



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

HIAGO NEGROMONTE SILVA

**CRIAÇÃO DE UM MODELO DE BIBLIOTECA DE EXTRATOS (EXTRATOTECA)
APLICADO A BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE FOLHAS DE CAJAZEIRA**

FORTALEZA

2018

HIAGO NEGROMONTE SILVA

**CRIAÇÃO DE UM MODELO DE BIBLIOTECA DE EXTRATOS (EXTRATOTECA)
APLICADO A BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE FOLHAS DE CAJAZEIRA**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Orientadora didático-pedagógica:
Profª. Dra. Dávila Souza Zampieri

Orientador Profissional:
Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA

2018

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

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

- S58c Silva, Hiago Negromonte.
Criação de um modelo de biblioteca de extratos (extratoteca) aplicado a banco ativo de germoplasma de folhas de cajazeira. / Hiago Negromonte Silva. – 2018.
83 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.
Coorientação: Profa. Dra. Dávila Souza Zampieri.
1. UPLC/QTOF/MS/MS. 2. Spondias mombin. 3. Cajá. 4. Anacardiaceae. 5. Extratoteca. I. Título.
CDD 540
-

HIAGO NEGROMONTE SILVA

**ESTABELECIMENTO DE BIBLIOTECA DE EXTRATOS (EXTRATOTECA)
APLICADO A FOLHAS DE CAJAZEIRA PROVENIENTES DE BANCO ATIVO DE
GERMOPLASMA.**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Davila Souza Zampieri (Orientadora pedagógica)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador profissional)
Embrapa Agroindústria Tropical - EMBRAPA

Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical - EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e toda e qualquer força superior que tenha me ajudado a chegar até aqui.

Ao meu orientador profissional Dr. Guilherme Julião Zocolo e à minha orientadora pedagógica Profa. Dra. Dávila Souza Zampieri minha sincera gratidão por terem aceitado me acompanhar durante todo esse período, pelo aprendizado e disponibilidade.

Aos meus pais, Telma de Lima Negromonte Silva e Ozéas Alves da Silva Filho pelo incentivo à educação, pelos conselhos, pelo exemplo e pelo amor. Sem isso, eu nada seria.

Às minhas irmãs, Tainá e Bruna, por ter dividido uma vida comigo, pela paciência e apoio.

Aos meus tios, primos e todos da minha grande família consanguínea que, independente da distância física, sempre me dão força em todas as vezes que estou em suas companhias.

Aos meus amigos que fiz no Colégio Juvenal de Carvalho, que mais do que amigos, se tornaram uma família para mim; aos amigos que fiz durante minha graduação; aos amigos que atraí pelo amor ao teatro e a todas as amizades que conquistei por aparentes acasos. Pelas descontrações, conversas, risadas e afetos, muito obrigado.

Àqueles que já deixaram o plano terrestre e que ainda assim me dão forças para continuar. Aos meus avós maternos. Aos meus avós paternos. À minha queridíssima amiga Ester. Minha imensa e saudosa gratidão.

Aos professores dos quais fui aluno, dos anos de pré-escola até o presente momento, pela sabedoria passada a mim durante todos esses anos, pela orientação e companheirismo. Ao Prof. Tércio pela orientação no projeto de iniciação científica durante a maioria da minha graduação. Obrigado, muito obrigado.

A todos os meus colegas de trabalho na Embrapa, em especial à Rayana pela parceria em laboratório.

À Universidade Federal do Ceará, à Embrapa e órgãos de fomento pela oportunidade de crescimento profissional, acadêmico e pessoal desde o início da minha graduação.

E por fim, a todos que não deixaram de ser citados propositalmente e colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho. Minha gratidão e respeito.

*“It is our choices that show what we truly
are, far more than our abilities.”*

J. K. Rowling

RESUMO

A conservação do material genético proveniente da biodiversidade é essencial para a manutenção da vida na terra, tanto no abastecimento alimentício como na medicina. O reino plantae apresenta uma fonte quase inesgotável para a aplicação de novos compostos pelo fato de produzirem moléculas de interesse, resultantes de seu metabolismo. A construção de uma biblioteca de extratos é uma alternativa para o armazenamento de informações atreladas à diferentes matrizes vegetais. A cajazeira (*Spondias mombin*) apresenta diversas atividades biológicas e ainda assim não se encontra na literatura uma identificação química detalhada da planta. Amostras de folhas provenientes de um banco ativo de germoplasma (BAG) de cajazeira foram usadas para dar início à consolidação da primeira extratoteca relacionada a BAG da Embrapa. Foi desenvolvido um método para armazenagem e rastreabilidade de todos os acessos das amostras disponíveis na coleção, assim como um banco de dados *in silico*. A técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução UPLC-QTOF-MS^E no modo de ionização positivo foi utilizada para traçar o perfil químico da *S. mombin*. Extratos hidroetanólicos (7:3) de folhas foram preparados previamente por extração líquido-líquido em ultrassom como parte do desenvolvimento de um método operacional padrão para obtenção de amostras de BAGs. Na primeira fração do cromatograma foram tentativamente identificados metabólitos do extrato de folhas que apresentou compostos fenólicos tais como catequina e o ácido clorogênico. Dois elagitaninos, muito semelhantes aos já reportados anteriormente por possuírem atividade antiviral, e alguns glicosídeos de quercetina também apresentaram fragmentos característicos desta classe química. O composto sespendole, reportado em espécie da família Anacardiaceae, também foi identificado na amostra. Todos os compostos foram parcialmente identificadas. O desenvolvimento de um procedimento padronizado de obtenção de uma extratoteca permitirá o crescimento de seu banco de dados físico e digital, o que representa uma perspectiva muito positiva para este trabalho.

Palavras – chave: UPLC/Q-TOF/MS/MS. *Spondias mombin*. Cajá. Anacardiaceae. Extratoteca. Banco ativo de germoplasma.

ABSTRACT

The preservation of genetic resources from biodiversity is essential to maintain life on Earth, in food distribution and medicine. Plantae kingdom produce molecules of interest that results of their metabolism and presents a source of new compounds that is almost endless. A library of extracts is a method to save information of different vegetal samples. Yellow mombin (*Spondias mombin*) has various proved biological activities. However, literature does not provide a detailed chemical profile for this plant. Samples from an active collection of germplasm of yellow mombin were collected to stablish Embrapa's first library of extracts including samples from a germplasm collection. A method to stock and track all samples in the collection was developed as well as an *in silico* database. The chemical identification of *S. mombin* was carried using Ultra Performance Liquid Chromatography hyphenated with a high-resolution mass spectrometer in positive ion mode (UPLC-QToF-MS/MS^E). Hydroethanolic extracts (7:3) of mombim leaves were prepared using ultrasound assisted liquid-liquid extraction. A standard method had been made for this procedure. On the first part of the chromatogram the attempt of identification reveled catequin and chlorogenic acid. The extract seemed to have high levels of phenolic compounds. Two peaks appeared to be ellagitannins, very similar to those previously reported for showing antiviral properties, and some quercetin glycosides that presented typical fragments for this type of molecule. Suspendole, identified in other Anacardiaceae species, was also found in the analyses. All compounds were partially identified. The development of a standard method to improve the library of extracts will result in the increase of the physical and digital database, which represents a positive perspective to this work.

Keywords: UPLC/Q-TOF/MS/MS. *Spondias mombin*. Yellow mombin. Anacardiaceae. Library of extracts. Active collection of germplasm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Algumas aplicações da química dos produtos naturais.....	17
Figura 2 - Decomposição térmica do isopentano.	19
Figura 3 - Estrutura dos alcaloides morfina e nicotina.	20
Figura 4 – Estrutura química da fenilalanina.	20
Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides (a cadeia de três carbonos é representada pelos carbonos 2, 3 e 4) seguida dos 4 principais grupos.	21
Figura 6 - Estrutura de um tanino condensado, com uma unidade da catequina em destaque (A), e de um galotanino como exemplo de um tanino hidrolisável (B).	22
Figura 7 - Fluxograma representativo da técnica UPLC-QToF-MS.	23
Figura 8 - Representação de um ionizador por eletrospray (ESI).	24
Figura 9 - Representação de um analisador quadrupolar.	25
Figura 10 - Representação de um analisador por tempo de voo.....	26
Figura 11 - Distribuição de acessos nos 11 principais países que possuem bancos de germoplasma de fruteiras.	28
Figura 12 - Folhas e frutos da cajazeira (<i>Spondias mombin</i>).	29
Figura 13 - Esquema de microextração do teste 1.	36
Figura 14 (a) - Esquema de microextração do teste 2.	38
Figura 15 - Comparação do rendimento em massa dos testes 1 e 2.	39
Figura 16 - Fluxograma geral do procedimento operacional padrão para preparo de extratos provenientes de BAGs.....	40
Figura 17 - Fotografia dos tubos organizados por QR-Codes, em caixa de armazenamento da extratoteca.	47
Figura 18 - Organização de armazenamento de amostras na extratoteca.	47
Figura 19 - Cromatograma da análise de extrato de folha de BAG de cajazeira (<i>Spondias mombin</i>).	51
Figura 20 - Fragmentação do dímero de catequina.....	54
Figura 21 - Fragmentação do ácido clorogênico.	55
Figura 22 - Estrutura da punicalina.....	56
Figura 23 - Estrutura de um galotanino (A) para a formação de uma unidade HHDP na molécula de trigaloil-HHDP-glucopiranosose (B).	56
Figura 24 - Rota de fragmentação do di-HHDP-glicose.....	57
Figura 25 - Exemplos de glicosídeos de quercetina.....	58

Figura 26 - Fragmentação do 3-O-Quercetina-galactosídeo.....	58
Figura 27 - Fragmentação do arabinosídeo de quercetina.....	59
Figura 28 - Estrutura química da quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercitrina).....	60
Figura 29 - Estrutura do sespendole.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas estudadas previamente com extratos de partes do pé de cajá.....	30
Tabela 2 – Relação das amostras do BAG de <i>Spondias mombin</i>	34
Tabela 3 – Massas pesadas após moagem das amostras	35
Tabela 4 – Massa pesada para primeiro teste de validação do método de extração.....	36
Tabela 5 – Massas de extrato obtidas do primeiro teste.....	37
Tabela 6 – Massas de extrato obtidas do segundo teste.....	39
Tabela 7 – Relação de todas as amostras de BAGs de cajá.....	41
Tabela 8 – Tentativa de identificação química dos compostos presentes no extrato de BAG de <i>Spondias mombin</i>	52

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Equação da energia cinética.....	25
Equação 2 – Cálculo da média aritmética das massas.....	45
Equação 3 – Cálculo do desvio padrão.....	45
Equação 4 – Cálculo do coeficiente de variação.....	46
Equação 5 – Cálculo do rendimento em porcentagem das massas obtidas para os extratos de BAGs de cajá.....	46
Equação 6 - Cálculo do erro em ppm das fórmulas moleculares obtidas pelo software MassLynx.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Performance)
Q-TOF	<i>Quadrupole – Time of Flight</i> (Quadrupolo Tempo de Vôo)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
ESI	<i>Eletrospray Ionization</i> (Ionização por Eletrospray)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
BAG	Banco Ativo de Germoplasma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Química dos produtos naturais	17
2.2 Metabólitos secundários	18
2.2.1 Terpenos	19
2.2.3 Compostos nitrogenados	19
2.2.2 Compostos fenólicos	20
2.3 Desreplicação	22
2.4 Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) e extratoteca	27
2.5 <i>Spondias mombin</i>	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Estabelecimento da extratoteca	32
4.1.1 Materiais	32
4.1.2 Equipamentos	33
4.1.3 Reagentes	33
4.1.4 Obtenção e Tratamento das Amostras	33
4.1.5 Validação do método de extração vegetal	35
4.1.6 Tratamento de BAGs de <i>Spondias mombin</i>	40
4.2 Identificação química das folhas de cajá	48
4.3 Parâmetros de análise química das folhas de cajá	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Extratoteca	48
5.2 Identificação química das amostras de cajá	49
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXTRAÇÃO VEGETAL DE BAGS	68

APÊNDICE B – FICHA DE ENTRADA DE AMOSTRAS DA EXTRATOTECA DA EMBRAPA.....	72
APÊNDICE C – LAYOUT DO SOFTWARE USADO PARA TRATAMENTO DE DADOS DA EXTRATOTECA DA EMBRAPA.....	75
APÊNDICE D – ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS...	79

1 INTRODUÇÃO

A química dos produtos naturais é uma área de grande interesse por sua ampla aplicabilidade na pesquisa com forte presença nos setores da indústria (KHAN, 2018). A procura por bens de consumo oriundos da biodiversidade aumenta juntamente com a busca por novas alternativas terapêuticas. Assim, a metabolômica vem como uma ferramenta crucial, tendo como papel fundamental a realização de uma ampla prospecção de compostos resultantes do metabolismo de sistemas biológicos (FUNARI et al., 2013).

Os metabólitos secundários são produtos de biossínteses realizadas pelos seres vivos e desempenham papéis essenciais na sua sobrevivência. No reino vegetal esses compostos possuem uma certa limitação, sendo produzidos apenas por organismos específicos. Muitos deles possuem efeitos biológicos interessantes e que podem auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos. (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Como uma estratégia de prospecção rápida e eficiente de compostos de interesse biológico, a técnica de desreplicação surgiu como uma forma inovadora na identificação química de produtos naturais, tratando-se de técnicas de prospecção que diminuem o tempo de análise aumentando sua eficiência. O rápido desenvolvimento de métodos cromatográficos acoplados à equipamentos de análise espectrométrica apresentam ganhos substanciais no que concerne a capacidade de identificação. Equipamentos de cromatografia rápida acoplados a massas de alta resolução, assim como os de ressonância Magnética Nuclear são atualmente a base das metodologias de desreplicação (FUNARI et al., 2013).

Banco Ativo de Germoplasma (BAG) é o conjunto de todo material genético de determinada espécie, o qual pode ser conservado de diversas formas. O uso de BAGs é dirigido para o avanço da pesquisa por todo o mundo (FERREIRA, 2011). Se busca então uma forma de valorizar este material na descoberta de substâncias com propriedades diferenciadas. No Brasil, a construção de uma extratoteca se mostra inovadora, já que a ocorrência deste tipo de banco de armazenagem é escassa no país.

A espécie *Spondias mombin*, pertencente à família Anacardiaceae, é predominante em países tropicais, incluindo o Brasil onde é conhecida como cajazeira (MORTON, 2004). Diversos estudos já foram feitos com partes aéreas da planta, comprovando altas concentrações de taninos, saponinas, flavonoides e outros compostos fenólicos (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Também foram observadas atividades biológicas antiviral (CORTHOUT et al., 1991),

sedativa (AYOKA et al., 2006), antimicrobiana (ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999), entre outras. Embora se tenha comprovado todos estes efeitos da planta, não se tem na literatura seu perfil químico detalhado. Pretende-se então realizar a identificação dos metabólitos secundários presentes na espécie.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Química dos produtos naturais

A metabolômica, estudo da identificação de produtos do metabolismo de sistemas biológicos, possui uma grande variedade de aplicações em áreas como cosméticos, fármacos e alimentos. Além disso, novas substâncias isoladas e identificadas auxiliam no desenvolvimento de novos materiais sintéticos, tratamentos medicinais e diversos bens consumíveis esuqmetizados na Figura 1, como óleos, pigmentos, resinas e condimentos (KHAN, 2018).

Figura 1 - Algumas aplicações da química dos produtos naturais.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos dias de hoje, apenas 10% de toda a diversidade mundial foi estudada, e em questão de atividade biológica, essa porcentagem é ainda menor. Enquanto isso, a procura de produtos oriundos da biodiversidade pela população só aumenta (FUNARI et al., 2013).

Por não existirem ferramentas e técnicas precisas de isolamento e identificação, assim como a falta de priorização e investimento, o estudo de produtos naturais sofreu um grande declínio. Consequentemente, os avanços científicos e tecnológicos na área foram impactados, resultando na desmotivação da descoberta de novos compostos.

Contudo, nos últimos anos, o interesse em terapias alternativas no combate a doenças crônicas e genéticas, assim como a procura por novos fármacos trouxe de volta a atenção sobre os produtos naturais. A busca por compostos biologicamente ativos resultou no desenvolvimento de tecnologias e estratégias para a separação, purificação e caracterização de substâncias (KHAN, 2018).

Por isso, um desafio atual é identificar moléculas bioativas de forma rápida e eficiente. O uso de técnicas capazes de identificar substâncias em quantidades mínimas de extrato e sem a necessidade de fracionamento e isolamento que demandam muito tempo e trabalho é essencial neste cenário (FUNARI et al., 2013).

2.2 Metabólitos secundários

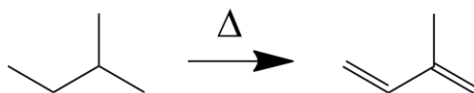
Alguns compostos orgânicos, que são produtos de diversas biossínteses realizadas pelos vegetais, não aparentam possuir função direta no desenvolvimento da planta. Esses compostos são chamados de metabólitos secundários.

Diferentemente dos metabólitos primários, estes possuem uma distribuição bastante restrita na natureza, ou seja, apenas certas espécies, ou famílias de plantas, são capazes de sintetizar um metabólito secundário específico. Essas moléculas possuem funções ecológicas muito importantes para a manutenção da vida do vegetal, como na defesa de competição planta-planta e em sua reprodução. Alguns exemplos são as antocianinas que conferem coloração à planta e a lignina, polímero natural responsável por sua estabilidade estrutural. Os metabólitos secundários podem ser distribuídos em três grupos químicos distintos: os terpenos, compostos nitrogenados e os compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

2.2.1 Terpenos

O grupo dos terpenos é o maior das três classes de metabólitos secundários. Essas moléculas atuam principalmente como inseticida, repelindo também muitos mamíferos herbívoros. São produtos da fusão de unidades de isopentano e muitas vezes também são chamados de isoprenóides, quando sua unidade é decomposta em isoprenos pela ação do calor, como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Decomposição térmica do isopentano.



Fonte: Elaborada pelo autor

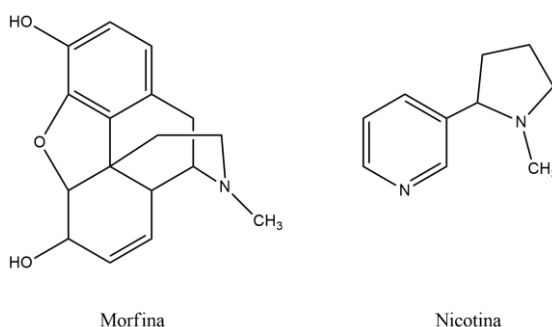
Esses compostos são classificados de acordo com a quantidade de carbonos em sua cadeia. Terpenos com duas unidades de pentanos são monoterpenos. Os sesquiterpenos possuem 3 unidades C5 enquanto que os diterpenos 4 unidades. (TAIZ; ZEIGER, 2006)

2.2.3 Compostos nitrogenados

Os metabólitos secundários que apresentam nitrogênio em sua estrutura formam o terceiro grupo. Estes também protegem o vegetal contra animais predadores. Os compostos nitrogenados são muito estudados por apresentar efeitos biológicos diversos.

Os alcaloides, grande sub-grupo destes compostos, geralmente possuem em suas estruturas um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico. Conseqüentemente, possuem uma grande variedade estrutural. Alguns são de interesse medicinal, como a morfina, outros com usos não-farmacológicos estimulantes, como a nicotina. (TAIZ; ZEIGER, 2006)

Figura 3 - Estrutura dos alcaloides morfina e nicotina.

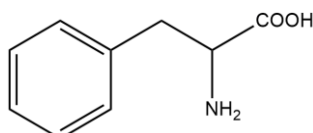


Fonte: Elaborada pelo autor

2.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, por sua vez, são assim designados por possuírem em sua estrutura o grupo fenol (uma hidroxila ligada a um anel aromático). É um grupo bastante heterogêneo, possuindo diferentes rotas de biossíntese, e por isso suas funções ecológicas são diversas, como o suporte estrutural e atrativo para animais polinizadores. Na rota do ácido chiquímico, mecanismo mais significativo na produção dos compostos fenólicos, a fenilalanina (Figura 4) aparece como intermediário (TAIZ; ZEIGER, 2006).

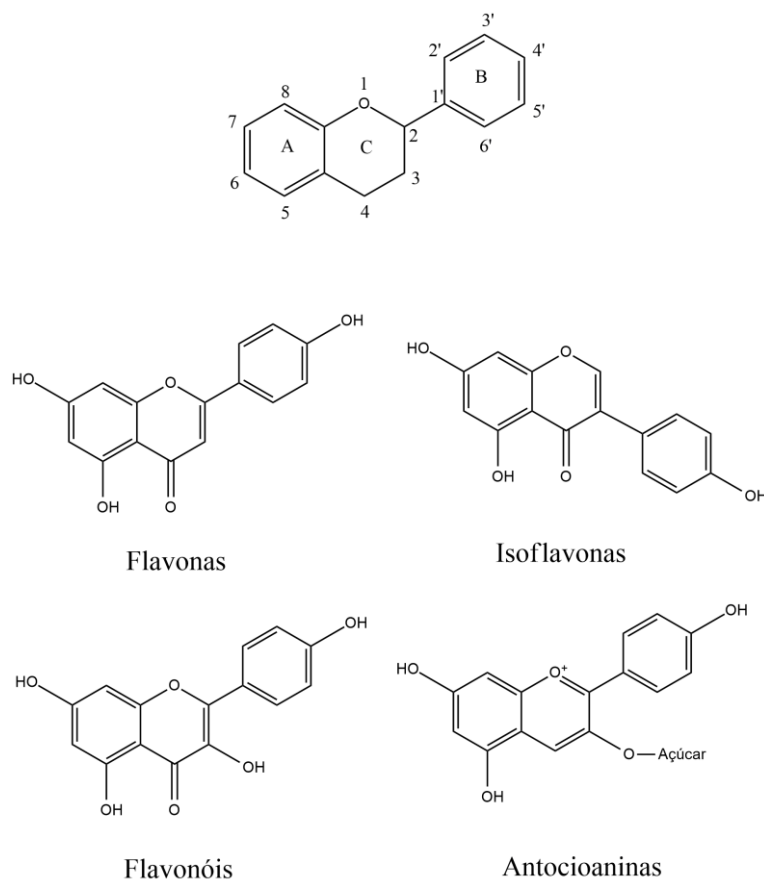
Figura 4 – Estrutura química da fenilalanina.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os compostos fenólicos são divididos em subgrupos. O maior deles é o dos flavonoides. Esses são classificados pelo nível de oxidação e substituintes na sua estrutura básica, composta por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos, mostrados na Figura 5. (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides (a cadeia de três carbonos é representada pelos carbonos 2, 3 e 4) seguida dos 4 principais grupos.



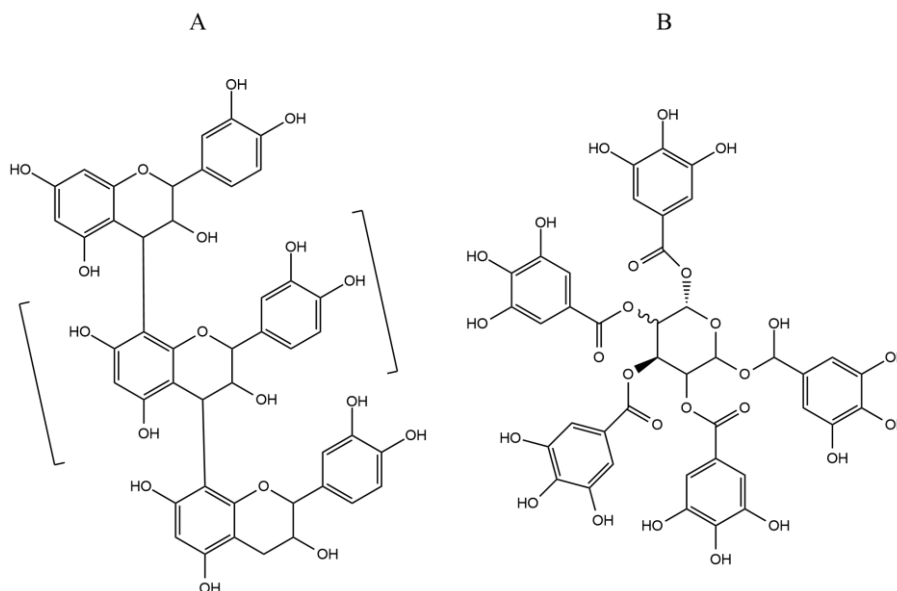
Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os taninos são macromoléculas naturais que constituem um segundo grupo de compostos fenólicos. São toxinas de defesa, podendo diminuir a sobrevivência de insetos e outros herbívoros. Eles são subdivididos em duas categorias: os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os taninos condensados são polímeros formados por unidades de flavonóis. Esses possuem uma grande diversidade pela variação de substituição, posições de suas ligações e estereoquímica de seus compostos (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos hidrolisáveis, por sua vez, apresentam em sua estrutura uma molécula de açúcar que possui como substituintes ésteres de ácidos fenólicos, geralmente o ácido gálico ou o ácido elágico (MONTEIRO et al., 2005). Moléculas com ácido gálico como substituintes são denominados galotaninos enquanto os que apresentam ácido elágico são chamados de elagitaninos, como os compostos da Figura 6. (SALMINEN et al., 1999).

Figura 6 - Estrutura de um tanino condensado, com uma unidade da catequina em destaque (A), e de um galotanino como exemplo de um tanino hidrolisável (B).



Fonte: Elaborado pelo autor baseado em (DIAS; ENDRINGER, 2014).

No estudo fitoquímico de espécies pertencentes à família Anacardiaceae são identificados compostos fenólicos em suas mais variadas formas com propriedades medicinais interessantes. (ENGELS et al., 2012) Por isso no desenvolvimento deste trabalho, será dada maior atenção a esse grupo, objetivando-se a identificação química dos compostos fenólicos presentes na matriz vegetal de *Spondias mombin*.

2.3 Desreplicação

Na década de 90 um novo conceito de prospecção química, dentro da área de Produtos Naturais surgiu na literatura e foi chamado de desreplicação. A desreplicação é definida como sendo um conjunto de técnicas de triagem de extratos que dispensam a necessidade de isolamento, demandam uma quantidade mínima de amostra, tornando mais rápida a elucidação estrutural de substâncias (FUNARI et al., 2013).

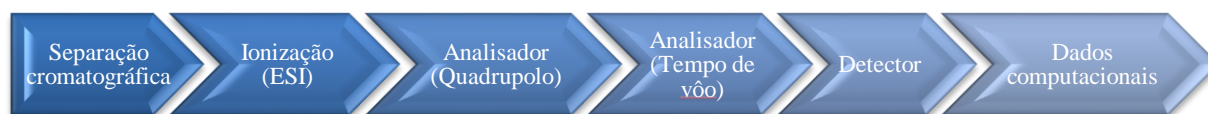
Atualmente, elementos cromatográficos de separação acoplados a detectores espectrométricos são os mais utilizados para este fim. A combinação da cromatografia líquida

de ultra performance (UPLC) com o ionizador por eletrospray e analisador por tempo de voo (ESI-qToF) hifenados a espectrometria de massas tandem (MS^E) é a técnica que traz maior relação custo benefício. Isto por que a abordagem demanda curto tempo de análise, pouca quantidade de amostra, baixo custo instrumental além de ser bastante sensível (FUNARI et al., 2013).

A espectrometria de massas é capaz de identificar metabólitos com alta velocidade e precisão. A prévia separação cromatográfica traz vantagens muito importantes. Moléculas com mesma massa podem ser distinguidos por possuírem tempos de retenção diferentes e interferentes podem ser separados dos metabólitos, possibilitando uma leitura mais exata (LAST; JONES; SHACHAR-HILL, 2007).

A mistura é injetada na coluna cromatográfica, onde as moléculas serão separadas de acordo com suas interações com a fase estacionária e com o solvente utilizado. Depois de separadas, as moléculas são ionizadas, particionadas e em seguida são aceleradas e direcionadas ao analisador. Nesta etapa, os fragmentos são separados de acordo com o tipo de analisador escolhido pelo operador. Em seguida, o detector consegue medir o peso dos íons e os transforma em espectros e outros dados computacionais (LAST; JONES; SHACHAR-HILL, 2007). A figura abaixo ilustra resumidamente todo o processo descrito.

Figura 7 - Fluxograma representativo da técnica UPLC-QToF-MS.

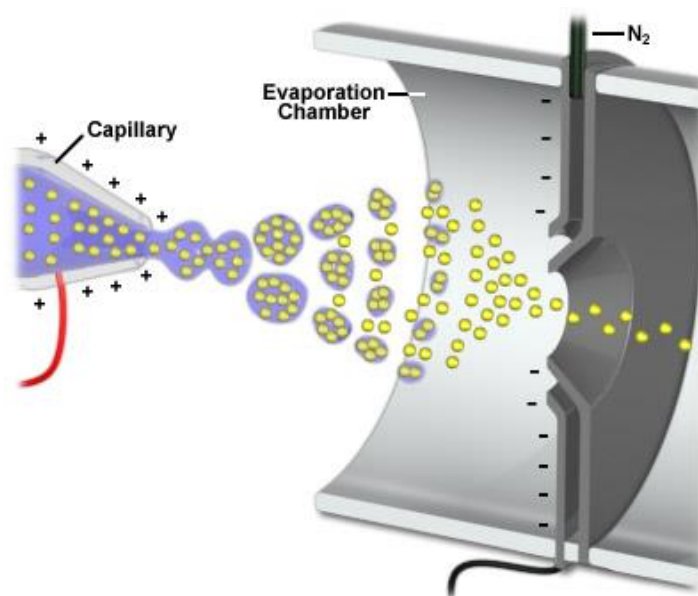


Fonte: Elaborada pelo autor

O equipamento utilizado neste trabalho é composto por um ionizador por eletrospray ou ESI, do inglês *Eletrospray Ionization*. Nesta etapa, toda a amostra vinda da coluna se encontra em solução no estado líquido. Então, esta solução é borrifada para dentro da câmara de ionização por um tubo capilar que possui um potencial de alta voltagem em sua superfície. A solução é então reduzida à gotículas que entram em contra fluxo com um gás de secagem inerte, sendo geralmente o nitrogênio. As gotículas são evaporadas e com o aumento

da densidade de carga em sua superfície, estas vão se dividindo gradativamente até se ter os íons livres inteiramente no estado gasoso, representados em amarelo na Figura 8. (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

Figura 8 - Representação de um ionizador por eletrospray (ESI).

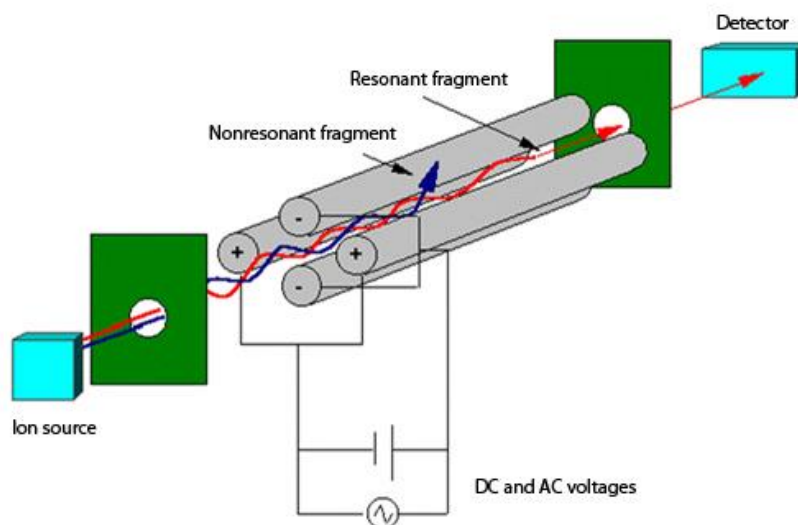


Fonte: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/esi> (2014)

Após serem evaporadas e ionizadas, as moléculas são aceleradas por um campo magnético até o analisador de massas, onde os íons serão separados de acordo com sua razão massa/carga. Neste trabalho foram utilizados dois tipos de analisadores em conjunto: o quadrupolar seguido do analisador por tempo de voo (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

O analisador quadrupolar, como o nome já sugere, se utiliza quadrupolo magnético formado por quatro barras paralelas. Entre elas são aplicadas uma radiofrequência e uma voltagem de corrente contínua. A razão entre a amplitude da radiação e a voltagem da corrente é controlada afim de que os íons sofram uma oscilação dentro do campo magnético. Íons com razão m/z fora da resolução (grande demais ou pequena demais) colidem com as barras e saem da trajetória, enquanto que os íons com massa dentro da faixa passam pelos eixos do quadrupolo em uma oscilação estável em direção ao analisador por tempo de voo, representados em azul e vermelho, respectivamente, na Figura 9. (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

Figura 9 - Representação de um analisador quadrupolar.



Fonte: <https://www.chromservis.eu/i/gc-ms-tof-description?lang=EN>

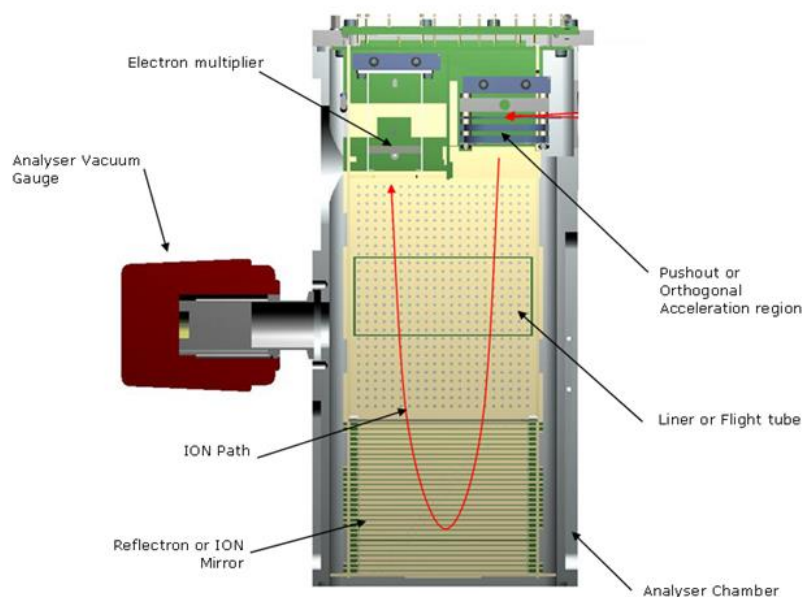
O sistema ToF (do inglês *Time of Flight*) detecta a presença dos íons de acordo com o tempo que lhe foi necessário para chegar no detector. A mesma quantidade de energia é aplicada em todos os compostos. Então, segundo a equação da energia cinética,

Equação 1 – Equação da energia cinética.

$$E_c = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

os íons de menor massa terão maior velocidade e os de maior massa terão menor velocidade. Desta forma, chegam no analisador em ordem crescente de massa, seguindo trajetória semelhante à da Figura 10. (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001)

Figura 10 - Representação de um analisador por tempo de voo.



Fonte: <https://www.chromservis.eu/i/gc-ms-tof-description?lang=EN>

Uma técnica sofisticada usada neste trabalho é a análise em modo *tandem* (MS^E). A técnica tem como princípio o uso de dois espectrômetros de massas dispostos em série. No primeiro canal o íon precursor é selecionado e então é levado a uma região onde são formados novos fragmentos. O segundo espectrômetro analisa esses fragmentos resultando o espectro MS/MS (KUKSIS; MYHER, 1995).

Utilizando-se de um banco de dados, como bibliotecas e coleções de moléculas, é possível realizar a identificação de compostos por análise de perfil espectrométrico. Da mesma forma, pode-se criar novas bibliotecas de dados MS/MS, permitindo a identificação de outras amostras pela interpretação de padrões de fragmentação, sem a necessidade de análises complementares (MATSUDA et al., 2009).

2.4 Extração

Em uma análise cromatográfica é necessário um pré-tratamento adequado da amostra. Isso por que a complexidade na matriz vegetal é muito grande, podendo conter proteínas incompatíveis com a coluna. Portanto, é indispensável para os fins deste trabalho a escolha de um método de extração que se tenha no final uma fração rica em compostos de interesse analítico com um tempo razoável de análise. Uma técnica clássica de extração de

compostos de uma dada matriz biológica é a extração líquido-líquido (ELL). Nela, ocorre a partição da amostra entre duas fases: aquosa e orgânica. A extração se baseia na afinidade do analito pelo solvente. Posteriormente, as frações são recolhidas usando-se um funil de separação ou pela centrifugação dos tubos de ensaio. Etapas subsequentes como a concentração ou secagem da amostra são realizadas dependendo do objetivo do trabalho (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

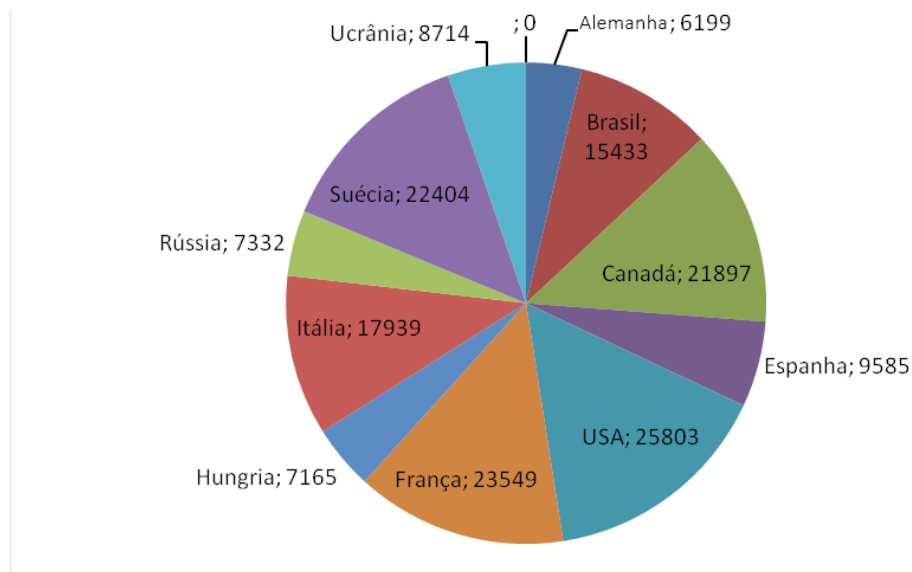
2.4 Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) e extratoteca

O germoplasma se define como o conjunto de todo o material hereditário de uma espécie. Um banco de germoplasma então, é uma forma de se armazenar toda a variabilidade genética de uma ou mais espécies. Este armazenamento pode ser feito na forma de sementes, *in vitro*, *in situ* ou como plantas em campo (FERREIRA, 2011).

Bancos *in vitro* tem como finalidade conservar o material em laboratório em condições que minimizem ao máximo o crescimento das amostras. Coleções denominadas “ativas” destes bancos são mantidas a curto e médio prazo afim de se avaliar, catalogar e realizar o intercâmbio destas com outras instituições (BESPALHOK FILHO; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

O uso de BAGs vem sendo dirigido no avanço de várias áreas de pesquisa, em especial na alimentação. Na última década, o Brasil se encontra entre os 10 países com maior número de bancos ativos de fruteiras, possuindo mais de 15 mil acessos distribuídos em diversas coleções, refletindo a grande biodiversidade do país, mostrado no gráfico da Figura 11. (FERREIRA, 2011).

Figura 11 - Distribuição de acessos nos 11 principais países que possuem bancos de germoplasma de fruteiras.



Fonte: (FERREIRA, 2011)

Neste contexto, busca-se novas formas de valorizar e diversificar todo este material que está sendo conservado. Uma destas formas é a identificação de metabólitos secundários que possuam atividade biológica nos BAGs, visando a aplicação na área farmacológica.

A utilização de técnicas de análise na investigação de marcadores químicos nos perfis metabólicos de plantas permite a criação de bibliotecas de extratos brutos. Estas bibliotecas tornam-se base no estudo de moléculas de interesse e de suas propriedades físicas e biológicas, além de possibilitar a realização de desreplicação. Contudo, hoje são conhecidos poucos casos do uso de biblioteca de extratos. No Brasil, a extratoteca do NuBBE, em Araraquara – SP (Torres, 2008), e a do grupo AsterBioChem em Ribeirão Preto – SP (Costa, 2012) merecem destaque. Visando o maior intercâmbio de conhecimento sobre as propriedades metabômicas de espécies manipuladas em laboratório, a construção de uma extratoteca vem como objetivo primordial deste trabalho.

2.5 *Spondias mombin*

Da família botânica Anacardiaceae, que compreende cerca de 600 espécies hoje conhecidas, 14 a 20 destas se encontram no gênero *Spondias* distribuídas mundialmente. Sete destas espécies se encontram nas américas, em grande peso em regiões tropicais como no nordeste brasileiro. Destacam-se neste gênero o umbu (*Spondias tuberosa*), a ciriguela (*Spondias purpurea*), a cajarana (*Spondias Dulcis*), o cajá (*Spondias mombin*), assim como algumas espécies consideradas híbridas naturais. (ARAUJO, 2014)

A espécie *Spondias mombin*, Figura 12, ocorre em diversas regiões do mundo, principalmente em países com florestas úmidas como o México, Peru, Brasil, alguns países da Ásia como Indonésia e Índia sendo também naturalizada na África. É uma planta tropical, comum em zonas áridas podendo ter porte de até cerca de 20 metros. Possui caule de aproximadamente 70 centímetros de diâmetro para uma planta adulta, ramificações longas e folhosas com cerca de 45 centímetros. Possui fruto aromático, de forma elíptica de aproximadamente 4 centímetros, amarelo dourado, dispostos em cachos de 12 unidades ou mais. Apresentam pequenas flores masculinas, femininas e bissexuais que também exalam fragrância característica (MORTON, 2004).

Figura 12 - Folhas e frutos da cajazeira (*Spondias mombin*).



Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spondias_mombin_\(Leaves_and_fruits\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spondias_mombin_(Leaves_and_fruits).jpg)

O fruto é conhecido no Brasil por vários nomes, dentre eles os mais comuns sendo cajá, acajá, acajaíba e taperebá. Possui um sabor ácido, polpa suculenta e refrescante tendo largo uso na produção de sucos, sorvetes e geleias. No Amazonas é usado na produção do “vinho de

taperebá”, enquanto no México se fazem conservas em vinagre e o fruto é geralmente apreciado com chili e sal (ARAUJO, 2014).

Além do fruto, a madeira da planta é usada na carpintaria e como lenha. Sua casca é rica em taninos, lhe conferindo uma coloração avermelhada característica. É usada como pigmento e na confecção de objetos de decoração (MORTON, 2004) .

Diversas atividades biológicas já foram observadas em extratos aquosos e etanólicos de folha de *S. mombin*. A primeira observada foi a ação antibacteriana (AJAO; SHONUKAN; FEMI-ONADEKO, 1985) e, desde então muitas outras propriedades medicinais foram estudadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividades biológicas estudadas previamente com extratos de partes do pé de cajá.

Atividade	Referência
Abortífera	(OFFIAH; ANYANWU, 1989)(OLOYE et al., 2013)
Antiviral	(CORTHOUT et al., 1991, 1992)
Antimicrobiana	(ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999) (ARAUJO DA SILVA et al., 2018)(AROMOLARAN; BADEJO, 2014) (ACCIOLY et al., 2012)
Anti-helmíntico	(ADEMOLA; FAGBEMI; IDOWU, 2005)
Anticonceptivo	(UCHENDU; ISEK, 2008)
Antidiabético	(ADEDIWURA; KIO, 2009)
Antibacteriana	(OLUGBUYIRO; MOODY; HAMANN, 2009) (CORTHOUT et al., 1994)
Gastroprotetora	(SABIU et al., 2016)
Anti-inflamatório	(CABRAL et al., 2016)
Antioxidante	(CABRAL et al., 2016)(ISHOLA; IKUOMOLA; ADEYEMI, 2017)
Sedativa	(AYOKA et al., 2006)
Ansiolítica	(AYOKA et al., 2008)
Inibidor de β -lactamase	(COATES et al., 1994)
Anti-diarreia	(AKUBUE; MITTAL; AGUWA, 1983)

Hipnótica	(AYOKA et al., 2006)
Fonte de vitamina C	(O.C., 1985)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos in vivo revelaram a capacidade abortífera de extratos de folhas de *Spondias mombin* em ratos. Suspeitava-se que a presença de saponinas poderia ser a causa deste efeito. (OFFIAH; ANYANWU, 1989) Mais tarde, comprovou-se que os esteroides presentes nas partes aéreas da planta são as responsáveis por alterar a concentração de hormônios importantes no período da gestação. (OLOYE et al., 2013)

No início da década de 90, Corthout e colaboradores conseguiram isolar e comprovar atividades antivirais de dois taninos hidrolisáveis (CORTHOUT et al., 1991) e logo depois de dois ésteres fenólicos, ambos extraídos de folhas e galhos de *Spondias mombin*. (CORTHOUT et al., 1992)

Das folhas de *S. mombin* também foi extraído um derivado do ácido anacárdico, inibidor da β -lactamase, enzima que confere resistência à bactérias na presença de antibióticos. (COATES et al., 1994)

Outros registros mostram a eficácia de extratos de folhas contra diversas bactérias (ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999), entre elas a causadora da leishmaniose (ACCIOLY et al., 2012) e da febre tifoide (AROMOLARAN; BADEJO, 2014).

Ayoka e colaboradores também verificaram propriedades importantes com relação ao efeito da planta no sistema nervoso central. Embora não se saiba ao certo o princípio ativo, as atividades sedativas foram melhor observadas em extratos etanólicos das folhas de *S. mombin*. (AYOKA et al., 2006)

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides e fenóis em extratos etanólicos das folhas da planta, além de minerais como potássio, magnésio, sódio, cálcio e fósforo. (NJOKU; AKUMEFULA, 2007) (IGWE et al., 2010) Ferro, zinco, manganês, cromo e cobre também foram posteriormente identificados em partes aéreas da planta (AYOOLA; ADEYEYE; ONAWUMI, 2010). A polpa, por sua vez, possui grandes concentrações de cobre e potássio, assim como compostos fenólicos e carotenoides, sendo a β -cryptoxantina em maior quantidade. (TIBURSKI et al., 2011)

Apesar de se ter nos dias de hoje uma boa noção dos tipos de metabólitos secundários encontrados no cajá, ainda não se tem na literatura um estudo mais aprofundado sobre a identificação química desses compostos. Dada a ampla variedade de atividades biológicas assim como o interesse farmacológico da espécie, pode-se afirmar que seu estudo metabolômico pode trazer avanços consideráveis na descoberta de novas moléculas bioativas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Iniciar a construção de uma biblioteca de extratos vegetais baseada em acessos de folhas e cascas de cajazeira provenientes de Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) da EMBRAPA.
- Traçar o perfil metabolômico de folhas de *Spondias mombin*.

3.2 Específicos

- Estabelecer um procedimento padrão de extração líquido-líquido aplicada à BAGs de folha e casca de cajá;
- Estabelecer um protocolo de armazenagem e rastreabilidade dos materiais vegetais, assim como todos os dados computacionais destinados a estudos *in silico* relacionados a eles;
- Realizar análise de extrato de folha de cajazeira por desreplicação utilizando sistema de cromatografia líquida de ultra performance acoplado a espectrometria de massas de alta resolução.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estabelecimento da extratoteca

4.1.1 Materiais

- Espátula;
- Vidrarias auxiliares: bécker, tubos de ensaio, erlenmeyer, pipeta de pasteur;
- Frascos de penicilina;
- Pipeta automática de 5000 μL com ponteiras;
- Seringa de vidro;
- Filtros PTFE com porosidade de 0,22 μm ;
- Hexano PA;
- Etanol PA;
- Água milli Q.

4.1.2 Equipamentos

- Moinho de facas;
- Balança analítica;
- Vórtex para agitação de tubos de ensaio;
- Banho ultrassom com potência fixa de 135 W;
- Sistema de centrifuga à vácuo (Speedvac);
- Tubos e caixas de armazenagem de extratos.

4.1.3 Reagentes

Os solventes utilizados em todo o procedimento foram oriundos da Vetec Quimica e Tedia High Purity Solvents. Em todos os métodos, a água de alta pureza utilizada foi produzida a partir do Milli-Q® Integral Purification System da Merck Millipore.

4.1.4 Obtenção e Tratamento das Amostras

As amostras de folha e casca do BAG de cajazeira provenientes da EMEPA foram recebidas e armazenadas antes de serem submetidas a qualquer procedimento de pré-tratamento. A relação de todo o material foi catalogada por meio de códigos a fim de facilitar sua identificação (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação das amostras do BAG de *Spondias mombin*.

Nome EMEPA	Descrição	Código	Código folha	Código casca
BAG Germoplasma 6.1	Clone 6.1	C61	C61F	C61C
BAG Germoplasma 11	Clone 11	C11	C11F	C11C
BAG Germoplasma 16.2	Clone 16.2	C162	C162F	C162C
BAG Germoplasma 17	Clone 17	C17	C17F	C17C
BAG Germoplasma 18	Clone 18	C18	C18F	C18C
BAG Germoplasma 25.2	Clone 25.2	C252	C252F	C252C
BAG Germoplasma 35	Clone 35	C35	C35F	C35C
Pé Franco 1.2	Progênie 1.2	P12	P12F	P12C
Pé Franco 1.3	Progênie 1.3	P13	P13F	P13C
Pé Franco 2.3	Progênie 2.3	P23	P23F	P23C
Pé Franco 5.3	Progênie 5.3	P53	P53F	P53C
Pé Franco 7.6	Progênie 7.6	P76	P76F	P76C
Pé Franco 8.2	Progênie 8.2	P82	P82F	P82C
Pé Franco 9.1	Progênie 9.1	P91	P91F	P91C
Pé Franco 10.2	Progênie 10.2	P102	P102F	P102C
Pé Franco 15	Progênie 15	P15	P15F	P15C
Pé Franco 24	Progênie 24	P24	P24F	P24C
Pé Franco 25.2	Progênie 25.2	P252	P252F	P252C
Pé Franco 29.3	Progênie 29.3	P293	P293F	P293C
Pé Franco 30	Progênie 30	P30	P30F	P30C
Pé Franco 34	Progênie 34	P34	P34F	P34C
Pé Franco 36	Progênie 36	P36	P36F	P36C

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todo o material foi levado ao moinho de facas até ser obtido um pó fino para posterior acondicionamento das massas em sacos plásticos. O armazenamento foi feito em ambiente seco em temperatura ambiente até o material ser submetido ao processo de extração. A massa obtida da pesagem das amostras é mostrada na tabela 3.

Tabela 3 – Massas pesadas após moagem das amostras.

BAGs de Folha	Massa (g)	BAGs de casca	Massa (g)
C61F	45,20	C61C	84,29
C11F	34,13	C11C	34,89
C162F	45,05	C162C	49,70
C17F	32,75	C17C	68,83
C18F	27,13	C18C	47,05
C252F	36,94	C252C	41,70
C35F	51,03	C35C	72,34
P12F	25,30	P12C	50,36
P13F	30,08	P13C	24,03
P23F	42,75	P23C	50,63
P53F	58,85	P53C	38,73
P76F	24,74	P76C	43,31
P82F	28,65	P82C	23,52
P91F	12,25	P91C	98,53
P102F	11,67	P102C	65,41
P15F	14,82	P15C	41,69
P24F	17,16	P24C	61,58
P252F	50,84	P252C	28,77
P293F	17,28	P293C	55,48
P30F	13,24	P30C	56,01
P34F	22,25	P34C	73,02
P36F	26,53	P36C	76,52

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.5 Validação do método de extração vegetal

Antes do início do procedimento de extração do BAG de cajazeira, procurou-se uma forma de potencializar a eficácia do método. Foi levada em consideração a quantidade de material vegetal usado, a fim de se obter o máximo de massa de extrato ao fim de todo o

processo. Pelo fato de se ter maior quantidade em massa, a amostra de casca P91C foi escolhida para o primeiro teste. Assim, 3 porções foram recolhidas, como mostra a Tabela 4:

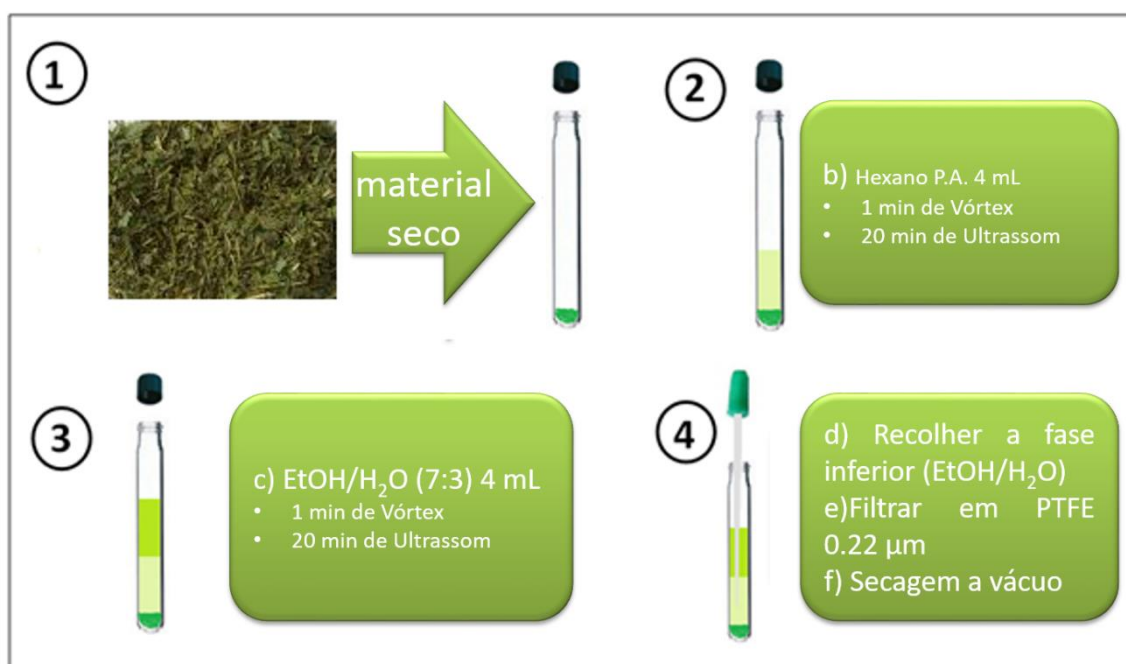
Tabela 4 – Massa pesada para primeira avaliação da quantidade de amostra a ser utilizada para validação do método de extração.

Tubo	Massa (g)
1	2,0002
2	1,0006
3	0,5002

Fonte: Elaborada pelo autor.

O vegetal após ser pesado foi submetido ao processo de micro-extração líquido-líquido em fase etanólica, como é esquematizado na Figura 13:

Figura 13 - Esquema de microextração do teste 1.



Fonte: Elaborada pelo autor

Pelo fato de se trabalhar com extratos de volume consideravelmente elevado, para os padrões das centrífugas do laboratório, não foi possível o uso da centrífuga para realizar a separação de fases. Notou-se, todavia, que a fase hexânica se separa com grande facilidade da fase polar, por ter grande quantidade de compostos solubilizados na mesma. Após 30 minutos

de decantação, a fase inferior (etanólica) de cada amostra foi colhida em frascos de vidro para posterior filtração.

Nesta etapa, o extrato do tubo 1 mostrou-se inviável devido ao excesso de partículas sólidas suspensas, dificultando muito o processo de filtração.

Usando filtros de PTFE com porosidade de 0,22 μm , a fase polar de cada tubo foi filtrada em 3 replicatas de 2 mL. Essas frações foram levadas ao secador rotativo à vácuo à 45 °C por aproximadamente 20 horas. As massas de extrato obtidas mostram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Massas de extrato obtidas do teste 1.

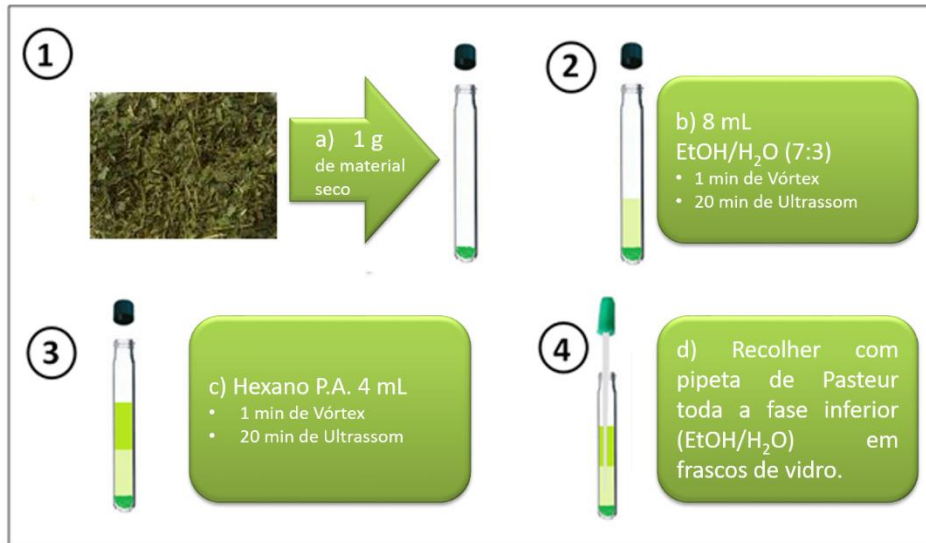
TUBO 1		TUBO 2		TUBO 3	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
I	125,4	I	40,8	I	22,9
II	111,6	II	52,1	II	24,1
III	69,3*	III	34,1	III	18,9

*Massa perdida por excesso de partículas sólidas em suspensão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

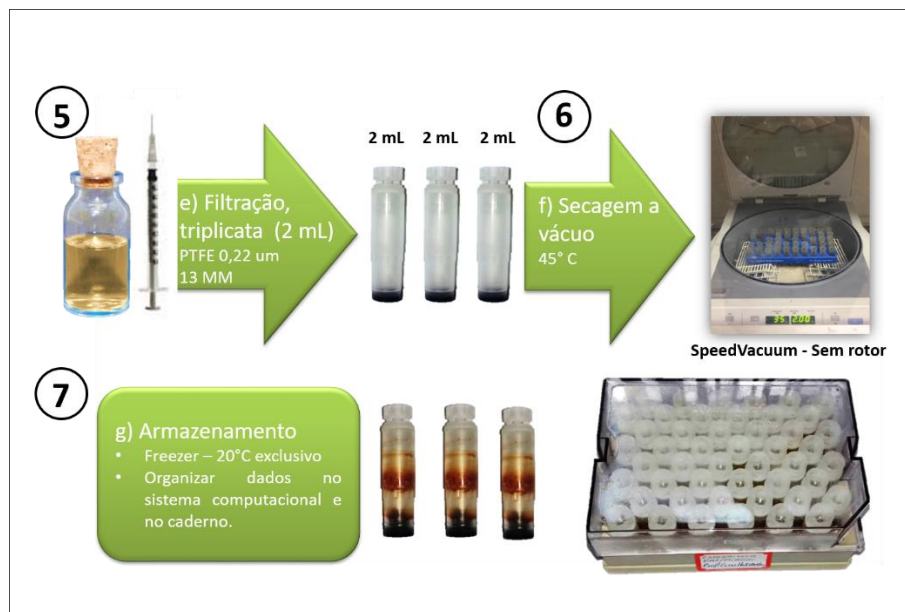
A partir dos resultados obtidos, nota-se a relação direta da quantidade de matéria usada no começo do processo para a massa de extrato obtida no final. A partir daí cogitou-se a possibilidade de aumentar o volume de solução etanólica a fim de se maximizar o ganho em massa de extrato. Além disso, para aprimorar a absorção de fenólicos e outros compostos polares, optou-se por inverter a sequência de etapas adicionando desta vez Etanol/H₂O primeiramente para posterior adição de hexano. O método do teste 2 é mostrado na figura 14.

Figura 14 (a) - Esquema de microextração do teste 2.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 (b) - Esquema de microextração do teste 2 (Continuação).



Fonte: Elaborada pelo autor

Desta vez, foram utilizadas duas amostras apenas:

- Tubo 4, com 1,0002 g de material vegetal.
- Tubo 5, com 0,5016 g de material vegetal.

Os extratos em fase polar foram colhidos, filtrados e secos da mesma forma do primeiro experimento. As massas obtidas compõem a Tabela 6.

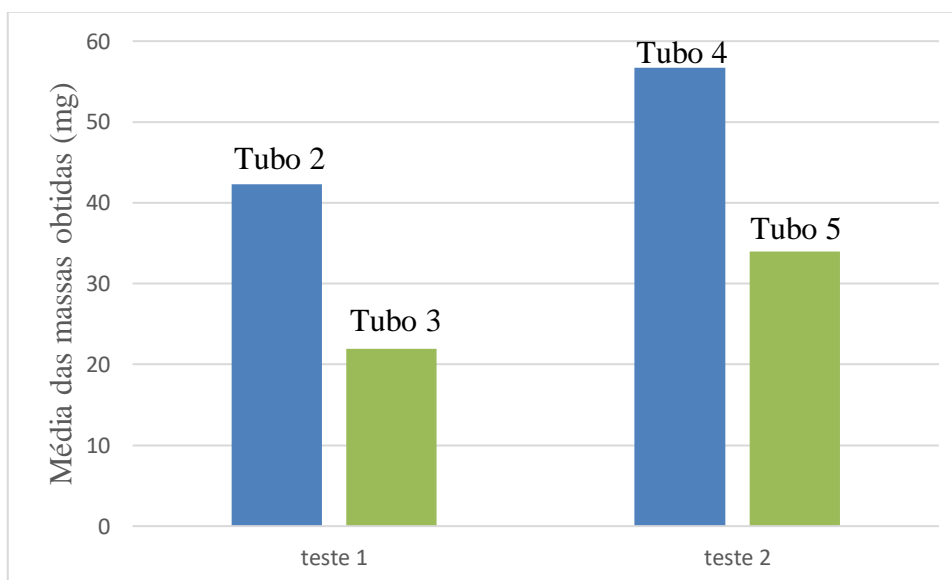
Tabela 6 – Massas de extrato obtidas do teste 2.

TUBO 4		TUBO 5	
Replicata	Massa (mg)	Replicata	Massa (mg)
I	66,5	I	35,6
II	68,3	II	35,5
III	35,4	III	30,8

Fonte: Elaborada pelo autor

A nível de comparação, pode-se fazer uso da média aritmética dos valores de massa obtidos nos dois testes (Figura 15). A partir destes dados, é nítido que o aumento de volume de solvente foi eficaz para a obtenção de maior quantidade em massa de extrato. Testes feitos com maior quantidade de matéria vegetal se mostraram eficazes para seus fins. Visando-se ter o máximo de material possível armazenado em extratoteca, o protocolo descrito para o teste 2 foi escolhido para o procedimento operacional padrão.

Figura 15 - Comparação do rendimento em massa dos testes 1 e 2.

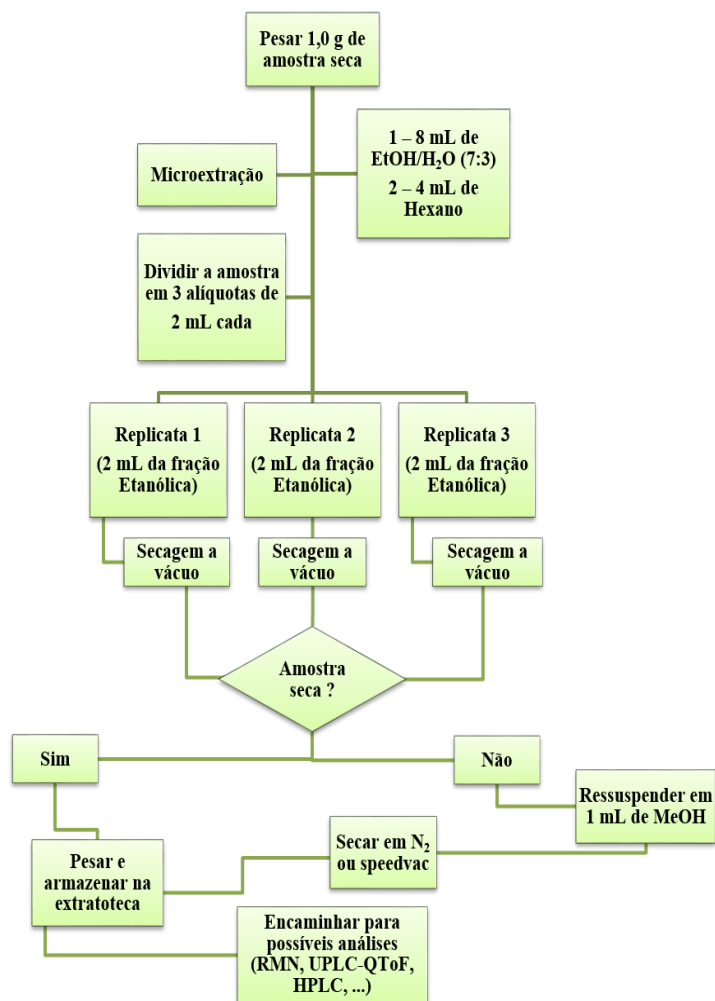


Fonte: Elaborada pelo autor

Uma vez que o método de extração foi aprimorado, possibilitando assim o preparo de amostras para análise em largas bateladas, pode-se aplicá-la no estudo com os BAGs de *Spondias mombin*. Amostras de cascas mostraram maior eficiência na etapa de secagem,

diferente de amostras de folhas. Após serem postas sob vácuo, os extratos provenientes de folhas de cajazeira precisaram ser resolubilizados em metanol e levadas mais uma vez ao aquecimento à vácuo. O procedimento operacional padrão desenvolvido é trazido no apêndice A. Um fluxograma completo de todo procedimento é mostrado na Figura 16.

Figura 16 - Fluxograma geral do procedimento operacional padrão para preparo de extratos provenientes de BAGs.



Fonte: Elaborada pelo autor

4.1.6 Tratamento de BAGs de *Spondias mombin*

Todas as amostras listadas na Tabela 7 passaram pelo procedimento operacional padronizado na etapa anterior.

Tabela 7 – Relação de todas as amostras de BAGs de cajá.

FOLHAS					CASCAS				
Código das amostras (Replicata)	QR Code	Massa (mg)	Quadrado do desvio	Rendimento (%)	Código das amostras (Replicata)	QR Code	Massa (mg)	Quadrado do desvio	Rendimento (%)
C61F(I)	NA0008758590	31,7	75,69	8,7	C61C(I)	NA0008758659	68,7	64	20,5
C61F(II)	NA0008758591	24,3	259,21		C61C(II)	NA0008758660	67,3	43,56	
C61F(III)	NA0008758592	31,6	77,44		C61C(III)	NA0008758661	68,6	62,41	
C11F (I)	NA0008758593	23,9	272,25	7,4	C11C(I)	NA0008758662	63,4	7,29	18,9
C11F(II)	NA0008758594	25,2	231,04		C11C(II)	NA0008758663	63,6	8,41	
C11F(III)	NA0008758595	25,5	222,01		C11C(III)	NA0008758664	62,2	2,25	
C162F(I)	NA0008758596	26,2	201,64	7,7	C162C(I)	NA0008758665	62,4	2,89	19,1
C162F(II)	NA0008758597	26,8	184,96		C162C(II)	NA0008758666	63,9	10,24	
C162F(III)	NA0008758598	24,7	246,49		C162C(III)	NA0008758667	64,3	12,96	
C17F(I)	NA0008758599	38,1	5,29	10,4	C17C(I)	NA0008758668	50,8	98,01	15,5
C17F(II)	NA0008758600	32,0	70,56		C17C(II)	NA0008758669	52,7	64	
C17F(III)	NA0008758601	34,3	37,21		C17C(III)	NA0008758670	51,5	84,64	
C18F(I)	NA0008758602	35,9	20,25	10,3	C18C(I)	NA0008758671	72,5	139,24	22,0
C18F(II)	NA0008758603	32,1	68,89		C18C(II)	NA0008758672	73,8	171,61	
C18F(III)	NA0008758604	35,3	26,01		C18C(III)	NA0008758673	73,9	174,24	

C252F(I)	NA0008758605	23,9	272,25	7,2	C252C(I)	NA0008758674	65,4	22,09	19,6
C252F(II)	NA0008758606	23,8	275,56		C252C(II)	NA0008758675	65,1	19,36	
C252F(III)	NA0008758607	24,5	252,81		C252C(III)	NA0008758676	65,1	19,36	
C35F(I)	NA0008758608	24,0	268,96	6,9	C35C(I)	NA0008758214	63,7	9	19,4
C35F(II)	NA0008758609	21,1	372,49		C35C(II)	NA0008758222	67,4	44,89	
C35F(III)	NA0008758610	24,1	265,69		C35C(III)	NA0008758199	63,1	5,76	
P12F(I)	NA0008758611	50,8	108,16	12,3	P12C(I)	NA0008758209	69,9	84,64	13,4
P12F(II)	NA0008758612	40,0	0,16		P12C(II)	NA0008758224	54,6	37,21	
P12F(III)	NA0008758613	32,6	60,84		P12C(III)	NA0008758648	9,2	2652,25	
P13F(I)	NA0008758614	54,6	201,64	15,7	P13C(I)	NA0008758365	54,4	39,69	16,1
P13F(II)	NA0008758615	46,9	42,25		P13C(II)	NA0008758366	52,2	72,25	
P13F(III)	NA0008758616	55,2	219,04		P13C(III)	NA0008758367	54,8	34,81	
P23F(I)	NA0008758617	27,6	163,84	8,2	P23C(I)	NA0008758368	63,5	7,84	19,1
P23F(II)	NA0008758618	27,8	158,76		P23C(II)	NA0008758369	64,3	12,96	
P23F(III)	NA0008758619	26,1	204,49		P23C(III)	NA0008758370	63,6	8,41	
P53F(I)	NA0008758620	51,2	116,64	15,6	P53C(I)	NA0008758371	77,2	272,25	23,5
P53F(II)	NA0008758621	52,2	139,24		P53C(II)	NA0008758372	79,9	368,64	
P53F(III)	NA0008758622	52,2	139,24		P53C(III)	NA0008758373	77,7	289	
P76F(I)	NA0008758623	60,9	420,25	19,8	P76C(I)	NA0008758374	64,7	16	19,2
P76F(II)	NA0008758624	66,2	665,64		P76C(II)	NA0008758375	65,0	18,49	
P76F(III)	NA0008758625	71,1	942,49		P76C(III)	NA0008758376	62,3	2,56	

P82F(I)	NA0008758626	48,2	60,84	14,0	P82C(I)	NA0008758377	64,1	11,56	19,5
P82F(II)	NA0008758627	52,6	148,84		P82C(II)	NA0008758378	64,0	10,89	
P82F(III)	NA0008758628	39,2	1,44		P82C(III)	NA0008758379	67,0	39,69	
P91F(I)	NA0008758629	46,2	33,64	13,7	P91C(I)	NA0008758380	76,9	262,44	23,5
P91F(II)	NA0008758630	43,1	7,29		P91C(II)	NA0008758381	79,9	368,64	
P91F(III)	NA0008758631	47,5	50,41		P91C(III)	NA0008758382	78,4	313,29	
P102F(I)	NA0008758632	71,0	936,36	17,2	P102C(I)	NA0008758383	67,0	39,69	19,9
P102F(II)	NA0008758633	77,2	1354,24		P102C(II)	NA0008758384	65,8	26,01	
P102F(III)	NA0008758634	23,6	282,24		P102C(III)	NA0008758385	66,3	31,36	
P15F(I)	NA0008758204	9,5	954,81	10,0	P15C(I)	NA0008758386	54,3	40,96	15,4
P15F(II)	NA0008758208	49,9	90,25		P15C(II)	NA0008758387	54,1	43,56	
P15F(III)	NA0008757637	41,0	0,36		P15C(III)	NA0008758388	45,2	240,25	
P24F(I)	NA0008758635	38,2	4,84	10,3	P24C(I)	NA0008758389	59,6	1,21	18,3
P24F(II)	NA0008758636	18,6	475,24		P24C(II)	NA0008758390	59,6	1,21	
P24F(III)	NA0008758637	46,4	36		P24C(III)	NA0008758391	63,5	7,84	
P252F(I)	NA0008758638	11,3	846,81	10,0	P252C(I)	NA0008758392	47,2	182,25	14,4
P252F(II)	NA0008758639	44,6	17,64		P252C(II)	NA0008758393	47,7	169	
P252F(III)	NA0008758640	44,8	19,36		P252C(III)	NA0008758394	48,8	141,61	
P293F(I)	NA0008758641	59,7	372,49	14,7	P293C(I)	NA0008758395	50,5	104,04	15,1
P293F(II)	NA0008758642	46,2	33,64		P293C(II)	NA0008758396	50,1	112,36	
P293F(III)	NA0008758643	41,3	0,81		P293C(III)	NA0008758397	50,7	100	

P30F(I)	NA0008758644	15,0	645,16	14,7	P30C(I)	NA0008758398	55,4	28,09	17,1
P30F(II)	NA0008758645	70,4	900		P30C(II)	NA0008758399	57,0	13,69	
P30F(III)	NA0008758646	61,2	432,64		P30C(III)	NA0008758400	58,3	5,76	
P34F(I)	NA0008758647	68,5	789,61	17,5	P34C(I)	NA0008758401	56,0	22,09	17,5
P34F(II)	NA0008758648	58,8	338,56		P34C(II)	NA0008758402	60,5	0,04	
P34F(III)	NA0008758649	48,0	57,76		P34C(III)	NA0008758403	58,0	7,29	
P36F(I)	NA0008758650	51,0	112,36	14,0	P36C(I)	NA0008758404	44,5	262,44	13,8
P36F(II)	NA0008758651	46,6	38,44		P36C(II)	NA0008758405	47,0	187,69	
P36F(III)	NA0008758652	42,5	4,41		P36C(III)	NA0008758406	46,2	210,25	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para compor a biblioteca de substâncias, foram utilizados os acessos descritos na Tabela 7. A quantidade a ser mantida na biblioteca de extratos foi a partir de 1 mg. Dados da literatura (WAGENAAR, 2008) indicam que a partir dessa quantidade já se tem massa suficiente para serem empregadas em avaliações químicas e biológicas. Quanto à extratoteca, as informações coletadas sobre os extratos sofreram uma triagem inicial, buscando-se através dos dados analíticos de tempo de retenção e massa molecular, e em comparação às substâncias isoladas, aqueles extratos com perfis bastante distintos entre si. Foram utilizados somente aqueles extratos que possuíam substâncias diferentes daquelas já estudadas e não ubíquas. Pretende-se manter a quantidade de 1-10 mg de cada extrato na biblioteca. As substâncias puras e os extratos serão armazenados em refrigerador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Com as massas pesadas para cada replicata, calculou-se a média aritmética de todos os valores obtidos para as folhas e para as cascas, obedecendo à equação 2.

Equação 2 – Cálculo da média aritmética das massas.

$$M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x$$

onde M é a média aritmética, N é o número de dados e x é o valor em mg das massas das replicatas.

Foi calculada uma média de 40,40 para as folhas e 60,70 para as cascas. Também foram obtidos os valores dos quadrados dos desvios, expostos na Tabela 7, com o objetivo de se calcular o desvio padrão através da equação 3.

Equação 3 – Cálculo do desvio padrão.

$$DP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x - M)^2}$$

Foi calculado um desvio padrão para as amostras de folha de 15,73 e para as amostras de casca de 10,99. Para se ter noção da homogeneidade dos dados tratados, pode-se fazer uso do coeficiente de variação utilizando para isso a equação 4.

Equação 4 – Cálculo do coeficiente de variação.

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100$$

Através da equação 4 foram calculados coeficientes de variação para as folhas e para as cascas de 38,93 e 18,10 respectivamente. A partir desses valores, pode-se dizer que foi feita uma extração com resultados mais homogêneos para as cascas. A etapa adicional de secagem pela qual os extratos de folhas tiveram que passar pode ser um motivo pela alta dispersão nos valores de massa pesados para essas amostras.

Os valores de rendimento para cada amostra de BAG foram calculados dividindo a soma das massas das triplicatas de cada amostra pela massa de material vegetal pesada inicialmente, como mostra a equação 5:

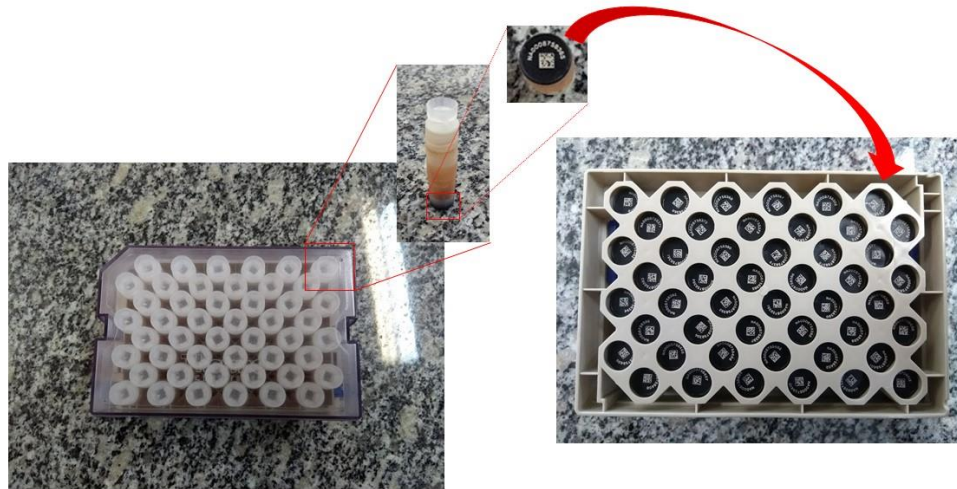
Equação 5 – Cálculo do rendimento em porcentagem das massas obtidas para os extratos de BAGs de cajá.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa obtida de extrato (mg)}}{\text{Massa vegetal inicial (mg)}} \times 100\%$$

O rendimento das extrações foram de 7 a 23% e, quanto às massas obtidas de extrato, foi obtido material em grande quantidade para a realização de análises químicas e biológicas.

Depois da etapa de secagem, todas os extratos foram armazenados em tubos contendo o código listado na Tabela 7, bem como um QR Code associado a ele, como mostra a Figura 17.

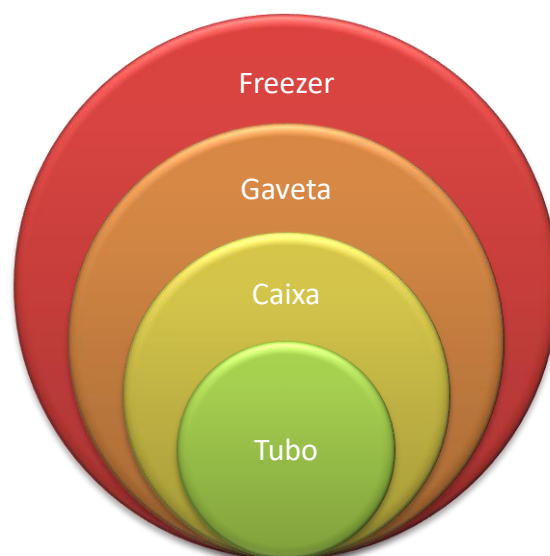
Figura 17 - Fotografia dos tubos organizados por QR-Codes, em caixa de armazenamento da extratoteca.



Fonte: elaborada pelo autor.

As caixas, também rotuladas, foram postas em gavetas dentro de refrigeradores. Desta forma, será rápido o acesso dessas amostras apenas seguindo uma ordem hierárquica de armazenagem mostrada na Figura 18.

Figura 18 - Organização de armazenamento de amostras na extratoteca.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Identificação química das folhas de cajazeira.

Juntamente com a coleção de bancos de germoplasma, objetiva-se com esse projeto a construção de um banco de dados. Através de uma plataforma digital, todos os resultados de análises são disponibilizados, para cada amostra cadastrada na extratoteca, em um software que está sendo desenvolvido pela Embrapa em conjunto com colaboradores (Apêndice C).

Deseja-se realizar a análise de um extrato em cada caixa para a criação de um modelo de identificação química que represente uma amostra de toda a coleção. Desta forma, um dos extratos armazenados de cajá foi coletado de forma aleatória para análise exploratória cromatográfica com espectrometria de massas.

4.3 Parâmetros de análise química das folhas de cajazeira.

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 μ m), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido formico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido formico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 μ l.

O modo ESI⁺ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extratoteca

Com as amostras de cajazeira, folhas e cascas, pode-se dar a primeira entrada de amostras provenientes de BAGs na extratoteca da Embrapa. O material se mostrou um excelente modelo para sua consolidação e uso contínuo para tal fim.

Todas as informações sobre os extratos foram catalogadas sob diferentes formas. Primeiramente, uma ficha de cadastro de amostras (Apêndice B), aplicada a extratos simples ou BAG, que é preenchida por seu responsável. Esta ficha de entrada deverá conter todas as informações sobre o local de origem, condições sob as quais foi feita a extração do material, e dados de armazenagem (Código do tubo, QR Code, caixa, gaveta, freezer...). Além disso, foi criado também um código de análise por equipamento (CAE) designado à cada procedimento de caracterização realizada para cada amostra. Essas fichas se encontram sob posse do pesquisador responsável pela extratoteca.

Para consulta dos mesmos dados presentes no material de entrada, cadernos de laboratórios exclusivos foram disponibilizados para todos os colaboradores da instituição.

Outra forma de acesso aos extratos é pela plataforma digital. Além dos dados listados nas fichas e caderno, dados computacionais como espectros e cromatogramas estarão salvos em computador através de softwares voltados ao estudo *in silico* do vegetal.

5.2 Identificação química das folhas de cajazeira.

Para o estabelecimento de um modelo de armazenamento de dados cromatográficos e espectrométricos relacionado a cada amostra contida na extratoteca utilizou-se uma amostra de cajazeira como exemplo. O cromatograma obtido da análise da amostra de folha de cajazeira é mostrado abaixo, seguido da tabela de identificação de seu perfil químico.

Com a técnica de UPLC, foi possível obter resultados com corridas rápidas sem a necessidade de grande quantidade de amostra. A ionização por eletrospray assim como os analisadores quadrupolar e por tempo de voo juntamente com a detecção de alta resolução auxiliaram na aquisição de dados, mostrando espectros claros e fragmentos de massas com até quatro casas decimais. Este nível de exatidão serve como diferencial para a identificação correta de compostos presentes na mistura.

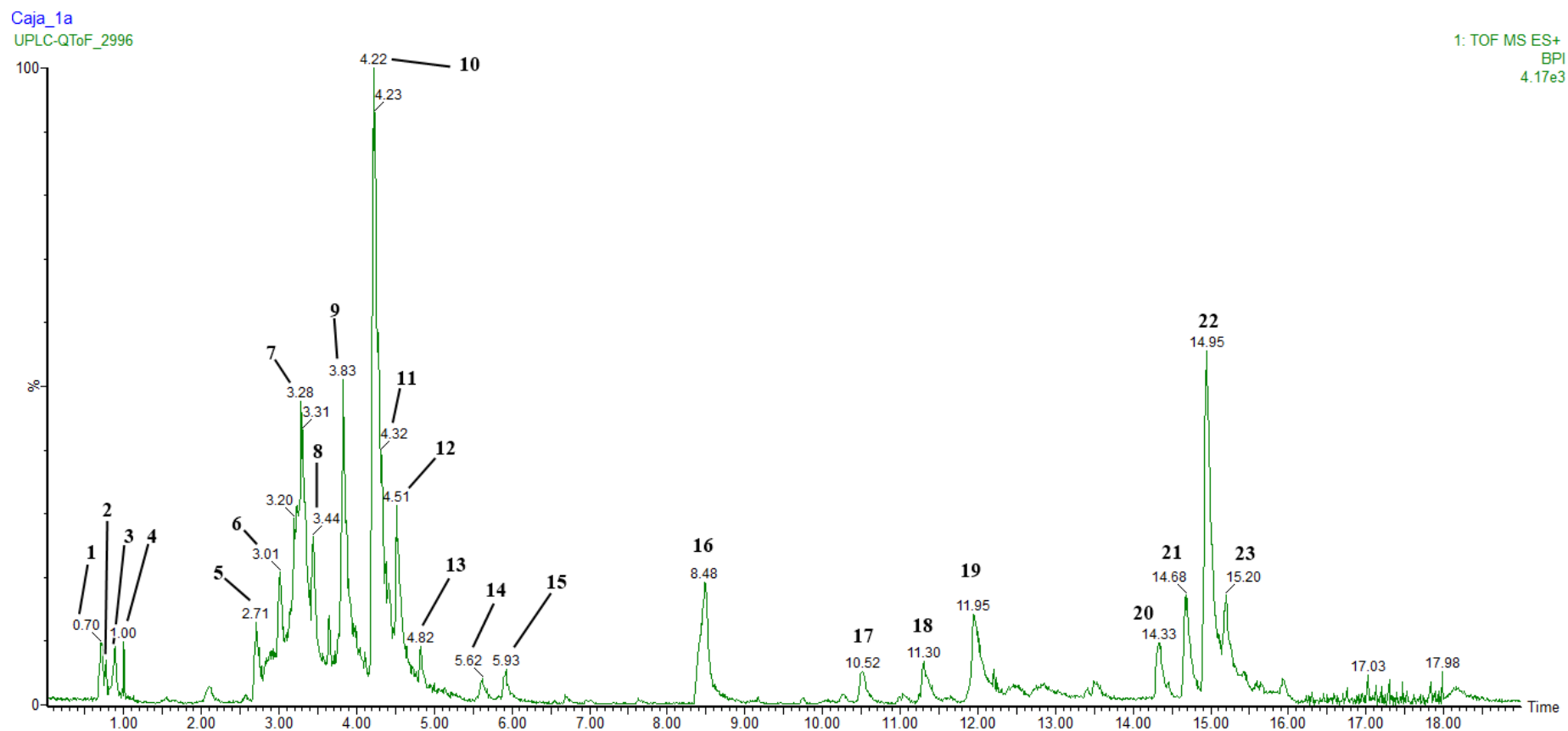
O software usado para o tratamento de dados foi o Masslynx (Waters Corporation) onde foram calculadas as fórmulas moleculares através da equação 6.

Equação 6 – Cálculo do erro em ppm das fórmulas moleculares obtidas pelo software MassLynx.

$$Erro (ppm) = \frac{(\text{massa observada} - \text{massa calculada})}{\text{massa observada}} \times 10^6$$

A identificação dos compostos foi feita baseada na comparação de padrões espectrométricos já abordados na literatura referente à espécie, gênero *Spondias* e família botânica Anacardiaceae. Também foram utilizados bancos de dados onde poderiam ser encontrados metabólitos já caracterizados. Tais bibliotecas estão disponíveis *online*, como a do Knapsack, Pubchem e Chempider. Todos os erros considerados apresentam valores inferiores a 5 ppm.

O cromatograma é mostrado a seguir na Figura 20, os dados de identificação química são trazidos na Tabela 8 e os espectros de massa para cada composto identificado se encontram no Apêndice D.

Figura 19 - Cromatograma da análise de extrato de folha de BAG de cajazeira (*Spondias mombin*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 – Tentativa de identificação química dos compostos presentes no extrato de BAG de folhas de *Spondias mombin*.

N° pico	t _r min	[M+H] ⁺ Observado	[M+H] ⁺ Calculado	Íons Fragmentos (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Tentativa de identificação	Referências
1	0,70	198.9403	-	138.9719, 110.0081	-	-	Não identificado	-
2	0,76	320.8691	-	182.9602, 122.9236	-	-	Não identificado	-
3	0,89	365.1028	-	163.0598	-	-	Não identificado	-
4	1,0	332.1289	-	-	-	-	Não identificado	-
5	2,71	579.1501	579.1503	427.0952, 409.0879, 291.0891, 205.0983, 188.0683, 146.0589, 118.0640	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂	-0.3	Dímero de catequina	(DOU et al., 2007) (CHAVES et al., 2010)
6	3,01	355.1025	355.1029	181.0555, 163.0371, 135.0425, 117.0329	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-1.1	Ácido clorogênico (Ácido cafeoilquínico)	(ENGELS et al., 2012)
7	3,28	783.0680	783.0681	303.0103; 277.0340; 221.0087; 163.0397	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	-0.1	Punicalina	(SEERAM et al., 2005)(ZHOU; LV; YUAN, 2010)
8	3,44	941.0954		783.0631; 303.0121; 277.0320;	C ₄₀ H ₂₈ O ₂₇	1.7	Derivado do ácido elágico	
9	3.83	785.0812	785.0837	303.0276, 483.0826, 277.0328	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	-3.2	Di-HHDP-glicose	(FRACASSE TTI et al., 2013) (SALMINEN et al., 1999)

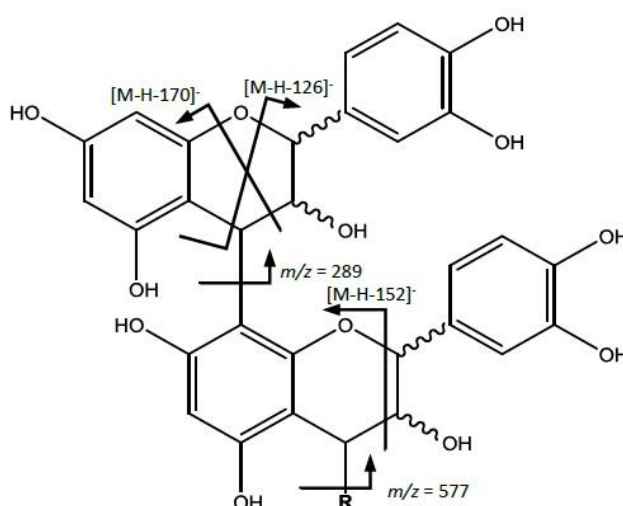
10, 11	4,22	465.1042	465.1033	303.0488, 229.0495, 181.0664	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	1.9	Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside	(ERŞAN et al., 2016)
12	4,51	435.0927	435.0927	303.0466, 287.0519, 229.0495	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	0	Quercetina 3- <i>O</i> -arabino- furanosídeo	(DE BRITO et al., 2007)
13	4,82	303.0502	303.0505	285.0417, 257.0420, 229.0504, 153.0167	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-1.0	Quercetina	(ABU-REIDAH et al., 2015)
14	5,62	449.0861	449.0873	303.0422, 297.0367	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	-2.7	Quercetina deoxihexosídeo (isômero)	(ENGELS et al., 2012)
15	5,93	449.0834	449.0873	303.0480, 287.0550	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	-1.6	Quercetina deoxihexosídeo (isômero)	(ENGELS et al., 2012)
16	8,48	274.2734		256.2635	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	-4.4	Não identificado	-
17	10,52	518.3267		316.3228, 184.0727			Não identificado	-
18	11,30	520.3419	520.3427	457.2773, 337.2744, 184.0727, 104.1069, 502.3248	C ₃₃ H ₄₅ NO ₄	-1.5	Sespendole	(ABU-REIDAH et al., 2015)
19	11,95	496.3395	-	313.2752, 184.0713	-	-	Não identificado	-
20	14,33	609.2722	609.2700	184.0720, 133.0847, 89.0585	C ₃₄ H ₄₀ O ₁₀	3.6	-	-
21	14,68	609.2721	609.2700	184.0722, 133.0850, 89.0585	C ₃₄ H ₄₀ O ₁₀	3.4	-	-
22	14,95	593.2751	593.2751	184.0736, 133.0849, 89.0585	C ₃₄ H ₄₀ O ₉	0,0	-	-
23	15,20	593.2754	593.2751	184.0720, 133.0849, 89.0585	C ₃₄ H ₄₀ O ₉	0,5	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os picos 1 a 4 não foram identificados pois o software não conseguiu calcular uma fórmula molecular com faixa de erro aceitável e condizente com os valores de massa observados.

No pico 5, no tempo de retenção 2,71 minutos, é observado $[M+H]^+$ 579.1501. Encontrou-se a fórmula molecular $C_{30}H_{27}O_{12}$ com erro de -0,3 ppm semelhante àquela do dímero de catequina ou de um possível enantiômero, a epicatequina. Estudos anteriores já identificaram compostos deste tipo na *Anacardium occidentale*, espécie da mesma família: Anacardiaceae (CHAVES et al., 2010). Condizentes com dados reportados por (DOU et al., 2007), fragmentos característicos em m/z 427.0952, 409.0879 e 291.0891 mostrados na Figura 20 foram observados neste pico.

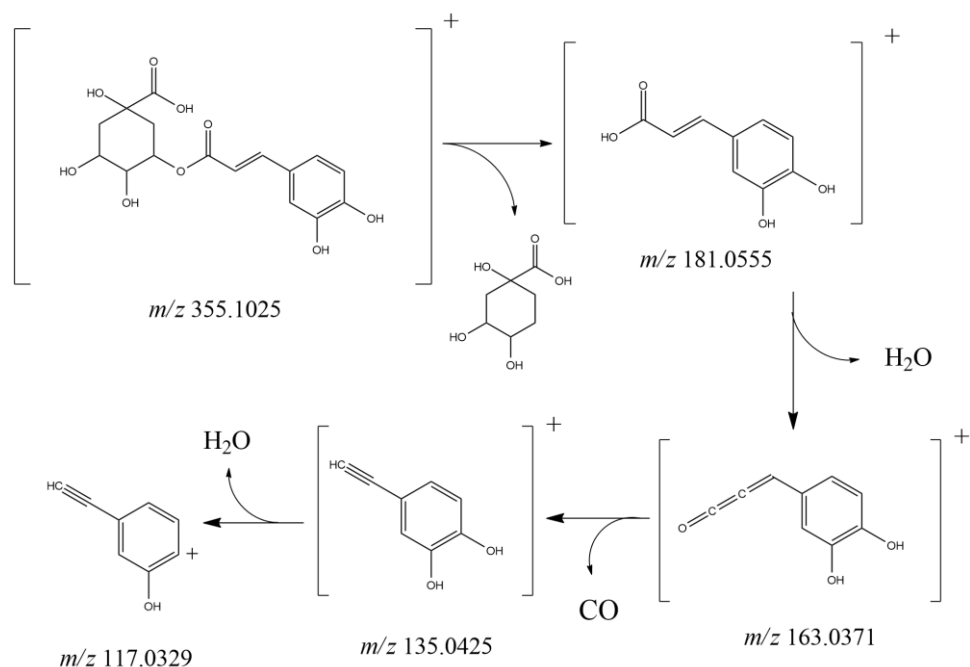
Figura 20 - Fragmentação do dímero de catequina.



Fonte: (NAVARRO et al., 2018).

No pico 6, tempo de retenção 3,01 minutos, observou-se valores de massa condizentes com o ácido clorogênico anteriormente identificado na família Anacardiaceae (ENGELS et al., 2012). Foi calculada com erro de -1,1 ppm a fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$ possuindo $[M+H]^+$ 355.1025 e fragmentos em m/z 181.0555, 163.0371, 135.0425 e 117.0329 que confirmam o padrão reportado na literatura mostrado na rota da Figura 21.

Figura 21 - Fragmentação do ácido clorogênico.

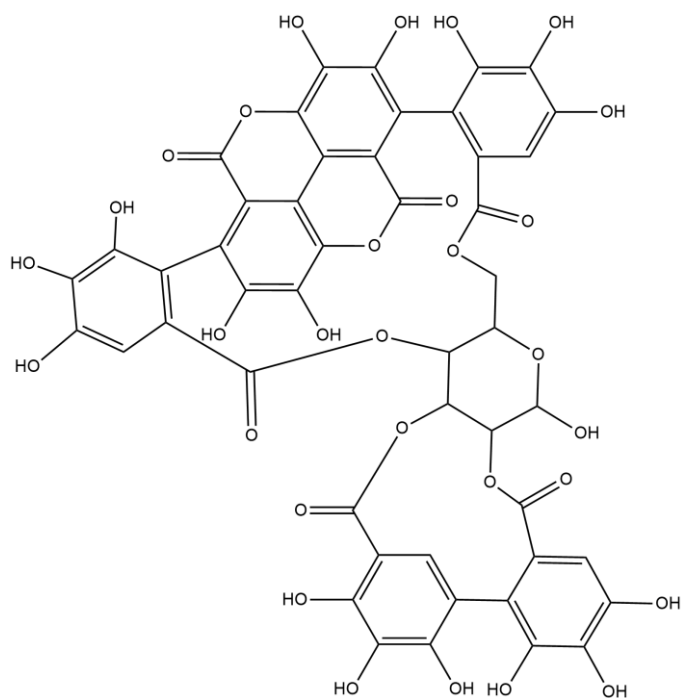


Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (WILLEMS et al., 2016).

No pico 7 (3,28 min) foi observado sinal $[M+H]^+$ 783.0680. Foi calculada a fórmula molecular $C_{34}H_{22}O_{22}$ com erro de -0,1 ppm. Pela presença do fragmento em m/z 303.0103 que se refere ao ácido elágico, uma identificação cabível é a punicalina, um elagitanino encontrado na *Punica granatum* (SEERAM et al., 2005). A estrutura química da punicalina é mostrada na Figura 22.

O pico 8 também apresenta fragmento relativo ao ácido elágico (m/z 303.0121), contudo não foi identificado para este pico nenhuma molécula já caracterizada na literatura. O software Masslynx conseguiu calcular para o pico 8 a fórmula molecular $C_{40}H_{28}O_{27}$ com erro de 1.7 ppm.

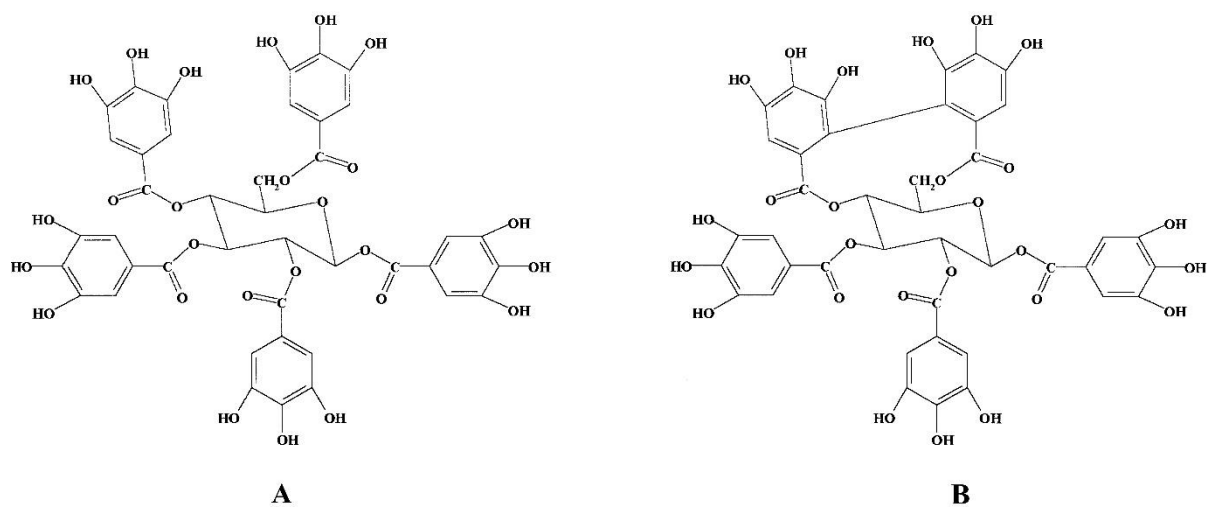
Figura 22 - Estrutura da punicalina.



Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (SEERAM et al., 2005).

No pico 9, em tempo de retenção 3,83 min, foi identificada a di-HHDP-glicose, possuindo a fórmula $C_{34}H_{24}O_{22}$ calculada com erro de -3,2 ppm. Este tipo de elagitanino é resultante de ligações C-C oxidativas entre moléculas de ácido gálico para a formação de unidades HHDP (Hexahidroxidifenil) como mostra a Figura 23 (SALMINEN et al., 1999).

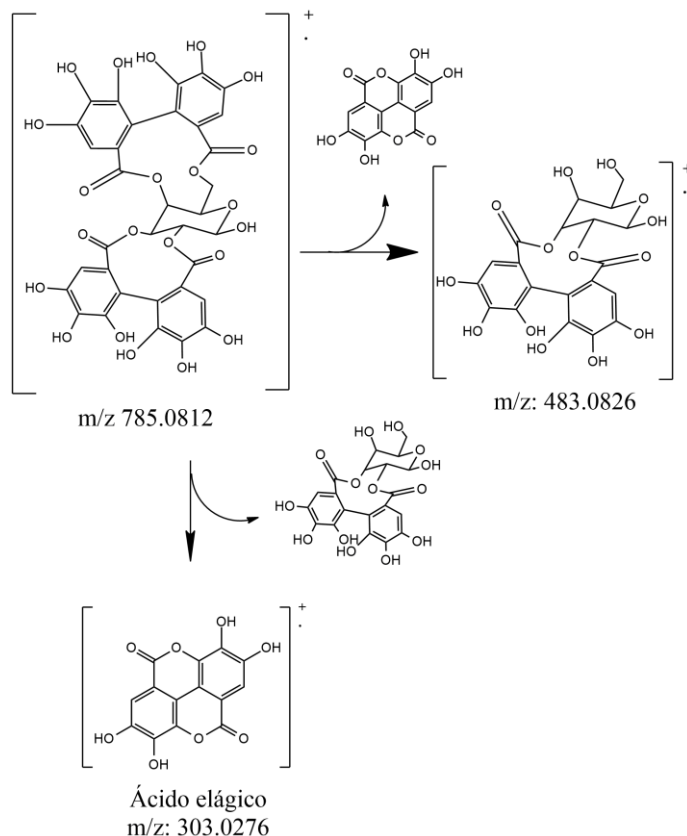
Figura 23 - Estrutura de um galotanino (A) para a formação de uma unidade HHDP na molécula de trigaloil-HHDP-glucopiranoose (B).



Fonte: (SALMINEN et al., 1999)

No composto identificado encontram-se dois grupamentos HHDP ligados à glicose. Com $[M+H]^+$ 785.0812 e fragmentos em m/z 483.0826 ($[M+H]^+ - \text{HHDP}$), e m/z 303.0276 (ácido elágico) mostrados na Figura 24.

Figura 24 - Rota de fragmentação do di-HHDP-glicose.

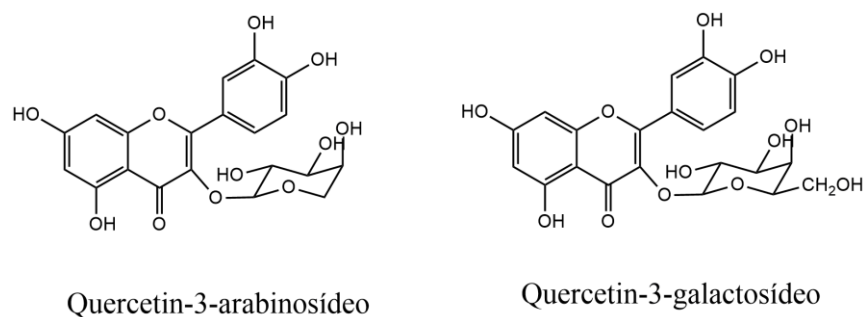


Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (SALMINEN et al., 1999) e (SOUSA et al., 2016).

O composto em questão apresenta grande semelhança com aqueles isolados por (CORTHOOUT et al., 1991), onde é comprovada atividade antiviral contra os vírus *Coxsackie* e *Herpes simplex*.

No estudo de identificação química de *Spondias mombin* foi observada uma grande variedade de metabólitos fenólicos derivados da quercetina. De fato, muitas vezes este composto é encontrado como agliconas, ou seja, ligado a monossacarídeos e outras unidades de açúcar. Tem-se como exemplos, um arabinosídeo e um galactosídeo de quercetina na Figura 25.

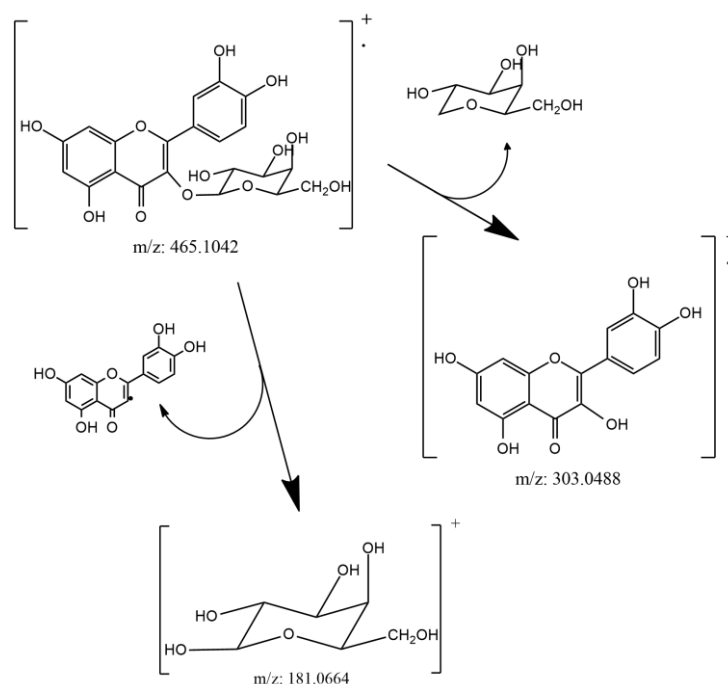
Figura 25 - Exemplos de glicosídeos de quercetina.



Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (CHEN; ZUO, 2007).

No pico mais intenso do cromatograma, em tempo de retenção 4,22 min, foi identificado o 3-*O*-Quercetina-galactosídeo $[M+H]^+$ 465.1042 (ERŞAN et al., 2016), com fórmula $C_{21}H_{20}O_{12}$ com erro de 1,9 ppm. Trata-se de um flavonoide, evidenciado pelo pico característico em m/z 303.0488 relativo à quercetina. Também foi observado fragmento em m/z 181.0664 relativo ao glicosídeo ligado à ela, pode-se verificar na Figura 26 a proposta de fragmentação em fase gasosa da 3-*O*-Quercetina-galactosídeo, baseada no trabalho de (ERŞAN et al., 2016).

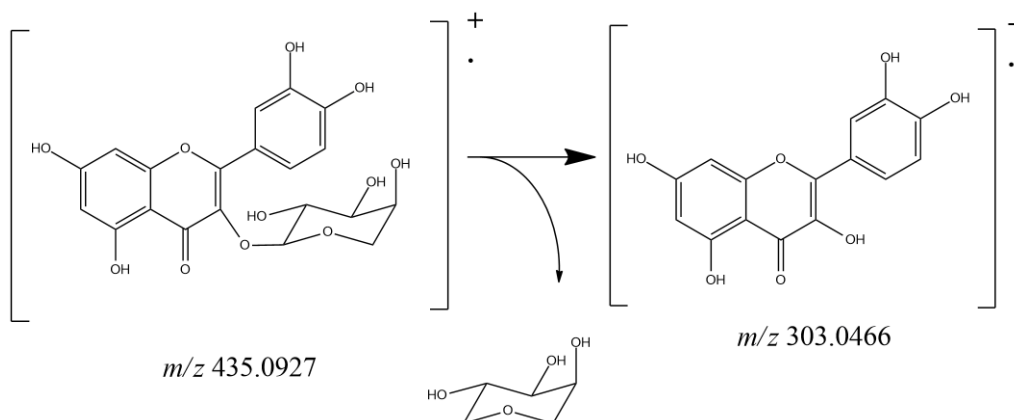
Figura 26 - Fragmentação do 3-*O*-Quercetina-galactosídeo.



Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (ERŞAN et al., 2016).

No pico de número 12, em 4,51 min, identificou-se um arabinosídeo de quercetina. Com erro de 0 ppm, a fórmula obtida foi $C_{20}H_{18}O_{11}$. Possui $[M+H]^+$ 435.0927 e $[M+H-132]^+$ pela perda da unidade do glicosídeo. Mais uma vez observa-se o fragmento diagnóstico de m/z 303.0466 referente à quercetina protonada na Figura 27. (DE BRITO et al., 2007)

Figura 27 - Fragmentação do arabinosídeo de quercetina.

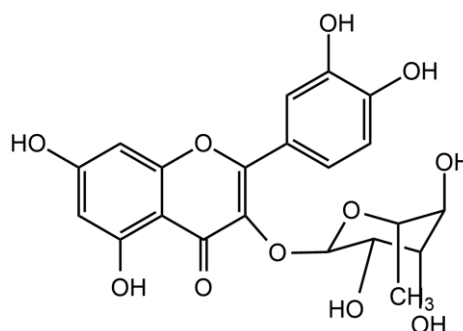


Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (DE BRITO et al., 2007).

No pico 13 é identificada a forma não glicosilada da quercetina com $[M+H]^+$ 303.0502, previamente já reportada na literatura. (ABU-REIDAH et al., 2015) A fórmula $C_{15}H_{10}O_7$ foi calculada com erro de -1,0 ppm. Fragmentos em m/z 285.0417 referente à perda da hidroxila, m/z 229.0495, 257.0420 e 153.0167 confirmam o padrão de fragmentação descrito por (SCIGELOVA et al., 2011).

Os picos 14 e 15 foram identificados como isômeros derivados da quercetina, descrito por (ENGELS et al., 2012) como quercetina deoxihexosídeo. Segundo autora e colaboradores, trata-se de um derivado da quercitrina, aglicona ligada a uma unidade de ramnose, mostrada na Figura 28. Foi calculada com erro de -2,7 e -1,6 ppm, respectivamente, a fórmula $C_{24}H_{16}O_9$.

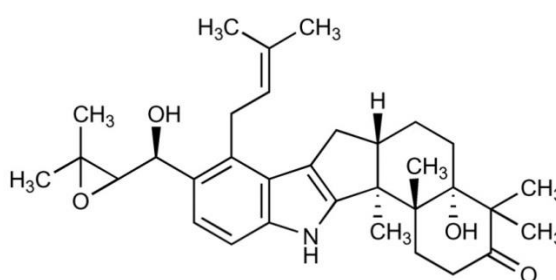
Figura 28 - Estrutura química da quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercitrina).



Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em (VECHIA et al., 2016).

No pico 18 foram observados fragmentos semelhantes aos que foram identificados em estudo metabolômico de *Rhus coriaria* por Abu-Reidah e colaboradores (ABU-REIDAH et al., 2015) com estrutura exposta na Figura 29. A molécula denominada sespendole possui fórmula molecular $C_{33}H_{45}NO_4$ calculada com erro de -1,5 ppm. Este composto atrai atenção por possuir estrutura de um indolossesquiterpeno, ou seja, metabólito derivado de hidrocarbonetos possuindo uma unidade heterocíclica nitrogenada aromática (UCHIDA et al., 2006a). No espectro de massas mostrado no Apêndice D é possível observar $[M+H]^+$ 520.3419, com fragmentos em m/z 502.3248 referente à perda de H_2O , picos mais intensos observados no MS^2 em m/z 184.0727 e 104.106, valores que coincidem aos descritos na literatura.

Figura 29 - Estrutura do sespendole.



Fonte: (UCHIDA et al., 2006a).

A elucidação deste composto é de interesse científico, pois moléculas desta classe, incluindo o sespendole, foram estudadas por (UCHIDA et al., 2006b) e (OHSHIRO et al., 2007) revelando atividade antimicrobiana.

Os picos 20 e 21 apresentam ambos o íon molecular $[M+H]^+$ 609.2722 com fragmentos em 184.0720, 133.0850 e 89.0585. Como apresentam perfis espectrométrico muito semelhantes, acredita-se que se trate de dois isômeros de um composto. A tentativa de identificação do software Masslynx calculou com um média de erro 3,5 ppm a fórmula molecular $C_{34}H_{40}O_{10}$.

De forma semelhante, os picos 22 e 23 também apresentam o mesmo comportamento, observando-se para esses picos $[M+H]^+$ 593.2754 com fragmentos em 184.0720, 133.0850 e 89.0585. O software Masslynx para esses picos calcula, com erro médio de 0,5 ppm, a fórmula molecular $C_{34}H_{40}O_9$.

6 CONCLUSÃO

O projeto da extratoteca da Embrapa foi iniciado com sucesso, tendo como resultado deste trabalho uma metodologia de extração e preparo de amostras onde pesquisadores deverão seguir o procedimento operacional padrão descrito no apêndice A.

Iniciou-se o armazenamento de extratos, tendo-se em vista a rastreabilidade de todas as replicatas pelo uso de QR-Codes atrelados a cada uma.

Foi desenvolvido um sistema de cadastro de amostras tanto em cadernos, como em fichas (apêndice B) onde todos os dados referentes aos extratos estarão a total disposição para todos os colaboradores do laboratório.

A identificação química da amostra de BAG de cajá foi realizada, revelando em sua maioria a presença de compostos fenólicos derivados da quercetina, taninos além de outros metabólitos que possuem atividades biológicas de interesse, motivando a realização de testes microbiológicos com estes extratos.

Como perspectivas futuras, pretende-se dar continuidade ao crescimento da extratoteca, e da plataforma digital (Apêndice C). Nessa plataforma, uma biblioteca de

moléculas já identificadas estará disponível e relacionada com a espécie na qual foi encontrada além de resultados de análises elucidativas que também poderão ser acessados, auxiliando suas possíveis aplicações.

7 REFERÊNCIAS

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 6, p. 494–497, 1999.

ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179–191, 2015.

ACCIOLY, M. P. et al. Leishmanicidal activity in vitro of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1–2, p. 79–84, 2012.

ADEDIWURA, F. J.; KIO, A. Antidiabetic activity of *spondias mombin* extract in niddm rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 3, p. 215–218, 2009.

ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: Studies in vitro and in vivo. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 3, p. 223–235, 2005.

AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial effect of aqueous and alcohol extracts of *spondias mombin*, and *alchornea cordifolia* - two local antimicrobial remedies. **Pharmaceutical Biology**, v. 23, n. 2, p. 67–72, 1985.

AKUBUE, P. I.; MITTAL, G. C.; AGUWA, C. N. Preliminary pharmacological study of some Nigerian medicinal plants. 1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 53–63, 1983.

ARAUJO, G. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos , composição química e potencial farmacológico. n. March 2015, 2014.

ARAUJO DA SILVA, G. et al. **AVALIAÇÃO DA LETALIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Spondias mombin* aff. *tuberosa***. [s.l: s.n.].

AROMOLARAN, O.; BADEJO, O. K. Efficacy of fresh leaf extracts of *Spondias mombin*

against some clinical bacterial isolates from typhoid patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 6, p. 442–446, 2014.

AYOKA, A. O. et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 166–175, 2006.

AYOKA, A. O. et al. Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. v. 11, p. 129–136, 2008.

AYOOLA, P. B.; ADEYEYE, A.; ONAWUMI, O. O. Trace elements and major minerals evaluation of *Spondias mombin*, *Vernonia amygdalina* and *Momordica charantia* leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 755–758, 2010.

BESPALHOK FILHO, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. A. Uso e conservação de germoplasma. **Uso E Conservação De Germoplasma**, p. 21–28, 2007.

CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 3, p. 304–311, 2016.

CHAGAS-PAULA, A. D.; OLIVEIRA, TIAGO BRANQUINHO, ZHANG, TONG, EDRADA-EBEL, R.; COSTA, F. B. DA. Prediction of Anti-inflammatory Plants and Discovery of Their Biomarkers by Machine Learning Algorithms and Metabolomic Studies. **Planta Medica**, v. 81, n. 6, p. 450–458, 2015.

CHAVES, M. H. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 106–112, 2010.

CHEN, H.; ZUO, Y. Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1357–1364, 2007.

COATES, N. J. et al. SB-202742, a novel β -lactamase inhibitor isolated from *spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 654–657, 1994.

CORTHOUT, J. et al. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129–1130, 1991.

CORTHOUT, J. et al. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v.

31, n. 6, p. 1979–1981, 1992.

CORTHOUT, J. et al. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n. 5, p. 460–463, 1994.

Costa, F. B. (2012). *Home*. Fonte: AsterBioChem: <http://www.asterbiochem.org/>

DE BRITO, E. S. et al. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112–1118, 2007.

DIAS, H.; ENDRINGER, D. Identification of Polyphenols : Sequence for Teaching High School Artigo Identificação de Polifenóis : Sequência Pedagógica para o Ensino Médio Identification of Polyphenols : Sequence for Teaching High School Chemistry. n. January, 2014.

DOU, J. et al. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7462–7468, 2007.

ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557–562, 2012.

ERŞAN, S. et al. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* l.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 26, p. 5334–5344, 2016.

FERREIRA, F. R. Germplasm of fruit crops. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 1–6, 2011.

FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 578–588, 2013.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

IGWE, C. U. et al. Evaluation of the chemical compositions of the leaf of *Spondias mombin* L.

from Nigeria. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 706–710, 2010.

ISHOLA, I. O.; IKUOMOLA, B. O.; ADEYEMI, O. O. Protective role of *Spondias mombin* leaf and *Cola acuminata* seed extracts against scopolamine-induced cognitive dysfunction. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 27–39, 2017.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2018.

KUKSIS, A.; MYHER, J. J. **Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995.

LAST, R. L.; JONES, A. D.; SHACHAR-HILL, Y. **Towards the plant metabolome and beyond** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007.

MATSUDA, F. et al. MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. **Plant Journal**, v. 57, n. 3, p. 555–577, 2009.

MONTEIRO, J. M. et al. **Taninos: Uma abordagem da química à ecologia** *Quimica Nova*, 2005.

MORTON, J. F. **Fruits of Warm Climates**. [s.l: s.n.].

NAVARRO, M. et al. Polyphenolic Characterization and Antioxidant Activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* Cultivars from Costa Rica. **Foods**, v. 7, n. 2, p. 15, 2018.

NEHME, C. J. et al. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 8, p. 602–611, ago. 2008.

NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. Phytochemical and nutrient evaluation of *Spondias Mombin* leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 613–615, 2007.

O.C., K. **The Unconventional sources of ascorbic acid in the tropics** *Nutrition reports international*, 1985.

OFFIAH, V. N.; ANYANWU, I. I. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 317–320, 1989.

OHSHIRO, T. et al. Selectivity of microbial acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase inhibitors toward isozymes. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 1, p. 43–51, 2007.

OLOYE, A. et al. **Hormonal variation in gravid does after oral treatment with crude ethanol extract of Spondias mombin**. [s.l: s.n.]. v. 6

OLUGBUYIRO, J. A O.; MOODY, J. O.; HAMANN, M. T. AntiMtb activity of triterpenoid-rich fractions from *Spondias mombin* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 9, p. 1807–1809, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy third edition Thomson Learning, Inc.**, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

SABIU, S. et al. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Ameliorative roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 180–186, 2016.

SALMINEN, J. P. et al. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 864, n. 2, p. 283–291, 1999.

SCIGELOVA, M. et al. Fourier Transform Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 7, p. M111.009431, 2011.

SEERAM, N. et al. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. **Separation and Purification Technology**, v. 41, n. 1, p. 49–55, 2005.

SOUSA, A. D. et al. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 91–103, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiología Vegetal*. **Fisiología Vegetal**, p. 536,537, 2006.

TIBURSKI, J. H. et al. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp.

Food Research International, v. 44, n. 7, p. 2326–2331, 2011.

Torres, L. B. (2008). *NuBBE - 10 anos de dedicação à química de Produtos Naturais*.

Fonte: Portal dos Fármacos:

http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/atualidades_10anosnubbe.html

UCHENDU, C. N.; ISEK, T. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. **African Health Sciences**, v. 8, n. 3, p. 163–167, 2008.

UCHIDA, R. et al. Structure elucidation of fungal sespendole, an inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages. **Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 6, p. 338–344, 2006a.

UCHIDA, R. et al. Suspendole, a new inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages, produced by *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25. **Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 2, p. 93–97, 2006b.


VECHIA, C. A. D. et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 288–296, 2016.

WAGENAAR, M. M. Pre-fractionated microbial samples - The second generation natural products library at Wyeth. **Molecules**, v. 13, n. 6, p. 1406–1426, 2008.

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.

ZHOU, H.; LV, J.; YUAN, Q. Preparative isolation and purification of punicalin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 72, n. 2, p. 225–228, 2010.

APÊNDICE A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXTRAÇÃO VEGETAL DE BAGS.

	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento		
Código 000.00.00.00.0.000	Revisão	Cópia Não Controlada	Página 68 / 83
Título:	PREPARAÇÃO DE EXTRATOS DE BAG PARA ARMAZENAMENTO EM EXTRATOTECA POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO ULTRASSOM		

1 Objetivo

Este procedimento tem como finalidade descrever o procedimento de preparação de extratos vegetais para armazenamento em extratoteca utilizando partição líquido-líquido e ultrassom.

2 Campo de Aplicação

Este procedimento experimental é aplicável para análises de variabilidade intra e interespecífica, sendo utilizado no caso de estudos contendo um grande número de amostras. O método permite uma execução rápida e de baixo custo no que tange os estudos de comparação de perfil metabolômico (CHAGAS-PAULA; OLIVEIRA, TIAGO BRANQUINHO, ZHANG, TONG, EDRADA-EBEL; COSTA, 2015; NEHME et al., 2008). Um ponto importante trata-se da remoção de interferentes (pigmentos, ácidos graxos etc.) em extratos vegetais que comprometam a análise em sistemas UPLC, sem a necessidade de utilização de cartuchos C18.

3 Referências

- A.D. Chagas-Paula, R. Oliveira, Tiago Branquinho, Zhang, Tong, Edrada-Ebel, F.B. Da Costa, Prediction of Anti-inflammatory Plants and Discovery of Their Biomarkers by Machine Learning Algorithms and Metabolomic Studies, *Planta Med.* 81 (2015) 450–458.
- [2] C.J. Nehme, P.L.R. de Moraes, A.G. Tininis, A.J. Cavalheiro, Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae), *Biochem. Syst. Ecol.* 36 (2008) 602–611. doi:10.1016/j.bse.2008.05.001.

3.1 Complementares

3.2 Cruzadas

Não se aplica.

4 Definições, siglas e abreviaturas

Não se aplica.

5 Responsabilidade

Esta metodologia pode ser usada por qualquer integrante dos laboratórios do CNPAT da Embrapa Agroindústria Tropical e de qualquer outra instituição de pesquisa, desde que treinado para essa atividade.

6 Descrição

6.1 Materiais

- Tubos de ensaio de 15 mL
- Estante para tubos de ensaio
- Seringa de vidro com agulha
- Pipeta automática de 1000 e 5000 µL com ponteiras
- Tubos padronizados da extratoteca da EMBRAPA tarados.
- Filtros de PTFE de tamanho de poro 0,22 µm.
- Vidrarias auxiliares: proveta, becker, frascos de penicilina, pipetas de pasteur.
- Hexano P.A.
- Etanol P.A.
- Metanol P.A.
- Água Milli Q

6.2 Equipamentos

- Balança analítica
- Vórtex para agitação de tubos de ensaio
- Banho ultrassom de potência fixa de 135 W
- Centrífuga à vácuo com aquecimento (Speedvacuum).

6.3 Procedimento experimental

Medir em balança analítica 1,0 g de vegetal seco e moído, em seguida, adicionar 8 mL de solução etanol/H₂O (7:3). Homogeneizar a mistura em vórtex por 1 minuto e realizar a extração de compostos polares em banho ultrassom por 20 minutos com potência fixa (135 W). Posteriormente, adicionar à mistura 4 mL de hexano P.A. Homogeneizar novamente a mistura em vortex por 1 minuto e realizar a retirada dos compostos apolares em banho ultrassom por mais 20 minutos. Em seguida, aguardar a sedimentação dos sólidos e a completa separação de fases. Retirar o máximo da fase inferior polar (etanol/água) com uma pipeta de Pasteur e dispor em frascos de penicilina. A figura 1 apresenta o esquema da primeira parte do procedimento.



Figura 30 - Procedimento de extração líquido-líquido de BAGs usando o ultrassom.

Realizar a filtração em filtros de PTFE de 0,22 μ m recolhendo 3 replicatas de 2 mL cada diretamente nos tubos padrão da extratoteca **tarados**.

Em seguida, realizar a secagem dos extratos levando os tubos para o speedvac por um pernoite, retirando o rotor central e posicionando os frascos de forma em que se possibilite a ação do vácuo, como é mostrado na figura 2.

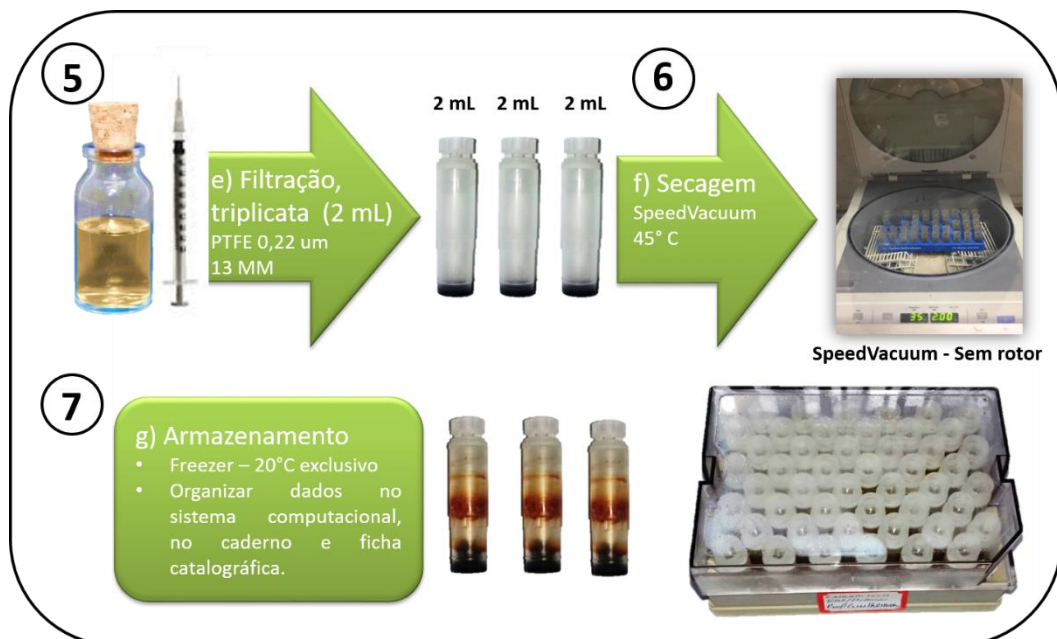


Figura 31 - Filtração, secagem e armazenamento de amostras na extratoteca.

Caso as amostras continuem úmidas, resuspendê-las em metanol P.A. e secar em N₂ ou novamente em speedvac.

Com os extratos secos, pesar massa obtida em cada replicata. Em seguida catalogar as amostras no caderno oficial da extratoteca, em ficha e no software contendo todos os dados de rastreabilidade bem como dados taxonômicos da matriz originária dos extratos.

A figura 3 representa todo o processo de preparação de amostra.

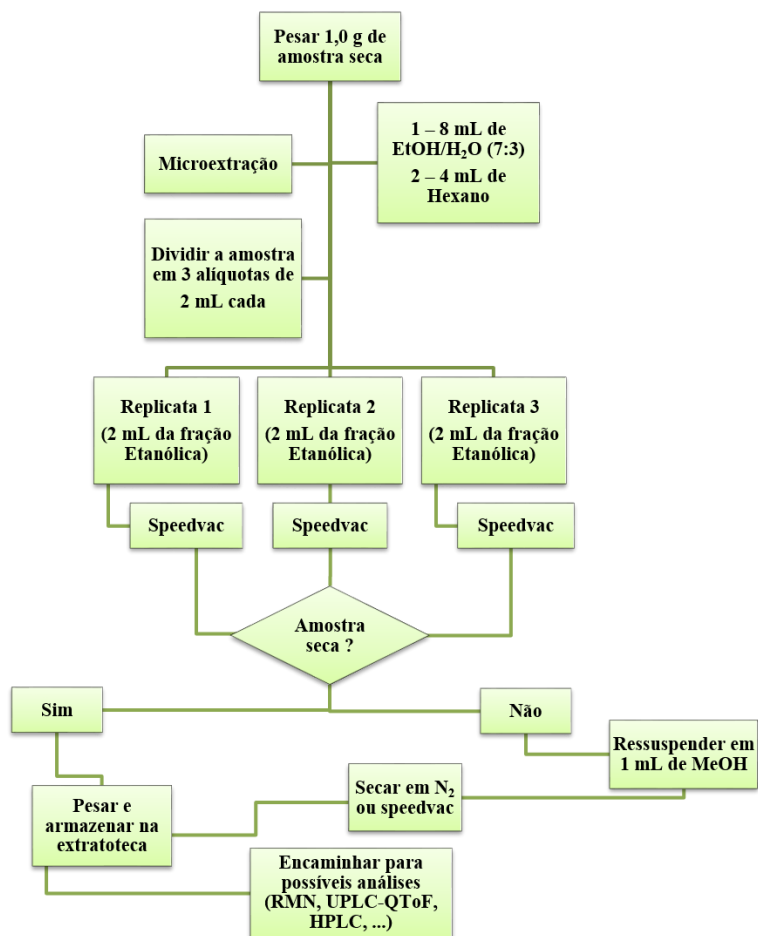


Figura 32 - Fluxograma representativo de todo o procedimento operacional padrão.

7 Anexos

Não se aplica.

APÊNDICE B – FICHA DE ENTRADA DE AMOSTRAS DA EXTRATOTECA DA EMBRAPA.

Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais			
Cadastro de amostras			
1. Procedência:		2. Data de chegada da amostra:	
Local (Cidade/UF): Petrolina - PE		Georreferenciamento:	
Instituição: EMEPA		Responsável pelo envio: Ricardo Elesbão	
Contato (tel):		E-mail:	
3. Especificações da amostra (Biomassa):			
Origem: (x) vegetal, () animal, () microbiológica, () material processado, () outro(s): _____			
Parte da biomassa: (x) folhas, () cascas, () galhos, () frutos, () outro(s): _____			
Apresentação: (x) <i>in natura</i> () extrato () outro(s): _____			
Tratamento primário biomassa: Material seco e moído em moinho de facas.			
Nome popular: Cajazeira			
Nome científico: <i>Spondias mombin</i>			
Outras informações relevantes:			
Técnica de extração: Extração líquido-líquido em Etanol/H ₂ O (7:3) com ultrassom.			
4. Análises realizadas:			
	Código das análises por equipamento		Código das análises por equipamento
UPLC-QTOF-MS^c		GC-FID	
RMN		FT-IR	
UPLC-QDA		HPLC-DAD-SPARK	
HPLC-PREP/SEMI-PREP		HPLC-MSⁿ	
HPLC-PDA			
GC-MS			
5. Projeto:			
Assinalar opção:			
(x) Embrapa, () CNPq, () FUNCAP, () INCT, () Internacional, () Externo, () Demanda sem projeto			
Título do Projeto: Biblioteca de substâncias e de extratos de Anacardiaceae empregando ferramentas "in silico" e de metabolômica para valoração de bancos ativos de germoplasma da Embrapa			
Se for Embrapa, informar número:		Responsável do LMQPN: Guilherme J. Zocolo	
6. Codificação para extratos únicos:			
Número do caderno extratoteca/Página(s):			
Número do caderno Laboratório/Página(s):			

Código da amostra no caderno de laboratório		
Freezer/Gaveta:		
Número da caixa:		
Código QRCode - Inicial/Final:		
7. Codificação para amostras originárias do Banco Ativo de Germoplasma (BAGs) ou múltiplas amostras:		
Número do caderno extratoteca/Página(s):	048.11.01.16.4.024	49 e 45
Número do caderno Laboratório/Página(s):	0001	8
Freezer/Gaveta:	Freezer 08 / Prateleira 01	Gaveta 01
Número da caixa:	Caixa 04	
Código QRCode - Inicial/Final:	NA0008758590	NA0008758618

Tabela 1. Correlação entre as amostras dos **BAGs** ou **múltiplas amostras** e metadados de armazenamento e análises*.

QRCode	Código da amostra no caderno de laboratório	Código das análises no UPLC-QTOF-MS ^E	Código das análises no RMN	Código das análises no UPLC-QDA
NA0008758590	C61F(I)	UPLC – 00001		
NA0008758591	C61F(II)	UPLC – 00002		
NA0008758592	C61F(III)	UPLC – 00003		
NA0008758593	C11F (I)	UPLC – 00004		
NA0008758594	C11F(II)	UPLC – 00005		
NA0008758595	C11F(III)	UPLC – 00006		
NA0008758596	C162F(I)	UPLC – 00007		
NA0008758597	C162F(II)	UPLC – 00008		
NA0008758598	C162F(III)	UPLC – 00009		
NA0008758599	C17F(I)	UPLC – 00010		
NA0008758600	C17F(II)	UPLC – 00011		
NA0008758601	C17F(III)	UPLC – 00012		
NA0008758602	C18F(I)	UPLC – 00013		
NA0008758603	C18F(II)	UPLC – 00014		
NA0008758604	C18F(III)	UPLC – 00015		
NA0008758605	C252F(I)	UPLC – 00016		
NA0008758606	C252F(II)	UPLC – 00017		
NA0008758607	C252F(III)	UPLC – 00018		
NA0008758608	C35F(I)	UPLC – 00019		
NA0008758609	C35F(II)	UPLC – 00020		
NA0008758610	C35F(III)	UPLC – 00021		
NA0008758611	P12F(I)	UPLC – 00022		
NA0008758612	P12F(II)	UPLC – 00023		
NA0008758613	P12F(III)	UPLC – 00024		
NA0008758614	P13F(I)	UPLC – 00025		
NA0008758615	P13F(II)	UPLC – 00026		
NA0008758616	P13F(III)	UPLC – 00027		
NA0008758617	P23F(I)	UPLC – 00028		
NA0008758618	P23F(II)	UPLC – 00029		

Fortaleza, de de 2018.

Dr. Guilherme Julião Zocolo
Responsável pela extratoteca

Dr(a).....
Responsável pela amostra

APÊNDICE C – LAYOUT DO SOFTWARE USADO PARA TRATAMENTO DE DADOS DA EXTRATOTECA DA EMBRAPA.

Figura 1 – Acesso aos dados da extratoteca por freezers.

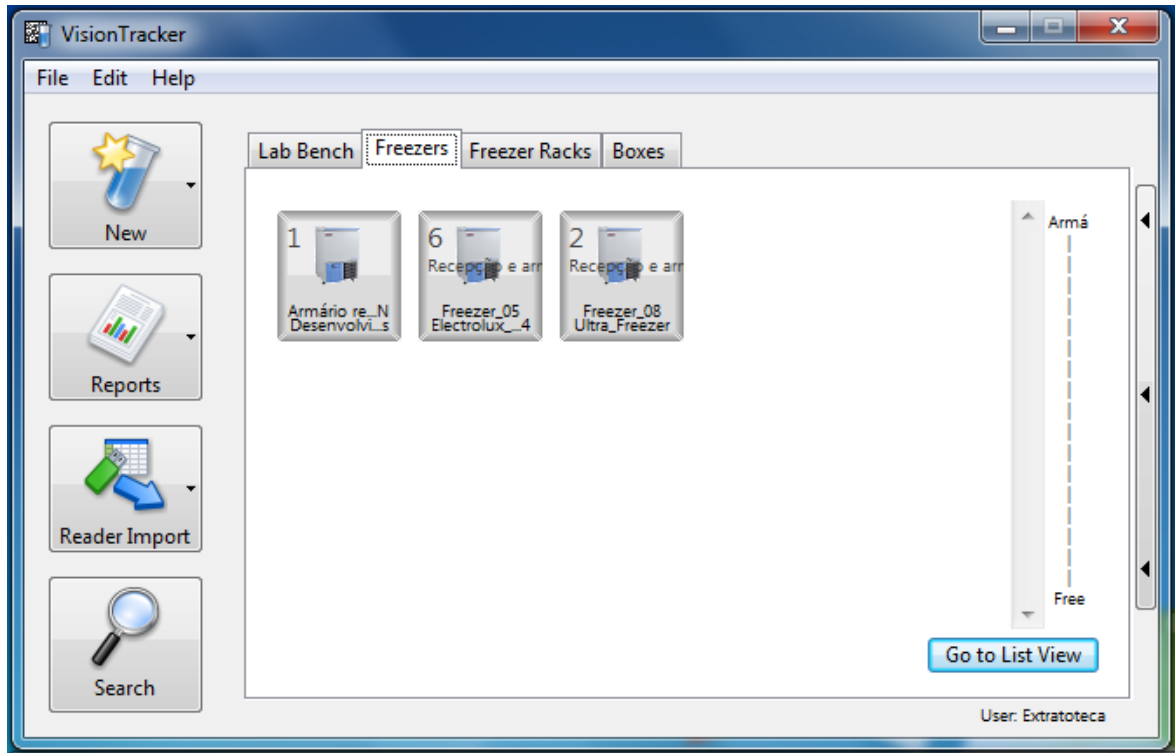


Figura 2 – Acesso aos dados da extratoteca por prateleiras dos freezers.

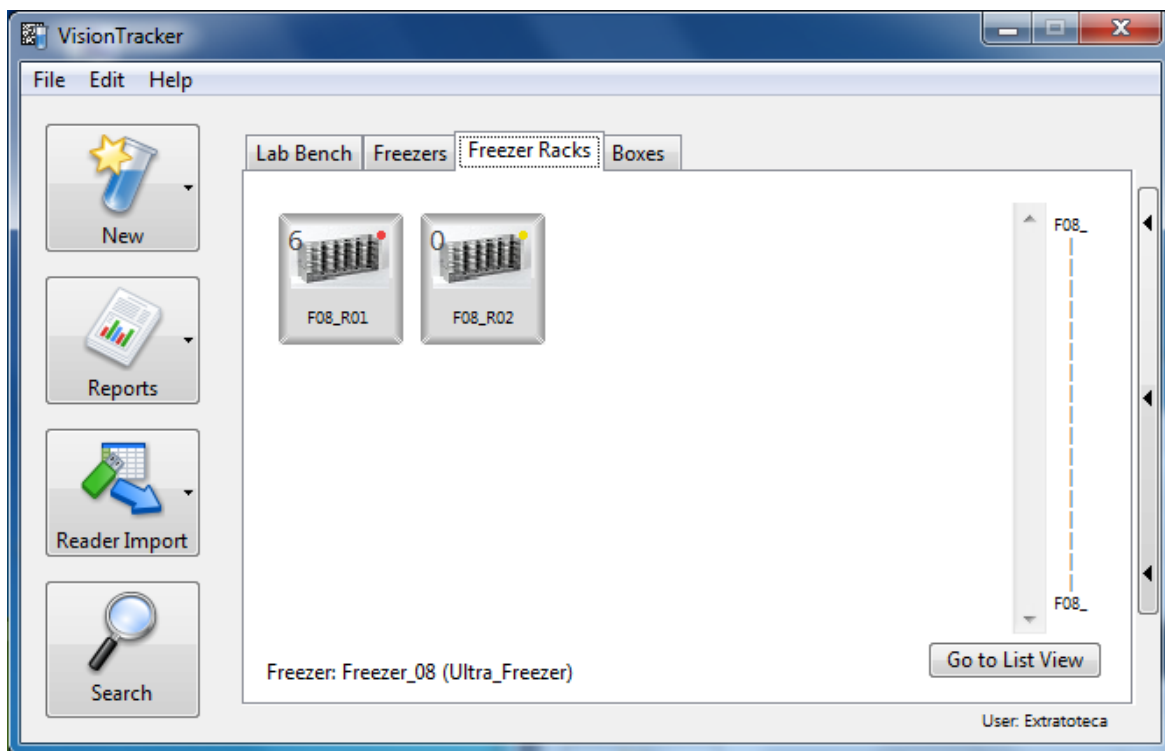


Figura 3 – Acesso aos dados da extratoteca pelas caixas.

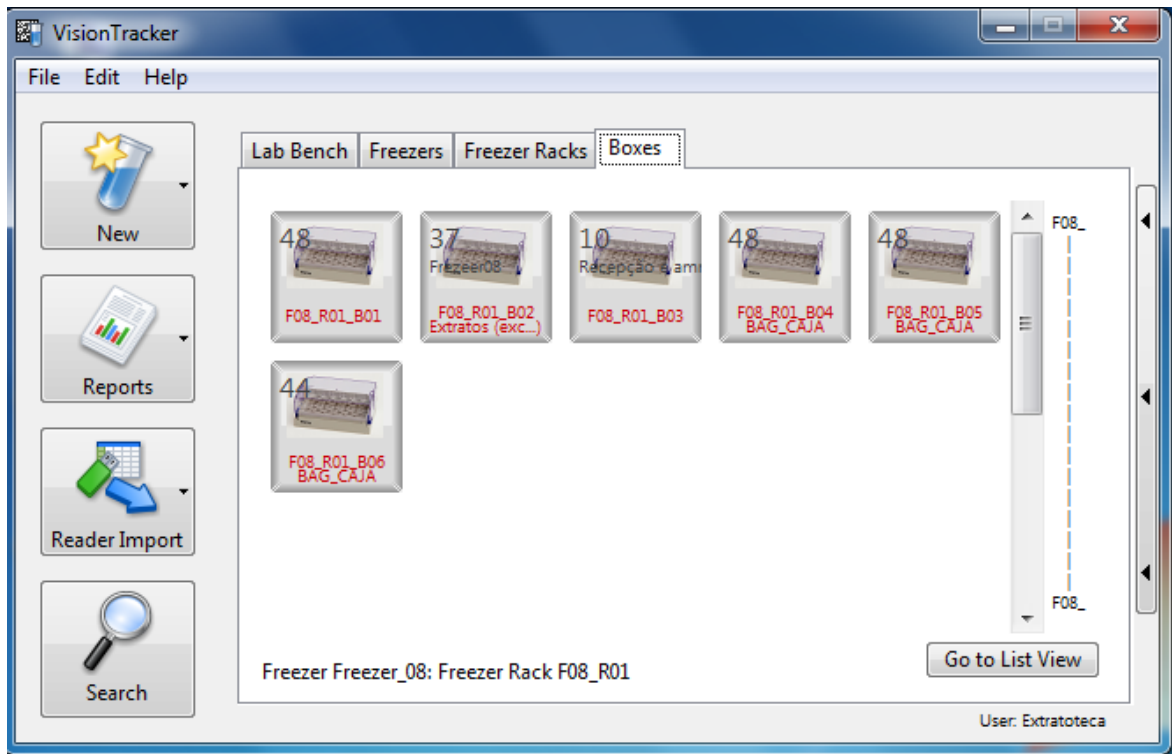


Figura 4 – Acesso aos dados da extratoteca pelos tubos.

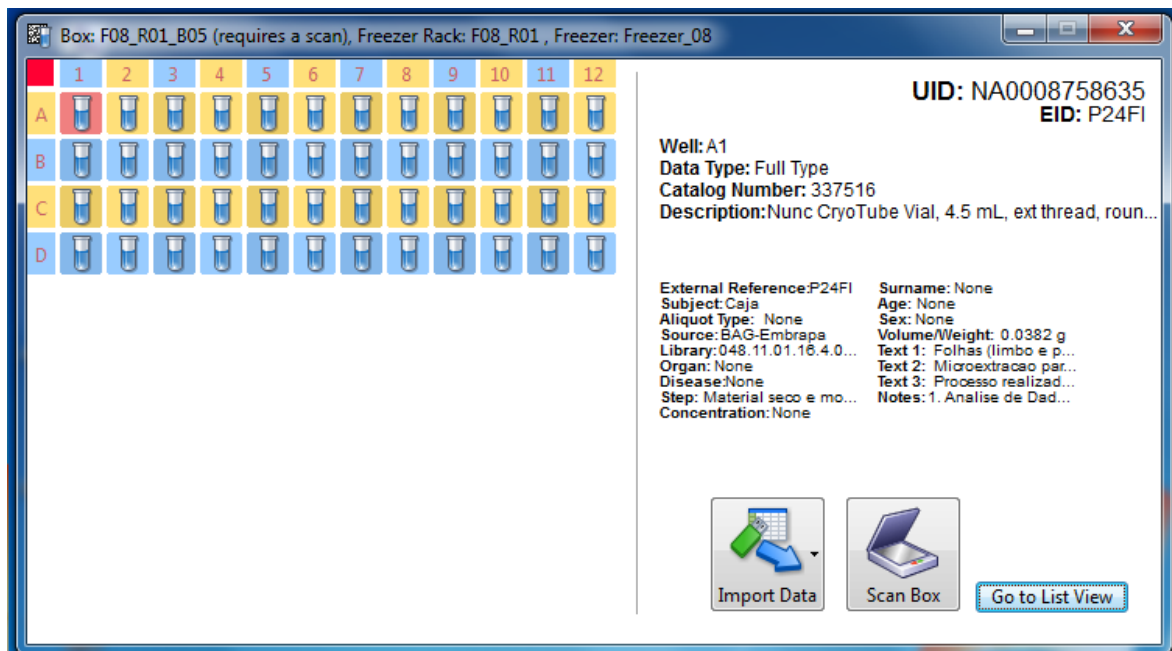


Figura 5 – Acesso aos dados da extratoteca em lista. Em destaque, leitor de QR Code.

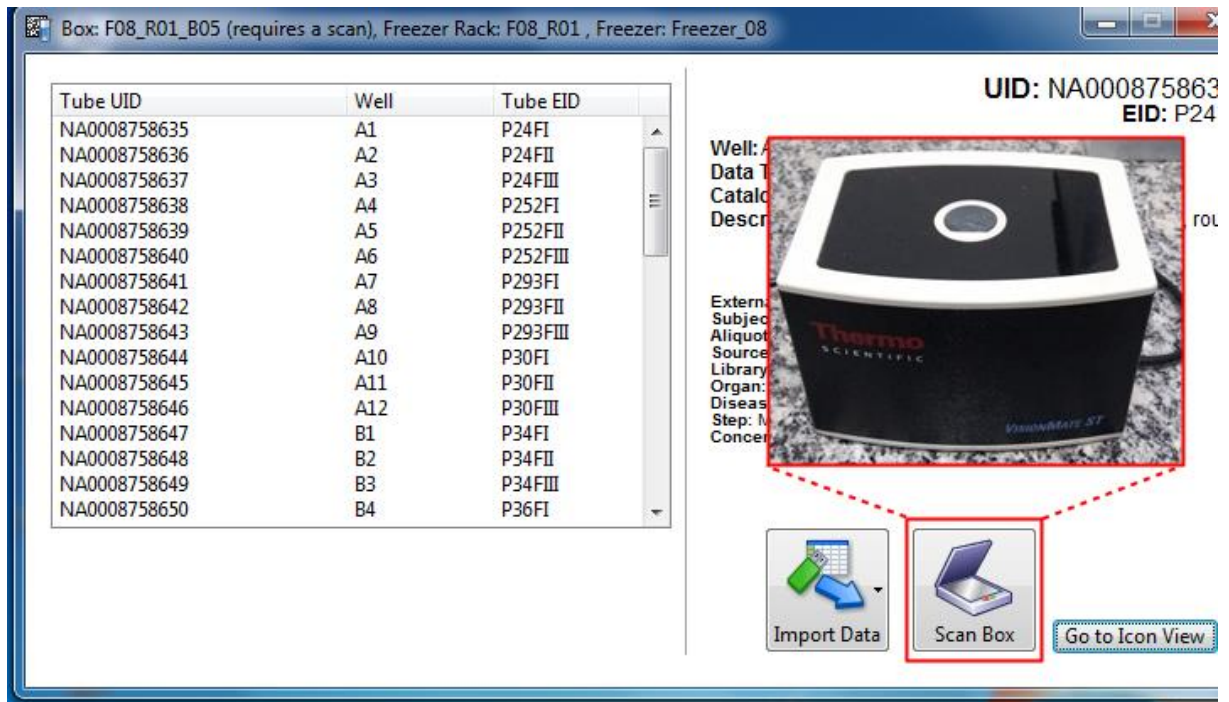


Figura 6 – Acesso aos dados referentes aos tubos de armazenagem da extratoteca.

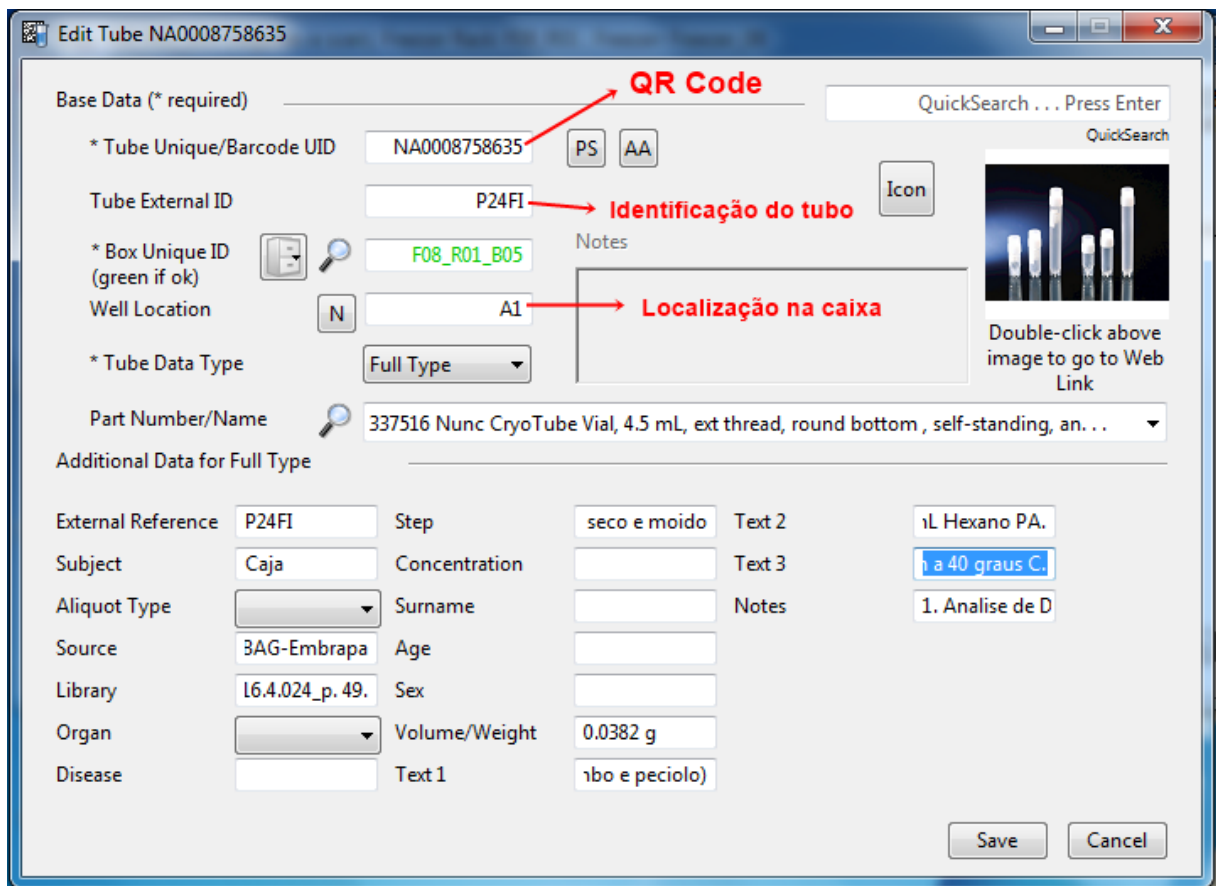
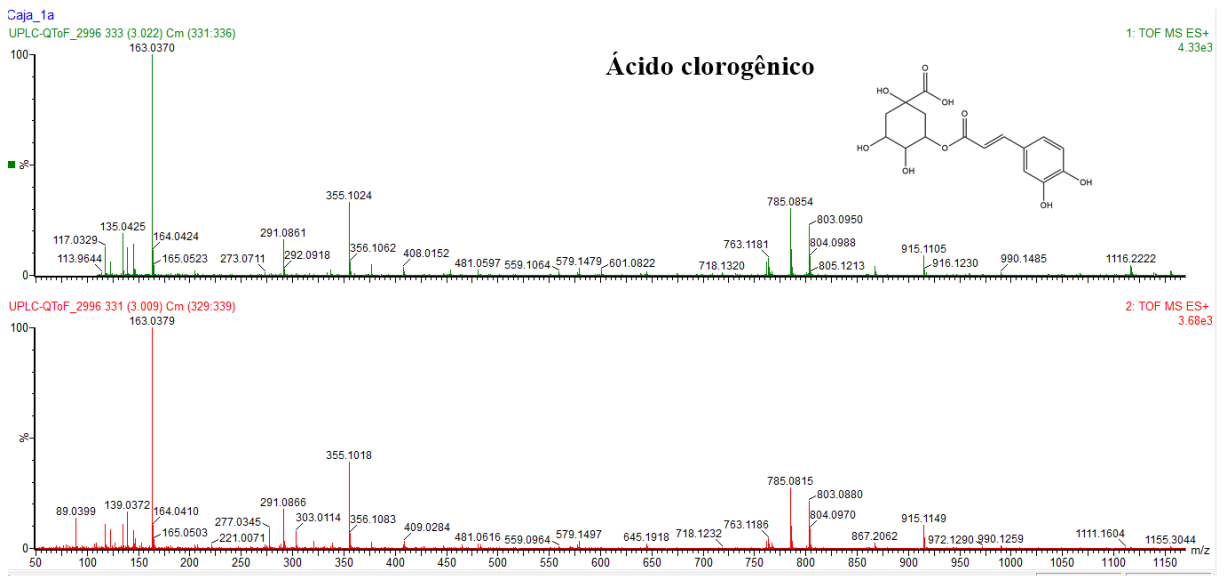
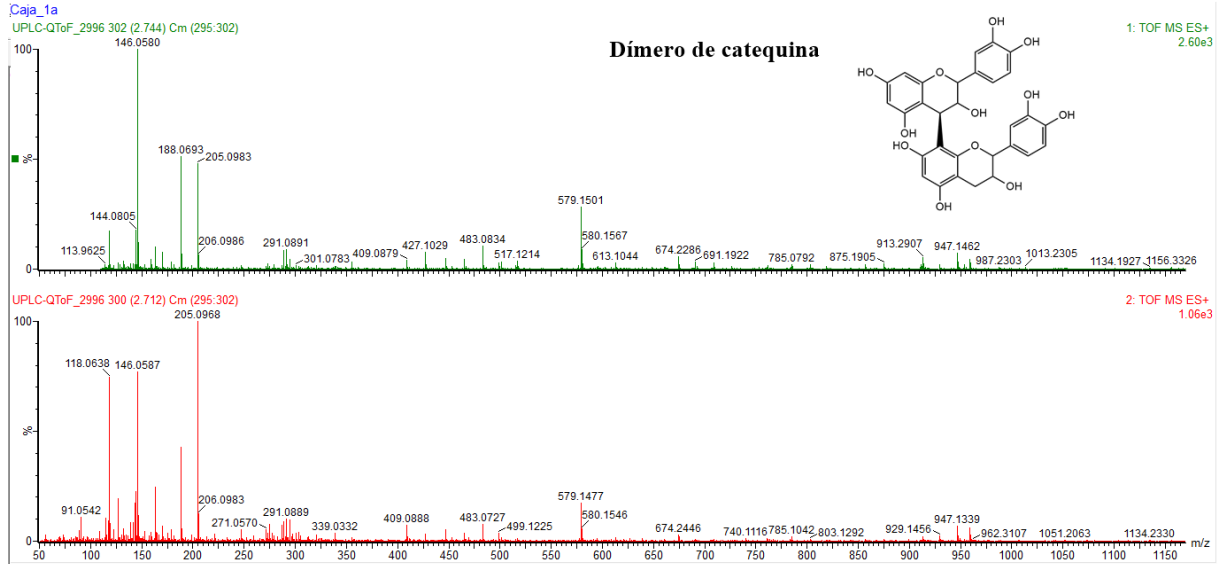


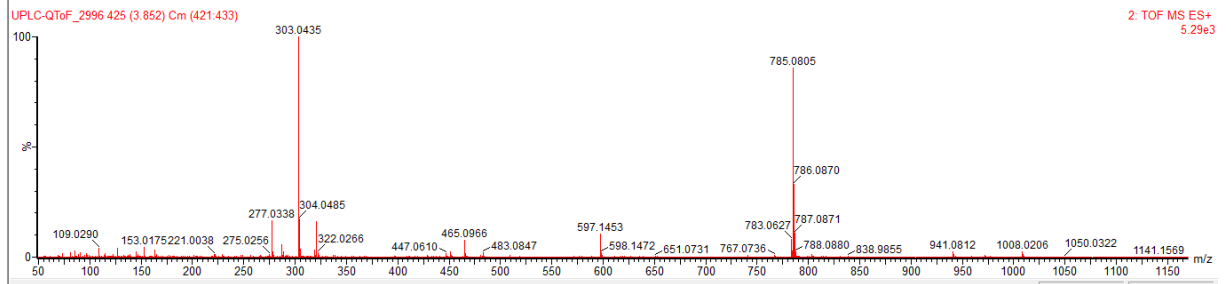
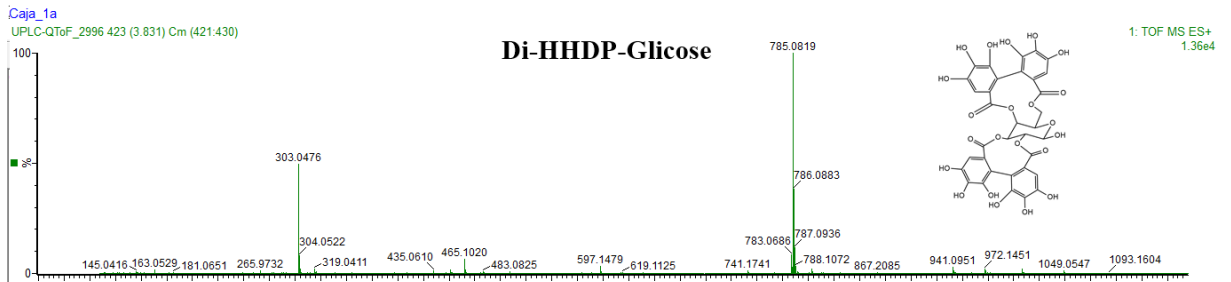
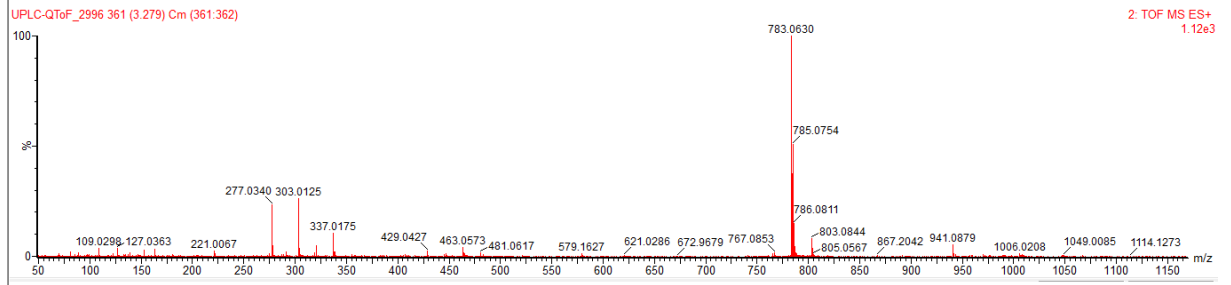
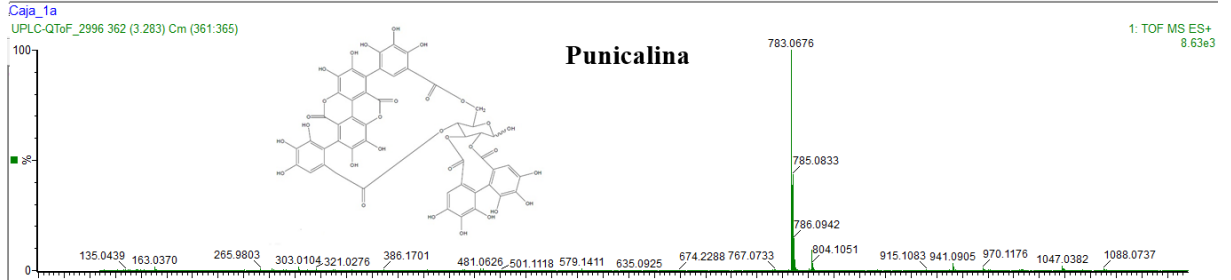
Figura 7 – Modelo de planilha de dados de amostras automaticamente tabelados pelo software.

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data table:

Tube UID	Tube EID	Box UID	Vial	Cat Number	Data Type	NIPNAL	REFREN	SUBJECT	DUOT	SOURCE	LIBRARY	ORGAN/DISEAS	STEP	ENTR/RNANAGE	SEX	CLUM/WEIGH	TEXT 1	TEXT 2
NA0006758435	P24F1	F08_R01_B05	A1	*37376	Full Type			P24F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0262 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758436	P24F1	F08_R01_B05	A2	*37376	Full Type			P24F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0898 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758437	P24F1	F08_R01_B05	A3	*37376	Full Type			P24F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0464 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758438	P23P1	F08_R01_B05	A4	*37376	Full Type			P23P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0113 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758439	P23P1	F08_R01_B05	A5	*37376	Full Type			P23P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0446 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758440	P23P1	F08_R01_B05	A6	*37376	Full Type			P23P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0449 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758441	P23P1	F08_R01_B05	A7	*37376	Full Type			P23P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0597 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758442	P23P1	F08_R01_B05	A8	*37376	Full Type			P23P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0462 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758443	P23P1	F08_R01_B05	A9	*37376	Full Type			P23P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0413 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758444	P30F1	F08_R01_B05	A10	*37376	Full Type			P30F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0509 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758445	P30F1	F08_R01_B05	A11	*37376	Full Type			P30F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0704 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758446	P30F1	F08_R01_B05	A12	*37376	Full Type			P30F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0632 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758447	P34F1	F08_R01_B05	B1	*37376	Full Type			P34F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0895 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758448	P34F1	F08_R01_B05	B2	*37376	Full Type			P34F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0588 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758449	P34F1	F08_R01_B05	B3	*37376	Full Type			P34F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0490 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758450	P36F1	F08_R01_B05	B4	*37376	Full Type			P36F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0703 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758451	P36F1	F08_R01_B05	B5	*37376	Full Type			P36F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0466 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758452	P36F1	F08_R01_B05	B6	*37376	Full Type			P36F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0425 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758453	P36F1	F08_R01_B05	B7	*37376	Full Type			P36F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0634 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758454	P36F1	F08_R01_B05	B8	*37376	Full Type			P36F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0259 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758455	P36F1	F08_R01_B05	B9	*37376	Full Type			P36F1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0549 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758456	P20P1	F08_R01_B05	B10	*37376	Full Type			P20P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0280 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758457	P20P1	F08_R01_B05	B11	*37376	Full Type			P20P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0286 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758458	P20P1	F08_R01_B05	B12	*37376	Full Type			P20P1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0393 g	Folhas limbo e p.	Microrretacao pa F
NA0006758459	C5C1	F08_R01_B05	C1	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0637 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758460	C5C1	F08_R01_B05	C2	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0575 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758461	C5C1	F08_R01_B05	C3	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0686 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758462	C1C1	F08_R01_B05	C4	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0624 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758463	C1C1	F08_R01_B05	C5	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0636 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758464	C1C1	F08_R01_B05	C6	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0622 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758465	C5C1	F08_R01_B05	C7	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0634 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758466	C5C1	F08_R01_B05	C8	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0639 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758467	C5C1	F08_R01_B05	C9	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0643 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758468	C1C1	F08_R01_B05	C10	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0506 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758469	C1C1	F08_R01_B05	C11	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0507 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758470	C1C1	F08_R01_B05	C12	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0516 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758471	C1C1	F08_R01_B05	D1	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0725 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758472	C1C1	F08_R01_B05	D2	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0738 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758473	C1C1	F08_R01_B05	D3	*37376	Full Type			C1C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0739 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758474	C5C1	F08_R01_B05	D4	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0854 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758475	C5C1	F08_R01_B05	D5	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0851 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758476	C5C1	F08_R01_B05	D6	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0851 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758477	C5C1	F08_R01_B05	D7	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0837 g	Casca	Microrretacao pa F
NA0006758478	C5C1	F08_R01_B05	D8	*37376	Full Type			C5C1	Caça	BAG-Embrapa	048.1101.94.4.024_L		Material seco em			0,0674 g	Casca	Microrretacao pa F

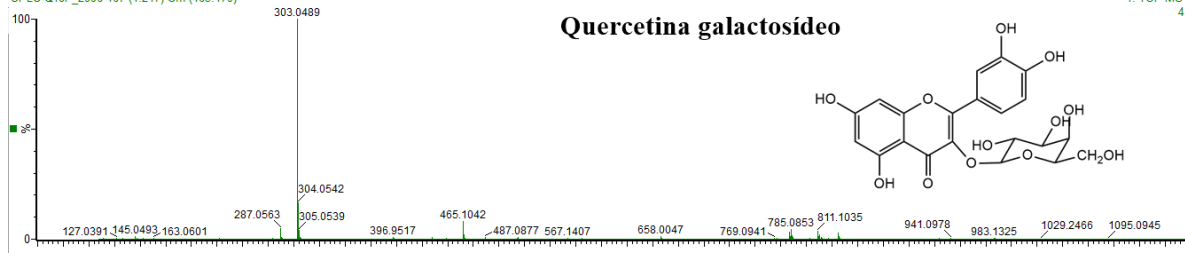
APÊNDICE D – ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS



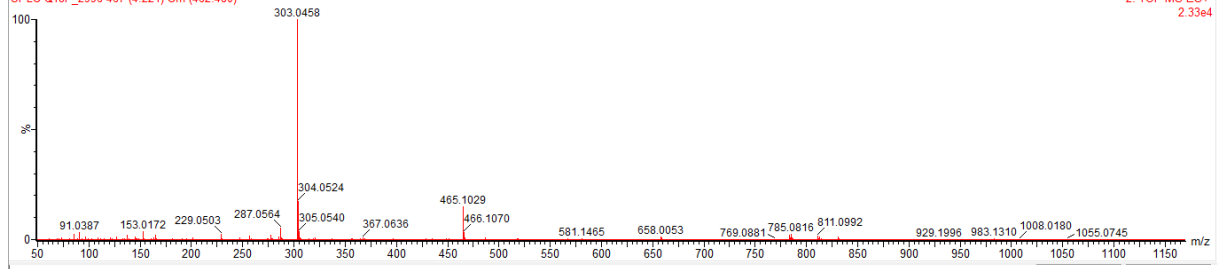


Caja_1a

UPLC-QToF_2996 467 (4.217) Cm (463:479)

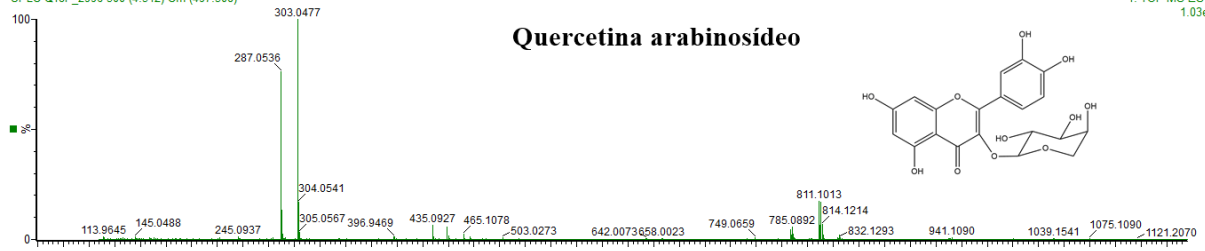


UPLC-QToF_2996 467 (4.221) Cm (462:480)



Caja_1a

UPLC-QToF_2996 500 (4.512) Cm (497:508)



UPLC-QToF_2996 501 (4.525) Cm (496:509)

