



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KYURI RIBEIRO

**TRIAGEM ENZIMÁTICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
DESREPLICAÇÃO DE COMPOSTOS DA *Chomelia ribesioides* PARA
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

Catalão - GO

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Av. Dr. Lamartine Pinto de Avelar, número 1120, - Bairro Setor Universitário, Catalão/GO, CEP 75704-020
Telefone: - - <https://www.ufcat.edu.br>

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA)

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO (UFCAT)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Catalão (UFCAT) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFCAT), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFCAT é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação ou Tese? **DISSERTAÇÃO**

2. Nome completo do autor: **Kyuri Ribeiro**

Nome completo do(a) orientador(a): **Lorena Ramos Freitas de Sousa**

3. Título do trabalho

Título: **Triagem enzimática, potencial antioxidante e desrepliação de compostos da *Chomelia ribesioides* para aplicação cosmética**

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento: [X] SIM [] NÃO¹

[¹] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs.: Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor



Documento assinado eletronicamente por **LORENA RAMOS FREITAS DE SOUSA, Orientador(a)**, em 02/10/2025, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kyuri Ribeiro, Usuário Externo**, em 02/10/2025, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufcat.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0246605** e o código CRC **7C2B13F7**.

KYURI RIBEIRO

**TRIAGEM ENZIMÁTICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
DESREPLICAÇÃO DE COMPOSTOS DA *Chomelia ribesioides* PARA
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), como requisito para obtenção do título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química. Linha de pesquisa: Produtos naturais.

Orientadora: Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa.

Coorientadora: Professora Doutora Adriana Pereira Mundim Guedes Macêdo.

Catalão - GO

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFCAT.

Ribeiro, Kyuri

Triagem enzimática, potencial antioxidante e desreplicação de compostos da *Chomelia ribesoides* para aplicação cosmética / Kyuri Ribeiro. - 2025.

85 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2025.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Desreplicação de compostos. 2. Triagem enzimática. 3. Potencial antioxidante. 4. Aplicação cosmética. I. Sousa, Lorena Ramos Freitas de, orient. II. Título.

CDU 54

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 117 da sessão de Defesa de Dissertação de **Kyuri Ribeiro**, que confere o título de Mestre em Química no Programa de Pós-graduação em Química da UFCAT.

Ao vigésimo nono dia do mês de setembro de dois mil e vinte e cinco, a partir das 14:00 horas, realizou-se no por meio da plataforma *google meet* (link: <https://meet.google.com/vug-yqwa-uzp>) a sessão pública de Defesa de Dissertação do(a) discente Kyuri Ribeiro, intitulada "**Triagem enzimática e desreplicação de compostos de *Chomelia ribesioides* em busca de inibidores para aplicação cosmética**" na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa (PPGQ Mestrado - UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Elaine Rosechrer Carbonero (PPGQ Mestrado - UFCAT), membro titular interno, Professora Doutora Vanessa Gisele Pasqualotto Severinoy (UFG), membro titular externo e Professora Doutora Adriana Pereira Mundim Guedes Macedo (UFCAT), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Lorena Ramos Freitas de Sousa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA: Triagem enzimática, potencial antioxidante e desreplicação de compostos da *Chomelia ribesioides* para aplicação cosmética



Documento assinado eletronicamente por **LORENA RAMOS FREITAS DE SOUSA, Orientador(a)**, em 01/10/2025, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, Usuário Externo**, em 01/10/2025, às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ELAINE ROSECHRER CARBONERO, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/10/2025, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA PEREIRA MUNDIM GUEDES MACEDO, Professor(a) do Magistério Superior, Substituto(a)**, em 01/10/2025, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufcat.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0245770** e o código CRC **0197BEFC**.

Dedico este trabalho...

À minha família, por todo apoio e incentivo nos estudos.

À minha orientadora e coorientadora, por todo conhecimento passado.

Aos meus amigos pela presença em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo nos estudos e por estar sempre apoiando minhas decisões.

À Profa. Dr.^a Lorena Ramos Freitas de Sousa, por minha inserção em seu grupo de pesquisa, pelas orientações desde a época da minha graduação e pela paciência.

À Profa. Dr.^a Adriana Mundim Guedes, pelos ensinamentos na parte de ensaios enzimáticos, interpretação de resultados e conselhos.

À Profa. Dr.^a Quezia Bezerra Cass, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pelas análises dos extratos CrFE e CrFrE por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM.

Aos professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em especial à Prof.^a Dr.^a Elaine Rosehrer Carbonero, por esclarecer minhas dúvidas relacionadas aos experimentos, incentivando-me a ser um pesquisador que busque a excelência.

A todos os meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica (LaBiOrg) da UFCAT, em especial o grupo de pesquisa do qual faço parte, pelo tempo que passamos juntos desenvolvendo nossos projetos e pelas conversas.

Aos amigos mais próximos, Rafael Ribeiro, Higor França, Caio Nogueira, Mateus Augusto, Samuel Guimarães e Júlia Darc Silva, por clarearem minha mente em momentos difíceis.

Aos órgãos de fomento CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, CNPQ e FINEP pelo suporte financeiro.

“Continue a nadar”.

Dory

RESUMO

Os inibidores enzimáticos, juntamente com agentes antioxidantes, são amplamente utilizados em formulações cosméticas. Compostos com atividade anti-elastase e antitirosinase têm sido empregados em formulações para pele senil como agentes *anti-aging* e clareadores. Produtos naturais (PNs) têm demonstrado potencial inibitório enzimático, sendo amplamente usados como matéria-prima em fitocosméticos. Neste trabalho, o objetivo foi investigar o extrato e as frações da *Chomelia ribesioides*, uma espécie desconhecida do ponto de vista químico e potencial biológico. Os extratos etanólicos de *C. ribesioides* foram avaliados frente às enzimas e a atividade foi medida através da absorbância dos produtos reacionais. Os extratos brutos investigados da *C. ribesioides*, fruto (CrFrE) e folha (CrFE) (100 µg/mL), apresentaram atividade inibitória da elastase de 58,7 e 58,6%, respectivamente. A atividade inibitória observada em relação à tirosinase para os extratos e frações testados foi inferior a 25%. A investigação dos extratos ativos de *C. ribesioides* foi realizada por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-IES-QqTOF-EM/EM). O tratamento dos dados espectrais foi realizado usando a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)*. Os compostos anotados da análise do CrFrE foram: quercetina, 20-hidroxiecdisona, ácido triterpênico, ácido di-cafeoilquínico, fitoesfingosina e delfinidina-3-*O*-hexosídica. Do CrFE foram anotados: quercetina, rutina, ácido mono-cafeoilquínico, flavan-3-ol, di-hidrokaempferol, ácido di-cafeoilquínico e delfinidina-3-*O*-hexosídica. Foi análise das frações hexânicas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A análise dos dados espectrais juntamente com o índice de retenção linear (IRL) levou a onze compostos, sendo: hexadecano, heptadecano, nonadecano, metil hexadecanoato, etil hexadecanoato, metil linoleato, metil octadecenoato e etil linoleato na fração hexano do fruto (CrFrEHe) e neofitadieno, metil hexadecanoato e metil octadecenoato presentes na fração hexano da folha (CrFEHe). No ensaio com o radical DPPH, as amostras testadas tiveram forte atividade antioxidante com EC₅₀ entre 6,8 e 10,6 µg/mL. Essa atividade pode estar relacionada com o teor de compostos fenólicos (185,92-280,56 mg EAG/g amostra) quantificados nas amostras. Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento químico e biológico da espécie *C. ribesioides*.

Palavras-chave: Desreplicação de compostos, Triagem enzimática, Potencial antioxidante, Aplicação cosmética.

ABSTRACT

Enzyme inhibitors, together with antioxidant agents, are widely used in cosmetic formulations. Compounds exhibiting anti-elastase and anti-tyrosinase activities have been employed in formulations for aging skin as anti-aging and skin-whitening agents. Natural products (NPs) have shown enzymatic inhibitory potential and are extensively used as raw materials in phytocosmetics. In this study, the objective was to investigate the extract and fractions of *Chomelia ribesioides*, a species that remains chemically and biologically unexplored. Ethanolic extracts of *C. ribesioides* were evaluated against target enzymes, and the activity was measured through the absorbance of the reaction products. The crude extracts from *C. ribesioides* fruit (CrFrE) and leaves (CrFE) (100 µg/mL) exhibited elastase inhibitory activity of 58.7% and 58.6%, respectively. The inhibitory activity observed against tyrosinase for the tested extracts and fractions was below 25%. The investigation of the active extracts of *C. ribesioides* was carried out using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-QqTOF-MS/MS). Spectral data processing was performed using the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform. Compounds annotated in the CrFrE analysis included quercetin, 20-hydroxyecdysone, triterpenic acid, di-caffeoylquinic acid, phytosphingosine, and delphinidin-3-*O*-hexoside. The CrFE extract yielded annotations for quercetin, rutin, mono-caffeoylquinic acid, flavan-3-ol, dihydrokaempferol, di-caffeoylquinic acid, and delphinidin-3-*O*-hexoside. The hexane fractions were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Interpretation of the spectral data, together with the linear retention index (LRI), identified eleven compounds, including hexadecane, heptadecane, nonadecane, methyl hexadecanoate, ethyl hexadecanoate, methyl linoleate, methyl octadecenoate, and ethyl linoleate in the fruit hexane fraction (CrFrEHe), and neophytadiene, methyl hexadecanoate, and methyl octadecenoate in the leaf hexane fraction (CrFEHe). In the DPPH radical scavenging assay, the tested samples exhibited strong antioxidant activity, with EC₅₀ values ranging from 6.8 to 10.6 µg/mL. This activity may be related to the phenolic compound content (185.92–280.56 mg GAE/g sample) quantified in the samples. The results obtained contribute to the chemical and biological understanding of the *C. ribesioides* species.

Keywords: *Compound dereplication; Enzymatic screening; Antioxidant potential; Cosmetic application.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Exportações e Importações Brasileiras de produtos cosméticos (2015-2024) (Valores em US\$ milhões).....	16
Figura 1.2 A. Catálise enzimática, clivagem da ligação peptídica feita pela elastase. B. Estrutura 3D da elastase de pâncreas suíno.....	18
Figura 1.3 A. Estrutura cristalina 3D da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> , apresentada como tetrâmero. B. Subunidade da tirosinase, destacando o sítio ativo da metaloenzima (Esferas pretas: oxigênio; CuA e CuB: íons de cobre; His: histidinas).....	19
Figura 1.4 A. Reações da melanogênese catalisadas pela tirosinase. B. Via biológica da melanogênese.....	20
Figura 1.5 Compostos identificados nas raízes de <i>Chomelia asiatica</i>	25
Figura 1.6 Compostos identificados na folha da espécie <i>C. obtusa</i>	25
Figura 1.7 A. Distribuição geográfica da <i>C. ribesioides</i> no Brasil. B. Exsicata da espécie <i>C. ribesioides</i>	26
Figura 1.8 A. Sinônimos para a espécie <i>C. ribesioides</i> . B. Folhas da espécie <i>C. ribesioides</i>	27
Figura 3.1 Fluxograma para criação da rede molecular na plataforma do <i>GNPS</i>	31
Figura 3.2 Fluxograma do ensaio enzimático para enzima elastase.....	34
Figura 3.3 Fluxograma do ensaio enzimático para enzima tirosinase.....	36
Figura 4.1. A. Redes moleculares geradas pelo <i>GNPS</i> dos extratos CrFrE (azul) e CrFE (vermelho). B. Rede molecular ampliada com nodos destacados para os compostos anotados.....	42
Figura 4.2 Proposta de fragmentação da quercetina (1A e 1B).....	44
Figura 4.3 Estrutura da 20-hidroxiecdisona (2A).....	44
Figura 4.4 Proposta de fragmentação do ácido triterpênico (ácido ursólico ou oleanólico) (3A).....	45
Figura 4.5 Proposta de fragmentação do derivado de ácido di-cafeoilquínico (4A e 6B).....	46
Figura 4.6 Estrutura da fitoesfingosina (5A).....	46
Figura 4.7 Proposta de fragmentação da delfinidina-3-O-glucosídica (6A e 7B).....	47
Figura 4.8 Proposta de fragmentação da rutina (2B).....	48
Figura 4.9 Proposta de fragmentação do derivado do ácido mono-cafeoilquínico (3B).....	49

Figura 4.10 Proposta de fragmentação do flavan-3-ol (catequina ou epicatequina) (4B).....	49
Figura 4.11 Proposta de fragmentação do di-hidrokaempferol (5B).....	50
Figura 4.12 Distribuição dos compostos anotados nos extratos CrFE e CrFrE.....	51
Figura 4.13 Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos (C ₇ -C ₄₀) analisado no CG-EM.....	52
Figura 4.14 Cromatograma obtido pela técnica de CG-EM para a fração CrFEHe.....	53
Figura 4.15 Cromatograma obtido pela técnica de CG-EM para a fração CrFrEHe.....	53
Figura 4.16 Metabólitos secundários identificados na <i>C. ribesiodides</i> por CG-EM.....	54
Figura 4.17 Avaliação do potencial inibitório dos extratos etanólicos e as frações obtidas de <i>C. ribesiodides</i> frente à enzima elastase	55
Figura 4.18 Avaliação do potencial inibitório dos extratos etanólicos e as frações obtidas de <i>C. ribesiodides</i> frente à enzima tirosinase.....	56
Figura 4.19 Reação do radical DPPH com um composto antioxidante. 1: DPPH na forma de radical (solução roxa), 2: DPPH reduzido (DPPH-H) (solução amarela).....	58
Figura 4.20 Curva de calibração do DPPH.....	59
Figura 4.21 Capacidade sequestrante de DPPH do ácido ascórbico.....	60
Figura 4.22 Perfil da atividade antioxidante observado nas amostras.....	61
Figura 4.23 Atividade antioxidante do extrato CrFE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.....	62
Figura 4.24 Atividade antioxidante do extrato CrFrE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.....	62
Figura 4.25 Atividade antioxidante da fração CrFEAcE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.....	63
Figura 4.26 Atividade antioxidante da fração CrFrEAcE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.....	63
Figura 4.27 Redução do molibdênio presente no reagente Folin-Ciocalteu pelo padrão (ácido gálico), para determinação dos fenóis totais.....	64
Figura 4.28 Curva de calibração para quantificação de compostos fenólicos.....	65
Figura 4.29 Gráfico apresentando a quantificação dos compostos fenólicos (mg EAG/g) nos extratos etanólicos da folha, do fruto e das frações de acetato de etila de <i>C. ribesiodides</i> (CrFE, CrFrE, CrFEAcE e CrFrEAcE).....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Preparo das soluções com diferentes concentrações de DPPH.....	37
Tabela 3.2	Preparo das soluções com diferentes concentrações de ácido gálico.....	39
Tabela 4.1	Massas obtidas dos extratos e frações de <i>C. ribesoides</i>	40
Tabela 4.2	Compostos anotados nos extratos CrFE e CrFrE.....	51
Tabela 4.3	Compostos identificados nas frações hexânicas da <i>C. ribesoides</i> através da técnica de CG-EM.....	54
Tabela 4.4	Quantificação da atividade antioxidante do padrão.....	60
Tabela 4.5	Quantificação da atividade antioxidante das amostras CrFE, CrFEAcE, CrFrE e CrFrEAcE.....	63
Tabela 4.6	Teores de compostos fenólicos presentes na <i>C. ribesoides</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	microgramas
µL	microlitro
µM	micromolar
°C	graus celsius
[M+H] ⁺	ionização no modo positivo
A	amostra
CA	controle da amostra
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-DAD	cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos
CL-EM/EM	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em <i>tandem</i>
CL-RMN	cromatografia líquida acoplada à ressonância magnética nuclear
CP	controle positivo
CN	controle negativo
cm	centímetro
CrFE	extrato etanólico das folhas de <i>C. ribesoides</i>
CrFEAcE	fração de acetato de etila das folhas de <i>C. ribesoides</i>
CrFEHe	fração hexânica das folhas de <i>C. ribesoides</i>
CrFEHi	fração hidroalcoólica das folhas de <i>C. ribesoides</i>
CrFrE	extrato etanólico dos frutos de <i>C. ribesoides</i>
CrFrEAcE	fração de acetato de etila dos frutos de <i>C. ribesoides</i>
CrFrEHe	fração hexânica dos frutos de <i>C. ribesoides</i>
Da	dalton
DAD	detector por arranjo de diodos
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E	enzima
EAG	equivalente de ácido gálico
EC ₅₀	concentração efetiva para resposta em 50%
EM/EM	espectrometria de massas em <i>tandem</i>

EM	espectrometria de massas
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FAPEG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás
g	grama
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HLE	Elastase humana leucocitária (Human Leukocyte Elastase)
IAA	índice de atividade antioxidante
IC ₅₀	concentração da amostra para inibir atividade biológica em 50%
IRL	índice de retenção linear
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
<i>m/z</i>	razão massa carga
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
nM	nanomolar
nm	nanômetro
PNs	produtos naturais
pH	potencial hidrogeniônico
PLL	partição líquido-líquido
PPE	Elastase de pâncreas suíno (Porcine pancreatic elastase)
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SucAla ₃ -pNA	<i>N</i> -succinil-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> -nitroanilida
V	volt
eV	elétron-volt

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTAS	viii
1 - INTRODUÇÃO	15
1.1 - APLICAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA	15
1.2 - ENZIMAS	17
1.2.1 - Elastase	17
1.2.2 - Tirosinase	18
1.3 - FAMÍLIA RUBIACEAE	22
1.3.1- Gênero <i>Chomelia</i>	23
1.3.2 - <i>Chomelia ribesioides</i>	25
1.4 - USO DE TÉCNICAS HIFENADAS E DA PLATAFORMA <i>GNPS</i> (GLOBAL NATURAL PRODUCTS SOCIAL MOLECULAR NETWORKING) PARA DESREPLICAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS	26
2 - OBJETIVO	27
2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 - METODOLOGIA	28
3.1- PREPARO DE AMOSTRAS E ESTUDO QUÍMICO	28
3.1.1 - Coleta e Preparo dos Extratos	28
3.1.2 - Fracionamento dos Extratos Etanólicos (Partição Líquido-Líquido)	29
3.1.3 - Condições Cromatográficas da Técnica de CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM	29
3.1.4 - Criação de Redes Moleculares na Plataforma <i>GNPS</i>	30
3.1.5 - Condições Cromatográficas da Técnica de GC-EM	31
3.2 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS	32
3.2.1 - Preparo das Amostras para os Ensaios Enzimáticos	32
3.2.2 - Preparo dos reagentes para o ensaio enzimático da elastase	32
3.2.3 - Ensaio Enzimático da Elastase	32
3.2.4 - Preparo dos Reagentes para o Ensaio Enzimático da Tirosinase	34
3.2.5 - Ensaio Enzimático da Tirosinase	34
3.3 - ENSAIO ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH)	36
3.3.1 - Preparo dos Reagentes	36
3.3.2 - Preparo das Amostras dos Extratos e Frações	36
3.3.3 - Curva do DPPH	37
3.3.4 - Determinação da Atividade Antioxidante das Amostras da <i>C. ribesioides</i>	37
3.4 - QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DA ESPÉCIE <i>C. RIBESIOIDES</i>	38
3.4.1 - Quantificação de Compostos Fenólicos	38

3.4.2 - Preparo dos Reagentes	38
3.4.3 - Preparo das Amostras dos Extratos e Frações	38
3.4.4 - Curva Padrão de Compostos Fenólicos	39
3.4.5 - Quantificação dos Fenóis Totais na <i>C. ribesoides</i>	39
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 - FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS (PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO)	40
4.2 - PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>C. RIBESIOIDES</i>	41
4.2.1 - Desreplicação dos Compostos nos Extratos	41
4.2.2 - Compostos Anotados no CrFrE e CrFE	43
4.2.3 - Identificação dos Constituintes Presentes nas Frações Hexânicas	51
4.3 - TRIAGEM ENZIMÁTICA DA ELASTASE E TIROSINASE	54
4.3.1. Atividade Inibitória Enzimática Investigada para o Fruto e Folha da <i>C. ribesoides</i>	54
4.4 - ENSAIO ANTIOXIDANTE (DPPH)	57
4.5 - QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS	63
5 – CONCLUSÃO	65
6 – REFERÊNCIAS	66
7 – ANEXOS	75

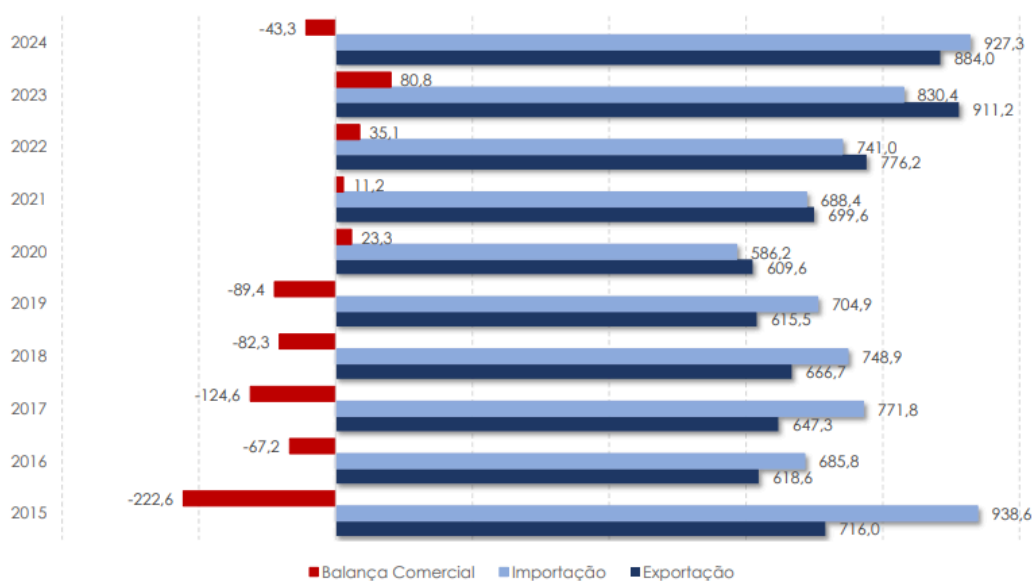
1 - INTRODUÇÃO

1.1 - APLICAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA

A pele é o órgão que atua como barreira de proteção para o corpo humano contra agressões externas, como patógenos, radiações ultravioleta e poluição. Também é responsável por mostrar o processo de envelhecimento do corpo humano, devido à perda de sua elasticidade e distúrbios relacionados ao estresse oxidativo da pele (BRAGAZZI *et al.*, 2019). Algumas das consequências do envelhecimento da pele são a ausência de uma espessura uniforme da epiderme, elastose dérmica, redução de colágeno e aumento de enzimas responsáveis pela degradação da matriz da pele. O fotoenvelhecimento, devido à exposição aos raios solares, resulta na produção de radicais livres, que por sua vez podem oxidar proteínas, causar danos ao DNA e reduzir hormônios (SAHU *et al.*, 2013).

A indústria cosmética possui grande capacidade de inovar em seus produtos e alcançar uma boa margem de lucros. Em escala global, esse ramo de mercado teve um aumento de 3,8% na última década e um volume líquido de 181 bilhões de libras. Além disso, outros valores, como a expansão anual no desenvolvimento dessa indústria, que varia de 3% a 5,5% nas últimas duas décadas, mantêm-se estáveis e flexíveis frente às crises econômicas. As expectativas para esse mercado são contínuas e positivas, com a proximidade global da população a mercados emergentes, prevendo aumento de cerca de 50%. Nos próximos 10 anos, espera-se que Brasil, China, Estados Unidos e Japão liderem essa indústria (MAHOMOODALLY; RAMJUTTUN, 2016). A ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos) realizou um levantamento da atividade econômica das empresas brasileiras; o panorama de 2015 a 2024 apresenta valores de exportações e importações (**Figura 1.1**), em US\$ milhões, mostrando a importância desse mercado para a economia brasileira (ABIHPEC, 2025).

Figura 1.1 Exportações e importações brasileiras de produtos cosméticos (2015-2024; valores em US\$ milhões).



Fonte: ABIHPEC.

Pesquisas apontam que as pessoas buscam por um estilo de vida mais natural por receio dos produtos artificiais (MAHOMOODALLY; RAMJUTTUN, 2016). Nas últimas décadas, foi observado que essa linha de cosméticos produzidos a partir de matéria-prima natural pode apresentar menores danos à pele, como menor incidência de reações alérgicas. Em relação à sustentabilidade, os biocosméticos possuem menor impacto ambiental por serem biodegradáveis, além de terem menos substâncias tóxicas presentes em cosméticos convencionais. O aumento da substituição de formulações cosméticas sintéticas pelas de origem vegetal está baseado na eficácia, nos benefícios à saúde, na menor toxicidade à pele e na sustentabilidade (SILVA *et al.*, 2024).

A aplicação de metabólitos secundários, como quercetina e ácido elágico, são alguns dos metabólitos presentes em extratos vegetais que eliminam radicais livres, inibem as enzimas elastase e metaloenzimas. Esses compostos são adicionados em formulações cosméticas com o objetivo de prevenir ou reverter o aspecto envelhecido da pele, proporcionando uma pele saudável (SAHU *et al.*, 2013).

Os produtos cosméticos com função clareadora têm o objetivo de fornecer tratamento para alguns distúrbios de pigmentação, como melasma, manchas café com leite e lentigo solar, expressões da produção de melanina. Alguns desses produtos possuem atividade antitirosinase, ou seja, têm a capacidade de inibir a atividade dessa enzima, por consequência evitando a hiperpigmentação da pele (GILLBRO; OLSSON, 2011).

1.2 - Enzimas

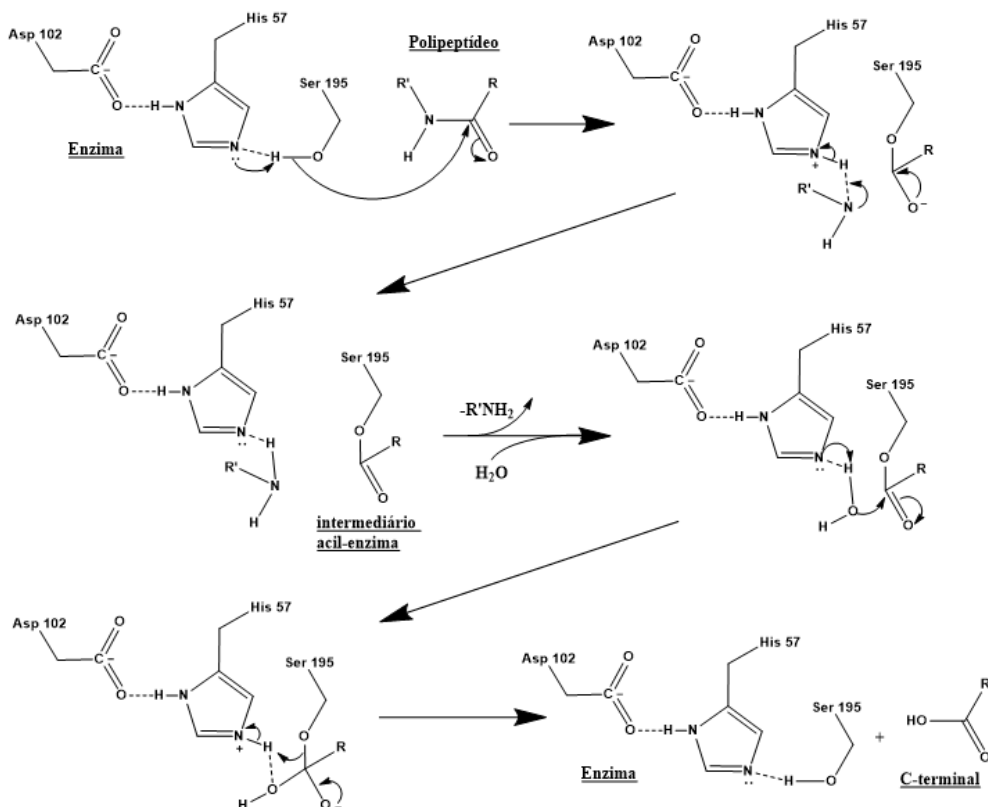
1.2.1 - Elastase

A elastase é uma serino-protease, da mesma família da quimotripsina. Essas enzimas são responsáveis pela clivagem de proteínas e outros componentes da matriz extracelular, através da tríade catalítica presente no sítio ativo composto por resíduos de serina, aspartato e histidina (**Figura 1.2**) (ALMONTE; SWEATT, 2011). A elastase de neutrófilos humanos é armazenada em grânulos primários dos granulócitos, sendo responsável pela degradação de proteínas como elastina, colágeno e fibronectina. Comercialmente, existem poucos inibidores eficazes contra essa enzima, o que torna as plantas, com sua vasta diversidade de metabólitos secundários, uma alternativa promissora para a busca de compostos com potencial inibitório (MERFORT, 2012).

Quando adequadamente regulada, essa enzima desempenha papéis essenciais na manutenção e elasticidade da pele, eliminação de microrganismos invasores e na digestão de proteínas, mas fatores como a baixa produção de alfa-1 antitripsina (inibidor natural da elastase), fazem com que a elastase se encontre superexpressa. Para o mercado de cosméticos, a busca por inibidores é voltada para retardar alguns efeitos negativos dessa hiperatividade, sinais típicos de envelhecimento como flacidez, rugas e perda de elasticidade da pele (CAMELIER *et al.*, 2008; CHIOCCHIO *et al.*, 2018).

Figura 1.2 A. Catálise enzimática, clivagem da ligação peptídica feita pela elastase. B. Estrutura 3D da elastase de pâncreas suíno.

A



B



Fonte: **(A)** CHIPALA, 2010; PIRES *et al.*, 2019; SKOREŃSKI, 2023; **(B)** RCSB PDB.

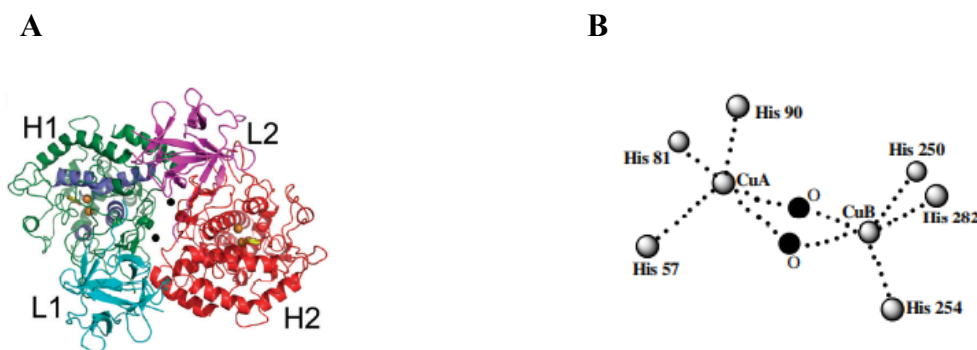
As enzimas elastase provenientes do ser humano (HLE) e do pâncreas suíno (PPE) possuem semelhança na digestão de proteínas estruturais, e as estruturas cristalinas são análogas entre si. A especificidade delas por substratos, como a elastina, é devida à similaridade geométrica e pela característica hidrofóbica de seus bolsões de ligação. A cadeia polipeptídica da HLE e PPE apresentam estruturas semelhantes, com similaridade em torno de 40% incluindo a tríade catalítica (BODE *et al.*, 1989).

1.2.2 - Tirosinase

A tirosinase é uma metaloenzima do tipo 3, enzimas com essa classificação possuem um dímero metálico em seu sítio ativo (KANTEEV *et al.*, 2015).

A tirosinase extraída do cogumelo *Agaricus bisporus* é uma enzima que possui um núcleo dinuclear com íons de cobre; cada íon de Cu^{2+} está ligado a três resíduos de histidina (His) e estão ligados através de uma ligação que forma uma ponte entre os (**Figura 1.3**) (LIU *et al.*, 2008).

Figura 1.3 **A.** Estrutura cristalina 3D da tirosinase de *Agaricus bisporus*, apresentada como tetrâmero. **B.** Subunidade da tirosinase, destacando o sítio ativo da metaloenzima (Esferas pretas: oxigênio; CuA e CuB: íons de cobre; His: histidinas).

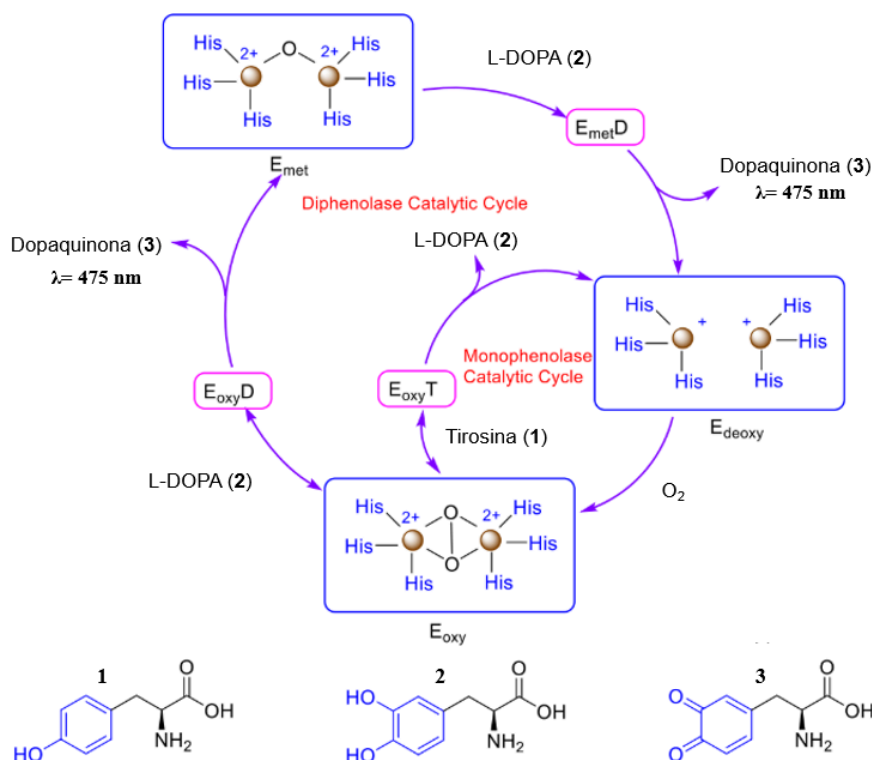


Fonte: **(A)** ISMAYA *et al.*, 2011. **(B)** LIU *et al.*, 2008.

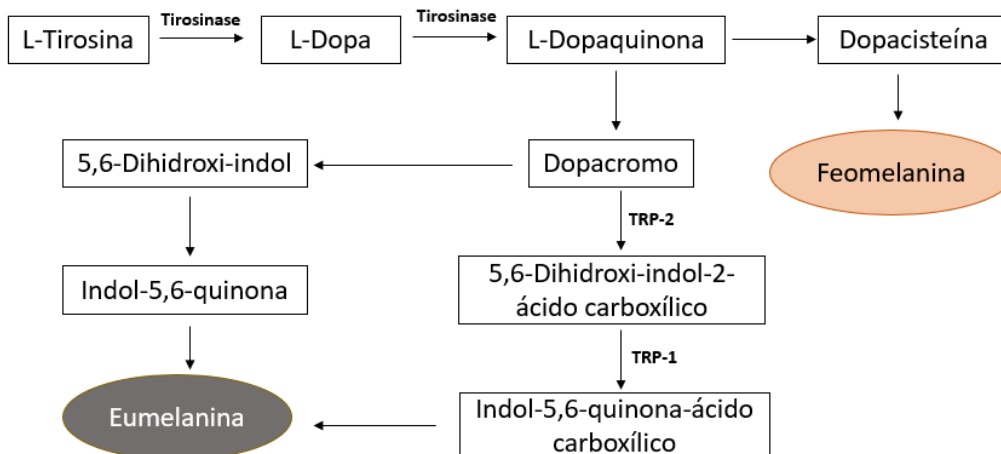
Dentre as atividades catalíticas dessa enzima, está a participação na síntese de melanina na via biológica da melanogênese (**Figura 1.4**), responsável pela pigmentação da pele, cabelo e olhos. No processo da melanogênese, a tirosinase atua na hidroxilação de monofenóis (L-tirosina) e oxidação de difenóis (L-DOPA), resultando na formação de quinonas que posteriormente são convertidas em melanina (HWANG *et al.*, 2007; ROCHA; MOREIRA, 2007).

Figura 1.4 **A.** Reações da melanogênese catalisadas pela tirosinase. **B.** Via biológica da melanogênese.

A



B



Fonte: GILLBRO; OLSSON, 2011; XUE *et al*, 2023.

As reações que a enzima tirosinase catalisam também são chamadas de monooxigenase (hidroxilação da L-tirosina) e oxidase (oxidação do L-DOPA). A parte responsável por essas reações é chamada de sítio ativo, cujo centro possui dois íons Cu^{2+} que são capazes de se ligarem ao oxigênio molecular. A formação das ligações do oxigênio aos íons metálicos resulta em estados de oxidação do sítio ativo da tirosinase. Os quatro estados de oxidação são: met-tirosinase, desoxi-tirosinase, oxi-tirosinase e deact-tirosinase. A oxidação na forma met é chamada de estado nativo ou “período de latência”, no qual os dois Cu^{2+} estão ligados a uma hidroxila. O estado de oxidação

seguinte é o desoxi, em que os íons de cobre são reduzidos a Cu^+ e não se ligam a nenhum oxigênio. Essa forma é crucial para que uma molécula de O_2 se ligue aos íons metálicos e passe para o estado de oxidação oxi, que se apresenta no formato de um peróxido. O último estado é o deact, o estado inativo da enzima tirosinase, em que a forma oxi catalisa a monooxigenase de um catecol, reduzindo um dos íons metálicos em Cu^0 , esse último estado não tem participação na via da melanogênese (RAMSDEN; RILEY, 2014).

Quando essa enzima se encontra superexpressa, ocorre uma produção excessiva de melanina, o que resulta no surgimento de manchas na pele. Nesse contexto, várias indústrias cosméticas têm buscado potenciais inibidores de tirosinase, visando desenvolver novas formulações que bloqueiem essa atividade enzimática, prevenindo a formação de manchas na pele (DAY; COHEN, 2013).

Diversos compostos têm apresentado atividade anti-enzimática frente a tirosinase de cogumelo, como o ácido kójico extraído de fungos (MUKHERJEE *et al.*, 2024), que tem sido usado nas indústrias cosméticas por décadas como componente de formulações cosméticas. Entretanto, o ácido kójico possui citotoxicidade e instabilidade no seu armazenamento, condições que motivaram a busca por novos inibidores (SINGH *et al.*, 2016). Atualmente, este composto é utilizado como controle positivo em ensaios enzimáticos frente a tirosinase, na triagem de potenciais inibidores, por apresentar IC_{50} de $3,37 \mu\text{g/mL} \pm 0,65$ e com porcentagem de inibição acima de 90% ($15,6 \mu\text{g/mL}$) (FREITAS *et al.*, 2016).

A hidroquinona é um composto fenólico que devido sua atividade biológica frente à tirosinase (IC_{50} de $70 \mu\text{M}$) era usada em produtos clareadores de pele devido sua atividade inibitória na hiperpigmentação, todavia, foram feitos estudos que apontaram o potencial mutagênico e citotóxico para as células animais (CHEN *et al.*, 2009). Diante desses riscos, a FDA (*Food and Drug Administration*) restringiu a comercialização de produtos que possuem hidroquinona na formulação, sendo permitido a compra somente com prescrição médica; alguns países como Japão e Austrália, além da União Europeia foram mais rigorosos e proibiram seu uso no tratamento de melasma. Apesar dos danos que podem ser causados, ainda existem tratamentos cutâneos que fazem a aplicação desse composto, como no tratamento de melasmas e hiperpigmentação pós-traumática, mas seu uso é feito em menores concentrações (4%) (TRUSWELL, 2020).

Na busca por compostos com atividade antitirosinase os derivados de resorcinóis estão se mostrando promissores inibidores da enzima e foi observado que a presença do grupo resorcinol é primordial para a atividade inibitória. O composto 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(2,4-dimetoxi-3-metilfenil)propano isolado da espécie *Dianella ensifolia* apresentou o IC₅₀ de 0,24 µM, mostrando um resultado superior aos inibidores já conhecidos (ácido kójico e hidroquinona) frente a tirosinase. Além disso, experimentos mutagênicos (teste de Ames) constataram que esse derivado de resorcinol não possui atividade prejudicial às células da pele, tornando esse composto aplicável em formulações clareadoras da pele (NESTEROV *et al.*, 2008).

A tirosinase é uma enzima presente em diversos organismos, como bactérias, fungos, insetos, mamíferos e plantas, e desempenha funções em processos biológicos essenciais. A estrutura dessa enzima que possui diferentes origens é estudada com base em suas propriedades, seus sítios de ligação de cobre, mecanismo de ativação e estrutura de domínio, sendo necessário mais estudos para complementar as informações já conhecidas (AGARWAL *et al.*, 2014). Estudos apontam que tirosinases provenientes de diferentes origens possuem resultados distintos em relação a alguns inibidores enzimáticos. As diferenças estruturais e o ambiente onde essas enzimas se localizam podem explicar os dados obtidos, sendo o caso da tirosinase humana e a tirosinase de cogumelo (MANN *et al.*, 2018). No entanto, o uso da tirosinase obtida do *Agaricus bisporus* ainda é bastante difundido em ensaios enzimáticos na busca de inibidores, devido a facilidade de manuseio, o baixo custo em relação a tirosinase de humana e também a similaridade do sítio ativo. O fato de alguns inibidores da tirosinase de cogumelo terem sua capacidade reduzida frente a tirosinase humana está atrelado à baixa similaridade dessas duas enzimas, pois possuem apenas 23% de suas sequências, incluso o sítio ativo metálico (OYAMA *et al.*, 2022). Somado ao manuseio e custos financeiros, os ensaios enzimáticos frente a tirosinase de cogumelo auxiliam no entendimento da atividade enzimática dessa enzima, assim como a sua inibição, e muitos artigos atuais utilizam essa metodologia em suas pesquisas que estão voltadas para a aplicação de Produtos Naturais (CHATATIKUN *et al.*, 2023).

1.3 - Família Rubiaceae

A família Rubiaceae possui cerca de 630 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies catalogadas pelo mundo, sendo encontradas predominantemente em locais de clima tropical e quente (KALA *et al.*, 2015). Os metabólitos secundários dessa

família possuem uma vasta gama de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia, com destaque para os alcaloides indólicos, terpenos e antraquinonas. A classificação dos gêneros e das espécies é muito relevante nesta família e, geralmente, é baseada em características morfológicas (tamanho da folha, frutos presentes, etc) e na caracterização química, pois os metabólitos servem como marcadores quimiotaxonômicos, tornando possível a diferenciação nos gêneros e subfamílias (MARTINS; NUNEZ, 2015; FARISCO, 2019).

1.3.1 - Gênero *Chomelia*

Dentre os gêneros da família Rubiaceae, destaca-se *Chomelia*, um dos mais diversos, com cerca de 76 espécies que são características em regiões neotropicais e estão inseridas na tribo *Guettardeae*. Esse gênero está presente nos territórios da América Central até o Paraguai, sendo que das 76 espécies identificadas, 37 foram registradas no Brasil, sendo 28 endêmicas.

No Brasil, estas espécies podem ser encontradas em todos os biomas, mas são mais abundantes na Mata Atlântica e no Cerrado. Em relação à tribo *Guettardeae*, esta possui delimitações objetivas e deficiência na parte de classificação de seus gêneros, observações estas realizadas após uma comparação de análises filogenéticas de Rubiaceae, tribos e gêneros desta família. Essas características da tribo *Guettardeae* se refletem em *Chomelia*, pois o fato deste gênero possuir uma morfologia diversa entre suas espécies, dificulta a delimitação das mesmas (PESSOA, 2017).

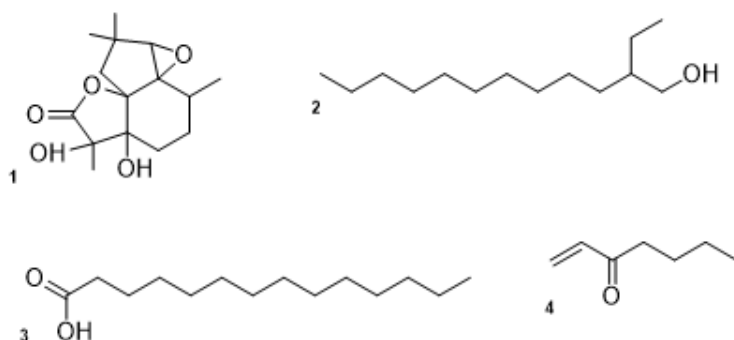
Existem muitas pesquisas a respeito do gênero *Chomelia* tanto na área da botânica, onde são descritas as características morfológicas, quanto na farmácia, biologia, química, e outras, onde se busca a identificação dos compostos químicos, sua atividade biológica e aplicações. Na espécie *C. asiatica*, popularmente conhecida como *kommi* na cultura indiana (GARG, 2024), com o uso de análises químicas qualitativas, já foram identificados compostos como alcaloides, flavonoides, aminoácidos, fenóis, lipídeos, glucosídeos, saponinas e taninos. A maioria dos metabólitos geralmente é sintetizado pela parte foliar da planta. Alguns deles não tem uma função identificada, mas em sua maioria possuem funções estruturais e atividade imunológica contra agentes patogênicos presentes nas plantas (SENTHILKUMARAN *et al.*, 2017).

As cascas, folhas e raízes de *C. asiatica* são usadas na medicina popular indiana no tratamento de dores abdominais, infecção ocular e ferimentos na pele. Tem estudos que identificaram os metabólitos secundários presentes na espécie, testaram as

atividades biológicas e quantificaram os compostos que podem estar relacionados aos efeitos benéficos observados no uso popular da cultura indiana. As principais atividades relatadas, foram: antinociceptiva, antimicrobiana, antioxidantes, cicatrizantes, anti-inflamatória e anticancerígena. Na parte de quantificação, o extrato etanólico da folha da *C. asiatica* obteve concentrações de 236 mg EAG/g (equivalente de ácido gálico por grama de amostra) e 12,3 mg EQ/g (equivalente de quercetina por grama de amostra) para fenóis totais e flavonoides, a presença desses compostos explicam a atividade antioxidante da espécie (IC₅₀ de 26,6 µg/mL, ensaio DPPH). Também foi determinado que o mesmo extrato na concentração de 100 µg/mL foi capaz de eliminar 60 - 67% de células cancerígenas no pulmão, propondo assim a atividade anticancerígena (MANOJJ *et al.*, 2020).

Através da técnica de CG-EM foram identificados compostos presentes nas folhas de *C. asiatica*, distribuídos nas classes dos aldeídos, açúcares, álcoois, cetonas, ácidos graxos, terpenoides, fenóis, ésteres e tocoferol. Alguns dos compostos identificados foram 11-hidroxi-aliacolida (1), 2-etil-1-dodecanol (2), ácido tetradecanoico (3), hept-1-en-3-ona (4) (Figura 1.5) (ANJANADEV, 2016). Entretanto alguns dos compostos identificados apresentaram incoerências, na tabela de resultados (tabela 3, página 19 do artigo de referência) existem compostos com fórmula molecular incorreta, e a identificação do derivado de xilose não poderia ser feita pela metodologia apresentada, sendo necessário uma etapa de derivatização do açúcar para a posterior análise por CG-EM.

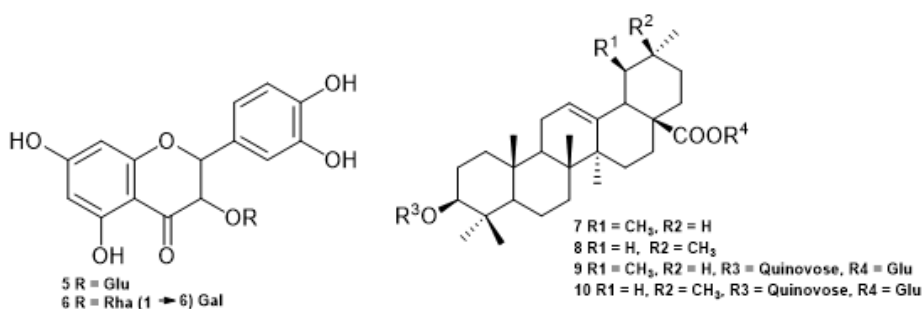
Figura 1.5 Compostos identificados nas raízes de *Chomelia asiatica*.



Outra espécie do gênero *Chomelia* estudada foi a *C. obtusa*, conhecida como *viuvinha* na região Sul do Brasil (GIEHL, 2025). Através de uma metodologia empregando RMN de ¹H, foram identificados qualitativamente diversos metabólitos secundários, como 3-*O*-β-D-glucopiranosil quercetina (5) e

3-*O*-[α -raminosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -galactopiranosídeo] quercetina (6). Também foram identificados os isômeros ácido ursólico (7), ácido oleanólico (8), ácido 3-*O*- β -D-quinovopiranosil-28-*O*- β -D-glucopiranosil quinóvico (9) e ácido 3-*O*- β -D-quinovopiranosil-28-*O*- β -D-glucopiranosil cinchólico (10) (Figura 1.6). A ausência de secoiridoides e alcaloides indólicos foi relatada, e esses resultados podem ser empregados no sistema de quimiotaxonomia para auxiliar na delimitação da espécie (BARROS *et al.*, 2008). Outros estudos realizados na parte de prospecção química da mesma espécie (*C. obtusa*) identificaram várias substâncias presentes no extrato da planta. Entre as principais, destacam-se ácido ursólico, ácido oleanólico, triterpenos glucosilados, derivados de quercetina, ácidos clorogênicos, esteroides e açúcares livres. Vale ressaltar que alguns desses metabólitos apresentaram atividades anti-inflamatória, antioxidante e moluscicida (TATIBANA *et al.*, 2009).

Figura 1.6 Compostos identificados na folha da espécie *C. obtusa*.



1.3.2 - *Chomelia ribesioides*

Chomelia ribesioides Benth. ex A. Gray, popularmente conhecida como *Comélia*, é uma planta nativa do cerrado brasileiro e da savana boliviana. No Brasil, tem ocorrência em quatro das cinco regiões, com exceção do Sul, sendo mais encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia e do Cerrado. Possui como característica uma corola campanulada internamente pubescente, o que a difere das demais espécies de *Chomelia*. Esta espécie é classificada como uma árvoreta, pois possui tronco definido e tem tamanho de um arbusto. Possui grupos de quatro folhas verticiladas ao redor do caule, contendo de 3 a 4 cm de comprimento por 2 a 2,5 cm de largura. Outras características incluem formato elíptico, pecioladas, consistência herbácea, nervuras primárias e secundárias proeminentes. Seus frutos verdes têm a presença de manchas marrons em sua parte superior com tamanho variando entre 1 e 1,5 cm, e quando maduros passam a ter uma cor preta (Figura 1.7) (NASCIMENTO *et al.*, 2018). Em relação aos estudos botânicos voltados para a taxonomia desta planta, sua morfologia

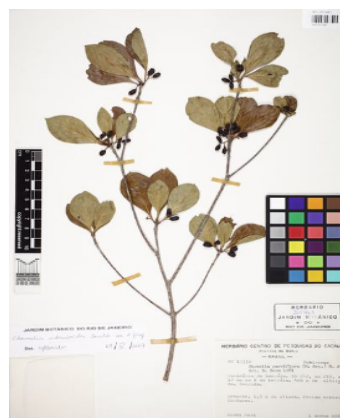
causa divergências a respeito de qual gênero essa espécie deveria ser classificada, até o momento permanece no gênero *Chomelia*, mas é possível observar sinonímias em gêneros diversos (**Figura 1.8**) (PESSOA, 2024). Os estudos dessa espécie estão concentrados na parte botânica, não existindo até o momento estudos químicos e biológicos, sendo relevante a sua investigação através de técnicas hífenadas para contribuição com o conhecimento da espécie e do gênero.

Figura 1.7 A. Espécie *C. ribesioides*. B. Exsicata da espécie *C. ribesioides*

A



B



fonte: PESSOA, 2024.

Figura 1.8 A. Sinonímias para a espécie *C. ribesioides*. B. Folhas da espécie *C. ribesioides*.

A

heterotípico *Anisomeris ribesioides* var. *villosula* Standl.
 ☐ heterotípico *Chomelia parviflora* (Müll.Arg.) Müll.Arg.
 ☐ heterotípico *Chomelia ribesioides* var. *tomentosa* (Müll.Arg.) Müll.Arg.
 heterotípico *Chomelia ribesioides* var. *villosula* (Müll.Arg.) Müll.Arg.
 ☐ heterotípico *Guettarda rhamnifolia* Standl.
 heterotípico *Malanea centralis* Sucre
 heterotípico *Malanea parviflora* Müll.Arg.
 heterotípico *Malanea ribesioides* var. *tomentosa* Müll.Arg.
 heterotípico *Malanea ribesioides* var. *villosula* Müll.Arg.
 homotípico *Anisomeris ribesioides* (Benth. ex A.Gray) Rusby
 homotípico *Caruelina ribesioides* (Benth. ex A.Gray) Kuntze
 homotípico *Malanea ribesioides* (Benth. ex A.Gray) Müll.Arg.

B



fonte: (A) PESSOA, 2024.

1.4 - Uso de Técnicas Hífenadas e da Plataforma *GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking)* para Investigação Química de Extratos de Plantas

As técnicas hífenadas são comumente aplicadas para a obtenção de informações a respeito dos metabólitos presentes nas plantas, sem a necessidade de isolamento dos compostos. Essas técnicas consistem na separação de compostos através

de técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida (CL) ou cromatografia gasosa (CG). Após a separação dos compostos, a amostra é conduzida para técnicas espectroscópicas ou espectrométricas que atuam como detector, como exemplos temos o detector de arranjo de diodos (DAD), o espectrômetro de massas (EM e EM/EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) que podem ser acoplados às técnicas cromatográficas, passando a ser chamado de técnica hifenada: CL-EM (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), CL-RMN (cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear), CL-DAD (cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos), CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O tratamento de dados obtidos pela análise de amostras via CL-EM/EM pode ser realizado usando *softwares* como *DataAnalysis 4.0*, *Bruker Smart Formula* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e bases de dados do *software CompoundCrawler*, juntamente com os dados na literatura, como ferramentas para a identificação dos compostos. O uso destes *softwares* e das bases de dados permite escolher áreas de interesse do espectro e pico do íon molecular específico, além de fornecer o erro, os íons fragmentos (EM²), propor a estrutura química e fórmula molecular (MENDES *et al.*, 2023).

O *Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)* é uma plataforma *online* de livre acesso utilizada para armazenamento e comparação de resultados de espectros de massas. Essa ferramenta possibilita a análise espectral através dos bancos de dados presentes no *GNPS*, e a desreplicação dos compostos é realizada a partir da criação de redes moleculares que acusam as similaridades espectrais. As redes moleculares facilitam a organização de dados de EM, mesmo trabalhando com uma grande quantidade de compostos, além de fornecer informações de metadados da amostra, que torna as análises mais eficientes e práticas (HUO *et al.*, 2023; PILON *et al.*, 2021). Nesse sentido, a plataforma *GNPS* pode agregar com a desreplicação dos compostos presentes na *Chomelia ribesioides*, enriquecendo os resultados químicos e biológicos já conhecidos para o gênero *Chomelia* e fornecendo novas informações para a espécie, para uma possível aplicação cosmética. Com isso em mente, surge o interesse no desenvolvimento desta pesquisa.

2 - OBJETIVO

Este projeto de pesquisa teve como objetivo a investigação química da

espécie *Chomelia ribesioides*, assim como a determinação da atividade anti-enzimática (elastase e tirosinase) e antioxidante, tendo em vista que são atividades interessantes na busca de agentes para aplicação em cosméticos.

2.1 - Objetivos específicos

- ❖ Coleta dos frutos e folhas de *C. ribesioides*;
- ❖ Secagem das folhas e preparo dos extratos etanólicos dos frutos frescos e folhas;
- ❖ Fracionamento dos extratos etanólicos de *C. ribesioides*;
- ❖ Prospeção química dos constituintes presentes no extrato e/ou frações ativas por CG-EM e CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM;
- ❖ Triagem biológica frente às enzimas elastase e tirosinase dos extratos e frações obtidos de *C. ribesioides*;
- ❖ Determinação da atividade antioxidante (método DPPH), quantificação dos compostos fenólicos pela técnica de espectroscopia (UV-Vis).

3 - METODOLOGIA

3.1 - PREPARO DE AMOSTRAS E ESTUDO QUÍMICO

3.1.1 - Coleta e Preparo dos Extratos

O estudo da espécie *Chomelia ribesioides* foi vinculado ao Programa MAI/DAI - UFCAT (Processo: 403611/2020-2) e ao projeto FINEP colaborativo entre Brasil e Alemanha (NativePlantInnovation 0558/21) “Plantas nativas brasileiras como fonte de matéria-prima inovadora para uso agrícola sustentável e cosmético, contribuindo para bioeconomia aprimorada”. Os frutos e folhas de *C. ribesioides* foram coletadas no dia 02 de fevereiro de 2023, na Reserva Ecológica Pasto do Pedrinho, em Catalão - GO (latitude: 18° 9' 57" sul, longitude: 47° 56' 47" oeste, altitude: 835 metros). A identificação vegetal foi realizada pelo Prof. Dr. Helder N. Consolaro, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Catalão (UFCAT). O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o número A1E6774 (<https://sisgen.gov.br/>).

As folhas foram secas em estufa a 40 °C por sete dias, sendo posteriormente trituradas e maceradas com etanol PA. Os frutos frescos foram colocados diretamente no etanol para o processo de extração. O material vegetal permaneceu no processo de maceração por no mínimo 3 dias, posteriormente foi concentrado no rotaevaporador a 40 °C (Marca IKA, modelo RV 05 Basic), equipado

com bomba de vácuo (Vaccubrand, Modelo ME 1C) e banho maria (marca FISATOM). Após a remoção do solvente foram obtidos os extratos etanólicos da folha (CrFE) e do fruto (CrFrE), e então armazenados no freezer.

3.1.2 - Fracionamento dos Extratos Etanólicos (Partição Líquido-Líquido)

Após o preparo dos extratos etanólicos da folha (CrFE) e do fruto (CrFrE), uma alíquota de 7 g de cada foi solubilizada em 400 mL de etanol/água na proporção 1:3 (v/v). Posteriormente, adicionou-se esta solução em um funil de separação seguida da adição de 100 mL de hexano, repetindo o processo por três vezes. Então, 100 mL de acetato de etila foram adicionados na fase aquosa, repetindo o processo por três vezes. Em sequência, as frações hexano e acetato de etila foram levadas ao rotaevaporador para remoção dos respectivos solventes. A fração hidroalcoólica foi obtida após a remoção do solvente orgânico (hexano ou acetato de etila) no rotaevaporador e liofilização. As frações secas foram pesadas para cálculo de rendimento e alíquotas foram pesadas para realização dos ensaios enzimáticos.

3.1.3 - Condições Cromatográficas da Técnica de CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM

As amostras CrFE e CrFrE foram solubilizadas em 1 mL de água/metanol/isopropanol (4:3:3, v/v/v), obtendo-se uma solução-estoque a 5 mg/mL. Em seguida 0,1 mL desta solução foi diluída em 1 mL de água/metanol/isopropanol (4:3:3, v/v/v), obtendo-se uma concentração de 0,5 mg/mL e 1 µL foi injetado.

As análises de CLUE-EM/EM foram feitas em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass (Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar). O equipamento usado foi o cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (CLUE-ESI-QqTOF-EM/EM) (Agilent, modelo Infinity II 1290), equipado com sistema de EM IMPACT HD™ (Bruker Daltonics), composto por fonte electrospray (ESI), analisador híbrido de íons do tipo quadrupolo-tempo de voo (QqToF) e *software* DataAnalysis.

Para a análise foi utilizada uma coluna analítica Cortecs™ C18+ (2,7 µm; 10 × 0,21 cm) (Waters, Milford, MA, EUA), com fase móvel composta por água (A), acetonitrila (B) e 0,1% de ácido fórmico em ambos os solventes. Um gradiente linear de 5 a 100% de B em 20 min foi utilizado a uma vazão de 0,4 mL/min a 40 °C. Os experimentos de ionização foram realizados no modo positivo $[M + H]^+$. Os parâmetros utilizados para fonte de ionização foram: nebulizador a 3,0 bar, fluxo de gás seco de 8,0 L/min, temperatura do aquecedor seco de 180 °C, tensão capilar de 4500 V,

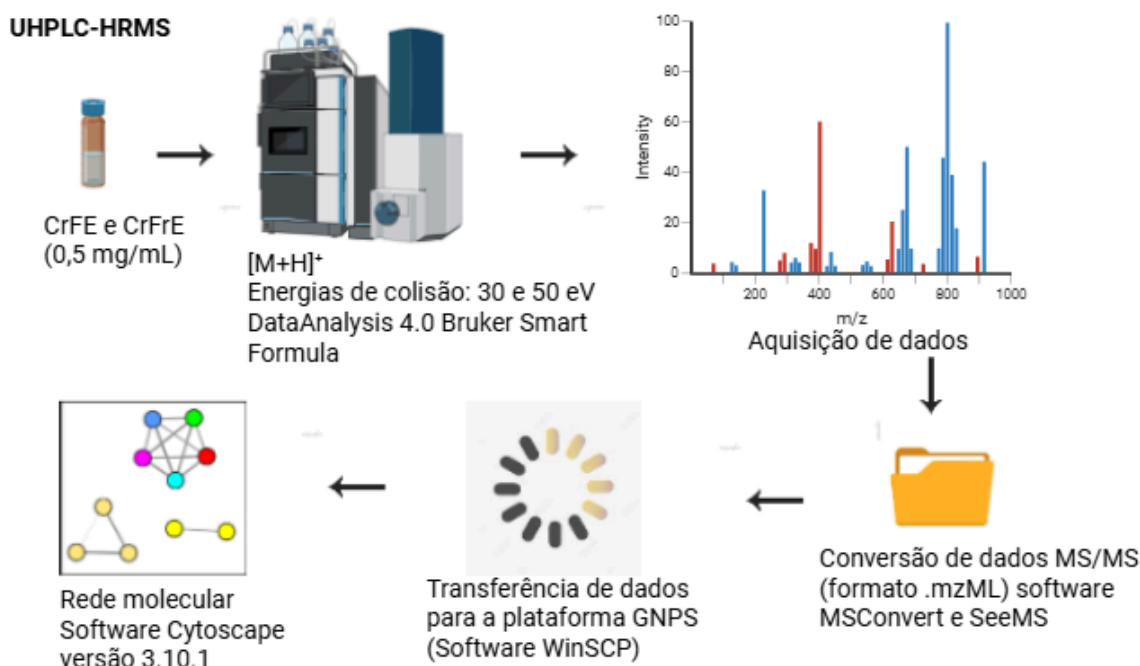
deslocamento da placa final de 500 V e energia da célula de colisão de 5 eV. A aquisição dos espectros foi realizada no modo auto EM/EM, com energia de colisão de 30 e 50 eV em toda a faixa m/z analisada (100-1000). Para a anotação dos compostos, foram utilizados os *softwares Data Analysis 4.0* e *Bruker Smart Formula* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.1.4 - Criação de Redes Moleculares na Plataforma GNPS

Os dados espectrais obtidos dos experimentos de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM para os extratos brutos das folhas e dos frutos da *C. ribesioides* (CrFE e CrFrE) foram inseridos na plataforma GNPS para se obter as redes moleculares (**Figura 3.1**). As redes moleculares foram criadas utilizando o fluxo de trabalho *online* disponível no site GNPS (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) por meio da plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Dentre as configurações escolhidas para criação das redes moleculares estão a tolerância da massa do pico do íon molecular que foi definida em 0,02 Da, e a tolerância dos íons fragmentos em 0,02 Da. Em seguida, uma rede foi criada, em que as arestas foram filtradas para manter apenas aquelas com um cosseno igual ou superior a 0,7, e os nós possuindo no mínimo 6 picos correspondentes.

Além disso, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as conexões de menor pontuação foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho ficasse abaixo desse limite. Os espectros presentes nas redes foram comparados com as bases de dados espectrais da plataforma do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados experimentais inseridos. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca precisaram ter um escore acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes para que fosse feita a anotação dos compostos. As redes geradas foram processadas e visualizadas no *software Cytoscape 3.10.1*.

Figura 3.1 Fluxograma para criação da rede molecular na plataforma do GNPS.



fonte: criado em BionRender.com.

3.1.5 - Condições Cromatográficas da Técnica de CG-EM

As frações hexânicas da folha e fruto da *C. ribesioides* (CrFEHe e CrFrEHe) foram solubilizadas em 1 mL de metanol na concentração de 1 mg/mL e injetadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas [CG Agilent 7820A, acoplado ao EM (quadrupolo, G4513A)]. O preparo das amostras e as análises foram realizadas nos laboratórios do Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão (IQ-UFCAT).

As amostras foram injetadas no modo *split* com um *delay* de 2 min, a temperatura do forno se manteve em 50 °C por 2 min, em seguida se iniciou o gradiente de 4 °C/min até o forno atingir 70 °C, após isso a temperatura subiu à 25 °C/min até 200 °C, e por fim 4 °C/min até os 300 °C onde se manteve por 3 min. O gás de arraste usado foi o hélio com um fluxo de 1,0 mL/min, em uma coluna HP-5MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm) para a separação dos constituintes químicos. O espectrômetro de massas ionizou os compostos por impacto de elétrons (energia de ionização de 70 eV, fonte a 230 °C), foi realizada uma varredura na faixa de *m/z* 50 - 600.

A identificação dos compostos presentes na fração hexânica da folha e do fruto da *C. ribesioides* foi feita com a comparação dos dados experimentais e os dados presentes na biblioteca *NIST Mass Spectral 2.0*. Também foi feita a injeção de um

padrão de hidrocarbonetos para obter o tempo de retenção e calcular o IRL dos compostos através do software *Retensoft*.

3.2 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A triagem com os extratos etanólicos da folha e do fruto da *C. ribesioides* frente às enzimas elastase e tirosinase foram feitas no Laboratório de Estudos de Biomoléculas, localizado no IQ-UFCAT.

3.2.1 - Preparo das Amostras para os Ensaios Enzimáticos

Uma solução estoque na concentração de 31 mg/mL em DMSO foi preparada para as amostras de extratos etanólicos dos frutos e das folhas de *C. ribesioides*, bem como de suas frações. Em seguida, foram pipetados 30 µL da solução estoque (31 mg/mL) e diluído em 150 µL de água ultrapura e 120 µL de DMSO, para a obtenção da concentração de 3,1 mg/mL.

3.2.2 - Preparo dos Reagentes para o Ensaio Enzimático da Elastase

a) Tampão

Para a triagem enzimática foi preparada uma solução de tampão trizma (pH = 8,0) (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 mM.

b) Substrato

O substrato *N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida (sucAla₃-*p*NA) (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em tampão trizma na concentração de 4,4 mM.

c) Enzima

Foi preparada uma solução de 200 µL, contendo 0,3 unidades/mL de elastase (2 µL) em tampão (198 µL). A solução tampão trizma e o substrato sucAla₃-*p*NA foram mantidos na geladeira até a utilização no ensaio enzimático (2-8 °C).

3.2.3 - Ensaio Enzimático da Elastase

O ensaio foi padronizado e realizado com o espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis modelo G6860A (Serial No. MY24239213) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Na triagem dos possíveis inibidores foi utilizada a elastase pancreática suína (E.C.3.4.21.36) (CAS 394445-21-1, Sigma-Aldrich). O substrato utilizado para medir a cinética da elastase é o *N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida que é hidrolisado em *N*-succinil-Ala-Ala-Ala e *p*-nitroanilina. O ensaio enzimático foi realizado com base na medida da atividade da elastase, determinada pela leitura

espectrofotométrica da absorbância da *p*-nitroanilina em 410 nm conforme procedimentos anteriores com algumas adaptações (CHIOCCHIO *et al.*, 2018; KORKMAZ *et al.*, 2010; MERFORT, 2012; SILVA *et al.*, 2025).

A concentração das amostras dos extratos (CrFE e CrFrE) e frações (**item 3.2.1**) utilizada no ensaio enzimático foi de 100 µg/mL. Na cubeta, a concentração dos reagentes, tampão trizma, substrato sucAla3-*p*NA e elastase, foram de 85 mM, 0,3 mM e 0,2 µg/mL, respectivamente.

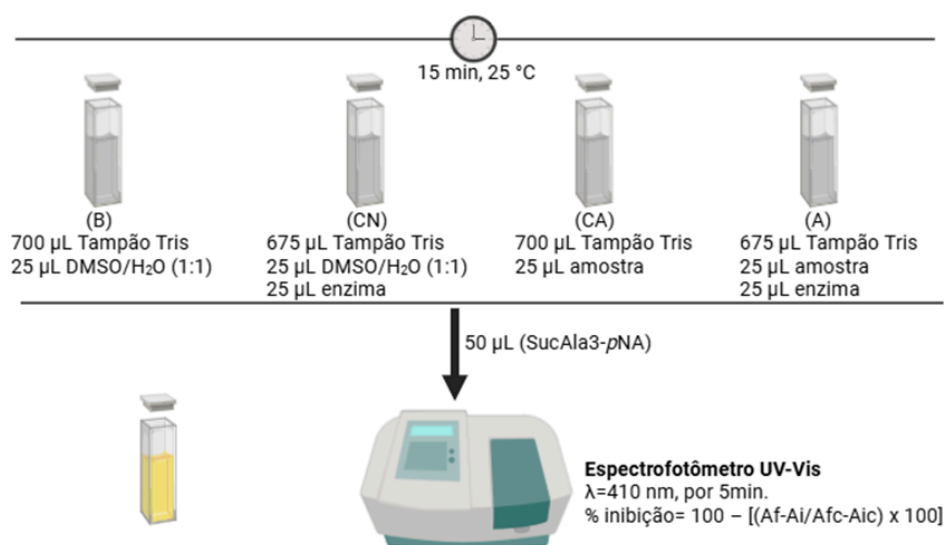
Para leitura, foram preparadas quatro soluções, as quais foram classificadas como: branco (**B**), controle negativo (**CN**), controle da amostra (**CA**) e amostra (**A**). A solução **B** foi preparada com 700 µL de tampão trizma e 25 µL de DMSO/H₂O (1:1); na solução **CN** utilizou-se 675 µL de tampão trizma, 25 µL de DMSO/H₂O (1:1) e 25 µL da enzima elastase; em **CA**, 700 µL de tampão trizma e 25 µL da amostra; e a solução **A** utilizou-se 675 µL de tampão trizma, 25 µL da amostra e 25 µL da enzima elastase. Essas soluções foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, 50 µL do substrato (0,3 mM) foi adicionado em cada solução, antes da leitura no espectrofotômetro de absorção no UV-visível. Os ensaios foram realizados em duplicata e os parâmetros utilizados na leitura das soluções no espectrofotômetro comprimento de onda de 410 nm, por 5 min a temperatura ambiente, leitura inicial (0 min) e final (5 min), conforme a **Figura 3.2**.

Os cálculos da inibição das amostras foram feitos com base nos valores de absorbância, sendo convertidos em concentração de produto reacional (*p*-nitroanilina). Os cálculos de inibição enzimática foram feitos em comparação com o controle negativo (**CN**), usando a equação a seguir:

$$\% \text{Inibição} = 100 - [(Af - Ai) / (Afc - Aic) \times 100], \text{ Em que:}$$

- Af = Absorbância final da amostra (**A**);
- Ai = Absorbância inicial da amostra (**A**);
- Afc = Absorbância final do controle negativo (**CN**);
- Aic = Absorbância inicial do controle negativo (**CN**).

Figura 3.2 Fluxograma do ensaio enzimático para enzima elastase.



fonte: criado em BionRender.com.

3.2.4 - Preparo dos Reagentes para o Ensaio Enzimático da Tirosinase

a) Tampão

A solução do tampão de fosfato de potássio (pH = 6,5) (Êxodo Científica) foi preparada na concentração de 50 mM.

b) Substrato

O substrato L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (Sigma-Aldrich), foi solubilizado no tampão de fosfato para se obter uma solução de 3,5 mM.

c) Enzima

A solução da enzima foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL em tampão fosfato e armazenada em freezer (-18 °C). As soluções de tampão e do substrato foram armazenadas na geladeira até o uso (2-8 °C).

3.2.5 - Ensaio Enzimático da Tirosinase

O ensaio enzimático padronizado da enzima tirosinase foi realizado utilizando a enzima tirosinase EC 1.14.18.1 (T3824, Sigma-Aldrich) extraída do cogumelo *Agaricus bisporus*, popularmente conhecido como *Champignon*. A tirosinase é uma metaloenzima que utiliza dois substratos em sua via metabólica, a L-tirosina e o L-DOPA. O ensaio enzimático foi realizado usando como substrato o L-DOPA e a atividade da tirosinase foi determinada pela leitura espectrofotométrica da absorbância do produto reacional, a dopaquinona, a 475 nm (CHEN; KUBO, 2002; HWANG *et al.*, 2007; KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2025).

As amostras dos extratos (CrFE e CrFrE) e frações foram avaliadas a 100 µg/mL. Na cubeta, as concentrações do tampão fosfato de potássio, do substrato e da enzima tirosinase foram de 20 mM, 0,5 mM e 30 µg/mL (50 unidades/mL), respectivamente.

Para o ensaio enzimático as cubetas foram distribuídas no mesmo modelo apresentado no ensaio da elastase (seção 3.2.3): o branco (**B**) contendo 310 µL de tampão de fosfato de potássio, 329 µL de água ultra pura e 25 µL de DMSO/H₂O (1:1); o controle negativo (**CN**) contendo 310 µL de tampão de fosfato de potássio, 284 µL de água ultra pura, 25 µL de DMSO/H₂O (1:1) e 45 µL da enzima tirosinase; o controle da amostra (**CA**) contendo 310 µL de tampão de fosfato de potássio, 329 µL de água ultra pura e 25 µL da amostra; e a solução da amostra (**A**) contendo 310 µL de tampão de fosfato de potássio, 284 µL de água ultra pura, 25 µL da amostra e 45 µL da enzima tirosinase. Essas soluções foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período, 111 µL do substrato (0,5 mM) foi adicionado em cada solução antes da leitura no espectrofotômetro de absorção no UV-visível. Os ensaios foram realizados em duplicata e os parâmetros utilizados na leitura das soluções no espectrofotômetro no comprimento de onda de 475 nm, por 5 min a temperatura ambiente, leitura inicial (0 min) e final (5 min), conforme a **Figura 3.3**.

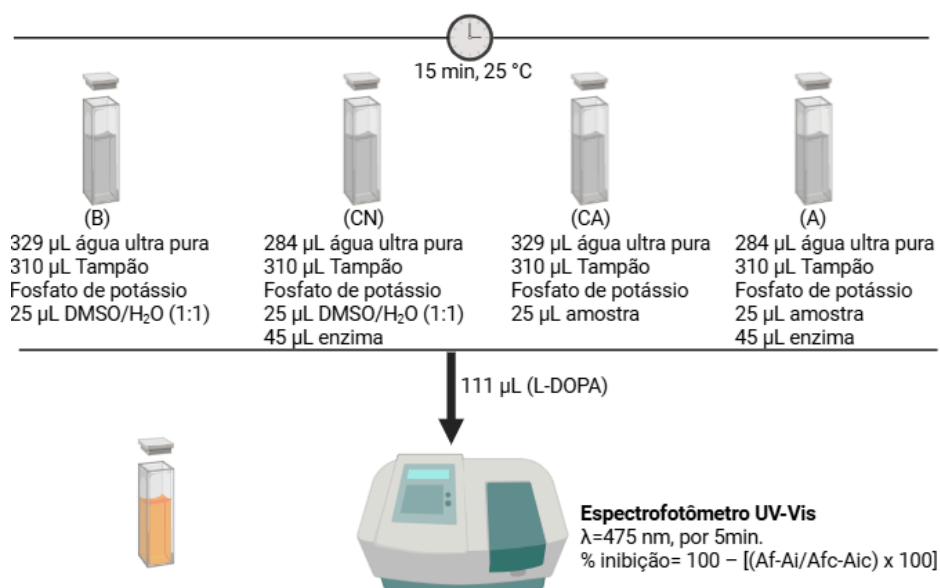
O cálculo do percentual de inibição foi feito usando os valores de absorbância, através da conversão em concentração de produto reacional (dopaquinona). Os cálculos de inibição enzimática foram feitos em comparação com o controle negativo (**CN**), usando a equação a seguir:

$$\% \text{Inibição} = 100 - [(A_f - A_i) / (A_{fc} - A_{ic}) \times 100],$$

onde:

- A_f = Absorbância final da amostra (**A**);
- A_i = Absorbância inicial da amostra (**A**);
- A_{fc} = Absorbância final do controle negativo (**CN**);
- A_{ic} = Absorbância inicial do controle negativo (**CN**).

Figura 3.3 Fluxograma do ensaio enzimático para enzima tirosinase.



fonte: criado em BionRender.com.

3.3 - ENSAIO ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH)

O ensaio para avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos da folha e fruto da *C. ribesoides* (CrFE e CrFrE), assim como as frações de acetato de etila (CrFEAcE e CrFrEAcE) foi feito com o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Foi estabelecido um protocolo com base na literatura (RUFINO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2017). Todas as etapas do ensaio foram realizadas nos laboratórios do Instituto de Química da Universidade Federal de Catalão (IQ/UFCAT).

3.3.1 - Preparo dos Reagentes

a) Solução estoque de DPPH

Foi preparada uma solução a 60 µM de DPPH (Sigma-Aldrich) em metanol (99,9% *HPLC*, SCIAVICCO), a qual foi armazenada na geladeira e sem contato com a luz.

b) Solução de ácido ascórbico (controle positivo)

Foi preparada uma solução estoque de ácido ascórbico na concentração de 3 mg/mL; a partir dela foram feitas diluições seriadas para obter as concentrações de trabalho (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 µg/mL).

3.3.2 - Preparo das Amostras dos Extratos e Frações

Para cada amostra (CrFE, CrFrE, CrFEAcE e CrFrEAcE) foi preparada uma solução estoque a 3 mg/mL em metanol. A partir de diluições seriadas foram

preparadas as soluções nas seguintes concentrações: 100; 50; 25; 12,5; 9,38; 6,25; 4; 3,13; 2 e 1,57 µg/mL.

3.3.3 - Curva do DPPH

A curva de calibração foi feita em duplicata para cada concentração (9,7; 19; 29; 38,7; 48 e 58 µM). As soluções foram preparadas em cubetas de vidro utilizando a solução estoque de DPPH (58 µM) e metanol (**Tabela 3.1**), em seguida feita a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm (RUFINO *et al.*, 2008).

Tabela 3.1 Preparo das soluções com diferentes concentrações de DPPH.

DPPH	Solução estoque (mL)	Metanol (mL)	Concentração (µM)
Branco	0	3	-
1	0,5	2,5	9,7
2	1	2	19
3	1,5	1,5	29
4	2	1	38,7
5	2,5	0,5	48
6	3	0	58

3.3.4 - Determinação da Atividade Antioxidante das Amostras da *C. ribesioides*

O ensaio foi feito em triplicata utilizando tubos de ensaios envolvidos com papel laminado para homogeneizar e incubar a mistura. Os tubos foram separados em quatro tipos [controle negativo (CN), branco do DPPH (B), controle da amostra (CA) e amostra (A)]. Em CN: 3000 µL de DPPH (60 µM); B: 3000 µL de metanol; CA: 2900 µL de metanol e 100 µL de amostra (extrato, fração ou padrão); A: triplicata com 2900 µL de DPPH e 100 µL de amostra (extrato, fração ou padrão). Após a adição das soluções, as misturas ficam incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente (sem contato com a luz), em seguida são transferidas para cubetas e lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Com os valores de absorbância obtidos e com auxílio dos softwares *Microsoft Excel version 2019* e *GraphPad Prism 10.6.0* foi possível obter algumas informações utilizando as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ ativ. antioxi.} = ((\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs amostra}) / (\text{Abs}_{\text{DPPH}})) * 100 \quad \text{Fórmula 1}$$

$$\text{g DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1.000.000) * 394,3 \quad \text{Fórmula 2}$$

$$\text{g extrato/g DPPH} = (\text{EC}_{50} / 1000) / \text{g DPPH} \quad \text{Fórmula 3}$$

$$\text{IAA} = \text{concentração inicial de DPPH} (\mu\text{g/mL}) / \text{EC}_{50} (\mu\text{g/mL}) \quad \text{Fórmula 4}$$

- Abs_{DPPH} = absorvância do controle negativo;
- Abs amostra = absorvância das triplicatas (extrato, fração ou padrão)
- EC_{50} = metade da concentração efetiva;
- g extrato/g DPPH = quantidade (em gramas) de extrato para reduzir uma grama de DPPH;
- IAA = índice de atividade antioxidante.

3.4 - QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS NA ESPÉCIE *C. RIBESIOIDES*

A determinação do teor de fenóis presentes nos extratos etanólicos e frações da *C. ribesiodides* (CrFrE e CrFE) foi realizada no Laboratório de Estudos de Biomoléculas (IQ/UFCAT).

3.4.1 - Quantificação de Compostos Fenólicos

Para o preparo dos reagentes assim como a padronização da metodologia do ensaio de quantificação de fenóis totais foram utilizados procedimentos relatados na literatura, com algumas modificações (DAMIANI *et al.* 2014; LAZZAROTTO *et al.* 2020).

3.4.2 - Preparo dos Reagentes

a) Solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3)

Foi pesado 10,1 g de Na_2CO_3 P.A. e diluiu-se com água ultrapura para 100 mL em balão volumétrico.

b) Solução Folin-Ciocalteu 3%

Foram diluídos 3 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) em água ultrapura e completou para o volume de 100 mL em balão volumétrico.

c) Solução estoque do padrão (ácido gálico)

Foi solubilizado 10,7 mg de ácido gálico anidro 99% em metanol (99,9% *HPLC*, SCIAVICCO) na concentração de 100 μ g/mL. Após o preparo, os reagentes foram armazenados na geladeira dentro de um frasco de vidro âmbar.

3.4.3 - Preparo das Amostras dos Extratos e Frações

Foram preparadas soluções estoques dos extratos etanólico da folha e do fruto da espécie *C. ribesiodides* (CrFE e CrFrE), e as frações de acetato de etila da folha (CrFEAcE) e fruto (CrFrEAcE), na concentração de 1,3 mg/mL (em metanol) de cada amostra. Para solução de trabalho, a concentração foi diluída para 0,195 mg/mL.

3.4.4 - Curva Padrão de Compostos Fenólicos

O ácido gálico anidro 99% é comumente utilizado como padrão na quantificação de fenóis totais presentes em uma amostra, são preparadas soluções em diferentes concentrações para se obter a curva padrão. A partir da solução estoque (100 µg/mL) foram preparadas as seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60 e 80 µg/mL (Tabela 3.2).

Para o preparo da curva padrão foi feita a triplicata para cada concentração em tubos de ensaios previamente envolvidos com papel laminado. Em cada tubo foi adicionado 1375 µL do reagente Folin-Ciocalteu 3% e 125 µL do padrão. Após 5 minutos, foi adicionado 125 µL da solução de Na₂CO₃ 10% e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente (sem interferência de luz). Em seguida, feita a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 765 nm.

Tabela 3.2 Preparo das soluções com diferentes concentrações de ácido gálico.

Padrão (ácido gálico)	Solução estoque (mL)	Metanol (mL)	Concentração (µg/mL)
Branco	0	10	-
Padrão 1	1	9	10
Padrão 2	2	8	20
Padrão 3	4	6	40
Padrão 4	6	4	60
Padrão 5	8	2	80
Padrão 6	10	0	100

3.4.5 - Quantificação dos Fenóis Totais na *C. ribesoides*

Na análise dos extratos (CrFE, CrFrE) e das frações (CrFEAcE e CrFrEAcE) a quantificação também foi feita em triplicata, seguindo procedimento semelhante, ao invés da adição de 125 µL da solução do padrão foi adicionado 125 µL da amostra (0,195 mg/mL). Nos tubos foram adicionados a solução de Folin-Ciocalteu 3% e a amostra, após 5 minutos foi adicionado o carbonato de sódio, a mistura foi incubada por 60 minutos nas mesmas condições já apresentadas, então foi realizada a leitura a 765 nm no espectrofotômetro. A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras analisadas, foi realizada utilizando as seguintes fórmulas:

$$y = ax + b$$

Fórmula 1

$$Fd = 1,3 \text{ mg} / 0,195 \text{ mg} = 6,67$$

Fórmula 2

$$\text{mg EAG/ g amostra} = \text{EAG} * \text{solvente} * Fd / \text{amostra}/1000$$

Fórmula 3

- y = absorvância;
- x e EAG = equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$);
- solvente = metanol (mL);
- F_d = fator de diluição;
- amostras = CrFE, CrFrE, CrFEAcE ou CrFrEAcE (g).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o preparo dos extratos etanólicos da folha e do fruto da *C. ribesiodides* (CrFE e CrFrE), foi realizada a investigação química e biológica e os resultados discutidos conforme a metodologia já apresentada.

4.1 - FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS (PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO)

A extração com etanol por maceração foi realizada a partir de 144,5 g de frutos e 59,0 g de folhas secas moídas da *C. ribesiodides*. Após a remoção do solvente em rotaevaporador foram obtidas 18,1 g do extrato CrFrE e 15,0 g do extrato CrFE. A partição líquido-líquido foi realizada para ambos os extratos etanólicos utilizando 7 g de cada extrato, sendo obtido as quantidades descritas na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 Massas obtidas dos extratos e frações de *C. ribesiodides*.

Código	Extrato bruto (g)	Rendimento (%) ^a	Frações	Massa (g)	Rendimento (%) ^b
CrFrE	18,1	12,5	Hexânica	0,4	5
			Acetato de Etila	1,0	14,4
			Hidroalcoólica	*	*
CrFE	15,0	25,4	Hexânica	1,2	16,6
			Acetato de Etila	2,2	31,6
			Hidroalcoólica	2,4	34,1

*Não foi liofilizado. CrFrE: extrato etanólico do fruto de *C. ribesiodides*; CrFE: extrato etanólico da folha de *C. ribesiodides*. ^a Rendimento calculado com base na massa fresca dos frutos e na massa seca das folhas. ^b Rendimento calculado com base na massa utilizada para partição (7,0g).

4.2 - PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE *C. RIBESIOIDES*

4.2.1 - Desreplicação dos Compostos nos Extratos

As redes moleculares foram geradas na plataforma do *GNPS* (descrito no item 3.1.4), a partir da análise dos dados experimentais de espectrometria de massas dos extratos da folha (CrFE) e do fruto (CrFrE) obtidos do experimento de CLUE-EM/EM no modo positivo $[M+H]^+$ (**Figura 4.1**). Os principais parâmetros estabelecidos para o processamento dos dados foram o valor de cosseno, erro, diferença de massa e picos semelhantes, tendo todas as correspondências entre os espectros da rede (experimental) e os espectros da biblioteca com escore acima de 0,7 e o mínimo de pelo menos 6 picos correspondentes para a anotação dos compostos. As redes geradas foram processadas e visualizadas no *software* Cytoscape 3.10.1 (WANG *et al.*, 2016) e os dados experimentais utilizados para a geração das redes de interações moleculares estão disponíveis no link <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e74f66ef28974966ac0394efc43aeec9>

Foram obtidos 376 nodos, incluindo os compostos que tiveram similaridade em seus dados EM/EM e os que não apresentaram correspondência espectral, dentre os quais, 133 nodos geraram 30 *clusters* e 243 nodos isolados. O nodo foi representado por gráfico de pizza em duas cores, sendo azul dos frutos e vermelho das folhas. Os dados inseridos na plataforma permitiram a comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros armazenados nas bibliotecas do *GNPS*, o que resultou na anotação de 38 compostos (**Figura 4.1**).

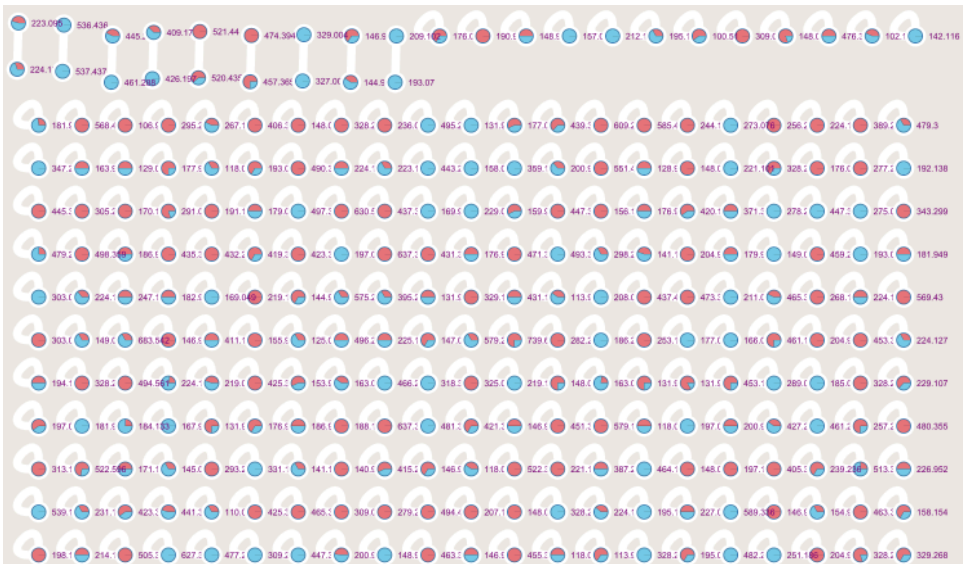
A plataforma *GNPS* possibilita que pesquisadores de diferentes grupos de pesquisa possam colaborar entre si com seus dados espectrais individuais, esse compartilhamento de informações facilita a desreplicação e identificação de compostos. A área de PNs em particular, teve um grande progresso com o uso de redes moleculares capazes de facilitar a análise espectros de massa obtidos de técnicas hifenadas. Outro fator interessante, é o aumento dos resultados inseridos na plataforma, resultando em bibliotecas maiores e com anotações mais precisas de compostos de PNs (PILON *et al.*, 2021).

A partir dos compostos anotados no *GNPS*, o tratamento de dados EM/EM experimentais foi feito também usando os *softwares* DataAnalysis 4.0, Bruker Smart Formula (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e as bases de dados do *software* CompoundCrawler. O uso destes *softwares*, do *molecular networking* e a comparação com os dados na literatura permitiu anotar 10 compostos. Dentre os compostos

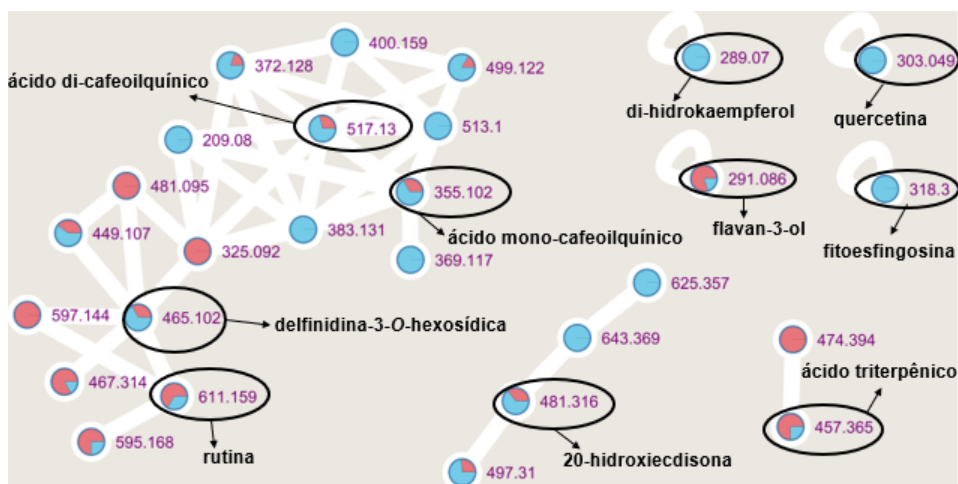
anotados, a quercetina, a fitoesfingosina e o di-hidrokaempferol tiveram correspondência apenas no fruto, os demais metabólitos foram anotados pelo *GNPS* estando presente nos frutos e nas folhas (**Figura 4.1**).

Figura 4.1 A. Redes moleculares geradas pelo *GNPS* dos extratos CrFrE (azul) e CrFE (vermelho). **B.** Rede molecular ampliada com os nodos destacados para os compostos anotados.

A



B



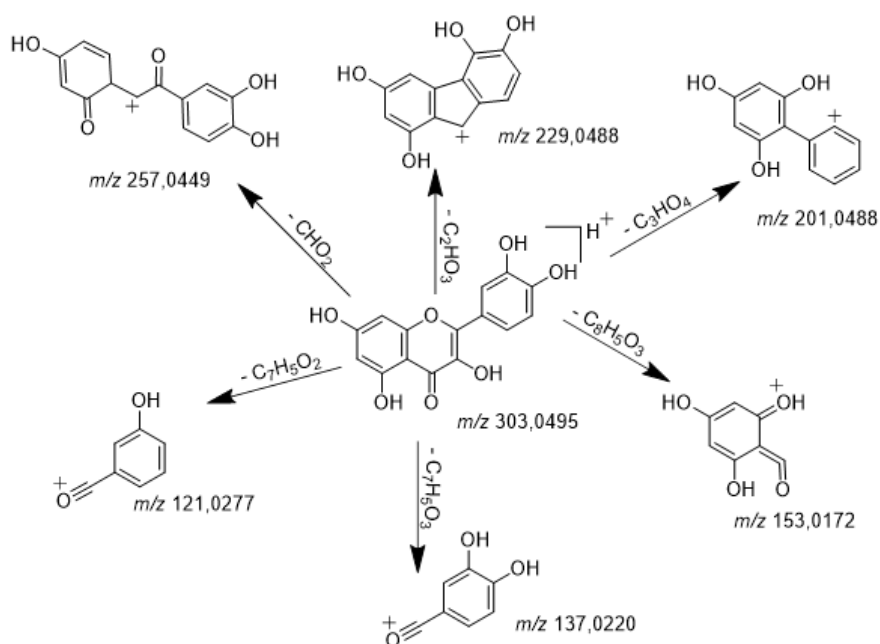
4.2.2 - Compostos Anotados no CrFrE e CrFE

Os dados espectrais obtidos no modo positivo $[M + H]^+$ para os extratos das folhas e frutos foram analisados e os compostos desreplicados usando o *GNPS* e os outros *softwares*. A comparação dos íons produtos com os dados da literatura e a investigação destes metabólitos secundários na família, gênero e espécie, confirmou a anotação de seis compostos presentes no extrato do fruto (CrFrE) (**1A**, **2A**, **3A**, **4A**, **5A** e **6A**) e sete no extrato da folha (CrFE) (**1B**, **2B**, **3B**, **4B**, **5B**, **6B** e **7B**) de *C. ribesoides*. No CrFrE os compostos são das classes esteroide, flavonoide e terpeno, enquanto no CrFE são compostos fenólicos e flavonoides (**Tabela 4.2**).

Nos cluster gerados pela análise do *molecular networking*, os compostos foram observados em ambos os extratos, com exceção da quercetina, di-hidrokaempferol e fitoesfingosina, que foram observados nas redes moleculares apenas no fruto (**Figura 4.1**). Entretanto, usando os *softwares* DataAnalysis 4.0, Bruker Smart Formula, *CompoundCrawler*, a presença da quercetina também foi observada na folha.

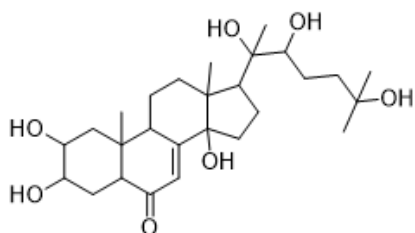
A quercetina (**1A** e **1B**, **Figura 4.2**) foi observada pelos picos do íon molecular $[M + H]^+$ em m/z 303,0495 no CrFE e m/z 303,0487 no CrFrE, fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$. Os íons produtos do CrFE m/z 257,0449 ($C_{14}H_9O_5^+$); 229,0488 ($C_{13}H_9O_4^+$); 201,0488 ($C_{12}H_9O_3^+$); 153,0172 ($C_7H_5O_4^+$); 137,0220 ($C_7H_5O_3^+$) e 121,0277 ($C_7H_5O_2^+$) e CrFrE (m/z 303,0487; 257,0479; 229,0478; 201,0533; 153,0141; 137,0213 e 121,0303), são característicos da quercetina (SCIGELOVA *et al.*, 2011).

Figura 4.2 Proposta de fragmentação da quercetina (**1A** e **1B**).



O composto **2A**, anotado como 20-hidroxiecdisona (**Figura 4.3**) é um composto pertencente à classe dos esteroides sendo muito comum em plantas. Esse composto apresentou o pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 481,3154 ($C_{27}H_{44}O_7$), com íons fragmentos característicos deste esteroide em m/z 463,3045; 445,2943; 371,2213; 303,1949 e 165,1263. Os íons fragmentos observados com m/z 463,3045 $[M - H_2O]^+$ é formado pela perda de -18,0109 Da, uma molécula de água e m/z 445,2943 $[M - 2H_2O]^+$ no espectro de EM² indica a perda de duas moléculas de água. Os íons fragmentos em m/z 371,2213 $[M - C_4H_{10}O]^+$ e 303,1949 $[M - C_8H_{16}O_3]^+$ representam a perda completa ou parcial da cadeia lateral do esteroide (LE *et al.*, 2014; ROSTANDY; GAO, 2019).

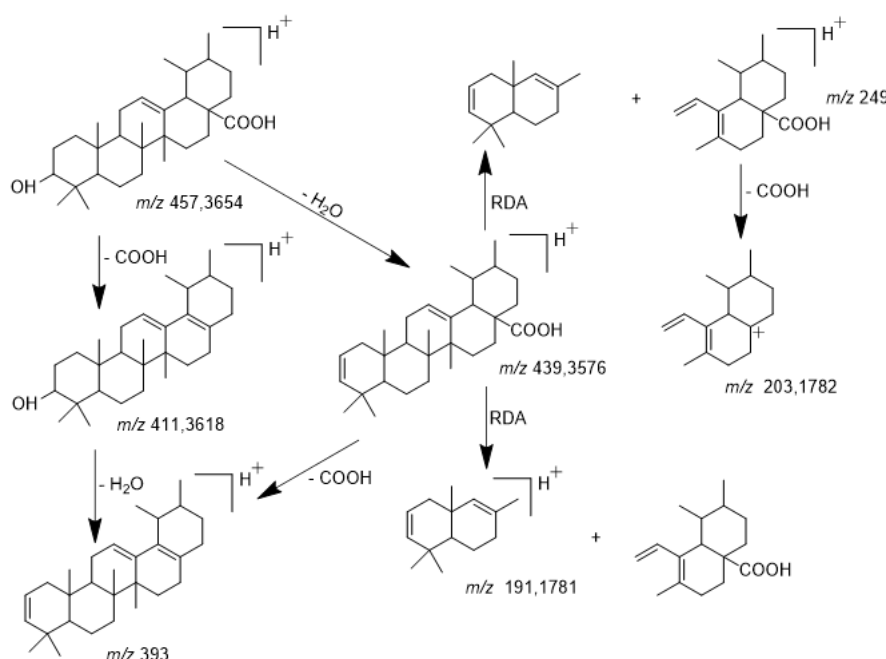
Figura 4.3 Estrutura da 20-hidroxiecdisona (**2A**).



O composto **3A** apresentou o pico do íon molecular em m/z 457,3654, fórmula química $C_{30}H_{49}O_3$. O íon produto de m/z 411,3618 foi gerado após a perda de 46,0036 Da referente a eliminação do grupo carboxílico $[M - COOH]^+$. É observado a eliminação de uma molécula de água pelo íon fragmento em m/z 439,3576 $[M - H_2O]^+$. Os íons fragmentos em m/z 203,1782 e 191,1781 são formados pela reação de retro-Diels-Alder (RDA), gerando os íons fragmentos de m/z 203,1782 e 191,1781.

Esses íons produtos são característicos de dois isômeros constitucionais ($C_{30}H_{49}O_3$), os ácidos ursólico e oleanólico, não sendo possível distinguir por espectrometria de massas, sendo o composto **3A** anotado como ácido triterpênico (**Figura 4.4**) (SHEN *et al.*, 2011).

Figura 4.4 Proposta de fragmentação do ácido triterpênico (ácido ursólico ou oleanólico) (**3A**).

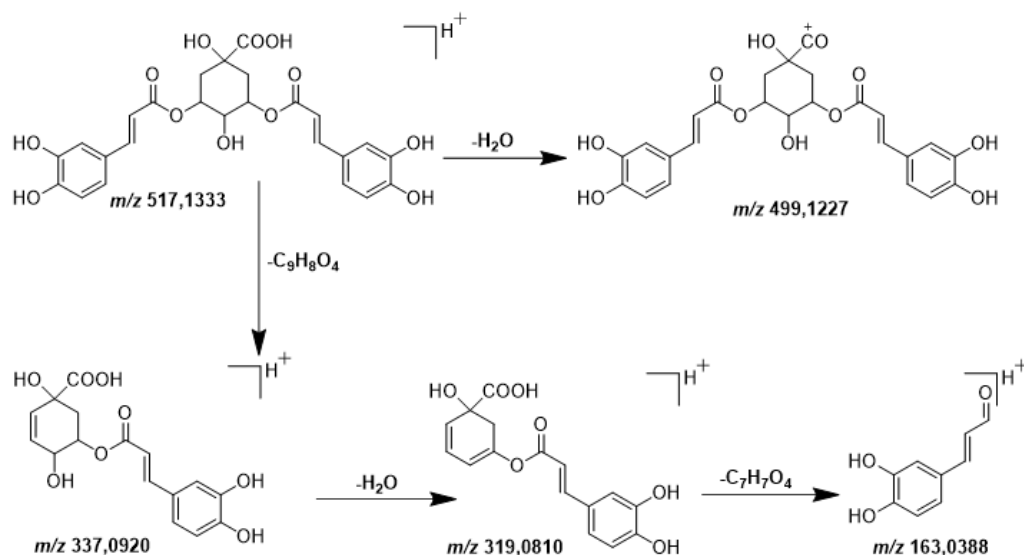


Os compostos **4A** (CrFrE) e **6B** (CrFE) foram anotados como um derivado de ácido di-cafeoilquínico (**Figura 4.5**), através dos picos característicos observados. O pico do íon molecular do **4A** em m/z 517,1333 ($C_{25}H_{25}O_{12}$) e seu pico base com m/z 163,0388 ($C_9H_8O_3$)⁺, são provenientes da eliminação da fração de ácido quínico [319,0810 – $C_7H_7O_4$]. O íon fragmento de m/z 499,1227 é resultante da perda de uma molécula de água [517,1333 – H_2O], e o pico de m/z 337,0920 ($C_{12}H_{16}O_8$)⁺ foi formado pela liberação de um ácido cafeico [517,1333 – $C_9H_8O_4$], seguida da perda de uma molécula de água [337,0920 – H_2O] gerando o íon fragmento com m/z 319,0810. Também foram observados íons que poderiam ser indicativos da liberação de ácido clorogênico (m/z 355,1026) e ácido cafeico (m/z 181,0485), todavia estes picos estavam em baixa intensidade. Os mesmos íons produtos foram observados no espectro EM/EM do composto **6B** (**Tabela 4.2**).

Os fragmentos característicos para o composto **4A** e **6B** são observados em isômeros de ácidos di-cafeoilquínico como: ácido 1,5-di-cafeoilquínico, ácido

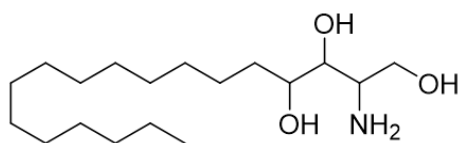
3,5-di-cafeoilquínico e o ácido 4,5-di-cafeoilquínico, mas não podem ser distinguidos por EM, sendo então anotados como ácido di-cafeoilquínico (SANTOS; LOPES, 2008; LI *et al.*, 2017).

Figura 4.5 Proposta de fragmentação do derivado de ácido di-cafeoilquínico (**4A** e **6B**).



O composto **5A**, foi anotado como fitoesfingosina (**Figura 4.6**) presente no CrFrE. O pico do íon molecular observado com m/z 318,3000 ($C_{18}H_{39}NO_3$), juntamente com os íons fragmentos observados em m/z 301,2935 ($C_{18}H_{38}NO_2^+$), m/z 300,2885 $[M - H_2O]^+$, m/z 284,9285 ($C_{17}H_{35}NO_2^+$), m/z 282,2799 $[M - 2H_2O]^+$ e m/z 60,0442 ($C_2H_6NO^+$) (WARD *et al.*, 2017; DAPIC *et al.*, 2019; AMARAL *et al.*, 2021).

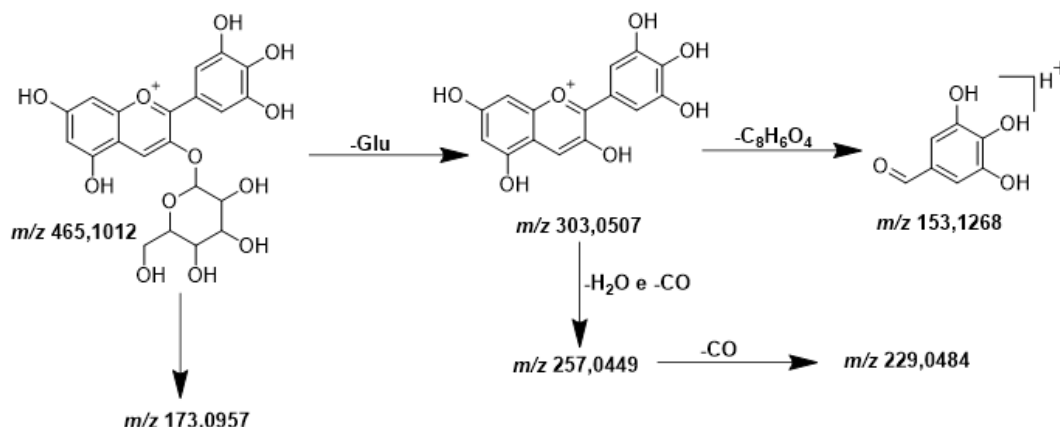
Figura 4.6 Estrutura da fitoesfingosina (**5A**).



Os compostos **6A** (CrFrE) e **7B** (CrFE) foram anotados como delfinidina-*O*-hexosídica (provável 3-*O*-) (**Figura 4.7**), através do pico do íon molecular com m/z 465,1012 ($C_{21}H_{21}O_{12}$), e dos íons produtos comparados na literatura. O íon fragmento com m/z 303,0507 foi gerado a partir da perda de uma ramificação hexosídica $[M - Hex]^+$ e o íon fragmento m/z 257,0449 foi formado após a eliminação de uma molécula de água e de um CO $[303,0507 - (H_2O + CO)]^+$. Também foi observado uma segunda eliminação de CO que resultou na formação do íon produto de m/z 229,0484 $[257,0449 - CO]^+$, e juntamente com os íons produtos de m/z 173,0957 e

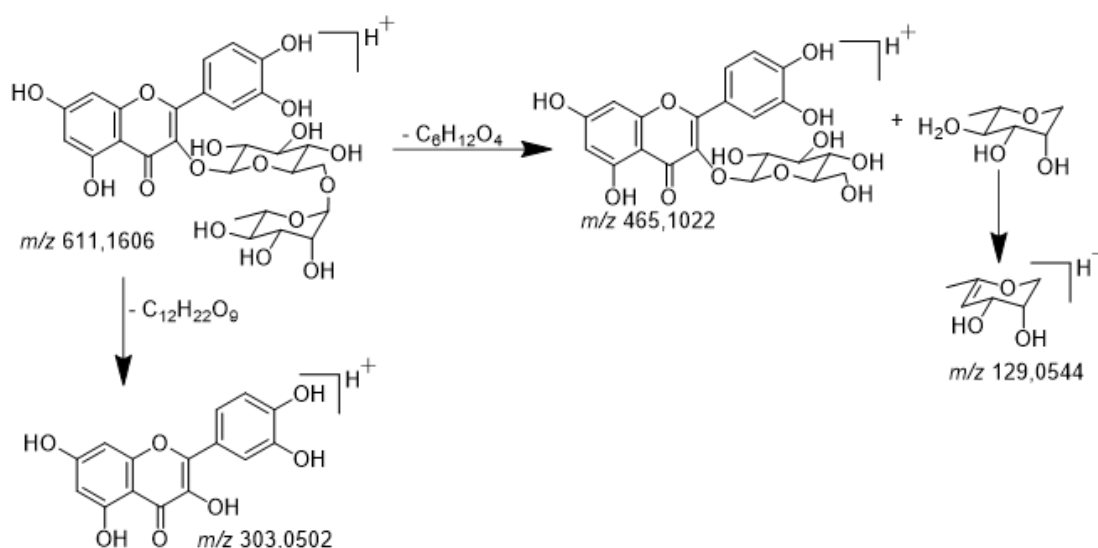
m/z 153,1268 [$303,0507 - C_8H_6O_4$] $^+$ muito característicos (BARNES *et al.*, 2009; SCORRANO *et al.*, 2017; YANG; CHEN, 2022).

Figura 4.7 Proposta de fragmentação da delfinidina-3-*O*-hexosídica (**6A** e **7B**).



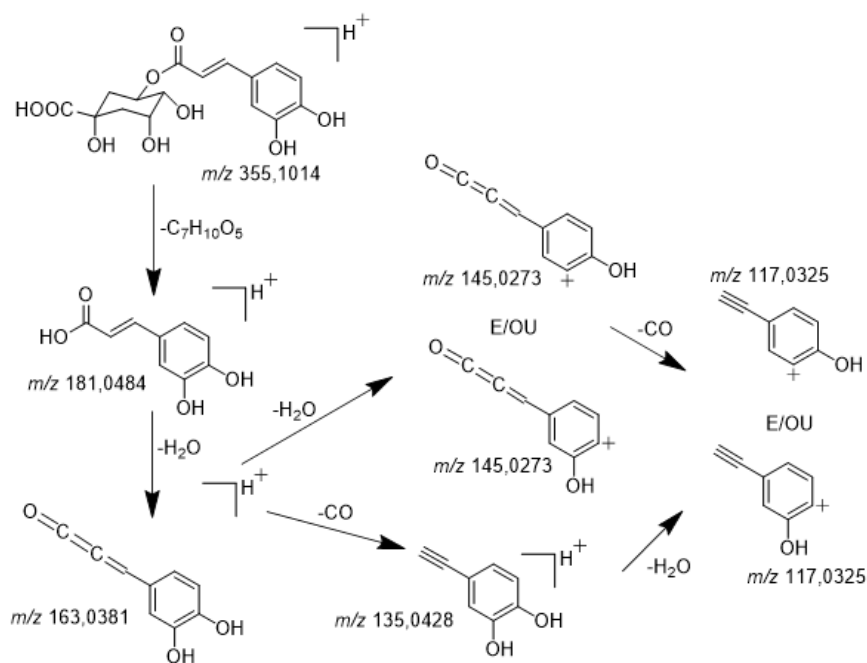
O composto **2B** apresentou a fórmula molecular $C_{27}H_{31}O_{16}$ observada pelo pico do íon molecular $[M + H]^+$ em m/z 611,1606. Os íons produtos observados foram característicos do composto de rutina, m/z 465,1022; 303,0502; 129,0544 e 85,0283 (**Figura 4.8**). A rutina é a forma glicosilada da quercetina (dissacarídeo rutinose), mas não é possível apontar apenas por espectrometria de massas quais são as unidades monoméricas. A perda das unidades hexosídicas foi observada pelo íon fragmento m/z 465,1022 que representa a perda de 146,0584 Da ($C_6H_{12}O_4$), também é observado a perda das suas hexoses $[M - C_{12}H_{22}O_9]^+$, na qual o íon produto de m/z 303,0502 é referente a aglicona da quercetina (SATHEESHKUMAR *et al.*, 2014).

Figura 4.8 Proposta de fragmentação da rutina (**2B**).



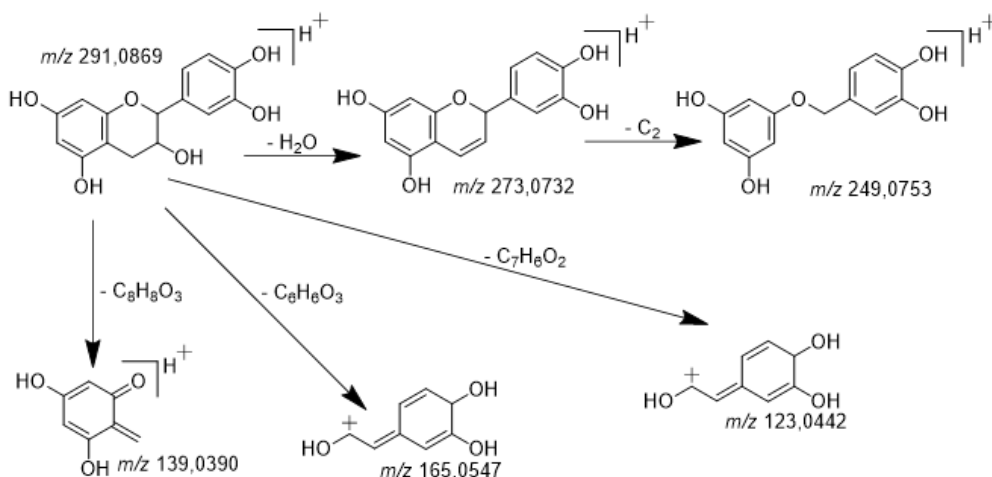
O composto **3B** foi anotado como ácido mono-cafeoilquínico (**Figura 4.9**), um éster dos ácidos cafeico e quínico, observado pelo pico do íon molecular $[M + H]^+$ de m/z 355,1014 (fórmula de $C_{16}H_{18}O_9$). Os principais íons produtos observados foram m/z 181,0484; 163,0381; 145,0273; 135,0428 e 117,0325. O íon fragmento em m/z 181,0484 representa uma clivagem da estrutura que leva a formação do ácido cafeico $[M - C_9H_8O_4]^+$. O íon fragmento m/z 163,0381 é formado pela perda de 18,0103 Da do ácido cafeico, referente a uma molécula de água. Os íons produtos m/z 145,0273 e 135,0428 foram formados a partir da eliminação de uma molécula de água $[163 - H_2O]^+$ e monóxido de carbono $[163 - CO]^+$, respectivamente. Também é observado o íon fragmento m/z 117,0325, obtido da perda de outra molécula de monóxido de carbono $[145 - CO]^+$, ou pela outra via que seria pela perda de uma molécula de água $[135 - H_2O]^+$ (WILLEMS *et al.*, 2016).

Figura 4.9 Proposta de fragmentação do derivado do ácido mono-cafeoilquínico (**3B**).



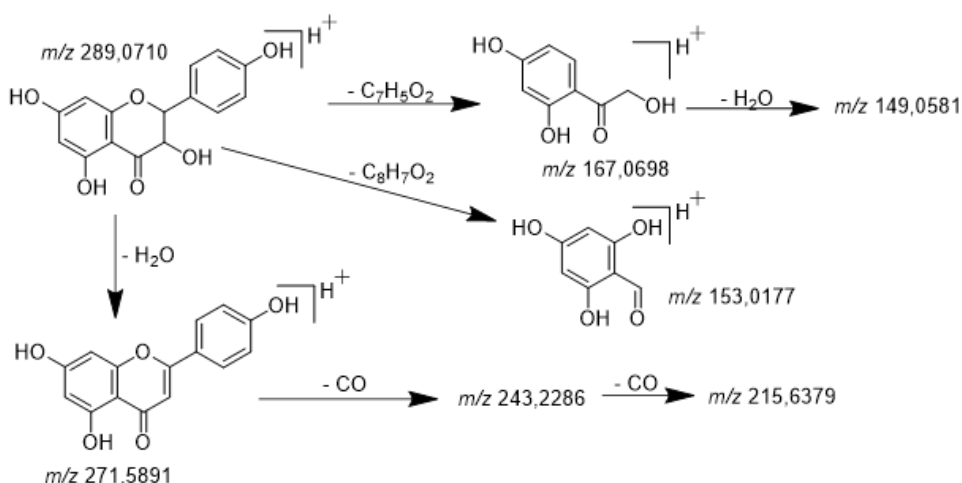
O composto **4B** apresentou o pico do íon molecular $[M + H]^+$ em m/z 291,0869 ($C_{15}H_{14}O_6$) e os íons fragmentos m/z 291,0869; 273,0732; 249,0753; 165,0547; 139,0390 e 123,0442, que são característicos de flavan-3-ol (catequina ou epicatequina, **Figura 4.10**). O íon fragmento m/z 273,0732 é resultante da perda de uma molécula de água $[291 - H_2O]^+$ e o íon fragmento m/z 249,0753 foi gerado da perda de C_2 $[273 - C_2]^+$. Os demais íons fragmentos foram formados a partir das eliminações de $-C_9H_9O_3$ em m/z 165,0547; $-C_7H_7O_3$ em m/z 139,0390 e $-C_7H_7O_2$ em m/z 123,0442 (LI; DEINZER, 2007; WOLF *et al.*, 2010).

Figura 4.10 Proposta de fragmentação do flavan-3-ol (catequina ou epicatequina) (**4B**).



O composto **5B** foi anotado como uma molécula derivada do composto kaempferol, conhecido como di-hidrokaempferol (**Figura 4.11**) através da comparação dos dados espectrais. O pico do íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 289,0710 ($C_{15}H_{12}O_6$). O íon fragmentos m/z 271,5891 é resultado da perda de uma molécula de água $[289 - H_2O]^+$, seguido da eliminação de duas moléculas de monóxido de carbono, m/z 243,2286 $[271 - CO]^+$ e 215,6379 $[243 - CO]^+$. Outras fragmentações observadas são as duas vias de fissão no anel C, uma formando o íon fragmento m/z 153,0177 ($C_7H_5O_4$)⁺ e a outra formando o íon m/z 167,0698 ($C_8H_7O_4$)⁺, essa segunda tem continuidade com o íon fragmento m/z 149,0581 formado após eliminação de uma molécula de água $[167 - H_2O]$ (LE GALL *et al.*, 2003).

Figura 4.11 Proposta de fragmentação do di-hidrokaempferol (**5B**).



Das anotações realizadas usando o *GNPS* e o *DataAnalysis*, os compostos quercetina, ácido triterpênico (ácido ursólico ou oleanólico) e os derivados de ácido clorogênico (ácidos di e mono-cafeoilquínico), foram relatados na literatura

para o gênero *Chomelia*, em que foi observado a presença de derivados de quercetina, ácido oleanólico, ácido ursólico e ácido clorogênico (BARROS *et al.*, 2008; TATIBANA *et al.*, 2009). Devido a escassez de estudos publicados para a espécie *C. ribesioides* e para o gênero, torna-se desafiador a citação da presença dos demais compostos anotados (Figura 4.12)

Figura 4.12 Distribuição dos compostos anotados nos extratos CrFE e CrFrE usando os softwares.

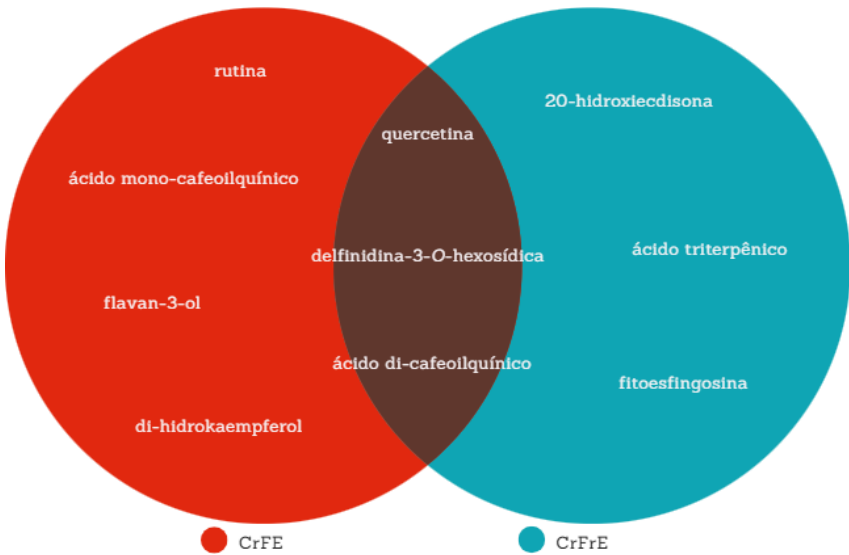


Tabela 4.2 Compostos anotados nos extratos CrFE e CrFrE.

CrFrE	Fórmula Molecular	Tr (min)	[M-H] ⁺ (Experimental)	[M-H] ⁺ (Teórico)	EM/EM	Erro (ppm)	Nome	Classe	Referência
1A	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	7	303,0495	303,0499	303,0493; 257,0449; 229,0488; 201,0488; 153,0172; 137,0220; 121,0277	1,5	quercetina	flavonoide	SCIGELOVA <i>et al.</i> , 2011
2A	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	5,3	481,3154	481,3160	481,3154; 463,3045; 445,2943; 371,2213; 303,1949; 165,1263	1,3	20-hidroxiecdisona	esteróide	LE <i>et al.</i> , 2014; ROSTANDY e GAO, 2019
3A	C ₃₀ H ₄₉ O ₃	8	457,3634	457,3654	457,3654; 439,3576; 411,3618; 203,1782; 191,1781	2,3	ácido triterpênico	terpenóide	SHEN <i>et al.</i> , 2011
4A	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	6	517,1333	517,1341	517,1333; 499,1227; 337,0920; 319,0810; 163,0388	1,7	ácido di-cafeoilquínico	fenol	SANTOS; LOPES, 2008; LI <i>et al.</i> , 2017
5A	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	9,9	318,3000	318,3003	318,3000; 301,2935; 300,2885; 284,9285; 282,2799; 60,0442	0,8	fitoesfingosina	esfingolípido	WARD <i>et al.</i> , 2017; DAPIC <i>et al.</i> , 2019; AMARAL <i>et al.</i> , 2021
6A	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	5,3	465,1012	465,1028	465,1012; 303,0507; 257,0449; 229,0484; 173,0957; 153,1268	3,4	delfinidina-3-O-hexosídica*	antocianina	BARNES <i>et al.</i> , 2009; SCORRANO <i>et al.</i> , 2017; YANG; CHEN, 2022
CrFE	Fórmula Molecular	Tr (min)	[M-H] ⁺ (Experimental)	[M-H] ⁺ (Teórico)	EM/EM	Erro (ppm)	Nome	Classe	Referência
1B	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	5,2	303,0498	303,0499	303,0487; 257,0479; 229,0478; 201,0533; 153,0141; 137,0213; 121,0303	0,5	quercetina	flavonoide	SCIGELOVA <i>et al.</i> , 2011
2B	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	5,1	611,1606	611,1607	611,1606; 465,1022; 303,0502; 129,0544; 85,0283	1	rutina	flavonoide	SATHEESHKUMAR <i>et al.</i> , 2014

3B	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3,6	355,1021	355,1024	355,1014; 181,0484; 163,0381; 145,0273; 135,0428; 117,0325	0,8	ácido mono-cafeoilquínico	fenol	WILLEMS <i>et al.</i> , 2016
4B	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	6	291,0855	291,0869	291,0869; 273,0732; 249,0753; 165,0547; 139,0390; 123,0442	2,7	flavan-3-ol	flavonoide	LI; DEINZER, 2007; WOLF <i>et al.</i> , 2010
5B	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	9	289,0710	289,0707	289,0710; 271,5891; 243,2286; 215,6379; 167,0698; 153,0177; 149,0581	-1,3	di-hidrokaempferol	flavonoide	LE GALL <i>et al.</i> , 2003
6B	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	6	517,1345	517,1341	517,1345; 449,1236; 337,0920; 319,0831; 163,0390	1,7	ácido di-cafeoilquínico	fenol	SANTOS; LOPES, 2008; LI <i>et al.</i> , 2017
7B	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	5,3	465,1024	465,1028	465,1024; 303,0507; 257,0443; 229,0449; 173,0932; 153,1275	3,4	delfinidina-3-O-hexosídica	antocianina	BARNES <i>et al.</i> , 2009; SCORRANO <i>et al.</i> , 2017; YANG; CHEN, 2022

Dados espectrais descritos nesta tabela foram obtidos da análise no CompoundCrawler e Data Analysis.

* provável 3-O-.

4.2.3 - Identificação dos Constituintes Presentes nas Frações Hexânicas

Com a técnica de CG-EM foi possível identificar constituintes apolares (alcanos, ésteres de ácidos graxos, diterpenos) presentes nas frações hexânicas do fruto (CrFrEHe) e da folha da *C. ribesioides* (CrFEHe). Para identificação dos compostos foi empregado o uso de um padrão de hidrocarbonetos (C₇-C₄₀, **Figura 4.13**) que foi injetado nas mesmas condições cromatográficas das amostras (**Figura 4.14 e 4.15**) descritas na metodologia, o tempo de retenção e a quantidade de carbonos presente em cada hidrocarboneto foram inseridos no software *Retensoft* que possibilitou calcular o IRL dos compostos com base no padrão utilizado. Os espectros de massa experimentais das amostras (CrFrEHe e CrFEHe) foram comparados com a biblioteca (NIST) disponível no equipamento, e os IRL experimentais (calculado no *Retensoft*) foram comparados com os IRL encontrados na literatura, que resultou na identificação de 9 compostos (**Tabela 4.3**).

Figura 4.13 Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos (C₇-C₄₀) analisado no CG-EM.

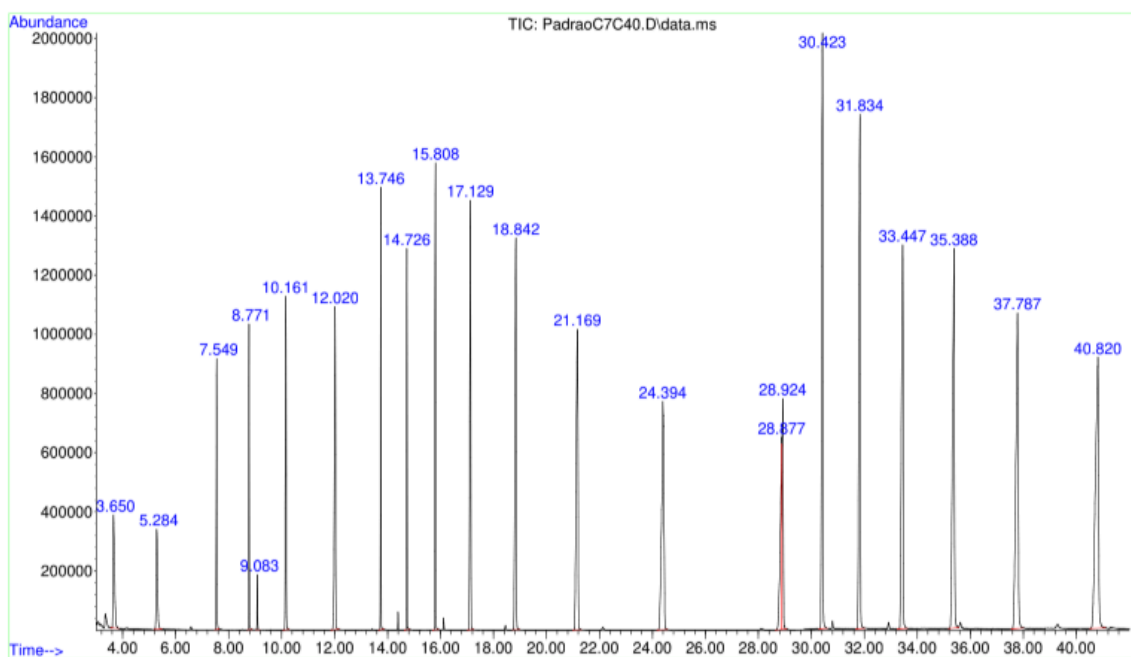


Figura 4.14 Cromatograma obtido pela técnica de CG-EM para a fração CrFEHe.

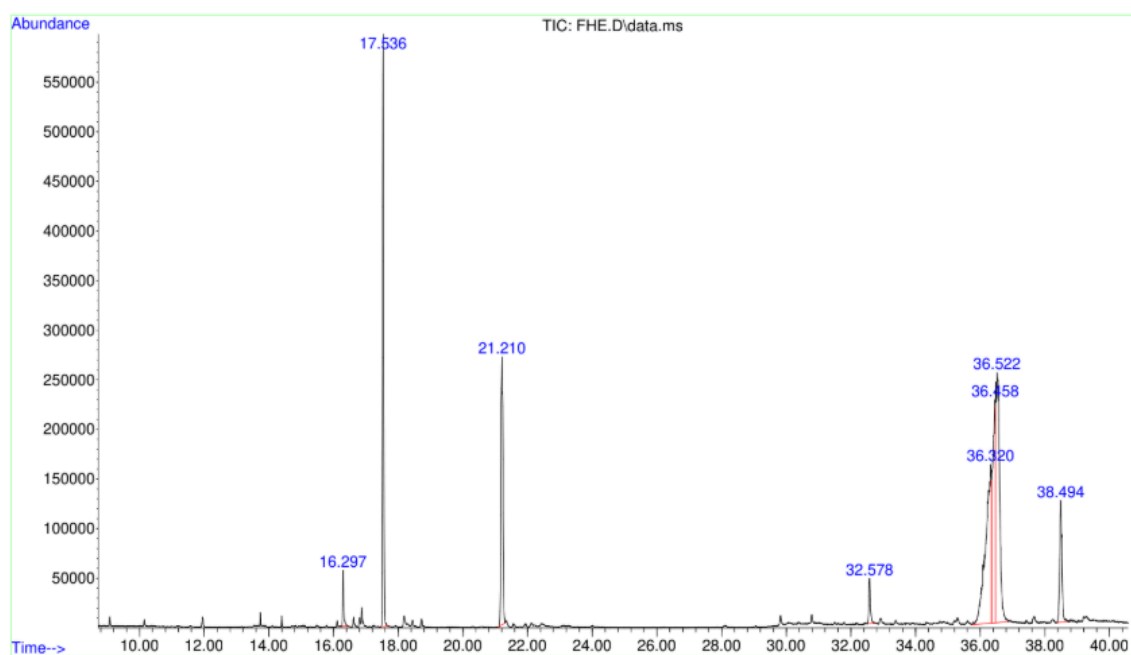
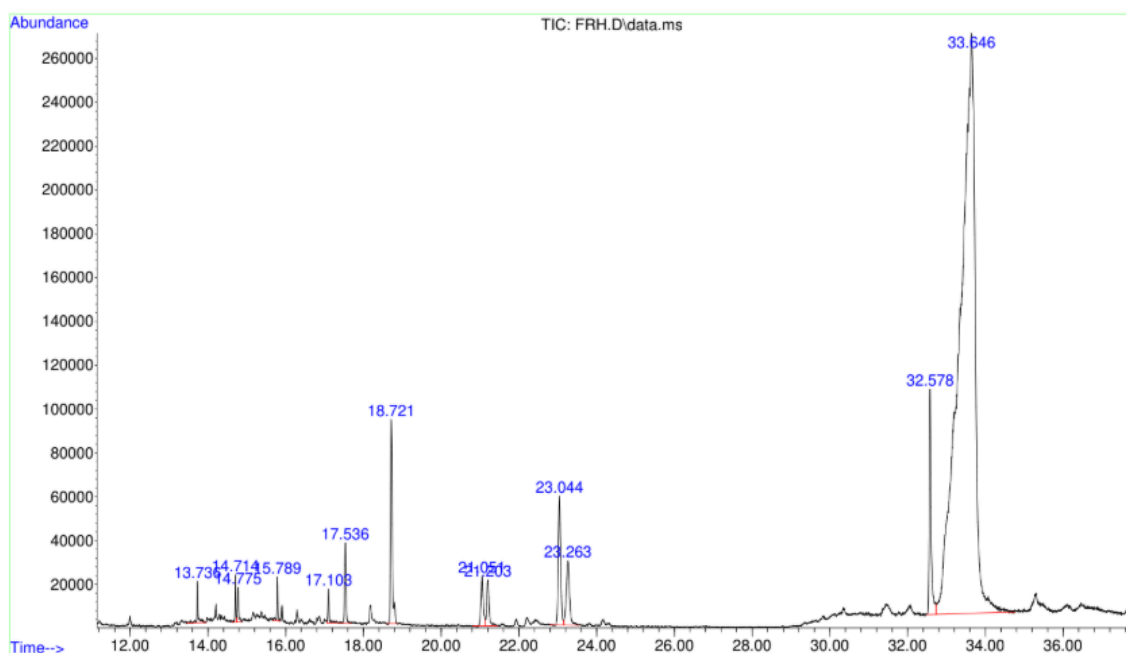


Figura 4.15 Cromatograma obtido pela técnica de CG-EM para a fração CrFrEHe.



Na fração hexânica do fruto da *C. ribesioides* foram identificados 8 compostos atribuídos nas classes dos alcanos e dos ácidos graxos: hexadecano, heptadecano, nonadecano, metil hexadecanoato, etil hexadecanoato, metil linoleato, metil octadecenoato e etil linoleato (**1C** - **8C**), na fração hexânica da folha foram identificados 3 compostos das classes dos ácidos graxos e diterpenos: neofitadieno, metil hexadecanoato e metil octadecenoato (**1D**, **2D** e **3D**) (**Figura 4.16**, **Tabela 4.3**).

Figura 4.16 Metabólitos secundários identificados na *C. ribesioides* por CG-EM.

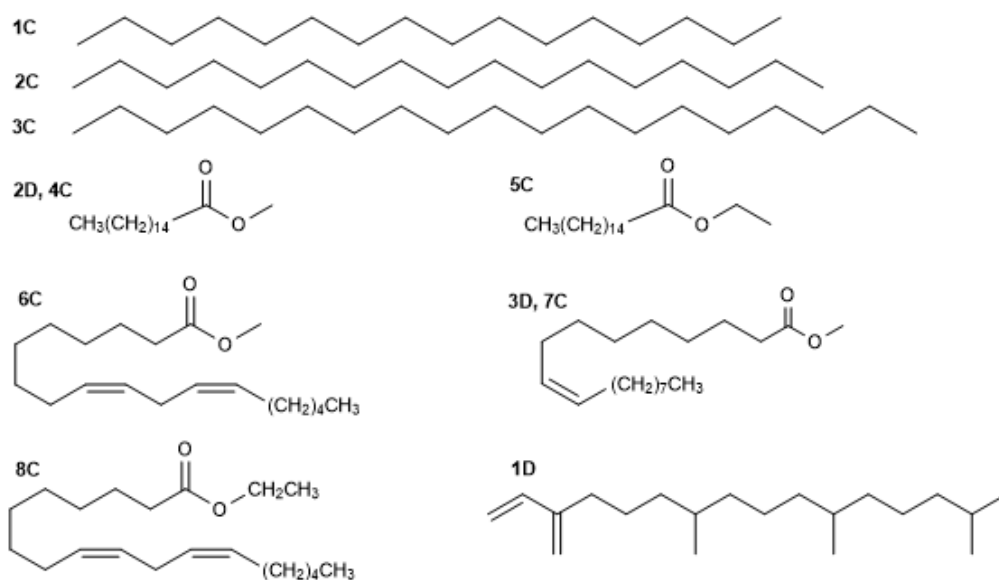


Tabela 4.3 Compostos identificados nas frações hexânicas da *C. ribesioides* através da técnica de CG-EM.

Compostos (CrFrEHe)	Tr (min)	Fórmula Molecular	Pico do íon molecular (<i>m/z</i>)	Composto	IRL ^{exp}	IRL ^{lit}	Referência
------------------------	-------------	----------------------	---	----------	--------------------	--------------------	------------

1C	13.736	C ₁₆ H ₃₄	226	hexadecano	1599	1600	ADAMS, 2017
2C	14.714	C ₁₇ H ₃₆	240	heptadecano	1699	1700	ADAMS, 2017
3C	17.103	C ₁₉ H ₄₀	268	nonadecano	1898	1900	ADAMS, 2017
4C	17.536	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	metil hexadecanoato	1924	1921	ADAMS, 2017
5C	18.721	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	etil hexadecanoato	1993	1993	ADAMS, 2017
6C	21.051	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	metil linoleato	2095	2085	ADAMS, 2017
7C	21.203	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	metil octadecenoato	2101	2103	PINO <i>et al</i> , 2005
8C	23.044	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	etil linoleato	2158	2159	PINO <i>et al</i> , 2005
Compostos (CrFEHe)	Tr (min)	Fórmula Molecular	Pico do íon molecular (m/z)	Composto	IRL ^{exp}	IRL ^{lit}	Referência
1D	16.297	C ₂₀ H ₃₈	278	neofitadieno	1837	1840	KUKIĆ <i>et al</i> , 2006
2D	17.536	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	metil hexadecanoato	1924	1921	ADAMS, 2017
3D	21.210	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	metil octadecenoato	2101	2103	PINO <i>et al</i> , 2005

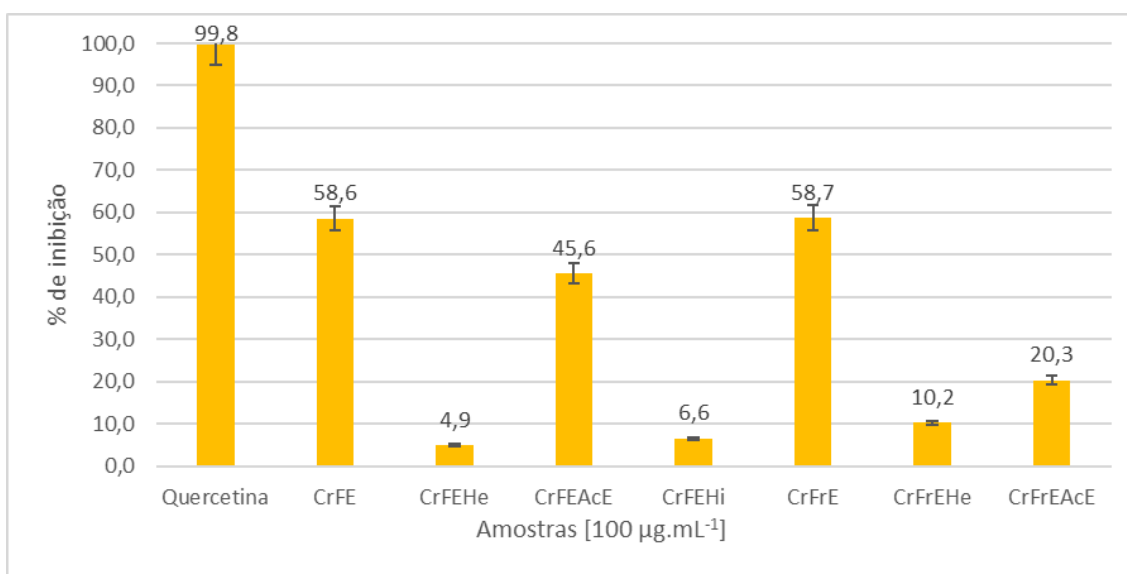
Legenda: 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 7C, 8C, 1D, 2D e 3D (Compostos identificados pela CG-EM na fração hexânica do fruto e da folha da *C. ribesiodides* (CrFrEHe e CrFEHe)), IRL^{exp} (índice de retenção linear experimental), IRL^{lit} (índice de retenção presente na literatura: PINO *et al*, 2005; KUKIĆ *et al*, 2006; ADAMS, 2017).

4.3 - TRIAGEM ENZIMÁTICA DA ELASTASE E TIROSINASE

4.3.1 - Atividade Inibitória Enzimática Investigada para o Fruto e Folha da *C. ribesiodides*

Os extratos etanólico bruto das folhas e dos frutos da *C. ribesiodides*, assim como as frações, foram testados na concentração de 100 µg/mL em um método espectrofotométrico com os comprimentos de onda de 410 e 475 nm para elastase e tirosinase, respectivamente, de acordo com nas seções 3.2.3 e 3.2.5. Os resultados de triagem das amostras frente a elastase estão descritos no gráfico da **Figura 4.17**.

Figura 4.17 Avaliação do potencial inibitório dos extratos etanólicos e frações obtidas de *C. ribesiodides* frente à enzima elastase.



Quercetina (Controle positivo); *C. ribesiodides* (Cr); folha (F); fruto (Fr); extrato etanólico (E); fração hexânica (He); fração de acetato de etila (AcE); fração hidroalcoólica (Hi).

De acordo com os resultados obtidos, os extratos etanólicos brutos apresentaram os melhores resultados frente a elastase, o extrato etanólico das folhas (CrFE) apresentou 58,6% de inibição, e o extrato etanólico dos frutos (CrFrE) apresentou 58,7% de inibição. Após o fracionamento dos extratos brutos não houve aumento da atividade inibitória enzimática. As frações das folhas, apolar e de alta polaridade, perderam atividade, apresentando inibição de 4,9% (CrFEHe) e 6,6% (CrFEHi). Contudo, a fração de acetato de etila de média polaridade (CrFEAcE) manteve-se ativa, com 45,6% de inibição, similar à apresentada pelo extrato bruto, sugerindo que os compostos responsáveis pela inibição estão mais presentes nessa fração. As frações oriundas do extrato bruto do fruto tanto a apolar como a de média polaridade perderam a atividade após o fracionamento apresentando 10,2% (CrFrEHe) e 20,3% (CrFrEAcE) de inibição. Foi feito o teste com o controle positivo (quercetina) para comparação da inibição, a inibição da enzima elastase foi de 99,8% (**Figura 4.17**). Os resultados de inibição sugerem que a interação dos compostos presentes nas frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica dos extratos possibilitaram uma maior inibição da atividade da elastase, visto que o material bruto apresentou maior inibição que as frações, algo que pode ser explicado pelo sinergismo entre as frações do extrato bruto, fazendo com que o todo possua maior inibição em comparação aos fracionados (GERTSCH *et al.*, 2011).

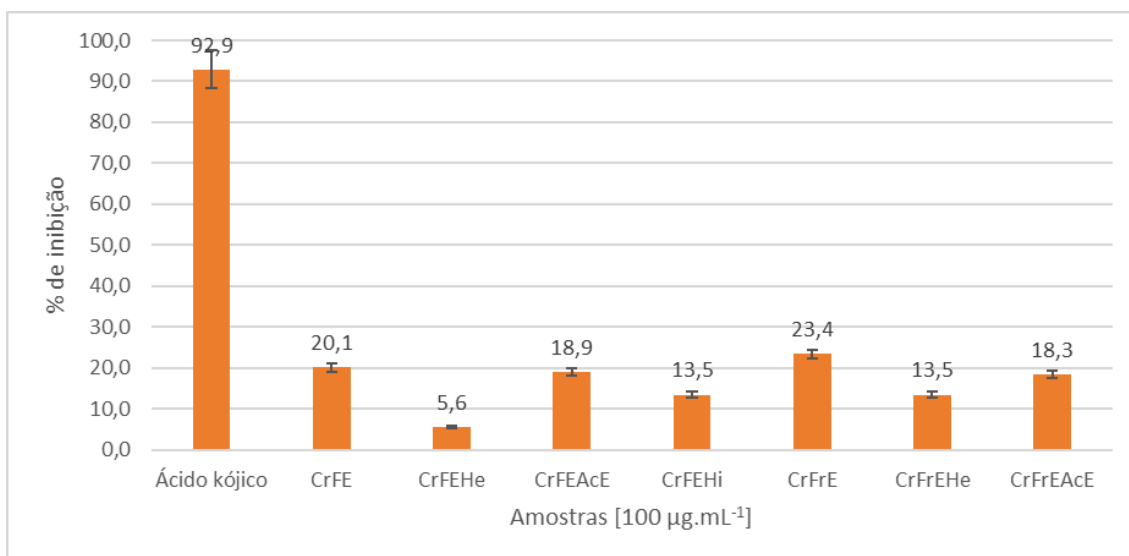
A investigação química realizada nos extratos ativos dos frutos e das folhas permitiu a anotação de alguns compostos conhecidos pela sua atividade anti-elastase, podendo justificar a atividade inibitória encontrada nos extratos. A quercetina (**Figura 4.2**), utilizada como controle positivo no ensaio enzimático, foi um dos compostos anotados na matriz de ambos os extratos da *C. ribesioides*. O IC₅₀ para quercetina é de 11,64 ± 0,67 µg/mL frente a elastase (SUTJIATMO *et al.*, 2020).

Também foi anotado nos frutos o ácido triterpênico (ursólico ou oleanólico) (**Figura 4.4**), conhecido como inibidor de elastase com IC₅₀ de 10,91 ± 0,03 µg/mL, composto usado como controle positivo nos ensaios frente às enzimas collagenase, elastase e hialuronidase, que são responsáveis pela degradação de proteínas estruturais e outros danos na epiderme (CHOMPOO *et al.*, 2012). De acordo com LEE e colaboradores (2001) a potência inibitória foi determinada para ambos os isômeros, com valores de IC₅₀ de 76,5 µg/mL para o ácido oleanólico e 31 µg/mL para o ácido ursólico.

A rutina, que foi anotada no extrato bruto das folhas, também é um composto inibidor de elastase, com valor de IC₅₀ de 46,88 µg/mL (**Figura 4.8**)

(GIRSANG *et al.*, 2020). As inibições observadas para os extratos brutos (**Figura 4.17**) podem ser justificadas pela presença desses e de outros compostos que apresentam atividade anti-elastase presentes no fruto e folha da *C. ribesioides*.

Figura 4.18 Avaliação do potencial inibitório dos extratos etanólicos e frações obtidas de *C. ribesioides* frente à enzima tirosinase.



Ácido kójico (Controle positivo); *C. ribesioides* (Cr); folha (F); fruto (Fr); extrato etanólico (E); fração hexânica (He); fração de acetato de etila (AcE); fração hidroalcoólica (Hi).

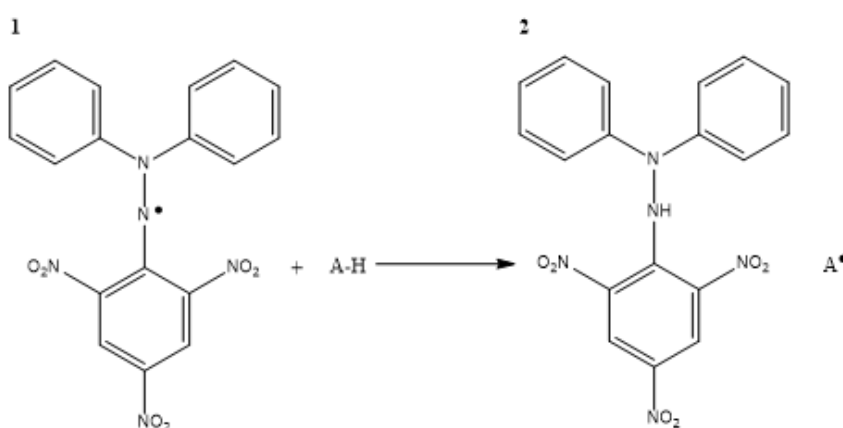
O ensaio das amostras de *C. ribesioides* frente a enzima tirosinase foi realizado usando o ácido kójico como controle positivo (100 µg/mL), que apresentou inibição de 92,9% (**Figura 4.18**). Nenhuma das amostras testadas, extratos e frações, apresentou inibição significativa em tirosinase, os extratos etanólicos brutos CrFE e CrFrE apresentaram 20,1% e 23,4% de inibição, respectivamente. As frações apresentaram porcentagem ainda menor, sendo que apenas a fração em acetato de etila da folha (CrFEAcE) manteve uma inibição próxima do extrato bruto com 18,9% de inibição.

De acordo com a literatura, os compostos anotados como: a quercetina e a rutina apresentaram atividade inibitória da tirosinase, com IC₅₀ de 22 µg/mL (KUBO *et al.*, 2020) e 55,65 µg/mL (GIRSANG *et al.*, 2020), respectivamente. Assim como, os ácidos ursólico e oleanólico com IC₅₀ de 8,4 ± 0,09 e 14,8 ± 0,16 µg/mL, respectivamente (NILE *et al.*, 2019). A baixa atividade observada nas amostras testadas pode se dar pela baixa concentração desses compostos inibidores, ou pelo fato de estarem inseridos em uma matriz complexa que dificulta sua atividade antitirosinase.

4.4 - ENSAIO ANTIOXIDANTE (DPPH)

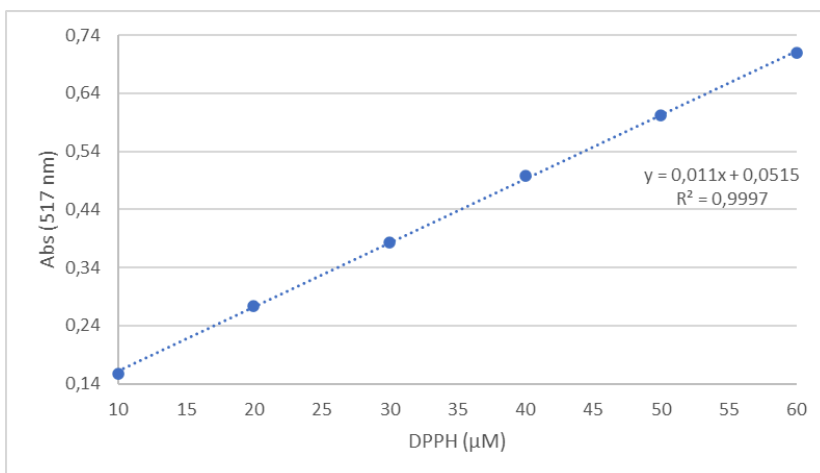
O DPPH é um radical livre que apresenta uma coloração roxa, que absorve no comprimento de onda de 517 nm. No ensaio, o composto antioxidante reage com o DPPH doando um elétron ou um hidrogênio, assim o radical se converte em uma molécula estável (DPPH-H) (**Figura 4.19**), adquirindo uma coloração amarela, e consequentemente uma redução da absorbância no comprimento de onda, isso faz com que tenha a redução da absorbância em 517 nm (AGUIAR; NOVELLI, 2020).

Figura 4.19 Reação do radical DPPH com um composto antioxidante. **1**: DPPH na forma de radical (solução roxa), **2**: DPPH reduzido (DPPH-H) (solução amarela).



Para quantificar o potencial antioxidante dos extratos etanólicos (CrFE e CrFrE), das frações (CrFEAcE e CrFrEAcE) e padrão (ácido ascórbico), foi feita a curva de DPPH, com concentrações entre 10 e 60 μM (**Figura 4.20**), seguindo a metodologia já apresentada, foi realizada a leitura de cada concentração no comprimento de onda de 517 nm.

Figura 4.20 Curva de calibração do DPPH.



Em ensaios de determinação de atividade antioxidante através do método com DPPH é comum o uso do ácido ascórbico como padrão, pois o composto apresenta alta capacidade de sequestrar o radical livre (ABRAHÃO *et al.*, 2012). A curva analítica do padrão (**Figura 4.21**) demonstrou a relação da concentração do analito com a sua atividade antioxidante, em que é possível observar que mesmo em baixas concentrações o padrão reduziu consideravelmente o DPPH. Na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ o ácido ascórbico apresentou uma atividade de 96% que não teve grande variação em concentrações maiores, também foram quantificadas outras informações, como EC_{50} , a quantidade de amostra necessária para reduzir um grama de DPPH, e IAA (índice de atividade antioxidante). O EC_{50} foi de 1,67 $\mu\text{g/mL}$, a massa necessária para reduzir o radical sendo de 0,16 g ácido ascórbico/g DPPH e o IAA de 14,37 (**Tabela 4.4**). Na literatura a concentração para ter uma atividade superior a 90% seria de 25 $\mu\text{g/mL}$ (ABRAHÃO *et al.*, 2012), e um EC_{50} de 6,69 $\mu\text{g/mL}$ (COSTA *et al.*, 2013), a distinção nos valores pode se dar pela metodologia aplicada, como concentração do radical livre, tempo de incubação, comprimento de onda empregado ou fatores laboratoriais, mas pode ser observado que dado a alta atividade antioxidante o uso do ácido ascórbico como padrão é válido.

Figura 4.21 Capacidade sequestrante de DPPH do ácido ascórbico.

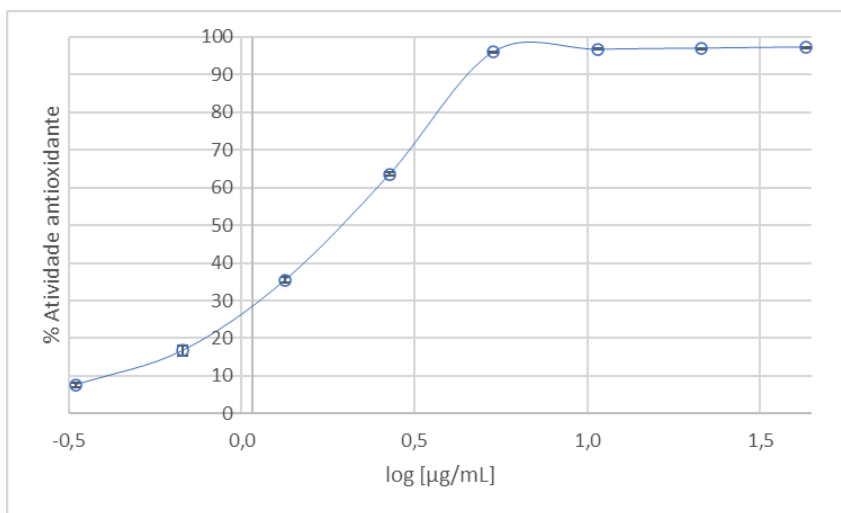


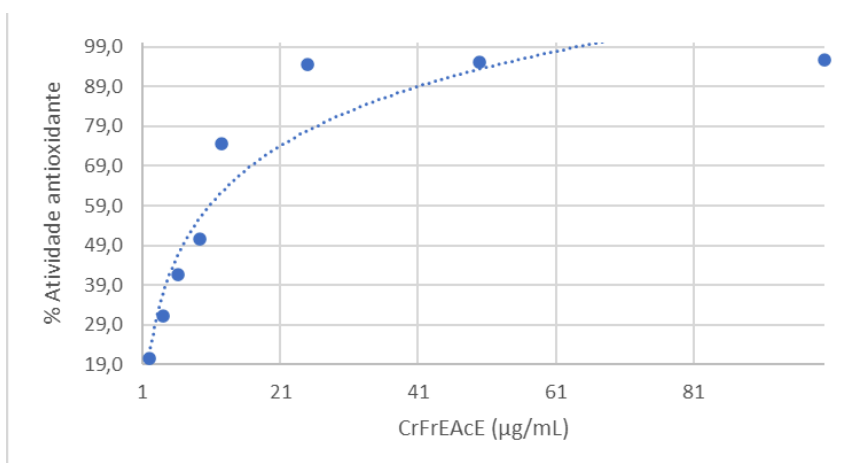
Tabela 4.4 Quantificação da atividade antioxidante do padrão.

Amostra	Ácido ascórbico
5 $\mu\text{g/mL}$ (%)	96

Amostra	Ácido ascórbico
EC ₅₀ (µg/mL)	1,67
g amostra/ g DPPH	0,16
IAA	14,37

No ensaio antioxidante para os extratos da folha (CrFE), do fruto (CrFrE) e das frações de acetato de etila (CrFEAcE e CrFrAcE) da *C. ribesoides* foram testadas diferentes concentrações. No extrato bruto da folha e do fruto foi visto que a partir da concentração de 50 µg/mL tiveram uma atividade sequestrante do radical superior a 93%. Na triagem para as frações de acetato de etila da folha e do fruto, foi observada um perfil semelhante de atividade mas em concentrações inferiores (12,5 e 25 µg/mL), o que era o esperado já que se trata de uma fração que possui uma alta concentração de compostos antioxidantes (**Tabela 4.5**). A triagem preliminar para as quatro amostras constatou que a partir da concentração de 25 µg/mL a porcentagem da atividade antioxidante das amostras não apresentava variação (**Figura 4.22**).

Figura 4.22 Perfil da atividade antioxidante observado nas amostras.



Para as amostras CrFE e CrFrE foram escolhidas as concentrações 1,57; 3,13; 6,25; 9,38; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, e após utilizar a absorbância de cada concentração foi feito o cálculo da porcentagem da atividade antioxidante e então plotada as informações em forma de gráficos (**Figura 4.23 e 4.24**). Aplicando as fórmulas apresentadas na metodologia foram obtidas as seguintes informações EC₅₀, quantidade (em gramas) de extrato para reduzir um grama de DPPH (g extrato/ g

DPPH) e IAA. Foi determinado um EC_{50} de 10,64 e 8,31 $\mu\text{g/mL}$ para o CrFE e CrFrE, em gramas foi quantificado 1,02 e 0,80 g extrato/ g DPPH para reduzir um grama do radical, com o índice de atividade antioxidante de 2,26 e 2,89 para o CrFE e CrFrE respectivamente (**Tabela 4.5**). Não foram encontrados resultados na literatura para a *C. ribesioides*, então foi feita a comparação com resultados da espécie *C. asiatica*, pois por estarem no mesmo gênero poderiam apresentar similaridade química e biológica. O extrato etanólico da folha da *C. asiatica* obteve um EC_{50} de 26,6 $\mu\text{g/mL}$ (MANOJJ *et al.*, 2020), também foi quantificado o EC_{50} para o extrato acetônico da folha, com EC_{50} de 20,38 $\mu\text{g/mL}$ (KARTHIKKUMARAN *et al.*, 2014), mostrando que os extratos da *C. ribesioides* apresentaram uma atividade antioxidante maior. O IAA calculado para o CrFE e CrFrE corroboram esse potencial, visto que quando esse índice é superior à 2 a atividade é considerada alta (**Tabela 4.5**) (COSTA *et al.*, 2017).

Figura 4.23 Atividade antioxidante do extrato CrFE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.

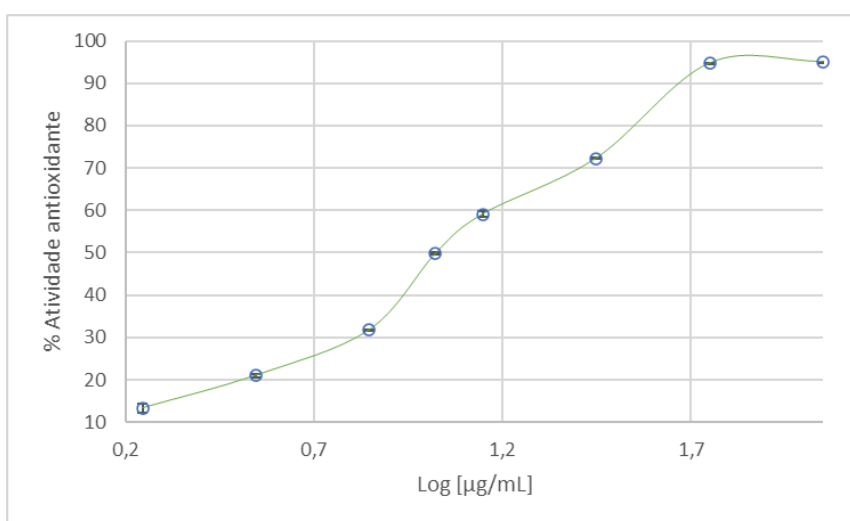
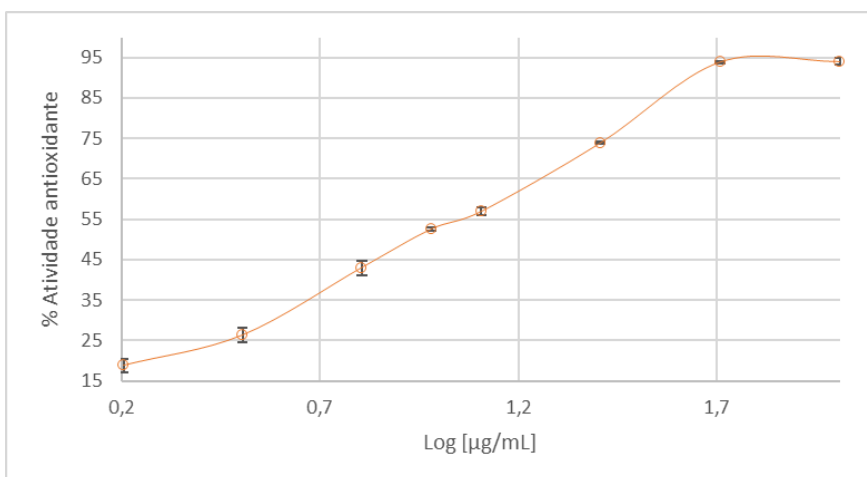


Figura 4.24 Atividade antioxidante do extrato CrFrE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.



Para as frações de acetato de etila da folha e do fruto da *C. ribesioides* foram escolhidas as concentrações 2; 4; 6,25; 9,38; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. Também foram calculados as porcentagens da atividade antioxidante e posteriormente plotado em formato de gráfico a concentração em função da atividade antioxidante para cada fração (**Figura 4.25 e 4.26**). O EC₅₀ para CrFEAcE foi de 6,79 µg/mL e de para CrFrEAcE foi de 7,12 µg/mL, enquanto a quantidade (em grama) de extrato necessária para reduzir um grama de radical livre foi de 0,65 e 0,68 g extrato/ g DPPH, também foi obtido um IAA de 3,53 e 3,37, respectivamente (**Tabela 4.5**). Após a comparação dos resultados dos extratos com as frações, foi visto que a atividade antioxidante das frações foi superior em relação ao extrato bruto, isso pode ser explicado pela concentração de compostos fenólicos, que apresentam atividade antioxidante, esse teor foi quantificado nos ensaios seguintes.

Figura 4.25 Atividade antioxidante da fração CrFEAcE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.

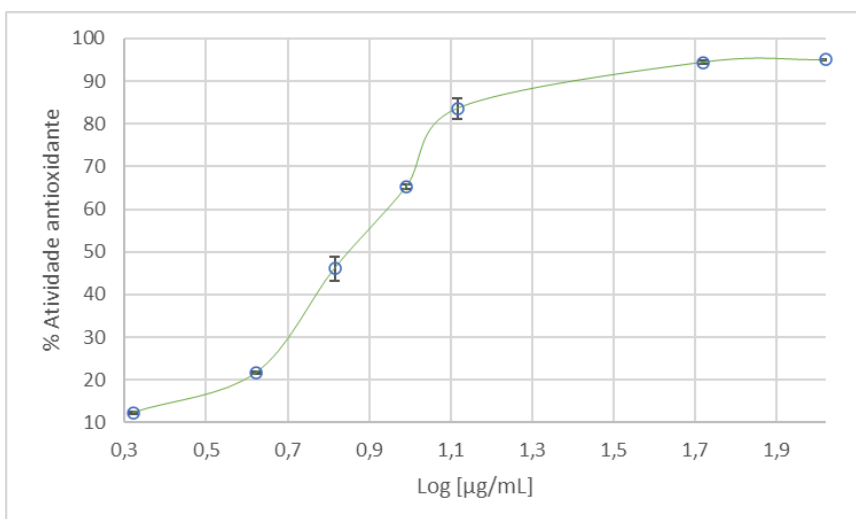


Figura 4.26 Atividade antioxidante da fração CrFrEAcE, quantificada pela capacidade sequestrante de DPPH.

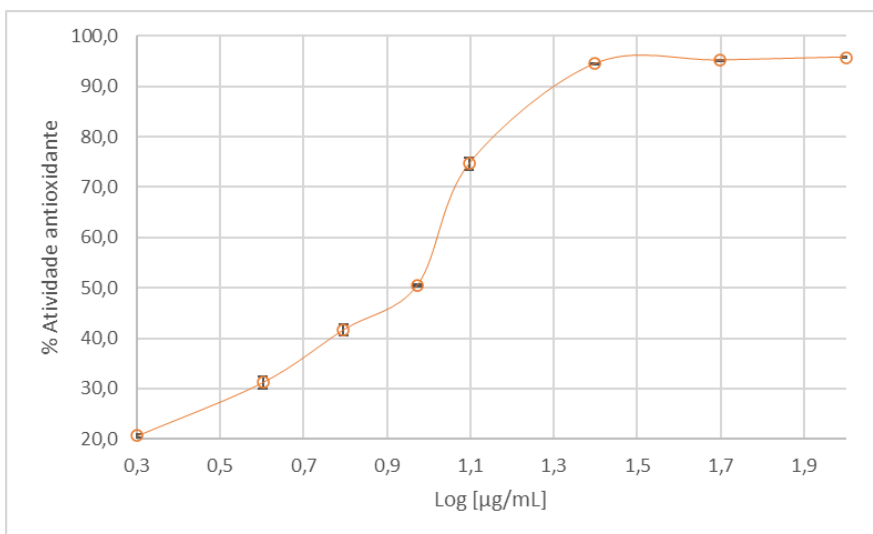


Tabela 4.5 Quantificação da atividade antioxidante das amostras CrFE, CrFEAcE, CrFrE e CrFrEAcE.

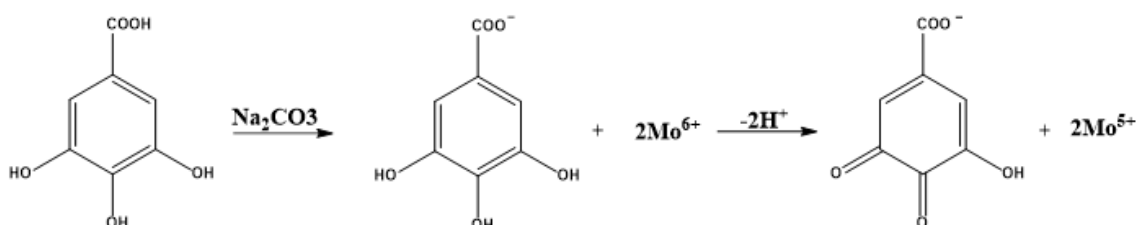
Amostra	CrFE	Amostra	CrFEAcE
50 µg/mL (%)	94,8	12,5 µg/mL (%)	83,6
EC ₅₀ (µg/mL)	10,64	EC ₅₀ (µg/mL)	6,79
g extrato/ g DPPH	1,02	g extrato/ g DPPH	0,65
IAA	2,26	IAA	3,53
Amostra	CrFrE	Amostra	CrFrEAcE
50 µg/mL (%)	93,9	25 µg/mL (%)	94,5
EC ₅₀ (µg/mL)	8,31	EC ₅₀ (µg/mL)	7,12
g extrato/ g DPPH	0,80	g extrato/ g DPPH	0,68
IAA	2,89	IAA	3,37

4.5 - QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS

O reagente Folin-Ciocalteu usado na quantificação de fenóis totais é composto por complexos de molibdênio e tungstênio (ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico), a solução possui cor amarelada devido ao estado de oxidação desses metais. O método colorimétrico é baseado na redução do molibdênio pelo íon fenolato.

Nessa reação ocorre a mudança do estado de oxidação do metal de Mo^{6+} (cor amarela) para Mo^{5+} (cor azul) que absorve em 765 nm (**Figura 4.27**) (PÉREZ *et al.*, 2023).

Figura 4.27 Redução do molibdênio presente no reagente Folin-Ciocalteu pelo padrão (ácido gálico), para determinação dos fenóis totais.



Foi feita a curva de calibração usando ácido gálico como padrão (**Figura 4.28**), para construção da curva foram preparadas diferentes concentrações do padrão (10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$), adicionados nos tubos reacionais e lidos à 765 nm, conforme descrito na metodologia. As absorbâncias determinadas foram usadas para determinar a equação de reta ($y = 0,0075x - 0,0639$), usada para calcular o equivalente de ácido gálico (EAG) nas amostras.

Figura 4.28 Curva de calibração para quantificação de compostos fenólicos.

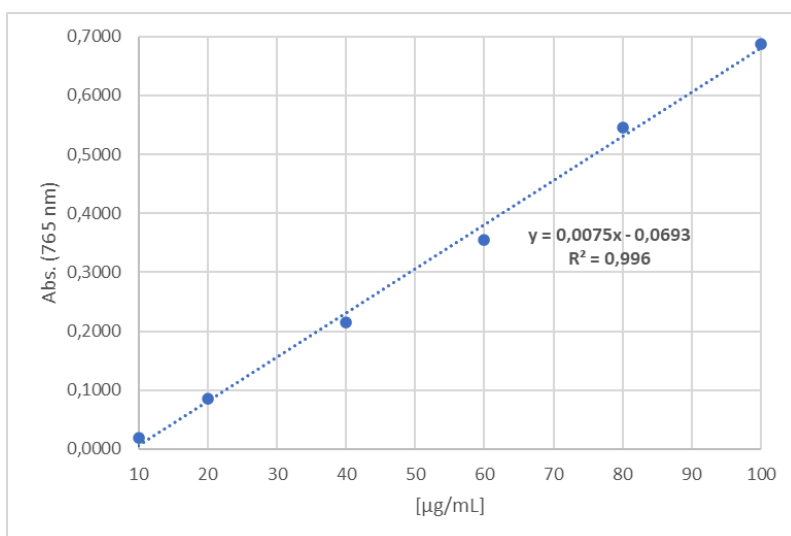
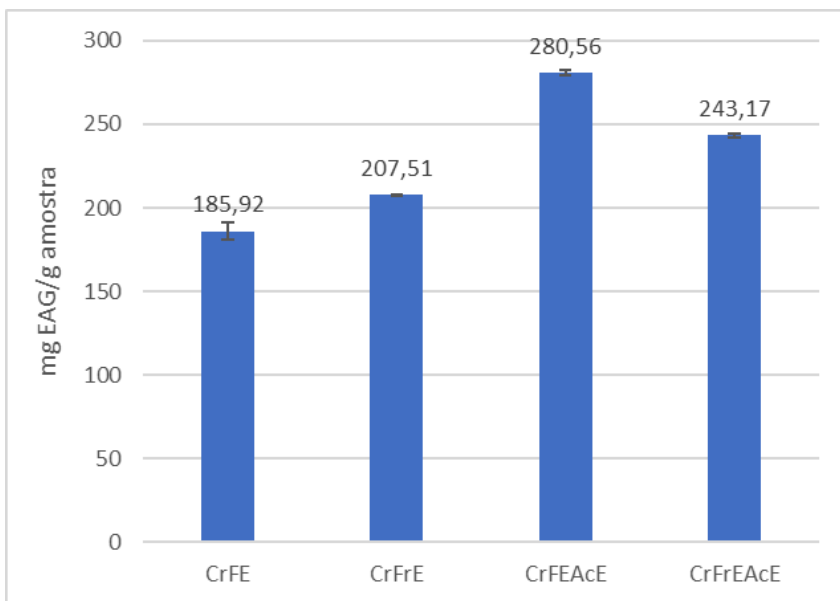


Tabela 4.6 Teores de compostos fenólicos presentes na *C. ribesioides*.

Amostra	massa (mg)	metanol (mL)	mg EAG/g	% (m/m)
CrFE	1,7	1,308	185,92	18,59
CrFrE	1,8	1,385	207,51	20,75
CrFEAcE	1,5	1,154	280,56	28,06
CrFrEAcE	2,2	1,692	243,17	24,32

Figura 4.29 Quantificação dos compostos fenólicos (mg EAG/g) nos extratos etanólicos da folha, do fruto e das frações de acetato de etila de *C. ribesioides* (CrFE, CrFrE, CrFEAcE e CrFrEAcE).



Os extratos etanólicos do fruto e da folha da *C. ribesioides* apresentaram 207,51 e 185,92 mg EAG/g (**Figura 4.31**) com teores de compostos fenólicos totais de 20,75 e 18,59% (m/m) respectivamente (**Tabela 4.6**), enquanto as frações de acetato de etila do fruto e da folha tiveram concentrações superiores de fenóis (243,17 e 280,56 mg EAG/g), como o esperado. Não foi encontrado nenhum registro na literatura de ensaio de quantificação de fenóis totais para a espécie *C. ribesioides*, mas foi encontrado alguns estudos voltados para o gênero, como por exemplo, o extrato etanólico da folha da *C. asiatica* apresentou concentração de 236 mg EAG/g (MANOJJ *et al.*, 2020). Outro estudo quantificou os fenóis totais em diferentes extratos da folha da *Chomelia asiatica*, foram realizadas extrações com éter de petróleo, clorofórmio, acetona, metanol e água quente, foram constatadas as concentrações de 254, 373, 572, 206 e 169 mg EAG/g, com a quantidade de compostos fenólicos variando entre 169 e 572 mg EAG/g, dependendo do solvente utilizado (KARTHIKKUMARAN *et al.*, 2014). Os resultados experimentais da *C. ribesioides* estão em conformidade aos da espécie de mesmo gênero (*C. asiatica*) encontrados na literatura.

Os compostos fenólicos apresentam alta atividade antioxidante devido sua capacidade de doar átomo de hidrogênio, fazendo com que esses compostos atuem como sequestradores de radicais livres (SOARES, 2002). Os compostos anotados pelo *GNPS* mostram a presença de compostos fenólicos nas amostras CrFE e CrFrE (**Tabela**

4.2), e a quantificação dos fenóis totais nas amostras da *C. ribesioides* determinou um teor (mg EAG/g) semelhante ao da *C. asiatica* presente na literatura. A presença desses compostos junto do teor observado justifica a forte atividade antioxidante que foi registrada no ensaio de DPPH (Tabela 4.5).

5 - CONCLUSÃO

A investigação química dos extratos etanólicos da folha e do fruto da espécie *C. ribesioides* na técnica de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM possibilitou a desreplicação de 10 compostos pela plataforma do *GNPS*, sendo majoritariamente compostos fenólicos. A técnica de CG-EM trouxe a identificação de 9 compostos presentes na fração hexânica da folha e do fruto da *C. ribesioides*, os compostos pertencentes às classes dos alcanos, ácidos graxos e diterpeno.

Nos ensaios biológicos, os extratos CrFE e CrFrE tiveram bons resultados frente à enzima elastase, com atividade inibitória em torno de 58%, todavia foi observado a perda da atividade quando foi realizado a triagem das frações (hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica). Os resultados dos extratos e das frações frente à tirosinase não apresentaram atividades expressivas, com a maior atividade próximo de 23%. Com base na literatura, os prováveis responsáveis pela atividade inibitória enzimática seriam os compostos fenólicos (ácido triterpênico), flavonoides (quercetina e rutina).

No ensaio da atividade antioxidante com as amostras testadas, foi observado um significativo potencial antioxidante, com atividade em torno de 94% na concentração de 50 µg/mL dos extratos bruto, e com atividade similar para as frações de acetato de etila mesmo em concentrações inferiores (25 e 12,5 µg/mL). Os extratos etanólicos da folha e do fruto apresentaram EC_{50} de 10,64 e 8,31 µg/mL. Quando foram testadas as frações de acetato de etila, foram observados EC_{50} menores, de 6,79 e 7,12 µg/mL, justificável pela maior concentração dos compostos antioxidantes. De modo geral o IAA foi determinado acima de 2,26 comprovando uma alta atividade antioxidante para as quatro amostras (CrFE, CrFEAcE, CrFrE, CrFrEAcE). Tendo em vista as atividades biológicas foi feita a quantificação dos compostos fenólicos totais, os teores ficaram entre 186 - 208 mg EAG/g (18,6 e 20,8%) para os extratos bruto, e 243 - 281 mg EAG/g (24,3 e 28,1%) nas frações de acetato de etila. Neste sentido, o uso das técnicas hifenadas em conjunto com as ferramentas de molecular networking e bancos de dados nos diferentes softwares utilizados, foi possível contribuir com o

conhecimento químico desta espécie *C. ribesioides*, até então desconhecida. A parte biológica também foi enriquecedora para a espécie, principalmente a atividade antioxidante que apresentou um alto potencial para a aplicação em formulações cosméticas. Em etapas futuras poderia ser feito ensaio de citotoxicidade, estabilidade, entre outros, para comprovar a aplicação cosmética.

6 - REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. São Paulo: ABIHPEC, 2025. Disponível em: https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2025/04/Panorama_do_-Setor-Atualizacao_16.05.25_Port.pdf. Acesso em: 7 jul. 2025.

ABRAHÃO, S. A. *et al.* Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de café bebida mole. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 127-133, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2012000100017>. Acesso em: 5 ago. 2025.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. [S. l.]: Allured Pub Corp, 2007. p 804. ISBN 9781932633214. Acesso em: 2 jun. 2025.

AGARWAL, P. *et al.* L-Tyrosinase—a multifunctional enzyme: structural and molecular features. **Gene and Protein Engineering**, 5th edn. Studium Press, LLC, Houston, p. 427-444, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/277179991_L-Tyrosinase_-_A_Multifunctional_Enzyme_Structural_and_Molecular_Features. Acesso em: 11 jan. 2025.

AGUIAR, M. A.; NOVELLI, P. H. G. S.. Desenvolvimento de uma formulação cosmética antioxidante e fotoprotetora à base de curcumina. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia** - ISSN: 1984-5693, v. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.22407/1984-5693.2020.v12.p.24-39>. Acesso em: 21 jul. 2025.

ALMONTE, A. G.; SWEATT, J. D.. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior. **Brain Research**, v. 1407, p. 107-122, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.042>. Acesso em: 9 jul. 2025.

AMARAL, B. S. *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *T. cruzi* magnetic beads affinity-based screening assays on crude plant extracts from Brazilian Cerrado. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 193, p. 113710, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113710>. Acesso em: 13 maio 2025.

ANJANADEVI, N.. Quantitative estimation of minerals, secondary metabolites and GC-MS Profile of *Chomelia asiatica* Linn. Root. **ScieXplore: International Journal of Research in Science**, v. 3, n. 1, p. 16, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.15613/sijrs/2016/v3i1/136479>. Acesso em: 9 dez. 2024.

BARNES, J. S. *et al.* General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray

ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 23, p. 4728-4735, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.032>. Acesso em: 15 maio 2025.

BARROS, M. P. *et al.* Constituintes químicos e avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante de extratos das folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & Schltdl. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1987-1989, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000800013>. Acesso em: 1 nov. 2023.

BODE, W.; MEYER, E.; POWERS, J.C.. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: x-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. **Biochemistry**, v. 28, n. 5, p. 1951-1963, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00431a001>. Acesso em: 8 jan. 2025.

BRAGAZZI, N. *et al.* Fasting and Its Impact on Skin Anatomy, Physiology, and Physiopathology: A Comprehensive Review of the Literature. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 249, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11020249>. Acesso em: 6 jan. 2025.

CAMELIER, A. A. *et al.* Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 7, p. 514-527, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1806-37132008000700012>. Acesso em: 9 jul. 2025.

CHATATIKUN, M. *et al.* Antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, molecular docking studies, and molecular dynamic simulation of active compounds found in nipa palm vinegar. **PeerJ Journals**, v. 11, p. e16494, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.16494>. Acesso em: 11 jan. 2025.

CHEN, Y. *et al.* Identification of an alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an inhibitor of tyrosinase and melanogenesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2200-2205, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf802617a>. Acesso em: 25 fev. 2025.

CHEN, W. *et al.* Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, t1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep07995>. Acesso em: 19 dez. 2024.

CHIOCCHIO, I. *et al.* Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 498-505, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.029>. Acesso em: 27 fev. 2025.

CHIPALA, G. E.. Anti-cancer compounds from cultured and field collected cyanobacteria. 2010. 242 p. Dissertação de doutorado — University of Illinois, Chicago, 2010.

CHOMPOO, J. *et al.* Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-106>. Acesso em: 14 nov. 2024.

COSTA, C. O. S. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante em amostras comerciais de *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 3, p. 312, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v12i3.7093>. Acesso em: 5 ago. 2025.

COSTA, M. *et al.* Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* kunth (euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, p. 687-701, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.18677/encibio_2017a53. Acesso em: 20 jul. 2025.

DAMIANI, E. *et al.* Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 59-66, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.010>. Acesso em: 17 jun. 2025.

DAPIC, I. *et al.* Characterization of ceramides with phytosphingosine backbone by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. **Croatica Chemica Acta**, v. 92, n. 3, p. 411-417, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5562/cca3506>. Acesso em: 13 maio 2025.

DAY, J. A.; COHEN, S. M.. Investigating the selectivity of metalloenzyme inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 7997-8007, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm401053m>. Acesso em: 4 dez. 2024.

FARISCO, F.. Dosagem de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e atividade antioxidante de extratos brutos de *Richardia brasiliensis* Gomes (Poaia-Branca) produzidos por maceração dinâmica ou banho ultrassônico. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27702>. Acesso em: 22 out. 2023.

FREITAS, M. M. *et al.* Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163130, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163130>. Acesso em: 19 dez. 2024.

GARG, J.. *Tarenna asiatica* – **eFlora of India**. 2024. Disponível em: <https://efloraofindia.com/efi/tarenna-asiatica/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

GERTSCH, J.. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. **Planta Medica**, v. 77, n. 11, p. 1086-1098, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270904>. Acesso em: 14 nov. 2024.

GIEHL, E. L. H.. *Chomelia obtusa*. **flora digital**, 2025. Disponível em: https://floradigital.ufsc.br/open_sp.php?img=7536. Acesso em: 11 jun. 2025.

GILLBRO, J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 3, p. 210-221, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00616.x>. Acesso em: 18 dez. 2024.

- GIRSANG, E. *et al.* Antioxidant and antiaging activity of rutin and caffeic acid. **Pharmaciana**, v. 10, n. 2, p. 147, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v10i2.13010>. Acesso em: 14 nov. 2024.
- HOFBAUER, S.. **RCSB PDB - 4YM9**: Crystal structure of Porcine Pancreatic Elastase (PPE) in complex with the novel inhibitor JM102. 2015. Imagem. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/4YM9>. Acesso em: 17 dez. 2024.
- HUO, C. *et al.* Global Natural Products Social (GNPS)-based molecular-networking-guided isolation of phenolic compounds from ginkgo biloba fruits and the identification of estrogenic phenolic glycosides. **Plants**, v. 12, n. 23, p. 3970, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12233970>. Acesso em: 30 jan. 2025.
- HWANG, J.; LEE, B. M.. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, l-dopa oxidation, and melanin synthesis. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, n. 5, p. 393-407, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10937400600882871>. Acesso em: 2 dez. 2024.
- ISMAYA, W. T. *et al.* Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. **Biochemistry**, v. 50, n. 24, p. 5477-5486, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi200395t>. Acesso em: 4 dez. 2024.
- KALA, S. C. *et al.*. Medicinal attributes of family rubiaceae. **Internatiol Journal of Pharmacy an Biological Sciences**, v. 5, p. 179-181, 2015.
- KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N.; CHAIKUL, P.. Biological activity and phytochemical profiles of *Dendrobium* : A new source for specialty cosmetic materials. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 61-70, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.059>. Acesso em: 2 dez. 2024.
- KANTEEV, M.; GOLDFEDER, M.; FISHMAN, A.. Structure-function correlations in tyrosinases. **Protein Science**, v. 24, n. 9, p. 1360-1369, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.2734>. Acesso em: 4 dez. 2024.
- KARTHIKKUMARAN, S.; *et al.* Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Tarenna asiatica* (L.) o. ktze. ex k. schum. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 102–110, 2014. Disponível em: <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ajpcr/article/view/824>. Acesso em: 2 jul. 2025.
- KUBO, I. *et al.* Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 1749-1755, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)00102-4). Acesso em: 18 nov. 2024.
- KUKIĆ, J. *et al.* Composition of essential oil of *Stachys alpina* L. ssp. *dinarica* Murb. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 3, p. 539-542, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.1684>. Acesso em: 2 jun. 2025.

LAZZAROTTO, S. R. S. *et al.* Folin ciocalteau adapted method to quantify polyphenols in yerba mate extracts. **Movimenta**, v. 13, n. 3, p. 419-426, 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1131484/1/Marcelo-Lazzarotto-Metodo-de-Folin.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2025.

LE GALL, G. *et al.* Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2438-2446, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf025995e>. Acesso em: 13 out. 2024.

LE, P. M.; MCCOOEYE, M.; WINDUST, A.. Application of UPLC-QTOF-MS in MSE mode for the rapid and precise identification of alkaloids in goldenseal (*Hydrastis canadensis*). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 6, p. 1739-1749, 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7558-x>. Acesso em: 29 set. 2024.

LEE, K. K. *et al.* Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from Areca catechu as a new anti-ageing agent. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, n. 6, p. 341-346, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.0412-5463.2001.00102.x>. Acesso em: 18 nov. 2024.

LI, F. *et al.* The novel contributors of anti-diabetic potential in mulberry polyphenols revealed by UHPLC-HR-ESI-TOF-MS/MS. **Food Research International**, v. 100, p. 873-884, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.052>. Acesso em: 12 maio 2025.

LIU, J. *et al.* 1-(1-Arylethylidene)thiosemicarbazide derivatives: A new class of tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1096-1102, 1, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.102>. Acesso em: 4 dez. 2024.

MAHOMOODALLY, M. F.; RAMJUTTUN, P. A quantitative ethnobotanical survey of phytocosmetics used in the tropical island of Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 45-59, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.039>. Acesso em: 3 nov. 2023.

MANN, T. *et al.* Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 7, p. 1601-1608, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.019>. Acesso em: 9 jan. 2025.

MANOJJ, D. *et al.* In vitro cytotoxicity study and anti-Brucella activity of *Tarenna asiatica* (L). **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 54-61, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.021>. Acesso em: 1 nov. 2023.

MARTINS, D.; NUNEZ, C.. Secondary metabolites from rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules200713422>. Acesso em: 23 out. 2023.

MERFORT, I.. Wechselwirkungen von pflanzlichen Naturstoffen und Elastase. **BIOspektrum**, v. 18, n. 6, p. 670-672, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12268-012-0242-4>. Acesso em: 24 out. 2023.

MUKHERJEE, A. *et al.* Fungi's treasure in cosmeceuticals-a comprehensive chemical approach. **South African Journal of Botany**, v. 166, p. 311-331, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.036>. Acesso em: 10 jun. 2025.

NASCIMENTO, J. M. ; VIANA, D. R. ; SILVA, A. M. ; SILVA, D. L. S. ; OLIVEIRA, R. R. ; CONCEIÇÃO, G. M.. Rubiaceae juss. do herbário professor aluizio bittencourt, maranhão, brasil. **BIOTA AMAZÔNIA**, V. 8, P. 24-31, 2018. Disponível em: <https://xjournals.com/collections/articles/Article?qt=p4PH+csgLb3NXrc3XkMXmBeNUyFSU64zRIP6j18mh9vXZq46J0i7IZ4xcCIb8fMwaoAxyHc5/Wk7myGqlfCECQ==>. Acesso em: 14 jan. 2025.

NESTEROV, A. *et al.* 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)propane, a novel tyrosinase inhibitor with strong depigmenting effects. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 56, n. 9, p. 1292-1296, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/cpb.56.1292>. Acesso em: 19 dez. 2024.

NILE, S. H. *et al.* Exploitation of apple pomace towards extraction of triterpenic acids, antioxidant potential, cytotoxic effects, and inhibition of clinically important enzymes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110563, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110563>. Acesso em: 18 nov. 2024.

OYAMA, T. *et al.* The structural differences between mushroom and human tyrosinase cleared by investigating the inhibitory activities of stilbenes. **Journal of Molecular Structure**, p. 134180, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134180>. Acesso em: 9 jan. 2025.

PÉREZ, M.; DOMINGUEZ-LÓPEZ, I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.. The chemistry behind the folin–ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>. Acesso em: 21 jul. 2025.

PESSOA, M. C. R. *et al.* First record of *Chomelia triflora* (J.H. Kirkbr.) Delprete & Achille (Rubiaceae) from Brazil. **Check List**, v. 13, n. 4, p. 159-162, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.15560/13.4.159>. Acesso em: 9 dez. 2024.

PESSOA, M.C.R.. *Chomelia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB20713>>. Acesso em: 31 out. 2023.

PILON, A. *et al.* REDES MOLECULARES: Uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170777>. Acesso em: 2 dez. 2024.

- PINO, J. A. *et al.* Volatile components from mango (*mangifera indica*.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2213-2223, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0402633>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- PIRES, C. B. A.; FONSECA, J. S.; SERUDO, R.L.. Proteases produzidas por microorganismos na região amazônica. **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 1, p. 15-33, 2019. Acesso em: 17 dez. 2024.
- PRETZLER, M.; BIJELIC, A.; ROMPEL, A. **RCSB PDB - 5M6B**: structure of recombinant mushroom tyrosinase (abPPO4). 2016. Imagem. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/5M6B>. Acesso em: 17 dez. 2024.
- RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A.. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388-2395, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.02.048>. Acesso em: 18 dez. 2024.
- ROCHA, L. M.; MOREIRA, L. M. A.. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1676-24442007000100006>. Acesso em: 4 dez. 2024.
- RODRIGUES, M. V. N. *et al.* O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *MultiCiências: Construindo a história dos produtos naturais*, v. 7, n. 5, 2006. Disponível em: http://researchgate.net/publication/228644859_O_emprego_de_tecnicas_hifenadas_no_estudo_de_plantas_medicinais/citations. Acesso em: 1 fev. 2025.
- ROSTANDY, B.; GAO, X.. Botanical metabolite ions extraction from full electrospray ionization mass spectrometry using high-dimensional penalized regression. **Metabolomics**, v. 15, n. 10, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1603-5>. Acesso em: 30 set. 2024.
- RUFINO, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, v. 128, 2007.
- SAHU, R. K. *et al.* Review on skin aging and compilation of scientific validated medicinal plants, prominence to flourish a better research reconnoiters in herbal cosmetic. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 7, n. 1, p. 1-22, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/rjmp.2013.1.22>. Acesso em: 6 jan. 2025.
- SANTOS, M. D.; LOPES, N. P.; IAMAMOTO, Y. HPLC-ESI-MS/MS analysis of oxidized di-caffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalyzed reactions. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 767-770, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-4042200800040001>. Acesso em: 12 maio 2025.
- SATHEESHKUMAR, N.; SHANTIKUMAR, S.; KOMALI, M.. Identification and Quantification of Aldose Reductase Inhibitory Flavonoids in Herbal Formulation and

Extract of *Gymnema sylvestre* Using HPLC-PDA and LC-MS/MS. **Chromatography Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/518175>. Acesso em: 4 out. 2024.

SCIGELOVA, M. *et al.* Fourier Transform Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 7, p. M111.009431, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.009431>. Acesso em: 2 out. 2024.

SCORRANO, S. *et al.* Anthocyanins Profile by Q-TOF LC/MS in *Myrtus communis* Berries from Salento Area. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 7, p. 2404-2411, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0813-6>. Acesso em: 15 maio 2025.

SENTHILKUMARAN, P. *et al.* Preliminary phytochemical screening in leaves of *Chomelia asiatica*. **World Journal of Pharmaceutical Research**, p. 1666-1672, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.20959/wjpr20178-9054>. Acesso em: 1 nov. 2023.

SHEN, D. *et al.* A Rapid LC/MS/MS Method for the analysis of nonvolatile antiinflammatory agents from *Mentha* spp. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. C900—C908, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02281.x>. Acesso em: 13 out. 2024.

SILVA, A. N. C. *et al.* Fitocosméticos: benefícios de cosméticos de origem natural na estética. **Revista ft**, v. 28, n. 139, p. 24-25, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.69849/revistaft/ni10202410312124>. Acesso em: 8 jan. 2025.

SILVA, C. F. *et al.* Chemical profiling and cosmeceutical potential of *Hymenaea stigonocarpa* fruit peel and seeds. **Food Chemistry**, p. 145961, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145961>. Acesso em: 10 set. 2025.

SINGH, B. K. *et al.* Kojic Acid Peptide: A new compound with anti-tyrosinase potential. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 5, p. 555, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.5.555>. Acesso em: 18 dez. 2024.

SKOREŃSKI, M.; TORZYK, K.; SIEŃCZYK, M.. Neutrophil serine proteases. **Rare Disease and Orphan Drugs Journal**, v. 2, n. 2, p. 6, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.20517/rdodj.2022.21>. Acesso em: 6 dez. 2024.

SOARES, S. E.. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-52732002000100008>. Acesso em: 12 ago. 2025.

SUTJIATMO, A. B. *et al.* Antioxidant and antiaging assays of *Ageratum conyzoides* (L.) ethanolic extract. **Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.7454/psr.v7i3.1061>. Acesso em: 21 nov. 2024.

TATIBANA, L. T. *et al.*. Metadados do item: ba. 2009. Disponível em: https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/UNICESU%20-1_74e7c21c45257b2cc9c820abdc54aae. Acesso em: 1 nov. 2023.

TRUSWELL, W. H.. Prescription skin care products and skin rejuvenation. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 59-65, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2019.09.005>. Acesso em: 8 jul. 2025.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>. Acesso em: 30 nov. 2024.

WARD, S. *et al.* Sphingosine and dihydrosphingosine as biomarkers for multiple sclerosis identified by metabolomic profiling using coupled UPLC-MS. **Analytical Methods**, v. 9, n. 41, p. 5929-5934, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7ay01922j>. Acesso em: 13 maio 2025.

WILLEMS, J. L. *et al.* Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 933, p. 164-174, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.041>. Acesso em: 4 out. 2024.

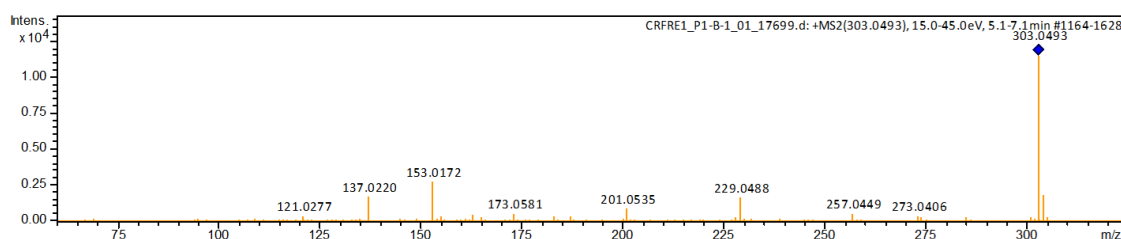
WOLF, S. *et al.* In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-148>. Acesso em: 4 out. 2024.

XUE, S. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of novel hybrids containing dihydrochalcone as tyrosinase inhibitors to treat skin hyperpigmentation. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00012>. Acesso em: 23 nov. 2024.

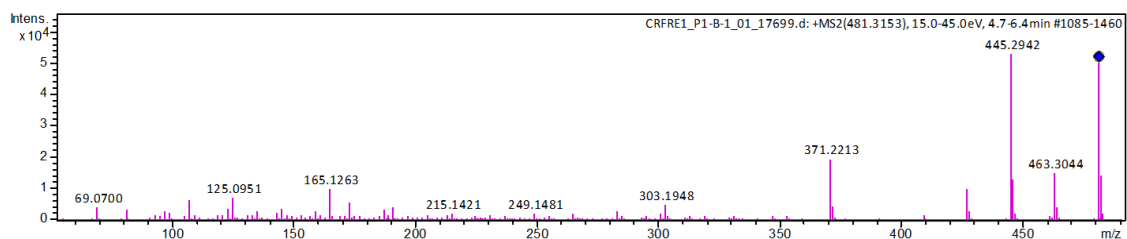
YANG, L.; CHEN, S.. Quantification of anthocyanosides in grapes by QuEChERS and biphenyl-UHPLC tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 30, n. 3, p. 382-401, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3427>. Acesso em: 15 maio 2025.

7 - ANEXOS

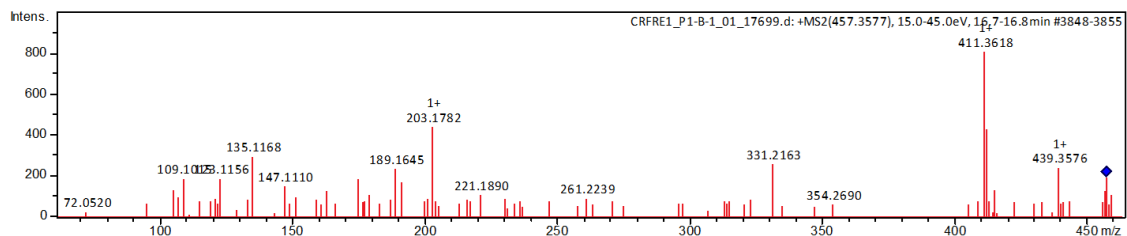
Espectro do composto 1A



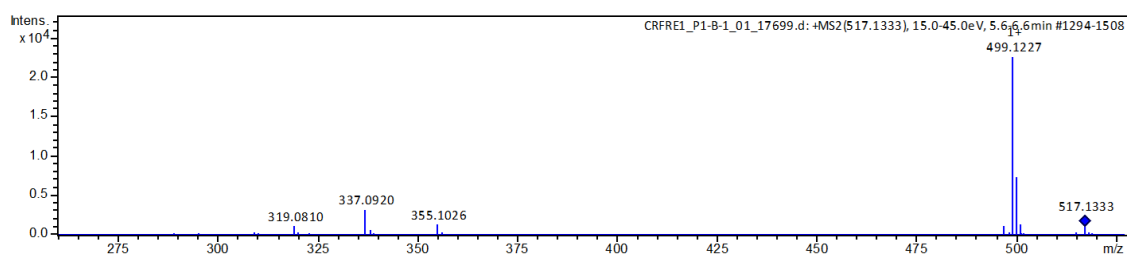
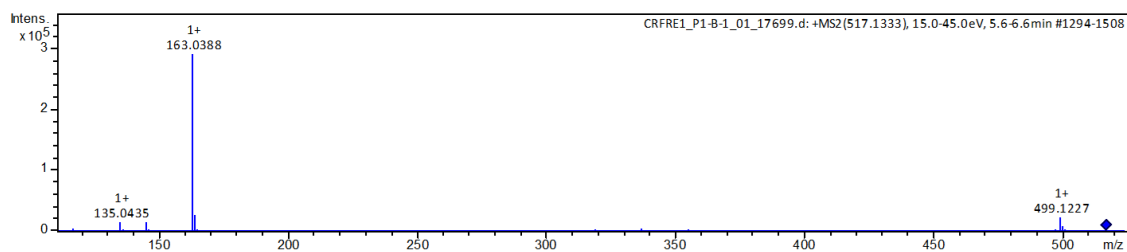
Espectro do composto 2A



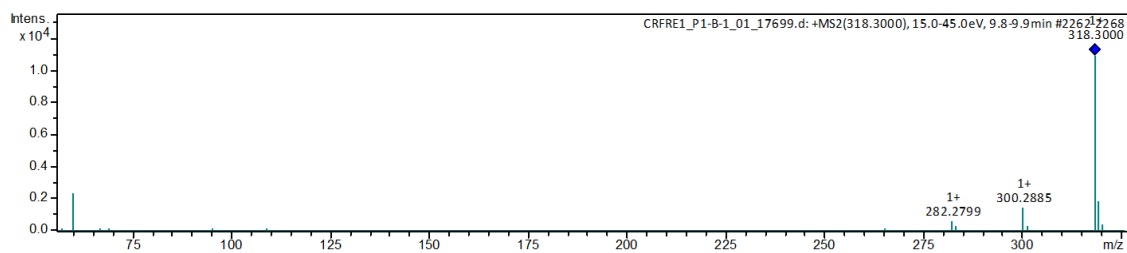
Espectro do composto 3A



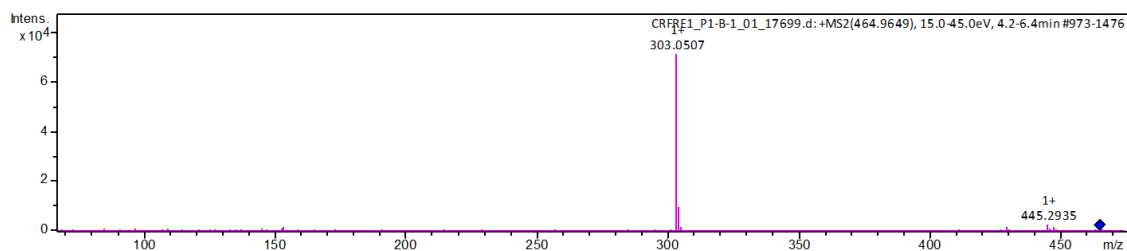
Espectro do composto 4A

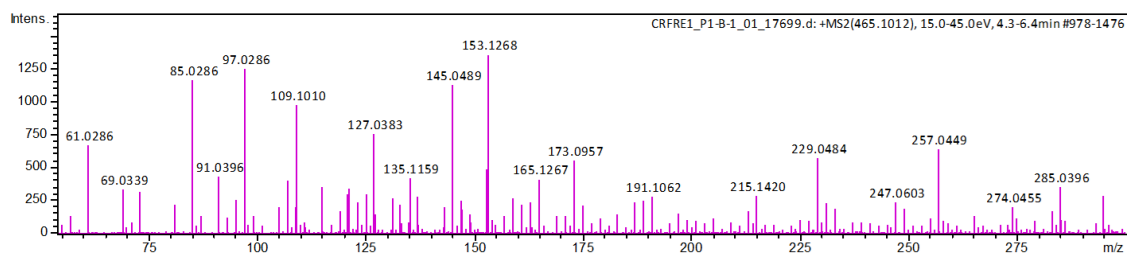


Espectro do composto 5A

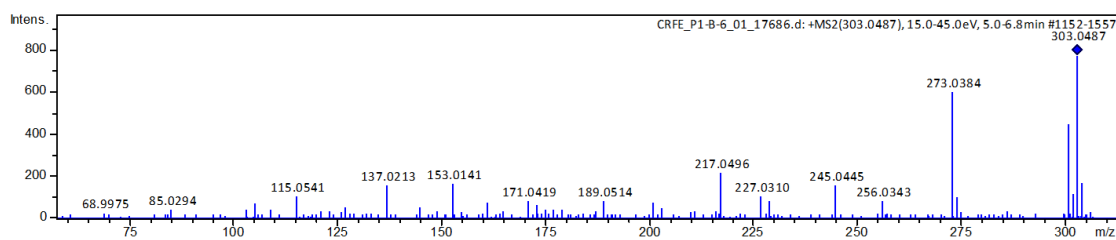


Espectro do composto 6A

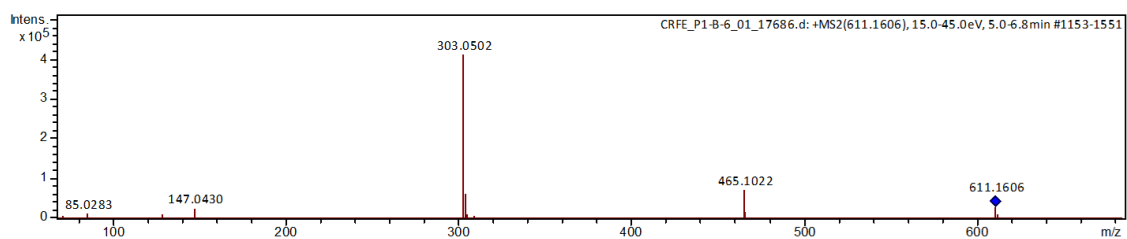




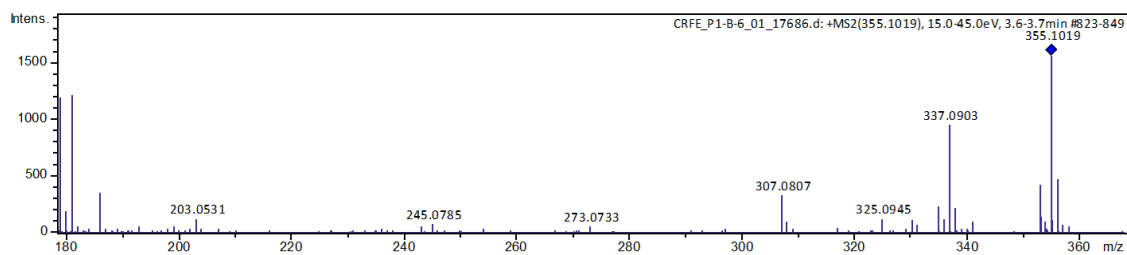
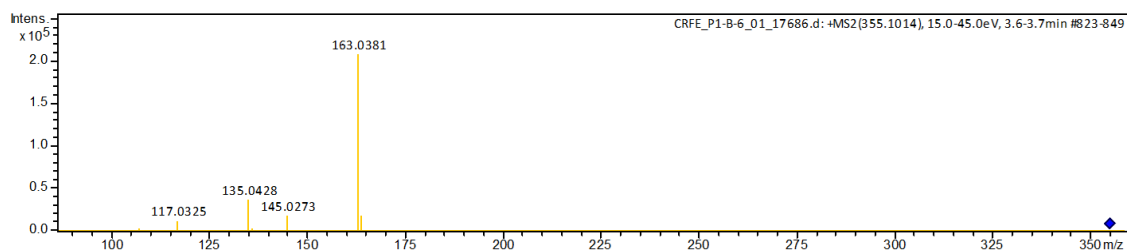
Espectro do composto 1B



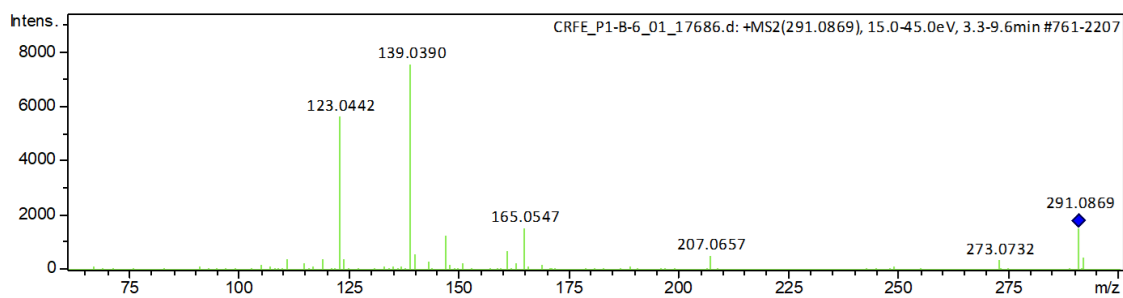
Espectro do composto 2B



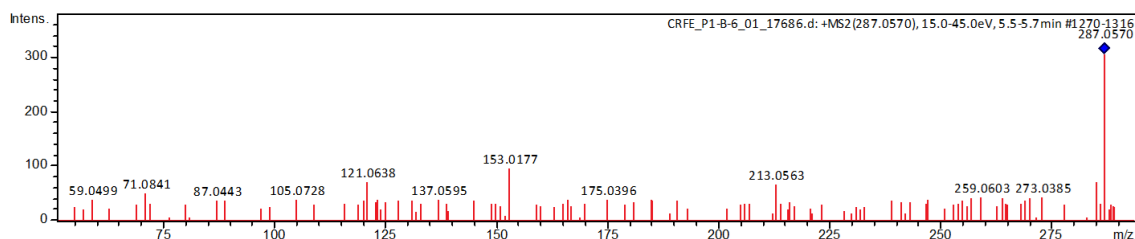
Espectro do composto 3B



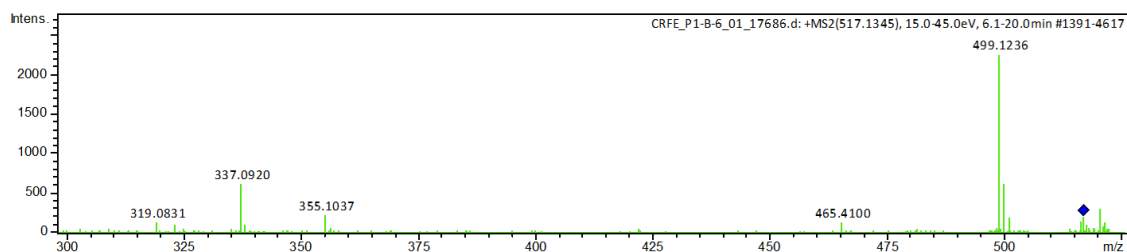
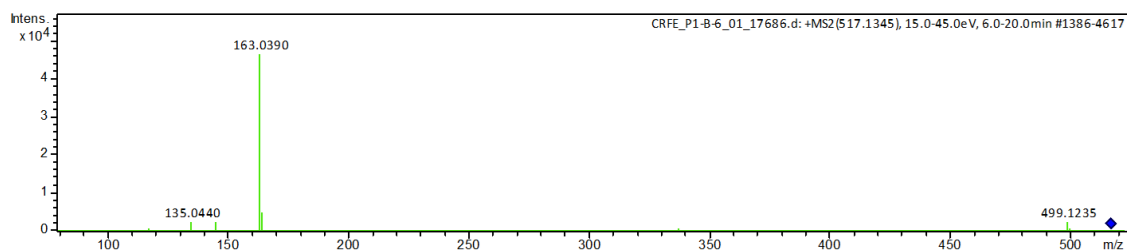
Espectro do composto 4B



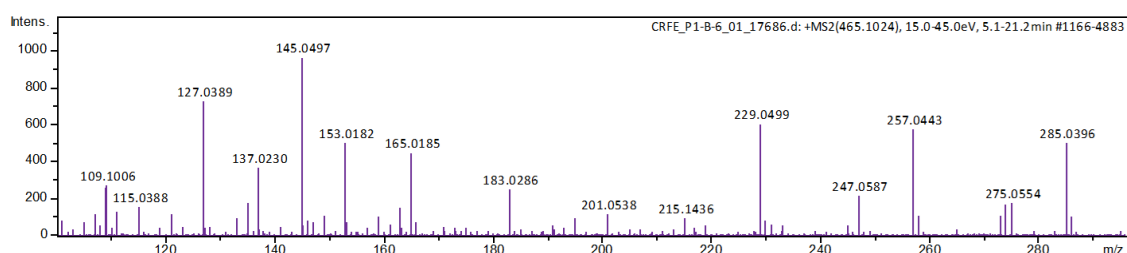
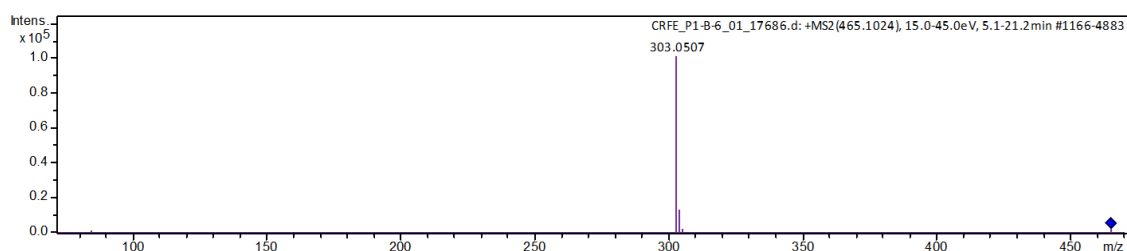
Espectro do composto 5B



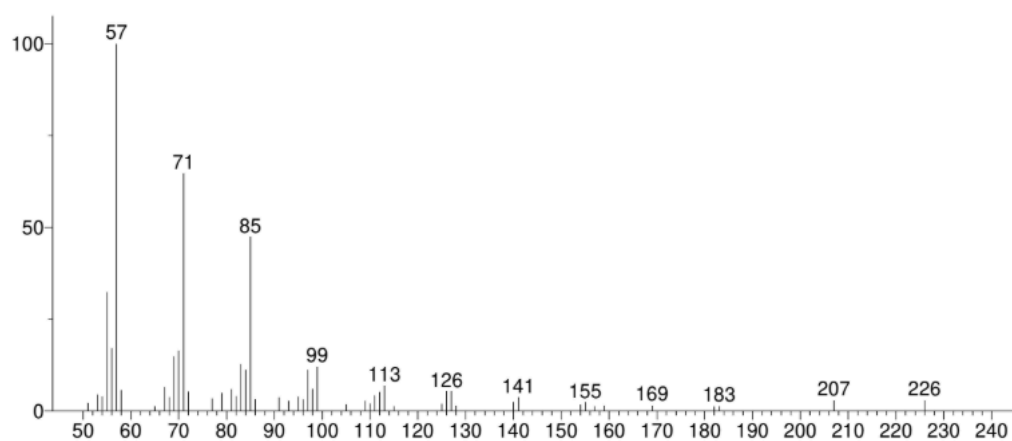
Espectro do composto 6B



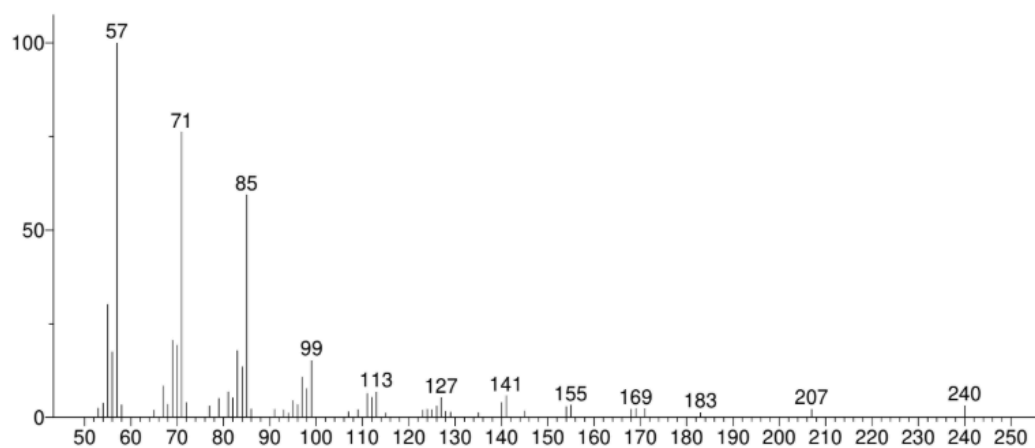
Espectro do composto 7B



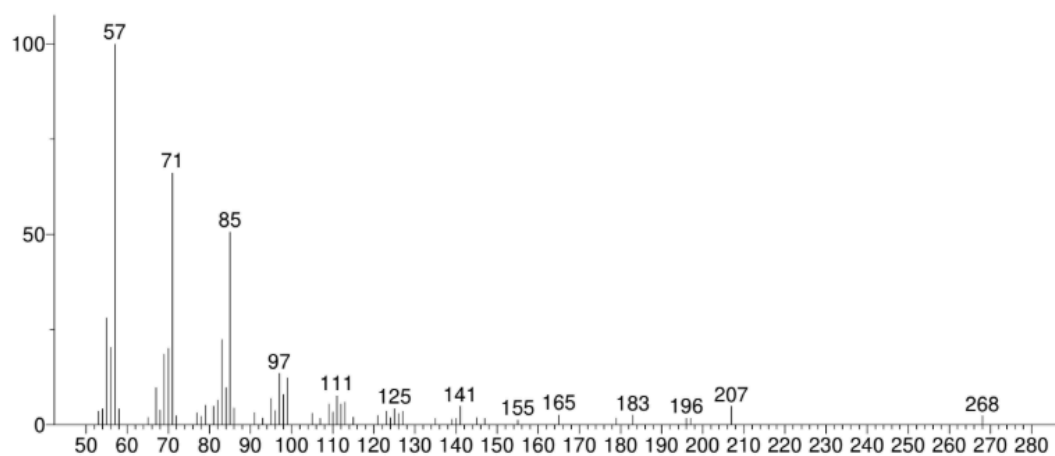
Espectro do composto 1C



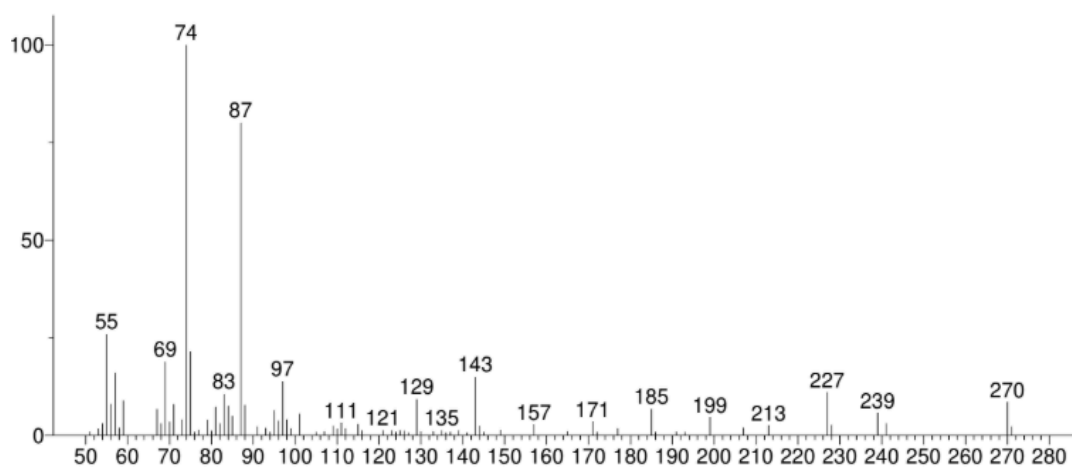
Espectro do composto 2C



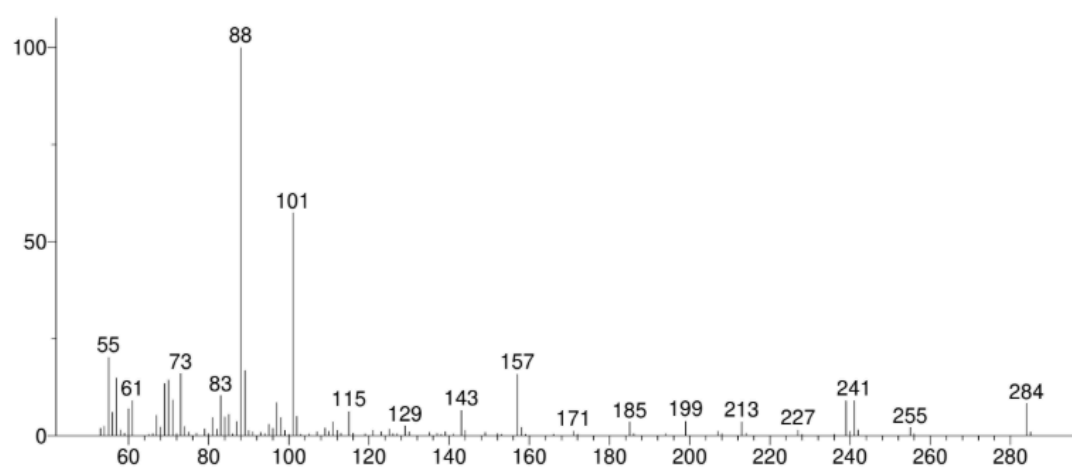
Espectro do composto 3C



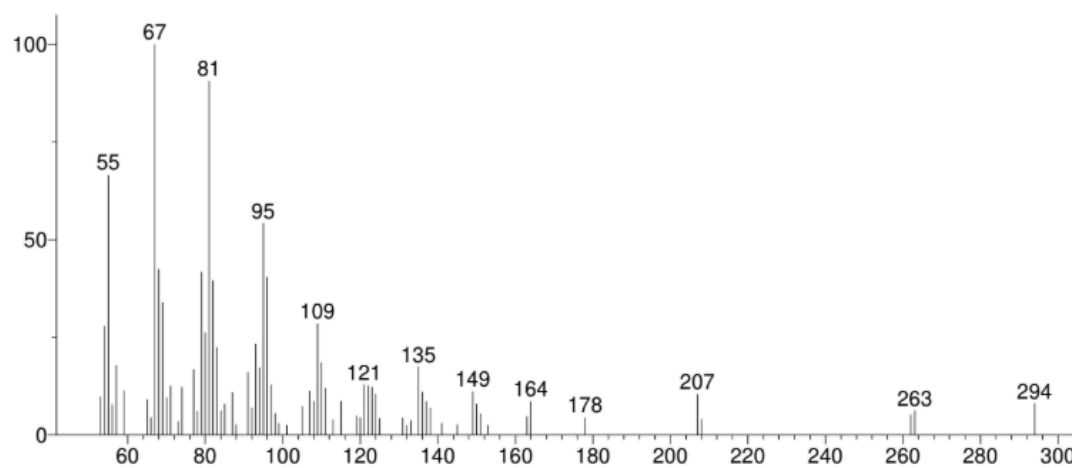
Espectro do composto 4C



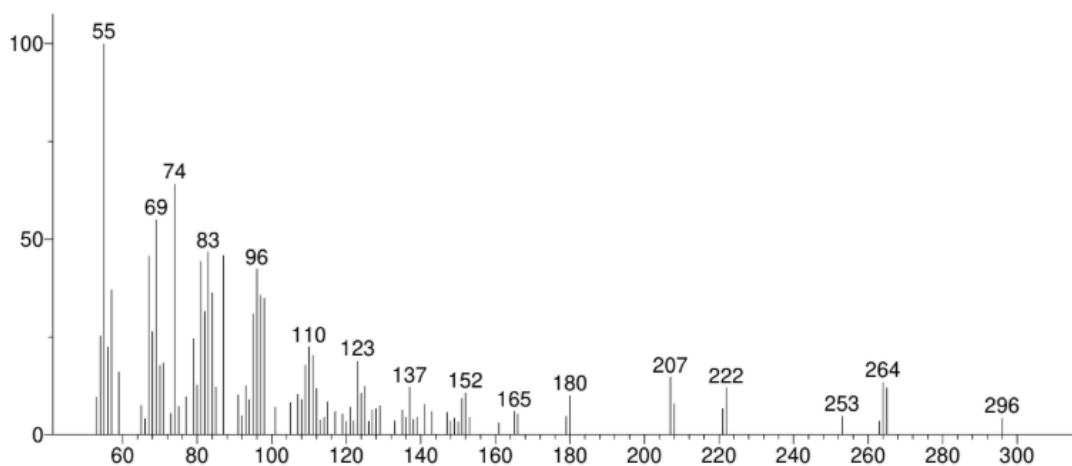
Espectro do composto 5C



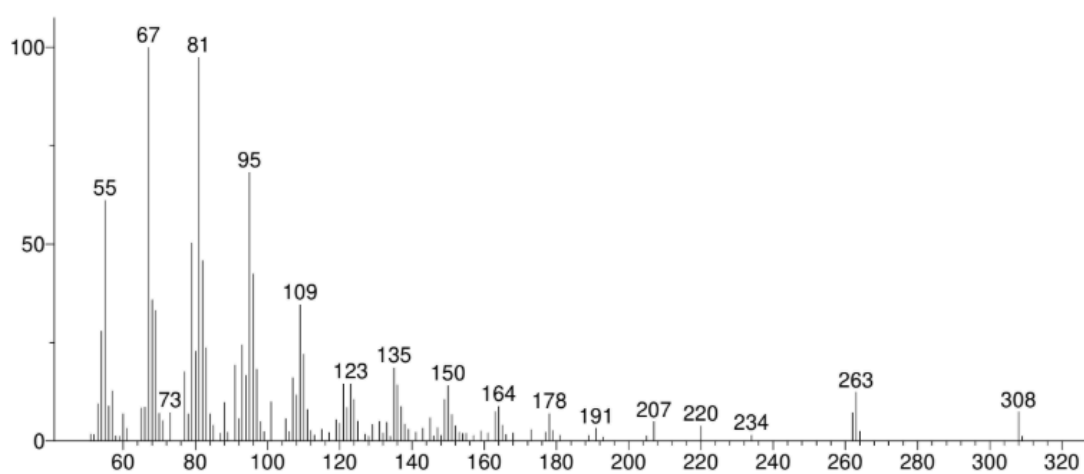
Espectro do composto 6C



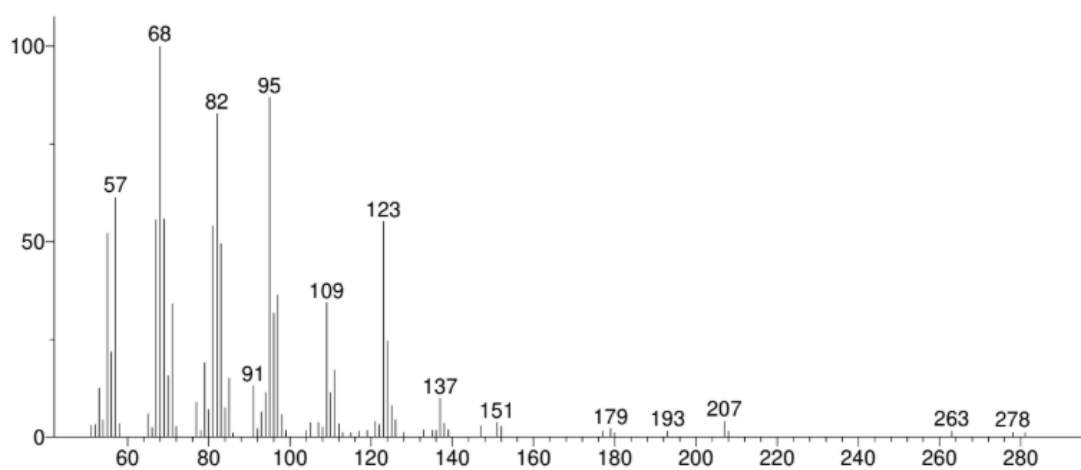
Espectro do composto 7C



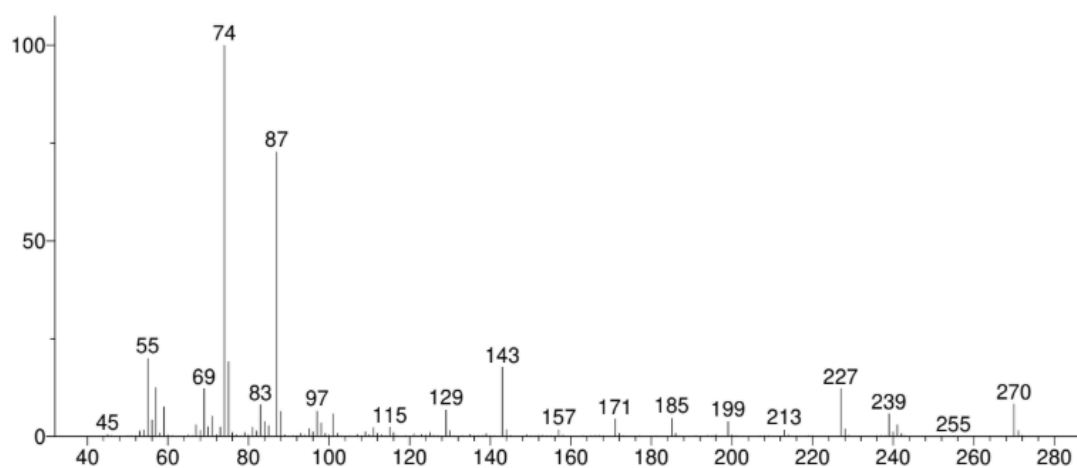
Espectro do composto 8C



Espectro do composto 1D



Espectro do composto 2D



Espectro do composto 3D

