



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**GABRIEL MEDEIROS NOBRE**

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS MICROMOLECULARES POR UFLC E LC-  
MS EM *CUCURBITA PEPO*, *PAULLINIA CUPANA* E *MANGIFERA INDICA***

**FORTALEZA**

**2017**

GABRIEL MEDEIROS NOBRE

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS MICROMOLECULARES POR UFLC E LC-MS  
EM *CUCURBITA PEPO*, *PAULLINIA CUPANA* E *MANGIFERA INDICA*

Monografia apresentada ao curso de Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Química com habilitação industrial.

Orientador profissional: Edy Sousa de Brito

Orientador pedagógico: Jair Mafezoli

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)

---

N672b Nobre, Gabriel Medeiros.

Bioprospecção de compostos micromoleculares por UFLC e LC-MS em Cucurbita pepo, Paullinia cupana e Mangifera indica / Gabriel Medeiros Nobre. – 2017.  
55 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Jair Mafezoli.

Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

1. Bioprospecção. 2. LC-MS. 3. Mangifera indica. 4. Cucurbita pepo. 5. Paullinia Cupana. I. Título.  
CDD 540

---

GABRIEL MEDEIROS NOBRE

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS MICROMOLECULARES POR UFLC E LC-MS  
EM *CUCURBITA PEPO*, *PAULLINIA CUPANA* E *MANGIFERA INDICA*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Química Bacharelado do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Industrial em Química Bacharelado.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Edy Sousa de Brito  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
(EMBRAPA)

---

Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
(EMBRAPA)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar uma vida tão plena e feliz.

A meus pais, Gladstone e Fatima, e ao meu irmão Gladstone Filho, por terem me dado todo apoio e incentivo necessários para conseguir meus sonhos, ajudando em todos os momentos difíceis e festejando a cada conquista obtida na Universidade.

A minha querida melhor amiga e noiva, Luiza Vitória, com que pude ter apoio e colo quando estive com problemas, sempre me dando todo carinho e atenção que só ela é capaz de dar, com aquele lindo sorriso no rosto que sempre me acalmava nos momentos difíceis.

Ao PET Química, pelo imenso aprendizado que me proporcionou durante a graduação. Aos meus companheiros petianos, pelos ótimos momentos de risadas, conversas, aprendizagens e, principalmente, pelo apoio durante essa fase da minha vida.

Aos meus orientadores, Dr. Edy Sousa de Brito e Dr. Jair Mafezoli, pela paciência que tiveram em me ensinar e aconselhar sempre que necessário. Além disso, pelo enorme aprendizado que tive com ambos, já que são pessoas que eu respeito imensamente.

Ao Dr. Paulo Riceli, pela orientação e aprendizado durante o estágio, sempre tendo toda paciência nos meus momentos de dificuldade.

Aos meus colegas do Laboratório de Produtos Naturais, em especial a Willyane, pelo respeito e auxílio no meu aprendizado, no decorrer do estágio.

Ao meu amigo Carlos José, pela amizade, conselhos e apoio durante toda minha graduação, em que tivemos momentos de dificuldade, mas superamos, sempre com a ajuda um do outro.

Enfim, a todos os que cruzaram meu caminho e de certa forma contribuíram para meu aprendizado durante a graduação.

## RESUMO

Nos últimos anos, vem crescendo os trabalhos relacionados ao estudo das substâncias presentes nos produtos naturais. A bioprospecção desses materiais tem sido de suma importância para a evolução da sociedade, propiciando estudos aplicados a seus efeitos tanto em plantas quanto em animais. Nesse trabalho, foram analisadas três espécies de planta, a *Cucurbita pepo*, conhecida popularmente como abóbora, a *Paullinia cupana*, conhecida como guaraná, e a *Mangifera indica*, conhecida pela sociedade como manga. O interesse foi de identificar as cucurbitacinas na abóbora, identificar e isolar as substâncias conhecidas como procianidinas no extrato do guaraná e coletar os componentes presentes na casca da manga por sistema CLAE. A extração das espécies foi através de sistema Soxhlet, seguido de rotaevaporação. O extrato da *Cucurbita pepo* foi analisado por LC-MS, com a não identificação das cucurbitacinas em sua composição. O extrato da *Paullinia cupana*, analisado por LC-MS, apresentou 11 procianidinas em sua composição, entretanto as análises de PDA não obtiveram sucesso para o isolamento dessas procianidinas. Por fim, a análise por sistema CLAE no extrato de *Mangifera indica*, resultou em um cromatograma com 12 picos de intensidade e resolução relevantes, onde foram coletados e armazenados no freezer para posterior estudo. A bioprospecção dessas espécies, provém de uma necessidade da sociedade para a solução de diversos problemas comuns, como doenças cardiovasculares e neurais, e dificuldades do desenvolvimento agrícola.

**Palavras-chave:** *Cucurbita pepo*, *Paullinia cupana*, *Mangifera indica*, CLAE, bioprospecção, LC-MS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Guarani: <i>Paullinia cupana</i> H.B.K. var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke.....	3
Figura 2	Estrutura química representando o núcleo púrico, a xantina e a cafeína da esquerda para a direita.....	5
Figura 3	Metabolismo do ácido gálico (G) em taninos hidrolisáveis: pentagalactilglicose é o precursor dos galotaninos (GT) e elagitaninos (ET)...	6
Figura 4	Estrutura química de tanino condensado.....	7
Figura 5	Pintura referente a <i>Cucurbita pepo</i> .....	8
Figura 6	Esqueleto estrutural das cucurbitacinas.....	9
Figura 7	Manga indiana, <i>Mangifera indica</i> ou manga comum, ilustração de manga indiana com flor isolada em um fundo branco.....	10
Figura 8	Esqueleto estrutura da mangiferina .....	11
Figura 9	Sistema soxhlet da extração da <i>Cucurbita pepo</i> .....	14
Figura 10	Extrato de <i>Cucurbita pepo</i> .....	15
Figura 11	Sistema Soxhlet com solvente éter de petróleo.....	16
Figura 12	Extrato aquoso (água e etanol) da <i>Paullinia cupana</i> .....	17
Figura 13	Antes e depois da partição com acetato de etila.....	18
Figura 14	Separação das soluções de <i>Paullinia cupana</i> após a partição.....	18
Figura 15	Partição da solução concentrada de <i>Paullinia cupana</i> .....	20
Figura 16	Extrato final da solução concentrada de <i>Paullinia cupana</i> .....	20
Figura 17	Extrato da <i>Mangifera indica</i> .....	21
Figura 18	Erlenmeyers onde foram coletados os 12 picos .....	24
Figura 19	Picos coletados em fracos de penicilina com água.....	24
Figura 20	Cromatograma do extrato da <i>Cucurbita pepo</i> , modo positivo e negativo, respectivamente.....	26
Figura 21	Esqueleto estrutural do flavan-3-ol.....	27

Figura 22	Cromatogramas referente ao extrato de <i>Paullinia cupana</i> em modo positivo [M+H] e negativo [M-H], respectivamente.....	27
Figura 23	Padrões procianidina B2 e procianidina A2, respectivamente.....	29
Figura 24	Estruturas das substâncias identificadas no extrato de guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> ) . 1- catequina, 2- epicatequina, 3- procianidina do tipo A dímero, 4- procianidina do tipo B dímero, 5- procianidina do tipo A trímero, 6- procianidina do tipo B trímero, 7- procianidina do tipo A tetramêro, 8- procianidina do tipo B tetramêro 8.....	30
Figura 25	Espectro de massa para os compostos 2 e 3 da tabela 6, respectivamente. ....	31
Figura 26	Espectros de massa para os compostos 6 e 4 da tabela 6, respectivamente....	32
Figura 27	Espectro de massa para o composto 9 da tabela 6.....	33
Figura 28	Espectro de massa para o composto 10 da tabela 6.....	34
Figura 29	Espectro de massa para o composto 7 da tabela 6.....	34
Figura 30	Espectro de massa para o composto 11 da tabela 6.....	35
Figura 31	Cromatograma extrato <i>Paullinia cupana</i> concentrado PDA.....	36
Figura 32	Cromatograma extrato <i>Paullinia cupana</i> concentrado PDA ampliado.....	37
Figura 33	Cromatograma do extrato da casca da manga por UFLC.....	38



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Massa exata de amostra em cada tubo falcon.....	16
Tabela 2	– Massa exata de amostra pesada para extração.....	19
Tabela 3	– Composição dos vials injetados no UPLC.....	23
Tabela 4	– Quantidade de amostra presente nos vials.....	23
Tabela 5	– Levantamento dos tipos de cucurbitacinas existente .....	25
Tabela 6	– Compostos <i>Paullinia cupana</i> (GUARANÁ) no modo negativo.....	28
Tabela 7	– Compostos <i>Paullinia cupana</i> (GUARANÁ) no modo positivo.....	28
Tabela 8	– Resultado dos picos.....	36
Tabela 9	– Picos coletados referente ao cromatograma do extrato da casca da manga..	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<i>Paullinia Cupana</i> .....	<b>3</b>
2.2	Alcaloides púricos.....	4
2.3	Taninos .....	5
2.3.1	Taninos hidrolisáveis .....	6
2.3.2	Taninos condensados.....	6
2.4	<i>Cucurbita pepo</i> .....	7
2.4.1	Curcubitacinas.....	8
2.5	<i>Mangifera indica</i> .....	9
2.5.1	Mangefirina.....	11
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Gerais</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2</b>	Objetivos específicos.....	13
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
4.1	Extração da <i>Cucurbita pepo</i> por sistema soxhlet.....	14
4.2	Extração da <i>Paullinia cupana</i> (Guaraná) .....	15
4.2.1	Desengorduramento da amostra por sistema soxhlet com éter de petróleo.....	15
4.2.2	Extração por ultrassom com solução Água/Etanol (1:1).....	16
4.2.3	Partição líquido – líquido do extrato aquoso.....	17
4.3	Preparo de solução concentrada de <i>Paullinia cupana</i> para isolar procianidinas	19
4.4	Extração por sistema soxhlet da <i>Mangifera indica</i> .....	21
4.5	Condições do sistema LC-MS e PDA para análise dos extratos .....	21
4.6	Preparo do extrato de <i>Cucurbita pepo</i> e <i>Paullinia cupana</i> a ser injetado no LC-MS e PDA.....	22
4.7	Tratamento e injeção do extrato da <i>Mangifera indica</i> no CLAE.....	22
4.8	Método e aplicação do extrato da casca da manga no CLAE.....	23
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>25</b>
5.1	Análise do extrato da <i>Cucurbita pepo</i> .....	25
5.2	Análise do extrato da <i>Paullinia cupana</i> .....	26
5.3	Isolamento das procianidinas do extrato da <i>Paullinia cupana</i> concentrado.....	35

5.4	Separação dos compostos do extrato da casca da <i>Mangifera indica</i> .....	37
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade sempre dependeu da natureza para sua evolução e sobrevivência. No início, a necessidade baseava-se na coleta e caça, sendo que com o passar do tempo e com a evolução, o uso de plantas e domesticação de animais começaram a ser evidentes. Muito mais tarde os recursos naturais foram tidos como mercadoria, utilizados como objeto de escambo e moeda de comércio. Atualmente, a exploração, a extração, a manipulação, o uso e a aplicação dos recursos naturais estão incorporados de diferentes maneiras à cultura de quase todos os povos do mundo moderno, e muitos destes recursos assumem o papel de commodities em grande parte da economia internacional.

A bioprospeção torna possível retirar um alto valor econômico da biodiversidade, termo que é conhecido na ciência como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto de importância para o desenvolvimento da sociedade (SACCARO JÚNIOR, 2011).

A *Paullinia cupana*, conhecida como guaraná, é característica da região amazônica (HENMAN, 1982) e apresenta baixa toxicidade e possui antioxidantes. Possui um grande efeito como quimioprolifático na carcinogênese, e potencial de atividade antibactericida contra o *Streptococcus mutans*, uma das causas de placa dental bacteriana (OTOBONE et al., 2005). As procianidinas fazem parte de sua composição, sendo importante estudos mais a fundo sobre formas de isolar esses compostos, pois são responsáveis pela adstringência de frutas, sucos e vinhos, e em muitos casos são compostos bioativos em plantas medicinais (PINTO, 2003).

A *Cucurbita pepo* é uma das espécies mais utilizada no mundo, sendo de suma importância economicamente para a humanidade. Ela possui uma rica diversidade em sua composição, sendo amplamente utilizada para o estudo de doenças e para o estudo no amadurecimento dos frutos (EZURA et al., 2008). As cucurbitacinas estão presentes na maioria das espécies da família cucurbitáceas, entretanto, ainda não foram identificadas sua presença em *Cucurbita pepo*. Desse modo, se faz importante o estudo para a identificação desses compostos na abóbora, já que possuem os efeitos citotóxicos, hepatoprotetores, anti-inflamatórios e cardiovasculares (METCALF et al., 1982).

A *Mangifera indica*, conhecida popularmente como manga, pertence à família Anacardiaceae. É amplamente encontrada no Brasil, sendo o segundo produtor mundial, com o Nordeste como sua principal região produtora, apresentando uma grande

distribuição pelo território nacional, mesmo em contraste com as condições precárias de comercialização da fruta, com base no sistema de distribuição em feiras livres tradicionais (YANRU et al., 1995). Com o extrato da manga, é possível obter vários compostos fenólicos, especialmente na sua casca, como a mangiferina, que possui efeitos antidiabético, hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatório. Com todos esses efeitos que ela possui, é possível que a mangiferina ajude na prevenção de doenças cardiovasculares, atuando sobre o processo aterosclerótico, sendo de suma importância o desenvolvimento de estudos através de seu isolamento por métodos como a cromatografia líquida ultrarrápida (WAUTHOZ et al., 2007).

Esse trabalho teve como objetivo o estudo químico das espécies *Mangifera indica*, *Cucurbita pepo* e *Paullinia cupana* visando o isolamento ou identificação de suas substâncias, através das técnicas analíticas CLAE e espectrometria de massas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Paullinia cupana* (guaraná)

A *Paullinia cupana* é popularmente chamada de guaraná, sendo identificada como uma variedade cultivada do varcupana Ducke do tipo selvagem, encontrada na parte superior da bacia amazônica (RADKOFER, 1895).

O guaraná típico da região da Amazônia, se espalha por todo o Brasil, dando ênfase a seu crescimento na região nordeste, principalmente na Bahia. Suas sementes, usadas amplamente na medicina popular, contém grandes quantidades de metil-xantinas, incluindo cafeína, teofilina e teobromina, saponinas, e polifenóis, especialmente os taninos. O extrato do guaraná é utilizado como um estimulante do sistema nervoso central, em casos de estresse mental e como anti-diarréico, diurético e antineurálgico. (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

O efeito antidepressivo foi relatado como sendo comparável para a imipramina antidepressiva tricíclica, e com um benefício efeito físico na cognição, sem alterar a atividade locomotora. (AUDI et al., 2010)

Figura 1: Guarani: *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke.



Fonte: Herman, 1982.

O guaraná apresenta baixa toxicidade e possui antioxidantes, com um grande efeito como quimioprolifático na carcinogênese, e potencial de atividade antibactericida contra o *Streptococcus mutans*, uma das causas de placa dental bacteriana (OTOBONE et al., 2005).

A cafeína está presente no guaraná. O efeito relativamente leve do guaraná, considerando seu alto teor de cafeína, pode ser devido à química interna existente em sua composição, do que à própria farmacologia de sua ingestão. As sementes possuem um alto teor de gorduras, óleos e resinas que, em conjunto, impedem que a droga total se dissolva com muito sucesso na água e nunca alcance as soluções aquosas simples que podem ser produzidas como o chá e o café.

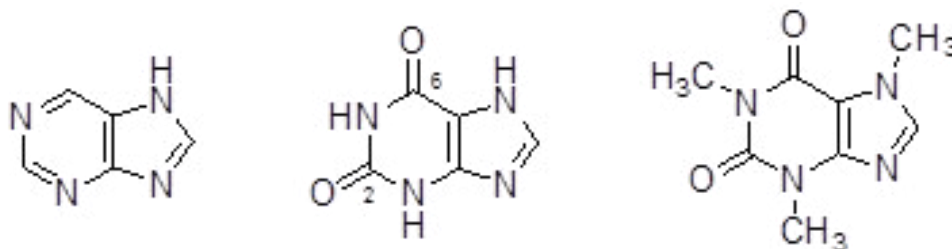
Os efeitos estimulantes do guaraná foram originalmente creditados ao alto teor de cafeína (HENMAN, 1982), embora posteriormente tenha sido indicado que os efeitos farmacológicos do guaraná não podem ser atribuídos unicamente à presença das bases de xantinas, sugerindo a importância dos antioxidantes presentes (MATTEI et al., 1998).

A xantina com maior concentração no guaraná é a cafeína, que possui aproximadamente entre 2,3 e 6,4 por cento de peso em amostra seca, com teobromina e teofilina a concentração menor que 0,2%. A substância teofilina produz um efeito estimulante no sistema nervoso central mais forte do que a cafeína, mas está presente em menor quantidade no extrato de guaraná (ESPINOLA et al., 1997; MATTEI et al., 1998).

### **3.2 Alcaloides púricos**

Os alcaloides púricos são metabólitos secundários derivados da xantina, chamados de falsos alcaloides por não derivarem diretamente de um aminoácido. Nesse grupo de compostos, destacam-se: cafeína, teofilina, teobromina, com propriedades estimulantes que afetam o sistema nervoso central. As principais drogas púricas são de conhecimento da sociedade, como o café, mate, chá-da-índia, cola, cacau e guaraná (ROBBERS et al., 1997).

Figura 2: Estrutura química representando o núcleo púrico, a xantina e a cafeína da esquerda para a direita.



Fonte: Autor, 2017

As substâncias originadas de bases púricas, adenina e guanina, com caráter anfótero (comportam-se como ácidos ou bases), podem ser caracterizadas como pseudo-alcalóides ou alcalóides púricos (presença de nitrogênio heterocíclico). Os principais precursores das metil-xantinas são as bases púricas livres dentre os quais a adenina parece ser a mais importante. A purina contém um anel de 6 membros (Pirimidínico) fundido com um anel de 5 membros (imidazólico) (COSTA, 2001).

### 3.3 Taninos

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (SALUNKHE et al., 1990). Apresentam alto peso molecular (500-3000 Da) e contém grupos hidroxila-fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas (DESHPANDE et al., 1986).

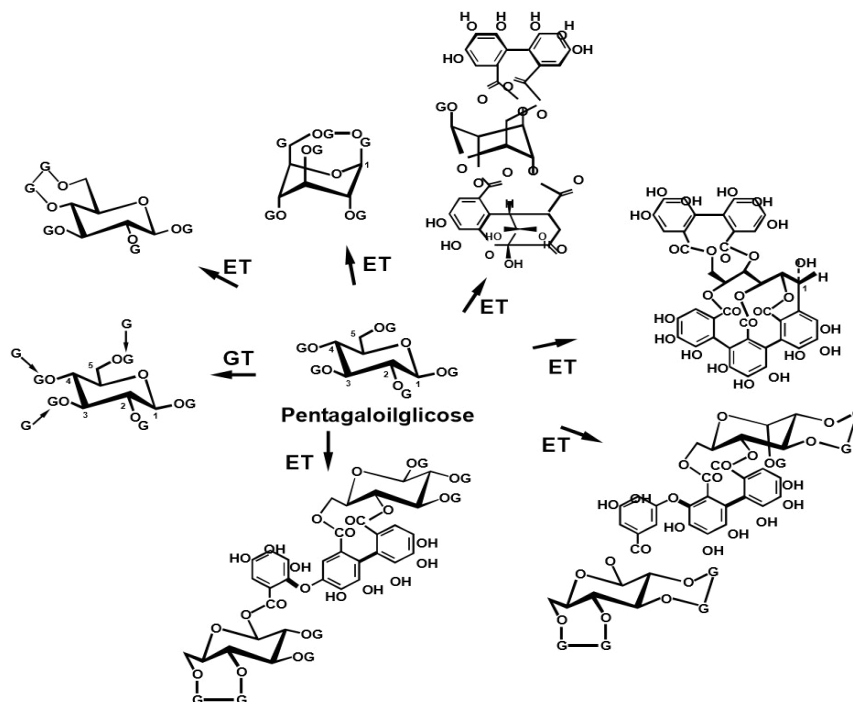
As formas dos taninos nas plantas podem variar de acordo com as condições climáticas e geográficas, podendo apresentar uma composição química variada, sendo muitas vezes, pouco conhecida. Na forma não oxidada, os taninos reagem com proteínas através de pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas. Quando não oxidados, os taninos se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfídricos da cisteína e ω-amino da lisina (NOZELLA, 2001).



### 3.3.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis estão presentes em folhas, galhos, cascas e madeiras de várias árvores. São constituídos de ácido elágico, e também ésteres do ácido gálico ou digálico com açúcares, como a glicose (HASLAM, 1966). Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (HERGERT, 1989). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, usualmente D-glucose, com seus grupos hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo hexadihidroxifênico (elagitaninos).

Figura 3 - Metabolismo do ácido gálico (G) em taninos hidrolisáveis: pentagaloilglicose é o precursor dos galotaninos (GT) e elagitaninos (ET).



Fonte: Costa, 2001.

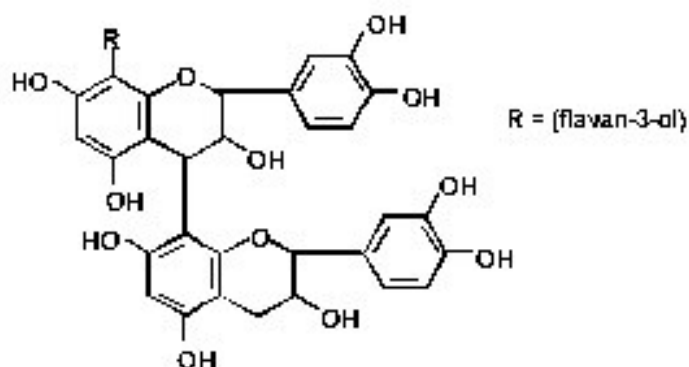
### 3.3.2 Taninos condensados

Os taninos condensados ou proantocianidinas são constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas). Eles estão presente nos alimentos normalmente consumidos (DESPHANDE et al., 1986). Os taninos condensados podem conter de duas a cinquenta unidades flavanóides, possuindo

estruturaco complexa. São resistentes  hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura.

Os pigmentos de antocianidinas são os responsáveis por um vasto conjunto de nuances rosa, vermelha, violeta e azul em flores, folhas, frutos, sucos e vinhos. Também são responsáveis pela adstringência de frutas, sucos e vinhos, e em muitos casos são compostos bioativos em plantas medicinais (PINTO, 2003).

Figura 4: Estrutura química de tanino condensado.



Fonte: Autor, 2017.

### 3.4 *Cucurbita pepo*

A família botânica Cucurbitaceae, inclui várias culturas vegetais economicamente e nutricionalmente cultivadas em todo o mundo, como pepino, melão, melancia e abóbora (BOUALEM et al., 2008). A família das cucurbitáceas apresenta uma rica diversidade de traços, sendo modelos primários para a análise de desenvolvimento corporal, para o estudo da biologia vascular e para a análise dos mecanismos envolvidos no amadurecimento dos frutos (EZURA et al., 2008; LI et al., 2009).

A *Cucurbita pepo*  a espécie economicamente mais importante dentro dos gneros distribuído em todo o mundo e uma das mais variáveis no reino vegetal. A *Cucurbita pepo* cultivada  constituída de duas subespécies, cada uma incluindo vários grupos de cultivares, ssp. Pepo (Abóbora, Marrow Vegetable, Cocozelle e Zucchini) e ssp. ovifera (Acorn, Scallop, Crookneck e Straightneck). Seu grande valor econmico baseia-se principalmente no uso culinário dos frutos imaturos, muitas vezes referidos

coletivamente como "abóboras de verão". A grande diversidade de usos torna os objetivos de reprodução bastante variáveis. (NISHIDA et al., 2000).

A falta de mapas genéticos mais densos, maiores coleções de marcadores de alto rendimento e populações de mapeamento adequadas limitam o isolamento de genes e a criação de abóbora. Muitos genes de *Cucurbita pepo* foram relatados em estudos, principalmente relacionados à qualidade dos frutos e à resistência a potentes vírus e vários fungos (NAKAJIMA et al., 1990). Apenas os transcritos de algumas amostras foram clonados e caracterizados molecularmente em estudos individuais em *Cucurbita pepo*, sendo os genes envolvidos na biossíntese ou via de sinalização dos reguladores de crescimento, que afetam o desenvolvimento de plantas e a resposta ao estresse (NISHIDA et al., 2000).

Figura 5: Pintura referente a *Cucurbita pepo*



Fonte: Object of the month, february 2005. <[http://cumuseum-archive.colorado.edu/Research/Objects/feb05\\_pumpkin.html](http://cumuseum-archive.colorado.edu/Research/Objects/feb05_pumpkin.html)> Acessado em 19/11/2017

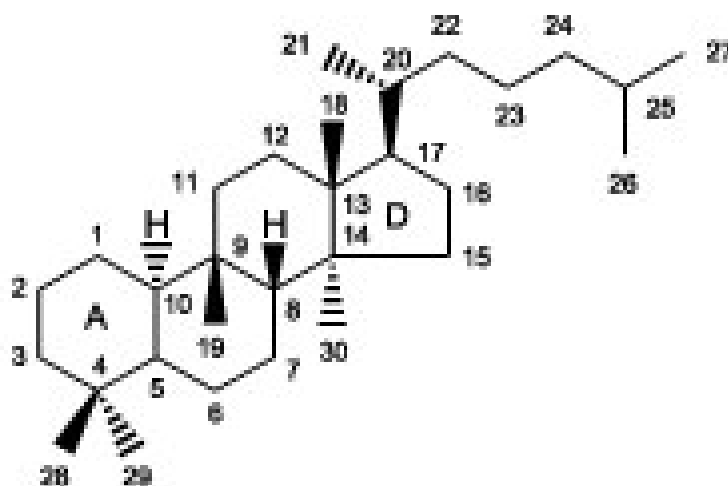
### 3.4.1 Cucurbitacinas

As cucurbitacinas são de grande interesse devido à ampla gama de atividades biológicas que exibem em plantas e animais. Elas são predominantemente encontradas na família das cucurbitáceas, mas também estão presentes em várias outras famílias do

reino vegetal. Apesar da sua toxicidade, as espécies das plantas em que foram encontradas foram usadas há séculos em diversas atividades farmacológicas. Vários compostos deste grupo foram investigados pelos efeitos citotóxicos, hepatoprotetores, anti-inflamatórios e cardiovasculares (METCALF et al., 1980; METCALF et al., 1982).

As atividades anti-inflamatórias de algumas cucurbitacinas foram associadas à inibição das enzimas da cicloxigenase, mas nenhuma pesquisa foi realizada para apoiar esta hipótese. O estudo sobre uma série de plantas geralmente reconhecidas como seguras para aplicações fitoecuticas, apresenta potentes atividades inibitórias anticancerígenas (YESILADA et al., 1998)

Figura 6: Esqueleto estrutural das cucurbitacinas



Fonte: Autor, 2017.

### 3.5 *Mangifera indica*

A manga (*Mangifera indica*), que pertence à família Anacardiaceae, é amplamente encontrada no Brasil, em Cuba e em muitas outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo uma das frutas comestíveis mais populares do mundo. A casca da manga tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento de hemorragias, sarna, diarreia, sífilis, diabetes, infecções cutâneas e anemia, utilizando um extrato aquoso obtido por decoção.

O Brasil é hoje, o segundo produtor mundial, sendo o Nordeste sua principal região produtora, apresentando grande diversidade de tipos e variedades, em contraste

com as condições precárias de comercialização da fruta, com base no sistema de distribuição em feiras livres tradicionais (YANRU. Z et al., 1995).

Figura 7: Manga indiana, *Mangifera indica* ou manga comum, ilustração de manga indiana com flor isolada em um fundo branco



Fonte: Indiano Manga, 2016. <<https://br.depositphotos.com/6751890/stock-illustration-indian-mango-or-mangifera-indica.html>> Acessado em 24/11/2017.

O valor vitamínico das mangas, fica circunscrito principalmente em torno de seu conteúdo de vitamina A (carotenóides), vitamina C (ácido ascórbico) e pequenas quantidades de vitaminas do complexo B (BLEINROTH, 1976). A manga madura possui quantidade apreciável de vitamina C, chegando a conter 110 mg/100 g de material conforme a variedade (BLEINROTH, 1976).

Em razão da manga ser uma fruta sazonal e muito abundante em vários países, seria valioso tanto em termos econômicos como nutricionais, tornar viável um melhor aproveitamento da mesma, de maneira que sejam preservados tanto quanto possível, seus componentes naturais. Para isto, tornam-se importantes, estudos sobre as características e transformações físicas, químicas, bioquímicas e sensoriais da manga durante os

estágios de amadurecimento, armazenamento e processamento, para a obtenção da melhoria da qualidade e aperfeiçoamento de sua industrialização.

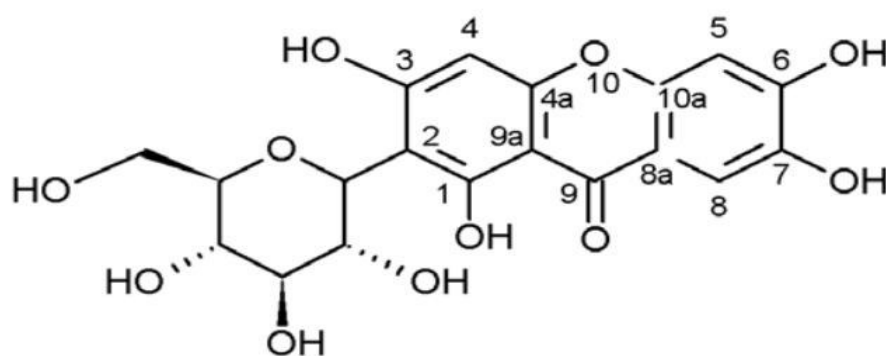
### 3.5.1 Mangiferina

A mangiferina (2-C-d-glucopiranosil-1,3,6,7-tetra-hidroxifantona), cujo nome de acordo com a IUPAC é 1,3,6,7-tetra-hidroxi-2- [3,4,5 -trihidroxi-6 (hidroximetil) oxan-2-il] xanten-9-ona, pertence à classe dos xantonoides, uma das várias classes de compostos naturais denominados coletivamente de polifenóis. Eles se originam por meio de técnicas biossintética, com aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina) como intermediários (fenilalanina ou tirosina) (SEEDI et al., 2010).

Com as folhas da *Mangifera indica*, é possível obter vários compostos fenólicos, especialmente a mangiferina, que possui efeitos antidiabético, hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatório. Com todos esses efeitos que ela possui, é possível que a mangiferina ajude na prevenção de doenças cardiovasculares, atuando sobre o processo aterosclerótico.

Os polifenóis vegetais, plantas fenólicas, são o maior e mais difundido grupo de metabólitos especializados, tradicionalmente conhecidos como metabólitos secundários, devido à sua aparente não participação no roteamento energético ou estrutural primário (KORKINA, 2007).

Figura 8 – Esqueleto estrutura da mangiferina



Fonte: Autor, 2017.

A Mangiferina tem sido amplamente estudada para uma variedade de atividades biológicas, tanto in vitro como in vivo em animais e seres humanos. Algumas das propriedades farmacológicas e químicas da mangiferina foram revisadas recentemente

(WAUTHOZ et al., 2007; SINGH et al., 2009), focadas na mangueira como a principal fonte desse composto. Além disso, nos últimos anos, foram publicados vários novos artigos interessantes sobre a bioatividade da mangiferina e seus mecanismos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O trabalho focou em realizar o estudo metabolômico de três espécies de plantas, a *Cucurbita pepo*, a *Paullinia cupana* e a *Mangifera indica*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar cucurbitacinas no extrato de *Cucurbita pepo*;
- Identificar e isolar as procianidinas no extrato de *Paullinia cupana*;
- Separar os picos do cromatograma referente ao extrato da *Mangifera indica* por CLAE.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Extração da *Cucurbita pepo* por sistema soxhlet

A amostra pulverizada de *Cucurbita pepo*, da semente, estava lacrada e armazenada a baixa temperatura em freezer. A temperatura ambiente, foi pesada em um papel de filtro em forma de cilindro, com peso de 18,9107 g. A amostra foi extraída utilizando os solventes hexano e metanol, respectivamente. Abaixo está uma representação final do sistema:

Figura 9: Sistema soxhlet da extração da *Cucurbita pepo*

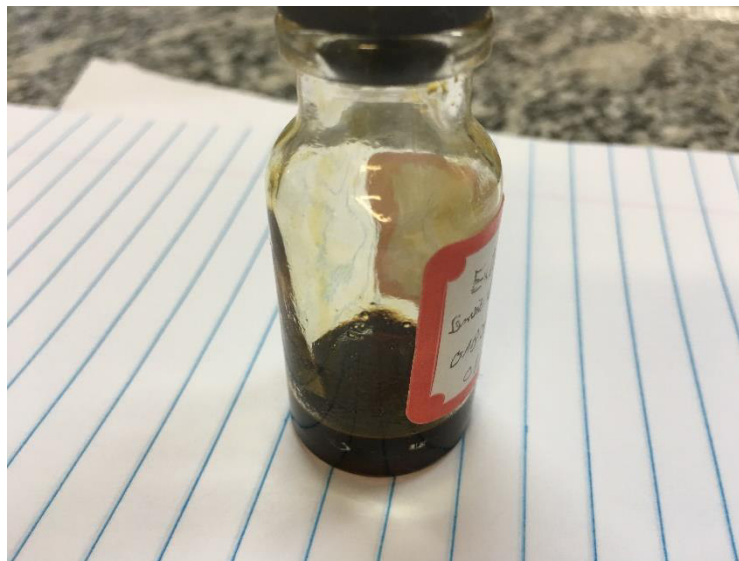


Fonte: Autor, 2017.

A extração com hexano durou 2 horas e 40 minutos e foi feita afim de desengordurar a amostra. Em seguida, foi feita a extração com o metanol o extrato a ser analisado. A amostra desengordurada foi retirada e colocada na capela por 1 hora para evaporar o hexano remanescente. Foi colocada em novo sistema soxhlet com 500 mL de metanol. A extração com metanol durou 2 horas e 25 minutos e, finalmente seco.

O extrato produzido da extração com o metanol foi rotaevaporado, seco com nitrogênio líquido por 45 minutos antes da pesagem do extrato. A massa do extrato de *Cucurbita pepo* obtida foi de 0,742 g.

Figura 10 – Extrato de *Cucurbita pepo*



Fonte: Autor, 2017.

#### 4.2 Extração da *Paullinia cupana* (Guaraná)

Vinte amostras de semente de *Paullinia cupana* em pó, oriunda da Amazônia, estavam lacradas a vácuo e armazenadas a baixa temperatura na geladeira. Após chegarem a temperatura ambiente, os lacres foram removidos e colocadas em um becker de plástico. Em seguida, um béquer de 250 mL foi tarado em uma balança semi-analítica e toda a amostra contida no recipiente de plástico foi pesada. A massa de *Paullinia cupana* (guaraná) foi de 135,94 g.

##### 4.2.1 Desengorduramento da amostra por sistema soxhlet com éter de petróleo

A amostra devidamente pesada foi colocada em um sistema soxhlet com éter de petróleo para processo de desengorduramento. Após a montagem do sistema, o solvente éter de petróleo foi colocado até metade do balão volumétrico de 3 litros, ou seja, 1,5 litros. Abaixo está uma imagem final do sistema.

Figura 11- Sistema Soxhlet com solvente éter de petróleo



Fonte: O autor, 2017.

Após 4 horas de processo de desengorduramento, a amostra foi retirada do sifão e colocada para secar na estufa por 1 hora, para retirar todo o éter de petróleo.

#### 4.2.2 Extração por ultrassom com solução Água/Etanol (1:1)

Após a amostra sair da estufa, foi pesada cerca de um grama da amostra desengordurada e colocada em tubos falcons de 50 mL. Esse processo foi feito para quatro tubos.

Tabela 1 – Massa exata de amostra em cada tubo falcon

<b>Tubo falcon</b>	<b>Massa pesada (g)</b>
1	1,0021
2	1,0071
3	1,0092
4	1,0337

Fonte: Autor, 2017.

Após a pesagem, foram adicionados 10 mL de solução água/etanol (1:1) nos tubos falcons com as devidas massas pesadas de guaraná em pó. Em seguida, foi utilizado a cuba ultrassônica Q3.0L Ultronique para dissolver o máximo de amostra nos tubos. Após 20 minutos no ultrassom, os tubos de ensaios foram para a centrífuga KC5 Kindly, onde ficaram por 10 minutos a uma rotação de 3000 rpm. Em seguida, a parte aquosa foi separada do sólido remanescente. A imagem ilustra o total de solução dos quatro tubos falcons obtido no laboratório.

Figura 12- Extrato aquoso (água e etanol) da *Paullinia cupana*

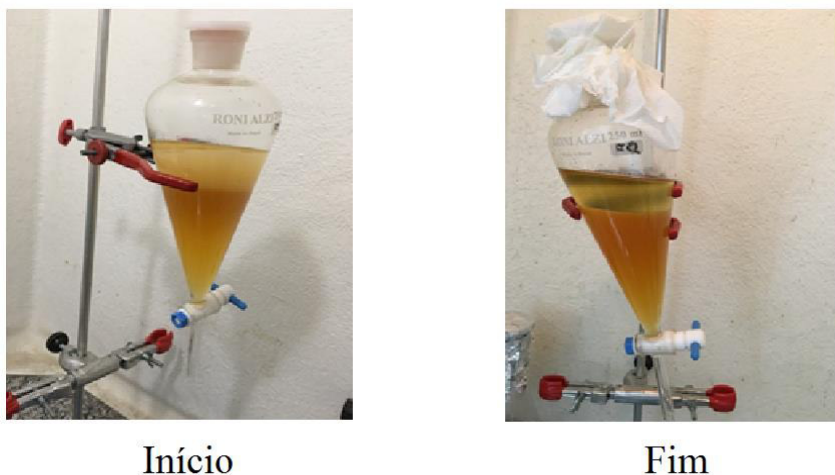


Fonte: O autor, 2017.

#### **4.2.3 Partição líquido – líquido do extrato aquoso**

10 mL da solução aquosa obtida, diluída em 100 mL com água mili-Q em um funil de separação de 250 mL. Em seguida foram diluídos 100 mL de acetato de etila no funil de separação, agitado por 10 minutos e colocado em repouso por 2 horas para separação das fases como ilustrado na figura 15.

Figura 13 – Antes e depois da partição com acetato de etila



Fonte: Autor, 2017.

Após a separação, a parte inferior (etanol e água), e parte superior (acetato de etila) foram coletados (figura 16).

Figura 14 – Separação das soluções de *Paullinia cupana* após a partição



Fonte: Autor, 2017.

A parte de acetato de etila continha água, logo, foi colocada no congelador por 1 hora e 30 minutos para congelar a água e separar do extrato de acetato de etila. A partição foi feita com o intuito de arrastar os compostos fenólicos de interesse, como cafeína, epicatequina, catequina e procianidinas, para uma melhor visualização no espectro de massa.

### 4.3 Preparo de solução concentrada de *Paullinia cupana* para isolar procianidinas

O processo do tópico 4.2 ao 4.2.3 foi repetido, exceto pela mudança na quantidade de amostra e de solventes utilizados. Foram adicionados cerca de 2,5 gramas do extrato desengordurado em oito tubos falcons de 50 mL, com o intuito de formar um extrato mais concentrado.

Tabela 2 – Massa exata de amostra pesada para extração

<b>Tubo Falcon</b>	<b>Massa pesada (g)</b>
<b>1</b>	2,5047
<b>2</b>	2,5049
<b>3</b>	2,5050
<b>4</b>	2,4981
<b>5</b>	2,5013
<b>6</b>	2,5047
<b>7</b>	2,4996
<b>8</b>	2,5090

Fonte: Autor, 2017.

Após a pesagem, foi colocado 30 mL de solução água/etanol (1:1) nos tubos falcons com as devidas massas pesadas de guaraná em pó. Em seguida, foi utilizado a cuba ultrassônica para diluir o máximo da amostra. Após 20 minutos no ultrassom, os tubos de ensaios foram para a centrifuga, onde ficaram por 10 minutos a uma rotação de 3000 rpm. Em seguida, a parte aquosa foi separada do sólido remanescente e feito o processo de partição com acetato de etila utilizando 150 mL do extrato de etanol e água com 600 mL de acetato de etila em um funil de separação de um litro, e colocado em repouso por 4 horas.

Figura 15 – Partição da solução concentrada de *Paullinia cupana*



Fonte: Autor, 2017.

Após a separação da parte contendo acetato de etila da parte etanol com água, o extrato de interesse, com acetato de etila, foi posto no rotaevaporador, onde permaneceu por 30 min, a 42°C com 50 rpm, para concentrar o extrato, retirando todo o acetato de etila. A imagem ilustra o extrato obtido no laboratório.

Figura 16 – Extrato final da solução concentrada de *Paullinia cupana*



Fonte: Autor, 2017.

#### 4.4 Extração por sistema soxhlet da *Mangifera indica*

A extração foi realizada utilizando 10 g da amostra em pó da casca da manga e colocados no sistema soxhlet adicionado com 600 mL de metanol P.A na proporção de 1:60 (m/v), no tempo de 9 horas, em triplicata.

Figura 17: Extrato da *Mangifera indica*



Fonte: Autor, 2017.

#### 4.5 Condições do sistema LC-MS e PDA para análise dos extratos

O sistema de cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) teve as seguintes condições: a análise cromatográfica foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 um), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido formico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido formico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µL.

As condições da massa de alta resolução – XEVO-QToF teve como modo ESI adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L / h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI<sup>+</sup> foi adquirido na faixa de 110-1180 Da,



temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS<sup>E</sup>. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

No PDA, a análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / PDA (Uv-vis) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (3 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 2 µL. No XEVO-QToF, a aquisição foi adquirida na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 600 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L / h. O modo ESI<sup>-</sup> e ESI<sup>+</sup> apresentaram voltagem do capilar de 0,8 kV e 1,5 kV. O instrumento foi controlado pelo software Empower 3 (Waters Corporation).

#### **4.6 Preparo do extrato de *Cucurbita pepo* e *Paullinia cupana* a ser injetado no LC-MS e PDA**

5 mg do extrato de *Cucurbita pepo* foram dissolvidos em 1 ml de água/metanol (1:1) filtrado em membrana de PT/FE 0,22 µm e adicionados em vial para posterior injeção. O extrato de *Paullinia cupana* a ser injetado no LC-MS, foi diluído 0,5 microlitros da amostra líquida em 9,5 µL de uma solução água/metanol (1:1) em vial de 1,5 mL. O mesmo procedimento foi feito para preparar o extrato para injeção no PDA.

#### **4.7 Tratamento e injeção do extrato da *Mangifera indica* no CLAE**

Para o extrato da *Mangifera indica*, vials de 1,5 mL foram preparados dissolvendo o extrato com solvente água/metanol (1:1). Foram utilizados 3 vials para coletar os picos exposto no cromatograma. De cada vial foi utilizado cerca de 1 mL, pois o UFLC da marca Shimadzu tem em seu injetor a capacidade de coletar apenas quantidades acima de 0,5 mL em cada vial.

Tabela 3 – Composição dos vials injetados no UPLC

<b>Vaio</b>	<b>Massa de extrato (mg)</b>	<b>Volume de solvente utilizado (mL)</b>
<b>1</b>	78,18	1,5
<b>2</b>	95,45	1,5
<b>3</b>	123,45	1,5

Fonte: Autor, 2017.

Foi utilizado 0,7 mL do vial 1, 1,0 mL do vial 2 e 0,9 mL do vial 3. Na tabela 3 tem a concentração presente em cada vial em mg/mL e a massa injetada de cada vial levando em conta o quanto foi usado de cada.

Tabela 4 – Quantidade de amostra presente nos vials

<b>Vaio</b>	<b>Razão massa por volume (mg/mL)</b>	<b>Massa injetada de cada vial (mg)</b>
<b>1</b>	52,12	36,48
<b>2</b>	63,63	63,63
<b>3</b>	82,30	74,07

Fonte: Autor, 2017.

O total de extrato injetado no UFLC foi de 174,19 mg para a coleta dos picos.

#### **4.8 Método e aplicação do extrato da casca da manga no CLAE**

Devido a problemas apresentado pelo CLAE com injetor e software, alguns mL do primeiro vial foram perdidas. Foram feitas 53 injeções, sendo 13 injeções de 30  $\mu$ L e 40 injeções de 50  $\mu$ L. O sistema UPLC Shimadzu teve as seguintes condições: bombas LC-20AD, forno do tipo CTO-20A a 30°C, detector do tipo SPD-M20A arranjo de diouro PDA “Uv-vis” e coluna Zorbax SB-C18 de 4,6 x 150 mm 3.5 micron. As corridas foram realizadas utilizando fluxo de 2 mL/min, com fase móvel A (Acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico) e B (Água Mili-Q com 0,1 % de ácido fórmico), com tempo de corrida de 18 minutos, tendo o gradiente variando de 5% a 36% de B em 0,01 a 8,5

minutos, e de 8,5 a 9 minutos variando de 36% a 100% de B, lavando e recondicionando até 18 minutos, para o equilíbrio do sistema. Após o estudo do cromatograma, foram coletados manualmente 12 picos em erlenmeyers. Em todos foram colocados 80 mL de metanol, para facilitar o processo de rotaevaporação.

Figura 18: Erlenmeyers onde foram coletados os 12 picos



Fonte: Autor, 2017.

Em seguida, os picos coletados foram para o rotevaporador, a uma temperatura média de 40 °C, para não degradar a amostra, e utilizando 50 rpm, para concentrar a amostra retirando o solvente, no caso a acetonitrila, o metanol e a água. Foi possível a retirada da acetonitrila e do metanol, permanecendo somente a água. Os picos coletados foram guardados em frascos de penicilina tarado e colocados no congelador para posterior análise dos picos.

Figura 19: Picos coletados em frascos de penicilina com água



Fonte: Autor, 2017

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise do extrato da *Cucurbita pepo*

O extrato de *Cucurbita pepo* foi obtido com o propósito de identificar a cucurbitacinas em sua composição. Contudo, apesar da literatura apresentar relatos dessas substancias, esse material é novo, podendo haver diferenças químicas. Inicialmente, foi necessário fazer um levantamento sobre os tipos existentes para possível identificação no extrato.

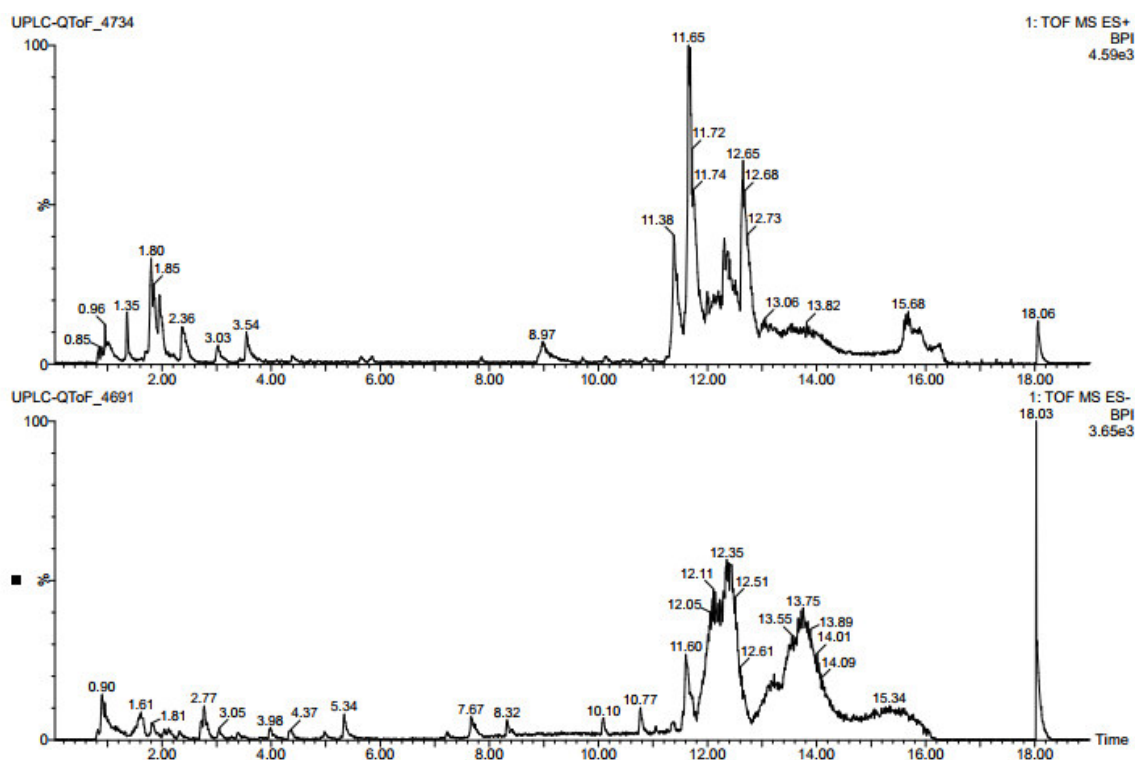
Tabela 5 – Levantamento dos tipos de cucurbitacinas existente

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO	CUCURBITACINAS	FÓRMULA MOLECULAR	MASSA MOLAR	ORGANISMO
C00003683	Cucurbitacin B	C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	558.31926845	<i>Bryonia dioica</i>
C00003683	Cucurbitacin B	C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	558.31926845	<i>Bryonia alba</i>
C00003684	Cucurbitacin C	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	560.33491851	<i>Bryonia alba</i>
C00003685	Cucurbitacin D	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	516.30870376	<i>Bryonia dioica</i>
C00003686	Cucurbitacin E	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	556.30361838	<i>Bryonia dioica</i>
C00003686	Cucurbitacin E	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	556.30361838	<i>Bryonia alba</i>
C00003689	Cucurbitacin I	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub>	514.2930537	<i>Bryonia dioica</i>
C00003689	Cucurbitacin I	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub>	514.2930537	<i>Bryonia alba</i>
C00003690	Cucurbitacin J	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	532.30361838	<i>Bryonia dioica</i>
C00003690	Cucurbitacin J	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	532.30361838	<i>Bryonia alba</i>
C00003694	Cucurbitacin S	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>6</sub>	498.29813907	<i>Bryonia dioica</i>
C00031748	Dihydrocucurbitacin B	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	560.33491851	<i>Bryonia dioica</i>
C00031748	Dihydrocucurbitacin B	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	560.33491851	<i>Bryonia alba</i>
C00031749	Dihydrocucurbitacin E	C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	558.31926845	<i>Bryonia alba</i>

Fonte: Base de dados KNapSAcK

Os dados obtidos na literatura (tabela 5), foi possível analisar os resultados obtidos no LC-MS, para a possível presença de cucurbitacinas no extrato. O cromatograma obtido foi o seguinte:

Figura 20: Cromatograma do extrato da *Cucurbita pepo*, modo positivo e negativo, respectivamente.



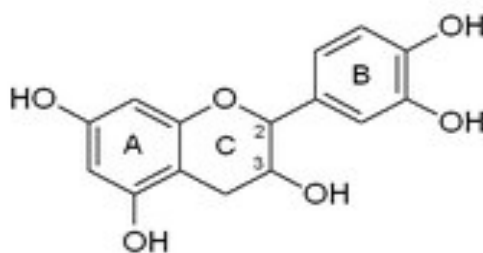
Fonte: Autor, 2017.

Em ambos os cromatogramas, tem-se picos em evidência, como o 12,35 no modo negativo e 11,65 no modo positivo. Ao analisar os picos dos cromatogramas, nenhuma cucurbitacina foi encontrada, pois os picos não correspondiam a uma massa ou uma fórmula molecular presente na tabela 5.

## 5.2 Análise do extrato da *Paullinia cupana*

O guaraná foi analisado com a finalidade de identificar os compostos de interesse, taninos condensados, e procianidinas, que são importantes para as propriedades do guaraná. As procianidinas são uma classe de taninos condensados (proantocianidinas) referente ao composto flavan-3-ol, que foram relatados como componentes em alimentos e bebidas, como uvas, vinho, chá verde e guaraná. As procianidinas podem ter uma ligação do tipo A ou B entre as unidades de flavonóides.

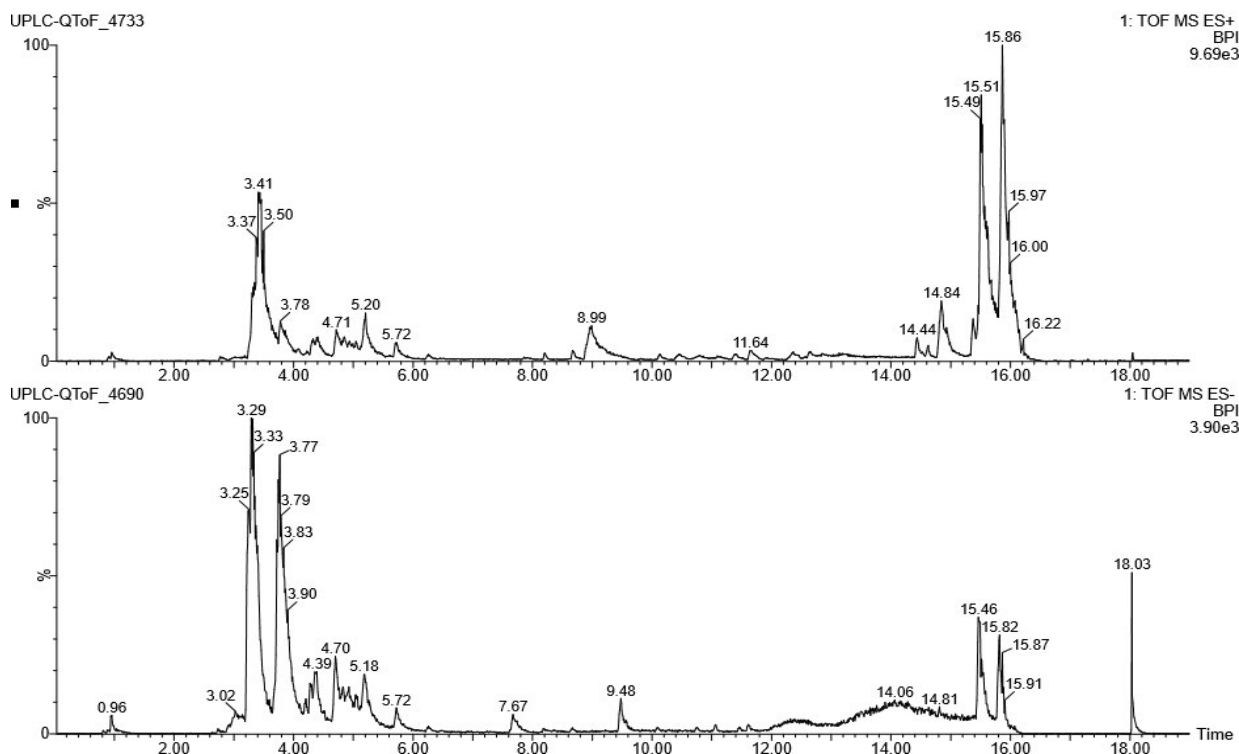
Figura 21: Esqueleto estrutural do flavan-3-ol.



Fonte: Autor, 2017.

O tipo B é caracterizado por unidades de flavonóides conectadas individualmente entre o carbono C (4) e C (6) da unidade de extensão da cadeia ou C (4) e C (8) da unidade de terminação da corrente. As procianidinas do tipo A são diferentes do tipo B por terem uma ligação éter adicional no carbono dois (FERREIRA et al., 2010). Após a injeção do extrato de *Paullinia cupana* no LC-MS, em modo positivo e negativo, foi obtido os seguintes cromatogramas:

Figura 22: Cromatogramas referente ao extrato de *Paullinia cupana* em modo positivo  $[M+H]^+$  e negativo  $[M-H]^-$ , respectivamente.



Fonte: Autor, 2017.

Os cromatogramas possuem diversos picos de intensidade considerável, como 3,29 e 3,77. Picos com tempos de retenção entre 3.02 e 5.72 foram cruciais para a identificação das procianidinas, pois são padrões. Após analisar os cromatogramas no software MassLynx V4.1, os compostos foram identificados e colocados em duas tabelas, um referente a análise em modo negativo e modo positivo.

Tabela 6 – Compostos *Paullinia cupana* (GUARANÁ) no modo negativo

Pico No.	TR Min	[M-H] <sup>-</sup> Observado	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	Produtos dos ions (MS/MS)	Fórmula empírica	Ppm (erro)	Nome
1	0.97	341.1092	341.1084	179.0540, 191.0539	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2.3	Sucrose
2	2.89	577.1346	577.1346	451.1248, 425.0985, 407.0710, 289.0751	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	0.0	Procianidina do tipo B dímero
3	3.02	577.1339	577.1346	451.1119, 425.0858, 407.0714, 289.0708	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	-1.2	Procianidina B2
4	3.29	289.0719	289.0712	245.0798, 205.0482	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	2.4	Catequina
5	3.70	863.1789	863.1823	711.1409, 573.1254, 451.0998, 289.0690	C <sub>45</sub> H <sub>35</sub> O <sub>18</sub>	-3.9	Procianidina do tipo A Trímero
6	3.78	289.0709	289.0712	245.0810, 205.0505	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	-1.0	Epicatequina
7	4.38	575.1195	575.1190	449.0919, 423.0761, 407.0818, 289.0751	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	0.9	Procianidina do tipo A dímero
8	4.55	1153.2604	1153.2614	865.1922, 577.1367, 425.0837, 407.0691	C <sub>60</sub> H <sub>37</sub> O <sub>24</sub>	-0.9	Procianidina do tipo B trítamero
9	4.57	865.2000	865.1980	577.1364, 425.0864, 407.0818	C <sub>45</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub>	2.3	Procianidina do tipo B trímero
10	4.75	1151.2499	1151.2457	863.1914, 575.1172, 407.0869, 289.0729	C <sub>60</sub> H <sub>47</sub> O <sub>24</sub>	3.6	Procianidina do tipo A trítamero
11	4.92	575.1196	575.1190	449.0895, 423.0736, 407.0828, 289.0712	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	0.3	Procianidina A2
12	5.55	861.1650	861.1667	575.1220, 423.0689, 289.0751	C <sub>45</sub> H <sub>33</sub> O <sub>18</sub>	-2.0	Procianidina do tipo A trímero

Fonte: O autor, 2017.

Tabela 7 – Compostos *Paullinia cupana* (GUARANÁ) no modo positivo

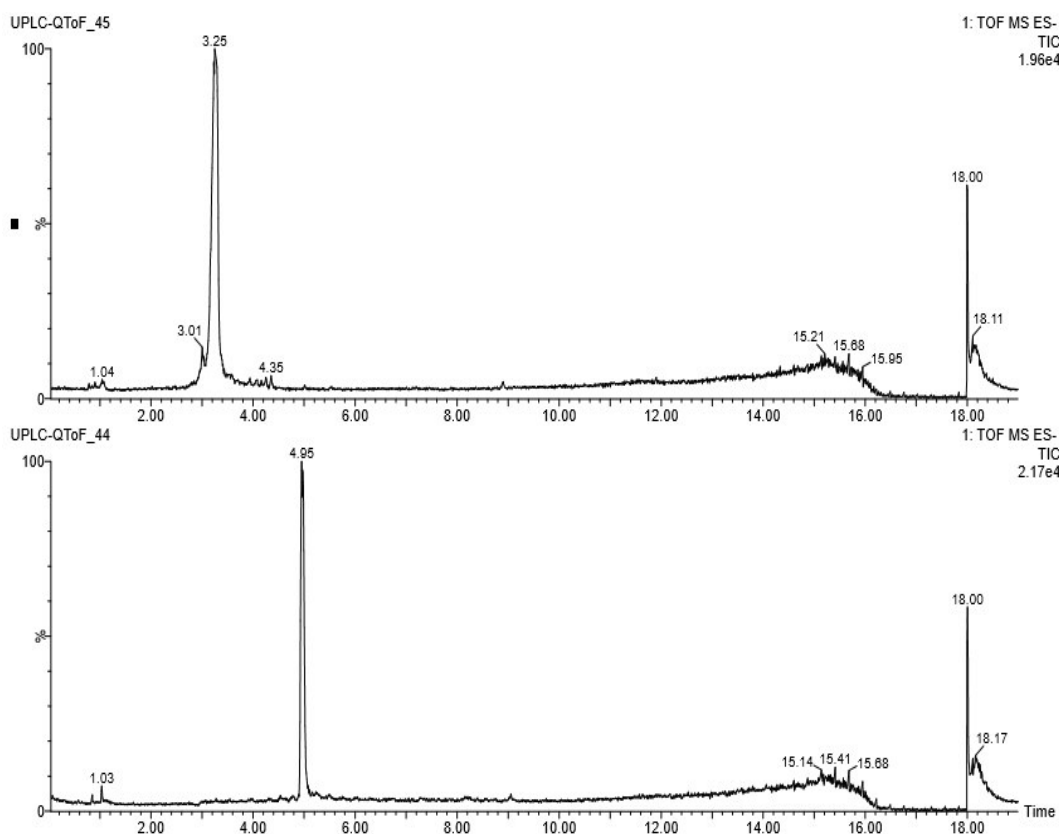
Pico No.	TR Min	[M-H] <sup>+</sup> Observado	[M-H] <sup>+</sup> Calculado	Produtos dos ions (MS/MS)	Fórmula empírica	Ppm (erro)	Nome
1	3.14	291.0870	291.0869	247.0561, 207.1010	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	0.3	Catequina
2	3.81	291.0860	291.0869	207.0643	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	-3.1	Epicatequina
3	3.93	195.0875	195.0882	165.0546, 138.0666	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-3.6	Caféina
4	3.22	579.1523	579.1503	453.1158, 427.1093, 409.0919, 291.0879	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	3.5	Procianidina B2
5	4.48	579.1522	579.1503	425.0867, 195.0831, 291.0852	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	3.3	Procianidina do tipo B dímero
6	5.25	577.1353	577.1346	441.1163, 425.0921, 138.0656, 289.0669	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	1.2	Procianidina do tipo A dímero

7	4.83	577.1358	577.1146	425.0897, 138.0669, 289.0968	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	2.1	Procianidina A2
8	3.71	865.1992	865.1980	575.1243, 427.1000, 291.0847, 195.0852	C <sub>45</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub>	1.4	Procianidina do tipo A trímero
9	6.25	863.1826	863.1823	577.1398, 425.0872, 138.0653	C <sub>45</sub> H <sub>35</sub> O <sub>18</sub>	1.5	Procianidina do tipo A dímero
10	4.05	867.2158	867.2136	579.1544, 291.0849, 195.0882	C <sub>45</sub> H <sub>39</sub> O <sub>18</sub>	2.5	Procianidina do tipo B trímero
11	5.12	1153.2583	1153.2614	865.2134, 577.1400, 425.0880, 291.0917	C <sub>60</sub> H <sub>49</sub> O <sub>24</sub>	-2.7	Procianidina do tipo A tetramero
12	4.38	1155.2660	1155.2770	867.2158, 579.1526, 291.0847	C <sub>60</sub> H <sub>51</sub> O <sub>24</sub>	-0.9	Procianidina do tipo B tetramero

Fonte: O autor, 2017.

Com os padrões das procianidinas A2 e B2, ilustrados na figura 25, foi possível comprovar suas existências devido aos tempos de retenção obtidos nas análises da amostra, comprovando que o tempo de retenção da procianidina B2 é menor do que a procianidina A2.

Figura 23: Padrões procianidina B2 e procianidina A2, respectivamente.



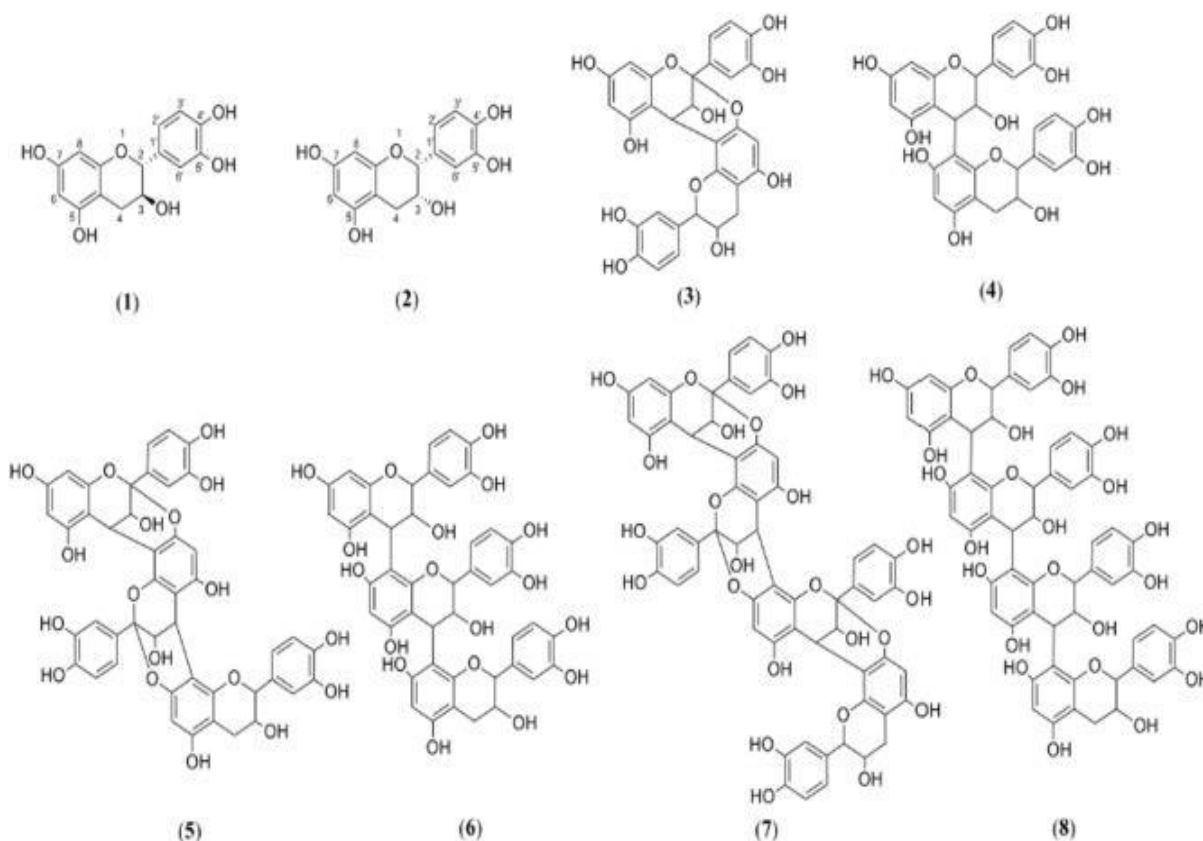
Fonte: Autor, 2017.

A caracterização das procianidinas do guaraná foi feita por análise das fragmentações. Os mecanismos mais comumente encontrados foram a fissão do anel



heterocíclico B com uma perda de 126 Da (fissão formando fósforo heterocíclico, HRF), reação retro Diels-Alder com perda de 152 Da, eliminação de água, formação de benzofurano (fissão formadora de benzofurano, FFB) e fissão da quinona e metamida (QM).

Figura 24: Estruturas das substâncias identificadas no extrato de guaraná (*Paullinia cupana*). 1- catequina, 2- epicatequina, 3- procianidina do tipo A dímero, 4- procianidina do tipo B dímero, 5- procianidina do tipo A trímero, 6- procianidina do tipo B trímero, 7- procianidina do tipo A tetramêro, 8- procianidina do tipo B tetramêro

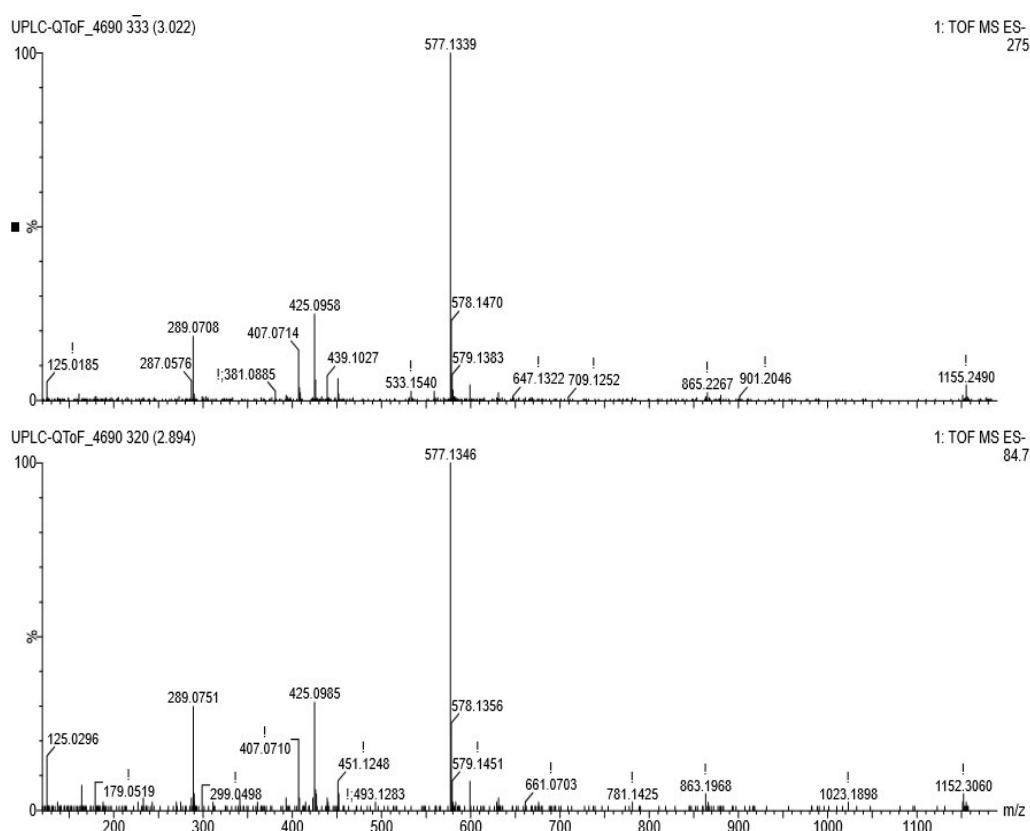


Fonte: Givaldo et al., 2017.

Os compostos 2 e 3 da tabela 5 deram um íon precursor em  $m/z$  577.1346 e 577.1339. Uma proposta de fragmentação pode ser em  $m/z$  451  $[M-H-126]^-$ , derivado do HRF e saída do 1,3,5-tri-hidroxibenzeno (floroglucinol). Os íons a  $m/z$  425  $[MH-152]^-$  e 407  $[MH-152-18]^-$ , corresponderam a reação Diels-Alder retro de uma porção da epicatequina superior que resultou na perda de uma unidade de glucogallin e subsequente eliminação de água. A substância precursora sofreu fissão QM com perda de

epicatequina para produzir um íon em  $m/z$  289  $[M-H-288]^-$ . As estruturas de 2 e 3 eram consistentes com dímeros de procianidina de tipo B e procianidina B2, respectivamente (QIANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Infelizmente, os dados de LC-MS não foram suficientes para determinar se as procianidinas foram formadas por unidades de catequina ou epicatequina. No entanto, os dados LC-MS registados para o composto 3, correspondem ao padrão analítico da procianidina B2.

Figura 25: Espectro de massa para os compostos 2 e 3 da tabela 5, respectivamente.

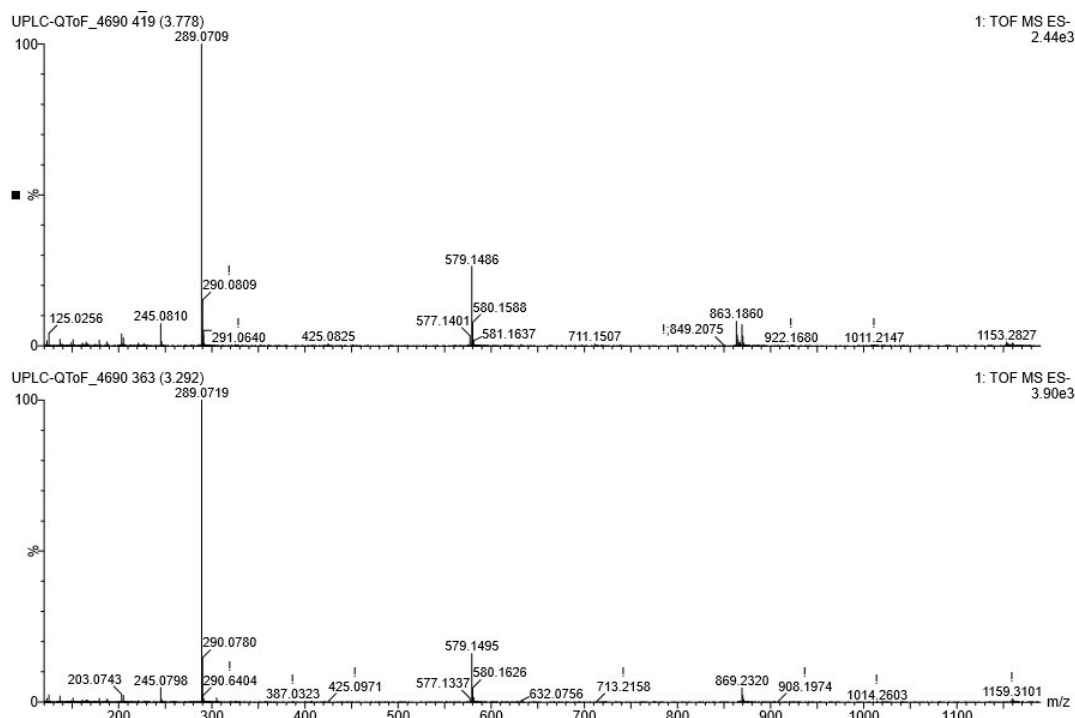


Fonte: Autor, 2017.

O composto 8 mostrou um íon precursor em  $m/z$  1153,2614 e foi caracterizado como um tetrâmero de procianidina de tipo B. Os fragmentos MS/MS a  $m/z$  865.1922 e 577.1367  $[M-H-288; M-H-576]^-$  foram atribuídos à quebra QM de uma e duas unidades de epicatequina, respectivamente. O fragmento  $m/z$  425.0837  $[M-H-576-152]$  foi atribuído à ruptura de ligação que acontece entre os flavonoides seguida por um rearranjo retro de Diels-Alder. O fragmento em  $m/z$  289  $[M-H-864]^-$  era típico da epicatequina (QIANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Os compostos 4 e 6 foram identificados como catequina e epicatequina, com os íons precursores em  $m/z$  289.0719 e 289.0709, respectivamente. O tempo de retenção da epicatequina é maior que o da catequina.

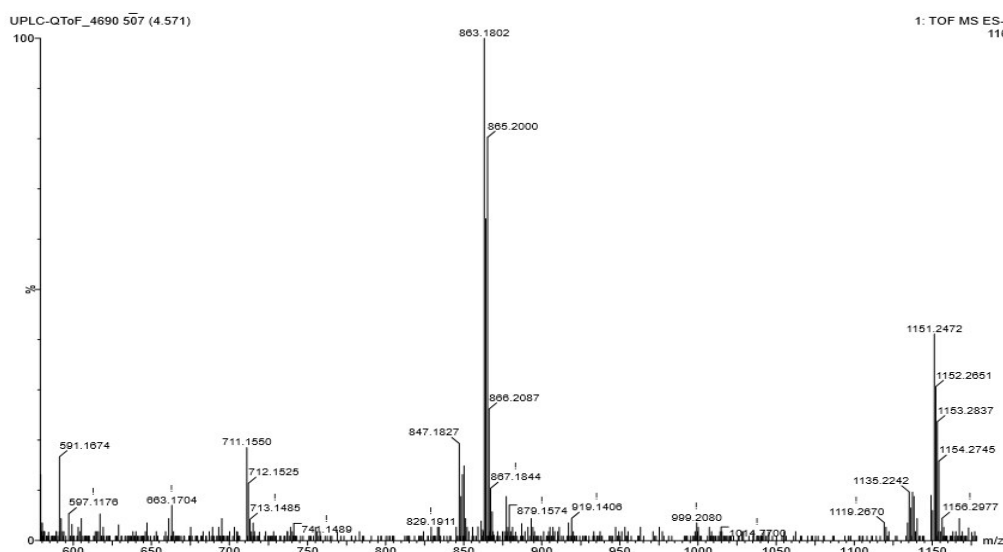
Figura 26: Espectros de massa para os compostos 6 e 4 da tabela 5, respectivamente.



Fonte: Autor, 2017.

O composto 9 exibiu um íon precursor em  $m/z$  865,2000 com fragmentos em  $m/z$  577.1364 [M-H-288]<sup>-</sup> formado a partir da perda de uma unidade de epicatequina superior por um mecanismo de clivagem QM. A formação de íons com  $m/z$  425.0864 [M-H-289-152]<sup>-</sup>, 407.0818 [M-H-289-152-18]<sup>-</sup> e 289.0815 [M-H-577]<sup>-</sup> foram por fragmentos já descrito para o composto 8. O composto 5 foi caracterizado por estes dados como um trímero de procianidina de tipo B (QIANG et al., 2015; TALA et al., 2013).

Figura 27: Espectro de massa para o composto 9 da tabela 5.

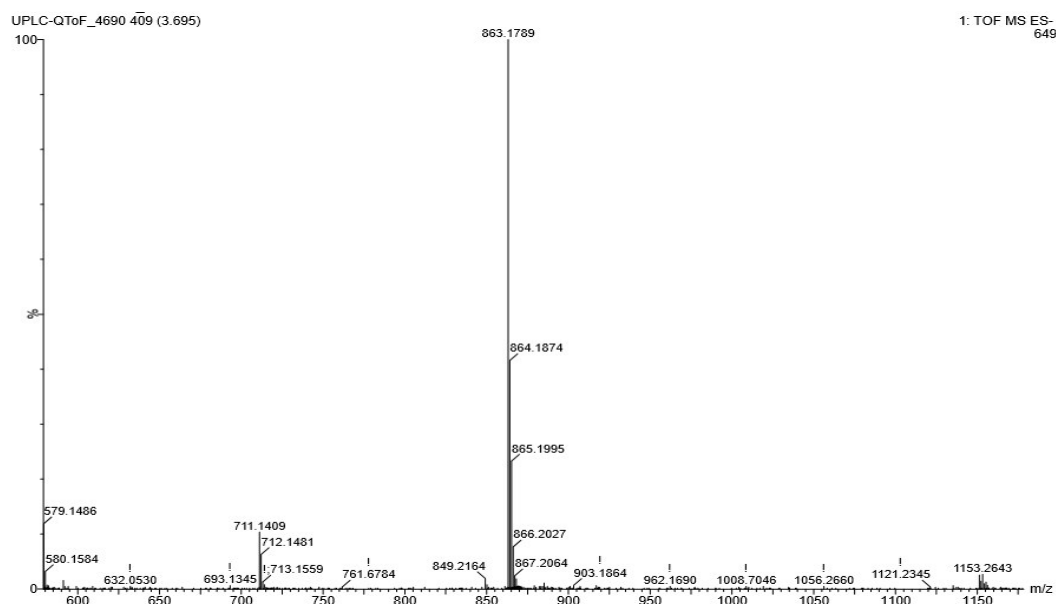


Fonte: Autor, 2017.

Os trímeros de procianidina com apenas uma conexão de tipo A foram evidenciados por fragmentos em  $m/z$  573 e 289, gerados a partir de clivagem QM entre as unidades intermediárias e terminais de epicatequina (GALAVERNA et al., 2015). O composto 5 mostrou um íon precursor em  $m/z$  863.1789 e fragmentos em  $m/z$  711.1409, 573.1254 e 289.0690. O fragmento em  $m/z$  711.1409 foi formado por rearranjo retro de Diels Alder a partir da unidade de epicatequina com perda de 152 Da.

O composto 10 mostrou um íon precursor em  $m/z$  1151.2499 com fragmentos MS/MS a  $m/z$  863.1914 [MH-288]<sup>-</sup>, 575.1172 [MH-576]<sup>-</sup> e  $m/z$  289.0729 [MH-862] que eram atribuídos a sucessivas clivagens de QM com perda de unidades de epicatequina. O fragmento de íon em  $m/z$  407,0869 [M-H-575-150-18]<sup>-</sup> foi formado por reação retro de Diels-Alder seguido por uma perda de água. O composto 10 foi caracterizado como tetrâmero de procianidina do tipo A (QIANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

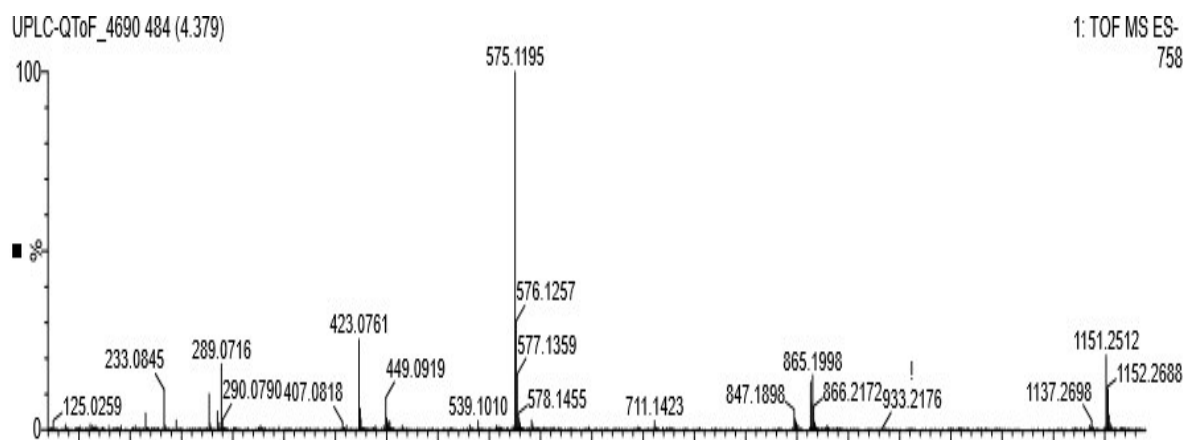
Figura 28: Espectro de massa para o composto 10 da tabela 5.



Fonte: Autor, 2017.

Os compostos 7 e 11 exibiram um íon precursor em  $m/z$  575 aproximadamente. A proposta de fragmentação para estes íons é fragmentos MS/MS em  $m/z$  449 [MH-126] - após HRF,  $m/z$  423 [MH-152] - de Diels-Alder retro de uma unidade de epicatequina e  $m/z$  289 [MH-288] - da clivagem QM de uma unidade de epicatequina. O composto 7 corresponde a um dímero de procianidina de tipo A e o composto 11 a uma procianidina A2, compatíveis com a fórmula  $C_{30}H_{23}O_{12}$  (QIANG et al., 2015).

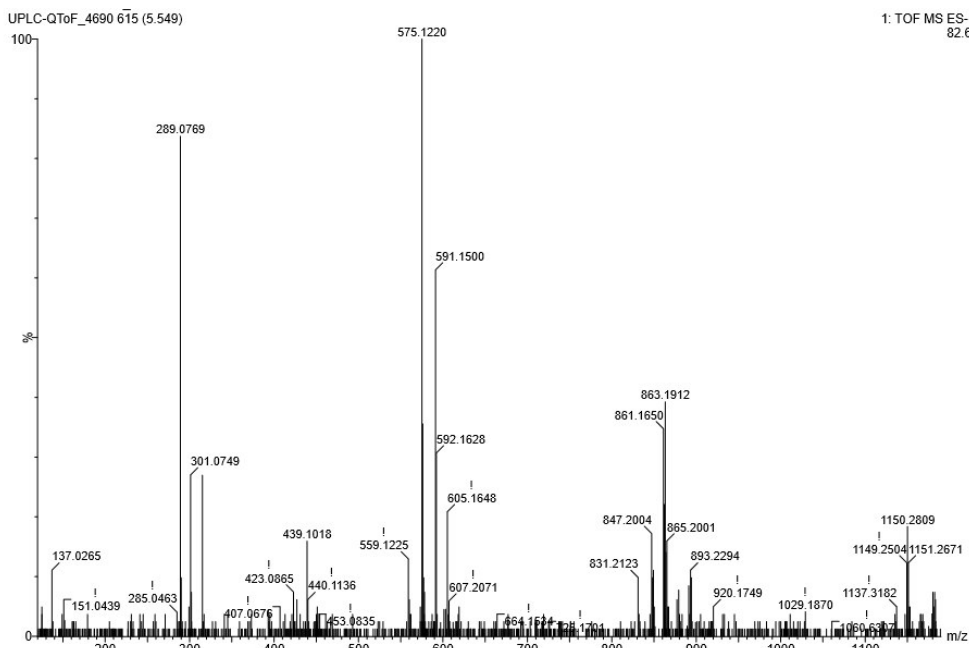
Figura 29: Espectro de massa para o composto 7 da tabela 5.



Fonte: Autor, 2017.

Finalmente, o composto 11 mostrou um íon precursor em  $m/z$  861.1650 consistente com um composto trimerico de procianidina através de duas ligações de tipo A (ZHANG et al., 2015).

Figura 30: Espectro de massa para o composto 11 da tabela 5



Fonte: Autor, 2017.

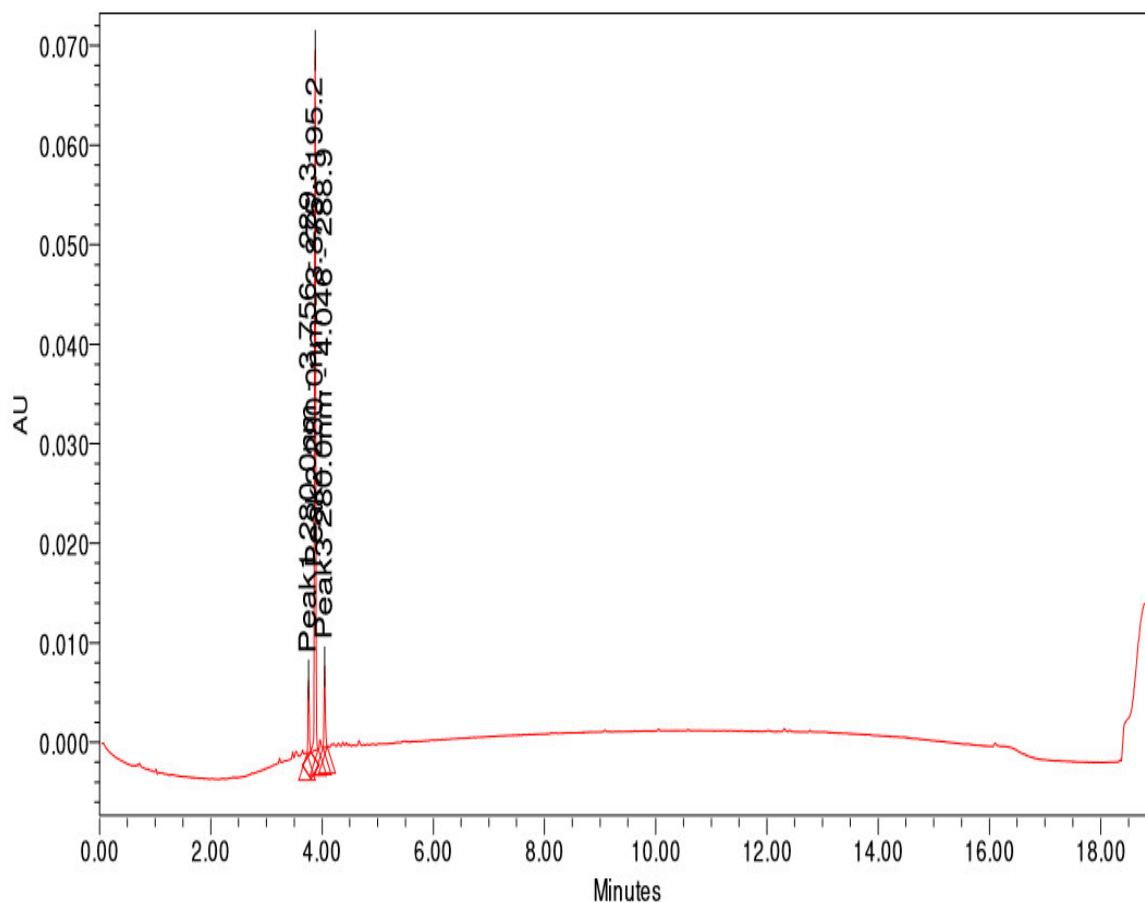
### 5.3 Isolamento das procianidinas do extrato da *Paullinia cupana* concentrado

O extrato concentrado da *Paullinia cupana* foi aplicado no PDA para identificação das procianidinas e seu possível isolamento de acordo com suas quantidades. O cromatograma obtido após a injeção no PDA não identificou quantidades de procianidinas, apenas a presença de catequina, epicatequina e cafeína. Portanto, não foi possível isolar as procianidinas do extrato de guaraná, pois não apareceram no cromatograma, indicando que não existiam em quantidade considerável, de forma que fosse possível coletar os picos pelo CLAE. Pode-se analisar os cromatogramas vendo os tempos de retenção, inseridos nas tabelas 5 e 6.

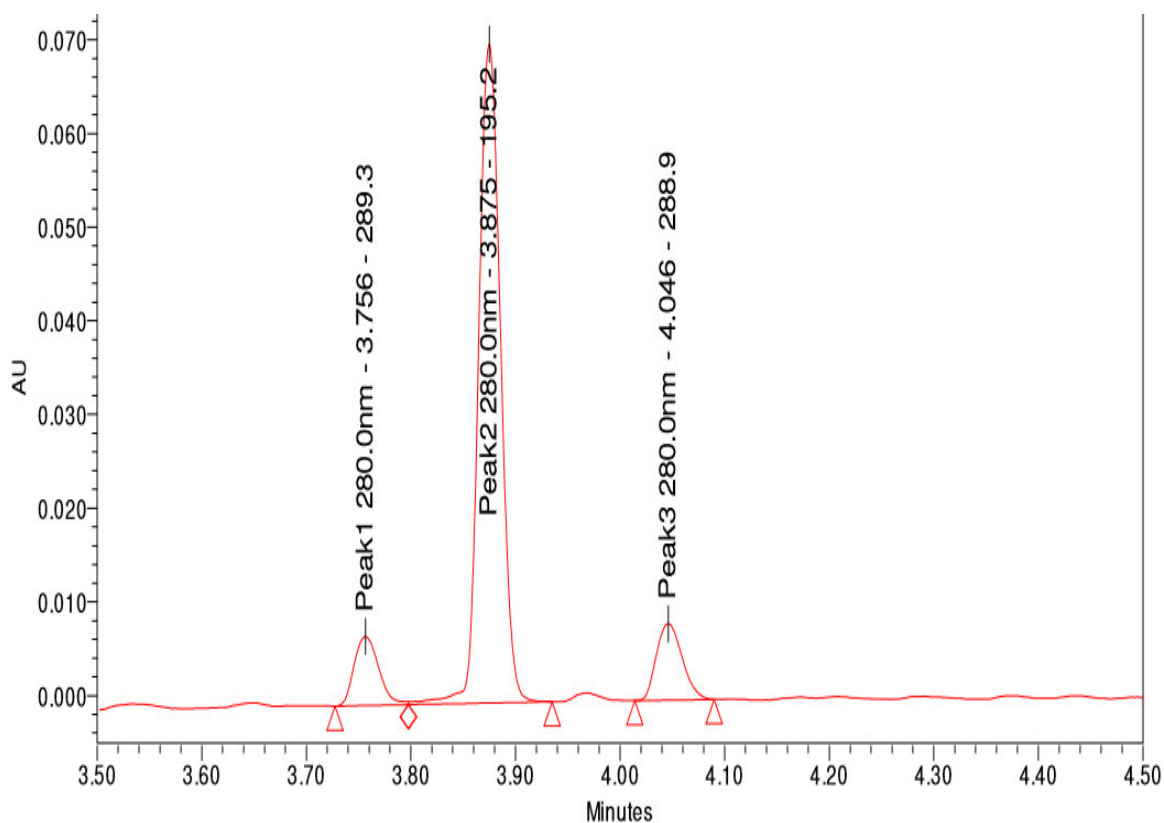
Tabela 8 – Resultado dos picos

Pico	Nome	Tempo de retenção	Área	Força
1	Peak1 280.0nm	3.756	12079	7370
2	Peak2 280.0nm	3.875	102036	70381
3	Peak3 280.0nm	4.046	14073	8180

Fonte: Autor, 2017.

Figura 31: Cromatograma extrato *Paullinia cupana* concentrado PDA

Fonte: Autor, 2017.

Figura 32: Cromatograma extrato *Paullinia cupana* concentrado PDA ampliado

Fonte: Autor, 2017

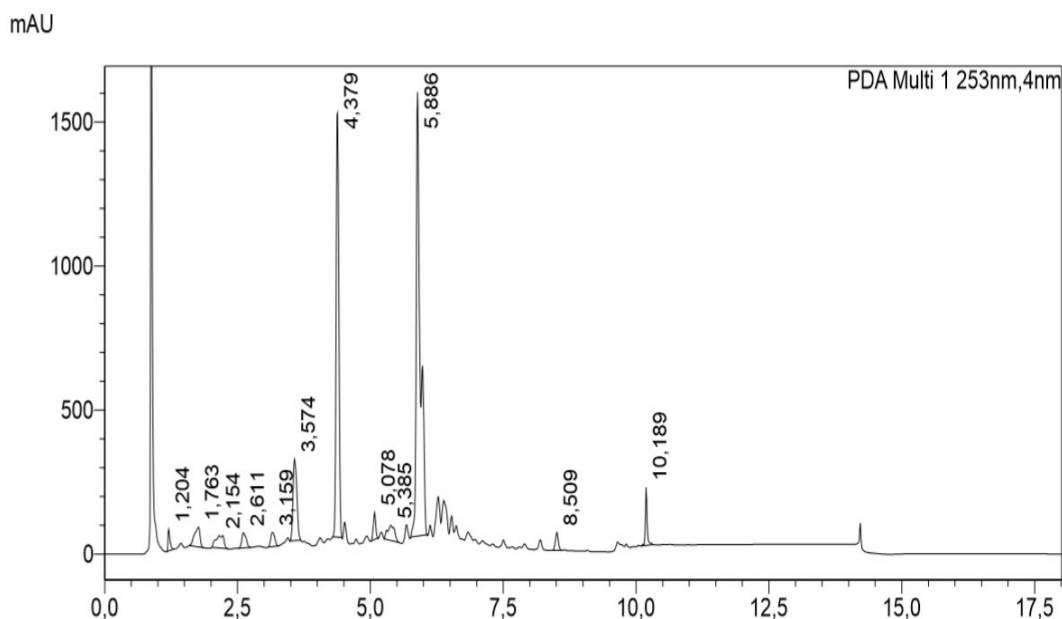
Ao analisar os picos, no tempo de retenção em 3.756 tem-se a catequina, em 3.875 é característico da cafeína e em 4.046 é referente a epicatequina. As procianidinas não apareceram pois no PDA se vê absorção, em que é proporcional a intensidade, com a visualização do comprimento de onda. No LC-MS se vê ionização, logo, o melhor estado de ionização de uma molécula é estando em baixa concentração, como acontece nas procianidinas no extrato da *Paullinia cupana*.

#### 5.4 Separação dos compostos do extrato da casca da *Mangifera indica*

O extrato foi injetado no CLAE para separar os compostos existentes em sua composição. O cromatograma obtido teve 12 picos de intensidade e de resolução relevantes para a coleta, que estão explicitados na tabela 10.



Figura 33: Cromatograma do extrato da casca da manga por CLAE



Fonte: Autor, 2017.

Tabela 9: Picos coletados referente ao cromatograma do extrato da casca da manga

Pico	Tempo de Retenção	Área	Intensidade
1	1,204	205155	74484
2	1,763	490354	68434
3	2,154	461518	43158
4	2,611	295587	52808
5	3,159	257689	49230
6	3,574	1436723	283189
7	4,379	5356714	1465500
8	5,078	487410	52853
9	5,385	487410	52853
10	5,886	8277328	1541754
11	8,509	230290	61685
12	10,189	468471	202015
<b>Total</b>		18065170	3989310

Fonte: Autor, 2017.

Os picos selecionados foram os que tinham melhor definição, sendo possível fazer a coleta de forma que o obtido saísse o mais puro possível. Os picos 10, 7 e 6 foram os de maior intensidade, com os tempos de retenção 5,886, 4,379, 3,574, respectivamente. Os picos coletados foram armazenados no congelador para posterior estudo, logo, não se tem ideia do que foi coletado sem antes analisar.

## 6 CONCLUSÃO

A preparação do extrato da *Cucurbita pepo* foi realizada com todo cuidado, para que não acontecesse a degradação das substâncias presentes na amostra, porém, o cromatograma obtido pelo LC-MS não mostrou nenhuma cucurbitacina, presente no levantamento da tabela 5. Logo, as cucurbitacinas não foram identificadas no extrato preparado, o que indica que essas substâncias não fazem parte da composição da *Cucurbita pepo*.

No estudo do extrato da *Paullinia cupana*, foram identificados as procianidinas por meio da análise no LC-MS. Foi possível provar sua presença por meio dos estudos das fragmentações dos espectros de massa de cada pico mostrado no cromatograma. Foram identificados nove procianidinas, catequina, epicatequina e a cafeína. As procianidinas A2 e B2 obtiveram resultados com tempo de retenção parecidos com os seus padrões, confirmando a sua presença no extrato. Não foi possível isolar essas procianidinas, pois não se mostraram presente na análise do PDA, ou seja, não existiam em quantidades suficiente na *Paullinia cupana* a ponto de seus picos aparecerem no cromatograma e ser possível a sua coleta.

Além disso, foi possível coletar doze picos de intensidade e de resolução relevantes do extrato da casca da *Mangifera indica* por meio do UFLC. Com a separação, foi possível concentrar o que foi coletado de cada pico retirando o metanol e a acetonitrila. Entretanto, por não ter sido possível retirar a água dos picos coletados, não foi possível fazer as identificações das substâncias.

Por fim, não foi possível realizar todos os objetivos do trabalho, entretanto, foi de suma importância a realização desses estudos nos materiais escolhidos, pois existe um potencial futuro de evoluir com as pesquisas, como identificar o que foi coletado do extrato da casca da *Mangifera indica* e tentar um novo caminho para isolar as procianidinas da *Paullinia cupana*.

## 7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, PRISCILA PEREIRA. **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais**. Revista Prismas: Dir., Pol. Pub. E Mundial, Brasília, v. 3, n.1, p.03-32, jan./jun. 2006.

BATE-SMITH, E.C. **Astringent tannins of Acer species**. Phytochemistry, v.16, p.1421-1426, 1977.

BLEINROTH, E.W. **Caracterização de variedades de manga para industrialização**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1976. 78 p. (Instruções Técnicas n.13)

BOUALEM A, FERGANY M, FERNANDEZ R, TROADEC C, MARTIN A, MORIN H, SARI MA, COLLIN F, FLOWERS JM, PITRAT M, PURUGGANAN MD, DOGIMONT C, BENDAHMANE A: **A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons**. Science. 2008, 321: 836-838.

COSTA, ALOÍSIO FERNANDES. **Farmacognosia**. 3º Ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibenkian, 2001. V.3 992 p. II.

DESHPANDE, S.S., CHERYAN, M., SALUNKHE, D.K. **Tannin analysis of food products**. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.24, n.4, p.401-449, 1986.

D. FERREIRA, J.P.J. MARAIS, C.M. COLEMAN, D. SLADE. **Proanthocyanidins: Chemistry and biology**. L. Mander, H.B. Liu (Eds.), Comprehensive natural products II, Elsevier Science (2010), pp. 605-661

DONALD L. PAIVA, GARY M. LAMPMAN, GEORGE S. KRIZ, JAMES R. VYVYAN, **Introdução a espectroscopia**. 4º Ed., p. 399 – 498, 2012.

E. YAMAGUTI-SASAKI, L.A. ITO, V.C.D. CANTELI, T.M.A. USHIROBIRA, T. UEDA-NAKAMURA, B.P. DIAS FILHO, C.V. NAKAMURA, J.C.P. MELLO, **Molecules** 12 (2007) 1950–1963.

E. YESILADA, S. TANAKA, E. SEZIK, M. TABATA: **Isolation of antiinflammatory principles from the fruit juice of Ecballiumelaterium**. J. Nat. Prod., 51 (1998), pp. 504-508

E.A. AUDI, C.M. RONCON, C.B. ALMEIDA, J.C.P. MELLO, J. EUR. COLL. **Neuropsychopharmacol**, p.20 (2010) S274.

E.A. AUDI, J.C.P. MELLO, 2000. **Fundação Universidade Estadual de Maringá**, BR Patent no. PI00066389, Cl. Int.

ELLARD-IVEY M, HOPKINS RB, WHITE TJ, LOMAX TL: **Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (Cucurbita pepo L.)**. Plant Mol Biol. 1999, 39: 199-208.

EL-SEEDI, H.R.; EL-BARBARY, M.A.; EL-GHORAB, D.M.H.; BOHLIN, L.; BORG-KARLSON, A.K.; GORANSSON, U.; VERPOORTE, R., **Recent Insights into the Biosynthesis and Biological Activities of Natural Xanthenes**. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17, (9), 854-901.

ESPÍNOLA, E.B., DIAS, R.F., MATTEI, R., CARLINI, E.A., 1997. **Pharmacological activity of guarana (Paullinia cupana Mart.) in laboratory animals**. J. Ethnopharmacol. 55, 223–229.

EZURA H, OWINO WO: **Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening**. Plant Sci. 2008, 175: 121-129.

F.J. OTOBONE, A.C.C. SANCHES, R.L. NAGAE, J.V.C. MARTINS, S. OBICI, J.C.P. MELLO, E.A. AUDI, BRAZ. **Arch. Biol. Technol.** 48 (2005)

FERRIOL M, PICÓ B, NUEZ F: **Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers**. Theor Appl Genet. 2003, 107: 271-282.

GUIMARÃES, L. F. L. **Cromatografia líquida de alta eficiência**, Collins, C. H., ed.; 7ª ed., Ed. Unicamp: Campinas, 1998, cap. IX.

HAGERMAN, A.; BUTLER, L.G. **The specificity of proanthocyanidin-protein interactions.** J. Biol. Chem. v.256, p.4494-4497. 1981.

HARVEY, M. I. **Analysis of hydrolysable tannins.** Animal Feed Sci. Technol., v.91, p.3-20, 2001.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins.** London: Academic Press, 1966. 179 p.

HENMAN, A.R., 1982. **Guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin.** J. Ethnopharmacol. 6, 311–338.

HERGERT, H.J. **Condensed tannic in adhesives: introduction and historical perspectives.** In: HEMINGWAY, R.W. et al. (Ed). **Adhesives from renewable resources.** Washington: American Chemical Society, 1989. p. 155-171.

KARGER, BARRY L. (1997). **"HPLC: Early and Recent Perspectives"**. Journal of Chemical Education. **74**: 45.

KORKINA, L.G., **Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health.** Cellular and Molecular Biology, 2007, 53, (1), 15-25.

L. R. SNYDER, J.J. KIRKLAND, AND J. W. DOLAN, **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, John Wiley & Sons, New York, 2009.

L.V. QIANG, F. LUO, X. ZHAO, Y. LIU, G. HU, C. SUN, X. LI, **Identification of proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn) Pulp by LC-ESI- Q-TOF-MS and their antioxidant activity.** PLoS One, 10 (3) (2015), pp. 1-17

LI Z, HUANG S, LIU S, PAN J, ZHANG Z, TAO Q, SHI Q, JIA Z, ZHANG W, CHEN H, SI L, ZHU L, CAI R: **Molecular isolation of the M gene suggests that a conserved-residue**

**conversion induces the formation of bisexual flowers in cucumber plants.** Genetics. 2009, 182: 1381-1385.

LIN MK, LEE YJ, LOUGH TJ, PHINNEY BS, LUCAS WJ: **Analysis of the pumpkin phloem proteome provides functional insights into angiosperm sieve tube function.** Mol Cell Proteomics. 2009, 8: 343-356.

M. MIRO, **Cucurbitacins and their pharmacological effects.** Phytother. Res., 9 (1995), pp. 159-168

M.W. DONG, **Modern HPLC for practicing scientists.** Wiley, 2006.

MASIBO, M.; HE, Q., **Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties-A Review.** Food Rev. Int., 2009, 25, (4), 346-370.

MATTEI, R., DIAS, R.F., ESPÍNOLA, E.B., CARLINI, E.A., BARROS, S.B.M., 1998. **Guaraná (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro.** J. Ethnopharmacol. 60, 111–116.

MENDES, F.R., CARLINI, E.A., 2002. **Toxicologia pré-clínica do extrato de café BST 0101: estudos iniciais em roedores.** In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 17 Cuiabá.

NAKAJIMA N, MORI H, YAMAZAKI K, IMASEKI H: **Molecular Cloning and Sequence of a Complementary DNA Encoding 1-Aminocyclopropane-l-carboxylate Synthase Induced by Tissue Wounding.** Plant Cell Physiol. 1990, 31: 1021-1029.

NISHIDA I, SUGIURA M, ENJU A, NAKAMURA M: **A Second Gene for Acyl-(Acyl-Carrier-Protein): Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase in Squash, Cucurbita moschata cv. Shirogikuza, Codes for an Oleate-Selective Isozyme: Molecular Cloning and Protein Purification Studies.** Plant Cell Physiol. 2000, 41: 1381-1391.

ORTEGA, G.G., SCHENKEL, E.P., ATHAYDE, M.L., MENTZ, L.A., 1989. **Brasilianische Phytotherapeutika. Ihre rolle im Arzneimittelmarkt. Dtsch. Apoth. Ztg.** 129, 1847–1848.

OTOBONE, F.J., SANCHES, A.C., NAGAE, R.L., MARTINS, J.V.C., OBICI, S., MELLO, J.C.P., AUDI, E.A., 2005. **Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds [Paullinia cupara var. sorbilis (Mart.) Ducke] on cognitive performance in Morris water maze in rats.** *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 723– 728.

OTOBONE, F.J., SANCHES, A.C.C., NAGAE, R., MARTINS, J.V.C., SELA, V.R., MELLO, J.C.P., AUDI, E.A., 2007. **Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [Paullinia cupara var. sorbilis (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats.** *Phytother. Res.* 21, 531– 535.

PARIS HS, BROWN RN: **The genes of pumpkin and squash.** *HortScience.* 2005, 40: 1620-1630.

PARIS HS: **A proposed subspecific classification for Cucurbita pepo.** *Phytologia.* 1986, 61: 113-138.

PASESHNICHENKO, V.A., **Regulation of Terpenoid Biosynthesis in Plants and Its Relation to the Biosynthesis of Phenolic-Compounds.** *Russian Journal of Plant Physiology,* 1995, 42, (5), 699-714.

PAVIA, DONALD L; LAMPMAN, GARY M.; KRIZ, GEORGE S.; ENGEL, RANDALL G. **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena.** 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

PINTO, G.A.S. **Produção de Tanase por Aspergillus niger.** 2003. 213f. Tese (Doutorado)-UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

R.L. METCALF, A.M. RHODES, R.A. METCALF, J.E. FERGUSON, E.R. METCALF, P. YUNG, **Cucurbitacin contents and diabroticites (Coleoptera; Chrysomelidae) feeding upon cucurbita spp.** *Entomol.,* 11 (1982), pp. 931-937

- R.L. METCALF, R.A. METCALF, A.M. RHODES, **Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 17 (1980), pp. 3769-3772
- R.R. PETERS, M.R. FARIAS, R.M. R. VALLE **Antiinflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from Wilbrandiaebracteata.** Planta Med., 63 (1997), pp. 525-528
- R.S. GALAVERNA, P.T.B. SAMPAIO, L.E.S. BARATA, M.N. EBERLIN, C.H.V. FIDELIS. **Differentiation of two morphologically similar Amazonian *Aniba* species by mass spectrometry leaf fingerprinting.** Analytical Methods, 7 (2015), pp. 1984-1990
- ROBBERS, JAMES E. SPEEDIE, MARYLIN K. TYLER, VARRO E.. **Farmacognosia e Biotecnologia.** Editora Premier. 1997.
- S. ZHANG, M.J. ZHU. **Characterization of polyphenolics in grape pomace extracts using ESI Q-TOF MS/MS.** Journal of Food Science and Nutrition, 1 (01) (2015), pp. 1-10
- SACCARO JUNIOR, NILO L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.
- SALUNKHE, D.K., CHAVAN, J.K., KADAM, S.S. **Dietary tannins: consequences and remedies.** Boca Raton : CRC Press, 1990. 200p.
- SILVERSTEIN, ROBERT M.; WEBSTER, FRANCIS X.; KIEMLE, DAVID J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2007. Cap III.
- SINGH, S.K.; SHARMA, V.K.; KUMAR, Y.; KUMAR, S.S.; SINHA, S.K., **Phytochemical and pharmacological investigations on mangiferin.** Herba Polonica, 2009, 55, (1), 126-139.
- V.R.S. TALA, C.V. SILVA, C.M. RODRIGUES, A.E. NKENGFAK, C.L. SANTOS, W. VILEGAS. **Characterization of proanthocyanidins from *Parkiabi globosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by flow injection analysis – electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry** Journal Molecules, 18 (3) (2013), pp. 2803-2820



VOGT, T., **Phenylpropanoid Biosynthesis**. *Molecular Plant*, 2010, 3, (1), 2-20.

WAUTHOZ, N.; BALDE, A.; BALDE, E.S.; VAN DAMME, M.; DUEZ, P., **Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. Bark and Pharmacological Studies of its Main C-Glucosylxanthone, Mangiferin**. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.*, 2007, 1, (2), 112-119.

YAMAGUCHI S, SAITO T, ABE H, YAMANE H, MUROFUSHI N, KAMIYA Y: **Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme ent-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.)**. *Plant J.* 1996, 10: 203-213.

YAMAGUTI-SASAKI, E., ITO, L.A., CANTELI, V.C.D., ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M., UEDANAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V., MELLO, J.C.P., 2007. **Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana***. *Molecules* 12, 1950–1963.

YANRU,Z., PANDEY,M., PRASAD, N.K., SRIVASTAVA, G.C. **Ripening associated changes in enzymes and respiratory activities in three varieties of mango (*Mangifera indica* L.)**. *Indian J. Plant Physiol.* v. 38, n.1, p.73-6, 1995.