



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

CAIO BEZERRA DE CASTRO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE FOLHA,
GALHO E CASCA DE AROEIRA-DO-SERTÃO (*MYRACRODRUON URUNDEUVA*
ALL.): ABORDAGEM METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA**

FORTALEZA, 2016

CAIO BEZERRA DE CASTRO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE FOLHA,
GALHO E CASCA DE AROEIRA-DO-SERTÃO (*Myracrodruon urundeuva* All):
ABORDAGEM METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA**

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.

Orientador didático-pedagógico:
Profª. Dra. Izaura Diógenes

Orientador Profissional:
Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA, 2016

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)

C35p Castro, Caio Bezerra de.
Perfil químico e atividade citotóxica de extratos de folha, galho e casca de Aroeira-do-Sertão
(Myracrodruon urundeuva) : abordagem metabolômica e quimiométrica / Caio Bezerra de Castro. – 2016.
93 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes.
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. Aroeira-do-Sertão. 2. Atividade Citotóxica. 3. Quimiometria. 4. UPLC-MS. I. Título.

CDD 540


CAIO BEZERRA DE CASTRO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS DE FOLHA,
GALHO E CASCA DE AROEIRA-DO-SERTÃO (*MYRACRODRUON URUNDEUVA*
ALL.): ABORDAGEM METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA**

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: 15/12/2016.


BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - (UFC)



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



Profa. Dra. Davila Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará - (UFC)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me dado forças no decorrer do semestre de realização deste trabalho.

Agradeço a meus pais, Francisco José Bezerra Rodrigues e Lúcia Helena Ciriaco de Castro, porque sem eles eu não seria nada. Muito obrigado por sempre estarem ao meu lado. Aos meus irmãos, Gabriel Bezerra de Castro e Lucas Bezerra de Castro pelas brigas, mas ao mesmo tempo pelo carinho que me fazia esquecer um pouco das obrigações.

Agradeço ao meu orientador profissional, Dr. Guilherme Julião Zocolo, por ter me recebido de braços abertos, por sempre estar de prontidão para ajudar no trabalho, pelo incentivo a pesquisa.

Agradeço a minha orientadora didático-pedagógica Prof.^a Dr.^a Izaura Cirino Nogueira Diógenes por fazer parte de praticamente toda minha graduação como orientadora de Iniciação Científica, por sempre acreditar em mim e pelo grande incentivo a pesquisa.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório Multiusuário de Química dos Produtos Naturais da EMBRAPA que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho, em especial aos analistas Paulo, Tigressa e Lorena que sempre estavam de prontidão no caso de dúvidas. A EMBRAPA pelo fornecimento do estágio.

Agradeço aos meus amigos da Química 2013.1 que estiveram comigo nessa caminhada de 4 anos de graduação. Aqueles que me ajudaram e aqueles que me viraram as costas, me fez amadurecer profissionalmente e como pessoa.

Agradecimento especial aos presentes que eu ganhei dessa graduação, a amizade da Juliana Fernandes e Licia Luz, por sempre estarem ao meu lado, pelos conselhos, pelas brigas e pelas risadas. Vocês são muito importantes pra mim.

Agradeço a todos os professores da Química que estiveram presentes na minha formação.

Agradeço ao Laboratório de Bioinorgânica, que também fez parte da minha graduação por 3 anos e por ter possibilitado conhecer dois amigos que também guardo no peito: Pedro Mikael e Carlos Daniel.

“We’re beautiful, like Diamonds in the sky”

- Sia Furler.

RESUMO

As plantas medicinais nos últimos anos vêm sendo utilizadas no tratamento de diferentes enfermidades, juntamente com a produção de fitoterápicos. O crescente número de casos de câncer em todo o mundo é um dado alarmante, principalmente porque o número de óbitos está concentrado em países em desenvolvimento. A Aroeira-do-Sertão, *Myracrodruon utundeuva*, é uma planta pertencente à flora brasileira e é encontrada principalmente na Caatinga. O uso medicinal dessa planta é bastante disseminado pela cultura popular e suas ações biológicas são bastante difundidas, como atividade neuroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e anticancerígena. A composição química dos extratos depende da seção do organismo vegetal que é analisada, podendo abranger diferentes classes de metabólitos secundários como os flavonoides, taninos, terpenos e esteroides. O seguinte trabalho pretendeu traçar o perfil químico dos extratos etanólicos da folha, galho e casca da Aroeira-do-Sertão oriundas de Petrolina, interior de Pernambuco, por meio da técnica de UPLC/Q-TOFMS/MS em cumplicidade com o tratamento estatístico dos dados e ensaio citotóxico *in vitro*. No total foram identificados ao todo cerca de 50 compostos abrangendo os três extratos analisados pela obtenção de espectros de massa de alta resolução no modo negativo (ESI). Os dados de atividade citotóxica destacaram o extrato da casca com potencial ação frente às linhagens de células cancerígenas HL60 (Leucêmica), HCT-116 (Colón humano), SF295 (Glioblastoma) e RAJI (Leucêmica). A Análise de Componentes Principais (PCA) resultou no surgimento de três grupos distintos indicando a diferença metabólica entre as seções da Aroeira. Através da OPLS-DA e S-plot foi possível determinar os compostos discriminantes pela comparação dos grupos e juntamente com os dados de citotoxicidade apontar possíveis compostos que podem estar relacionados com tal ação anticancerígena.

Palavras – chave : Aroeira-do-Sertão. Atividade Citotóxica. Quimiometria. UPLC/Q-TOFMS/MS.

ABSTRACT

Nowadays, medicinal plants are being used to treat a big variety of diseases, alongside to the production of phytotherapeutic compounds. The increasing number of cancer cases around the world is an alarming data, especially because the deaths are concentrated in countries that are in development. The (Aroeira do sertao), *Myracrodruon utundeuva*, is a plant that belongs to the Brazilian flora e is mostly found in the Caatinga. The medicinal use of this plant is widely disseminated through popular culture, and its biological actions are very well known, for example, the neuroprotective, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic antibiotic and ant cancerous activities. The chemical composition of the extracts depends on the section of the vegetal organism that is analyzed, the extract can have different classes of secondary metabolites as flavonoids, (taninos), (terpenos), and steroids. This work's goal was to stablish the chemical profile of the ethanoic extracts of the leaves, branches and bark of the (aroeira do sertao) that were obtained in Petrolina, Pernambuco. Using UPLC/Q-TOFMS/MS and a statistical data processing of the cytotoxic assay *in vitro*. It was identified a total number of 50 compounds in the three extracts that had their high-resolution mass spectra in the negative mode (ESI) analyzed. The Cytotoxic activity data showed that the extract that came from the bark has a potential action over the cancerous HL60 (Leukemia), HCT-116 (Human colon), SF295 (glioblatoma), RAJI (Leukemia) cells. The Principal Component Analysis (PCA) resulted in three distinct groups formed that indicated the metabolic difference among the Aroeira's sections. Using OPLS-DA and the S-Plot was possible to determine the discriminating compounds through comparison of the groups and alongside with the cytotoxic data, to point possible compounds that might be related with the anti-cancerous activity.

Keywords: Aroeira-do-Sertão. Cytotoxic activity. Chemometrics. UPLC/Q-TOFMS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica das diversas fontes de agentes terapêuticos	17
Figura 2 – Demonstração do efeito dos diferentes estádios do câncer no prognóstico da doença	18
Figura 3 – Os 10 tipos de câncer mais comuns diagnosticados no mundo estimados em 2012 pela Globocan	19
Figura 4 – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	19
Figura 5 – Mapa da Caatinga com destaque para a região onde se obteve o material de trabalho. Limite entre Petrolina e Lagoa Grande, interior de Pernambuco	21
Figura 6 – Imagens reais da árvore, folhas e casca do caule da espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i>	22
Figura 7 – Relação entre órgão da aroeira-do-sertão com diferentes ações biológicas	23
Figura 8 – Estrutura principal de um flavonóide	31
Figura 9 – Esquema simplificado das seções do espectrômetro de massa acoplado ao UPLC usado neste trabalho	34
Figura 10 – Representação da ionização por eletrospray	35
Figura 11 – Representação gráfica dos autovalores e autovetores	37
Figura 12 – Estruturas químicas da (A) Corilagina e do (B) Ácido Geraniinico	47
Figura 13 – Estrutura química base dos (A) Ácidos Anacárdicos e (B) substituintes dos encontrados no trabalho	48
Figura 14 – Estruturas base dos derivados da catequina e epicatequina identificados na casca da Aroeira-do-Sertão	48
Figura 15 – Cromatograma do modo negativo ESI dos extratos da folha da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	49
Figura 16 – Cromatograma do modo negativo ESI dos extratos do galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	50
Figura 17 – Cromatograma do modo negativo ESI dos extratos da casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	51
Figura 18 – (A) Cromatograma e (B) Espectro de Massa de Alta Resolução do padrão analítico Corilagina analisado em UPLC/Q-TOFMS/MS	63

Figura 19 – Padrão de fragmentação do íon m/z 599 $[M-H]^-$ referente à Quercitrina 2'' O-galato	65
Figura 20 – Cromatograma do Mix de padrões	66
Figura 21 – Espectro de Massa de Alta Resolução do padrão de Ácido Clorogênico em modo negativo	67
Figura 22 – Cromatograma do padrão analítico Urundeuquina A	68
Figura 23 – Cromatograma do padrão analítico Urundeuquina B	69
Figura 24 – Mecanismo de fragmentação de formação do íon fragmento em 125 Da para os derivados de Galocatequina	70
Figura 25 – Mecanismo de fragmentação do Epigalocatequina 3-O-galato	71
Figura 26 – Espectro de Massa de Alta Resolução no tempo de retenção de 3,00 min do extrato de casca da Aroeira-do-Sertão	71
Figura 27 – Gráfico em 3D da análise de componentes principais dos extratos da folha, galho e casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i> analisados por através da UPLC/Q-TOFMS/MS	74
Figura 28 – Gráfico da OPLS-Da scores para os extratos de folha e casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	75
Figura 29 – Gráfico S-plot das amostras de folha (eixo 1) e casca (eixo -1) da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	77
Figura 30 – Variação média dos discriminantes do extrato etanólico da casca em relação à folha	78
Figura 31 – Gráfico da OPLS-Da scores para os extratos de folha e casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	79
Figura 32 – Gráfico S-plot das amostras de galho (eixo 1) e folha (eixo -1) da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	80
Figura 33 – Variação média dos discriminantes do extrato etanólico da folha em relação ao galho	81
Figura 34 – Gráfico da OPLS-Da scores para os extratos de casca e galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	82
Figura 35 – Gráfico S-plot das amostras de galho (eixo 1) e casca (eixo -1) da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	83
Figura 36 – Variação média dos discriminantes do extrato etanólico da casca em relação ao galho	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes não-voláteis extraídos de diversas partes do organismo vegetal da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	26
Tabela 2 – Valores de massa antes (m1) e após a moagem (m2) das folhas, cascas e galhos da Aroeira-do-Sertão com a respectiva tara (T)	42
Tabela 3 – Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos da Aroeira-do-Sertão da extração para análise em UPLC	42
Tabela 4 – Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos da Aroeira-do-Sertão para análise anticâncer bem como da tara dos frascos de penicilina, massa final dos frascos e massa do extrato obtida	44
Tabela 5 – Tentativa de identificação dos compostos não-voláteis presentes no extrato etanólico referente às folhas da <i>Myracrodruon urundeuva</i> All	52
Tabela 6 – Tentativa de identificação dos compostos não-voláteis presentes no extrato etanólico referente aos galhos da <i>Myracrodruon urundeuva</i> All	56
Tabela 7 – Tentativa de identificação dos compostos não-voláteis presentes no extrato etanólico referente às cascas da <i>Myracrodruon urundeuva</i> All	59
Tabela 8 – Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	73
Tabela 9 – Relação das coordenação da S-plot com os pares t_r - m/z dos compostos discriminantes análise S-plot para folha e casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	76
Tabela 10 – Relação das coordenação da S-plot com os pares t_r - m/z dos compostos discriminante análise S-plot para folha e galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	79
Tabela 11 – Relação das coordenação da S-plot com os pares t_r - m/z dos compostos discriminante análise S-plot para casca e galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	83

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação de representação da energia cinética	35
Equação 2 – Modelo de cálculo do erro em ppm das fórmulas moleculares obtidas pelo software MassLynx	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
Q-TOF	Quadrupolo Tempo de Vôo
MS	Espectrometria de Massa
ESI	Ionização por Eletrospray
PCA	Análise de Componentes Principais
OPLS-DA	Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IC ₅₀	Metade da Máxima Concentração Inibitória
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 A relevância das plantas medicinais	17
2.2 Câncer: aspectos gerais	18
2.3 Câncer: Exploração da Flora do Nordeste Brasileiro na Descoberta de Potenciais Drogas Anticancerígenas	20
2.4 Aroeira-do-Sertão: aspectos gerais	21
2.5 Aroeira-do-Sertão: importância biológica	23
2.6 Aroeira-do-Sertão: compostos químicos não-voláteis	24
2.7 Metabólitos Secundários	30
2.7.1 Flavonoides	31
2.7.2 Taninos hidrolisáveis	32
2.8. Metabolômica	32
2.9 Instrumentação analítica para aquisição de dados	33
2.9.1 UPLC/Q-TOFMS/MS	33
2.10 Tratamento de dados: quimiometria	36
2.10.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	36
2.10.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	37
2.10.2.1 Análise Discriminante Ortogonal dos Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA)	37
3 OBJETIVOS	39
4 MATERIAL E MÉTODO	40
4.1 Materiais	40
4.1.1 Materiais utilizados na metodologia de extração	40
4.1.2 Materiais utilizados no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	40
4.2 Equipamentos	41
4.2.1 Equipamentos utilizados na metodologia de extração	41
4.2.2 Equipamentos utilizados no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	41
4.3 Reagentes	41
4.4 Obtenção e Tratamento das amostras	41
4.5 Metodologia de extração para análise exploratória em UPLC	42

4.6 Metodologia de extração para análise anticâncer	43
4.7 Metodologia do ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	44
4.8 Parâmetros de análise realizada em UPLC/Q-TOFMS/MS	45
4.9 Parâmetros da análise quimiométricas	45
4.10 Análise estatística da atividade citotóxica	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Perfil químico dos extratos da <i>Myracrodruon urundeuva</i> pela análise em UPLC/Q-TOFMS/MS	46
5.1.1 Perfil químico das folhas da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	62
5.1.2 Perfil químico dos galhos da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	66
5.1.3 Perfil químico das cascas da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	69
5.2 Atividades Citotóxica dos extratos de folha, casca e galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	73
5.3 Análise PCA dos extratos de folha, galho e casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	74
5.4 Análise de OPLS-DA dos extratos de folha e casca da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	75
5.5 Análise de OPLS-DA dos extratos de folha e galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	78
5.6 Análise de OPLS-DA dos extratos de casca e galho da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	82
6 CONCLUSÃO	86
7 REFERENCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Myracrodruon Urundeuva, nome científico da espécie conhecida como Aroeira-do-Sertão pertencente à família Anacardiaceae, é uma árvore de grande porte, com tronco medindo cerca de 1 m de diâmetro e presença de ramos flácidos. Pode ser encontrada em diversas regiões do Brasil, do Nordeste ao Centro-Oeste, porém ocorre frequentemente na Caatinga, principalmente no estado do Ceará. O nome aroeira vem de araroeira, derivado de Arara com adição do sufixo “eira” que significa lugar, porque é o local de preferência de pouso e vivência dessa ave (LORENZI and MATOS 2000, BRAGA 2001).

A Aroeira-do-Sertão é uma planta medicinal bastante utilizada popularmente devido às diversas ações farmacológicas que apresenta. É usada no tratamento anti-inflamatório da área da ginecologia, de doenças respiratórias e urinárias, hemorragias, na forma de infusão e decocção, como também no tratamento ginecológico pós-parto e no tratamento de feridas cutâneas. A entrecasca foi estudada em ensaio clínico farmacológico onde obteve ação no tratamento de úlcera péptica (via oral) e de cervitite e ectopia (via local), o que promoveu a formulação de preparações farmacotécnicas conhecidas como “elixir da aroeira” e “creme vaginal de aroeira”. As preparações passaram a ser utilizadas pelo Projeto Farmácias Vivas da UFC em apoio à comunidade local. Recentemente, a Aroeira-do-Sertão foi adicionada a lista oficial da ANVISA de plantas, que são bastante usadas pela população, com potencial uso como fitoterápicos (BANDEIRA 2002, VIANA, BANDEIRA et al. 2003, AQUINO 2013).

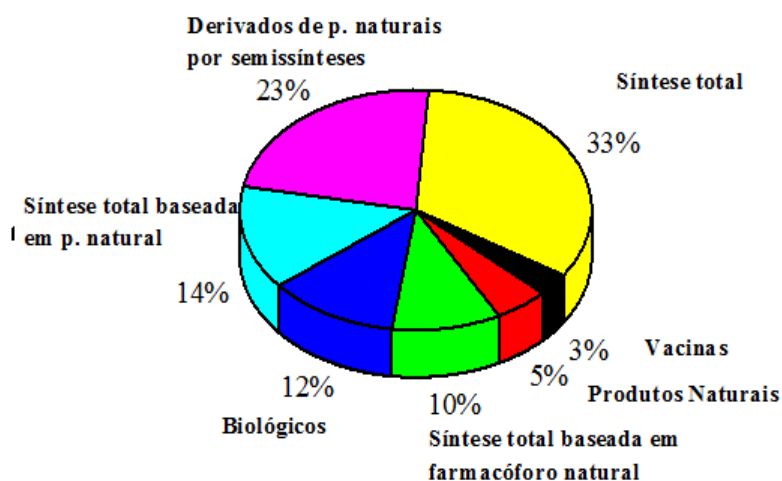
Ainda assim, poucos estudos foram realizados ultimamente na intenção de investigar a composição química dos extratos da Aroeira-do-Sertão. A maioria deles diz respeito à composição da parte que é usada medicinalmente, entrecasca, na descoberta de taninos, polifenóis eligninas e chalconas (BANDEIRA 2002). Os estudos com a folha concentram-se na elucidação química de óleos essenciais da folha (AQUINO 2013). Dessa forma, o presente trabalho objetivou traçar o perfil químico dos extratos etanólicos das várias partes da *Myracrodruon urundeuva*, como folha, galho e casca através da técnica de UPLC/Q-TOFMS/MS aliada as análises quimiométricas, sendo elas: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante Ortogonal dos Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA). Através da comparação com atividade citotóxica *in vitro*, ter uma noção de compostos com potencial ação anticancerígena.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A relevância das plantas medicinais

Qualquer vegetal que seja capaz de produzir compostos biologicamente ativos é denominado de planta medicinal. Geralmente, essas substâncias são consequência do metabolismo secundário das plantas (PIRES and GRIPP 1988). A natureza tem o papel de fornecer todo o material de estudo para o desenvolvimento de novas drogas. Newman e Cragg desde 1997 têm publicado revisões que abordam a quantidade de drogas aprovadas que foram provenientes diretamente de produtos naturais e/ou produtos naturais modificados desde a década de 80. Em 2012, sua quarta revisão demonstrou a relevância dos produtos naturais como alicerce no desenvolvimento de metodologias para produção de novas drogas. Cerca de 80% (79 no total de 99) das drogas anticancerígenas são baseadas em compostos extraídos de fontes naturais, os quais podem ser utilizados diretamente, com alguma modificação estrutural ou como base para a síntese de outros compostos ativos. No caso de agentes anti-infecciosos, em torno de 48,8% (132 no total de 270) dos medicamentos também são produzidos a base de produtos naturais. O levantamento realizado por Newman e Cragg desde a década de 80 demonstra a importância das plantas medicinais como fonte de produtos naturais que se torna uma regra base para a descoberta de potenciais drogas e no desenvolvimento de processos. A figura 1 destaca a participação dos produtos naturais na produção em cerca de 52% das diferentes fontes de agentes terapêuticos (NEWMAN and CRAGG 2012).

Figura 1. Representação gráfica das diversas fontes de agentes terapêuticos.

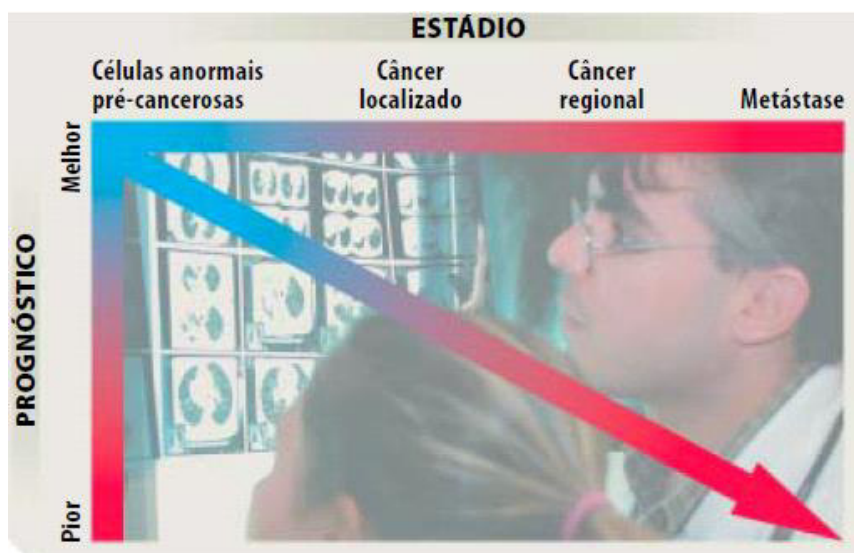


Fonte: Newman e Cragg 2012. Modificada pelo autor.

2.2 Câncer: Aspectos Gerais

O câncer é uma doença que se desenvolve a partir dos mecanismos de multiplicação das células do corpo. As células normais, as quais se organizam para formar os tecidos e órgãos do organismo, realizam o ciclo de vida habitual: dividem-se, amadurecem e morrem. Porém, quando células anormais não obedecem ao ciclo pelo fato da ocorrência de uma modificação genética ou mutação, que pode ocorrer pela ação de diversos fatores, sendo eles biológicos, físicos ou químicos, a doença pode ser formada. Caso o sistema imunológico não seja capaz de eliminar esse tipo de célula, o crescente número delas pode desenvolver as células cancerosas. Essas se multiplicam rapidamente e desordenadamente podendo formar conjuntos que são denominados de tumores. Embora todo esse processo possa demorar anos para ocorrer, o diagnóstico deve ser realizado o mais cedo possível. No prognóstico, que determina as chances de cura do câncer, os médicos analisam diversos fatores, bem como o tipo e estágio do câncer. A figura abaixo é um gráfico que relaciona o estágio do câncer com o prognóstico, o qual se torna mais reduzido na metástase que consiste no espalhamento de tumores por diferentes regiões do corpo (INCA).

Figura 2. Demonstração do efeito dos diferentes estádios do câncer no prognóstico da doença.

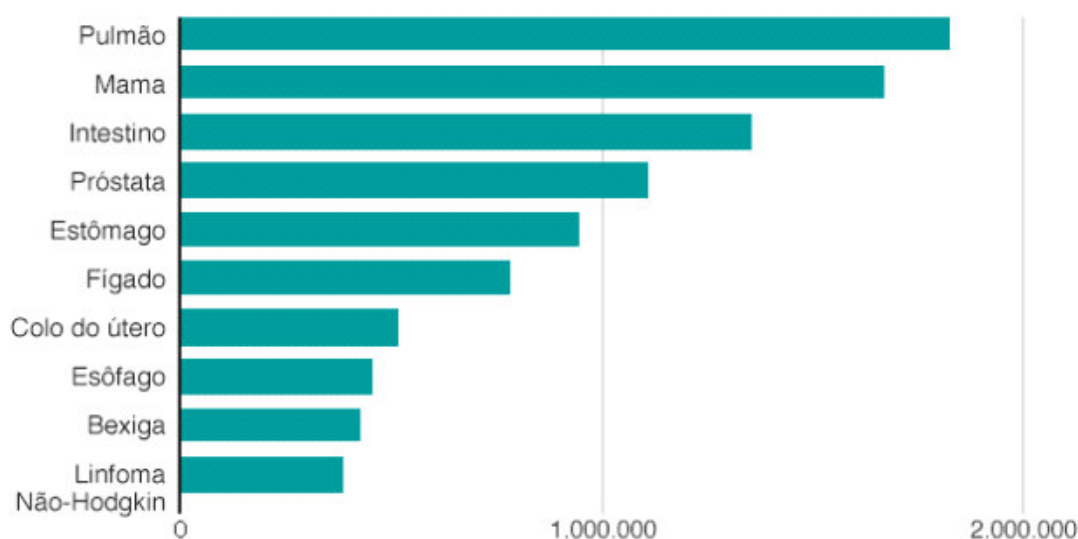


Fonte: INCA.

Em 2012, o projeto Globocan/Iarc publicou dados relativos à estimativa de incidência do câncer no mundo para aquele ano. Segundo os números, dos 14 milhões de novos casos estimados, 60% deles ocorrem em países em desenvolvimento. Porém, o mais alarmante é que dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% deles ocorrem nesses mesmos países.

Com base no mesmo projeto, os tipos de câncer de maior incidência no mundo fora pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). A figura 3 é o gráfico que compara as incidências de diversos tipos de câncer no mundo.



Figura 3. Os 10 tipos de câncer mais comuns diagnosticados no mundo estimados em 2012 pela Globocan.



Fonte: (BBC 2016).

Ainda de acordo com a publicação da Globocan em 2012, os cientistas preveem um aumento de 70% de novos casos de câncer no mundo nas próximas décadas. Em números, isso significa 21,4 milhões de novos pacientes até 2032 (BBC 2016). Segundo dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2015, a estimativa para o Brasil é a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer entre os anos de 2016 e 2017. Os principais tipos são de próstata para os homens e mama para as mulheres. A figura abaixo resume os 10 tipos de câncer estimados para 2016 por sexo (INCA 2015).

Figura 4. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 	Mulheres 	Mama feminina	57.980	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA (2015).

2.3 Câncer: Exploração da Flora do Nordeste Brasileiro na Descoberta de Potenciais Drogas Anticancerígenas

A enorme biodiversidade da flora brasileira justifica por se só o enorme potencial da pesquisa na área de produtos naturais com a finalidade de descobrir e/ou desenvolver novos medicamentos contra o câncer. Grande parte do Nordeste brasileiro é recoberto pela Caatinga (cerca de 70% ou 1,000,000 km²), a qual consiste em uma vegetação xerófila composta principalmente por espécies herbáceas de alto endemismo (cerca de 30% - 180 de 596). Muitas espécies já conhecidas por seus efeitos terapêuticos pela medicina local como *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., *Annona muricata* L., *Allamanda cathartica* L., pau-ferro, *Costus spicatus* Jacq., *Solanum cernuum* Vell, dentre outras, já foram estudadas para avaliação de possível potencial anticâncer (PESSOA, COSTA-LOTUFO et al. 2006).

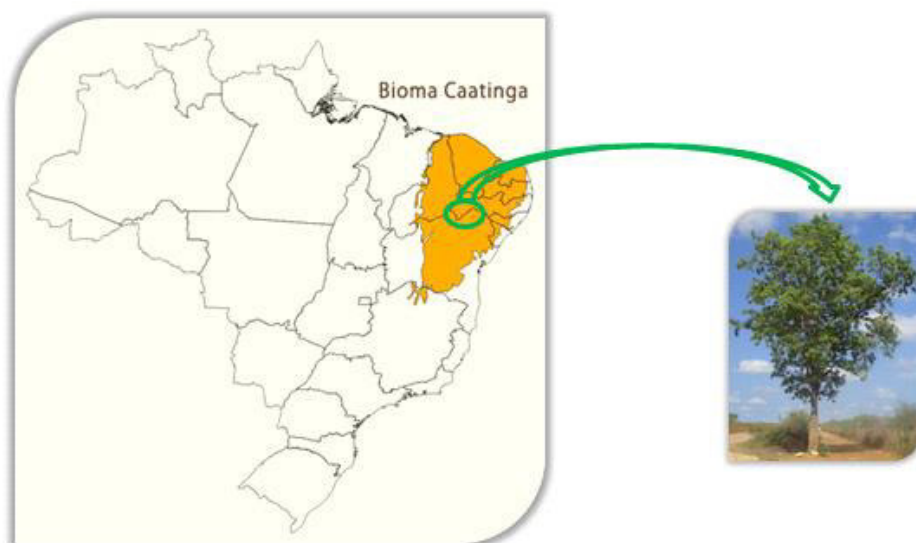
Em 1952, o Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco iniciou um programa de busca por extratos de plantas com alguma atividade biológica. O primeiro estudo com essa finalidade foi realizado por Santana et al. (1968) utilizando o extrato obtido a partir da casca do caule da espécie *Tabebuia avellandae*. O principal componente do extrato, a benzoquinona Lapachol, apresentou grande propriedade antitumoral inibindo em cerca de 82% o crescimento de células do Sarcoma de Yoshida e 50% do Carcinossarcoma de Walker em ratos. Cerca de 37 espécies foram avaliadas contra células KB, onde muitas delas apresentaram valores de IC₅₀ abaixo de 10 µg/mL. Esse estudo foi realizado por Nascimento et al. (1984-1985). Em 1997, Moraes et al. estudou os extratos crus de 75 espécies de plantas brasileiras que produziram redução próximo a 50% no crescimento de tumores. Para que os extratos sejam considerados ativos a inibição deve ser acima de 40% in vivo. Nesse estudo ele observou dez extratos que possuíram notável desempenho sendo eles, com a respectiva inibição em porcentagem: *Plumeria bracteata* (52%), *Tagetes minuta* (51%), *Hymenolobium petraeum* (71%), *Ageratum conyzoides* (43%), *Annona squamosa* (56%), *Obrygnia phalerata* (59%), *Euphorbia tirucalli* (60%), *Croton regelianus* (75%), *Wilbrandia verticillata* (84%) e *Auxemma oncocalyx* (48%). Pessoa et al. (2006) publicaram essas informações além de uma tabela que resume o efeito inibitório contra o crescimento de células cancerosas dos extratos hidroalcoólicos e fitoquímicos de diversas espécies de plantas do Nordeste brasileiro. O resultado mais relevante para esse trabalho é o

fato da *Myracrodruon urundeuva* possuir atividade considerável o que instiga o estudo químico aliado com essa atividade biológica (PESSOA, COSTA-LOTUFO et al. 2006).

2.4 Aroeira-do-sertão: Aspectos Gerais

A aroeira-do-sertão, como é conhecida popularmente, pertence à família Anacardiaceae e possui o nome científico *Myracrodruon urundeuva* Allemão, porém também pode ser encontrada pelo sinônimo *Astronium urundeuva* Engl. Sua ocorrência é observada por toda a região que vai do Ceará até Argentina e Paraguai, portanto pode ser vista em regiões secas como no caso da Caatinga, em destaque na figura 5 com a área de obtenção do material de trabalho, mas também em regiões de florestas úmidas e fechadas (CORREIA 1984).

Figura 5. Mapa da Caatinga com destaque para a região onde se obteve o material de trabalho. Limite entre Petrolina e Lagoa Grande, interior de Pernambuco.



Fonte: Elaborada pelo autor.

É uma árvore que pode ter de 10 a 15 m de altura, porém depende do local de crescimento. Possui tronco alto e reto, coberto por uma casca castanho-escura, a qual é subdividida em placas escamiformes em troncos velhos, porém no caso dos jovens é escamosa e cinzenta. As folhas são dispostas de forma alternada, com 5-7 pares de folíolos ovado-obtusos e pubescentes em ambas as faces. É uma planta dioica, com flores masculinas e femininas pequenas, pendentes, com coloração que varia de parda à purpúrea exibindo pelos brancos. Por consequência, possuem frutos drupáceos, com cerca de 0,5 cm de diâmetro,

ovais, nigrescentes e apiculados (MARTIUS 1967, RIZZINI 1971, VIANA, BANDEIRA et al. 2003). Geralmente, a aroeira-do-sertão floresce entre os meses de junho e julho e frutifica entre agosto e dezembro. Em seu estado vegetativo, ela pode ser confundida com outra espécie que também faz parte da família Anacardiaceae, a *Schinopsis brasiliensis* (Baraúna) (Filho, Santos et al. 2009). Na figura 6, podem-se observar imagens reais da aroeira-do-sertão, bem como da casca e folhas da planta.

Figura 6. Imagens reais da árvore, folhas e casca do caule da espécie *Myracrodruon urundeuva*.



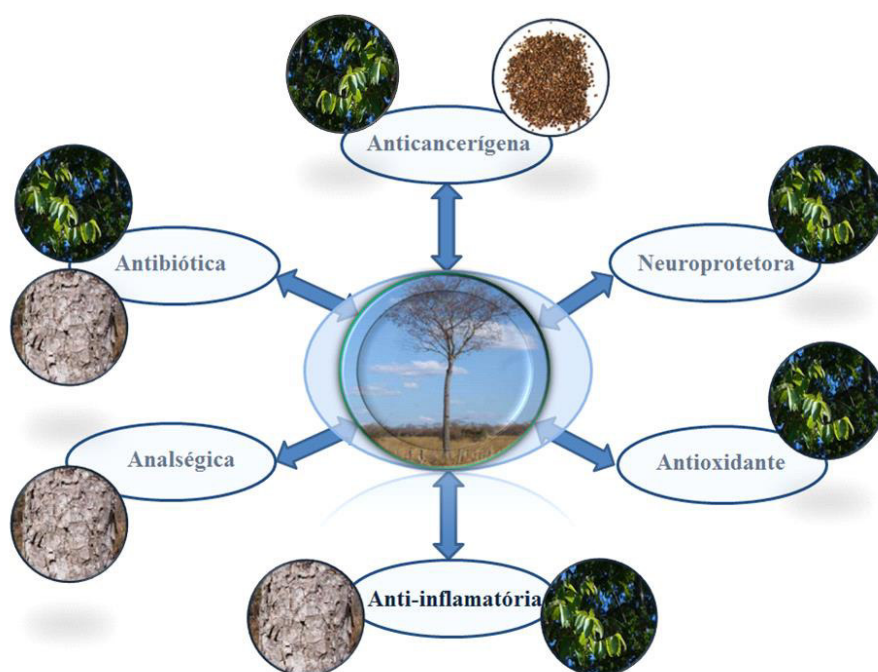
Fonte: Elaborada pelo autor.

A madeira da aroeira-do-sertão possui diversas qualidades que ocasionaram intensa exploração nos últimos 50 anos. Pelo fato de ser bastante resistente à umidade e possuir alta durabilidade, é rotineiramente extraída para a utilização na construção civil, mourões de cerca e curtimento de couro devido ao elevado teor de taninos. A extração exagerada e o manejo impróprio dessa matéria-prima prejudica o uso dessa planta medicinal contra os males os quais são combatidos devido às suas propriedades terapêuticas já comprovadas como anti-inflamatória, anti-infecciosa, cicatrizante, dentre outras (CONCEIÇÃO 1980, BANDEIRA 1993, ALBUQUERQUE, LEAL et al. 2011).

2.5 Aroeira-do-sertão: Importância Biológica

Já são bastante reportadas na literatura especializada em plantas medicinais as atividades biológicas exercidas pelos extratos da *Myracrodruon urundeuva* de diferentes seções como casca, folhas e sementes (Figura 7). Sousa e colaboradores demonstraram os efeitos anti-inflamatórios e contra úlcera gástrica em roedores de uma fração rica em taninos extraídos da entrecasca da aroeira do-sertão usando acetato de etila como solvente (SOUZA, AQUINO et al. 2007). A mesma extração com esse solvente foi realizada por Viana e colaboradores para obtenção de uma fração rica em chalconas, as quais foram responsáveis pelos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios observados nos testes realizados em ratos. Esse trabalho foi de extrema relevância por ter sido o primeiro a relatar efeitos analgésicos centrais e periféricos de chalconas diméricas naturais (VIANA, BANDEIRA et al. 2003).

Figura 7. Relação entre órgão da aroeira-do-sertão com diferentes ações biológicas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A atividade antibiótica também é observada para extratos da planta em questão. Da Silva e colaboradores perceberam esse efeito pela ação dos extratos hidroalcoólico cru e semipuro, o qual foi obtido por sucessivas partições com solventes orgânicos com acréscimo de polaridade. Os extratos foram obtidos a partir da folha e casca, onde especialmente os extratos da folha obtiveram resultados expressivos contra bactérias Gram-positivas, possivelmente pela presença de compostos bioativos que afetam a síntese de peptidoglicanas.

Além disso, realizaram testes de identificação com os extratos obtidos e observaram a presença de diversos metabólitos secundários como taninos hidrolisáveis, flavonoides, saponinas (especialmente na folha), terpenos e esteroides. Apesar disso, eles concluem que experimentos cromatográficos de alto rendimento devem ser realizados para se traçar um melhor perfil das moléculas que possuem tal efeito (DA SILVA, MOTA et al. 2013).

Outro importante estudo realizado recentemente verificou a atividade neuroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas da aroeira. Segundo a literatura, certamente essa atividade é diretamente relacionada com as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias extensivamente relatadas (CALOU, BANDEIRA et al. 2014). Um trabalho bastante relevante publicado em 2011 testou extratos obtidos via semente de 21 espécies de plantas diferentes do Nordeste brasileiro contra linhagens de células tumorais. A única espécie que obteve resultados positivos, principalmente contra a linhagem HL-60 de leucemia [IC₅₀ de 12,5 (9,5-16,7) µg/mL], foi a *Myracrodruon urundeuva*. Adicionalmente, obteve resultado satisfatório contra glioblastoma SF-295 [IC₅₀ de 25,1 (17,3-36,3) µg/mL] e 180 células de Sarcoma [IC₅₀ de 38,1 (33,5-43,4) µg/mL]. Eles observaram a redução dos números de célula, volume e viabilidade além de fragmentação internucleosomal do DNA dependente da dose aplicada. Portanto, concluíram que o extrato etanólico da semente da aroeira-do-sertão induziu o mecanismo de apoptose celular das células tumorais (FERREIRA, FARIAS et al. 2011). Além disso, Pessoa et al. (2006) publicaram resultados referentes a inibição do crescimento de células tumorais sob efeito do extrato etanólico de folhas da Aroeira-do-Sertão. Os valores de IC₅₀ para esse estudo foram de 7,4 µg/mL contra HL-60 e 8,5 µg/mL contra SW1573, os quais são considerados valores relevantes, pois quanto menor o IC₅₀ menor é a quantidade de extrato responsável por essa inibição (PESSOA, COSTA-LOTUFO et al. 2006). Com base nisso e em outros fatores, torna-se importante investigar quimicamente no âmbito de estruturas moleculares que compõem esses extratos ativos biologicamente.

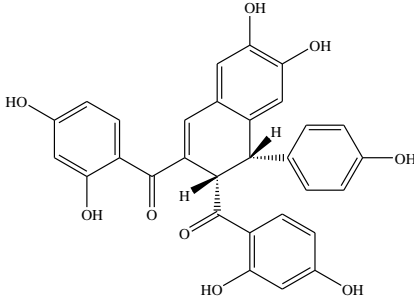
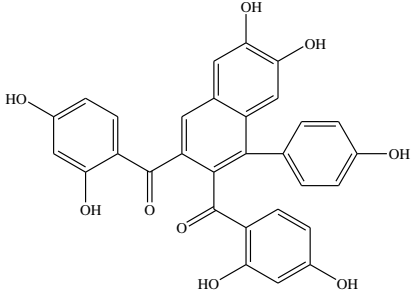
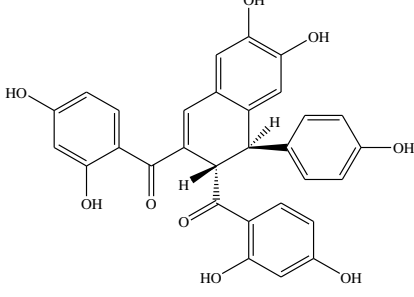
2.6 Aroeira-do-sertão: Compostos Químicos não-voláteis

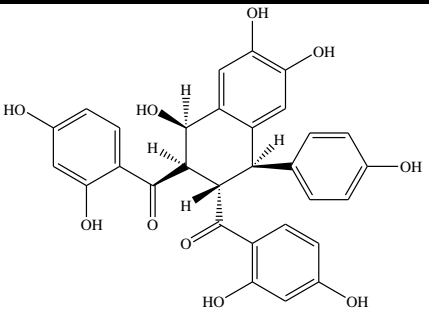
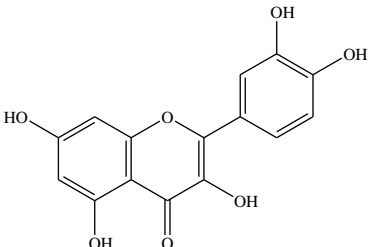
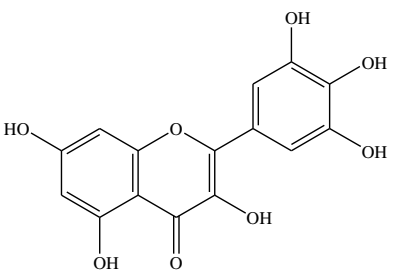
Apesar dos diversos efeitos terapêuticos dos extratos da aroeira-do-sertão de diferentes partes do organismo vegetal, o conhecimento sobre a constituição química bem como o isolamento dos compostos que promovem as atividades biológicas não são tão expressivos. Estudos realizados por Bandeira (2002) com o extrato acetato de etila possibilitou a identificação e isolamento de alguns compostos que posteriormente foram relacionados a algumas atividades terapêuticas como anti-inflamatória, analgésica e

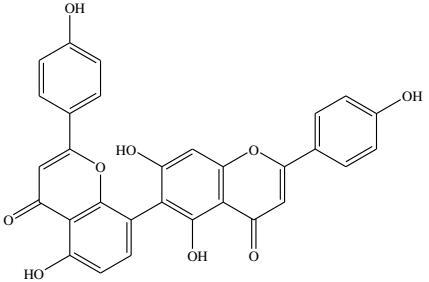
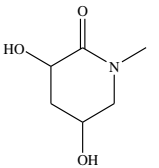
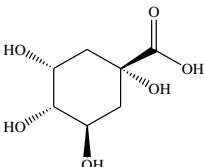
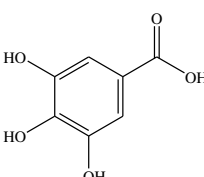
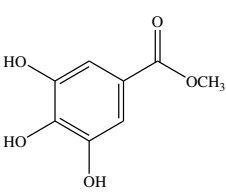
antioxidante (VIANA, BANDEIRA et al. 2003) e no tratamento da conjuntivite alérgica (ALBUQUERQUE, LEAL et al. 2011). Esses compostos foram as chalconas diméricas urundeuvina A (extraída da entrecasca da planta adulta; caule e xilopódio dos brotos), urundeuvina B (extraída da entrecasca da planta adulta; caule e xilopódio dos brotos), urundeuvina C (extraída da entrecasca da planta adulta) e matosina (extraída dos caule e xilopódio dos brotos). Ainda assim, foram identificados outros compostos do mesmo grupo dos flavonoides nas folhas dos brotos, sendo estes quercetina, aromadendrinol e o biflavonóide agastiflavona. No cerne foram encontrados o β -sitosterol e o glicosídeo do β -sitosterol (BANDEIRA 2002).

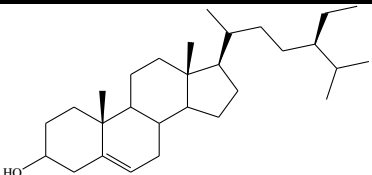
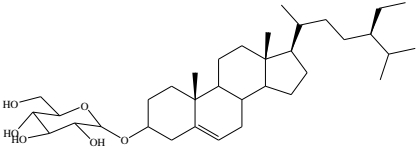
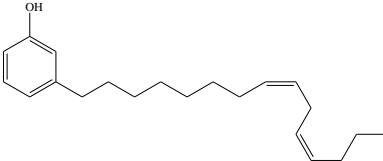
A partir do extrato etanólico da semente da *Myracrodruon urundeuva*, Souza (2012) identificou e isolou um composto que foi ativo contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, vetor da dengue. O composto isolado foi o *m*-pentadecadienil-fenol (SOUZA, CUNHA et al. 2012). A partir dos extratos obtidos através dos decoctos da hidrodestilação das folhas da aroeira-do-sertão que gera como constituinte principal o mirceno, Aquino (2013) identificou quatro compostos sendo um deles inédito na literatura. Os compostos foram: *N*-metil-3*R**,5*R**-di-hidroxi-2-piperidinonam, ácido quínico, ácido gálico e galato de metila. No mesmo trabalho, os extratos foram submetidos a testes farmacológicos, os quais confirmaram a não citotoxicidade e potencial poder anti-inflamatório sob neutrófilos humanos (AQUINO 2013). Todos os compostos mencionados são listados na tabela 1.

Tabela 1. Constituintes não-voláteis extraídos de diversas partes do organismo vegetal da *Myracrodruon urundeuva*.

Componentes	Classe	Estrutura	Fórmula Molecular	Órgão vegetal	Referência
Urundevina A	Chalconas		$C_{30}H_{22}O_9$	Entrecasca (adulta); caule e xilopódio dos brotos)	(BANDEIRA 2002)
Urundevina B	Chalconas		$C_{30}H_{20}O_9$	Entrecasca (adulta); caule e xilopódio dos brotos)	(BANDEIRA 2002)
Urundevina C	Chalconas		$C_{30}H_{22}O_{10}$	Entrecasca (adulta)	(BANDEIRA 2002)

Matosina	Chalconas		$C_{30}H_{24}O_{10}$	Caule e xilopódios (BANDEIRA 2002) brotos
Quercetina	Flavonóides		$C_{15}H_{10}O_7$	Folhas dos brotos (BANDEIRA 2002)
Aromadendrinol	Flavonóides		$C_{15}H_{10}O_8$	Folhas dos brotos (BANDEIRA 2002)

Agatisflavona	Flavonóides		$C_{30}H_{18}O_{10}$	Folhas dos brotos	(BANDEIRA 2002)
<i>N</i> -metil-3 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *-di- hidroxi-2- -piperidinona	Alcalóides		$C_6H_{11}O_3N$	Folhas da planta adulta	(AQUINO 2013)
Ácido quínico			$C_7H_{12}O_6$	Folhas da planta adulta	(AQUINO 2013)
Ácido gálico	Taninos		$C_7H_6O_5$	Folhas da planta adulta	(AQUINO 2013)
Galato de Metila	Taninos		$C_8H_8O_5$	Folhas da planta adulta	(AQUINO 2013)

β -sitosterol	Terpenos		$C_{29}H_{50}O$	Cerne	(BANDEIRA 2002)
Glicosídeo do β -sitosterol	Terpenos		$C_{35}H_{60}O_6$	Cerne	(BANDEIRA 2002)
<i>m</i> -pentadecadienil-fenol			$C_{21}H_{32}O$	Sementes	(SOUZA, CUNHA et al. 2002)

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.7 Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários são compostos químicos produzidos a partir do metabolismo secundários das plantas. Eles são derivados dos metabólitos primários, os quais são conhecidos como precursores do metabolismo secundário. Existem três diferentes precursores: ácido chiquímico que é precursor de compostos aromáticos, acetato que é precursor dos ácidos graxos, polifenóis, isoprenos, prostaglandina, entre outros e aminoácidos que são os precursores dos alcaloides. Dessa forma, os metabólitos secundários são divididos em três grupos gerais: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (GOTTLIEB, KAPLAN et al. 1996, TAIZ and ZEIGER 2013).

Durante grande parte do século XX, acreditava-se que os metabólitos secundários eram biossintetizados a partir de reações da planta ao meio externo. Porém, estudos mais recentes demonstraram que alguns deles possuem papel fundamental na vida do organismo vegetal com ações específicas que depende de diversos fatores. Eles afetam a produção desses compostos como a sazonalidade, ritmo circadiano, idade e estágio de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, entre outros. É interessante notar que esses compostos são distribuídos no reino vegetal de acordo com a espécie analisada, ou seja, um metabólito secundário pode estar presente em determina espécie ao passo que em outra não. Essas características relacionam-se com os fatores mencionados anteriormente e atuam de alguma forma na distinção entre metabólitos primários e secundários (GROS, POMILIO et al. 1985, GOTTLIEB, KAPLAN et al. 1996, GOBBO-NETO and LOPES 2007).

Por mais que estes compostos químicos não sejam ativos no metabolismo principal da planta, eles possuem funções bastante importantes na manutenção da vida vegetal, destacando-se ações sob os mecanismos de competição e sobrevivência. Essas funções ecológicas são resumidas abaixo (TAIZ and ZEIGER 2013):

- Proteção das plantas contra os herbívoros e as eventuais infecções ocasionadas por organismos patogênicos;
- Atração (odor, cor ou sabor) no que diz respeito a agentes polinizadores e dispersores de sementes;
- Agentes de competição planta-planta e nas simbioses planta-microrganismo.

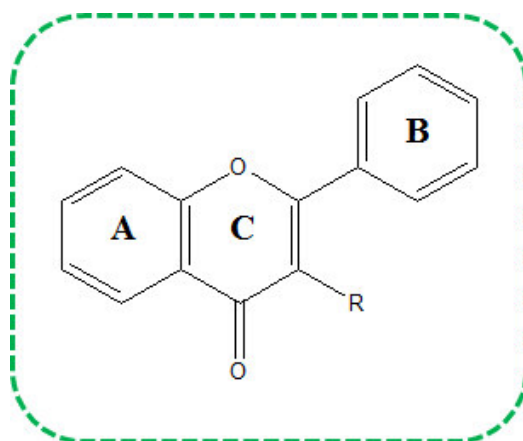
A espécie abordada neste trabalho, *Myracrodruon urundeuva*, possui uma vasta gama de diferentes tipos de metabólitos secundários extraídos já relatados na literatura que dependem da seção do organismo que é usada na extração. Além das atividades ecológicas já mencionadas, eles possuem outras funções que eventualmente podem ser úteis a outros organismos. Com foco neste trabalho o qual analisa os extratos das folhas, cascas e galhos da aroeira-do-sertão, torna-se válido ressaltar as principais classes encontradas nessa seção do organismo vegetal, os flavonoides e os taninos hidrolisáveis.

2.7.1 Flavonóides

Essa classe de metabólitos primários é formada por compostos polifenólicos, ou seja, que apresentam mais de um núcleo aromático. De origem natural, são biossintetizados pela via dos fenilpropanóides. Inúmeras funções são atribuídas a essa classe de compostos nas plantas, destacando-se: proteção dos vegetais contra diversos agentes externos como radiação ultravioleta e visível, insetos, fungos, bactérias e vírus, atração de agentes polinizadores, antioxidantes, controle na taxa de hormônios vegetais, inibidores enzimáticos, dentre outras (SIMÕES, SCHENKEL et al. 2003).

Eles podem ser subdivididos em diversas classes de acordo com a rota biossintética que é seguida para gera-los. São: flavonas, flavonóis e derivados C- e O-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidro-flavonóis, flavanonas, di-hidro-chalconas, flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, neoflavonoides, biflavonoides, dentre outras. A figura 8 mostra o esqueleto principal dos flavonoides (SIMÕES, SCHENKEL et al. 2003).

Figura 8. Estrutura principal de um flavonóide.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Algumas classes de flavonoides tem exibido atividade antitumoral *in vitro* e em modelos animais, sendo elas: chalconas, flavononas, flavonóis, flavonas e isoflavonas. O galato de epigallocatequina, classe dos flavonóis, presente em folhas de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze demonstrou atividade de prevenção em modelo animal de câncer duodenal. Tal atividade foi confirmada pela liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que indica inibição (CHANG and KINGHORN 2001).

2.7.2 Taninos hidrolisáveis

Esse tipo de metabólito pertence a classe geral dos taninos, os quais são compostos que dão característica de adstringência para determinadas seções do organismo vegetal através da interação das proteínas glucoproteínas salivares causando precipitação. Geralmente, essas moléculas são encontradas na natureza na forma de ésteres ou associadas a açúcares. São formados a partir do chiquimato e compreendem os ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados (BRUNETON 1991, HELDT 1997, MONTEIRO, ALBUQUERQUE et al. 2005).

A considerável atividade antioxidante dos taninos é de grande valia no tratamento de doenças degenerativas que estão associadas a altas concentrações de espécies oxigenadas reativas ou radicais livres. Isso porque essa classe de compostos pode atuar na captação de radicais, interceptando as espécies de oxigênio formando radicais estáveis, como: o bloqueio da peroxidação de lipídeos em mitocôndria hepáticas, o bloqueio da lipoxigenase em leucócitos, o bloqueio da xantinoxidase e a repressão da formação de radicais de ânion superóxido (MONTEIRO, ALBUQUERQUE et al. 2005).

2.8 Metabolômica

O campo da metabolômica abrange o estudo de moléculas de baixo peso, sendo útil na descoberta de novos biomarcadores (TAKAYAMA, MOCHIZUKI et al. 2015). A palavra “metabolômica” foi introduzida no meio científico em 1998 por Oliver et al., onde estudou a análise funcional do genoma de uma levedura. Ela possui aplicação em diversas áreas como ferramenta na genômica funcional, aplicações nas pesquisas farmacêutica e médica, na discriminação de diferentes genótipos e os efeitos da manipulação genética, descoberta de produtos naturais e em diversas aplicações na pesquisa de plantas (ERSNET, SILVA et al. 2014).

Dependendo da finalidade do estudo, o estudo metabolômico segue estratégias diferentes. A metabolômica em si abrange um conjunto de análises usadas na identificação e quantificação, desde o preparo da amostra até a análise estatística, de metabólitos como possíveis biomarcadores ou provenientes de alguma alteração no genoma. No entanto, quando se quer analisar de forma rápida uma amostra com o auxílio de uma base de dados de metabólitos, sem identificação ou quantificação, o *fingerprint* metabólico é o ideal. Normalmente ele é usado para métodos de diagnóstico, na indústria ou rotina clínica. Quando os metabólitos são pré-definidos e a quantificação é pré-estabelecida, o estudo passa a ser chamado *metabolite profiling* ou perfil metabólico (FIEHN 2002, MADSEN, LUNDSTEDT et al. 2010).

2.9 Instrumentação Analítica para aquisição dos dados

2.9.1 UPLC/Q-TOFMS/MS

Por muito tempo, técnicas analíticas de identificação e separação de compostos baseadas em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) têm sido utilizadas. Porém, com a redução do tamanho de partícula, que inicialmente promoveu um aumento significativo no poder de resolução da técnica, ocasionou uma desregulação entre poder de resolução e tempo de medida. Esse conflito foi gerado pela incapacidade do sistema de pressão/bombeamento de líquido do equipamento. O desenvolvimento de novos sistemas de bombeando e injeção atingindo pressões elevadíssimas, cerca de 10.000 psi, aliados com tamanhos de partícula abaixo de 2 µm promoveram o surgimento de um novo nível de performance. Para isso, o uso de detectores capazes de processar rapidamente os dados fornecidos pelo sistema cromatográfico foi essencial. A utilização de metodologias a base de LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) têm sido o mais recente meio de investigação cromatográfica de matrizes complexas (CHURCHWELL, TWADDLE et al. 2005).

Metodologias a base do UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) têm significado aos analistas rapidez, resolução e sensibilidade. A coluna cromatográfica dessa técnica é composta por partículas porosas com um tamanho abaixo de 2 µm. Esse fato acarreta aumento de resolução, estreitamento dos picos, aumento da sensibilidade e reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, como possui um sistema de bombeamento de solvente que atinge altas pressões, as quais podem atingir valores acima dos 100 MPa, o tempo de corrida é encurtado. Essa característica é evidenciada pela redução do consumo de solvente

durante as medidas em comparação ao HPLC. O fato da coluna presente no UPLC ser substancialmente menor em comparação a técnica mais antiga, a quantidade de amostra que é injetada também é reduzida. O efeito matriz é quase inexistente na técnica de elevadas pressões, porque a alta resolução e o estreitamento dos picos reduzem demasiadamente a possibilidade de co-eluição. Por isso, é dispensável o uso de métodos de quantificação por adição de padrão, como costuma ser utilizado na técnica convencional, mas sim quantificação por padrão interno, que seria mais bem apropriada (NOVÁKOVÁ, MATYSOVÁ et al. 2006, DE STEENE and LAMBERT 2008, WAN, BAI et al. 2013).

A espectrometria de massa é uma técnica de identificação de compostos baseada na razão m/z dos íons formados durante a medida, bem como das suas abundâncias. Após a passagem da amostra pela coluna cromatográfica, ela atinge a entrada do espectrômetro de massa e passa pela fonte de ionização que possui a função de particionar a amostra em íons. Em seguida, os íons são levados por meio de um campo eletromagnético até o analisador de massa que os separa de acordo com a razão m/z correspondente. Por fim, os íons são identificados pelo detector e o sinal gerado é registrado pelo sistema de dados (Figura 9 – esquema simplificado de um espectrômetro de massa) (PAVIA, GARY et al. 2010).

Figura 9. Esquema simplificado das seções do espectrômetro de massa acoplado ao UPLC usado neste trabalho.

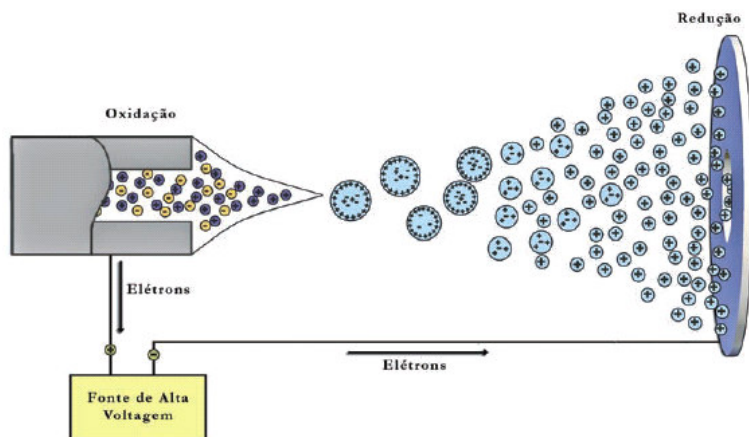


Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectrômetro de massa acoplado ao UPLC ioniza a amostra a partir de um eletrospray (ESI). Esse método de ionização é baseado na formação de um spray de íons quando se aplica um potencial, que pode ser positivo ou negativo, no tubo capilar por onde passa a amostra. Ao se aplicar potencial, ocorre deformação do líquido ocasionado pelo campo elétrico e a formação do cone de Taylor. A ocorrência de processos eletroquímicos favorece a formação gotículas carregadas que entram em contrafluxo de um gás inerte ($N_{2(g)}$), cujo tem a função de evaporar as moléculas de solvente presentes nas gotículas. Com isso, as gotículas diminuem de tamanho continuamente até o surgimento dos íons isolados que por

meio de um campo elétrico são transportados ao analisador. A figura abaixo representa o processo que ocorre nesse tipo de ionização (PAVIA, GARY et al. 2010).

Figura 10. Representação da ionização por eletrospray.



Fonte: (LANÇAS 2009).

O UPLC/Q-TOFMS/MS, técnica utilizada no trabalho, possui um sistema de analisador híbrido compostos por dois analisadores: o quadrupolar e o tempo de voô. O analisador quadrupolar é formado por quatro barras cilíndricas paralelas dispostas de certa maneira que o feixe de íons passe entre elas. As barras geram um campo elétrico que depende de uma faixa de razão m/z escolhida pelo analista. Se o íon possuir a razão dentro da faixa, ele passa normalmente pelas barras em trajetória espiral até atingir o detector. Porém, se o íon possui a razão fora da faixa, ele sai da trajetória e não consegue atingir o detector. Por isso, espectrômetros de massa que possuem apenas o analisador quadrupolar são de baixa resolução. O analisador de massa por tempo de voô baseia-se no tempo que os íons levam para chegar ao detector. Esse tempo depende unicamente da massa do íon, já que todos eles são acelerados com o mesmo valor de energia cinética que segue a fórmula abaixo:

Equação 1. Equação de representação da energia cinética.

$$E = \frac{mc^2}{2}$$

Portanto, os íons atingem o detector em ordem crescente de massa (PAVIA, GARY et al. 2010). Com base nisso, a técnica analítica descrita juntamente com a Quimiometria, descrita posteriormente, são de suma importância na análise do perfil químico da espécie de planta abordada neste trabalho, visto a capacidade já demonstrada na literatura

de análise de amostras que apresentam matriz complexa (FUNARI, CASTRO-GAMBOA et al. 2013).

2.10 Tratamento dos Dados: Quimiometria

A Quimiometria é um método analítico baseado no conjunto de ferramentas matemáticas, estatísticas e computacionais que analisam dados de viés químico a fim de classificar, interpretar, investigar e prever determinado comportamento. Ela é subdividida em diversas subáreas tendo destaque apenas algumas como o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. No planejamento de experimentos existe a procura por variáveis que possuem maior impacto sobre determinado processo. No reconhecimento de padrões, busca-se agrupar amostras que são semelhantes entre si com base em uma vasta gama de informações, que podem ser medidas espectrais, por exemplo, e assim, detectar alguma tendência nos dados. A calibração multivariada estabelece modelos que correlacionam uma série de medidas realizadas em amostras com determinada propriedade (SOUZA and POPPI 2012).

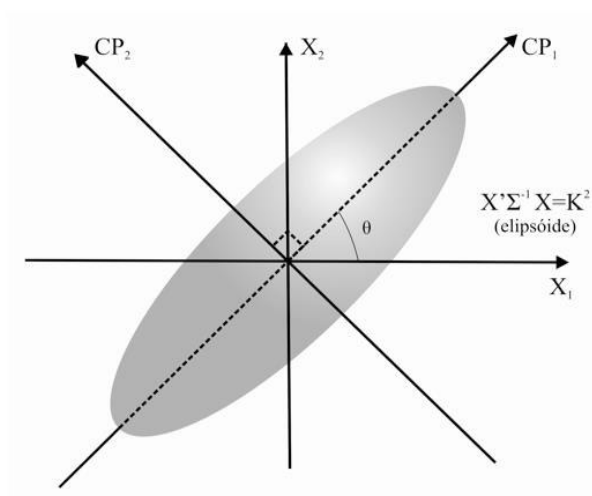
As técnicas quimiométricas de análise multivariada são bastante requeridas no estudo de produtos naturais porque buscam correlacionar o perfil metabólito a uma determinada propriedade biológica. Alguns mecanismos estatísticos são usados para conseguir tal feito como por meio da análise de componentes principais (PCA, Principal Components Analysis), por mínimos quadrados parciais (PLS, Partial Least Squares), por análise hierárquica de agrupamentos (HCA, Hierarchical Cluster Analysis), por análises discriminantes, análises de correlações, entre outros (FUNARI, CASTRO-GAMBOA et al. 2013).

2.10.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

O objetivo do uso desta técnica é reduzir a quantidade de dados da amostra original e ao mesmo tempo preservar o maior número de informações possíveis. Essa redução é realizada por meio do estabelecimento de um conjunto de novas variáveis ortogonais que são combinações lineares das originais, denominadas componentes principais (PCs). Elas são dispostas nos eixos dos gráficos que são obtidos após a análise (PCA). Eles demonstram as relações que existem entre as diferentes variáveis, que é o objetivo central do reconhecimento de padrões auxiliando na interpretação dos dados. Estes gráficos podem ser de natureza bi ou tridimensional (CORREIA and FERREIRA 2007). A figura 11 representa as componentes

parciais de funcionamento da técnica. A PCA é bastante usada, pois possui vantagem na análise de um conjunto de dados multivariados, na exploração de dados, classificação da amostra e análise replicada (BRERENTON 2007, KHAKIMOV, GÜRDENIZ et al. 2015).

Figura 11. Representação gráfica dos autovalores e autovetores.



Fonte: (MARTINS, GODOY et al. 2012)

2.10.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A análise quimiométrica por meio da PLS difere da PCA por adotar dois conjuntos de variáveis regidos por duas equações. Assim como a PCA, também consiste em uma análise multivariada dos dados, porém pela decomposição simultânea das matrizes X e Y . Ainda assim, a interpretação é semelhante à realizada na análise por PCA (KHAKIMOV, GÜRDENIZ et al. 2015).

2.10.2.1 Análise Discriminante Ortogonal dos Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA).

A OPLS-DA é um segmento da PLS-DA, que consiste numa regressão da PLS clássica usada em amostras discriminantes, considerando duas classes de matrizes, onde a variável Y tende a 0 e as outras variáveis a 1. O principal objetivo da PLS-DA é melhorar a separação entre esses dois grupos por meio de classes de informações. Na OPLS-DA ocorre a remoção da variável independente Y (ortogonal) de X (KHAKIMOV, GÜRDENIZ et al. 2015).

A proposta da OPLS-DA é a simplificação da análise, ou seja, a redução da complexidade dos dados por meio dessa remoção da variável não correlacionada. Dessa forma, a interpretação dos dados torna-se mais simplificada, pois a informação é descrita por apenas um componente, porém o poder de predição das duas técnicas (PLS-DA e OPLS-DA) são bastante semelhantes. Além disso, esse tipo de análise é bastante utilizado em estudos metabolômicos devido à análise multivariada de dados e simplificação da interpretação (TRYGG and WOLD 2002). A grande vantagem dessa técnica é a enorme capacidade de evidenciar os metabólitos de maior importância dentro de um grupo, também chamados de discriminantes da amostra, por meio do gráfico-S (S-plot) que apresenta a integração e classificação das variáveis com maior correlação e variância entre os grupos (GOMES 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ❖ Realizar estudo metabolômico os extratos etanólico da folha, galho e casca da *Myracrodruon urundeuva* por meio da UPLC/Q-TOFMS/MS conjuntamente com análise quimiométricas e ensaio citotóxico *in vitro* frente à diferentes linhagens de células cancerígenas com o intuito de gerar o conhecimento de compostos oriundos de uma planta local com potencial atividade anticâncer.

3.2 Específicos

- ❖ Identificar os compostos químicos não-voláteis dos extratos etanólicos da folha, galho e casca da Aroeira-do-Sertão;
- ❖ Testar a potencial atividade citotóxica *in vitro* desses extratos frente às linhagens HL60 (Leucêmica), HCT-116 (Cólon humano), SF295 (Glioblastoma) e RAJI (Leucêmica) de células cancerígenas;
- ❖ Obter diferentes perfis metabólicos a partir dos dados de análise quimiométricas (PCA);
- ❖ Listar as variáveis, ou compostos discriminantes, que influenciam a separação dos grupos através da OPLS-DA e S-plot;
- ❖ Correlacionar os dados de quimiometria e atividade citotóxica com a finalidade de determinar compostos ou grupos de compostos ligados a tal ação.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais utilizados nas metodologias de extração

- Tubos de ensaio de 15 mL;
- Estante para tubos de ensaio;
- Seringa de vidro com agulha;
- Pipeta automática de 5000 uL com ponteiros;
- Vials para UPLC-MS (2 mL);
- Filtros de PTFE de tamanho de poro 0,22 µm;
- Vidrarias auxiliares: proveta, becker, erlenmeyer, pipeta de pasteur;
- Hexano PA;
- Etanol PA;
- Água Milli Q;
- Frascos de penicilina.

4.1.2 Materiais utilizados no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

- Linhagens tumorais: HCT-116, SF-295, HL60 e RAJI;
- DMSO PA;
- 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT);
- Placas de petri.

As células de linhagens tumorais usadas neste trabalho HCT-116 (côlon-humano), SF-295 (Glioblastoma), HL60, RAJI (leucêmica) e PC3 (próstrata) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Elas foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37

°C e atmosfera de 5% de CO₂. Todo o ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da FioCruz.

4.2 Equipamentos

4.2.1 Equipamentos usados na metodologia de extração

- Balança analítica;
- Moinho de facas;
- Vórtex para agitação de tubos de ensaio;
- Banho ultrassom de potência fixa de 135 W;
- Centrífuga sem a necessidade de refrigeração;
- Rota evaporador;
- Liofilizador.

4.2.1 Equipamentos usados no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

- Estufa incubadora de CO₂;
- Centrífuga;
- Espectrofotômetro de placa.

4.3 Reagentes

Os solventes utilizados nos procedimentos de extração foram oriundos da Vetec Química e Tedia High Purity Solvents. No procedimento de análise das amostras via UPLC, os solventes utilizados foram procedentes da LiChrosolv® e da Aldrich Chemical Company. Em todos os métodos, a água de alta pureza utilizada foi produzida a partir do Milli-Q® Integral Purification System da Merck Millipore.

4.4 Obtenção e Tratamento das Amostras

As amostras folha, casca e galho de Aroeira-do-Sertão foram obtidas de plantas aparentemente jovens de ocorrência natural próximas ao limite entre os municípios de Petrolina e Lagoa Grande, interior de Pernambuco, no dia 24 de Agosto de 2016, entre 9 e 10

horas da manhã. Os materiais foram embalados em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada a 50 °C durante uma semana ininterrupta (total de 168 horas).

Previamente a extração, as amostras foram pesadas para obtenção da massa de amostra coletada e em seguida moídas em moinho de facas. Após a moagem, as amostras foram armazenadas em sacos de plástico com tara e guardadas a temperatura ambiente. Na tabela abaixo foi registrado as massas das amostras antes e após a pesagem com a respectiva tara dos sacos de plásticos cujos foram utilizados para a armazenagem do material moído.

Tabela 2. Valores de massa antes (m1) e após a moagem (m2) das folhas, cascas e galhos da Aroeira-do-Sertão com a respectiva tara (T).

Amostra	m1 (g)	m2 (g)	T (g)
Folhas	117,23	118,42	2,81
Cascas	161,35	158,86	2,83
Galhos	107,22	105,50	2,82

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Metodologia de extração para análise exploratória em UPLC

Após a moagem de todo o material, foi realizada a pesagem em balança analítica de cerca de 50 mg de cada seção da planta (folha, casca e galhos) transferidas para os tubos de ensaio, onde se observa os valores de massa na tabela 3. Vale ressaltar que o procedimento foi realizado em triplicata. Portanto, para cada amostra foram necessários três tubos além do necessário para o branco totalizando quatro tubos de ensaio para cada seção da planta analisada.

Tabela 3. Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos da Aroeira-do-Sertão da extração para análise em UPLC.

Amostra	m (g)
MU-F-B	-
MU-F-1	0,0500
MU-F-2	0,0501
MU-F-3	0,0500
MU-G-B	-

MU-G-1	0,0498
MU-G-2	0,0501
MU-G-3	0,0503
MU-C-B	-
MU-C-1	0,0501
MU-C-2	0,0502
MU-C-3	0,0505

Onde MU- *Myracrodruon urundeuva*; B- Branco; 1- 1ª replicata; 2- 2ª replicata; 3- 3ª replicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a pesagem do material seco, foi adicionado 4 mL de Hexano PA. Para facilitar a homogeneização, os tubos foram levados ao vórtex por 1 minuto cada com a seguida extração dos compostos apolares do material em banho ultrassom. Os tubos ficaram sobre ação do ultrassom por 20 minutos com potência fixa em 135 W. Logo após, adicionou-se 4 mL de uma solução Etanol/Água (70:30) a mistura. O mesmo processo descrito acima foi realizada para homogeneização com a seguida extração dos compostos polares (fase etanólica de interesse) em banho ultrassom por 20 minutos. Com a finalidade de separar o extrato não dissolvido da solução, os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 3000 rpm. Ao fim, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, retirou-se uma alíquota de 1 mL da fase etanólica (inferior) e transferiu-a para a seringa acoplada ao filtro de PTFE 0,20 µm. Em seguida, a alíquota foi filtrada, o filtrado foi recolhido em vials e armazenados em ultrafreezer (-80 °C) para posterior análise em UPLC.

4.6 Metodologia de extração para análise anticâncer

O mesmo procedimento de extração descrito na seção 4.4 foi realizado. A diferença consiste na finalização. Em vez de recolher o filtrado em vials para UPLC, ele foi recolhido em frascos de penicilina para posterior rota evaporação. Além disso, as replicatas foram colhidas no mesmo frasco com a finalidade de obtenção da maior massa possível. Após a evaporação, os extratos foram liofilizados e os respectivos tubos de cada amostra foram pesados para obtenção da massa final. É válido ressaltar que os tubos de penicilina foram anteriormente tarados somente com a etiqueta para obtenção da massa inicial do tubo com a finalidade de ao fim calcular a massa do extrato obtida após a liofilização. A tabela abaixo resume todos os valores de massa obtidos nessa metodologia.

Tabela 4. Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos da Aroeira-do-Sertão para análise anticâncer bem como da tara dos frascos de penicilina, massa final dos frascos e massa do extrato obtida.

Amostra	m_a (g)	T (g)	m_f (g)	$m_e = m_f - T$ (g) [R%]
MU-F-1	0,0502	18,3249	18,3499	0,0250 [16,57%]
MU-F-2	0,0503			
MU-F-3	0,0504			
MU-G-1	0,0505	21,0170	21,0350	0,0180 [11,90%]
MU-G-2	0,0504			
MU-G-3	0,0503			
MU-C-1	0,0506	20,7121	20,7327	0,0206 [13,61%]
MU-C-2	0,0505			
MU-C-3	0,0503			

*Rendimento = $(m_{\text{total da amostra}} / m_e) \times 100\%$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a pesagem, o material foi estocado sob refrigeração até o momento da análise biológica.

4.7 Metodologia do ensaio de citotoxicidade *in vitro*

O método MTT foi utilizado nesse ensaio. Esse método é bastante utilizado por grandes centros de pesquisa, pois é rápido, barato e permite investigar a disponibilidade e o estado metabólico das células. Baseia-se na análise colorimétrica da conversão do sal de tetrazolium (MTT) em azul de formazan segundo a ação de enzimas mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas.

Os extratos testados foram dissolvidos em DMSO puro para preparação de uma solução estoque de concentração de 20 mg mL^{-1} . Porém, para a realização dos testes, as amostras foram diluídas para uma concentração única de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As células das linhagens HCT-116, SF295 e HL60 foram plaqueadas nas seguintes concentrações: 7×10^4 , 1×10^5 e $3 \times 10^5 \text{ cels mL}^{-1}$, respectivamente ao passo que a concentração para a linhagem RAJI foi de $4 \times 10^5 \text{ cels mL}^{-1}$. Em seguida, as placas foram incubadas juntamente com as soluções dos extratos previamente preparadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao fim, realizou-se centrifugação e o sobrenadante foi removido. Na sequência, $150 \mu\text{L}$ da solução de

MTT foram adicionados com a seguida incubação das placas por 3 horas. Após, as placas foram novamente centrifugadas para a retirada da solução de MTT. Por fim, o precipitado de formazan foi dissolvido em 150 μ L de DMSO puro para a realização da leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

4.8 Parâmetros de análise realizada em UPLC/Q-TOFMS/MS

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 (150x2,1 mm, 1,7 μ m), com temperatura fixa em 40 °C, utilizando as fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% por 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 a 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V e voltagem capilar de 2,6 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).

4.9 Parâmetros da análise quimiométricas

Todas as análises quimiométricas realizadas neste trabalho seguiram as condições de t_r de 0,88 a 16,2 min e faixa de massa de 120 a 1180 Da. O modelo utilizado para realização do PCA foi centrado na média. As demais técnicas de OPLS-DA e S-plot foram derivadas do PCA, os quais analisaram as variáveis pares t_r -m/z.

4.10 Análise estatística da atividade citotóxica

Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média \pm desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 5*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil químico dos extratos da *Myracrodruon urundeuva* pela análise em UPLC/Q-TOFMS/MS

A partir da metodologia descrita na seção 4.5 foi possível obter extratos etanólicos das amostras de folhas, galhos e casca da Aroeira-do-Sertão, as quais foram analisadas pela técnica UPLC/Q-TOFMS/MS seguindo os parâmetros expostos na seção 4.8, atentando-se para o modo negativo ESI⁻ utilizado. A cromatografia líquida de alto performance acoplada ao espectrômetro de massa baseado na fonte de ionização por eletrospray e analisadores quadrupolo/tempo de voo foi de grande importância para o desenvolvimento do trabalho, visto a capacidade de analisar pequenas quantidades de amostra em corridas curtas com cerca de 20 minutos e obtenção de espectros de massa de alta resolução (m/z com 4 casas decimais). Esse último fator é essencial na identificação dos metabólitos secundários extraídos, ou seja no estudo metabolômico, tendo em vista a enorme quantidade de diferentes compostos com a mesma grandeza de razão m/z que foi observado com a pesquisa na literatura. O reconhecimento desses compostos foi baseado em uma intensa busca na literatura com o auxílio de bases de dados, como PubChem e Chemspider, artigos referentes ao gênero (*Myracrodruon*) e à família (*Anacardiaceae*) e comparação do par t_r - m/z de padrões analisados seguindo os parâmetros já relatados.

Uma vasta gama de diferentes compostos fenólicos foi identificada nos extratos da Aroeira-do-Sertão, como principalmente derivados de flavonoides e taninos. Os compostos majoritários da folha foram a Corilagina, a qual é relatada pela primeira vez para o gênero *Myracrodruon*, mas já foi descrita na família no gênero *Schinopsis* por (HILLIS 1962), Ácido Geraniinico relatado pela primeira vez para a família, derivados de Quercetina, Ácido Gálico e Ácidos Anacárdicos, os quais são bastante relatados para a família. As estruturas da Corilagina, Ácido Geraniinico podem ser observadas na figura 12. A estrutura base dos Ácidos Anacárdicos encontrados neste trabalho podem ser visualizadas na figura 13. Para o galho, os compostos majoritários foram ácido clorogênico, derivados do ácido quínico, e as chalconas diméricas Urundeuvinas A e B relatadas primeiramente por (BANDEIRA 2002) que caracterizam a espécie, além da Corilagina e do mesmo padrão de Ácidos Anacárdicos observado na folha. A casca exibe como compostos majoritários além do ácido clorogênico e das urundeuvinas presentes no galho, derivados da catequina e epicatequina (estruturas na figura 14). Nas figuras 15, 16 e 17 podem ser observados os cromatogramas referentes à

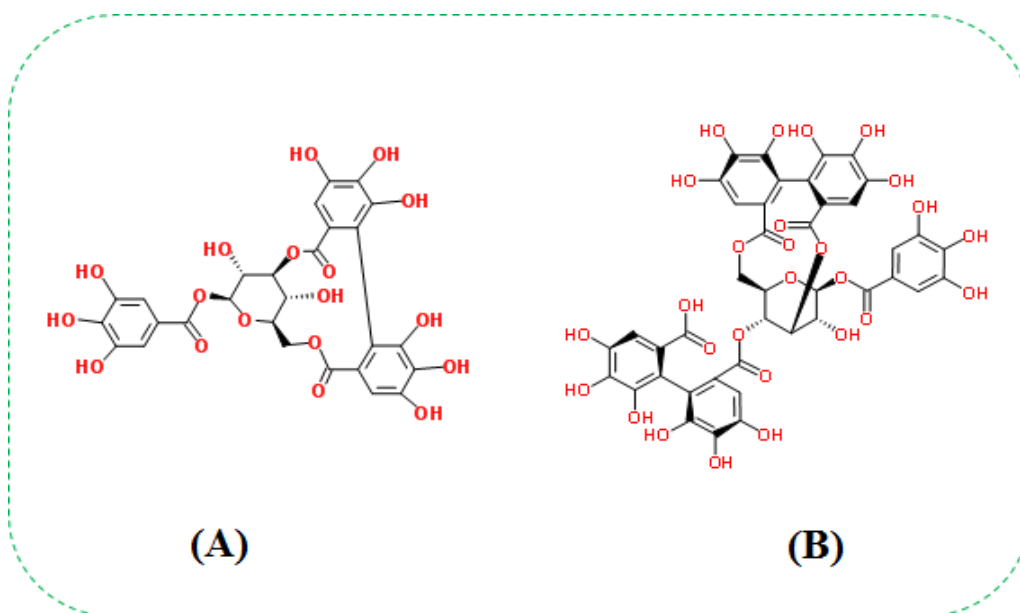
folha, ao galho e à casca da Aroeira-do-Sertão, respectivamente. É válido ressaltar que todas as fórmulas moleculares encontradas obtiveram erro menor que 10 ppm calculado automaticamente pelo software MassLynx seguindo a seguinte equação:

Equação 2. Modelo de cálculo do erro em ppm das fórmulas moleculares obtidas pelo software MassLynx.

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

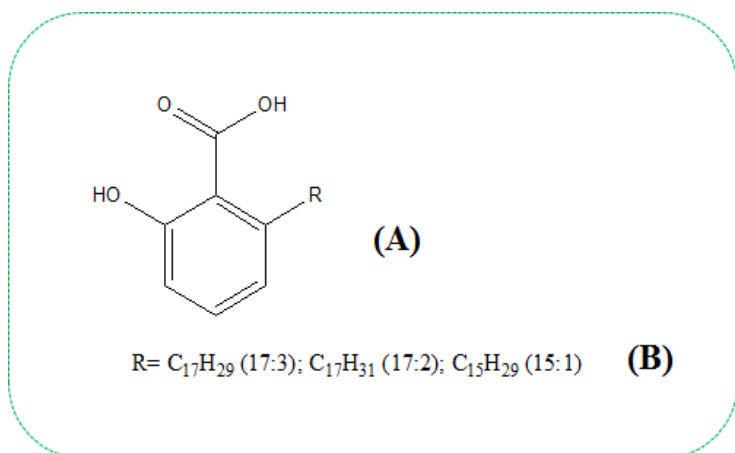
A identificação do perfil químico da planta estudada neste trabalho está exibida nas tabelas 5, 6 e 7 referentes à folha, ao galho e à casca, respectivamente, relatando o tempo de retenção (t_r) de cada pico, bem como as razões m/z calculada e observada, os fragmentos oriundos do MS^2 , a fórmula molecular de menor erro e i-fit registrada pelo MassLynx, o erro em ppm calculado como demonstrado acima, o nome do composto (N.I para os não identificados) e a referência a qual suporta a identificação.

Figura 12. Estruturas químicas da (A) Corilagina e do (B) Ácido Geraniinico.



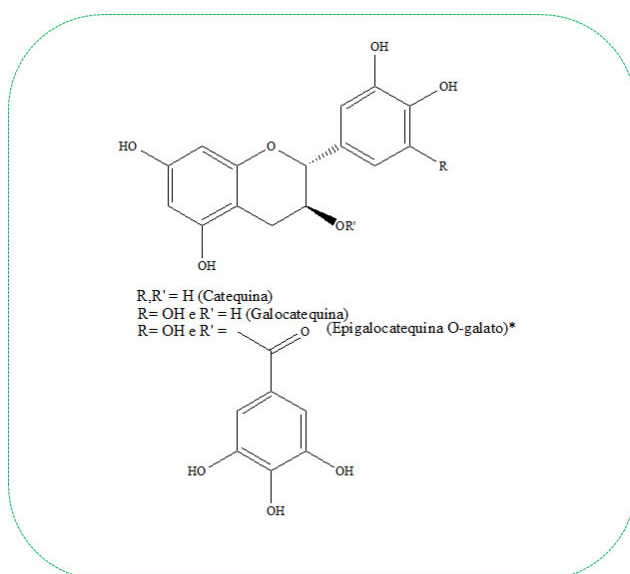
Fonte: ChemSpider.

Figura 13. Estrutura química base dos (A) Ácidos Anacárdicos e (B) substituintes dos encontrados no trabalho.



Fonte: Elaborada pelo autor.

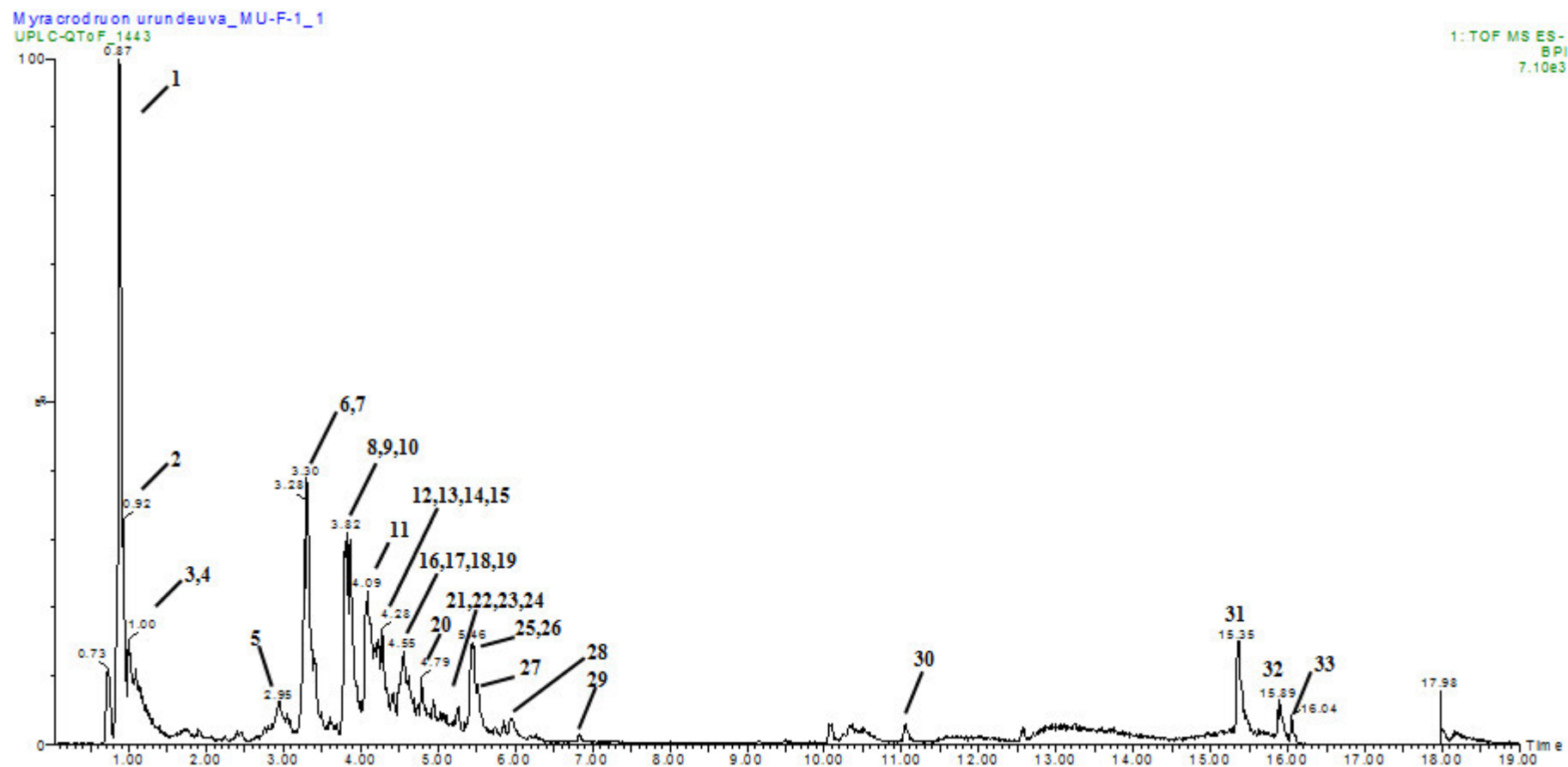
Figura 14. Estruturas base dos derivados da catequina e epicatequina identificados na casca da Aroeira-do-Sertão.



*A ligação OR' está para trás do plano.

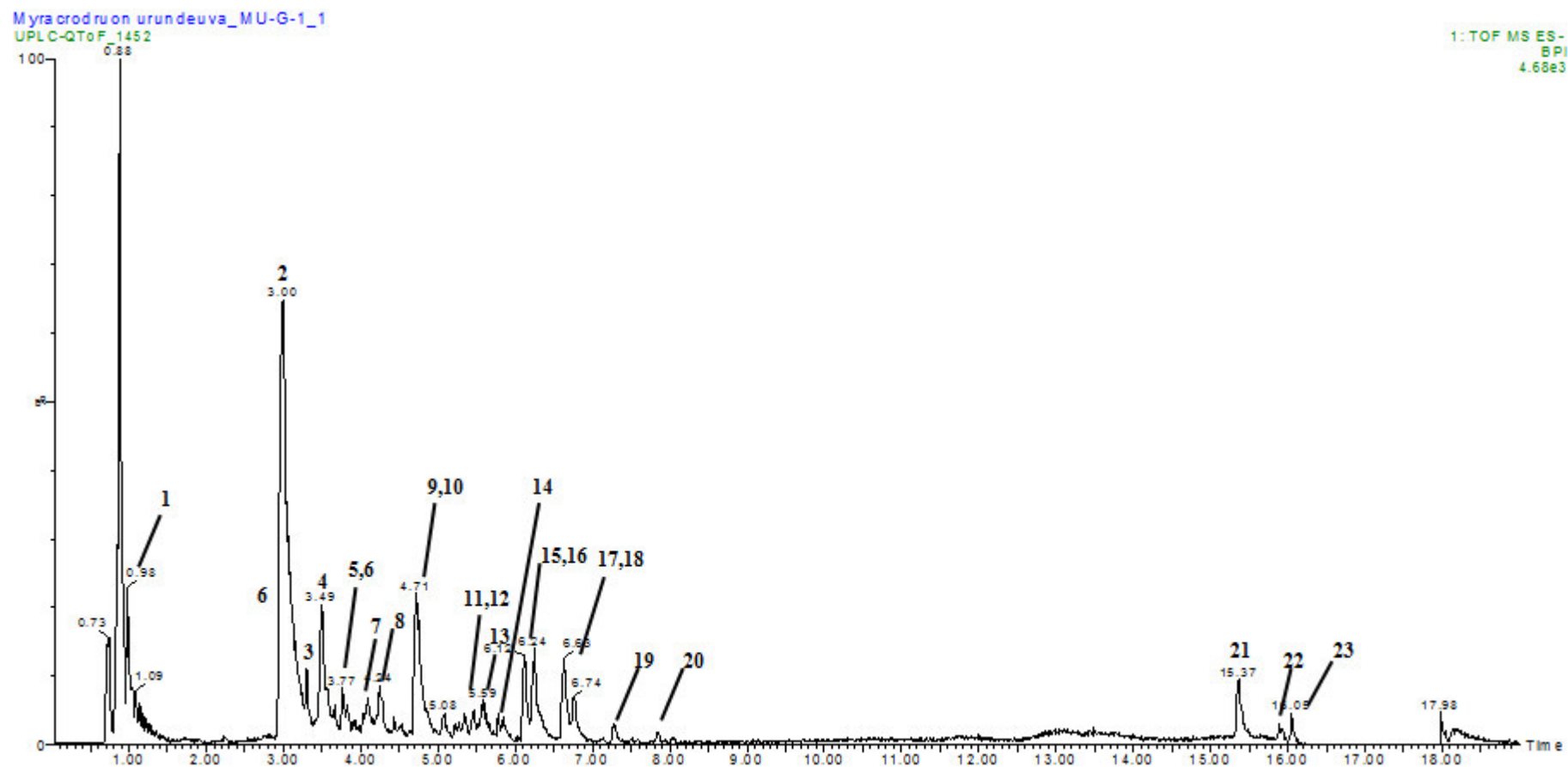
Fonte: Elaborada pela autor

Figura 15. Cromatograma do modo negativo ESI dos extratos da folha da *Myracrodruon urundeuva*.



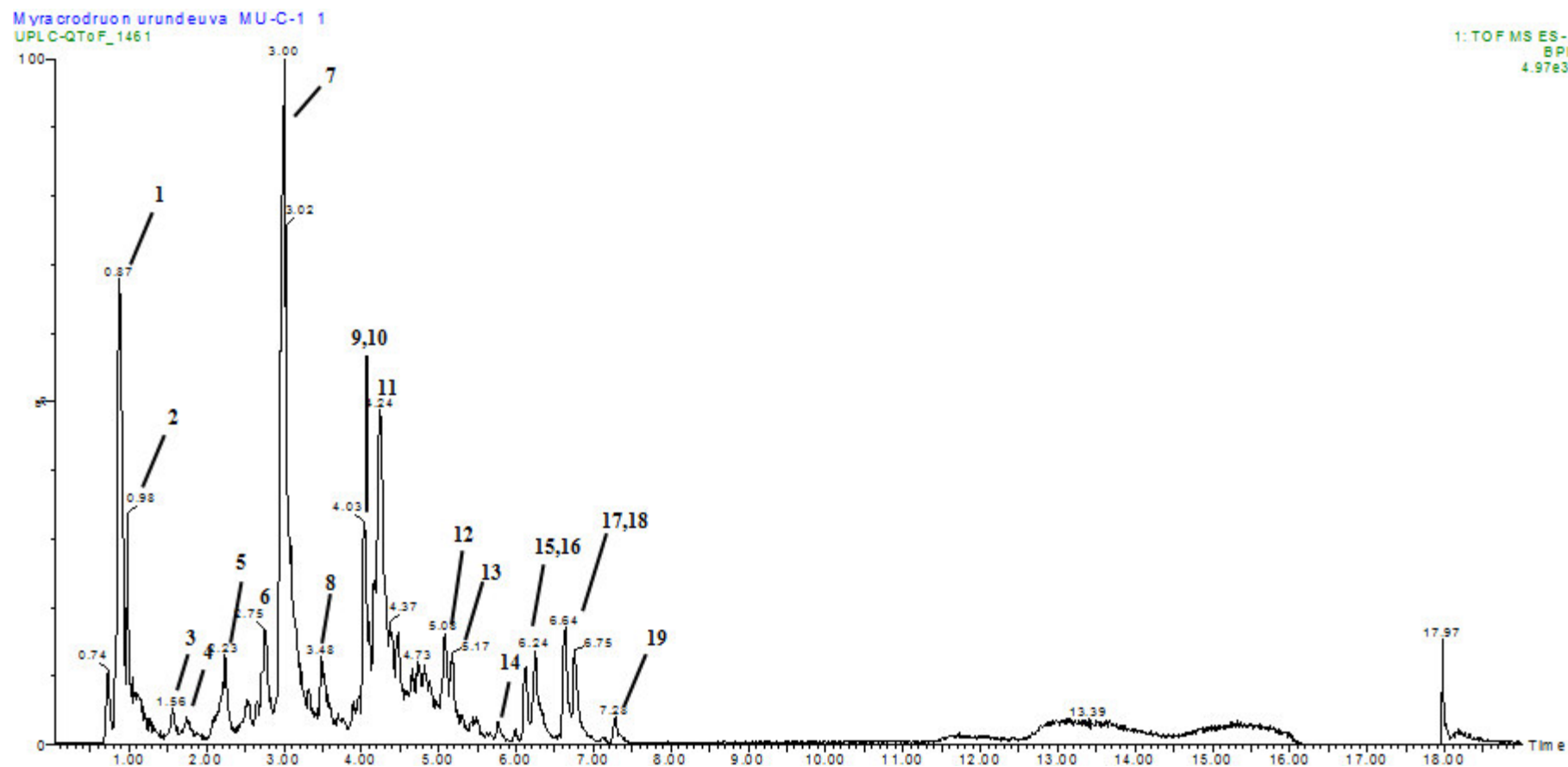
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16. Cromatograma do modo negativo ESI dos extratos do galho da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17. Cromatograma do modo negativo ESI dos extratos da casca da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5. Tentativa de identificação dos compostos não-voláteis presentes no extrato etanólico referente às folhas *da Myracrodruon urundeuva* All.

Pico n°	t_r (min)	[M-H]⁺ Calculado	[M-H]⁺ Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Tentativa Identificação	Referências
1	0,87	191,0556	191,0546	173,0456; 127,0416; 93,0355; 85,0356	C ₇ H ₁₂ O ₆	-5,2	Ácido Quínico	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
2	0,92	191,0497	191,0489	87,0094; 85,0300	C ₁₄ H ₈ O	-4,2	N.I	-
3	0,96	377,0771	377,0799	209,0308; 191,0462; 133,0132; 115,0336; 85,0308	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁	8,3	N.I	-
4	0,98	343,0665	343,0654	191,0480; 169,0123; 125,0247	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	-3,2	Ácido Quínico Galoil	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
5	2,95	321,0247	321,0259	169,0126; 125,0230	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	3,7	Ácido Digálico	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
6	3,25	9510740	951,0764	933,0729; 300,9977	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	2,5	Geraniina	(KUMAR, CHANDRA et al. 2015)
7	3,30	633,0728	633,0744	463,0564; 300,9948	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	2,5	Corilagina	(KUMAR, CHANDRA et al. 2015); PADRÃO

8	3,78	953,0896	953,0887	300,9953; 169,0121	$C_{41}H_{30}O_{27}$	-0,9	Ácido Geraniinico	PROCURAR
9	3,86	785,0837	785,0815	300,9965; 169,0135	$C_{34}H_{26}O_{22}$	-2,8	N.I	-
10	3,94	787,0994	787,1043	635,0976; 483,0720; 169,0121	$C_{34}H_{28}O_{22}$	6,2	Tetra-O-galoil hexosídeo	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
11	4,04	609,1456	609,1486	300,9949	$C_{27}H_{30}O_{16}$	4,9	Rutina	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
12	4,20	463,0877	463,0867	301,0127	$C_{21}H_{20}O_{12}$	-2,2	Quercetina 3-O-galactosídeo	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
13	4,22	477,0669	477,0648	301,0137; 151,0047	$C_{21}H_{18}O_{13}$	-4,4	Quercetina 3-O-glucuronida	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
14	4,23	463,0877	463,0881	301,0102	$C_{21}H_{20}O_{12}$	0,9	Quercetina 3-O-glucosídeo	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
15	4,28	939,1104	939,1104	769,0933; 617,0834; 169,0125	$C_{41}H_{32}O_{26}$	0,0	Pentagaloil hexosídeo	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
16	4,42	433,0771	433,0777	301,0091; 300, 0276	$C_{20}H_{18}O_{11}$	1,4	Quercetina 3-O-xilosídeo	(SCHIEBER, BERARDINI et al. 2003)

17	4,50	433,0771	433,0779	301,0098	$C_{20}H_{18}O_{11}$	1,8	Quercetina 3-O-arabinopiranosídeo	(SCHIEBER, BERARDINI et al. 2003)
18	4,56	433,0771	433,0769	301,0157; 300,0251	$C_{20}H_{18}O_{11}$	-0,5	Quercetina 3-O-arabinofuranosídeo	(SCHIEBER, BERARDINI et al. 2003)
19	4,57	1091,1213	1091,1266	939,1158; 769,0972	$C_{48}H_{36}O_{30}$	4,9	Hexagaloil hexosídeo	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
20	4,79	461,0720	461,0719	315,0167; 299,9943; 169,0120	$C_{21}H_{18}O_{12}$	-0,2	N.I	-
21	4,94	615,0986	615,0977	469,0454; 317,0319; 169,0127	$C_{28}H_{24}O_{16}$	-1,5	Miricitrina O-galato	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
22	5,03	545,0567	545,0521	469,0479; 393,0441; 169,0124	$C_{24}H_{18}O_{15}$	-8,4	Dihidroxibenzoico acetato-digalato	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
23	5,12	621,0575	621,0590	469,5466; 393,0484; 169,0135	$C_{22}H_{22}O_{21}$	2,4	Ácido Vanoleico-galoil Bilactona	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
24	5,26	585,0880	585,0914	301,0345	$C_{27}H_{22}O_{15}$	5,8	Quercetina Galoil-pentosídeo	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
25	5,44	599,1037	599,0995	301,0322	$C_{28}H_{24}O_{15}$	-7,0	Quercitrina 2'' O-	(ABU-REIDAH,

							galato isômero I	ALI-SHTAYEH et al. 2015)
26	5,45	349,0560	349,0540	198,0496; 197,0422; 169,0128; 124,0163	$C_{16}H_{14}O_9$	-5,7	Etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxibenzoato	(DORTA, GONZÁLEZ et al. 2014)
27	5,51	599,1037	599,1052	301,0328	$C_{28}H_{24}O_{15}$	2,5	Quercitrina 2'' O-galato isômero II	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
28	5,93	501,0669	501,0681	349,0569; 197,0431	$C_{23}H_{18}O_{13}$	2,4	Etil <i>p</i> -trigalato	(DORTA, GONZÁLEZ et al. 2014)
29	6,83	327,2171	327,2185	301,0063; 197,0454; 160,0125	$C_{18}H_{32}O_5$	4,3	N.I	-
30	11,05	527,2886	527,2888	339,1956; 277,2189; 255,2327; 183,0122; 116,9280	$C_{27}H_{44}O_{10}$	6,1	N.I	-
31	15,35	369,2430	369,2400	325,2519; 255,2318; 183,0120; 133,0716	$C_{24}H_{34}O_3$	-8,1	Ácido Anacárdico (17:3)	-
32	15,89	345,2430	345,2429	301,2523;	$C_{22}H_{34}O_3$	-0,3	Ácido Anacárdico (15:1)	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
33	16,04	371,2586	371,2587	327,2703	$C_{24}H_{36}O_3$	0,3	Ácido Anacárdico (17:2)	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)

Tabela 6. Tentativa de identificação dos compostos não-voláteis presentes no extrato etanólico referente aos galhos da *Myracrodruon urundeuva* All.

Pico n°	t _r (min)	[M-H] ⁺ Calculado	[M-H] ⁺ Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Tentativa Identificação	Referências
1	0,98	191,0188	191,0192	111,0079	C ₆ H ₈ O ₇	-2,1	Ácido Cítrico	(OJEWOLE 2003); (NG, LAFONTAINE et al. 2004)
2	3,00	353,0873	353,0896	191,0493; 127,0390	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	6,5	Ácido Clorogênico	PADRÃO
3	3,31	633,0756	633,0728	481,0862; 463,0547; 300,9978	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	4,4	Corilagina	PADRÃO
4	3,50	337,0923	337,0910	191,0525; 163,0423; 93,0346	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	-3,9	Ácido Quínico 5- <i>p</i> -coumaroil	(PLAZONIC, BUCAR et al. 2009)
5	3,67	739,1722	739,1738	561,1341; 449,0960; 305,0672; 289,0721; 191,0554; 169,0134	C ₃₂ H ₃₆ O ₂₀	2,2	N.I	-
6	3,77	367,1029	367,1048	191,0548	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	5,2	Ácido Quínico 5-O-feruloil	(PLAZONIC, BUCAR et al. 2009)
7	4,08	497,1295	497,1338	301,0029	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₃	8,6	N.I	-
8	4,28	939,1162	939,1196	769,0943; 467,1019; 357,0903;	C ₃₄ H ₃₆ O ₃₁	3,6	N.I	-
		467,0978	467,1005	217,0140; 169,0139	C ₂₄ H ₂₀ O ₁₀	5,8	N.I	-

		357,0610	357,0640		$C_{18}H_{14}O_8$	8,4	N.I	-
9	4,71	341,0661	341,0647	217,0136; 189,0191; 169,0123	$C_{18}H_{14}O_7$	-4,1	N.I	-
10	4,76	451,1029	451,1027	341,0663; 315,0154; 299,9924; 217,0164; 169,0132	$C_{24}H_{20}O_9$	-0,4	N.I	-
11	5,34	603,1139	603,1172	341,0698; 323,0532; 217,0123; 169,0111	$C_{31}H_{24}O_{13}$	5,5	N.I	-
12	5,44		603,1180	341,0678; 297,0623; 217,0160; 483,1894	$C_{31}H_{24}O_{13}$	6,8	N.I	-
					$C_{23}H_{32}O_{11}$	5,8	N.I	-
13	5,59	447,0716	447,0757	295,0283; 169,0137	$C_{24}H_{16}O_9$	9,2	N.I	-
14	5,78	193,0865	193,0869	178,0597; 163,0395;	$C_{11}H_{14}O_3$	2,1	N.I	-
15	6,12	525,1186	525,1203	447,0691; 415,0824; 389,1017; 371,0922; 135,0076	$C_{30}H_{22}O_9$	3,2	Urundevina A isômero I	(BANDEIRA 2002)
16	6,24	525,1186	525,1195	507,1172; 389,1032; 371,0961; 135,0076	$C_{30}H_{22}O_9$	1,7	Urundevina A isômero II	(BANDEIRA 2002)
17	6,63	525,1186	525,1180	389,1053; 371,0939; 135,0079	$C_{30}H_{22}O_9$	-1,1	Urundevina A isômero III	(BANDEIRA 2002)
18	6,74	523,1029	523,1036	521,0576; 387,0816; 371,0969; 251,0719; 135,0080	$C_{30}H_{20}O_9$	1,3	Urundevina B isômero II	(BANDEIRA 2002)
19	7,27	329,2328	329,2357	229,1500; 211,1381; 171,1021; 135,0294	$C_{18}H_{34}O_5$	8,8	N.I	-
20	7,86	931,3142	931,63	513,1505; 325,1795; 255,2356;	$C_{34}H_{60}O_{29}$	2,3	N.I	-

175,0410

21	15,35	369,2430	369,2426	325,2518; 255,2348; 183,0105; 116,9281	$C_{24}H_{34}O_3$	-1,1	Ácido Anacárdico (17:3)	-
22	15,90	345,2430	345,2445	301,2550; 119,0225	$C_{22}H_{34}O_3$	4,3	Ácido Anacárdico (15:1)	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
23	16,05	371,2586	371,2588	327,2708	$C_{24}H_{36}O_3$	0,5	Ácido Anacárdico (17:2)	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7. Tentativa de identificação dos compostos não-voláteis presentes no extrato etanólico referente à casca da *Myracrodruon urundeuva* All.

Pico n°	t_r (min)	[M-H]⁻ Calculado	[M-H]⁻ Observado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Tentativa Identificação	Referências
1	0,88	191,0556	191,0545	85,0312	C ₇ H ₁₂ O ₆	-5,8	Ácido Quínico	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
2	0,95	133,0137	133,0129	115,0042	C ₄ H ₆ O ₅	-6,0	Ácido Málico	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
3	1,56	331,0665	331,0666	169,0135; 89,0265	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	0,3	Galoil Glucose	(DORTA, GONZÁLEZ et al. 2014)
4	1,75	343,0665	343,0689	191,0537; 169,0145; 125,0258	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	7,0	Ácido quínico galoil	(ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016)
5	2,24	305,0661	305,0653	125,0232	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-2,6	Galocatequina / Epigalocatequina	(SCHULZE-KAYSERS, FEUEREISEN et al. 2015); (MIKETOVA, SCHRAM et al. 2000)

6	2,76	483,0775	483,0813	331,0816; 169,0153	$C_{20}H_{20}O_{14}$	7,9	Digaloil Hexosídeo	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015)
7	3,00	353,0853	353,0883	191,0567	$C_{16}H_{18}O_9$	2,8	Ácido clorogênico	PADRÃO
8	3,48	457,0771	457,0768	305,0664; 169,0125; 125,0248	$C_{22}H_{18}O_{11}$	0,0	Epigallocatequina- 3-O-galato	(MIKETOVA, SCHRAM et al. 2000); (SUN, LIANG et al. 2007)
9	4,03	357,0610	357,0596	231,0304; 217,0113; 177,0165; 125,0250	$C_{18}H_{14}O_8$	-3,9	N.I	-
10	4,10	497,1284	497,1295	313,0569; 217,0141; 169,0131	$C_{22}H_{25}O_{13}$	-2,2	N.I	-
11	4,24	467,0919	467,0902	357,0596; 217,0108	$C_{31}H_{16}O_5$	-3,6	N.I	-
12	5,08	619,1088	619,1078	467,0990; 449,0925; 357,0618; 449,0909	$C_{31}H_{24}O_{14}$ $C_{17}H_{22}O_{14}$	-1,6 -6,2	N.I N.I	- -
13	5,18	629,1286	629,1295	519,0919; 467,1021; 409,0577; 357,0553; 177,0170; 169,0126	$C_{33}H_{26}O_{13}$	-1,3	N.I	-
14	5,97	523,1029	523,1057	467,0979; 387,0932; 357,0617; 251,0755; 169,0178	$C_{30}H_{20}O_9$	5,4	Urundeuvina B isômero I	BANDEIRA (2002)
15	6,12	525,1186	525,1183	467,1109; 415,0845; 389,1050; 371,0915; 135,0123	$C_{30}H_{22}O_9$	-0,6	Urundeuvina A isômêro I	BANDEIRA (2002)
16	6,24	525,1186	525,1191	467,0904; 415,0870; 389,0987;	$C_{30}H_{22}O_9$	1,0	Urundeuvina A	BANDEIRA

				371,0880; 135,0065			isômero II	(2002)
17	6,63	525,1186	525,1189	415,0841; 389,1058; 371,0908; 135,0085	$C_{30}H_{22}O_9$	0,6	Urundevina A isômero III	BANDEIRA (2002)
18	6,75	523,1029	523,1046	387,0881; 251,0710	$C_{30}H_{20}O_9$	3,2	Urundevina B	BANDEIRA
		525,1186	525,1205	371,0945; 135,0091	$C_{30}H_{22}O_9$	3,6	isômero II	(2002)
							Urundevina A isômero IV	
19	7,26	329,2328	329,2348	251,0757; 229,1458; 211,1344	$C_{18}H_{33}O_5$	6,1	N.I	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

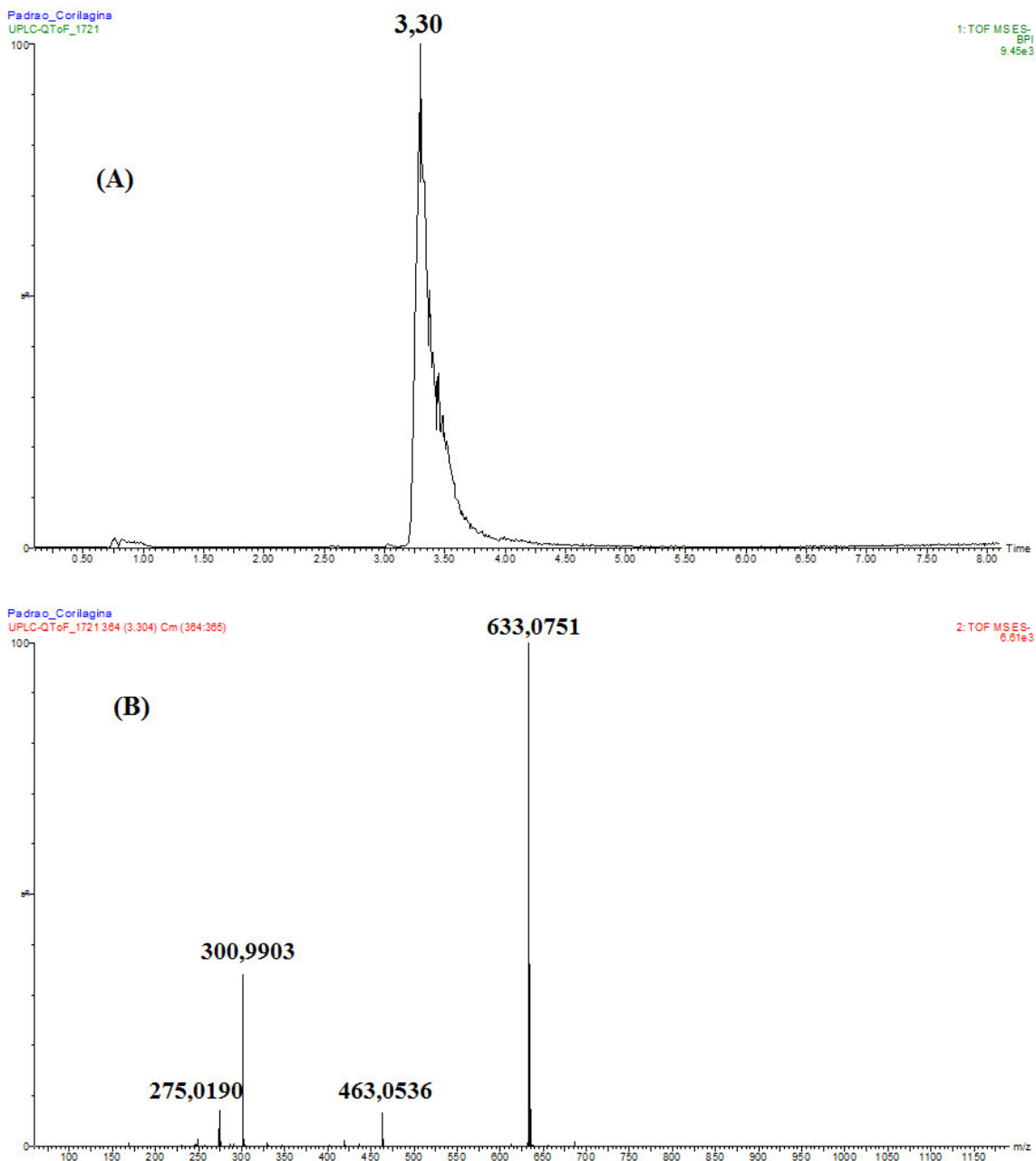
5.1.1 Perfil químico das folhas da *Myracrodruon urundeuva*

O composto 1 apresentou em seu espectro de massa MS o íon molecular 191,0546 [M-H]⁻, que de acordo com (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015) indica a presença do Ácido Quínico. Essa correlação foi baseada também nos íons fragmentos do MS/MS pela presença do íon 173,0456 [M-H-18,0090]⁻ que indica perda de uma molécula de H₂O. O composto 4 apresentou no MS um íon de baixa intensidade em 343,0654 [M-H]⁻ e 191,0454 [M-H]⁻ como pico base. No MS² houve redução do íon de mais alta intensidade e permanência do íon base com pequena mudança nas últimas duas casas decimais. Segundo (ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016) e (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015), esse íon de maior massa é correspondente ao composto Ácido Quínico Galoil devido à presença além do fragmento em 191,0480 Da, que seria a perda de uma porção Galoil de 152 Da sugerindo o Ácido Quínico desprotonado, o aparecimento dos fragmentos em 169,0123 e 125,0247 Da, que sugere a presença do Ácido Gálico. O fato do pico do íon molecular ser em relação ao fragmento já no MS sugere quebra na fonte de ionização. Esse fenômeno acontece em casos de compostos que apresentam alta instabilidade e no momento da formação dos íons ocorrem fragmentações. O composto 5 apresentou razão *m/z* 321,0259 [M-H]⁻. Com base no espectro de MS², o qual exibiu fragmentos em 169,0126 e 125,0230, esse composto foi identificado como Ácido Digálico, também observado por (ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016) com mesmo padrão de fragmentação.

O composto 6 possui espectro de massa com *m/z* em 951,0764 [M-H]⁻, que apresentou como fragmentos os íons 933,0729 e 300,9977 Da. Com base em intensa busca na literatura, essa molécula foi identificada como Geraniina relatada por (KUMAR, CHANDRA et al. 2015) que observou o mesmo padrão de fragmentação, destacando-se o íon em 300 Da como Ácido Elágico. O composto 6 não foi relatado pela literatura até o momento como pertencente ao gênero e à família. O composto 7, com base no mesmo artigo que relatou a Geraniina e no padrão analítico, foi identificado como Corilagina possuindo *m/z* de 633,0744 [M-H]⁻. O principal fator levado em consideração como termo de comparação com o padrão analítico foi o tempo de retenção e como pode ser observado na figura 18, ele foi o mesmo observado no cromatograma abordado (figura 15) igual a 3,30 min. Além disso, os fragmentos em 463,0536 e 300,9903 Da observados no padrão também estão de acordo com o composto observado no tempo de retenção referido, fato que dá suporte a identificação. Esses fragmentos são gerados pela perda consecutiva de uma unidade de galoil e água (170 Da) e o íon em 300 Da é referente ao Ácido Elágico (KUMAR, CHANDRA et al. 2015). O composto

8 apresentou m/z de 953,0887 $[M-H]^-$ com fragmentos no MS^2 de 300,9953 e 169,0121 Da, sendo identificado como Ácido Geraniinico.

Figura 18. (A) Cromatograma e (B) Espectro de Massa de Alta Resolução do padrão analítico Corilagina analisado em UPLC/Q-TOFMS/MS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

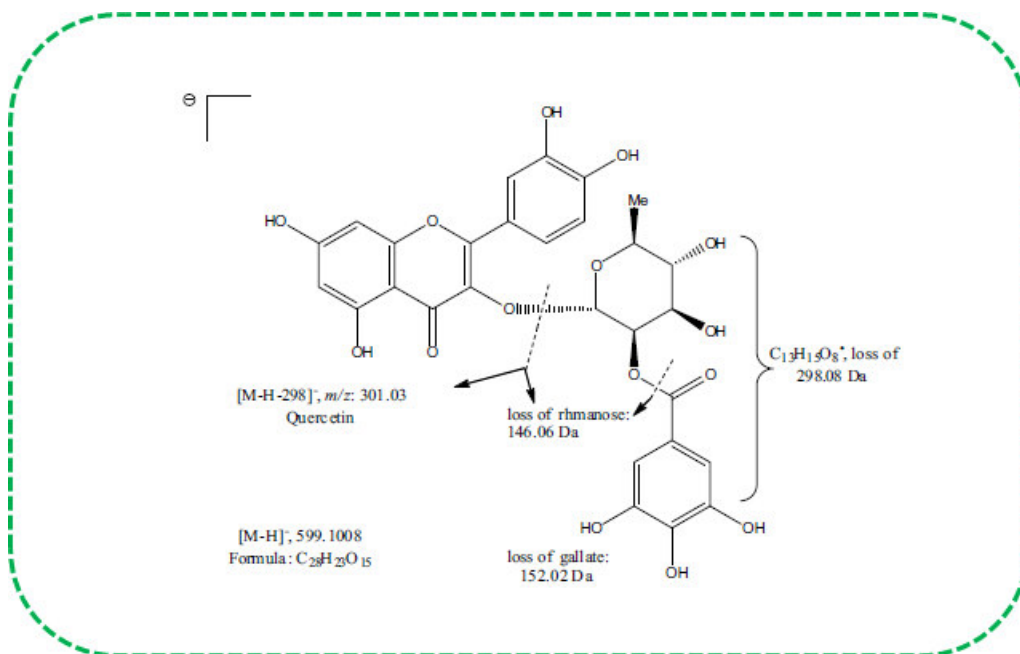
O composto 10 apresentou m/z de 787,1043 $[M-H]^-$, com fragmentos de 635,0976, 483,0720 e 169,0121 Da. Esse padrão de fragmentação com sucessivas perdas de 152 Da é compatível com moléculas de galoil associada a um hexosídeo. Esse comportamento foi

observado em tempos de retenção diferentes para os compostos 15 e 19, 939,1104 e 1091,1266 [M-H]⁻ respectivamente. Porém, além desse tipo de fragmentação, segundo (BERARDINI, CARLE et al. 2004), essas moléculas também podem apresentar perda de unidades de 170 Da que equivale a uma molécula de Ácido Gálico neutra. Esse fato foi observado com o aparecimento dos fragmentos em 769,0933 e 769,0972, respectivamente. Com base nos íons moleculares, na ordem de eluição e padrão de fragmentação, os compostos 10, 15, e 19 foram identificados como Tetra-O-galoil hexosídeo, Pentagaloil hexosídeo e Hexagaloil hexosídeo respectivamente de acordo com (ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016). O composto 11 foi identificado como Rutina também encontrado por (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015) e mostrou razão *m/z* de 609,1486 [M-H]⁻. O padrão de ramificação foi confirmado pela presença do fragmento em 300,9949 Da observado por (KUMAR, CHANDRA et al. 2015).

Os compostos 12, 13 e 14 apresentam *m/z* 463,0867, 477,0648 e 463,0881 [M-H]⁻ respectivamente e são derivados da Quercetina. Esses três flavonoides possuíram coeluição, portanto a ordem de eluição observada por (ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016) foi levada em consideração. Foram identificados como Quercetina 3-O-galactosídeo, Quercetina 3-O-glucuronida e Quercetina 3-O-glucosídeo, respectivamente. Segundo (SHUKRI and ALAN 2010), a perda de uma unidade de 162 Da originando o fragmento em 301 Da (Quercetina desprotonada) caracteriza o derivado de hexosídeo e que há a regra geral de eluição prioritária do derivado da galactose e em seguida o derivado da glicose. De acordo com (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015), o íon molecular em 477,0648 Da gera o fragmento 301,0137 Da devido à perda de Ácido Glucorônico de 176 Da. Os compostos 16, 17 e 18 também são derivados de Quercetina, porém com uma molécula de pentosídeo associada justificada pela perda de 132 Da do íon molecular 433,0777, 433,0779 e 433,0769 [M-H]⁻ originando fragmentos em 301 Da. Eles foram identificados como Quercetina 3-O-xilosídeo, Quercetina 3-O-arabinopiranosídeo e Quercetina 3-O-arabinofuranosídeo seguindo a mesma ordem de eluição proposta por (SCHIEBER, BERARDINI et al. 2003) e (SHUKRI and ALAN 2010). Outros derivados de Quercetina também identificados foram os compostos 24, 25 e 27 que são Quercetina Galoil-pentosídeo, Quercitrina 2'' O-galato isômeros I e II, respectivamente. Para o derivado do galoil-pentosídeo a razão *m/z* foi 585,0914 [M-H]⁻ observado também por (ERSAN, ÜSTÜNDAG et al. 2016). De acordo com (SALDANHA, VILEGAS et al. 2013), o fragmento em 301,0345 Da é observado pela perda de 132 e 152 Da, que corresponde as porções de pentosídeo e galoil, respectivamente. Na figura 19 pode-se

observar a fragmentação da Quercitrina 2'' O-galato relatada por (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015), que apresenta m/z de 599 com perda de 298 Da referente a unidade de raminosídeo-galato gerando o fragmento de 301 Da. No caso deste trabalho, as massas exatas dos íon moleculares foram de 599,0995 e 599,1052 Da. Portanto, os fragmentos gerados no espectro de segunda ordem foram de 301,0322 e 301,0328 Da, respectivamente.

Figura 19. Padrão de fragmentação do íon m/z 599 $[M-H]^-$ referente à Quercitrina 2'' O-galato.



Fonte: ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015).

O composto 21 obteve m/z de 615,0977 $[M-H]^-$ e segundo (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015) apresenta o mesmo padrão de fragmentação do composto 25 com perda de uma unidade de 298 Da identificado como Miricitrina O-galato. Essa fragmentação gerou o íon 317,0319 Da. O composto 22 apresentou m/z de 545,0521 $[M-H]^-$ e foi identificado como Dihidroxi-benzoico acetato-digalato (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015). O composto 23 foi identificado como Ácido Vanoleico-galoil Bilactona com base na referência já citada pela tabela 6 e apresentou íon molecular de m/z 621,0590 $[M-H]^-$. O assinalamento foi confirmado pela perda de 152 Da referente a uma unidade de galoil originando o fragmento em 469,0479 Da referente ao Ácido Vanoleico Bilactona. O composto 26 apresentou razão m/z de 349,0540 $[M-H]^-$, com fragmentos no MS^2 de 197,0422 e 169,0128 Da sugerindo a presença de Etil Galato e Ácido Gálico, respectivamente. Ele foi identificado como Etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxybenzoyl)oxibenzoato de acordo com (DORTA, GONZÁLEZ et al. 2014). O composto 28 foi identificado como Etil p-trigalato de

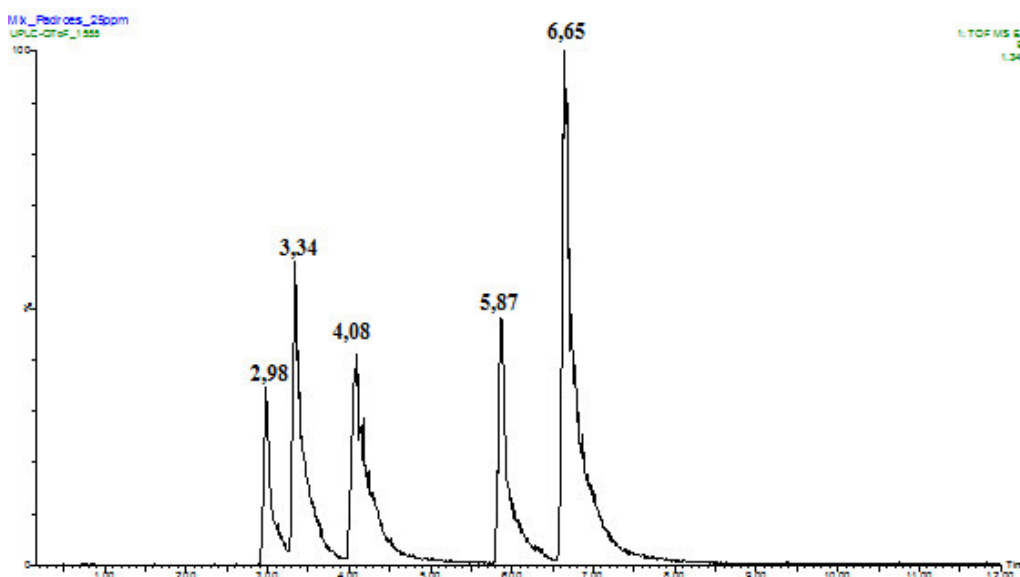
acordo com a mesma referência do composto 26 apresentando m/z de 501,0681 $[M-H]^-$. O espectro de segunda ordem mostrou os fragmentos em 349,0569 e 197,0431 referentes à perda sequencial de duas unidades de galoil.

Os compostos 31, 32 e 33 foram identificados como Ácidos Anacárdicos (17:3), (15:1) e (17:2), respectivamente apresentando m/z 369,2400, 345,2429 e 371,2587 $[M-H]^-$. Todos eles apresentam perda de uma molécula de CO_2 equivalente a 44 Da no MS^2 , comum nesse tipo de molécula, originando os fragmentos 325,2519, 301,2523 e 327,2703 Da, respectivamente.

5.1.2 Perfil químico dos galhos da *Myracrodruon urundeuva*

O composto 1 demonstrou em seu espectro de primeira ordem o íon molecular de m/z igual a 191,0192 $[M-H]^-$ e com base em seu espectro MS^2 foi possível identificá-lo como Ácido Cítrico sugerido por (NG, LAFONTAINE et al. 2004) pelo aparecimento do fragmento em 111,0079 Da. Esse fragmento é gerado pela perda de uma unidade de CO_2 44 Da e duas de H_2O 36 Da (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, LÓPEZ-MARTÍNEZ et al. 2010). O composto 2 foi identificado baseado em um mix de padrões injetados. O cromatograma referente ao mix pode ser observado na figura 20. De modo comparativo, observa-se que esse composto possui praticamente o mesmo tempo de retenção do Ácido Clorogênico, que elui em 2,98 min. Para confirmar a identificação, o espectro de massa do padrão no tempo referido foi analisado, onde se observou o íon molecular com m/z em 353,0945 $[M-H]^-$ e no MS^2 o aparecimento do mesmo fragmento em 191,0551 Da (figura 21).

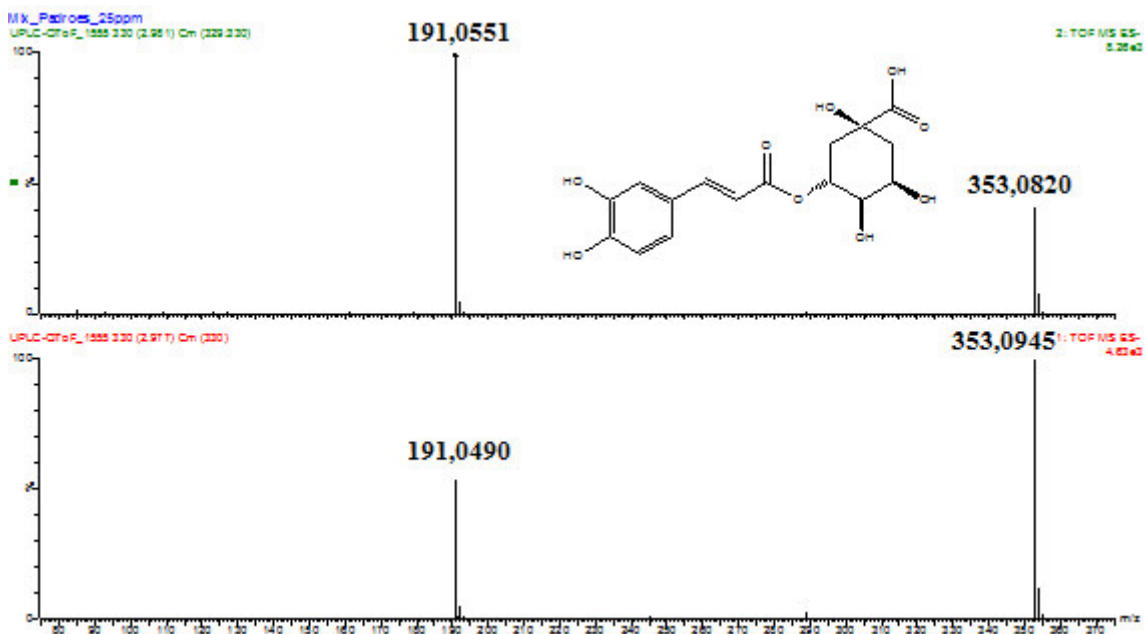
Figura 20. Cromatograma do Mix de padrões.



*ÁCIDO CLOROGÊNICO: 2,98 min.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21. Espectro de Massa de Alta Resolução do padrão de Ácido Clorogênico em modo negativo.

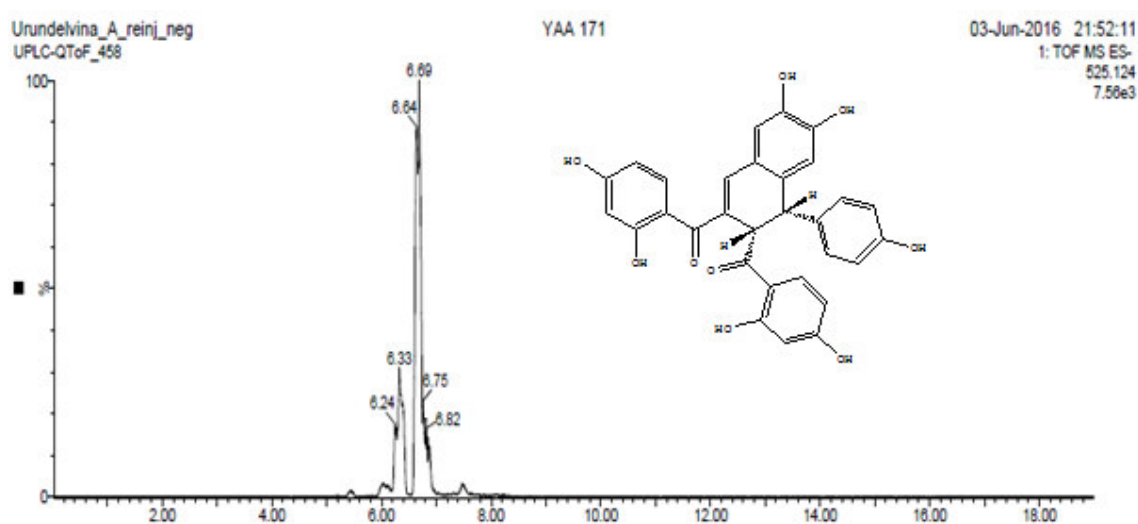


Fonte: Elaborada pelo autor.

O composto 3 apresentou íon molecular com m/z de 633,0728 $[M-H]^-$ e o mesmo tempo de retenção do composto 7 do extrato da folha que foi identificado como Corilagina baseado no cromatograma, como também no espectro MS/MS^2 demonstrados na figura 18. Os mesmos fragmentos foram observados no composto do extrato do galho em 463,0547 e 300,9978 Da. Portanto, a molécula 3 desse extrato também foi identificado como Corilagina. O compostos 4 e 7 foram identificados como derivados do Ácido Quínico. Eles apresentaram m/z de 337,0910 e 367,1048 $[M-H]^-$, respectivamente. Além disso, os dois compostos apresentam no espectro de segunda ordem o íon do Ácido Quínico desprotonado como pico base, 191,0525 e 191,0548 Da respectivamente. Segundo (PLAZONIC, BUCAR et al. 2009), a identificação plausível seria Ácido Quínico 5-*p*-coumaroil e Ácido Quínico 5-*O*-feruloil, porque dentro os isômeros que eles possuem, esses seriam os únicos a produzirem o fragmento majoritário em 191 Da. Ainda assim, o composto 4 apresentou um íon fragmento de 163,0423 Da que certamente corresponde ao Ácido Coumárico (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015). Os dois compostos já foram identificados anteriormente nas folhas da espécie *Schinus terebinthifolius* (FARAG 2008).

Os compostos 15, 16 e 17 apresentaram íons moleculares com m/z de 525,1203, 525,1195 e 525,1180. De acordo com a fórmula molecular calculada pelo software, os compostos foram identificados como Urundevina A. Essa chalcona dimérica foi primeiramente isolada por (BANDEIRA 2002) a partir da entrecasca da *Myracrodruon urundeuva*, sendo um importante caracterizador dessa espécie. Com fim de confirmar a identificação, o padrão analítico dessa molécula foi injetado objetivando a comparação com o tempo de retenção observado no extrato. A figura 22 mostra que o cromatograma do padrão apresenta basicamente três tempos de retenção distintos, indicando a presença de isômeros da Urundevina A. Essa afirmação é adequada, porque a estrutura química apresenta centros estereogênicos que possibilitam a existência de isômeros. Os tempos de retenção do extrato foram 6,12, 6,24 e 6,63 ao passo que do padrão foram 6,24, 6,33 e 6,69 min (majoritários).

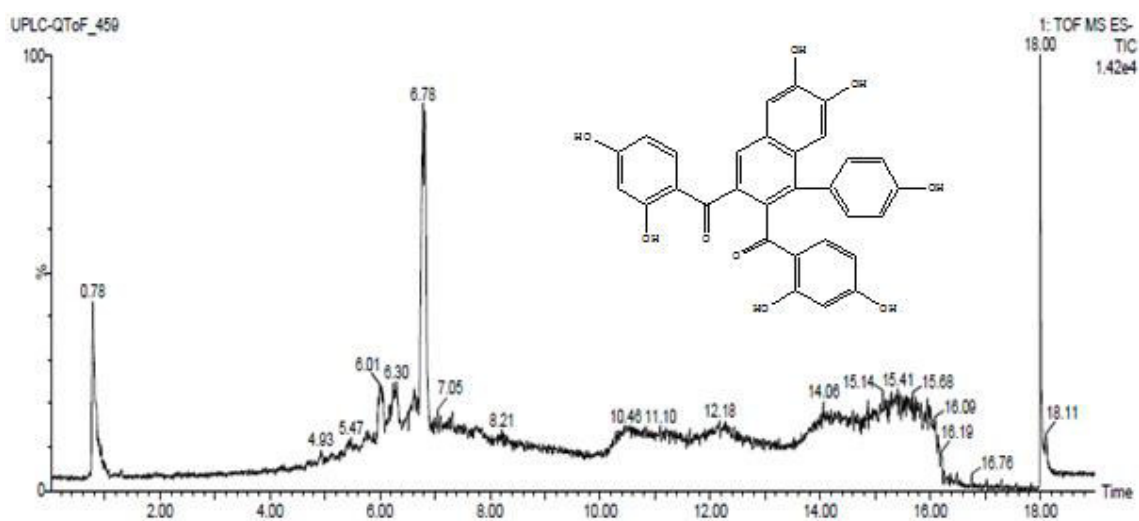
Figura 22. Cromatograma do padrão analítico Urundevina A.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O composto 18 apresentou razão m/z de 523,1036 $[M-H]^-$ e a partir da fórmula molecular obtida foi identificado como Urundevina B, também isolada primeiramente por (BANDEIRA 2002). Da mesma forma realizada para Urundevina A, o padrão da B foi injetado com o intuito de comparar o tempo de retenção com o observado no extrato. O pico no extrato referente ao composto foi de 6,74 min apresentando boa concordância com o observado na figura 23 para o padrão em 6,78 min.

Figura 23. Cromatograma do padrão analítico Urundevina B.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os compostos 21, 22 e 23 foram identificados da mesma forma que os compostos 31, 32 e 33 do extrato da folha como Ácido Anacárdico (17:3), (15:1) e (17:2), respectivamente. O padrão comum de fragmentação desse tipo de ácido foi observado, que é a perda de 44 Da referente a uma molécula de CO₂.

5.1.3 Perfil químico das cascas da *Myracrodruon urundeuva*

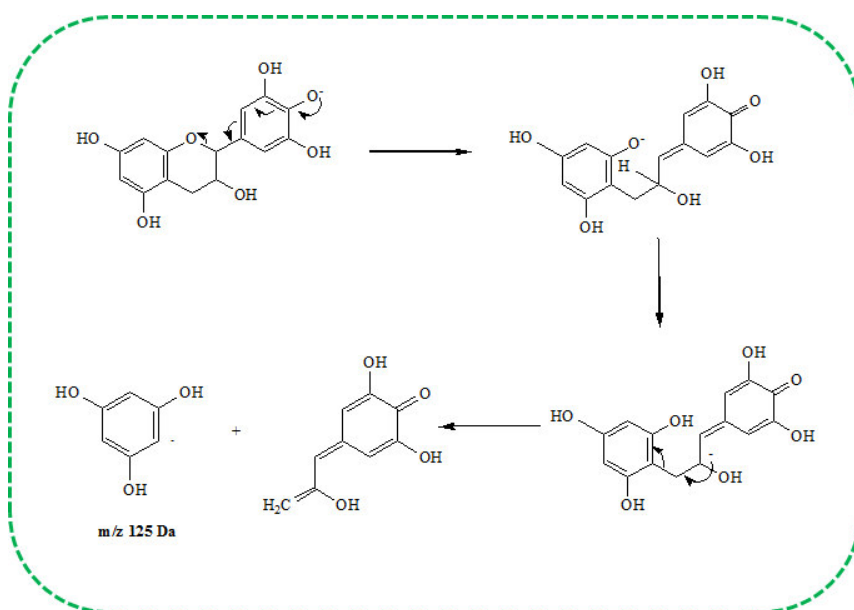
O composto 1 do extrato da casca foi identificado igualmente como o primeiro composto da folha, porque os dois possuíram praticamente o mesmo tempo de retenção e razão m/z de 191,0545 [M-H]⁻. Portanto, foi identificado como Ácido Quínico. O composto 2 possui valor m/z de 133,0129 [M-H]⁻. Com base no seu espectro de segunda ordem, identificou-o como Ácido Málico pelo surgimento do fragmento em 115,0042 Da que sugere a perda de uma molécula de H₂O (18 Da) (ABU-REIDAH, ALI-SHTAYEH et al. 2015). O composto 3 mostrou valor de m/z de 331,0666 [M-H]⁻ e seu espectro MS² o íon base de 169,0135 Da. Esse fragmento ocorre pela perda da molécula de glucose que equivale a 162 Da. Esse mesmo comportamento é observado para o composto 6 com m/z de 483,0813 [M-H]⁻. Porém, de início, ele perde uma unidade de galoil equivalente a 152 Da evidenciado pelo surgimento do íon em 331,0816 Da no espectro de segunda ordem. Portanto, eles foram identificados como Monogaloil glucosídeo e Digaloil glucosídeo, respectivamente (REGAZZONI, ARLANDINI et al. 2013). O composto 4 tem m/z de 343,0689 [M-H]⁻ foi identificado como Ácido Quínico galoil por apresentar fragmentos em 191,0537 Da [M-H]-

152]⁻ devido à perda de uma molécula de galoil e 169,0145 à formação do Ácido Gálico desprotonado.

O composto 5 tem razão *m/z* de 305,0653 [M-H]⁻ e apresenta como íon fragmento principal no espectro de segunda ordem em 125,0232 Da. Esse fragmento é explicado com base no mecanismo que pode ser visualizado na figura 24 proposto por (MIKETOVA, SCHRAM et al. 2000). A proposição desse mecanismo ocorreu porque todos os derivados de catequina apresentaram o mesmo fragmento em 125 Da independente da presença de uma unidade de galoil associada. Ele indica a presença do anel A não modificado. Portanto, esse composto foi identificado como Galocatequina/Epigalocatequina porque somente com dados de espectrometria de massa não se pode confirmar a correta estereoquímica. Essa diferença foi mostrada na figura 13, onde o prefixo “epi” é adicionado quando as duas ligações dos centros estereogênicos estão direcionados para trás do plano. Da mesma forma, o composto 8 foi identificado como derivado de catequina, o Epigalocatequina 3-O-galato 457,0768 [M-H]⁻.

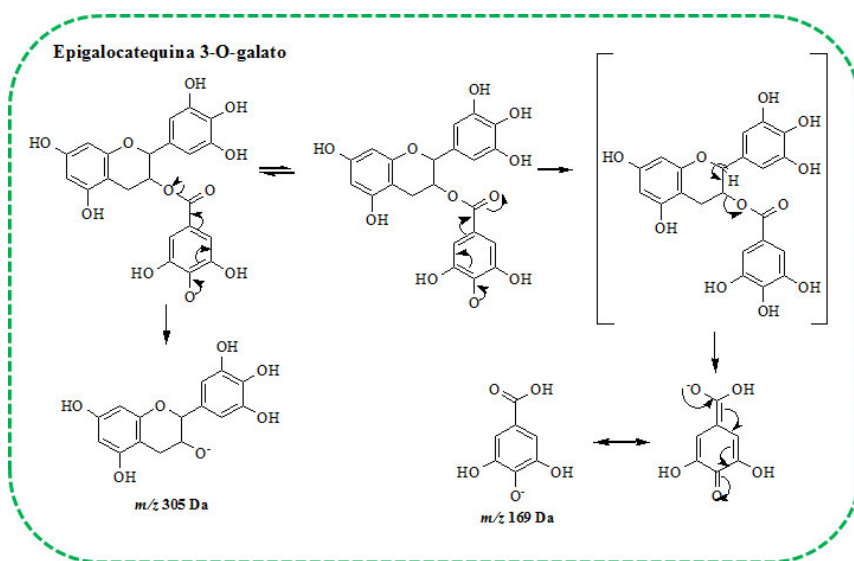
O espectro MS² mostra a perda de uma unidade galoil de 152 Da gerando o fragmento em 305,0664 Da. Ocorre a formação de uma unidade de Ácido Gálico desprotonado evidenciado pelo íon fragmento em 169,0125 Da, como também da unidade em 125,0248 Da como demonstrado para o composto 5. Na figura 25 pode-se observar o mecanismo de fragmentação para a molécula 8.

Figura 24. Mecanismo de fragmentação de formação do íon fragmento em 125 Da para os derivados de Galocatequina.



Fonte: (MIKETOVA, SCHRAM et al. 2000). Modificada pelo autor.

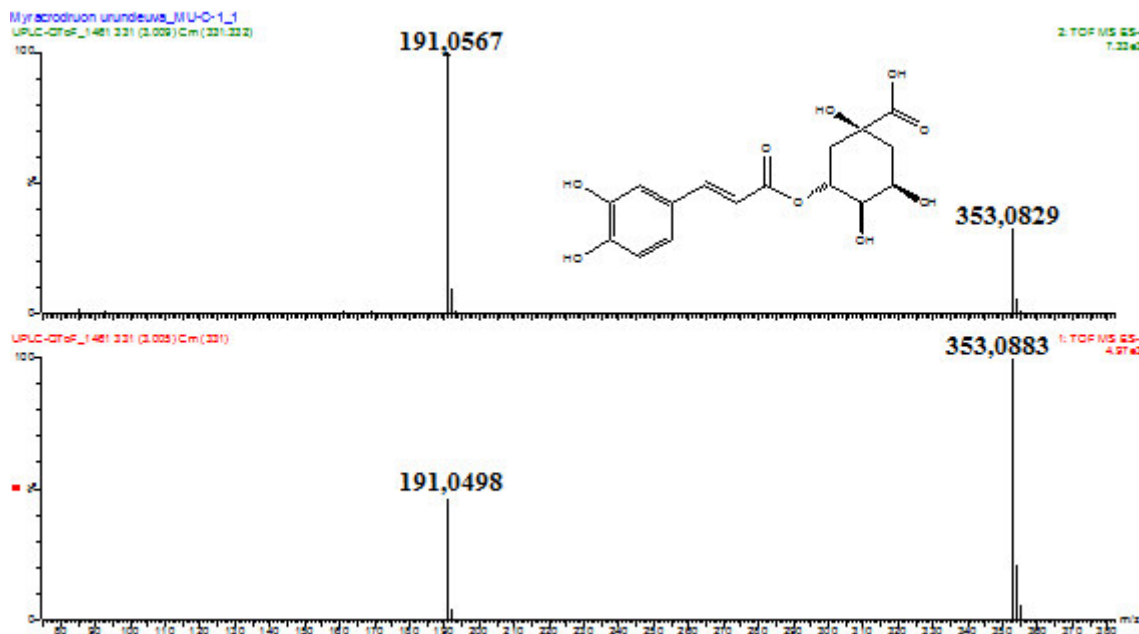
Figura 25. Mecanismo de fragmentação do Epigalocatequina 3-O-galato.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como aconteceu no extrato do galho no tempo de retenção de 3,00 min o qual o cromatograma foi comparado com o mix de padrões (figura 20), o composto 7 foi identificado como Ácido Clorogênico. Da mesma forma, apresentou o íon fragmento em 191,0528 Da no espectro de segunda ordem, como pode ser visualizado na figura 26, corroborando com o espectro observado para o padrão na figura 21.

Figura 26. Espectro de Massa de Alta Resolução no tempo de retenção de 3,00 min do extrato da casca da Aroeira-do-Sertão.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os compostos 15, 16 e 17 foram identificados da mesma maneira que os compostos de mesma numeração do extrato do galho com base no cromatograma do padrão analítico da figura 22. Como já dito anteriormente, esse composto é um caracterizador da espécie por ter sido isolado unicamente na espécie *Myracrodruon urundeuva*, por isso o nome Urundevina (BANDEIRA 2002). Com base nisso, certifica-se que o material de trabalho realmente trata-se da Aroeira-do-Sertão. Portanto, esses compostos foram identificados como Urundevina A isômero I, II, e III, respectivamente. Porém, um quarto isômero pôde-se ser identificado em 6,75 min. Com a análise do cromatograma do padrão, visualiza-se que essa afirmação é verdadeira, porque no referido tempo certa quantidade do compostos ainda pode eluir. Ainda assim, outro tipo de Urundevina também foi identificado com base no padrão da figura 23 por correlação entre os tempos de retenção com o extrato. Diferente o extrato do galho, o da casca mostrou a eluição da Urundevina B primeiramente em 5,97 min e depois em 6,75 min. Portanto, da mesma forma do compostos A, supõe-se a presença de isômeros para o compostos B, visto que compostos de mesma fórmula molecular e íon fragmento são isômeros quando eluem em diferentes tempos. Logo, os compostos 14 e 18 foram identificados como Urundevina B.

5.2 Atividades Citotóxica dos extratos de folha, casca e galho da *Myracrodruon urundeuva*

Com base no experimento realizado como descrito na seção 4.7, pôde-se comparar a eficácia dos extratos da Aroeira-do-Sertão frente às várias linhagens de células cancerosas, sendo elas: HL60 (Leucêmica), HCT-116 (Cólon-humano), SF-295 (Glioblastoma), RAJI (Leucêmica). A tabela 8 mostra os resultados do ensaio de citotoxicidade dos extratos como forma de comparação baseado nas médias das inibições de crescimento frente às linhagens.

Tabela 8. Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração única de 100 µg mL⁻¹.

Amostra	HL60		HCT-116		SF-295		RAJI	
	IC% (média)	DP%	IC% (média)	DP%	IC% (média)	DP%	IC% (média)	DP%
Folha	86,14	4,62	69,48	4,23	64,93	3,24	41,84	3,38
Galho	41,98	4,94	-17,76	4,72	10,52	5,47	-5,34	6,42
Casca	88,56	1,99	80,47	2,46	83,41	1,87	77,56	0,70

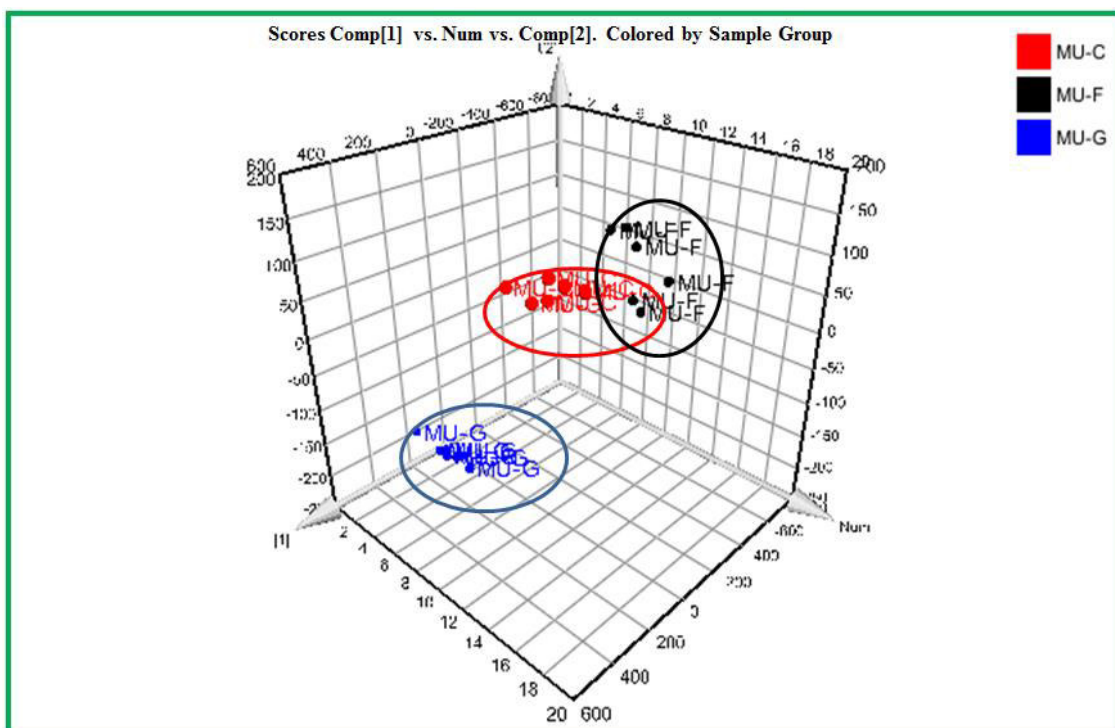
Estudando os dados da tabela 7, percebe-se que o extrato etanólico referente à casca inibiu efetivamente o crescimento das células cancerosas de todas as linhagens, uma vez que se considera elevada atividade citotóxica valores acima de 70%. Em contrapartida, o extrato referente ao galho obteve menor atividade, porque os valores encontraram-se abaixo do valor mínimo. O extrato etanólico da folha obteve o melhor resultado frente à linhagem HL60 Leucêmica, que já foi estudada anteriormente por (PESSOA, COSTA-LOTUFO et al. 2006), onde obteve valor de IC₅₀ de 7,4 µg mL⁻¹ nesse trabalho. O elevado potencial citotóxico do extrato etanólico da casca frente às células cancerosas merece certa atenção, porque de acordo com a revisão bibliográfica até então, somente extratos advindos das folhas e sementes da *Myracrodruon urundeuva* obtiveram tal estudo. Além disso, por meio de estudos etnobotânicos baseados em entrevistas com a população local da Caatinga, existe uma flutuação entre as principais seções da planta utilizada para as diversas atividades terapêuticas como combate ao câncer, inflamações, dor de garganta, doenças renais, problemas de coluna, cicatrizante, próstata, inflamação do colo do útero, bronquite, difteria, inflamação do fígado, diarreia, gastrite, coceira, tosse, dentro outros (SILVA and FREIRE 2010, MARINHO 2011, CORDEIRO and FÉLIX 2014). A correlação entre o uso popular e estudo laboratorial do real potencial é intensamente buscado pelos pesquisadores da área. A investigação química desse

extrato torna-se de extrema importância como potencial descoberta de um agente fitoterápico para as linhagens testadas. Além disso, a comparação do perfil químico desse extrato da casca com o do galho também é bastante significativo porque pode demonstrar compostos discriminantes que eventualmente sejam o diferencial para a potencial atividade.

5.3 Análise PCA dos extratos de folha, galho e casca da *Myracrodruon urundeuva*

A análise PCA, ou seja, de componentes principais foi realizada primeiramente para se observar a diferença do perfil metabolômico das três diferentes matrizes de estudo da Aroeira-do-Sertão: folha, galho e casca. Essa técnica promove a formação de grupos com semelhanças entre si. Sendo assim, grupos com semelhantes perfis metabólicos agrupam-se. Como pode ser observado na figura 27, gráfico de PCA em 3D, existe a formação de três grupos distintos que seguem a diferença das matrizes. Em primeira instância, pode-se dizer que as amostras de folha, galho e casca da *Myracrodruon urundeuva* possuem diferentes perfis metabolômicos entre si, como já observado na seção de identificação dos compostos não-voláteis. O PCA foi realizado pelo modelo centrado na média obtendo poder de discriminação das amostras de 93,79 % ($R^2X[1]=0,8329$ e $R^2X[2]=0,105$). A distribuição das amostras foi baseado nas intensidades dos picos no cromatograma e do par t_r - m/z .

Figura 27. Gráfico em 3D da análise de componentes principais dos extratos da folha, galho e casca da *Myracrodruon urundeuva* analisados por através da UPLC/Q-TOFMS/MS.



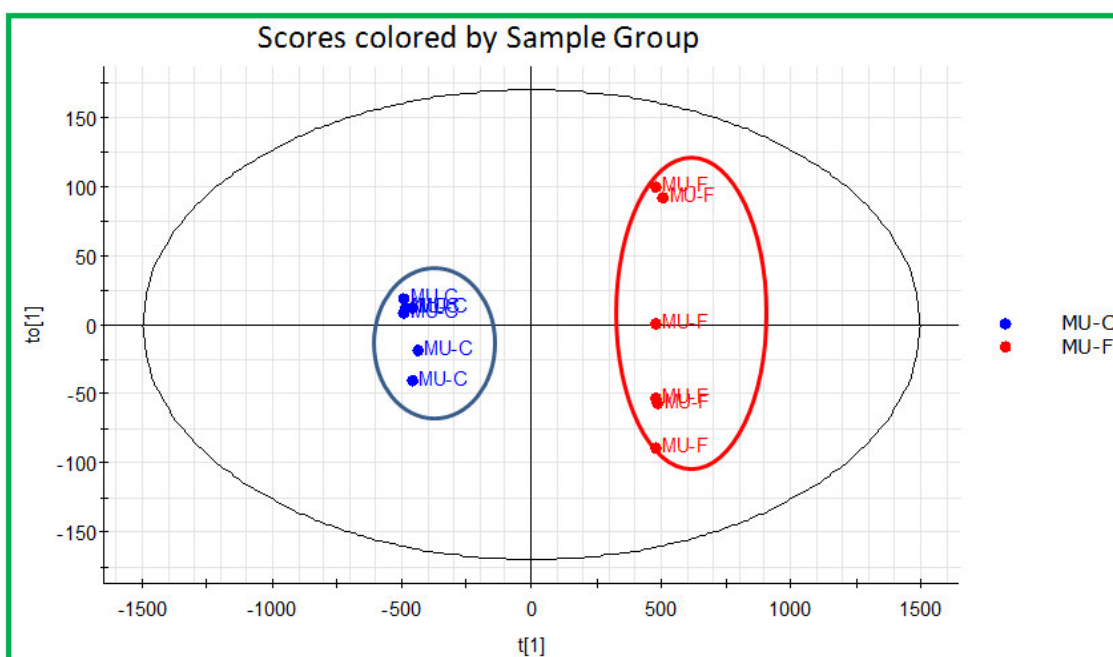
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4. Análise de OPLS-DA dos extratos de folha e casca da *Myracrodruon urundeuva*

Após a análise de componentes principais realizada para todas as amostras, foi feito a OPLS-DA somente entre o grupo MU-F, referente à folha e MU-C, referente às casca buscando intensificar a simplificar a visualização das diferenças entre eles. Na figura 28, observa-se o gráfico de scores da análise, onde se verifica claramente a formação de dois grupos distintos. Como a OPLS-DA usa os mesmo dados da PCA, isso leva a crer que realmente, o perfil metabólico das folhas da Aroeira-do-Sertão é distinta em relação à casca.

A variação explicada, como próprio nome diz está relacionada com o grau de explicação que o modelo tem sob os dados apresentados e é um parâmetro do bom ajuste dos dados, representado por R^2Y . A variação predita, que é o quanto o modelo prediz das variáveis sendo considerado um parâmetro de qualidade e habilidade preditiva, representado por Q^2 . A boa qualidade de modelo é indicada quando esses parâmetros estão acima de 0,5 e quanto mais próximo de 1 mais confiável é (YANG, LEE et al. 2015). Para essa análise, $R^2Y = 0,99$ e $Q^2 = 0,99$. Portanto, os resultados são altamente confiáveis.

Figura 28. Gráfico da OPLS-Da scores para os extratos de folha e casca da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

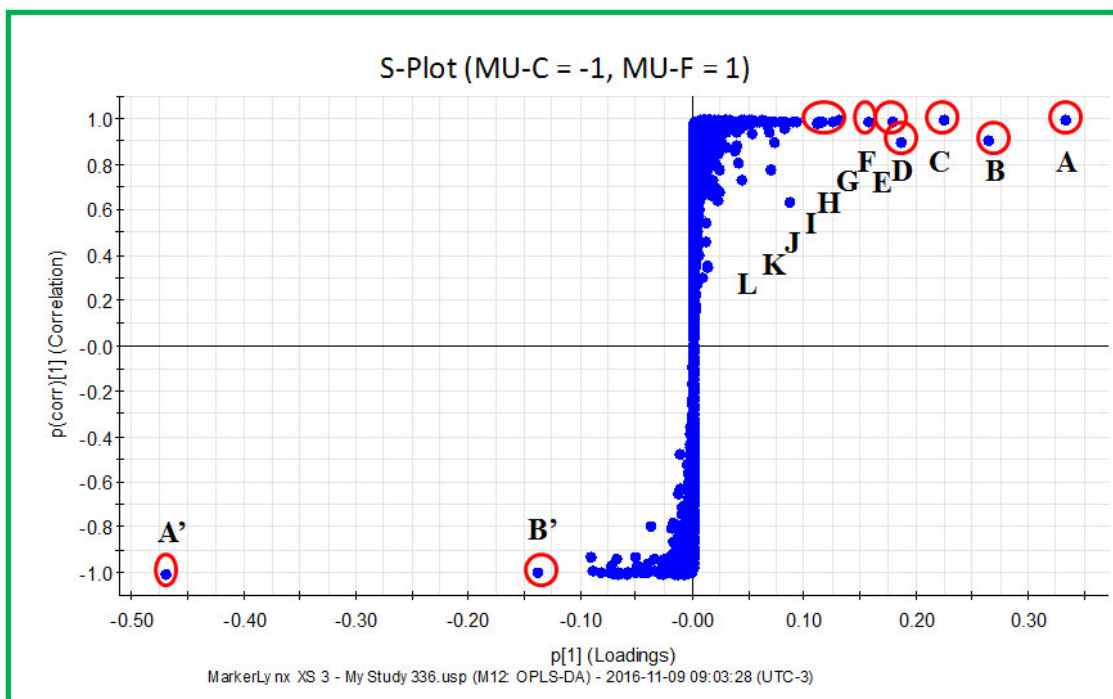
Ainda assim, outra análise foi realizada para verificar as variáveis que contribuem significativamente para a separação dos grupos. Ela destaca as variáveis discriminantes, ou seja, aquelas que se afastam do eixo comum entre os dois grupos comparados. Esses pontos foram destacados em vermelho e identificados com base nos eixos. No eixo positivo está contido os discriminantes relativos à folha em relação à casca, denominados de A a M, ao passo que no eixo negativo os discriminantes da casca em relação à folha, denominados de A' e B'. Cada ponto corresponde a um par t_r - m/z e portanto são atribuídos aos compostos identificados na seção 5.1. Por meio da tabela 9, consegue-se identificar qual composto é correspondente a cada ponto, porque ela mostra os valores das coordenadas S-plot relacionadas aos pares t_r - m/z . Essa análise é a S-plot, uma variação da OPLS-Da, e pode ser observada na figura 29 para as amostras de folha e casca.

Tabela 9. Relação das coordenação da S-plot com os pares t_r - m/z dos compostos discriminantes da análise S-plot para folha e casca da *Myracrodruon urundeuva*.

Compostos	t_r	m/z	p[1]	p(corr)[1]
A' – Ácido Clorogênico	2,99	353,0865	-0,47081	-0,998458
K – Geraniina	3,26	951,0815	0,111688	0,99461
A – Corilagina	3,30	633,0771	0,331775	0,997285
B – Ácido Geraniinico	3,80	953,0995	0,26399	0,912756
C – N.I	3,87	785,0830	0,222834	0,997664
L – Tetragaloil hexosídeo	3,96	787,1041	0,110516	0,984972
J – Quercetina 3-O-galactosídeo	4,20	463,0881	0,11311	0,996414
I – Quercetina 3-O-glucurodina	4,21	477,0644	0,114517	0,996501
H – Pentagaloil hexosídeo	4,27	939,1142	0,124645	0,990417
G – Quercetina 3-O-arabinopiranosídeo	4,49	433,0781	0,130055	0,997665
D – Hexagaloil hexosídeo	4,58	1091,1296	0,185425	0,905343
F – Quercitrina 2'' O-galato	5,42	599,1023	0,155494	0,992721
B' – Urundeuquina A isômero I	6,19	525,1185	-0,139172	-0,99438
E – Ácido Anacárdico (15:3)	15,38	369,2405	0,177408	0,995649

Fonte: Elaborada pelo autor.

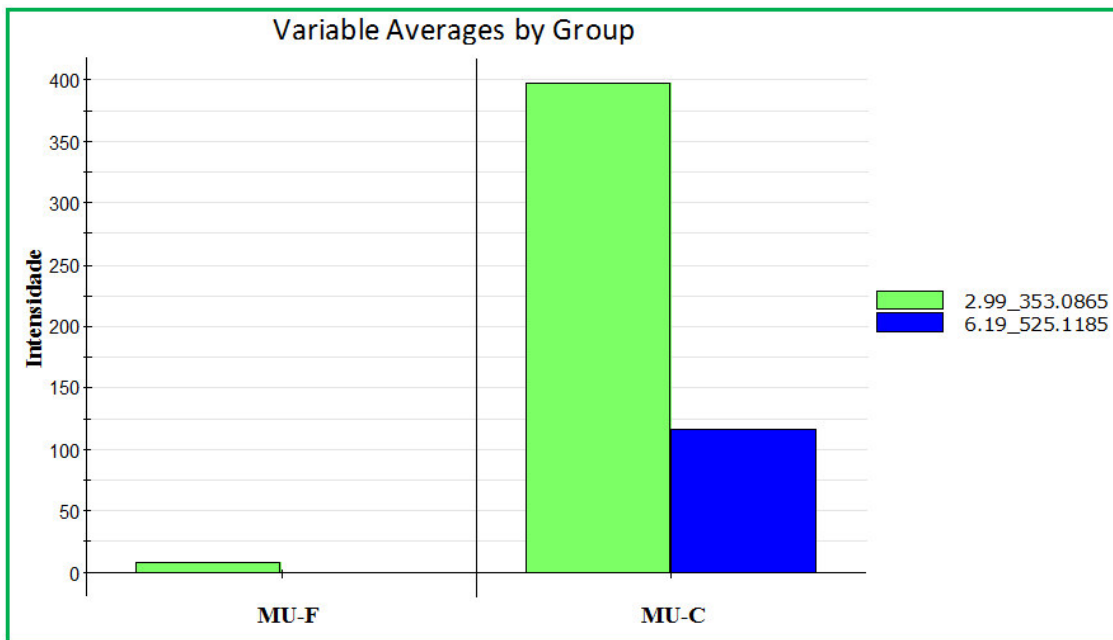
Figura 29. Gráfico S-plot das amostras de folha (eixo 1) e casca (eixo -1) da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A identificação dos compostos no gráfico S-plot permite conhecer os compostos que se destacam em cada seção da planta por meio da metodologia de extração utilizada. A correlação com os dados de atividade citotóxica pode dar uma ideia do grupo de compostos que podem estar atuando frente às linhagens de células cancerosas testadas. Resgatando os dados da tabela, percebe-se que o extrato etanólico da folha possui atividade quase semelhante ao extrato da casca frente à linhagem HL60. No entanto, para as outras linhagens, a atividade da casca é bem superior chegando quase ao dobro no caso da linhagem RAJI. Portanto, os compostos discriminantes dessa seção da Aroeira-do-Sertão podem estar atuando mais eficientemente sob essa linhagem, já que por meio da S-plot a diferenciação estatística dos dois extratos concerne sobre A' e B'. A figura 30 mostra a variação média dos discriminantes da casca em relação à folha, Ácido Clorogênico e Urundeuvin A isômero I, onde se observa claramente a diferença de intensidade. Portanto, esses dois compostos podem estar relacionados com a melhor atividade do extrato etanólico da casca frente à RAJI.

Figura 30. Variação média dos discriminantes do extrato etanólico da casca em relação à folha.



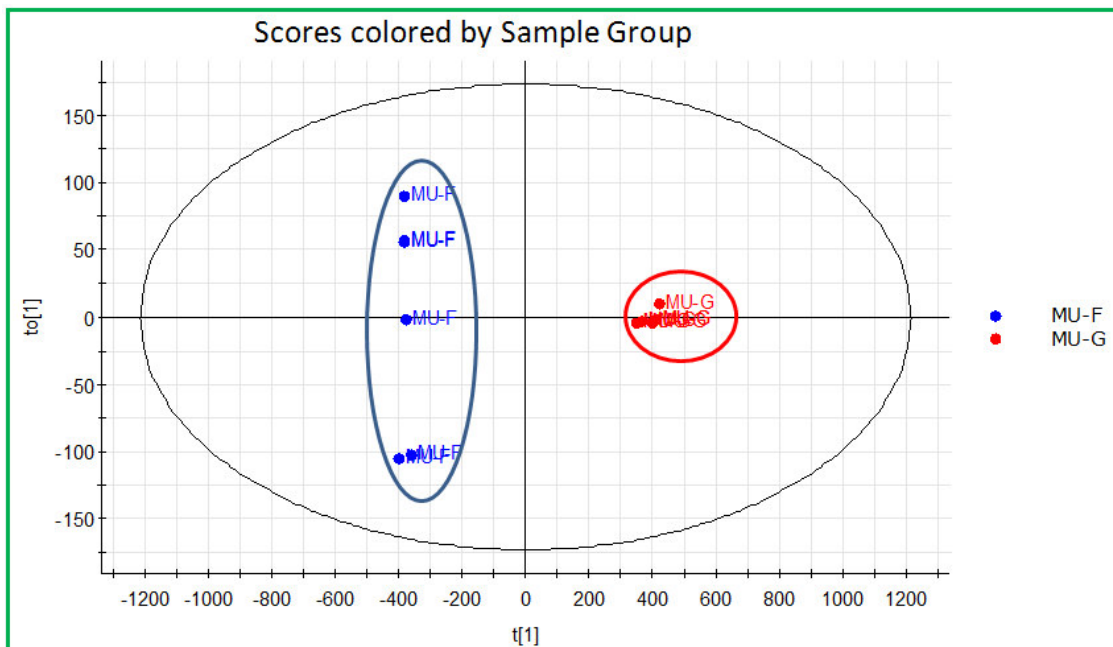
*Ácido Clorogênico (m/z 353,0865 Da); Urundevina A isômero I (m/z 525,1185 Da).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Análise de OPLS-DA dos extratos de folha e galho da *Myracrodruon urundeuva*

Da mesma forma realizada na seção 5.4, obteve-se o gráfico de OPLS-DA dos grupos MU-F, relativo à folha e MU-G, ao galho. A figura 31 mostra a relação entre esses dois grupos, que são distintos quando ao perfil metabólico comprovado pela separação deles. A análise obteve $R^2Y = 0,99$ e $Q^2 = 0,98$, o que mostra o bom ajuste dos dados e grande habilidade preditiva.

Figura 31. Gráfico da OPLS-Da scores para os extratos de folha e casca da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A S-plot verificou os principais compostos que foram responsáveis pela separação dos grupos por meio do par t_r - m/z . Com base na tabela 10, que destaca esses pares com as coordenadas S-plot é possível identificar quais são os compostos discriminantes. No eixo positivo encontram-se os pontos destacados em vermelho relativos ao galho que vão de A a E, ao passo que os pontos referentes à folha estão contidos no eixo negativo e vão de A' a L'. O gráfico S-plot pode ser visto na figura 32.

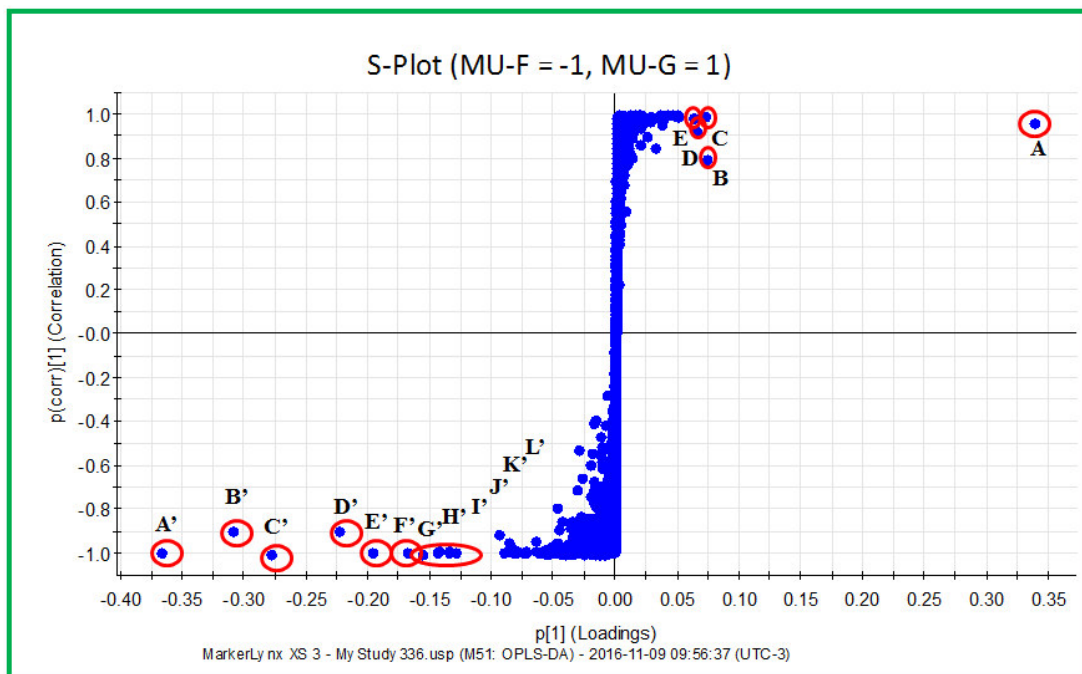
Tabela 10. Relação das coordenação da S-plot com os pares t_r - m/z dos compostos discriminantes da análise S-plot para folha e galho da *Myracrodruon urundeuva*.

Compostos	t_r	m/z	$p[1]$	$p(\text{corr})[1]$
D – Ácido Cítrico	0,99	191,0182	0,0654446	0,927366
A – Ácido Clorogênico	2,99	353,0865	0,338018	0,965054
L' – Geraniina	3,26	951,0815	-0,129096	-0,993299
A' – Corilagina	3,30	633,0771	-0,367515	-0,996377
C – Ácido Quínico 5- <i>p</i> -coumaroil	3,49	337,0923	0,0716124	0,995421

B' – Ácido Geraniinico	3,80	953,0995	-0,309699	-0,897829
C' – N.I	3,87	785,0830	-0,279647	-0,997311
I' – Tetragaloil hexosídeo	3,96	787,1041	-0,143145	-0,985844
J' – Quercetina 3-O-galactosídeo	4,20	463,0881	-0,135172	-0,995039
H' – Quercetina 3-O-glucuronida	4,21	477,0644	-0,144022	-0,995733
K' – Pentagaloil hexosídeo	4,27	939,1142	-0,135065	-0,986392
G' – Quercetina 3-O-arabinopirano- Sídeo	4,49	433,0781	-0,156345	-0,997282
D' – Hexagaloil hexosídeo	4,58	1091,1296	-0,224251	-0,898058
E' – Quercitrina 2'' O-galato	5,42	599,1023	-0,197141	-0,992556
B – Urundevina A isômero I	6,19	525,1185	0,0728581	0,799633
E – Urundevina A isômero II	6,63	525,1189	0,0620205	0,988472
F' – Ácido Anacárdico (15:3)	15,38	369,2405	-0,168503	-0,991514

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32. Gráfico S-plot das amostras de galho (eixo 1) e folha (eixo -1) da *Myracrodruon urundeuva*.

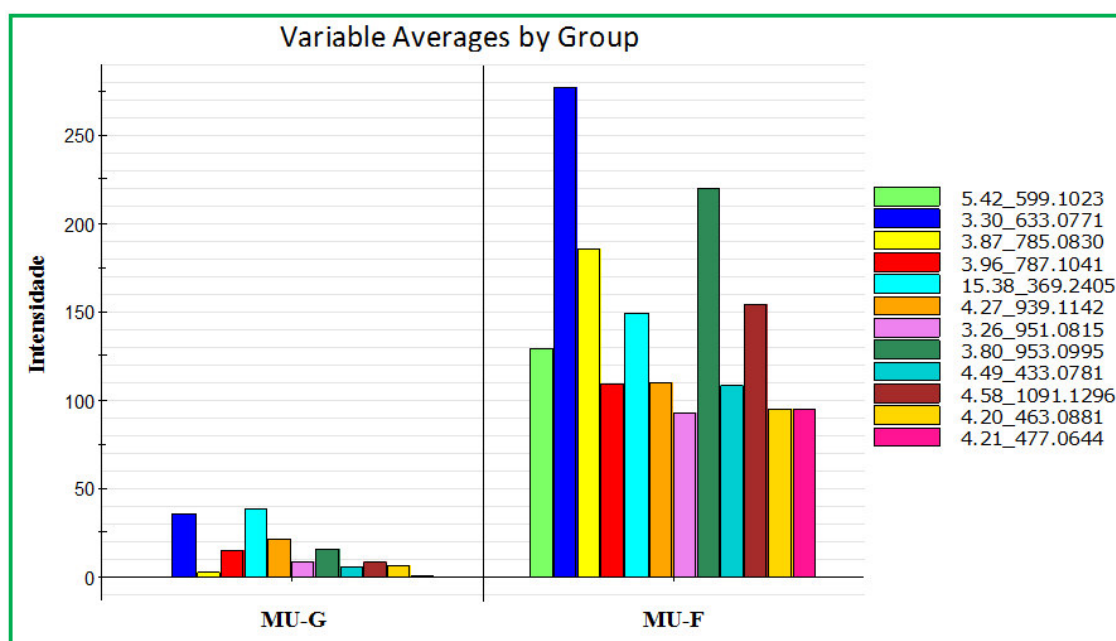


Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando os dados de quimiometria dessa seção juntamente com a atividade citotóxica dos extratos, percebe-se que os compostos discriminantes da folha tem ação bem

superior comparados com os do galho. Como já publicado por (PESSOA, COSTA-LOTUFO et al. 2006), o extrato etanólico das folhas da Aroeira-do-Sertão apresentam elevada atividade frente à linhagem HL60. Portanto, a elevada atividade citotóxica da folha comparada ao galho contra a mesma linhagem com o suporte da referência citada anteriormente aliada aos dados retirados da S-plot, pode-se ter uma noção de quais compostos são responsáveis por tal atividade. A figura 33 mostra o gráfico de variação de intensidade dos compostos da folha com relação ao galho do extrato etanólico da Aroeira-do-Sertão, onde se pode ver que apesar de o galho também possuir Corilagina em sua composição, a concentração é bem inferior quando se compara com a folha. O mesmo ocorre com outros compostos como o Ácido Anacárdico (15:3), Pentagaloil hexosídeo e Tetragaloil hexosídeo. A diferença de concentração de compostos possivelmente ativos tem influência no ensaio de citotoxicidade, porque ele é realizado em concentração única.

Figura 33. Variação média dos discriminantes do extrato etanólico da folha em relação ao galho.



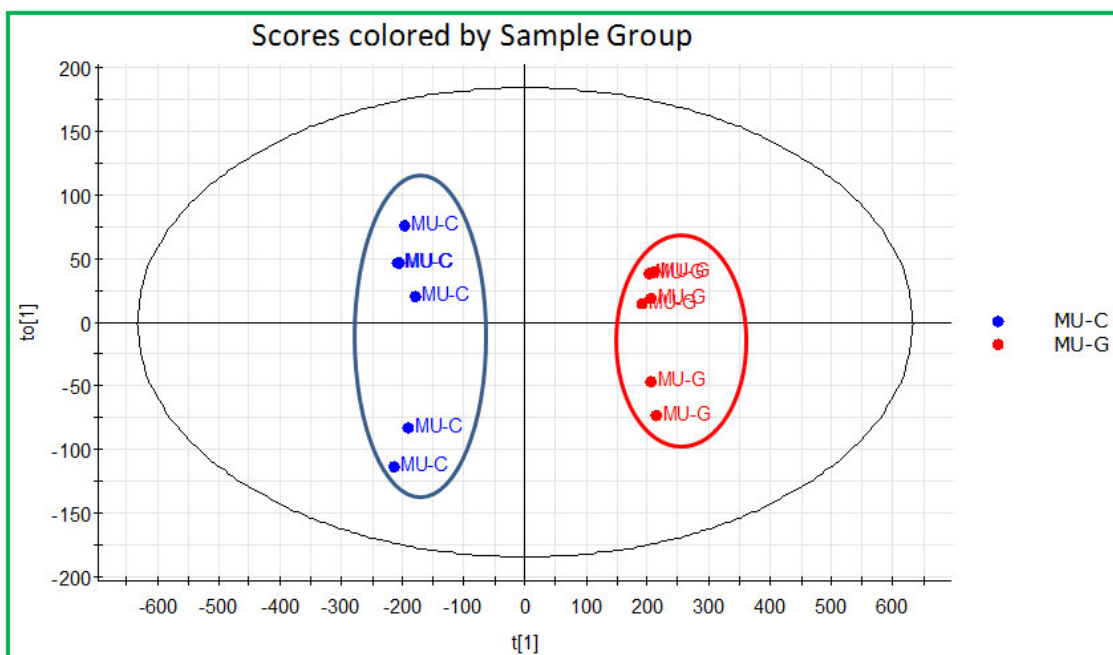
*Quercitrina 2''O-galato (m/z 599,1023 Da); Corilagina (m/z 633,0771 Da); N.I (m/z 785,0830 Da); Tetragaloil hexosídeo (m/z 787,1041 Da); Ácido Anacárdico (m/z 369,2405 Da); Pentagaloil hexosídeo (m/z 939,1142 Da); Geraniina (m/z 951,0815 Da); Ácido Geraniinico (m/z 953,0995 Da); Quercetina 3-O-arabinopiranosídeo (m/z 433,0781 Da); Hexagaloil hexosídeo (m/z 1091,1296 Da); Quercetina 3-O-galactosídeo (m/z 463,0881 Da); Quercetina 3-O-glucuronida (m/z 477,0664 Da).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Análise de OPLS-DA dos extratos de casca e galho da *Myracrodruon urundeuva*

Da mesma forma realizada nas duas últimas seções, esta analisada dois grupos retirados da análise de componentes principais, MU-C, referente à casca e MU-G ao galho. Essa comparação tem um destaque sob as outras quando os resultados de atividade citotóxica é levada em consideração, porque o extrato etanólico da casca obtiveram resultados ótimos, ou seja acima de 70%, para todas as linhagens de células cancerosas testadas. Do contrário, o extrato do galho teve os piores resultados, todos abaixo de 70%. Portanto, a comparação entre esses dois extremos poderá resultar no aparecimento de compostos discriminantes que realmente sejam responsáveis por tais atividades. A figura 34 mostra o gráfico da OPLS-DA, o qual obteve $R^2Y = 0,99$ e $Q^2 = 0,99$. Portanto, o modelo foi bons ajuste e habilidade preditiva.

Figura 34. Gráfico da OPLS-DA scores para os extratos de casca e galho da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A S-plot, figura 35, mostra claramente os compostos discriminantes que são responsáveis por essa separação em dois grupos observada na OPLS-DA. No eixo positivo estão contidos os compostos do galho, de A a E, ao passo que no eixo negativo estão inclusos

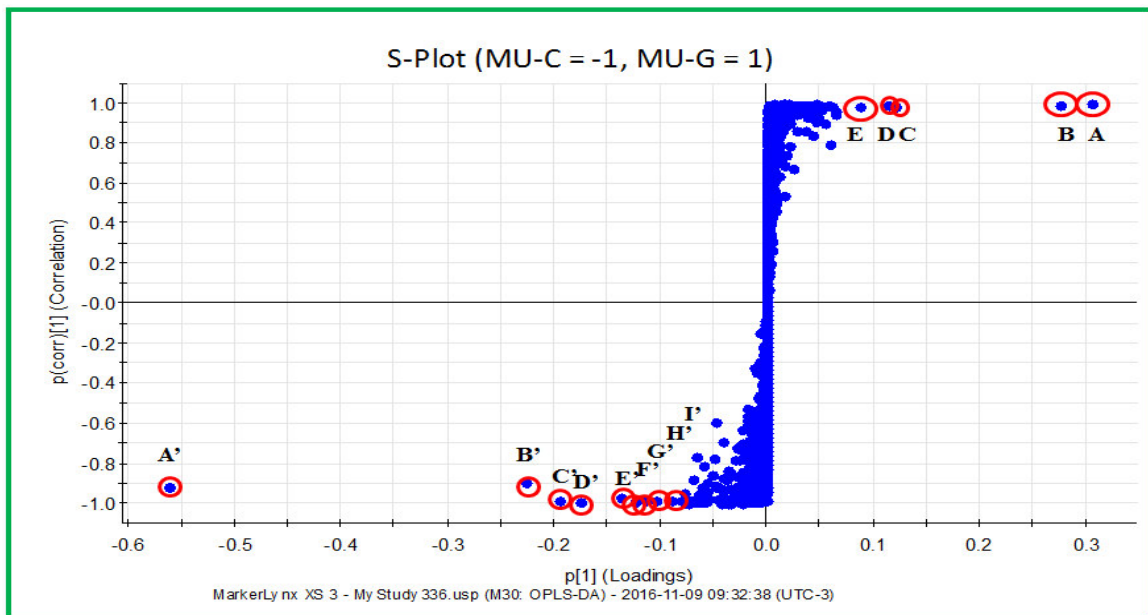
os da casca, de A' a H'. Por meio da tabela 11, identifica-se esses compostos de acordo com o par t_r - m/z e as coordenadas S-plot.

Tabela 11. Relação das coordenação da S-plot com os pares t_r - m/z dos compostos discriminantes da análise S-plot para casca e galho da *Myracrodruon urundeuva*.

Compostos	t_r	m/z	p[1]	p(corr)[1]
A – N.I	4,74	341,0637	0,30535	0,996685
B – N.I	4,73	451,1009	0,276747	0,995082
C – Ácido Anacárdico (15:3)	15,38	369,2405	0,121023	0,983901
D – Corilagina	3,30	633,0771	0,114078	0,99468
E – Ácido Quínico 5- <i>p</i> -coumaroil	3,49	337,0923	0,0877576	0,982012
A' – Ácido Clorogênico	2,99	353,0865	-0,562089	-0,915865
B' – Urundeuquina A isômero I	6,19	525,1185	-0,226429	-0,893421
C' – N.I	5,05	619,1112	-0,195054	-0,984389
D' – N.I	5,18	629,1322	-0,175018	-0,993682
E' – Galocatequina	2,21	305,0660	-0,137005	-0,973057
F' – N.I	4,11	497,1307	-0,12378	-0,991312
G' – Epigalocatequina 3-O-galato	3,53	457,0785	-0,113706	-0,988228
H' – Urundeuquina B isômero II	6,78	523,1049	-0,104502	-0,987369
I' – N.I	5,05	449,0907	-0,0896121	-0,985326

Fonte: Elaborada pelo autor.

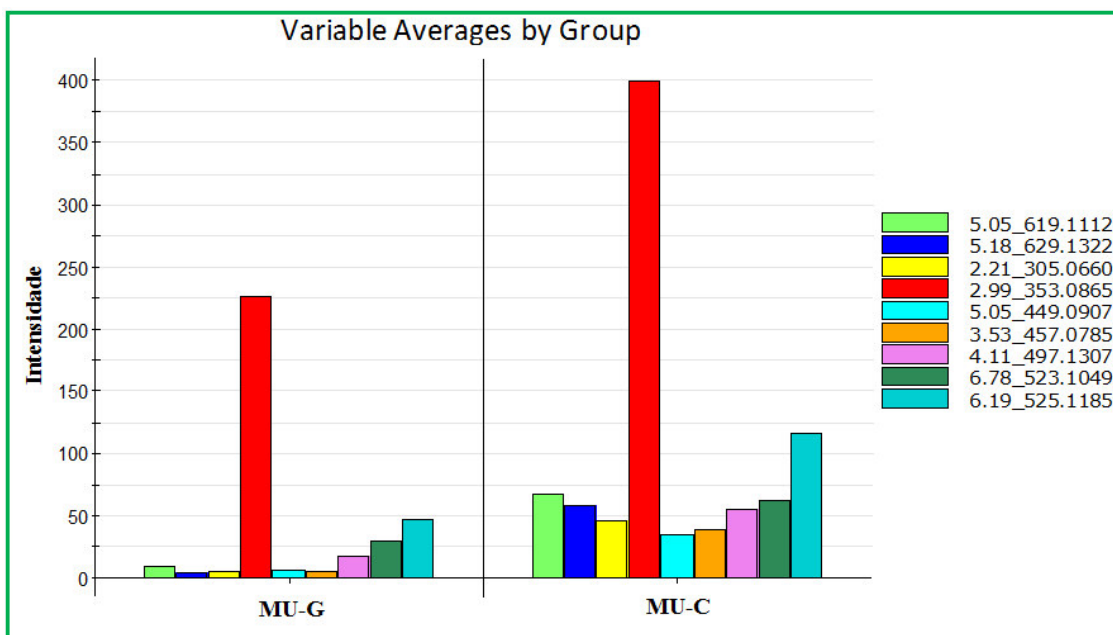
Figura 35. Gráfico S-plot das amostras de galho (eixo 1) e casca (eixo -1) da *Myracrodruon urundeuva*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como já dito, o extrato da casca apresentou potencial atividade citotóxica frente à todas as linhagens testadas, o oposto do que ocorreu com o galho. Então, dentro do grupo desses compostos discriminantes na casca pode conter o responsável por tal atividade ou na verdade o conjunto pode ser responsável. É válido ressaltar que tanto a casca quanto o galho possuem Ácido Clorogênico, um dos discriminantes da casca. No entanto, como observa-se na figura 36, a quantidade desse composto presente na seção que tem maior atividade é bem superior, merecendo destaque, porque faz-se acreditar que tal composto eventualmente pode estar diretamente relacionado com a potencial atividade do extrato etanólico da casca da Aroeira-do-Sertão.

Figura 36. Variação média dos discriminantes do extrato etanólico da casca em relação ao galho.



*N.I (*m/z* 619,1112, 629,1322, 449,0907 e 497,1307 Da); Galocatequina (*m/z* 305,0660 Da); Ácido Clorogênico (*m/z* 353,0865 Da); Epigallocatequina 3-O-galato (*m/z* 457,0785 Da); Urundevina A (*m/z* 525,1185) e Urundevina B (*m/z* 523,1049 Da).

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho com o uso da técnica analítica UPLC/Q-TOFMS/MS permitiu traçar o perfil químico da Aroeira-do-Sertão com alta precisão, pois forneceu valores de massa de alta resolução. A partir de um método de extração simples e rápido por meio de ultrassom, identificou-se 27 compostos no extrato etanólico da folha, 9 no extrato do galho e 14 no da casca. Foram identificados principalmente metabólitos secundários da classe dos flavonoides e taninos hidrolisáveis.

Por meio do ensaio citotóxico *in vitro* utilizando o método do MTT conclui-se que o extrato etanólico da casca possui compostos químicos não-voláteis que atuam frente às linhagens HL60 (Leucêmica), HCT-116 (Cólon humano), SF-295 (Glioblastoma) e RAJI (Leucêmica) inibindo o crescimento das células cancerosas com forte potencial, obtendo os resultados 88,56%, 80,47%, 83,41% e 77,56%, respectivamente.

Com o uso da PCA, foi possível observar a separação dos grupos relativos a cada seção da planta de forma significativa e com excelente confiabilidade. Além disso, a OPLS-DA por meio de comparação de diferentes arranjos de grupos (MU-F x MU-C; MU-F x MU-G; MU-C x MU-G) permitiu melhorar a separação com boa habilidade preditiva. A S-plot mostrou os compostos discriminantes de cada grupo em relação ao outro e por meio da comparação com os resultados de atividade citotóxica, pôde-se traçar uma linha de compostos que provavelmente atuam na inibição das células cancerosas.

De modo geral, esse trabalho permitiu avaliar de forma rápida o perfil químico das diferentes seções da Aroeira-do-Sertão e aliado com os resultados de atividade citotóxica e quimiometria traçar planos para o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos engrandecendo a flora local e o conhecimento popular.

7 REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M., M. S. ALI-SHTAYEH, R. M. JAMOUS, D. ARRÁEZ-RÓMAN and A. SEGURA-CARRETETO (2015). "HPLC-DAD-ESI-MS/MS SCREENING OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM *Rhus coriaria* L. (Sumac) FRUITS." FOOD CHEMISTRY **166**: 179-191

ALBUQUERQUE, R. J. M., L. K. A. M. LEAL, M. A. M. BANDEIRA, G. S. B. VIANA and L. V. RODRIGUES (2011). "CHALCONE FROM MYRACRODRUON URUNDEUVA ARE EFFICACIOUS IN GUINEA PIG OVABULMIN-INDUCED ALLERGIC CONJUNCTIVITIS." BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY **21**(6): 953-962.

AQUINO, N. C. (2013). "APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS E CROMATOGRÁFICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE SEIS TIPOS QUÍMICOS DE MYRACRODRUON URUNDEUVA FR. ALLEM (AROEIRA-DO-SERTÃO)." DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM QUÍMICA) UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ: 112 p.

BANDEIRA, M. A. M. (1993). "CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS DO NORDESTE, *MYRACRODRUON URUNDEUVA* FR. ALL. (=ASTRONIUM URUNDEUVA ENGL) AROEIRA-DO-SERTÃO." DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM QUÍMICA) UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ: 204F.

BANDEIRA, M. A. M. (2002). "*Myracrodruon urundeuva* Allemão (AROEIRA-DO-SERTÃO): CONSTITUINTES QUÍMICOS ATIVOS DA PLANTA EM DESENVOLVIMENTO E ADULTA." Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Ceará: 322 f.

BBC. (2016). "DEZ GRÁFICOS QUE EXPLICAM O IMPACTO DO CÂNCER NO MUNDO." Retrieved 09/10/2016, 2016, from http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/02/160204_gch_graficos_cancer_fn.

BERARDINI, N., R. CARLE and A. SCHIEBER (2004). "CHARACTERIZATION OF GALLOTANNINS AND BENZOPHENONE DERIVATIVES FROM MANGO (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') PEELS, PULP AND KERNELS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY " RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY **18**: 2208-2216.

BRAGA, R. (2001). "PLANTAS DO NORDESTE ESPECIALMENTE DO CEARÁ." MOSSORÓ **5 ed.**

BRUNETON, J. (1991). "ELEMENTOS DE FITOQUÍMICA Y DE FARMACOGNOSIA." ACRIBIA SA: ESPANHA.

BRENTON, R. G. (2007). "APPLIED CHEMOMETRICS FOR SCIENTISTS." University of Bristol, UK.Chichester: The Atrium.

CALOU, I., M. A. M. BANDEIRA, W. AGULAR-GALVÃO, G. CERQUEIRA, R. SIQUEIRA, K. R. NEVES, G. A. BRITO and V. G. S. B. (2014).

"NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF A STANDARDIZED EXTRACT FROM MYRACRODRUON URUNDEUVA FR. ALL. (AROEIRA-DO-SERTÃO), AS EVALUATED BY A PARKINSON'S DISEASE MODEL IN RATS." HINDAWI PUBLISHING CORPORATION PARKINSON'S DISEASE **2014**: 11.

CHURCHWELL, M. I., N. C. TWADDLE, L. R. MEEKER and D. R. DOERGE (2005). "IMPROVING LC-MS SENSITIVITY THROUGH INCREASES IN CHROMATOGRAPIC PERFORMANCE: COMPARISONS OF UPLC-ES/MS/MS TO HPLC-ES/MS/MS." JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B **825**: 134-143.

CHANG, L. C. and A. D. KINGHORN (2001). "FLAVONOIDS AS CANCER CHEMOPREVENTIVE AGENTS." BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PRODUCTS SOURCES.

CONCEIÇÃO, M. (1980). "AS PLANTAS MEDICINAIS DO ANO 2000." TAO LIVRARIA E EDITORA: 15.

CORDEIRO, J. M. P. and L. P. FÉLIX (2014). "CONHECIMENTO ETNOBOTÂNICO SOBRE ESPÉCIES VEGETAIS NATIVAS DA CAATINGA E PLANTAS ESPONTÂNEAS NO AGRESTE DA PARAÍBA, BRASIL." REV. BRAS. PL. MED. **16**(3).

CORREIA, M. P. (1984). "DICIONÁRIO DAS PLANTAS ÚTEIS DO BRASIL E DAS EXÓTICAS CULTIVADAS." INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO FLORESTAL **6**.

CORREIA, P. R. M. and M. M. C. FERREIRA (2007). "RECONHECIMENTO DE PADRÕES POR MÉTODOS NÃO SUPERVISIONADOS: EXPLORANDO PROCEDIMENTOS QUIMIOMÉTRICOS PARA TRATAMENTO DE DADOS ANALÍTICOS." Química Nova **30**(2): 481-487.

DA SILVA, C. M., F. B. C. MOTA, M. D. RODRIGUES, O. D. ALVEZ and V. H. MAIA (2013). "CRUDE EXTRACTS AND SEMI-FRACTIONS FROM MYRACRODRUON URUNDEUVA WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (atcc) STRAINS OF CLINICAL RELEVANCE." JOURNAL OF MEDICINE PLANTS RESEARCH **7**(32): 2407-2413.

DE STEENE, J. C. V. and W. E. LAMBERT (2008). "COMPARISON OF MATRIX EFFECTS IN HPLC-MS/MS AND UPLC-MS/MS ANALYSIS OF NINE BASIC PHARMACEUTICALS IN SURFACE WATERS." JOURNAL AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY **19**: 713-718.

DORTA, E., M. GONZÁLEZ, M. G. LOBO, C. SÁNCHEZ-MORENO and B. ANCOS (2014). "SCREENING OF PHENOLIC COMPOUNDS IN BY-PRODUCT EXTRACTS FROM MANGOES (*Mangifera indica* L.) BY HPLC-ESI-QTOF-MS AND MULTIVARIATE ANALYSIS FOR USE AS A FOOD INGREDIENT." FOOD RESEARCH INTERNATIONAL **57**: 51-60.

- ERSAN, S., O. G. ÜSTÜNDAG, R. CARLE and R. M. SCHWEIGGERT (2016). "IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN RED AND GREEN PISTACHIO (*Pistacia vera* L.) HULLS (EXO- AND MESOCARP) BY HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY: 1-35.
- ERSNET, M., D. B. SILVA, R. R. SILVA, R. Z. N. VÊNICO and N. P. LOPES (2014). "MASS SPECTROMETRY IN PLANT METABOLOMICS STRATEGIES: FROM ANALYTICAL PLATFORMS TO DATA ACQUISITION AND PROCESSING." NAT. PROD. REP. **31**: 784-806
- FARAG, S. F. (2008). "POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM THE LEAVES OF *Schinus terebinthifolius* RADDI, BULL. ." PHARM. SCI. **31**: 319-329.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R., J. C. LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. ROMERO-GONZÁLEZ, J. L. MARTÍNEZ-VIDAL, M. I. A. FLORES and A. G. FRENICH (2010). "SIMPLE LC-MS OF CITRIC AND MALIC ACIDS FRUITS AND VEGETABLES." CHROMATOGRAPHIA **72**: 55-62.
- FERREIRA, P. M. P., D. F. FARIAS, M. P. VIANA, T. M. SOUZA, I. M. VASCONCELOS, B. M. SOARES, C. PESSOA, L. V. COSTA-LOTUFO, M. O. MORAES and A. F. U. CARVALHO (2011). "STUDY OF THE ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL OF SEED EXTRACTS FROM NORTHEASTERN BRAZILIAN PLANTS." AN. ACAD. BRAS. CIENC. **83**(3): 1045-1058.
- FIEHN, O. (2002). "METABOLOMICS - THE LINK BETWEEN GENOTYPES AND PHENOTYPES." PLANT MOLECULAR BIOLOGY **48**: 155-171.
- FILHO, J. A. S., A. P. B. SANTOS, M. F. S. NASCIMENTO and F. S. E. SANTO (2009). "GUIA DE ÁRVORES DA CAATINGA." Editora e Gráfica Franciscana/Universidade do Vale do São Francisco.
- FUNARI, C. S., I. CASTRO-GAMBOA, A. J. CAVALHEIRO and V. d. S. BOLZANI (2013). "METABOLÔMICA, UMA ABORDAGEM OTIMIZADA PARA EXPLORAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ESTADO DA ARTE, PERSPECTIVAS E DESAFIOS." Química Nova **36**(10): 1605-1609.
- GOBBO-NETO, L. and N. P. LOPES (2007). "PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA DO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS." QUÍMICA NOVA **30**(2): 374-381.
- GOMES, L. A. L. (2013). "INVESTIGAÇÃO METABOLÔMICA DA TOXICIDADE DA COCAÍNA EM RATOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS." Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de São Paulo: 148 p.
- GOTTLIEB, O. R., M. A. C. KAPLAN and M. R. M. B. BORIN (1996). "BIODIVERSIDADE: UM ENFOQUE QUÍMICO-BIOLÓGICO." RIO DE JANEIRO: UFRJ: 268 p.

GROS, E. G., A. B. POMILIO, A. M. SELDES and G. BURTON (1985). "INTRODUCTION AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES." WASHINGTON: THE GENERAL SECRETARIAT OF THE ORGANIZATION OS AMERICAN STATES: 196 p.

HELDT, H. (1997). "PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY." UNIVERSITY OXFORD.

HILLIS, W. E. (1962). WOOD EXTRACTIVES AN THEIR SIGNIFICANCE TO THE PULP AND PAPER INDUSTRIES, ACADEMIC PRESS.

INCA "Situação do Câncer no Brasil." **Carcinogênese: mecanismo de desenvolvimento dos tumores.:** 16-17.

INCA (2015). "ESTIMATIVA 2016: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL."

KHAKIMOV, B., G. GÜRDENIZ and S. B. ENGELSEN (2015). "Trends in the application of chemometrics to foodomics studies." Acta Alimentaria **44**(1): 4-31.

KHAKIMOV, B., G. GÜRDENIZ and S. B. ENGELSEN (2015). "Trends in the application of chemometrics to foodomics studies." Acta Alimentaria **44**(1): 4-31.

KUMAR, S., P. CHANDRA, V. BAJPAI, A. SINGH, M. SRIVASTAVA, D. K. MISHRA and B. KUMAR (2015). "RAPID QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Phyllanthus amarus* USING LC/MS/MS TECHNIQUES." INDUSTRIAL CROPS PRODUCTS **69**: 143-152.

LANÇAS, F. M. (2009). "A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA MODERNA E A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: FINALMENTE "COMPATÍVEIS"?" SCIENTIA CHROMATOGRAPHICA **1**(2).

LORENZI, H. and F. J. A. MATOS (2000). "PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL NATIVAS E EXÓTICAS." NOVA ODESSA: INSTITUTO PLANTARUM DE ESTUDOS DA FLORA LTDA.

MADSEN, R., T. LUNDSTEDT and J. TRYGG (2010). "CHEMOMETRICS IN METABOLOMICS - A REVIEW IN HUMAN DISEASE DIAGNOSIS." ANALYTICA CHIMICA ACTA **659**: 23-33.

MARINHO, M. G. V. e. a. (2011). "LEVANTAMENTO ETNOBOTÂNICO DE PLANTAS MEDICINAIS EM ÁREA DE CAATINGA NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DE ESPINHARAS, PARAIBA, BRASIL." REV. BRAS. PL. MED. **13**(2): 170-182.

MARTINS, S. L. M., L. P. GODOY and L. F. D. LOPES (2012). "MONITORAMENTO DO CONTROLE ESTATÍSTICO DO PROCESSO UTILIZANDO FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS." Espacios **33**(6).

MARTIUS, C. F. P. (1967). "FLORA BRASILIENSIS." NEW YORK: EDITORA REPRINT XII (PARTE I): 6223.

MIKETOVA, P., K. H. SCHRAM, J. WHITNEY, M. LI, R. HUANG, E. KERUS, S. VALCIC, B. M. TIMMERMAN, R. ROURICK and S. KLOHR (2000). "TANDEM MASS SPECTROMETRY STUDIES OF GREEN TEA CATECHINS. IDENTIFICATION OF THREE MINOR COMPONENTS IN THE POLYPHENOLIC EXTRACT OF GREEN TEA." JOURNAL MASS SPECTROMETRY **35**: 860-869.

MONTEIRO, J. M., U. P. ALBUQUERQUE and E. L. ARAÚJO (2005). "TANINOS: UMA ABORDAGEM DA QUÍMICA À ECOLOGIA. ." QUIMICA NOVA **28**(5): 892-896.

NEWMAN, D. J. and G. M. CRAGG (2012). "NATURAL PRODUCTS AS SOURCES OF NEW DRUGS OVER THE 30 YEARS FROM 1981 TO 2010." JOURNAL PRODUCT NATURALS **75**(3): 311-335.

NG, L. K., P. LAFONTAINE and M. VANIER (2004). "CHARACTERIZATION OF CIGARRETE TOBACCO BY DIRECT ELECTROSPRAY IONIZATION-ION TRAP MASS SPECTROMETRY (ESI-ITMS) ANALYSIS OF THE AQUEOUS EXTRACT-A NOVEL AND SIMPLE APPROACH." JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY **52**: 7251-7257.

NOVÁKOVÁ, L., L. MATYSOVÁ and P. SOLICH (2006). "ADVANTAGES OF APPLICATION OF UPLC IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS." TALANDA **68**: 908-918.

OJEWOLE, J. A. O. (2003). "EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OS *Sclerocarya birrea* (A.Rich) Hochst. (family: Anacardiaceae) STEM-BARK EXTRACTS IN RATS." JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY **85**: 217-220.

PAVIA, D. L., L. M. GARY, G. S. KRIZ and J. R. VYVYVAN (2010). "INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA." CENGAGE LEARNING Cengage Learning TRADUÇÃO DA 4ª EDIÇÃO NORTE-AMERICANA: 399-499.

PESSOA, C., L. V. COSTA-LOTUFO, A. LEYVA, M. E. A. MORAES and M. O. MORAES (2006). "ANTICANCER POTENCIAL OF NORTHEAST BRAZILIAN PLANTS." Lead Molecules from Natural Products: discovery and new trends: 197-211.

PIRES, M. J. P. and A. GRIPP (1988). "CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS EM BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA. ." ACTA AMAZONICA **18**: 61-73.

PLAZONIC, A., F. BUCAR, Z. MALES, A. MORNAR, B. NIGOVIC and N. KUJUNDZIC (2009). "IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS IR BURR PARSLEY (*Caucalis platycarpus* L.), USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTION AND ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY." MOLECULES **14**: 2466-2490.

REGAZZONI, L., E. ARLANDINI, D. GARZON, N. F. SANTAGATI, G. BERETTA and R. M. FACINO (2013). "A RAPID PROFILING OF GALLOTANNINS AND FLAVONOIDS OF THE AQUEOUS EXTRACT OF *Rhus coriaria* L. BY FLOW INJECTION ANALYSIS WITH HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY ASSISTED WITH DATABASE SEARCHING." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS **72**: 202-207.

RIZZINI, C. T. (1971). "PLANTAS DO BRASIL ÁRVORES E MADEIRA ÚTEIS DO BRASIL: MANUAL DE DENDROLOGIA BRASILEIRO." RIO DE JANEIRO: EDGARD BLÜCHER/EDUSP.

SALDANHA, L. L., W. VILEGAS and A. L. DOKKEDAL (2013). "CHARACTERIZATION OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS IN *Myrcia bella* Cambess. USING FIA-ESI-IT-MS" AND HPLC-PAD-ESI-IT-MS COMBINED WITH NMR." MOLECULES **18**: 8402-8416.

SCHIEBER, A., N. BERARDINI and R. CARLE (2003). "IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY." JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY **51**: 5006-5011.

SCHULZE-KAYSERS, N., M. M. FEUEREISEN and A. SCHIEBER (2015). "PHENOLIC COMPOUNDS IN EDIBLE SPECIES OF THE ANACARDIACEAE FAMILY - A REVIEW." ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY **5**: 73301-73314.

SHUKRI, M. A. M. and C. ALAN (2010). "ANALYSIS OF PHENOLICS IN *Anacardium occidentale* SHOOT EXTRACTS USING A REVERSE-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY (RP-HPLC-MS)." JOURNAL TROPICAL AGRICULTURAL AND FOOD SCIENCE **38**(2): 221-230.

SILVA, T. S. and E. M. X. FREIRE (2010). "ABORDAGEM ETNOBOTÂNICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS CITADAS POR POPULAÇÕES DO ENTORNO DE UMA UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DA CAATINGA DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL." REV. BRAS. PL. MED. **12**(4): 427-235.

SIMÕES, C. M. O., E. P. SCHENKEL, G. GOSMANN, J. C. P. MELLO, L. A. MENTZ and P. R. PETROVICK (2003). FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO.

SOUZA, A. M. and R. J. POPPI (2012). "EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: UM TUTORIAL, PARTE I." Química Nova **35**(1): 223-229.

SOUZA, S. M. C., L. C. M. AQUINO, A. C. MILACH, M. A. M. BANDEIRA, M. P. E. NOBRE and G. S. B. VIANA (2007). "ANTIINFLAMATORY AND ANTIULCER PROPERTIES OF TANNINS FROM MYRACRODRUON URUNDEUVA ALLEMÃO (ANACARDIAECAE) IN RODENTS." PHYTOTHER. RES. **21**: 220-225.

SOUZA, T. M., A. P. CUNHA, D. F. FARIAS, L. K. MACHADO, S. M. MORAIS, N. M. RICARDO and A. F. CARVALHO (2012). "INSECTICIDAL ACTIVITY AGAINST Aedes Aegypti OF m-PENTADECADIENYL-PHENOL ISOLATED FROM MYRACRODRUON URUNDEUVA SEEDS." PEST MANAG SCI **68**(10): 1380-1384.

SUN, J., F. LIANG, Y. BIN, P. LI and C. DUAN (2007). "SCREENING NON-COLORED PHENOLICS IN RED WINES USING CHROMATOGRAPHY/ULTRAVIOLET AND MASS SPECTROMETRY/MASS SPECTROMETRY LIBRARIES." MOLECULES **12**: 679-693.

TAIZ, L. and E. ZEIGER (2013). "FISIOLOGIA VEGETAL." PORTO ALEGRE. ARTMED EDITORA LTDA **5ª Edição**.

TAKAYAMA, T., T. MOCHIZUKI, K. TODOROKI, J. Z. MIN, H. MIZUNO, K. INOUE, H. AKATSU, I. NOGE and T. TOYO'OKA (2015). "A NOVEL APPROACH FOR LC-MS/MS-BASED CHIRAL METABOLIMICS FINGERPRINTING AND CHIRAL METABOLOMICS EXTRACTION USING A PAIR OF ENANTIOMERS OF CHIRAL DERIVATIZATION REAGENTS." ANALYTICA CHIMICA ACTA **898**: 73-84

TRYGG, J. and S. WOLD (2002). "ORTHOGONAL PROJECTIONS TO LATENT STRUCTURES (O-PLS)." Journal of Chemometrics **16**: 119-128.

VIANA, G. S. B., M. A. M. BANDEIRA and F. J. A. MATOS (2003). "ANALGESIC AND ANTIINFLAMATORY EFFECTS OF CHALCONES ISOLATED FROM MYRACRODRUON URUNDEUVA." PHYTOMEDICINE **10**(2): 189-195.

WAN, J. B., X. BAI, X. J. CAI, Y. RAO, Y. S. WANG and Y. T. WANG (2013). "CHEMICAL DIFFERENTIATION OF DA-CHENG-QI-TANG, A CHINESE MEDICINE FORMULA, PREPARED BY TRADITIONAL AND MODERN DECOCTION METHODS USING UPLC/Q-TOFMS-BASED METABOLOMICS APPROACH." JOURNAL PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS **83**: 34-42.

YANG, H., D. Y. LEE, K. B. KANG, J. Y. KIM, S. O. KIM, Y. H. YOO and S. H. SUNG (2015). "IDENTIFICATION OF GINSENOSE MARKERS FROM DRY PURIFIED EXTRACT OF *PANAX GINSENG* BY A DEREPLICATION APPROACH AND UPLC-QTOF/MS ANALYSIS." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS **109**: 91-104.