



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JHONYSON ARRUDA CARVALHO GUEDES

**ESTUDO DO PERFIL METABOLÔMICO DE FOLHAS DE CAJAZEIRA,
UMBUZEIRO E ABACAXIZEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTICÂNCER POR MEIO DE ANÁLISE MULTIVARIADA**

FORTALEZA

2018

JHONYSON ARRUDA CARVALHO GUEDES

ESTUDO DO PERFIL METABOLÔMICO DE FOLHAS DE CAJAZEIRA,
UMBUZEIRO E ABACAXIZEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTICÂNCER POR MEIO DE ANÁLISE MULTIVARIADA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Professor Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientador: Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2018

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

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

G957e Guedes, Jhonyson Arruda Carvalho.

Estudo do perfil metabolômico de folhas de cajazeira, umbuzeiro e abacaxizeiro e sua correlação com potencial atividade anticâncer por meio de análise multivariada / Jhonyson Arruda Carvalho Guedes. – 2018.

154 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientação: Profa. Dra. Guilherme Julião Zocolo.

1. Metabolômica. 2. Cromatografia. 3. Spondias mombin L.. 4. Spondias tuberosa Arr. Cam.. 5. Ananas comosus L.. I. Título.

JHONYSON ARRUDA CARVALHO GUEDES

ESTUDO DO PERFIL METABOLÔMICO DE FOLHAS DE CAJAZEIRA,
UMBUZEIRO E ABACAXIZEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTICÂNCER POR MEIO DE ANÁLISE MULTIVARIADA

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química,
da Universidade Federal do Ceará, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Química. Área de
concentração: Química Analítica.

Aprovada em: ___/___/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Coorientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Dra. Gisele Simone Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

A Deus.

Aos meus pais, Tércio e Solange.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Tércio e Solange, por todo amor e dedicação para comigo, pessoas que tenho imenso orgulho de ter como pais, fundamentais para a conclusão desse trabalho, pessoas que me ensinaram os princípios da dignidade e honestidade, agradeço também por todo o esforço para me oferecer a melhor educação e por sempre acreditar e confiar no meu potencial.

Ao meu irmão e irmã, Thyêgo, Thárcia Shara. Bem como os demais membros da minha família por todo o apoio oferecido a mim.

A minha namorada Tamyris, por ter me dado apoio incondicional e indescritível, amor, carinho e atenção, sabendo me compreender nas horas difíceis. Agradeço também por toda força e incentivo ao longo do Curso. Sem ela ao meu lado tudo teria sido imensuravelmente mais difícil.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, meu orientador, resumi-lo a meu orientador é pouco, dada a tamanha importância que ele teve, não só na condução do trabalho, mas durante toda essa caminhada, atuando sempre com grande sabedoria, como um grande conselheiro e como um grande amigo. Além disso, agradeço também seu apoio de forma absoluta e irrestrita, sua imensa disponibilidade e paciência, sendo literalmente um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, meu orientador, pela orientação, pela oportunidade, pela disponibilidade e pelo apoio e incentivo. Por acreditar em minha capacidade, por todo o empenho para que minha aprendizagem fosse plena e não medir esforços para que este trabalho fosse realizado.

Ao Dr. Edy Sousa de Brito, pela disponibilidade, pelas grandiosas contribuições e por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo para melhoria do mesmo.

A Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri, pela disponibilidade e por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo bastante para melhoria do mesmo.

A Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa, pela disponibilidade, pela contribuição com o presente trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Ao Dr. Kirley Marques Canuto, por todas as valorosas contribuições no decorrer dessa caminhada, principalmente no Exame de Qualificação.

Aos meus atuais e ex-companheiros do LAT pela amizade e por todas as horas de diversão e descontração propiciadas pelos mesmos: Allen, André Henrique, Ari Clecius, Carla, Cláudio, Clêrton, Daniel, Edmilson, Eliezer, Fátima, Gisele, Juliene, Marília, Max, Pablo, Renata, Sarah, Tatiana e Vitor, em especial, aos meus grandes amigos(as) André Gadelha, Diego, Jefferson, Rouse e Wagner.

Aos meus companheiros do LMQPN pelas horas de descontração, amizade e grandes momentos de aprendizagem: Bruno, Camila Mota, Carol, Erbenia, Fátima, Kaline, Liana, Licia, Marcelo, Oiram, Régis e Sheila.

Aos alunos de iniciação científica, que contribuíram de forma direta na execução desse trabalho: Amanda, Camila, Hiago, Lucas, Luiza, Sávio e Thays, em especial ao Yuri Piridina, pela sua dedicação, proatividade e execução impecável em todas as tarefas que lhe foram dadas.

Aos meus amigos do Sukita, pelas importantes horas de descontração, caminhadas e jogatinas: Breno Bofe, Ed, Felipe, Hand, Italo, Kelly, Murilo e Yuri, em especial ao meu grande amigo Waltim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por subsidiar o projeto de pesquisa.

A Embrapa Agroindústria Tropical, pelo suporte e apoio na realização das atividades de pesquisa deste trabalho, em especial, aos membros do LMQPN, Lorena Mara, Tigressa e Paulo Riceli, que contribuíram e sempre se prontificaram a ajudar ativamente para a execução desse trabalho. Sem esquecer da Sra. Rouse.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), onde passei boa parte do tempo durante o curso, sendo a mesma como uma segunda casa, onde adquiri bastante conhecimento apesar das enormes dificuldades. Além de todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.” (Marie Curie).

RESUMO

O uso de coprodutos da agroindústria de frutas como fonte de moléculas bioativas apresenta vantagens econômicas, uma vez que esses compostos estão disponíveis a um baixo custo e podem apresentar uma alternativa de agregação de valor a essa matéria prima altamente disponível. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil metabolômico das folhas de cajazeira, umbuzeiro e sete variedades de abacaxizeiro, correlacionando os perfis químicos a testes de citotoxicidade. Foram analisados os extratos hexânicos de cajazeira, umbuzeiro e sete variedades do abacaxizeiro e os extratos hidroalcoólicos de folhas de cajazeira e umbuzeiro. Os perfis metabólicos dos extratos hexânicos foram estabelecidos via GC-MS, nas folhas de cajazeira e umbuzeiro foram identificados vinte e três metabólitos distintos, nas cultivares de abacaxizeiro foram identificados vinte e sete. Os extratos hidroalcoólicos das folhas de cajazeira e umbuzeiro foram analisados por UPLC-QTOF-MS^E permitindo a identificação de quarenta e três metabólitos. Através da análise multivariada (PCA, HCA, PLS-DA e OPLS-DA), foi possível correlacionar os perfis metabolômicos com as respectivas atividades citotóxicas, por meio da identificação dos respectivos marcadores químicos. Os extratos hexânicos do umbuzeiro apresentaram alta atividade contra todas as linhagens tumorais incluindo as células saudáveis, mostrando-se, portanto, ser inviável, por apresentar alta citotoxicidade. Contudo, o extrato da cajazeira apresentou atividade de inibição relevante para a linhagem de câncer de próstata (75,28%), além disso, foi verificado um bom índice de seletividade em relação a linhagem celular saudável (44,63%). Em relação aos extratos hexânicos das sete variedades do abacaxizeiro, de modo geral foi verificada atividade citotóxica promissora contra as seis linhagens tumorais testadas (colo humano, leucemia, próstata, astrocitoma, mama e colo do útero), neste caso também foram determinados os biomarcadores que tentativamente foram associados a atividade citotóxica. Nos extratos hidroalcoólicos, os ensaios de citotoxicidade demonstram que as folhas de cajazeira apresentam melhor atividade citotóxica quando comparadas as folhas do umbuzeiro. Os melhores resultados foram obtidos frente as linhagens de células tumorais de leucemia e melanoma. A validação dos biomarcadores encontrados via métodos quimiométricos foi realizada por meio de comparações, usando cálculos teóricos, envolvendo orbitais moleculares o que representou uma inovação no campo dos estudos metabolômicos.

Palavras-chave: Metabolômica. Cromatografia. *Spondias mombin* L. *Spondias tuberosa* Arr. Cam. *Ananas comosus* L.

ABSTRACT

The use of co-products from the fruit agroindustry as a source of bioactive molecules presents economic advantages since these compounds are available at a low cost and may present an alternative of adding value to this highly available raw material. Therefore, the present study had as objective to evaluate the metabolomic profile of the leaves of cajazeira, umbuzeiro and seven varieties of pineapple, correlating the chemical profiles to cytotoxicity tests. The hexane extracts of cajazeira, umbuzeiro and seven varieties of pineapple and the hydroalcoholic extracts of leaves of cajazeira and umbuzeiro were analyzed. The metabolic profiles of the hexane extracts were established via GC-MS, in the cassava and umbuzeiro leaves 23 different metabolites were identified in the cultivars of pineapple were identified 27. The hydroalcoholic extracts of the leaves of cajazeira and umbuzeiro were analyzed by UPLC-QTOF-MS^E allowing the identification of 43 metabolites. Through the multivariate analysis (PCA, HCA, PLS-DA and OPLS-DA), it was possible to correlate the metabolomic profiles with the respective cytotoxic activities, through the identification of the respective biomarkers. The hexanic extracts of the umbuzeiro showed high activity against all the tumoral lines including the healthy cells, being, therefore, to be infeasible, to present high cytotoxicity. However, the extract of cajazeira presented inhibitory activity relevant to the prostate cancer strain (75.28%); in addition, a good selectivity index was verified in relation to the healthy cell line (44.63%). In relation to the hexanic extracts of the seven varieties of pineapple, promising cytotoxic activity against the six tumor lines tested (human colon, leukemia, prostate, astrocytoma, breast and uterine cervix) was generally verified, in this case, the chemical markers that were tentatively associated with the cytotoxic activity. In the hydroalcoholic extracts, the cytotoxicity assays demonstrate that the leaves of cassava have better cytotoxic activity when compared to the umbuzeiro leaves. The best results were obtained against leukemia and melanoma tumor cell lines. The validation of the biomarkers found by chemometric methods was performed through comparisons, using theoretical calculations involving molecular orbitals, which represented an innovation in the field of metabolomic studies.

Keywords: Metabolomics. Chromatography. *Spondias mombin* L. *Spondias tuberosa* Arr. Cam. *Ananas comosus* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Árvore da cajazeira (<i>Spondias mombin</i> L.) com seus respectivos frutos	25
Figura 2	– Umbuzeiro (<i>Spondias tuberosa</i> Arr. Cam.) em cultivo conjunto com milho e feijão (a); Árvore do Umbuzeiro (b); fruta umbu (c) e flores da árvore (d)	28
Figura 3	– Plantação de abacaxis (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.), cultivar imperial.	30
Figura 4	– Relações biossintéticas entre os metabólitos primários e secundários. As rotas biossintéticas dos metabólitos secundários ocorrem pelas seguintes vias: (1) via dos aminoácidos; (2) via do chiquimato; (3) via dos policetídeos; (4) via do ácido mevalônico; (5) e via do metileritritol fosfato (MEP)	34
Figura 5	– Principais classes de metabólitos secundários de plantas e sua origem biossintética	37
Figura 6	– Condensação de unidades de isopreno na formação dos terpenos	38
Figura 7	– Diferentes funções químicas atribuídas a monoterpenos e monoterpenoides	39
Figura 8	– Exemplos de carotenos e xantofilas precursores da vitamina A	42
Figura 9	– Estrutura química do diterpeno taxol (paclitaxel)	42
Figura 10	– Estrutura química dos taninos (a) ácido gálico e (b) β -1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glicose	46
Figura 11	– Estrutura química de taninos hidrolisáveis: (a) galotanino ácido tânico; (b) elagitanino ácido elágico	46
Figura 12	– Exemplos de alguns monômeros que taninos condensados (proantocianidinas)	47
Figura 13	– Núcleo fundamental dos flavonoides com sua numeração sistemática.	48
Figura 14	– Núcleos fundamentais das principais classes de flavonoides	49
Figura 15	– Etapas envolvidas nas análises metabolômicas	53

Figura 16 – Inhibitory effect of <i>S. mombin</i> and <i>S. tuberosa</i> hexane leaf extracts Percent inhibition (%) was determined by MTT assay after 72 h of incubation, and at a concentration of 100 µg mL ⁻¹	68
Figura 17 – Chromatograms, same scale, of hexane leaf extracts Green denotes <i>S. tuberosa</i> and oranges denotes <i>S. mombin</i>)	74
Figura 18 – Chemometrics analysis: a) bidimensional scores coordinate system (PC1 × PC2) from <i>S. mombin</i> and <i>S. tuberosa</i> leaf extracts; b) influence plot from Hotelling's T ² × F residuals; c) line forms of relevant loadings	75
Figura 19 – Heat map representing the chemical composition variability between <i>S. mombin</i> and <i>S. tuberosa</i> . The deeper red color represents the higher relative intensity, the deeper blue color the lower relative intensity, and the intermediary intensity in white color	76
Figura 20 – Chromatogram obtained in the UPLC-QTOF-MS ^E system in negative mode (ESI ⁻) of the extracts from the: (a) <i>S. mombin</i> and (b) <i>S. tuberosa</i>	89
Figura 21 – Principal Component Analysis (PCA) in 3D of the extracts of the <i>S.</i> <i>mombin</i> and <i>S. tuberosa</i> , analyzed by UPLC-QTOF-MS ^E	101
Figura 22 – Charts for the extracts of the leaves of <i>S. mombin</i> (yellow mombin) and <i>S. tuberosa</i> (umbu): (a) OPLS-DA; (b) S-Plot and (c) mean variation of the chemical markers of the ethanolic extract of the leaves of <i>S. mombin</i> in relation to the leaves of <i>S. tuberosa</i> and leaves of <i>S.</i> <i>tuberosa</i> in relation to the leaves of <i>S. mombin</i>	103
Figura 23 – Graphs of the trend variables of the chemical markers: (a) <i>S. mombin</i> leaves (yellow mombin) and (b) <i>S. tuberosa</i> leaves (umbu)	105
Figura 24 – Cell proliferation inhibition (%) of extracts of <i>Spondias</i> leaves determined by MTT assay after 72 h of incubation at a concentration of 100 µg mL ⁻¹	106
Figura 25 – Labeled molecular structure of (a) chlorogenic acid (4), (b) myricetin- 3-O-rhamnoside (20), (c) doxorubicin, (d) geraniin (6) and (e)	

paclitaxel. They were optimized (DFT/ ω B97X-D/6-311++G(d,p)) under effect of solvent (water) via implicit model C-PCM	109
Figura 26 – Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) for (4) , (6) , doxorubicin, (20) and paclitaxel. The LUMO for each structure was calculated from the optimized (DFT/ ω B97X-D/6-311++G(d,p)) structures under effect of solvent (water) via implicit model C-PCM	110
Figura 27 – Comparison among the chromatograms (same scale) from seven cultivars of pineapple leaves with the identified organic compounds	125
Figura 28 – Dendrogram representing chemical composition similarity relationships among leaves from different pineapple cultivars	127
Figura 29 – a) principal components 1 (PC1) vs. principal components 2 (PC2) vs. principal components 3 (PC3) score coordinate system for pineapple leaves from different cultivars; b) respective loadings plotted in line form	128
Figura 30 – Variation in the absolute area of the chemical compounds according to pineapple cultivars, with the same colors illustrated in the score graph (Figure 3a)	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Subclassificação dos metabólitos terpênicos	40
Tabela 2	– Exemplos de tetraterpenos que conferem pigmentação natural a alimentos	41
Tabela 3	– Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a estrutura básica	44
Tabela 4	– Classes dos flavonoides com algumas características conhecidas	50
Tabela 5	– Percent inhibition (%) of <i>S. mombin</i> and <i>S. tuberosa</i> hexane leaf extracts, as determined by MTT assay after 72 h of incubation, at a concentration of 100 µg mL ⁻¹	69
Tabela 6	– Compounds identified in hexane extracts from <i>S. mombin</i> and <i>S. tuberosa</i> leaves	72
Tabela 7	– Statistical parameters obtained by multivariate regression modeling using PLS for each cytotoxic activity	77
Tabela 8	– Constituents identified or tentatively identified in samples of <i>Spondias mombin</i> (yellow mombin) and <i>Spondias tuberosa</i> (umbu) .	91
Tabela 9	– Cultivars from the active germplasm bank of pineapple (AGB Pineapple) or from the experimental fields of Embrapa Cassava and Fruits	115
Tabela 10	– Cell proliferation inhibition (%) of hexane extracts from pineapple leaves against HCT-116 (colon carcinoma), PC3 (prostate), HL60 (leukemia), MCF-7 (breast), SNB19 (astrocytoma), and HeLa (cervix) cells determined by MTT assay after 72 h of incubation at a concentration of 100 µg mL ⁻¹ . The selectivity of the compounds was investigated using cell line L929 (mouse fibroblast)	120
Tabela 11	– Relevant chemical compounds identified in hexane extract of leaves from <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr., with respective retention time (RT in min), theoretical and experimental retention indices (RI), relative area, representative ions (<i>m/z</i>), and percentage (%) match	121

Tabela 12 – Statistical parameters obtained by multivariate calibration using PLS regression for each cytotoxic activity	130
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivos específicos	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	O gênero <i>Spondias</i>	23
3.1.1	<i>Spondias mombin</i>	24
3.1.2	<i>Spondias tuberosa</i>	27
3.2	O gênero <i>Ananas</i>	29
3.2.1	<i>Ananas comosus</i>	30
3.3	Metabolismo vegetal	32
3.3.1	<i>Metabólitos secundários</i>	33
3.3.1.1	<i>Terpenos</i>	36
3.3.1.2	<i>Compostos fenólicos</i>	43
3.3.1.3	<i>Taninos</i>	44
3.3.1.4	<i>Flavonoides</i>	48
3.4	Metabolômica	51
3.4.1	<i>Preparo de amostras nas análises metabolômicas</i>	54
3.4.2	<i>Técnicas analíticas utilizadas em estudos metabolômicos</i>	55
3.4.3	<i>Análise estatística em estudos metabolômicos</i>	57
3.4.3.1	<i>Métodos não supervisionados de análises de dados</i>	59
3.4.3.2	<i>Métodos supervisionados de análises de dados</i>	61
4	PERFIL METABOLÔMICO BASEADO EM CG-EM COMBINADO COM FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS DE EXTRATOS APOLARES DE FOLHAS DE SPONDIAS MOMBIN L. E SPONDIAS TUBEROSA ARR. CAM. ASSOCIADO A ATIVIDADES CITOTÓXICAS	62
5	ESTUDOS METABOLÔMICOS DE FOLHAS DE SPONDIAS MOMBIN L. E SPONDIAS TUBEROSA ARR. CAM. CORRELACIONADO COM A ATIVIDADE CITOTÓXICA	81
6	PERFIL METABÓLICO E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS APOLARES DE FOLHAS DE ABACAXI E ANÁLISE	

	QUIMIOMÉTRICA DE DIFERENTES CULTIVARES DE	
	ABACAXI	112
7	CONCLUSÕES	134
	REFERÊNCIAS	136

1 INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e vegetais é recomendado em diretrizes alimentares em nível mundial, elas são ricas em nutrientes e metabólitos que podem prevenir várias doenças (BAZZANO, 2005). O consumo atual é dado de forma bem abrangente não resumindo-se apenas em porções frescas, como também em formas congeladas, em produtos processados e derivados, incluindo frutas secas, enlatadas, em iogurtes, bebidas e geleias (HEBER et al., 2006). Além disso, tem havido uma tendência crescente no uso de frutas como ingredientes em alimentos funcionais e suplementos, que podem ser combinados com outras frutas, vegetais coloridos e extratos de ervas.

Frutos proporcionam significativos benefícios a saúde em decorrência de seus altos níveis de polifenóis, vitaminas, minerais e fibras (ZHAO, 2007). Os polifenóis compreendem uma ampla variedade de compostos, divididos em várias classes, como os ácidos hidroxibenzoico, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, estilbenos, e lignanas que ocorrem em espécies silvestres.

Em detrimento da capacidade agroindustrial instalada, que atende a grandes demandas, o setor de fruticultura pouco aproveita os resíduos gerados, que em sua maioria produzem grandes quantidades de resíduos. O desenvolvimento de novos produtos, a partir de fontes alternativas ou seja, a implementação de novos usos para resíduos de folhas de umbuzeiro, cajazeira e abacaxizeiro, tendo em vista que a literatura relata que tais partes da planta possuem uma concentração bem mais elevada de substâncias bioativas quando comparadas às frutas (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001; SOUSA et al., 2016).

Pesquisas já demonstraram existir uma vasta diversidade de moléculas com alto potencial antioxidante dentro de variados gêneros de fruteiras (MANACH et al., 2004; MOYER et al., 2002). Além disso, evidências sugerem que o genótipo tem uma profunda influência sobre concentrações de compostos bioativos (ANTTONEN; KARJALAINEN, 2005). Testes em laboratórios mostraram que as fruteiras têm propriedades anticancerígenas, antioxidantes e antiproliferativos (HEBER et al., 2006; MEYSKENS; SZABO, 2005).

Estes diferentes compostos bioativos, incluindo flavonoides, taninos e ácidos fenólicos, têm recebido considerável atenção por se apresentarem como moléculas que trazem possíveis efeitos positivos à saúde humana. Estudos *in vitro* e

in vivo têm sido realizados, enfatizando o papel dos metabólitos secundários como importantes moléculas bioativas. Na verdade, a química e a biologia de ácidos fenólicos e flavonoides são importantes no contexto dos efeitos biológicos exercido no corpo humano (BAGALKOTKAR et al., 2006; KUMAR et al., 2015; PERERA; TON; PALANISAMY, 2015). Nesse contexto, o presente trabalho destaca o estudo de folhas, que é um importante coproduto, de três frutas comercialmente relevantes para a região do Semiárido: cajazeira, umbuzeiro e abacaxizeiro. Do ponto de vista fitoquímico, essas espécies são ricas em metabólitos secundários, em particular, os compostos fenólicos, com atividades biológicas promissoras.

Estudos científicos demonstram usos medicinais que pessoas, de diversas partes do mundo, fazem das plantas do gênero *Spondias*, gênero no qual estão inseridas as frutas cajá e umbu. Porém, mais estudos farmacológicos devem ser realizados, devido a potencialidade da planta. Os estudos realizados atribuem os mecanismos de ação aos compostos fenólicos (taninos e flavonoides), na maioria, presentes nas folhas. No entanto, outros metabólitos secundários também podem contribuir para essas atividades, pois vitamina C, saponinas, alcaloides, terpenos e carotenoides têm sido identificados nessas espécies (AYOKA et al., 2006; BATAGLION et al., 2015; CARVALHO-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012; ZERAIK et al., 2016).

As espécies do gênero *Spondias* mais estudadas são a *S. mombin* (cajá) e *S. tuberosa* (umbu). O conhecimento a respeito da composição química dos extratos de folhas, cascas e frutos dessas plantas é fundamental para determinar a atividade das mesmas e, como muitas possuem componentes em comum, também podem ter ações semelhantes. Por isso, as demais espécies, provavelmente, têm importantes ações farmacológicas que merecem ser investigadas (PESSOA et al., 2006).

O fato de atividades terem sido estudadas e comprovadas, e as pesquisas demonstrarem baixa toxicidade em modelos experimentais *in vivo* (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000), justifica a continuidade das pesquisas com espécies desse gênero. Somado a isso, a literatura carece de informações mais aprofundadas quanto ao perfil químico dessas espécies, associado a atividade anticâncer das folhas e casca das mesmas

O abacaxi é uma das frutas tropicais mais consumidas do mundo, se caracterizando como uma fruta mundialmente importante na indústria alimentícia. A fruta apresenta boas características sensoriais, além disso, é conhecida por ser uma

boa fonte de vitaminas e antioxidantes, exibindo alta atividade contra radicais livres, maior que a banana e comparável a goiaba (SHARMA et al., 2016).

O abacaxi apresenta reconhecidas propriedades farmacológicas, sendo também utilizado na medicina popular e indígena para o tratamento da disúria e como antidiarreico. Estudos reportaram que extratos da fruta apresentam efeitos antidiabéticos e anti-inflamatórios, sendo os compostos fenólicos associados a estes efeitos (MA et al., 2007).

No entanto, ainda são poucas as informações sobre o perfil metabólico das principais cultivares de abacaxi. Estudos relacionados a atividade citotóxica que possam ser correlacionadas aos compostos bioativos encontrados nas folhas destes cultivares são necessários.

As folhas de abacaxi são um coproduto gerado em grande quantidade, nesse contexto, estudos que demonstrem a funcionalidade das folhas podem abrir seu espectro de uso, potencializando seus benefícios à saúde e agregando valor a planta.

A evidência dos compostos fenólicos bem como a de outras classes de metabólitos associados aos conhecimentos populares dos seus efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes, destas espécies indicam um potencial para investigação e descoberta de novos fármacos.

Os produtos naturais, mais especificamente os metabólitos secundários, são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm (BUTLER, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2013; FUNARI et al., 2013; HAEFNER, 2003; MISHRA; TIWARI, 2011). Muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas importantes nos vegetais, tais como: proteção contra herbívoros e contra infecção por patógenos; atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2010). Além disso, são de grande utilidade para espécie humana como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos, agroquímicos e etc (BUTLER, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2013; FUNARI et al., 2013; HAEFNER, 2003; MISHRA; TIWARI, 2011).

Nesse contexto, a metabolômica tem sido considerada uma das mais avançadas abordagens sobre o mapeamento químico de um organismo, permitindo o estudo da composição metabólica de um organismo ou sistema biológico, de modo que são descritos todos os metabólitos presentes em um dado organismos. O estudo trata-se de uma combinação de técnicas analíticas e estatísticas, que fornece

informações e percepções sobre as semelhanças e diferenças, em termos qualitativos e quantitativos, da gama dinâmica de metabólitos nos organismos (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005; MAO et al., 2014; SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Desse modo, a metabolômica se destaca de qualquer outra análise de compostos orgânicos em escala de diversidade química (BOUFRIDI; QUINN, 2016; FUNARI et al., 2013; HU; XU, 2013; MOCO et al., 2007).

O mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie exige, necessariamente, o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas de alto desempenho, uma vez que o número de compostos químicos em um extrato à base de plantas ou de outros materiais de origem biológica pode chegar a milhares (FUNARI et al., 2013). Nesse contexto, os métodos espectroscópicos (RMN, MS, MS-MS) e cromatográficos (HPLC, UPLC, GC, GC-MS, LC-MS) são amplamente utilizados para análise metabólica de extratos de plantas (FUNARI et al., 2013; YULIANA et al., 2013). Desse modo, o acoplamento de uma técnica que leve à separação dos constituintes de uma amostra com uma ou mais técnicas espectroscópicas que deem informações sobre a estrutura destes constituintes é frequentemente utilizado para o estabelecimento dos perfis metabólicos de amostras (FUNARI et al., 2013).

Dentre os métodos de separação utilizados nos estudos metabolômicos destacam-se a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) de alta e de ultra alta eficiência (HPLC e UPLC, respectivamente), sendo as duas últimas as mais aplicadas em estudos metabolômicos, dado ao fato de serem adequadamente compatíveis aos analitos presentes nos produtos naturais. Além disso, a cromatografia líquida é um método de separação bastante versátil, uma vez que permite a separação de compostos de uma ampla gama de polaridade com pouco esforço na preparação de amostras, quando comparado a GC (AYOKA et al., 2006; BOUFRIDI; QUINN, 2016; CUNHA et al., 2017; DORTA et al., 2014; FUNARI et al., 2013; HU; XU, 2013; JIANG et al., 2010; MOCO et al., 2007; NAUSHAD; KHAN, 2014; SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006). Por outro lado, dentro das técnicas espectrométricas, a espectrofotometria no ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis), a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e a ressonância magnética nuclear (NMR 1D e 2D) destacam-se para a obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas (DORTA et al., 2014; ERŞAN et al., 2016; FUNARI et al., 2013;

KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011; LI et al., 2016; NAUSHAD; KHAN, 2014; VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007).

Atualmente, a combinação da UPLC acoplada à HRMS com ionização por *electrospray* e analisador de massas por tempo de voo (ESI-TOF), e/ou a espectrometria de massas *tandem* (MSⁿ) é a que fornece a melhor relação custo-benefício. Sendo assim, um equipamento de UPLC-QTOF-MS^E é uma técnica extremamente sensível, demandando quantidades mínimas de amostras e menor tempo de análise, proporcionando um arsenal de informações valiosas quanto à estrutura dos metabólitos de interesse (FORCISI et al., 2013; FUNARI et al., 2013; MOCO et al., 2007).

A literatura reporta diversos estudos com as mais variadas frutas, correlacionado com distintas propriedades farmacológicas, contudo, um coproduto agroindustrial pouquíssimo aproveitado são as cascas, galhos e folhas dos frutos. Desse modo, o trabalho se propõe em realizar estudos metabolômicos das folhas de cajazeira, umbuzeiro e de sete variedades comerciais de abacaxizeiro.

Tendo em vista os numerosos usos medicinais é surpreendente que as investigações fitoquímicas sobre estas interessantes frutas tropicais comestíveis serem escassas. Portanto, faz-se necessário estudos mais aprofundados, quanto a composição química das espécies selecionadas, embora haja alguns estudos relatados na literatura a maior parte deles não apresenta uma caracterização química consistente.

Sendo assim, somando as informações apresentadas anteriormente, que vão desde o grande potencial dos produtos naturais, aliando a grande importância dos metabólitos secundários, o presente trabalho se propõe a conceber estudos metabolômicos das folhas de cajazeira, umbuzeiro e de sete variedades comerciais de abacaxi, utilizando técnicas de extração, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-QTOF-MS^E) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Dessa forma, será possível traçar o perfil metabólico das folhas da cajazeira, umbuzeiro e abacaxizeiro, bem como a realização de ensaios citotóxicos para a avaliação e correlação da atividade biológica com os compostos químicos detectados.

2 OBJETIVOS

Realizar estudos metabolômicos dos extratos hidroetanólicos e hexânicos das folhas de cajazeira (*Spondias mombin* L.), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) e sete cultivares comerciais de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) por meio da UPLC-QTOF-MS^E e GC-MS conjuntamente com análises quimiométricas e ensaios citotóxicos *in vitro* frente à diferentes linhagens de células tumorais com o intuito de gerar o conhecimento químico que possa ser correlacionado ao potencial da atividade anticâncer.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar os compostos químicos dos extratos hidroetanólicos e hexânicos das folhas de cajazeira, umbuzeiro e sete cultivares comerciais de abacaxi;
- Testar a atividade citotóxica *in vitro* desses extratos frente às linhagens tumorais HL60 (leucêmica), HCT-116 (colo humano), PC3 (próstata), SNB19 (astrocitoma), MCF-7 (mama), B16F10 (melanoma) e HeLa (colo do útero);
- Estabelecer relação entre as atividades citotóxicas e os testes de seletividade provenientes das células não tumorais (L929);
- Obter informações a respeito das diferenças e semelhanças entre os perfis químicos das folhas do umbuzeiro e da cajazeira, a partir dos dados de análise quimiométricas (PCA);
- Obter informações a respeito das diferenças e semelhanças entre os perfis metabólicos das sete cultivares de folhas de abacaxi, a partir dos dados de análise quimiométricas (PCA e HCA);
- Listar as variáveis, ou compostos discriminantes, que influenciam a diferenciação entre os extratos mediante a separação dos grupos através da OPLS-DA, PLS-DA e S-Plot;
- Correlacionar os perfis químicos e atividades citotóxicas, por meio das análises quimiométricas, com a finalidade de determinar os compostos ou grupos de compostos ligados a atividade biológica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Spondias*

A família Anacardiaceae compreende cerca de 76 gêneros e 600 espécies que são principalmente árvores e arbustos que crescem em zonas tropicais, subtropicais e temperadas. A família é subdividida em cinco tribos: *Anacardiaceae*, *Spondiadeae*, *Rhoeae*, *Semecarpeae* e *Dobineae* (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; LIMA; SILVA; OLIVEIRA, 2018; WANNAN, 2006).

Desse modo, a família Anacardiaceae constitui uma ampla variedade de espécies, que têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lansea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacando-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonoides, terpenos, esteroides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólicos e derivados (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006).

Alguns membros das tribos *Anacardiaceae* e *Rhoeae*, como o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.) e pistache (*Pistacia vera* L.) são plantas com frutas comestíveis importantes. A tribo *Spondiadeae* inclui 17 gêneros e 140 espécies, com cerca de 14 a 15 espécies pertencentes ao gênero *Spondias* (BACHELIER; ENDRESS, 2009).

No gênero *Spondias* as espécies que merecem destaque são cajazeira (*Spondias mombin* L.), cujos frutos são conhecidos em certas regiões brasileiras como cajá, cajá-mirim ou taperebá, ciriguela, umbu ou imbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.); cajarana ou cajá-manga (*S. dulcis* Forst. ou *S. cytherea* Sonn.) e duas espécies taxonomicamente indefinidas, contudo, são consideradas híbridos naturais, cajá-umbu ou umbucajá (*S. mombin* × *S. tuberosa*) e umbuguela (*S. tuberosa* × *S. purpurea*). A *S. tuberosa* é nativa de regiões semiáridas e as suas ocorrências são restritas no nordeste do Brasil (SANT'ANNA-SANTOS et al., 2006).

No Brasil, dentre as espécies do gênero *Spondias*, podemos destacar a importância comercial do cajá (*S. mombin*), umbu (*S. tuberosa*) e cajá-umbu (*S.*

mombin x S. tuberosa). Seus frutos são comercializados *in natura* ou processados na forma de polpas, sucos e outros produtos alimentícios. Devido à utilização comercial destes frutos, estudos vêm abordando as suas características de cultivo, assim como as características físico-químicas, maturação e estabilidade, bem como, seus constituintes químicos (ALMEIDA; ALBUQUERQUE; CASTRO, 2011; HAMANO; MERCADANTE, 2001).

Somado ao uso comercial, também há literatura considerável quanto ao uso popular de espécies deste gênero. Na medicina tradicional, em diversas regiões do mundo, espécies do gênero *Spondias* são utilizadas para o tratamento de desordens infecciosas e também como abortivo (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; HAJDU; HOHMANN, 2012).

3.1.1 *Spondias mombin*

Cajá (*Spondias mombin* L.), Figura 1, é uma fruta pequena, de forma elíptica com 3-4 cm de comprimento, cultivada na Região Nordeste do Brasil. Sua utilização comercial tem aumentado nos últimos anos, devido a sua acessibilidade, disponibilidade durante todo o ano e o fácil preparo. Como exemplo, os frutos da cajazeira (*S. mombin*) são utilizados como polpas congeladas e sucos pasteurizados (HAMANO; MERCADANTE, 2001).

Esses frutos apresentam altos níveis de potássio, magnésio, fósforo e cobre, quando comparada a outras frutas. Apresentam também altos teores de compostos fenólicos e antioxidantes do que a maioria dos frutos consumidos no Brasil (TIBURSKI et al., 2011). A cor amarela da polpa do cajá indica a presença de carotenoides, que contribuem para a aparência atraente das frutas e produtos derivados de sua polpa. Os seguintes carotenoides já foram encontrados na polpa do cajá: luteína, zeinoxantina, β -criptoxantina, *cis*- β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno e fitoeno. A β -criptoxantina, a luteína e a zeinoxantina são os principais carotenoides presentes (HAMANO; MERCADANTE, 2001; MATTIETTO; MATTA, 2011; TIBURSKI et al., 2011).

Estudos fitoquímicos revelaram que suas folhas contém taninos, saponinas, resinas, esteróis e triterpenos, flavonoides e alcaloides (ASUQUO et al., 2013; CARABALLO; CARABALLO; RODRÍGUEZ-ACOSTA, 2004). Em resumo, a espécie possui uma composição que confere alto valor nutricional, podendo estar

associada à prevenção de diversas doenças (TIBURSKI et al., 2011). Na medicina tradicional, as folhas e casca do caule da cajazeira (*S. mombin*) são utilizadas para tratamento de desordens infecciosas, principalmente diarreias e disenterias (BURKILL, 1995). As folhas também são utilizadas como anti-inflamatório, antitumoral, antidepressivo e ansiolítico (AYOKA et al., 2005; CABRAL et al., 2016; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; ELUFIOYE et al., 2017; SAMPAIO et al., 2018; UCHENDU; ISEK, 2008).

Figura 1 - Árvore da cajazeira (*Spondias mombin* L.) com seus respectivos frutos.



Fonte: Adaptado de “Fruits of Colombia: *Spondias mombin*”, 2018.

Em estudo *in vitro*, os extratos aquoso e etanólico de folhas de cajazeira (*S. mombin*) inibiram o crescimento bacteriano, sendo este o primeiro relato da validação do uso popular desta espécie como antibacteriano (AJAO; SHONUKAN; FEMI-ONADEKO, 1985). Pesquisas com extrato metanólico das folhas da cajazeira (*S. mombin*) apresentaram atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella dysenteriae*, enquanto extratos da casca do caule inibiram o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999).

Comprovações experimentais de atividades antiparasitárias apresentam resultados promissores. Motivadas pelo uso de plantas medicinais para o tratamento de malária na região de fronteira entre o Brasil e a Venezuela, em que o as folhas da

cajazeira (*S. mombin*) foram citadas para amenizar os sintomas da febre, possivelmente devido à presença de taninos e flavonoides (CARABALLO; CARABALLO; RODRÍGUEZ-ACOSTA, 2004).

Desta forma, as avaliações *in vitro* evidenciaram atividade leishmanicida, devido à presença de galotaninos em sua composição química (ACCIOLY et al., 2012). A atividade anti-helmíntica foi comprovada *in vitro* e *in vivo* contra *Haemanchus* ssp., *Trichostrongylus* ssp., *Oesophagostomum* ssp., *Strongyloides* ssp. e *Trichuris* ssp (ADEMOLA; FAGBEMI; IDOWU, 2005).

Após a validação da atividade anti-helmíntica, estudos do uso de folhas de cajazeira (*Spondias mombin*) como ração animal foram viabilizados, motivado pela presença de saponinas, alcaloides, flavonoides e taninos. A quantificação dos minerais identificou o cálcio e potássio como majoritários, mas também há concentração expressiva de selênio, bem como, de vitaminas A e C (IGWE et al., 2010). Em contrapartida, outro estudo determinou elevadas concentrações de ferro e cromo (AYOOLA; ADEYEYE; ONAWUMI, 2010). A presença de cromo possibilita o uso desta espécie para o tratamento de *diabetes mellitus*, uma vez que este micronutriente apresenta ação agonista à insulina (GOMES et al., 2005).

Embora os extratos não apresentem atividade antifúngica significativa, certa atividade antimicrobiana é atribuída à presença de taninos, saponinas e antraquinonas (ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999). Também há relato na literatura de atividade satisfatória contra *Mycobacterium tuberculosis* (OLUGBUYIRO; MOODY; HAMANN, 2009). Em avaliação *in vivo*, a atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *Clostridium sporogenes* foi comprovada, evoluindo nos testes para um possível fitomedicamento antibacteriano a base do extrato das folhas da cajazeira (*S. mombin*) (OLADUNMOYE, 2007).

Além disso, estudos revelam que o extrato metanólico de *S. mombin* inibe a replicação dos vírus *Herpes simplex* e coxsakie B, responsáveis por dolorosas úlceras bucais. Os compostos ativos contra esses vírus foram identificados como geraniina, galoilgeraniina e dois ésteres de cafeína (CORTHOUT et al., 1991, 1992; SILVA et al., 2011). Outros compostos foram isolados das folhas e cascas desta espécie, identificados como ácido 2-O-cafeicol-(+)-alohidroxicítrico e butil éster butírico do ácido clorogênico, que mostraram considerável atividade antiviral (CORTHOUT et al., 1992), bem como, o ácido elágico e quercetina isolados das

folhas, apresentaram atividade antiviral contra o vírus da dengue tipo 2 (SILVA et al., 2011).

Na medicina tradicional africana, as folhas da cajazeira (*S. mombin*) também são utilizadas no tratamento de distúrbios neurológicos. Alguns trabalhos desenvolvidos comprovaram cientificamente os efeitos ansiolítico, sedativo, antiepiléptico e antipsicótico (AYOKA et al., 2005, 2006; SAMPAIO et al., 2018). Os efeitos no sistema nervoso central observados com o uso de extratos alcoólicos e aquosos das folhas são atribuídos a presença de flavonoides e alcaloides (ASUQUO et al., 2013).

3.1.2 *Spondias tuberosa*

Entre as espécies nativas da região semiárida do Nordeste brasileiro, o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.), Figura 2, destaca-se pela possibilidade de ser cultivado em larga escala, podendo ser aproveitado tanto para alimentação humana quanto para a suplementação alimentar de animais, especialmente caprinos e ovinos, que constituem os rebanhos predominantes nessa região (ALBUQUERQUE; ANDRADE; SILVA, 2005).

A avaliação etnofarmacológica de *Spondias tuberosa* identificou usos diversos para tratamento de algumas patologias, entre elas diabetes, inflamações, cólicas uterinas, dores de estômago e como hipocolesterolêmico (LINS NETO; PERONI; ALBUQUERQUE, 2010). Os frutos do umbuzeiro apresentam pronunciada atividade antioxidante e sequestro de radicais livres, que pode ser atribuído a presença de compostos fenólicos e vitamina C, além disso, há relatos da presença de flavonoides, antocianinas e carotenoides (ALMEIDA et al., 2011; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; LIMA; SILVA; OLIVEIRA, 2018; RUFINO et al., 2011, 2010; ZERAIK et al., 2016). Outros compostos bem conhecidos por suas propriedades terapêuticas também foram detectados em umbu, tais como os ácidos: gálico, clorogênico, protocatecúico, *p*-cumárico, vanílico e ferúlico. Sendo os fenólicos majoritários o ácido clorogênico (118,9 µg g⁻¹ de polpa) e o ácido protocatecúico (141,3 µg g⁻¹ de polpa) (GOMES et al., 2013; ZERAIK et al., 2016).

Figura 2 - Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) em cultivo conjunto com milho e feijão (a); Árvore do Umbuzeiro (b); fruta umbu (c) e flores da árvore (d).



Fonte: Adaptado de LINS NETO; PERONI; ALBUQUERQUE, 2010.

O extrato metanólico das folhas do umbuzeiro (*S. tuberosa*) assim como o das folhas da cajazeira (*S. mombin*) apresentou atividade antiviral contra o vírus da dengue tipo 2, contudo, o extrato das folhas do umbuzeiro (*S. tuberosa*) apresentou atividade antiviral de forma mais pronunciada, tal fato é atribuído a presença de ácido elágico, flavonóis, quercetina e rutina nos extratos de umbu (SILVA et al., 2011).

Estudos realizaram a avaliação dos efeitos anticâncer de extratos de 72 amostras de espécies do nordeste brasileiro, dentre elas, o extrato das cascas do umbuzeiro apresentou atividade inibitória sobre as células malignas de tumor (PESSOA et al., 2006).

Devido à presença de flavonoides e taninos nos frutos e casca do caule do umbuzeiro (*S. tuberosa*), associado ao conhecimento popular dos seus efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes, esta espécie é promissora para bioprospecção e descoberta de novos fármacos (DE SOUSA ARAÚJO et al., 2008).

3.2 O gênero *Ananas*

A família Bromeliaceae inclui cerca de 56 gêneros e mais de 2700 espécies, divididos em três subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae. A família se destaca por ser uma das principais componentes da flora brasileira, abrigando aproximadamente 36% das espécies catalogadas com vários gêneros endêmicos, alguns deles encontrados apenas na Mata Atlântica. As espécies dessa família se encontram presentes em grande parte da América do Sul, Caribe e América Central, chegando a alcançar o México e o sudeste norte-americano (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009).

Como já foi mencionado anteriormente, dentro da família Bromeliaceae estão inseridas muitas espécies. Contudo, poucas delas foram estudadas quimicamente até o momento. Entretanto, há uma quantidade considerável de compostos químicos identificados, os quais pertencem majoritariamente às classes dos triterpenos e flavonoides. Outras classes de compostos como esteróis, diterpenos, ácidos cinâmicos, gliceróis substituídos e compostos nitrogenados também foram identificados nesta família. Do ponto de vista farmacológico, também há poucos trabalhos descritos na literatura (MA et al., 2007; MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009).

À família Bromeliaceae estão associadas diversas espécies nas quais são utilizadas como fonte de fibras, alimentos, forragens e medicamentos, além de uso ornamental e místico (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009). Apesar do nome desta família estar profundamente associado às bromélias, o abacaxi (*Ananas comosus*) é a espécie mais conhecida, sendo considerado uma das frutas tropicais mais populares do mundo. Além disso, é o único representante desta família cultivado extensivamente como fonte de alimento (CATHCART, 1995; MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009).

O gênero *Ananas* é o mais importante do ponto de vista econômico, tendo em vista que nele está incluído o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.), dentro do qual figuram inúmeras variedades hortícolas e também outras espécies que são utilizadas para a produção de fibras ou para ornamentação (SOUSA; WANDERLEY, 2007).

A espécie *Ananas comosus* (L.) Merr. é a mais estudada quimicamente nesta família, em função do valor comercial. Vários estudos foram conduzidos com a finalidade de identificar as substâncias responsáveis pelo seu aroma. Desse modo,

cerca de 280 constituintes voláteis foram determinados, todavia poucos deles foram identificados como sendo contribuintes efetivos do aroma do abacaxi. Entre os principais constituintes do aroma do abacaxi, tem-se a furanona do abacaxi (4-hidroxi-2,5-dimetil-3[2H]-furanona (HDF) ou furaneol®), ésteres como 2-metilbutanoatos de metila e etila, 2-metilpropanoato de etila, hexanoato de metila, 3-(metiltio)propanoatos de metila e etila, como também vários hidroxi e acetoxi ésteres, γ -lactonas e o 1-(*E,Z*)-3,5-undecatrieno (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009).

3.2.1 *Ananas comosus*

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.), Figura 3, é uma monocotiledônea herbácea perene pertencente à família Bromeliaceae com distribuição neotropical. No Brasil, há representantes distribuídos em quase todos os ecossistemas, desde o nível do mar até as regiões montanhosas de altitudes mais elevadas (SOUSA; WANDERLEY, 2007).

No que se refere à morfologia externa do abacaxizeiro este apresenta um caule (talo) curto e grosso, de onde partem folhas em forma de calha, estreitas e rígidas, no qual se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, encontrado geralmente a uma profundidade de 15 a 30 cm da superfície do solo (SOUSA; WANDERLEY, 2007).

Figura 3 - Plantação de abacaxis (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cultivar imperial.



Fonte: Adaptado de EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2014.

O modo como a folha do abacaxizeiro se insere no caule determina os tipos de planta: ereta, semiereta e tende a horizontal. As folhas são rígidas com ceras nas superfícies superiores e protegidas na parte inferior por uma camada de tricomas que reduzem a transpiração. Na base do caule localizam-se as folhas mais velhas com formato de lança e as mais novas apresentam-se alongadas, conservando a parte basal mais larga (SOUSA; WANDERLEY, 2007).

O abacaxi (*Ananas comosus*) é bastante utilizado como alimento, além disso, também é muito utilizado na medicina popular. Uma vez que o mesmo, apresenta reconhecidas propriedades medicinais, agindo principalmente como estomáquico, carminativo, diurético e anti-inflamatório, sendo também indicado para problemas nas vias respiratórias e para neurastenia (LORENZI; MATOS, 2008; MA et al., 2007; MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009; PAVAN et al., 2012).

O abacaxi tornou-se muito popular principalmente pelo seu sabor e aroma marcantes. Seus frutos são fonte de bromelina, sendo esta uma enzima que os protege da depredação por larvas de insetos, a qual apresenta grande valor comercial e cujo uso se encontra em ascensão devido à sua aplicabilidade na indústria farmacêutica (atividade anti-helmíntica, anti-inflamatória e anticancerígena) (KALAISELVI et al., 2012; MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009; PAVAN et al., 2012; TYSNES et al., 2001).

Nesse contexto, estudos que demonstrem a funcionalidade da bromelina como suplemento alimentar podem abrir seu espectro de uso, potencializando seus benefícios à saúde (BITANGE et al., 2008; PAVAN et al., 2012), devendo estes estudos incluir a casca, folha, coroa e caule, além da polpa do abacaxi.

A literatura reporta procedimentos de extração e purificação da bromelina de diferentes infrutescências (KETNAWA; CHAIWUT; RAWDKUEN, 2012; LOPES et al., 2013), bem como seu potencial anti-inflamatório, mostrando elevado efeito inibitório dos marcadores de inflamação, a exemplo da produção de prostaglandinas (PG), através da atividade da ciclo-oxigenase - 2 (COX-2) e do fator de transcrição nuclear-Kappa B (NF-kB), tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (CHOBOTOVA; VERNALLIS; MAJID, 2010; KALRA et al., 2008).

Além da bromelina, os compostos fenólicos constituem um grupo de moléculas que têm despertado interesse de pesquisadores para o uso no controle de doenças. Estudos tem comprovado que fenólicos oriundos de diferentes fontes

vegetais inibem a atividade da COX-2 e NF-kB (CICHOCKI; BLUMCZYŃSKA; BAER-DUBOWSKA, 2010; RANILLA et al., 2010).

Pesquisas sobre propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias de frutos tem sido realizadas, sobretudo utilizando ensaios *in vivo*, com a finalidade de estabelecer soluções para prevenir e ajudar no tratamento do câncer (KALRA et al., 2008). Portanto, extratos obtidos de diferentes partes da planta podem atuar como coadjuvantes no tratamento de cânceres e outras doenças degenerativas (LEA et al., 2008). No entanto, ainda são poucas as informações que atribuem a atividade anticâncer aos compostos bioativos encontrados em cultivares de abacaxi.

Na literatura são reportados diversos usos que atestam as propriedades medicinais do abacaxi. Sendo utilizado na Tailândia para o tratamento da disúria, na China, serve como agente alexifármaco, antitussígenos e antidiarreicos, e as folhas são usualmente empregadas como agente contra a dispepsia e antidiarreico (XIE et al., 2006); na Índia, o suco das folhas e frutos verdes apresenta atividade anti-helmíntica e propriedades abortivas (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009).

Estudos com extratos etanólicos das folhas de abacaxi indicaram efeitos antidiabético, anti-hiperlipidêmico e antioxidante. Pesquisas também relataram que os extratos de folhas de abacaxi podem aumentar a sensibilidade à insulina em ratos com diabetes do tipo II. Além disso, outras propriedades farmacológicas também são atribuídas ao abacaxi, tais como anti-inflamatória, antioxidante, e depurativa (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009; XIE et al., 2006).

3.3 Metabolismo vegetal

Os metabólitos são produtos intermediários ou finais de todos os processos celulares, ou seja, são os resultados terminais de adaptações dos organismos em resposta a um ambiente (CANUTO et al., 2018; FIEHN, 2001, 2002). Nesse contexto, as plantas produzem uma quantidade imensurável de metabólitos com estruturas químicas que vão de simples a estruturas com altíssima complexibilidade. Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos, os metabólitos primários e os metabólitos secundários.

Os metabólitos primários, também denominados de metabólitos basais, são moléculas essenciais para o crescimento e desenvolvimento, sendo destinados principalmente à manutenção da vida e à reprodução de todos os seres vivos. Nesse

grupo estão incluídos os fitoesteróis, aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, vitaminas e ácidos graxos (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; HARBORNE, 1999; SIMÕES et al., 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os metabolismos basais de plantas, animais, microrganismos e seres humanos apresentam grandes semelhanças. Por outro lado, na maioria das vezes, os metabólitos secundários são restritos a *taxa* (plural de *taxo*, unidade taxonômica) específicos, estabelecendo assim uma relação quimiotaxonômica, uma vez que, a ocorrência de alguns metabólitos secundários são característicos à algumas famílias, gêneros ou espécies (SIMÕES et al., 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013).

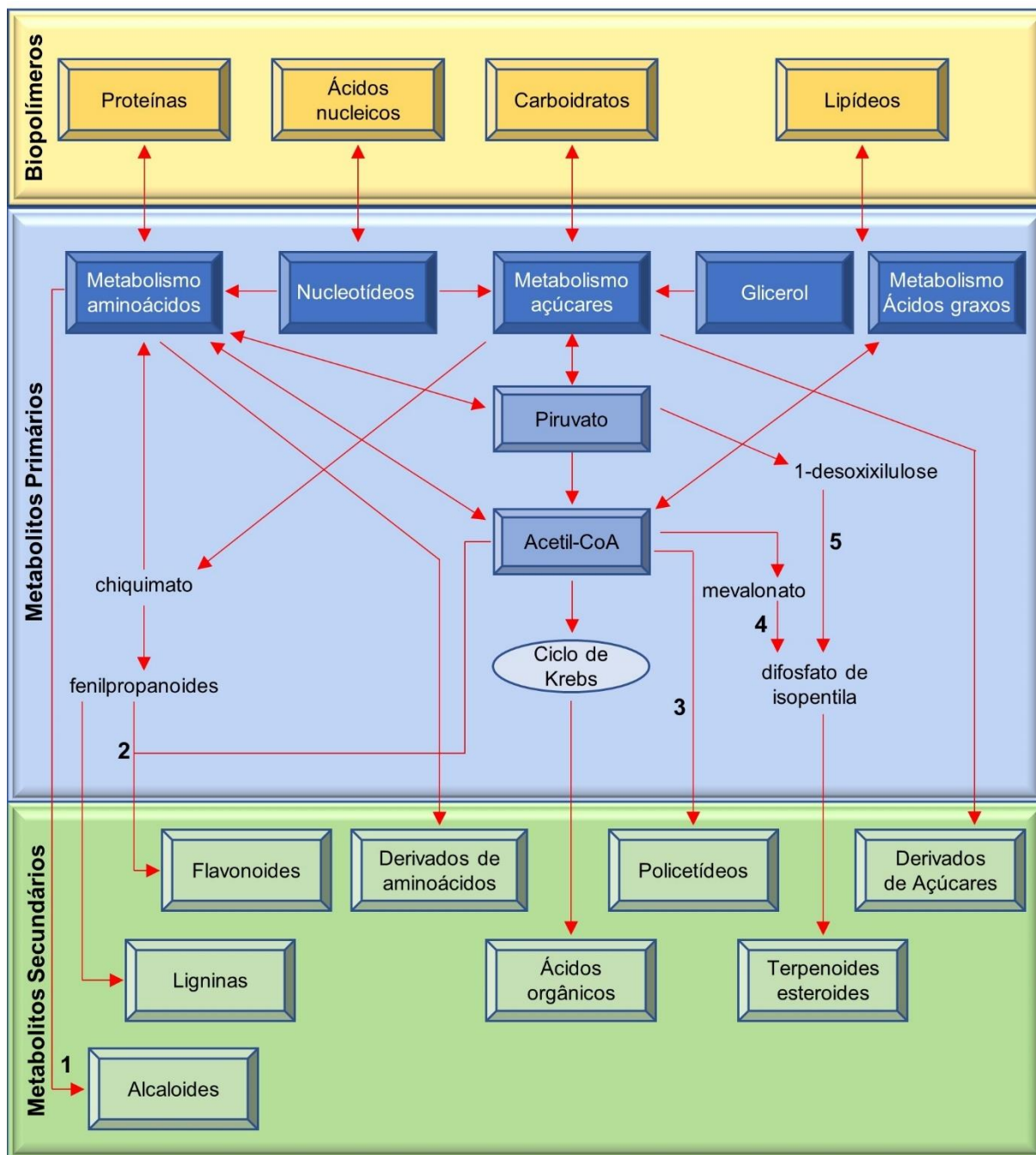
Embora classificadas como sendo do metabolismo primário ou do secundário, as reações bioquímicas não ocorrem de forma independente em um mesmo organismo. Alterações no primeiro podem afetar profundamente o segundo e, embora o reverso não seja verdadeiro, alguns casos em que metabólitos secundários são convertidos em primário já foram descritos. Além disso, muito metabólitos secundários são oriundos de sequencias de reações análogas aquelas do metabolismo primário. Portanto, a linha divisória entre metabolismo primário e secundário não é nítida (SIMÕES et al., 2003).

Contudo, de forma geral é considerado que os produtos do metabolismo primário, por meio de diversas rotas biossintéticas frequentemente desconhecidas, são responsáveis por dar origem a um grande e diverso grupo de metabólitos denominado de metabólitos secundários (Figura 4) (SIMÕES et al., 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013).

3.3.1 Metabólitos secundários

Os vegetais produzem uma grande quantidade de compostos orgânicos que normalmente parecem não ter funções direta associadas ao crescimento e ao desenvolvimento. Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários, produtos secundários, metabólitos especiais ou produtos naturais. Esses compostos são metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da) que podem apresentar potencial relevância terapêutica. Além disso, são notabilizados pela diversidade de tipos estruturais complexos (FUNARI et al., 2013; SIMÕES et al., 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 4 - Relações biossintéticas entre os metabólitos primários e secundários. As rotas biossintéticas dos metabólitos secundários ocorrem pelas seguintes vias: **(1)** via dos aminoácidos; **(2)** via do chiquimato; **(3)** via dos policetídeos; **(4)** via do ácido mevalônico; **(5)** e via do metileritritol fosfato (MEP).



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2017.

Em geral, os metabólitos secundários apresentam papéis não reconhecidos diretamente nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes. Com isso, durante vários

anos os produtos secundários eram considerados subprodutos do metabolismo, tendo em vista que não apresentam funções aparentes. Nesse sentido, os estudos dos metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do final do século XIX e início do século XX, interessados nessas substâncias pela sua provável importância como drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais (SIMÕES et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Atualmente, sabemos que muitos metabólitos secundários têm funções ecológicas importantes nos vegetais. Atuando na proteção contra herbívoros, proteção contra infecção por microrganismos e agindo como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes. Além disso, são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm. São também de grande utilidade para a espécie humana como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos e agroquímicos (CRAGG; NEWMAN, 2013; FUNARI et al., 2013; MISHRA; TIWARI, 2011; SIMÕES et al., 2003).

É importante relatar que os produtos naturais descritos até hoje foram isolados ou registrados a partir de menos de 10% da biodiversidade do mundo, sendo que a parcela das substâncias com propriedades biológicas e/ou farmacológicas é ainda menor (FUNARI et al., 2013). Um dos fatores do surgimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza, é decorrente de necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a coevolução de plantas, insetos, microrganismos e mamíferos conduz majoritariamente a síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração (RHODES, 1994; SIMÕES et al., 2003).

Sendo assim, os metabólitos secundários, por serem frequentemente fatores de interação entre microrganismos, apresentam atividades biológicas importantes. Como já foi mencionando anteriormente, muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva principalmente do grande número de substâncias farmacologicamente importantes (CRAGG; NEWMAN, 2013; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; RHODES, 1994; SIMÕES et al., 2003).

A determinação de uma grande quantidade e variedade de substâncias farmacologicamente ativas, é atribuída em parte como resultante do processo de biodescoberta e das estratégias experimentais usadas para este fim, ou seja, de como

acessar essas bibliotecas naturais e identificar, numa quantidade enorme de substâncias naturais, nas quais são biologicamente ativas de interesse medicinal (CHIN et al., 2006; FUNARI et al., 2013; KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009).

De modo geral, os produtos naturais, são agrupados de acordo com suas rotas biossintéticas. Atualmente, são conhecidos cerca de 100 mil metabólitos especiais provenientes de vegetais, estima-se ainda que de 5 a 10 mil são encontrados nos alimentos. Sabendo que apenas um número limitado de rotas biossintéticas são utilizadas para a síntese desses metabólitos, os produtos naturais são classificados em um número limitado de grupos (SIMÕES et al., 2017). De forma geral, com base nas rotas biossintéticas, os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013). Todavia, inseridos nesses grupos há inúmeras subdivisões, na Figura 5, são apresentadas as classes químicas dos principais metabólitos secundários de potencial interesse terapêutico.

3.3.1.1 *Terpenos*

Os terpenos constituem a maior classe química de metabólitos secundários, apresentando uma grande variedade de substâncias vegetais, cuja estrutura deriva do 2-metilbuta-1,3-dieno, também denominado isopreno. Assim, os terpenos são ocasionalmente designados de isoprenoides. Em geral, a maioria das diversas substâncias desta classe é insolúvel em água (SIMÕES et al., 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os terpenos são sintetizados nas plantas pela junção de, pelo menos duas unidades moleculares, cada uma com cinco átomos de carbono. Como já foi mencionando anteriormente, a estrutura dessas unidades é semelhante à do 2-metilbuta-1,3-dieno (isopreno) e, por isso elas são designadas de unidades isopreno ou unidades isoprênicas (unidades pentacarbonadas, C₅) (SIMÕES et al., 2003, 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013; VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

A molécula isopreno, após ligação com radicais fosfato, origina as duas unidades básicas pentacarbonadas (C₅), o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP). A partir das duas unidades básicas geradas, os terpenos são biossintetizados por meio das rotas do mevalonato e do 1-desoxixilulose-5-fosfato

(DXP), tais como estão descritas na Figura 4 (FELIPE; BICAS, 2017; SIMÕES et al., 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013). Os dois precursores sofrem condensação, concebendo inicialmente hidrocarbonetos acíclicos, que eventualmente podem dobrar-se sobre a superfície de enzimas, de forma a promover a formação de terpenos cíclicos (FELIPE; BICAS, 2017).

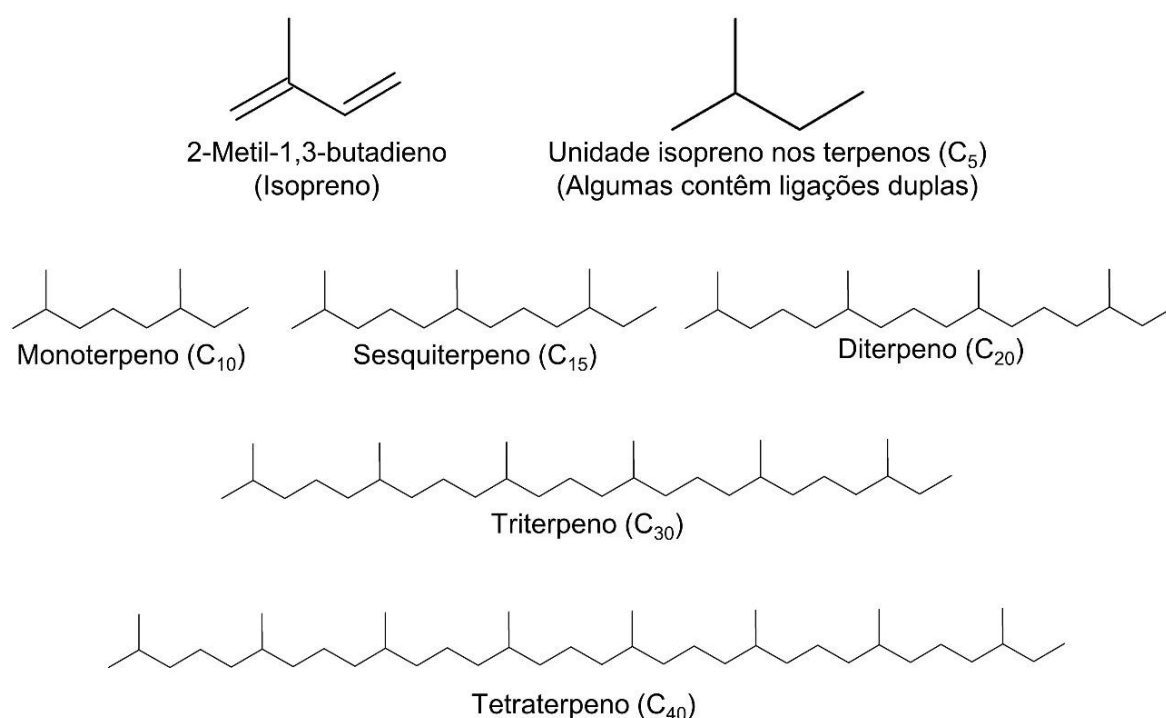
Figura 5 - Principais classes de metabólitos secundários de plantas e sua origem biosintética.



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2017.

Sendo assim, originam-se diferentes classes de terpenos, que normalmente apresentam um número de átomos de carbonos múltiplos de cinco. Desta forma, dependendo do número de unidades isopreno incorporadas à estrutura, os terpenos são classificados como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}). Os terpenos maiores incluem os triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos ($[C_5]_n$) (Figura 6) (KLEIN, 2016; SIMÕES et al., 2003, 2017; TAIZ; ZEIGER, 2013; VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

Figura 6 - Condensação de unidades de isopreno na formação dos terpenos.



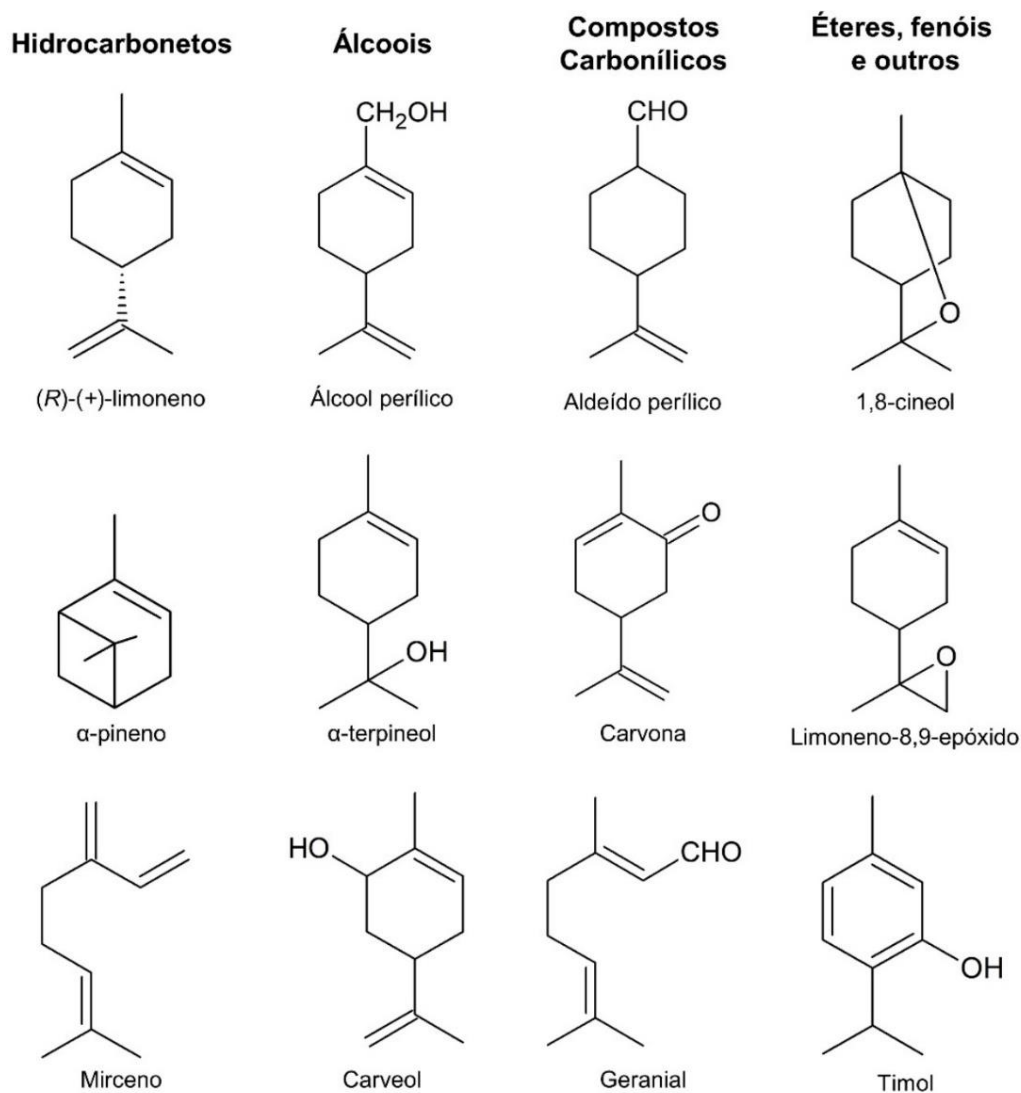
Fonte: Autor, 2018.

Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como “alcenos naturais”, tendo em vista que apresentam uma dupla ligação carbono-carbono, sendo, portanto, caracterizados como hidrocarbonetos insaturados. Entretanto, os terpenos que contêm oxigênio nas suas estruturas químicas, são designados de terpenoides, esses compostos podem apresentar diferentes funções químicas, tais como: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos (Figura 7) (FELIPE; BICAS, 2017; HARBORNE, 1999; MCMURRY, 2012).

Tendo em vista a variedade na quantidade de unidades isoprênicas associadas as diversas funções químicas, os metabólitos terpênicos podem dar

origem a múltiplas estruturas químicas distintas, nas quais podem originar subclassificações, tais como estão apresentadas na Tabela 1.

Figura 7 - Diferentes funções químicas atribuídas a monoterpenos e monoterpênicos.



Fonte: Adaptado de FELIPE; BICAS, 2017.

Alguns terpenos são toxinas inibidoras para muitos insetos e mamíferos herbívoros, exercendo importantes funções de defesa vegetal. Como exemplo, podemos citar os ésteres de monoterpenos, denominados de piretroides, os quais apresentam uma potente atividade inseticida. Desse modo, os piretroides naturais ou sintéticos são princípios ativos de inseticidas comerciais, uma vez que os mesmos têm baixa persistência no ambiente e baixa toxicidade para mamíferos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Tabela 1 - Subclassificação dos metabólitos terpênicos.

Classes de terpenos	Descrição
Monoterpenos	Lactonas monoterpênicas ou iridóides (Constituintes de óleo essencial)
Sesquiterpenos	Lactonas sesquiterpênicas (característicos da família Compositae, constituintes de óleo essencial)
Diterpenos	Giberelinas (hormônios vegetais que regulam o crescimento)
	Saponinas (esteroides glicosilados)
	Cardenólídeos (toxinas glicosídicas extremamente tóxicas ao coração)
Triterpenos	Fitoesteróis (Constituintes da membrana)
	Cucurbitacinas (característicos da família Cucurbitaceae)
	Limonóides (sabor amargo das frutas cítricas)
	Carotenos (Pigmentos terpênicos)
Tetraterpenos	Xantofilas (Pigmentos terpenoides)

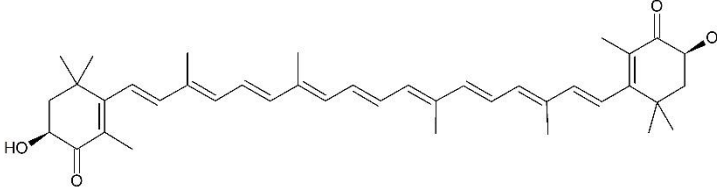
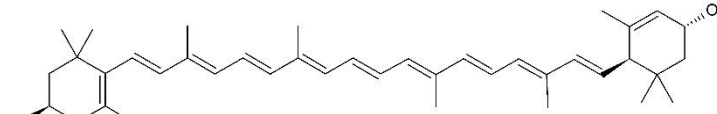
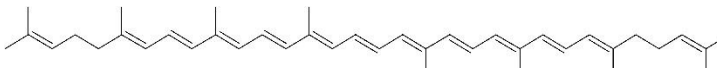
Fonte: Adaptado de FELIPE; BICAS, 2017; HARBORNE, 1999.

Os monoterpenos e sesquiterpenos têm estruturas terpênicas de menor massa molecular, além disso, geralmente apresentam volatilidade acentuada (FELIPE; BICAS, 2017). Muitos desses compostos estão presentes nos vegetais, por meio de uma mistura de compostos voláteis, nos quais são característicos pelos fortes odores de algumas plantas, provenientes de suas folhas, cascas e flores. Com isso, muitos terpenos são utilizados como agentes flavorizantes em alimentos (extratos de cravo-da-índia e hortelã), como perfumes (rosa, lavanda, sândalo) ou como solventes (terebintina) (KLEIN, 2016; VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

Por outro lado, as moléculas dos di-, tri- e tetraterpenos, praticamente não contribuem com o aroma dos vegetais, tendo em vista que estes compostos são

caracterizados pela baixa volatilidade. Uma vez que suas estruturas químicas são maiores que a dos monoterpenos e sesquiterpenos. Contudo, é importante ressaltar a importância dessas moléculas. Os di- e triterpenos são os componentes majoritários de oleorresinas (uma secreção constituída basicamente de óleo essencial e resina) obtida de diferentes tipos de plantas. A importância desse tipo de produto está atrelada à extensa aplicabilidade em inúmeras atividades industriais, tais como: fixador de perfumes, solventes ou matéria-prima para a produção de tintas, graxas e ceras, além disso, esses metabólitos também estão presentes e no cotidiano das pessoas, por meio da medicina popular (FELIPE; BICAS, 2017).

Tabela 2 - Exemplos de tetraterpenos que conferem pigmentação natural a alimentos.

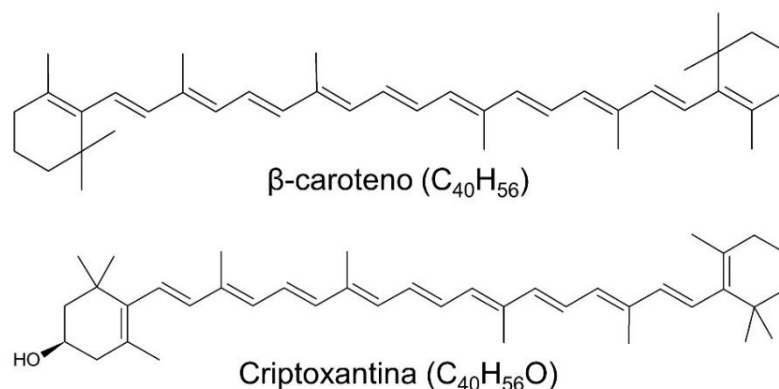
Tetraterpeno	Alimento que confere cor
 <p data-bbox="443 1128 772 1158">Astaxantina (C₄₀H₅₂O₄)</p>	Camarão, caranguejo, lagosta e salmão
 <p data-bbox="475 1346 740 1375">Luteína (C₄₀H₅₆O₂)</p>	Gema de ovo, pêsego e abobrinha
 <p data-bbox="480 1559 735 1588">Licopeno (C₄₀H₅₆)</p>	Tomate e goiaba

Fonte: Adaptado de FELIPE; BICAS, 2017.

Em relação aos tetraterpenos, esses metabólitos são pigmentos, responsáveis por conferir a coloração em diferentes plantas, vegetais e alimentos Tabela 2. Existe uma extensa variedade de tetraterpenos, sendo os mesmos divididos em carotenos (terpenos) e xantofilas (terpenoides) (Figura 8). Dentre as funções exercida por essa classe de terpenos na natureza estão: são considerados pigmentos acessórios da fotossíntese em plantas; em tecidos animais, alguns deles são

precursores da vitamina A; determinados carotenoides apresentam expressiva atividade antioxidante (FELIPE; BICAS, 2017; YUAN et al., 2015).

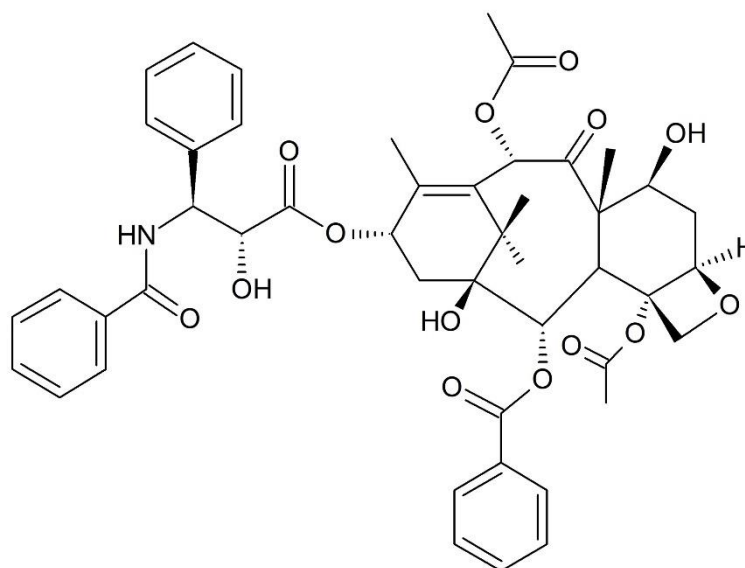
Figura 8 - Exemplos de carotenos e xantofilas precursores da vitamina A.



Fonte: Adaptado de FELIPE; BICAS, 2017.

Terpenos também apresentam comprovadas atividades farmacológicas, um exemplo é o metabólito taxol (paclitaxel) (Figura 9), diterpeno funcionalizado de estrutura complexa. Esse metabólito, foi um dos anticancerígenos mais interessantes dentre mais de 100 mil compostos extraídos de mais de 35 mil espécies de plantas, sendo considerado um dos fármacos antitumorais mais efetivos do mercado. Esse composto foi isolado em 1962 pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), a partir da casca do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia* (VOLLHARDT; SCHORE, 2013).

Figura 9 - Estrutura química do diterpeno taxol (paclitaxel).



Fonte: Adaptado de VOLLHARDT; SCHORE, 2013.

3.3.1.2 Compostos fenólicos

Os vegetais produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários que contêm o grupo funcional hidroxila em um anel aromático. Essas substâncias são classificadas como compostos fenólicos (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013). Os compostos fenólicos representam uma classe na qual inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, onde ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2003). Essas moléculas podem ser formadas por um ou mais anéis benzênicos, ligados a grupos hidroxilas, podendo ainda apresentar como substituintes grupamentos metil, metoxil, amino e monossacarídeos (HARBORNE, 1999).

Desse modo, os compostos fenólicos podem apresentar uma grande variedade de estruturas químicas, podendo assim serem classificados de acordo com tipo da estrutura carbônica principal, conforme exposto na Tabela 3, onde C6 corresponde ao anel benzênico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono (SIMÕES et al., 2003). Sendo assim, é possível perceber que os compostos fenólicos constituem um grupo quimicamente bastante heterogêneo, com aproximadamente 10 mil compostos com diferentes propriedades físicas e químicas.

Os compostos fenólicos são comumente encontrados conjugados a açúcares e ácidos orgânicos, assim, tem-se que alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A química dos fenólicos influencia diretamente a sua biodisponibilidade, metabolismo, efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* (MANACH et al., 2005). Como já foi mencionado anteriormente, os compostos fenólicos apresentam uma ampla diversidade química, com isso são observadas também uma grande variedade de funções nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Dentre as funções biológicas mais importantes tem-se: crescimento e desenvolvimento vegetativo; defesa contra herbívoros e patógenos; funções de atrativos de polinizadores ou dispersores de sementes; e proteção contra a radiação ultravioleta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, os compostos fenólicos fornecem pigmentação, apresentam atividades antimicrobiana e antifúngica, funções de

dissuasão de insetos, quelação de metais pesados tóxicos e propriedades antioxidante contra radicais livres gerados durante a fotossíntese (YURAWECZ et al., 2005).

Tabela 3 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a estrutura básica.

Esqueleto básico	Classes de composto fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos e antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignananas
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2003.

3.3.1.2.1 Taninos

Historicamente, a importância dos vegetais ricos em taninos está associada às propriedades da transformação da pele animal em couro (curtimento). Durante o curtimento, são formadas ligações entre as fibras de colágeno na pele

animal, onde a pele adquire resistência ao calor, água e abrasivos. Essa capacidade dos taninos de se combinarem com macromoléculas explica a capacidade de precipitar celulose, pectinas e proteínas. Essas propriedades são a base da definição clássica dos taninos: substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular de cerca de 500 – 5000 Dalton, as quais apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatinas e outras proteínas (SERRANO et al., 2009; SIMÕES et al., 2017).

Os taninos se acumulam principalmente nos tecidos lenhosos, mas também podem ser encontrados em outras partes da planta, tais como: raízes, flores, sementes, folhas e frutos (CSEKE et al., 2006; SIMÕES et al., 2017). Os taninos desempenham um papel essencial na definição das propriedades sensoriais de frutas e produtos derivados. Esses metabólitos são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e vegetais, de modo que tecidos vegetais ricos em taninos, apresentam um forte sabor adstringente (CSEKE et al., 2006; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2005a, 2005b; SIMÕES et al., 2017). O gosto azedo e a sensação adstringente causado pelos taninos é resultado de interações entre os taninos e proteínas, que afetam os receptores gustativos presentes em membranas das mucosas. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (SIMÕES et al., 2017).

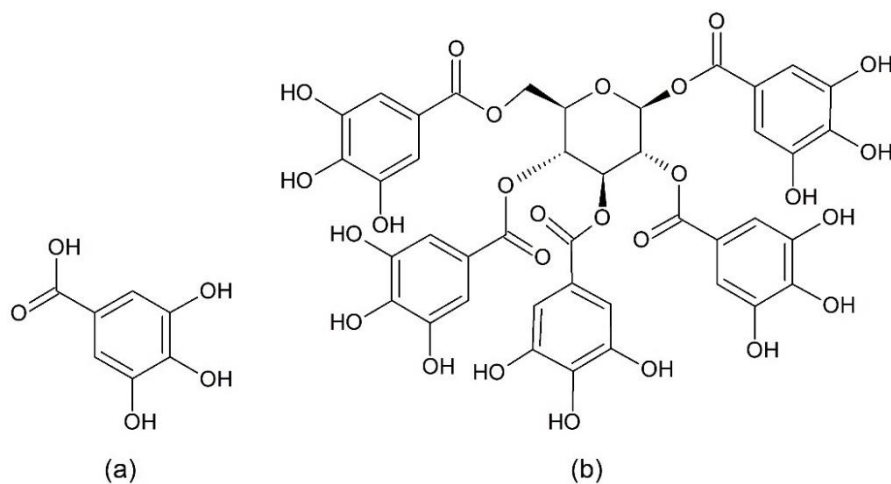
Tradicionalmente, os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de um açúcar, em geral β -D-glicose, cujas hidroxilas são esterificadas com um ou mais ácidos gálicos (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) (Figura 10), formado na via do chiquimato (CSEKE et al., 2006; SIMÕES et al., 2017).

O metabólito β -1,2,3,4,6-pentagalactose (Figura 10) representa o padrão máximo de substituição alcançado, sendo considerado o precursor imediato para as duas classes de taninos hidrolisáveis: galotaninos e elagitaninos (SIMÕES et al., 2017).

Os galotaninos são oriundos da união entre unidades de ácido gálico, o grau de substituição total de 10 a 12 resíduos de ácido gálico por molécula de glicose pode ser alcançado, um exemplo já relatado na literatura é o ácido tânico (Figura 11). Por outro lado, os elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidroxidifenol-

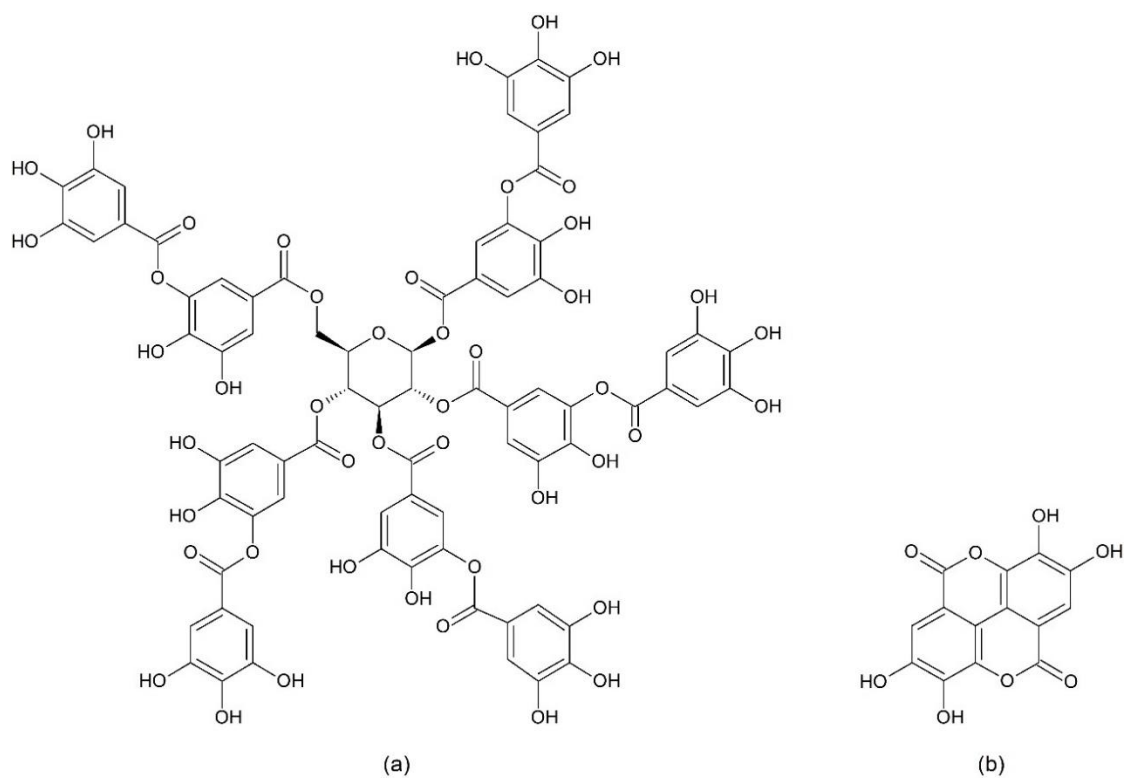
D-glicose (HHDP), os quais são obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes (SIMÕES et al., 2017).

Figura 10 - Estrutura química dos taninos (a) ácido gálico e (b) β -1,2,3,4,6-pentagaloiil-D-glicose.



Fonte: AUTOR, 2018.

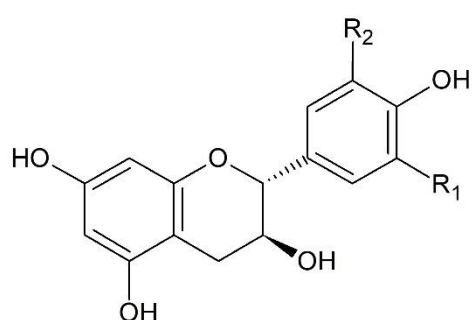
Figura 11 - Estrutura química de taninos hidrolisáveis: (a) galotanino ácido tânico; (b) elagitanino ácido elágico.



Fonte: AUTOR, 2018.

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades monoméricas de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos, também são conhecidos por proantocianidinas, uma vez que essa classe de taninos produz pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como: cianidina e delphinidina (SIMÕES et al., 2017). O grau de polimerização varia bastante ao longo de uma ampla gama de dímeros, podendo conter até cerca de 200 unidades de flavonóis monoméricos. Os monômeros mais comuns são os diastereoisômeros (+)-catequina / (-)-epicatequina, (-)-galocatequina / (-)-epigalocatequina e (+)-afzelequina / (-)-epi afzelequina (Figura 12), sendo os respectivos oligômeros e polímeros chamados de procianidinas, prodelfinidinas e propelargonidinas (SERRANO et al., 2009).

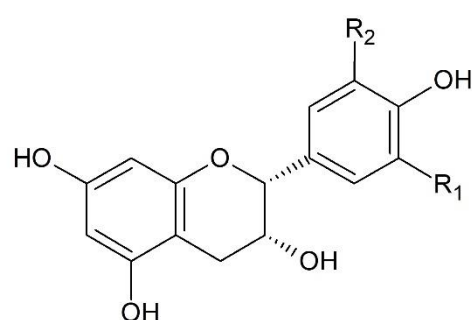
Figura 12 - Exemplos de alguns monômeros que taninos condensados (proantocianidinas).



(+)-catequina ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$)

(+)-afzelequina ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$)

(-)-galocatequina ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$)



(-)-epicatequina ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$)

(-)-epiafzelequina ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$)

(-)-epigalocatequina ($R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$)

Fonte: Adaptado de SERRANO et al., 2009.

De modo geral, vegetais ricos em taninos são empregados na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, como diarreias, hipertensão, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (SERRANO et al., 2009; SIMÕES et al., 2017). Além disso, teste *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos isolados quimicamente, apresentaram diversas atividades farmacológicas. Dentre elas, podemos citar, ações bactericida, fungicida, antiviral, citotóxica, cicatrizante, antimutagênica e sequestradora de radicais livres (SIMÕES et al., 2017).

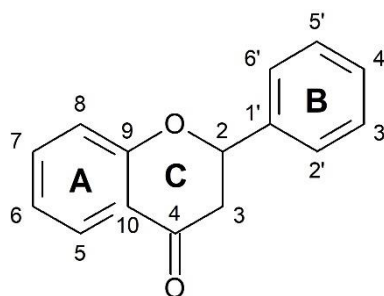
Quimicamente, acredita-se que as propriedades biológicas atribuídas aos taninos são decorrentes de três características gerais: (i) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio e cálcio); (ii) atividades antioxidantes e sequestradoras de radicais livres; e (iii) capacidade de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996; SERRANO et al., 2009; SIMÕES et al., 2017)

3.3.1.2.2 Flavonoides

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante e vasta classe de compostos fenólicos. Metabólitos secundários fenólicos ou polifenólicos são aqueles que possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros). Contudo, uma definição levando em conta apenas a estrutura química não é apropriada, tendo em vista que existem compostos que contêm hidroxilas fenólicas que fazem parte de outras classes de metabólitos. Sendo assim é mais conveniente utilizar uma definição que leve em conta a origem biosintética (SIMÕES et al., 2017).

A maioria dos flavonoides são compostos solúveis em água que possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, apresentando um arranjo estrutural de dois anéis benzênicos separados por uma unidade de três carbonos (CSEKE et al., 2006; SIMÕES et al., 2017). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C, onde os átomos de carbono recebem numeração ordinária para os núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de linha (') para o núcleo B (Figura 13) (SIMÕES et al., 2017).

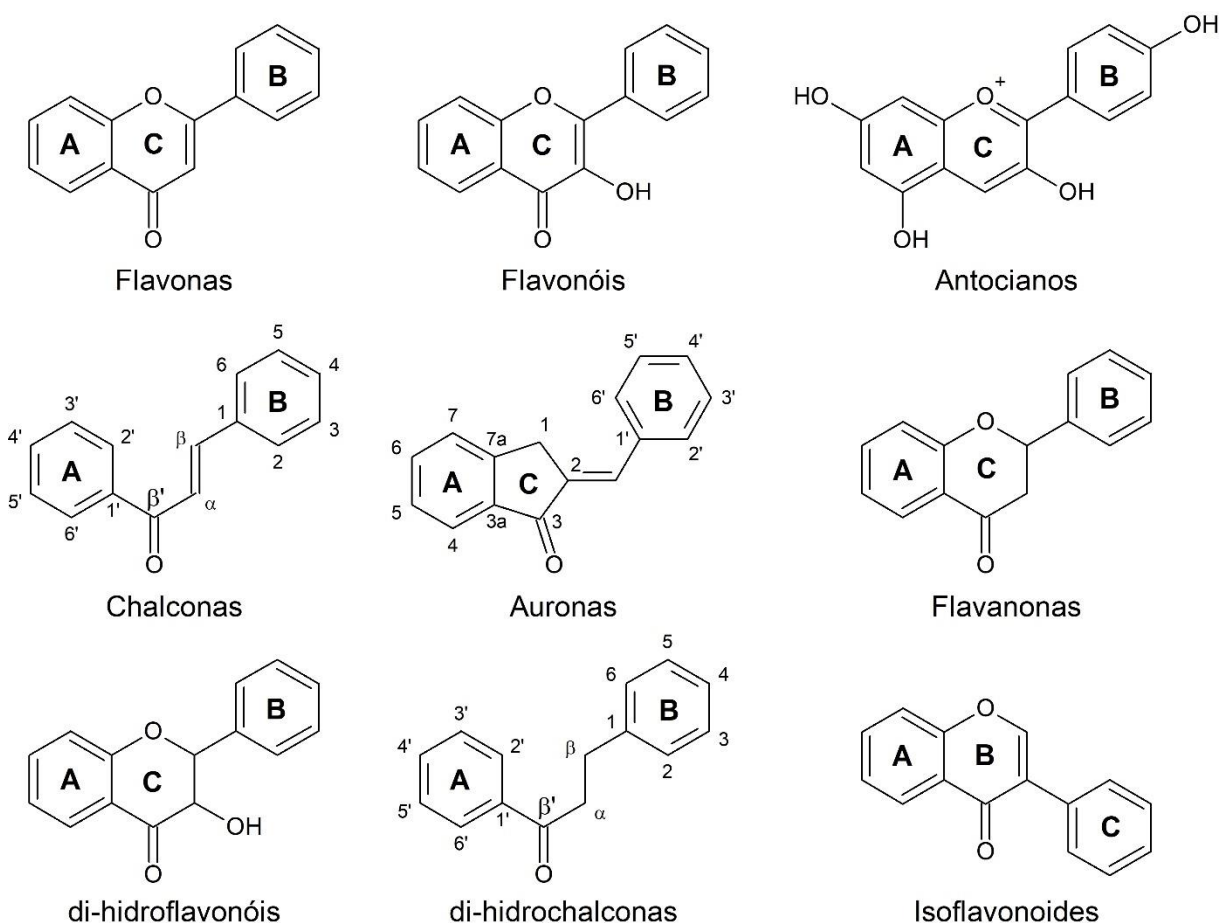
Figura 13 - Núcleo fundamental dos flavonoides com sua numeração sistemática.



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2017.

Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados, além disso, muitos apresentam-se conjugados com açúcares. A forma conjugada, também denominada glicosídeos ou heterosídeo, pode ser encontrada de duas formas: O-heterosídeos (quando a ligação ocorre por intermédio de uma hidroxila) e C-heterosídeos (quando a ligação ocorre através de um átomo de carbono). Por outro lado, quando o flavonoide se encontra na forma não conjugada, ou seja, sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo muitas vezes denominado de forma livre (SIMÕES et al., 2017).

Figura 14 - Núcleos fundamentais das principais classes de flavonoides.



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2017.

A classificação dos flavonoides é baseada no estado de oxidação e no grau de insaturação do anel heterocíclico central (anel C) (ou perda, como no caso das chalconas). Na Figura 14 são apresentados os núcleos fundamentais das principais classes de flavonoides, além disso, acrescenta-se ainda as classes dos neoflavonoides (grupo de flavonoides associados estrutural e biogeneticamente aos

flavonoides e isoflavonoides) e dos biflavonoides (flavonoides diméricos, maioria de flavonas e flavanonas) (SIMÕES et al., 2017).

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nos vegetais, dentre elas, podem-se citar: (a) proteção dos vegetais contra a incidência da radiação ultravioleta, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; (b) atração para animais polinizadores; (c) antioxidante; (d) controle da ação de hormônios vegetais; (e) agentes alelopáticos; e (f) inibidores de enzimas. Os flavonoides também podem ser utilizados como marcadores taxonômicos, sobretudo em razão de (a) sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal; (b) sua especificidade em algumas espécies; (c) sua relativa facilidade de identificação; e (d) sua relativa estabilidade. Na Tabela 4 estão apresentadas as principais classes de flavonoides associadas com um algumas importantes características (SIMÕES et al., 2017).

Tabela 4 - Classes dos flavonoides com algumas características conhecidas.

Classes	Caraterísticas
Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos e C-heterosídeos	Copigmentação em flores; protetores contra raios (UV) nas folhas
Antocianos	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	Pigmentação amarela
Auronas	Pigmentação amarela
di-hidroflavonóis	Presentes em tecidos lenhosos
Flavanonas	Podem apresentar sabor amargo
di-hidrochalconas	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	Substâncias adstringentes
Isoflavonoides	Propriedades estrogênicas e antifúngicas
Neoflavonoides	-
Biflavonoides	Propriedades antifúngicas

Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2017.

3.4 Metabolômica

As ciências ômicas buscam a caracterização e quantificação coletiva de conjuntos de moléculas biológicas. Fazem parte deste conjunto de ciências, a genômica (estudo dos genes), a transcriptômica (estudo dos transcritos genéticos, RNA's), a proteômica (estudo das proteínas), e a metabolômica (estudo dos metabolomas) (CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013). O desenvolvimento das ciências ômicas causou uma verdadeira revolução científica, e hoje elas são amplamente utilizadas no estudo dos sistemas biológicos. As estratégias ômicas têm como objetivo identificar e/ou quantificar todo o conjunto de biomoléculas (genes, proteínas, metabólitos, etc.) contidos em um tecido, célula, fluido ou organismo biológico, gerando uma enorme quantidade de dados que são avaliados por ferramentas de bioestatística e bioinformática (SUSSULINI, 2017).

O termo metaboloma é relativamente recente, tendo surgido paralelamente a termos como genoma, transcriptoma e proteoma. A definição do mesmo apareceu pela primeira vez na literatura em 1998, quando um grupo de pesquisa mediu a variação nas concentrações relativas de metabólitos como resultado da deleção ou superexpressão de um gene (OLIVER, 1998; SIMÕES et al., 2017; SUSSULINI, 2017). O metaboloma é, portanto, denominado como o conjunto de metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes em um organismo ou sistema biológico (CANUTO et al., 2018; OLIVER, 1998; SIMÕES et al., 2017).

Nesse contexto, em 2001, o termo metabolômica foi introduzido e definido por Oliver Fiehn, como a análise abrangente e quantitativa de todos os metabólitos de um sistema biológico (FIEHN, 2001).

A metabolômica é considerada uma das mais avançadas abordagens sobre o mapeamento químico de um organismo da biodiversidade. A abordagem metabolômica é bastante versátil, podendo ser utilizada em diferentes tipos de estudo, tais como: na investigação de alterações metabólicas de um organismo em resposta ao estresse induzido por agentes físicos (luz UV, calor, desidratação, etc.), químicos (como fármacos e agroquímicos) ou biológicos (patógenos ou outros). Além disso, essa abordagem também é utilizada no controle de qualidade, ecologia química, estudos de quimiotaxonomia e para a identificação de novos produtos naturais (BOUFRIDI; QUINN, 2016; FUNARI et al., 2013).

Nos estudos metabolômicos, é priorizada a identificação do subconjunto de metabólitos que caracterizam as diferenças entre amostras distintas. Pesquisas com esse enfoque vêm sendo aplicadas em vários estudos que envolvem plantas, tais como: caracterização, relações quimiotaxonômicas e ecológicas, avaliação e comparação de plantas geneticamente modificadas. Devido a esta ampla gama de aplicações, a metabolômica vem crescendo exponencialmente nas pesquisas que envolvem a química de produtos naturais, a julgar pelo incremento no número de publicações (FUNARI et al., 2013).

Os estudos metabolômicos são essencialmente pautados em análises comparativas dos perfis metabólicos individuais adquiridos para diferentes amostras. Desse modo, os perfis metabólicos são obtidos a partir de métodos analíticos que revelem todas as características químicas inerentes a determinados padrões funcionais e estruturais das classes de produtos naturais analisadas (FUNARI et al., 2013; JIANG et al., 2010; KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011; KRASTANOV, 2010).

Sendo assim, o perfil metabólico pode ser definido como um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectroscópicos adquiridos para uma amostra complexa de extratos vegetais, de animais e microrganismos, e de fluidos biológicos (urina, sangue, plasma). Desta forma, o perfil metabólico característico de uma amostra, também chamado de impressão digital ou *fingerprint*, retrata o conjunto de informações analíticas, nas quais devem refletir todos os metabólitos secundários detectáveis e presentes em uma dada amostra em estudo (FUNARI et al., 2013; JIANG et al., 2010; KIM; CHOI; VERPOORTE, 2011; KRASTANOV, 2010).

Normalmente, os estudos metabolômicos podem ser subdivididos em duas abordagens analíticas diferentes: metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*) e metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*) (CANUTO et al., 2018; NAUSHAD; KHAN, 2014).

A abordagem metabolômica global está baseada na análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo (CANUTO et al., 2018).

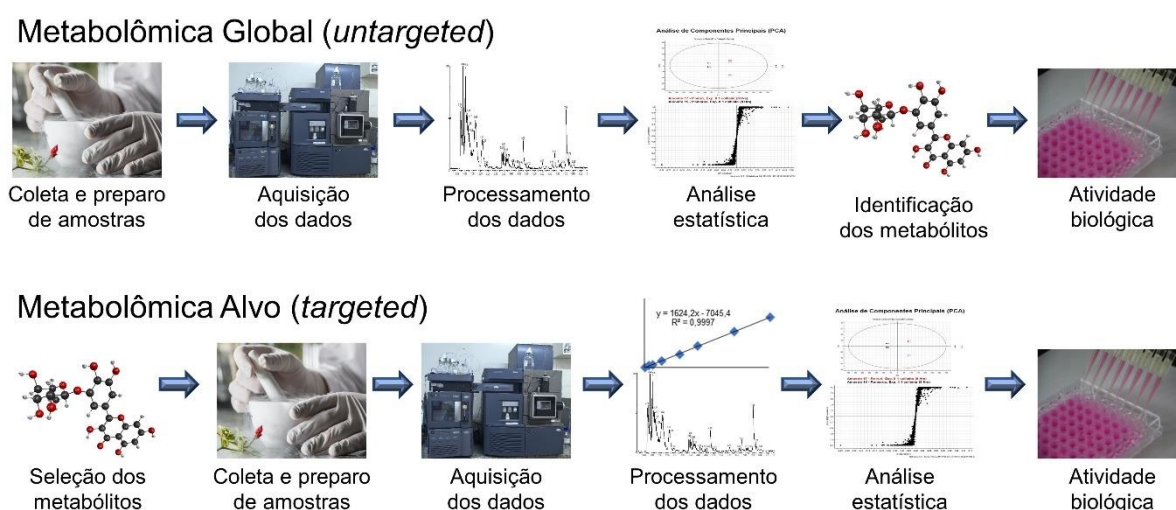
Por outro lado, a metabolômica alvo pode ser definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas (CANUTO et al., 2018). Tipicamente, a metabolômica alvo é realizada quando os compostos alvo foram

previamente estabelecidos como possíveis biomarcadores, por meio da abordagem metabolômica global (NAUSHAD; KHAN, 2014).

Uma terceira abordagem metabolômica denominada de *class-specific nontargeted metabolomics* também pode ser estabelecida, em contraste com a metabolômica global, que tem como objetivo separar e identificar o maior número possível de compostos, *class-specific nontargeted metabolomics* é focada em um grupo de compostos quimicamente relacionados, com o objetivo de encontrar metabólitos desconhecidos pertencentes a uma dada classe química (NAUSHAD; KHAN, 2014).

Inicialmente, para desenvolver um estudo metabolômico, um problema biológico a ser estudado deve ser previamente definido. Outro ponto importante é o tipo de abordagem metabolômica que será empregada (global ou alvo), tendo em vista que a partir dessa escolha é que são definidas as etapas de preparo de amostras e análises, uma vez que estas decisões estão inter-relacionadas, e a condução de todo o experimento metabolômico irá afetar diretamente o resultado final. Normalmente, o desenvolvimento de estudos metabolômicos é concebido mediante a execução de uma série de etapas, nas quais estão resumidamente apresentadas na Figura 15 (CANUTO et al., 2018).

Figura 15 - Etapas envolvidas nas análises metabolômicas.



Fonte: Adaptado de CANUTO et al., 2017.

3.4.1 Preparo de amostras nas análises metabolômicas

Um dos grandes desafios nas pesquisas relacionadas com estudos metabolômicos está na complexidade química que caracteriza diferentes classes de metabólitos, bem como diferentes tipos de metaboloma (por exemplo, origem endógena ou origem exógena). Metabólitos secundários variam entre 50 Da e 1500 Da de massa, a partir de baixa concentração na ordem de picomolar (pmol L^{-1} , $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$) para concentrações mais elevadas na ordem molar (mol L^{-1}). As propriedades químicas e físicas vão desde os compostos mais polares até os mais apolares. Além disso, sua estereoquímica leva a diferentes funções biológicas (FORCISI et al., 2013).

Tendo em vista essa vasta diversidade e complexidade química, a detecção de todo o conjunto de metabólitos presentes em uma amostra em diferentes sistemas biológicos se torna um grande desafio. A conquista deste objetivo requer a integração de diferentes plataformas analíticas, a fim de permitir a faixa máxima de detecção e identificação de analitos, por meio de alta sensibilidade, seletividade e resolução. Frequentemente, os metabólitos secundários de distintas características químicas e físicas, polares, apolares, voláteis e não voláteis coexistem em amostras. Sendo assim, a combinação apropriada de preparação de amostra e a integração de ferramentas analíticas adequadas definem o caminho para um desempenho otimizado em estudos metabolômicos (FORCISI et al., 2013).

A etapa de preparo de amostras é uma das mais importantes e que demanda maior tempo de trabalho. Isso se deve à complexidade das amostras biológicas, sua heterogeneidade e grande faixa de concentração dos metabólitos presentes (CANUTO et al., 2018). É importante salientar que a técnica de preparo de amostras adotada deve ser altamente reprodutível e robusta. Tendo em vista que essa etapa é uma fonte de alta variabilidade a extração dos metabólitos de uma matriz biológica específica (FORCISI et al., 2013). Essa etapa envolve a escolha do tipo de amostra (tipo de fluido biológico, células, tecido, etc.), a definição do número de amostras que serão avaliadas em cada grupo estudado, e como essas amostras serão coletadas e armazenadas, antes de nova manipulação (CANUTO et al., 2018).

Essa etapa, depende fundamentalmente da abordagem metabolômica escolhida, tipo de amostra e técnicas de análise que serão utilizadas nos estudos metabolômicos. Na abordagem metabolômica global, um preparo de amostras ideal requer o mínimo de etapas, a fim de minimizar as possíveis fontes de contaminação

e erros sistemáticos. Além disso, um método pouco seletivo é, em geral, preferido, visando estender a maior gama de metabólitos possíveis (CANUTO et al., 2018; FORCISI et al., 2013; NAUSHAD; KHAN, 2014; SUSSULINI, 2017). Para amostras líquidas, precipitação de proteínas e remoção de sais através da adição de solventes orgânicos são comumente empregadas. Adicionalmente, uma filtração ou diluição também são executadas. Por outro lado, a extração de amostras semissólidas ou sólidas, como células e tecidos, devido a sua maior rigidez, necessitam de aparatos mecânicos, como moinhos, ultrassom e misturadores, em conjunto com solventes orgânicos, para romper a parede celular ou o tecido e extrair os metabólitos de forma eficiente (CANUTO et al., 2018; SUSSULINI, 2017).

Por outro lado, na abordagem metabolômica alvo, o procedimento é seletivo e pode ser otimizado a um composto ou classe de compostos, resultando em um efeito de pré-concentração e matriz reduzida (CANUTO et al., 2018; NAUSHAD; KHAN, 2014; SUSSULINI, 2017). Nessa abordagem, são utilizadas convencionalmente técnicas de extrações do tipo líquido-líquido (LLE, do inglês, *liquid-liquid extraction*), sólido-líquido (SLE, do inglês, *solid-liquid extraction*), ou em fase sólida (SPE, do inglês, *solid-phase extraction*), objetivando a concentração dos analitos, remoção de interferentes e seleção das espécies de interesse (CANUTO et al., 2018; SUSSULINI, 2017).

3.4.2 Técnicas analíticas utilizadas em estudos metabolômicos

Diferentemente de outras ciências ômicas, a metabolômica impõe um grande desafio analítico no mapeamento completo da constituição metabólica de organismo biológico. Uma vez que existe uma grande diversidade química de metabólitos, com diferentes funções biológicas e com níveis de concentrações discrepantes. Sendo assim, é importante enfatizar que atualmente não é possível encontrar uma única técnica analítica capaz de promover a identificação e quantificação de todo o metaboloma de um determinado sistema biológico (CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013; SUSSULINI, 2017). Sendo assim, a aquisição dos dados nos estudos metabolômicos, exige o uso de multiplataformas de análise, proporcionando assim uma maior cobertura em termos das substâncias químicas detectadas e, conseqüentemente, um maior entendimento biológico do organismo estudado (CANUTO et al., 2018; SUSSULINI, 2017).

As técnicas analíticas comumente empregadas para aquisição de dados em estudos metabolômicos são espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ou NMR, do inglês, *nuclear magnetic resonance*) e a espectrometria de massa (MS, do inglês, *mass spectrometry*) (CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013; SUSSULINI, 2017; YULIANA et al., 2013).

A espectroscopia de RMN pode ser considerada como uma técnica universal e robusta de detecção de metabólitos, onde as amostras podem ser analisadas diretamente com o mínimo de manipulação e muitas classes de pequenos metabólitos podem ser medidas simultaneamente. A técnica tem a vantagem de requerer pouca quantidade de amostra e não destruir a mesma após as análises, apesar de contaminá-la com solventes deuterados. Em contrapartida, as principais desvantagens da RMN para a metabolômica são baixa sensibilidade e complexidade espectral com sobreposição de sinais em certas regiões espectrais, comprometendo a identificação clara. (CANUTO et al., 2018; SUSSULINI, 2017).

A MS é a técnica de análise mais usada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade em comparação com a espectroscopia de RMN. Essa técnica analítica pode ser usada através da infusão direta dos extratos (DIMS, do inglês, *direct infusion mass spectrometry*), entretanto, muitas vezes a análise é dificultada por problemas de supressão de ionização (CANUTO et al., 2018; HU; XU, 2013; SUSSULINI, 2017).

Visando contornar os problemas decorrentes da supressão iônica e conseqüentemente melhorar a sensibilidade e ampliar a cobertura ao metaboloma, geralmente a MS é hifenizada com as técnicas analíticas de separação, como a cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*), cromatografia líquida de alta eficiência (LC, do inglês, *liquid chromatography*) ou cromatografia líquida de ultra-desempenho (UPLC, do inglês, *ultra-performance liquid chromatography*). Além disso, a informação do tempo de retenção, ou migração do metabólito previamente separado, auxilia na identificação do metabólito, com uso de padrões analíticos autênticos (CANUTO et al., 2018; FORCISI et al., 2013; SUSSULINI, 2017).

A GC-MS é uma das técnicas de análise mais empregadas em estudos metabolômicos, apresentando alta robustez e reprodutibilidade. Essa técnica requer que os analitos sejam voláteis e termicamente estáveis, essas condições excluem muitos metabólitos secundários importantes das plantas. Entretanto, grande parte dos metabólitos que compõem o metaboloma podem ser derivatizados, para que se

tornem voláteis a baixas temperaturas. A derivatização é um procedimento tedioso, que pode introduzir erros por perdas por volatilização durante o processo, e limita o número de amostras a serem trabalhadas em conjunto (CANUTO et al., 2018; DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014; SUSSULINI, 2017; YULIANA et al., 2013).

Todavia, o uso da GC-MS em metabolômica apresenta uma grande vantagem, resultante da construção de bibliotecas de espectros, conferindo alta credibilidade na identificação dos metabólitos, que combina a informação de tempo de retenção e o padrão de fragmentação obtido, em decorrência da ionização por impacto de elétrons. Além disso, através da derivatização, em um único método cromatográfico, é possível determinar classes bem distintas de importantes metabólitos de baixa polaridade, como aminoácidos, aminas e ácidos carboxílicos, podem ser avaliadas (CANUTO et al., 2018; DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014; SUSSULINI, 2017).

Atualmente, a LC-MS vem sendo cada vez mais aplicada nos estudos envolvendo análises metabolômicas. É uma técnica analítica que apresenta alta robustez, sensibilidade, reprodutibilidade e seletividade, além de ser de fácil operação, podendo ser totalmente automatizados. LC-MS é considerada uma técnica abrangente no que se refere à classe de compostos a serem analisadas, devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, sendo o mais comum a eluição em fase reversa (CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013).

Atualmente, a combinação de UPLC acoplada à MS com ionização por *electrospray* e analisador de massas tandem (MS^n), quadrupolo tempo de voo (ESI-Q-TOF) é a técnica que fornece a melhor relação custo-benefício nas investigações metabolômicas. Desse modo, é possível obter sensibilidade, precisão e resolução, proporcionando um arsenal de valiosas informações quanto à estrutura dos metabólitos de interesse (FORCISI et al., 2013; FUNARI et al., 2013; NAUSHAD; KHAN, 2014).

3.4.3 Análise estatística em estudos metabolômicos

Nos estudos metabolômicos, frequentemente são adquiridos grandes volumes de dados de alta complexidade de interpretação, tornando impossível tratar as informações manualmente. Portanto, várias ferramentas e softwares de informática

foram desenvolvidos para ajudar no processamento de dados, de modo a evitar erros e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas (BOUFRIDI; QUINN, 2016; CANUTO et al., 2018; CORREIA; FERREIRA, 2007; HU; XU, 2013; MOCO et al., 2007). Nesse contexto, as ferramentas quimiométricas, através dos softwares, são utilizadas com o objetivo de reduzir o dimensionamento do conjunto de dados sem perder a qualidade das informações geradas nas análises metabolômicas. Sendo assim, é proporcionando uma maior clareza na interpretação visual dos resultados, possibilitando identificar as semelhanças e diferenças nos mais variados tipos de amostras.

É importante salientar que os dados referentes aos perfis metabólicos estão sujeitos a erros experimentais inerentes ao método analítico. Sendo assim, previamente a execução da análise multivariada é de fundamental importância um pré-tratamento dos dados gerados (CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013).

Um exemplo da necessidade de uma etapa de tratamento prévio dos dados é o próprio trabalho em questão. Uma vez que são observadas pequenas variações nos tempos de retenção dos picos cromatográficos referentes aos metabólitos. Além disso, a necessidade de uma etapa prévia de pré-tratamento dos dados também é decorrente do fato das análises quimiométricas fazerem uso de cálculos matriciais. Sendo assim, elas só funcionarão adequadamente quando o tempo de retenção de uma determinada substância for idêntico nos diferentes cromatogramas. Assim, uma correção deve ser realizada para alinhar os picos cromatográficos (CANUTO et al., 2018; FUNARI et al., 2013; MOCO et al., 2007).

Nas análises metabolômicas global, aplicam-se etapas de alinhamento, agrupamento, correção do tempo de retenção e de linha de base, deconvolução espectral, e normalização. Por outro lado, nas análises metabolômicas alvo, o resultado da análise se dá em termos da quantificação dos metabólitos pré-selecionados. Sendo assim, visando aumentar a precisão e a confiabilidade das quantificações, padrões internos e padrões marcados isotopicamente são comumente utilizados (FUNARI et al., 2013).

A análise estatística é utilizada para extrair informações relevante dos dados, através de métodos de análise multivariada e univariada. As análises estatísticas multivariadas, também denominada de métodos de reconhecimento de padrões, são recomendadas para a classificação e discriminação de entidades ou metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras, além disso, também

são utilizadas para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica (CANUTO et al., 2018; FERREIRA, 2015; FUNARI et al., 2013).

Nas análises univariadas, as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) são avaliadas separadamente e, ao contrário dos métodos multivariados, são desprezadas as relações entre elas. Testes estatísticos como ANOVA e teste t de Student são frequentemente utilizados (CANUTO et al., 2018). Por outro lado, as ferramentas de análises estatísticas multivariadas empregadas para a análise de dados de perfis de metabólitos podem ser classificadas como abordagens não supervisionadas e supervisionadas (FUNARI et al., 2013; THEODORIDIS et al., 2012).

Nos métodos supervisionados, cada amostra analisada provém de uma classe preestabelecida, e essa informação é utilizada durante a análise dos dados e na construção dos modelos de classificação. Em contrapartida, os métodos não supervisionados não fazem uso dessa informação e, portanto, não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação amostras. De modo que as mesmas são naturalmente agrupadas com base nas informações contidas nos dados experimentais (FERREIRA, 2015).

3.4.3.1 Métodos não supervisionados de análises de dados

De modo geral, inicialmente são utilizados os métodos não supervisionados, também designados de métodos exploratórios, com a finalidade de reduzir a dimensionalidade dos dados e fornecer uma visão geral da separação, formação de conglomerados de dados (*clusters*) e/ou *outliers* (FUNARI et al., 2013; THEODORIDIS et al., 2012). Em todos os casos, a finalidade principal é reunir amostras de tal modo que aquelas pertencentes a um mesmo grupo sejam mais semelhantes entre si. A ideia é maximizar a homogeneidade interna, dentro dos grupos, e maximizar a heterogeneidade entre grupos (FERREIRA, 2015).

Sendo assim, alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos (CORREIA; FERREIRA, 2007). Dentre os métodos não supervisionados mais utilizados, tem-se a análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA, do inglês, *hierarchical cluster analysis*) (CANUTO et al., 2018;

CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015; FUNARI et al., 2013; THEODORIDIS et al., 2012).

HCA e PCA permitem a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis são elevados. O uso desses algoritmos tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de agrupamentos naturais entre as amostras. Como já foi mencionado anteriormente, ambos são classificados como exploratórios ou não supervisionados, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (CORREIA; FERREIRA, 2007).

HCA é útil para reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados de grande porte, principalmente quando se tem muitos conjuntos de amostras e/ou variáveis, permitindo que dezenas de milhares de amostras possam ser agrupadas por suas semelhanças (FERREIRA, 2015). A HCA busca agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes distintas. A representação gráfica obtida é denominada de dendrograma, um gráfico bidimensional independentemente do número de variáveis do conjunto de dados (CORREIA; FERREIRA, 2007).

A PCA é o método não supervisionado mais empregado nos estudos metabolômicos, sua utilização visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informações (variância) possíveis. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs). Organizadas em ordem decrescente de importância, as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs (BOUFRIDI; QUINN, 2016; BRO; SMILDE, 2014; CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015).

Através da interpretação dos gráficos é possível verificar quais dos parâmetros analisados (variáveis) são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras. A avaliação das PCs pode auxiliar no estabelecimento de uma assinatura química particular para cada grupo de amostras segregado após a PCA. Esse é o objetivo principal dos estudos de reconhecimento de padrões, que busca encontrar uma maneira de relacionar a identidade de uma amostra com suas características químicas (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Tanto HCA quanto PCA permitem a interpretação multivariada de conjuntos de dados grandes e complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais. Estes gráficos apresentam informações que expressam as inter-relações que podem existir entre as variáveis, facilitando a interpretação multivariada do comportamento das amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007).

3.4.3.2 Métodos supervisionados de análises de dados

Nas análises supervisionadas, selecionam-se uma série de amostras representativas de cada grupo para as quais as medidas experimentais são coletadas e o padrão de cada um deles é definido. Nesses métodos, as informações a respeito das amostras é que supervisionam o desenvolvimento dos critérios de discriminação que serão utilizados para fazer o reconhecimento e a consequente distinção de novas amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Normalmente, os métodos supervisionados de análises são executados posteriormente aos métodos não supervisionados. Esses métodos são concebidos com o objetivo de melhorar a separação entre os grupos obtida nas análises exploratórias. Em suma, o uso dos métodos supervisionados tem por objetivo obter a máxima distinção dos grupos de amostras e entender quais variáveis são responsáveis por esta distinção (THEODORIDIS et al., 2012).

Os métodos supervisionados de análises mais utilizados em estudo metabolômicos são análise discriminante por mínimos quadrados parciais ou projeção para estruturas latentes (PLS-DA, do inglês, *projection to latent structures* ou *partial least squares discriminant analysis*) e mínimos quadrados parciais ortogonais ou projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal projection to latent structures* ou *orthogonal partial least squares discriminant analysis*) (BOCCARD; RUTLEDGE, 2013; CANUTO et al., 2018; CORREIA; FERREIRA, 2007; THEODORIDIS et al., 2012).

As análises por meio da OPLS-DA foram introduzidas como uma melhoria do método PLS-DA para discriminar dois ou mais grupos de amostras. O algoritmo OPLS-DA melhora a capacidade preditiva, devido a correção de sinal ortogonal para distinguir as variações nos dados que são úteis para a previsão de uma resposta (BYLESJÖ et al., 2006; THEODORIDIS et al., 2012; WESTERHUIS et al., 2010).

4 PERFIL METABOLÔMICO BASEADO EM CG-EM COMBINADO COM FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS DE EXTRATOS APOLARES DE FOLHAS DE *SPONDIAS MOMBIN* L. E *SPONDIAS TUBEROSA* ARR. CAM. ASSOCIADO A ATIVIDADES CITOTÓXICAS

GC-MS-based metabolomic profiles combined with chemometric tools and cytotoxic activities of non-polar leaf extracts of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam.

Jhonyson Arruda Carvalho Guedes; Elenilson de Godoy Alves Filho; Tigressa Helena Soares Rodrigues; Maria Francilene Souza Silva; Maria Auxiliadora Coelho de Lima; Christiane Mendes Cassimiro; Gisele Silvestre da Silva; Ricardo Elesbão Alves; Kirley Marques Canuto; Edy Sousa de Brito; Cláudia do Ó Pessoa; Ronaldo Ferreira do Nascimento; Guilherme Julião Zocolo

Artigo a ser submetido

ABSTRACT

Agroindustrial residues, such as leaves of fruit plants, can be sources of bioactive molecules, thus adding value to co-products that are rarely explored in agroindustry. The aim of this study was to investigate the phytochemical profiles of *S. tuberosa* and *S. mombin* leaves, and their antitumor potential. Cytotoxicity of hexane extract and its effect on cell proliferation of six tumor cell lines (human colon carcinoma, prostate, leukemia, breast, astrocytoma, and cervix) were assessed by *in vitro* MTT assays. In addition, selectivity of extracts was investigated using non-tumor cell lines. We observed that, *S. tuberosa* leaf extract was cytotoxic in both tumor and healthy cells. *S. mombin* extracts selectively inhibited cell proliferation in the PC3 tumor cell line for prostate cancer and did not significantly affect healthy cells. The metabolic profiles of the extracts were evaluated by gas chromatography coupled with mass spectrometry and twenty-three metabolites were identified. In order to correlate metabolic profiles with results from cytotoxic tests, we used chemometric tools. Possible chemical markers were identified that may be responsible for cytotoxicity and the inhibition of

cell proliferation, which were observed in biological assays. This study revealed that the unexplored co-products in agroindustry may have great therapeutic potential, and therefore should be screened for biologically active compounds.

Keywords: Yellow mombin; Umbu; Metabolic fingerprint; Multivariate analysis

1 Introduction

Spondias tuberosa Arr. Cam. and *Spondias mombin* L. are representative species of tropical America, and are traditionally known in Brazil as umbu and yellow mombin, respectively (LIMA; SILVA; OLIVEIRA, 2018; MATTIETTO; MATTA, 2011). These exotic species belong to the *Spondias* genus of the family Anacardiaceae (SAMEH et al., 2018); their fruits have recognized nutritional (LIMA; SILVA; OLIVEIRA, 2018; TIBURSKI et al., 2011), medicinal (SAMEH et al., 2018), and commercial value (GOUVÊA et al., 2017; MALDONADO-ASTUDILLO et al., 2014; SILVA et al., 2017).

Spondias mombin is found in tropical regions of South America, Africa, and Asia (SAMPAIO et al., 2018). In Brazil, it is widely cultivated, mainly in the North and Northeast regions (MATTIETTO; MATTA, 2011). Additionally, *S. mombin* is also found in Caribbean (NEIENS; GEIBLITZ; STEINHAUS, 2017) and French Polynesian islands (TEAI et al., 2005). On the other hand, *Spondias tuberosa* is an endemic fruit tree species native to the Brazilian semiarid region (LIMA; SILVA; OLIVEIRA, 2018). Commercial production of umbu is non-existent, and demand for the fruit stems from domestic extractivism (NETO et al., 2012).

Spondias has been widely used as a popular treatment for several diseases. Specifically, *S. mombin* has been used as a diuretic, and is also used to treat various nervous disorders (SAMPAIO et al., 2018). Further, it presents potential anti-fertility and abortifacient activities (DANIYAL; AKRAM, 2015; OFFIAH; ANYANWU, 1989; UCHENDU; ISEK, 2008). *S. tuberosa* has been used in digestive disorders, diarrhea, and menstrual abnormalities (BARBOSA et al., 2018). In an earlier study, *S. tuberosa* ethanol extracts from rats showed antidiabetic effects (BARBOSA et al., 2018). In addition, studies revealed that it also displays anti-inflammatory, antioxidant (SANTOS et al., 2018), and anticholinesterases activities (ZERAIK et al., 2016). Both *Spondias* presents antibacterial, antimicrobial, and antiviral properties (ARAÚJO et al., 2012). *S. tuberosa* seed extracts in methanol and chloroform (LC₅₀: 168.3 and 152.26 µg mL⁻¹,

respectively) (SANTOS et al., 2018) showed moderate cytotoxic activity in brine shrimps.

The low cytotoxicity of *Spondias* demonstrated by various *in vivo* experimental models (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000) suggests that this species may be developed into a useful product. Currently, the literature lacks further information on the chemical profiles associated the cytotoxic activities of *Spondias* leaves.

Therefore, the objective of this study was to investigate unknown properties of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves, as well as to determine the chemical profiles of non-polar extracts by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In addition, we aimed to correlate the identified chemical compounds with cytotoxicity test results in order to determine biologically active compounds that can be of value to this agroindustrial residue and contribute to the development of new therapeutic alternatives for cancer.

2 Materials and Methods

2.1 Samples, reagents, and chemicals

Yellow mombin (*S. mombin*) and umbu leaves (*S. tuberosa*) were collected in Petrolina-PE, Brazil. Samples were dried in a circulating air oven for three days at 40 °C. Subsequently, dry plant materials were grounded and packed into transparent plastic bags, properly labeled, and were protected from excessive heat, moisture, and light.

Water was purified using a Milli-Q Integral Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, USA). Ethanol (96%) and hexane (95%) used for extraction were purchased from Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (Life Science). The n-alkane homologous series of C₈-C₃₀, pyridine, and MSTFA (N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide) were purchased from Sigma-Aldrich (Supelco Solutions).

2.2 Extraction and derivatization

Dried plant leaf samples (500 mg) were weighed and transferred into test tubes. This was followed by addition of 4 mL hexane, and the mixture was vortexed for 1 min. Extraction of non-polar compounds was performed in an ultrasonic bath for 20 min at a fixed power of 135 W. Test tubes were centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and suspended plant materials were decanted. Finally, a 3 mL aliquot of the hexane phase was collected and dried in a rotary evaporator. The extraction procedure was performed in quadruplicates for each species (CHAGAS-PAULA et al., 2015; GUEDES et al., 2018; NEHME et al., 2008).

Dry hexane extracts (10 mg each) were transferred into vials and dissolved in 200 μ L pyridine. Next, 200 μ L MSTFA was added, and the final solution was placed in a water bath at 37 °C for 30 min (SILVA et al., 2016a). Samples were then filtered (0.22 μ m PTFE) and stored in 2 mL vials for 24 h at 4 °C prior to GC-MS analysis.

*2.3 Identification of compounds of *Spondias* spp. leaf extracts by GC-MS*

Samples were analyzed by GC-MS 7890B/MSD-5977A (Agilent, California, USA). Chromatographic separations were performed using a 5% phenyl-methyl column (HP-5MS 30 m \times 0.25 mm \times 1.0 μ m; Agilent Technologies). The carrier gas was helium (1 mL min⁻¹), and the injection volume was 1 μ L in split mode (1:10) at 260 °C. The oven temperature was kept at 120 °C for 3 min and then programmed to 320 °C at 3 °C min⁻¹. The mass spectrometer operated in EI mode (70 eV) with a scan mass range of 40 to 660 m/z . The total time of the analysis was 79.67 min. The trimethylsilane (TMS) derivatives were tentatively identified by comparison of their mass spectra with those available from the National Institute of Standards and Technology (NIST) from the Spectrometer Database (NIST 2.0) and by comparing their linear retention indexes (LRI) with a C₈-C₃₀ n-alkanes series (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963).

2.4 In vitro assay cytotoxic activity

2.4.1 Cell line and culture

Compounds were evaluated via *in vitro* MTT assays against seven cancer cell lines: HCT-116 (Human colon carcinoma), PC3 (Prostate), HL60 (Leukemia), MCF-7 (Breast), SNB-19 (Astrocytoma), HeLa (Cervix), and L929 (Murine fibroblast). The selectivity index of the compounds for proliferation of a non-tumor cell line (cell line L929; mouse fibroblast) was used as control. All cancer cell tumor lines were maintained in RPMI 1640 medium, with the exception of L929, which was cultivated in DMEM. All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol L⁻¹ L-glutamine, 100 IU mL⁻¹ penicillin, and 100 mg mL⁻¹ streptomycin; cells were cultured in an incubator at 37 °C with 5% CO₂.

2.4.2 Determination of cytotoxicity

Cell viability was determined by reduction of the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product, as described in literature (MOSMANN, 1983). Samples were tested at a concentration of 100 µg mL⁻¹ in six tumor cell lines and one non-tumor cell line. Cells were seeded into 96-well plates (0.1 × 10⁶ cells/well for PC3, SNB-19, MCF-7, HeLa, and L929 cells, 0.3 × 10⁶ cells/well for SF-295 cells, and 0.7 × 10⁵ cells/well for HCT-116 cells), and were treated with the extracts for 72 h. At the end of the treatment, plates were centrifuged, and cells were incubated with fresh media (200 mL) containing 0.5 mg mL⁻¹ MTT. Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in DMSO (150 µL), and absorbance was measured using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, USA). Cell viability was quantified as the percentage of control absorbance of the reduced dye at 595 nm. Data were presented as growth inhibition (GI, %). Two independent experiments were carried out in triplicates. Values were computed using the *GraphPad Prism*TM 5.0 program.

To allow for comparison, doxorubicin was used as a positive control. IC₅₀ was defined as the drug concentration resulted in 50% inhibition of cell growth, with the corresponding 95% confidence interval (CI 95%).

The intensity scale used in literature was adopted to evaluate the cytotoxic potential of the extracts: no activity (WA), little activity (LA, inhibition of cell growth ranging from 1% to 50%), moderate activity (MA, inhibition of cell growth ranging from 50% to 75%), and very potent activity (VA, cell growth inhibition ranging from 75% to

100%) were used (PINHEIRO et al., 2016; TECHNICAL COMMITTEE ISO/TC 194, 2009).

2.5 Chemometric analysis

A total of 8 chromatograms (4 biological replicates of each leaf species) were converted to American Standard Code for Information Interchange (ASCII) files and imported by the Origin™ 9.4 software for numerical matrix construction. This resultant matrix was exported for unsupervised chemometric analysis by Principal Component Analysis (PCA) and supervised analysis by Partial Least Squares (PLS), using the Unscrambler X™ program 10.4 software (CAMO software, Woodbridge, NJ, USA).

Initially, Singular Value Decomposition (SVD) algorithm was applied to decompose the matrix. The PCA algorithm was applied following baseline correction, sample normalization (chromatograms), and mean-centered over the variables (composition) (FREITAS et al., 2018). Relevant information from the chemical data was obtained by the first two Principal Components (PCs), with a confidence level of 95%.

In order to correlate the identification of marker compounds based on cytotoxic activities with the species of leaves and to improve the relationship between samples and composition, regression modeling by PLS was developed using each cytotoxic activity as a categorical variable. The NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) algorithm was used for model construction. The number of latent variables (LV) were selected in accordance to statistical parameters: RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration), RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation), and the respective calibration coefficient (R^2) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; HOTELLING, 1933). A full cross-validation method was applied to evaluate the performance of the models.

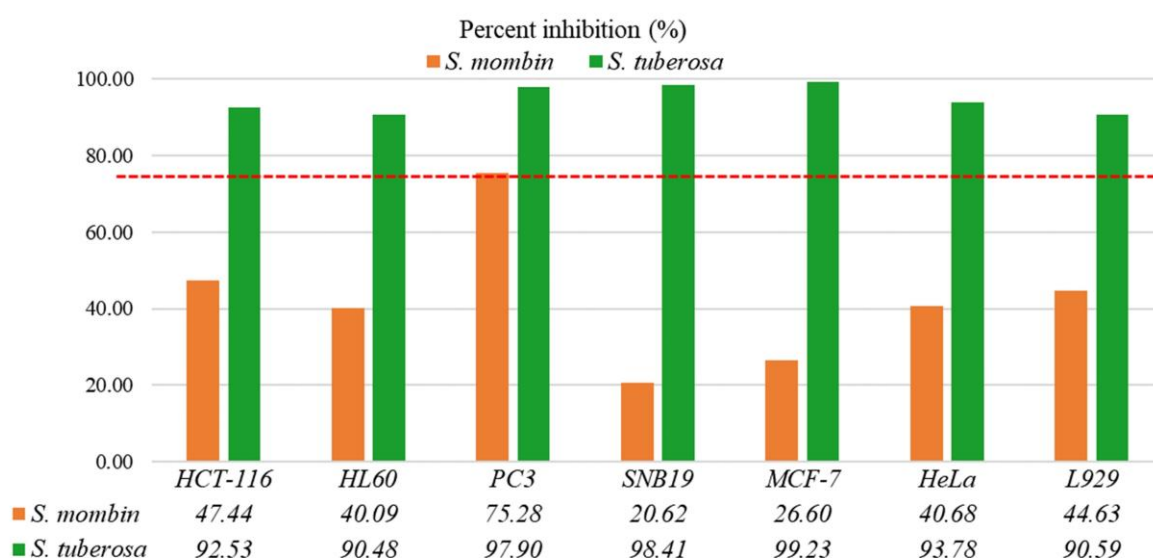
3 Results and Discussion

3.1 Cytotoxicity

Through single-concentration initial screening tests ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), we showed that hexane leaf extracts from *S. tuberosa* resulted in more than 70% growth inhibition (90.48 to 99.23%) in all cell lines tested. *S. mombin* extracts were cytotoxic against prostate cell lines only, at an inhibition rate of 75.28%. Selectivity of extracts was investigated using the non-tumor cells line L929 (mouse fibroblast). Thus, *S. mombin* extracts were also tested against non-tumoral lineages, which showed growth inhibition of less than 50% for prostate cell lines; this suggested that *S. mombin* exerts low toxicity against non-tumor cells. Table 5 describes cell proliferation inhibition (%) of hexane leaf extracts from *S. mombin* and *S. tuberosa* against the tumor cells lines HCT-116 (colon carcinoma), PC3 (prostate), HL60 (leukemia), MCF-7 (breast), SNB19 (astrocytoma), and HeLa (cervix). Data are shown as mean cell growth inhibition against the cell lines, illustrated at Figure 16.

It is known that the percentage of inhibition of cell growth is high when it is between 75% and 100%, and moderate when the inhibition is between 51% and 74% (GUEDES et al., 2018). In this regard, *S. tuberosa* extracts presented higher activities against all tumor cell lines (HCT-116, HL60, PC3, SNB19, MCF-7, and HeLa) as compared to *S. mombin*. Conversely, *S. tuberosa* extracts also exhibited low selectivity between tumor and non-tumor cells (high L929 percentage).

Figura 16 - Inhibitory effect of *S. mombin* and *S. tuberosa* hexane leaf extracts Percent inhibition (%) was determined by MTT assay after 72 h of incubation, and at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Source: AUTHOR, 2018.

Tabela 5 - Percent inhibition (%) of *S. mombin* and *S. tuberosa* hexane leaf extracts, as determined by MTT assay after 72 h of incubation, at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Extract	HCT-116 (colon)	HL60 (leuk.)	PC3 (prost.)	SNB19 (astroc.)	MCF-7 (breast)	HeLa (cervix)	L929 (fibrob.)
<i>S. mombin</i>	47.44 \pm 1.13	40.09 \pm 0.23	75.28 \pm 3.73	20.62 \pm 4.02	26.60 \pm 6.11	40.68 \pm 2.76	44.63 \pm 2.31
<i>S. tuberosa</i>	92.53 \pm 0.52	90.48 \pm 0.29	97.90 \pm 0.73	98.41 \pm 0.42	99.23 \pm 0.60	93.78 \pm 1.53	90.59 \pm 2.19
Dox ^a , IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	0.11 (0.08-0.14)	0.01 (0.006-0.01)	0.44 (0.34-0.54)	1.20 (1.03–1.39)	0.08 (0.07-0.11)	-	0.99 (0.91–1.08)

*Results expressed as average of inhibition percentage of cell growth (GI%) and standard deviation (SD) from two independent experiments in triplicate.

^aDoxorubicin was the positive control, and IC₅₀ is the drug concentration that caused 50% inhibition of cell growth, with a 95% confidence interval (CI 95%).

Source: AUTHOR, 2018.

S. mombin extracts showed the lowest cytotoxicity against tumor cells lines; however, they showed higher selectivity (low L929 percentage) as compared to *S. tuberosa* extracts. In addition, *S. mombin* extracts inhibited cell proliferation of the tumor cell line PC3 (prostate), 75.28%.

Studies evaluated the cytotoxic activity of stem bark extracts from two species of the family Annonaceae; active extracts that resulted in more than 75% cell growth inhibition in any cell line was characterized (PINHEIRO et al., 2016). Another study examined compounds with very potent activities, which resulted in cell growth inhibition ranging from 75-100% (MACÊDO et al., 2018). In this work, *S. tuberosa* showed high inhibition potential (93.78%) against the HeLa cell line. This data supported study results reported in the literature, which showed similar activity with extracts from *Salvia sahendica*; these extracts resulted in 100% inhibition at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the same lineage, and was categorized as a highly cytotoxic species (MORADI-AFRAPOLI et al., 2018).

Hexane extracts of *S. tuberosa* bark in human epidermoid cancer cells (HEp-2 cells) did not cause cytotoxicity at any concentration; conversely, an increase in cell number was observed at 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (BARBOSA et al., 2016). In this study, *Spondias mombin* extracts inhibited cell growth by 92.53% in HCT-116 cells, 98.41% in SNB19 cells, 99.23% in MCF-7 cells, and 90.48% in HL60 cells.

Spondias mombin leaf extracts inhibited cell growth by 75.28% in the prostate cell line. Studies revealed that the extract of this species demonstrated an IC_{50} value of $< 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ against the cell line MRC-5 (Lung) (TRAORE et al., 2014). Aqueous *S. mombin* extracts exhibited the potential to induce genetic damage in both somatic and germ cell lines. In addition, they counteracted the effects of known mutagens or carcinogens (OYEMEMI et al., 2015), which may be responsible for the difference in their bioactivities. Therefore, *Spondias mombin* can be a good source of natural pesticides and antitumor agents (OLADIMEJI et al., 2016).

Among the compounds identified in *S. tuberosa*, some studies reported the presence of α -cadinol in *Pallenis spinose* extracts, which inhibited growth of leukemic (HL-60, K562, and Jurkat) and solid tumor cells (MCF-7, HepG2, HT-1080, and Caco-2) with an IC_{50} in the ranges of 0.25 - 0.66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.50 - 2.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (AL-QUDAH et al., 2017). Another compound identified was stearic acid, which is associated with reduced cardiovascular and cancer risks (SENYILMAZ-TIEBE et al., 2018).

Palmitic acid, present in both the species, induced senescence in HepG2 cells, and reduced the expression of SMARCD1, which is known to regulate senescence-associated lipid accumulation in hepatocytes (HARADA et al., 2018). Squalene and α -amyrin, together with other compounds present in *Wrightia pubescens* extracts, were effective against HT-29 (cell line colon) with an IC_{50} of $1.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ (REYES et al., 2018). The compound β -amyrin showed cytotoxic effects against HCT-116 cells, and was the most active compound in *Vicia monantha* subsp. *monantha* seed extracts ($IC_{50} = 22.61 \mu\text{g mL}^{-1}$) (EL-HALAWANY; OSMAN; ABDALLAH, 2018).

Our study results demonstrated that *S. tuberosa* hexane extracts show greater cytotoxicity as compared to *S. mombin* extracts in all tested cell lines. However, *S. tuberosa* leaf extracts exhibited low selectivity between tumor and non-tumor cells. In contrast, *S. mombin* leaf extracts were efficient against PC3 tumor cells, and also showed high selectivity between tumor and non-tumor cells. Our results also provide evidence that plants of this genus are rich sources of active metabolites showing cytotoxic activities. As these extracts show potent inhibitory effects on cell growth, future studies should focus on studying the possible molecular mechanisms of cytotoxicity.

3.2 Identification of the organic compounds

A total of 23 organic compounds from *S. mombin* and *S. tuberosa* leaf extracts were characterized. Figure 17 illustrates the compounds identified in chromatograms from each extract; Table 6 describes the respective retention time, retention index, percentage of match, and representative ions (m/z) of the isolated compounds; these were found to be mainly organic acids and lipophilic vitamins. As expected, the profiles of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaf extracts exhibited many similarities, since they belong to the same family and genus. However, differences in the levels of some metabolites were observed (Figure 17).

Tabela 6 - Compounds identified in hexane extracts from *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves. (continue).

Compound name	^a RT (min)	^b RI _{exp}	^c RI _{lit}	Match	R. Match	Representative ions (m/z)	<i>S. mombin</i>	<i>S. tuberosa</i>
α -cadinol	15.89	1656	1652	875	926	43, 95 (BP), 121, 161, 204, 222 (M ⁺⁺)		+
dodecanoic acid*	23.26	1881	1881.4	817	846	73, 75, 95, 129, 257 (BP)	+	
myristic acid*	29.46	2080	2080.2	947	948	73, 75, 117, 129, 285 (BP), 342 (M ⁺⁺)	+	+
malic acid*	30.24	2107	2094.5	759	902	73 (BP), 115, 147, 287, 419	+	
pentadecanoic acid*	32.39	2181	2181.2	876	893	73, 75, 117, 129, 299 (BP), 356 (M ⁺⁺)	+	
<i>cis</i> -9-hexadecenoic acid*	34.97	2272	2268.5	812	813	73, 75, 129, 311 (BP), 353	+	+
palmitic acid*	35.36	2287	2281.2	948	948	73, 75, 117, 129, 313 (BP), 370 (M ⁺⁺)	+	+
margaric acid*	37.98	2384	2388	801	901	73, 75, 117, 129, 327 (BP), 384 (M ⁺⁺)	+	
linoleic acid*	39.85	2455	2462	945	945	73, 75, 129, 337 (BP), 379	+	+
9, 12, 15-octadecatrienoic acid*	40.07	2467	2470	953	956	73, 75, 95, 129, 335 (BP), 392 (M ⁺⁺)	+	+
stearic acid*	40.64	2486	2482.8	810	910	73, 75, 117, 129, 341 (BP), 398 (M ⁺⁺)		+
nonadecanoic acid*	43.14	2585	2583.8	768	906	73, 75, 117, 129, 355 (BP), 412 (M ⁺⁺)	+	
citric acid*	43.96	2618	2589.6	820	837	73 (BP), 147, 357, 431, 459, 591	+	

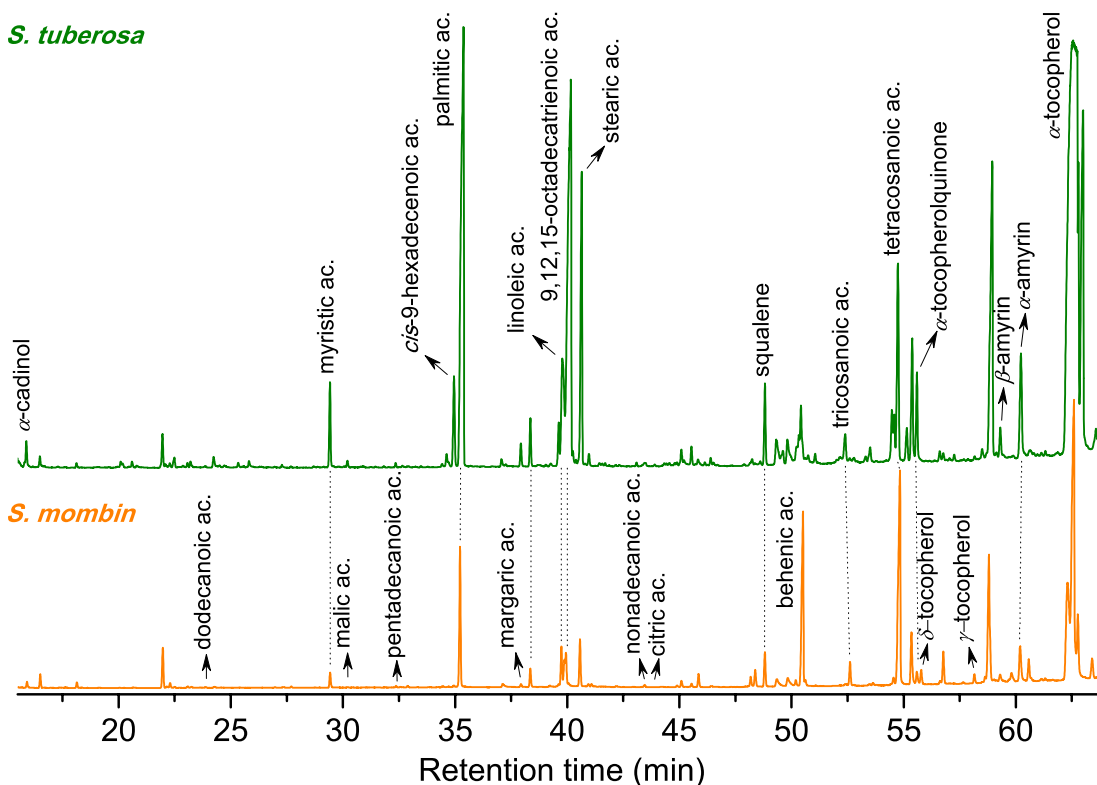
Tabela 6 - Compounds identified in hexane extracts from *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves. (continuation).

Compound name	^a RT (min)	^b RI _{exp}	^c RI _{lit}	Match	R. Match	Representative ions (m/z)	<i>S. mombin</i>	<i>S. tuberosa</i>
squalene	48.94	2830	2835.8	963	966	69 (BP), 81, 95, 121, 137	+	+
behenic acid*	50.27	2889	2909.7	926	936	73, 75, 117, 129, 397 (BP)	+	
tricosanoic acid*	52.48	2990	2984.6	856	890	73, 75, 117, 129, 411 (BP)	+	+
tetracosanoic acid*	54.65	>3000	3088	909	927	73, 75, 117, 129, 425 (BP), 482 (M ⁺)	+	+
α -tocopherolquinone	55.70	>3000		709	774	150, 165, 178, 221 (BP), 430, 446 (M ⁺)	+	+
δ -tocopherol*	55.92	>3000	3153	714	715	73, 195, 251, 291, 516 (BP, M ⁺)	+	
γ -tocopherol*	58.28	>3000	3269	615	631	73, 209, 265, 305, 530 (BP, M ⁺)	+	
β -amyirin	59.30	>3000	3314	852	904	95, 203, 218 (BP), 426 (M ⁺)		+
α -amyirin	60.31	>3000	3355	863	889	95, 135, 189, 203, 218 (BP), 426 (M ⁺)	+	+
α -tocopherol*	62.79	>3000	3419	736	774	73, 207, 221, 544 (BP, M ⁺)	+	+

^at_r =retention time; ^bRI_{exp} = experimental retention index; ^cRI_{lit} = retention index from literature; *Compounds as TMS derivatives; BP (Base peak) and M (Molecular ion)

Source: AUTHOR, 2018.

Figura 17 - Chromatograms, same scale, of hexane leaf extracts Green denotes *S. tuberosa* and oranges denotes *S. mombin*.



Source: AUTHOR, 2018.

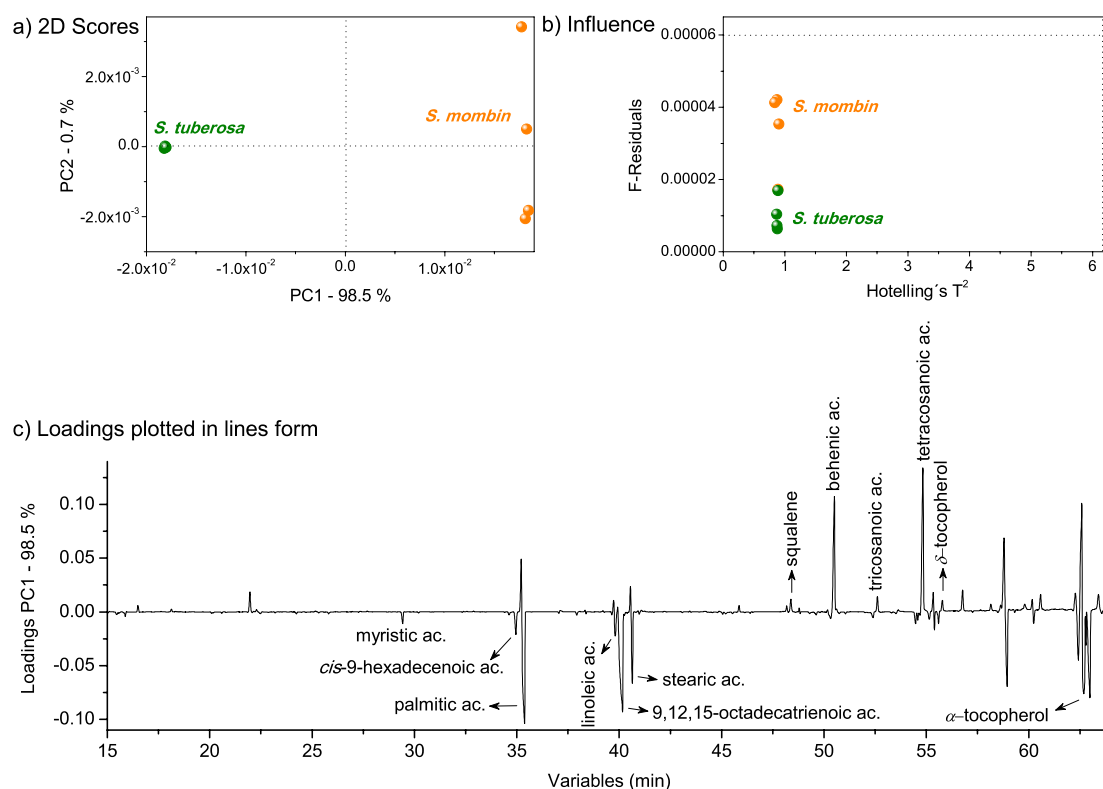
3.3 Chemometric evaluation

Due to the complexity and high dimensionality of the dataset obtained by GC-MS (total of 23 compounds \times 8 chromatograms = 184 variables), exploratory chemometric analysis by PCA was developed to investigate the variability in the organic composition of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves. Figure 18 illustrates the results; bidimensional scores (PC1 \times PC2) are shown on the top right (a), influence plots of extracts based on Hotelling's T^2 versus F-residuals modeling of PC1 are shown on the top left (b), and the relevant loadings for samples are shown on the bottom (c).

According to the scores plot (a), PC1 retained almost all model variability of extract samples, at 98.5% total variance. In addition, compositions of *S. tuberosa* leaf extracts were more homogeneous as compared with those of *S. mombin* (b), which supports its high influence on the model. In general, the respective loadings from PC1 represented the higher amounts of squalene, behenic acid, tricosanoic acid, tetraacosanoic acid, and δ -tocopherol *S. mombin* extracts. On the other hand, *S.*

tuberosa extracts presented higher levels of myristic acid, *cis*-9-hexadecenoic acid, palmitic acid, α -tocopherol, stearic acid, linoleic acid and 9, 12, 5-octadecatrienoic acid.

Figura 18 - Chemometrics analysis: a) bidimensional scores coordinate system (PC1 \times PC2) from *S. mombin* and *S. tuberosa* leaf extracts; b) influence plot from Hotelling's $T^2 \times F$ residuals; c) line forms of relevant loadings.

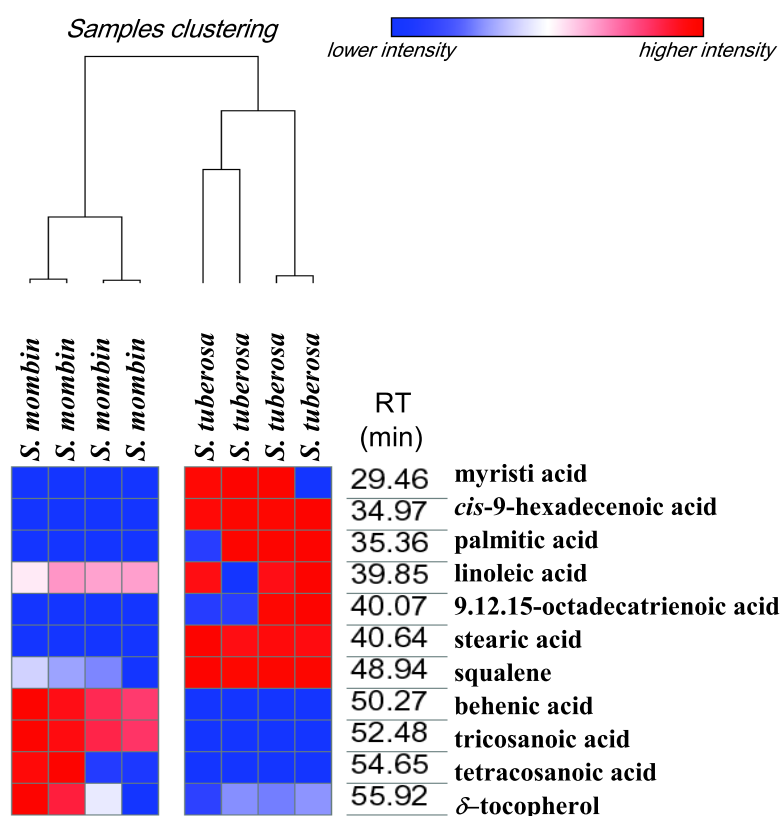


Source: AUTHOR, 2018.

Unsupervised chemometric evaluation of PCA was carried out to examine the phytochemical profiles of *S. mombin* and *S. tuberosa*; results indicated high variability between species. Therefore, due to the elevated amount of information, a clustering analysis by heat map was developed and illustrated in Figure 19 as a 3D dendrogram (samples \times retention times \times signals intensity). The analysis highlighted the difference between *S. mombin* and *S. tuberosa* samples, which is attributed to higher levels of various compounds at 29.46 min (myristic acid), 34.97 min (*cis*-9-hexadecenoic acid), 35.36 min (palmitic acid), 39.85 min (linoleic acid), 40.07 min (9, 12, 15-octadecatrienoic acid), 40.64 min (stearic acid), and 48.94 min (squalene) in *S. tuberosa* as compared with those in *S. mombin* samples. On the other hand, several

compounds were elevated at 50.27 min (behenic acid), 52.48 min (tricosanoic acid), 54.65 min (tetracosanoic acid), and 55.92 min (δ -tocopherol) in *S. mombin* samples.

Figura 19 - Heat map representing the chemical composition variability between *S. mombin* and *S. tuberosa*. The deeper red color represents the higher relative intensity, the deeper blue color the lower relative intensity, and the intermediary intensity in white color.



Source: AUTHOR, 2018.

Based on results from the PCA and cytotoxic activities described in Table 5, a regression model by PLS was developed using each cytotoxic activity as a categorical variable to define the association between samples, cytotoxic activities, and marker compounds. The statistical parameters used to achieve model qualities are described in Table 7.

The high explained variance in the PC1 axis, the calibration coefficient (R^2), and the similarity criteria for both calibration and cross validation presented elevate classification quality in all models. Furthermore, proximity between the values prevented clear indication of the most appropriate regression models. However, the prostate activity (PC3) model showed the lowest calibration and validation errors,

which indicated that this model may appropriately describe the relationship between extract composition and cytotoxic activity.

Tabela 7 - Statistical parameters obtained by multivariate regression modeling using PLS for each cytotoxic activity.

Model	LV1 ^a (%)	R ² cal ^b	RMSEC ^c	R ² val ^d	RMSECV ^e	RMSEC / RMSECV ^f
HCT-116 (colon)	99.99	0.999	0.234	0.999	0.347	0.67
HL60 (leukemia)	99.99	0.999	0.261	0.999	0.388	0.67
PC3 (prostate)	99.99	0.999	0.117	0.999	0.174	0.67
SNB19 (astrocytoma)	99.99	0.999	0.403	0.999	0.598	0.67
MCF-7 (breast)	99.99	0.999	0.376	0.999	0.559	0.67
HeLa (cervix)	99.99	0.999	0.275	0.999	0.408	0.67
L929 (fibroblast)	99.99	0.999	0.238	0.999	0.354	0.67

^a Total variance percent in X matrix refer to one Latent Variable (LV).

^b Calibration coefficient between the real concentration and the concentration predicted during the calibration.

^c Root Mean Square Error of Calibration.

^d Calibration coefficient between the real concentration and the concentration predicted during the validation.

^e Root Mean Square Error of Cross Validation.

^f Similarity criterion.

Source: AUTHOR, 2018.

High cytotoxic activities were showcased by *S. tuberosa* extracts against both tumor (HCT-116, HL60, PC3, SNB19, MCF-7 and HeLa) and non-tumor cell lines (L929); *S. mombin* extracts were only cytotoxic toward prostate tumor cells, which

suggested that leaves extracts of *S. mombin* may be more relevant for our study purposes.

The metabolites myristic acid, *cis*-9-hexadecenoic acid, palmitic acid, linoleic acid, 9, 12, 15-octadecatrienoic acid, and stearic compounds may be associated with elevated activity against the tumor cells lines HCT-116, PC3, SNB19, MCF-7, HeLa, and the non-tumor cells line L929 (Figure 16). A previous study showed that palmitic acid and 9,12-octadecadienoate in hexane extracts from pineapple leaves are potential markers for cytotoxic activity against the HCT-116, PC3, SNB19, MCF-7, and HeLa cell lines. In addition, margaric acid, *cis*-11-eicosenoic acid, stigmasterol, and δ -tocopherol were also highly cytotoxic against the HL60 cell line (GUEDES et al., 2018).

On the other hand, *S. mombin* leaf extracts exerted inhibitory effects on PC3 tumor cell proliferation and demonstrated selectivity between tumor and non-tumor cells. Chemical markers that may be associated with cytotoxic activity against prostate tumor cells (PC3) were suggested to be squalene, tricosanoic acid, δ -tocopherol, and mainly the acids as well as behenic and tetracosanoic acids (Figure 16).

Behenic (C24:0) and tetracosanoic (C24:0) acids are important fatty acids. In general, lipids are able to modulate the viability of tumor cells (KAPLAN et al., 2013; MURRAY et al., 2015; POULOSE et al., 2018). However, there is no direct evidence that suggests behenic and tetracosanoic acids are potential anti-cancer prostate agents.

Isoprenoid squalene was suggested to complement anticancer therapies (TATEWAKI et al., 2016). It is considered to be a potent chemo-preventative and chemotherapeutic agent, and is able to inhibit tumor growth in ovarian, lung, skin, lung, breast, and colon cancers (LOZANO-GRANDE et al., 2018).

Squalene is a natural lipid precursor of cholesterol biosynthesis, which allows the resulting bioconjugates to spontaneously self-model as nanoparticles to improve their pharmacological activity (PERAMO et al., 2018). It has been reported that this lipid acts as a drug carrier by chemically linking with drugs to improve certain physicochemical properties. For example, administration of squalene-doxorubicin nanohybrids resulted in higher reduction of pancreatic tumors when compared with free doxorubicin. (95% vs 29%) (WICKI et al., 2015). Therefore, squalene-based nanoparticles have been considered to be promising candidates for anti-cancer drugs (BUI et al., 2014; KOTELEVETS et al., 2017; SAHA et al., 2015). In the nutritional

context, virgin olive oil is an important source of squalene (BELTRÁN et al., 2016). Consumption of olive oil has been correlated with lower risk of tumor development in various cancer types (GAFORIO et al., 2015; LOZANO-GRANDE et al., 2018; NEWMARK, 1999).

We found three vitamin E isoforms, α , γ and δ -tocopherol in *S. tuberosa* and *S. mombin*. Specifically, α -tocopherol was found in *S. tuberosa* hexanic extracts, while the other two isoforms were found only in *S. mombin* extracts.

Recently, preclinical investigations into vitamin E isoforms revealed that aside from the non-alpha-tocopherol form, all others show promising anticancer effects (ABRAHAM et al., 2018). Tocopherols, particularly the γ and δ homologs, have been shown to inhibit the growth of various tumor types, including prostate cancer (ABRAHAM et al., 2018; HUANG et al., 2014; WANG; HONG; YANG, 2016).

Studies that examined the synergistic effects of vitamin E isoforms against human androgen-dependent prostate cancer cells (LNCaP) indicated that the combination of δ -tocopherol and γ -tocotrienol significantly inhibits prostate cancer cell growth (SATO et al., 2017).

In contrast, a racemic tocopherol study in two prostate cancer cell lines (LNCaP and PC3) indicated that neither RRR-alpha-tocopherol nor RRR-gamma-tocopherol exhibits inhibitory effects on cell growth and apoptotic cell death (MOORE et al., 2017).

Thereby, experimental evidence and literature data strongly supports the possibility of chemical markers of *S. tuberosa* and *S. mombin* being potential agents against tumor cells. In view of various reports regarding the potential of vitamin E isoforms, our experimental results suggested vitamin E isoforms act through synergistic effects.

Based on data presented to date, metabolites may exert potential cytotoxic activities in prostate cancer cells (PC3) and act as biomarkers. Among these, we propose that vitamin E isoforms (δ -tocopherol) and squalene are the major contributors for our experimental results.

4 Conclusions

Hexane extracts from *S. tuberosa* exhibited higher activities against all tumor cell lines as compared with those from *S. mombin*. Within the ambit, *S. tuberosa*

showed potent cytotoxic activity against six tumor lines and demonstrated 90.48-99.23% inhibition against cell growth. However, hexane extract from *S. tuberosa* leaves showed low selectivity between tumor and non-tumor lines, and therefore are not ideal candidates for therapeutics.

On the other hand, hexanic extracts from *S. mombin* exhibited lower proliferative inhibition (20.62-75.28%). Nevertheless, cell growth of prostate cell lines was inhibited by 75.28%. More importantly, *S. mombin* demonstrated high selectivity between tumor and non-tumor cells and is therefore considered a promising phytotherapeutic candidate against cancer.

A total of twenty-three different organic compounds were identified in hexane extracts of *S. mombin* and *S. tuberosa* species. Using chemometric tools, we were able to verify some similarities and differences between the hexane extracts of various species. We established chemical markers that distinguished between *S. mombin* (squalene, tricosanoic acid, δ -tocopherol, behenic acid and tetracosanoic acid) and *S. tuberosa* (myristic acid, *cis*-9-hexadecenoic acid, palmitic acid, linoleic acid, 9, 12, 15-octadecatrienoic acid and stearic) leaf extracts, which may be associated with the observed differences in cytotoxic activity.

The results of this work demonstrate that hexane extracts of *S. tuberosa* present greater cytotoxic activity than *S. mombin* in all tested cell lines. Since existing literature lacks data on cytotoxicity of these two species, our work provides valuable information on the medicinal properties of these species. Our data suggest that *S. tuberosa* and *S. mombin* leaves are potentially important supplements because of their nutritional content and due to their ability to reduce the risk of cancer. In view of this, the above data suggest that these plant extracts may possibly be potential therapeutic agents

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), National Institute of Science and Technology - INCT BioNat, grant # 465637/2014-0, Brazil. The authors are grateful to CNPq for the financial support and scholarships (303791/2016-0). We also thank Embrapa (SEG 03.14.01.012.00.00).

5 ESTUDOS METABOLÔMICOS DE FOLHAS DE *SPONDIAS MOMBIN* L. E *SPONDIAS TUBEROSA* ARR. CAM. CORRELACIONADO COM A ATIVIDADE CITOTÓXICA

Metabolomic studies of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. leaves and identification of cytotoxic activity

Jhonyson Arruda Carvalho Guedes, Maria Francilene Souza Silva, Christiane Mendes Cassimiro Ramires, Cláudia do Ó Pessoa, Maria Auxiliadora Coelho de Lima, Kirley Marques Canuto, Edy Sousa de Brito; Marcelo de Freitas Lima, Ricardo Elesbão Alves, Ronaldo Ferreira do Nascimento, Guilherme Julião Zocolo

Artigo a ser submetido

ABSTRACT

This work is to carry out the comparative study of the metabolomic profile of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. leaves. Together with chemometric and cytotoxic assays against the different cancerous lines with the purpose of generating the chemical knowledge that can be correlated to cytotoxic activity. The analysis of extracts by UPLC-QTOF-MS^E allowed the identification of 43 compounds, many of them reported for the first time in these species. The multivariate analysis made it possible to identify the biomarkers responsible for the distinction between species. Cytotoxicity assays demonstrate that extracts of *S. mombin* L. have better cytotoxic activity. Comparisons, using molecular orbitals calculations, from the major components of *S. mombin* L. and commercially available drugs, active against leukemia and other cancer cells lines, have detailed out the chemical similarities between those compounds. We can therefore correlate the biomarkers of *S. mombin* L. leaves as supposed to be responsible for the difference in the degree of cytotoxicity between the species. The literature corroborates these results, and there are reports of cytotoxicity associated with the same classes of compounds that were identified in this study.

Keywords: Metabolomics; Yellow mombin; Umbu; Chromatography; DFT.

1 Introduction

In traditional medicine, in several regions of the world, leaves, barks and stems of *Spondias mombin* L. (popularly known as yellow mombin) are used for the treatment of infectious disorders, mainly diarrhea and dysentery. In the *in vitro* studies, the aqueous and ethanolic extracts of *S. mombin* L. leaves inhibited bacterial growth, being this the first report of the validation of the popular use of this species as antibacterial agent (AJAO; SHONUKAN; FEMI-ONADEKO, 1985). In addition, studies reveal that the hydroalcoholic extract of *S. mombin* inhibits the replication of Herpes simplex and coxsackie B viruses, responsible for painful mouth ulcers. The active compounds against these viruses were identified as geraniin, galoylgeraniine and two esters of caffeine (CORTHOUT et al., 1991).

Spondias tuberosa Arr. Cam. (popularly known as umbu), the ethnopharmacological study identified its uses for the treatment of some pathologies, among them diabetes, inflammations, uterine cramps and stomach pains (NETO; PERONI; ALBUQUERQUE, 2010). The fruits of the *S. tuberosa* present pronounced antioxidant activity and free radical sequestration, which can be attributed to the presence of phenolic compounds and vitamin C, in addition, there are reports of the presence of flavonoids, anthocyanins and carotenoids. Other compounds well known for their therapeutic properties have also been detected in *S. tuberosa*, such as: gallic acid, chlorogenic acid, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid, vanillyl acid and ferulic acid (GOMES et al., 2013; ZERAIK et al., 2016).

Scientific studies have supported most of the medicinal uses that people in various parts of the world make of plants of the genus *Spondias*. In addition, pharmacological properties not reported by the population were also observed in experimental models. The leaf extracts of *S. tuberosa* and the leaves of *S. mombin* showed antiviral activity against the dengue virus type 2. This fact was associated with the presence of ellagic acid, flavonoids, quercetin and rutin in the extracts (SILVA et al., 2011). Many of the pharmacological properties of the genus *Spondias* are attributed to the phenolic compounds (tannins and flavonoids), mostly present in leaves. However, other secondary metabolites may also contribute to these activities, since vitamin C, saponins, alkaloids, terpenes and carotenoids have been identified in these species (BATAGLION et al., 2015; ZERAIK et al., 2016). The evidence of these

compounds associated with the popular knowledge of anti-inflammatory and healing effects of this species becomes promising for investigation and discovery of new drugs.

The most studied *Spondias* species are *S. mombin* and *S. tuberosa*. The chemical composition of leaf, bark and fruit extracts of plants is fundamental to determine their activity, and since many have common components, they may also have similar actions. Therefore, the other species probably have important pharmacological actions that deserve to be investigated (PESSOA et al., 2006). In addition, because many activities have been studied and proven, and research has shown low toxicity in experimental models *in vivo* (TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000), it is justified the continuity of other research on species of this genus. In addition, the literature lacks further information on the chemical profile of these species, associated with anticancer activity of the pulp, leaves and bark of the species.

Thus, the present work proposes to perform the metabolomic study of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves, using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS^E), together with chemometric analyzes and *in vitro* cytotoxic assays different cancer cell lines. In this way, it will be possible to trace the metabolic profile of the *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves, as well as to correlate them with the cytotoxic activity.

2 Material and method

2.1 Samples, reagents and chemicals

Samples of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves were collected in Petrolina-PE, Brazil. The samples were dried in a circulating air oven for three days at 40 °C. Subsequently, the dry plant material was ground and packed in transparent plastic bags, properly identified and protected from moisture and light.

Water was purified using a Milli-Q Integral Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, USA). Ethanol (96%) and hexane (95%) are purchased from Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and the acetonitrile (LC-MS grade) was supplied by Tedia (Fairfield, Ohio, EUA). Formic acid (purity ~ 98%), Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (Life Science).

The tumor cells used, PC3 (Prostate), HL60 (Leukemia), SNB19 (astrocytoma), MCF-7 (breast), B16F10 (melanoma) and L929 (non-tumor) were donated by the National Cancer Institute (NCI)-USA, cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics, kept in an oven at 37 °C and atmosphere containing 5% CO₂.

2.2 Extraction methodology for UPLC analysis

The extracts were obtained by liquid-liquid partition using ultrasound. Initially, a 50 mg amount of the dried plant leaf samples was weighed into a test tube. Subsequently, 4 mL of 95% hexane was added and the mixture was vortexed for 1 min. The extraction of the non-polar compounds was performed in an ultrasonic bath for 20 min with a fixed power of 135 W. Then, 4 mL of hydroethanolic solution (7:3) was added. The mixture was vortexed for 1 min and sonicated for 20 min. Thereafter, the test tubes were centrifuged to decant the undissolved plant material at 3000 rpm for 10 min. At the end of the procedure, a 1 mL aliquot of the lower polar phase (hydroethanolic) was removed, and this aliquot was filtered on a 0.22 µm PTFE filter. The filtered aliquot was collected in vials and sent for analysis in UPLC-QTOF-MS^E (CHAGAS-PAULA et al., 2015; NEHME et al., 2008). The extraction procedure was done in quintuplet for the two species and the extraction blank in triplicate, $N = 13$ extractions.

2.3 Extraction methodology for analysis of anticancer activity

Extraction for biological analysis occurred similarly to the procedure for UPLC-QTOF-MS^E analysis, as described in section 2.2. However, at the end of the procedure, instead of withdrawing a 1 mL aliquot of the hydroethanolic phase, 3 mL was withdrawn, in order to obtain a sufficient mass of at least 10 mg for cytotoxic testing. The extracts were dried in a rotary evaporator and lyophilized.

2.3.1 Methodology for evaluation of cytotoxic potential in vitro

For the analyzes of the cytotoxic potential, all the extracts were evaluated *in vitro* using the MTT assay against cancer cell lines: PC3 (Prostate), HL60

(Leukemia), SNB19 (astrocytoma), MCF-7 (breast) and B16F10 (melanoma). The selectivity of the compounds toward a normal proliferating cell line was investigated using the cell line L929 (mouse fibroblast) after 72 h of drug exposure. All cancer cell lines were maintained in RPMI 1640 medium. The L929 cell were cultivated under standard conditions in DMEM with Earle's salts. All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol L⁻¹ glutamine, 100 IU mL⁻¹ penicillin, 100 mg mL⁻¹ streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. In cytotoxicity experiments, cells were plated in 96-well plates (0.1 x 10⁶ cells/well for PC3, SNB-19, MCF-7, HeLa and L929 cells, SF-295 cells 0.3 x 10⁶ cells/well, 0.7 x 10⁵ cells/well for HCT-116 cells). All tested compounds were dissolved with DMSO. The final concentration of DMSO in the culture medium was kept constant (0.1%, v/v).

2.3.1.1 Determination of cytotoxicity

The cell viability was determined through the reduction of the yellow dye MTT to a blue formazan product, as described by Mosmann (1983). At the end of the incubation time (72 h), the plates were centrifuged, and the medium was replaced with fresh medium (200 mL) containing 0.5 mg mL⁻¹ MTT. Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in DMSO (150 µL) and the absorbance was measured using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, EUA). The extract effect was quantified as the percentage of the control absorbance of the reduced dye at 595 nm. Data are presented as growth inhibition (GI, %). Each sample was tested in triplicate in two independent experiments. Values were computed using GraphPad Prism® 5.0 program.

2.4. Metabolomics analysis - UPLC-QTOF-MS^E

The analyzes were performed in an Acquity UPLC (Waters) chromatographic system, coupled to a quadrupole / time of flight (QTOF, Waters). Chromatographic runs were performed on a Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2.1 mm, 1.7 µm), fixed temperature 40 °C. The binary gradient elution system consisted of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The UPLC elution conditions were optimized as follows: linear gradient from 2 to 95% B (0-15

min), 100% B (15-17 min), 2% B (17.01), 2% (17.02-19.01 min), a flow of 0.4 mL min⁻¹, and a sample injection volume of 3 μ L.

The chemical profile of samples was performed by coupling the Waters ACQUITY UPLC system to the QTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) with the electrospray ionization interface in negative ionization mode (ESI⁻). The ESI⁻ mode was acquired in the range of 110-1180 Da, fixed source temperature at 120 °C, desolvation temperature 350 °C, desolvation gas flow of 500 L h⁻¹, extraction cone of 0.5 V, capillary voltage of 2.6 kV. Leucine enkephalin was used as a lock mass. The MS mode used Xevo G2-XS QTOF. The spectrometer operated with MS^E centroid programming using a tension ramp from 20 to 40 V. The instrument was controlled by Masslynx 4.1 software (Waters Corporation).

2.5 Compound identification

The data generated by the UPLC-QTOF-MS^E analyzes were processed using MassLynx software version 4.1. The comparison of all the peaks in the mass chromatogram was made based on a tolerance of \pm 0.05 min for the retention time and \pm 0.05 Da for the exact mass. All possible molecular formulas were deduced (elements C, H, O and tolerance of 10 ppm) using the Elemental Composition tool from MassLynx.

It is important to note that the metabolic profile of the species was established through the MS^E spectra, by the dereplication of the 31 compounds that were tentatively identified according to data from the literature based on chemotaxonomy.

2.6 Data processing and statistical analysis

In order to discriminate the chemical profiles obtained through the UPLC-QTOF-MS^E of the different species, all data were processed by the MarkerLynx statistical software. Subsequently, the multivariate analysis was performed, where the PCA (principal components analysis) and the OPLS-DA (orthogonal partial least squares discriminant analysis) were performed. The multivariate analysis was performed under the following conditions: retention time 0.80 to 17.00 min, mass range

of 110 to 1200 Da, tolerance of masses 0.05 Da, and elimination of noise at the level of 5.

For the analysis of the data, a list of peak intensities detected using the retention time pair (t_r) and mass data (m/z) was used as the identifier of each peak. An arbitrary identification was assigned to each of these t_r - m/z pairs based on their elution order. The ion intensities for each detected peak were normalized against the sum of the peak intensities within that sample using MarkerLynx. The compounds were considered the same when they matched their t_r and m/z values (SOUSA et al., 2017).

The data set was mean centered, and the Pareto scale method was used to generate the PCA. The data composing the peak number (t_r - m/z pair), sample name and ion intensity were analyzed by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) using the MarkerLynx software. The mean centered calculates the average spectrum of the data set and subtracts the average of each spectrum, aiming to focus the floating part of the data instead of the original value. The Pareto scale measures each variable by the square root of its standard deviation, amplifying the contribution of metabolites of lower concentration (NI et al., 2008; VAN DEN BERG et al., 2006).

2.7 Theoretical calculations

The structures of chlorogenic acid, geraniin, myricetin-3-*O*-rhamnoside and the commercial substances used for comparison purposes paclitaxel and doxorubicin were downloaded from PubChem (KIM et al., 2016) database with the respectively PubChem CID: 1794427, 3001497, 56843093, 36314 and 31703. The structures were optimized from molecular mechanics UFF (RAPPE et al., 1992) force field to ab initio DFT/ ω B97X-D/6-311++G(d,p) including dispersion corrections (CHAI; HEAD-GORDON, 2008). All ab initio calculation were performed in solution using C-PCM implicit model for each interaction (BARONE; COSSI, 1998; COSSI et al., 1996; TOMASI; MENNUCCI; CAMMI, 2005). Optimizations were followed by harmonic frequency calculations to obtain vibrational, rotational and translational contributions to the free energy. For optimized structures, single point energy calculations were performed using DFT/ ω B97X-D/6-311++G(d,p) basis set also in solution via C-PCM to evaluate the charge of the system using the geodesic (Spackman approach)

(SPACKMAN, 1996). All ab initio calculations were performed using GAMESS version 1 May 2013 (R1) program system (SCHMIDT et al., 1993). The visualization and analysis of the results were done using MacMolplt program (BODE; GORDON, 1998). All final optimized structures are present in supplementary material.

3 Results

3.1 Analysis of the chemical profile of *S. mombin* leaves and *S. tuberosa* leaves

The chemical profile of the *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves was established by analyzing the negative mode (ESI⁻) chromatograms, as shown in Figure 20, together with the chromatograms the mass spectra were analyzed. In addition, it is important to note that the chemical identification was based on studies that used samples of the same genus and species, genus or family of the samples studied. To facilitate further interpretation of the data, the peaks displayed in the chromatograms were consecutively numbered according to the elution order (Table 8). In Table 1, it is possible to observe the 43 compounds detected, with 31 metabolites tentatively identified in the samples. Also associated with metabolites are their deprotonated ions [M-H]⁻ and their ions fragments, as well as the error in parts per million (ppm) and its possible molecular formula.

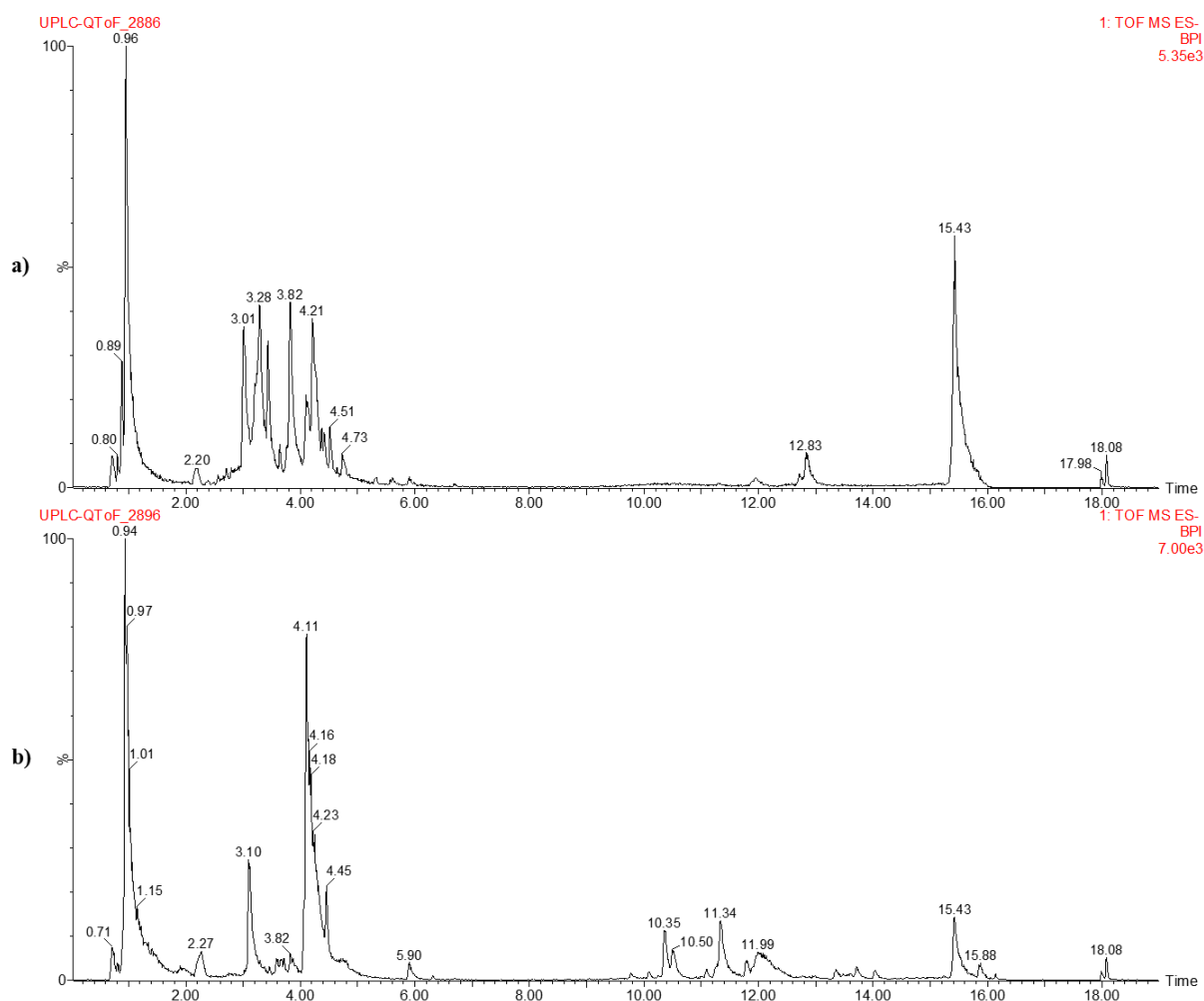
The peak **1** ($t_r = 0.89$ min), presented in its mass spectrum a deprotonated ion m/z 341.1084 [M-H]⁻, it was verified the presence of fragments in the second order spectrum, MS/MS, 89.0253 Da and 179.0508 Da, which according to the literature indicates the presence of sucrose (FARAG et al., 2014).

The peaks **2** ($t_r = 0.96$ min), **5** ($t_r = 3.09$ min), **9** ($t_r = 3.43$ min), **14** ($t_r = 3.81$ min), **23** ($t_r = 4.41$ min), **31** ($t_r = 4.74$ min), **33** ($t_r = 10.36$ min), **34** ($t_r = 10.49$ min), **35** ($t_r = 11.34$ min), **36** ($t_r = 11.79$ min), **37** ($t_r = 12.06$ min), and **38** ($t_r = 12.83$ min), are unidentified molecules. In Table 1, the possible molecular formulas identified, associated with the monoisotopic masses observed in the MS mass spectra are presented.

The peak **3** ($t_r = 2.20$ min) presented in its MS mass spectrum the deprotonated ion 315.0726 [M-H]⁻, and the presence of MS/MS fragments m/z 108.0205 Da, 109.0261 Da and 153.0205 Da, which are compatible with the phenolic acid denominated dihydroxybenzoic acid hexoside. This check is based on

fragmentation, where loss of a monosaccharide (162 Da) occurs, resulting in the fragment 153.0244 Da, which undergoes a decarboxylation ($[M-H-44]^-$) resulting in the ion 109.0259 Da. This compound was identified in both samples, *S. mombin* and *S. tuberosa*, and was previously reported in *S. purpurea* (ENGELS et al., 2012).

Figura 20 - Chromatogram obtained in the UPLC-QTOF-MS^E system in negative mode (ESI⁻) of the extracts from the: (a) *S. mombin* and (b) *S. tuberosa*.



Source: AUTHOR, 2018.

The peak **4** ($t_r = 2.98$ min), presented in its MS mass spectrum the deprotonated ion m/z 353.0883 $[M-H]^-$, in MS/MS has been verified the presence of fragments ions m/z 191.0536 Da, 179.0346 Da, 127.0387 Da, 93.0352 Da, 85.0258 Da. The compound is a phenolic acid denominated as chlorogenic acid, since from the molecular ion m/z 353.0883 $[M-H]^-$, occurs the loss of caffeic acid $[M-H-162]^-$ resulting in the fragment m/z 191.0536 Da which represents quinic acid, the ion m/z 179.0346

Da of caffeic acid was also detected (ENGELS et al., 2012). The compound in question has already been identified previously in *S. mombin* leaves (CABRAL et al., 2016).

The peak **6** ($t_r = 3.28$ min) exhibited in its MS mass spectrum the deprotonated ion m/z 951.0728 $[M-H]^-$, in the mass spectrum MS/MS was observed the presence of fragments 169.0121 Da, 300.9928 Da and 933.0704 Da. The compound was identified as geraniin, where the fragment m/z 933.0704 $[M-H-H_2O]^-$ is due to the loss of water, and also was observed the fragments 169.0121 Da and 300.9928 Da, which correspond respectively to the compounds gallic acid and ellagic acid (KUMAR et al., 2015).

The peak **7** ($t_r = 3.32$ min) was observed in its MS mass spectrum the deprotonated ion m/z 633.0721 $[M-H]^-$, in the mass spectrum MS/MS was observed the presence of fragments 275.0136 Da, 300.9921 Da, 463.0549 Da and 481.0700 Da. The fragments m/z 481.0700 $[M-H-C_7H_4O_4]^-$ and 463.0549 $[M-H-C_7H_4O_4-H_2O]^-$ resulting from consecutive losses of galloyl and H_2O , the fragment m/z 300.9921 Da is attributed to ellagic acid. Thus, peak 7 was identified as corilagin, already reported in leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa* (KUMAR et al., 2015).

The peak **8** ($t_r = 3.37$ min) was observed in the leaf samples of *S. tuberosa*, presented in its mass spectrum MS the ion m/z 635.0850 $[M-H]^-$, in the mass spectrum MS/MS was observed the presence of fragments 125.0153 Da, 169.0037 Da, 313.0535 Da and 465.0733 Da. The correlation of masses observed in MS and MS/MS, indicates that the compound in question is a tannin referred to as trigalloyl glucose. In view of the fact that the fragments m/z 465 $[M-H-C_7H_6O_5]^-$ and 313 $[M-H-C_7H_6O_5-C_7H_4O_4]^-$ are derived from the successive losses of gallic acid and the galloyl group, being also observed gallic acid (m/z 169) and decarboxylated gallic acid m/z 125 $[M-H-44]$ (KUMAR et al., 2015).

The peak **10** ($t_r = 3.47$ min), was observed in the mass spectrum MS the ion m/z 387.1656 $[M-H]^-$, and the fragment m/z 207.0122 Da. Indicating that the compound is the tuberonic acid hexoside. Considering that the ion fragment 207.0122 $[M-H-Hex-H_2O]^-$ is derived from the loss of hexose followed by loss of water (KUMAR et al., 2015). This compound was detected in the *S. tuberosa* leaves samples, in the literature consulted, no reports that said compound was detected in samples of *S. tuberosa*.

Tabela 8 - Constituents identified or tentatively identified in samples of *Spondias mombin* (yellow mombin) and *Spondias tuberosa* (umbu). (continue).

Peak Nº.	t _r min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Fragments of ions (MS/MS)	Molecular Formula	Error (ppm)	Identification	S. <i>mombin</i>	S. <i>tuberosa</i>	References
1	0.89	341.1084	341.1084	89.0253; 179.0508	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.0	Sucrose	+	+	(FARAG et al., 2014)
2	0.96	189.0026	189.0035	-	C ₆ H ₆ O ₇	-4.8	Not identified	+	+	-
3	2.20	315.0726	315.0716	108.0205; 109.0261; 153.0205	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	0.3	Dihydroxybenzoic acid hexoside	+	+	(ENGELS et al., 2012)
4	2.98	353.0883	353.0873	191.0536; 179.0346; 127.0387; 93.0352; 85.0258	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-2.0	Chlorogenic acid (3-Caffeoylquinic acid)	+		(ENGELS et al., 2012)
5	3.09	369.0406	369.0399	-	C ₂₂ H ₉ O ₆	1.9	Not identified		+	-
6	3.28	951.0728	951.0740	169.0121; 300.9928; 933.0704	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	-1.3	Geraniin	+		(KUMAR et al., 2015)
7	3.32	633.0721	633.0728	275.0136; 300.9921; 463.0549; 481.0700	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	-1.1	Corilagin	+	+	(KUMAR et al., 2015)
8	3.37	635.0850	635.0884	125.0153; 169.0037; 313.0535; 465.0733	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	-5.4	Trigaloyl glucose		+	(KUMAR et al., 2015)
9	3.43	1109.0990	1109.0979	-	C ₂₂ H ₄₆ O ₅₀	1.0	Not identified	+		-
10	3.47	387.1656	387.1655	207.0122	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	0.3	Tuberonic acid hexoside		+	(KUMAR et al., 2015)
11	3.54	457.0776	457.0771	169.0077; 305.0776	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	1.1	Epigallocatechin-3-O-gallate		+	(DOU et al., 2007)

Tabela 8 - Constituents identified or tentatively identified in samples of *Spondias mombin* (yellow mombin) and *Spondias tuberosa* (umbu). (continue).

Peak Nº.	t _r min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Fragments of ions (MS/MS)	Molecular Formula	Error (ppm)	Identification	S. <i>mombin</i>	S. <i>tuberosa</i>	References
12	3.60	169.0136	169.0137	125.0209	C ₇ H ₆ O ₅	-0.6	Gallic acid	+		(ENGELS et al., 2012)
13	3.70	625.1405	625.1405	301.0172; 463.0570	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	0.0	Quercetin-O-dihexoside	+	+	(HANHINEVA et al., 2008)
14	3.81	383.0614	383.0614	-	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₁	0.0	Not identified		+	-
15	3.85	953.0920	953.0896	935.0901; 633.0782; 463.0527 169.0055; 465.	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇	2.5	Galloyl-bis-HHPD-glucose	+		(SILVA et al., 2016b)
16	3.99	787.0969	787.0994	0557; 617.0544; 635.1483 151.0046; 179.9985;	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	-3.2	Tetra-O-galloyl-glucoside	+	+	(DORTA et al., 2014)
17	4.02	609.1454	609.1456	257.0696; 271.0286; 300.0203; 301.0291 151.0047; 271.0229;	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.2	Quercetin rhamnosyl hexoside	+	+	(ENGELS et al., 2012)
18	4.12	609.1465	609.1456	300.0204; 301.0304; 343.0400	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1.5	Quercetin-3-O-rutinoside (rutin)		+	(ENGELS et al., 2012)
19	4.19	300.9972	300.9984	229.0009	C ₁₄ H ₆ O ₈	-4.0	Ellagic acid	+		(CABRAL et al., 2016; FRACASSETTI et al., 2013)

Tabela 8 - Constituents identified or tentatively identified in samples of *Spondias mombin* (yellow mombin) and *Spondias tuberosa* (umbu). (continue).

Peak N°.	t _r min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Fragments of ions (MS/MS)	Molecular Formula	Error (ppm)	Identification	S. <i>mombin</i>	S. <i>tuberosa</i>	References
20	4.25	463.0880	463.0877	150.9999; 179.0036; 271.0275	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.6	Myricetin-3-O-rhamnoside	+	+	(CUNHA et al., 2017)
21	4.28	463.0871	463.0877	272.0222; 301.0347	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-1.3	Quercetin-3-O-galactoside	+	+	(ERŞAN et al., 2016)
22	4.37	463.0891	463.0877	179.0049; 271.0242; 300.9987	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	3.0	Quercetin-3-O-glucoside	+	+	(ERŞAN et al., 2016)
23	4.41	981.1262	981.1268	-	C ₃₆ H ₃₈ O ₃₂	-0.6	Not identified	+		-
24	4.45	609.1454	609.1456	193.0835; 271.0090; 300.0305	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.3	Rhamnetin hexosyl pentoside		+	(ENGELS et al., 2012)
25	4.50	593.1509	593.1506	255.0142; 284.0307; 285.0398	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.5	Kaempferol deoxyhexosyl hexoside		+	(ENGELS et al., 2012)
26	4.52	433.0762	433.0771	255.0310; 271.0261; 300.0264; 301.0125	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	-2.1	Quercetin-3-O-xyloside	+		(SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003)
27	4.58	433.0756	433.0771	255.0297; 271.0261; 300.0275; 301.0098	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	-3.5	Quercetin-3-O- arabinopyranoside	+		(SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003)
28	4.66	433.0750	433.0771	255.0325; 271.0284; 300.0245; 300.9988	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	-4.8	Quercetin-3-O- arabinofuranoside	+		(SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003)

Tabela 8 - Constituents identified or tentatively identified in samples of *Spondias mombin* (yellow mombin) and *Spondias tuberosa* (umbu). (continue).

Peak N°.	t _r min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Fragments of ions (MS/MS)	Molecular Formula	Error (ppm)	Identification	S. <i>mombin</i>	S. <i>tuberosa</i>	References
29	4.68	593.1512	593.1506	255.0273; 284.0290; 285.0376	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1.0	Kaempferol-3-O-rutinoside		+	(ENGELS et al., 2012)
30	4.72	615.0988	615.0986	169.0203; 287.0917; 469.8464	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	0.3	Myricitrin-O-gallate		+	(ABU-REIDAH et al., 2015)
31	4.74	451.1032	451.1029	-	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	0.7	Not identified	+		-
32	5.91	301.0350	301.0348	151.0022; 191.0171; 271.0193	C ₁₅ H ₉ O ₇	0.7	Quercetin	+	+	(ABU-REIDAH et al., 2015)
33	10.36	397.1324	397.1346	-	C ₁₅ H ₂₅ O ₁₂	-5.5	Not identified		+	-
34	10.49	675.3683	675.3686	-	C ₄₄ H ₅₁ O ₆	-0.4	Not identified		+	-
35	11.34	593.2791	593.2809	-	C ₂₇ H ₄₅ O ₁₄	-3.0	Not identified		+	-
36	11.79	653.3777	653.3783	-	C ₄₉ H ₅₀ O	-0.9	Not identified		+	-
37	12.06	577.2653	577.2649	-	C ₃₀ H ₄₁ O ₁₁	0.7	Not identified		+	-
38	12.83	385.2385	385.2379	-	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	1.6	Not identified	+		-
39	15.33	369.2430	369.2430	183.0168; 325.2550	C ₂₄ H ₃₄ O ₃	0.0	(17:3)-anacardic acid	+	+	(ERŞAN et al., 2016)
40	15.43	371.2586	371.2586	107.0494; 119.0497; 327.2541	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	0.0	(17:2)-anacardic acid	+	+	(ERŞAN et al., 2016)

Tabela 8 - Constituents identified or tentatively identified in samples of *Spondias mombin* (yellow mombin) and *Spondias tuberosa* (umbu). (continuation).

Peak N°.	t _r min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Fragments of ions (MS/MS)	Molecular Formula	Error (ppm)	Identification	S. <i>mombin</i>	S. <i>tuberosa</i>	References
41	15.85	319.2274	319.2273	275.2350	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	0.3	(13:0)-anacardic acid		+	(ERŞAN et al., 2016)
42	15.95	345.2439	345.2430	301.2579	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	2.6	(15:1)-anacardic acid		+	(ERŞAN et al., 2016)
43	16.98	373.2776	373.2743	106.0412; 329.2853	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	8,8	(17:1)-anacardic acid		+	(ERŞAN et al., 2016)

Source: AUTHOR, 2018.

The peak **11** ($t_r = 3.54$ min), in the MS mass spectrum was observed 457.0776 [M-H]⁻, on the other hand in the MS/MS mass spectrum was observed the fragments 169.0077 Da and 305.0776 Da. The compound was identified as epigallocatechin-3-O-gallate (DOU et al., 2007).

The peak **12** ($t_r = 3.60$ min), it was possible to observe the deprotonated ion m/z 169.0136 [M-H]⁻ and its ion fragment 125.0209 Da, which are characteristic for gallic acid (m/z 169). The fragment observed in the MS/MS m/z 125.0209 [M-H-44]⁻ It arises from the decarboxylation of gallic acid (ENGELS et al., 2012).

The peak **13** ($t_r = 3.70$ min), the MS mass spectrum presented the deprotonated ion m/z 625.1405 [M-H]⁻, this ion correlated with the fragments observed in the MS/MS 301.0172 Da and 463,0570 Da is characteristic and identified as quercetin-O-dihexoside (HANHINEVA et al., 2008). The fragments observed in the MS/MS are related to the losses of one and two hexoses of the molecular ion [M-H]⁻, originating respectively the fragments 463.0512 M-H-Hex]⁻ and 300.9982 [M-H-2Hex]⁻

The peak **15** ($t_r = 3.85$ min), was observed in the MS mass spectrum the deprotonated ion m/z 953.0920 [M-H]⁻, on the other hand in the MS/MS mass spectrum the ions fragments m/z 935.0901 Da, 633.0782 Da and 463.0527 Da. The correlation of mass spectra obtained in MS and MS/MS suggests that the compound in question is an ellagitannin called galloyl-bis-HHPD-glucose. The ion m/z 953.0920 [M-H]⁻ is the deprotonated ion containing one molecule of water [M+H₂O-H]⁻, thus, in the MS/MS the loss of the water molecule is observed, obtaining the molecular ion 935.0901 [M-H]⁻. From the molecular ion, successive losses of the groups HHDP (hexa-hydroxydiphenyl-D-glucose) and gallic acid, generating respectively the fragments 633.0782 [M-H-HHDP]⁻ and 463.0527 [M-H-HHDP-170]⁻ (SILVA et al., 2016b).

The peak **16** ($t_r = 3.99$ min), was verified in the mass spectrum MS the deprotonated ion m/z 787.0969 [M-H]⁻, in addition, in the MS/MS mass spectrum it was possible to observe the fragments m/z 169.0055 Da, 465.0557 Da, 617.0544 Da and 635.1483 Da. Thus, based on the literature consulted, the correlation between mass observed in MS and MS/MS was performed, so that peak 16 was identified as tetra-O-galloyl-glucoside. The occurrence of fragments m/z 635.1483 Da and 617.0544 Da, is due to the losses of the galloyl group (152 Da) and gallic acid (170 Da), respectively (DORTA et al., 2014). The ion m/z 169.0055 Da is attributed to gallic acid, on the other hand, the occurrence of the ion 465.0557 Da, is attributed the successive losses of the galloil (152 Da) and gallic acid (170 Da). It is important to note that this compound was

determined in the species *Mangifera indica*, a species belonging to the Anacardiaceae family, the same family of *S. mombin* and *S. tuberosa* species. However, among the references consulted, the occurrence of this compound in *S. mombin* and *S. tuberosa* samples was not observed. However, the present work identified the said compound in both samples.

The peaks **17** ($t_r = 4.02$ min), **18** ($t_r = 4.12$ min) and **24** ($t_r = 4.45$ min), presented in the MS mass spectrum, respectively the ions 609.1454, 609.1465 and 609.1454 [M-H]⁻. In this way, identical molecular formulas were obtained, related to these monoisotopic masses. Thus, we can infer that the compounds represented by peaks **17**, **18** and **24** are concerned with isomers of molecular formula C₂₇H₃₀O₁₆, given that the compounds have the common molecular ion, m/z 609 [M-H]⁻. The formation of the ion m/z 300.9966 [M-H-146-162]⁻ (quercetin) successive losses of the rhamnoside group and of a glucose (SILVA et al., 2016b; TIBERTI et al., 2007).

In addition, corroborating the association of the fragments, and consequently with the identification was also associated the order of elution of the compounds as it is presented in the literature. Therefore, the peaks **17**, **18** and **24**, were respectively identified as: quercetin rhamnosyl hexoside, quercetin 3-O-rutinoside (rutin) and rhamnetin hexosyl pentoside (ENGELS et al., 2012). The three compounds were identified in *S. tuberosa* leaves, however, in the leaves of *S. mombin* was observed only quercetin rhamnosyl hexoside. It is important to note that these compounds were detected in *S. purpurea* pulps, same family and same gender of the species studied in this work. However, from the literature consulted, this is the first work to determine these compounds in leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa*.

The peak **19** ($t_r = 4.19$ min), it was possible to observe in the mass spectrum MS the ion m/z 300.9972 [M-H]⁻, in the MS/MS mass spectrum was observe the fragment m/z 229.0009 Da. With this, compound was identified as ellagic acid (CABRAL et al., 2016; FRACASSETTI et al., 2013).

In the peaks **20** ($t_r = 4.25$ min), **21** ($t_r = 4.28$ min) and **22** ($t_r = 4.37$ min), were observed in the MS mass spectrum, respectively ions 463.0880, 463.0871 and 463.0891 [M-H]⁻. Thus, analogous molecular formulas were obtained, related to these monoisotopic masses. Thus, we can see that the three compounds are isomers of molecular formula C₂₁H₂₀O₁₂. Through the literature it was possible to extract important information regarding the prediction of the order of elution of the compounds. Thus, the peaks **20**, **21** and **22** were respectively identified as the compounds myricetin-3-O-

rhamnoside, quercetin-3-*O*-galactoside e quercetin-3-*O*-glucoside (CUNHA et al., 2017; ERŞAN et al., 2016).

In the peaks **25** ($t_r = 4.50$ min) and **29** ($t_r = 4.68$ min), it was possible to observe in the MS mass spectrum respectively the deprotonated ions 593.1509 and 593.1512 [M-H]⁻. With this, it was determined that the compounds represented in peaks **25** and **29** are isomers, in view that the peaks had similar masses, and therefore molecular formula of C₂₇H₃₀O₁₅. In order to carry out the identification of the compounds, the correlation of the detected masses in MS and MS/MS was conceived, in addition, the order of elution of the compounds was taken into account as it was observed in the literature. Thus, the compounds were identified as kaempferol deoxyhexosyl hexoside and kaempferol-3-*O*-rutinoside (ENGELS et al., 2012). These compounds were also detected in *S. purpurea*, same family and same gender of the sheets of yellow mombin. However, within the consulted literature available in the available databases, this is the first work to determine these compounds in *S. tuberosa* leaves.

The peaks **26** ($t_r = 4.52$ min), **27** ($t_r = 4.58$ min) and **28** ($t_r = 4.66$ min), presented in their mass spectra MS respectively the ions m/z 433.0762, 433.0756 and 433.0750 [M-H]⁻. With this, identical molecular formulas were obtained, related to these monoisotopic masses, C₂₀H₁₈O₁₁. In addition, corroborating with the identification was also associated the order of elution of the compounds as discussed in the literature (SCHIEBER; BERARDINI; CARLE, 2003). Thus, peaks **26**, **27** and **28** were identified as: quercetin-3-*O*-xyloside, quercetin-3-*O*-arabinopyranoside and quercetin-3-*O*-arabinofuranoside. It is important to point out that these compounds were detected in mango, a species belonging to the family Anacardiaceae, however in the literature consulted, this is the first work to detect these compounds in leaves of *S. mombin*.

The peak **30** ($t_r = 4.72$ min), it was observed in the MS mass spectrum the deprotonated ion 615.0988 [M-H]⁻, in the analysis of the MS/MS mass spectrum the masses m/z 169.0203 Da, 287.0917 Da and 469.8464 Da, corresponding to myricitrin-*O*-gallate. This compound was also identified in a *Rhus coriaria* plant, which belongs to the family of Anacardiaceae (ABU-REIDAH et al., 2015). However, based on the literature consulted, this compound is not determined in species of *S. tuberosa*.

The peak **32** ($t_r = 5.91$ min), the mass spectrum MS exhibited the mass 301.0350 [M-H]⁻, already in the mass spectrum MS/MS it was possible to observe the fragments m/z 151.0022 Da, 191.0171 Da and 271.0193 Da. By means of mass

correlation, the compound was identified as quercetin. This compound was identified in the samples of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves, in addition, it was also previously determined in the *Rhus coriaria* plant, a species belonging to the Anacardiaceae family, the same family in which the *S. mombin* and *S. tuberosa* (ABU-REIDAH et al., 2015).

In the peaks **39** ($t_r = 15.33$ min), **40** ($t_r = 15.43$ min) and **43** ($t_r = 16.98$ min), were observed in the MS mass spectrum respectively the deprotonated ions m/z 369.2436 [M-H]⁻, 371.2570 [M-H]⁻ and 373.2776 [M-H]⁻. These masses were also observed by Erşan et al., 2016, being identified as anacardic acid C17 alkyl chain, distinguished by the degree of saturation of the carbon chain. Therefore, the peaks **39**, **40** e **43** were respectively identified as (17:3)-anacardic acid, (17:2)-anacardic acid and (17:1)-anacardic acid.

We can also observe that in MS/MS mass spectra of anacardic acids (C17), a fragment was observed [M-H-44]⁻. This fact indicates the loss of the carboxyl group of the anacardic acids, giving rise to the fragments 325.2581 Da, 327.2788 Da and 329.2853 Da, respectively observed at peaks **39**, **40** and **43**.

In the peaks **41** ($t_r = 15.85$ min) and **42** ($t_r = 15.95$ min), respectively, the masses were observed 319.2274 [M-H]⁻ and 345.2439 [M-H]⁻. These masses correspond to two anacardic acids, described by ERŞAN et al., 2016. These masses were associated, respectively, with the molecular formulas C₂₀H₃₂O₃ and C₂₀H₃₄O₃. With this, the peaks **41** and **42** were identified respectively as (13:0)-anacardic acid and (15:1)-anacardic acid.

In addition, observing the MS/MS mass spectrum, the presence of fragments m/z 275.2350 Da e 301.2579 Da, respectively in the peaks **41** and **42**. The formation of these fragments is consistent with the identified anacardic acids, since the formation of these fragments is due to the decarboxylation of the anacardic acids. Thus, the formation of fragments occurs 275.2350 [M-H-44]⁻ and 301.2579 [M-H-44]⁻, respectively in the MS/MS mass spectra of the peaks **41** and **42**.

It is important to note that the five anacardic acids were identified in the *S. tuberosa* leaves, however, in the leaves of *S. mombin*, only (17:3)-anacardic acid and (17:2)-anacardic acid.

3.2 Multivariate analysis

3.2.1 Principal Component Analysis (PCA)

The PCA was initially used to reduce the high-dimensional data set in a two-dimensional or three-dimensional score chart without losing important information. The scores and loadings graphs resulting from the PCA were used to investigate the relationship of the identified compounds with the analyzed samples, in order to verify possible groupings (NI et al., 2008).

In the identification of compounds present in the leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa*, it was possible to verify that the analyzed samples present differences regarding their metabolic composition. In order to support this observation, PCA was used. Thus, it was conceived by the pre-processed data, this technique allows the visualization of the data generated by the metabolic study of the *S. mombin* and *S. tuberosa* species, based on the similarities and differences inherent in the samples. Thus, those samples that have similar metabolic composition tend to cluster.

From the 3D PCA graph (Figure 21) it is possible to verify that there is indication of systematic trends among *S. mombin* and *S. tuberosa* species, since it is possible to clearly visualize the formation of two groups.

3.2.2 OPLS-DA e S-Plot analysis

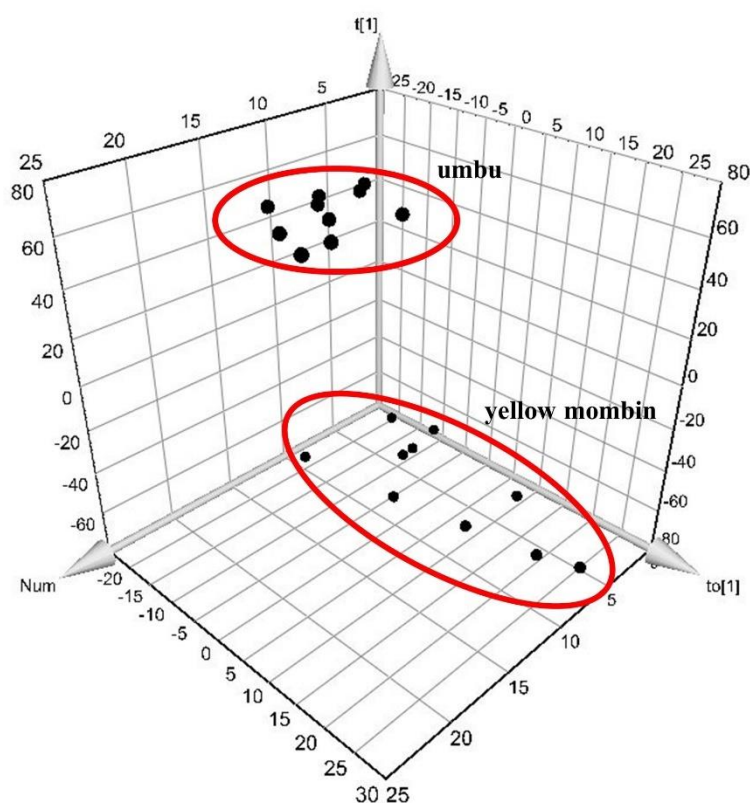
The PCA made it possible to separate and distinguish the metabolomic profiles of the *S. mombin* and *S. tuberosa* species in two distinct groups. Thus, to determine the responsible variables, chemical markers, separation and consequent differentiation of groups of samples, the OPLS-DA associated to the S-Plot dispersion charts are used in the data set.

In this context, the OPLS-DA model was applied to the data from the UPLC-QTOF-MS^E in order to compare the groups of samples. The *t_r-m/z* values served as the basis for identifying or attempting to identify the potential chemical markers responsible for the classification and separation of the samples.

By analyzing the OPLS-DA score graph (Figure 22 (a)) between the samples of the *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves, it is possible to verify the clear separation of the two groups of samples. To evaluate the accuracy and reliability of the

OPLS-DA model, two parameters were used: the variable R2Y, called explained variation and the variable Q2, called predicted variation. In summary, R2Y provides a measure of model fit for the original data, while Q2 provides an internal measure of consistency between the original and predictive data of the cross-validation. Models with parameters R2Y and Q2 close to 1 are considered excellent, although values above 0.5 are accepted when the components of the samples present high complexity (WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001).

Figura 21 - Principal Component Analysis (PCA) in 3D of the extracts of the *S. mombin* and *S. tuberosa*, analyzed by UPLC-QTOF-MS^E.



Source: AUTHOR, 2018.

Thus, the OPLS-DA scores show the separation of the groups with R2Y values = 0.99 and Q2 = 0.99. This result suggests that the model explains 99% of the Y variations, with a predictive ability of 99%, indicating that the model is well established and has an excellent prediction. In order to identify the possible chemical markers, we used the importance of projection (VIP) and S-Plot, which were obtained from OPLS-DA analyzes for all samples. VIP is a way of classifying the best range at

which discriminatory metabolites are inserted and is considered statistically significant when the value is greater than 1.0 (NI et al., 2008). In this work, we used a $VIP > 5$ and $p < 0.05$.

In the S-plot graph (Figure 22 (b)), each point represents an ion (pair t_r - m/z). The X-axis represents the variable contribution, and the more the point of the t_r - m/z pair moves away from zero, the more it contributes to the difference between the two groups. The Y-axis represents the variable confidence, and the pair t_r - m/z moves away from zero, the confidence level for the difference between the two groups (SOUSA et al., 2017).

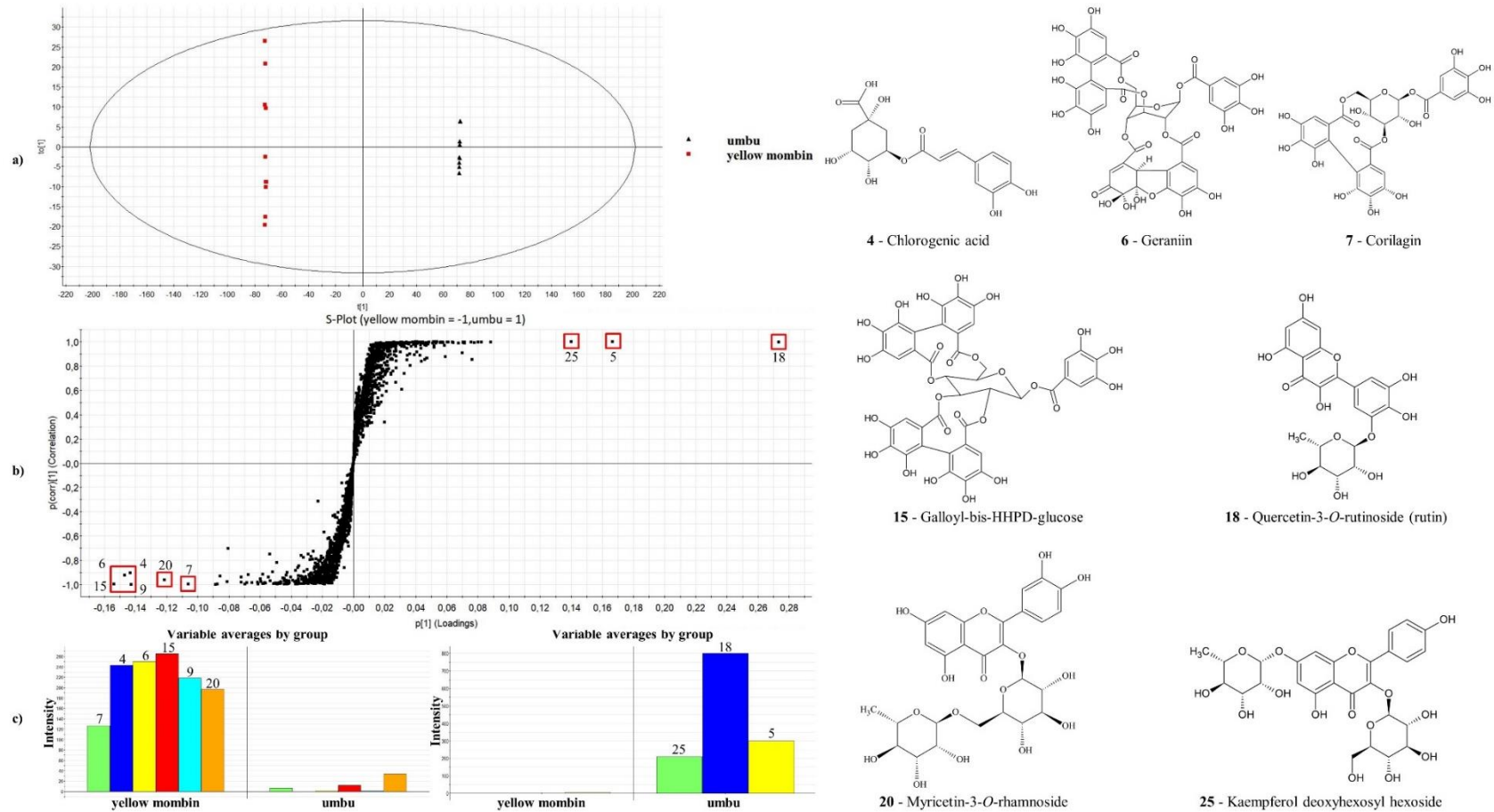
According to the S-Plot (Figure 22 (b)), the ions in the lower left corner, represented by **4**, **6**, **7**, **9**, **15** and **20** (Table 8), were the ions that most contributed to characterize the samples of *S. mombin* leaves. On the other hand, in the upper right corner of the S-plot graph (Figure 22 (b)), more characteristic ions of *S. tuberosa* leaves were identified as **5**, **18** and **25**. Therefore, the set of ions represented by **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **15**, **18**, **20** and **25**, are the potential chemical markers responsible for characterizing and discriminating the two groups of samples and consequently distinguish the samples of leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa*.

As previously mentioned, each point corresponds to a pair t_r - m/z and carrying are assigned to the identified compounds. Thus, the compounds were tentatively identified as: chlorogenic acid (**4**), not identified (**5**), geraniin (**6**), Corilagin (**7**), not identified (**9**), galloyl-bis-HHPD-glucose (**15**), rutin (**18**), myricetin-3-O-rhamnoside (**20**) e kaempferol deoxyhexosyl hexoside (**25**).

3.2.2.1 Evaluation of the distribution of chemical markers in the leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa*

In Figure 22 (c), we can observe the average variation of the chemical markers distributed in the leaves of *S. mombin* in relation to the leaves of *S. tuberosa* and vice-versa. With this, we can see what was predicted by the S-Plot and trend graphs, where we can observe and determine the chemical markers associated with the samples of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves.

Figura 22 - Charts for the extracts of the leaves of *S. mombin* (yellow mombin) and *S. tuberosa* (umbu): (a) OPLS-DA; (b) S-Plot and (c) mean variation of the chemical markers of the ethanolic extract of the leaves of *S. mombin* in relation to the leaves of *S. tuberosa* and leaves of *S. tuberosa* in relation to the leaves of *S. mombin*.



Source: AUTHOR, 2018.

Evaluating the mean distribution of the discriminant chemical markers of the samples of the *S. mombin*, Figure 22 (c), it is possible to observe that the compounds chlorogenic acid, geraniin, corilagin, not identified, galloyl-bis-HHPD-glucose and myricetin-3-O-rhamnoside practically nonexistent in the samples of leaves of *S. tuberosa*. Therefore, the compounds are very characteristic of the *S. mombin* leaves.

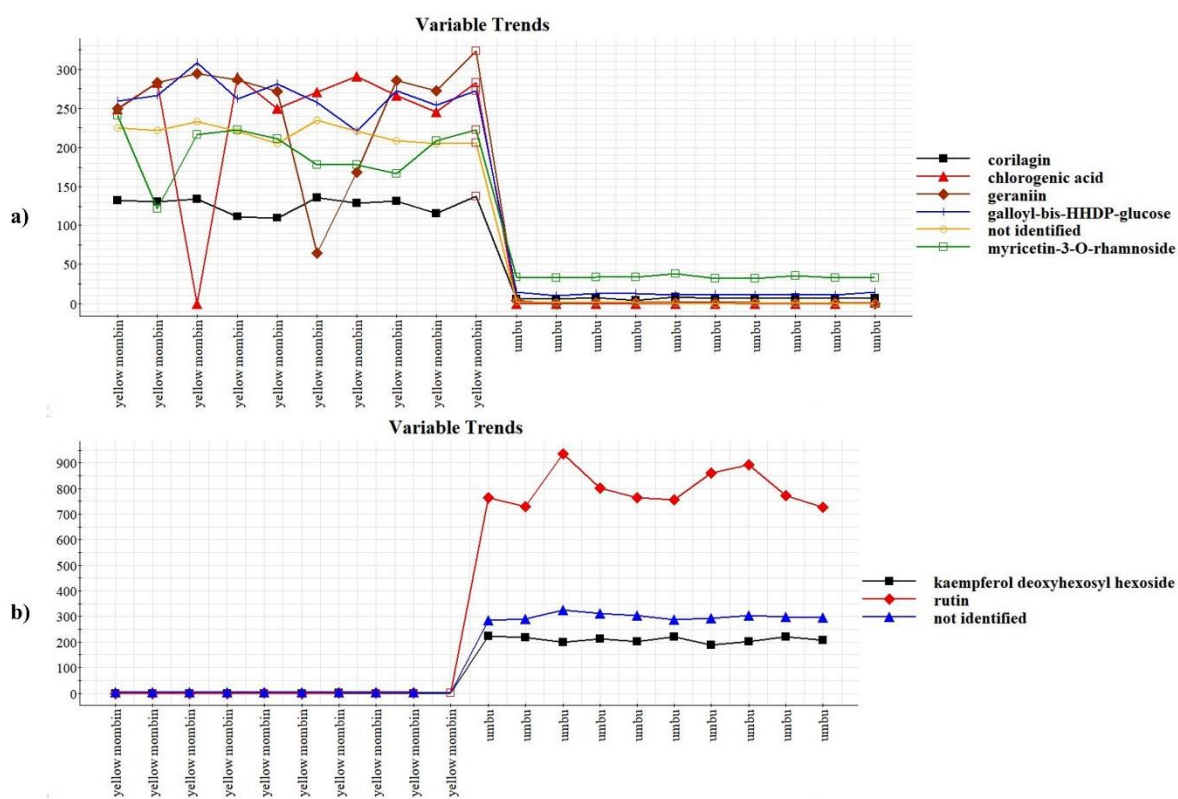
In a similar way to that realized for the samples of leaves of *S. mombin* with respect to the leaves of *S. tuberosa*. Evaluating the mean distribution of discriminant chemical markers of *S. tuberosa* leaves samples (Figure 22 (c)) it is possible to infer that the compounds kaempferol deoxyhexosyl hexoside, rutin and an unidentified compound are much more widely distributed in the samples of *S. tuberosa* leaves. The chemical marker rutin, stands out in relation to the other markers, where we can observe that the same one is presented of quite intense form in the set of samples of leaves of *S. tuberosa*.

In order to corroborate and confirm the inferences obtained through the graphs shown in the Figure 22 (b), we can observe the trend graphs of the potential chemical markers of the leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa* (Figure 23). In the trend graphs, we can evaluate the dispersion of the chemical markers in the sample sets of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves.

In the Figure 23 (a), presents the trend graphs of characteristic chemical markers of the *S. mombin* leaves. With this, we can observe the variation of biomarkers in the *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves. Thus, as expected, biomarkers occur at higher concentrations in the *S. mombin* leaves than in the *S. tuberosa* leaves. Thus, reinforcing the conclusions obtained by means of the S-Plot graph and the chemical distribution of the markers, where the compounds chlorogenic acid, geraniin, corilagin, not identified, galloyl-bis-HHPD-glucose and Myricetin-3-O-rhamnoside, are the compounds responsible for characterizing and discriminating the set of *S. mombin* samples from *S. tuberosa* samples.

Analogously to what has been said previously for the samples of *S. mombin*, in the Figure 23 (b), shows the trend graphs of chemical markers characteristic of *S. tuberosa* leaves. Where we can visualize the variation of the chemical markers on the *S. tuberosa* and *S. mombin* leaves. Thus, it is observed that the compounds kaempferol deoxyhexosyl hexoside, rutin and another unidentified compound are present in higher concentrations in the *S. tuberosa* leaves samples than in the *S. mombin* leaves samples.

Figura 23 - Graphs of the trend variables of the chemical markers: (a) *S. mombin* leaves (yellow mombin) and (b) *S. tuberosa* leaves (umbu).



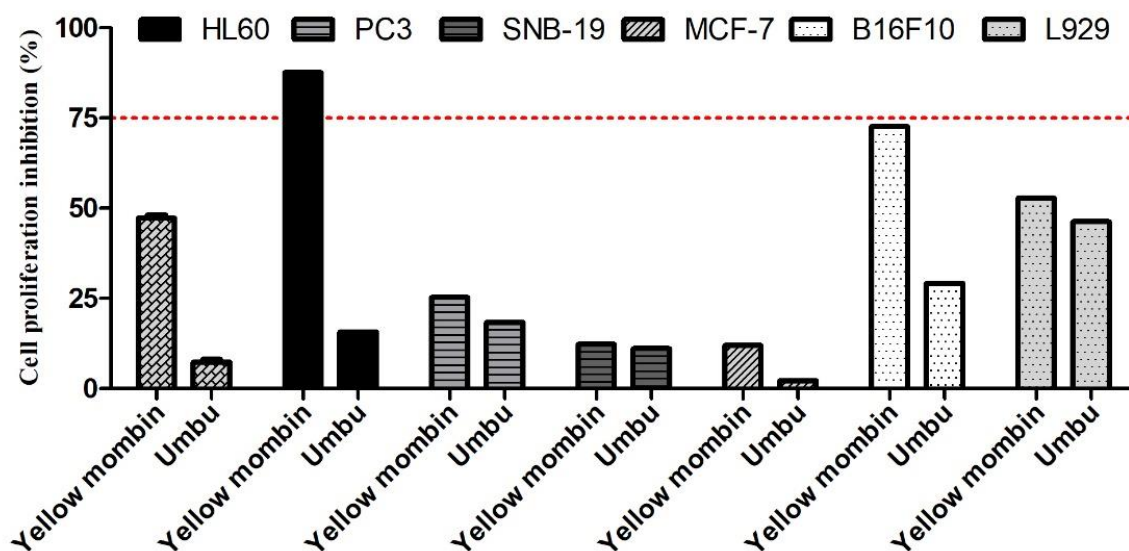
Source: AUTHOR, 2018.

3.3 Evaluation of the cytotoxic activity of leaf extracts of *S. mombin* and *S. tuberosa*

By means of the cytotoxic tests, it was possible to compare the efficacy of extracts of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves against the tumor and non-tumor cell lines. The extracts of *S. tuberosa* showed low cytotoxicity against the tumor lines tested. On the other hand, the extracts of *S. mombin* presented percentage that varied of high (75-100%) to moderate (51-74%) of cell growth inhibition, with values varying from 7,4 to 87,6%. The *S. mombin* extract presented a high percentage of inhibition for the leukemic lineage (HL60) (87,6%) and moderate cytotoxic activity for melanoma (B16F10) with percentage of the 72,6%. The extracts of *S. mombin* and *S. tuberosa* were tested against the non-tumoral lineage, where it can be verified that the percentage of inhibition was less than 60%, therefore presenting low toxicity to the non-tumor cells (Figure 24). Thus, through the cytotoxicity tests, it is possible to observe that the extracts of the leaves of *S. mombin* presented better activity against the leukemic lineage and melanoma, in addition it is still observed that the extract

presents low toxicity. These facts may be associated with the chemical markers attributed to the leaves of *S. mombin*, considering that they are the compounds responsible for the distinction of the leaves of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves.

Figura 24 - Cell proliferation inhibition (%) of extracts of *Spondias* leaves determined by MTT assay after 72 h of incubation at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Source AUTHOR, 2018.

It is important to mention that the chemical markers determined for the leaves of *S. mombin*, have important bioactive properties proven. The chlorogenic acid is a known bioactive agent, acting in the prevention of some disorders, including cardiovascular disorders, neurological diseases and cancer. This compound is also capable of improving glucose tolerance and promoting weight loss (FORINO et al., 2015). Studies have shown that chlorogenic acid promotes cell death by apoptosis in leukemic cells (HL60) (YEN et al., 2018). In addition, the chemical markers also has cytotoxic action against breast cancer strains (MCF7) (EL-NABI et al., 2018), as well as induction of cell death in contralateral tumors *in vivo* (VANCSIK et al., 2018).

The geraniin chemical marker is an important bioactive compound in which it is related to multiple activities, such as anticancer, antiviral, antihypertensive, antihyperglycemic and analgesic (PERERA; TON; PALANISAMY, 2015). The geraniin has been reported to inhibit the invasion of human osteosarcoma cells (WANG et al., 2017), induction of apoptosis in breast and lung cancer cells (MCF7) and stop the cycle

in the S phase at of 24, 48 and 73 hours (LI et al., 2013; ZHAI et al., 2016). The apoptotic activity of geraniin was studied in melanoma cells, where it was verified that the induction of apoptosis of this compound can provide fundamental mechanism for the chemopreventive action of cancer (LEE et al., 2008).

The chemical marker galloyl-bis-HHPD-glucose is a tannin belonging to the class of ellagitannins. Plants rich in this class of compounds are used in traditional medicine to treat various diseases such as diarrhea, high blood pressure, rheumatism, bleeding burns, stomach problems (heartburn, nausea, gastritis and gastric ulcer), kidney problems, urinary system and inflammatory processes in general. In addition, *in vitro* tests detected several pharmacological activities. Among them, we can mention the bactericidal, fungicidal, antiviral, cytotoxic and healing actions (SERRANO et al., 2009). In the literature consulted, there were no reports of the correlation of this compound with anticancer activity.

The results of the present study demonstrate that the ethanolic extract of *S. mombin* leaves presented better cytotoxic activity against the melanoma and leukemia lines, besides presenting low toxicity to the non-tumoral lineage. Therefore, it is a candidate for a phyto-compound as a potential antitumor agent.

3.4. Theoretical results

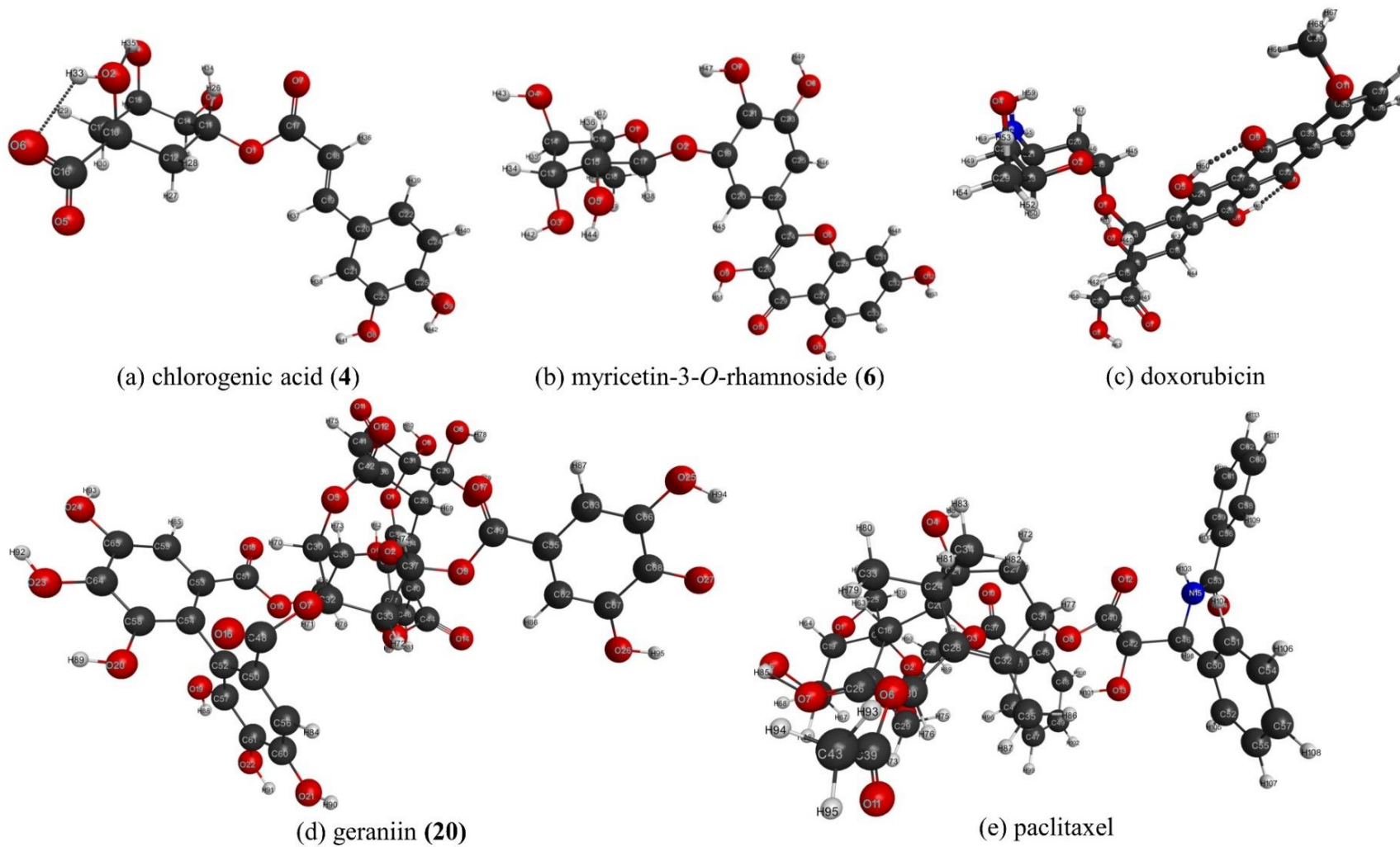
The theoretical study was aimed to help find evidences that could probe the pharmacological activity of the main substances found in the ethanolic extract of *S. mombin* leaves. They were carried out the geometry optimization of chlorogenic acid, geraniin, and myricetin-3-O-rhamnoside. For comparison reasons we decided repeat all theoretical procedure with well-known and commercially available active principle used against leukemia and other cancer lines, we have chosen doxorubicin and paclitaxel as they present obvious structural similarities with the studied substances. The optimized structures can be seen in Figure 25.

Regarding the similarities previously pointed out we could highlight the saturated six member ring for the three first structures of Figure 25 (a **(4)**, b **(6)** and c), where **(6)** and doxorubicin have a tetrahydropyran ring. Another characteristic that must be mentioned is the ester (for **(4)**) and ether (for **(6)** and doxorubicin) linkages, respectively represented by C11-O1-C17, C17-O2-C19 and C13-O1-C19. D **(20)** and

E on the other hand are similar in the polycyclic structure and both have important ester linkages on those cases involving C37-O9-C49 and C31-O8-C40 for **(20)** and paclitaxel, respectively.

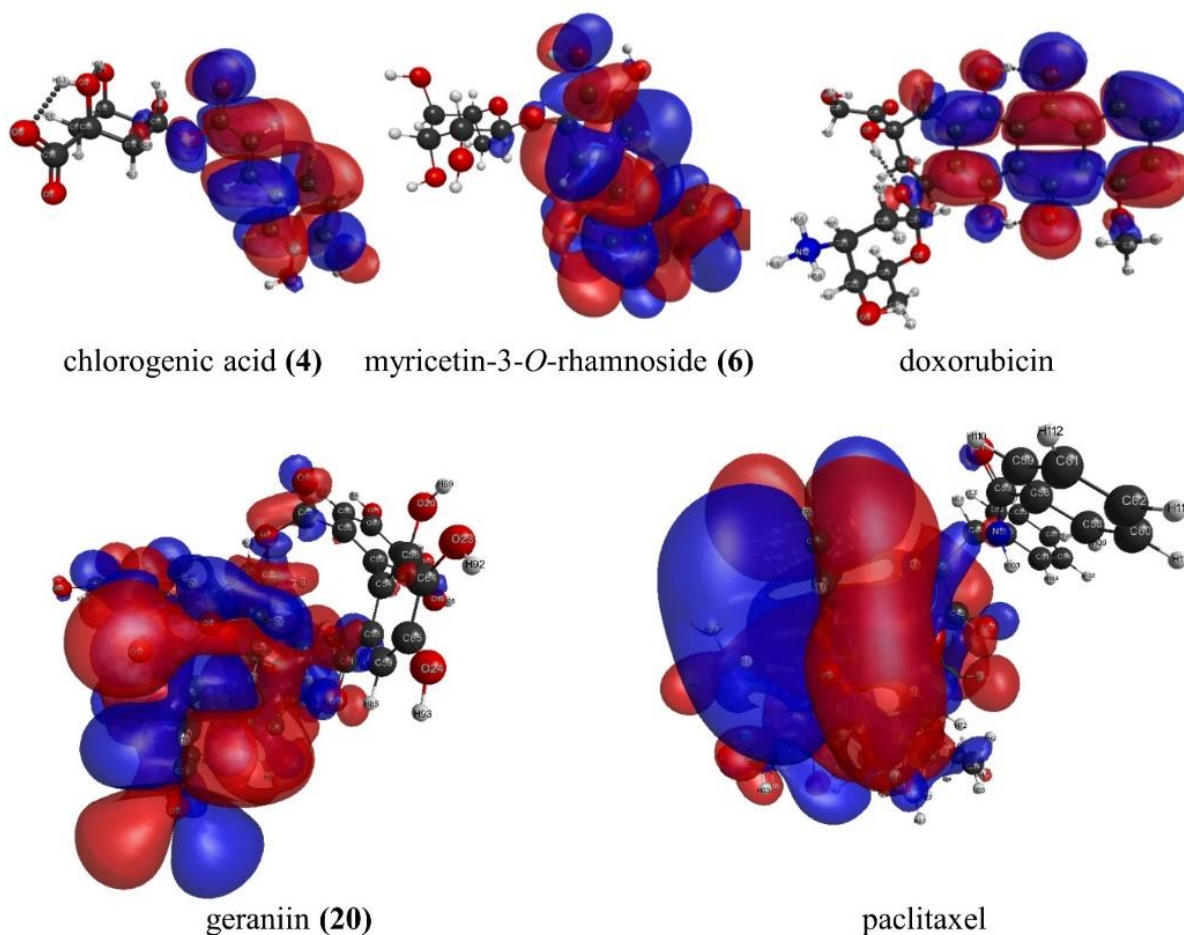
Another possible comparison that we have made involves the frontier orbital LUMO of each compound. Fukui et al. (FUKUI et al., 1954; FUKUI; YONEZAWA; SHINGU, 1952) postulated that the reactivity or selectivity of some organic reactions should be controlled by the interactions between highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), so one could study a mechanism in the basis of his frontier molecular orbital theory. In special cases one could refer to an active site of an enzyme or some biological receptor as a nucleophilic cavity, where often they have amino acids residues stereochemically placed to break or making bonds, in these cases, it would be fair imagine the substrate molecule as the target of the nucleophilic electron cloud in some kind of mechanisms (NÁRAY-SZABÓ; WARSHEL, 2006), so if the interest is to compare the efficiency of some compound in produce a pharmacological effect, we could compare the lowest unoccupied molecular orbital of each comparison candidate to see if at least they have the same LUMO. The Figure 26 shows the LUMO for each of the studied molecules.

Figura 25 - Labeled molecular structure of (a) chlorogenic acid (**4**), (b) myricetin-3-*O*-rhamnoside (**20**), (c) doxorubicin, (d) geraniin (**6**) and (e) paclitaxel. They were optimized (DFT/ ω B97X-D/6-311++G(d,p)) under effect of solvent (water) via implicit model C-PCM.



Source: AUTHOR, 2018.

Figura 26 - Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) for **(4)**, **(6)**, doxorubicin, **(20)** and paclitaxel. The LUMO for each structure was calculated from the optimized (DFT/ ω B97X-D/6-311++G(d,p)) structures under effect of solvent (water) via implicit model C-PCM.



Source: AUTHOR, 2018.

4 Conclusions

By means of the UPLC-ESI-QTOF-MS^E technique it was possible to conceive the identification of a total of 43 compounds in the leaves of *S. tuberosa* and *S. mombin*. In this way, it was possible to establish the chemical profile, In addition, it is important to mention that some compounds determined in the present work were described for the first time in *S. tuberosa* and *S. mombin*. Therefore, the present research presents itself as a great source of information for the development of future works.

The chemometric methods (PCA, OPLS-DA and S-Plot) were essential to identify the differences inherent in the metabolic profiles of *S. tuberosa* and *S. mombin* leaves. In addition, these methods helped to identify the chemical markers (chlorogenic acid, geraniin, corilagin, galloyl-bis-HHPD-glucose, rutin, myricetin-3-O-rhamnoside e kaempferol deoxyhexosyl hexoside) responsible for characterizing and discriminating samples of the *S. tuberosa* and *S. mombin*.

In relation to the cytotoxicity tests, it was possible to observe that the extracts of the leaves of *S. mombin* showed better activity against the leukemic lineage and melanoma, in addition it is still observed that the extract presents low toxicity against the non-tumoral lineage. The best cytotoxic activity obtained in the *S. mombin* leaves samples may be associated with the chemical markers, since they are responsible for distinguishing the samples of *S. mombin* and *S. tuberosa* leaves, in addition, the determined chemical markers have several pharmacological properties already mentioned in literature.

The DFT comparison between some structures present in *S. mombin* ethanolic extract and commercially available drugs has indicated a similar frontier orbital fingerprint, as well as suitable reactive ether or ester centers that could explain the biochemical activity of those compounds.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), National Institute of Science and Technology - INCT BioNat, grant # 465637/2014-0, Brazil. This research was also supported by resources supplied by the Center for Scientific Computing (NCC/GridUNESP) of the São Paulo State University (UNESP).

6 PERFIL METABÓLICO E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS APOLARES DE FOLHAS DE ABACAXI E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DE DIFERENTES CULTIVARES DE ABACAXI

Metabolic profile and cytotoxicity of non-polar extracts of pineapple leaves and chemometric analysis of different pineapple cultivars

Jhonyson Arruda Carvalho Guedes, Elenilson de Godoy Alves Filho, Tigressa Helena Soares Rodrigues, Maria Francilene Souza Silva, Fernanda Vidigal Duarte Souza, Lorena Mara Alexandre e Silva, Ricardo Elesbão Alves, Kirley Marques Canuto, Edy Sousa de Brito, Cláudia do Ó Pessoa, Ronaldo Ferreira do Nascimento, Guilherme Julião Zocolo

Artigo publicado em: *Industrial Crops and Products*, Vol. 124, Páginas 466-474, 2018

doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.026

ABSTRACT

The use of co-products from the fruit agroindustry as a source of bioactive molecules presents economic advantages, since these compounds are highly available and inexpensive. Therefore, the present study aimed to evaluate their qualitative chemical composition followed by multivariate analysis, and to correlate the results with those of the cytotoxicity tests. The non-polar metabolic profiles of the leaves of seven commercial pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivars were investigated by using GC-MS. Twenty-seven metabolites were identified from the seven hexanic extracts. Multivariate analysis (Hierarchical Cluster Analysis, Principal Component Analysis and Partial Least Squares) revealed significant differences in the metabolic fingerprint of the different cultivars. Overall, the hexanic extracts of the seven cultivars of pineapple leaves showed promising antitumor activity against the six tumor lines tested (colon, leukemia, prostate, astrocytoma, breast and cervix). Correlation of the chemometric data, qualitative analysis, and cytotoxic tests allowed us to determine the possible biomarkers responsible for each specific antitumor activity. This study

demonstrates a great valuation potential of a co-product little explored in the agroindustry of foods through the prospection of biologically active compounds.

Keywords: *Ananas*; GC-MS; Cytotoxicity; Multivariate analysis.

1 Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr., Bromeliaceae family) is one of the most widely consumed tropical fruits in the world due to its pleasing aroma and flavor. Brazil is the main center of origin and diversity of the genus *Ananas* and has important genetic variability to explore.

In addition to its food and nutritional value, pineapple has many other potential uses. It can be used for ornamental purposes (SOUZA et al., 2012, 2014), as reinforcing fiber for a variety of products (SENA NETO et al., 2013, 2015), and as paper fiber. It also has enzymes with proteolytic action and secondary metabolites (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JR., 2009; MARQUES; GUTIÉRREZ; DEL RÍO, 2007; YUSOF et al., 2011), and is used as animal feed (FAGUNDES; FAGUNDES, 2010; SANTOS et al., 2008).

Pineapple has well-known and wide-ranging therapeutic properties. In recent years, studies have sought to consolidate and systematize the application of these therapeutic properties of pineapple, including its cytotoxic activity. In addition, the literature describes other therapeutic properties associated with pineapple, including antidiabetic, antihyperlipidemic, and antioxidant effects (XIE et al., 2005). Some previous studies have reported that pineapple can improve insulin sensitivity in type 2 diabetes (XIE et al., 2006).

In vitro studies have shown the activity of various fruit extracts against different stages of tumor formation and indicate that diets rich in fruits and vegetables may have protective effects against cancer. Epidemiological studies suggest that a diet rich in fruits and vegetables, with a high concentration of bioactive compounds, contributes to a reduction in risk of certain types of cancers in humans (VEER et al., 2000).

Research on the antioxidant and anti-inflammatory properties of fruits has been performed, particularly using *in vivo* assays, in order to establish solutions to prevent and assist in the treatment of cancer (KALRA et al., 2008; LANDETE, 2013).

Some compounds in the hydroalcoholic extract of pineapple leaves have previously been determined (MA et al., 2007). However, there is still little information that relates anticancer activity to the bioactive compounds found in the leaves of cultivars pineapple.

It is known that this agroindustrial residue (pineapple leaves) are produced in large quantity and are currently discarded in the environment. Therefore, it is necessary to establish studies that may contribute to the valuation of these residues that could potentially become inputs of the pharmaceutical industry. Despite the numerous medicinal uses of pineapple, phytochemical investigations on this species are scarce. In relation to its non-polar composition, the literature is even scarcer, in terms of both the chemical profile of the pineapple leaves and the association of compounds with specific biological activities.

It is important to note that comparisons of chemical profiles of extracts with different biological activities can be used to indicate hit compounds related to the observed activity (SILVA et al., 2016a). The correlation between chemical compounds and biological activity can be determined through the use of chemometric tools such as Hierarchical Cluster Analysis (HCA), Principal Component Analysis (PCA) and regression analysis by Partial Least Squares (PLS).

In this context, the objective of this study was to determine the non-polar profile of pineapple leaves (seven commercial cultivars), by using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Furthermore, it aimed to correlate the chemical compounds identified in the pineapple leaves with the results of the cytotoxicity tests, aiming at the prospection of biologically active compounds that will add value to this agroindustrial residue.

2 Materials and Methods

2.1 Samples, reagents, and chemicals

Seven cultivars found at the Active Germplasm Bank of Pineapple (AGB Pineapple) or at the Experimental Fields of Embrapa Cassava and Fruits (Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas, Bahia, Brazil) were investigated. Twenty healthy leaves from 10 different plants (two leaves per plant) belonging to each cultivar were harvested. The samples were dried in a circulating air oven for three days at 50 °C.

Subsequently, the dry plant material was ground and packed in sealed and transparent plastic bags, properly identified, and protected from excessive heat, moisture, and light. Table 9 presents information of interest about the cultivars selected for this work.

Tabela 9 - Cultivars from the active germplasm bank of pineapple (AGB Pineapple) or from the experimental fields of Embrapa Cassava and Fruits.

Cultivars	Category/ origin / sample collection site	Cultivation status
Perolera	Local cultivar / Venezuela / AGB pineapple of Embrapa	This cultivar is adapted to high altitudes up to 1500 m, and is cultivated in Colombia and Venezuela
Perola	Cultivar / Selection from Brazil / AGB pineapple of Embrapa	Widely cultivated in Brazil
Golden	Cultivar / Selection from Central America / Experimental fields of Embrapa	This cultivar was selected in Central America and is widely cultivated in several pineapple-producing regions.
Smooth Cayenne	Cultivar / Selection from Venezuela / Experimental fields of Embrapa	This cultivar covers 70% of the area planted with pineapple worldwide
Imperial	HYBRID of PE x SC /Breeding Program - Brazil / Experimental fields of Embrapa	Small-scale plantings in Brazil
Vitoria	HYBRID of PE x SC /Breeding Program - Brazil / Experimental fields of Embrapa	Expanding cultivated areas
Ajuba	HYBRID of PE x SC /Breeding program - Brazil / Experimental fields of Embrapa	Expanding cultivated areas

Source: AUTHOR, 2018.

Water was purified using a Milli-Q Integral Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, USA). Ethanol (96%) and hexane (95%) used for the extraction were purchased from Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)

were purchased from Sigma-Aldrich (Life Science). The n-alkane homologous series of C8-C30, pyridine, and MSTFA (N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide) were purchased from Sigma-Aldrich (Supelco Solutions).

2.2 Extraction and derivatization

Initially, 500 mg of dried plant leaf samples was weighed and transferred into a test tube. Next, 4 mL of hexane was added, and the mixture was vortexed for 1 min. The extraction of non-polar compounds was performed in an ultrasonic bath for 20 min at a fixed power of 135 W. Then, the test tubes were centrifuged to decant suspended plant material at 3000 rpm for 10 min. Finally, a 3 mL aliquot of the hexane phase was collected and dried in a rotary evaporator (CHAGAS-PAULA et al., 2015; NEHME et al., 2008). The extraction procedure was performed in quadruplicate for each of the seven cultivars of pineapple leaves.

The dry hexane extracts (10 mg each) were transferred to vials and dissolved in 200 μ L of pyridine. Next, 200 μ L of MSTFA was added, and the final solution was placed in a water bath at 37 °C for 30 min (SILVA et al., 2016a). Subsequently, the samples were filtered (0.20 μ m PTFE) and stored in 2 mL vials for 24 h at 4 °C before GC-MS analysis.

2.3 Identification of compounds of *Ananas spp.* leaf extracts by GC-MS

Samples were analyzed by GC-MS 7890B/MSD-5977A (Agilent, California, USA). Chromatographic separations were performed using a 5% phenyl-methyl column (HP-5MS 30 m x 0.25 mm x 1.0 μ m; Agilent Technologies). The carrier gas was helium (1 mL min⁻¹), and the injection volume was 1 μ L in split mode (1:10) at 260 °C. The oven temperature was kept at 120 °C for 3 min and then programmed to 320 °C at 3 °C min⁻¹. The mass spectrometer operated in EI mode (70 eV) with a scan mass range of 40 to 660 *m/z*. The total time of the analysis was 79.67 min. The trimethylsilane (TMS) derivatives were tentatively identified by comparison of their mass spectra with those available from the National Institute of Standards and Technology (NIST) from the Spectrometer Database (NIST 2.0) and by comparing their linear retention indexes (LRI) with a C8-C30 n-alkanes series (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963).

2.4 *In vitro* assay cytotoxic activity

2.4.1 Cell line and culture

All the compounds were evaluated *in vitro* using MTT assay against seven cancer cell lines: HCT-116 (human colon carcinoma), PC3 (prostate), HL60 (leukemia), MCF-7 (breast), SNB-19 (astrocytoma), and HeLa (cervix). The selectivity of the compounds toward a normal proliferating cell line was investigated using cell line L929 (mouse fibroblast) after 72 h of drug exposure. All cancer cell tumor lines were maintained in RPMI 1640 medium. The L929 cells were cultivated under standard conditions in DMEM with Earle's salts. All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol L⁻¹ L-glutamine, 100 IU mL⁻¹ penicillin, and 100 mg mL⁻¹ streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. In the cytotoxicity experiments, cells were plated in 96-well plates (0.1 × 10⁶ cells/well for PC3, SNB-19, MCF-7, HeLa, and L929 cells, 0.3 × 10⁶ cells / well for SF-295 cells, and 0.7 × 10⁵ cells / well for HCT-116 cells). All tested compounds were dissolved with DMSO. The final concentration of DMSO in the culture medium was kept constant (0.1%, v/v).

2.4.2 Determination of cytotoxicity

Cell viability was determined by the reduction of yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product, as described by Mosmann (1983). At the end of the incubation time (72 h), the plates were centrifuged and the medium was replaced with fresh medium (200 mL) containing 0.5 mg mL⁻¹ MTT. Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in DMSO (150 µL), and the absorbance was measured using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, USA). The extract effect was quantified as the percentage of control absorbance of the reduced dye at 595 nm. Data are presented as growth inhibition (GI, %). Each sample was tested in triplicate in two independent experiments. Values were computed using the GraphPad Prism™ 5.0 program.

To allow comparison, doxorubicin was used as positive control. The IC₅₀ was the concentration of the drug that caused 50% inhibition of cell growth with the corresponding 95% confidence interval (CI 95%).

2.5 Chemometric analysis

Chemometric analysis was performed to investigate the variability of the chemical composition in leaves from different cultivars of pineapple. A total of 28 chromatograms (quadruplicate acquisition of seven species) were converted to American Standard Code for Information Interchange (ASCII) files and imported by Origin™ 9.4 software for numerical matrix construction. To reduce the original data dimensionality and to observe sample composition trends, the matrix was exported for unsupervised chemometric analysis by Hierarchical Clustering Analysis (HCA), Principal Component Analysis (PCA), and the supervised method known as Partial Least Squares (PLS), using The Unscrambler X™ 10.4 software (CAMO Software, Woodbridge, NJ, USA) (HOTELLING, 1933).

Initially, we applied the unsupervised agglomerative method (HCA), which groups natural clusters into a two-dimensional space (dendrogram). In the dendrogram, the samples were set according to their proximity represented by Squared Euclidean distance using the complete linkage method. The Singular Value Decomposition (SVD) algorithm was applied to decompose the matrix. PCA was performed after the application of the baseline correction and normalization algorithms over the samples (chromatograms) and mean-centered over the variables (composition). The relevant information from the chemical data was obtained using the first three Principal Components (PCs), with a confidence level of 95%.

To improve the identification of chemical variability of pineapple cultivars based on their cytotoxic activities, the PLS method was employed using the previously determined cytotoxic activities (section 2.4) as categorical variables (Y column). The Nonlinear Iterative Partial Least Squares (NIPALS) algorithm was applied to build the models for cytotoxic activity, and the Latent Variables (LV) were selected in accordance to statistical parameters as Square Error of Calibration (SEC), Square Error of Validation (SEV), and R^2 values. The full cross-validation method was applied to evaluate the performance of the PCA and PLS models.

3 Results and Discussion

3.1 Cytotoxicity

The inhibition percentage of cell growth was high (75-100%) to moderate (51-74%) (TECHNICAL COMMITTEE ISO/TC 194, 2009). The hexane extracts inhibited cell growth between 34.17 and 97.69%. For the non-tumor cell line (L929), extracts of Ajuba, Imperial, Perolera, and Vitoria presented low cytotoxicity (CI < 50%), and therefore were considered promising candidates for *in vivo* studies (Table 10). The Cayenne and Perola extracts showed cytotoxic effects against tumor lines PC3, HCT, MCF-7, and HeLa. On the other hand, Golden and Perolera extracts presented cytotoxic activity higher than 75% against five out of the six tested tumor cell lines (with the exception of HL60). All the cultivars presented an inhibition percentage higher than 95% against prostate tumor cells (PC3). The cytotoxic activities will be further discussed in the chemometric evaluation (Section 3.2).

All the hexane extracts (except that from Perola) presented an inhibition percentage higher than 75% against the colon lines (HCT-116). The Cayenne extract exhibited high activity against the tumor lines. However, this same extract had cytotoxic effects on non-tumor cells. All the hexane extracts inhibited the proliferation of prostatic cells, and this is one of the first reports of antitumor activity against the prostate cell line. Furthermore, all pineapple cultivars showed moderate activity at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against breast cancer cell lines (MCF-7), with inhibitory percentages ranging between 77.0 and 91.4%, except for Ajuba, Imperial, and Vitoria, which had low activities ranging from 39.68 to 61.03%.

Tabela 10 - Cell proliferation inhibition (%) of hexane extracts from pineapple leaves against HCT-116 (colon carcinoma), PC3 (prostate), HL60 (leukemia), MCF-7 (breast), SNB19 (astrocytoma), and HeLa (cervix) cells determined by MTT assay after 72 h of incubation at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The selectivity of the compounds was investigated using cell line L929 (mouse fibroblast).

Extract	HCT-116 (colon)	HL60 (leukemia)	PC3 (prostate)	SNB19 (astrocytoma)	MCF-7 (breast)	HeLa (cervix)	L929 (non-tumor)
Ajuba	88.36 \pm 0.87	70.69 \pm 0.70	97.27 \pm 0.31	45.09 \pm 3.13	42.17 \pm 2.13	64.05 \pm 1.09	39.42 \pm 0.71
Cayenne	80.97 \pm 3.74	46.45 \pm 0.18	97.69 \pm 0.52	68.28 \pm 2.24	85.94 \pm 0.18	77.36 \pm 1.79	77.39 \pm 0.33
Golden	85.58 \pm 0.87	45.46 \pm 1.52	96.27 \pm 1.00	76.17 \pm 0.71	91.40 \pm 0.90	84.51 \pm 2.42	84.68 \pm 1.15
Imperial	83.32 \pm 0.17	59.07 \pm 2.04	95.91 \pm 0.10	37.68 \pm 1.07	39.68 \pm 11.57	47.96 \pm 2.40	47.72 \pm 1.84
Perola	42.57 \pm 5.47	30.45 \pm 0.53	97.17 \pm 0.21	82.87 \pm 0.40	87.07 \pm 0.46	80.93 \pm 0.92	69.86 \pm 3.41
Perolera	91.14 \pm 0.52	65.37 \pm 2.04	97.11 \pm 0.68	75.77 \pm 1.34	77.22 \pm 2.26	79.61 \pm 0.73	49.72 \pm 1.86
Vitoria	90.10 \pm 0.52	73.55 \pm 1.93	96.48 \pm 0.58	34.17 \pm 1.90	61.03 \pm 13.7	39.76 \pm 9.57	37.49 \pm 0.84
Dox ^a , IC ₅₀ [μM]	0.21 (0.16 - 0.29)	0.02 (0.01 - 0.02)	0.76 (0.59 - 0.93)	2.07 (1.78 - 2.41)	0.15 (0.12 - 0.19)	-	1.72 (1.58 - 1.87)

* Results expressed as average of inhibition percentage of cell growth (CI% -) and standard deviation (SD) from two independent experiments in triplicate; ^a doxorubicin was the positive control, and IC₅₀ is the drug concentration that caused 50% inhibition of cell growth, with a 95% confidence interval (CI 95%).

Source: AUTHOR, 2018.

Tabela 11 - Relevant chemical compounds identified in hexane extract of leaves from *Ananas comosus* (L.) Merr., with respective retention time (RT in min), theoretical and experimental retention indices (RI), relative area, representative ions (m/z), and percentage (%) match. (*continue*).

Peak	Compound	RT (min)	RI _{exp}	RI _{lit}	Match	R. Match	Representative ions (m/z)
1	dodecanoic acid*	23.28	1882	1881.4	813	840	73, 75, 95, 129, 257 (BP), 314 (M ⁺⁺)
2	tetradecanoic acid*	29.46	2081	2080.2	946	947	73, 75, 117, 129, 285 (BP), 314 (M ⁺⁺)
3	malic acid*	30.26	2108	2094.5	916	929	73 (BP), 115, 147, 287, 419
4	pentadecanoic acid*	32.43	2183	2181.2	940	940	73, 75, 117, 129, 299 (BP), 356 (M ⁺⁺)
5	<i>cis</i> -9-hexadecenoic acid*	35.01	2274	2268.5	805	808	73, 75, 115, 129, 311 (BP)
6	palmitic acid*	35.72	2294	2281.2	943	945	73, 75, 117, 129, 313 (BP), 370 (M ⁺⁺)
7	<i>cis</i> -10-heptadecenoic acid*	37.37	2361	2373.9	875	884	73, 75, 129, 171, 325 (BP), 367
8	margaric acid*	38.03	2386	2388	863	896	73, 75, 117, 129, 171, 327 (BP), 384 (M ⁺⁺)

Tabela 11 - Relevant chemical compounds identified in hexane extract of leaves from *Ananas comosus* (L.) Merr., with respective retention time (RT in min), theoretical and experimental retention indices (RI), relative area, representative ions (m/z), and percentage (%) match. (*continue*).

Peak	Compound	RT (min)	RI _{exp}	RI _{lit}	Match	R. Match	Representative ions (m/z)
9	9,12-octadecadienoic acid*	40.44	2478	2462	930	933	73, 75, 129, 337 (BP), 379
10	stearic acid*	40.94	2497	2486.7	957	958	73, 75, 117, 129, 341 (BP), 398 (M ⁺⁺)
11	<i>cis</i> -10-nonadecenoic acid*	42.47	2558	2571.2	852	873	73, 75, 129, 353 (BP), 395
12	nonadecanoic acid*	43.20	2587	2583.8	883	929	73, 75, 117, 129, 355 (BP), 412 (M ⁺⁺)
13	citric acid*	44.06	2622	2622	926	927	73 (BP), 147, 357, 459, 591
14	<i>cis</i> -11-eicosenoic acid*	45.02	2662	2671.7	721	863	73, 75, 129, 147, 367 (BP)
15	behenic acid*	50.27	2889	2909.7	927	933	73, 75, 117, 129, 397 (BP), 454 (M ⁺⁺)
16	tricosanoic acid*	52.47	2989	2984.6	815	844	73, 75, 117, 129, 411 (BP)

Tabela 11 - Relevant chemical compounds identified in hexane extract of leaves from *Ananas comosus* (L.) Merr., with respective retention time (RT in min), theoretical and experimental retention indices (RI), relative area, representative ions (m/z), and percentage (%) match. (*continue*).

Peak	Compound	RT (min)	RI _{exp}	RI _{lit}	Match	R. Match	Representative ions (m/z)
17	tetracosanoic acid*	54.65	>3000	3088	924	930	73, 75, 117, 129, 425 (BP), 482 (M ⁺⁺)
18	vitamin E	55.46	>3000	3138	948	951	121, 165 (BP), 205, 430 (M ⁺⁺)
19	α -tocopherolquinone	55.63	>3000	-	688	754	150, 165, 178, 203, 221 (BP), 446 (M ⁺⁺)
20	campesterol	57.04	>3000	3131	893	911	43 (BP), 81, 107, 145, 289, 400 (M ⁺⁺)
21	ergostanol	57.16	>3000	-	681	867	147 (BP), 165, 215, 233, 402 (M ⁺⁺)
22	stigmasterol	57.72	>3000	3262	788	810	83, 133, 207 (BP), 255, 412 (M ⁺⁺)
23	γ -sitosterol	58.94	>3000	3351.3	916	937	81, 107, 145, 213, 396, 414 (BP, M ⁺⁺)
24	stigmastanol	59.08	>3000	3325	819	842	81, 107, 215 (BP), 233, 416 (M ⁺⁺)

Tabela 11 - Relevant chemical compounds identified in hexane extract of leaves from *Ananas comosus* (L.) Merr., with respective retention time (RT in min), theoretical and experimental retention indices (RI), relative area, representative ions (m/z), and percentage (%) match. (*continuation*)

Peak	Compound	RT (min)	RI _{exp}	RI _{lit}	Match	R. Match	Representative ions (m/z)
25	sitostenone	61.45	>3000	3435	621	881	73, 124, 147, 207 (BP), 281, 412 (M ⁺)
26	stigmasterol*	64.03	>3000	-	648	826	73, 75, 83 (BP), 207, 281, 469, 526 (M ⁺)
27	δ-tocopherol*	65.35	>3000	-	691	723	75, 207, 474 (BP, M ⁺)

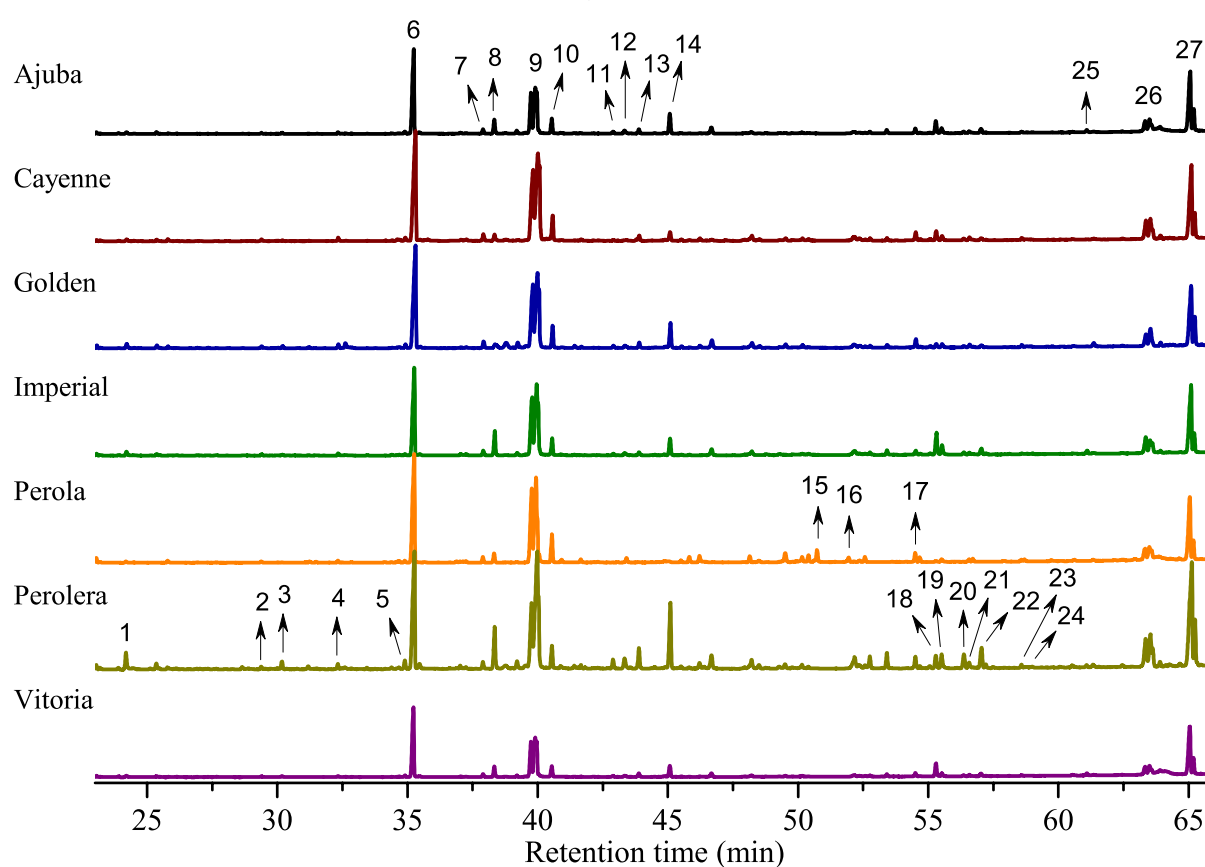
^aRt = retention time; ^bRI_{exp} = experimental retention index; ^cRI_{lit} = retention index from literature; *Compounds as TMS derivatives.

Source: AUTHOR, 2018.

3.2 Identification of the organic compounds

Figure 27 presents a comparison of the chromatograms (same scale) of leaf hexane extracts from seven cultivars of pineapple. Twenty-seven organic compounds were identified. The compounds identified were mainly primary metabolites (organic acids, fatty acids), phytosterols and lipophilic vitamins, it is important to note that the classes of substances identified are in agreement with the chemotaxonomic data observed in the literature. (MARQUES; GUTIÉRREZ; DEL RÍO, 2007). Table 11 presents the respective chemical compounds with retention times (RT), retention index (RI), major m/z peak, and percentage (%) match. In general, the chromatograms showed similar profiles among the samples and only a few differences in the signal intensity of some components. Compounds 15-17 and 18-24 were detected only in the Perola and Perolera cultivars, respectively.

Figura 27 - Comparison among the chromatograms (same scale) from seven cultivars of pineapple leaves with the identified organic compounds.



Source: AUTHOR, 2018.

3.3 Unsupervised chemometric evaluation

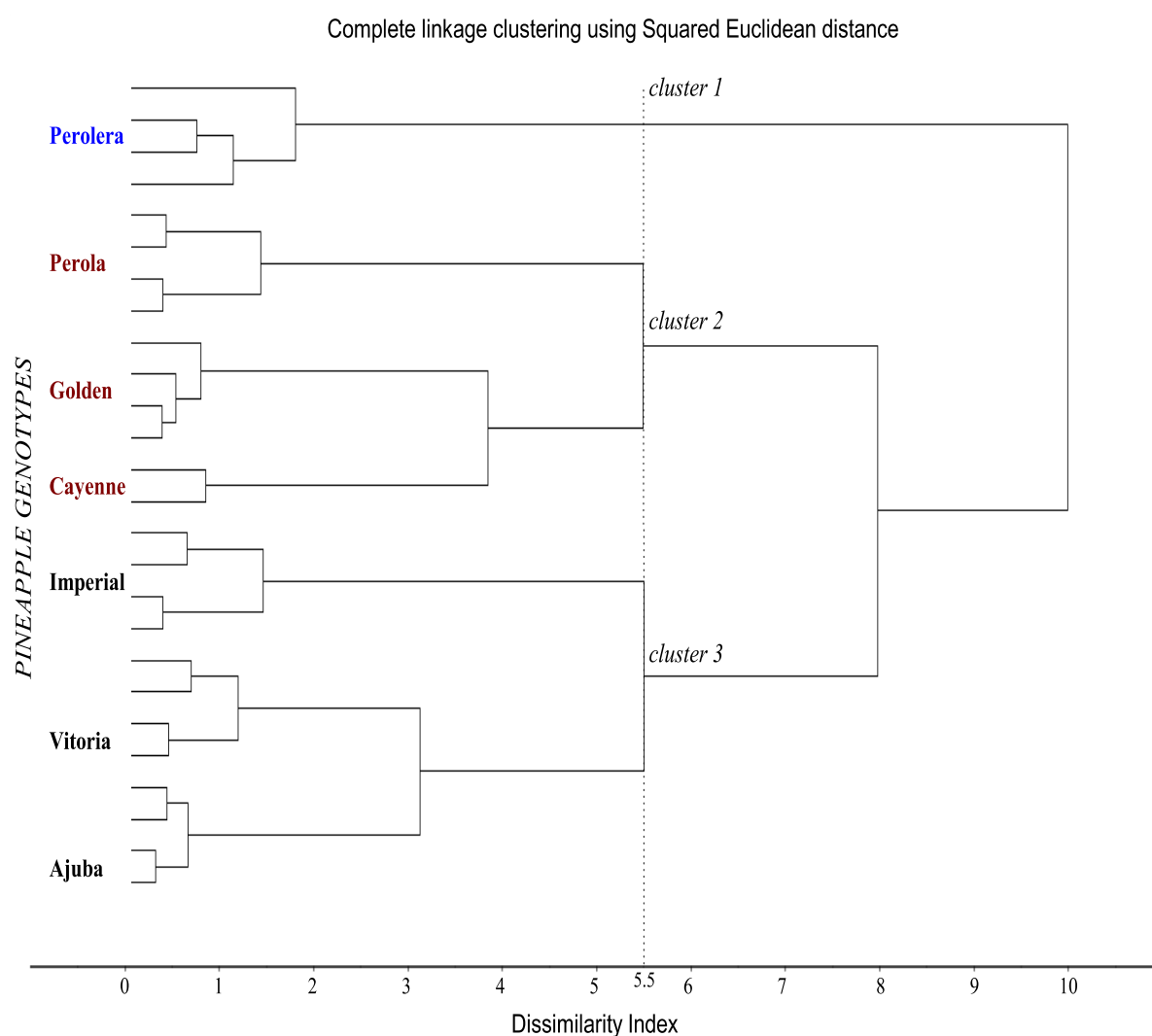
Traditionally, multivariate analysis is used to explore a complex matrix of data in order to determine variations, similarities, and relationships between samples and their composition (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Unsupervised chemometric analyses are advantageous when the compounds or degradation products are not known, disallowing the use of certified standard compounds. Therefore, as the numerical matrix from the pineapple leaves presented 263,956 of data (28 chromatograms \times 9,427 variables), HCA and PCA methods were developed for high-quality untargeted evaluation of the variability of the organic compounds, improving our knowledge of pineapple leaf composition by cultivar. Groups were formed by the leaves closest in composition (similar) at a dissimilarity index near zero, and distant leaves (different) with a dissimilarity index near 10 (Figure 28) (SILVA et al., 2012). Three clear clusters were observed at dissimilarity index 5.5: cluster 1 corresponded to leaves from the Perolera cultivar; cluster 2 to Perola, Golden, and Cayenne; and cluster 3 to Imperial, Vitoria, and Ajuba.

The PCA method was applied to reduce the dimensionality of the original data, aiding interpretation of the multivariate data. The PCA results (Figure 29) exhibited separation tendencies in the samples related to the first three Principal Components (PC1, PC2, and PC3), with 91.30% of the total variance. Figures 29 (a) and (b) illustrate the 3D scores and the respective loadings plotted in line form, respectively. The clusters previously observed during the HCA evaluation were important to understanding the sample clustering in the score graph. The PCA results showed clustering of the leaves from Ajuba, Imperial, and Vitoria (illustrated in black) at null PC1 scores, the leaves from Cayenne, Golden and Perola (red) at negative PC1 scores, and the leaves from Perolera (blue) at positive scores for the same PC. The PC2 axis presented the clustering of the leaves from Perolera (blue), Cayenne, Golden, and Perola (red) at positive scores, and the leaves from Ajuba, Imperial, and Vitoria (black) at negative scores. The PC3 axis supported the aforementioned leaf clustering and improved the attribution of compound variability in the loading graph (Figure 3b).

In general, the positive loadings from the PC1 axis showed higher amounts of palmitic acid (35.72 min), 9,12-octadecadienoate (40.44 min), and steric acid (40.94 min) in Perolera, Cayenne, Golden, and Perola leaves, and higher amounts of

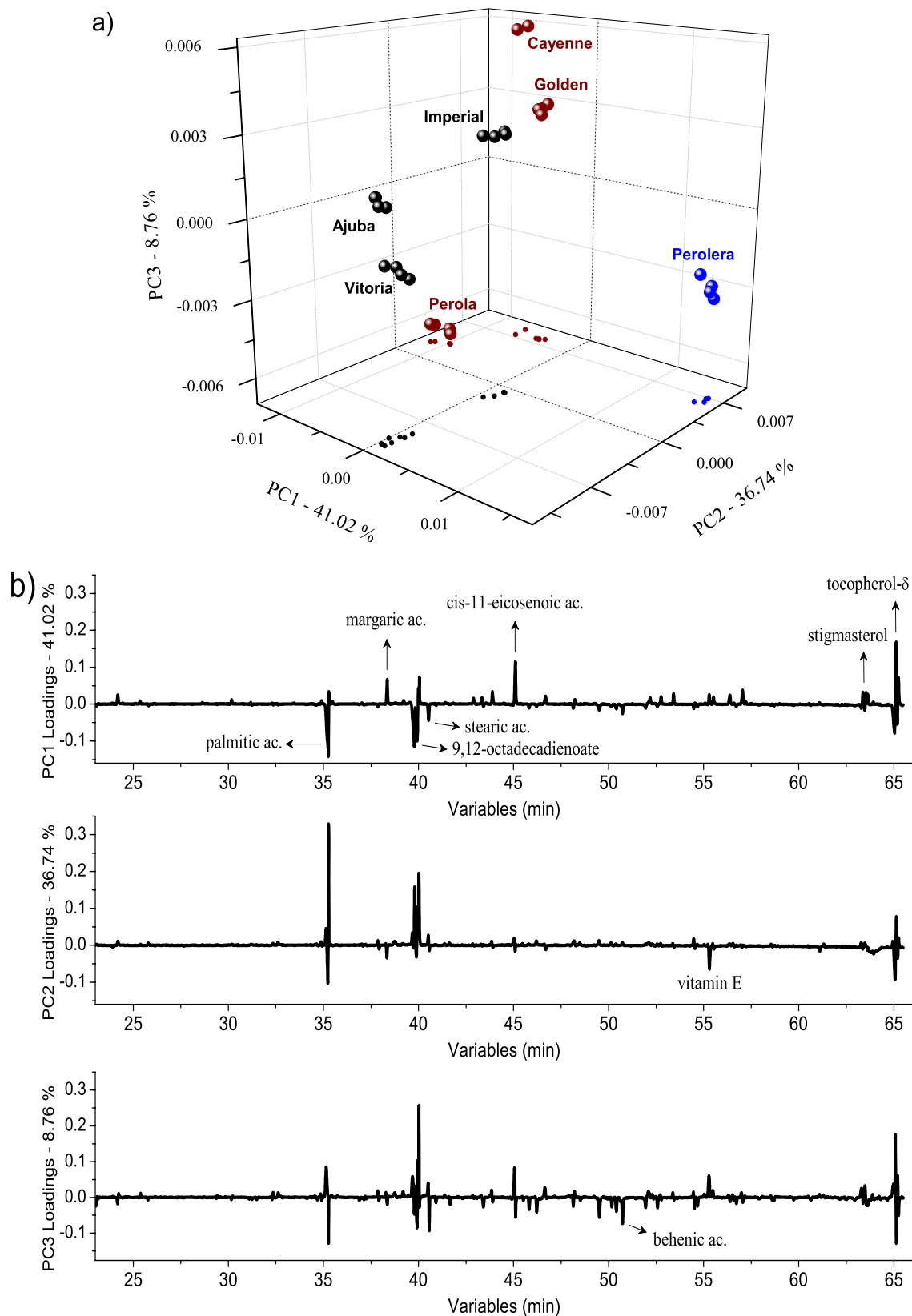
margaric acid (38.03 min), *cis*-11-eicosenoic acid (45.02 min), vitamin E (55.46 min), stigmasterol (64.03 min), and δ -tocopherol (65.35 min) in leaves from the Ajuba, Imperial and Vitoria cultivars. Additionally, the PC2 axis highlighted higher amounts of palmitic acid and 9,12-octadecadienoate in Cayenne, Golden, Perola and Perolera leaves than in Ajuba, Imperial and Vitoria. Therefore, the compounds palmitic acid and 9,12-octadecadienoate may be related as potential markers for cytotoxic activities against the HCT-116, PC3, SNB19, MCF-7, and HeLa cell lines, but not the L929 cell line.

Figura 28 - Dendrogram representing chemical composition similarity relationships among leaves from different pineapple cultivars.



Source: AUTHOR, 2018.

Figura 29 - a) principal components 1 (PC1) vs. principal components 2 (PC2) vs. principal components 3 (PC3) score coordinate system for pineapple leaves from different cultivars; b) respective loadings plotted in line form.



Source: AUTHOR, 2018.

Although only the Vitoria cultivar showed cytotoxic activity against the HL60 cell line (Table 10), the Ajuba and Perolera cultivars also presented high activity, indicating that other compounds such as margaric acid, *cis*-11-eicosenoic acid, vitamin E, stigmasterol, and δ -tocopherol. An earlier study showed that the compound stigmasterol isolated from *Passiflora mucronata* decreased the number of cells in the B16F10 line in the G1/G0 phase and subsequently increased the cell number in the sub-G1 phase, presumably indicating apoptosis as a possible mode of cell death (DA SILVA et al., 2018).

3.4 Regression analysis based on cytotoxic activities

The cytotoxic activities (Table 10) were used as categorical variables (Y column) for regression analysis by the PLS method. Seven classification models were created to correlate the chemical variability of the hexane extracts from pineapple leaves with their cytotoxicity in order to identify biomarker compounds. In general, the statistical parameters used to assess the quality of the calibration models (Table 12) indicated that all the models were well-adjusted with three Latent Variables (LV), principally the models for the HCT-116, HL60, SNB19, and L929 cell lines, based on the low values of SEC (Standard Error of Calibration) and SEV (Standard Error of Cross Validation) (FREITAS et al., 2018; WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001), the proximity (similarity) between SEC and SEV values, and the high correlation coefficients (R^2). These models corroborated the strongest relationship between the compounds palmitic acid and 9,12-octadecadienoic acid and cytotoxicity (except for HL60 - leukemia), which supports them as marker compounds, as well as the positive relationship between vitamin E and lower cytotoxic activity against non-tumor cells. Niso-Santano et al. (2015) reported that palmitic acid stimulates a canonical pathway of autophagy (NISO-SANTANO et al., 2015) and activation of caspase and apoptosis owing to the triggering of mitochondrial or lysosomal permeabilization (LI et al., 2008).

The Golden cultivar inhibited the highest number of tumor cell lines (five), followed by Cayenne and Perola (four) (Table 10). These pineapple cultivars presented higher amounts of palmitic acid and 9,12-octadecadienoic acid, but also a larger effect against non-tumor cells (high cytotoxicity).

Tabela 12 - Statistical parameters obtained by multivariate calibration using PLS regression for each cytotoxic activity.

Model	LV1+LV2+LV3^a (%)	R² cal^b	SEC^c	R² val^d	SEV^e	SEC/SEV^f
HCT-116 (colon)	97.07	0.971	2.801	0.961	3.372	0.83
HL60 (leukemia)	98.29	0.983	1.938	0.975	2.442	0.79
PC3 (prostate)	84.58	0.946	0.130	0.894	0.188	0.69
SNB19 (astrocytoma)	97.94	0.979	2.784	0.968	3.605	0.77
MCF-7 (breast)	95.37	0.954	4.363	0.941	5.116	0.85
HeLa (cervix)	93.93	0.939	4.129	0.908	5.292	0.78
L929 (non-tumor)	99.62	0.996	1.069	0.994	1.378	0.78

^a Total variance percent in the X matrix refers to three Latent Variables (LV1+LV2+LV3).

^b Coefficient of correlation between the real concentration and the concentration predicted during the calibration (R² cal).

^c Standard Error of Calibration (SEC).

^d Coefficient of correlation between the real concentration and the concentration predicted during the validation (R² val).

^e Standard Error of Cross Validation (SEV).

^f Similarity criterion (SEC/SEV).

Source: AUTHOR, 2018.

On the other hand, Ajuba, Imperial, and Vitoria presented lower amounts of the two aforementioned compounds along with margaric acid, *cis*-11-eicosenoic acid, vitamin E, and δ -tocopherol, and showed lower cell proliferation inhibition against two, two, and three cell lines (Table 10), respectively, as well as a lesser effect against non-tumor cells (low cytotoxicity).

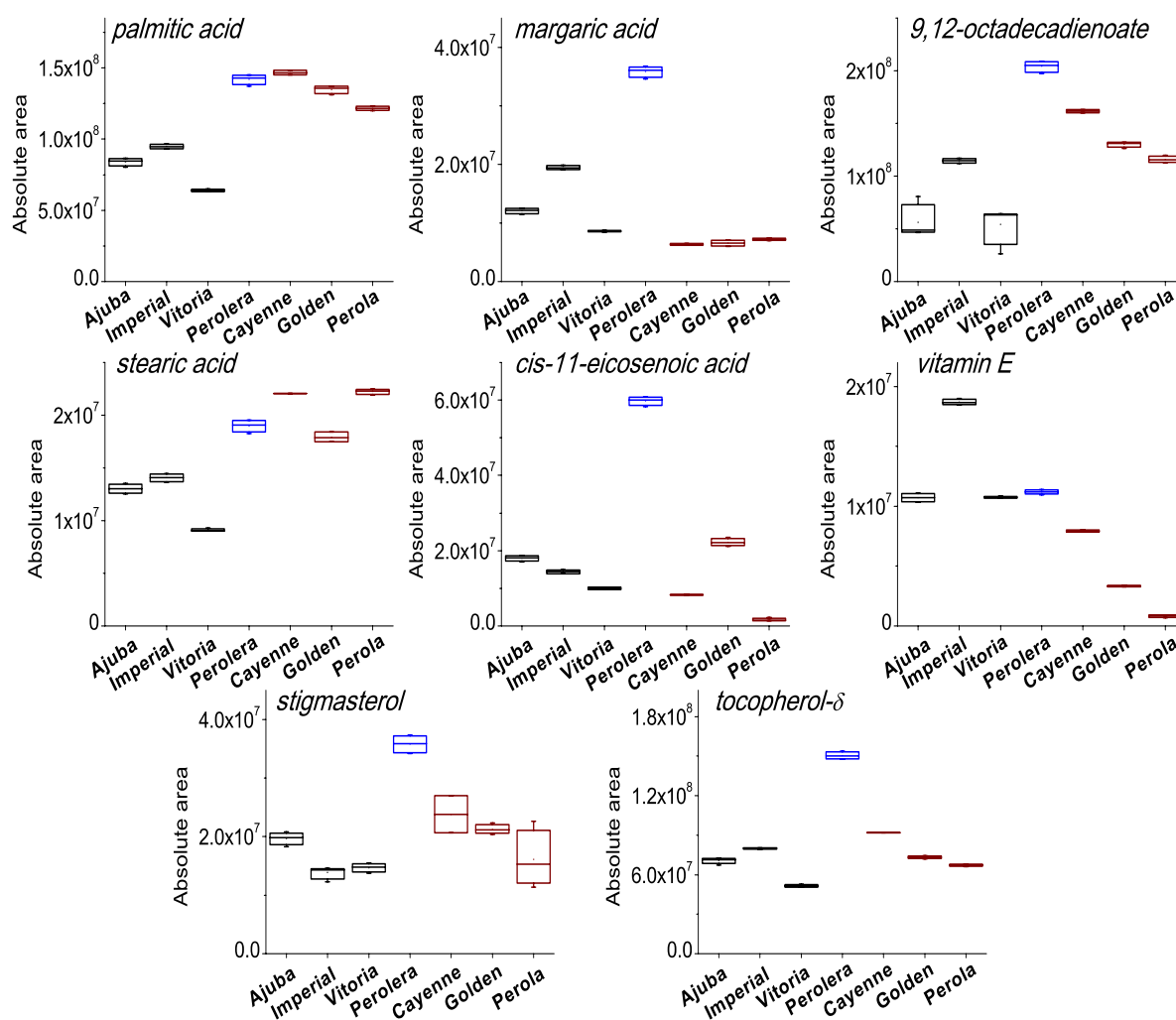
Fatty acids play a structural role in cell membranes, influencing the fluidity and enzymatic activity of the membrane, and play an important role in many physiological and pathological physiological pathways (COVIELLO et al., 2014). Fatty acid analogues promote cell death in breast cancer cells (MDA-MB-231), and the further development of carboxylate-modified analogs could lead to potential anticancer agents (KOOLAJI et al., 2018).

Although the leaves from Perolera showed the highest cell proliferation inhibitory effects (for five cell lines), they showed low cytotoxicity in non-tumor cells. In the PLS results, leaves from Perolera clustered with those of Ajuba, Imperial, and Vitoria (lower proliferation inhibition and low cytotoxicity in L929) for the HCT-116, HL60, and PC3 tests. However, for the SNB19, MCF-7, and HeLa tests, leaves from Perolera clustered with those from Golden, Cayenne, and Perola, with high proliferation inhibition and low selectivity. As result, this clustering variation of the Perolera leaves between the two main groups indicates that the presence of margaric acid, *cis*-11-eicosenoic acid, vitamin E, stigmasterol, and δ -tocopherol decrease its proliferation inhibition effect against non-tumor cells. There is evidence of the antitumor response and anti-inflammatory activity of metabolites of vitamin E analogues (ZINGG, 2007). Mazzini et al., 2009 in order to obtain more data on the structural requirements for antitumor properties of vitamin E analogues, studied the therapeutic activity of garcinic acid and verified the anti-proliferative effect of garcinic acid and some of its derivatives on the C6 glioma cancer cell line.

As noted in the chemometric results, typical chemical compounds present in pineapple leaves changed according to cultivar and cytotoxic activity. Therefore, the important compounds in the chemometric evaluation with no overlapped signals in chromatograms were semi-quantified and expressed as an absolute area (Figure 30). In general, the semi-quantitative results presented lower amounts of palmitic acid, stearic acid, and 9,12-octadecadienoate in leaves from Ajuba, Imperial, and Vitoria (in black color), as well as higher amounts of margaric acid, *cis*-11-eicosenoic acid, vitamin E, stigmasterol, and δ -tocopherol in leaves from Perolera, which supports their

positive effect against non-tumor cells in the reduction of cytotoxicity. The similarities observed in the results of the semi-quantitative analysis and chemometric evaluation were important because they corroborate each other, showing that similar results can be obtained by either approach.

Figure 30 - Variation in the absolute area of the chemical compounds according to pineapple cultivars, with the same colors illustrated in the score graph (Figure 29a).



Source: AUTHOR, 2018.

4 Conclusions

The hexanic extracts from seven cultivars of pineapple leaves inhibited tumor cell growth between 34.17 and 97.69%. In the non-tumor cell line (L929), extracts from Ajuba, Imperial, Perolera, and Vitoria presented low cytotoxicity. Therefore, these extracts are promising for *in vivo* studies.

Through GC-MS, it was possible to analyze and identify 27 different chemical compounds in the seven different cultivars of pineapple leaves. The association between the chemical profile and the multivariate analysis was extremely important in verifying the differences inherent to the seven cultivars. This made it possible to reduce the data set without losing the quality of the results, allowing a better understanding of the findings. Through HCA, we verified the grouping of the samples into three clusters.

Through analysis of the PCA graph, the presence of clusters between the samples was also verified. However, joint evaluation of the chemical profile and cytotoxic and multivariate analysis data revealed palmitic acid and 9,12-octadecadienoate compounds as potential markers for cytotoxic activity against the HCT-116, PC3, SNB19, MCF-7, and HeLa cell lines, but not the L929 cell line. In this study, information was generated on the chemical and biological profiles related to pineapple leaves, which are a voluminous and important agroindustrial residue, in this way the data contribute to the possibility of using and valuing this previously discarded residue.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), National Institute of Science and Technology - INCT BioNat, grant # 465637/2014-0, Brazil. The authors are grateful to CNPq for the financial support and scholarships (303791/2016-0). We also thank Embrapa (SEG 03.14.01.012.00.00).

7 CONCLUSÕES

Os extratos hexânicos das folhas de umbuzeiro apresentaram maiores atividades que os extratos da cajazeira, contra todas as linhagens tumorais testadas. No entanto, o extrato hexânico das folhas do umbuzeiro apresentou baixa seletividade entre as linhagens tumorais e não tumorais, sendo, portanto, inviável. Por sua vez, o extrato da cajazeira inibiu 75,28% do crescimento celular da linhagem prostática e mostrou boa seletividade entre células tumorais e não tumorais, apresentando-se promissor para futuros estudos.

Um total de vinte e três diferentes compostos orgânicos foram identificados nos extratos hexânicos das folhas de cajazeira e umbuzeiro. Através da associação da identificação química com as ferramentas quimiométricas foi possível verificar algumas semelhanças e peculiaridades entre os extratos hexânicos das espécies estudadas. Neste contexto, foi possível estabelecer os marcadores químicos que distinguem os extratos das folhas da cajazeira (esqualeno, ácido tricosanoico, δ -tocoferol, ácido beênico e ácido tetracosanoico) e do umbuzeiro (ácido mirístico, ácido *cis*-9-hexadecenoico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido 9,12,15-octadecatrienoico e ácido esteárico), que podem estar associados à atividade citotóxica observada.

Considerando que os dados sobre citotoxicidade para estas espécies são escassos na literatura, este trabalho acrescenta valor medicinal às espécies estudadas. Estes dados sugerem que as folhas do umbuzeiro e da cajazeira são suplementos potencialmente importantes para a vida diária, não apenas devido ao seu conteúdo nutricional, mas também como um potente redutor natural no risco de câncer. Diante disso, esses dados sugerem que esses extratos são suplementos nutricionais potencialmente importantes na indústria farmacêutica e agroindustrial, com vistas a explorar um coproduto praticamente inexplorado.

Os extratos hidroalcoólicos das folhas de cajazeira e umbuzeiros foram analisados por meio da técnica UPLC-ESI-QTOF-MS^E, desse modo, foi possível conceber a identificação tentativa de um total de 43 compostos, estabelecendo assim um perfil químico. Além disso, é importante mencionar que alguns compostos determinados no presente trabalho foram descritos pela primeira vez nas folhas de cajazeira e umbuzeiro. Portanto, a presente pesquisa apresenta-se como uma grande fonte de informação para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Os métodos quimiométricos (PCA, OPLS-DA e S-Plot) foram essenciais para identificar as diferenças inerentes ao perfil metabólico das folhas. Além disso, esses métodos ajudaram a identificar os marcadores químicos (ácido clorogênico, geraniina, corilagina, galoil-bis-HHPD-glicose, rutina, miricetina-3-O-ramnosídeo e kaempferol desoxihexosil hexosídeo) responsáveis por caracterizar e discriminar amostras de *S. tuberosa* e *S. mombin*.

Em relação aos testes de citotoxicidade, foi possível observar que os extratos das folhas de cajazeira apresentaram melhor atividade contra a linhagem leucêmica e melanoma, além disso, ainda é observado que o extrato apresenta baixa toxicidade frente à linhagem não tumoral. Essa atividade citotóxica provavelmente está associada aos marcadores químicos, tendo em vista que eles são responsáveis por distinguir as amostras das folhas de cajazeira e umbuzeiro, além disso, os marcadores químicos determinados possuem diversas propriedades farmacológicas já mencionadas na literatura.

Os extratos hexânicos das sete cultivares das folhas do abacaxizeiro inibiram o crescimento de células tumorais. Na linhagem celular não tumoral (L929), os extratos de Ajubá, Imperial, Perolera e Vitória apresentaram baixa citotoxicidade.

Através das análises via GC-MS, foi possível identificar 27 compostos químicos distintos nas sete diferentes cultivares de folhas de abacaxi. A associação entre o perfil químico e a análise multivariada foi de extrema importância na verificação das diferenças inerentes às sete cultivares. Através da HCA, verificamos o agrupamento das amostras em três clusters.

Nas análises de PCA, também foram observados clusters entre as amostras. No entanto, a avaliação conjunta do perfil químico e dados de análise citotóxica e multivariada revelaram ácido palmítico e 9,12-octadecadienoato como potenciais marcadores de atividade citotóxica contra as linhagens celulares HCT-116, PC3, SNB19, MCF-7 e HeLa. Neste estudo, foram geradas informações sobre os perfis químicos e biológicos relacionados às folhas de abacaxizeiro, que são um resíduo agroindustrial volumoso e importante, contribuindo para a possibilidade de utilização e valoração desse resíduo previamente descartado.

REFERÊNCIAS

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 494–497, set. 1999.
- ABRAHAM, A. et al. Vitamin E and its anticancer effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 01-23, maio 2018.
- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 166, p. 179–191, 2015.
- ACCIOLY, M. P. et al. Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 187, n. 1–2, p. 79–84, jun. 2012.
- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies *in vitro* and *in vivo*. **Tropical animal health and production**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 223–235, 2005.
- AGRA, M. DE F.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 114–140, mar. 2007.
- AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. Antibacterial Effect of Aqueous and Alcohol Extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia* - Two Local Antimicrobial Remedies. **International Journal of Crude Drug Research**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 67–72, 27 jan. 1985.
- AL-QUDAH, M. A. et al. Composition, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from Fresh and Air-Dried Aerial Parts of *Pallenis spinosa*. **Chemistry & Biodiversity**, [s.l.], v. 14, n. 8, 2017.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. D. H. C.; SILVA, A. C. O. DE. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 27–38, 2005.
- ALMEIDA, A. L. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; CASTRO, C. C. Reproductive biology of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), an endemic fructiferous species of the caatinga (dry forest), under different management conditions in northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, [s.l.], v. 75, n. 4, p. 330–337, 2011.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International journal**, [s.l.], v. 44, p. 2155–2159, 2011.
- ANTTONEN, M. J.; KARJALAINEN, R. O. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. **Journal of Food Composition and Analysis**,

[s.l.], v. 18, n. 8, p. 759–769, dez. 2005.

ARAÚJO, A. R. S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, 2012.

ASUQUO, O. R. et al. Comparative study of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Spondias mombin* on neurobehaviour in male rats. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 29–35, 2013.

AYOKA, A. O. et al. Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal Tradicional, complementary and alternative medicine**, [s.l.], v. 2, p. 153–155, 2005.

AYOKA, A. O. et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 103, n. 2, p. 166–75, jan. 2006.

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

BACHELIER, J. B.; ENDRESS, P. K. Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoecium structure and evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 159, n. 4, p. 499–571, abr. 2009.

BAGALKOTKAR, G. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l.], v. 58, n. 12, p. 1559–1570, 2006.

BARBOSA, H. DE M. et al. *Spondias tuberosa* inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 227, p. 248–257, dez. 2018.

BARBOSA, H. M. et al. Acute Toxicity and Cytotoxicity Effect of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark: Hematological, Biochemical and Histopathological Evaluation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 88, n. 3, p. 1993–2004, 2016.

BARONE, V.; COSSI, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. **The Journal of Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 102, n. 11, p. 1995–2001, mar. 1998.

BATAGLION, G. A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 180, p. 280–287, ago. 2015.

BAZZANO, L. A. **Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases**. kobe: Background paper of the joint FAO/WHO work shop on Fruit and Vegetables for health, 2005.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A Practical Guide**. 1. ed. [s.l.] Wiley-Interscience, 1998.

BELTRÁN, G. et al. Squalene in virgin olive oil: Screening of variability in olive cultivars. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s.l.], v. 118, n. 8, p. 1250–1253, ago. 2016.

BITANGE, N. T. et al. Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain): A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 513–520, 2008.

BOCCARD, J.; RUTLEDGE, D. N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 769, p. 30–39, 2013.

BODE, B. M.; GORDON, M. S. Macmolplt: a graphical user interface for GAMESS. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 133–138, jun. 1998.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Turning Metabolomics into Drug Discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 27, n. 8, p. 1334–1338, 2016.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 6, n. 9, p. 2812–2831, 2014.

BUI, D. T. et al. Multifunctional squalene-based prodrug nanoparticles for targeted cancer therapy. **Chem. Commun.**, [s.l.], v. 50, n. 40, p. 5336–5338, abr. 2014.

BURKILL, H. M. **The Useful Plants of West Tropical Africa**. Vol. 3. 2 ed. London: Royal Botanic Gardens, 1995.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.

BYLESJÖ, M. et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**, [s.l.], v. 20, n. 8–10, p. 341–351, ago. 2006.

CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 304–311, 2016.

CANUTO, G. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials, in the southeastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 186–188, 2004.

CARVALHO-SILVA, L. B. DE et al. Antiproliferative, antimutagenic and antioxidant activities of a Brazilian tropical fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 1319–1324, dez. 2014.

CATHCART, D. J. The importance of maintaining bromeliad imports. **Florida Entomologist**, [s.l.], v. 78, n. 1, p. 16–21, 1995.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. **Metabolites**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015.

CHAI, J.-D.; HEAD-GORDON, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s.l.], v. 10, n. 44, p. 6615, 2008.

CHIN, Y.-W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. E239–E253, jun. 2006.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A. B.; MAJID, F. A. A. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. **Cancer letters**, [s.l.], v. 290, n. 2, p. 148–56, abr. 2010.

CICHOCKI, M.; BLUMCZYŃSKA, J.; BAER-DUBOWSKA, W. Naturally occurring phenolic acids inhibit 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced NF-kappaB, iNOS and COX-2 activation in mouse epidermis. **Toxicology**, [s.l.], v. 268, n. 1–2, p. 118–24, jan. 2010.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 481–487, abr. 2007.

CORREIA, S. D. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 6, p. 1287–1300, 2006.

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

CORTHOUT, J. et al. Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 31, n. 6, p. 1979–1981, 1992.

COSSI, M. et al. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. **Chemical Physics Letters**, [s.l.], v. 255, n. 4–6, p. 327–335, jun. 1996.

COVIELLO, G. et al. Erythrocyte membrane fatty acids profile in colorectal cancer patients: A preliminary study. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 34, n. 9, p. 4775–4779, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n.

6, p. 3670–3695, jun. 2013.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Chennai: Blackwell Publishing, 2006.

CSEKE, L. J. et al. **Natural Products from Plants**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.

CUNHA, A. G. et al. UPLC-qTOF-MS/MS-based phenolic profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) maturation stages. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 1051, p. 24–32, 2017.

DA SILVA, I. C. V. et al. Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and antioxidant activity of an enriched flavonoid extract and from *Passiflora mucronata*. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, 15 mar. 2018.

DANIYAL, M.; AKRAM, M. Antifertility activity of medicinal plants. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s.l.], v. 78, n. 7, p. 382–388, jul. 2015.

DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 114, n. 3, p. 325–354, dez. 2007.

DE SOUSA ARAÚJO, T. A. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 120, n. 1, p. 72–80, out. 2008.

DETTMER-WILDE, K.; ENGEWALD, W. **Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference**. London: Springer, 2014.

DORTA, E. et al. 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**, [s.l.], v. 57, p. 51–60, 2014.

DOU, J. et al. Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 18, p. 7462–7468, set. 2007.

EL-HALAWANY, A. M.; OSMAN, S. M.; ABDALLAH, H. M. Cytotoxic constituents from *Vicia monantha* subsp. *monantha* seeds. **Natural Product Research**, p. 1–4, 7 fev. 2018.

EL-NABI, S. E.-S. H. et al. HPLC analysis of phenolic acids, antioxidant activity and *in vitro* effectiveness of green and roasted *Coffea arabica* bean extracts: a comparative study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, 24 jan. 2018.

ELUFIOYE, T. et al. Anticholinesterase constituents from the leaves of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Biologics: Targets and Therapy**, [s.l.], v. Volume 11, p. 107–114, ago. 2017.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. **Adubação N-P-K para o abacaxizeiro 'BRS Imperial' para o Extremo Sul da Bahia**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2617/adubacao-n-p-k-para-o-abacaxizeiro-brs-imperial-para-o-extremo-sul-da-bahia>. Acesso em: 13 ago. 2018.

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

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

FAGUNDES, N. S.; FAGUNDES, N. S. Restos Culturais Do Abacaxizeiro Na Alimentação De Ruminantes. **Revista eletrônica**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 1243–1247, 2010.

FARAG, M. A. et al. Metabolomic fingerprints of 21 date palm fruit varieties from Egypt using UPLC/PDA/ESI–qTOF-MS and GC–MS analyzed by chemometrics. **Food Research International**, [s.l.], v. 64, p. 218–226, out. 2014.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 120–130, 2017.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FIEHN, O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. **Comparative and Functional Genomics**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 155–168, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FORCISI, S. et al. Liquid chromatography – mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1292, p. 51–65, 2013.

FORINO, M. et al. (1S,3R,4S,5R)5-O-Caffeoylquinic acid: Isolation, stereo-structure characterization and biological activity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 178, p. 306–310, 2015.

FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from

camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 139, n. 1–4, p. 578–588, 2013.

FREITAS, J. V. B. et al. Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of *Ocimum*. **Talanta**, [s.l.], v. 180, p. 329–336, 2018.

Fruits of Colombia: *Spondias mombin*. Disponível em: <http://www.latin-wife.com/blog/colombia/spondias-mombin/>. Acesso em: 13 ago. 2018.

FUKUI, K. et al. Molecular Orbital Theory of Orientation in Aromatic, Heteroaromatic, and Other Conjugated Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 22, n. 8, p. 1433–1442, ago. 1954.

FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; SHINGU, H. A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons. **The Journal of Chemical Physics**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 722–725, abr. 1952.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant Metabolomics: Potential for Practical Operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s.l.], v. 100, n. 4, p. 347–354, 2005.

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

GAFORIO, J. J. et al. Molecular Aspects of Squalene and Implications for Olive Oil and the Mediterranean Diet. In: **The Mediterranean Diet**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 281–290.

GOMES, E. D. B. et al. A Rapid Method for Determination of Some Phenolic Acids in Brazilian Tropical Fruits of Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**, [s.l.], v. 03, n. 03, p. 1–10, 2013.

GOMES, M. R. et al. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 262–266, out. 2005.

GONÇALVES, A. E. D. S. S.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M. I. S. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 2010.

GOUVÊA, R. F. et al. Effect of enzymatic treatment on the rheological behavior and vitamin C content of *Spondias tuberosa* (umbu) pulp. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 54, n. 7, p. 2176–2180, 24 jun. 2017.

GUEDES, J. A. C. et al. Metabolic profile and cytotoxicity of non-polar extracts of pineapple leaves and chemometric analysis of different pineapple cultivars. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 124, n. August, p. 466–474, nov. 2018.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. 536–544, 2003.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 139, n. 3, p. 838–57, fev. 2012.

HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of Carotenoids from Commercial Products of Caja (*Spondias lutea*). **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 335–343, 2001.

HANHINEVA, K. et al. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) flowers. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 69, n. 13, p. 2463–2481, 2008.

HARADA, G. et al. Delphinidin-3-glucoside suppresses lipid accumulation in HepG2 cells. **Cytotechnology**, 28 ago. 2018.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products from plants. In: WALTON, N. J.; BROWN, D. E. (Eds.). **Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products**. London: World Scientific / Imperial College Press, 1999. p. 1–25.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 205–215, 1996.

HEBER, D. et al. **Nutritional Oncology**. 2. ed. London: Academic Press publications, 2006.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of Educational Psychology**, [s.l.], v. 24, n. 6, p. 417–441, 1933.

HU, C.; XU, G. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 52, p. 36–46, dez. 2013.

HUANG, H. et al. Potent inhibitory effect of δ -tocopherol on prostate cancer cells cultured *in vitro* and grown as xenograft tumors *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 44, p. 10752–10758, nov. 2014.

IGWE, C. U. et al. Evaluation of the chemical compositions of the leaf of *Spondias mombin* L. from Nigeria. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 706–710, 2010.

JIANG, Y. et al. Analytica Chimica Acta Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 657, n. 1, p. 9–18, 2010.

KALAISELVI, M. et al. Evaluation of Antioxidant Potential and Fourier Transform

Infrared Spectroscopy Analysis of *Ananus Comosus* (L.) Merrill Peel. [s.l.], v. 3, n. 2, p. 237–242, 2012.

KALRA, N. et al. Regulation of p53, nuclear factor κ B and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 226, n. 1, p. 30–37, jan. 2008.

KAPLAN, M. et al. Can Behenic Acid (C22:0) Levels be a Prognostic Factor in Glial Tumors? **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, [s.l.], v. 40, n. 06, p. 854–856, 23 nov. 2013.

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. **Food and Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 90, n. 3, p. 385–391, jul. 2012.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 6, p. 267–275, 2011.

KIM, S. et al. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 4 jan. 2016.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y.-W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current opinion in drug discovery & development**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 189–196, 2009.

KLEIN, D. **Química Orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

KOOLAJI, N. et al. Carboxylate Analogues of Aryl-Urea-Substituted Fatty Acids That Target the Mitochondria in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells to Promote Cell Death. **ChemMedChem**, [s.l.], v. 13, n. 10, p. 1036–1043, 23 maio 2018.

KOTELEVETS, L. et al. A Squalene-Based Nanomedicine for Oral Treatment of Colon Cancer. **Cancer Research**, [s.l.], v. 77, n. 11, p. 2964–2975, jun. 2017.

KRASTANOV, A. Metabolomics-The State of Art. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 1537–1543, 2010.

KUMAR, S. et al. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 69, p. 143–152, 2015.

LANDETE, J. M. Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 53, n. 7, p. 706–721, jan. 2013.

LEA, M. A. et al. Inhibition of growth and induction of differentiation of colon cancer cells by peach and plum phenolic compounds. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 28, n. 4 B, p. 2067–2076, 2008.

- LEE, J.-C. et al. Geraniin-mediated apoptosis by cleavage of focal adhesion kinase through up-regulation of Fas ligand expression in human melanoma cells. **Molecular nutrition & food research**, [s.l.], v. 52, n. 6, p. 655–663, 2008.
- LI, J. et al. Geraniin induces apoptotic cell death in human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [s.l.], v. 91, n. 12, p. 1016–1024, dez. 2013.
- LI, J. et al. Identification of chemical composition of leaves and flowers from *Paeonia rockii* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 7, 2016.
- LI, Z. et al. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. **Hepatology**, [s.l.], v. 47, n. 5, p. 1495–1503, 2008.
- LIMA, M. A. C.; SILVA, S. DE M.; OLIVEIRA, V. R. Umbu — *Spondias tuberosa*. In: **Exotic Fruits**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 427–433.
- LINS NETO, E. M. F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): An Endemic Species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Economic botany**, [s.l.], v. 64, p. 11–21, 2010.
- LOPES, P. C. et al. Determinação do teor de proteínas totais e da atividade proteolítica de resíduos agroindustriais do processamento de frutos do abacaxizeiro (*Ananas comosus* var . *comosus*) cv . Pérola. [s.l.], v. 9, p. 1–6, 2013.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Plantarum, 2008.
- LOZANO-GRANDE, M. A. et al. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. **International Journal of Agronomy**, [s.l.], v. 2018, p. 1–13, ago. 2018.
- MA, C. et al. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1165, p. 39–44, 2007.
- MACÊDO, L. A. R. DE O. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities and evaluation of cytotoxicity of the fractions obtained from *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 506–512, 2018.
- MALDONADO-ASTUDILLO, Y. I. et al. Postharvest physiology and technology of *Spondias purpurea* L. and *S. mombin* L. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 174, p. 193–206, jul. 2014.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 79, p. 727–747, 2004.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I.

Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 81, n. 1, p. 230S–242S, 1 jan. 2005.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JR., A. Metabólitos secundários da família bromeliaceae. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 7, p. 1885–1897, 2009.

MAO, Q. et al. Discrimination of leaves of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* by ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 97, p. 129–140, 2014.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Chemical characterization of lignin and lipophilic fractions from leaf fibers of curaua (*Ananas erectifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 4, p. 1327–1336, 2007.

MATTIETTO, R. A.; MATTA, V. M. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2011.

MAZZINI, F. et al. Configuration of the vitamin E analogue garcinoic acid extracted from *Garcinia kola* seeds. **Chirality**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 519–524, maio 2009.

MCMURRY, J. **Química Orgânica - Combo**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

MEYSKENS, F. L.; SZABO, E. Diet and Cancer: The Disconnect Between Epidemiology and Randomized Clinical Trials. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 14, n. 6, p. 1366–1370, 2005.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 10, p. 4769–4807, out. 2011.

MOCO, S. et al. Metabolomics technologies and metabolite identification. **Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 9, p. 855–866, 2007.

MOORE, C. A. et al. Precision prostate cancer chemoprevention with gamma-tocotrienol. **Journal of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 35, n. 15, 20 maio 2017.

MORADI-AFRAPOLI, F. et al. Cytotoxic activity of abietane diterpenoids from roots of *Salvia sahendica* by HPLC-based activity profiling. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 27–33, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOYER, R. A. I. A. M. et al. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 3, p. 519–525, 2002.

MURRAY, M. et al. Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 150, p. 109–128, jun. 2015.

NÁRAY-SZABÓ, G.; WARSHEL, A. **Computational Approaches to Biochemical Reactivity**. Netherlands: Springer Science & Business Media, 2006. v. 19.

NAUSHAD, M.; KHAN, M. R. **Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2014.

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

NEIENS, S. D.; GEIBLITZ, S. M.; STEINHAUS, M. Aroma-active compounds in *Spondias mombin* L. fruit pulp. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 243, n. 6, p. 1073–1081, 23 jun. 2017.

NETO, E. M. DE F. L. et al. Analysis of umbu (*Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae)) in different landscape management regimes. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s.l.], v. 184, n. 7, p. 4489–4499, 20 jul. 2012.

NETO, E. M. DE F. L.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): An Endemic Species from the Semi–Arid Region of Northeastern Brazil. **Economic Botany**, [s.l.], v. 64, n. 1, p. 11–21, 23 mar. 2010.

NEWMARK, H. L. Squalene, Olive Oil, and Cancer Risk: Review and Hypothesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s.l.], v. 889, p. 193–203, out. 1999.

NI, Y. et al. Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 582, n. 17, p. 2627–2636, 2008.

NISO-SANTANO, M. et al. Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy. **The EMBO Journal**, [s.l.], v. 34, n. 8, p. 1025–1041, 15 abr. 2015.

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

OLADIMEJI, A. O. et al. Identification and comparison of the volatile constituents of fresh and dried leaves of *Spondias mombin* found in North-central Nigeria: *in vitro* evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 54, n. 11, p. 2674–2678, 2016.

OLADUNMOYE, M. K. Comparative evaluation of the effects of leaf extract from *Spondias mombin* on rats with induced infections from *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes*. **Research Journal of Phytochemistry**, [s.l.], v. 1, p. 68–73,

2007.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 170–179, ago. 2012.

OLIVER, S. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 9, p. 373–378, 1 set. 1998.

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

OYEYEMI, I. T. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity study of aqueous and hydro-methanol extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrical* L. using animal bioassays. **Interdisciplinary Toxicology**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 184–192, 2015.

PAVAN, R. et al. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. **Biotechnology Research International**, [s.l.], v. 2012, p. 1–6, 2012.

PERAMO, A. et al. Squalene versus cholesterol: Which is the best nanocarrier for the delivery to cells of the anticancer drug gemcitabine? **Comptes Rendus Chimie**, mar. 2018.

PERERA, A.; TON, S. H.; PALANISAMY, U. D. Perspectives on geraniin, a multifunctional natural bioactive compound. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 243–257, 2015.

PESSOA, C. et al. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. In: KHAN, M. T. H.; ATHER, A. (Eds.). . **Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Science, 2006. v. 2p. 197–211.

PINHEIRO, S. et al. Phytochemical screening and evaluation of cytotoxicity of stem bark extracts of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysoarpa* (Annonaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 793–798, 2016.

POULOSE, N. et al. Genetics of lipid metabolism in prostate cancer. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 50, n. 2, p. 169–171, fev. 2018.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 98, n. 4, p. 991–1000, abr. 2005a.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Bioactive berry compounds? novel tools against human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 8–18, 2 abr. 2005b.

RANILLA, L. G. et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of

commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 101, n. 12, p. 4676–89, jun. 2010.

RAPPE, A. K. et al. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 114, n. 25, p. 10024–10035, dez. 1992.

REYES, M. M. D. L. et al. Cytotoxic Compounds from *Wrightia pubescens* (R.Br.). **Pharmacognosy Research**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 9–15, 2018.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 1–20, jan. 1994.

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, [s.l.], v. 44, n. 7, p. 2072–2075, 2011.

RUFINO, S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SAHA, D. et al. The role of solvent swelling in the self-assembly of squalene based nanomedicines. **Soft Matter**, [s.l.], v. 11, n. 21, p. 4173–4179, maio 2015.

SAMEH, S. et al. Genus *Spondias*: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2018, p. 1–13, 2018.

SAMPAIO, T. I. DOS S. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 224, p. 563–578, out. 2018.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F. et al. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 481–489, jun. 2006.

SANTOS, P. A. et al. Chemical Study, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Oil Seeds of *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae). **International Journal of Fruit Science**, p. 1–12, jul. 2018.

SANTOS, S. C. et al. Utilização da silagem de restos culturais do abacaxizeiro em substituição à silagem de cana-de-açúcar na alimentação de ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 400–408, 2008.

SATO, C. et al. Combination Effect of δ -Tocotrienol and γ -Tocopherol on Prostate Cancer Cell Growth. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, [s.l.], v. 63, n. 5, p. 349–354, 2017.

SCHIEBER, A.; BERARDINI, N.; CARLE, R. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-

- performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 17, p. 5006–5011, 2003.
- SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 401–413, nov. 2001.
- SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 11, p. 1347–1363, nov. 1993.
- SENA NETO, A. R. et al. Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf fiber varieties for use in composites. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 529–537, 2013.
- SENA NETO, A. R. et al. Comparative study of 12 pineapple leaf fiber varieties for use as mechanical reinforcement in polymer composites. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 64, p. 68–78, fev. 2015.
- SENYILMAZ-TIEBE, D. et al. Dietary stearic acid regulates mitochondria *in vivo* in humans. **Nature Communications**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 3129, 7 dez. 2018.
- SERRANO, J. et al. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s.l.], v. 53, p. 310–329, 2009.
- SHARMA, P. et al. Study on the phytochemical properties of pineapple fruit leather processed by extrusion cooking. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 72, p. 534–543, 2016.
- SILVA, A. R. A. et al. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 406–413, 2011.
- SILVA, B. M. et al. Genetic diversity of Cajazeira (*Spondias mombin* L.) in three geographic regions. **Genetics and Molecular Research**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 16018946, 2017.
- SILVA, J. G. A. et al. Chemical Profile and Cytotoxic Activity of Leaf Extracts from *Senna* spp. from Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 27, n. 10, p. 1872–1880, 2016a.
- SILVA, L. M. A et al. ¹H HRMAS NMR spectroscopy and chemometrics for evaluation of metabolic changes in *citrus sinensis* caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 23, n. 6, p. 1054–1061, jun. 2012.
- SILVA, R. V. et al. *In vitro* photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 83, p. 509–514, 2016b.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

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

SOUSA, A. D. et al. UPLC-QTOF-MSE-based chemometric approach driving the choice of the best extraction process for *Phyllanthus niruri*. **Separation Science and Technology**, [s.l.], v. 52, n. 10, p. 1696–1706, 3 jul. 2017.

SOUSA, G. M. DE; WANDERLEY, M. DAS G. L. *Aechmea rodriguesiana* (L. B. Sm.) L. B. Sm. (Bromeliaceae) uma espécie endêmica da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 517–520, 2007.

SOUZA, E. H. DE et al. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [s.l.], v. 59, n. 7, p. 1357–1376, 2012.

SOUZA, E. H. DE et al. Selection and use recommendation in hybrids of ornamental pineapple. **Revista Ciencia Agronomica**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. 409–416, 2014.

SPACKMAN, M. A. Potential derived charges using a geodesic point selection scheme. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 1–18, 15 jan. 1996.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 62, p. 817–836, 2003.

SUSSULINI, A. **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. Cham: Springer, 2017. v. 965.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TATEWAKI, N. et al. Squalene Inhibits ATM-Dependent Signaling in γ IR-Induced DNA Damage Response through Induction of Wip1 Phosphatase. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, jan. 2016.

TEAI, T. et al. Volatile Compounds in Fresh Yellow Mombin Fruits (*Spondias mombin* L.) from French Polynesia. **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 368–372, jul. 2005.

TECHNICAL COMMITTEE ISO/TC 194. **ISO 10993-5: Biological evaluation of**

medical devices: part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:10993-5:ed-3:v1:en>. Acesso em: 29 nov. 2018.

THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 711, p. 7–16, 2012.

TIBERTI, L. A. et al. On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely Cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 100–105, 2007.

TIBURSKI, J. H. et al. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, [s.l.], v. 44, n. 7, p. 2326–2331, 2011.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l.], v. 80, n. 7, p. 1024–1032, 15 maio 2000.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 105, n. 8, p. 2999–3094, ago. 2005.

TRAORE, M. S. et al. *In Vitro* Antiprotozoal and Cytotoxic Activity of Ethnopharmacologically Selected Guinean Plants. **Planta Medica**, [s.l.], v. 80, n. 15, p. 1340–1344, 2014.

TYSNES, B. B. et al. Bromelain Reversibly Inhibits Invasive Properties of Glioma Cells. **Neoplasia**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 469–479, 2001.

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

VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 7, n. 142, p. 1–15, 2006.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 463–471, jan. 1963.

VANCSIK, T. et al. Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. **Journal of Cancer**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 41–53, 2018.

VEER, P. et al. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. **Public health nutrition**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 103–107, 2000.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 3–14, 2007.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Química Orgânica**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman,

2013. v. 3.

WANG, H.; HONG, J.; YANG, C. S. δ -Tocopherol inhibits receptor tyrosine kinase-induced AKT activation in prostate cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, [s.l.], v. 55, n. 11, p. 1728–1738, nov. 2016.

WANG, Y. et al. Geraniin inhibits migration and invasion of human osteosarcoma cancer cells through regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. **Anti-Cancer Drugs**, [s.l.], v. 28, n. 9, p. 959–966, 2017.

WANNAN, B. S. Analysis of Generic Relationships in Anacardiaceae. **Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 165–195, 10 maio 2006.

WESTERHUIS, J. A. et al. Multivariate paired data analysis: Multilevel PLS-DA versus OPLS-DA. **Metabolomics**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 119–128, 2010.

WICKI, A. et al. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 200, p. 138–157, fev. 2015.

WOLD, S.; SJOSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s.l.], v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001.

XIE, W. et al. The effects of *Ananas comosus* L. leaves on diabetic-dyslipidemic rats induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet. **The American journal of Chinese medicine**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 95–105, 2005.

XIE, W. et al. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 143, n. 4, p. 429–435, ago. 2006.

YEN, G. C. et al. Antioxidant activity and anticancer effect of ethanolic and aqueous extracts of the roots of *Ficus beecheyana* and their phenolic components. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 182–192, 2018.

YUAN, H. et al. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. **Horticulture Research**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 15036, 26 dez. 2015.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 293–304, 2013.

YURAWECZ, M. P. et al. Fatty Acid Composition and Antioxidant Properties of Cold-Pressed Marionberry, Boysenberry, Red Raspberry, and Blueberry Seed Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 3, p. 566–573, fev. 2005.

YUSOF, Y. et al. Producing Paper Using Pineapple Leaf Fiber. **Advanced Materials**

Research, [s.l.], v. 383–390, p. 3382–3386, 2011.

ZERAIK, M. L. et al. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 21, p. 396–405, 2016.

ZHAI, J.-W. et al. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 311–318, 2016.

ZHAO, Y. **Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007.

ZINGG, J.-M. Molecular and Cellular Activities of Vitamin E Analogues. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 545–560, 2007.