtos lácteos. Esta situação torna-se mais crítica em pessoas com agravos clínicos que produzem hiperglicemia, tais como o diabetes mellitus, cuja taxa de açúcares na corrente sanguínea é naturalmente elevada, acarretando uma maior formação dos AGEs.

5.1.2 Formação de AGEs induzido pelo sistema HX/XO-BSA-MG-GO

A curva de calibração (0 – 400 mg) para demonstração da fluorescência intrínseca de MG e GO, pode ser visualizada na figura 44. Nesta, observa-se maior fluorescência para MG, o que poderia indicar um fator de interferência na quantificação dos AGEs. Como forma de evitar esta possível interferência, foram produzidos controles sem a presença de BSA, para desconto da fluorescência intrínseca do MG e GO contidos na mistura reacional.

Figura 44 -Fluorescência intrínseca em diferentes concentrações de tampão fosfato puro (pH= 6,6) para metilglioxal (MG) e glioxal (GO).



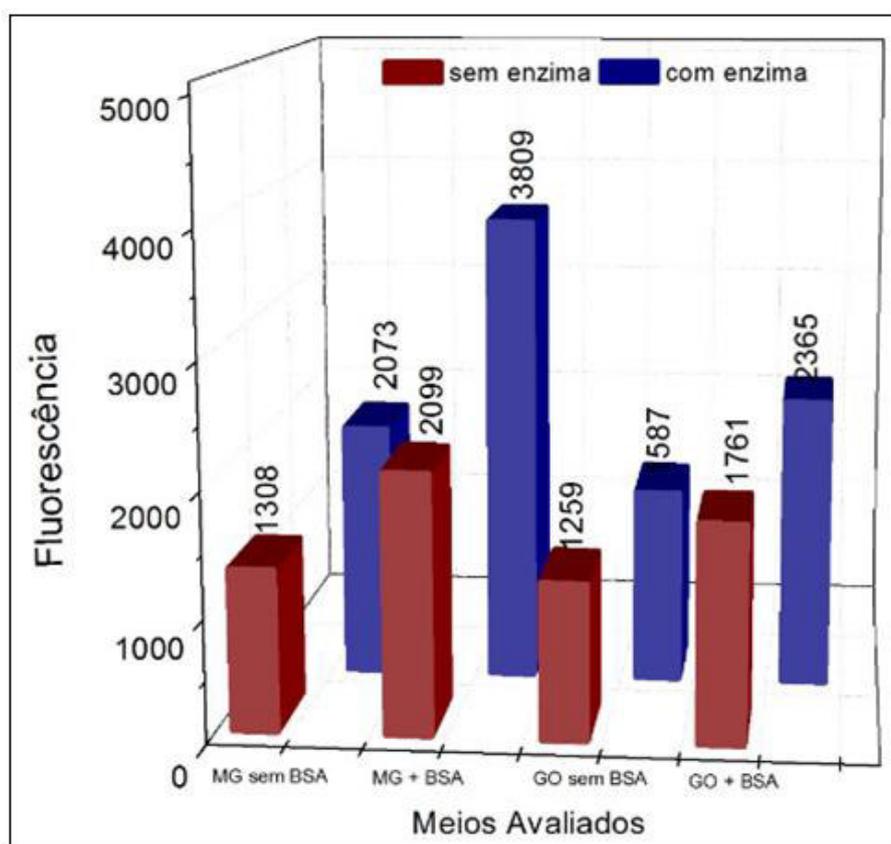
Fonte: autor, 2017.

Logo, analisando a figura 45, verifica-se que descontando-se as fluorescências intrínsecas de ambos na mistura reacional (MG e GO), obtém-se praticamente o mesmo padrão qualitativo na formação dos AGEs, quando em comparação aos procedimentos nos quais se utilizou os açúcares. O mais surpreendente deste procedimento é que a formação dos AGEs foi obtida em apenas 3 horas de experimento. O menor tempo de formação observado para os processos com os compostos dicarbonílicos pode ser explicado por duas razões:

I- presença de maior número de grupamentos carbonílicos nestes compostos para sofrerem o ataque nucleofílico dos grupamentos amino, oriundos de proteínas ou resíduos de aminoácidos;

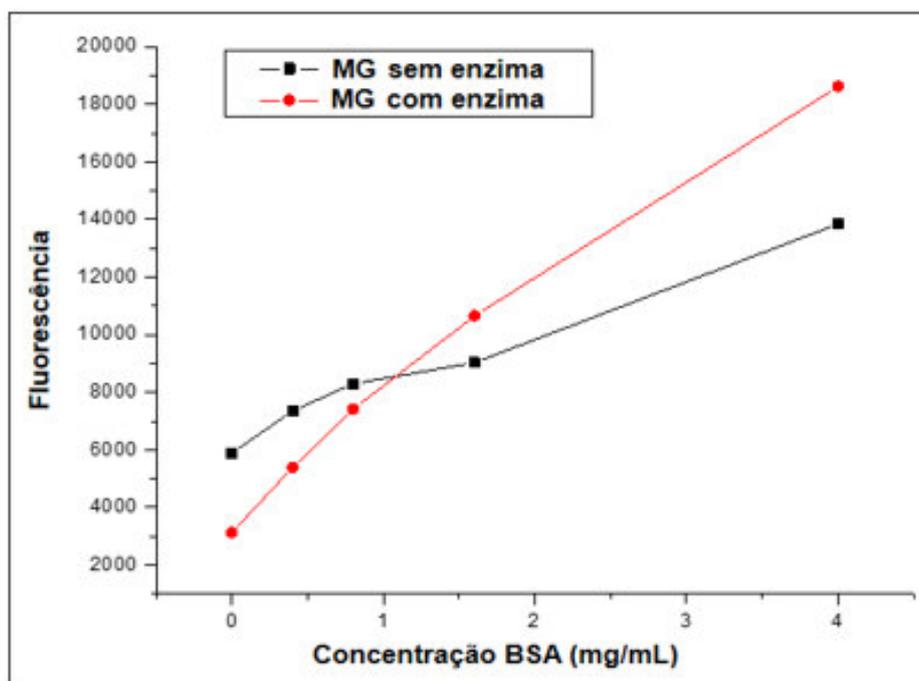
II- menor cadeia de ambos (MG e GO) quando comparados aos açúcares testados (glicose e frutose), minimizando o impedimento estérico.

Figura 45 -Formação dos AGEs utilizando MG e GO (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6) utilizando 3 horas de incubação.



A Figura 46 mostra a experiência que foi realizada com 1 hora de incubação e variando-se a concentração de BSA, utilizando MG na presença e ausência da enzima XO. A adição de XO apresenta uma melhor linearidade no processo e conseqüentemente uma melhor constância e reprodutibilidade do método quando comparado ao processo sem adição da mesma.

Figura 46 -Formação dos AGEs utilizando MG (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com 1 horas de incubação e variando-se a concentração de BSA (0-4 mg/mL).



Fonte: autor, 2017.

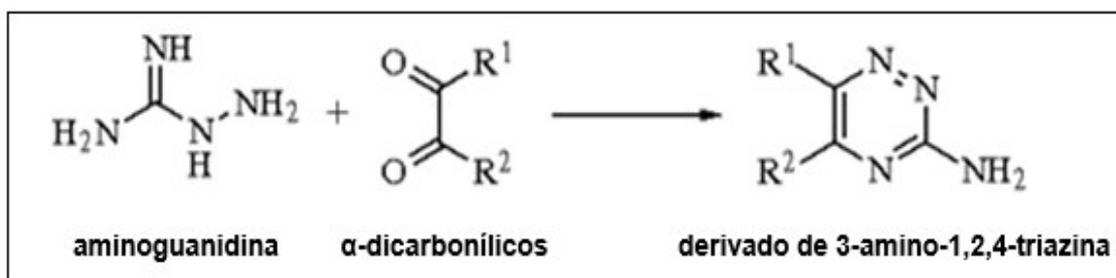
5.1.3 Inibição de AGEs utilizando extratos e frações de HSG, e composto puros identificados em HSG

5.1.3.1 Inibição utilizando Aminoguanidina (padrão indicado pela literatura)

Conforme demonstrado por Nilsson (1999) e Thornalley (2003), a aminoguanidina (AG) pode atuar como controle positivo em ensaios que busquem demonstrar a inibição de AGEs, em virtude de sua capacidade de inibição do processo de glicação. A aminoguanidina reage rapidamente com compostos dicarbonílicos (tais como MG e GO) atuando como agente varredor destes (capturadores de RCS). Esta capacidade se justifica pela formação de

adutos substituídos, derivados de 3-amino-1,2,4-triazina. Assim propõe-se a estrutura genérica representada na figura 47, para os derivados α -dicarbonílicos (MG e GO) com aminoguanidina (THORNALLEY, 2003). Desta maneira, pode-se inferir que a aminoguanidina diminui a quantidade de AGEs formados, considerando os procedimentos *in vitro*.

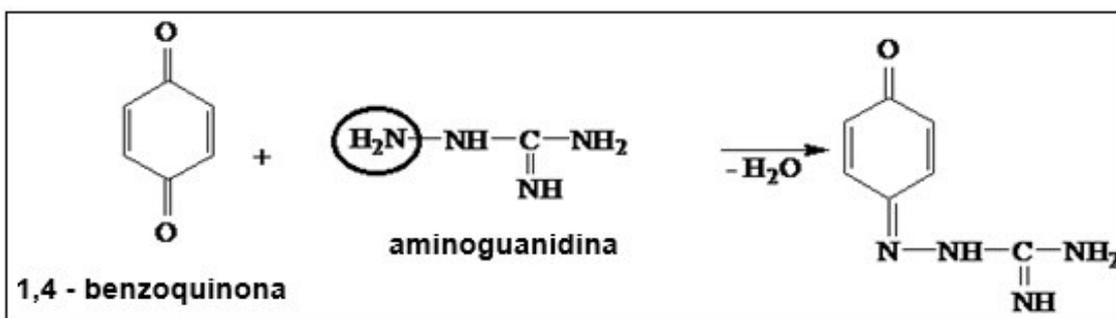
Figura 47 - Representação esquemática para a estrutura proposta do aduto monosubstituído principal, formado pela reação entre aminoguanidina (capturadores de RCS) e compostos α -dicarbonílicos (MG e GO).



Fonte: Adaptado de Thornalley, 2003.

Adicionalmente, a reação de formação do antisséptico Ambazone[®], na qual a aminoguanidina reage com 1,4-benzoquinona (reação de condensação), mostra que o ataque nucleofílico parte preferencialmente do átomo de nitrogênio do grupamento amino (-NH₂) em destaque na figura 48 (KLEEMANN et al., 2009).

Figura 48 - Primeira etapa da reação de formação do antisséptico Ambazone[®]:

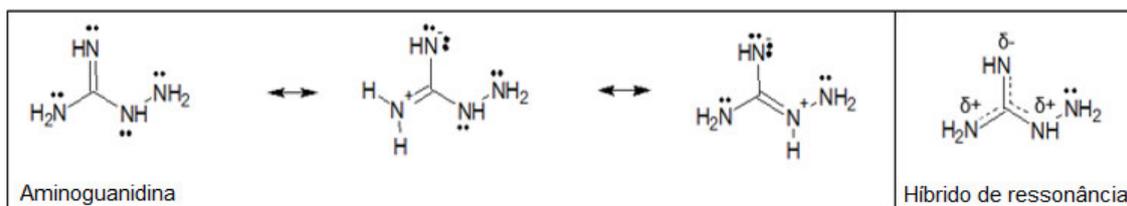


Fonte: Kleeman et al., 2009

Pode-se atribuir a maior capacidade nucleofílica para este grupo, em virtude do par de elétrons não ligante do nitrogênio se encontrar em um orbital puramente sp³. Isso faz com que este par de elétrons não participe do efeito

ressonante presente nesta molécula, evidenciado pelas estruturas de ressonância presentes na figura 49, tornando-o mais susceptível para promover o ataque nucleofílico.

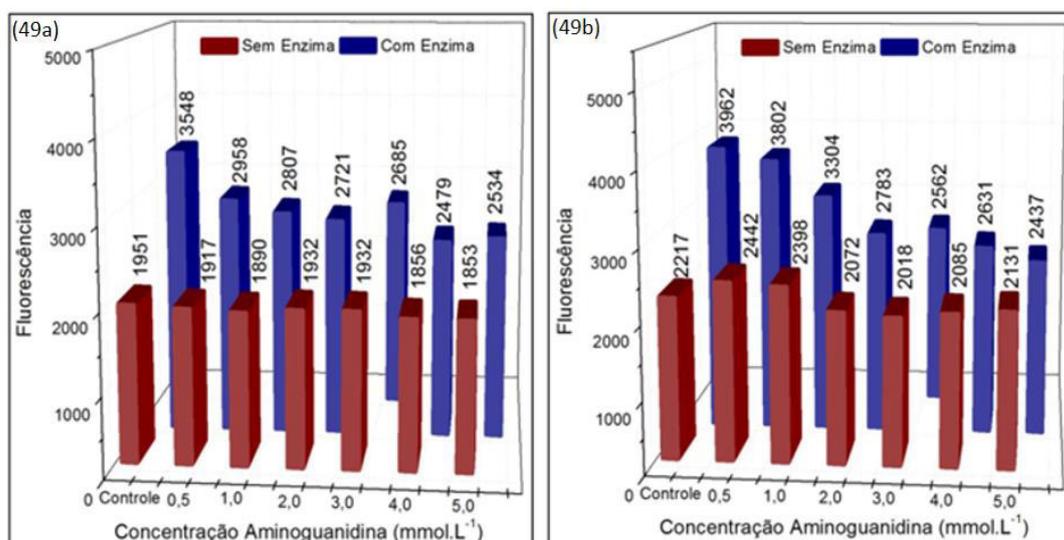
Figura 49 - Representação esquemática para as estruturas de ressonância da aminoguanidina e seu estado híbrido.

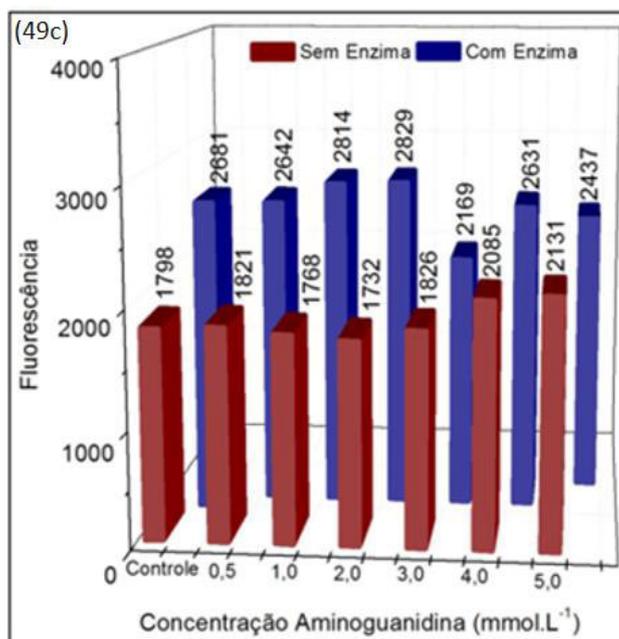


Fonte: autor, 2017.

Logo, os gráficos abaixo (figura 50) revelam que o controle de aminoguanidina funcionou em todos os métodos testados (glicose, MG e GO), principalmente com concentrações superiores a 1,0 mM, onde se verificou maior diminuição da fluorescência quando comparado aos controles sem adição desta substância. Porém apenas nos ensaios com glicose e MG (50a, 50b respectivamente) obteve-se diminuição gradual da fluorescência à medida que aumentou-se a concentração de AG.

Figura 50 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações de aminoguanidina (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (50a) procedimento com glicose - 48 horas (50b) procedimento com MG - 3 horas (50c) procedimento com GO - 3 horas.





Fonte: autor, 2017.

Percebe-se que a ação da AG em capturar as espécies dicarbonílicas (capturadores de RCS) com respectiva formação dos adutos substituídos, ocorreu de forma mais linear, nos procedimentos em que se adicionou a enzima XO. Quando comparados aos dados obtidos por Thornalley(2003), conseguiu-se demonstrar a ação da AG em atuar como agente capturador de compostos 1-2 dicarbonílicos (capturadores de RCS), em concentrações até 5 vezes menores.

5.1.3.2 Inibição utilizando o flavonóide Rutina

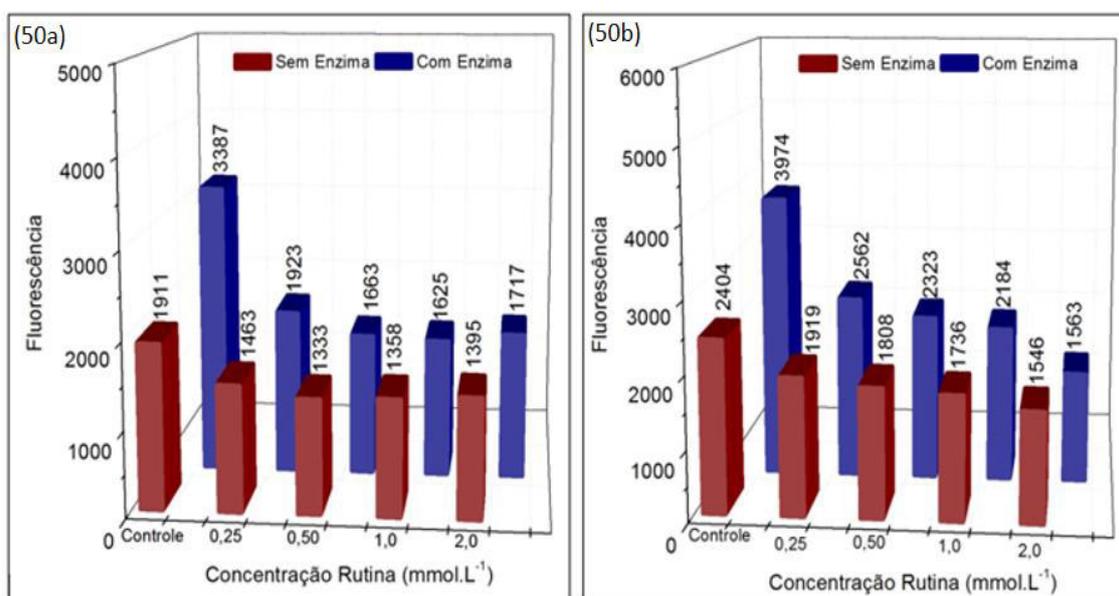
A capacidade de alguns flavonóides atuarem como agentes varredores de compostos 1,2-dicarbonílicos (capturadores de RCS), foi anteriormente demonstrada utilizando os procedimentos clássicos, com período de incubação de até 4 semanas. Catequinas, epicatequinas, protoantocianidinas apresentaram-se entre os grupos de substâncias ativas (LO et al., 2006; PENG et al., 2008; SHAO et al., 2008). Em 2007, Sang e colaboradores (2007), demonstraram que epigallocatequina-3-galato (EGCG) poderia facilmente capturar MG e GO, em condições de pH neutro ou levemente alcalino, originando adutos mono e disubstituídos (razão molar 3:1) a partir de reações de condensação. Ainda segundo estes autores, estas reações ocorrem preferencialmente nas posições 6 e/ou 8 do anel A flavonóico. A maior reatividade destas posições é evidenciada pelo aumento da nucleofilicidade

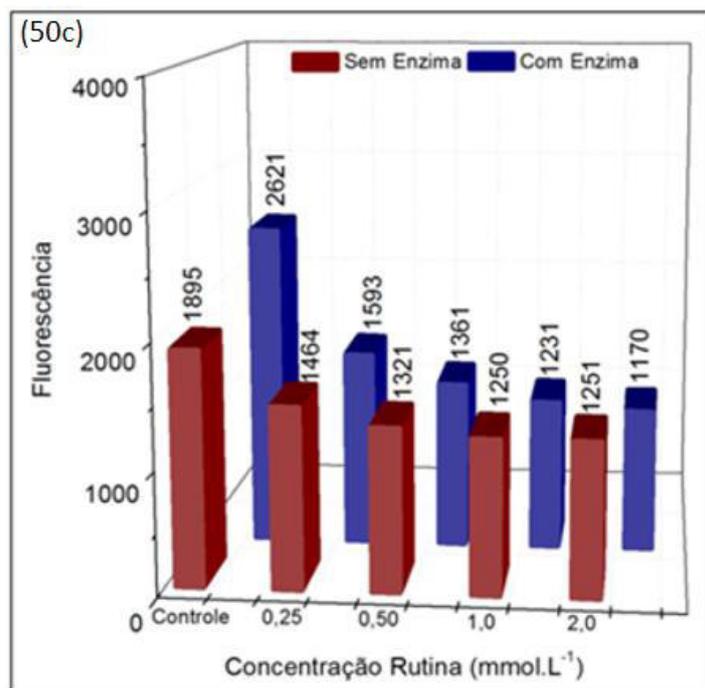
destes carbonos (6,8), em função do efeito de ressonância, ativado pelos grupamentos fenólicos, frente a uma reação de condensação.

A rutina é um flavonóide com estrutura muito similar a EGCG, na qual se substitui um anel polifenólico por grupamentos glicosílicos. Em todos os ensaios realizados (glicose, MG e GO), a rutina apresentou elevada capacidade em atuar como agente capturador de compostos 1-2 dicarbonílicos e conseqüentemente combater a formação dos AGEs. A figura 51 (51a, 51b, 51c) evidencia claramente tal afirmação, tendo em vista que considerando os três ensaios realizados e todas as concentrações de rutina testadas, verifica-se uma redução gradativa e bastante significativa da fluorescência quando comparadas aos controles (sem rutina). De maneira oposta a AG, a diminuição da fluorescência ocorreu em ambos os processos, com e sem a adição da enzima XO.

Observa-se nos três métodos utilizados, que a adição de apenas 0,25 mmol.L⁻¹ de rutina, provoca uma diminuição na fluorescência em praticamente 50%. Os resultados dos procedimentos com MG e GO, também se revelaram promissores e verifica-se uma diminuição de mais de 70 % da fluorescência com a adição de 2,00 mmol.L⁻¹ de rutina ao sistema.

Figura 51 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações de Rutina (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (51a) procedimento com glicose - 48 horas (51b) procedimento com MG - 3 horas (51c) procedimento com GO - 3 horas.



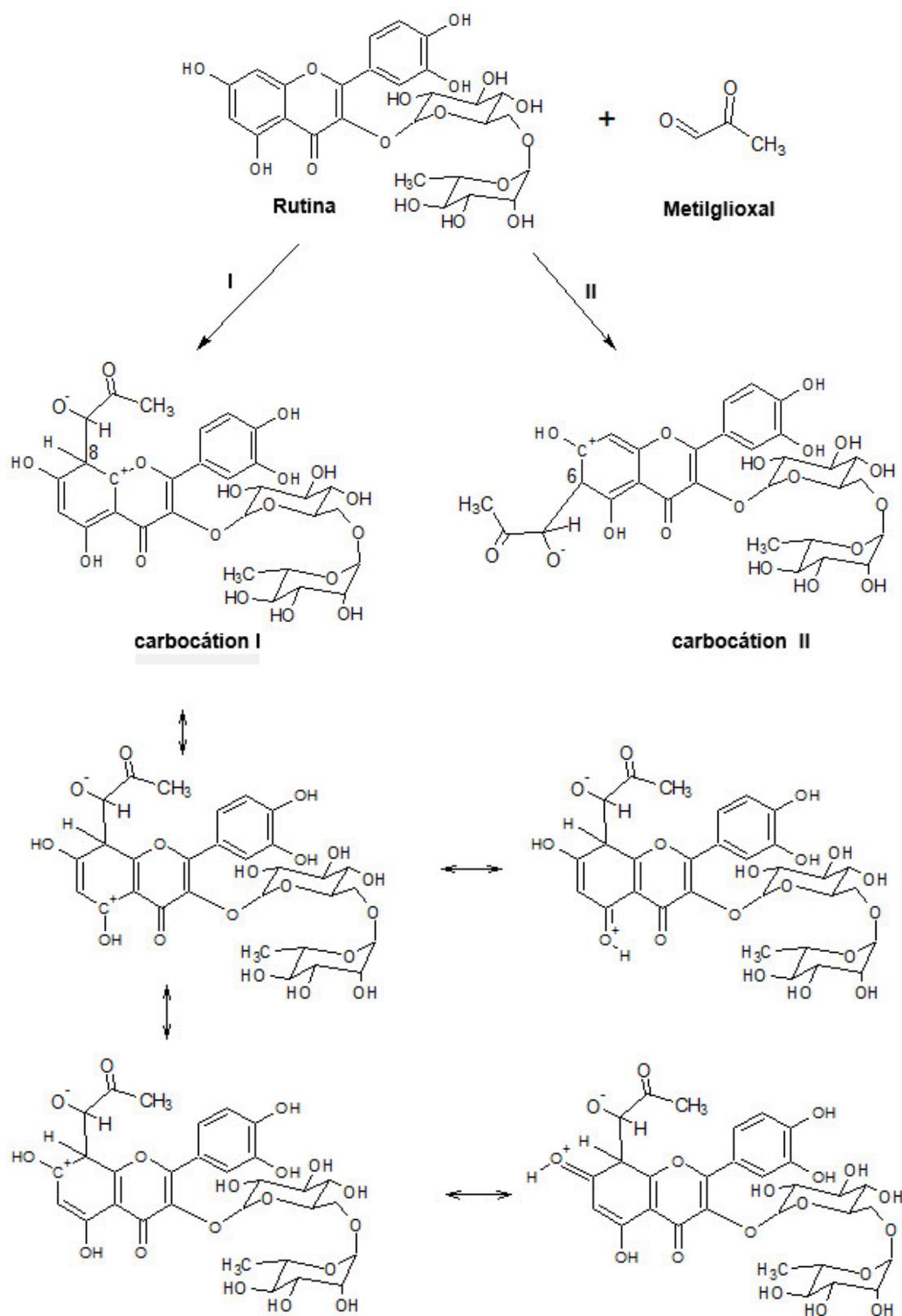


Fonte: Autor, 2017.

A partir da comparação dos resultados obtidos com rutina e aminoguanidina (figuras 50 e 51) é possível afirmar que a rutina apresenta melhor eficácia para capturar as espécies dicarbonílicas. Esta afirmação ancora-se no fato da rutina ter provocado uma maior redução percentual da fluorescência em todos os testes e concentrações utilizados.

A reação da rutina com os compostos dicarbonílicos produz um intermediário carbocátion, com introdução destes preferencialmente nas posições 6 ou 8 do anel A flavonóico (fig 52; I, II). Esses intermediários, apresentam 5 estruturas de ressonância conforme evidencia a figura 52. Sendo assim a maior reatividade da rutina se justifica pelo fato citado, tendo em vista que o intermediário da AG é menos estável. Além da estabilidade do intermediário carbocátion estabilizado pelo efeito ressonante, existe um maior número de posições disponíveis (carbono 6,8,6-8) para promoverem o ataque nucleofílico às carbonilas de MG e GO, quando comparados a aminoguanidina, podendo ser formados adutos mono (posição 6 ou 8) e dissubstituídos (posição 6-8).

Figura 52 -Representação esquemática proposta para as estruturas de ressonância obtidas pela reação entre rutina e MG (capturadores de RCS), baseado nos dados demonstrados por Sang et al., 2007.



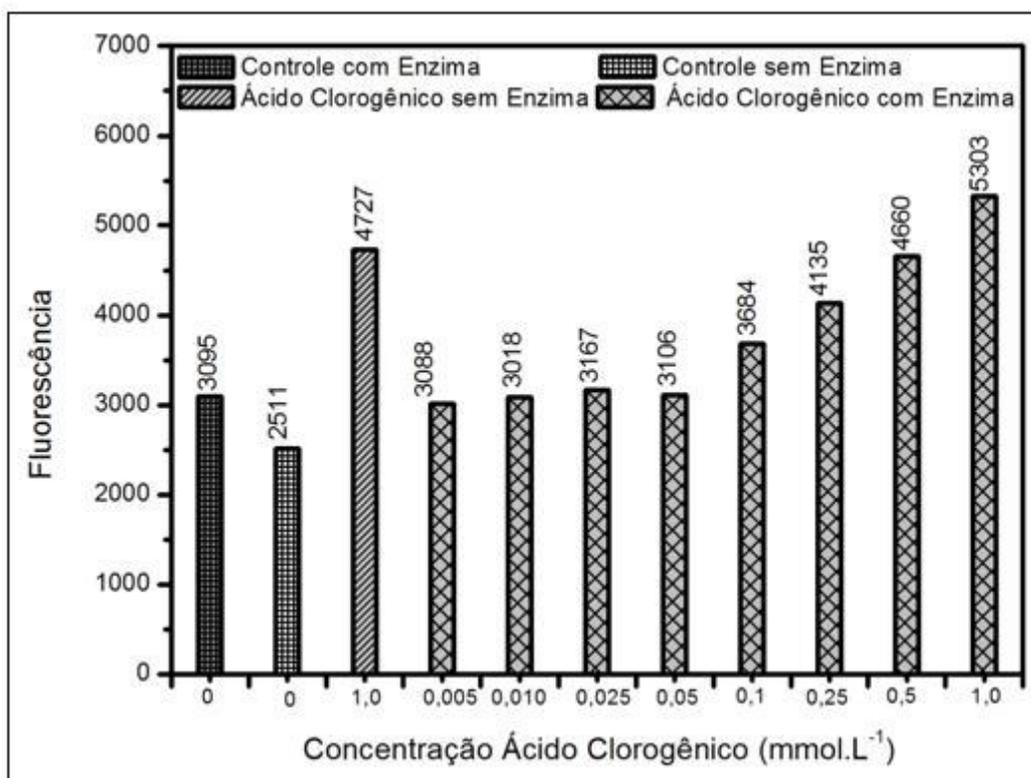
Fonte: autor, 2017.

Assim o conjunto de dados acima mencionados podem justificar a maior reatividade da rutina frente a AG, para atuar como agente varredor de espécies dicarbonílicas, tais como MG e GO.

5.1.3.3 Inibição utilizando Ácido clorogênico

Após as análises com aminoguanidina e rutina, o ácido clorogênico foi testado, para avaliar a capacidade de ácidos fenólicos em combater a formação dos AGEs. A figura 53 apresenta os resultados para o procedimento realizado com glicose utilizando-se ácido clorogênico. Neste, a eficácia do ácido clorogênico não foi evidenciada devido à sua elevada fluorescência intrínseca. Em todas as amostras nas quais adicionou-se ácido clorogênico foi obtida fluorescência superior aos controles (com e sem enzima XO). Assim, considerando a sua elevada fluorescência e as interferências dela decorrentes, apenas o ensaio com glicose (48 horas) foi realizado.

Figura 53 -Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações de ácido clorogênico com glicose (37 °C), na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6) com 48 horas de incubação.

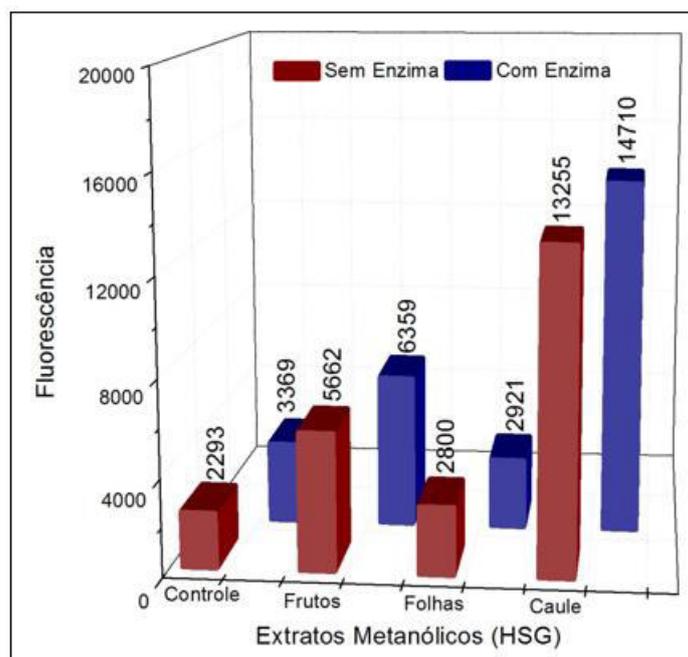


Fonte: autor, 2017.

5.1.3.4 Inibição utilizando extratos e frações HSG

A literatura revela que infusões das folhas de HSG são utilizadas pela medicina tradicional no combate a diabetes, sendo a rutina um dos seus principais constituintes. Logo, considerando os dados obtidos com a rutina, avaliou-se a capacidade dos extratos metanólicos das folhas, caule e frutos de HSG frente a capacidade de inibir a formação dos AGEs, utilizando apenas o ensaio com glicose (figura 54). A análise inicial dos extratos metanólicos de HSG (na qual se inseriu 5 mg dos mesmos ao sistema) foi dificultada em virtude da elevada fluorescência dos compostos presentes nas amostras do caule e frutos, sendo verificada diminuição na fluorescência apenas no ensaio com as folhas. Assim o extrato metanólico das folhas foi escolhido para avaliação utilizando os três métodos desenvolvidos (glicose, MG e GO).

Figura 54 -Combate a formação dos AGEs, utilizando 5 mg de diferentes extratos metanólicos de HSG com glicose (37 °C), na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com 48 horas de incubação.

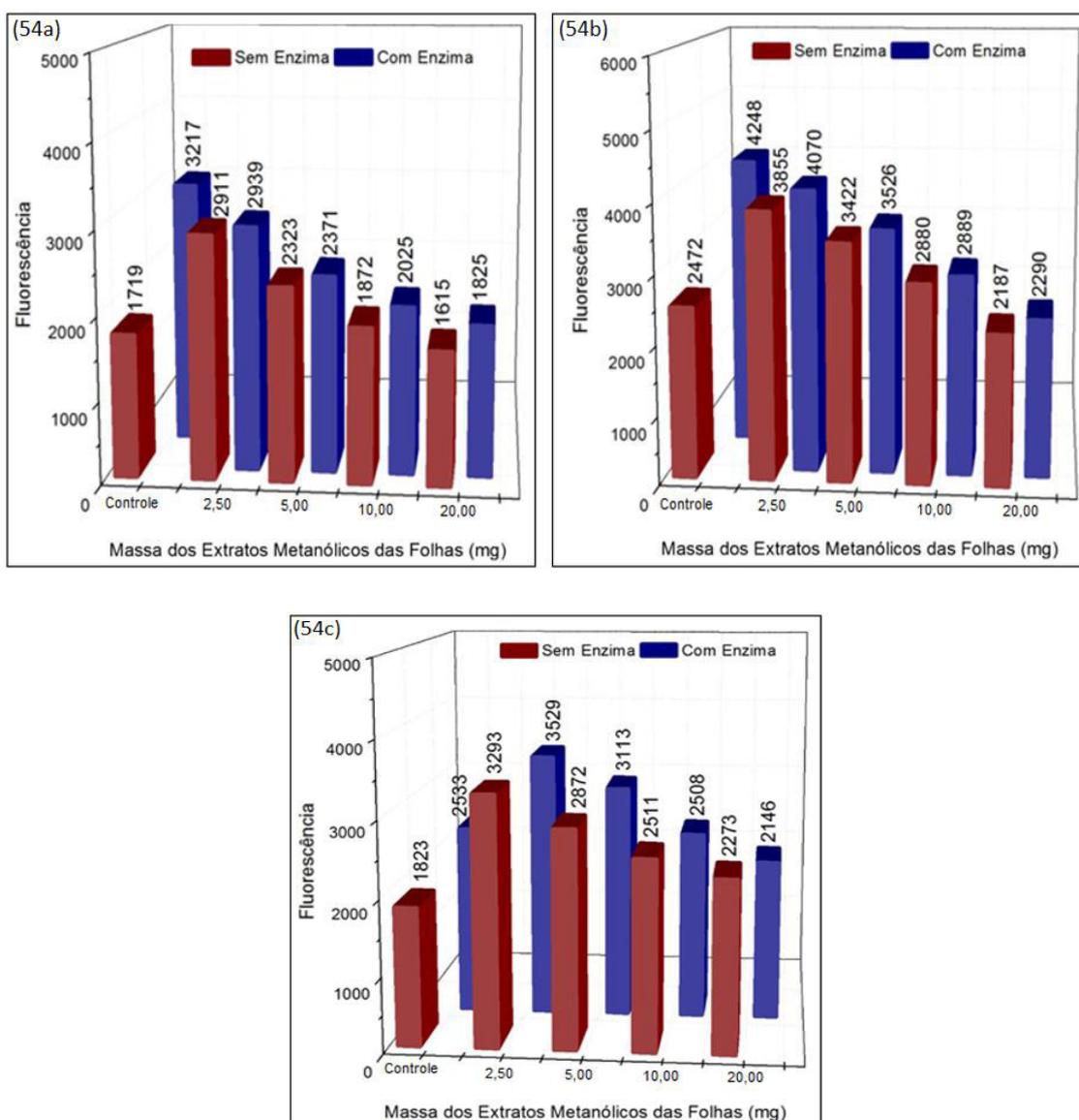


Fonte: autor, 2017.

A análise detalhada do extrato das folhas, demonstra que o mesmo produziu diminuição da fluorescência nos ensaios com glicose e MG. Ressalta-se que nas amostras em que se adicionou a enzima XO, observou-se redução da fluorescência em todas as concentrações testadas. Nas amostras em que

não se utilizou a enzima, esta diminuição só ocorreu na presença de maiores quantidades de extrato. No método com GO a diminuição da fluorescência foi observada apenas quando se utilizou 20 mg do extrato na presença da enzima XO. Assim a capacidade do extrato metanólico das folhas de HSG em atuar como capturador de compostos dicarbonílicos, possivelmente está relacionada a presença de flavonóides e outros compostos polifenólicos já identificados em HSG (ENDRINGER, 2007).

Figura 55 - Combate a formação dos AGEs utilizando diferentes concentrações do extrato metanólico das folhas de HSG (37 °C) na presença e ausência da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (55a) procedimento com glicose - 48 horas (55b) procedimento com MG - 3 horas (55c) procedimento com GO - 3 horas.

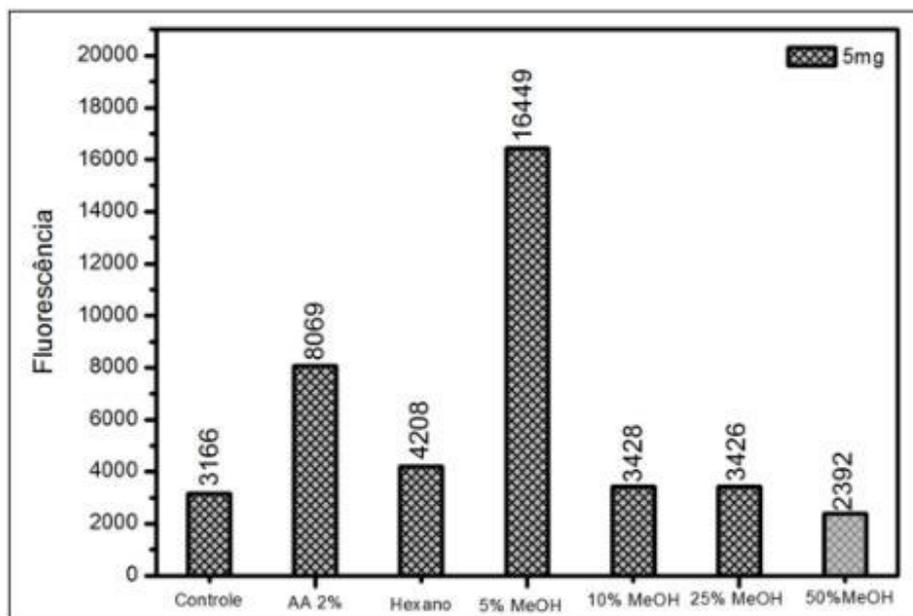


Fonte: autor, 2017.

O efeito de combate AGEs apresentado pelas frações (obtidas via SPE C₁₈) dos extrato metanólicos das folhas de HSG (capturadores de RCS), só foi observado na fração em que utilizou-se o gradiente de eluição contendo 50% de MeOH em ácido acético a 2%. Tal afirmação baseia-se no fato de apenas esta fração ter provocado redução da fluorescência, em praticamente 25%, quando comparado ao controle no qual não se adicionou as frações. Ressalta-se que neste ensaio só foram produzidas amostras com adição da enzima XO.

A capacidade em atuar como agente capturador de RCS da fração contendo 50% de metanol (MeOH) é atribuída a elevada presença de rutina na mesma, conforme indicam nos cromatogramas das folhas apresentados na página 94, onde consta a discussão acerca da constituição química das folhas de HSG.

Figura 56 -Combate a formação dos AGEs, utilizando 5 mg de diferentes frações (obtidas via SPE C₁₈) do extrato metanólico das folhas de HSG com glicose (37 °C), somente na presença da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), com 48 horas de incubação.



Fonte: autor, 2017.

5.2 Propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG)

5.2.1 Rendimento dos extratos

Os dados apresentados na tabela 7 indicam os rendimentos obtidos para os extratos de folhas, caules e frutos de HSG nos dois métodos de extração utilizados. Verifica-se que a extração via sohxlet apresentou valores mais altos de rendimento em todas as extrações. A extração via sohxlet é um processo mais exaustivo tendo em vista que ocorre em temperaturas mais elevadas, o que pode justificar o maior rendimento obtido por este método. Os dados revelam também maior existência de compostos com características polares tendo em vista que em todos os casos as frações etanólicas-metanólicas apresentaram-se com maior quantidade de extrato.

É possível ainda verificar na extração utilizando sistema sohxlet, que os frutos de HSG produzem quantidade de extrato muito maior do que caules e folhas. Acrescenta-se que o fruto de HSG (mangaba) apresenta elevado teor de açúcar, que pode contribuir para grande quantidade de extrato metanólico obtido (46,81 %).

Tabela 7 - Rendimentos dos extratos das folhas, caules e frutos por sohxlet e extração a frio.

Amostras (Sohxlet)	Material botânico (massa em gramas)	Massa extratos (g) (hexânico/metanólico)	Rendimento (%) (hexânico/metanólico)
Folhas	10,0123	0,6377 / 1,4411	6,37 / 14,39
Caule	10,0254	0,1608 / 0,8626	1,60 / 8,60
Frutos	10,0033	1,784 / 4,6824	17,83 / 46,81
Extração a frio			
Folhas	1760	97,3650 / 228,0	5,53 / 12,95
Caule	2226	31,5692 / 161,0	1,42 / 7,23

Fonte: autor, 2017.

5.2.2 Análise qualitativa dos compostos polifenólicos observados nos extratos de HSG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a espectrômetro de massas (HPLC-ESI-MS)

Como mencionado anteriormente, os extratos metanólicos das folhas, caule e frutos de HSG passaram por fracionamento via coluna SPE, sendo obtidas diferentes frações, variando-se a concentração de metanol em solução de ácido acético a 2%. Estas, foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-ESI/MS). Para a identificação dos compostos polifenólicos, utilizou-se espectrometria de massas (MS) e ultravioleta (UV), comparando os espectros obtidos com um banco de dados do laboratório, formado pela injeção de compostos puros (padrões).

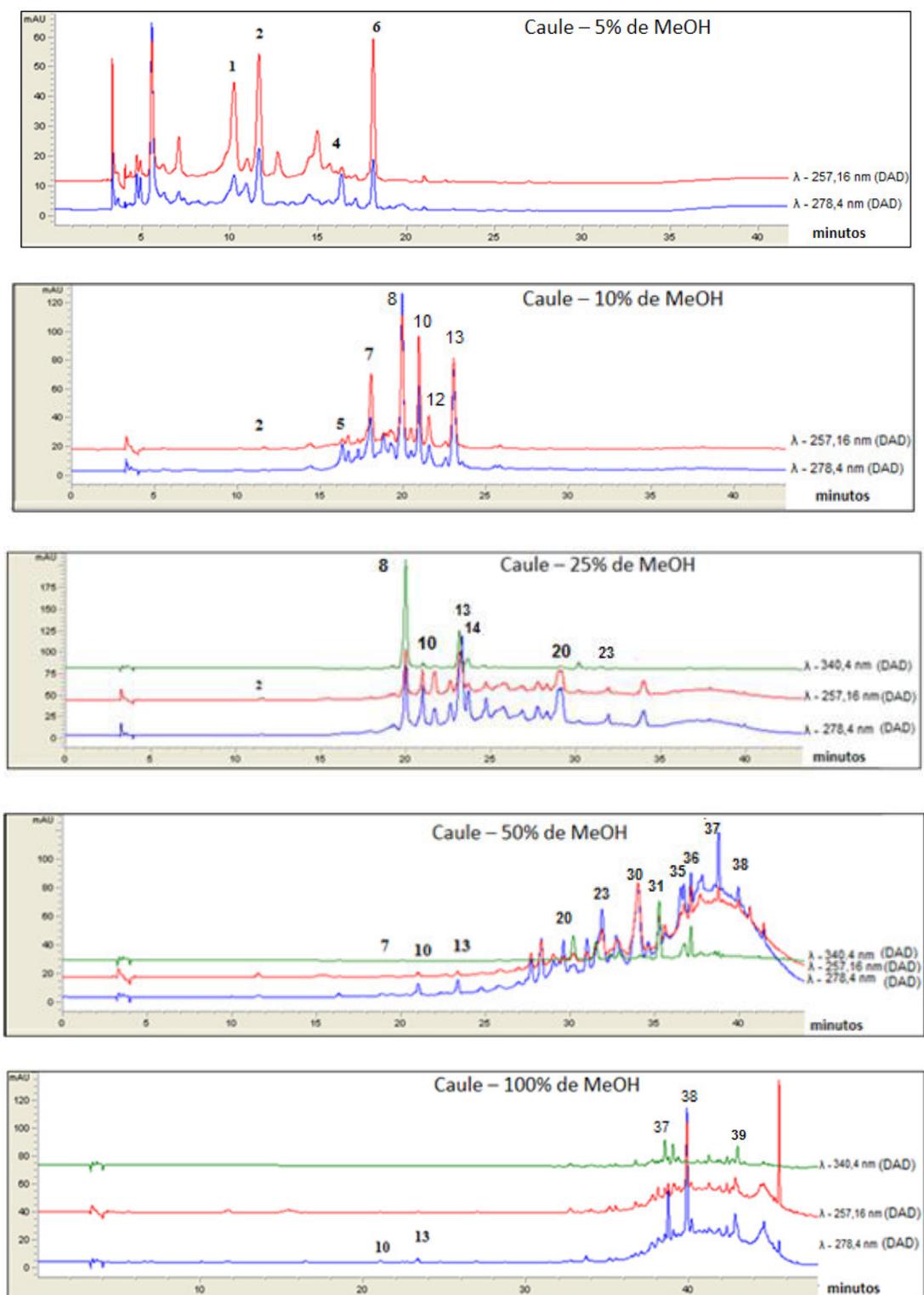
Os espectros das diferentes frações foram selecionados em diferentes comprimentos de onda (257, 278, e 340 nm), bem como também os espectros na região do ultravioleta com o comprimento de onda máximo dos fenólicos majoritários e os espectros de massas, estando apresentados nos anexos I e II (páginas 129 e 141, respectivamente).

Considerando os dados obtidos com a técnica HPLC-ESI-MS, foi possível identificar diferentes compostos polifenólicos, nas diferentes partes de HSG (folhas, caule e fruto). Abaixo estão apresentados os cromatogramas para as diversas frações avaliadas dos extratos do caule, frutos e folhas de HSG (figuras 57a, 57b, 57c). Os picos estão indicados com números a partir do tempo de retenção. A nomenclatura e outras informações acerca de cada composto identificado, estão demonstrados na tabela 8. Foram identificadas quarenta e uma substâncias distintas, sendo a presença de vinte e seis destas observadas pela primeira vez em HSG.

O ácido clorogênico (em suas formas *cis* e *trans*) e a isoramnetina ramnoglicosídeo foram os únicos compostos encontrados nas três partes avaliadas da planta. A presença de ácido clorogênico está de acordo com pesquisas anteriores, enquanto o flavonóide isoramnetina está sendo relatado pela primeira vez em HSG (ENDRINGER, 2007; FERREIRA et al., 2007; LIMA et al., 2015). Porém, apesar de folhas, caule e frutos possuírem tal semelhança,

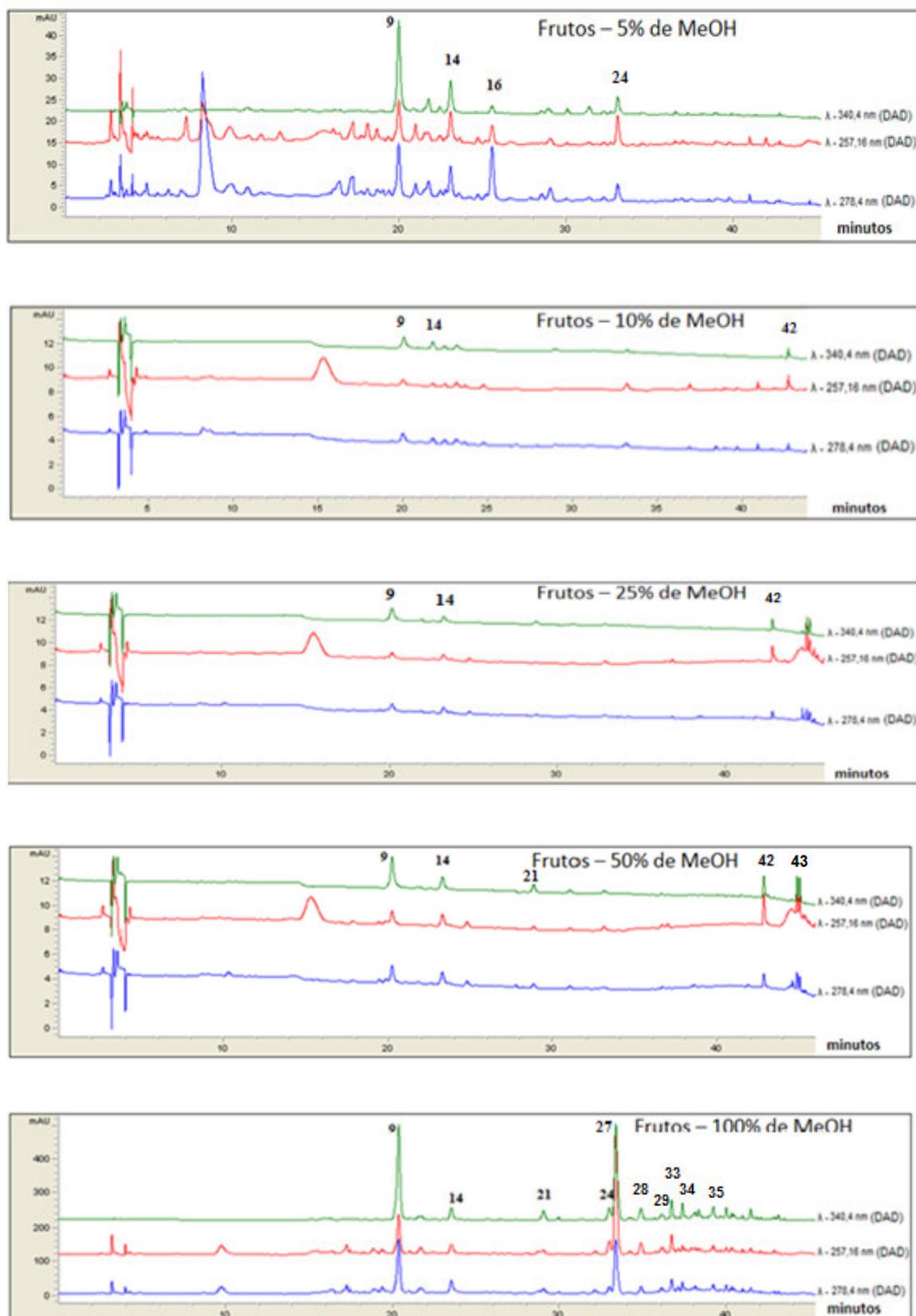
verifica-se diferentes classes de flavonóides e compostos polifenólicos ao depender da parte estudada da planta.

Figura 57a - Cromatogramas do extrato metanólico do caule de HSG identificados por HPLC-ESI-MS (frações SPE) em diferentes comprimentos de onda.



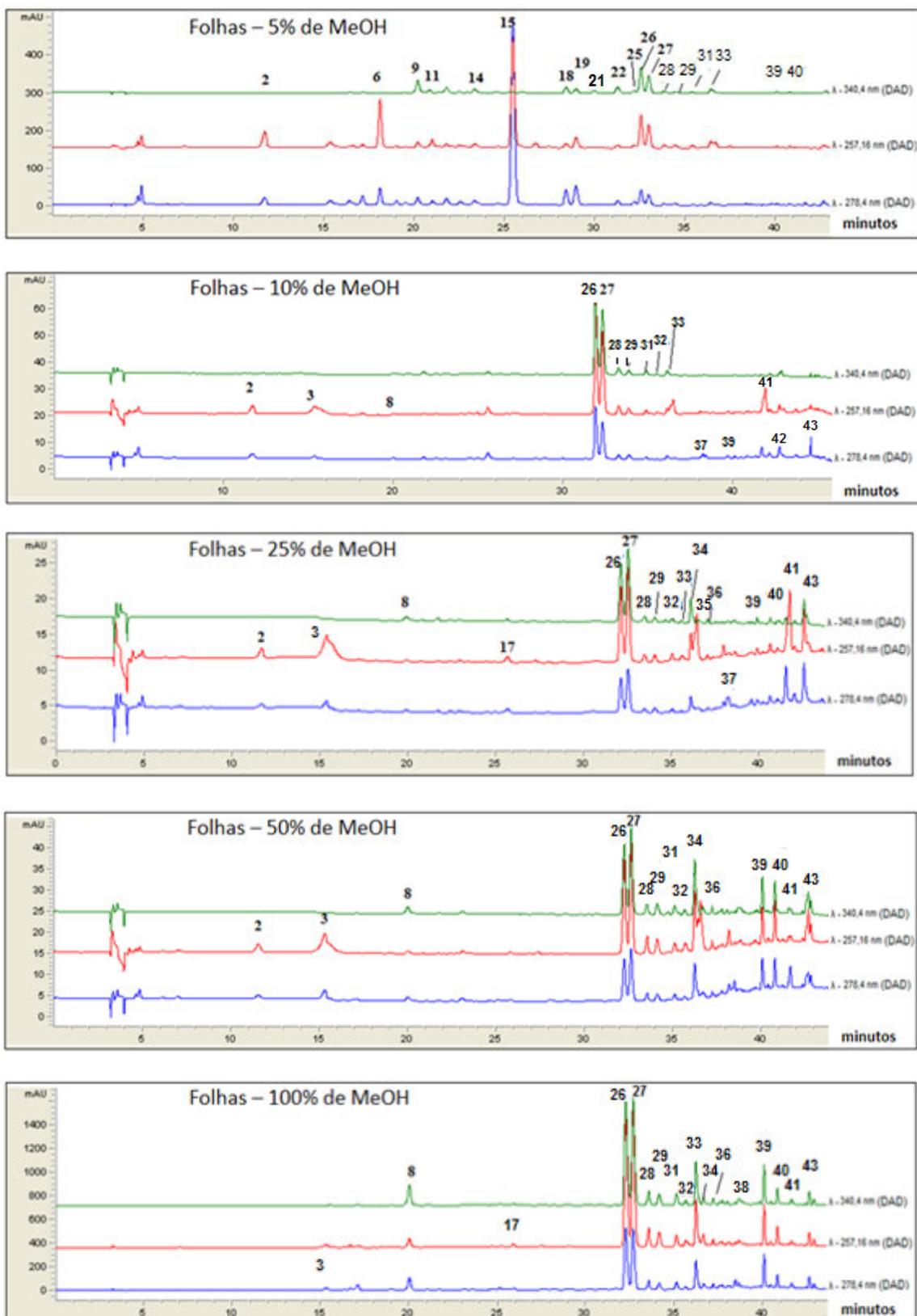
Fonte: autor, 2017.

Figura 57b - Cromatogramas do extrato metanólico dos frutos de HSG identificados por HPLC-ESI-MS (frações SPE) em diferentes comprimentos de onda.



Fonte: autor, 2017.

Figura 57c - Cromatogramas do extrato metanólico das folhas de HSG identificados por HPLC-ESI-MS (frações SPE) em diferentes comprimentos de onda.



Fonte: autor, 2017

Tabela 8 - Lista de compostos identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa(HPLC-ESI-MS), nas diferentes partes avaliadas de HSG (folhas, caule e frutos).

N°	TEMPO	Compostos fenólicos	DAD	m/q	PARTE	Autor (1ª referência na literatura)
	Minutos		λ_{nm}	[M-H] ⁻		
1	10.17	Ácido vanílico glicosídeo	257	329	Caule	Marques, 2017
2	11.67	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	257	153	Folha, caule	Marques, 2017
3	15.25	M = 408	278	407	Folha	*
4	16.24	M=360	278	359	Caule	*
5	16.66	Procianidina B1	278	577	Caule	Rodrigues et al., 2007
6	18.09	Ácido <i>para</i> -hidroxibenzóico	257	137	Folha, caule	Marques, 2017
7	18.77	Catequina	278	289	Caule	Rodrigues et al., 2007
8	19.98	Ácido clorogênico	340	353	Todas as partes	Lima et al., 2015 Endringer, 2007
9	20.17	Ácido <i>trans</i> - clorogênico	340	353	Folha, fruto	Lima et al., 2015 Endringer, 2007
10	20.94	Procianidina B2	278	577	Caule	Rodrigues et al., 2007
11	20.98	Ácido vanílico	257	167	Folha	Lima et al., 2015

12	21.55*	Catequina-C-glicosídeo	278	451	Caule	Rodrigues et al., 2007
13	23.05	Epicatequina	278	289	Caule	Rodrigues et al., 2007
14	23.33	Ácido <i>cis</i> -clorogênico	340	353	Todas as partes	Lima et al., 2015 Endringer, 2007
15	25.45	M = 136	257	135	Folha	*
16	25.49	Vanillina	278	359	Fruto	Marques, 2017
17	25.86	M = 1218	340	1217	Folha	*
18	28.42	Ácido <i>trans</i> -para-cumárico	340	163	Folha	Marques, 2017
19	28.95	Ácido <i>cis</i> -para-cumárico	340	163	Folha	Marques, 2017
20	29.00	Procianidina-C-glicosídeo	278	739	Caule	Rodrigues et al., 2007
21	29.00	Ácido <i>trans</i> -ferúlico quinato	340	367	Fruto, folha	Marques, 2017
22	31.24	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	340	193	Folha	Marques, 2017
23	31.88*	Catequina-C-glicosídeo	278	451	Caule	Rodrigues et al., 2007
24	32.14**	Quercetina ramnogalactosídeo	340	609	Fruto	Marques, 2017
25	32.18	Ácido <i>cis</i> -ferúlico	340	193	Folha	Marques, 2017
26	32.55**	Quercetina ramnogalactosídeo	340	609	Folha	Marques, 2017

27	33.97***	Quercetina rhamnoglucosídeo (Rutina)	340	609	Folha, fruto	Endringer, 2007 Ferreira et al., 2007 Marques, 2017
28	33.25***	Rutina	340	609	Folha, fruto	
29	33.84	Quercetina galactosídeo	340	463	Folha, frutos	Marques, 2017
30	34.46	Quercetina glicosídeo	340	463	Caule	Marques, 2017
31	35.00	Ácido <i>trans</i> -etil-clorogênico	340	381	Folha, caule	Marques, 2017
32	35.36	Canferol ramnogalactosídeo	340	593	Folha	Marques, 2017
33	35.66	Quercetina pentosídeo	340	433	Folha, fruto	Marques, 2017
34	36.39	Canferol ramnoglicosídeo	340	593	Folha, fruto	Marques, 2017
35	36.67	Isoramnetina ramnoglicosídeo	340	623	Todas as partes	Marques, 2017
36	37.00	Ácido <i>cis</i> -etil-clorogênico	340	381	Folha, caule	Marques, 2017
37	37.2	Quercetina ramnosídeo	278	435	Folha, caule	Marques, 2017
38	38.41	Afzelequina -C-glicosídeo	278	435	Caule, folha	Rodrigues et al., 2007
39	39.51	Epicatequina-C- glicosídeo	340	451	Folha, Caule	Marques, 2017

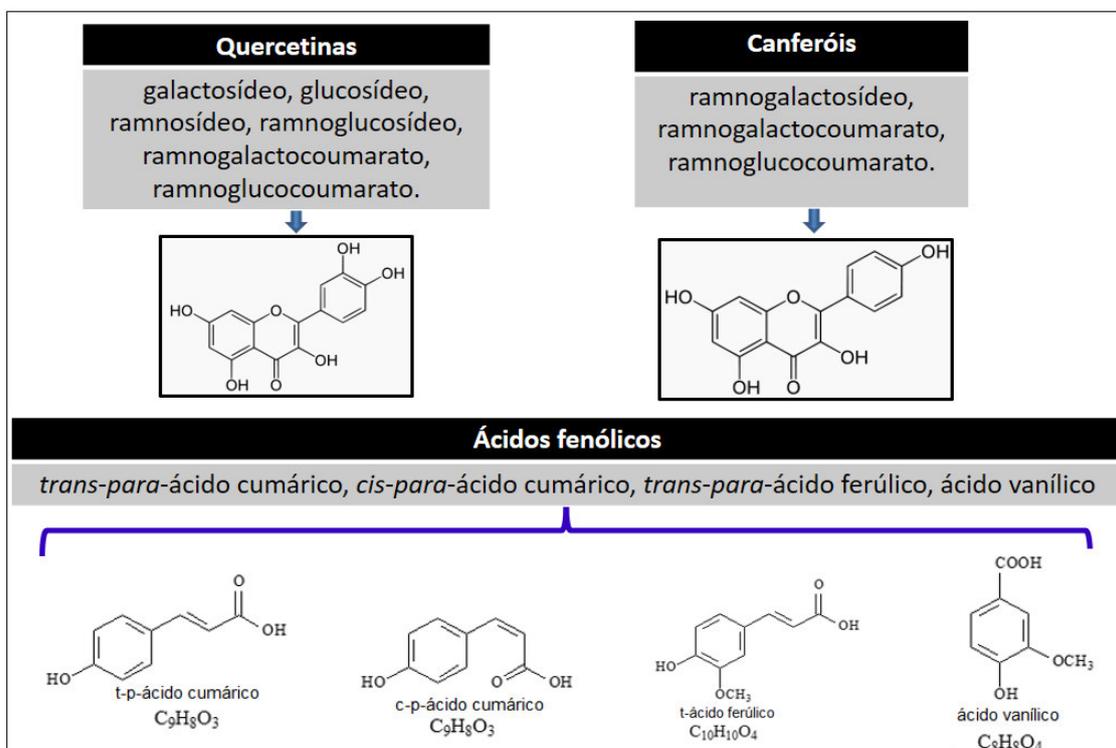
40	40.06	Quercetina ramnogalactocumarato	340	755	Folha	Marques, 2017
41	40.76	Quercetina ramnoglicocumarato	340	739	Folha	Marques, 2017
42	41.62	Canferol ramnogalactocumarato	340	739	Folha,Fruto	Marques, 2017
43	42.69	Quercetina	340	301	Folha, fruto	Marques, 2017
44	42.33	Canferol ramnoglicocumarato	340	739	Folha	Marques, 2017

***Compostos iguais identificados em diferentes tempos de retenção.**

Fonte: Autor, 2017

As folhas apresentaram um perfil bastante diversificado de compostos polifenólicos e flavonóides. Nestas se observa a presença de flavonóis, como quercitinas substituídas (pentosídeo, galactosídeo, glucosídeo, ramnosídeo, ramnogalactocoumarate, ramnoglucocoumarato, rutina) e canferóis (ramnogalactosídeo, ramnogalactocoumarato, ramnoglucocoumarato). A rutina é a única espécie que aparecem todas as frações avaliadas das folhas, com picos muito intensos, nos levando a acreditar que seja o componente majoritário. Foi verificada a presença de ácidos alguns fenólicos, entre eles: ácido *trans-para*-cumárico, ácido *cis-para*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico e ácido *cis*-ferúlico. Adicionalmente foram encontradas no extrato das folhas três compostos com diferentes razões massa/carga (M= 135, 408, 1218) que não foram identificados, sendo estes isolados e reservados para estudos posteriores. A presença das quercitinas e canferóis substituídos por diferentes grupos de açúcares, assim como os ácidos fenólicos mencionados, está sendo descrita pela primeira vez em HSG. A maior parte de espécies inéditas encontradas em HSG (17 substâncias) neste trabalho, foram verificadas nesta parte da planta.

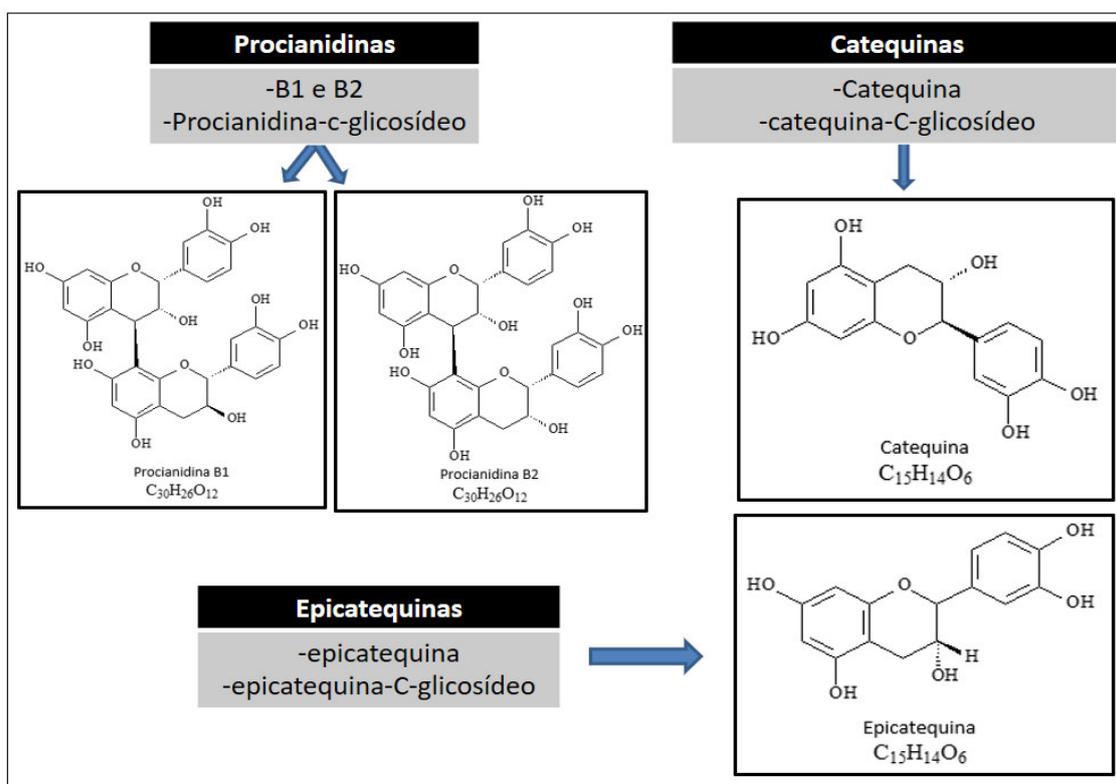
Figura 58 -Quadro ilustrativo das principais espécies identificadas no extrato metanólico das folhas de HSG.



Fonte: autor, 2017.

A composição química do extrato metanólico do caule, demonstrou um perfil bem diferenciado das folhas, sendo encontrado procianidinas, catequinas e epicatequinas. Estes dados corroboram com pesquisas anteriores realizadas por Rodrigues e colaboradores (2006, 2007), utilizando HPLC-MS. Foram identificados pela primeira vez no caule de HSG, quatro ácidos fenólicos (ácido *cis/trans*-etil-clorogênico, ácido vanílico, ácido *cis*-etil-clorogênico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico) e o flavonóide afzelequina-C-glicosídeo.

Figura 59 -Quadro ilustrativo das principais espécies identificadas no extrato metanólico do caule de HSG.

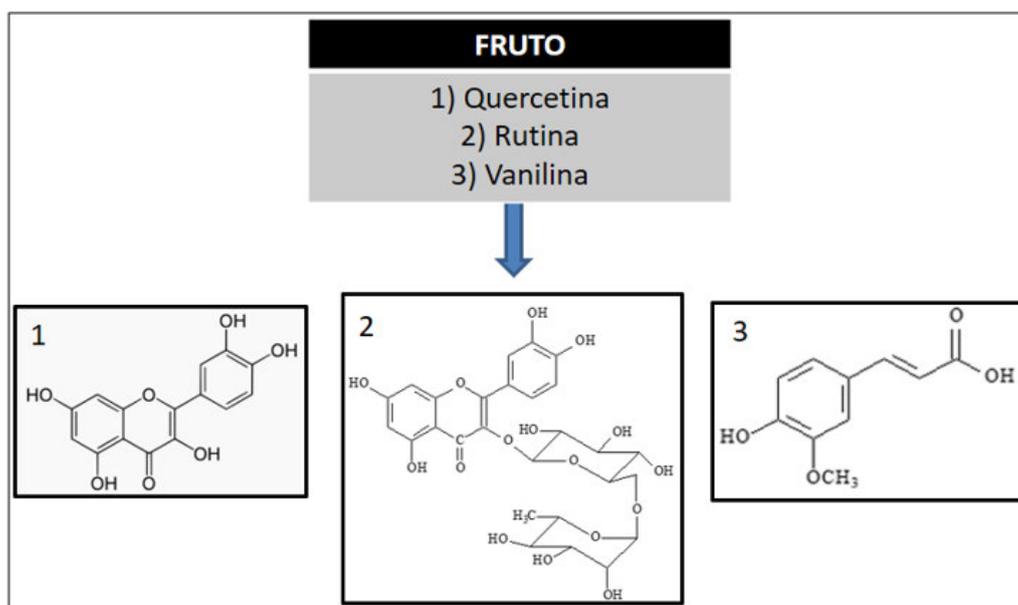


Fonte: autor, 2017.

De maneira oposta as folhas e caule, o extrato dos frutos apresentou baixa variedade de compostos polifenólicos em sua constituição química. Neste, foram identificados os ácidos fenólicos vanilina e ácido *trans*-ferúlico e os flavonóides quercetina, rutina, isoramnetina. A presença de vanilina e rutina nos frutos foi demonstrada pela primeira vez por Lima et al.(2015), sendo os demais compostos identificados pela primeira vez nos frutos de HSG. Logo os dados apresentados apontam para um elevado potencial bioativo, nas diferentes partes

de HSG, que pode ser explorado para inúmeras aplicações terapêuticas distintas.

Figura 60 -Quadro ilustrativo das principais espécies identificadas no extrato metanólico dos frutos de HSG.



Fonte: autor, 2017.

5.2.3 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas, caule e frutos de HSG foram investigados através dos ensaios de DPPH, FRAP, ORAC e xantina-oxidase conforme metodologia anteriormente descrita. Os valores de IC_{50} e concentração equivalente (EC) para os extratos mencionados estão apresentados abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 - Capacidade antioxidante (DPPH, FRAP, ORAC, XANTINA) dos extratos metanólicos de folhas, caules e frutos de HSG.

Amostras	Ensaio			
	DPPH (mg/mL) (IC_{50})	FRAP (mg/mL) (EC)	ORAC (Units)	HX/XO ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (IC_{50})
EMF	285.49	387.4	2.70	12
EMC	264.81	647.89	1.74	*
EMM	3995,56	12111,42	0,29	*
Rutina	229,25	438,87	5,40	*

Ac. <i>para</i> -cumárico	*	23106,67	5,29	*
Trolox	66.00	62.44	1.00	2.32

EMF= Extrato metanólico das folhas

EMC= Extrato metanólico do caule

EMM= Extrato metanólico dos frutos

*** Não apresentou atividade significativa nas concentrações testadas**

Fonte: autor, 2017.

Os extratos testados foram obtidos por extração Soxhlet e comparados a forma sintética e solúvel da vitamina E (Trolox), sendo os valores expressos em IC₅₀ ou concentração equivalente (EC). É possível ainda observar com os dados obtidos que todos os extratos (folhas, caule e frutos) apresentaram capacidade antioxidante nos ensaios de DPPH, FRAP e ORAC, porém sendo folhas e caules as partes da planta com a maior presença de substâncias com estas características.

Na avaliação do DPPH, que mede a capacidade das substâncias presentes nos extratos de inibir o radical livre DPPH, observa-se que EMC exibe concentração inibitória IC₅₀ (264,81 mg/L) levemente menor do que EMF (285,49) para inibição do DPPH. Os dados obtidos indicam que tanto caule, folhas e frutos possuem essa habilidade, sendo os frutos o com menor capacidade (3995,56 mg/mL), praticamente 60 vezes menor que o Trolox.

No que se refere ao FRAP, que mede a capacidade de redução do ferro pela formação de um complexo, percebe-se que o extrato das folhas (EMF) apresentam melhor eficácia que o caule (EMC) já que é necessário praticamente o dobro da concentração do extrato de caule (647,89 mg/L) para realizar a redução de Fe⁺³/Fe⁺².

Acerca dos valores relativos ao ensaio de ORAC folhas, caules e frutos demonstraram atividade antioxidante, observando-se, porém, que os valores relativos as folhas apresentam um resultado mais significativo e sendo os frutos (EMM) novamente o material com menor capacidade antioxidante. Curiosamente, este foi o único ensaio em que o ácido-*para*-cumárico apresentou elevada capacidade antioxidante (5,29 unidades de ORAC). A rotina também se

mostrou com potencial ORAC muito superior ao Trolox (5,40 unidades de ORAC), e aos extratos, o que pode ser um indicativo de um possível erro experimental.

Já no que diz respeito a avaliação frente a enzima Hipoxantina/Xantina apenas o extrato das folhas demonstrou modesta ação antioxidante. Caule e frutos não apresentaram atividade nesta metodologia. Em todos os ensaios realizados para avaliação do potencial antioxidante de HSG os frutos apresentaram-se com ação antioxidante menos significativa o que pode estar correlacionado com uma menor presença de compostos fenólicos quando comparados a folhas e caules.

Os valores apresentados referentes ao potencial da atividade antioxidante das folhas e caules de HSG podem estar relacionados a presença de diversos flavonóides identificados por HPLC/MS, tais como: quercetinas, canferol, procianidinas, catequinas, epicatequinas e outros ácidos fenólicos que são classes de compostos com capacidade antioxidante significativa (ENDRINGER, 2007). Dos compostos puros testados, apenas a rutina apresentou atividade antioxidante considerável.

5.2.4 Inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA)

A atividade de inibição da ECA dos extratos metanólicos de HSG foi avaliada usando um ensaio com HPLC. O sistema foi calibrado com captopril utilizado como controle positivo na concentração de 6,85 nM. A capacidade de conversão de ECA está relacionada ao poder farmacológico para o tratamento de doenças relacionadas ao controle da pressão arterial.

Os resultados obtidos (tabela 10) para os extratos das folhas e caules de HSG revelaram grande inibição da atividade de ECA sendo da ordem de 97,63% e 95,07% para EMF e EMC respectivamente. Os dados apresentados suportam a utilização de infusões de folhas e caules de HSG pela medicina popular no tratamento de doenças relacionadas a hipertensão arterial e apontam para o desenvolvimento de pesquisas com esta planta, no que se refere a produção de produtos farmacêuticos com maior eficácia e baixo custo. Da mesma forma que

nos ensaios relacionados ao potencial antioxidante, os frutos também apresentaram-se bem menos ativos quando comparados a folhas e caules no que se refere a inibição de ECA, sendo este de apenas 5,93%.

Tabela 10 -Percentual de conversão da enzima conversora da angiotensina I (ECA) para os extratos de HSG.

Extratos	% de conversão (ECA)	Desvio Padrão
EMF	97,63	2,89%
EMC	95,07	3,76%
EMM	5,93	3,15%

Fonte: autor, 2017.

Para materiais que apresentem conversões acima de 60% faz-se necessário o cálculo do índice de conversão de 50% da ECA (IC₅₀). Foram encontrados valores significativos de IC₅₀ para os extratos das folhas e caules sendo estes de 79,24e146,47µg/mL respectivamente (tabela 11). Como referência podemos mencionar o valor de IC₅₀ do captopril, principal medicamento utilizado no Brasil para o tratamento da hipertensão, que corresponde a 6,85 µg/mL.

Tabela 11 -IC₅₀ para os extratos metanólicos das folhas e caule de HSG.

Extratos de HSG	IC₅₀ (µg/mL)
EMF	79.24
EMC	146.47

Fonte: autor, 2017.

Os valores encontrados para o poder de conversão da ECA nas folhas de HSG corrobora com o trabalho realizado anteriormente por Endringer (2007), numa metodologia utilizando pulmões de coelho. O autor atribui como principais compostos inibidores da ECA rutina e bornesitol. Já Ferreira et al. (2007), realizando testes com HSG em artérias de ratos, verificou a vasodilatação destas a partir de um mecanismo via óxido nítrico (NO). No entanto a revisão da literatura não revelou publicações acerca do efeito anti-hipertensivo do caule de HSG. Sendo esta capacidade demonstrada pela primeira vez com este trabalho (MARQUES et al., 2015).

Tal característica dos extratos mencionados podem ser justificadas tendo em vista a presença de diversos metabólitos, dentre eles compostos fenólicos presentes nas folhas (ENDRINGER, 2007; SILVA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012) e nos caules pela elevada concentração de procianidinas (RODRIGUES et al., 2007).

5.2.5 Inibição frente a enzima acetilcolinesterase (AChE)

Como mencionado anteriormente, esta metodologia permite a verificação de maneira qualitativa do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase que está relacionada ao tratamento da doença de Alzheimer. A formação de um halo branco em torno dos "spots" é um indicativo de inibição da enzima AChE. A tabela 12 mostra os resultados obtidos para extratos e frações testadas bem como o tamanho dos halos em milímetros, em comparação com o padrão de eserina (positivo).

Tabela 12 - Inibição da enzima acetilcolinesterase por extratos etanólicos e hexânicos de folhas e caule de *Hancornia speciosa* Gomes.

Amostras	Resultado	Tamanho do halo (mm)
Padrão positivo (Eserina)	Positivo	9
EHF	Negativo	**
EHC	Positivo	13
EHM	Positivo	9
EEF	Positivo	9
EEC	Positivo	8
EEM	Positivo	9
FHCH – hexano	Negativo	**
FHCD – diclorometano	Negativo	**
FHCA – acetato de etila	Positivo	12
FHCM – metanol	Positivo	11
EHC – fração (1/3)	Negativo	**
EHC – fração (74/88)	Negativo	**
EHC – fração (90/98)	Positivo	6
EHC – fração (104/106)	Positivo	7
EHC – fração (112-118)	Negativo	**
EHC – fração (120/126)	Negativo	**

EHC – fração (128-132)	Negativo	**
EHC – fração (136/143)	Positivo	16
EHC – fração (144/146)	Positivo	15

** Sem atividade

* EHF – extrato hexânico das folhas; EHC – extrato hexânico do caule; EHM – extrato hexânico do fruto; EEF – extrato etanólico da folhas; EEC – extrato etanólico do caule; EEM – extrato etanólico do fruto; EHC – extrato hexânico do caule (frações).

Fonte: autor, 2017.

Os extratos etanólicos das folhas, caule e frutos, bem como os extratos hexânicos do caule e frutos, apresentaram resultados positivos no que diz respeito à inibição da AChE, enquanto que o extrato hexânico das folhas não apresentou tal característica. Entre os diferentes extratos de HSG analisados, o extrato hexânico do caule, mostrou-se com o potencial mais promissor para a inibição da AChE (13 mm). Por este motivo foi selecionado para fracionamento, utilizando cromatografia em coluna aberta (CCD), buscando o isolamento do princípio ativo.

A avaliação da inibição de AChE das diversas frações, obtida por meio de cromatografia de coluna sobregel desidratado EHC, mostrou que as frações 136-143 e 144-146 foram as mais ativas (16 e 15 mm respectivamente). Estas frações foram reunidas, e depois da remoção do solvente, obteve-se pó branco (25 mg) que apresentou faixa de fusão compreendida entre 203-211 °C. Este foi submetido a análise de RMN ¹H e ¹³C, e identificado como uma mistura que contém o triterpeno lupeol. Este resultado está de acordo com pesquisa realizada por Endringer (2007) que também isolou esta substância na fração de acetato de etila no extrato hexânico do caule.

5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C)

Os dados obtidos através de RMN ¹H, ¹³C e ¹³C-DEPT 135° indicam que durante o processo de fracionamento do EHC, a reunião das frações (136-146) levou a obtenção de uma mistura e não de um composto puro. Assim os sinais obtidos foram comparados com os resultados obtidos por Endringer (2007) que verificou a presença de esteróis (estigmasterol) e triterpenos (lupeol), considerando o mesmo gradiente de eluição, no fracionamento do EHC, utilizando coluna filtrante.

Os deslocamentos observados, estão apresentados na tabela 13, que os correlaciona com dados da literatura (MAHATO; KUNDU,1994).

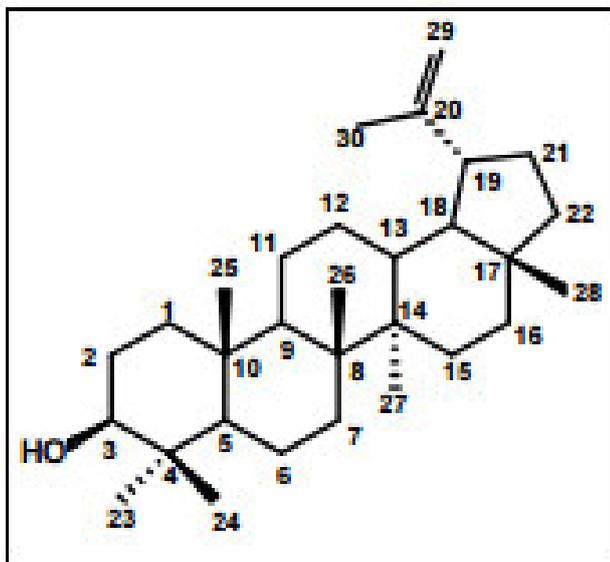
Tabela 13 - Deslocamento químico de RMN ^{13}C de EHC (136-146) comparados com os dados da literatura (MAHATO; KUNDU,1994).

136-146 (125MHz,CDCl₃)		Lupeol [MAHATO; KUNDU,1994] (125MHz,CDCl₃)	
C	δ_{C}		δ_{C}
1	38,14		38,7
2	27,34		27,4
3	77,47		78,9
4	38,46		38,8
5	55,48		55,5
6	18,38		18,3
7	34,30		34,3
8	40,95		40,8
9	50,44		50,4
10	37,19		37,1
11	21,07		20,9
12	25,19		25,1
13	37,92		38,0
14	42,95		42,8
15	27,55		27,4
16	35,68		35,5
17	43,11		43,0
18	48,39		48,0
19	48,11		47,9
20	151,03		150,9
21	29,76		29,8
22	40,12		40,0
23	28,14		28,0
24	14,64		15,4
25	16,10		16,1
26	16,29		15,9
27	14,64		14,5
28	18,13		18,0
29	109,52		109,3
30	19,43		19,3

Fonte: Autor, 2017.

Portanto, a partir do levantamento bibliográfico e dos deslocamentos químicos verificados, sugeriu-se como possível estrutura para EHC (136-146) o triterpeno com esqueleto do tipo lupano (figura 61), usualmente conhecido por lupeol.

Figura 61 - Estrutura química do triterpeno lupeol.



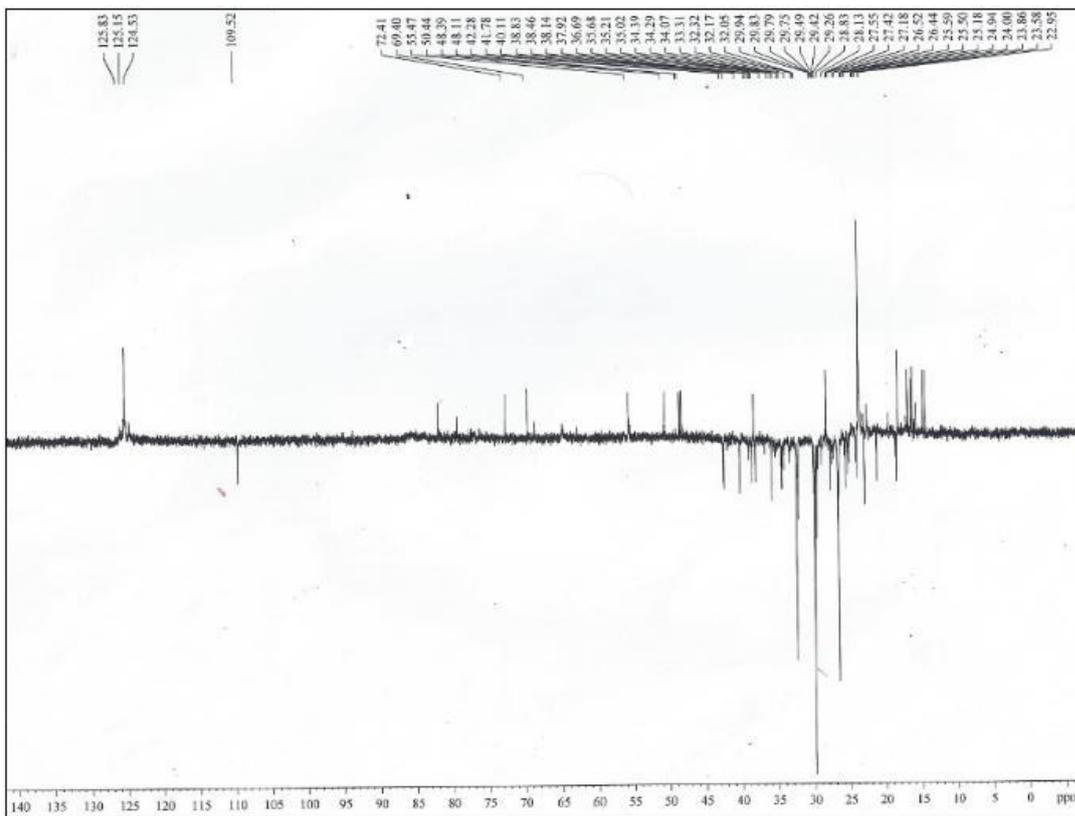
Fonte: Endringer, 2007.

O espectro de RMN ^1H de EHC (136-146), obtido com triclorometano deuterado (CDCl_3) com 500 MHz de frequência, apresentou sete singletos que podem ser identificados na mistura (figura 62), referentes à absorção dos hidrogênios dos grupamentos metílicos terciários.

Verifica-se que o último singletto se apresenta na região mais desprotegida (δ 1,69), sugerindo que este encontra-se ligado a um carbono com hibridização sp^2 . Na região de δ 3,20, à absorção de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado (carbinólico).

Analisando os dados do espectro de RMN ^{13}C em comparação com os dados de RMN ^{13}C -DEPT 135° (figuras 63 e 64 respectivamente) de EHC (136-146), obtido em CDCl_3 a 125 MHz, obteve-se os valores de sete carbonos metílicos (CH_3), onze carbonos metilênicos (CH_2), seis carbonos metínicos (CH) e seis carbonos não hidrogenados (C), resultando um total em trinta picos de carbonos, característicos de triterpenos pentacíclicos (Tabela 13). No espectro pode-se observar sinais considerados característicos para um esqueleto lupano, esses sinais são: δ 77,47 (HC-OH), além dos sinais em δ 151,03 (C-20) e δ 109,52 (C-29) foram condizentes com a presença de uma dupla ligação terminal.

Figura 64– Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de EHC (136-146).



Fonte: autor, 2017.

6. CONCLUSÕES

As metodologias desenvolvidas acoplando-se o sistema de geração de radicais livres ao processo de formação dos produtos de glicação avançada (AGEs), mostraram-se bastante eficazes em virtude da redução drástica do tempo de reação para obtenção dos AGEs, considerando todos os ensaios desenvolvidos (glicose, glioxal e metilglioxal).

Os dados acerca das metodologias para obtenção dos AGEs, permitem concluir que o acoplamento do sistema de geração de radicais livres denominado hipoxantina/xantinaoxidase, ao processo de formação dos AGEs, promoveu a formação dos mesmos em 48 horas para os procedimentos com açúcares e em apenas 3 horas com os dicarbonílicos (metilglioxal e glioxal). Ressalta-se que as metodologias atuais necessitam de um período de incubação com até 4 semanas para obtenção dos AGEs *in vitro*. Portanto, quando na presença de radicais livres, os AGEs se formam mais rapidamente, possivelmente pela oxidação dos açúcares e das cadeias laterais das proteínas, que geram espécies dicarbonílicas reativas (RCS) com maior velocidade.

Os resultados verificados nos métodos em que buscou-se analisar a capacidade de diferentes espécies em combater a formação dos AGEs, por atuarem como agentes capturadores de espécies dicarbonílicas reativas (RCS), indicaram que a rutina se mostrou mais efetiva que o próprio controle positivo indicado pela literatura (aminoguanidina). A maior reatividade da rutina pode se justificar pelo fato dos inúmeros intermediários carbocátions gerados e estabilizados por efeito de ressonância dos anéis aromáticos existentes em sua estrutura. Assim, podem se formar adutos mono e dissubstituídos nas posições 6 e/ou 8 do anel A flavonóico.

Em virtude da elevada fluorescência dos compostos constituintes dos frutos e caule, apenas os extratos metanólicos das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (HSG) apresentaram a capacidade de atuarem como capturadores de espécies dicarbonílicas.

Esta pesquisa também reafirma as evidências de Maillard, de que o processamento dos alimentos, em busca de melhor palatibilidade, produz

espécies nocivas a saúde humana, como por exemplo: o processo de cozimento dos alimentos em elevadas temperaturas. Os resultados demonstram que a alteração na temperatura dos procedimentos, de 37 °C para 90 °C, promoveu aumento significativo na formação dos AGEs.

De maneira análoga, a substituição de glicose por frutose ou galactose nos métodos desenvolvidos, praticamente dobrou a formação dos AGEs em todas as condições analisadas. Estas informações, corroboram para demonstrar à ação maléfica de dietas ricas em produtos industrializados com adição do xarope de frutose (sucos, energéticos, bebidas carbonatadas, etc), bem como de produtos lácteos. O incremento na formação dos AGEs, devido à presença de frutose e galactose, pode ser explicado pelo fato destas, apresentarem maior quantidade de espécies em sua forma aberta, para sofrer reação de condensação conforme descrito na reação de Maillard. Logo, a presença de frutose e galactose em excesso no organismo humano, contribui para acelerar o processo de glicação das proteínas.

A análise do perfil químico dos constituintes de folhas, caule e frutos de HSG revelou uma elevada diversidade de flavonóides e compostos fenólicos, existentes em todas as partes avaliadas da planta. Nas folhas verificou-se a predominância de quercitinas e canferóis, enquanto no caule as catequinas e procianidinas foram verificadas em praticamente todas as frações avaliadas por HPLC/MS. Os frutos demonstraram uma variedade menos significativa, porém também se identificou quercitina, rutina e alguns ácidos fenólicos. Das quarenta e uma espécies distintas identificadas em todas as partes de HSG, vinte e seis destas, estão sendo descritas pela primeira vez na literatura.

O extrato hexânico do caule (EHC), apresentou-se como aquele com maior capacidade inibitória frente a enzima acetilcolinesterase, que está relacionada ao tratamento da doença de Alzheimer. O processo de fracionamento do EHC por cromatografia em coluna aberta, levou a obtenção de frações impuras (misturas). A análise dos dados de RMN para fração mais ativa, quando confrontado com dados da literatura, nos permitiu sugerir a obtenção de uma mistura contendo o triterpeno lupeol e possivelmente terpenóides (estigmasterol).

Os extratos metanólicos de folhas e caule de HSG apresentam um elevado potencial de inibição da enzima conversora da angiotensina I, que se relaciona ao controle da atividade anti-hipertensiva. Ambos os extratos mencionados apresentaram elevada atividade anti-hipertensiva e corroboram diretamente com a medicina tradicional (popular) que indica a utilização de infusões de folhas de HSG com esta finalidade pelos povos indígenas. Estes resultados apontam para a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas com os mesmos, visando isolar e identificar os principais compostos responsáveis por esta ação terapêutica e conseqüentemente o desenvolvimento de novos fármacos e fitoterápicos mais ativos e acessíveis para a sociedade.

A capacidade em combater os radicais livres (poder antioxidante) dos extratos de folhas, caule e frutos de HSG parecem corroborar com os dados do perfil químico. Tal afirmação está ancorada nos resultados obtidos, pois demonstram que as partes da planta com maior capacidade em combater os radicais livres, foram exatamente aquelas que apresentaram maior diversidade de flavonóides e compostos fenólicos (folhas e caule). Os frutos apresentaram-se menos ativos, muito provavelmente devido a menor variedade de flavonóides e outros fenólicos em sua constituição.

Portanto tendo em vista todo o potencial farmacológico apresentado pelos extratos de HSG, espera-se com esta pesquisa despertar ainda mais o interesse da comunidade científica para estudos com esta planta, projetando a produção de fármacos e patentes.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, H. M.; EL-BASSOSSY, H. M.; MOHAMED, G. A.; EL-HALAWANY, A. M.; ALSHALI, K. Z.; BANJAR, Z. M. Mangostanaxanones III and IV: advanced glycation end-product inhibitors from the pericarp of garcinia mangostana. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, p. 216-226, 2017.

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

BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. XY, p. 1-13, 2016.

BARRETO, J. C. **Prospecção de substâncias com potencial antioxidante em cultivares de *Mangifera indica* Linn**: identificação e qualificação de compostos fenólicos. 2007. 266p. Tese (Doutorado - Área de concentração: Química Orgânica) - Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R. W. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5599-5610, 2008.

BOUSOVA, I.; PRUCHOVA, Z.; TRNKOVA, L.; DRŠATA, J. Comparison of glycation of glutathione S-transferase by methylglyoxal, glucose or fructose. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 357, p. 323–330, 2011.

BRINGS, S.; FLEMING, T.; FREICHEL, M.; MUCKENTHALER, M. U.; HERZIG, S.; NAWROTH, P. P. Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for

intervention. **International Journal of Molecular Science**, n. 5, v. 18, p. 1-24, 2017.

BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do herbário da Universidade de Feira de Santana. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p. 152-163, 1982.

BRUCE, P. Y. **Química orgânica**. 4 ed. v. 2. São Paulo: PEARSON, 2006.

CAMPANA, P. R.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. **Phytomedicine**, v. 16, n. 5, p. 456-461, 2009.

CARDOSO, M. C.; REIS, B. L.; OLIVEIRA, D. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from the Brazilian Cerrado: nutritional value, carotenoids and antioxidants vitamins. **Fruits**, v. 69, n. 2, p. 89-99, 2014.

CHEN, H.; VIRK, M. S.; CHEN, F. Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 400-411, 2016.

CHEN, G.; SMITH, J. S. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products. **Food Chemistry**, v. 168, p. 190-195, 2015.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; GIUGLIANI, E. R. J.; DUNCAN, M. S.; GIUGLIANI, C. **Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ELLMAN G. L.; COURTNEY K. D.; ANDRES V. J. R.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ENDRINGER, D.C. **Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**. 2007. 259p. Tese (Doutorado - Área de Fármacos e Medicamentos) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

FAN, X.; RENEKER, L. W.; OBRENOVICH, M. E.; STRAUCH, C.; CHENG, R.; JARVIS, S. M.; ORTWERTH, B. J.; MONNIER, V. M. Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 45, p. 16912-16917, 2006.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, p. 473–478, 2007.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 161–164, 2007.

FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, n. 6, v. 61, p. 19-23, 1980.

FILHO, J. M. B.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; FILHO, A. P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.

FRANCO, C. F. O.; FILHO, C. J.; BARREIRO, N. M.; ARAÚJO, I. A.; MATIAS, E. C.; MENINO, I. B.; LIMA, I. X.; MARINHO, S. J. O.; FONTINELLI, I. S. C. **Mangabeira: *Hancornia speciosa* Gomes**. 1 ed. João Pessoa: EMEPA, 2003.

FREITAS, A. C. **MANGABA (*Hancornia speciosa* Gomes)**: localização de populações nativas no cerrado amapaense e caracterização morfológica das progênies do banco ativo de germoplasma da EMBRAPA Amapá. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado – Mestrado Integrado em Desenvolvimento Regional) -

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá, Universidade Federal do Amapá, Macapá.

GANGA, R. M. D.; FERREIRA, G. A.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L. Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p.101-103, 2010.

GAUTIERI, A.; PASSINI, F. S.; SILVAN, U.; SICAIRO, M. G.; CARIMATI, G.; VOLPI, P.; MORETTI, M.; SCHOENHUBER, H.; REDAELLI, A.; BERLI, M. Advanced glycation end-products: mechanics of aged collagen from molecule to tissue. **Matrix Biology**, v. 59, p. 95–108, 2017.

GAVILANES, M. L.; BRANDAO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. **Informação agropecuária**, v. 16, p. 40 - 44, 1992.

HALVORSEN, B. L.; CARLSEN, M. H.; PHILLIPS, K. M.; BØHN, S. K.; HOLTE, K.; JACOBS, D. R. J.; BLOMHOFF, R. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 93-135, 2006.

HE, J.; ZENG, M.; ZHENG, Z.; HE, Z.; CHEN, J. Simultaneous determination of N^ε-(carboxymethyl) lysine and N^ε-(carboxyethyl) lysine in cereal foods by LC–MS/MS. **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 367–374, 2014.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 319-326, 2005.

HIRAMOTO, K.; SEKIGUCHI, K.; ASO-O, R.; AYUHA, K.; NI-IYAMA, H.; KATO, T.; KIKUGAWA, K. DNA strand breaks induced through active oxygen radicals by fragrant component 4-hydroxy-2-hydroxymethyl- 5-methyl-3(2h)-furanone in maillard reaction of hexose/amino acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 803-814, 1995.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 159 - 172, 1990.

HU, T. Y.; LIU, C. L.; CHYAU, C. C.; HU, M. L. Trapping of methylglyoxal by curcumin in cell-free system and in human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 33, p. 8190-8196, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; WOODILL, M. H.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4437-4444, 2002.

JIANG, Y.; HENGEL, M.; PAN, C.; SEIBER, J. N.; SHIBAMOTO, T. Determination of toxic alpha-dicarbonyl compounds, glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl, released to the headspace of lipid commodities upon heat treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1067-1071, 2013.

JOGLEKAR, M. M; PANASKAR, S. N; ARVINDEKAR, A. U. Inhibition of advanced glycation end product formation by cymene—A common food constituent. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 107–115, 2014.

JOGLEKAR, M. M; PANASKAR, S. N.; CHOUGALE, A. D.; ULKARNIB, M. J.; ARVINDEKAR, A. U. A novel mechanism for antiglycative action of limonene through stabilization of protein conformation. **MolecularBioSystems**, v. 9, p. 2463-2472, 2013.

JUNIOR, M. S. S.; CALIARI, M.; VERA, R; SOUZA, A. G. Conservação pós-colheita de mangaba sob refrigeração e modificação da atmosfera de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 28, n. 2, p. 78-86, 2008.

KAZI, R. S.; BANARJEE, R. M.; DESHMUKH, A. B.; PATIL, G. V.; JAGADEESHAPRASAD, M. G.; KULKARNI, M. J. Glycation inhibitors extend yeast chronological lifespan by reducing advanced glycation end products and by back regulation of proteins involved in mitochondrial respiration. **Journal of Proteomics**, v. 156, p. 104–112, 2017.

KLEEMANN, A.; ENGEL, J.; KUTSCHER, B.; REICHERT, D. **Pharmaceutical substances**: syntheses, patents and applications of the most relevant APIs. 5. ed. Berlin: THIEME, 2009.

LAHOQUE, V.; REHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A. HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 870-875. 2010.

LAPOLLA, A.; FEDELE, D.; REITANO, R.; ARICO, N. C. Enzymatic digestion and mass spectrometry in the studies of advanced glycation end products/peptides. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, p. 496-509, 2004.

LEDERMAN, I. E.; BEZERRA, J. E. F. Situação atual e perspectivas da cultura da mangaba no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracajú. **Anais...** Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1CD.

LEDL, F.; SCHLEICHER, E. New aspects of the Maillard reactions in foods and in the human body. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 29, p. 565-706, 1990.

LEE, G. C.; LEE, C. Y. Inhibitory effect of caramelisation products on enzymic browning. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, 1997.

LIAO, G. Z.; WANG, G. Y.; ZHANG, Y. J.; XU, X. L.; ZHOU, G. H. Formation of heterocyclic amines during cooking of duck meat. **Food Additives & Contaminants**, v. 29, p.1668-1678, 2012.

LIMA, J. P.; AZEVEDO, L.; SOUZA, N. J.; NUNES, E. E.; BOAS, E. V. B. V. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit in vivo and its phenolic profile identification. **Food Research International**, v. 75, p. 216–224, 2015.

LIMA, J. P.;FANTE, C. A.;PIRES, C. R. F.; NUNES, E. E.;ALVES, R. R.; ELIAS, H. H. S.; NUNES, C. A.;BOAS, E. V. B. V. The antioxidative potential and volatile constituents of mangaba fruit over the storage period. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 1-6, 2015.

LIMA, J. P. **Primeira avaliação do efeito antimutagênico in vivo da mangaba e identificação do seu perfil fenólico**. 2015. 93 p. Tese (Doutorado - Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LO, C. Y.; HSIAO, W. T.; CHEN, X. Y. Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acid. **Journal Food Science**, v. 76, n. 3, p. H90-H96, 2011.

LO, C. Y.; LI, S.; TAN, D.; PAN, M. H.; SANG, S.; HO, C. T. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1118-1128, 2006.

LOSSO, J. N. **The maillard reaction reconsidered: cooking and eating for health**. New York: CRC Press, 2016. 438 p

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-75, 1994.

MAILLARD, L. C. Action des acidesamines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. **CR Academy of Sciences**, v. 154, p. 66-68, 1912.

MAJS, V. B. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, 2006.

MARINHO, D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from Hancornia speciosa Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, n. 2, p. 530–537, 2011.

MARQUES, S. P. D. M.; OLIVEIRA, I. R.; OWEN, R. W.; TREVISAN, M. T. S. Antioxidant capacity, angiotensin I converting enzyme (ACE) and

acetylcholinesterase inhibition by extracts of the leaves and bark of *Hancornia speciosa* Gomes. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 172-183, 2015.

MASAKI, H.; OKANO, Y.; SAKURAI, H. Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 45-56, 1999.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.439–445, 2009.

MONNIER, V. M.; VISHWANATH, V.; FRANK, K. E.; ELMETS, C. A.; DAUCHOT, P.; KOHN, R. R. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagenlinked fluorescence. **New England Journal of Medicine**, v. 314, p. 403-408, 1986.

MORAES, T. E. M.; RODRIGUES, C. M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T. M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C. H.; BRITO, A. R.; HIRUMA, L. C. A. *Hancornia speciosa*: indications of gastroprotective, healing and anti-helicobacter pylori actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 161-168, 2008.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ARAÚJO, N. C. C.; ALMEIDA, A. S. Quality of fruits native to latin america for processing: mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Acta Horticulturae Leuven**, v. 2, n. 575, p. 549-554, 2002.

NAVARRO, M.; MORALES, F. J. Mechanism of reactive carbonyl species trapping by hydroxytyrosol under simulated physiological conditions. **Food Chemistry**, v. 175, p. 92–99, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 5 ed. 2011.

NEMET, I.; VARGA, D.; TURK, Z. Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 875-881, 2004.

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation Research**, v. 48, n. 10, p. 509-515, 1999.

OLIVEIRA, I. R. **Estudo da Variabilidade Química e do Potencial Farmacológico de Espécies de Senna do Nordeste**. 2015. 146p. Tese (Doutorado - Área de concentração: Química Orgânica) - Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OLIVEIRA, K. S.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, E. C.; LIMA, S. C.; ALOUFA, M. A. Efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Árvore**, v. 38, n. 4, p. 601-607, 2014.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDAO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v.48, p.170–179, 2012.

OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 10, p.1235-1247, 2000.

PASTINO, A. K.; GRECO, T. M.; MATHIAS, R. A.; CRISTEA, I. M.; SCHWARZBAUER, J. E. Stimulatory effects of advanced glycation endproducts (AGEs) on fibronectin matrix assembly. **Matrix Biology**, v. 59, p. 39–53, 2017.

PENG, X.; CHENG, K. W.; MA, J.; CHEN, B.; HO, C. T.; LO, C.; CHEN, F.; WANG, M. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1907-1911, 2008.

PENG, X.; MA, J.; CHEN, F.; WANG, M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food Function**, v. 2, p. 289–301, 2011.

PEREIRA, A. B. D.; VERÍSSIMO, T. L.; OLIVEIRA, M. A.; ARAUJO, I. A.; ALVES, R. J.; BRAGA, F. C. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. **Journal of Chromatography B**, v.887– 888, p.133– 137, 2012.

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

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. 1 ed. Planaltina: EMBRAPA, 1994.

POULSEN, M. W.; HEDEGAARD, R. V.; ANDERSEN, J. M.; COURTEN, B.; BUGEL, S.; NIELSEN, J.; SKIBSTED, L. H.; DRAGSTED, L. O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 10-37, 2013.

PRASANNA, G.;SARASWATHI, N. T. Linolenic acid prevents early and advanced glycation end-products (AGEs) modification of albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**,v. 95, p. 121–125, 2017.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; CALIXTO, S. F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidante power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RHEE, K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RIBEIRO, S. S.; JESUS, A. M.; ANJOS, C. S.; SILVA, T. B.; SANTOS, A. D.; JESUS, J. R.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; GOMES, W. F.; ALVES, P. B.;

CARVALHO, A. A.; PESSOA, C. M. M. O.; PINHEIRO, M. L.; PRATA, A. P.; BLANK, A. F.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V. R.; COSTA, E. V.; NOGUEIRA, P. C.; BEZERRA, D. P. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v. 78, n. 14, p. 1601-1606, 2012.

RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA, L. C. A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynacea). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo, 2006.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; LIMA, C. A. H.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1907-1914, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZ, J. J.; CALIXTO, F. S.; MANCINI, J. F. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAMPAIO, T. S. **Estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: isolamento, determinação estrutural e atividade biológica.** 2008. 148p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, Aracajú.

SANG, S.; SHAO, X.; BAI, N.; LO, C. Y.; YANG, C. S.; HO, C. T. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: a new trapping agent of reactive dicarbonyl species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1862-1870, 2007.

SANTOS, E. A.; SAMPAIO, T.; FEITOSA, J. G. R.; RIBEIRO, A. O.; NOGUEIRA, P. C. L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynacea). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo, 2006.

SANTOS, P. O.; JUNIOR, A. M. B.; MELO, D. L. F. M.; TRINDADE, R. C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 108-111, 2007.

SERO, L.; SANGUINET, L.; BLANCHARD, P.; DANG, B. T.; MOREL, S.; RICHOMME, P.; SERAPHIN, D.; DERBRE, S. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to Identify AGE Inhibitors in crude plant extracts. **Molecules**, v. 18, p. 14320-14339, 2013.

SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v.12, p.424–432, 2005.

SHAKAMBARI, G.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Phlorotannins from Brown Algae: inhibition of advanced glycation end products formation in high glucose induced *Caenorhabditis elegans*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 371-379, 2015.

SHAO, X.; BAI, N.; HE, K.; HO, C. T.; YANG, C. S.; SANG, S. Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 2042-2050, 2008.

SHEN, Y.; XU, Z.; SHENG, Z. Ability of resveratrol to inhibit advanced glycation end product formation and carbohydrate-hydrolyzing enzyme activity, and to conjugate methylglyoxal. **Food Chemistry**, v. 216, p. 153–160, 2017.

SILVA, A. V. C.; SANTOS, A. R. F.; WICKERT, E.; JUNIOR, J. F. S.; COSTA, T. S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 4, p. 572-578, 2011.

SILVA, G. C.; BRAGA, F. C.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 214–219, 2016.

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

SILVA, J. J. F.; LEDO, A. S. **A cultura da mangaba**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

SILVA, J. P.; AREIAS, F. M.; PROENÇA, F. M.; COUTINHO, O. P. Oxidative stress protection by newly synthesized nitrogen compounds with pharmacological potential. **Life Sciences**, v. 78, p. 1256-1267, 2006.

SMITH, P. K.; MASILAMANI, M.; LI, X. M.; SAMPSON, H. M. The false alarm hypothesis: Food allergy is associated with high dietary advanced glycation end-products and proglycating dietary sugars that mimic alarmins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 2, p. 429–437, 2017.

SOLOMONS, G. T. W.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SPITELLER, G. Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1126, p. 128–133, 2008.

TAN, D.; WANG, Y.; LO, C. Y.; HO, C. T. Methylglyoxal: its presence in beverages and potential scavengers. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 261-264, 2008.

TANG, D.; ZHU, J. X.; WU, A. G.; XU, Y. H.; DUAN, T. T.; ZHENG, Z. G.; WANG, R. S.; LI, D.; ZHU, Q. Pre-column incubation followed by fast liquid chromatography analysis for rapid screening of natural methylglyoxal scavengers directly from herbal medicines: case study of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Chromatography A**, v. 1286, p. 102–110, 2013.

THORNALLEY, P. J. Dietary AGEs and ALEs and risk to human health by their interaction with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)-an introduction. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 5, p.1107-1110, 2007.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304; 2003.

TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

TURNER, D. P. Chapter one – the role of advanced glycation end-products in cancer disparity. **Advances in Cancer Research**, v. 133, p. 1–22, 2017.

URIBARRI, J.; CAI, W.; PEPPA, M.; GOODMAN, S.; FERRUCI, L.; STRIKER, G.; VLASSARA, H. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. **Journal of Gerontology A**, Biological Sciences and Medical Sciences, v. 62, n. 4, p. 427-433, 2007.

VIEIRA, C. V. **Caracterização de frutos e de mudas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) de Goiás**. 2011. 182p. Dissertação (Mestrado – Engenharia de alimentos) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

VIEIRA, R. D. N. **Cultura da mangabeira**. Aracaju: Embrapa-CPATC, (Circular Técnica n.2), 1994. 16 p.

VILLA, M.; PARRAVANO, M.; MICHELI, A.; GADDINI, L.; MATTEUCCI, A.; MALLOZZI, C.; FACCHIANO, F.; ALBEDI, F. M.; PRICCI, F. A quick, simple method for detecting circulating fluorescent advanced glycation end-products: Correlation with in vitro and in vivo non-enzymatic glycation. **Metabolism**, v. 71, p. 64-69, 2017.

VINSON, J. A.; HOWARD, T. B. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. **Journal Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 659-663, 1996.

VISTOLI, G.; MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, p. 3-27, 2013.

VLISSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both?. **Current Diabetes Reports**, v.14, n.1, p. 1-17, 2014.

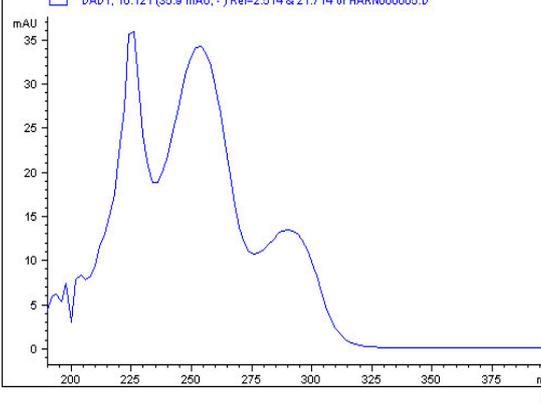
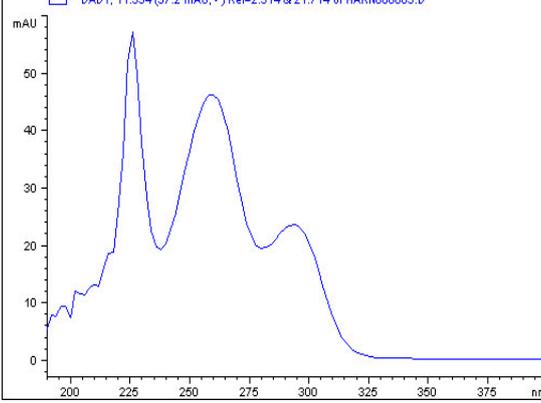
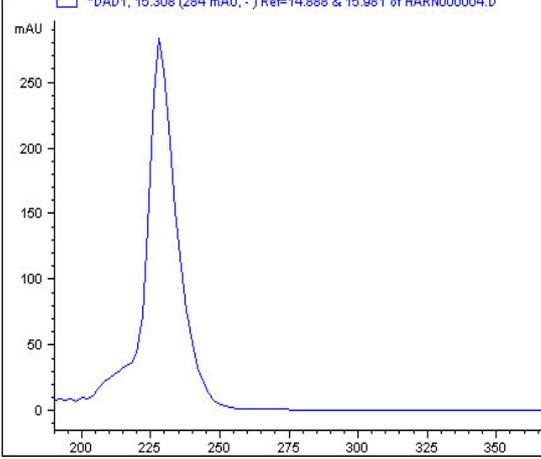
YIM, H.; KANG, S.; HAH, Y.; CHOCK, P. B.; YIM, M. B. Free radicals regenerated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 47, p. 28228–28233, 1995.

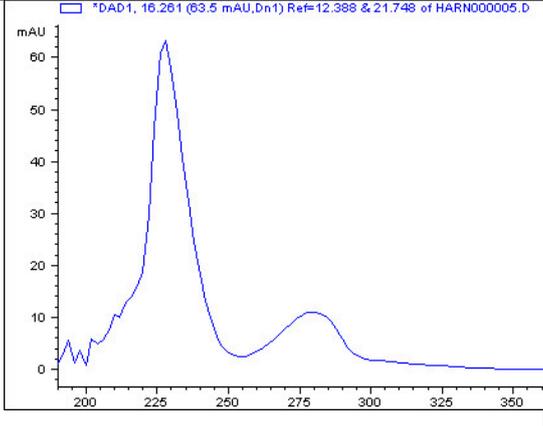
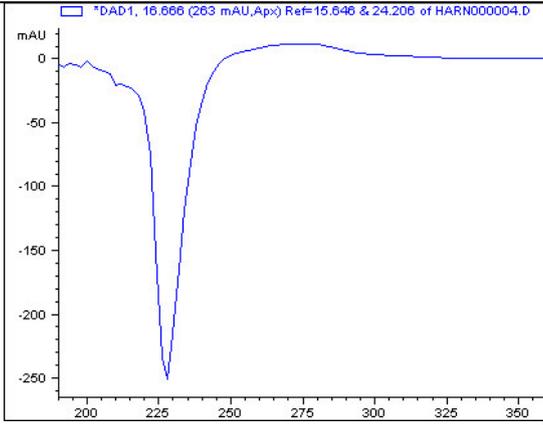
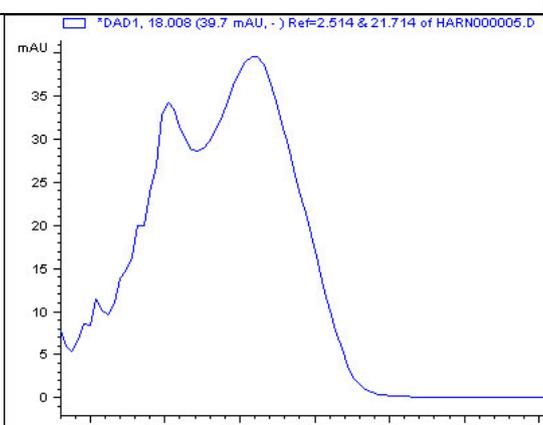
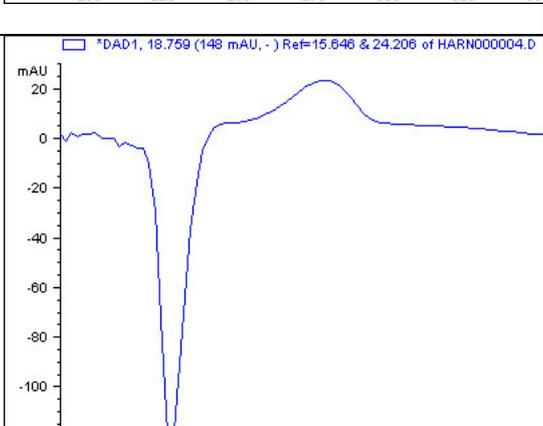
YU, L. L.; WANG, S.; SUN, B. G. **Food Safety Chemistry: toxicant occurrence, analysis and mitigation**. New York: CRC, 2014.

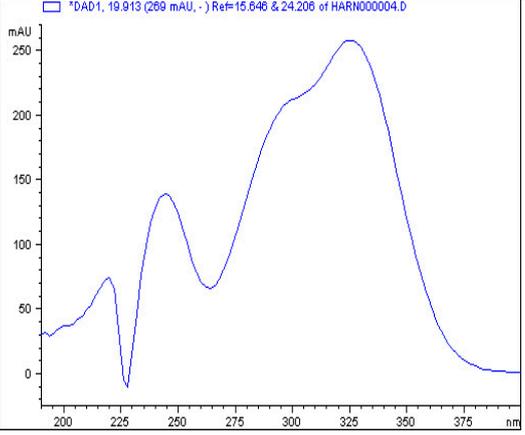
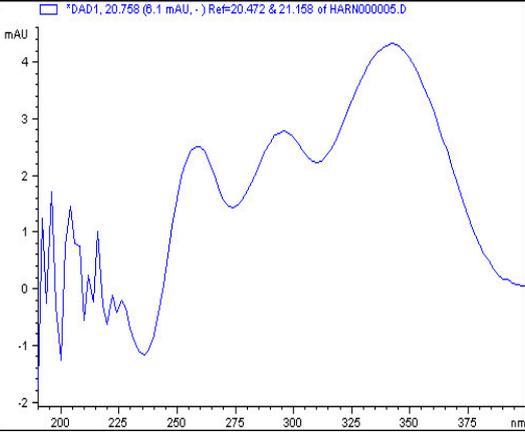
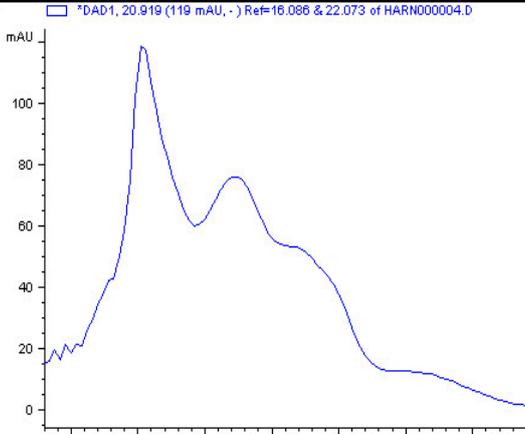
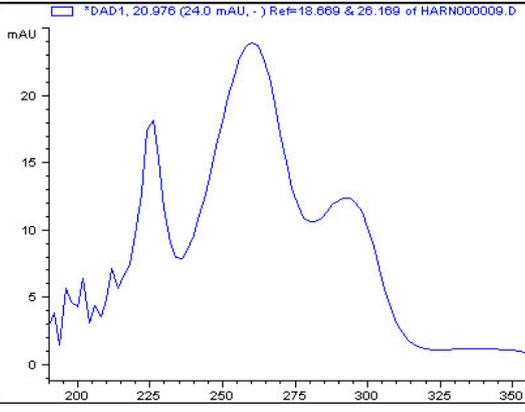
WANG, Y.; HO, C. T. Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 4140-4149, 2012.

ANEXOS

ANEXO I. Espectros de DAD dos compostos identificados em HPLC-ESI-MS, nos extratos metanólicos de *Hancornia speciosa* Gomes.

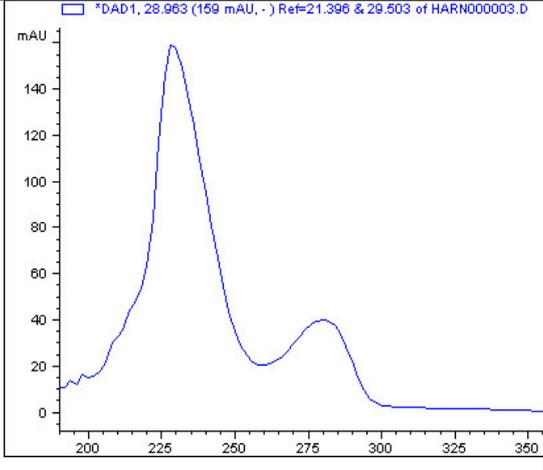
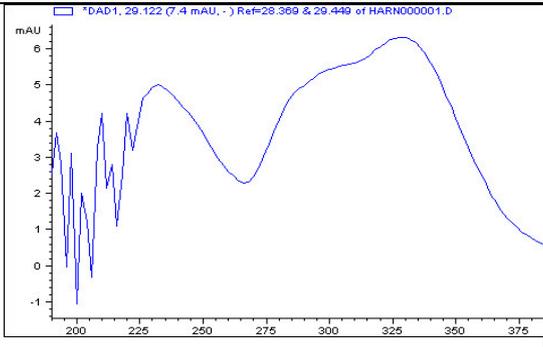
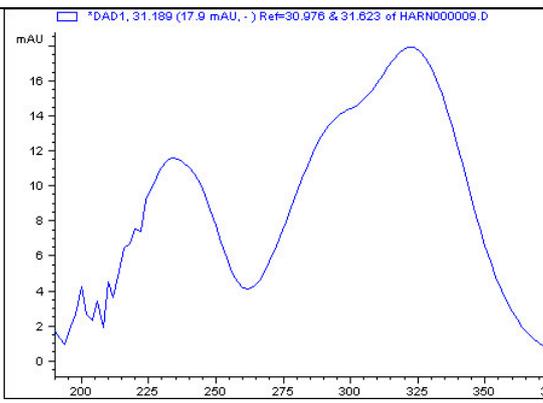
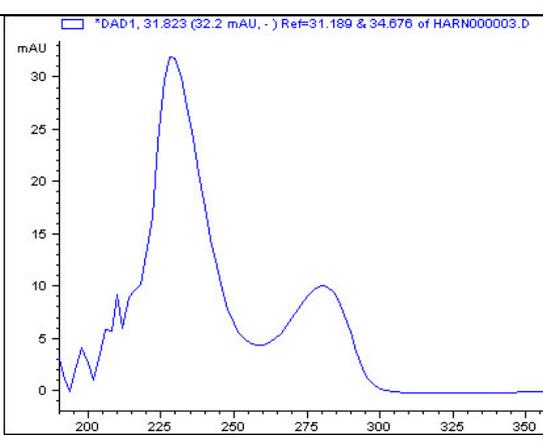
N°	Nome do composto	Massa molecular	Tempo de retenção (minutos)	DAD
1	Ácido vanílico glicosídeo	330	10.17	 <p>*DAD1, 10.121 (35.9 mAU, -) Ref=2.514 & 21.714 of HARN000005.D</p>
2	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	154	11.67	 <p>*DAD1, 11.554 (57.2 mAU, -) Ref=2.514 & 21.714 of HARN000005.D</p>
3	M = 408	408	15.25	 <p>*DAD1, 15.308 (284 mAU, -) Ref=14.888 & 15.981 of HARN000004.D</p>

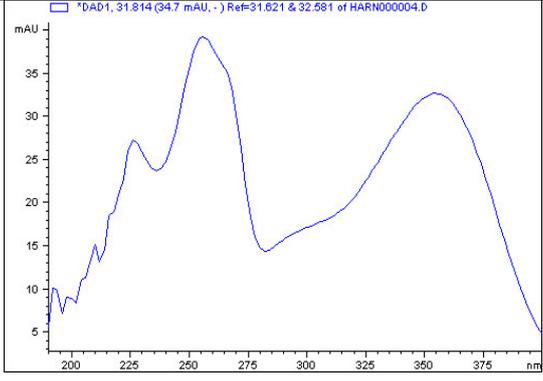
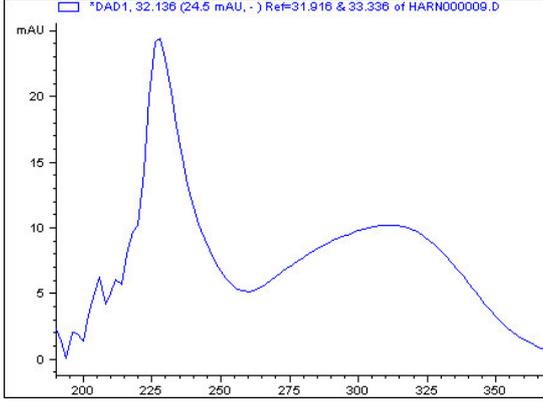
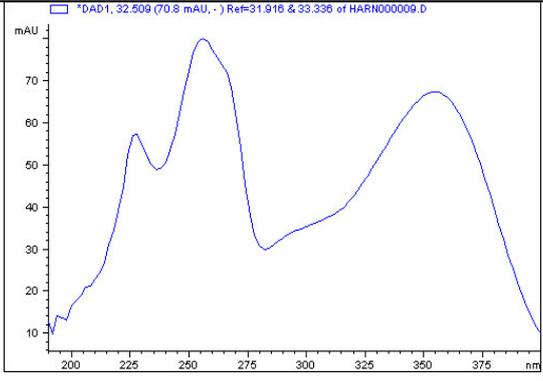
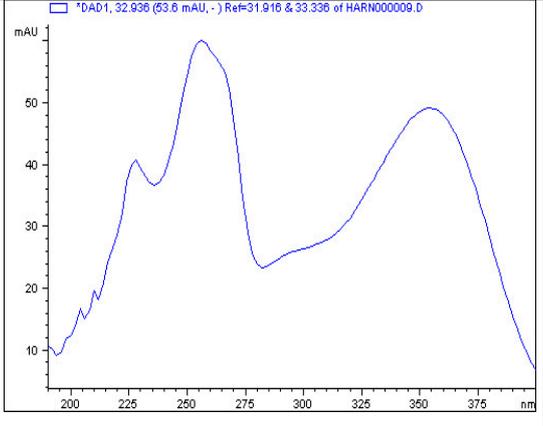
4	M=360	360	16.24	
5	Procianidina B1	578	16.66	
6	Ácido para-hidroxibenzoico	138	18.09	
7	Catequina	290	18.77	

8	Ácido clorogênico	354	19.98	 <p>*DAD1, 19.913 (269 mAU, -) Ref=15.646 & 24.206 of HARN000004.D</p>
9	<i>Trans</i> -ácido clorogênico	354	20.17	 <p>*DAD1, 20.758 (8.1 mAU, -) Ref=20.472 & 21.158 of HARN000005.D</p>
10	Procianidina B2	578	20.94	 <p>*DAD1, 20.919 (119 mAU, -) Ref=16.088 & 22.073 of HARN000004.D</p>
11	Ácido vanílico	168	20.98	 <p>*DAD1, 20.976 (24.0 mAU, -) Ref=18.689 & 26.169 of HARN000009.D</p>

12	Catequina-C-glicosídeo	452	21.55	<p>*DAD1, 21.553 (167 mAU, Apx) Ref=16.086 & 22.073 of HARN000004.D</p>
13	Epicatequina	290	23.05	<p>*DAD1, 23.066 (85.1 mAU, -) Ref=15.846 & 24.206 of HARN000004.D</p>
14	<i>Cis</i> -ácido clorogênico	354	23.33*	<p>*DAD1, 20.758 (6.1 mAU, -) Ref=20.472 & 21.188 of HARN000005.D</p>
15	M = 136	136	25.45	<p>*DAD1, 25.463 (490 mAU, -) Ref=25.123 & 26.269 of HARN000009.D</p>

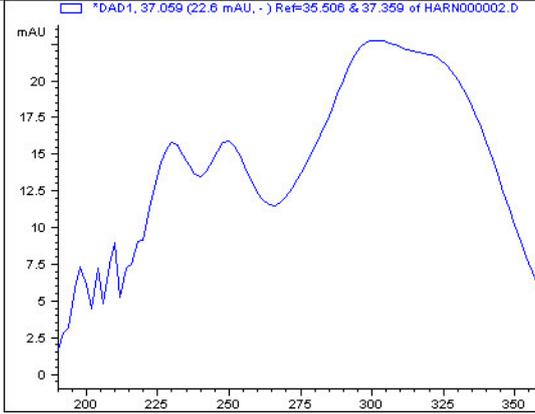
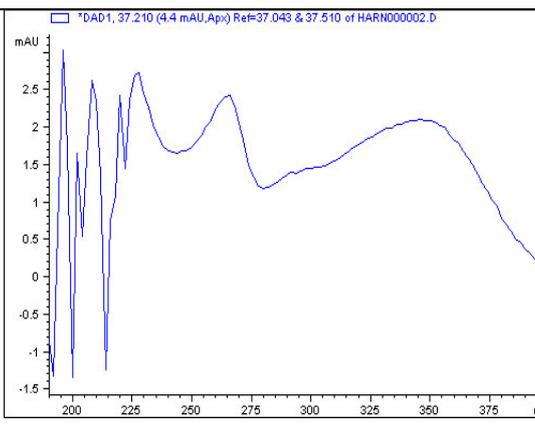
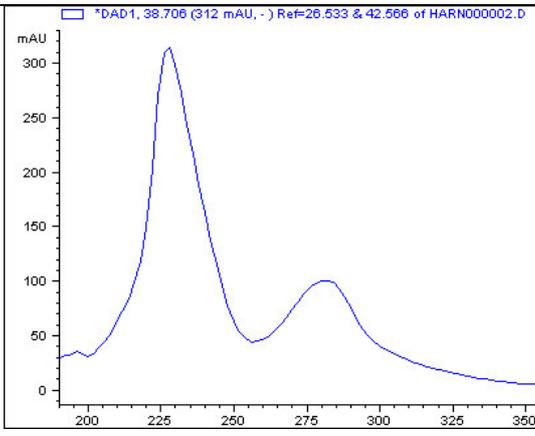
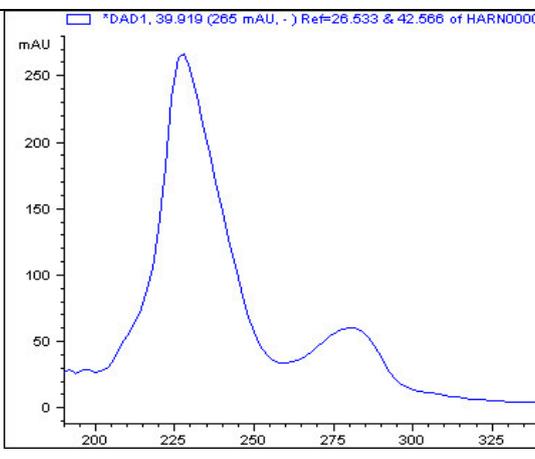
16	Vanillina	360	25.49	
17	M = 1218	1218	25.86	
18	<i>Trans</i> -para-ácido cumárico	164	28.42	
19	<i>Cis</i> -para-ácido cumárico	164	28.95	

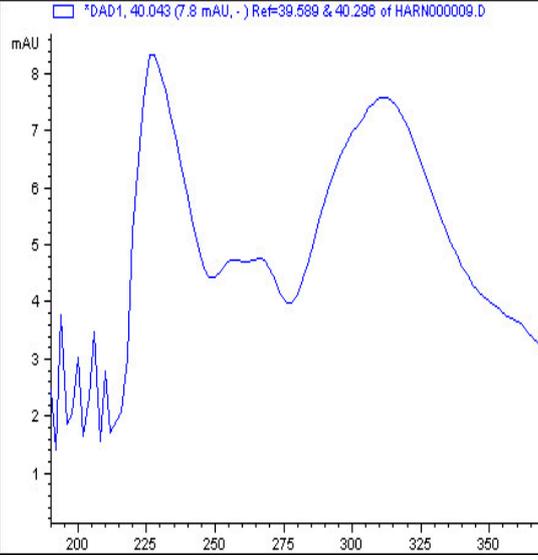
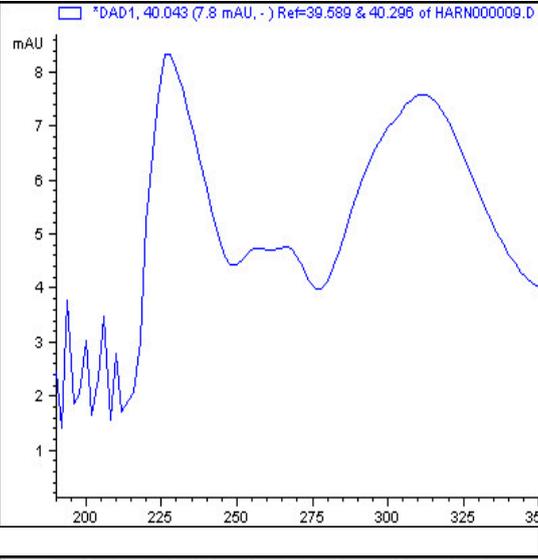
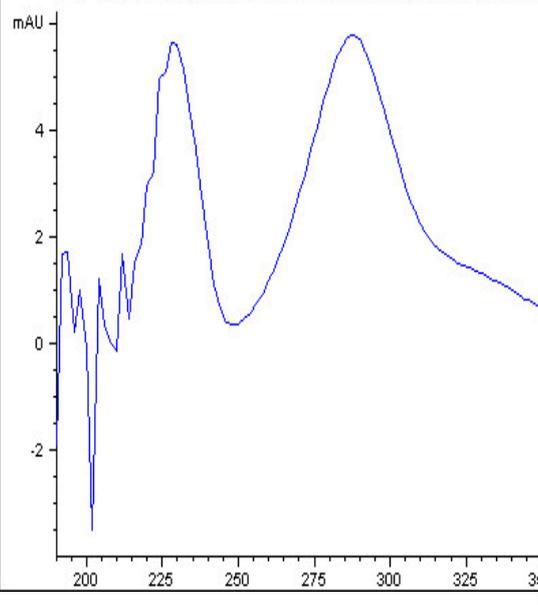
20	Procianidina-C-glicosídeo	740	29.00	 <p>*DAD1, 28.963 (159 mAU, -) Ref=21.396 & 29.503 of HARN000003.D</p> <p>The chromatogram displays absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 140) against time (minutes) on the x-axis (200 to 350). A prominent peak is observed at 28.963 minutes, reaching approximately 150 mAU. A secondary, smaller peak is visible at approximately 285 minutes.</p>
21	<i>Trans</i> -ácido ferúlico quinato	368	29.00	 <p>*DAD1, 29.122 (7.4 mAU, -) Ref=28.369 & 29.449 of HARN000001.D</p> <p>The chromatogram shows absorbance (mAU) on the y-axis (-1 to 6) against time (minutes) on the x-axis (200 to 375). The signal is characterized by a noisy baseline with a broad, low-intensity peak centered around 29.122 minutes, reaching a maximum of about 6 mAU.</p>
22	<i>Trans</i> -ácido ferúlico	194	31.24	 <p>*DAD1, 31.189 (17.9 mAU, -) Ref=30.976 & 31.623 of HARN000009.D</p> <p>The chromatogram plots absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 16) against time (minutes) on the x-axis (200 to 350). A significant peak is located at 31.189 minutes, with an absorbance of approximately 18 mAU. A smaller peak is present at approximately 235 minutes.</p>
23	Catequina-C-glicosídeo	452	31.88	 <p>*DAD1, 31.823 (32.2 mAU, -) Ref=31.189 & 34.676 of HARN000003.D</p> <p>The chromatogram shows absorbance (mAU) on the y-axis (0 to 30) against time (minutes) on the x-axis (200 to 350). A sharp, high-intensity peak is observed at 31.823 minutes, reaching nearly 35 mAU. A secondary peak is visible at approximately 285 minutes.</p>

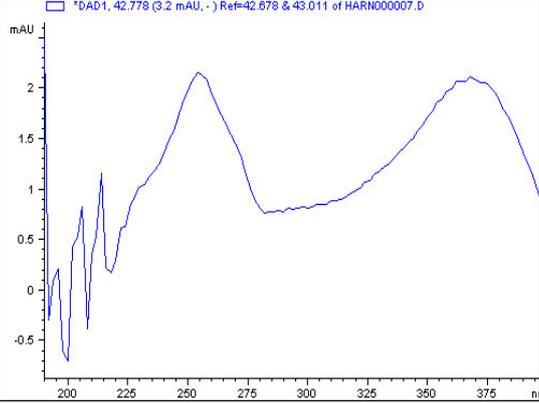
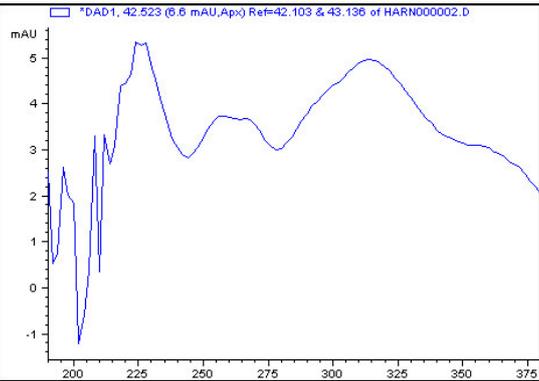
24	Quercetina ramnogalactosídeo	610	32.14	 <p>*DAD1, 31.814 (34.7 mAU, -) Ref=31.821 & 32.581 of HARN000004.D</p>
25	<i>Cis</i> -ácido ferúlico	194	32.18	 <p>*DAD1, 32.136 (24.5 mAU, -) Ref=31.916 & 33.336 of HARN000009.D</p>
26	Quercetina ramnogalactosídeo		32.55	 <p>*DAD1, 32.509 (70.8 mAU, -) Ref=31.916 & 33.336 of HARN000009.D</p>
27	Rutina		32.97	 <p>*DAD1, 32.936 (63.6 mAU, -) Ref=31.916 & 33.336 of HARN000009.D</p>

28	Rutina	610	33.25	<p>*DAD1, 33.676 (28.5 mAU, -) Ref=32.869 & 34.042 of HARN000001.D</p>
29	Quercetina galactosídeo	464	33.84	<p>*DAD1, 33.836 (16.8 mAU, Ap) Ref=33.589 & 34.176 of HARN000009.D</p>
30	Quercetina glucosídeo	464	34.46	<p>*DAD1, 34.376 (6.8 mAU, -) Ref=34.236 & 34.763 of HARN000009.D</p>
31	<i>Trans</i> -etil-ácido clorogénico	382	35.00	<p>*DAD1, 35.206 (47.0 mAU, -) Ref=34.446 & 35.506 of HARN000002.D</p>

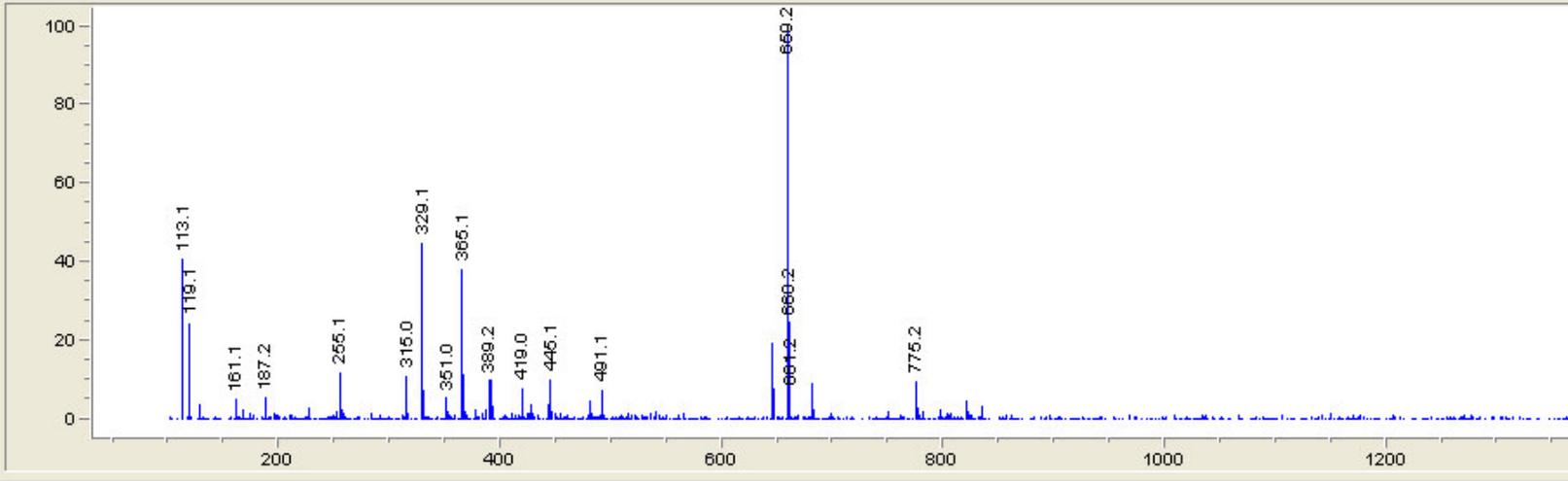
32	Canferol ramnogalactosídeo	594	35.36	<p>*DAD1, 35.316 (14.7 mAU, -) Ref=34.763 & 35.636 of HARN000009.D</p>
33	Quercetina pentosídeo	434	35.66	<p>*DAD1, 35.650 (4.6 mAU, -) Ref=35.463 & 39.176 of HARN000002.D</p>
34	Canferol ramnoglicosídeo	594	36.39	<p>*DAD1, 36.403 (16.9 mAU, -) Ref=36.243 & 37.063 of HARN000009.D</p>
35	Isoramnetina ramnoglicosídeo	624	36.67	<p>*DAD1, 36.054 (4.5 mAU, -) Ref=35.868 & 36.874 of HARN000004.D</p>

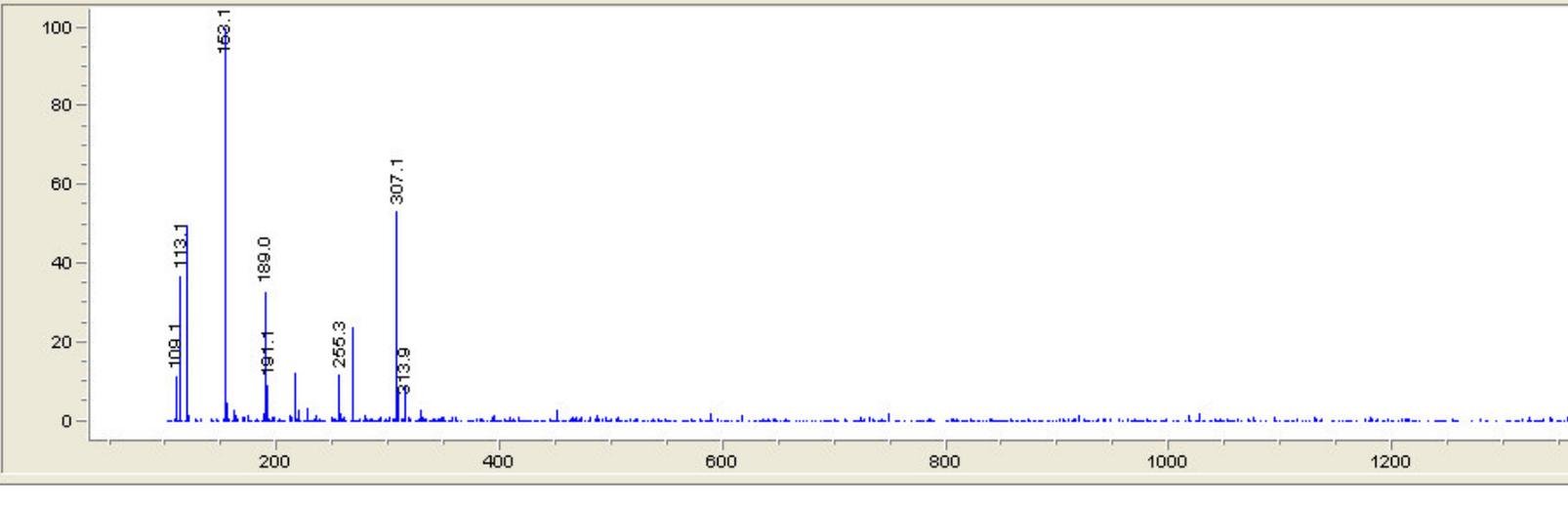
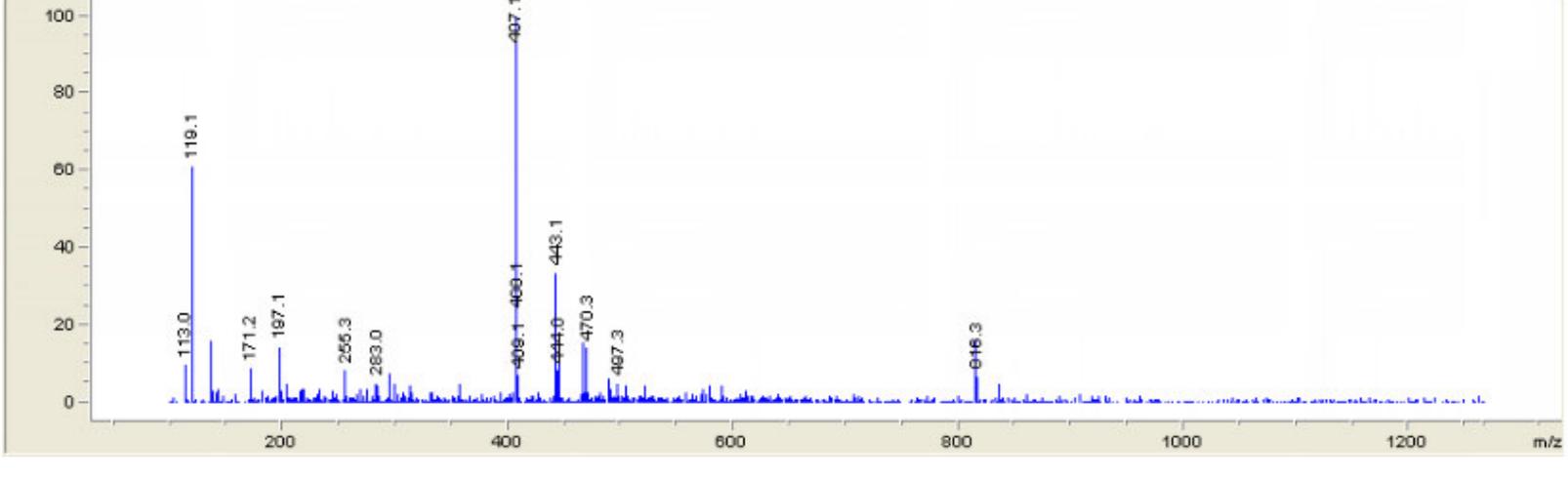
36	<i>Cis</i> -etil-ácido clorogênico	382	37.00	 <p>*DAD1, 37.059 (22.6 mAU, -) Ref=35.506 & 37.359 of HARN000002.D</p>
37	Quercetina ramnosídeo	448	37.2	 <p>*DAD1, 37.210 (4.4 mAU, Ap) Ref=37.043 & 37.510 of HARN000002.D</p>
38	afzelequina -C- glicosídeo	436	38.41	 <p>*DAD1, 38.706 (312 mAU, -) Ref=26.533 & 42.566 of HARN000002.D</p>
39	Epicatequina -C- glicosídeo	452	39.51	 <p>*DAD1, 39.919 (265 mAU, -) Ref=26.533 & 42.566 of HARN000002.D</p>

40	Quercetina ramnogalactocumarato	756	40.06	 <p>*DAD1, 40.043 (7.8 mAU, -) Ref=39.589 & 40.296 of HARN000009.D</p> <p>mAU</p> <p>200 225 250 275 300 325 350</p>
41	Quercetina ramnoglucocumarato	756	40.76	 <p>*DAD1, 40.043 (7.8 mAU, -) Ref=39.589 & 40.296 of HARN000009.D</p> <p>mAU</p> <p>200 225 250 275 300 325 350</p>
42	Canferol ramnogalactocumarato	740	41.62	 <p>*DAD1, 41.616 (9.3 mAU, -) Ref=40.903 & 41.863 of HARN000002.D</p> <p>mAU</p> <p>200 225 250 275 300 325 350</p>

43	Quercetin	302	42.69	
44	Canferol ramnoglucocumarato		42.33	

ANEXO II. Espectros de massas dos compostos identificados em HPLC-ESI-MS, nos extratos metanólicos de *Hancornia speciosa* Gomes.

N°	Nome do composto	TR	Espectros de Massas
1	Ácido vanílico glicosídeo	10.17	 <p>Max: 139</p>

2	Ácido 3,4-dihidroxi-benzóico o (3,4-DHBA)	11.67	 <p>Mass spectrum of 3,4-DHBA. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 1400, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 163.1. Other labeled peaks include 109.1, 113.1, 189.0, 255.3, 307.1, and 313.9.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>109.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>113.1</td><td>~40</td></tr><tr><td>163.1</td><td>100</td></tr><tr><td>189.0</td><td>~35</td></tr><tr><td>255.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>307.1</td><td>~55</td></tr><tr><td>313.9</td><td>~10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	109.1	~10	113.1	~40	163.1	100	189.0	~35	255.3	~15	307.1	~55	313.9	~10	Max: 130												
m/z	Relative Intensity																															
109.1	~10																															
113.1	~40																															
163.1	100																															
189.0	~35																															
255.3	~15																															
307.1	~55																															
313.9	~10																															
3	M = 408	15.25	 <p>Mass spectrum of M = 408. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 1200, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 407.1. Other labeled peaks include 113.0, 118.1, 171.2, 197.1, 255.3, 283.0, 408.1, 443.0, 443.1, 470.3, 497.3, and 616.3.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>118.1</td><td>~60</td></tr><tr><td>171.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>197.1</td><td>~20</td></tr><tr><td>255.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>283.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>407.1</td><td>100</td></tr><tr><td>408.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>443.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>443.1</td><td>~40</td></tr><tr><td>470.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>497.3</td><td>~10</td></tr><tr><td>616.3</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	113.0	~10	118.1	~60	171.2	~15	197.1	~20	255.3	~15	283.0	~10	407.1	100	408.1	~10	443.0	~10	443.1	~40	470.3	~15	497.3	~10	616.3	~15	m/z
m/z	Relative Intensity																															
113.0	~10																															
118.1	~60																															
171.2	~15																															
197.1	~20																															
255.3	~15																															
283.0	~10																															
407.1	100																															
408.1	~10																															
443.0	~10																															
443.1	~40																															
470.3	~15																															
497.3	~10																															
616.3	~15																															

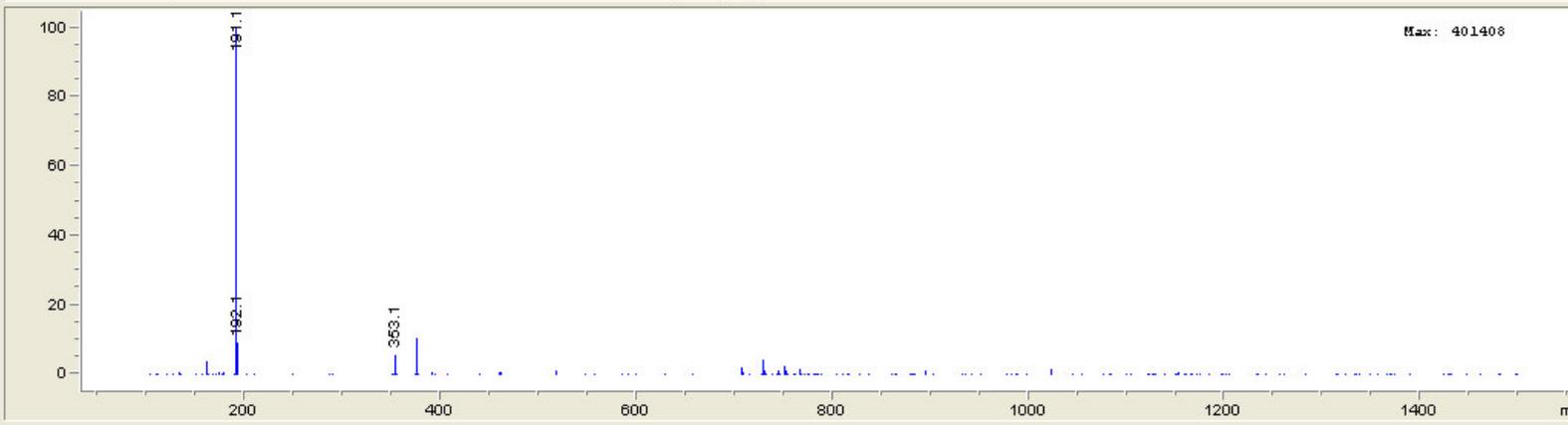
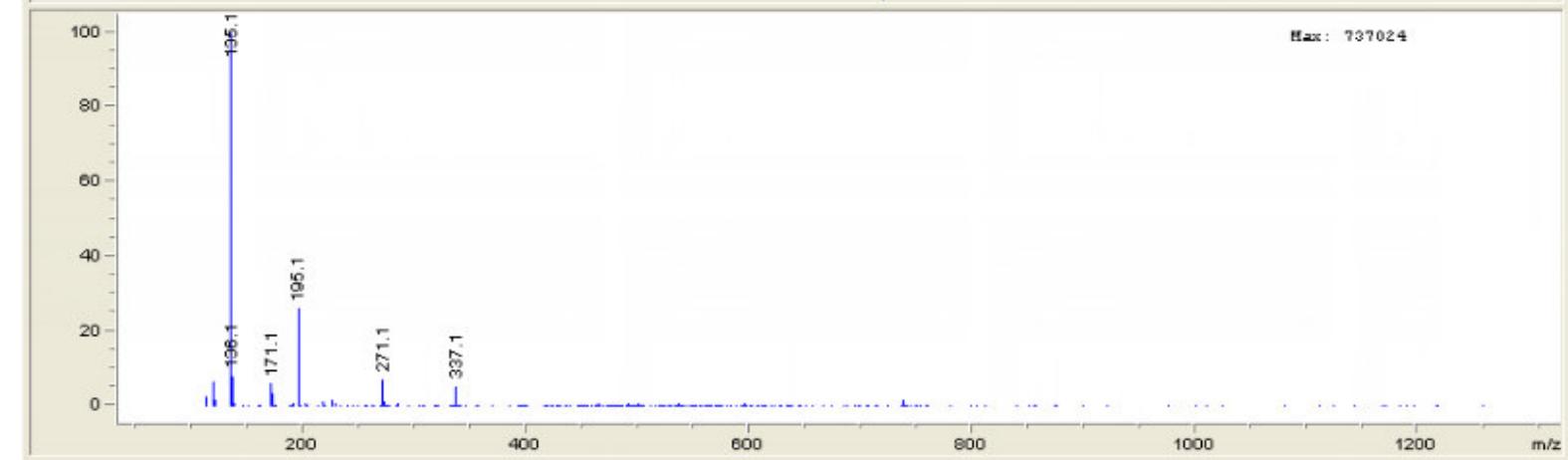
<p>4</p>	<p>M=360</p>	<p>16.24</p>	
<p>5</p>	<p>Procianidina B1</p>	<p>16.66</p>	<p>*MSD1 SPC, time=16.623 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000010.D AP-ES, Scan, Frag: 300</p>

<p>6</p>	<p>Ácido <i>para</i>-hidroxibenzoico</p>	<p>18.09</p>	<p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 1400). The base peak is at m/z 137.1. Other labeled peaks include 113.0, 119.1, 147.0, 173.1, 187.1, 233.0, 283.0, 343.0, 421.1, and 461.0.</p>
<p>7</p>	<p>Catequina</p>	<p>18.77</p>	<p>*MSD1 SPC, time=18.731 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000010.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 1400). The base peak is at m/z 372.32. Other labeled peaks include 122.1, 150.1, 191.1, 221.1, 246.0, 246.2, 293.4, 353.2, 407.1, 461.1, 463.1, 541.2, 576.0, 613.2, 714.0, 723.2, 739.2, 746.2, 796.9, 865.2, 866.2, 887.3, 973.2, 1012.4, 1108.0, 1153.2, 1318.8, and 1392.3.</p>

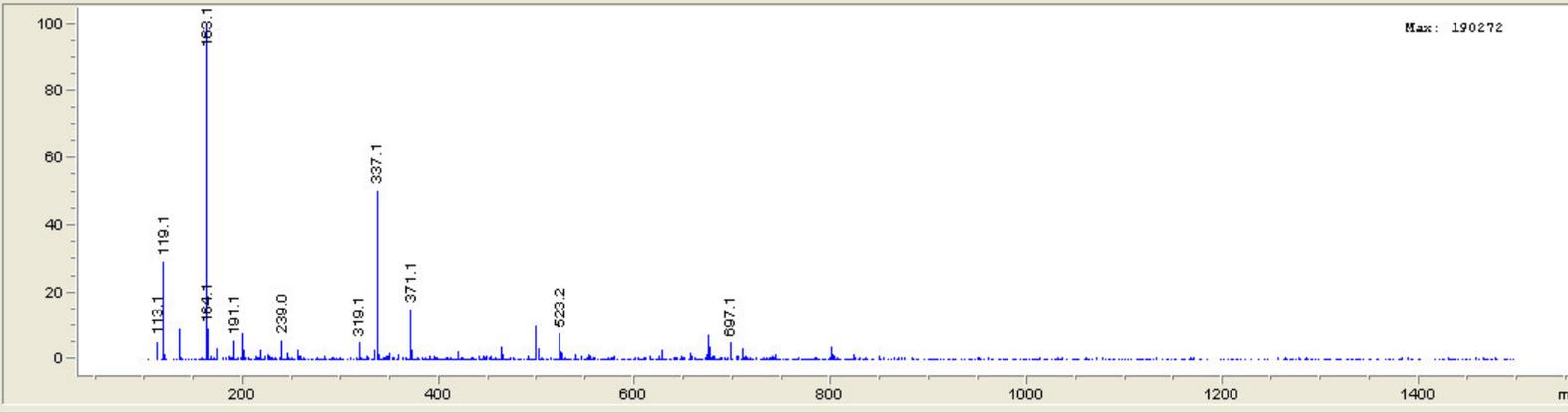
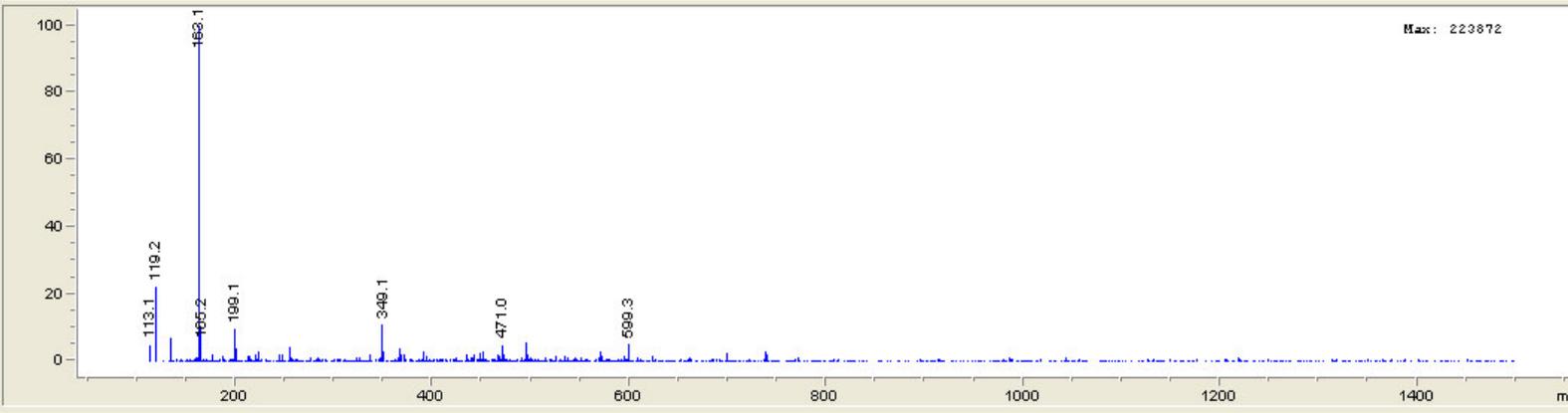
<p>8</p>	<p>Ácido clorogênico</p>	<p>19.98</p>	<p>*MSD1 SPC, time=33.564 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Max: 5728</p>
<p>9</p>	<p>Ácido <i>trans</i>-clorogênico</p>	<p>20.17</p>	<p>*MSD1 SPC, time=33.564 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Max: 5728</p>

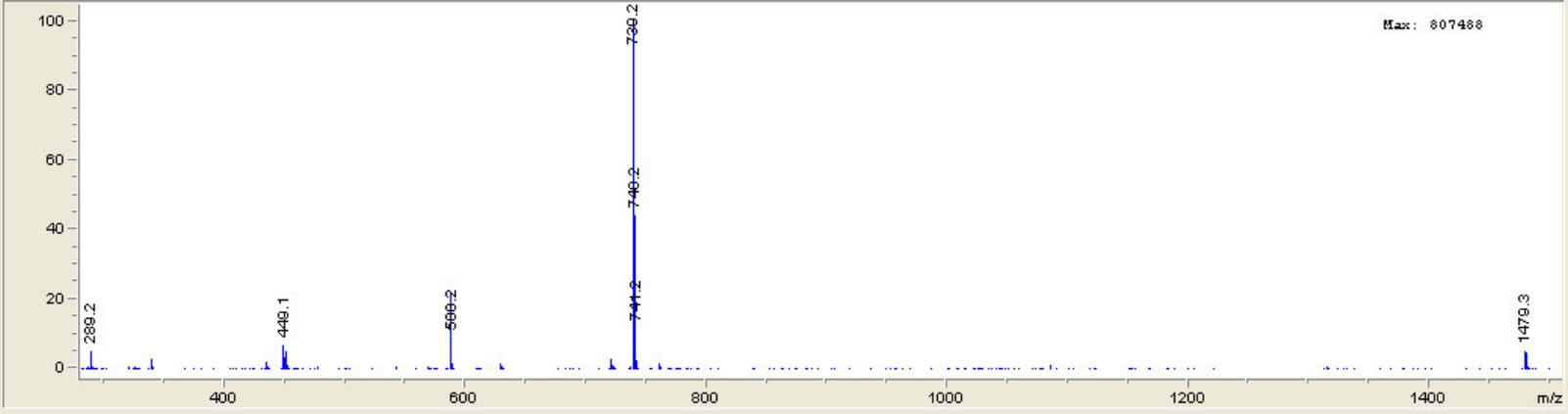
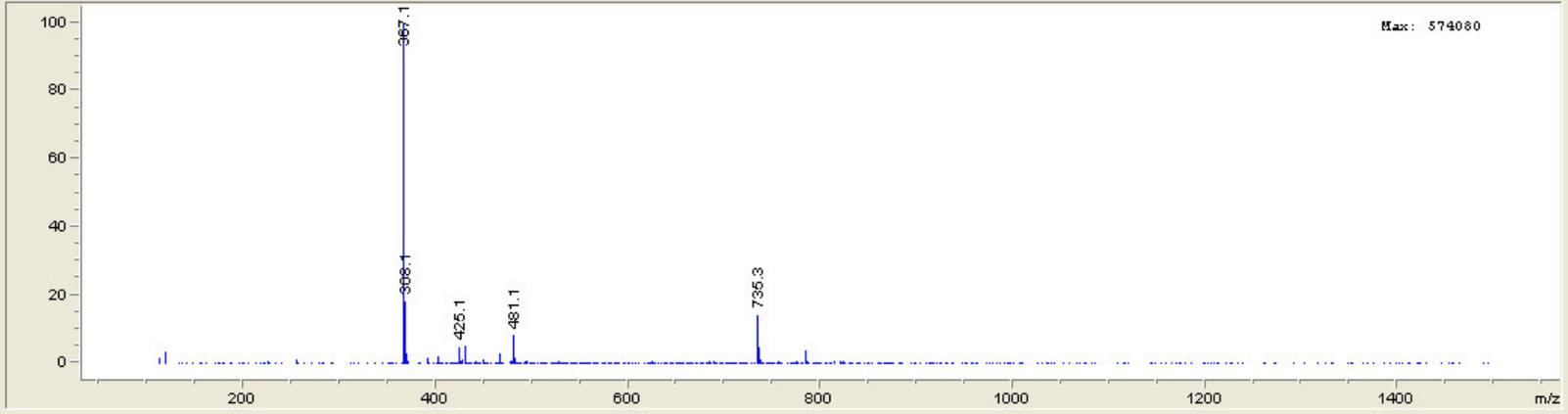
10	Procianidina B2	20.94	<p>*MSD1 SPC, time=20.968 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000010.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Max: 215296</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>287.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>289.1</td><td>~45</td></tr><tr><td>425.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>425.1</td><td>~35</td></tr><tr><td>577.1</td><td>100</td></tr><tr><td>579.2</td><td>~40</td></tr><tr><td>599.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>1177.3</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	287.1	~15	289.1	~45	425.2	~15	425.1	~35	577.1	100	579.2	~40	599.3	~15	1177.3	~15																										
m/z	Relative Intensity																																														
287.1	~15																																														
289.1	~45																																														
425.2	~15																																														
425.1	~35																																														
577.1	100																																														
579.2	~40																																														
599.3	~15																																														
1177.3	~15																																														
11	Ácido vanílico	20.98	<p>*MSD1 SPC, time=21.042 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 59952</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>~20</td></tr><tr><td>119.1</td><td>~55</td></tr><tr><td>141.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>166.0</td><td>~15</td></tr><tr><td>167.1</td><td>100</td></tr><tr><td>177.1</td><td>~45</td></tr><tr><td>195.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>204.5</td><td>~95</td></tr><tr><td>234.7</td><td>~10</td></tr><tr><td>263.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>291.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>323.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>357.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>411.0</td><td>~15</td></tr><tr><td>461.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>481.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>525.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>565.2</td><td>~35</td></tr><tr><td>661.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>623.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>661.4</td><td>~10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	113.0	~20	119.1	~55	141.0	~10	166.0	~15	167.1	100	177.1	~45	195.0	~10	204.5	~95	234.7	~10	263.2	~10	291.2	~10	323.1	~10	357.0	~10	411.0	~15	461.1	~10	481.1	~10	525.1	~10	565.2	~35	661.0	~10	623.2	~10	661.4	~10
m/z	Relative Intensity																																														
113.0	~20																																														
119.1	~55																																														
141.0	~10																																														
166.0	~15																																														
167.1	100																																														
177.1	~45																																														
195.0	~10																																														
204.5	~95																																														
234.7	~10																																														
263.2	~10																																														
291.2	~10																																														
323.1	~10																																														
357.0	~10																																														
411.0	~15																																														
461.1	~10																																														
481.1	~10																																														
525.1	~10																																														
565.2	~35																																														
661.0	~10																																														
623.2	~10																																														
661.4	~10																																														

12*	Catequina-C-glicosido	21.55	<p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 1400). The base peak is at m/z 451.1. Other labeled peaks include 221.1, 289.1, 331.2, 462.1, 903.2, and 925.2. Max: 220800.</p>
13	Epicatequina	23.05	<p>*MSD1 SPC, time=21.005 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000010.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 1400). The base peak is at m/z 577.2. Other labeled peaks include 245.1, 273.0, 289.1, 363.0, 425.1, 461.1, 579.2, 699.2, and 1166.3. Max: 242432.</p>

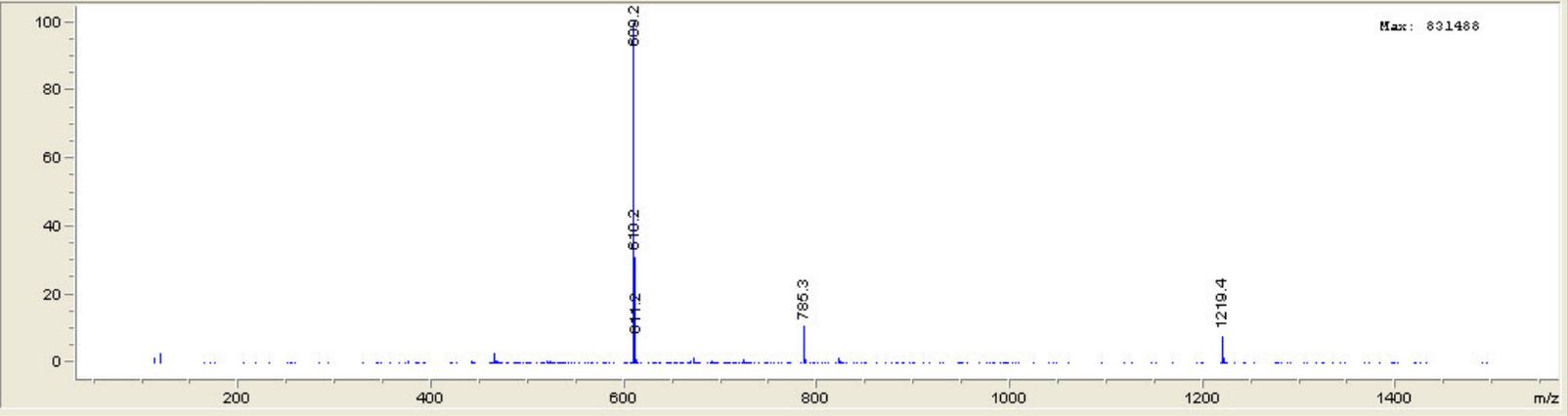
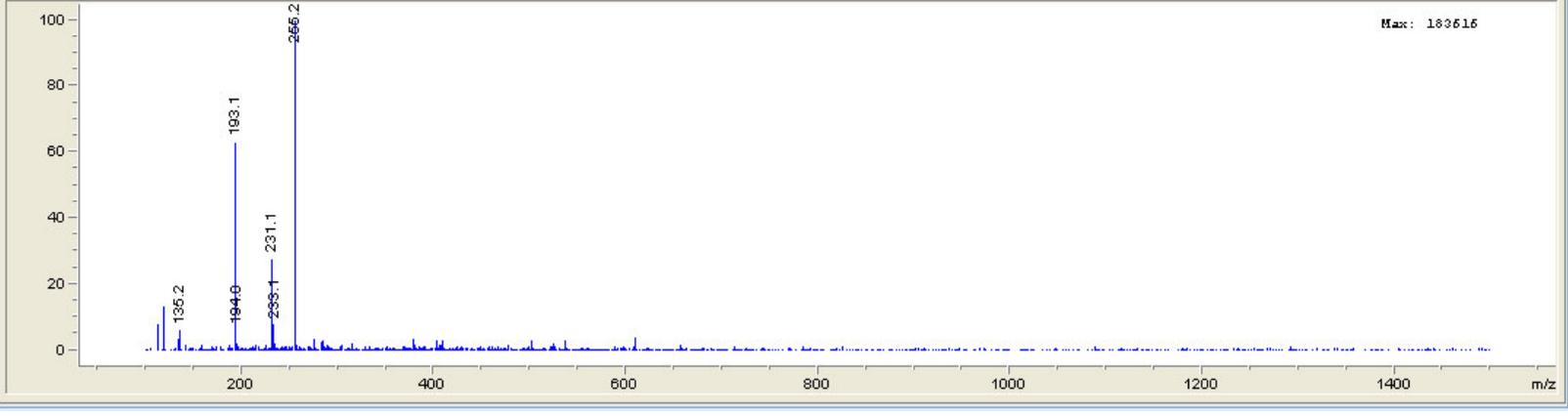
14	Ácido <i>cis</i> -clorogênico	23.33	<p>*MSD1 SPC, time=23.132 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000010.D API-ES, Scan, Frag: 300</p>  <p>Max: 401408</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>191.1</td><td>100</td></tr><tr><td>192.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>353.1</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	191.1	100	192.1	~15	353.1	~15						
m/z	Relative Intensity																
191.1	100																
192.1	~15																
353.1	~15																
15	M = 136	25.45	<p>*MSD1 SPC, time=25.479 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 737024</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>136.1</td><td>100</td></tr><tr><td>196.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>171.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>195.1</td><td>~30</td></tr><tr><td>271.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>337.1</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	136.1	100	196.1	~10	171.1	~10	195.1	~30	271.1	~15	337.1	~15
m/z	Relative Intensity																
136.1	100																
196.1	~10																
171.1	~10																
195.1	~30																
271.1	~15																
337.1	~15																

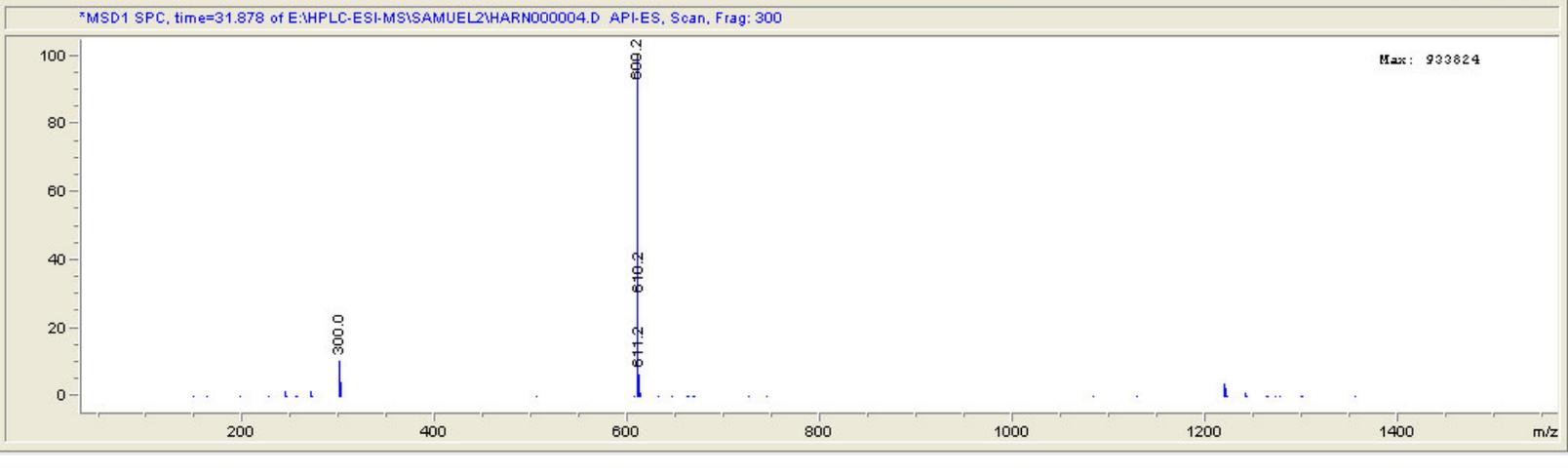
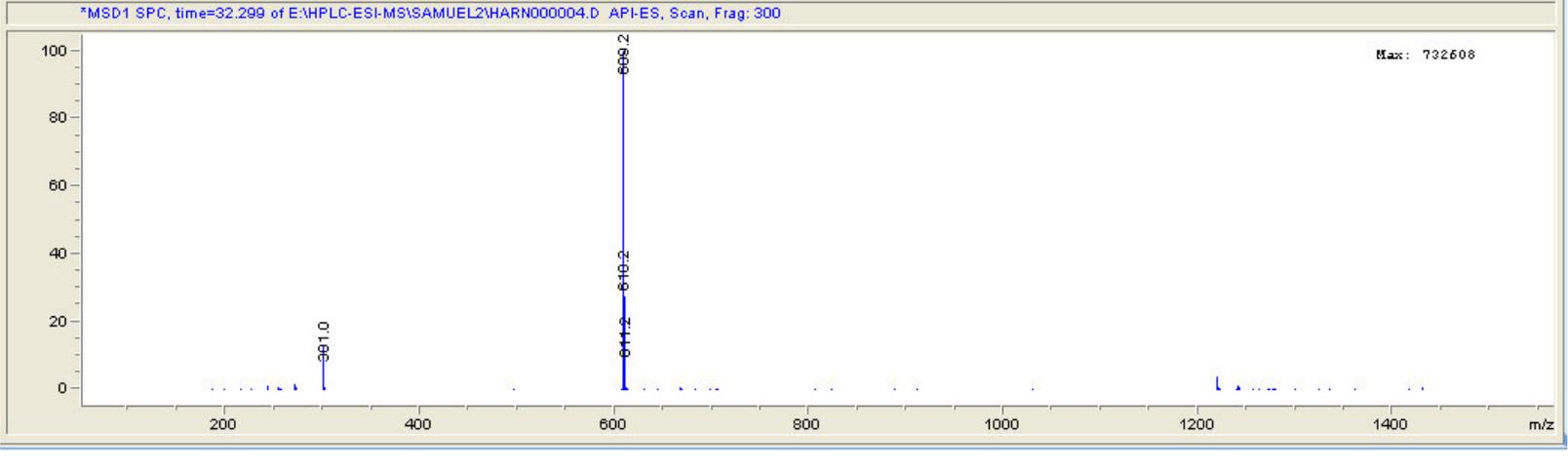
16	Vanillina	25.49	<p>*MSD1 SPC, time=25.497 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000010.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 31824</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity (approx)</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>60</td></tr><tr><td>119.1</td><td>100</td></tr><tr><td>141.0</td><td>15</td></tr><tr><td>164.1</td><td>95</td></tr><tr><td>255.3</td><td>30</td></tr><tr><td>949.0</td><td>10</td></tr><tr><td>963.8</td><td>10</td></tr><tr><td>1106.0</td><td>15</td></tr><tr><td>1227.7</td><td>15</td></tr><tr><td>1329.7</td><td>15</td></tr><tr><td>1425.5</td><td>15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity (approx)	113.0	60	119.1	100	141.0	15	164.1	95	255.3	30	949.0	10	963.8	10	1106.0	15	1227.7	15	1329.7	15	1425.5	15
m/z	Relative Intensity (approx)																										
113.0	60																										
119.1	100																										
141.0	15																										
164.1	95																										
255.3	30																										
949.0	10																										
963.8	10																										
1106.0	15																										
1227.7	15																										
1329.7	15																										
1425.5	15																										
17	M = 1218	25.86	<p>*MSD1 SPC, time=25.772 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000007.D API-ES, Scan, Frag: 400</p> <p>Max: 317312</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity (approx)</th></tr></thead><tbody><tr><td>1216.3</td><td>10</td></tr><tr><td>1217.3</td><td>100</td></tr><tr><td>1220.3</td><td>10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity (approx)	1216.3	10	1217.3	100	1220.3	10																
m/z	Relative Intensity (approx)																										
1216.3	10																										
1217.3	100																										
1220.3	10																										

18	Ácido <i>trans</i> -para-cumárico	28.42	<p>*MSD1 SPC, time=28.431 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 190272</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>119.1</td><td>~35</td></tr><tr><td>163.1</td><td>100</td></tr><tr><td>164.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>191.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>239.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>319.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>337.1</td><td>~55</td></tr><tr><td>371.1</td><td>~25</td></tr><tr><td>523.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>687.1</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	113.1	~10	119.1	~35	163.1	100	164.1	~15	191.1	~10	239.0	~10	319.1	~15	337.1	~55	371.1	~25	523.2	~15	687.1	~15
m/z	Relative Intensity																										
113.1	~10																										
119.1	~35																										
163.1	100																										
164.1	~15																										
191.1	~10																										
239.0	~10																										
319.1	~15																										
337.1	~55																										
371.1	~25																										
523.2	~15																										
687.1	~15																										
19	Ácido <i>cis</i> -para-cumárico	28.95	<p>*MSD1 SPC, time=28.962 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 223872</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>119.2</td><td>~25</td></tr><tr><td>163.1</td><td>100</td></tr><tr><td>165.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>199.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>349.1</td><td>~20</td></tr><tr><td>471.0</td><td>~15</td></tr><tr><td>599.3</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	113.1	~10	119.2	~25	163.1	100	165.2	~10	199.1	~15	349.1	~20	471.0	~15	599.3	~15						
m/z	Relative Intensity																										
113.1	~10																										
119.2	~25																										
163.1	100																										
165.2	~10																										
199.1	~15																										
349.1	~20																										
471.0	~15																										
599.3	~15																										

20	Procianidina-C-glucosídeo	29.00	<p>*MSD1 SPC, time=28.981 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 300</p>  <p>Max: 807488</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>289.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>449.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>589.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>739.2</td><td>100</td></tr><tr><td>741.2</td><td>~45</td></tr><tr><td>1479.3</td><td>~10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	289.2	~10	449.1	~15	589.2	~15	739.2	100	741.2	~45	1479.3	~10
m/z	Relative Intensity																
289.2	~10																
449.1	~15																
589.2	~15																
739.2	100																
741.2	~45																
1479.3	~10																
21	Ácido <i>trans</i> -ferúlico quinato	29.00	<p>*MSD1 SPC, time=29.017 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 574080</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>367.1</td><td>100</td></tr><tr><td>369.1</td><td>~20</td></tr><tr><td>425.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>481.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>735.3</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	367.1	100	369.1	~20	425.1	~10	481.1	~10	735.3	~15		
m/z	Relative Intensity																
367.1	100																
369.1	~20																
425.1	~10																
481.1	~10																
735.3	~15																

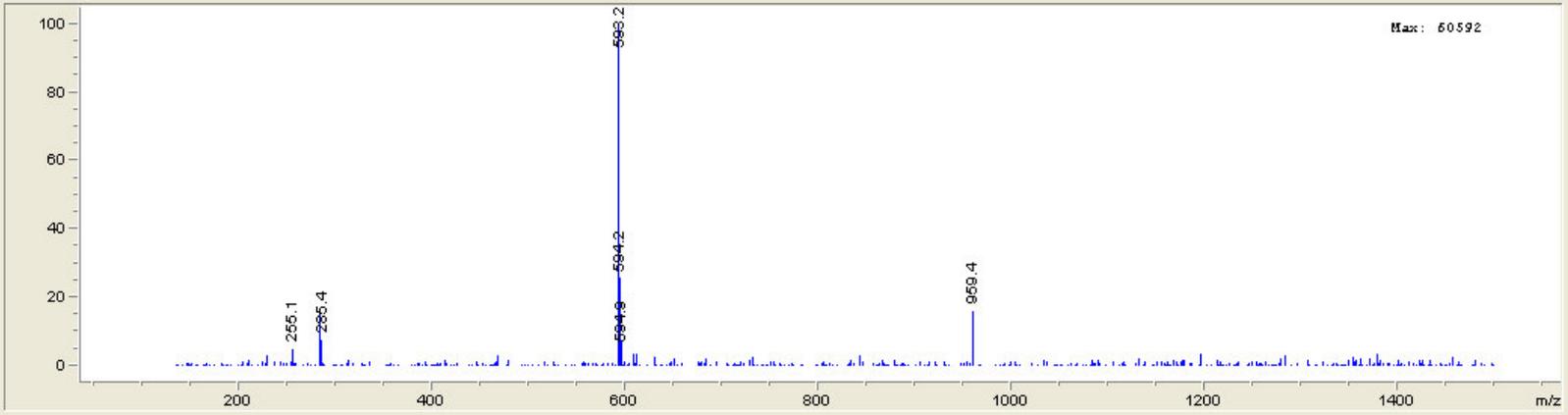
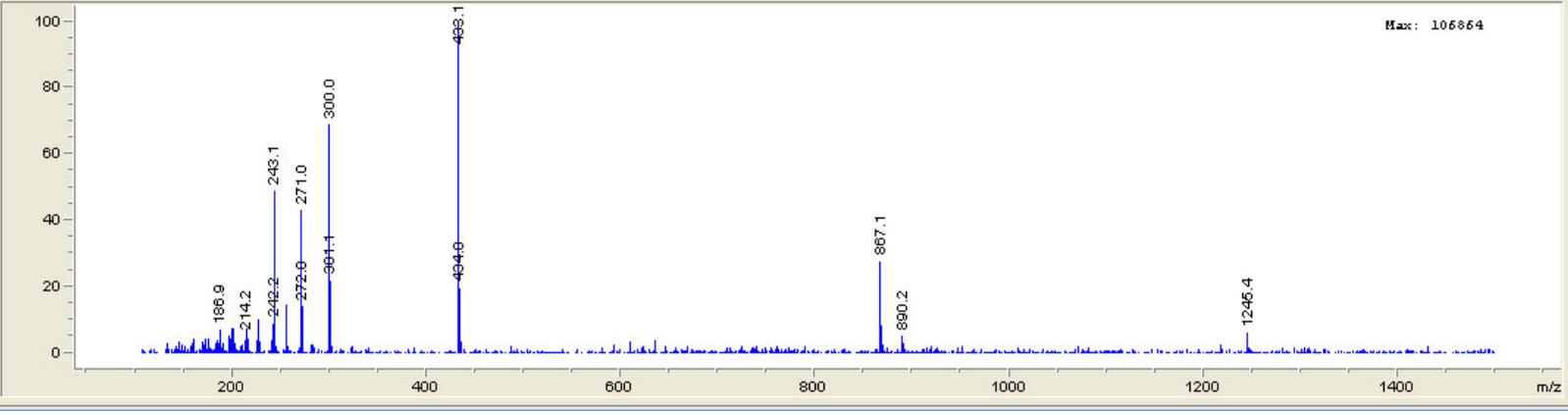
22	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	31.24	<p>*MSD1 SPC, time=31.254 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 100576</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>~20</td></tr><tr><td>178.0</td><td>~15</td></tr><tr><td>199.1</td><td>100</td></tr><tr><td>221.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>255.4</td><td>~15</td></tr><tr><td>316.9</td><td>~15</td></tr><tr><td>385.2</td><td>~40</td></tr><tr><td>461.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>555.0</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	113.0	~20	178.0	~15	199.1	100	221.1	~15	255.4	~15	316.9	~15	385.2	~40	461.2	~15	555.0	~15		
m/z	Relative Intensity																								
113.0	~20																								
178.0	~15																								
199.1	100																								
221.1	~15																								
255.4	~15																								
316.9	~15																								
385.2	~40																								
461.2	~15																								
555.0	~15																								
23	Catequina-C-glicosídeo	31.88	<p>*MSD1 SPC, time=31.878 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Max: 211264</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>189.1</td><td>~30</td></tr><tr><td>191.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>219.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>341.1</td><td>100</td></tr><tr><td>342.1</td><td>~25</td></tr><tr><td>451.1</td><td>~65</td></tr><tr><td>452.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>613.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>740.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>903.1</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	189.1	~30	191.1	~10	219.0	~10	341.1	100	342.1	~25	451.1	~65	452.1	~15	613.2	~15	740.3	~15	903.1	~15
m/z	Relative Intensity																								
189.1	~30																								
191.1	~10																								
219.0	~10																								
341.1	100																								
342.1	~25																								
451.1	~65																								
452.1	~15																								
613.2	~15																								
740.3	~15																								
903.1	~15																								

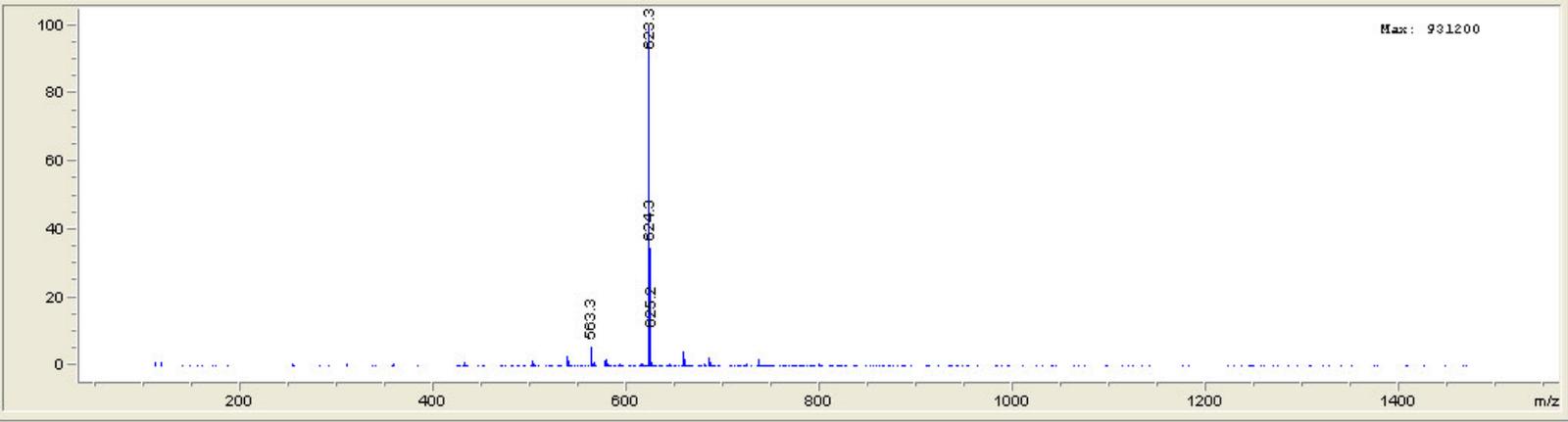
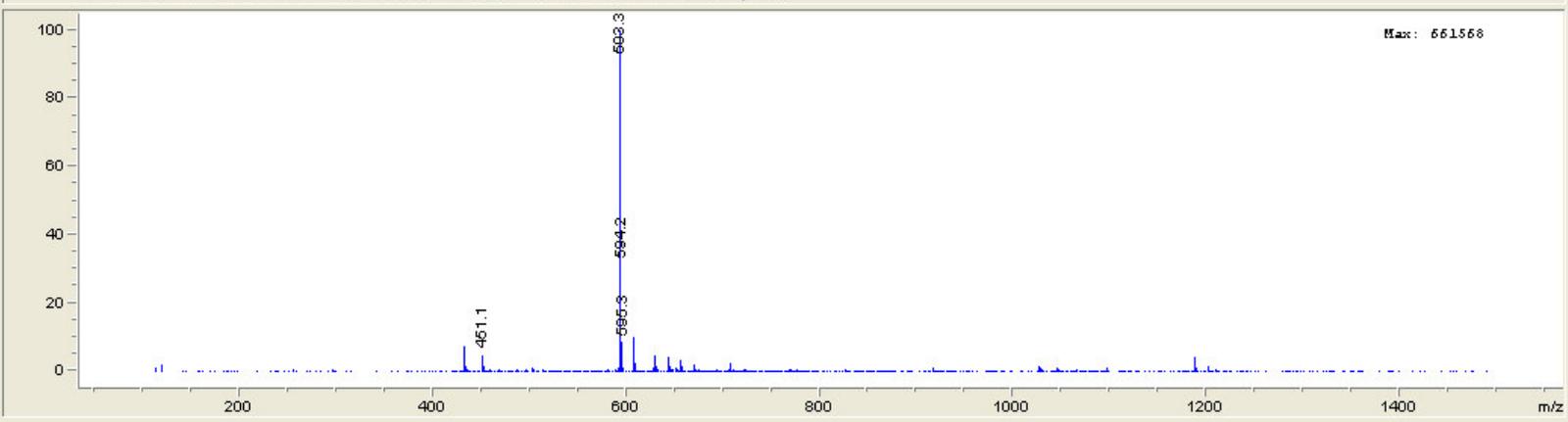
24*	Quercetina ramnogalactosíd eo	32.14	<p>*MSD1 SPC, time=32.886 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 831488</p> <p>Detailed description: This mass spectrum shows relative intensity on the y-axis (0 to 100) and m/z on the x-axis (0 to 1400). The base peak is at m/z 609.2. Other labeled peaks include m/z 611.2, 785.3, and 1219.4.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>609.2</td><td>100</td></tr><tr><td>611.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>785.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>1219.4</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	609.2	100	611.2	~15	785.3	~15	1219.4	~15
m/z	Relative Intensity												
609.2	100												
611.2	~15												
785.3	~15												
1219.4	~15												
25	Ácido <i>cis</i> - ferúlico	32.18	<p>*MSD1 SPC, time=32.226 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000009.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 183516</p> <p>Detailed description: This mass spectrum shows relative intensity on the y-axis (0 to 100) and m/z on the x-axis (0 to 1400). The base peak is at m/z 285.2. Other labeled peaks include m/z 136.2, 193.1, and 231.1.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>136.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>193.1</td><td>~65</td></tr><tr><td>231.1</td><td>~30</td></tr><tr><td>285.2</td><td>100</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	136.2	~15	193.1	~65	231.1	~30	285.2	100
m/z	Relative Intensity												
136.2	~15												
193.1	~65												
231.1	~30												
285.2	100												

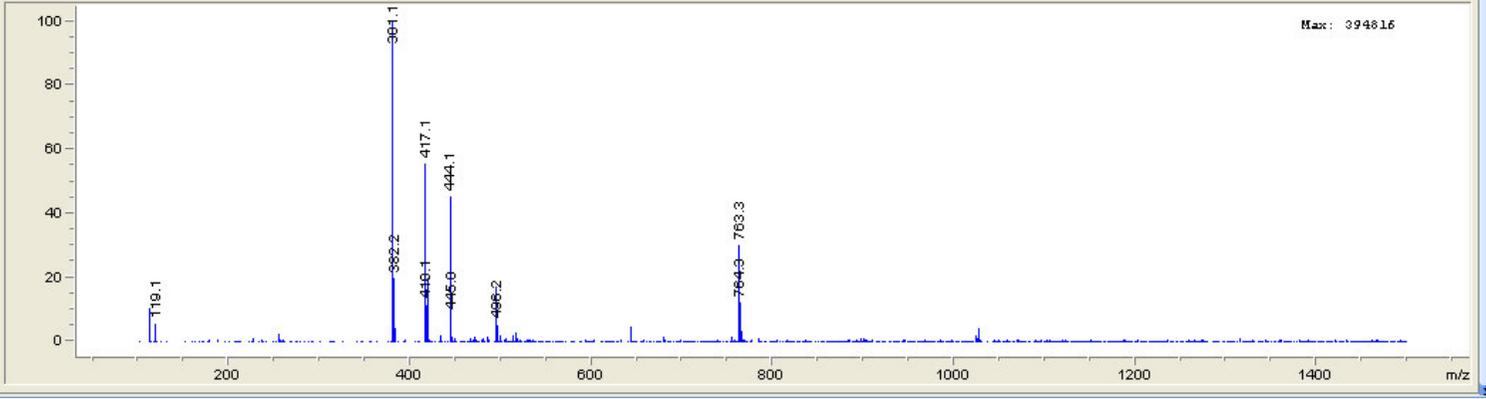
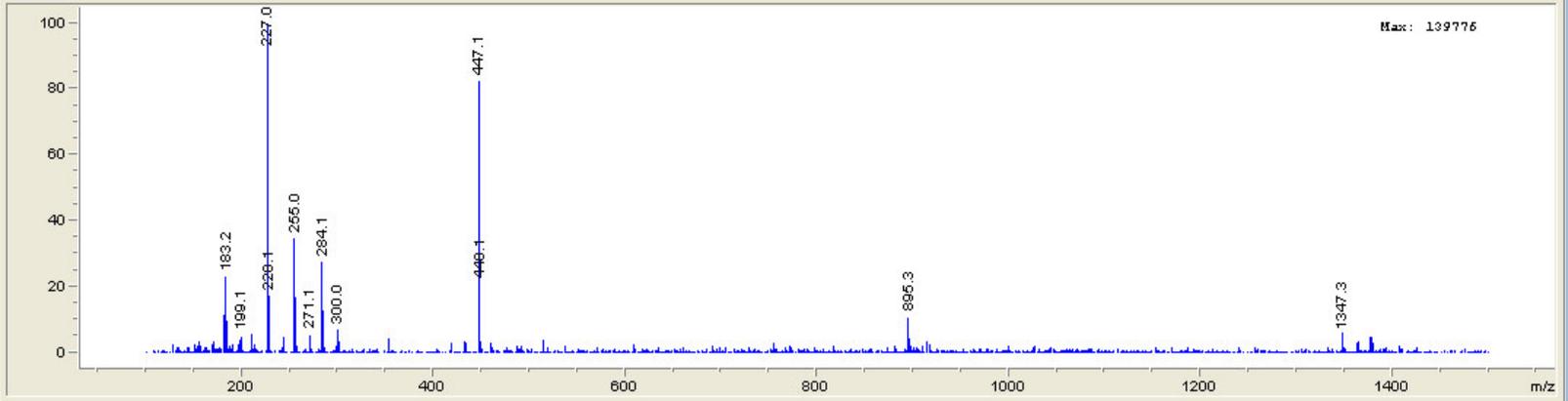
26	Quercetina ramnogalactosíd eo	32.55	 <p>*MSD1 SPC, time=31.878 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Max: 932824</p> <p>This mass spectrum shows relative intensity on the y-axis (0 to 100) and m/z on the x-axis (0 to 1400). The base peak is at m/z 609.2. Other significant peaks are labeled at m/z 300.0, 610.2, and 611.2.</p>
27* *	Quercetin rhamnoglucosid eo (Rutina)	32.97	 <p>*MSD1 SPC, time=32.299 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p> <p>Max: 732608</p> <p>This mass spectrum shows relative intensity on the y-axis (0 to 100) and m/z on the x-axis (0 to 1400). The base peak is at m/z 609.2. Other significant peaks are labeled at m/z 301.0, 610.2, and 611.2.</p>

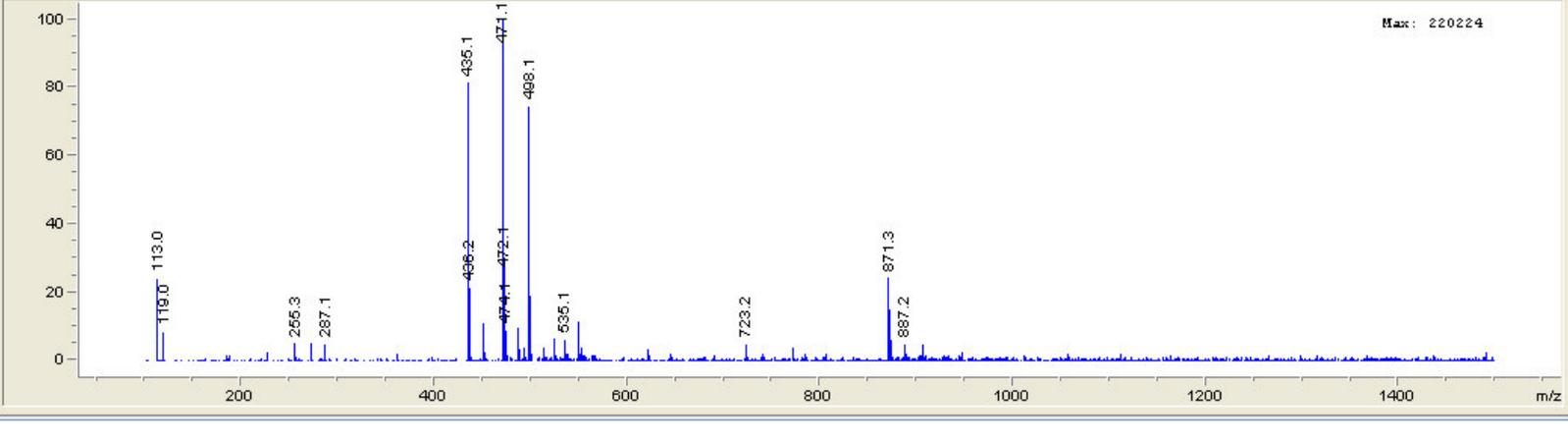
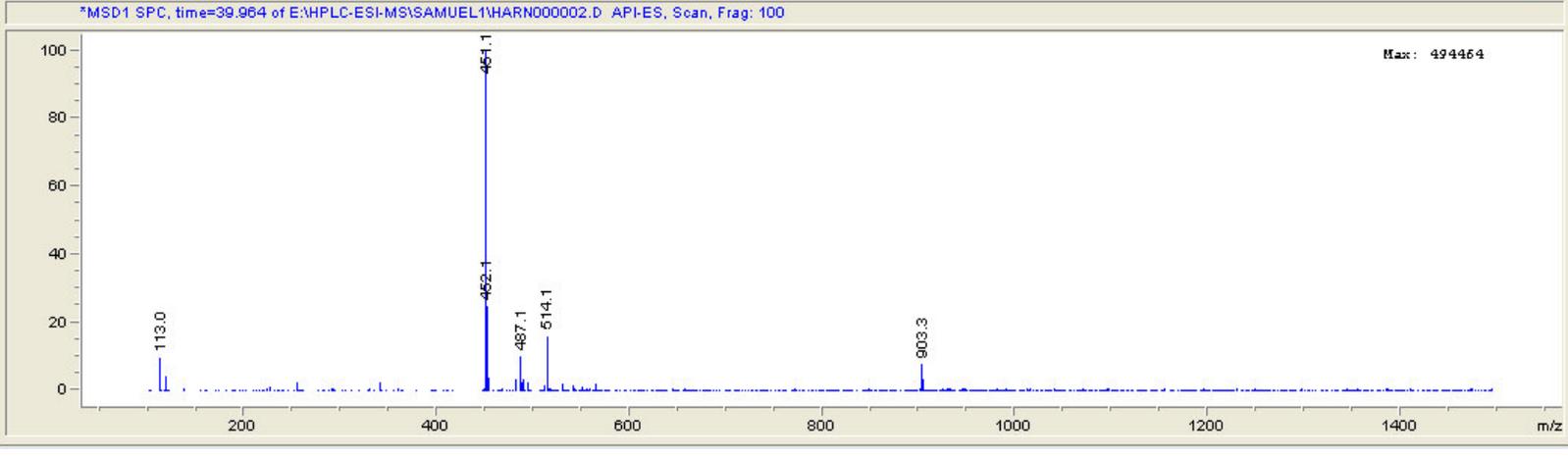
28	Rutina	33.25	<p>*MSD1 SPC, time=33.253 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 2.01472e+006</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>609.2</td><td>100</td></tr><tr><td>611.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>619.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>1219.4</td><td>~25</td></tr><tr><td>1221.4</td><td>~25</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	609.2	100	611.2	~10	619.2	~10	1219.4	~25	1221.4	~25										
m/z	Relative Intensity																								
609.2	100																								
611.2	~10																								
619.2	~10																								
1219.4	~25																								
1221.4	~25																								
29	Quercetina galactosídeo	33.84	<p>*MSD1 SPC, time=34.151 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 146368</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>~15</td></tr><tr><td>255.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>463.2</td><td>100</td></tr><tr><td>465.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>484.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>623.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>579.3</td><td>~10</td></tr><tr><td>609.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>785.3</td><td>~10</td></tr><tr><td>928.3</td><td>~10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	113.0	~15	255.1	~10	463.2	100	465.1	~10	484.2	~10	623.2	~10	579.3	~10	609.2	~10	785.3	~10	928.3	~10
m/z	Relative Intensity																								
113.0	~15																								
255.1	~10																								
463.2	100																								
465.1	~10																								
484.2	~10																								
623.2	~10																								
579.3	~10																								
609.2	~10																								
785.3	~10																								
928.3	~10																								

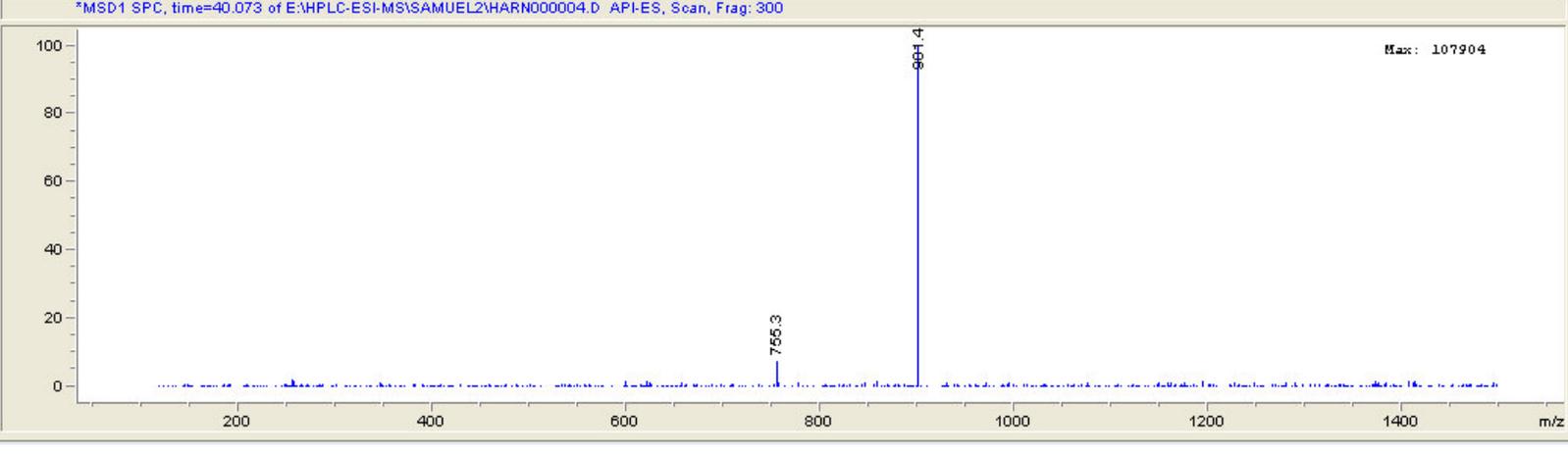
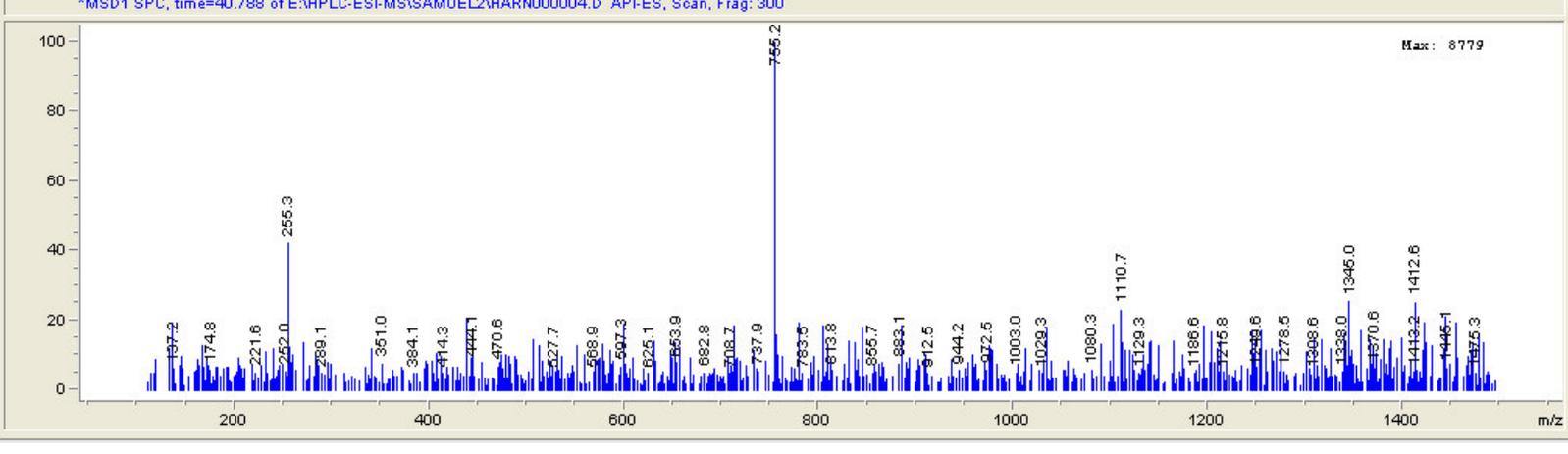
30	Quercetina glucosídeo	34.46	<p>*MSD1 SPC, time=34.885 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 357104</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>119.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>463.1</td><td>100</td></tr><tr><td>464.1</td><td>~35</td></tr><tr><td>487.4</td><td>~10</td></tr><tr><td>577.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>800.4</td><td>~35</td></tr><tr><td>857.3</td><td>~15</td></tr><tr><td>926.3</td><td>~35</td></tr><tr><td>927.3</td><td>~35</td></tr><tr><td>1263.4</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	119.1	~15	463.1	100	464.1	~35	487.4	~10	577.1	~10	800.4	~35	857.3	~15	926.3	~35	927.3	~35	1263.4	~15		
m/z	Relative Intensity																										
119.1	~15																										
463.1	100																										
464.1	~35																										
487.4	~10																										
577.1	~10																										
800.4	~35																										
857.3	~15																										
926.3	~35																										
927.3	~35																										
1263.4	~15																										
31	Ácido <i>trans</i> -etil-clorogênico	35.00	<p>*MSD1 SPC, time=35.417 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL1\HARN000002.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 200000</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>119.1</td><td>~15</td></tr><tr><td>113.1</td><td>~30</td></tr><tr><td>227.0</td><td>~10</td></tr><tr><td>255.3</td><td>~10</td></tr><tr><td>381.1</td><td>100</td></tr><tr><td>399.1</td><td>~25</td></tr><tr><td>417.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>444.1</td><td>~30</td></tr><tr><td>449.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>495.2</td><td>~10</td></tr><tr><td>763.4</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	119.1	~15	113.1	~30	227.0	~10	255.3	~10	381.1	100	399.1	~25	417.2	~15	444.1	~30	449.2	~10	495.2	~10	763.4	~15
m/z	Relative Intensity																										
119.1	~15																										
113.1	~30																										
227.0	~10																										
255.3	~10																										
381.1	100																										
399.1	~25																										
417.2	~15																										
444.1	~30																										
449.2	~10																										
495.2	~10																										
763.4	~15																										

32	Canferol ramnogalactosíd eo	35.36	<p>*MSD1 SPC, time=34.848 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p>  <p>Max: 60592</p> <p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 1400). The base peak is at m/z 598.2. Other labeled peaks include 255.1, 285.4, 594.2, 594.9, and 859.4.</p>
33	Quercetina pentosídeo	35.66	<p>*MSD1 SPC, time=35.710 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000008.D API-ES, Scan, Frag: 400</p>  <p>Max: 106864</p> <p>Mass spectrum showing relative intensity (0 to 100) versus m/z (0 to 1400). The base peak is at m/z 433.1. Other labeled peaks include 186.9, 214.2, 242.2, 243.1, 271.0, 272.0, 301.1, 300.0, 867.1, 880.2, and 1245.4.</p>

34	Canferol ramnoglicosídeo	36.39	<p>*MSD1 SPC, time=36.058 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 931200</p>
35	Isoramnetina ramnoglicosídeo	36.67	<p>*MSD1 SPC, time=36.646 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000006.D API-ES, Scan, Frag: 100</p>  <p>Max: 661568</p>

36	Ácido <i>cis</i> -etil-clorogênico	37.00	 <p>Mass spectrum of Ácido <i>cis</i>-etil-clorogênico. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 1400, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 381.1. Other labeled peaks include m/z 119.1, 362.2, 417.1, 444.1, 486.2, 764.3, and 783.3. The maximum intensity is 39481.6.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>119.1</td><td>~10</td></tr><tr><td>362.2</td><td>~35</td></tr><tr><td>381.1</td><td>100</td></tr><tr><td>417.1</td><td>~65</td></tr><tr><td>444.1</td><td>~55</td></tr><tr><td>486.2</td><td>~15</td></tr><tr><td>764.3</td><td>~30</td></tr><tr><td>783.3</td><td>~25</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	119.1	~10	362.2	~35	381.1	100	417.1	~65	444.1	~55	486.2	~15	764.3	~30	783.3	~25
m/z	Relative Intensity																				
119.1	~10																				
362.2	~35																				
381.1	100																				
417.1	~65																				
444.1	~55																				
486.2	~15																				
764.3	~30																				
783.3	~25																				
37	Quercetina ramnosídeo	37.2	<p>*MSD1 SPC, time=37.250 of E:\HPLC-ESI-MS\AMUEL2\HARN000008.D API-ES, Scan, Frag: 400</p>  <p>Mass spectrum of Quercetina ramnosídeo. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 0 to 1400, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 327.0. Other labeled peaks include m/z 183.2, 255.0, 284.1, 447.1, 895.3, and 1347.3. The maximum intensity is 13977.6.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity</th></tr></thead><tbody><tr><td>183.2</td><td>~25</td></tr><tr><td>255.0</td><td>~45</td></tr><tr><td>284.1</td><td>~35</td></tr><tr><td>327.0</td><td>100</td></tr><tr><td>447.1</td><td>~85</td></tr><tr><td>895.3</td><td>~20</td></tr><tr><td>1347.3</td><td>~15</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity	183.2	~25	255.0	~45	284.1	~35	327.0	100	447.1	~85	895.3	~20	1347.3	~15		
m/z	Relative Intensity																				
183.2	~25																				
255.0	~45																				
284.1	~35																				
327.0	100																				
447.1	~85																				
895.3	~20																				
1347.3	~15																				

38	Afzelequina -C-glicosídeo	38.41	 <p>Mass spectrum of Afzelequina -C-glicosídeo. The x-axis represents m/z from 0 to 1400, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 471.1. Other significant peaks are labeled at m/z 113.0, 119.0, 256.3, 287.1, 436.2, 472.1, 498.1, 535.1, 723.2, 871.3, and 887.2. The maximum intensity is 220224.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity (approx)</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>20</td></tr><tr><td>119.0</td><td>15</td></tr><tr><td>256.3</td><td>10</td></tr><tr><td>287.1</td><td>10</td></tr><tr><td>436.2</td><td>80</td></tr><tr><td>471.1</td><td>100</td></tr><tr><td>472.1</td><td>35</td></tr><tr><td>498.1</td><td>75</td></tr><tr><td>535.1</td><td>15</td></tr><tr><td>723.2</td><td>15</td></tr><tr><td>871.3</td><td>30</td></tr><tr><td>887.2</td><td>10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity (approx)	113.0	20	119.0	15	256.3	10	287.1	10	436.2	80	471.1	100	472.1	35	498.1	75	535.1	15	723.2	15	871.3	30	887.2	10
m/z	Relative Intensity (approx)																												
113.0	20																												
119.0	15																												
256.3	10																												
287.1	10																												
436.2	80																												
471.1	100																												
472.1	35																												
498.1	75																												
535.1	15																												
723.2	15																												
871.3	30																												
887.2	10																												
39	Epicatequina-C-glicosídeo	39.51	 <p>Mass spectrum of Epicatequina-C-glicosídeo. The x-axis represents m/z from 0 to 1400, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 461.1. Other significant peaks are labeled at m/z 113.0, 462.1, 487.1, 514.1, and 903.3. The maximum intensity is 494464.</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity (approx)</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>15</td></tr><tr><td>461.1</td><td>100</td></tr><tr><td>462.1</td><td>30</td></tr><tr><td>487.1</td><td>10</td></tr><tr><td>514.1</td><td>15</td></tr><tr><td>903.3</td><td>10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity (approx)	113.0	15	461.1	100	462.1	30	487.1	10	514.1	15	903.3	10												
m/z	Relative Intensity (approx)																												
113.0	15																												
461.1	100																												
462.1	30																												
487.1	10																												
514.1	15																												
903.3	10																												

40	Quercetina ramnogalactocu marato	40.06	<p>*MSD1 SPC, time=40.073 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p>  <p>Max: 107904</p>
41	Quercetina ramnoglicocuma rato	40.76	<p>*MSD1 SPC, time=40.788 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL2\HARN000004.D API-ES, Scan, Frag: 300</p>  <p>Max: 87179</p>
42	Canferol ramnogalactocu marato	41.62	

43	Quercetina	42.69	<p>*MSD1 SPC, time=42.769 of E:\HPLC-ESI-MS\SAMUEL3\HARN000008.D API-ES, Scan, Frag: 100</p> <p>Max: 42048</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity (approx)</th></tr></thead><tbody><tr><td>113.0</td><td>40</td></tr><tr><td>119.0</td><td>55</td></tr><tr><td>140.9</td><td>25</td></tr><tr><td>170.9</td><td>15</td></tr><tr><td>227.3</td><td>10</td></tr><tr><td>255.3</td><td>45</td></tr><tr><td>285.0</td><td>35</td></tr><tr><td>301.1</td><td>100</td></tr><tr><td>337.1</td><td>20</td></tr><tr><td>374.3</td><td>15</td></tr><tr><td>428.0</td><td>15</td></tr><tr><td>468.8</td><td>15</td></tr><tr><td>510.1</td><td>10</td></tr><tr><td>649.1</td><td>15</td></tr><tr><td>764.8</td><td>15</td></tr><tr><td>860.8</td><td>15</td></tr><tr><td>919.7</td><td>10</td></tr><tr><td>978.5</td><td>10</td></tr><tr><td>1043.0</td><td>10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity (approx)	113.0	40	119.0	55	140.9	25	170.9	15	227.3	10	255.3	45	285.0	35	301.1	100	337.1	20	374.3	15	428.0	15	468.8	15	510.1	10	649.1	15	764.8	15	860.8	15	919.7	10	978.5	10	1043.0	10
m/z	Relative Intensity (approx)																																										
113.0	40																																										
119.0	55																																										
140.9	25																																										
170.9	15																																										
227.3	10																																										
255.3	45																																										
285.0	35																																										
301.1	100																																										
337.1	20																																										
374.3	15																																										
428.0	15																																										
468.8	15																																										
510.1	10																																										
649.1	15																																										
764.8	15																																										
860.8	15																																										
919.7	10																																										
978.5	10																																										
1043.0	10																																										
44	Canferol ramnoglicocuma rato	42.33	<p>Max: 21464</p> <table border="1"><thead><tr><th>m/z</th><th>Relative Intensity (approx)</th></tr></thead><tbody><tr><td>146.1</td><td>15</td></tr><tr><td>227.1</td><td>25</td></tr><tr><td>256.1</td><td>15</td></tr><tr><td>284.1</td><td>65</td></tr><tr><td>285.1</td><td>25</td></tr><tr><td>300.0</td><td>15</td></tr><tr><td>593.1</td><td>25</td></tr><tr><td>739.2</td><td>100</td></tr><tr><td>741.1</td><td>10</td></tr></tbody></table>	m/z	Relative Intensity (approx)	146.1	15	227.1	25	256.1	15	284.1	65	285.1	25	300.0	15	593.1	25	739.2	100	741.1	10																				
m/z	Relative Intensity (approx)																																										
146.1	15																																										
227.1	25																																										
256.1	15																																										
284.1	65																																										
285.1	25																																										
300.0	15																																										
593.1	25																																										
739.2	100																																										
741.1	10																																										