



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PEDRO ELLISON SANTOS DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS
FLAVONOIDES EXTRAÍDOS POR TÉCNICAS ASSISTIDAS POR
ULTRASSOM E MICRO-ONDAS DAS FOLHAS DE *Croton*
grewioides Baill.**

**MASS SPECTROMETRY IN THE CHARACTERIZATION OF
FLAVONOIDS EXTRACTED BY USING MICROWAVE AND
ULTRASOUND-ASSISTED OF LEAVES FROM *Croton*
grewioides Baill.**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PEDRO ELLISON SANTOS DO NASCIMENTO
CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS
FLAVONOIDES EXTRAÍDOS POR TÉCNICAS ASSISTIDAS POR
ULTRASSOM E MICRO-ONDAS DAS FOLHAS DE *Croton*
***grewioides* Baill.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Valéria Regina de Souza Moraes

Coorientador: Dr^ª. Vilma Menezes de Jesus Prado

MASS SPECTROMETRY IN THE CHARACTERIZATION OF
FLAVONOIDS EXTRACTED BY USING MICROWAVE AND
ULTRASOUND-ASSISTED OF LEAVES FROM *Croton*
***grewioides* Baill.**

*Dissertation presented to the
Graduate Programm in Chemistry of
the Federal University of Sergipe to
obtain MSc. In Chemistry.*



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

N244c Nascimento, Pedro Ellison Santos do

Caracterização por espectrometria de massas dos flavonoides extraídos por técnicas assistidas por ultrassom e micro-ondas das folhas de *Croton grewoides* Baill / Pedro Ellison Santos do Nascimento ; orientadora Valéria Regina de Souza Moraes - São Cristóvão, 2021.
131 f. : il.

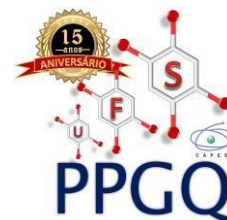
Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Química. 2. Ultrassom. 3. Microondas. 4. Antioxidantes. Moraes, Valéria Regina de Souza orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Pedro Ellison Santos do Nascimento apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 29/01/2021.

____ Prof.ª Dr.ª Valéria
Regina de Souza Moraes Departamento de Química - UFS

____ Prof. Dr. Péricles Barreto Alves
Departamento de Química - UFS

____ Prof.ª Dr.ª Sara Maria
Thomazzi Departamento de Fisiologia - UFS

RESUMO

A complexidade de compostos presentes nas plantas permite que elas possam ser utilizadas em diferentes enfermidades, o qual só é possível devido a presença de compostos bioativos que constituem seus metabólitos secundários. Considerando a escassez no conhecimento químico da espécie *Croton grewoides* e a necessidade de se estabelecer novas metodologias de extração de seus compostos antioxidantes, neste trabalho foi realizado a otimização dos processos de extração por ultrassom e micro-ondas utilizando um planejamento experimental, auxiliados por tratamentos estatísticos. Foi possível a determinação das melhores condições de extração para cada uma das técnicas estudadas, a extração assistida por ultrassom (EAU) e a extração assistida por micro-ondas (EAM). Determinadas as melhores condições de extração, os extratos de *C. grewoides* foram analisados por cromatografia líquida e seus cromatogramas fingerprint submetidos a análise quimiométrica. Também foram feitas análises por espectrometria de massas de alta resolução, utilizando o analisador Orbitrap, com o objetivo de se obter os espectros de massas perfil químico dos extratos, atribuir a fórmula molecular e propor a estrutura química ao maior número possível de compostos presentes nesta espécie. Através dos resultados quimiométricos dos dois fingerprints, dos metabólitos identificados e dos dados de atividades antioxidantes obtidos, foi possível atribuir que a melhor técnica de extração para compostos antioxidantes a partir de *C. grewoides* é a extração assistida por micro-ondas. Adicionalmente, foi possível propor, pela primeira vez, estruturas de quarenta e um compostos nos extratos desta espécie a partir da análise de espectrometria de massas de alta resolução, sendo considerado um método inédito para o estudo químico desta espécie.

Palavras-chaves: *Croton grewoides*, planejamento experimental, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, espectrometria de massas de alta resolução, antioxidantes

ABSTRACT

The complexity of compounds present in plants allows them to be used for different diseases, which is due to the presence of bioactive compounds named as secondary metabolites. Considering the lack of chemical knowledge of *Croton grewioides* species and the need to establish new methodologies for the extraction of its antioxidant compounds, in this work was carried out the optimization of the extraction processes by ultrasound and microwave using an experimental planning, aided by statistical analysis. Thus, it was possible to determine the best extraction conditions for each of the technique studied, ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE). From the best conditions of extraction, the extracts of *C. grewioides* were analyzed by liquid chromatography and their fingerprint chromatograms submitted to chemometric analysis. High resolution mass spectrometry analyzes were also carried out, using the Orbitrap analyzer, with the objective of obtaining a chemical profile of mass spectrums, chemical profile of the extracts, and try to chemically identify the molecular formula and propose the chemical structure to the largest number possible of compounds present in this species. Through the chemometric results from both fingerprint, the identified metabolites and the antioxidant activities obtained, it was possible to assigned that the best extraction technique for antioxidant compounds from *C. grewioides* is microwave assisted extraction. Additionally, it was possible to propose, for the first time, structures of forty one compounds in the extracts of this species from the analysis of high resolution mass spectrometry, being considered an unprecedented method for the chemical study of this species.

Keywords: *Croton grewioides*, experimental design, Ultrasound-Assisted Extraction, Microwave-Assisted-Extraction, High Resolution Mass Spectrometry, antioxidants

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Fundamentação teórica.	2
2.1	O conceito de Química verde e seus princípios.	2
2.1.1	Extração Assistida por Micro-ondas.	4
2.1.2	Extração Assistida por Ultrassom.....	5
2.2	Estudo de otimização dos processos de extração.....	6
2.3	Análises quimiométricas	6
2.4	Espectrometria de massas de alta resolução – HRMS – Orbitrap.....	7
2.5	Compostos fenólicos bioativos	10
2.6	Flavonoides	11
2.7	Determinação do teor de compostos bioativos	14
2.7.1	Teor de fenólicos totais.....	14
2.7.2	Teor de flavonoides totais	15
2.8	Potencial terapêutico dos compostos fenólicos	16
2.9	Atividades antioxidantes	22
2.9.1	Radicais DPPH•.....	22
2.9.2	Ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP)	23
2.10	Família Euphorbiaceae	24
2.11	Gênero <i>Croton</i> L.....	25
2.12	A espécie <i>Croton grewoides</i>	28
3	Objetivo	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos.....	35
4	Metodologia	35
4.1	Equipamentos, Materiais e Reagentes	35

4.2	Material botânico.....	37
4.3	Planejamento experimental para os processos de extração	38
4.3.1	Extração Assistida por Micro-ondas (EAM).....	38
4.3.2	Extração Assistida por Ultrassom (EAU).	40
4.4	Preparação dos extratos	41
4.5	Preparo das Amostras para Análise Cromatográfica.....	42
4.5.1	Extração em Fase Sólida (SPE- Solid Phase Extraction).....	42
4.5.2	Condições Analíticas do Perfil Cromatográfico	42
4.6	Teor de fenólicos totais	43
4.7	Teor de Flavonoides totais.....	44
4.8	Atividade antioxidante.....	44
4.8.1	Atividade antioxidante pelo método DPPH•.....	44
4.8.2	Capacidade redutora do ferro (FRAP).....	44
4.9-	Análise por espectrometria de massas de alta resolução - HRMS .	45
4.10	Análise Quimiométrica	45
5	Resultados e discussões	46
5.1	Otimização da metodologia de Extração Assistida por Ultrassom (EAU)	48
5.1.1	Análise estatística dos resultados de TFT da extração Assistida por <i>Ultrassom</i> (EAU)	49
5.2	Otimização da metodologia de extração assistida por micro-ondas (MAE)	52
5.2.1	Análise estatística dos resultados de TFT da extração Assistida por Ultrassom (EAU)	52
5.3	Obtenção dos extratos de todos os acessos de <i>Croton grewoides</i> a partir das condições ótimas de EAU e EAM	56
5.3.1	Quantificação de flavonoides totais	56
5.4	Análises cromatográficas	57

5.5 Propostas estruturais dos compostos presentes nos extratos de <i>C. grewioides</i>	60
5.6 Análise quimiométricas para as amostras analisadas por Cromatografia Líquida (CLAE-DAD).....	65
5.7 Análise quimiométrica para as amostras analisadas por HRMS – Orbitrap.	70
5.8 Determinação das atividades antioxidantes	77
6 Conclusão	81
7 Perspectivas futuras	83
8 Referências	84
Anexo I.....	97
Anexo II.....	105

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a Deus, por todas as vezes que me concedeu sabedoria e força necessária para conquistar mais uma vitória.

Aos meus pais, Djalma e Gilson, as minhas irmãs, Gildeane e Emily e a minha namorada Jessy por todo o apoio, companheirismo, compreensão, conselhos. Sinto que com vocês ao meu lado posso ir além dos meus sonhos.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Sergipe (UFS), que por meio do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) e do Departamento de Química (DQI) proporcionaram a oportunidade e o prazer em desenvolver este trabalho e realizar um sonho.

A Prof^a. Dr^a Valéria Regina de Souza Moraes, pela oportunidade em tê-la como minha mentora, compartilhando seus conhecimentos, confiança e apoio.

A Dr^a. Vilma Menezes de Jesus Prado, pela a oportunidade de tê-la como minha coorientadora e desta forma me presentear com todos seus ensinamentos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), FAPITEC/SE, e CNPq.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira, por todos os ensinamentos e apoio ao projeto com as suas contribuições direta ao trabalho e a minha evolução.

Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene, pela disponibilização dos equipamentos e materiais do seu laboratório para a execução deste trabalho.

A Prof^a Dr^a. Zaine Teixeira Camargo, pela disponibilidade do seu equipamento para a extração para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior, pela disponibilidade do seu equipamento de espectrometria de massas.

A Prof^a Dr^a. Lisiane dos Santos Freitas, pela disponibilidade de materiais do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank, pelo fornecimento das folhas da espécie *Croton grewoides* Baill e pela disponibilidade do seu equipamento de extração.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, da Universidade Federal de São Carlos, por realizar as análises quimiométricas.

A Prof^o Dr^a Elma Regina Silva De Andrade Wartha do Departamento de Nutrição da UFS, pelas análises colorimétricas.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção, sugestões e observações a este trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório que sempre me ajudaram, seja profissionalmente ou pessoalmente, Ariane, Cristivane, Graciele, Julio, Matheus

e em especial ao Raphael, que sempre esteve ao meu lado como um segundo coorientador.

Aos meus amigos Lukas e Iasmin que me acompanham desde a graduação e durante a pós, e que foram de suma importância para estas conquistas.

Aos amigos que fiz na UFS, seja na graduação e no mestrado, que sempre me impulsionavam.

Aos funcionários do DQI pelos excelentes trabalhos prestados e pelos inúmeros “Bom dia” que me davam forças para começar minha jornada de trabalho.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente, meu muito obrigado!

Lista de abreviações e siglas.

EAM- Extração Assistida por Micro-ondas

EAU- Extração Assistida por Ultrassom

PCA- Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis*)

TFT- Teor de Fenólicos Totais

CLAE-DAD- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por Arranjo de Diodos

DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

FRAP – Poder antioxidante redutor férrico (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

HRMS- Espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, *High Resolution Mass Spectrometry*)

104 – Acesso 104

106 – Acesso 106

112 – Acesso 112

120 – Acesso 120

R% - Rendimento

SPE- Extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

PC1 – Primeira componente principal

PC2 – Segunda componente principal

Lista de tabelas

Tabela 1: Exemplo de trabalhos que demonstram os resultados obtidos por extrações via ultrassom (EAU) e micro-ondas (EAM).....	6
Tabela 2: Estudos sobre espécies de Croton que apresentam potenciais biológicos e farmacológicos.	28
Tabela 3: Distribuição dos acessos de <i>C. grewoides</i> de acordo com os municípios de origens e dados georreferenciais	37
Tabela 4: Condições para a realização do planejamento experimental 2 ³ para a EAM.	39
Tabela 5: Condições para a realização do planejamento experimental 2 ³ para a EAU.	40
Tabela 6: Condições ótimas para a extração de todos os acessos de Croton grewoides para as metodologias de EAU e EAM.	42
Tabela 7: Massas obtidas do material seco e triturado, separados por granulometria.	46
Tabela 8: Dados de rendimento e teor de fenólicos totais para a otimização das EAU e EAM.....	48
Tabela 9: Dados estatísticos do modelo ANOVA para a otimização da EAU..	49
Tabela 10: Dados estatísticos do modelo ANOVA para a otimização da EAM.	53
Tabela 11: Valores de rendimento de todos os acessos obtidos por EAU e EAM	56
Tabela 12: Teor de flavonoides totais, equivalente de catequina/g de extrato	56
Tabela 13: Marcadores quimiotaxômicos presentes na espécie <i>C. grewoides</i>	64
Tabela 14: Dados das variâncias percentuais de todas as componentes principais para as amostras analisadas por CLAE-DAD.....	66
Tabela 15: Dados das variâncias percentuais de todas as componentes principais para as amostras analisadas por espectrometria de massas.	71
Tabela 16: Grupo 1 - Compostos característicos dos extratos EAM e EAU do acesso 106 (Grupo 1, PC1 negativo e PC2 positivo).....	75
Tabela 17: Grupo 2 - Compostos característicos do extrato EAM do acesso 107 (Grupo 2, PC1 positivo e PC2 positivo).	75

Tabela 18: Grupo 3 - Compostos característicos dos extratos EAM e EAU do acesso 104 (Grupo 3, PC1 negativo e PC2 negativo).	76
Tabela 19: Grupo 4 - Compostos característicos do extrato EAU do acesso 107 e dos extratos EAU e EAM dos acessos 112 e 120 (Grupo 4, PC1 positivo e PC2 negativo).	76
Tabela 20: Determinação da atividade antioxidante dos extratos por DPPH e FRAP.	79
Tabela 21: Valores das abundâncias relativas dos íons característicos dos acessos 107, 112 e 120 obtidos por ultrassom e os acessos 112 e 120 obtidos por micro-ondas	80
Tabela 1A: Propostas de compostos encontrados por HRMS da espécie <i>Croton grewoides</i> obtidos por meio da extração assistida por micro-ondas.	97

Lista de Figuras

Figura 1: Os doze princípios da química verde [14].	3
Figura 2: Números de publicações com tema química verde nos últimos 10 anos.	4
Figura 3: Esquema da distribuição das fontes de ionização em relação a natureza da amostra.	8
Figura 4: Ilustração do analisar de massas Orbitrap [40]	9
Figura 5: Estruturas de compostos fenólicos.	10
Figura 6: Rota de convergência da via ácido chiquímico e acetato.	12
Figura 7: Biossíntese dos flavonoides.	13
Figura 8: Esquema da reação do reagente de Folin-Ciocalteu	14
Figura 9: Reação de complexação do Flavonoide com o $AlCl_3$	15
Figura 10: Compostos isolados da <i>M. arboreus</i> com atividade promissora antidiabética.	16
Figura 11: Compostos isolados da <i>H. emerus</i> com atividades antioxidante, tirosinase e elastase promissoras.	17
Figura 12: Flavonoides que apresentaram atividade frente a doenças respiratórias	19
Figura 13: Flavonoides que apresentaram atividade promissoras contra o SARS-CoV-2 por meio de docking molecular	21
Figura 14: Esquema da representação da reação de transferência de elétrons do reagente de DPPH•	23
Figura 15: Esquema da representação da reação de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} do reagente de FRAP	24
Figura 16: Estruturas dos compostos majoritários da <i>Croton rudolphianus</i> .	26
Figura 17: Compostos isolados da <i>Croton gratissimus</i> .	27
Figura 18: Compostos identificados do óleo essencial de <i>C. grewoides</i> .	29
Figura 19: Marcadores quimiotaxonômicos de n-alcenos encontrados em <i>C. grewoides</i> .	30
Figura 20: Composição química do óleo essencial de <i>C. grewoides</i> .	30
Figura 21: Composição química do extrato metanólico de <i>C. grewoides</i> .	32

Figura 22: Compostos isolados do extrato aquoso de <i>C. grewioides</i>	34
Figura 23: (A) Foto da espécie <i>Croton grewioides</i> no Campus do Sertão, (B) Acondicionamento das folhas trituradas e separadas por granulometria.	38
Figura 24: Equipamento de micro-ondas utilizado para as extrações.	39
Figura 25: Equipamento de ultrassom utilizado nas extrações.	41
Figura 26: (A) Filtração à vácuo e (B) Liofilização dos extratos obtidos por EAU e EAM.	41
Figura 27: Curva de calibração do ácido gálico.	47
Figura 28: Diagrama de Pareto do planejamento experimental 2^3 das EAU...	50
Figura 29: Gráficos de superfície de respostas das EAU.	51
Figura 30: Diagrama de Pareto do planejamento experimental 2^3 das EAM...	54
Figura 31: Gráficos de superfície de respostas das EAM.	55
Figura 32: Cromatogramas comparativos dos acessos da <i>C. grewioides</i> extraídos via EAM (A) e EAU (B).	58
Figura 33: Cromatogramas comparativos dos acessos entre os métodos de extração.	59
Figura 34: Fingerprints dos espectros de massas obtidos pela técnica de HRMS.	61
Figura 35: Exemplos de flavonoides como marcadores quimiotaxonômicos da espécie <i>C. grewioides</i>	62
Figura 36: Gráfico das variâncias explicadas das PC's obtidas.	67
Figura 37: Gráfico de scores PC1 versus PC2 das amostras analisadas por LC-DAD da espécie <i>C. grewioides</i>	68
Figura 38: Gráfico de loadings das PC1 e PC2 das amostras analisadas por LC-DAD.	69
Figura 39: Gráfico das variâncias explicadas das PC's para as amostras analisadas por espectrometria de massas.	72
Figura 40: Gráfico de scores das amostras de <i>C. grewioides</i>	73
Figura 41: Gráfico de loadings das PC1 e PC2 das amostras analisadas por Orbitrap.	74
Figura 42: Determinação da atividade antioxidante dos extratos por DPPH e FRAP. Letras minúsculas diferentes (a-d) indicam que há diferença estatística pelo Tukey ($p < 0,05$).	78

Figura 1A: Propostas estruturais dos flavonoides presentes na espécie <i>Croton grewoides</i> analisados por HRMS.	105
--	-----

1 Introdução

A utilização de plantas aromáticas na medicina alternativa é uma prática milenar e o seu crescimento ao longo dos anos é evidente, o qual vincula-se aos inúmeros estudos relacionados a suas atividades, tanto no âmbito biológico, quanto farmacológico. A expansão do consumo de plantas medicinais associa-se a presença dos compostos bioativos que são utilizados para o tratamento e profilaxia de doenças, sendo reforçado pelas probabilidades reduzidas de causarem efeitos colaterais. Baseado nessa demanda, diversos medicamentos conhecidos como fitofármacos podem ser elaborados, tendo como base os compostos naturais [1,2].

A diversidade de compostos encontrados em plantas confere a estas a característica de serem aplicáveis em múltiplos alvos, como por exemplo, no tratamento do câncer, Alzheimer, infecções virais e bacterianas. Essas enfermidades eram comumente tratadas com o uso de medicamentos sintéticos, mas atualmente estão sendo vinculadas a terapias embasadas em substâncias de origem natural [1, 3, 4]. Os compostos responsáveis por combater estas patologias são biossintetizados no interior das células das plantas, estes são conhecidos como metabólitos secundários. Como primeira forma de ação, pode-se dizer que estes compostos defendem a planta de fatores biológicos, climáticos e químicos [5].

Os fenólicos compreendem a classe de compostos mais estudada no que se refere ao tratamento de enfermidades, devido ao poder de redução e modulação do estresse oxidativo em organismos vivos, provocando uma menor incidência de doenças tumorais, cardíacas e inflamatórias. Esse efeito decorre do alto poder antioxidante destes compostos, tendo como principais representantes os flavonoides e ácidos fenólicos [6]. Os fenólicos são encontrados nas matrizes vegetais nas formas agliconas ou glicosiladas, os quais podem ser extraídos por técnicas convencionais, tais como infusão, decocção ou maceração [7]. No entanto, algumas metodologias de extração mais modernas vêm ganhando notoriedade ao longo dos anos [8, 9].

Técnicas de extração assistidas por micro-ondas (EAM; ou MAE do inglês Microwave Assisted-Extraction), ultrassom (EAU; ou UAE do inglês Ultrasound-Assisted-Extraction), com líquido pressurizado (PLE, do inglês Pressurized

Liquid Extraction) e fluido supercrítico (SFE, do inglês Supercritical Fluid Extraction) se tornaram valiosas alternativas para extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais. A aplicação dessas técnicas proporciona uma série de benefícios ecológicos, pois baseia-se nos fundamentos e conceitos da química verde, permitindo um maior rendimento de extração dos compostos bioativos, uma vez que conseguem penetrar/destruir, com mais eficiência as paredes das células vegetais [10, 11]. De forma a melhorar e otimizar os processos de extração, pode-se utilizar um planejamento experimental que auxilie no entendimento de como as variáveis de um processo podem interferir no teor de recuperação dos compostos presentes nas plantas.

2 Fundamentação teórica.

2.1 O conceito de Química verde e seus princípios.

O conceito de química verde foi implementado no início dos anos 90, quando uma mobilização da comunidade científica começou a desenvolver seus conceitos em resposta à lei de prevenção da poluição. Essa iniciativa foi consolidando-se e outros pesquisadores começaram a vislumbrar contribuições relevantes, a exemplo do Prof. Roger A. Sheldon, da Universidade de Leicester e membro honorário da Royal Society of Chemistry, que apresentou duas métricas verdes denominadas de Economia Atômica (EA) e fator E.

Em 1998, os pesquisadores Paul Anastas e John Warner definiram os 12 princípios da Química Verde como representado na Figura 1, onde a partir desse ponto a busca por essa temática foi se intensificando. Atualmente, este é um tema muito discutido, inclusive um decreto da ONU da agenda 2030 estabeleceu 17 objetivos para o Desenvolvimento Sustentável (ODS), dos quais 14 tem relação direta com a utilização de produtos químicos [12-14].

Figura 1: Os doze princípios da química verde [14].



A disseminação da temática correlacionada a proteção ambiental e a preservação da biodiversidade fez com que a química verde evoluísse rapidamente, com isso métodos de extração, principalmente de compostos orgânicos, foram aprimorados para melhor atender a essas demandas. Metodologias como, extração com solvente verdes, ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico e líquidos pressurizados ganham destaque nesse contexto. O emprego dessas técnicas além de reduzir os níveis de solventes prejudiciais à saúde e o alto consumo de energia, maximizam a extração de compostos bioativos, pois conseguem penetrar ou destruir com maior facilidade a parede celular [15, 16].

O desenvolvimento de técnicas alternativas visando a extração de compostos bioativos de matriz vegetal vem avançando ao longo do tempo. Um levantamento feito nos últimos anos evidencia um crescimento em número de publicações com esta temática, fato que está ligado ao forte anseio na busca por metodologias mais sustentáveis que se enquadrem cada vez mais no conceito já mencionado de química verde (Figura 2) [8, 9].

Figura 2: Números de publicações com tema química verde nos últimos 10 anos.

Fonte: ScienceDirect (Elsevier).

O aumento no número das publicações relaciona-se a extrema necessidade do século XXI, no que diz respeito a temática de conservação do meio ambiente. As tecnologias de extração verde configuram métodos de extrações dos compostos bioativos mais eficientes, vinculados aos parâmetros particulares de cada metodologia que contribuem com a seletividade nas extrações de tais compostos, favorecendo assim a preservação ambiental [9].

Assim, como principais benefícios da utilização de metodologias de extração mais verdes temos: a baixa toxicidade do solvente extrativo utilizado, menor consumo de energia e solvente e maior eficiência durante o processo extrativo, os quais justificam, sobremaneira, a mudança de comportamento dos químicos de produtos naturais, relacionada a busca por estas novas metodologias de obtenção de compostos bioativos provenientes de plantas.

2.1.1 Extração Assistida por Micro-ondas.

O conceito básico que envolve a técnica de Extração Assistida por Micro-ondas (EAM), é a interação molecular entre o componente elétrico da radiação com as moléculas que possuem um momento de dipolo. O contexto físico-

químico da técnica evidencia que o aquecimento através da difusão da radiação aumenta a rotação dipolar dos solventes, contribuindo com o aumento da pressão interna nas paredes celulares do material vegetal, favorecendo o seu rompimento, o que facilita a transferência de massa entre matriz vegetal e solvente [17, 18].

Os aspectos físico-químicos da EAM influenciam na extração dos compostos bioativos, atribuindo a essa técnica maior seletividade para extração. Estudos sobre otimização expõem que parâmetros como, tempo de extração, potência do equipamento e composição do solvente exercem interferências na extração desses compostos [19, 20]. Esses parâmetros conseguem interagir de forma mais eficiente na retirada de compostos bioativos da matriz vegetal, pois é possível estabelecer a combinação de todos eles em uma única extração, diferente da maceração, por exemplo, que só utiliza o fator composição do solvente e tempo para realizar a extração.

2.1.2 Extração Assistida por Ultrassom.

A técnica de extração de compostos via ultrassom é umas das metodologias mais utilizadas para a extração de compostos bioativos. Mesmo sendo considerada uma técnica moderna, os primeiros estudos datam os anos 50, desde essa época já havia o conhecimento que o seu uso causava efeitos positivos nas extrações, tais como o aumento no teor de compostos extraídos. Este efeito deve-se ao fenômeno chamado de cavitação, o qual promove a retirada de compostos solúveis no solvente extrator, que estão retidos dentro da parede celular, rompendo-as, otimizando a transferência de massa e facilitando a penetração do solvente dentro das células [21, 22].

A cavitação é formada por micro explosões que podem chegar a ordem de 5.000 K de temperatura e 100 MPa de pressão, consequência da forma de propagação da onda ultrassônica no meio líquido [22].

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos que enfatizam a eficiência da extração assistida por ultrassom, método que vem destacando-se nos últimos anos, na obtenção dos compostos bioativos, principalmente de polifenóis, que são responsáveis por atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais [23, 24].

2.2 Estudo de otimização dos processos de extração.

O desenvolvimento de tecnologias de extração de compostos naturais, desempenha papel fundamental na otimização dos processos extrativos. A utilização de equipamentos que permitam o ajuste simultâneo de duas ou mais variáveis, contribui significativamente para a retirada de compostos da matriz vegetal. Metodologias como Extração Assistida por Micro-ondas (EAM) e Extração Assistida por Ultrassom (EAU) são as técnicas mais utilizadas para os estudos de otimização para essas extrações [25]

Essas metodologias apresentam estudos que comprovam suas eficiências frente a extrações clássicas de compostos naturais, tais como a maceração, infusão e Soxhlet. Além da maximização na extração, estas técnicas são muitas das vezes consideradas verdes por não necessitarem de uso de solventes tóxicos, e possuírem seletividade nas extrações de compostos bioativos, refletindo diretamente nos resultados de testes biológicos e farmacológicos como mostra os exemplos da Tabela 1.

Tabela 1: Exemplo de trabalhos que demonstram os resultados obtidos por extrações via ultrassom (EAU) e micro-ondas (EAM).

Métodos de extração	Espécie	Atividade potencializada	Referências
EAU	<i>Spondias tuberosa</i>	Antioxidante	[26]
EAM e EAU	<i>Lavatera thuringiaca</i>	Antioxidante, citotóxica e antibacteriana	[27]
EAM e EAU	<i>Aronia melanocarpa</i>	Antioxidante e citotóxica	[28]
EAM e EAU	<i>Satureja hortensis</i> L	Antioxidante, citotóxica e antibacteriana	[29]

2.3 Análises quimiométricas

A quimiometria é uma ferramenta estatística/ matemática muito aplicada na química analítica, afim de auxiliar na interpretação assertiva de dados, por meio

de modelagem estatística e tratamentos mais refinados dos dados. Essa técnica desenvolveu-se rapidamente ao longo dos anos, sendo hoje umas das principais formas de interpretação de dados analíticos, como por exemplo, na análise de dados cromatográficos e de espectrometria de massas [30, 31].

Por conta da sua versatilidade a técnica de quimiometria se tornou imprescindível para a aquisição e interpretação dos dados experimentais. Atualmente a química de produtos naturais implementa constantemente essa ferramenta para a compilação dos resultados em termos das extrações, trabalhando com a otimização da metodologia de extração [25-29], e na análise de dados na forma de *fingerprints* cromatográficos ou de outras técnicas espectrométricas [32, 33].

Por meio da otimização dos processos de extração, a quimiometria permite o estudo e compreensão das melhores condições de extração, intercalando as variáveis apresentadas no processo, permitindo a determinação da condição de extração mais favoráveis para todo tipo de amostra [34].

No que concerne a quimiometria fundamentada na obtenção de um *fingerprint* cromatográfico, espectroscópica e/ou espectrométrico, tal modalidade proporciona uma visão mais abrangente do perfil químico presente na amostra, podendo, desta forma, apresentar maior confiabilidade e agilidade, aos estudo de reconhecimento de padrões químicos, como no caso dos marcadores quimiotaxonômicos ou filogênicos presentes na amostra analisada [33, 35].

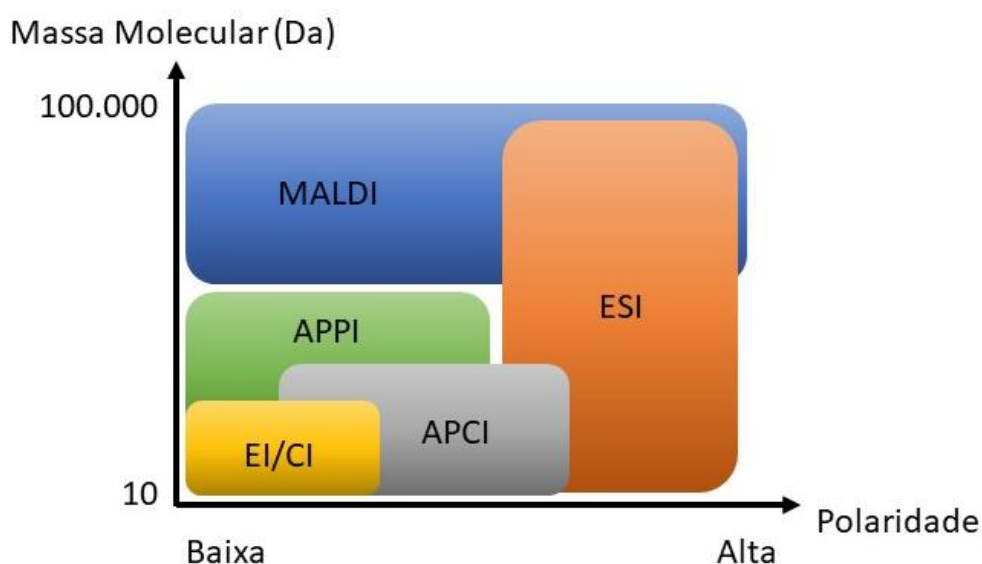
2.4- Espectrometria de massas de alta resolução – HRMS – Orbitrap

A espectrometria de massas é considerada uma das técnicas mais completas para analisar constituintes químicos de uma matriz complexa, a qual analisa as substâncias baseadas na razão massa/carga (m/z) das moléculas ionizadas a partir de diferentes fontes de ionização disponíveis [36].

Nas últimas décadas houve um aumento na procura pelo uso dos métodos de espectrometria de massas de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry* – HRMS) principalmente no que diz respeito a determinação dos constituintes químicos presentes em plantas medicinais. A alta demanda possibilitou o desenvolvimento tecnológico desta metodologia e, atualmente,

diversas fontes de ionização são disponíveis, sendo elas: *Electrospray ionization* (ESI), *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI), *Atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) e a *Laser-Desorption Ionization* (LDI), que são escolhidas a depender das características do analito, como demonstrada na Figura 3 [36, 37].

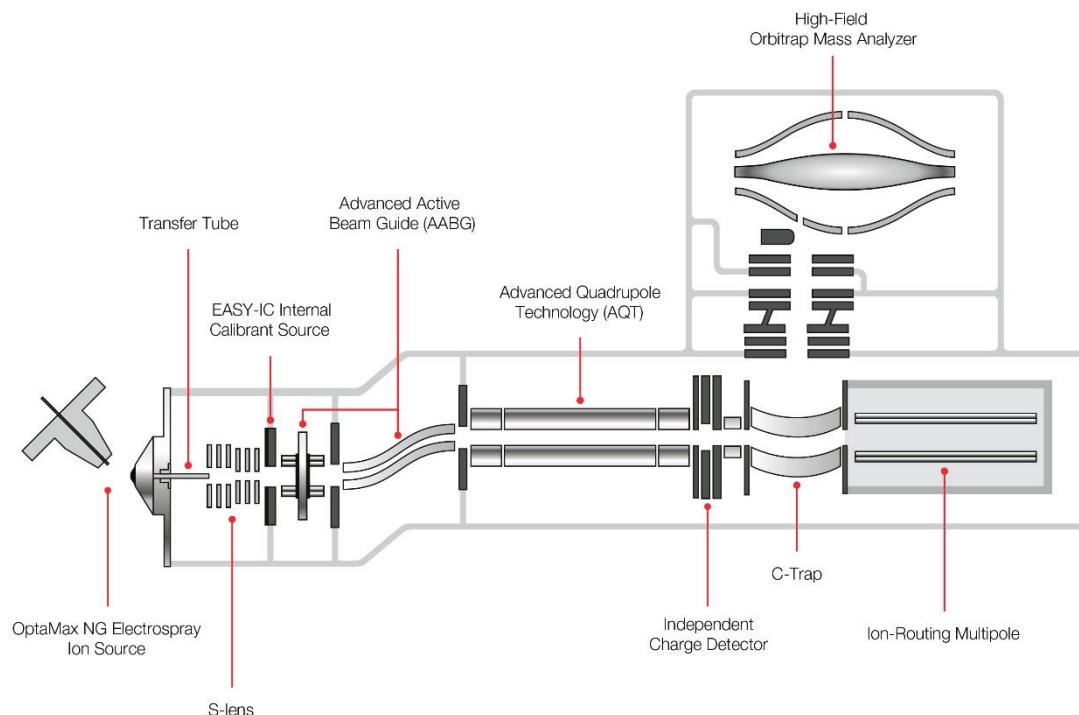
Figura 3: Esquema da distribuição das fontes de ionização em relação a natureza da amostra.



Fonte: Figura adaptada da referência [37].

Outro componente que evoluiu nestas duas décadas foram os analisadores de massas, a exemplo dos analisadores de ultra-alta resolução como o Orbitrap, apresentando-se mais sensíveis no que diz respeito a resolução, como mostrado na Figura 4 [38, 39].

Figura 4: Ilustração do analisar de massas Orbitrap [40]



Esse analisador permite determinar a massa molecular dos íons com uma resolução de até cinco casas decimais, possibilitando a separação dos íons dos constituintes com maior precisão. Sua funcionalidade permite que os íons permaneçam presos em um compartimento contendo um eletrodo, fazendo com que as moléculas ionizadas percorram grandes distâncias, o que favorece o alto poder de resolução deste analisador [38, 39].

A literatura dispõe de muitos estudos que explicitam a utilização deste equipamento como um detector acoplado a um Cromatógrafo Líquido ou Gasoso, entretanto, atualmente é possível encontrar trabalhos envolvendo a injeção direta dos constituintes, ou a mistura destes, como é o caso dos estudos com bio-oleômica e metabolômica.

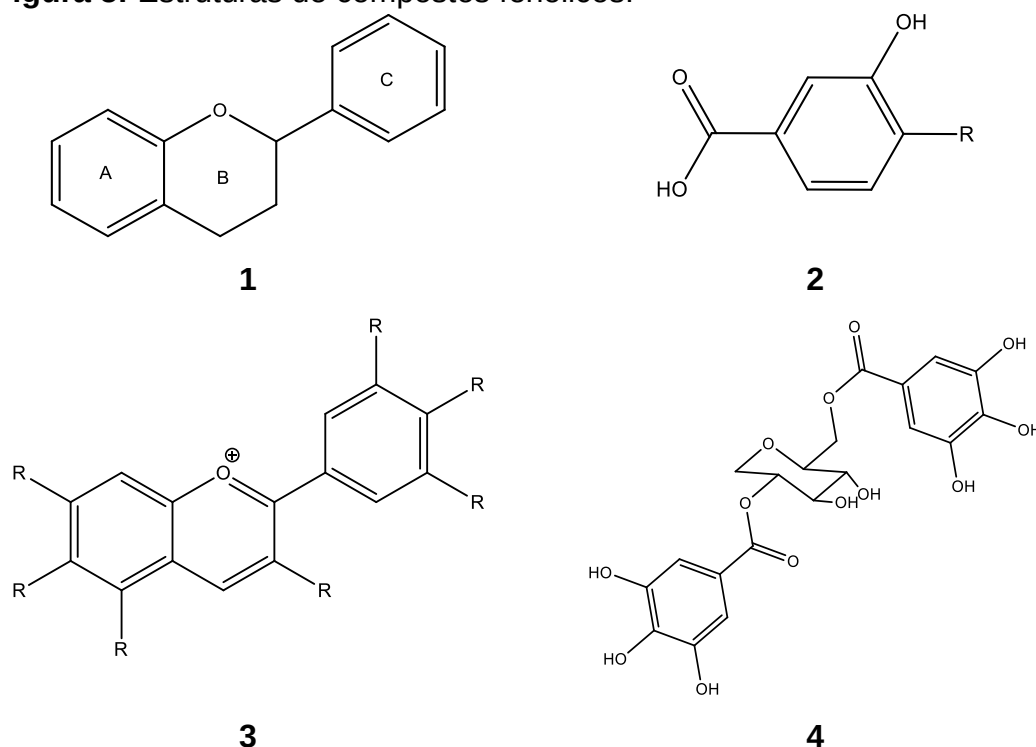
Um dos estudos utilizando esta metodologia foi realizado por Fraga e colaboradores [41], o qual demonstra a caracterização química por HRMS de compostos polares, provenientes de extratos da polpa e da casca da pitomba, fazendo uma relação com suas atividades antioxidantes. O estudo evidenciou que nos extratos estavam presentes derivados de ácidos fenólicos e flavonoides, como ácido caféico, ácido-*p*-cumárico, ácido chiquímico, rutina, quercetina e miricetina.

2.5 Compostos fenólicos bioativos

Os compostos presentes em plantas são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, têxteis, farmacêuticas e de fertilizantes. Os estresses sofridos pelas plantas, seja por alteração no índice de radiação UV, presença de pragas, mudanças nas condições climáticas, disponibilidade hídrica, dentre outros, levam a um estímulo que favorece a produção de algumas classes de compostos ou, até mesmo, uma substância específica [42].

Os compostos fenólicos são formados por classes de compostos que dispõem em seu esqueleto base fenol ou polifenóis, como por exemplo, os flavonoides (**1**), os ácidos fenólicos (**2**), as antocianinas (**3**) e os taninos (**4**) (Figura 5), entre outros, que são derivados da rota Biosintética do ácido Chiquímico [43, 44].

Figura 5: Estruturas de compostos fenólicos.



Compostos como flavonoides, cumarinas, taninos, possuem a propriedade de captura de radicais livres presentes nos organismos, atuando no meio celular nas reações redox. Assim, a partir do conhecimento da presença de compostos fenólicos na matriz vegetal em estudo, a avaliação da atividade

antioxidante dos seus extratos se torna uma alternativa interessante para estudos de atividades farmacológicas, uma vez que esta atividade está diretamente relacionada a diversos tipos de doenças [45, 46].

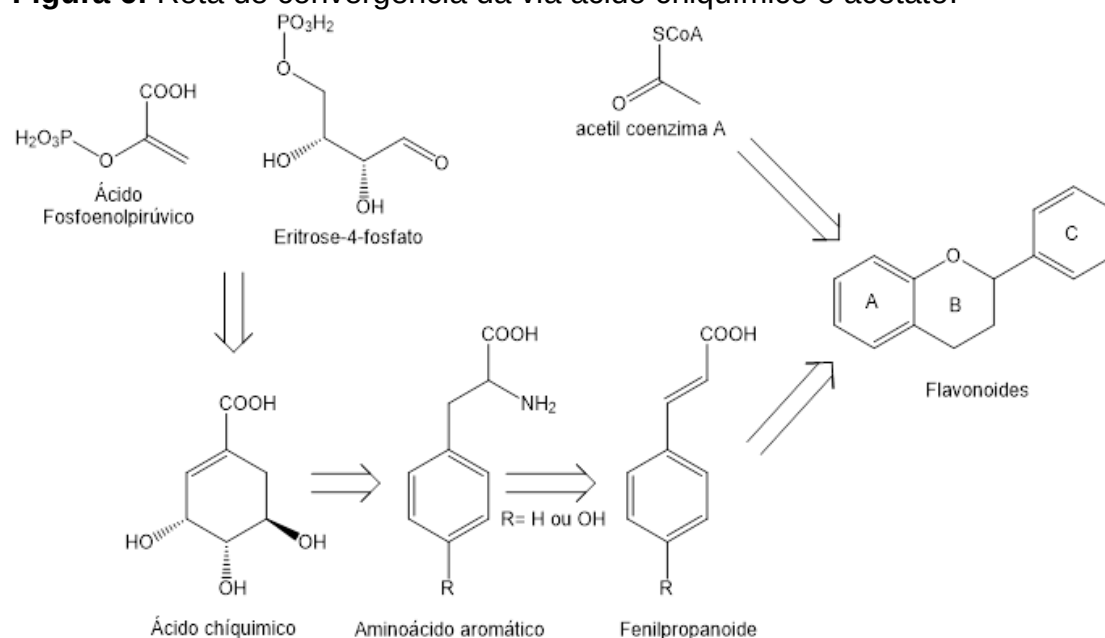
Os compostos fenólicos bioativos são todos aqueles que apresentam atividade contra uma série de patologias. Também são incluídos nesta categoria, aqueles que atuam como agentes antitumorais, inflamatórios, bacterianos, virais e parasitários [8, 47, 48], podendo ser usados como uma fonte direta no tratamento de alguma enfermidade, ou como produtos de partida para a síntese de fármacos, chamados assim de fitofármacos. Os derivados fenólicos representam muito bem esta classe, pois são detentores de um número muito grande de atividades biológicas [4].

2.6 Flavonoides

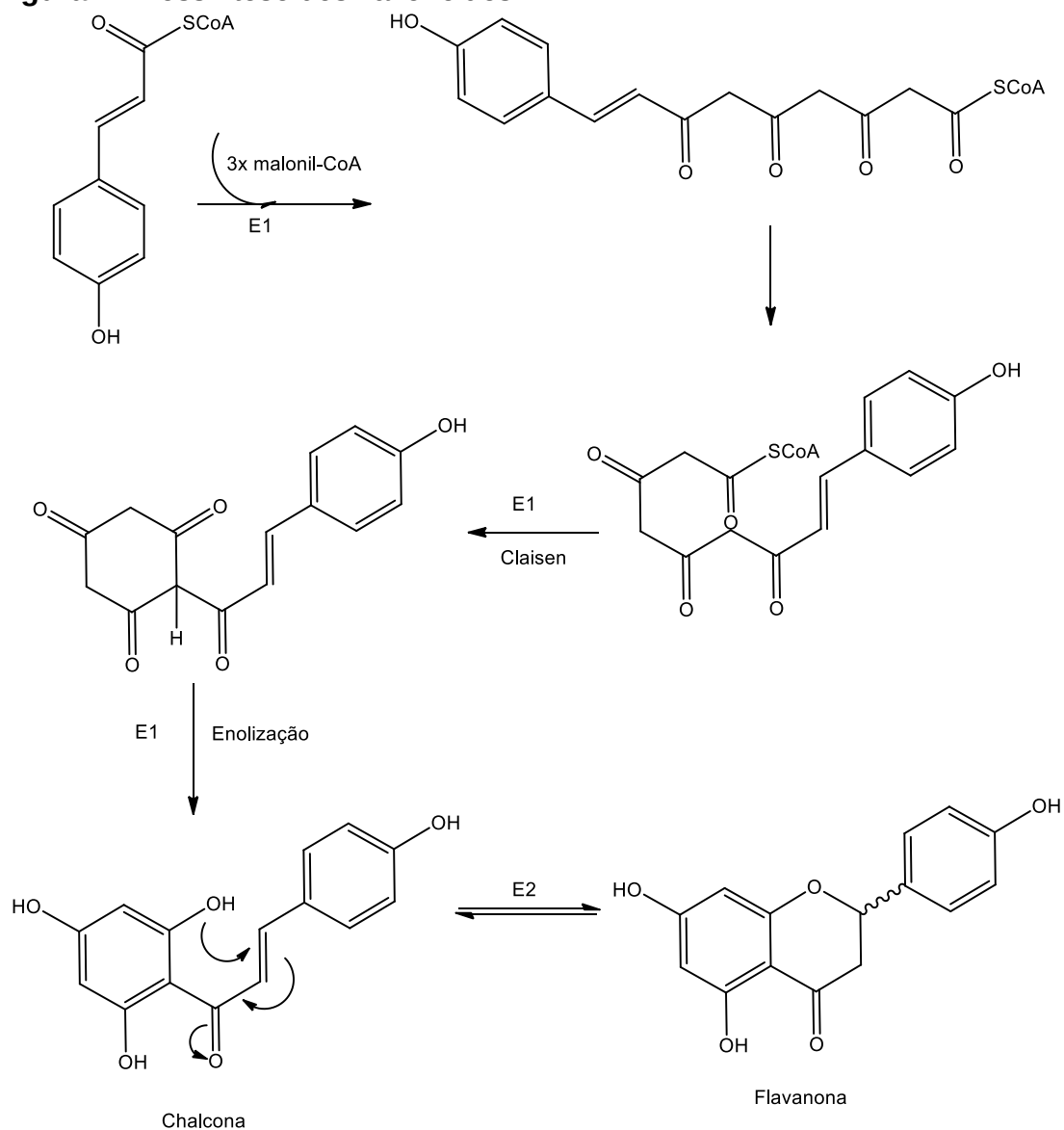
Os flavonoides compreendem uma das classes de compostos bioativos mais estudada, pois além da sua variedade estrutural apresentam diversas atividades farmacológicas. Esses metabolitos secundários são os principais moduladores fisiológicos presentes nas plantas, sua formação ocorre desde o plantio e sua função está intimamente ligada aos estímulos de defesa que as plantas possuem. Os flavonoides mais comumente encontrados nas plantas são os da subclasse das antocianinas, flavonóis, flavonas e proantocianidinas, cada uma delas associadas a um mecanismo específico de proteção das plantas, seja na filtração da radiação ultravioleta, presença de patógenos como fungos, ou em resposta ao ataque por herbívoros [49, 50].

A biossíntese dos flavonoides resulta na convergência de duas rotas biossintéticas, via do ácido chiquímico e a via do acetato. Os flavonoides são polifenois que possuem em seu esqueleto base dois anéis benzênicos, um identificado como anel A e o outro como anel C, e um heterocíclico identificado como anel B que se localiza interligando os anéis aromáticos (Figura 6) [51].

Figura 6: Rota de convergência da via ácido chiquímico e acetato.



A simples convergência destas duas rotas biossintéticas não é suficiente para a formação dos flavonoides, para isso outras reações são fundamentais para que esses compostos sejam produzidos no interior das plantas. A reação com três moléculas de malonil-CoA, na presença da enzima Chalcona sintase, favorece o aumento da cadeia por meio de grupos ésteres presentes na coenzima A, o que facilita uma série de reações de condensação e ciclização. A partir disso inicia a conversão do esqueleto base de fenilpropanoides ($\text{C}_6\text{-C}_3$) em chalcona ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$) para posterior ciclização do heterociclo através da enzima chalcona isomerase, formando a flavanona que é o esqueleto base dos flavonoides, como é exposto na Figura 7 [51].

Figura 7: Biossíntese dos flavonoides.

E1- Chalcona sintase
E2- Chalcona isomerase

A partir do esqueleto básico da flavanona são gerados vários derivados de flavonoides, por meio de reações enzimáticas que ocorrem no interior do material vegetal, como as reações de redução, oxidação, metilação, glicosilação, dentre outras. Por meios destas reações são gerados os diidroflavonois, flavonois, antocianinas, flavonas e outros derivados de flavonoides [51].

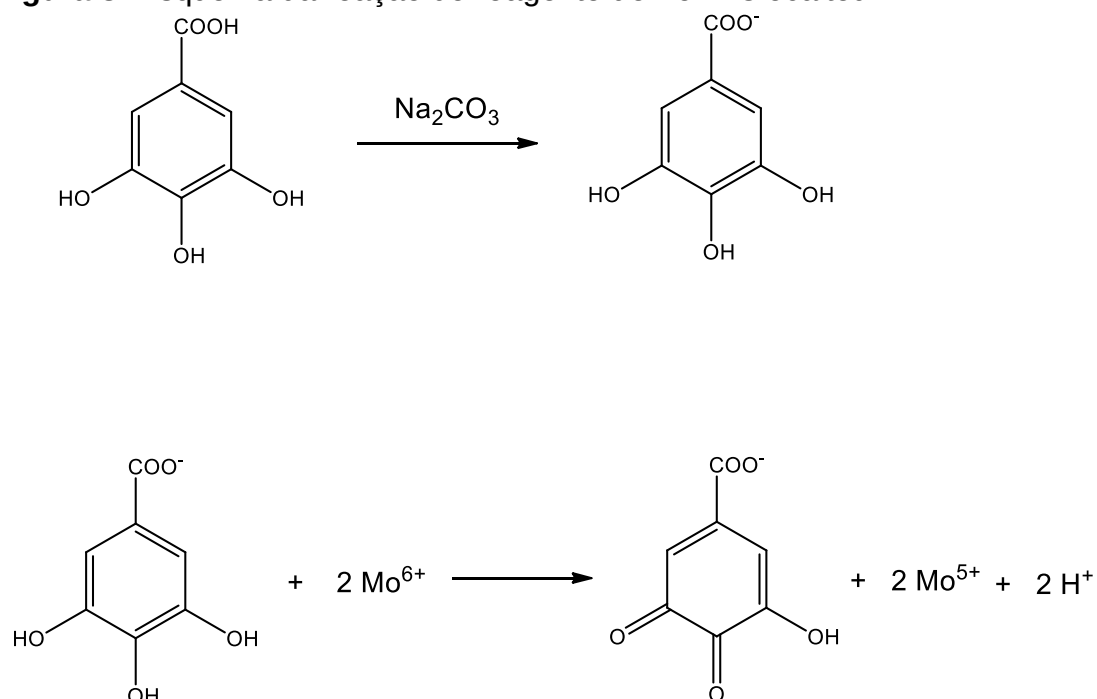
2.7 Determinação do teor de compostos bioativos

2.7.1 Teor de fenólicos totais

O teste com reagente de Folin-Ciocalteu é uma metodologia utilizada para determinar o teor de fenólicos totais em uma amostra. Trata-se de um ensaio colorimétrico que tem como finalidade a quantificação de espécies redutoras presentes em misturas complexas. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução que contém o ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e o ácido fosfomolibdínico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), que apresenta uma coloração amarela [52].

A reação para a quantificação das espécies redutoras, em sua maioria os compostos fenólicos, é realizada em meio alcalino, pois assim há formação do ânion fenolato, que tem o potencial de redução para os metais presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, transformando-os em óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) (Figura 8), apresentando uma tonalidade azul [52].

Figura 8: Esquema da reação do reagente de Folin-Ciocalteu



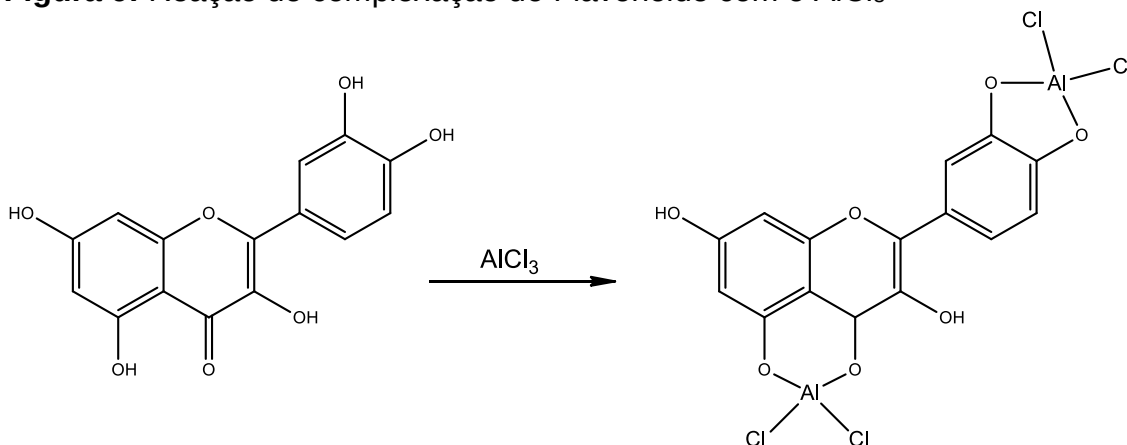
Assim, a quantificação dos compostos fenólicos é obtida a partir de uma relação direta dos dados obtidos por análise espectrofotométrica das amostras com a curva de calibração gerada a partir do padrão do ácido gálico [52].

2.7.2 Teor de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais presentes em uma matriz vegetal é determinada a partir das técnicas cromatográficas e espectrométricas. No entanto, o ensaio colorimétrico realizado por meio do método espectrométrico é atualmente o mais utilizado, tanto pelo baixo custo, quanto pela velocidade na obtenção dos dados. Para realizar a avaliação por meio desta técnica, é preciso submeter a matriz vegetal a uma reação de complexação com o Cloreto de Alumínio (AlCl_3) [53, 54].

A reação ocorre quando o íon Alumínio (III) se complexa com as moléculas de flavonoides presentes por meio da ligação O-Al-O, formando um quelato, como demonstra a Figura 9. Essa reação de complexação emite uma coloração amarelada, cuja a intensidade é diretamente proporcional a concentração de flavonoides no meio [54, 55].

Figura 9: Reação de complexação do Flavonoide com o AlCl_3

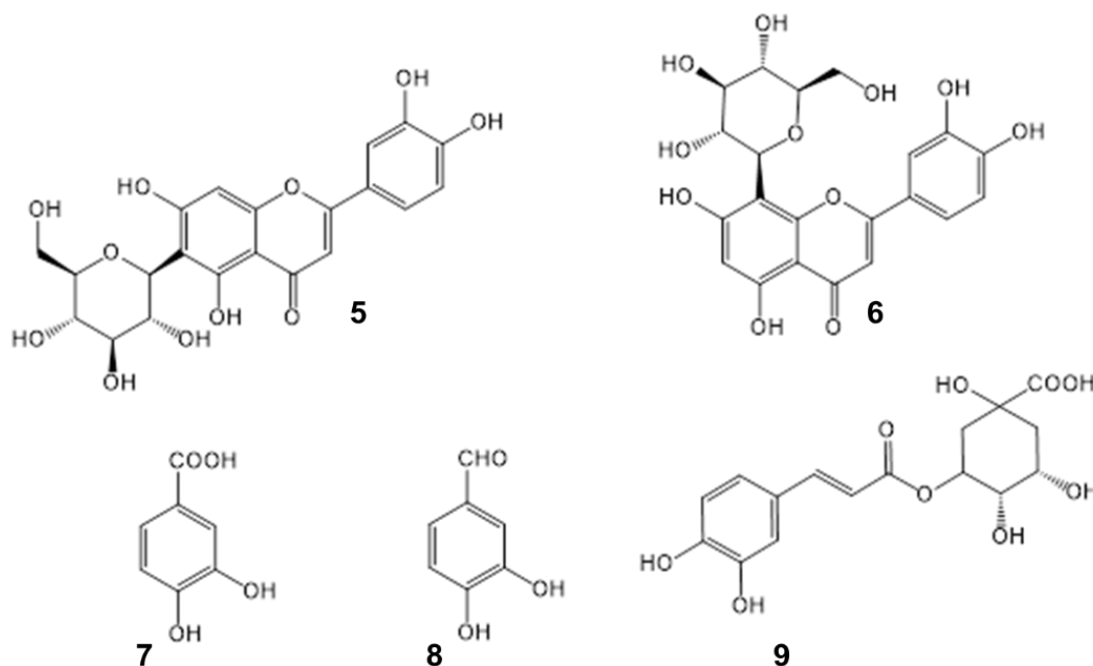


Os flavonoides estão diretamente relacionados a atividades antioxidantes descobertas em inúmeras plantas medicinais. Outros estudos também apontam que os flavonoides presentes em plantas são os responsáveis por atividades como antitumoral, acetilcolinesterase, antinociceptiva, antibacteriana entre outras [56].

2.8 Potencial terapêutico dos compostos fenólicos

Estudos mais recentes demonstram o potencial fitoterápico e fitofármaco dos compostos fenólicos. Kasangana e colaboradores [57], expuseram em seu trabalho que uma fração do extrato hidroalcoólico da espécie *Myrianthus arboreus* apresentou atividade antidiabética promissora, sendo comparada a insulina. Os autores indicam, através de fracionamentos bio guiados, que os compostos, representados na Figura 10 isoorientina (5), orientina (6), ácido protocatecúico (7), 3,4-di-hidroxibenzaldeído (8) e ácido clorogênico (9), são os responsáveis por essa atividade.

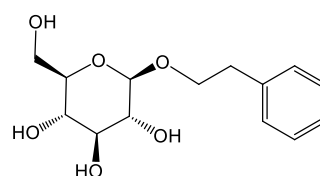
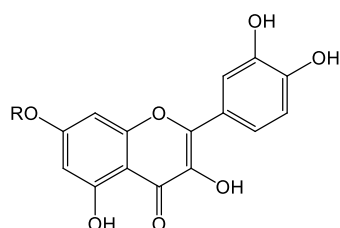
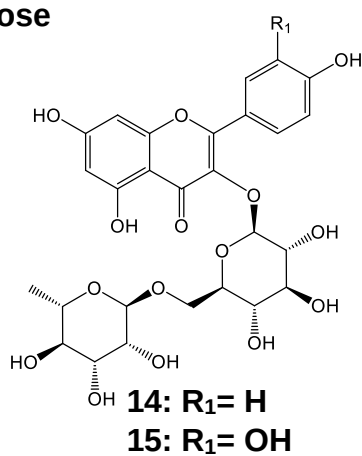
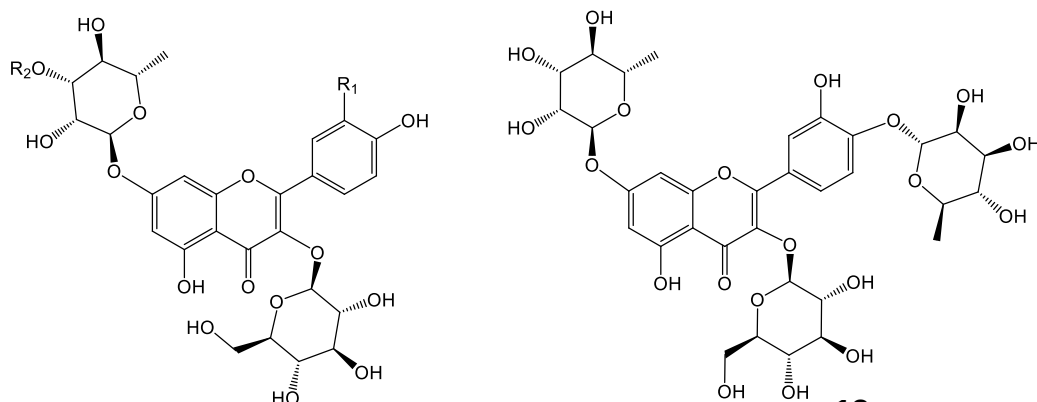
Figura 10: Compostos isolados da *M. arboreus* com atividade promissora antidiabética.



Schmitt e colaboradores [58], realizaram um estudo biologicamente guiado das flores da *Hippocrepis emerus*, com o objetivo de investigar as atividades antioxidantes da tirosinase e elastase. Para isso os pesquisadores realizaram o fracionamento do extrato metanólico, gerando frações de acetato de etila e *n*-butanol, sendo estas ativas frente aos testes biológicos. Os autores creditam estas atividades aos derivados de flavonoides glicosilados (10, 11, 13,

14, 15 e 17), não glicosilados (**12 e 16**) e ao derivado de um fenilpropanoide (**18**) isolados, mostrados na Figura 11.

Figura 11: Compostos isolados da *H. emerus* com atividades antioxidante, tirosinase e elastase promissoras.

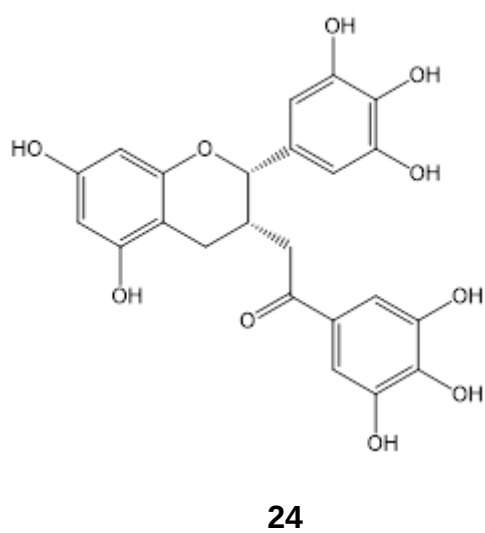
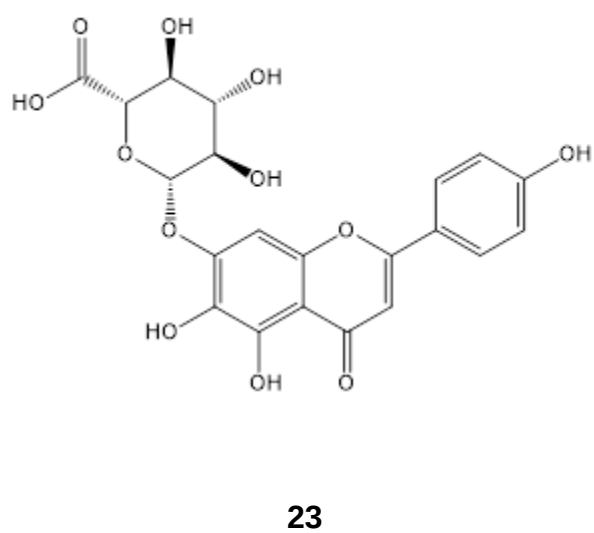
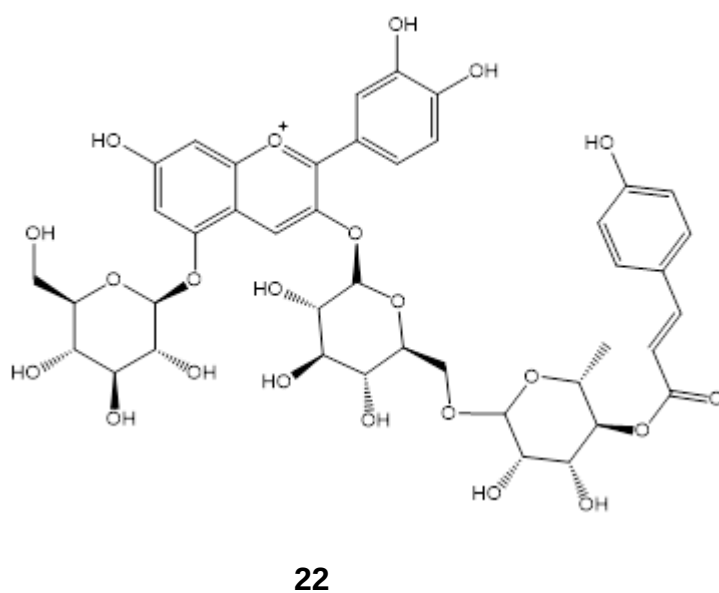
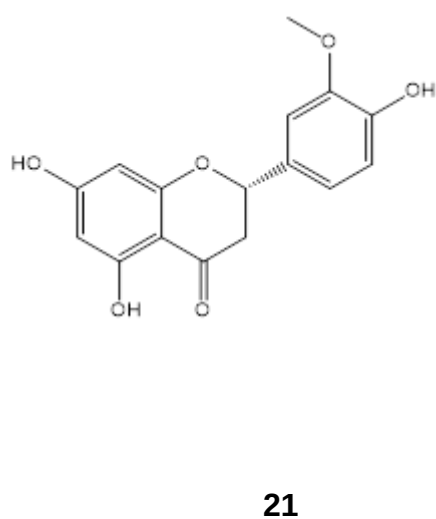
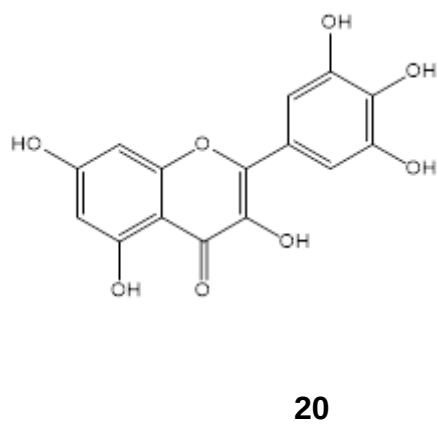
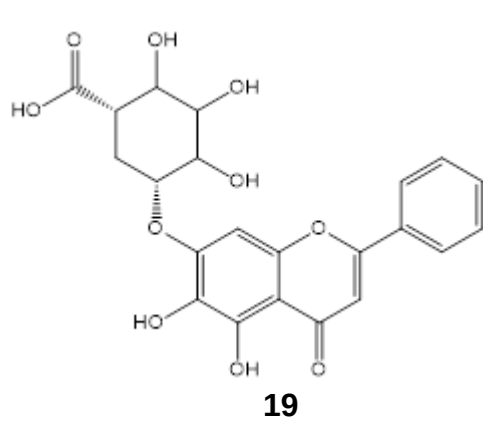


Os flavonoides compreendem uma das classes de metabólitos secundários que são constantemente estudados devido a sua capacidade

sinérgica com outras drogas sintéticas, ausência de toxicidade sistêmica e, também, por possuir uma propriedade de interagir com múltiplos alvos e interceptar diversas vias celulares, através de um efeito denominado de pleiotrópico [59].

O artigo de revisão elaborado por Russo e colaboradores [59] apresenta uma retrospectiva dos últimos 70 anos, descrevendo os flavonoides que apresentaram ações antivirais, tais como a quercetina (**19**), miricetrina (**20**), hesperetina (**21**), baicalina (**22**), escutellarina (**23**) e galato de epigallocatequina (**24**) (Figura 12). Todos eles demonstraram resultados positivos no combate a doenças virais que atingem o sistema respiratório, como é o caso do coronavírus. No mesmo artigo o autor relata dados experimentais datado do início dos anos 2000, onde utilizaram culturas dos vírus SARS-CoV demonstrando, em laboratório, a eficiência dos flavonoides frente as linhagens do coronavírus.

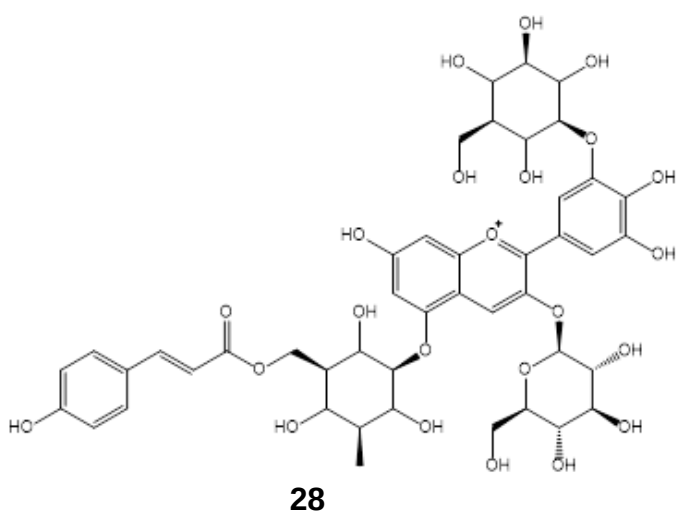
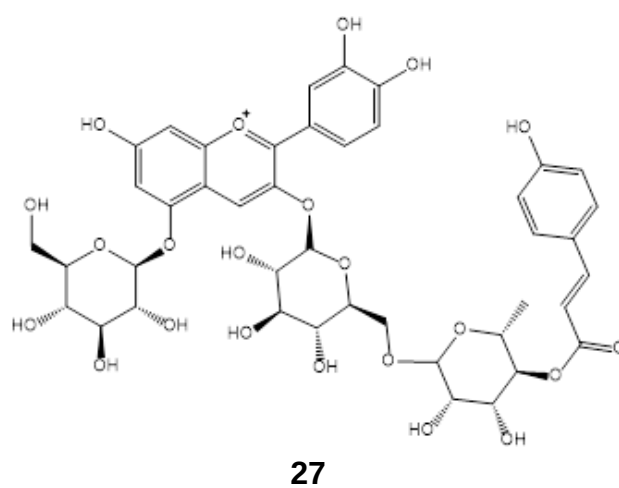
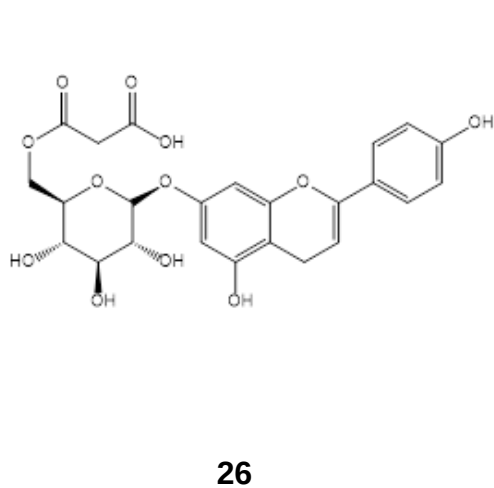
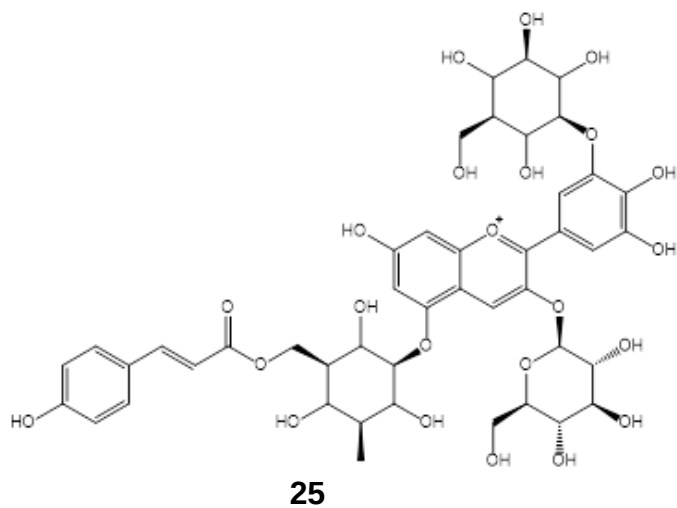
Figura 12: Flavonoides que apresentaram atividade frente a doenças respiratórias



Diante do cenário atual da pandemia da COVID-19, estudos de *docking* molecular demonstraram-se um importante aliado na produção científica para a promoção de novas terapêuticas para o combate desta enfermidade. Atualmente sabe-se que o SARS-CoV-2 possui RNA de fita simples como seu genoma e é capaz de produzir proteínas estruturais e não estruturais como a protease e a RNA – polimerase dependente do RNA, permitindo que os dois mecanismos proporcionem a clivagem da sua cadeia polipeptídica do vírus em várias proteínas não estruturais. Desta forma, os estudos envolvendo *docking* molecular promovem moléculas capazes de interagir com essas enzimas [59,60].

Neste estudo de *docking* molecular, Rameshkumar e colaboradores [60] demonstraram que os flavonoides albireodelfin (**25**), Apigenina 7- (6 " - malonilglucosídeo) (**26**), Cianidina-3- (*p*-coumaroil) -rutinosídeo-5-glucosídeo (**27**) e delfinidina 3-O-beta-D-glucosídeo 5-O - (6-coumaroil-beta-D-glucosídeo) (**28**) (Figura 13), apresentaram os melhores resultados quando submetidos aos testes *in silico* contra os alvos protéicos principais da SARS-CoV-2. Em paralelo os cinco flavonoides foram testados quanto ao seu poder mutagênico e sua capacidade citotóxica, não apresentando nenhum destes efeitos. Estes resultados indicam que esses compostos representam potenciais agentes fitoterápicos no combate ao novo coronavírus.

Figura 13: Flavonoides que apresentaram atividade promissoras contra o SARS-CoV-2 por meio de *docking* molecular



2.9 Atividades antioxidantes

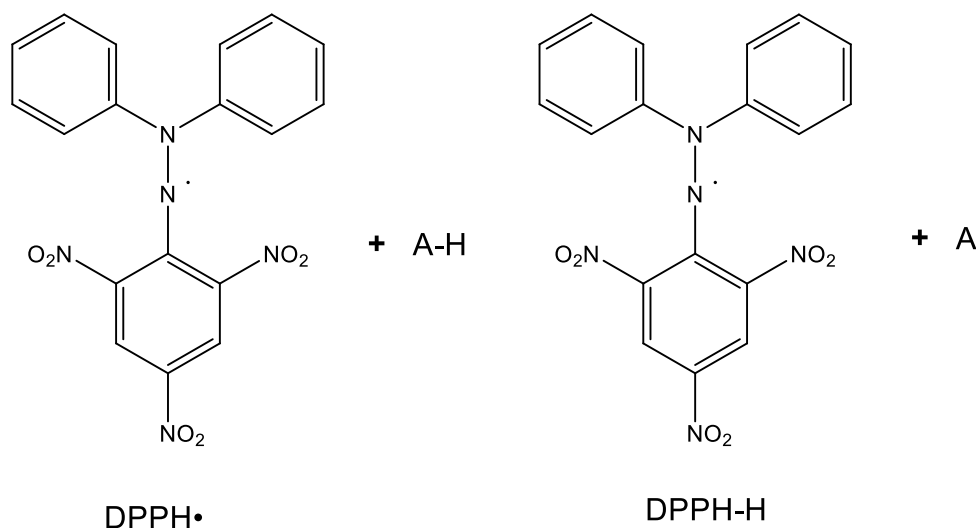
Todos os organismos vivos produzem compostos denominados de radicais livres, os quais são representados por compostos oxigenados ou nitrogenados, causando estresse oxidativo quando sua produção é excessiva. Esse efeito é responsável por uma série de patologias degenerativas devido aos danos causados nas células, como inflamações, doenças cardíacas, tumores, lesão hepática, diabetes entre outras [61, 62].

A respeito desta temática, pesquisadores reúnem esforços para investigar e determinar compostos que possuam atividade de inibição ao estresse oxidativo. Para isso diversos métodos para avaliar o potencial antioxidante das substâncias podem ser empregados para dimensionar a sua ação, como o ABTS [do inglês, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], DPPH (do inglês, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (do inglês, Ferric-Reducing Antioxidant Power), dentre outros. Cada metodologia apresenta mecanismos de ação diferentes e conseguem simular situações metabólicas presentes nos organismos vivos [62].

2.9.1 Radicais DPPH•

O método de radical livre estável DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), pode ser avaliado por meio da neutralização onde ocorre a transferência de elétrons, ou redução dos radicais quando há transferência do átomo de hidrogênio. A reação por meio da neutralização, que ocorre entre o reagente de DPPH• e a substância antioxidante, é a mais aceita devido a sua estabilidade, já que a reação de redução dos radicais ocorre de forma reversível, tornando-a mais instável (Figura 14) [63].

Figura 14: Esquema da representação da reação de transferência de elétrons do reagente de DPPH•

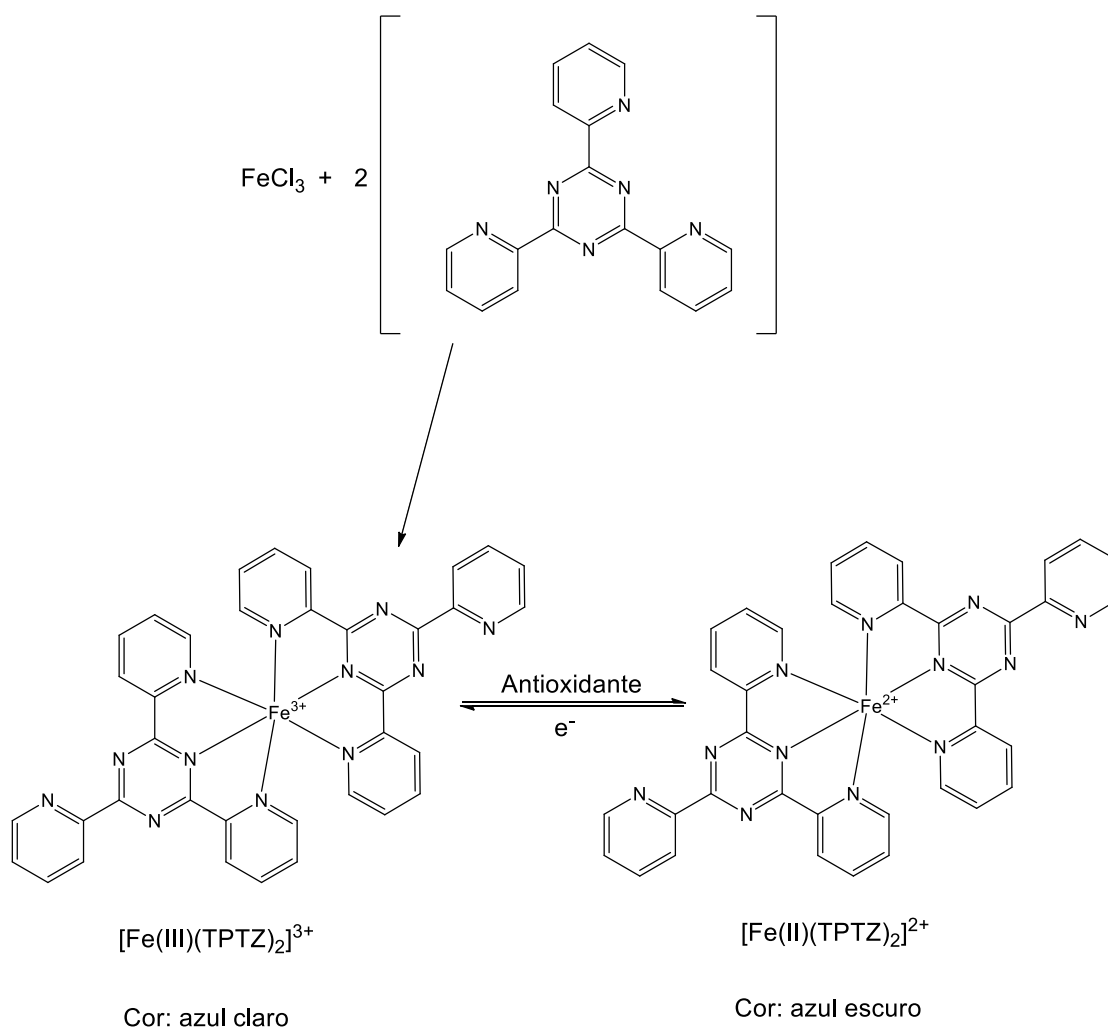


2.9.2 Ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP)

Para a avaliação da ação antioxidante de compostos naturais, o ensaio de determinação do poder de redução do íon ferro, conhecido como FRAP (do inglês, Ferric Reducing Antioxidant Power) baseia-se em uma reação eletroquímica de redução em que o reagente é formado por uma solução contendo cloreto férrico na presença do ligante TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina). Esta reação resulta na formação do complexo $[\text{Fe(III)} (\text{TPTZ})_2]^{+3}$, em uma tonalidade roxo claro (Figura 15) [64, 65].

Esse ensaio colorimétrico ocorre quando as substâncias com propriedades antioxidantes são submetidas a este meio reacional, favorecendo a redução do Fe^{3+} (íon férrico) em Fe^{2+} (íon ferroso), e pode ser determinado por meio da absorbância. Assim, quanto maior a absorbância maior será o poder em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} e, conseqüentemente, maior será seu potencial antioxidante [64, 65].

Figura 15: Esquema da representação da reação de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} do reagente de FRAP



2.10 Família Euphorbiaceae

Nos últimos anos estudos apontam que espécies da família Euphorbiaceae, composta por aproximadamente 6.300 espécies, distribuídas em 275 gêneros, é uma das mais importantes e mais utilizadas pela população [65-68]. Segundo o sistema desenvolvido por Webster, a família da Euphorbiaceae é composta por 5 subfamílias, Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae [69, 70]. No Brasil é calculado que 1.100 espécies de 72 gêneros, podem ser encontradas em todas as regiões brasileiras [43].

A família Euphorbiaceae foi por muito tempo, fonte de economia, principalmente nas indústrias farmacológicas, madeireira, alimentícia e na produção de ornamentos [67, 71]. As espécies que pertencem a essa família são conhecidas principalmente por atividades antidiarreicas, entretanto estudos comprovam a eficiência dessas espécies frente a outras patologias, destacando as espécies dos gêneros *Croton* L., *Euphorbia* L e *Jatropha* L [66, 71]

2.11 Gênero *Croton* L.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade, tendo a caatinga como um dos mais importantes biomas brasileiros. Apresenta-se como uma vegetação semi-árida que abrange nove estados em uma área de aproximadamente 850.000 Km². Esse ecossistema agrega diversas espécies animal e vegetal, dentre elas as espécies do gênero *Croton* L, com aproximadamente 1250 espécies já catalogadas, sendo o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae [68].

A maior concentração do gênero *Croton* L está presente em terras dos continentes americanos, em especial na América do Sul. O Brasil é o país que se destaca por conter o maior número de espécies, aproximadamente 350, e sua distribuição se concentra nas vegetações mais secas, como a caatinga o cerrado e o semiárido [42].

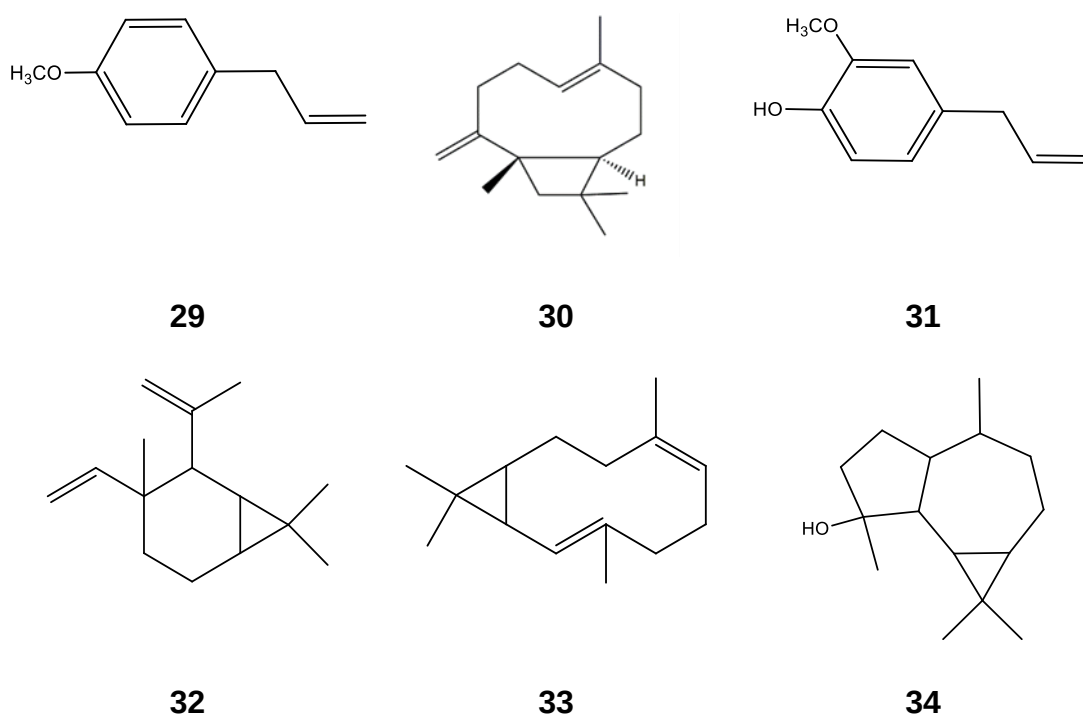
As espécies de *Croton* são amplamente utilizadas em medicinas alternativas para o tratamento de diversas enfermidades, principalmente distúrbios gastrointestinais, diabetes, reumatismo, inflamações e diarreia [72].

Estudos recentes creditam às espécies do gênero *Croton* L, atividade promissoras contra inúmeras doenças, por possuírem compostos bioativos em sua composição química, como diterpenos, alcaloides e derivados de compostos fenólicos: flavonoides, taninos e fenilpropanoides. No entanto, os compostos diterpenos clerodano representam a maioria dos compostos já identificados no gênero, com aproximadamente 800 compostos conhecidos [72].

O trabalho mais recente sobre espécies do gênero *Croton*, investiga a atividade anticâncer da espécie *Croton caudatus* [73], comprovando que os extratos etanoicos apresentam atividade promissora, com resultados próximos ao padrão Doxorubicina na apoptose celular.

As espécies do gênero *Croton* são bem conhecidas por suas atividades parasitárias e inseticidas. Nesse contexto, Ribeiro e colaboradores [74] apresentaram o estudo da atividade inseticida da *Croton rudolphianus* contra o *Sitophilus zeamais*, onde foi constatado que o óleo essencial extraído apresentava atividade promissora, que pode estar relacionada com a presença dos compostos voláteis majoritários, como: metil chavicol (**29**), (*E*)-cariofileno (**30**), eugenol (**31**), bicicloelemeno (**32**), biciclogermagreno (**33**), espatulenol (**34**), representados na Figura 16.

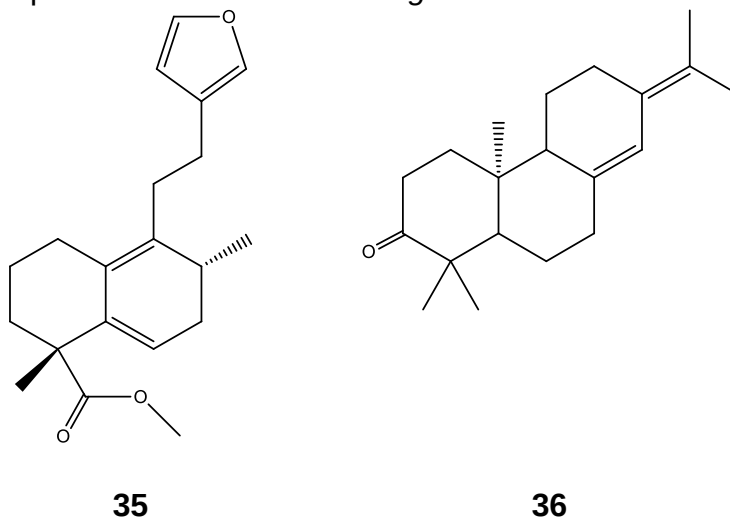
Figura 16: Estruturas dos compostos majoritários da *Croton rudolphianus*.



A composição química das espécies de *Croton* apresenta-se muito diversificada, sendo possível a detecção de compostos como diterpenos, flavonoides, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Afim de investigar essa variedade de compostos N.J. Sadgrove e colaboradores [75] estudaram os constituintes presentes no óleo essencial de *Croton gratissimus*, e realizaram o isolamento de dois diterpenos, denominados de éster gratissihalimanoico (diterpeno clerodano, **35**) e gratissimona **36**), mostrados na Figura 17. Os compostos isolados foram testados contra bactérias gram-positivas e gram-

negativas para determinar a atividade antimicrobiana, não sendo possível a observação de atividade positiva.

Figura 17: Compostos isolados da *Croton gratissimus*.



Vários grupos de pesquisa na Universidade Federal de Sergipe exercem um papel imprescindível no desenvolvimento e difusão de estudos relacionados a investigação química, biológica e farmacológica de espécies de plantas medicinais do território sergipano. Dentre estes estudos pode-se mencionar os referentes ao gênero *Croton*, em particular os que envolve a espécie *Croton argyrophyllus*.

Os estudos desta espécie são geralmente relacionados com a composição química do seu óleo essencial, como o estudo desenvolvido por Ramos e colaboradores [76]. Neste trabalho, o objetivo foi conhecer a composição química do óleo essencial a partir das folhas frescas da espécie *Croton argyrophyllus* e avaliar sua atividade anti-inflamatória. A caracterização química por CG-EM permitiu identificar 42 compostos voláteis, dentre eles os majoritários biciclogermacreno (14,60%), espatuleno (8,27%), (*E*)-cariofileno (6,79%), β -elemeno (6,19%), β -felandreno (5,75%), mirceno (4,81%) e óxido de cariofileno (3,68%)

Em outro estudo, realizado em 2014 por Araújo e colaboradores [77] investigou-se a composição química do óleo essencial da espécie *Croton argyrophyllus* e seu efeito frente a atividade citotóxica. Desta forma, 24 compostos foram determinados por meio de CG-EM, sendo que 12,31% foram

monoterpenos e 85,06% sesquiterpenos. Também foram identificados os seguintes constituintes majoritários, biciclogemagreno (27,78%), δ -elemeno (8,67%), β -elemeno (8,50%), prenopsan-8-ol (8,50%), *E*-cariofilleno (6,27%), *trans*-dauca-4(11),7-dieno (5,97%) e espatulenol (4,83%). O óleo apresentou atividade citotóxica frente aos macrófagos murinos com concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Em 2018, Amaral e colaboradores [78] estudaram o óleo essencial desta espécie realizando também a determinação de suas atividades antioxidante e antitumoral, onde sugeriram que a presença de monoterpenos e sesquiterpenos contribuem para as atividades testadas, demonstrando atividades promissoras em relação aos padrões de controle. Em particular, o óleo apresentou atividades mais pronunciadas para duas células tumorais, a SF-295 e OVCAR-8, glioblastoma e câncer de ovário, respectivamente.

As espécies do gênero *Croton* apresentam diversos estudos correlacionando sua composição química com as atividades biológicas e farmacológicas, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Estudos sobre espécies de *Croton* que apresentam potenciais biológicos e farmacológicos.

Espécie	Estudo científico	Referência
<i>C. blanchetianus</i>	Atividade antibacteriana	[79]
<i>C. floribundus</i> Spreng	Atividade anti-inflamatória	[80]
<i>C. conduplicatus</i> , <i>C. pulegioidorus</i> e <i>C. grewioides</i>	Atividade parasitária e larvívica	[81]
<i>C. rhamnifolioides</i>	Atividade anti-inflamatória	[82]

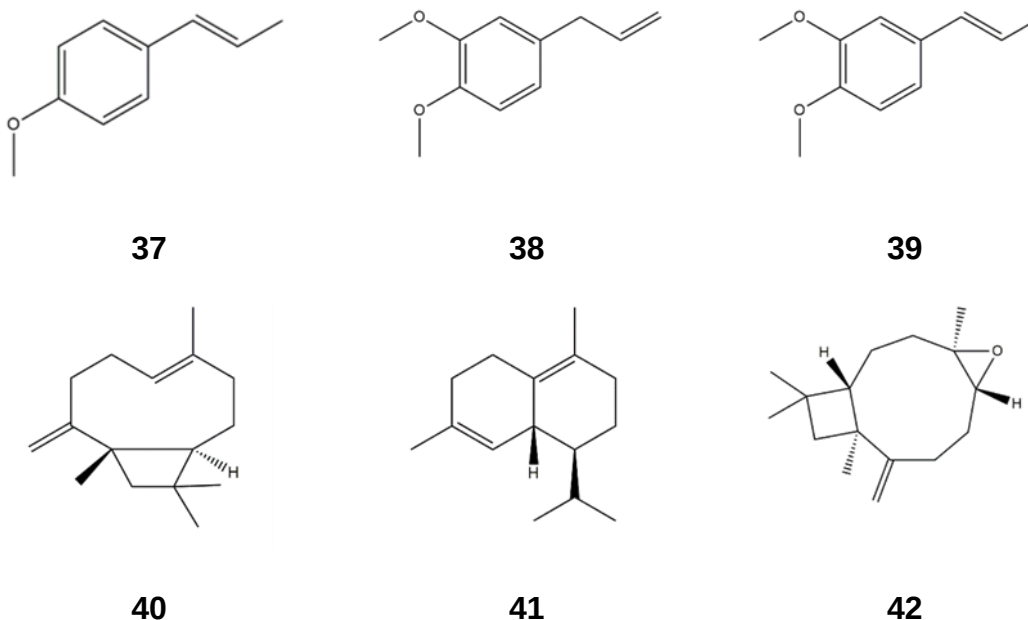
2.12 A espécie *Croton grewioides*

Nos últimos anos o gênero *Croton* está sendo extensivamente estudado por pesquisadores que buscam entender o seu potencial fitoterápico, devido as

atividades encontradas, sejam elas farmacológicas ou biológicas, como a descoberta de três novos epóxi-clerodanos [83], cujo derivados furanoditerpenoides apresentam importantes atividades como, atividade anti-inflamatória [84], anti-câncer [85] e antiviral [86]. Além destes, destacam-se os alcaloides e flavonoides que apresentaram atividades antiviral contra o HIV [87], antiprotozoária [88] e anti-inflamatórias [89].

Há poucos estudos relatados na literatura sobre a espécie *Croton grewioides*. No entanto, o seu primeiro estudo foi a investigação da atividade biológica do óleo essencial das folhas e caules para determinar sua composição química e avaliar a ação inseticida. Foram identificados os constituintes (*E*)-anetol (**37**), metil eugenol (**38**), (*E*) metil isoeugenol (**39**), β -cariofileno (**40**), δ -cadineno (**41**) e óxido cariofileno (**42**) (Figura 18). Os óleos essenciais obtidos das folhas e caules apresentaram atividade inseticida, porém com um efeito maior de mortalidade para o óleo proveniente das folhas com 95% contra 70% para o do caule [90].

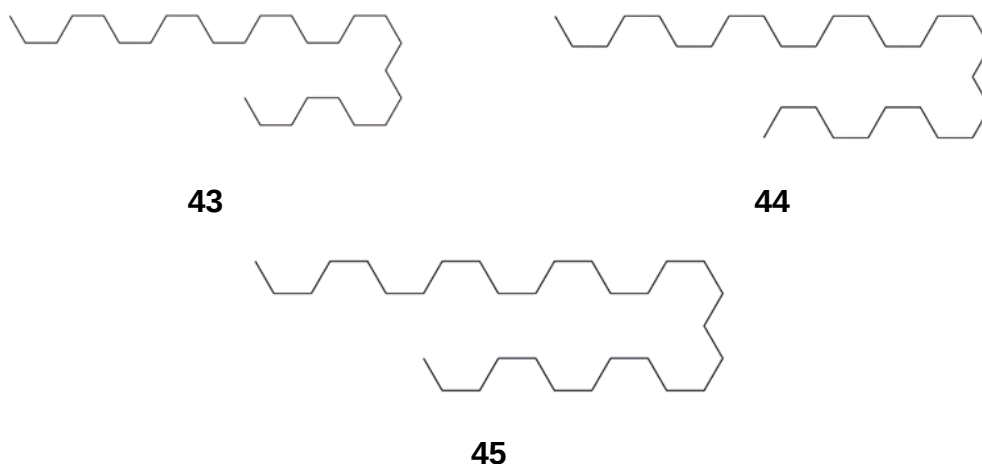
Figura 18: Compostos identificados do óleo essencial de *C. grewioides*.



Em um estudo subsequente realizado por Costa Filho e colaboradores [91], foram avaliados os marcadores quimiotaxonômicos de n-alcenos em várias plantas do gênero *Croton* L. e uma delas, a *C. grewioides*, apresentou alcanos

de C₂₃ a C₃₃ como marcadores químicos. Dentre eles, o mais significativo em termos percentuais foram C₂₇ (12,9%) **43**, C₂₉ (43,0%) **44** e C₃₁ (17,0%) **45**, mostrados na Figura 19.

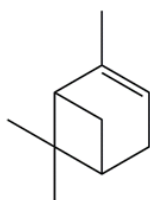
Figura 19: Marcadores quimiotaxonômicos de n-alcanos encontrados em *C. grewioides*.



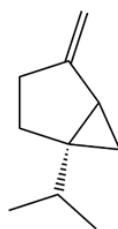
Silva e colaboradores [92] investigaram a atividade antidiarreica do extrato metanólico de *C. grewioides*, com base na quimiotaxonomia do gênero. Os resultados mostraram que os testes realizados via oral não apresentaram atividade significativa, porém o extrato administrado por intraperitoneal em camundongos fêmea, apresentou resultado positivo para esta atividade.

Medeiros e colaboradores [93] investigaram o efeito de modulação da resistência bacteriana do óleo essencial e do seu principal componente, o α -pineno. O óleo indicou a presença do α -pineno (47,43%) **46**, sabineno (12,09%) **47**, limoneno (7,98%) **48**, biciclogermacreno (5,69%) **33**, *trans*-cariofileno (5,51%) **49** e o germacreno D (4,96%) **50**, mostrados na Figura 20. O efeito modulador apresentou resultados positivos tanto para o óleo essencial como para o α -pineno sendo 64 e 32 vezes mais potentes, respectivamente, do que o padrão Tetraciclina.

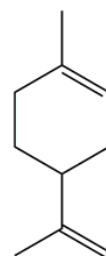
Figura 20: Composição química do óleo essencial de *C. grewioides*.



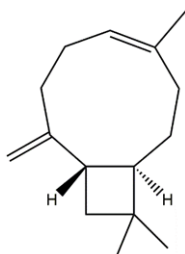
46



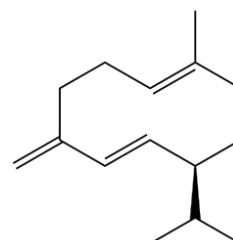
47



48



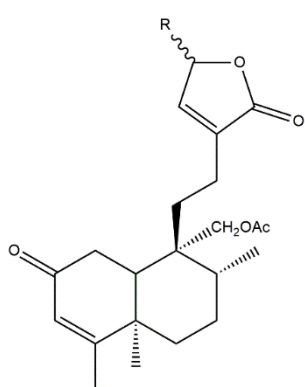
49



50

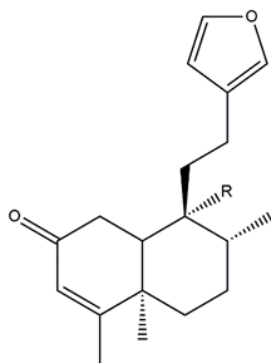
A investigação sobre a composição química do extrato etanólico de *C. grewioides* feita por Medeiros [94], mostrou a elucidação de treze compostos inéditos na espécie. Foram identificados *ent*-2-oxo-cleroda-3,13-dien-15 α ,16-olideo-21-ato (grewiona A) **51**, *ent*-2-oxo-cleroda-3,13-dien-15 β ,16-olideo-21-ato (grewiona B) **52**, velamona **53**, velamolona **54**, ácido grewioico **55**, 2-oxo-5 α ,8 α -cleroda-3,13-dien-15,16-olideo **56**, ácido patagônico **57**, ácido caurenoico (ácido *ent*-caur-16-en-19-oico) **58** e *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico **59**; três derivados fenólicos, ferulato de octila **60**, metil eugenol **61**, 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona **62** e um derivado de esteroide, estigmast-4-en-3-ona **63**, representados na Figura 21.

Figura 21: Composição química do extrato metanólico de *C. grewoides*.



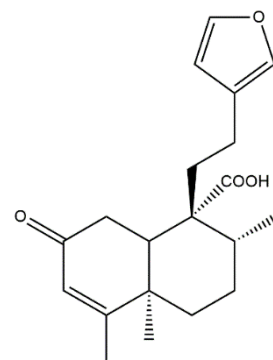
51: R= α OH

52: R= β OH

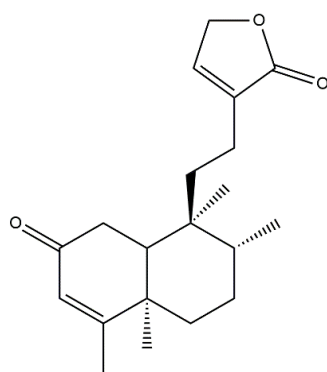


53: R= Me

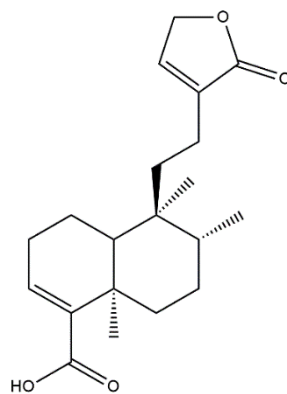
54: R=CH₂OH



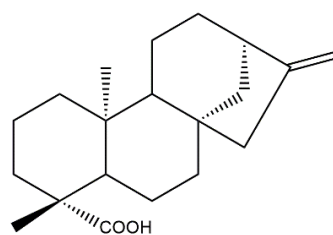
55



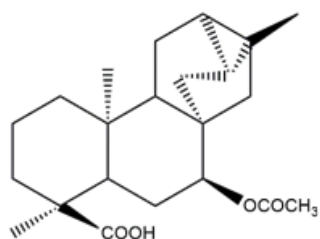
56



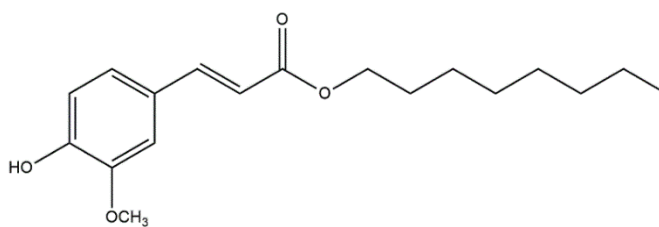
57



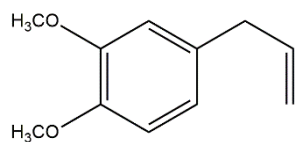
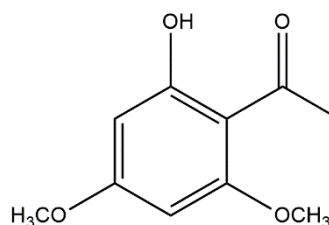
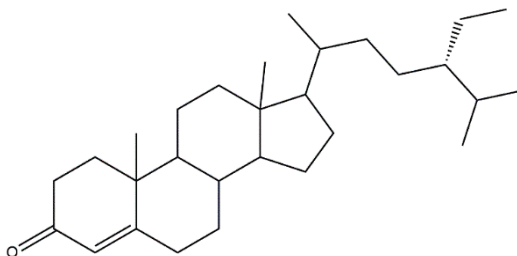
58



59

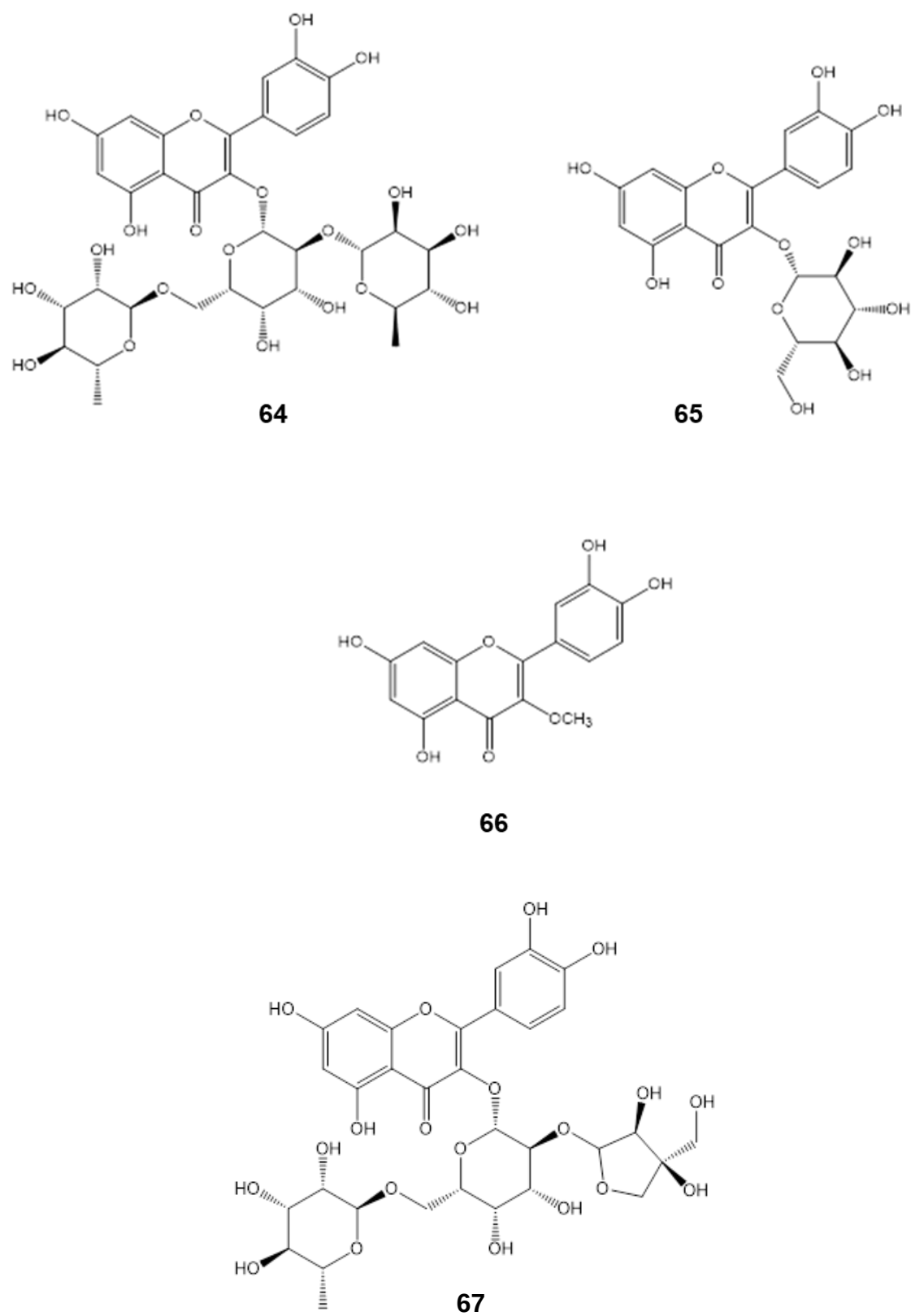


60

**61****62****63**

O último estudo a respeito de *C. grewoides* foi relatado por Prado e colaboradores [32] em nosso grupo de pesquisa. Foi feita a análise de *fingerprint* cromatográfico juntamente com a quimiometria (PCA, do inglês Principal Component Analysis), isolamento e caracterização de quatro constituintes fixos do extrato aquoso (decocção), onde foram identificados a quercetina-3-O-[α -ramnopiranosil-(1-2)- α -ramnopiranosil-(1-6)- β -glicopiranosídeo] **64**, quercetina-3-O-glicosídeo **65** e quercetina-3-O-metil **66** e o 3-O- β -D-galactopiranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -apiopyranoside-(1 $\rightarrow$ 6)- α -L-rhamnopyranoside (Figura 22). Foram investigadas, também, a ação antitumoral frente a duas células antitumorais, HepG2 e HL-60, e frente a enzima acetilcolinesterase. Os extratos brutos não foram eficazes frentes aos testes, porém quatro frações hexânicas se mostraram ativas frente as células HL-60, com uma inibição acima de 80%.

Figura 22: Compostos isolados do extrato aquoso de *C. grewoides*.



O isolamento destes compostos de extrema relevância científica associado ao pouco relato na literatura sobre os constituintes fixos desta espécie, nos motivou a continuar o estudo em busca de uma metodologia de extração mais eficiente, com a finalidade de se obter estes e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico, contribuindo ainda mais para o conhecimento dos compostos polares desta espécie.

3 Objetivo

3.1 Geral

- ✓ Realizar a otimização do processo de extração de compostos fenólicos através de extração assistida por ultrassom e micro-ondas a partir da espécie *C. grewioides*, utilizando métodos quimiométricos e avaliar as atividades farmacológicas e biológicas.

3.2 Específicos

- ✓ Otimizar as metodologias de extrações (EAM, EAU) com a finalidade de obter o maior teor de compostos fenólicos em comparação a metodologia convencional.
- ✓ Obter os perfis cromatográficos de cinco acessos de *C. grewioides* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).
- ✓ Realizar testes de atividade antioxidante para cada extrato obtido, utilizando os ensaios FRAP e DPPH.

4 Metodologia

4.1 Equipamentos, Materiais e Reagentes

- Estufa de Circulação forçada – Marconi (MA 035, Piracicara, SP, Brasil)

- Balança analítica – modelo APX-200 da marca Denver Instrument Company
- Solventes: Acetonitrila (Tedia, Fairfield, OH, EUA); metanol (J.T. Baker, Philipsburg, PA, EUA) grau analítico e CLAE; Ácido fórmico 88% (v/v) (J.T. Baker Philipsburg, PA, EUA) grau analítico; Etanol (NEON, Susano, SP) grau analítico.
- Água deionizada – MILLI-Q (Millipore, São Paulo, SP, Brasil)
- Colunas cromatográficas – Coluna KINETEX® (5µm, 25,0 x 0,46 cm, Phenomenex);
- Rota evaporador R-3, Buchi.
- Mini centrífuga modelo mini spin (Eppendorf AG Hamburg- Alemanha).
- Cartucho de SPE C₁₈ com volume de 1 mL e coluna de 100 mg, da marca J.T. Baker (40 µm APD, 60A).
- Bomba a vácuo DIAPUMP® (FANEM, SP, Brasil) acoplada a um Manifold a vácuo de 12 portas.
- Banho ultrassônico - Elma® (Elmasonic P 60 H).
- Micro-ondas - Milestone NEOS-GR® Microwave Gravity Station.5.
- Reagentes: Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil); DPPH (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha).
- Liquidificador doméstico - Britânia (Eletronic pro 2 em 1).
- Cromatógrafo Líquido - SHIMADZU (Quioto, Japão), modelo Prominence, composto por: sistema binário de bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A3, auto injetor SIL-20AHT, detectores espectrofotométricos UV-Vis com arranjo de diodos SPD-M20A e ELSD conectado a uma interface CBM- 20A e forno de colunas CTO-20A.
- Peneira para análise granulométrica – Bertel (Caieiras, SP, Brasil).
- Ultrafreezer – Liotop UFR30 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil).
- Liofilizador de bancada – Liotop L101 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil).
- Exactive HCD Plus (Thermo Scientific, Bremen, Germany); analisador Orbitrap; fonte de ionização Ion Max API com probe HESI (do inglês *Heated Electrospray Ionization* – HESI); modo de infusão direta

utilizando uma bomba de seringa modelo Fusion 101 (Chemyx, Stafford, TX) com uma seringa de 500 µL (Thermo Scientific, NJ, EUA)

4.2 Material botânico

As folhas de cinco acessos (104, 106, 107, 112 e 120) de *Croton grewioides*, SisGen nº A8CCB3B, (Figura 23A) foram coletadas no Campus Sertão da Universidade Federal de Sergipe em Nossa Senhora da Glória no dia 08 de agosto de 2019. A localização geográfica de origem de cada acesso coletado é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos acessos de *C. grewioides* de acordo com os municípios de origens e dados georreferenciais

Acesso	Origem (Município, Estado, País)	Dados georreferenciados
104	Poço Verde, Sergipe, Brasil	S 10°55'17.8" W 37°06'04.1"
106	Poço Redondo-Serra da Guia, Sergipe, Brasil	S 09°58'06.5" W 37°51'48.4"
107	Poço Redondo-Serra da Guia, Sergipe, Brasil	S 09°58'06.5" W 37°51'48.4"
112	Poço Redondo-Serra da Guia, Sergipe, Brasil	S 09°58'06.9" W 37°51'49.1"
120	Poço Redondo-Serra da Guia, Sergipe, Brasil	S 09°58'06.9" W 37°51'49.1"

O material foi seco em estufa de circulação forçada à 50 °C durante 89 horas e, posteriormente, trituradas em um liquidificador doméstico. A separação do material triturado foi feita utilizando uma peneira granulométrica, separando-os em duas granulometrias distintas (Figura 23B), uma com um “range” 30 a 60 mesh e a outra com valor maior do que 60 mesh.

Figura 23: (A) Foto da espécie *Croton grewiioides* no Campus do Sertão, (B) Acondicionamento das folhas trituradas e separadas por granulometria.



(A)



(B)

4.3 Planejamento experimental para os processos de extração

As otimizações dos processos de extração foram realizadas através de planejamentos experimentais 2^3 , obtendo como resposta o teor de fenólicos. O acesso 106 foi escolhido para os ensaios, por ter sido possível obter uma maior quantidade de massa de suas folhas. A comparação do efeito de cada extração para diminuir o efeito de matriz, foi feito utilizando a proporção matriz/solvente (g/mL) fixada em 1g/15 mL. Os parâmetros distintos de cada técnica foram modificados para avaliar a suas respectivas influências sobre os extratos.

4.3.1 Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)

Para o processo de otimização da EAM (Figura 24) foi utilizado 1g das folhas do acesso 106 e extraído com 15 mL da solução extratora, de composição variável (50% e 20%) de etanol:água (Tabela 4). Para a execução do planejamento experimental do tipo 2^3 , parâmetros como composição do solvente, tempo e potência foram variados.

O planejamento experimental foi realizado em duplicata para cada ensaio, dando origem a 16 ensaios. Para a validação do processo de otimização, os

experimentos foram realizados em ordem aleatória, como está representado na Tabela 4.

Tabela 4: Condições para a realização do planejamento experimental 2^3 para a EAM.

Variáveis		Superior (+)	Inferior (-)
<i>Comp. Solvente</i>		50%	20%
<i>Tempo</i>		10 minutos	5 minutos
<i>Potência</i>		600 Watts	300 Watts

Experimentos		Variáveis		
<i>Ensaio</i>	<i>Ordem</i>	<i>Solvente (%)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Potência (W)</i>
1	9°, 11°	20	5	300
2	8°, 14°	50	5	300
3	5°, 10°	20	10	300
4	2°, 7°	50	10	300
5	15°, 16°	20	5	600
6	3°, 11°	50	5	600
7	4°, 6°	20	10	600
8	1°, 12°	50	10	600

Figura 24: Equipamento de micro-ondas utilizado para as extrações.



4.3.2 Extração Assistida por Ultrassom (EAU).

As extrações via EAU (Figura 25) foram realizadas também seguindo o planejamento do tipo 2^3 . Assim, para o processo de otimização 1g das folhas do acesso 106 foi extraído utilizando 15 mL do solvente extrator composto pela mistura etanol:água nas proporções 50% e 20% (Tabela 5).

A partir das escolhas das variáveis, o planejamento experimental foi feito em triplicata apenas para os experimentos do ponto central, gerando 11 experimentos no total, os quais foram realizados em ordem aleatória, como está representado na Tabela 5.

Tabela 5: Condições para a realização do planejamento experimental 2^3 para a EAU.

Variáveis		Superior (+)	Inferior (-)
<i>Comp. Solvente</i>		50%	20%
<i>Tempo</i>		10 minutos	5 minutos
<i>Potência</i>		90%	30%

Experimentos		Variáveis		
<i>Ensaio</i>	<i>Ordem</i>	<i>Solvente (%)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Potência (%)</i>
1	9°	20	5	30
2	5°	50	5	30
3	7°	20	10	30
4	1°	50	10	30
5	11°	20	5	90
6	10°	50	5	90
7	2°	20	10	90
8	4°	50	10	90
PC-1	3°	35	7,5	60
PC-2	8°	35	7,5	60
PC-3	6°	35	7,5	60

Figura 25: Equipamento de ultrassom utilizado nas extrações.



4.4 Preparação dos extratos

Os extratos de todos os acessos de *Croton grewoides* obtidos por EAU e EAM, utilizando a razão matriz vegetal/solvente (1 g:15 mL) foram preparados de acordo com os parâmetros demonstrados na Tabela 6. Os extratos foram filtrados utilizando um sistema a vácuo (Figura 26A) para, em seguida, serem rotaevaporados até a remoção do etanol. Posteriormente, o material foi congelado em ultrafreezer à -80 °C durante 12 horas e liofilizados por 72 horas à -50 °C sob uma pressão abaixo de 500 μ mHg (Figura 26B). Todos os extratos obtidos foram, subsequentemente, mantidos em freezer até que suas análises fossem realizadas.

Figura 26: (A) Filtração à vácuo e (B) Liofilização dos extratos obtidos por EAU e EAM.



A



B

Tabela 6: Condições ótimas para a extração de todos os acessos de *Croton grewoides* para as metodologias de EAU e EAM.

Acessos	EAU			EAM		
	Solvente (%)	Tempo (minutos)	Potência (%)	Solvente (%)	Tempo (minutos)	Potência (watts)
104	20	10	90	50	10	600
106	20	10	90	50	10	600
107	20	10	90	50	10	600
112	20	10	90	50	10	600
120	20	10	90	50	10	600

4.5 Preparo das Amostras para Análise Cromatográfica

4.5.1 Extração em Fase Sólida (SPE- Solid Phase Extraction)

Todos os extratos hidroalcoólicos foram submetidos ao processo de “clean-up” (limpeza) por extração em fase sólida (SPE) antes das análises por Cromatografia Líquida. Para isso, foram dissolvidos 10 mg dos extratos em 1 mL de uma solução 1:1 etanol:água, obtendo uma solução na concentração de 10 mg/mL. A solução foi agitada por alguns segundos e centrifugada a 13300 rpm (11866 força G) por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e utilizado para o procedimento de limpeza.

Para o procedimento de “clean-up” o cartucho foi condicionado com 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de água. Posteriormente, foi adicionado ao cartucho 1 mL da solução do extrato (10 mg/mL) a qual foi eluída sequencialmente com 1 mL das soluções: 50% MeOH:H₂O e 100% MeOH, gerando duas frações.

4.5.2 Condições Analíticas do Perfil Cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna analítica Kinetex C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex), temperatura do forno da coluna de 25°C e detecção espectrofotométrica em $\lambda = 320$ nm. As amostras

foram analisadas utilizando um sistema de eluição gradiente em modo reverso, com fase móvel constituída por ACN (B) e solução de ácido fórmico 0,5% (v/v) (A), com a seguinte inclinação: 5 a 15% (B) por 8 minutos, 15 a 19% (B) por 15 minutos, 19 a 24% (B) por 10 minutos, isocrático em 24% (B) por 20 min, 24 a 100% (B) por 15 minutos e mantida isocrático em 100% (B) por 8 minutos. Ao término da corrida cromatográfica foi feito um gradiente de retorno de 100 a 5% em 15 min e o tempo de espera para o acondicionamento da coluna foi de 40 min. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e em cada análise foram injetados 25 µL da solução.

4.6 Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais (TFT) foi realizado com todos os extratos obtidos a partir dos dois métodos de extração (EAM e EAU). Foi utilizada uma adaptação da metodologia aplicada por Woisky e Salatino [95]. Foram pipetadas alíquotas de 12,5 µL do extrato, em triplicata, em microplaca. Em seguida, foi adicionado 12,5 µL do reagente Folin Ciocalteu e 200 µL de água destilada. Decorridos 3 minutos da reação, foram acrescentados 25 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). A placa será mantida em temperatura ambiente, protegida da luz, transcorrido uma hora, a absorbância foi verificada em espectrofotômetro a 720 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/Kg de EP, determinados por uma curva padrão, por meio das equações 1 e 2 [96].

Equação da reta:

$$y = a + bx \text{ (Equação 1)}$$

Através do valor de x encontrado na equação anterior, é possível determinar o teor de fenólicos relativo por grama de extrato:

$$\text{mgEAG g}^{-1} \text{ extrato} = \frac{\text{concentração EAG L}^{-1}}{\text{concentração do extrato gL}^{-1}} \text{ (Equação 2)}$$

onde **EAG: equivalente de ácido gálico**

4.7 Teor de Flavonoides totais

Para a realização deste teste, foi feita uma adaptação da metodologia aplicada por Woisky e Salatino [95]. Assim, uma alíquota de 25µL dos extratos, em triplicada, foi colocada em microplacas, seguida pela adição de 100µL de água destilada e 7,5µL de NaOH (5%), deixando em repouso por alguns minutos. Ao transcorrer o tempo foi adicionada uma alíquota de 7,5µL de $AlCl_3$ (10%), após 6 minutos 100µL de NaOH (4%) e 10µL de água destilada foram adicionados e deixando em repouso durante 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 510nm. O experimento foi acompanhado por um branco (sem a adição de extrato) e os resultados foram expressos em miligrama equivalente de catequina/100g de extrato determinado por uma curva de catequina.

4.8 Atividade antioxidante

4.8.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH•

A metodologia utilizada foi uma adaptação daquela descrita por Brand-Williams e colaboradores [97]. Assim, foram retiradas alíquotas de 50µL dos extratos, em triplicata, em microplaca e adicionados 150µL de solução de DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazil) com concentração de 0,006mM diluído em metanol. Após 30 minutos de repouso, a redução do radical foi medida a 515 nm em um espectrofotômetro. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle (sem a presença do extrato). Os resultados foram expressos em Equivalentes Trolox/Kg de extrato.

4.8.2 Capacidade redutora do ferro (FRAP)

A metodologia utilizada foi uma adaptação daquela descrita por Oyaizu [98]. Desta forma, em ambiente escuro foram retiradas alíquotas de 27µL do extrato, em triplicata, em microplaca e em seguida foi adicionado uma alíquota de 270µL da solução do reagente de FRAP (Solução de TPTZ, cloreto férrico e tampão fosfato). A microplaca foi mantida em estufa, à temperatura de 37°C durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro

a 595 nm. Todos os resultados foram expressos em equivalentes μM de Trolox/Kg de extrato, utilizando a curva de Trolox.

4.9- Análise por espectrometria de massas de alta resolução - HRMS

O preparo das amostras para a análise foi realizado a partir da diluição em metanol de 10 μL da solução do extrato, após o processo de clean-up descrito na seção 4.5.1, para o volume final de 1 mL para a obtenção de uma solução com concentração aproximada de 50 ppm. As condições de análise empregadas no modo HESI(-) as condições empregadas foram: voltagem do *spray* 3,5 kV, aquecimento da região de vaporização 40 °C, temperatura do capilar 300 °C, *sheath gas* 10 ua, gás auxiliar 10 ua e *sweep gas* 10 ua.

Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 1000 com o acúmulo de 100 micro scans e resolução de 140.000 FWHM (m/z 200). O espectro de massas final foi obtido através da subtração do espectro do branco do espectro de massas da amostra. Após a aquisição dos dados, o processamento dos espectros e atribuição da fórmula molecular dos íons foi realizada utilizando o software Xcalibur (versão 3.1, Thermo Fisher Scientific), e para isso foi considerado aceitável a atribuição de fórmulas moleculares com um erro de até 3 ppm entre o valor de m/z experimental e o valor de m/z da fórmula atribuída para o íon.

4.10 Análise Quimiométrica

Para avaliar as semelhanças e diferenças entre os perfis cromatográficos, foram aplicadas ferramentas quimiométricas exploratórias, com auxílio 59 do programa computacional Pirouette (v.4.0, Infometrix, EUA). Antes, porém, foi necessário o pré-tratamento dos dados (alinhamento dos picos) utilizando o algoritmo Correlation Optimised Warping (COW) [99] e posterior pré-processamento (centrado na média) dos dados originais. O pré-tratamento dos dados foi realizado com o programa computacional Matlab (versão 2009a, The MathWorks, Natick, MA, EUA). Essa análise foi realizada pelo Prof. Dr.

Edenir Rodrigues Pereira Filho, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

5 Resultados e discussões

Os acessos da espécie vegetal *C. grewioides* foram triturados para a separação granulométrica dos seus particulados, como demonstrado na Tabela 7. Desta forma a granulometria de 30-60 mesh foi escolhida para a realização dos ensaios de planejamento experimental.

Tabela 7: Massas obtidas do material seco e triturado, separados por granulometria.

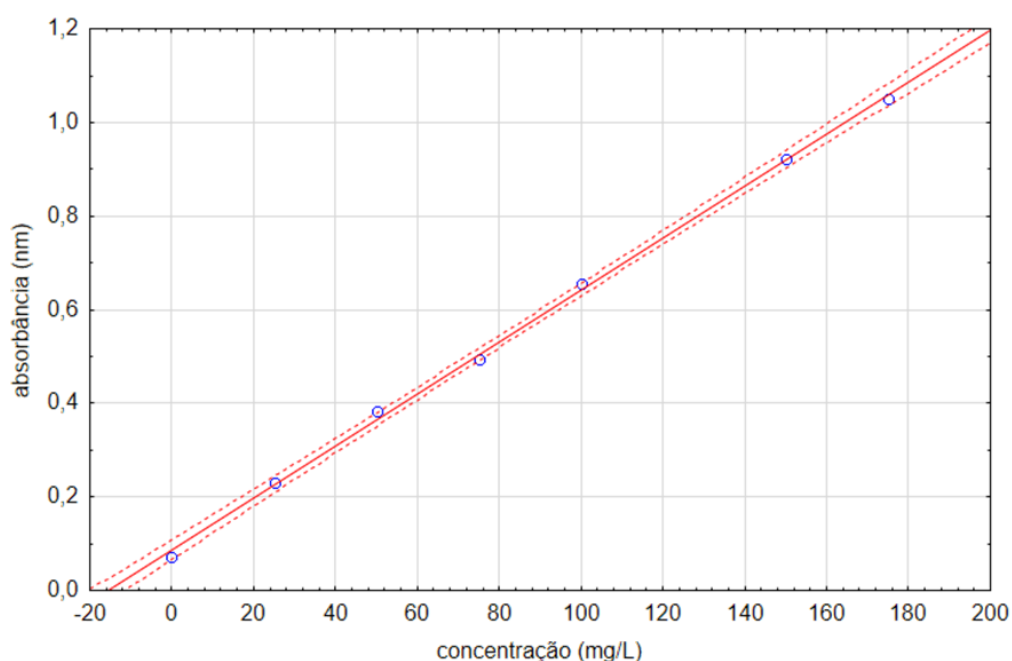
Acessos	Massa total (g)	30-60 mesh (g)	>60 mesh (g)
104	226,60	116,53	98,91
106	296,45	135,99	141,44
107	85,32	25,47	53,92
112	152,21	62,81	72,09
120	161,35	64,35	81,58

Os modelos dos planejamentos experimentais foram tratados utilizando o software Statistica®, os quais foram desenvolvidos através de duas maneiras, levando em consideração as duplicatas em cada ensaio da extração por micro-ondas (EAM) e as triplicatas no ponto central da extração assistida por ultrassom (EAU), com experimentos da ordem 2³.

Para avaliar a metodologia mais eficiente para a extração dos compostos fenólicos, os planejamentos foram feitos fixando, em todas elas, a razão “massa vegetal/volume do solvente” e modificando as demais variáveis. Com isso, pôde-se representar os resultados de cada otimização através da ANOVA, Diagrama de Pareto e superfície de resposta.

O tratamento das respostas do Teor de Fenólicos Totais (TFT) foi desenvolvido através do teste de Folin- Ciocalteu. Para isso, uma curva de calibração com o ácido gálico (padrão) foi construída, Figura 27, utilizando sete concentrações nos valores de 0, 25, 50, 75, 100, 150 e 175 mg/L. Através dela foi possível obter a equação da reta, que será utilizada para prever o teor equivalente de fenólicos totais, com um coeficiente de determinação (R^2) apropriado para estes cálculos.

Figura 27: Curva de calibração do ácido gálico.



$$y = 0,0877 + 0,0056 \cdot x; R^2 = 0,9989$$

Após a realização da curva de calibração, foi possível investigar o valor do TFT dos ensaios realizados para os extratos do acesso 106 obtidos pelos dois métodos de extração. A Tabela 8 mostra os rendimentos obtidos (mg de extrato/g de material vegetal x 100) de cada extrato, considerando a quantidade de material vegetal utilizada e os valores de TFT calculados pela equação da reta do ácido gálico, os quais mostraram ser bem satisfatórios [100, 101]. Os tratamentos dos dados foram realizados através do software Statística®, possibilitando uma análise apurada dos dados e parâmetros que influenciam diretamente na extração dos compostos fenólicos.

Tabela 8: Dados de rendimento e teor de fenólicos totais para a otimização das EAU e EAM.

Acesso 106					
EAM			EAU		
Ensaio	R%	TFT (mg EAG.g ⁻¹ extrato)	Ensaio	R%	TFT (mg EAG.g ⁻¹ extrato)
1	19,72	175,88 ± 4,02	1	21,16	226,05 ± 19,14
2	21,52	210,52 ± 2,56	2	19,09	145,34 ± 12,59
3	8,87	149,80 ± 5,11	3	18,91	233,67 ± 7,97
4	19,79	166,47 ± 18,81	4	20,37	221,29 ± 5,54
5	19,10	148,97 ± 20,15	5	18,22	214,27 ± 2,88
6	19,85	184,80 ± 7,07	6	17,84	216,17 ± 6,43
7	21,11	203,61 ± 10,74	7	17,92	237,36 ± 7,51
8	19,93	237,07 ± 24,02	8	20,18	200,58 ± 2,58
---			PC-1	18,85	236,53 ± 7,89
---			PC-2	18,28	241,05 ± 8,09
---			PC-3	17,71	227,72 ± 8,89

5.1 Otimização da metodologia de Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

A escolha dos parâmetros para a extração via ultrassom foi elaborada considerando dados relatados em artigos baseados no uso desta técnica [102, 103], os quais, em sua maioria, evidenciaram que uma composição do solvente extrator com baixas quantidades de etanol (menores que 50%) seria mais eficaz para a extração dos compostos fenólicos. Este fato é associado ao maior efeito de permeabilidade, que é a capacidade do solvente penetrar no tecido vegetal.

Assim, duas diferentes composições foram escolhidas, 20 e 50% de etanol em água.

Os outros parâmetros modificados desta técnica (tempo e potência), foram escolhidos de forma a simularmos tanto condições mais drásticas (tempo= 10 minutos e potência= 90%), como condições mais moderadas (tempo= 5 minutos e potência= 30%).

5.1.1 Análise estatística dos resultados de TFT da extração Assistida por Ultrassom (EAU)

Os resultados obtidos pelo diagrama de Pareto (Figura 28) e ANOVA (Tabela 9) corroboram entre si, pois evidenciam como fatores individuais mais relevantes do planejamento experimental é a composição do solvente e o tempo. O ANOVA mostra que o modelo estatístico do planejamento está aceitável, com um $r^2=0,825$ similar a valores encontrados na literatura [104–106]. Além disso, o ANOVA reflete que a maior contribuição para a extração dos compostos fenólicos é dada pela variável solvente, a qual é reforçada pelo diagrama de Pareto. Neste último caso, o valor negativo (-6,67303) representa que a diminuição da composição do etanol no solvente extrator favorece a extração desta classe de compostos.

Tabela 9: Dados estatísticos do modelo ANOVA para a otimização da EAU.

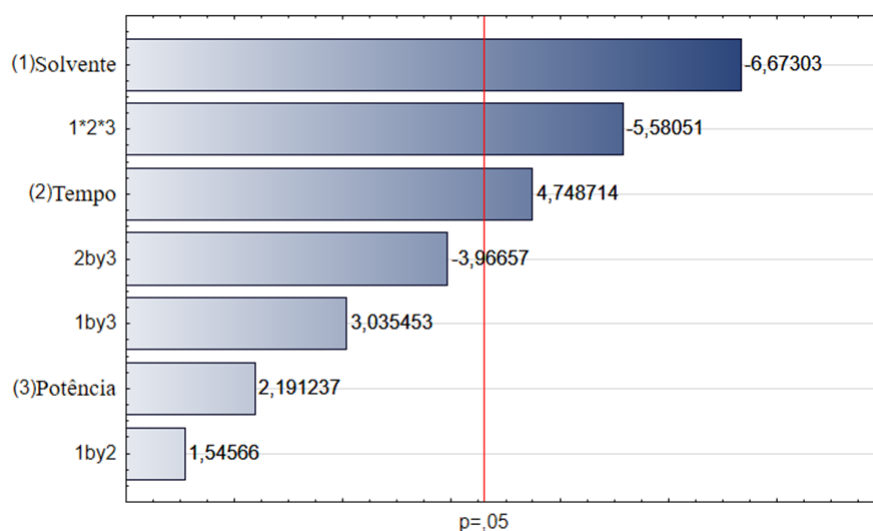
	SS	df	MS	F	P
Solvente	2047,238	1	2047,238	44,52932	0,021728
Tempo	1036,751	1	1036,751	22,55029	0,041598
Potência	220,750	1	220,750	4,80152	0,159793
1 e 2	109,837	1	109,837	2,38906	0,262218
1 e 3	423,613	1	423,613	9,21397	0,093550
2 e 3	723,358	1	723,358	15,73370	0,058076
1*2*3	1431,762	1	1431,762	31,14215	0,030643
Erro puro	91,950	2	45,975		
Total de SS	7265,574	10			

SS: soma dos quadrados; df: graus de liberdades; MS: média dos quadrados; F: estatística; P: valor;

Vale mencionar que o fator tempo, embora seja o segundo fator de relevância individual, é o terceiro fator mais significativo para este tipo de extração, o qual foi notabilizado pelos dois tratamentos estatísticos. No entanto, o valor positivo obtido pelo diagrama de Pareto (tempo: 4,748714) demonstra que o aumento do tempo de extração favorece a retirada dos compostos fenólicos da matriz vegetal.

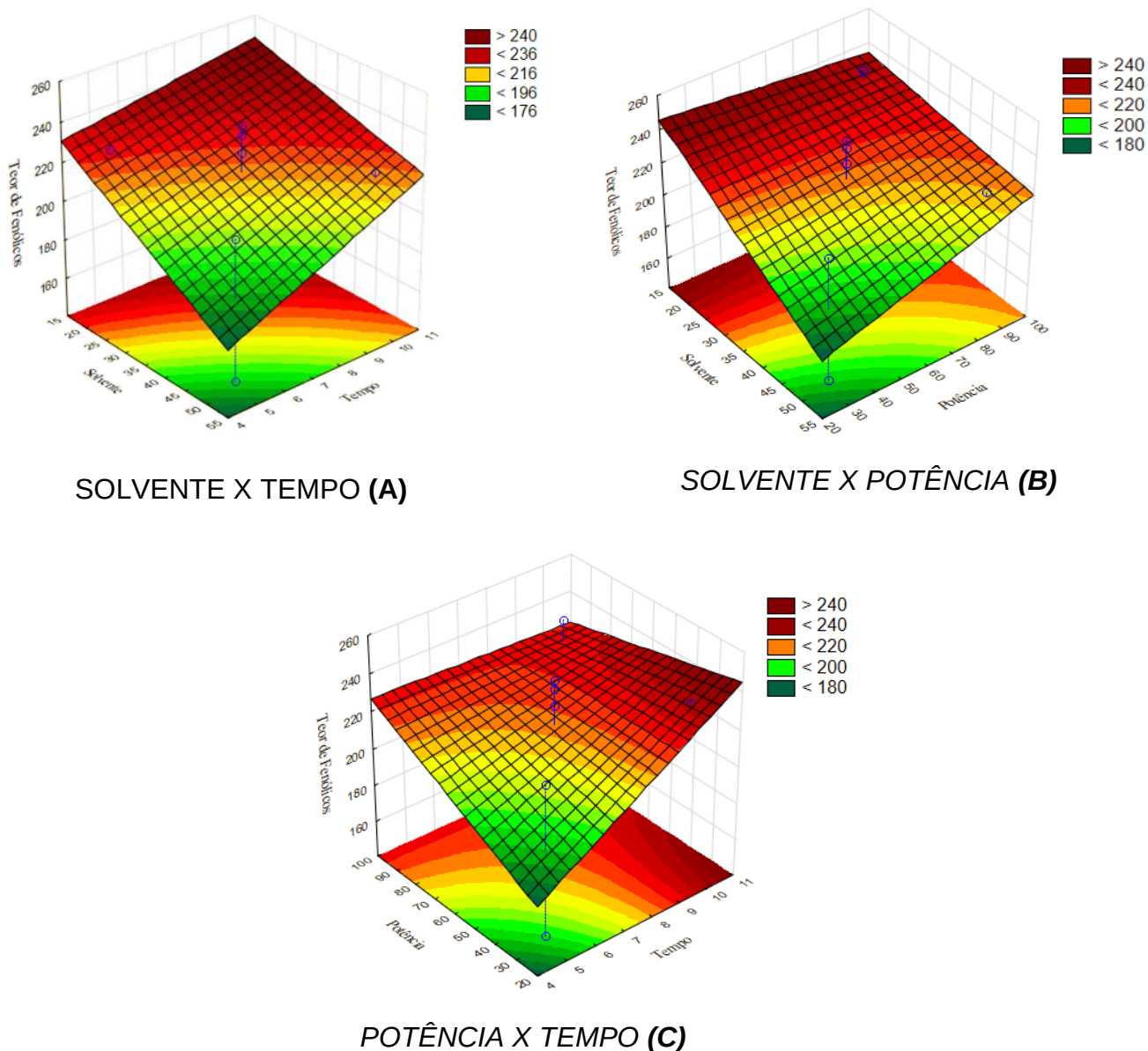
O terceiro fator importante para a extração dos compostos fenólicos é o fator triplo “solvente x tempo x potência”, o qual se apresenta como a segunda variável mais significativa para ambos os tratamentos estatísticos. O valor negativo obtido pelo diagrama de Pareto (Figura 28) evidencia que a melhor extração deverá ocorrer quando utilizarmos os menores valores dos três fatores, sendo: solvente 20%, tempo: 5 minutos e potência: 30%).

Figura 28: Diagrama de Pareto do planejamento experimental 2^3 das EAU.



O último passo para o tratamento estatístico para a EAU foi a obtenção dos três gráficos superfície de resposta (Figura 29). Através dele pode-se investigar as interferências dos fatores principais em relação a resposta (Teor de Fenólicos Totais), ajudando a conhecer qual é o ensaio e qual a tendência que possui a maximização na extração dos compostos fenólicos.

Figura 29: Gráficos de superfície de respostas das EAU.



Os gráficos de superfície de resposta apresentam, ilustrativamente, o que os dados do Diagrama de Pareto e a ANOVA apontam, pois quando se analisa os gráficos que tem o fator potência (**B** e **C**), nota-se que seus valores máximos de TFT mostram pequena variação entre os valores máximos e mínimos de potência. Por outro lado, quando se faz uma análise nos eixos do tempo e do solvente, para os três gráficos, fica evidente a variação na composição do TFT presente nos extratos. O resultado se torna mais acentuado quando observamos o gráfico SOLVENTE X TEMPO (**A**).

Reunindo todas as informações obtidas por meio de todos os dados estatísticos apresentados, o ensaio que forneceu o resultado maximizado de extração de compostos fenólicos foi aquele com a menor composição de solvente (20%), maior tempo de extração (10 minutos) e maior potência (90%), ensaio 7 (Tabela 8).

5.2 Otimização da metodologia de extração assistida por micro-ondas (MAE)

Para o estudo do planejamento experimental na extração com o micro-ondas foi utilizado os mesmos parâmetros (solvente, tempo e potência) avaliados na extração assistida por ultrassom, de forma a permitir a comparação entre os métodos na extração dos compostos fenólicos. Além destes fatores, também é possível avaliar como o fenômeno físico-químico, intrínseco à cada técnica, atua na remoção destes compostos na espécie *Croton grewoides*.

5.2.1 Análise estatística dos resultados de TFT da extração Assistida por Ultrassom (EAU)

Os resultados adquiridos pelo Diagrama de Pareto (Figura 30) e ANOVA (Tabela 10) mostram a existência de três fatores relevantes para o processo de extração, sendo dois deles de variáveis individuais (solvente e potência) e um duplo (tempo x potência). O modelo experimental construído apresentou um $r^2=0,9116$, similar a valores encontrados na literatura [107].

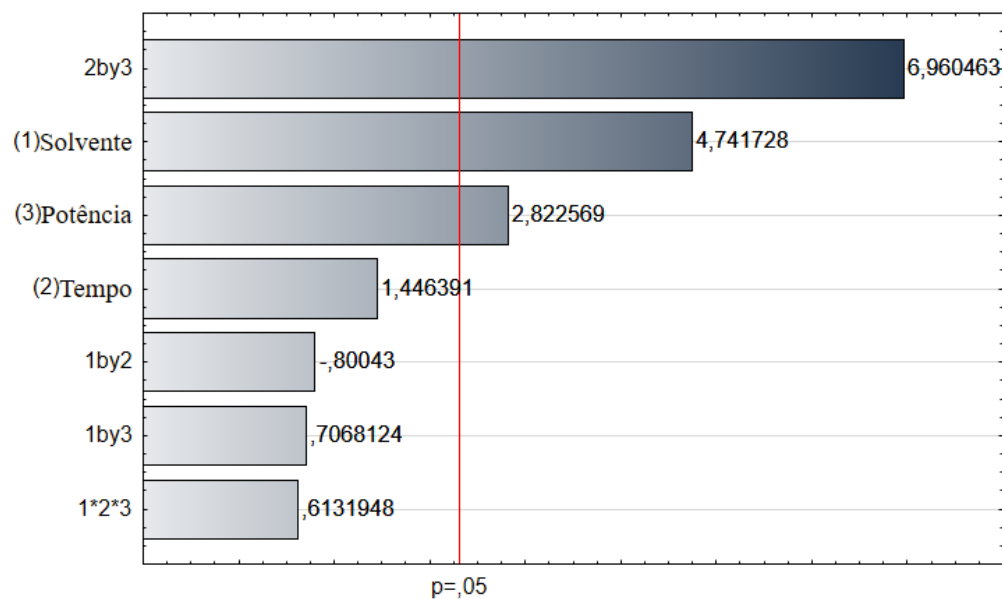
Tabela 10: Dados estatísticos do modelo ANOVA para a otimização da EAM.

	SS	df	MS	F	P
<i>Solvente</i>	3635,80	1	3635,803	22,48398	0,001461
<i>Tempo</i>	338,30	1	338,297	2,09205	0,186083
<i>Potência</i>	1288,30	1	1288,297	7,96689	0,022405
<i>1 e 2</i>	103,60	1	103,603	0,64069	0,446578
<i>1 e 3</i>	80,79	1	80,786	0,49958	0,499749
<i>2 e 3</i>	7834,36	1	7834,357	48,44805	0,000117
<i>1*2*3</i>	60,80	1	60,803	0,37601	0,556775
<i>Erro puro</i>	1293,65	8	161,706		
<i>Total SS</i>	14635,60	15			

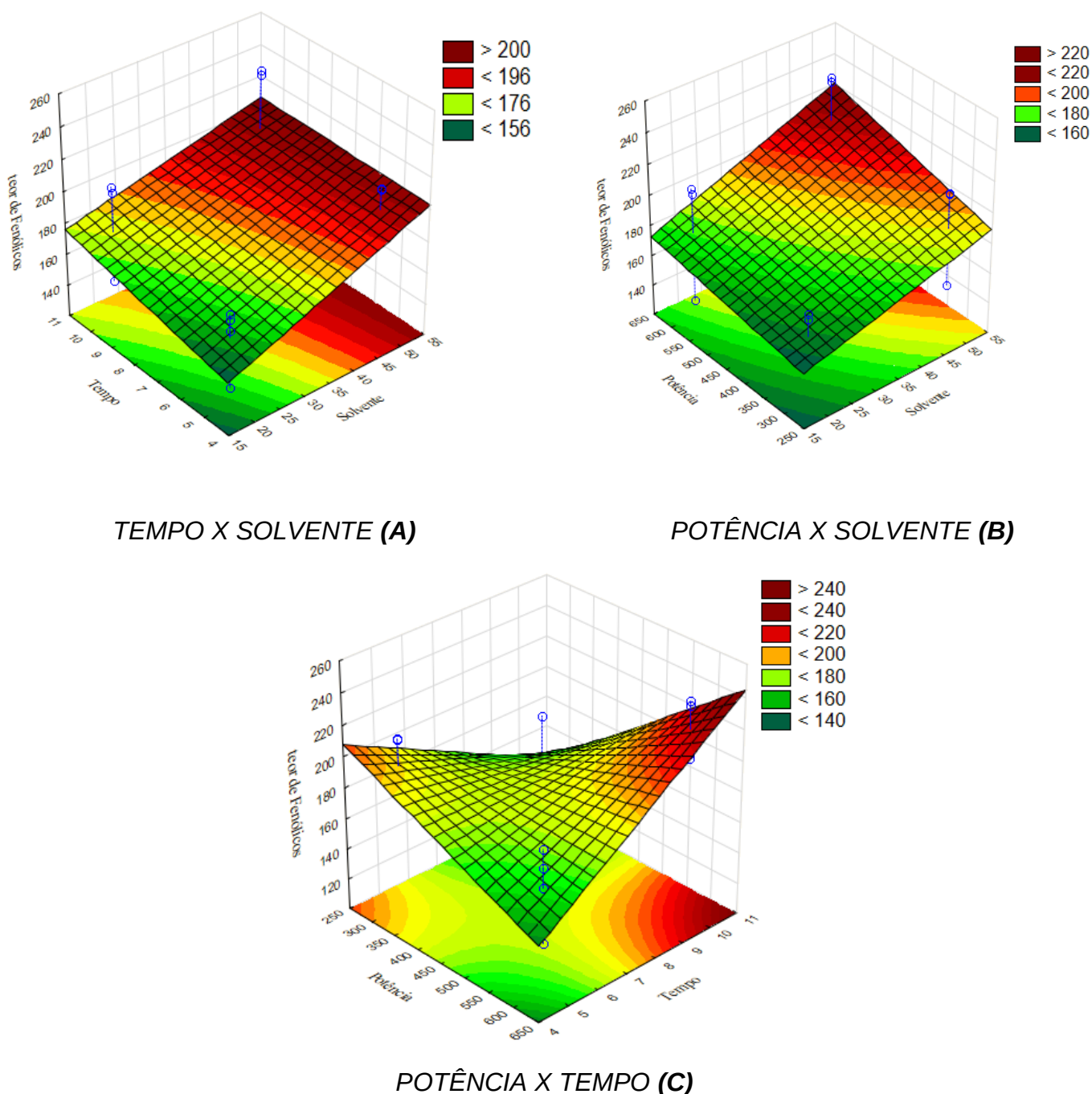
SS: soma dos quadrados; **df:** graus de liberdades; **MS:** média dos quadrados; **F:** estatística; **P:** valor;

Nos dois tratamentos estatísticos, o fator duplo (tempo x potência) mostrou ser o mais relevante para a extração dos compostos fenólicos. No caso do diagrama de Pareto, apresentado na Figura 30, todos os parâmetros estatisticamente significativos (solvente, potência e tempo x potência) apresentam valores positivos. Este resultado revela a tendência de que os valores máximos destes parâmetros são mais eficientes para a extração dos compostos fenólicos quando se utiliza a EAM em espécies de *C. grewioides*.

Figura 30: Diagrama de Pareto do planejamento experimental 2³ das EAM



O último passo para o tratamento estatístico para a EAM foi a obtenção dos três gráficos superfície de resposta (Figura 31). Através dele pode-se investigar as interferências dos fatores principais em relação a resposta (Teor de Fenólicos Totais), ajudando a conhecer qual é o ensaio e qual a tendência que possui a maximização na extração dos compostos fenólicos.

Figura 31: Gráficos de superfície de respostas das EAM

O gráfico **C**, que representa a interação do fator duplo (potência x tempo), reforça que estes parâmetros são os melhores para a recuperação dos compostos fenólicos. No entanto, para esta melhor recuperação os dois fatores deverão apresentar valores máximos, pois quando um deles está em seu valor mínimo a recuperação diminui. O gráfico **B** analisa os dois fatores principais, dos individuais, de maior relevância, mostrando que valores máximos de solvente e potência resultam em uma melhor recuperação dos compostos fenólicos.

Desta forma, reunindo todas as informações obtidas por meio de todos os dados estatísticos apresentados, o ensaio que forneceu o resultado maximizado de extração de compostos fenólicos foi aquele com maior composição do solvente (50%), maior tempo de extração (10 minutos) e maior potência (600 watts), ensaios 15 e 16 (Tabela 8).

5.3 Obtenção dos extratos de todos os acessos de *Croton grewoides* a partir das condições ótimas de EAU e EAM

Sabendo das condições ótimas de extração, os acessos 104, 106, 107, 112 e 120 foram submetidos as duas metodologias de extração (EAU e EAM). Os respectivos rendimentos estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de rendimento de todos os acessos obtidos por EAU e EAM

Acessos	EAU	EAM
	Rendimento (%)	Rendimento (%)
104	25,26	24,06
106	17,92	19,93
107	16,84	16,87
112	20,76	12,65
120	21,46	21,65

5.3.1 Quantificação de flavonoides totais

A quantificação dos compostos bioativos foi realizada por meio do teor de flavonoides totais, que foi mensurado utilizando equivalente de catequina por grama de extrato testado, como representado na Tabela 12.

Tabela 12: Teor de flavonoides totais, equivalente de catequina/g de extrato

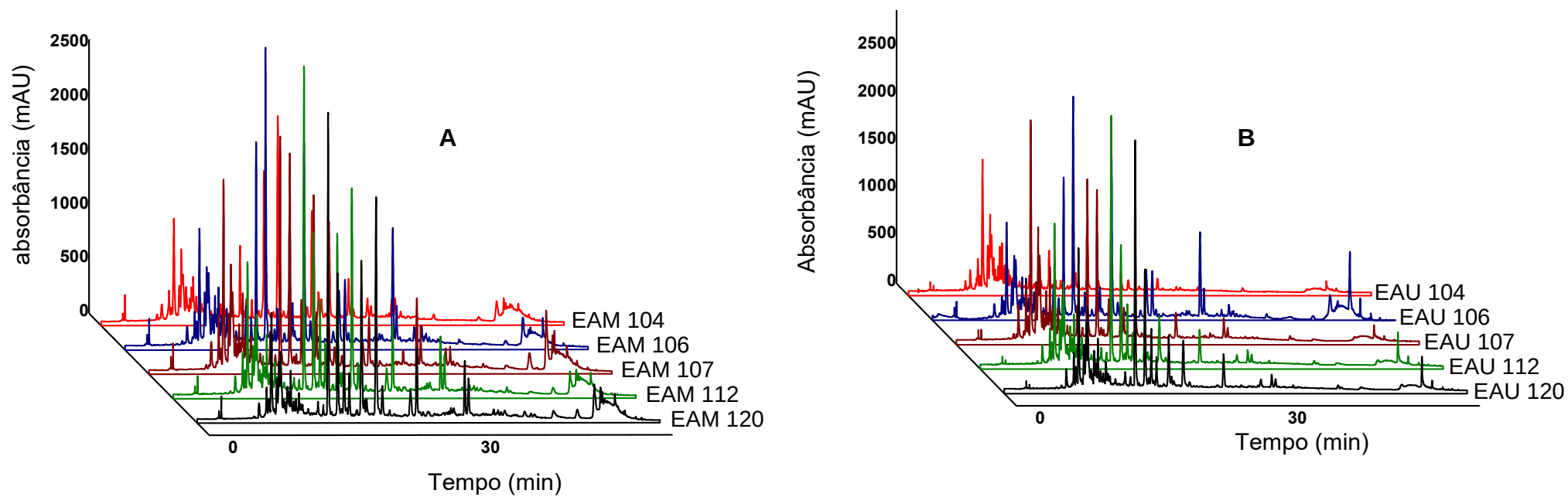
Acessos	EAU	EAM
	Eq catequina/g extrato	Eq catequina/g extrato
104	97,17± 6,22	156± 11,60
106	141,88± 6,22	158,35± 10,61
107	57,17± 1,36	99,53± 0
112	165,41± 5,43	177,17± 32,63
120	278,35± 33,30	257,17± 11,12

Por meio da análise dos resultados apresentados na Tabela 12, é notório que o método de extração empregados atuam de forma distinta na recuperação dos flavonoides pertencentes a *C. grewoides*. Sendo mais eficaz a sua obtenção quando extraído pela técnica de EAM para os acessos 104, 106, 107 e 112. Entretanto esse fenômeno não se aplica quando observado o acesso 120, que apresenta melhor recuperação para a metodologia de EAU.

5.4 Análises cromatográficas

Todos os extratos obtidos pelas duas técnicas foram submetidos às análises por cromatografia líquida. Através dos cromatogramas obtidos (Figura 32 e 33) é possível observar, visualmente, uma certa diferença e semelhança entre os extratos, principalmente na faixa de tempo de retenção entre 10 minutos a 30 minutos. No entanto, o grau de semelhança e diferença ficará mais evidente após análises quimiométricas através da Análise de Componentes Principais (PCA) presente no item 5.6.

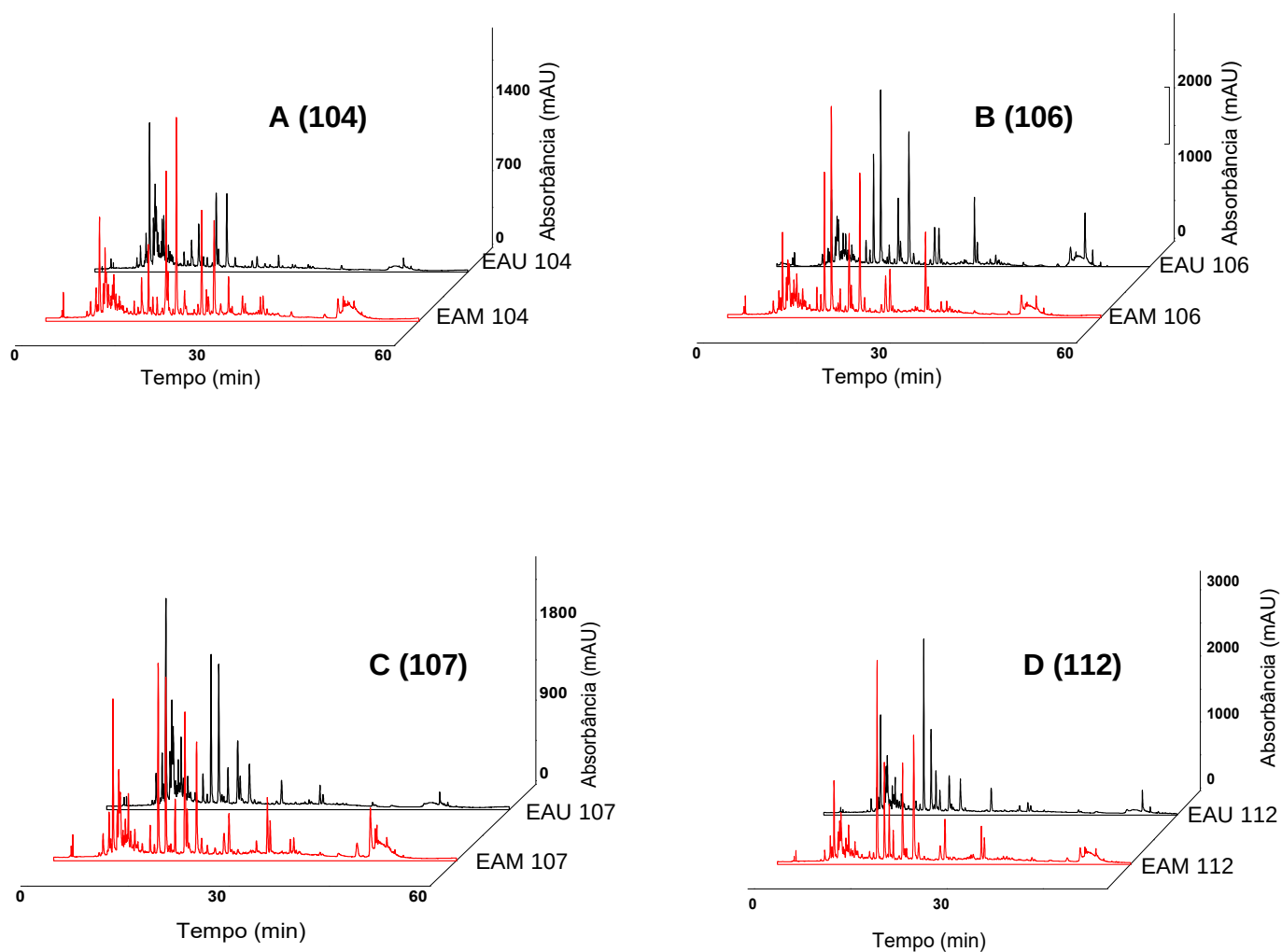
Figura 32: Cromatogramas comparativos dos acessos da *C. grewioioides* extraídos via EAM (A) e EAU (B).

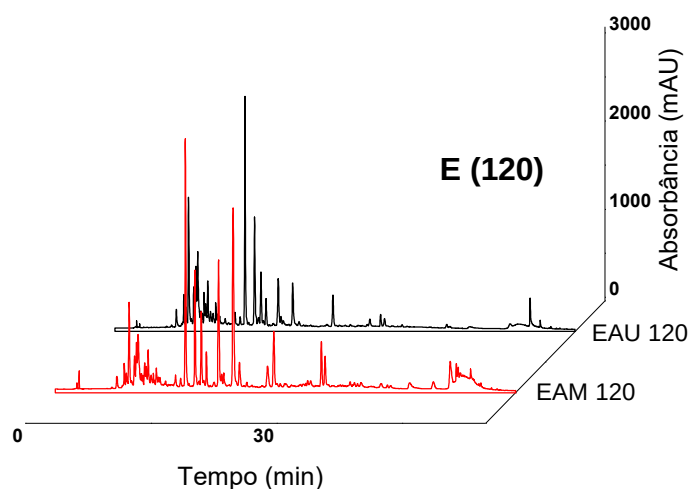


A diferença química entre os acessos é claramente observada, entretanto os acessos 112 e 120 parecem ser os mais similares entre si, pois seus respectivos extratos apresentam grandes semelhanças para ambas as metodologias de extração, Figura 33 (D) e (E).

De forma bastante precoce, pode-se ainda sugerir que o método de extração assistida por micro-ondas (EAM) é a técnica mais eficiente para a extração de compostos, que são detectáveis por UV, a partir de *Croton grewoides*. A proximidade destes perfis poderá também ser confirmada pelos dados quimiométricos a serem feitos em etapas posteriores.

Figura 33: Cromatogramas comparativos dos acessos entre os métodos de extração.





Desta forma, pode-se dizer que a diferença entre as metodologias de extração foi significativa para a extração dos compostos presentes na espécie *C. grewioides*.

5.5 Propostas estruturais dos compostos presentes nos extratos de *C. grewioides*

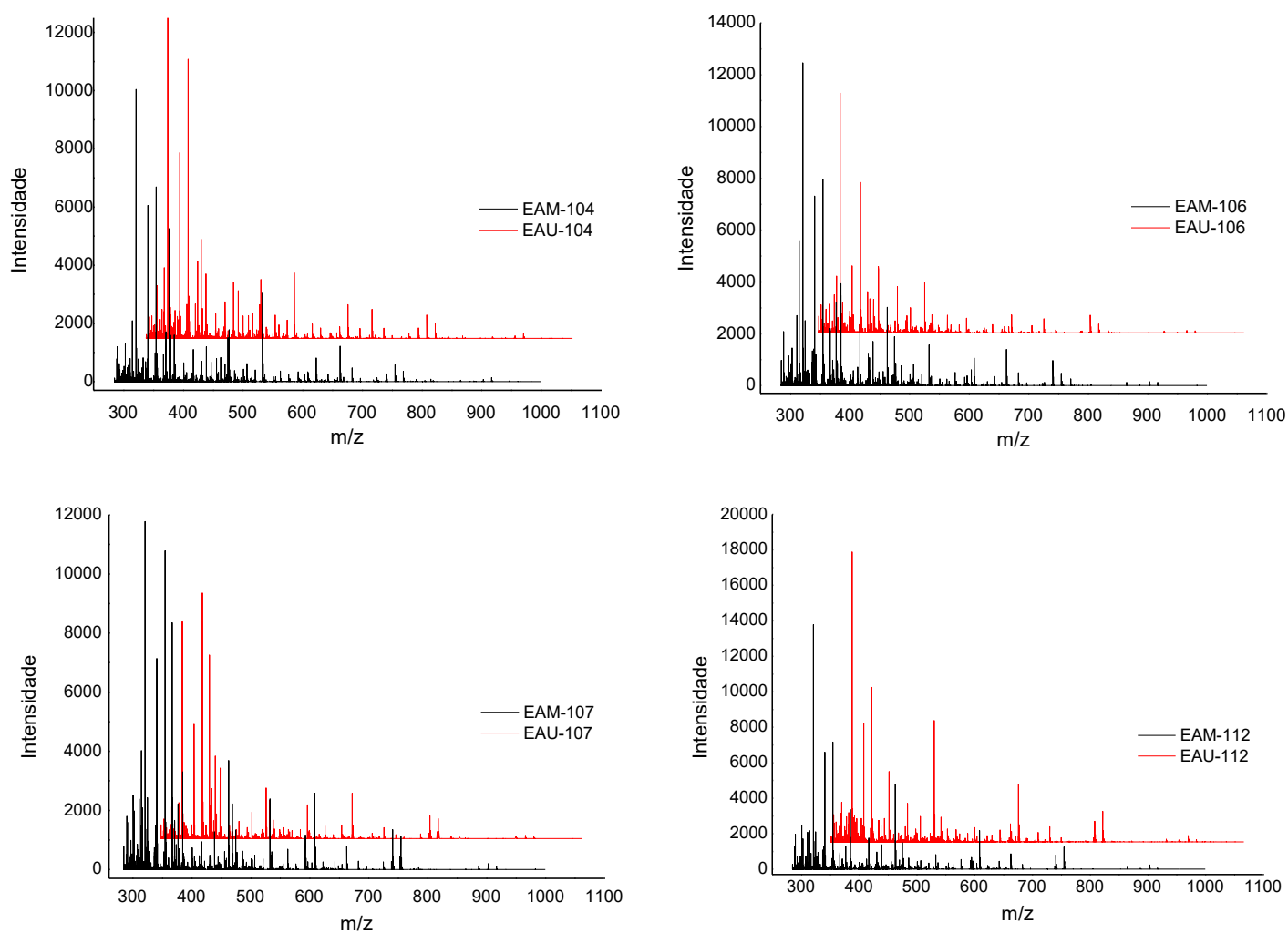
Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários que comumente são relatados como marcadores filogenéticos, devido a sua grande abrangência em determinadas famílias vegetais. Alguns autores sugerem que determinados derivados de flavonoides glicosilados podem ser utilizados como diagnósticos do gênero *Croton* e até de algumas espécies deste gênero [108]. No entanto, de forma geral, diversos derivados flavonoidicos, como canferol, quercetina, aromadrendina e isoflavonas são constantemente isolados e caracterizados, atribuindo aos flavonoides como uma das principais classes de compostos do reino vegetal [109 - 112].

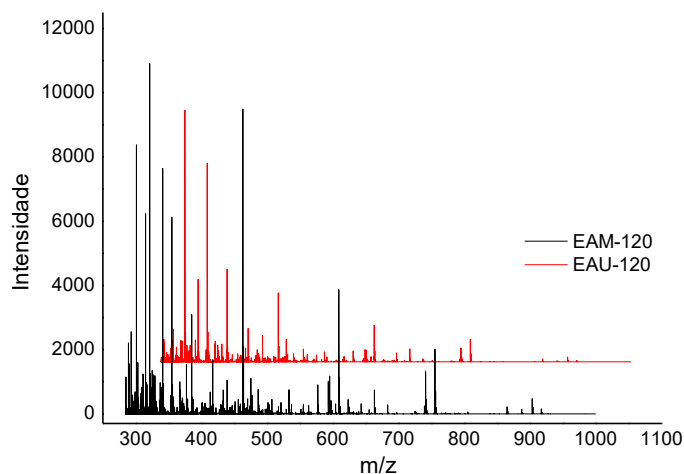
A proposta dos marcadores químicos presentes na espécie *C. grewioides* foi feita com base na fórmula molecular atribuída $[M-H^+]$, a partir da massa exata do íon determinado por HRMS. Com base nas fórmulas moleculares determinadas, as estruturas químicas foram propostas levando-se em consideração as estruturas de flavonóides presentes no Banco de Dados *ChemSpider* e reportados em artigos científicos. Foi avaliado a região de massas

superior a m/z 285, a partir da qual são detectados os flavonoides canferol e seus derivados, comumente relatados em espécies de *Croton*. Desta forma, foi possível propor cerca de 41 estruturas químicas pertencentes a classe dos flavonoides (Anexo I e II), dos quais, sete deles estão presentes em todos os acessos, independentemente da metodologia de extração empregada (EAU ou EAM). Este resultado sugere que os flavonoides podem ser marcadores filogenéticos do gênero *Croton*.

A Figura 34, mostra os perfis dos espectros de massas para cada acesso e seus respectivos extratos.

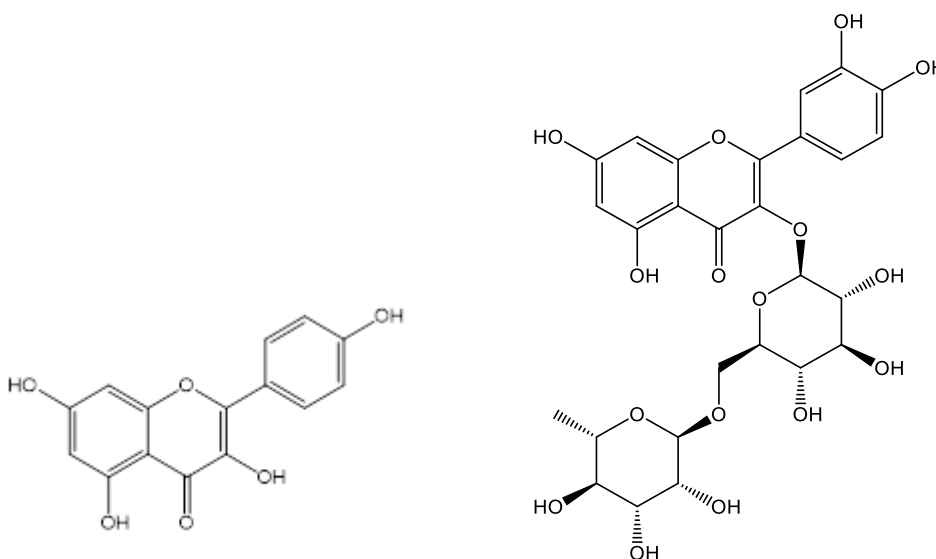
Figura 34: *Fingerprints* dos espectros de massas obtidos pela técnica de HRMS.





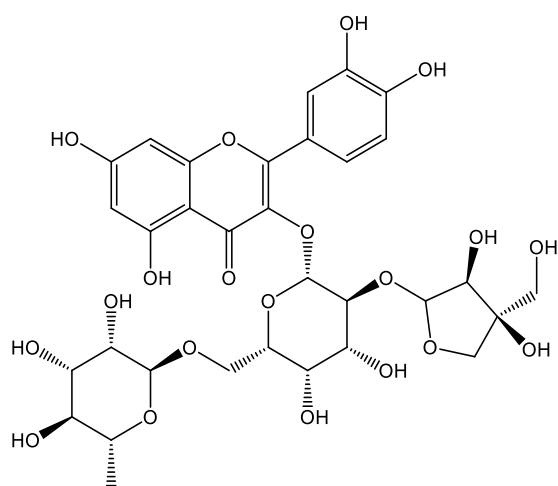
Assim, analisando as fórmulas moleculares obtidas a partir da massa exata dos íons e comparando com as moléculas com mesma fórmula molecular presentes no Banco de Dados ChemSpider e com dados da literatura, foi possível propor que os compostos responsáveis por essa filogenia (Figura 35) são: canferol (**67**), quercetina (**19**), 3-O-metilquercetina (**66**), isoquercetina (**65**), rutina (**84**), quercetina-3-O- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -apiopyranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -L-rhamnopiranosídeo (**92**) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- α -L-rhamnopiranosídeo (**64**). A Tabela 13 mostra a abundância relativa de todos estes compostos em cada uma das amostras analisadas.

Figura 35: Exemplos de flavonoides como marcadores quimiotaxonômicos da espécie *C. grewoides*



68

84



67

Tabela 13: Marcadores quimiotaxômicos presentes na espécie *C. grewioides*.

Composto	M.T. [H-1]*	EAU					EAM				
		Abundância Relativa					Abundância Relativa				
		104	106	107	112	120	104	106	107	112	120
Canferol (68)	285,04046	0,34	0,29	0,28	0,19	0,96	0,51	0,19	1,94	2,03	10,49
Quercetina (19)	301,03538	1,90	3,90	5,75	9,84	8,52	5,26	6,75	21,39	18,08	76,81
3-O-metilquercetina (66)	315,05103	8,00	23,72	14,68	10,04	8,41	17,59	44,98	34,16	15,69	57,13
Isoquercetina (65)	463,08820	7,34	21,24	20,61	41,84	27,35	8,20	24,24	31,28	34,60	87,03
Rutina (84)	609,14611	3,48	7,44	18,43	19,88	14,40	3,38	8,54	21,96	15,80	35,49
quercetina-3-O-β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-apiopyranosil-(1→6)-α-L-rhamnopiranosídeo (67)	741,18837	3,06	7,38	9,30	9,30	5,50	2,71	7,81	11,47	5,87	12,09
quercetina-3-O-β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-rhamnopiranosil-(1→6)-α-L-rhamnopiranosídeo (64)	755,20402	6,97	3,60	8,18	8,18	8,89	5,74	3,75	9,45	9,06	18,37

*M.T. [H-1]: Massa Teórica apresentada com a ausência de um átomo de hidrogênio.

Esses marcadores químicos já foram relatados em outros estudos tanto do gênero quanto da mesma espécie. O trabalho mais recente foi relatado por Vilma e colaboradores [32] onde demonstra o isolamento dos compostos 64, 65, 66 e 67 a partir de um extrato aquoso, preparado por decocção de um acesso de *C. grewoides*, sendo o composto 30 considerado inédito como produto natural.

5.6 Análise quimiométricas para as amostras analisadas por Cromatografia Líquida (CLAE-DAD)

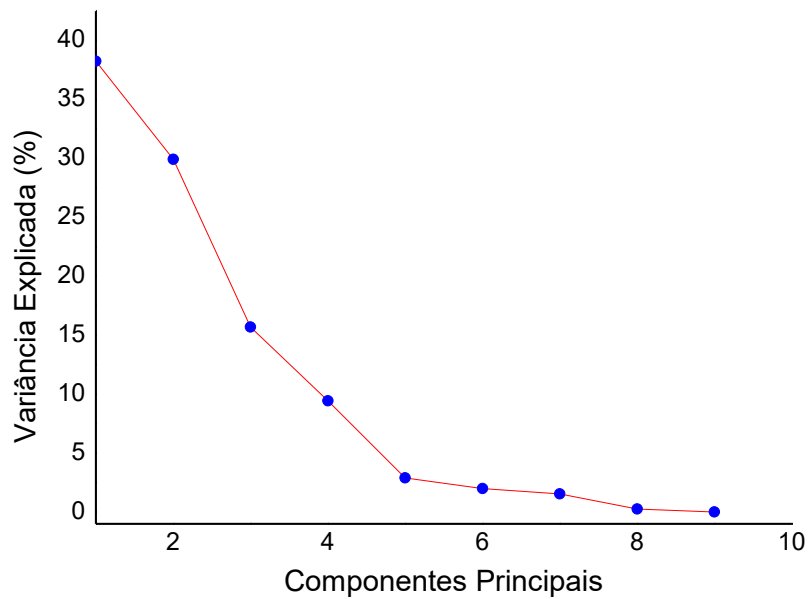
A análise quimiométrica utilizada para auxiliar na identificação da diferença e/ou semelhança entre os acessos foi a análise por componente principal (PCA). Para isso, uma matriz contendo 10 linhas (amostras) e 7501 variáveis (tempo de retenção de 75 minutos) foi organizada e verificada os seus principais componentes. Com isso, foi possível observar que a soma das duas primeiras componentes principais, para estes experimentos, resultou em 68,1% da variância total dos dados, como representado na tabela 14.

Tabela 14: Dados das variâncias percentuais de todas as componentes principais para as amostras analisadas por CLAE-DAD.

Componente principal	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada (%)
PC1	38,2	38,2
PC2	29,9	68,2
PC3	15,7	83,8
PC4	9,4	93,3
PC5	2,9	96,2
PC6	2,0	98,2
PC7	1,5	99,7
PC8	0,3	100,0
PC9	0,0	100,0

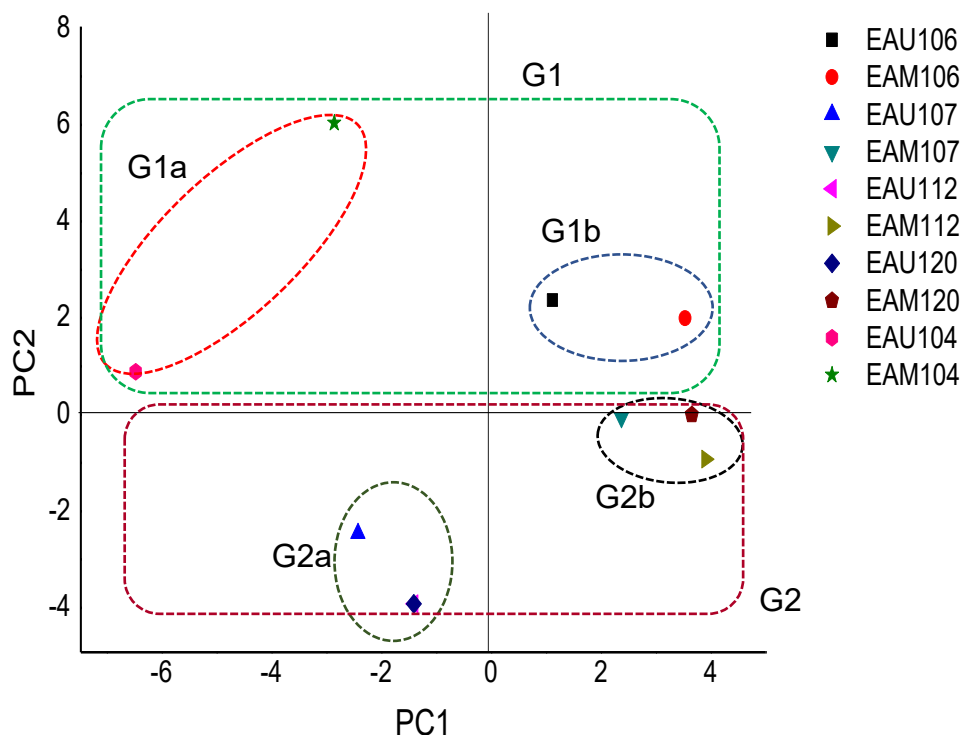
Os resultados apresentados nesta tabela demonstram os valores obtidos em cada PC's, e são representados graficamente na Figura 36.

Figura 36: Gráfico das variâncias explicadas das PC's obtidas.



Desta forma os resultados subsequentes foram elaborados utilizando as duas componentes principais (PC1 *versus* PC2), gerando o gráfico de *scores* representado na Figura 37.

Figura 37: Gráfico de *scores* PC1 versus PC2 das amostras analisadas por LC-DAD da espécie *C. grewoides*



Com os dados dispostos no gráfico de *scores* é possível observar a formação de dois grandes (G1 e G2) grupos e quatro subgrupos (G1a, G1b, G2a e G2b), que conseguem demonstrar que há diferenças químicas entre os extratos quando consideramos as metodologias de extração utilizadas como quando consideramos os cinco acessos estudados.

O primeiro grande grupo (G1) está representado na PC2 positiva, que evidencia a semelhança entre os quatro extratos obtidos dos acessos 104 e 106, independente da metodologia de extração. Por outro lado, o segundo grupo (G2) evidencia a semelhança entre seis extratos obtidos dos acessos 107, 112 e 120, também independente da metodologia de extração.

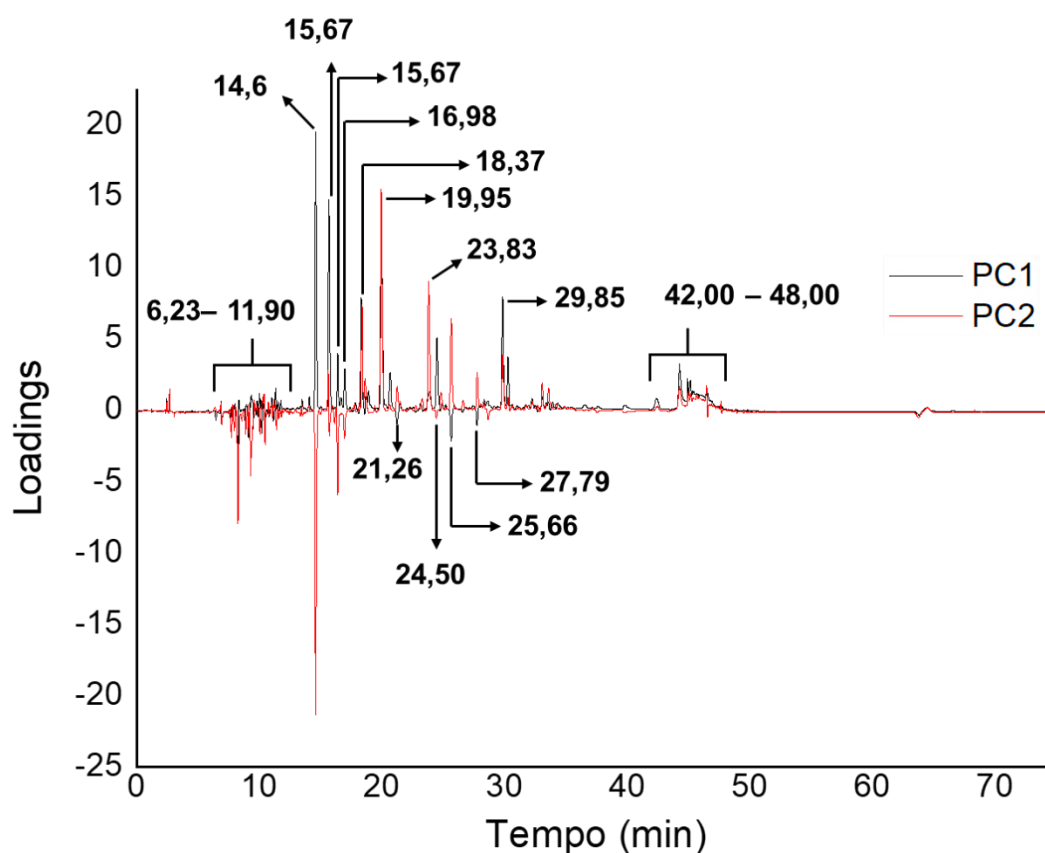
Se fizermos uma análise dos grupos G1 através da componente PC1, percebe-se a diferenciação entre os acessos 104 e 106, pois eles apresentam PC1 negativa e positiva, respectivamente. Assim, para o grupo G1 observa-se que através da componente PC1 é permitido analisar as diferenças entre os acessos, independente da metodologia de extração empregada, uma vez que os

extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas tanto do acesso 104 (G1a) quanto do acesso 106 (G1b) são semelhantes.

De forma inversa, quando analisamos o grupo G2 e tendo como referência a componente PC1, percebe-se a diferenciação entre os extratos quando consideramos o método de extração pois há a formação de dois outros subgrupos, o G2a que é formado pelos extratos dos acessos 107, 112 e 120 preparados por ultrassom (PC1 negativo) e o G2b que é formado pelos extratos dos acessos 107, 112 e 120 preparados por micro-ondas (PC1 positivo).

Para identificar quais variáveis diferenciam as amostras entre si, recorre-se ao gráfico de *loadings* (Figura 38).

Figura 38: Gráfico de *loadings* das PC1 e PC2 das amostras analisadas por LC-DAD.



Considerando a mesma análise feita no gráfico de *scores*, as bandas cromatográficas que caracterizam as amostras agrupadas em G1 são aquelas com tempo de retenção de 18,37; 19,95; 21,26; 23,83; 25,66; 27,79; 29,85 e a

região entre 42,00 à 48,00 minutos. As bandas cromatográficas que caracterizam as amostras agrupadas em G2 estão presentes na região de tempos de retenção entre 6,23 à 11,90 minutos e nos valores de 14,60; 15,67; 16,40; 16,98 e 24,50 minutos.

Analisando o grupo G1 (PC2 positivo) e variando a componente PC1, pode-se identificar quais bandas cromatográficas são características dos dois subgrupos, G1a e G1b. Assim, as bandas cromatográficas com tempos de retenção de 21,26; 25,66 e 27,79 minutos são responsáveis pela diferenciação dos dois extratos do acesso 104 (G1a) em relação aos dois extratos do acesso 106 (G1b), o qual tem como bandas cromatográficas predominantes aquelas com tempos de retenção de 18,37; 19,95; 23,83; 29,85 e a região entre 42,00 à 48,00 minutos.

Analisando o grupo G2 (PC2 negativo) e variando a componente PC1, pode-se identificar quais bandas cromatográficas são características dos dois outros subgrupos, G2a e G2b. Desta forma, as bandas cromatográficas na região entre 6,23 à 11,90 minutos são responsáveis pela separação dos extratos obtidos por ultrassom dos acessos 107, 112 e 120 (G2a) em relação aos extratos dos mesmos acessos obtidos por micro-ondas (G2b), os quais apresentam bandas cromatográficas predominantes aquelas com tempos de retenção de 14,60; 15,67; 16,40; 16,98 e 24,50 minutos.

Considerando a mesma análise feita no gráfico de scores, as bandas cromatográficas que caracterizam as amostras agrupadas em G1 são aquelas com tempo de retenção de 18,37; 19,95; 21,26; 23,83; 25,66; 27,79; 29,85 e a região entre 42,00 à 48,00 minutos.

5.7 Análise quimiométrica para as amostras analisadas por HRMS – Orbitrap.

A análises dos dados por meio da PCA foi realizada utilizando uma matriz contendo 10 linhas (amostras) e 41 variáveis (íons com fórmula molecular atribuída). Esse tratamento foi utilizado para diferenciar, estatisticamente, os extratos de *C. grewoides* seja em relação a identidade de cada acesso ou entre as metodologias de extração utilizadas.

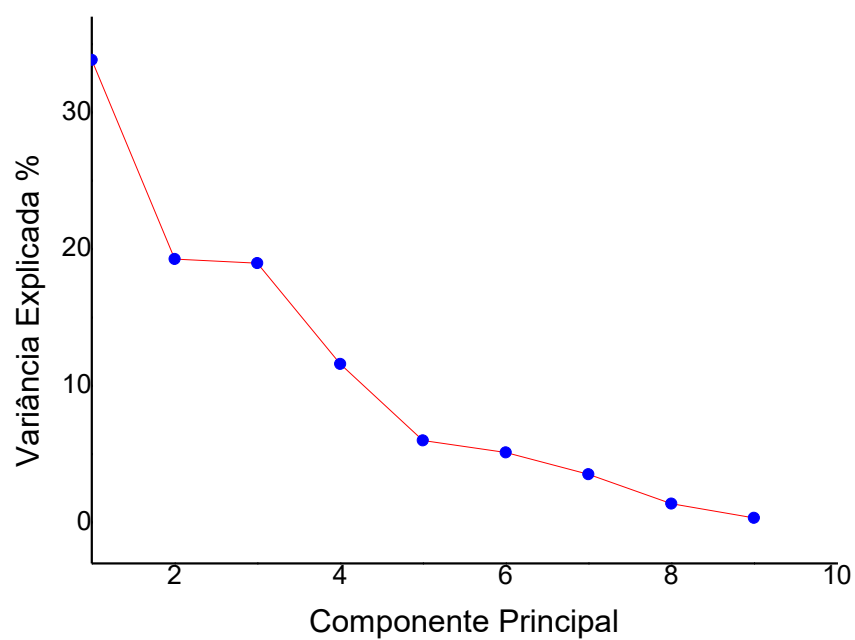
Com a análise de componente principal pode-se observar que as duas primeiras componentes, PC1 e PC2, descrevem 53,1% da variância total dos dados, sendo estas utilizadas para as análises posteriores (Tabela 15).

Tabela 15: Dados das variâncias percentuais de todas as componentes principais para as amostras analisadas por espectrometria de massas.

Componente principal	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada (%)
PC1	33,8	33,8
PC2	19,3	53,1
PC3	18,9	72,0
PC4	11,6	83,6
PC5	5,9	89,6
PC6	5,1	94,7
PC7	3,5	98,2
PC8	1,3	99,6
PC9	0,3	100,0

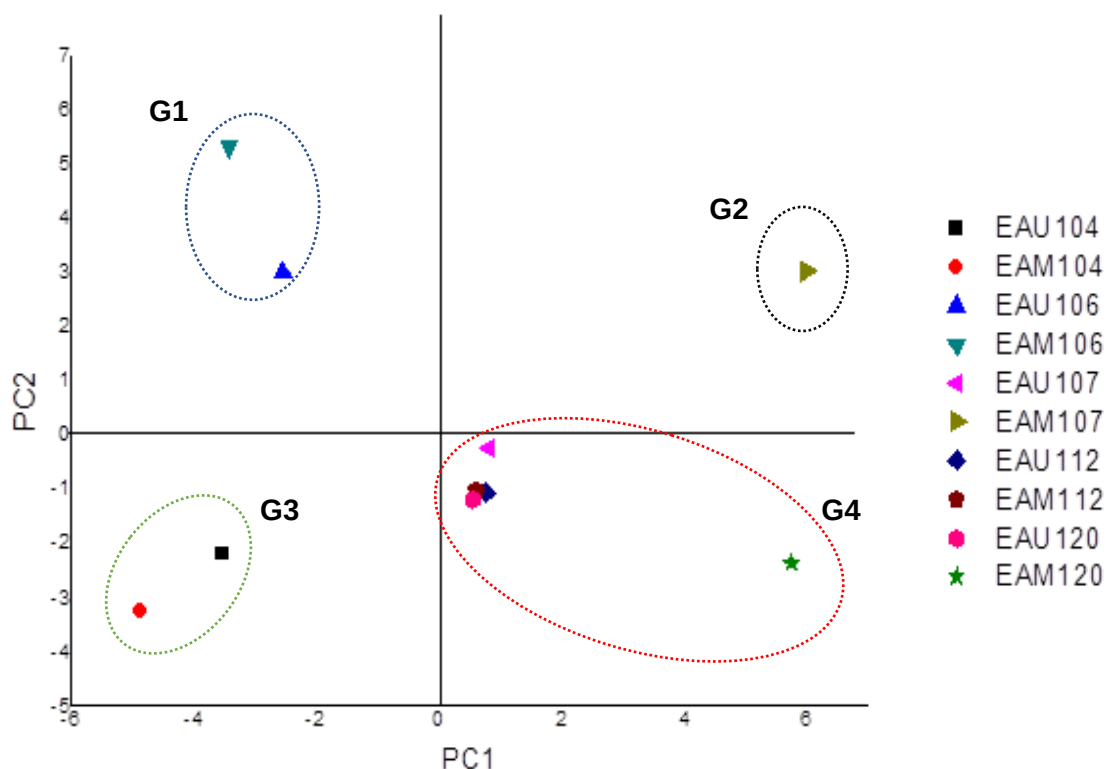
Os dados tabelados são apresentados graficamente (Figura 39), demonstrando as variâncias explicadas para cada PC estudada neste trabalho. Com isso, os resultados podem ser representados por meio de duas componentes principais, PC1 e PC2.

Figura 39: Gráfico das variâncias explicadas das PC's para as amostras analisadas por espectrometria de massas.



Na Figura 40 encontra-se representado o gráfico de *scores*, PC1 *versus* PC2, que possibilita a diferenciação entres os acessos e as metodologias empregadas neste trabalho.

Figura 40: Gráfico de scores das amostras de *C. grewioides*.



Através do gráfico de scores, podemos perceber a formação de quatro grandes grupos. O grupo 1 é formado pelos extratos, EAU e EAM, do acesso 106, com PC1 negativo e PC2 positivo; o grupo 2 é formado apenas pelo extrato EAM do acesso 107, com PC1 positivo e PC2 positivo; o grupo 3 é formado pelos extratos, EAU e EAM, do acesso 104 apresentando PC1 e PC2 negativos; enquanto que o grupo 4 é formado pelo extrato EAU do acesso 107 e pelos extratos EAU e EAM dos acessos 112 e 120, apresentando PC1 positivo e PC2 negativo.

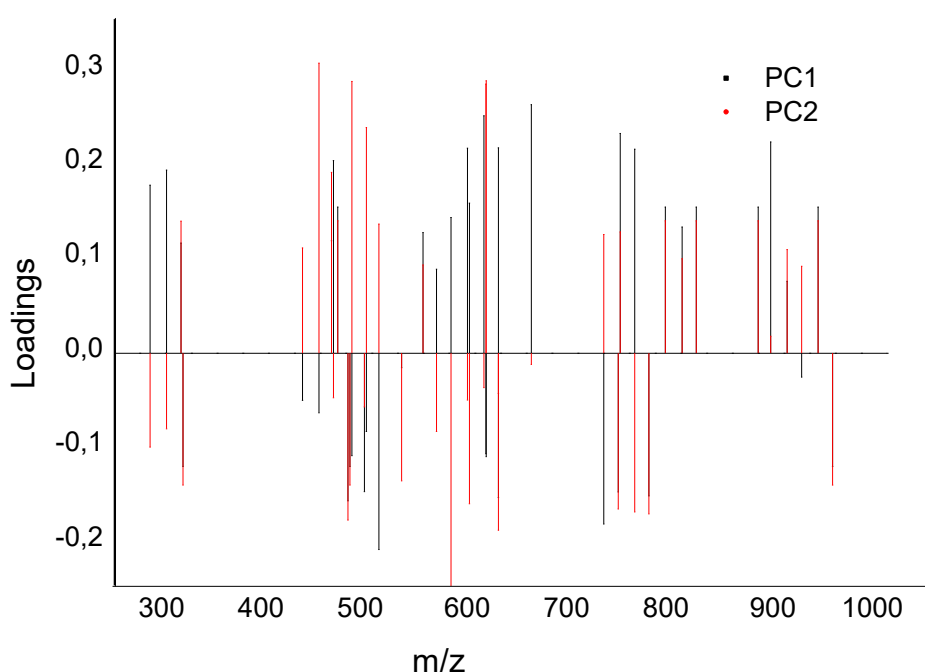
Considerando as análises por HRMS, estes resultados evidenciam que, com exceção do 107, os extratos obtidos por micro-ondas ou ultrassom são relativamente similares. Além do acesso 107, que demonstra apresentar um perfil químico diferente entre seus extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas, podemos destacar também uma significativa diferenciação entre os dois extratos do acesso 120. Embora tendo sido classificados no grupo 4, podemos perceber um distanciamento entre suas posições no quadrante de PC1 positivo e PC2

negativo. Podemos notar também que os extratos que mais se assemelharam foram aqueles provenientes do acesso 112, sugerindo um perfil químico bastante similar entre os dois extratos obtidos.

Estas diferenças e semelhanças podem ter origem tanto no modo de preparo dos extratos permitindo a extração de diferentes compostos, quanto também na identidade de cada acesso.

Para poder identificar quais são os metabólitos responsáveis pela semelhança e diferença entre estas amostras, observamos o gráfico de *loadings*, mostrado na Figura 41.

Figura 41: Gráfico de *loadings* das PC1 e PC2 das amostras analisadas por Orbitrap.



Assim, através do gráfico de *loadings* podemos identificar quais íons caracterizam cada grupo destacado no gráfico de *scores*, evidenciando suas prevalências nos diferentes extratos e fazendo uma comparação com suas origens geográficas. Isso porque o acesso 104 é o único proveniente de Poço Verde- SE, enquanto os demais acessos são originários de Poço Redondo-SE.

Desta forma, os compostos que caracterizam os extratos pertencentes ao grupo 1 são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16: Grupo 1 - Compostos característicos dos extratos EAM e EAU do acesso 106 (Grupo 1, PC1 negativo e PC2 positivo).

m/z	EAM-106, EAU-106	
	Composto	Localidade
449,07255	69a, 69b, 69c	
495,11441	76	
507,11441	77	Poço Redondo – S
611,12537	85a, 85b	09°58'06.5" W
611,16176	86	37°51'48.4"
725,19345	90	
741,18837	67	
785,19345	93	
917,23571	99a, 99b	

Na tabela 17, demonstramos os compostos que caracterizam o extrato pertencente ao grupo 2.

Tabela 17: Grupo 2 - Compostos característicos do extrato EAM do acesso 107 (Grupo 2, PC1 positivo e PC2 positivo).

m/z	EAM-107	
	Composto	Localidade
315,05103	66	
461,10893	70	
467,11950	71	
549,88590	79a, 79b	
801,20950	94	Poço Redondo – S
815,20402	95	09°58'06.5" W
875,22515	96a, 96b	37°51'48.4"
887,22515	97	
903,22006	98	
933,25175	100a, 100b, 100c	

Na tabela 18, demonstramos os compostos que caracterizam o extrato pertencente ao grupo 3.

Tabela 18: Grupo 3 - Compostos característicos dos extratos EAM e EAU do acesso 104 (Grupo 3, PC1 negativo e PC2 negativo).

EAM-104, EAU-104		
m/z	Composto	Localidade
317,03029	20	
477,10385	73a, 73b, 73c	
479,08311	74a, 74b	
481,09876	72	
493,09876	75	Poço Verde – S
529,13515	78	10°55'17.8" W
623,16176	88	37°06'04.1"
739,20910	91	
769,21967	92	
947,26740	101a, 101b, 101c	

Finamente, na tabela 19, demonstramos os compostos que caracterizam o extrato EAU do acesso 107 e os extratos EAU e EAM dos acessos 112 e 120, pertencentes ao grupo 4.

Tabela 19: Grupo 4 - Compostos característicos do extrato EAU do acesso 107 e dos extratos EAU e EAM dos acessos 112 e 120 (Grupo 4, PC1 positivo e PC2 negativo).

EAU-107, EAU-112, EAM-112, EAU-120 e EAM-120		
m/z	Composto	Localidade
285,04046	68	
301,03538	19	Poço Redondo – S
463,08820	65	09°58'06.5" W
563,17701	80	37°51'48.4"
577,13515	81a, 81b, 81c	/

593,13006	82	Poço Redondo – S
595,13046	83a, 83b	09°58'06.9" W
609,14611	84	37°51'49.1"
623,14063	87a, 87b	
655,15159	89a, 89b	
755,20402	64	

As correlações realizadas por meio da PCA permitiram separar os íons predominantes para cada conjunto de amostras em quatro grandes grupos, conforme demonstrado anteriormente. Diante disso, é possível verificar que os íons que caracterizam o grupo 1 são aqueles referentes aos metabólitos derivados de quercetina, miricetina, epigallocatequina, serigenina e canferol. Já os íons que caracterizam o grupo 2 são os derivados de quercetina, diosmetina, 2,3-diidromiricetina e canferol. O grupo 3 se difere dos outros agrupamentos pois possuem os derivados flavonoídicos de miricetina, isorrametina, mearnsitrina, quercetina e canferol. O grupo 4 apresenta íons derivados de canferol, quercetina, pinocembrina, procianidina, epigallocatequina e isorrametina. Com isso pode-se propor a presença de 10 diferentes esqueletos básicos de flavonoides, confirmando a diversidade química presente na *C. grewoides*.

É interessante observar a predominância dos derivados de quercetina e canferol em todos os quatro grupos que foram diferenciados por espectrometria de massas, corroborando com dados da literatura que demonstram a presença destes derivados em várias espécies do gênero *Croton* [105].

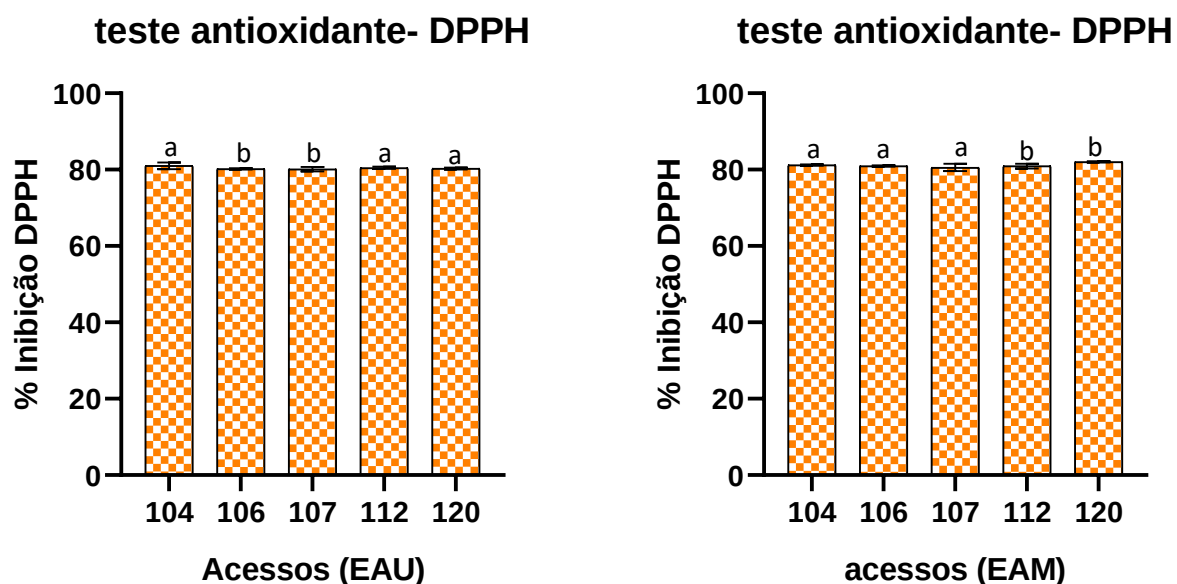
5.8 Determinação das atividades antioxidantes

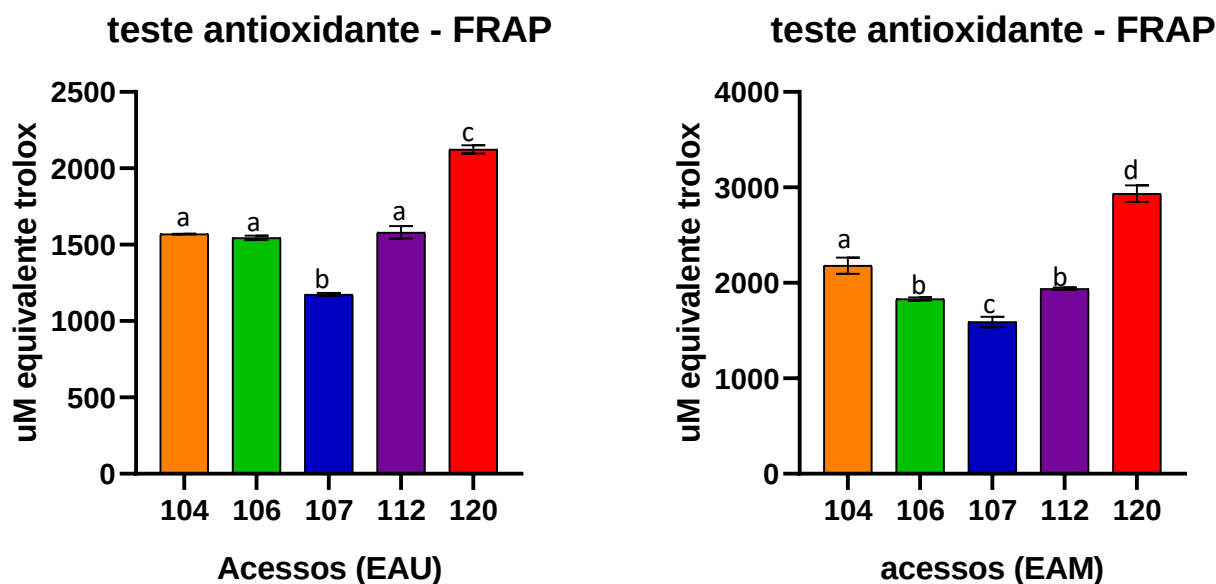
Os resultados apresentados na Figura 42 estão demonstrando os valores de percentual de inibição do radical DPPH e de equivalente trolox para o ensaio com o FRAP obtidos a partir dos extratos da espécie *C. grewoides*. Todos os ensaios apresentaram inibição superior a 80% frente a este radical.

Os resultados apresentados nos gráficos abaixo foram interpretados com o auxílio do tratamento estatísticos de teste de Tukey. Com isso, pode-se informar que pela metodologia de DPPH os extratos apresentaram inibição

superior a 80% do radical. Já pela metodologia de FRAP, foi demonstrado que os acessos interagem diferentemente com o reagente, atribuindo assim valores difusos de equivalente trolox para a reação de oxi/redução empregado neste teste.

Figura 42: Determinação da atividade antioxidante dos extratos por DPPH e FRAP. Letras minúsculas diferentes (a-d) indicam que há diferença estatística pelo Tukey ($p < 0,05$).





Vale a pena destacar que entre os extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas, aqueles provenientes do acesso 104, 112 e 120, respectivamente, apresentaram estatisticamente, pelo método de Tukey, valores de inibição do radical DPPH, demonstrando similaridade estatística.

Considerando cada acesso, podemos observar que os seus respectivos extratos obtidos pela técnica de micro-ondas apresentaram maiores percentuais de inibição do radical DPPH, valores demonstrados na tabela 20, sugerindo que esta metodologia de extração apresenta uma maior capacidade de extração de compostos capazes de inibir radicais livres.

Tabela 20: Determinação da atividade antioxidante dos extratos por DPPH e FRAP.

Acessos	DPPH (% inibição)		FRAP (μ M eq. Trolox)	
	EAU	EAM	EAU	EAM
104	81,02 $\pm$ 0,87	81,20 $\pm$ 0,15	1569,78 $\pm$ 1,92	2180,89 $\pm$ 84,94
106	80,21 $\pm$ 0,15	80,93 $\pm$ 0,15	1545,33 $\pm$ 14,53	1832,00 $\pm$ 17,64
107	80,12 $\pm$ 0,56	80,58 $\pm$ 0,93	1174,22 $\pm$ 10,72	1590,89 $\pm$ 55,21

112	80,48±0,31	80,93±0,62	1580,89±40,32	1939,78±13,47
120	80,30±0,27	82,01±0,15	2124,22±26,94	2935,33±86,67

Com relação aos resultados obtidos das atividades antioxidantes utilizando a metodologia de FRAP, os extratos mais promissores foram aqueles obtidos pelo método de micro-ondas, corroborando com o resultado do DPPH, possibilitando afirmar que esta metodologia de extração permite a recuperação de compostos com maior propriedade de oxirredução, neste caso, e consequentemente maior poder antioxidante.

Analizando as metodologias para a determinação da atividade antioxidante é correto afirmar que ambas as extrações apresentaram resultados interessantes para os ensaios de DPPH e FRAP, embora as extrações por meio da utilização do micro-ondas tenham se destacado por apresentar resultados superiores quando comparado com a técnica de ultrassom.

Dentre todos os extratos obtidos por micro-ondas, merece destaque os extratos do acesso 120, o qual apresentou melhores resultados para atividade antioxidante para as duas metodologias. Esta atividade está relacionada aos seus constituintes químicos predominantes, que se caracterizam pelos íons referentes aos compostos 68, 19, 65, 80, 81 (a, b, c), 82, 83 (a, b), 84, 87 (a, b) 89 (a, b) e 64 mostrados na Tabela 21.

Tabela 21: Valores das abundâncias relativas dos íons característicos dos acessos 107, 112 e 120 obtidos por ultrassom e os acessos 112 e 120 obtidos por micro-ondas

Composto	m/z	EAU	EAU	EAM	EAU	EAM
		107	112	112	120	120
Abundância relativa						
68	285,04046	0,28	0,19	2,03	0,96	10,49
19	301,03538	5,75	9,84 ??	18,08	8,52	76,81

65	463,0882	20,61	41,84	34,60	27,35	87,03
80	563,17701	5,21	2,3	1,98	2,08	2,37
81a, 81b, 81c	577,13515	1,55	4,06	3,95	4,27	8,28
82	593,13006	1,65	1,34	3,51	1,41	9,20
83a, 83b	595,13046	0,87	6,21	4,74	4,84	10,75
84	609,14611	18,43	19,88	15,8	14,4	35,49
87a, 87b	623,14063	-	-	1,47	-	4,01
89a, 89b	655,15159	0,87	0,73	0,59	0,64	1,14
64	755,20402	8,18	10,53	9,06	8,89	18,37

Conforme pode-se observar na Tabela 21, com exceção do composto 18, todos os compostos que caracterizam o grupo G4, mencionados acima, apresentam valores de abundâncias relativas maiores para o extrato de micro-ondas do acesso 120. Isto sugere que não somente sua presença, mas também suas maiores abundâncias ocasionam a maior atividade antioxidante observada para este extrato.

6 Conclusão

O método de preparação de extratos vegetais é um dos fatores que afeta seus efeitos biológicos. No entanto, métodos tradicionais de extração como maceração e soxhlet, estão sendo cada vez menos empregados para a obtenção de metabólitos secundários de plantas, uma vez que envolvem o uso de uma quantidade grande de solventes, de tempo e de altas temperaturas. Por conta disso, há uma grande possibilidade de geração de artefatos oriundos de solvólises, oxidações e degradações térmicas e fotoquímicas.

Neste contexto surgem as metodologias de extração mais modernas que aliam menor tempo de extração, menor custo e que sejam ambientalmente amigáveis. As extrações assistidas por ultrassom e micro-ondas se encaixam nesta categoria e, por isso, estão sendo muito utilizadas para estudos fitoquímicos.

Neste trabalho foram empregados modelos de planejamento experimentais para determinar qual metodologia seria mais eficiente para a extração de compostos antioxidantes da espécie *Croton grewioides*. Para isso, levou-se em consideração os rendimentos dos extratos obtidos e suas respostas de teor de fenólicos totais. Após a otimização dos métodos de extração, foi possível obter os perfis cromatográficos de todos os extratos obtidos a partir de cinco acessos desta espécie os quais, com a ajuda das análises quimiométricas, percebemos diferenças entre os extratos baseados na identidade de cada acesso e/ou na metodologia de extração empregada. De todas as observações a que merece destaque é a separação dos extratos obtidos por ultrassom e micro-ondas para três acessos, o 107, 112 e o 120; enquanto que os perfis químicos dos extratos dos acessos 104 e 106 não mostraram diferenças entre as duas metodologias de extração empregadas. Vale ressaltar que estas observações estão atreladas ao tipo de detector utilizado nas análises cromatográficas, que no nosso caso foi o arranjo de diodos e, por isso, permite apenas detectar compostos que apresentam cromóforos.

A partir da utilização do perfil químico, baseado no espectro de massas de alta resolução, obtido para todos os extratos, pôde-se verificar um resultado que atingiu, de forma geral, uma certa semelhança com o obtido através dos perfis cromatográficos. Novamente, percebeu-se o agrupamento entre os dois extratos dos acessos 104 e 106 entre si, demonstrando que para estes acessos o método de extração não influenciou no perfil químico de forma muito significativa. A diferença mais expressiva foi a separação do extrato obtido por micro-ondas do acesso 107 em relação ao obtido por ultrassom, sendo este último mais similar aos extratos de ultrassom e micro-ondas dos acessos 112 e 120.

Considerando que a análise por espectrometria massas de alta resolução é muito mais abrangente do que uma análise por ultravioleta, seria mais correto, a partir de então, afirmarmos que os acessos 107, 112 e 120 são realmente acessos muito próximos do ponto de vista genético, com ressalva apenas para o extrato de micro-ondas do acesso 107 que se diferenciou dos demais. Adicionalmente a isso, pode-se sugerir que os acessos 104 e 106 devem apresentar características genéticas que os diferem dos demais.

Estas semelhanças e diferenças, evidenciadas acima, entre os extratos podem ter diversas origens. Uma delas é a individualidade de cada acesso, que precisa ser melhor avaliada através de estudos genéticos em colaboração com o grupo do Professor Dr. Arie Fitzgerald Blank, que é o responsável pelo fornecimento deste material vegetal. Outros efeitos causadores das semelhanças e diferenças entre estes perfis químicos podem advir de fatores como disponibilidade hídrica, radiação UV, época de coleta da planta, altitude, solo e local de origem entre outros. No entanto, neste caso se fará necessário novas investigações para conclusões mais precisas.

Neste trabalho pôde-se, também, sugerir que o uso da metodologia de extração por micro-ondas é a mais adequada quando se deseja extrair compostos antioxidantes de *C. grewioides*, pois todos os extratos provenientes destas extrações se mostraram mais eficazes tanto no teste de DPPH quanto no de FRAP.

Com relação aos metabólitos secundários mais comuns nesta espécie, pôde-se propor que aqueles flavonoides derivados da quercetina e canferol predominam em todos os acessos, independentemente do método de extração utilizado. Embora ainda sejam necessários mais estudos, podemos concordar com os relatos de alguns autores que sugerem que os flavonoides glicosilados podem ser utilizados como diagnósticos do gênero *Croton*.

Finalmente, como primeiro trabalho utilizando estes métodos de extração modernos para o estudo químico de *C. grewioides*, e também de sua submissão às análises por espectrometria de massas de alta resolução permitindo a sugestão de quarenta e um compostos nesta espécie, acredita-se que este estudo auxiliará diversos estudos futuros que culminará em um maior conhecimento desta espécie e também do gênero *Croton*, que é bastante escasso na literatura.

7 Perspectivas futuras

Todos os extratos apresentados neste trabalho serão submetidos a testes biológicos/farmacológicos para avaliação de suas atividades frente a células antitumorais, poder antidiabético e sua ação parasitária, considerando relatos na

literatura que confirmam estas atividades para os derivados de fenólicos presentes nesta espécie. Além disso, será realizado o estudo estatístico de PCA com cromatogramas *fingerprint* dos extratos realizados em quadruplicatas, pois só assim pode-se confirmar que a metodologia de análise é robusta.

Infelizmente, por conta da Pandemia a realização destas análises em quadruplicata ficou impossibilitada. Quando a situação dos casos de COVID-19 se estabilizou em nosso Estado e as atividades laboratoriais foram retomadas, o ar condicionado do laboratório onde se situa o Cromatógrafo Líquido quebrou, não sendo oportuno que se colocasse o equipamento em funcionamento, por poder gerar superaquecimento. Tão logo esta situação se resolva, realizaremos as análises em quadruplicata para que nossos resultados possam ter mais valor científico, já que estatisticamente é o mais correto.

Pretende-se, também, analisar os extratos via Cromatografia Líquida acoplada ao espectrômetro de massas, pois só assim poderemos informar com mais precisão quais compostos realmente fazem parte do perfil químico desta espécie. Por conta do tempo curto que tínhamos a partir da necessidade de se modificar nosso plano de trabalho, esta análise foi impossível pois necessitava de um maior tempo para as análises. No entanto, com o conhecimento prévio alcançado neste trabalho, acredita-se que esta atividade se tornará possível em um futuro bem próximo, levando a resultados ainda mais interessantes.

8 Referências

- [1] Vyas, S.; Kotharia, S. L.; Kachhwaha., S. Nootropic. Medicinal Plants: Therapeutic Alternatives For Alzheimer's Disease. *J. Herb. Med.*, **2019**, 17.
- [2] Chukwuma, C. I.; Matsabisa, M. G.; Ibrahim, M. A.; Erukainure, O. L.; Chabalala, M. H.; Islamc., M. S. Medicinal Plants With Concomitant Anti-Diabetic And Anti-Hypertensive Effects As Potential Sources Of Dual Acting Therapies Against Diabetes And Hypertension: A Review. *J. Ethnopharmacol.*, **2019**, 235, 329–360.
- [3] Benarba, B.; Pandiella., A. Colorectal Cancer And Medicinal Plants: Principle Findings From Recent Studies. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, 107, 408–423.
- [4] Erhabor, C. R.; Erhabor, J. O.; McGaw., L. J. The Potential Of South

African Medicinal Plants Against Microbial Biofilm And Quorum Sensing Of Foodborne Pathogens: A Review. *South African J. Bot.*, **2019**, 126, 214–231.

[5] Thakur, M.; Bhattacharya, S.; Khosla, P. K.; Puri, S. Improving Production Of Plant Secondary Metabolites Through Biotic And Abiotic Elicitation. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, **2019**, 12, 1–12.

[6] Ribeiro, V. R.; Fernandes, I. De A. A.; Mari, I. P.; Stafussa, A. P.; Rossetto, R.; Maciel, G. M.; Haminiuk, C. W. I. Bringing Together *Saccharomyces Cerevisiae* And Bioactive Compounds From Plants: A New Function For A Well-Known Biosorbent. *J. Funct. Foods*, **2019**, 60.

[7] Saucedo-Pompa, S.; Torres-Castillo, J. A.; Castro-López, C.; R. Rojasa, E. J. S.-A.; Ngangyo-Heya, M.; Martínez-Ávila, G. C. G. Moringa Plants: Bioactive Compounds And Promising Applications In Food Products. *Food Res. Int.*, **2018**, 111, 438–450.

[8] Wanga, J. .; Wanga, J. .; Yea, J. .; Vanga, S. K. .; Raghavana, V. Influence Of High-Intensity Ultrasound On Bioactive Compounds Of Strawberry Juice: Profiles Of Ascorbic Acid, Phenolics, Antioxidant Activity And Microstructure. *Food Control*, **2019**, 96, 128–136.

[9] Bruno, S. F. .; Ekorong, F. J. A. A. .; Karkal, S. S. .; Cathrine, M. S. B. .; Kudrea, T. G. Green And Innovative Techniques For Recovery Of Valuable Compounds From Seafood By-Products And Discards: A Review. *Trends Food Sci. Technol.*, **2019**, 85, 10–12.

[10] Anastas, P. T. .; Kirchhoff, M. M. Origins, Current Status, And Future Challenges Of Green Chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **2002**, 35, 686–694.

[11] Tundo, P. .; Griguol, E. Green Chemistry For Sustainable Development. *Chem. Int.*, **2018**, 40, 18–24.

[12] Correa, A. G. .; Zuin, V. G. Química Verde: Fundamentos E Aplicações. In *Introdução À Química Verde*; São Carlos: Edufscar, 2009; Pp 9–22.

[13] To, M. H.; Uisan, K.; Ok, Y. S.; Pleissner, D.; Lin, C. S. K. Recent Trends In Green And Sustainable Chemistry: Rethinking Textile Waste In A Circular Economy. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **2019**, 20, 1–10.

[14] Marco, B. A. De; Rechelo, B. S.; Tótolí, E. G.; Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N. Gandolpho Tótolí, Ana Carolina Kogawa, Hérica Regina Nunes Salgado. Evolution Of Green Chemistry And Its Multidimensional Impacts: A Review. *Saudi Pharm. J.*, **2019**, 27, 1–8.

- [15] Mena-García, A.; Ruiz-Matute, A. I.; Soria, A. C.; Sanz., M. L. Green Techniques For Extraction Of Bioactive Carbohydrates. *Trends Anal. Chem.*, **2019**, *119*, 115612.
- [16] Armenta, S.; Garrigues, S.; Esteve-Turrillas, F. A.; Guardia., M. De La. Green Extraction Techniques In Green Analytical Chemistry. *Rends Anal. Chem.*, **2019**, *16*, 248–253.
- [17] Mirzadeha, M.; Arianejadb, M. R.; Khedmat., L. Antioxidant, Antiradical, And Antimicrobial Activities Of Polysaccharides Obtained By Microwave-Assisted Extraction Method: A Review. *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 229.
- [18] Vinatoru, M.; Mason, T. J.; Calinescu., I. Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) And Microwave Assisted Extraction (MAE) Of Functional Compounds From Plant Materials. *Trends Anal. Chem.*, **2017**, *97*, 159–178.
- [19] Kumar, M.; Dahuja, A.; Sachdev, A.; Kaur, C.; Varghes, E.; Saha, S.; Sairam., K. V. S. S. Evaluation Of Enzyme And Microwave-Assisted Conditions On Extraction Of Anthocyanins And Total Phenolics From *Black soybean (Glycine Max L.)* Seed Coat. *International. J. Biol. Macromol.*, **2019**, *135*, 1070–1081.
- [20] Rodsamran, P.; Sothornvit., R. Extraction Of Phenolic Compounds From Lime Peel Waste Using Ultrasonicassisted And Microwave-Assisted Extractions. *Food Biosci.*, **2019**, *28*, 66–73.
- [21] Cravotto, G.; Boffa, L.; Mantegna, S.; Perego, P.; Avogadro, M.; Cintas., P. Improved Extraction Of Vegetable Oils Under High-Intensity Ultrasound And/Or Microwaves. *Ultrason. Sonochem.*, **2008**, *15*, 898–902.
- [22] Wen, C.; Zhang, J.; Zhang, H.; Dzah, C. S.; Zandile, M.; Duan, Y.; Ma, H.; Luo., X. Advances In Ultrasound Assisted Extraction Of Bioactive Compounds From Cash Crops – A Review. *Ultrason. - Sonochemistry*, **2018**, *48*, 538–549.
- [23] Trojanowska, A.; Tsibranska, I.; Dzhonova, D.; Wroblewska, M.; Haponska, M.; Jovancic, P.; Marturano, V.; Tylkowski., B. Ultrasound-Assisted Extraction Of Biologically Active Compounds And Their Successive Concentration By Using Membrane Processes. *Chem. Eng. Res. Des.*, **2019**, *147*, 378–389.
- [24] Cavalaro, R. I.; Cruz, R. G. Da; Dupont, S.; Bell, J. M. L. N. De M.; Vieira., T. M. F. De S. In Vitro And In Vivo Antioxidant Properties Of Bioactive Compounds From Green Propolis Obtained By Ultrasound-Assisted Extraction.

Food Chem. X, **2019**, 4.

- [25] Goltz, C.; Ávila, S.; Barbieri, J. B.; Igarashi-Mafra, L.; Mafra, M. R. Ultrasound-Assisted Extraction Of Phenolic Compounds From Macela (*Achyrocline satureioides*) Extracts. *Ind. Crop. Prod.*, **2018**, 115, 227–234.
- [26] Diasa, J. L.; Mazzutti, S.; Souzac, J. A. L. De; Ferreirab, S. R. S.; Soaresc, L. A. L.; Stragevitcha, L.; Danielskia, L. Extraction Of Umbu (*Spondias Tuberosa*) Seed Oil Using CO₂, Ultrasound And Conventional Methods: Evaluations Of Composition Profiles And Antioxidant Activities. *J. Supercrit. Fluids*, **2019**, 145, 10–18.
- [27] Mašković, P. Z.; Veličković, V.; Đurović, S.; Zeković, Z.; Radojković, M.; Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Milan Mitić, J. V. . . Biological Activity And Chemical Profile Of *Lavatera thuringiaca* L. Extracts Obtained By Different Extraction Approaches. *Phytomedicine*, **2018**, 38, 118–124.
- [28] Aleksandra, C.; Švarc-Gajić, J.; Zeković, Z.; Mašković, P.; Đurović, S.; Zengin, G.; Delerue-Matos, C.; Lozano-Sánchez, J.; Jakšića., A. Chemical And Biological Insights On Aronia Stems Extracts Obtained By Different Extraction Techniques: From Wastes To Functional Products. *J. Supercrit. Fluids*, **2017**, 128, 173–181.
- [29] Mašković, P.; Veličković, V.; Mitić, M.; Đurović, S.; Zeković, Z.; Radojković, M.; Cvetanović, A.; Švarc-Gajić, J.; Vujić., J. No Title summer Savory Extracts Prepared By Novel Extraction Methods Result In Enhanced Biological Activity. *Ind. Crop. Prod.*, **2017**, 109, 875–881.
- [30] Anzardi, M. B.; Arancibia, J. A.; Oliveira, A. C. Processing Multi-Way Chromatographic Data For Analytical Calibration, Classification And Discrimination: A Successful Marriage Between Separation Science And Chemometrics. *Trends in Analytical Chemistry*, **2021**, 134, 11612.
- [31] Shafii, N. Z.; Saudi, A. S. M.; Pang, J. C.; Abu, I. F.; Sapawe, N.; Kamarudin, Hammad, M. K. A.; Saud, F. M.; Application Of Chemometrics Techniques To Solve Environmental Issues In Malaysia. *Heliyon* 5, **2019**, E02534.
- [32] Prado, V. M.J.; Jesus, R.A.; Oliveira, J.M.A.; Pereira, C.S.A.; Blank, A.F.; Pereira-Filho, E.R.; Cass, Q.B.; Lima, J.M.; Ferreira, A.G.; Nogueira, P.C.L. E Moraes, V.R.S. Evaluation Of The Seasonality And Extraction Method On The Polar Extracts Of *Croton grewoides* Baill. By Chromatogram Fingerprinting And Isolation Of A New Triglycosylated Flavonoid *J. Braz. Chem. Soc.*, **2021**, 32, 385-

394.

- [33] Xin, Z.; Ma, S.; Ren, D.; Liu, W.; Hana, B.; Zhang, Y.; Xiao, J.; Yi, L.; Deng, B. UPLC–Orbitrap–MS/MS Combined With Chemometrics Establishes Variations In Chemical Components In Green Tea From Yunnan And Hunan Origins, *Food Chemistry*, **2018**, 266, 534–544.
- [34] Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. A.; De Carvalho, V. S.; Da Silva, E. G. P.; Queiroz, A. F. S.; Felix, C. S. A.; Da Silva, D. L. F.; Dourado, G. B.; Oliveira, R. V. Multivariate Optimization Techniques In Analytical Chemistry - An Overview. *Microchemical Journal*, **2018**, 140, 176–182.
- [35] Kalogiouri, N. P.; Aalizadeh, R.; Dasenaki, M. E.; Thomaidis, N. S. Application Of High Resolution Mass Spectrometric Methods Coupled With Chemometric Techniques In Olive Oil Authenticity Studies - A Review. *Analytica Chimica Acta*, **2020**, 1134, 150-173.
- [36] Andrew, R.; Homer, N. Z. M. Mass Spectrometry: Future Opportunities For Profiling And Imaging Steroids And Steroid Metabolites. *Current Opinion In Endocrine And Metabolic Research*, **2020**, 15, 71–78.
- [37] Freitas, L. S. Energia Da Biomassa: Termoconversão E Seus Produtos. 1 Ed. - Curitiba: Brazil Publishing, 2020.
- [38] Makarov, A. Captura Orbital Eletrostática Axialmente Harmônica: Uma Técnica De Análise De Massa De Alto Desempenho. *Química Analítica*, **2000**, 72, 1156–62.
- [39] Hu, Q; Noll, RJ; Li, H; Makarov, A; Hardman, M; Graham Cooks, R. The Orbitrap: Um Novo Espectrômetro De Massa. *Journal Of Mass Spectrometry*, **2005**, 40, 430–43.
- [40] Termo Fisher. Orbitrap Exploris 240. <https://Planetorbitrap.Com/Orbitrap-Exploris-240> (Acessada Em 29 De Dezembro De 2020).
- [41] Fraga, L. N.; Oliveira, A. K. S.; Aragão, B. P.; Souza, D. A.; Santos, E. W. P.; Melo, J. A.; Silva, A. M. O.; Wisniewski Jr, A.; Corrêa, C. B.; Wartha, E. R. S. A.; Bacci, L.; Carvalho, I. M. M. Mass Spectrometry Characterization, Antioxidant Activity, And Cytotoxicity Of The Peel And Pulp Extracts Of Pitomba. *Food Chemistry*, 2021, 340, 127929.
- [42] Cai, R.; Yuana, Y.; Cui, L.; Wang, Z.; Yue, T. Cyclodextrin-Assisted Extraction Of Phenolic Compounds: Current Research And Future Prospects. *Trends Food Sci. Technol.*, **2018**, 79, 19–27.

- [43] Setford, P. C.; Jeffery, D. W.; Grbin, P. R.; Muhlack, R. A. Factors Affecting Extraction And Evolution Of Phenolic Compounds During Red Wine Maceration And The Role Of Process Modelling. *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, 69, 106–117.
- [44] Martins, S.; Mussatto, S. I.; Martínez-Avila, G.; Montañez-Saenz, J.; Aguilar, C. N.; Teixeira, J. A. Bioactive Phenolic Compounds: Production And Extraction By Solid-State Fermentation. A Review. *Biotechnol. Adv.*, **2011**, 29, 365–373.
- [45] Meng, D.; Zhang, P.; Li, S.; Ho, C.-T.; Zhao, H. Antioxidant Activity Evaluation Of Dietary Phytochemicals Using *Saccharomyces cerevisiae* As A Model. *J. Funct. Foods*, **2017**, 38, 36–44.
- [46] Martelli, G.; Giacomini, D. Antibacterial And Antioxidant Activities For Natural And Synthetic Dualactive Compounds. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 158, 91–105.
- [47] Pires, T. C. S. P.; Dias, M. I.; Barros, L.; Calhelha, R. C.; Alves, M. J.; M. Oliveira, B. P. P.; Buelga, C. S.; Ferreira, I. C. F. R. Edible Flowers As Sources Of Phenolic Compounds With Bioactive Potential. *Food Res. Int.*, **2018**, 105, 580–588.
- [48] Xia, E. .; Deng, G. .; Guo, Y. .; H, L. Biological Activities Of Polyphenols From Grapes. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11, 622–646.
- [49] Albert, N. W.; Thrimawithana, A. H.; Mcghie, T. K.; Clayton, W. A.; Deroles, S. C.; Schwinn, K. E.; Davies, K. M. Genetic Analysis Of The Liverwort *Marchantia Polymorpha* Reveals That R2R3MYB Activation Of Flavonoid Production In Response To Abiotic Stress Is An Ancient Character In Land Plants. *New Phytologist*, **2018**. 218, 554–566.
- [50] Ma, D.; Reichelt, M.; Yoshida, K.; Gershenzon, J.; Constabel, C. P. Two R2R3-MYB Proteins Are Broad Repressors Of Flavonoid And Phenylpropanoid Metabolism In Poplar. *The Plant Journal*, **2018**,. Doi:10.1111/Tpj.14081
- [51] Dewick, Paul M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. – 2nd Ed. 2002 John Wiley & Sons Ltd
- [52] Pires, J. S., Torres, P. B., Dos Santos, D. Y. A. C., Chow, F., Ensaio Em Microplaca De Substâncias Redutoras Pelo Método Do Folin-Ciocalteu Para Extratos De Algas. *Instituto De Biociência, Universidade De São Paulo*, 2017

- [53] Markhan, K.R. Techniques Of Flavonoid Identification. Academic Press: London, **1982**, 113p.
- [54] Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Gomes, T.L.B.; Cardoso, K.C.M.; Albuquerque, U.P.; Amorim, E.L.C. Teor De Flavonóides Totais Em Produtos Contendo Pata-De-Vaca (*Bauhinia* L.) Comercializados Em Farmácias De Recife/PE. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **2012**, *14*, 586-591.
- [55] Mabry T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. The Systematic Identification Of Flavonoids. Springer: Berlin, 1970. P.51-2.
- [56] Milevskaya, V.V.; Prasad, S.; Temerdashev, Z.A. Extraction And Chromatographic Determination Of Phenolic Compounds From Medicinal Herbs In The Lamiaceae And Hypericaceae Families: A Review. *Microchemical Journal*, **2019**, *145*, 1036-1049
- [57] Kasangana, P. B.; Hoda M. Eid, A. N.; Stevanovic, T.; Haddad., P. S. Further Isolation And Identification Of Anti-Diabetic Principles From Root Bark Of *Myrianthus arboreus* P. Beauv.: The Ethyl Acetate Fraction Contains Bioactive Phenolic Compounds That Improve Liver Cell Glucose Homeostasis. *J. Ethnopharmacol.*, **2019**, *245*, 112167.
- [58] Schmitt, M.; Magid, A. A.; Hubert, J.; Etique, N.; Duca, L.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Bio-Guided Isolation Of New Phenolic Compounds From *Hippocrepis emerus* Flowers And Investigation Of Their Antioxidant, Tyrosinase And Elastase Inhibitory Activities. *Phytochem. Lett.*, **2020**, *35*, 28–36.
- [59] Russo, M.; Moccia, S.; Spagnuolo, C.; Tedesco, I.; Russo, G. L. Roles Of Flavonoids Against Coronavirus Infection. *Chemico-Biological Interactions*, **2020**, *328*, 109211
- [60] Rameshkumar, M. R.; Indu, P.; Arunagirinathan, N.; Venkatadri, B.; El-Serehy, H. A.; Ahmad, A. Computational Selection Of Flavonoid Compounds As Inhibitors Againstsars-Cov-2 Main Protease, RNA-Dependent RNA Polymerase And Spikeproteins: A Molecular Docking Study. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, **2021**, *28*, 448–458
- [61] Loganayaki N, Siddhuraju P, Manian S. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Of Phenolic Extracts From *Helicteres Isora* L. And *Ceiba Pentandra* L. *J Food Sci Technol*. **2013**, *50*, 687-695.

- [62] Zhao, B.; Wang, X.; Liu, H.; Lv, C.; Lu, J. Structural Characterization And Antioxidant Activity Of Oligosaccharides From *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *International Journal Of Biological Macromolecules*, **2020**, *150*, 737–745.
- [63] Oliveira, G.L.S. Determinação Da Capacidade Antioxidante De Produtos Naturais In Vitro Pelo Método Do DPPH•: Estudo De Revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **2015.**, *17*, 36-44,
- [64] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability Of Plasma (FRAP) As A Measure Of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **1996**, *239*, 70–76.
- [65] Urrea-Victoria, V.; Pires, J.; Torres, P. B.; Dos Santos, D. Y. A. C.; Chow, F. Ensaio Antioxidante Em Microplaca Do Poder De Redução Do Ferro (FRAP) Para Extratos De Algas. *Instituto De Biociências*, Universidade De São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
- [66] Crepaldi, C. G.; Campos, J. L. A.; Albuquerque, U. P.; Sales, M. F. Richness And Ethnobotany Of The Family Euphorbiaceae In A Tropical Semiarid Landscape Of Northeastern Brazil. *South African J. Bot.*, **2016**, *102*, 157–165.
- [67] Oliveira, D. G. A Família Euphorbiaceae Juss. Em Um Fragmento De Caatinga Em Sergipe. *Sci. Plena*, **2013**, *9*, 1–7.
- [68] Govaerts, R.; Frodin, D. G.; Radeliffe-Smith, A. Euphorbiaceae: *Croton* A Excoecariopsis Lista De Verificação Mundial De Euphorbiaceae (E Pandaceae). *R. Bot. Gard. Kew*, **2000**, *2*, 417–536.
- [69] Lucena, M. F. A. .; Alves, M. Notas Taxonômicas Para Euphorbiaceae S.L. Do Nordeste Do Brasil. *Hoehnea*, **2010**, *37*, 71–85.
- [70] Sátiro, L. N. .; Roque, N. A Família Euphorbiaceae Nas Caatingas Arenosas Do Médio Rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta Bot. Bras*, **2008**, *22*, 99–118.
- [71] Trindade, M. J. S. .; Lameira, O. A. A. Espécies Úteis Da Família Euphorbiaceae No Brasil. *Rev. Cuba. Plantas Med.*, **2014**, *19*, 292-309.
- [72] Salatino, A.; Salatino, F.; Negri., G. Traditional Uses, Chemistry And Pharmacology Of *Croton* Species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* [Online]., **2007**, *18*, 11–33.
- 2017**, *96*, 384–395.
- [73] Shantabi, L.; Jagetia, G. C.; Moirangthem, D. S.; Nongalleima, K. Anticancer Activity Of An Ehnomedicinal Plant *Croton caudatus* Geiseler, Kam

Sabut In Cultured Hela Cells,. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **2020**.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101500>.

[74] Silva, I. A. T. De A. R.; Da, R.; Silva, A. G. Da; Milet-Pinheiro, P.; Paiva, P. M. G.; Navarro, D. M. Do A. F.; Silva, M. V. Da; Napoleão, T. H.; Correia, M. T. Dos S. Chemical Characterization And Insecticidal Effect Against *Sitophilus Zeamais* (Maize Weevil) Of Essential Oil From *Croton rudolphianus* Leaves. *Crop Prot.*, **2020**, 129, 105043.

[75] Sadgrove, N.J.; Madeley, L.G.; Wyk, B. E. V. Volatiles From African Species Of *Croton* (Euphorbiaceae), Including New Diterpenes In Essential Oil From *Croton Gratissimus*. *Heliyon* 5, **2019**, 5 (10), E02677.

[76] Ramos, J. M. O.; Santos, C. A. ; Santana, D. G. ; Santos, D. A. ; Alves, P. B.; Thomazzi, S. M.. Chemical Constituents And Potential Anti-Inflammatory Activity Of The Essential Oil From The Leaves Of *Croton argyrophyllus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*, **2013**, 23, 644-650.

[77] Araujo, S. S. ; Santos, M. ; Dias, A. ; Ferro, J. ; Barreto, E. O. ; Correa, C. B.; Shan, A. ; Santana, A. E. G. ; Thomazzi, S. M. ; Antoniolli, A. R. ; Estevam, C. S. Chemical composition and cytotoxicity analysis of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth. *The Journal of Essential Oil Research*, **2014**, 26, 446-451.

[78] Amaral, R. G. ; Andrade, L. N. ; Severino, P. ; Araújo, S. S. ; Santos, M. I. S.; Lima, C. A. ; Moraes, M. O. ; Pessoa, C. O. ; Carvalho, A. A. ; Thomazzi, S. M. ; Estevam, C. S. Investigation of the possible antioxidant and anticancer effects of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae). *Chem. Eng. Trans.*, **2018**, 64, 2-6.

[79] Firmino, N. C. S.; Alexandre, F. S. O.; Vasconcelos, M. A. De; Pinheiro, A. A.; Arruda, F. V. S.; Guedes, M. L. S.; Silveira, E. R.; Teixeira, E. H. Diterpenes Isolated From *Croton blanchetianus* Baill: Potential Compounds In Prevention And Control Of The Oral *Streptococci* biofilms. *Ind. Crop. Prod.*, **2019**, 131, 371–377.

[80] Queiroz, S. A. S.; Pinto, M. E. F.; Bobey, A. F.; Russo, H. M.; Batista, A. N. L.; Jr., J. M. B.; Codo, A. C.; Medeiros, A. I.; Bolzani, V. S. Diterpenoids With Inhibitory Activity Of Nitrite Production From *Croton floribundus*. *J. Ethnopharmacol.*, **2020**, 249, 112320.

- [81] Castro, K. N. De C.; Chagas, A. C. De S.; Costa-Júnior, L. M.; Canuto, K. M.; Brito, E. S. De; Rodrigues, T. H. S.; Andrade, I. M. De. Acaricidal Potential Of Volatile Oils From *Croton* Species On *Rhipicephalus Microplus*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2019**, 29, 811–815.
- [82] Martins, A. O. B. P. B.; Rodrigues, L. B.; Cesário, F. R. A. S.; Oliveira, M. R. C. De; Tintino, C. D. M.; Castro, F. F. E; Alcântara, I. S.; Fernandes, M. N. M.; Albuquerque, T. R. De; Silva, M. S. A. Da; Et Al. Anti-Edematogenic And Anti-Inflammatory Activity Of The Essential Oil From *Croton rhamnifolioides* Leaves And Its Major Constituent 1,8-Cineole (Eucalyptol). *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 96, 384-395.
- [83] Jiménez, R. V. .; Mendoza, D. V. .; De-Lucio, J. A. G. .; Montiel, S. G. .; Ibarra, J. R. V. Three Novel Epoxy-Clerodanes Bearing A Furan Ring From *Croton hypoleucus*. *Phytochem. Lett.*, **2018**, 24, 21–26.
- [84] Yang, L. .; Bo, Z. Y. .; Feng, C. L. .; Hua, C. N. .; Nan, W. Z. .; Qi, J. S. .; Qiang, L. G. .; L.Y.; L.; Cai, W. G. New Labdane Diterpenoids From *Croton laui* And Its Anti-Inflammatory Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26, 4687–4691.
- [85] Qing, Y. Q. .; Tang, S. .; Bin, S. W. .; Qiong, W. W. .; Huang, M. .; Jiang, X. L. C. A-H. Diterpenoids From The Roots Of *Croton crassifolius*. *J. Nat. Prod.*, **2017**, 80, 254–260.
- [86] Cai, G. W. .; Gui, L. J. .; Qiang, L. G. .; Jiao, X. J. .; Xia, W. .; Cai, Y. W. .; Lan, L. Y. Clerodane Diterpenoids From *Croton crassifolius*. *J. Nat. Prod.*, **2012**, 75, 2188–2192.
- [87] Ravanelli, N. .; Santos, K. P. .; Motta, L. B. .; Lago, J. H. G. .; Furlan, C. M. Alkaloids From *Croton echinocarpus* Baill.: Anti-HIV Potential. *South African J. Bot.*, **2016**, 102, 153–156.
- [88] Díaz, J. G. .; Tuentner, E. .; Arranz, J. C. E. .; Maury, G. L. .; Cos, P. .; Pieters, L. Antimicrobial Activity Of Leaf Extracts And Isolated Constituents Of *Croton linearis*. *J. Ethnopharmacol.*, **2019**, 236, 250–257.
- [89] Nascimento, A. M. .; Ferreira, D. M. .; Lin, F. T. D. .; Kimura, A. .; Filho, A. P. S. .; Werner, M. F. P. .; Iacomini, M. .; Sassaki, G. L. .; Cipriani, T. R. .; Souza, L. M. Phytochemical Analysis And Anti-Inflammatory Evaluation Of Compounds From An Aqueous Extract Of *Croton cajucara* Benth. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, 145, 821–830.

- [90] Silva, C. G. V. .; Zago, H. B. .; Júnior, H. J. G. S. .; Camara, C. A. G. .; Oliveira, J. V. .; Barros, R. .; Schwartz, M. O. E. .; Lucena, M. F. A. Composition And Insecticidal Activity Of The Essential Oil Of *Croton crewoides* Baill. Against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes Subfasciatus* Boheman). *J. Essent. Oil Res.*, **2008**, 20, 179–182.
- [91] Filho, L. O. C. .; Silva, M. H. M. .; Cortez, J. S. A. .; Silva, S. I. .; Oliveira, A. F. M. Foliar Cuticular N-Alkane Of Some *Croton* Species From Brazilian Semiarid Vegetation,. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2012**, 41, 13–15.
- [92] Silva, A. D. S. .; Silva, K. M. .; Neto, J. C. .; Costa, V. C. O. .; Pessôa, H. L. F. .; Tavares, J. F. .; Silva, M. S. .; Cavalcante, F. A. *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae) Shows Antidiarrheal Activity In Mice. *Pharmacognosy Res.*, **2016**, 8, 202–205.
- [93] Nascimento, V. M. Y. M. .; Souto, A. L. .; Madeiro, S. A. L. .; Costa, V. C. O.; Silva, S. M. P. M.; Silva, V. S. F.; Agra, M. F.; Siqueira-Júnior, J. P.; Tavares, J. F. Chemical Composition And Modulation Of Bacterial Drug Resistance Of The Essential Oil From Leaves Of *Croton grewoides*. *Microb. Pathog.*, **2017**, 111, 468 – 471.
- [94] Medeiros, V. M. Estudo Fitoquímico De *Croton grewoides* Baill. E Revisão Da Ocorrência Das Principais Classes De Metabólitos Do Gênero *Croton*. Ph.D. Tese, Univ. Fed. Da Paraíba, João Pessoa, PB **2012**.
- [95] Woisky, R. G; Salatino, A. Analysis Of Propolis: Some Parameters And Procedures For Chemical Quality Control. *Journal Of Apicultural Research*, **1998**, 37, 99-105.
- [96] Swain, T.; Hills, W.E. The Phenolic Constituents Of *Punus domestica*. I- Quantitative Analysis Of Phenolic Constituents. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, **1959**, 19, 63-68.
- [97] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use Of A Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss Technology*, **1995**, 28, 25-30.
- [98] Oyaizu, M. Studies On Products Of Browning Reaction: Antioxidative Activities Of Products Of Browning Reaction Prepared Form Glucosamine. *Japanese Journal Of Nutrition*, **1986**, 44, 307-315.
- [99] Skov, T.; Berg, F. V. D.; Tomasi, G.; Bro, R. Automated Alignment Of Chromatographic Data. *J. Chemom.* **2006**, 20, 484-497.

- [100] Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Mudalip, S. K. A.; Olalere, O. A. Microwave-Assisted Extraction Of *Vernonia amygdalina* Leaf For Optimal Recovery Of Total Phenolic Content . *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, **2018**, *10*, 16–24.
- [101] Ali, A.; Lim, X. Y.; Chong, C. H.; Mah, S. H.; Chua., B. L. Optimizatin Of Ultrasound-Assisted Extraction Of Natural Antioxidants From *Piper betle* Using Response Surface Methodology. *Food Sci. Technol.*, **2018**, *89*, 681–688.
- [102] Irakli, M.; Chatzopoulou, P.; Ekateriniadou, L. Optimization Of Ultrasound-Assisted Extraction Of Phenolic Compounds: Oleuropein, Phenolic Acids, Phenolic Alcohols And Flavonoids From Olive Leaves And Evaluation Of Its Antioxidant Activities. *Ind. Crops Prod.*, **2018**, *124*, 382–388.
- [103] Chen, S.; Zeng, Z.; Hu, N.; Bai, B.; Wang, H.; Suo, Y. Simultaneous Optimization Of The Ultrasound-Assisted Extraction For Phenolic Compounds Content And Antioxidant Activity Of *Lycium ruthenicum* Murr. Fruit Using Response Surface Methodology. *Food Chem.*, **2018**, *242* 1–8.
- [104] Sousa, A. D.; Maia, A. I. V.; Rodrigues, T. H. S.; M., C. K.; Ribeiro, P. R. V. .; Pereira, R. C. A. .; Vieira, R. F. .; Brito, E. S. Ultrasound-Assisted And Pressurized Liquid Extraction Of Phenolic Compounds From *Phyllanthus amarus* And Its Composition Evaluation By UPLC-QTOF. *Ind. Crops Prod.*, **2016**, *79*, 91–103.
- [105] Espada-Bellido, E.; Ferreiro-González, M.; Carrera, C.; Palma, M.; Barroso, C. G.; Barbero., G. F. Optimization Of The Ultrasound-Assisted Extraction Of Anthocyanins And Total Phenolic Compounds In Mulberry (*Morus nigra*) Pulp. *Food Chem.*, **2017**, *219*, 23–32.
- [106] Dranca, F.; Oroian, M. Optimization Of Ultrasound-Assisted Extraction Of Total Monomericanthocyanin (TMA) And Total Phenolic Content (TPC) From Eggplant (*Solanum melongena* L.) Peel. *Ultrason. Sonochem.*, **2016**, *31*, 637–646.
- [107] Garrido, T.; Gizdavic-Nikolaidis, M.; Leceta, I.; Urdanpilleta, M.; Guerrero, P.; Caba, K. De La; Kilmartin, P. A. Optimizing The Extraction Process Of Natural Antioxidants From Chardonnay Grape Marc Using Microwave-Assisted Extraction. *Waste Manag.* **88**, **2019**, *88*, 110–117.
- [108] Mato, L. M. M. Química De Espécies Nativas De *Croton* L. (Euphorbiaceae). Dissertação De Mestrado Do Instituto De Biociências Da

Universidade De São Paulo, São Paulo, BR, 2011

[109] Lan, Y. H.; Chiang, Y. T.; Lin, I. L.; Huang, S. S.; Lin, Y. H.; Lin, Y. C. Flavonoids With Chemotaxonomic Significance From *Cajanus scarabaeoides*. *Biochemical Systematics And Ecology*, **2020**, 93, 104136.

[110] Devkota, H. P.; Kawamura, K.; Sasanuma, M.; Watanabe, M.; Watanabe, T. Flavonoid Glycosides From The Leaves Of *Aphananthe aspera* (Thunb.) Planch. (Cannabaceae) And Their Chemotaxonomic Significance. *Biochemical Systematics And Ecology*, **2019**, 83 112–113

[111] Liang, H.; Zhao, M.; Tu, P.; Jiang, Y. Polymethoxylated Flavonoids From *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Biochemical Systematics And Ecology*, **2020**, 93, 104162.

[112] Mshengu, B.; Uwumubyeyi, V.; Moodley, R. Chemical Constituents From *Rhoicissus digitata* And *Rhoicissus tomentosa* And Their Chemotaxonomic Significance. *South African Journal Of Botany*, **2020**, 135, 87-91.

Anexo I

Tabela 22A: Propostas de compostos encontrados por HRMS da espécie *Croton grewoides* obtidos por meio da extração assistida por micro-ondas.

Nº	M. T	F. M	EAM-104			EAM-106			EAM-107			EAM-112			EAM-120		
			Dados experimentais dos compostos presentes nos extratos obtidos por micro-ondas														
			m/z [M-H] ⁻	Erro	A.R	m/z [M-H] ⁻	Erro	A.R	m/z [M-H] ⁻	Erro	A.R	m/z [M-H] ⁻	Erro	A.R	m/z [M-H] ⁻	Erro	A.R
68	285,04046	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,04057	0,38	0,51	285,04052	0,21	0,19	285,04047	0,03	1,94	285,04039	-0,26	2,03	285,04045	-0,05	10,49
19	301,03538	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,03541	0,12	5,26	301,03539	0,05	6,75	301,03536	-0,06	21,39	301,03527	-0,36	18,08	301,03533	-0,17	76,81
66	315,05103	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315,05126	0,73	17,59	315,05122	0,61	44,98	315,05115	0,4	34,16	315,05105	0,06	15,69	315,0511	0,22	57,13
20	317,03029	C ₁₅ H ₉ O ₈	317,03042	0,4	0,01	---	---	---	---	---	---						
69a																	
69b	449,07255	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	449,07279	0,54	0,93	449,07274	0,42	4,27	449,07263	0,08	1,57	449,07245	-0,21	1,11	449,07261	0,13	0,96
69c																	
70	461,10893	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁	---	---	---	---	---	---	461,10895	0,04	0,24				---	---	---
65	463,0882	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,08846	0,56	8,2	463,08845	0,55	24,24	463,08835	0,33	31,28	463,0882	-0,01	34,6	463,08823	0,07	87,03
71	467,1195	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₂	---	---	---	---	---	---	467,11938	-0,25	0,54						

72	481,09876	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₃	---	---	---	481,09888	0,25	1,37	---	---	---	----	---	---	---	---	---
73a																	
73b	477,10385	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477,10393	0,18	17,8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
73c																	
74a	479,08311	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃															
74b			479,08319	0,16	0,73	---	---	---	---	---	---	----	----	----	---	---	---
75	493,09876	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₃	493,09899	0,46	0,75	493,09893	0,33	0,26	---	---	---	----	---	---	---	---	---
76	495,11441	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₃	---	---	---	495,11408	-0,68	0,18	---	---	---	---	---	---	---	---	---
77	507,11441	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	507,11445	0,06	1,8	507,11436	-0,1	2,31	---	---	---	---	---	---	---	---	---
78	529,13515	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	529,13506	-0,17	0,3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
79a	549,8859	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	---	---	---	---	---	---	549,08869	0,18	0,78	---	---	---	---	---	---
79b																	
80	563,17701	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₃	563,17688	-0,23	3,57	---	---	---	563,17692	-0,17	5,79	563,17666	-0,63	1,98	563,17669	-0,58	2,37
81a																	
81b	577,13515	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577,13523	0,15	2,6	---	---	---	577,13516	0,01	1,65	577,13502	-0,22	3,95	577,13508	-0,13	8,28
81c																	
82	593,13006	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,13039	0,55	3,42	---	---	---	593,13018	0,2	9,92	593,13003	-0,06	3,51	593,13011	0,08	9,2
83a	595,13046	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	---	---	---	---	---	---	---	----	---	595,13021	-0,41	4,74	595,13028	-0,31	10,75

83b																	
84	609,14611	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609,14635	0,41	3,38	609,14644	0,55	8,54	609,14632	0,35	21,96	609,14609	-0,03	15,8	609,14616	0,08	35,49
85a	611,12537	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₇	---	---	---	611,1254	0,05	0,4	---	---	---	---	---	---	---	---	---
85b																	
86	611,16176	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	---	---	---	611,16229	0,87	0,27	---	---	---	---	---	---	---	---	---
87a	623,14063	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₄	---	---	---	---	---	---	623,1405	-0,2	2,15	623,14039	-0,38	1,47	623,14049	-0,22	4,01
87b																	
88	623,16176	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆	623,16183	0,11	8,05	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
89a	655,15159	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₈	---	---	---	---	---	---	655,1516	0,02	1,47	655,15141	-0,27	0,64	655,15157	-0,03	1,14
89b																	
90	725,19345	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₉	725,19361	0,22	1,26	---	---	---	725,19337	-0,12	2,13	725,19317	-0,39	0,23	725,19317	-0,38	0,73
91	739,2091	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	739,20905	-0,07	0,27	---	---	---	739,20919	0,12	2,36	---	---	---	---	---	---
67	741,18837	C ₃₂ H ₃₇ O ₂₀	741,18864	0,37	2,71	741,18868	0,43	7,81	741,1884	0,05	11,47	741,18816	-0,29	5,87	741,18822	-0,2	12,09
64	755,20402	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀	755,20397	-0,06	5,74	755,20388	-0,18	3,75	755,2038	-0,29	9,45	755,20352	0,62	9,06	755,20371	-0,41	18,37
92	769,21967	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀	769,21958	-0,12	3,45	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
93	785,19345	C ₃₇ H ₃₇ O ₁₉	---	---	---	---	---	---	785,19326	-0,25	0,55	---	---	--	---	---	---
94	801,2095	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₂	---	---	---	---	---	---	801,2091	-0,5	0,31	--	--	--	---	---	---
95	815,20402	C ₃₈ H ₃₉ O ₂₀	---	---	---	---	--	---	815,20432	0,37	0,04	---	---	---	---	---	---

Tabela 2: Propostas de compostos encontrados por HRMS da espécie *Croton grewioides* obtidos por meio da extração assistida por micro-ondas.

[illegible]

73a																		
73b	477,10385	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	477,10384	-0,01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
73c																		
74a																		
74b	479,08311	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
75	493,09876	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₃	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
76	495,11441	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₃	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
77	507,11441	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃	507,11427	-0,28	1,01	507,11434	-0,15	1,45	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
78	529,13515	C ₂₆ H ₂₅ O ₁₂	529,13508	-0,13	0,28	---	---	---	529,13507	-0,15	0,3	529,13511	-0,08	0,94	529,13497	-0,34	1,05	
79a																		
79b	549,8859	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅	---	---	---	---	---	---	549,08888	0,53	0,85	---	---	---	---	---	---	---
80	563,17701	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₃	563,17687	-0,26	4,26	563,17676	-0,45	2,09	563,17692	-0,17	5,21	563,17685	-0,29	2,3	563,17684	-0,3	2,08	
81a																		
81b	577,13515	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577,13504	-0,2	3,09	---	---	---	577,13519	0,07	1,55	577,13524	0,15	4,06	577,13508	-0,13	4,27	
81c																		
82	593,13006	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,13028	0,37	1,66	---	---	---	593,13026	0,34	1,65	593,13043	0,62	1,34	593,13023	0,28	1,41	
83a																		
83b	595,13046	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	---			---	---	---	595,13049	0,05	0,87	595,13062	0,28	6,21	595,13052	0,1	4,84	

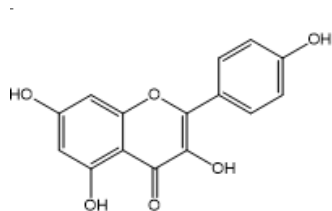
84	609,14611	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609,14616	0,08	3,48	609,14627	0,26	7,44	609,14627	0,27	18,43	609,14638	0,45	19,88	609,14622	0,18	14,4
85a	611,12537	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₇	---	---	---	611,12532	-0,09	0,18	---	---	---	---	---	---	---	---	--
85b																	
86	611,16176	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	---	---	---	611,16192	0,26	0,17	---	---	---	---	---	---	---	---	---
87a	623,14063	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₄	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--	--
87b																	
88	623,16176	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆	623,16161	-0,23	10,02	---	---	---	623,16174	-0,03	1,1	623,16162	-0,22	1,24	623,16152	-0,38	0,85
89a	655,15159	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₈	---	---	---	---	---	---	655,15155	-0,06	0,87	655,15168	0,14	0,73	655,15158	-0,01	0,59
89b																	
90	725,19345	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₉	725,19355	0,14	1,51	---	---	---	725,19355	0,13	1,85	725,1936	0,2	0,36			
91	739,2091	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	739,20914	0,05	0,41	---	---	---	---	---	---	739,20933	0,3	1,43	739,20882	-0,39	1,07
67	741,18837	C ₃₂ H ₃₇ O ₂₀	741,18852	0,2	3,06	741,18837	0,01	7,38	741,18853	0,22	9,3	741,18853	0,23	7,1	741,18849	0,17	5,5
64	755,20402	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀	755,20381	-0,27	6,97	755,20387	-0,2	3,6	755,20384	-0,24	8,18	755,20385	-0,22	10,53	755,20377	-0,32	8,89
92	769,21967	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀	769,21947	-0,26	4,47	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
93	785,19345	C ₃₇ H ₃₇ O ₁₉	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
94	801,2095	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₂	---	---	---	---	---	---	801,2096	0,3	0,3	---	---	---	---	---	---
97	887,22515	C ₄₁ H ₄₃ O ₂₂	---	---	---	---	---	---	---	---	---	887,22493	-0,24	0,64	887,22482	-0,37	0,49
98	903,22006	C ₄₁ H ₄₃ O ₂₃	---	---	---	---	---	---	---	---	---	903,22027	0,23	2,19	903,21994	-0,13	1,97

							99a														
	917,23571	C ₄₂ H ₄₅ O ₂₃	917,23561	-0,1	1,43	---	---	---	---	---	---	917,23561	-0,11	0,71	917,23546	-0,28	0,55				
	99b																				
	101a																				
	947,2674	C ₄₀ H ₅₁ O ₂₆	947,26713	-0,29	0,19	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
	101c																				

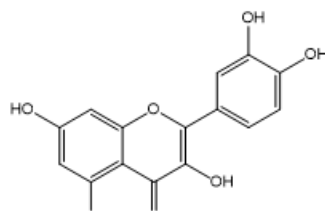
Anexo II

69a

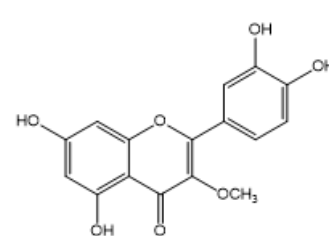
Figura 43A: Propostas estruturais dos flavonoides presentes na espécie *Croton grewoides* analisados por HRMS.

**68**

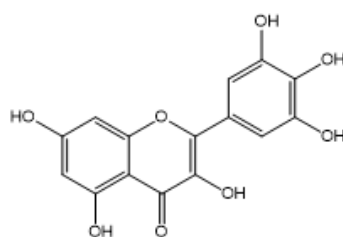
Kamferol

**19**

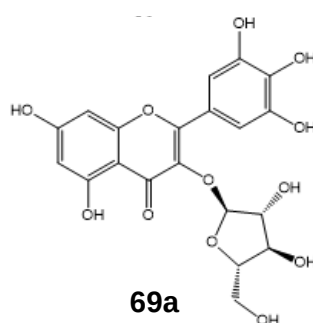
Quercetin

**66**

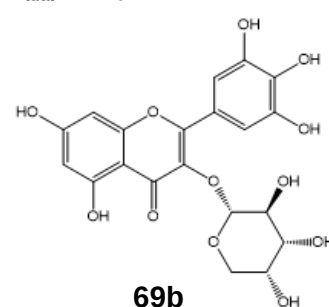
3-O-methyl-quercetin

**20**

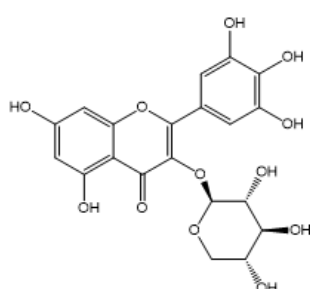
Myricetin

**69a**

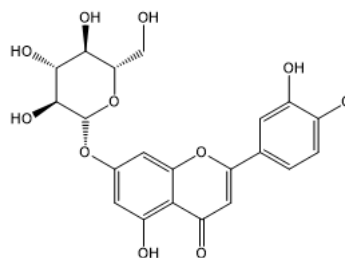
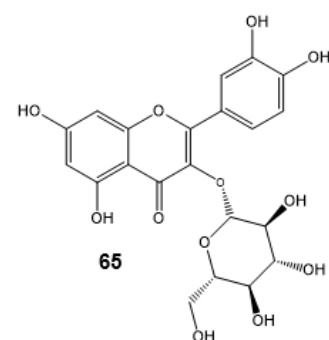
Myricetin-3-Xyloside

**69b**

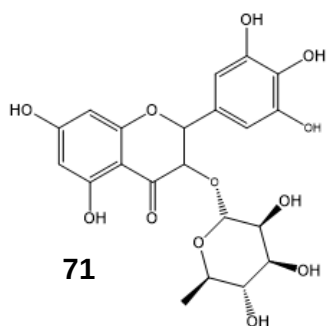
Myricetin 3-arabinoside

**69c**

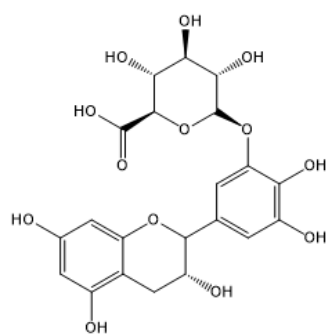
myricetin-3-O-arabinofuranoside

**70**Diosmetin 7-O- β -D-glucopyranoside**65**

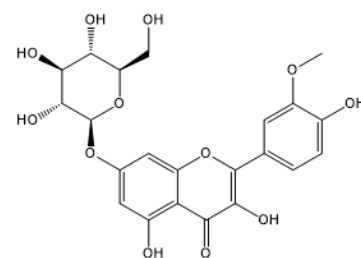
Isoquercetin



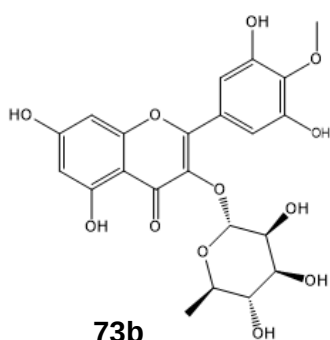
4,5,7-Trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl 6-deoxy- α -L-mannopyranoside



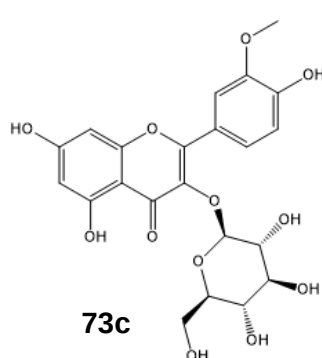
Epigallocatechin-3'-glucuronide



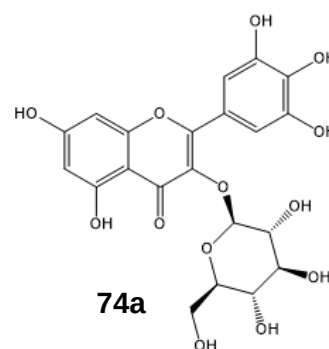
isorhamnetin 7-O- β -D-glucopyranoside



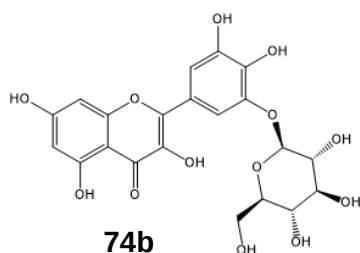
Mearnsitrin



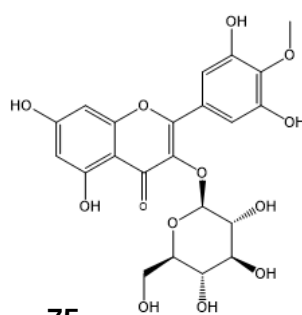
isorhamnetin 3-glucoside



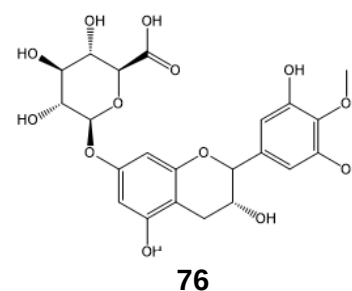
Myricetin 3-O- β -D-Galactopyranoside



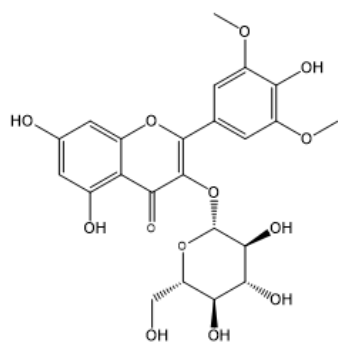
myricetin 3'-O- β -D-glucopyranoside



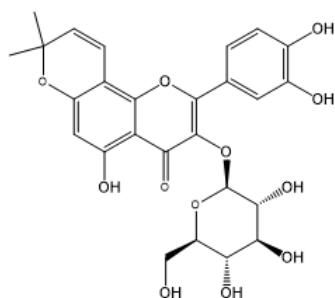
2-(3,5-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl β -D-glucopyranoside



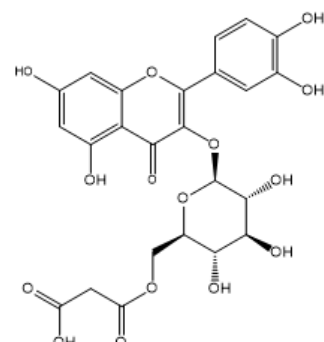
4'-methyl-epigallocatechin-7-glucuronide

**77**

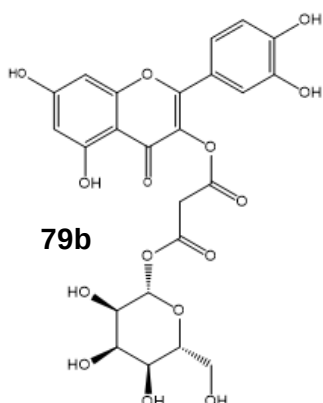
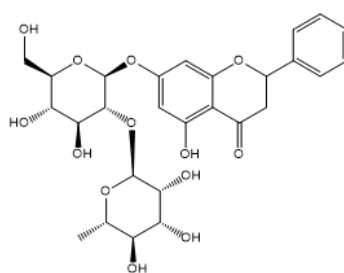
Syringetin-3-glucoside

**78**

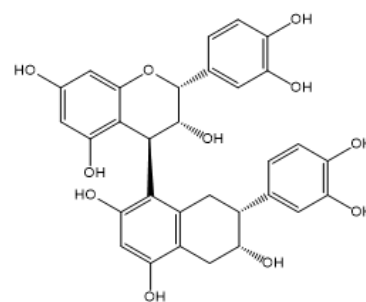
matsudone A

**79a**

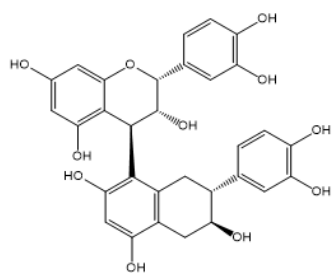
Quercetin-3-O-(6''-malonylglucoside)

**79b**Quercetin-3-O-malonyl- β -D-glucoside**80**

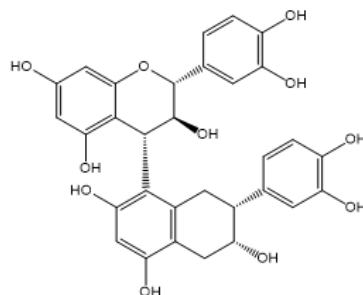
Pinocembrin 7-rhamnosylglucoside

**81a**

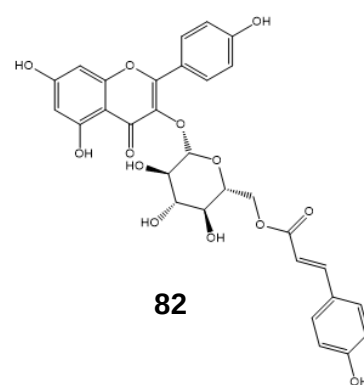
(+) -Procyanidin B2

**81b**

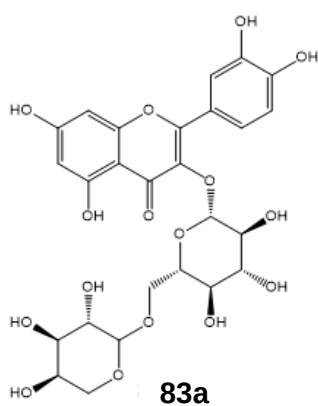
Procyanidin B1

**81c**

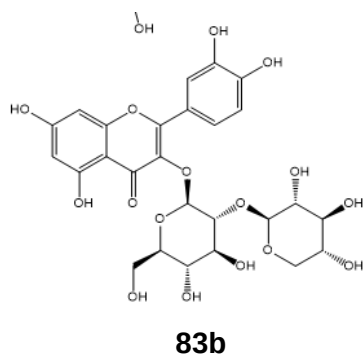
Procyanidin B4

**82**

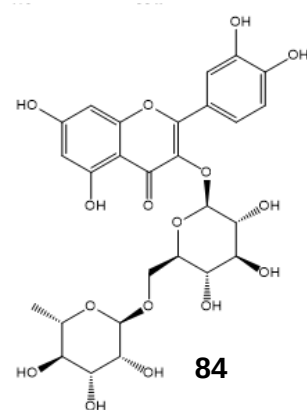
Tiliroside



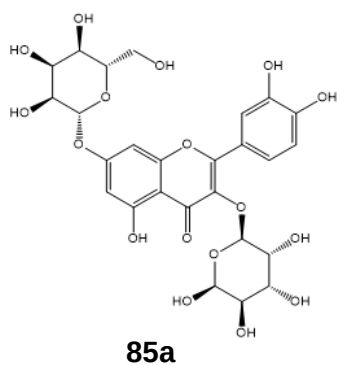
Peltatoside



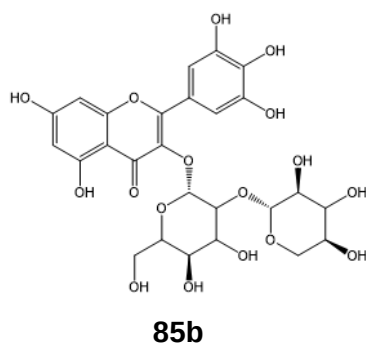
Quercetin 3-sambubioside



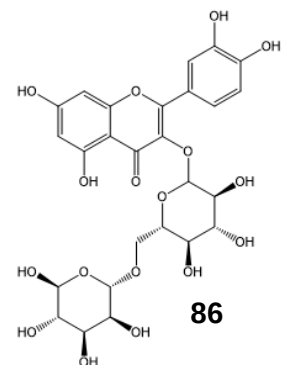
Rutin



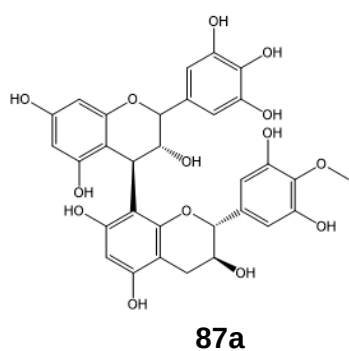
Quercetin-3-L-arabino-7-D-glucoside



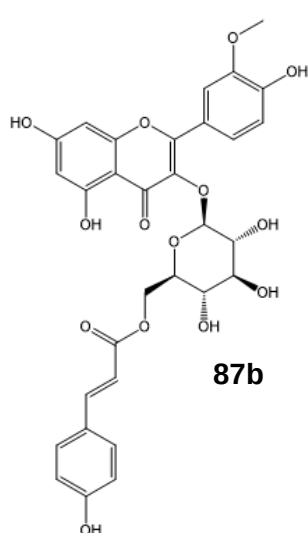
5,7-Dihydroxy-4-oxo-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-chromen-3-yl 2-O-[(3ξ)-β-D-erythro-pentopyranosyl]-β-D-glycero-hexopyranoside



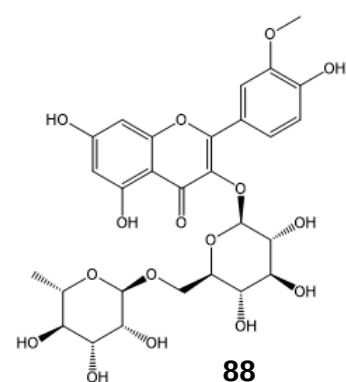
2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-4,5,7-trihydroxy-4H-chromen-3-yl 6-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl)-D-glucopyranoside



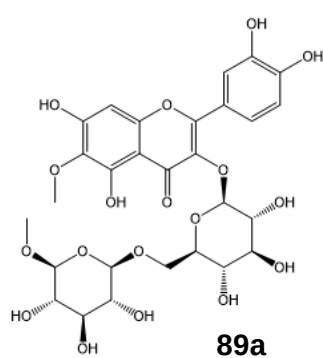
epigallocatechin-(4β->8)-4'-O-methylgallocatechin



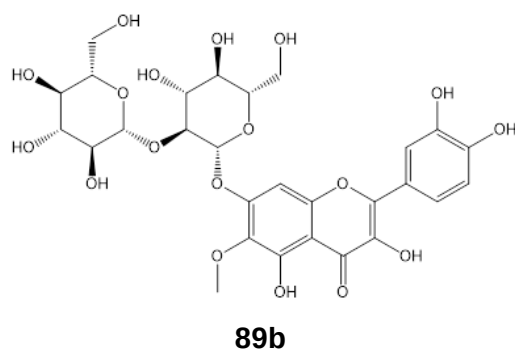
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-O-[(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoyl]-β-D-glucopyranoside



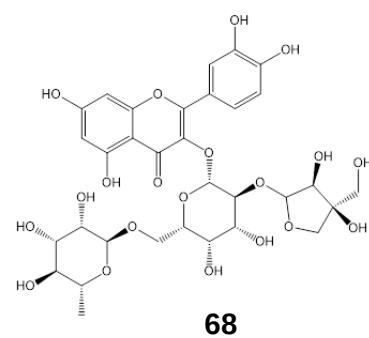
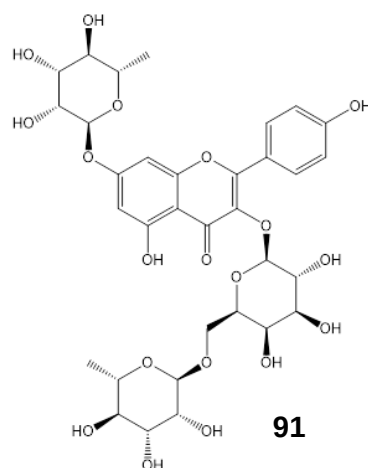
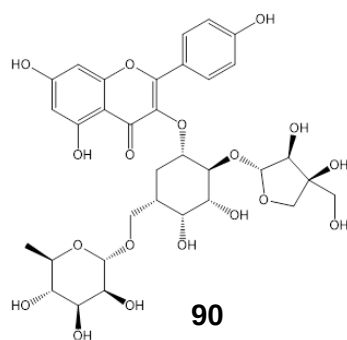
narcissin



Petuletin 3-O-gentiobioside



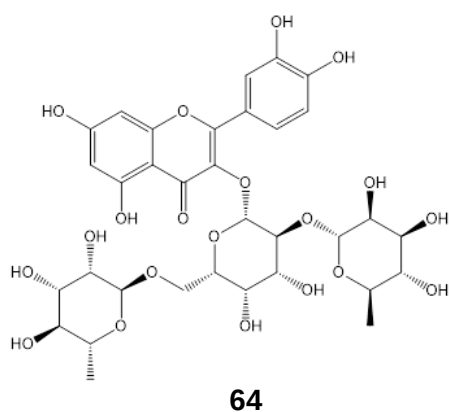
Patuletin-7-diglucoside



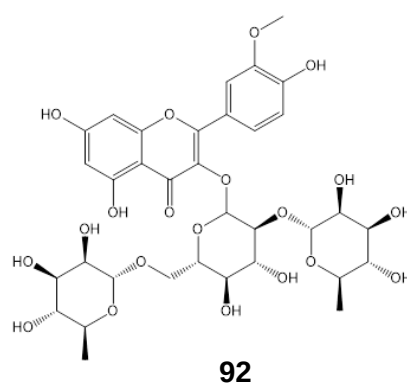
Kaempferol 3-O-(apiofuranosyl-(1'''-2'')-rhamnopyranosyl-(1'''-6''))-galactopyranoside

Robinin

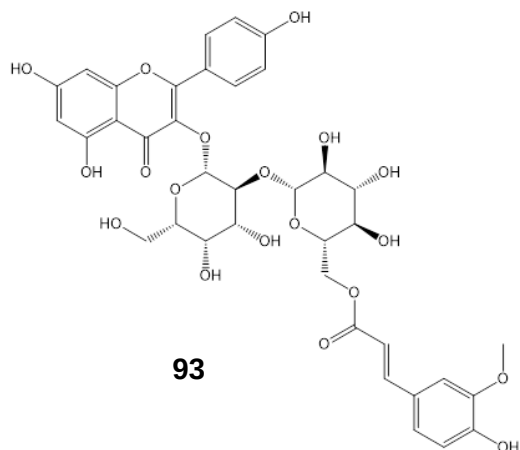
3-O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-α-apiopyranoside-(1→6)-α-L-rhamnopyranoside



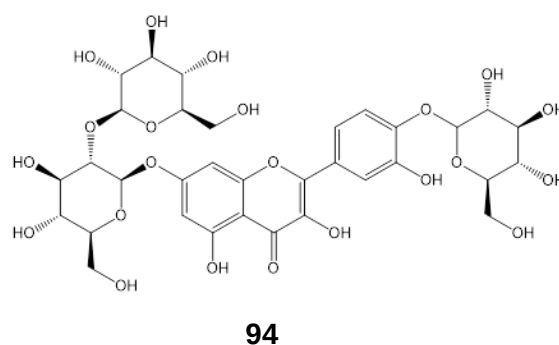
quercetin3-O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranoside-(1→6)-α-L-rhamnopyranoside



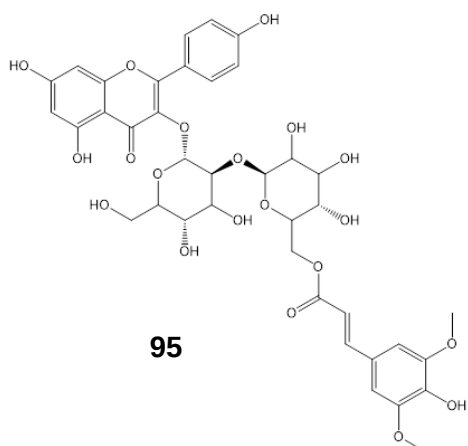
Typhaneoside



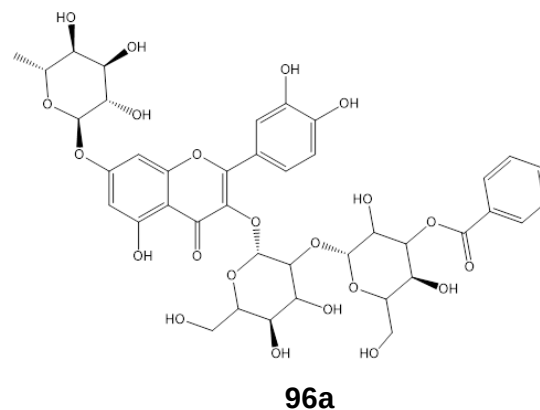
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 2-O-{6-O-[(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl]-β-D-glucopyranosyl}-β-D-galactopyranoside



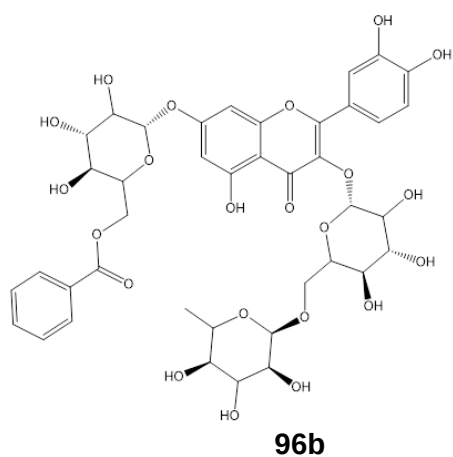
Pedunculumoside E



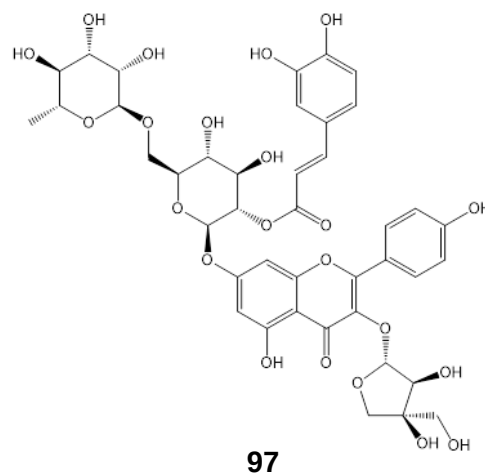
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 2-O-{6-O-[(2E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenoyl]-β-L-glycero-hexopyranosyl}-α-L-threo-hexopyranoside



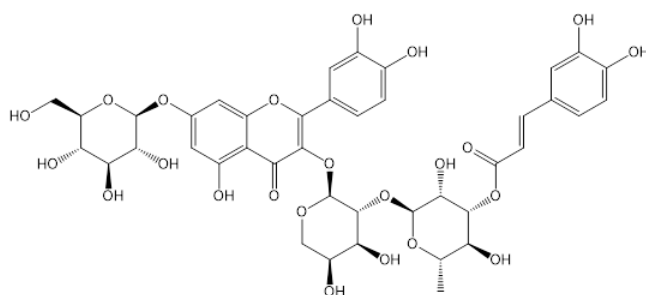
3-[[2-O-(3-O-Benzoyl-β-D-glycero-hexopyranosyl)-β-D-threo-hexopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl 6-deoxy-α-L-erythro-hexopyranoside



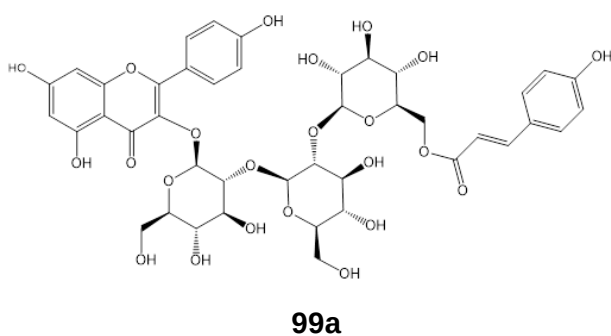
3-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-erythro-hexopyranosyl)- β -D-threo-hexopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl 6-O-benzoyl- β -D-threo-hexopyranoside



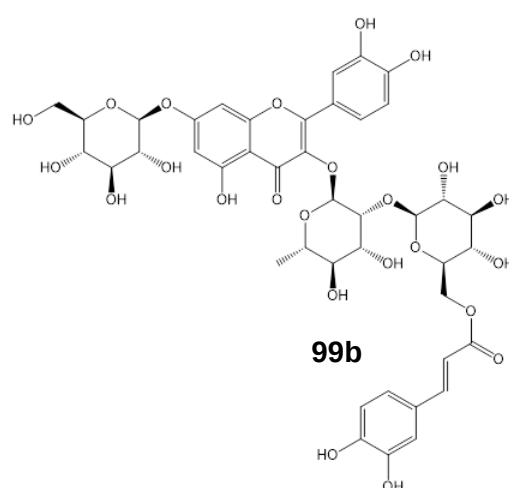
Kaempferol 3-O- β -D-apiofuranoside 7-O- α -L-rhamnosyl-(1^{'''}->6^{'''})-O- β -D (2^{'''}-O-E-caffeoylgalactopyranoside)



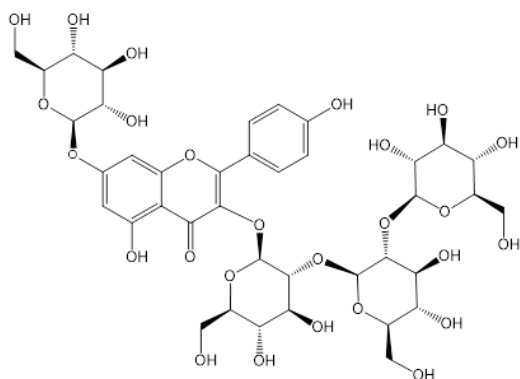
calabricoside B



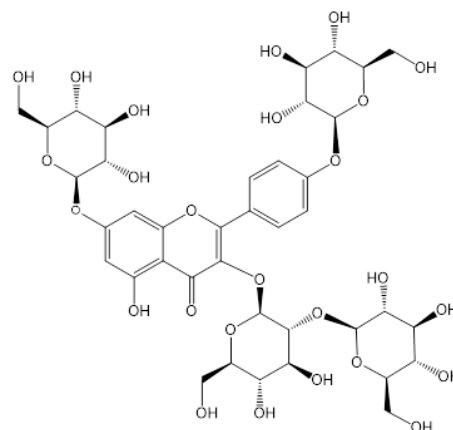
Kaempferol 3-O-[6-(4-coumaroyl)- β -D-glucosyl-(1->2)- β -D-glucosyl-(1->2)- β -D-glucoside]



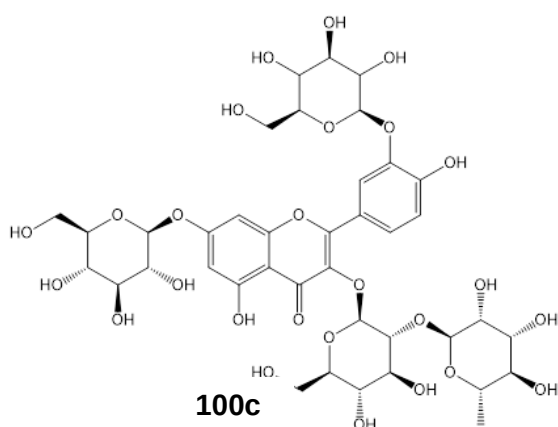
quercetin 3-O- α -L-[6^{'''}-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl-(1->2)-rhamnopyranoside]-7-O- β -D-glucopyranoside

**100a**

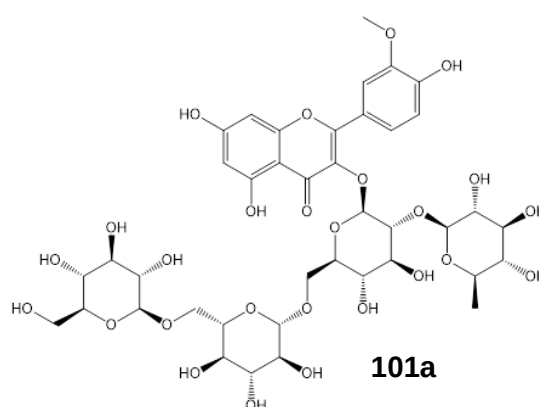
7-(β-D-threo-Hexopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl β-D-erythro-hexopyranosyl-(1→2)-β-D-glycero-hexopyranosyl-(1→2)-β-D-threo-hexopyranoside

**100b**

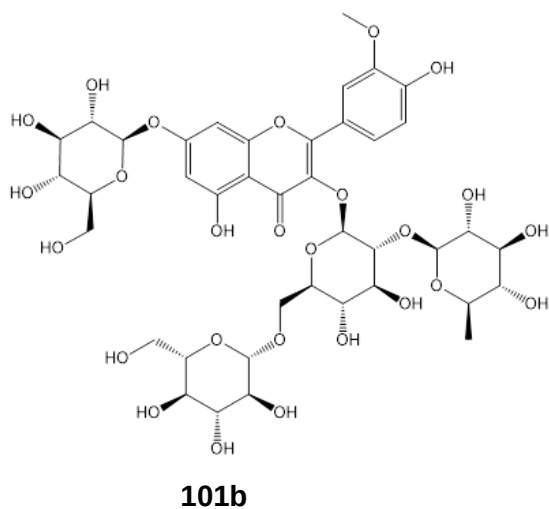
7-(β-D-threo-Hexopyranosyloxy)-2-[4-(β-D-threo-hexopyranosyloxy)phenyl]-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-O-β-D-threo-hexopyranosyl-β-D-glycero-hexopyranoside

**100c**

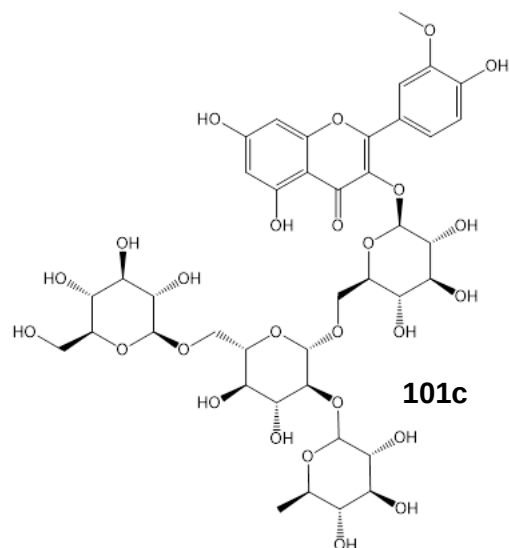
7-(β-D-threo-Hexopyranosyloxy)-2-[3-(β-D-threo-hexopyranosyloxy)-4-hydroxyphenyl]-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-O-(6-deoxy-α-L-erythro-hexopyranosyl)-β-D-glycero-hexopyranoside

**101a**

3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-3-[(2S,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl]oxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydropyran-2-yl]oxymethyl]tetrahydropyran-2-yl]oxymethyl]tetrahydropyran-2-yl]oxy-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one



7-(β-D-Glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-deoxy-α-L-glucopyranosyl-(1→2)-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside



5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-deoxy-α-L-erythro-hexopyranosyl-(1→2)-[β-D-threo-hexopyranosyl-(1→6)]-β-D-threo-hexopyranosyl-(1→6)-β-D-threo-hexopyranoside