



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

LICIA DOS REIS LUZ

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE FOLHA,
GALHO E CASCA DE BARAÚNA: ABORDAGEM METABOLÔMICA E
QUIMIOMÉTRICA**

FORTALEZA

2019

LICIA DOS REIS LUZ

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE FOLHA,
GALHO E CASCA DE BARAÚNA: ABORDAGEM METABOLÔMICA E
QUIMIOMÉTRICA

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

Orientadora: Professora Dra. Helena Becker
Co-orientador: Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA

2019

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)

- L994p Luz, Licia dos Reis.
Perfil químico e atividade citotóxica dos extratos de folha, galho e casca de baraúna : abordagem
metabolômica e quimiométrica / Licia dos Reis Luz. – 2019.
85 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Helena Becker.
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.
1. Plantas medicinais. 2. Caatinga. 3. Desreplicação. 4. LC-MS. 5. Quimiometria. I. Título.
- CDD 540
-

LICIA DOS REIS LUZ

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE FOLHA,
GALHO E CASCA DE BARAÚNA: ABORDAGEM METABOLÔMICA E
QUIMIOMÉTRICA

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

Aprovada em: 06/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Helena Becker
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Dávila Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Deus por estar sempre comigo, me dando forças para seguir, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, Vlândia dos Reis Luz e Jocildo de Freitas Luz por tanto amor, cuidado, dedicação e pelo exemplo deles na minha vida. Aos meus irmãos, Davi, Lívinha e Vilocas por está sempre por perto, me apoiando e contribuindo da melhor forma. Além dos tios, primos que estão sempre presentes em minha vida.

A Professora Dra. Helena Becker por ter aceitado me orientar.

Ao meu orientador Dr. Guilherme Julião, que esteve sempre presente com todo apoio durante a realização deste trabalho, além de todo o incentivo à pesquisa.

Aos professores do programa de pós-graduação em química da UFC pelos valiosos ensinamentos.

À Embrapa pela oportunidade de desenvolver toda a pesquisa durante o mestrado.

A Prof.^a Dr^a Cláudia do Ó Pessoa e a doutoranda Maria Francilene que participaram da realização dos teste biológicos in vitro.

Ao Dr. Diogo por me conceder as amostras de baráúna para as análises.

Aos funcionários e aos alunos do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, pela enorme contribuição sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, Juliana, Caio e Amanda por estarem sempre ao meu lado durante todo a graduação e mestrado.

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

RESUMO

A baraúna, *Schinopsis brasiliensis*, é uma planta pertencente à flora brasileira, encontrada tipicamente no bioma caatinga. São relatados o uso de suas folhas e casca para o tratamento de diversas doenças como tosse, gripe, diarreia, inflamação da garganta e impotência sexual. No entanto, existe pouco conhecimento a respeito da comparação fingerprint metabólico das três partes da planta, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico. Um total de 44 compostos, incluindo isômeros, foram identificados nas amostras de folha, galho e casca, em que 16 compostos relatados pela primeira vez na espécie como corilagina e ácido clorogênico, através da cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas em alta resolução (UPLC-QTOF-MS^E). A análise de componentes principais (PCA) foi capaz de distinguir de maneira eficiente as diferenças metabolômicas entre cada seção da planta. A análise de discriminação de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) juntamente com o gráficos de S-Plot, VIP e Heatmap foram utilizados para identificar 23 compostos biomarcadores, que podem estar associados às melhores atividades citotóxicas desempenhadas pela folha e casca. A casca apresentou o menor valor de IC₅₀ para a linhagem SW-620, além dos melhores valores de índice de seletividade para diversas linhagens. Estes resultados demonstraram uma potencialidade significativa da planta que pode contribuir para a agregação de valor a esse ativo da biodiversidade.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Caatinga. Desreplicação. LC-MS. Quimiometria. Atividade citotóxica.

ABSTRACT

The baraúna, *Schinopsis brasiliensis*, is a plant belonging to the Brazilian flora, typically found in the caatinga biome. The use of its leaves and bark for the treatment of various health dysfunctions such as cough, flu, diarrhea, inflammation of the throat and sexual impotence are reported. However, there is little knowledge about the metabolic fingerprint comparison of the three parts of the plant, both from the chemical and pharmacological point of view. A total of 44 compounds, including isomers, were identified in the leaf, branch and bark samples, in which 16 compounds were first identified in the species as corilagine and chlorogenic acid, through liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution (UPLC-QTOF-MS^E). Principal component analysis (PCA) was able to distinguish efficiently the metabolomic differences between each section of the plant. Orthogonal partial least squares discriminatory analysis (OPLS-DA) along with the S-Plot, VIP and Heatmap graphs were used to identify 23 biomarkers compounds, which may be associated with the best cytotoxic activities performed by leaf and bark. The bark presented the lowest value of IC₅₀ for the SW-620 strain, in addition to the best values of selectivity index for several strains. These results demonstrated a significant potential of the plant that can contribute to the aggregation of value to this biodiversity asset.

Keywords: Medicinal plants. Caatinga. Dereplication. LC-MS. Chemometrics. Cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mapa da Caatinga.....	14
Figura 2	– Imagens da árvore da espécie <i>S.brasiliensis</i>	18
Figura 3	– Imagens das folhas ¹ , flores ¹ e frutos da espécie <i>S.brasiliensis</i>	16
Figura 4	– Principais fatores que podem influenciar os metabólitos secundários.....	28
Figura 5	– Componentes de um espectrômetro de massas.....	32
Figura 6	– Representação esquemática da ionização por eletrospray (ESI).....	34
Figura 7	– Fluxograma de extração líquido-líquido para análise em UPLC.....	43
Figura 8	– Cromatogramas dos extratos da folha, galho e casca de <i>S.brasiliensis</i> no modo de ionização negativo (ESI-).....	48
Figura 9	– Cromatogramas dos extratos da folha, galho e casca de <i>S.brasiliensis</i> no modo de ionização positivo (ESI+).....	49
Figura 10	– Estruturas química dos compostos tentativamente identificados.....	55
Figura 11	– Espectro MS ² da quercetina- <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-hexosídeo.....	58
Figura 12	– Padrão de fragmentação da quercetina- <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-hexosídeo.....	58
Figura 13	– Espectro MS ² do ácido clorogênico.....	60
Figura 14	– Padrão de fragmentação do ácido clorogênico.....	60
Figura 15	– Espectro MS ² da corilagina na amostra (A) e como padrão analítico (B).....	61
Figura 16	– Espectro MS ² da urundevina A, padrão analítico (A) e nas amostras (B,C)..	62
Figura 17	– Espectro MS ² do ácido quínico galoil (A) e do ácido quínico digaloil (B).....	63
Figura 18	– Padrão de fragmentação do ácido quínico galoil e do ácido quínico digaloil..	64
Figura 19	– Gráfico de escores de PCA para as amostras de folha, galho e casca de <i>S.brasiliensis</i> , analisados por UPLC-QTOF-MS ^E	69
Figura 20	– Gráfico de loadings de PCA para as amostras de folha, galho e casca de <i>S.brasiliensis</i> , analisados por UPLC-QTOF-MS ^E	70
Figura 21	– Análise de OPLS-DA dos grupos: folha-galho; folha-casca; galho-casca.....	71

Figura 22 – Análise de S-Plot e gráficos de barras das variáveis: folha-galho; folha-casca; galho-casca.....	73
Figura 23 – Mapa de calor representando a variabilidade da composição química entre folhas, cascas e galho de <i>S.brasiliensis</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Constituintes extraídos de algumas partes do organismo vegetal da espécie <i>S.brasiliensis</i>	22
Tabela 2	– Valores de massa antes (m_a) e após (m_d) das folhas, cascas e galhos da <i>S.brasiliensis</i> com a respectiva tara (T).....	46
Tabela 3	– Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos de <i>S.brasiliensis</i> da extração para análise em UPLC.....	47
Tabela 4	– Tentativa de identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da folha, galho e casca de <i>S.brasiliensis</i>	50
Tabela 5	– Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos de <i>S.brasiliensis</i> para análise anticâncer bem como a tara dos frascos de vidro, massa final dos frascos e massa do extrato obtida.....	65
Tabela 6	– Percentual de inibição de proliferação celular (%) de extratos etanólico de casca, galho e folha de <i>S.brasiliensis</i> em concentração de 100 µg/mL.....	65
Tabela 7	– Atividade citotóxica in vitro de extratos etanólico de casca e folha de <i>S.brasiliensis</i> em células tumorais e não tumorais.....	66
Tabela 8	– Valores de índice de seletividade IC ₅₀ (células não tumorais)/IC ₅₀ (células tumorais).....	68
Tabela 9	– Relação dos compostos discriminantes da folha em comparação ao galho...	74
Tabela 10	– Relação dos compostos discriminantes do galho em comparação a folha....	74
Tabela 11	– Relação dos compostos discriminantes da folha em comparação a casca.....	75
Tabela 12	– Relação dos compostos discriminantes da casca em comparação a folha.....	75
Tabela 13	– Relação dos compostos discriminantes da casca em comparação ao galho..	76
Tabela 14	– Relação dos compostos discriminantes do galho em comparação ao casca..	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Bioma da caatinga	14
2.2	Importância das plantas medicinais	15
2.3	Família Anacardiaceae	16
2.4	Baraúna (<i>Schinopsis brasiliensis</i>): Aspectos Gerais	17
2.5	Baraúna: Importância Biológica	19
2.6	Baraúna: Composição Química	20
2.7	Metabólitos secundários	27
2.8	Metabolômica	29
2.9	Instrumentação Analítica	30
2.9.1	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ultra Eficiência</i>	30
2.9.2	<i>Espectrometria de massas</i>	31
2.9.2.1	<i>Electrospray</i>	32
2.9.2.2	<i>Analisador híbrido – Qtof</i>	34
2.10	Identificação estrutural	35
2.11	Tratamento de dados	36
2.10.1	<i>Análise de Componentes Principais (PCA)</i>	37
2.10.2	<i>Mínimos Quadrados Parciais (PLS)</i>	38
2.10.3	<i>OPLS-DA</i>	38
2.10.4	<i>VIP</i>	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivo Específico	40
4	PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1	Materiais, equipamentos, reagentes	40
4.1.1	<i>Análise por UPLC-QTOF-MS</i>	40
4.1.2	<i>Extração</i>	41
4.1.3	<i>Análise citotóxica</i>	41
4.2	Coleta e tratamento do material vegetal	42
4.3	Metodologia de extração para análise exploratória em UPLC-QTOF-MS^E 42	42

4.4	Condições das análises realizada em UPLC-QTOF-MS ^E	43
4.5	Metodologia de extração para análise anticâncer.....	44
4.6	Metodologia do ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	44
4.7	Parâmetros da análise estatística da atividade citotóxica.....	45
4.8	Parâmetros de análise quimiométricas.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Preparo e extração das amostras.....	46
5.2	Análise de Identificação por UPLC-QTOF-MS ^E	47
5.2.1	<i>Perfil químico do extrato da folha de S. brasiliensis</i>	56
5.2.2	<i>Perfil químico do extrato dos galhos de S. brasiliensis</i>	59
5.2.3	<i>Perfil químico do extrato da casca de S. brasiliensis</i>	62
5.3	Análise da atividade citotóxica dos extratos de folha, galho e casca de <i>S. brasiliensis</i>	64
5.3.1	<i>Extração para análise anticâncer</i>	64
5.3.2	<i>Concentração Única e IC₅₀</i>	65
5.3.3	<i>Índice de Seletividade</i>	67
5.4	Tratamento quimiométrico.....	68
5.4.1	<i>Análise dos Componentes Principais (PCA) dos extratos de folhas, galhos e casca de baraúna</i>	68
5.4.2	<i>Análise OPLS-DA dos extratos de folhas, galho e casca de baraúna</i>	70
5.4.3	<i>Potenciais biomarcadores</i>	72
5.4.4	<i>Mapa de Calor (Heatmap)</i>	77
86	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento e cura de diversas doenças vem sendo realizada desde a antiguidade. Atualmente, milhares de pessoas em todo o mundo ainda utilizam fitoterápicos, revelando o quanto os conhecimentos terapêuticos são pertinentes no decorrer dos tempos (CRAGG; NEWMAN, 2013; MACIEL; PINTO; JÚNIOR, 2002) .

Os produtos naturais têm sido uma fonte rica de compostos para a descoberta de fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2013). A literatura descreve, o crescente número de medicamentos derivados de plantas, utilizadas no tratamento do câncer (DUTRA *et al.*, 2016). Cerca de 60% dos agentes anticancerígenos são derivados da natureza. Já existem diversas drogas derivadas de plantas, como o taxol, a vimblastina, vincristina que melhoraram demasiadamente a eficiência da quimioterapia contra alguns tipos agressivos de cânceres (PESSOA *et al.*, 2006).

No cenário do que foi discutido, a espécie estudada é a *Schinopsis brasiliensis* Engl., conhecida popularmente como baraúna, braúna, braúna-parda e braúna-do-sertão, é uma árvore brasileira nobre, pertencente à família Anacardiaceae. É nativa da caatinga e mata atlântica encontrada nas regiões semi-áridas do Brasil (FERNANDES *et al.*, 2015). A baraúna é bastante utilizada para o tratamento de diversas enfermidades como influenza, tosse, diarreia, verminoses e imponência sexual pela população da caatinga (AGRA *et al.*, 2007; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Considerando os estudos já relatados acerca dessa planta, foi possível observar que ainda não tinha sido realizado o estudo do perfil químico dos extratos etanólico das três seções (folha, galho e casca) utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada a espectrometria de massas em alta resolução (QTOF-MS). Este trabalho apresenta uma análise comparativa dos metabólitos secundários presentes nas folhas, galhos e casca de *S.brasiliensis* utilizando a técnica de UPLC-QTOF-MS^E aliada aos modelos de análise multivariada de dados (PCA, OPLS-DA, VIP e S-Plot). Bem como, a realização de testes de atividade citotóxica, para a melhor compreensão e correlação entre o perfil químico de cada seção e a atividade biológica exercida.

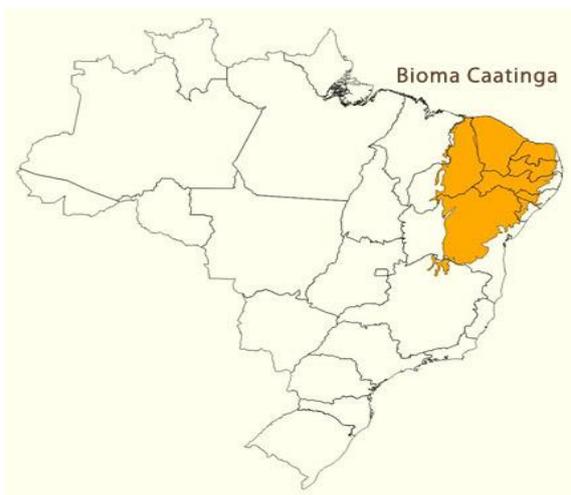
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioma da caatinga

O Brasil tem um dos maiores níveis de biodiversidade do mundo, além de uma enorme diversidade cultural. O país apresenta uma imensa extensão territorial, com climas e solos bastante variados. Através dessas características, há uma evidente diversidade de biomas, os principais são definidos como: Bioma Amazônia, Bioma Cerrado, Bioma Mata Atlântica, Bioma Caatinga, Bioma Pampa e Bioma Pantanal (BRANDON *et al.*, 2005).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro. É caracterizado por uma vegetação espinhosa e rala, particularizada predominantemente, pela completa caducifólia da maior parte de suas espécies, as quais são submetidas à deficiência hídrica durante a maior parte do ano, devido à baixa pluviosidade, má distribuição das chuvas, elevada taxa de evapotranspiração e baixa capacidade de retenção de água dos solos, em geral rasos e pedregosos (ANDRADE LIMA, 1989).

Figura 1 – Mapa da caatinga



Fonte: <http://www.cerratinga.org.br/>, acesso dia 20/02/2017.

Há uma extensa biodiversidade nesse bioma, fazendo com que seja responsável por amparar variadas atividades econômicas direcionadas para fins industriais e agrosilvopastoris, principalmente nos ramos de alimentos, químico, de cosméticos e farmacêuticos, sendo um dos maiores desafios da ciência brasileira é o estudo e a conservação da diversidade biológica desse bioma. A caatinga é a região menos estudada entre as regiões naturais brasileiras, com grande

parte do esforço científico estando concentrado em alguns poucos pontos em torno das principais cidades. Além disso, a caatinga é a região natural brasileira menos protegida, pois as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território. Ademais, ainda ocorre um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos chave e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região (LEAL *et al.*, 2005).

Existem diversas espécies de plantas nesse bioma e, são referidas cerca de 98 famílias de angiospermas, representadas por 1.511 espécies, equivalente a 3% da riqueza nacional, sendo muitas destas exclusivas da caatinga. A família mais expressiva é a Leguminosae (18%), a Anacardiaceae ocupa a 40ª posição de representatividade na flora caatingueira (<1%). Muitas dessas espécies de plantas são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular e para a produção comercial de produtos fitoterápicos, como *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira) (DA SILVA *et al.*, 2004; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

2.2 Importância das plantas medicinais

De modo geral, as plantas medicinais são quaisquer vegetais capazes de produzir substâncias biologicamente ativas que podem ser utilizadas como precursores de fármacos semi-sintéticos ou com fins terapêuticos (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Desde a antiguidade, é relatado o uso das plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças, variando de resfriados a infecções mais graves. Ainda nos dias de hoje, essa prática é bastante utilizada por diferentes culturas no mundo (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os produtos naturais têm sido uma fonte rica de compostos para a descoberta de fármacos. Newman e Cragg *et al.* 2012, demonstraram em suas revisões, a relevância dos produtos naturais como base no desenvolvimento de metodologias para a produção de novos medicamentos. Cerca de 80% das drogas anticancerígenas são oriundas de compostos extraídos de fontes naturais, sendo base para a síntese de outras substâncias ativas ou utilizadas diretamente, com alguma modificação estrutural (NEWMAN; CRAGG, 2012). No entanto, seu uso decresceu nas últimas duas décadas, em parte devido a barreiras técnicas para o mapeamento de produtos naturais em ensaios de alto rendimento contra alvos moleculares (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/ atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (MACIEL; PINTO; JÚNIOR, 2002).

Em virtude da enorme biodiversidade no país, ainda existe uma grande lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. À vista disso, é necessário o incentivo ao estudo das plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em razão da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas (FOGLIO *et al.*, 2006).

2.3 Família Anacardiaceae

Anacardiaceae é uma família composta por cerca de 76 gêneros e 600 espécies. Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos (Anacardiaceae, Dobineae, Rhoaeae, Semecarpeae e Spondiadeae). São encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais com algumas espécies em regiões temperadas, e não são encontradas em áreas secas do deserto. A manga (*Mangifera indica*), originária da Ásia e o caju (*Anacardium occidentale*), nativo do Brasil, são espécies frutíferas dessa família (NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2008; VOGL *et al.*, 1996).

Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. A dermatite de contato provocada por essas plantas é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura dessas substâncias, denominadas lipídios fenólicos. Estas substâncias podem estar presentes em diferentes partes do material vegetal, ocorrendo principalmente em espécies do gênero *Rhus*. Esse gênero é o maior da família, caracterizado por apresentar flavonóides em abundância, principalmente biflavonóides. É relatado que esses biflavonóides apresentam atividades biológicas importantes, como antimalárica, antiviral e citotóxica (CORREIA *et al.*, 2006).

Espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Anacardium*, *Lannea*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Melanorrhoea*, *Pistacia*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Schinus*, *Semecarpus*, *Spondias* e *Tapirira*. *Anacardium*, *Mangifera*, *Rhus* e destacam-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 flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólico e derivados (CORREIA *et al.*, 2006).

2.4 Baraúna (*Schinopsis brasiliensis*): Aspectos Gerais

Schinopsis brasiliensis é uma árvore nobre pertencente à família Anacardiaceae de ordem *sapindales* e gênero *schinapes*. Sua ocorrência é observada em quase toda a área das caatingas da Bahia à Paraíba, com poucos representantes do Rio Grande do Norte ao Piauí, além de alguns estados brasileiros do norte, centro-oeste, e em outros países como Paraguai e Bolívia. No Nordeste é conhecida popularmente como baraúna, braúna, braúna-parda e braúna-do-sertão. O nome é derivado de uma palavra em espanhol, que significa “quebra machado”, devido a dureza de sua madeira (ANDRADE LIMA, 1989).

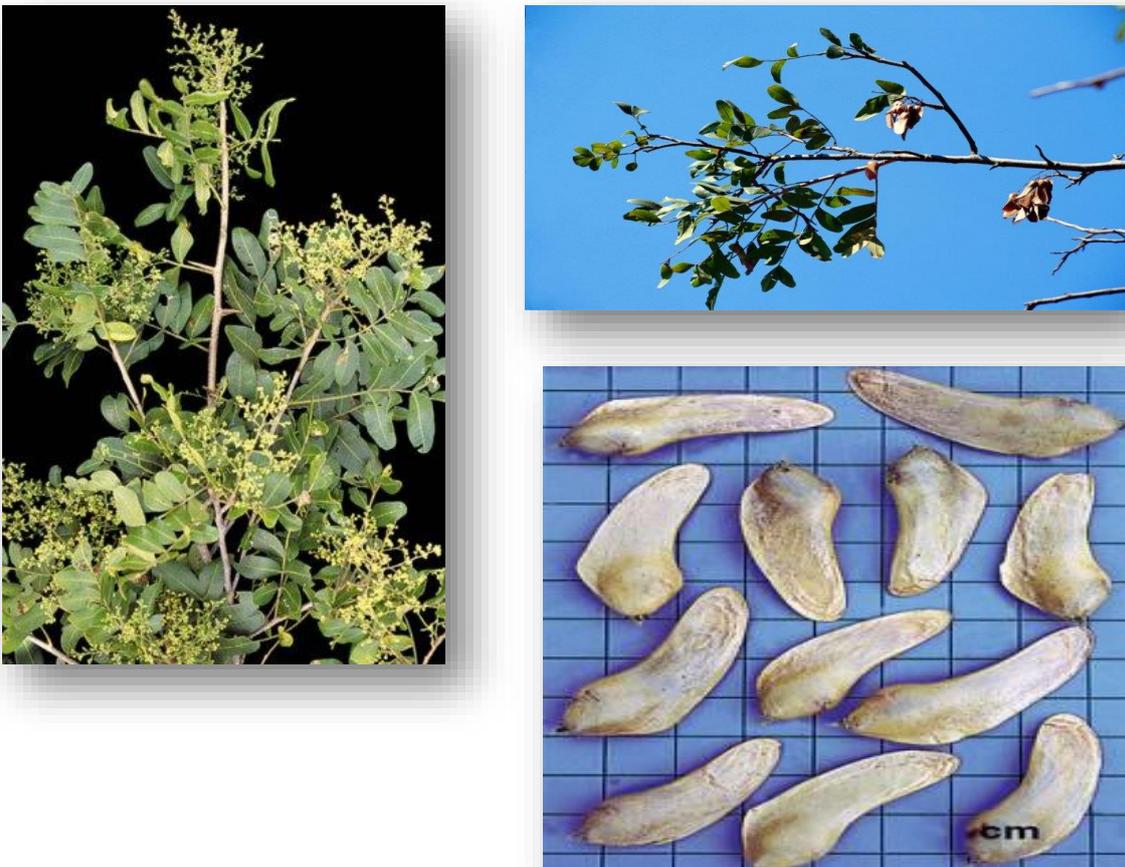
Trata-se de uma árvore espinhenta e de comportamento decíduo, a maioria atinge dimensões próximas a 15 m de altura na idade adulta, sendo uma das maiores árvores da caatinga. Caracteriza-se pelos ramos espinhosos de até 3,5 cm com um porte grandioso de galharia espessa e bem distribuída numa copa de poucas e pequenas folhas. Desenvolve-se lentamente, a idade de corte dá-se geralmente entre 20 a 30 anos. Seu tronco é reto e bem conformado. Os ramos e caule principal são atacados por larvas e insetos. A casca é cinza escura, quase negra, áspera, desprendendo-se em porções irregularmente quadrangulares, forma pequenas rachaduras, quadradas. As flores são pequenas, medindo de 3 mm a 4 mm de diâmetro, brancas, glabras e suavemente perfumadas. O fruto é uma drupa alada, medindo de 3 cm a 3,5 cm de comprimento, de coloração castanho-claro e cheia de massa esponjosa (SANTOS; BETÂNIA; AMADOR, 2013). Nas figuras 2 e 3 encontram-se a árvore, folhas, flores e frutos da espécie *S. brasiliensis*, respectivamente.

Figura 2 – Imagens da árvore da espécie *S. brasiliensis*.



Fonte: http://www.cnip.org.br/banco_img/Barauna/schinopsisbrasiliensis.html, acesso 03/03/17.

Figura 3 – Imagens das folhas¹, flores¹ e frutos² da espécie *S. brasiliensis*.



Fontes:

¹http://www.cnip.org.br/banco_img/Barauna/schinopsisbrasiliensis4.html;

² <http://www.roquevalente.com/barauna%20tree.htm>, acesso 03 de março de 2017.

É considerada uma espécie nobre da caatinga. Diversos são os seus usos, seja na área medicinal; ornamental, pois é utilizada na arborização de praças e canteiros centrais; madeireira que é usada para estacas, pilões, lenha e carvão; nas indústrias de curtume devido à produção de taninos de suas cascas e como alimento para caprinos e ovinos (PARENTE, [s.d.]).

A madeira é dura, pesada, quando nova ou recentemente derrubada, densidade de $(1,23\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$, de grande durabilidade, altamente resistente à decomposição quando em ambiente externo e semelhante à da aroeira. Tem cor castanha avermelhada, escurecendo quando mais velha e exposta ao ar. Está entre as madeiras mais resistentes do mundo, em que sua durabilidade é ilimitada, e em condições favoráveis, é indestrutível pelo tempo (FERNANDES; TORRES, 1941). Essa madeira é bastante utilizada na construção civil, na fabricação de móveis, produção de postes (PAES *et al.*, 2004). Em razão disso, uma intensa exploração foi realizada, havendo assim um quase esgotamento das reservas dessa espécie. Atualmente, é considerada em perigo imediato de extinção, principalmente no nordeste do Brasil, sendo esse o principal fator de seu corte ser proibido (SANTOS; BETÂNIA; AMADOR, 2013).

Em vista disso, são necessárias práticas de controle e conservação dessas espécies de plantas com grande significância medicinal e econômica, como a baraúna, através de estratégias no âmbito sustentável aliada a manutenção do equilíbrio do ecossistema.

2.5 Baraúna: Importância Biológica

De acordo com estudos etnofarmacológicos, diferentes partes da planta de *S. brasiliensis*, como folha e casca, são amplamente utilizadas para o tratamento de doenças como gripe, osteoporose, feridas, diarreia, anti-séptico, antiinflamatório e micoses (AGRA *et al.*, 2007; DE ALBUQUERQUE, 2006; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Foi relatado a utilização da casca do caule, na medicina popular, como antitússico e contra diarreia, através de um xarope feito a partir do cozimento de um punhado dessa casca em um litro de água com açúcar, tomando de três a quatro vezes ao dia até os sintomas desaparecerem. Contudo, dependendo da parte da planta utilizada e a região, a forma de uso e o modo de administração é diferente (AGRA *et al.*, 2007). É relatado também a utilização da casca triturada e cozida da braúna pelos índios kariri-xoco e xoco a fim de aliviar dores de dentes e ouvido (MAIA, 2004).

As atividades biológicas exercidas pelos extratos de *Schinopsis brasiliensis* são bastante mencionadas na literatura. Diversos estudos foram realizados a partir de diferentes seções da planta como casca, folha e sementes. Foram avaliadas as atividades antimicrobiana,

antioxidante e toxicidade *in vitro* de extratos metanólico das folhas, confirmando a alta atividade antioxidante e antimicrobiana, e moderada toxicidade (SARAIVA *et al.*, 2013). Esse estudo foi realizado utilizando testes com larvas de *Artemia salina*, baseado no método de Meyer *et al.* (1982). Segundo Meyer, os valores de concentração letal média $LC_{50} < 500 \mu\text{g.ml}$ indicam toxicidade, valores de LC_{50} de 500 a $1000 \mu\text{g.ml}$ indicam toxicidade moderada, enquanto que os valores de $LC_{50} > 1000 \mu\text{g.ml}$ sugerem uma falta de toxicidade. O valor do extrato metanólico da folha foi de $705,54 \pm 60,46 \mu\text{g.ml}$, o que resulta que o extrato seja moderadamente tóxico. Esse resultado demonstra que em concentrações elevadas do extrato pode afetar negativamente o metabolismo da *A. salina*, devido à alta concentração de polifenóis como taninos, flavanóides e outros compostos fenólicos (SARAIVA *et al.*, 2011).

Além disso, é relatado a atividade antimicrobiana dos extratos de folhas, casca do caule, flor, vagens e sementes contra bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* (CHAVES *et al.*, 2011; SARAIVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012); *Salmonella typhimurium* (SARAIVA *et al.*, 2011); *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis* and *Enterococcus faecalis* (SILVA *et al.*, 2012).

Também foi analisado a toxicidade e a atividade larvicida de diferentes extratos de casca de *S. brasiliensis*. Frações de acetato de etila, hexano e clorofórmio apresentaram potencial larvicida, enquanto frações de clorofórmio e acetato de etila foram tóxicas para os caramujos *B. glabrata* (SANTOS *et al.*, 2014).

Ademais, o extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila da casca, mostraram resultados promissores exibindo efeito antinociceptivo central e atividade antiinflamatória, com inibição do processo inflamatório (CARLA *et al.*, 2018).

2.6 Baraúna: Composição Química

O conhecimento acerca da composição química da baraúna assim como o isolamento dos compostos que podem estar relacionados às atividades biológicas ainda não são expressivos, embora, exista diversos estudos relativos aos efeitos terapêuticos das diferentes partes da planta. O estudo fitoquímico dessa espécie é de imensa importância por apresentar uso na medicina popular, com diversas atividades biológicas, além de estar na lista de espécies que estão ameaçadas de extinção.

A maioria dos estudos de *Schinopsis brasiliensis* descritos na literatura refere-se a identificação e isolamento de compostos, na maioria de extratos apolares, de folhas e de cascas

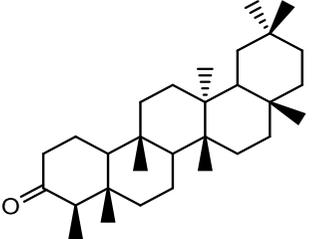
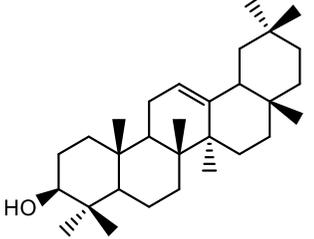
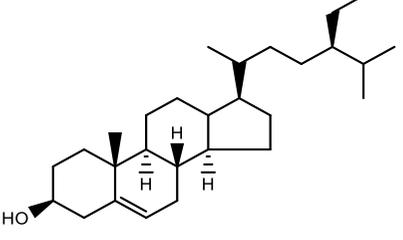
por meio de métodos cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, tais como, CG-MS, HPLC-MS e RMN (CARLA *et al.*, 2018; DONATI *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017).

Tem-se relatos sobre a identificação de compostos químicos como taninos, polifenóis e esteroides, presentes nos extratos da casca do caule e das folhas de *S.brasiliensis* (CARDOSO; DAVID; DAVID, 2005; CARDOSO *et al.*, 2014; MOREIRA, 2014). Biflavonóides como 4'-metoxi-7-hidroxi-flavanona-(3→3'')-3'''-metoxi-4''',7''-dihidroxi-flavanona foram isolados do extrato hexânico da casca (CARDOSO; DAVID; DAVID, 2005; CARDOSO *et al.*, 2014). Além disso, através do óleo essencial extraído das folhas, foi identificado altas concentrações de mirceno e baixas concentrações de outros compostos como β-cariofileno, guaiol e eucaliptol (DONATI *et al.*, 2014).

A composição química do extrato etanólico da casca foi estudado por (SANTOS *et al.*, 2017), onde foram identificados 16 compostos fenólicos, dentre eles, derivados do ácido gálico a fim de verificar sua atividade antioxidante.

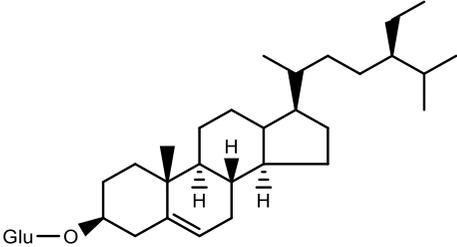
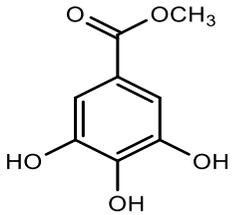
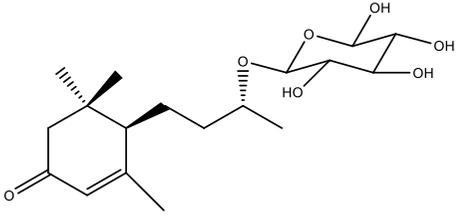
Na tabela 1, encontram-se algumas substâncias que foram isoladas de extratos hexânico, diclorometanico e etanólico da casca e folhas da espécie.

Tabela 1- Constituintes extraídos de algumas partes do organismo vegetal da espécie *S. brasiliensis*

Componentes	Estrutura	Fórmula Molecular	Orgão Vegetal	Referências
Friedelina		$C_{30}H_{50}O$	Folha	Moreira, 2009
β -amirina		$C_{30}H_{50}O$	Folha	Moreira, 2009
β -sitosterol/Folha		$C_{29}H_{50}O$	Folha	Moreira, 2009

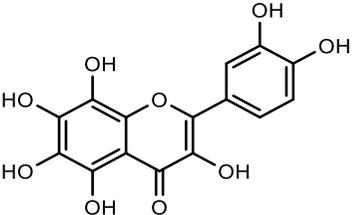
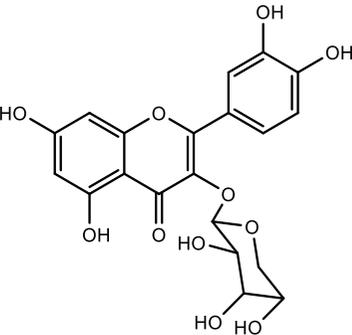
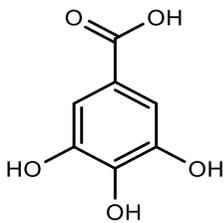
Fonte: Adaptado de (MOREIRA, 2014).

Tabela 1- Constituintes extraídos de algumas partes do organismo vegetal da espécie *S. brasiliensis* (continue).

Componentes	Estrutura	Fórmula Molecular	Orgão Vegetal	Referências
β -sitosterol-glicosilado		$C_{35}H_{60}O_6$	Folha	Moreira, 2009
Galato de metila		$C_8H_8O_5$	Folha	Moreira, 2009
(6R,9R)-megastigma-4-en-3-ona 9-O- β -glicanopiranosídeo		$C_{19}H_{32}O_7$	Folha	Moreira, 2009

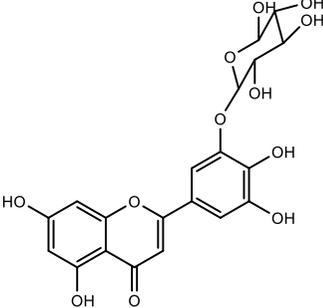
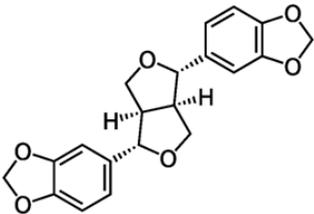
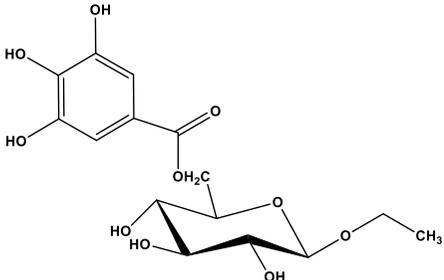
Fonte: Adaptado de (MOREIRA, 2014).

Tabela 1- Constituintes extraídos de algumas partes do organismo vegetal da espécie *S. brasiliensis* (continue).

Componentes	Estrutura	Fórmula Molecular	Orgão Vegetal	Referências
5,6,7,8,3',4'- hexahidroxiflavonol		$C_{15}H_{10}O_9$	Folha	Moreira, 2009
Quercetina-3-O- β - D-xilopiranosídeo		$C_{20}H_{18}O_{11}$	Folha	Moreira, 2009
Ácido gálico		$C_7H_6O_5$	Folha	Moreira, 2009

Fonte: Adaptado de (MOREIRA, 2014).

Tabela 1– Constituintes extraídos de algumas partes do organismo vegetal da espécie *S. brasiliensis* (continue).

Componentes	Estrutura	Fórmula Molecular	Orgão Vegetal	Referências
5,7,4',5'- tetrahidroxiflavona- 3'-O- β- glicopiranosídeo		$C_{21}H_{20}O_{12}$	Folha	Moreira, 2009
Siringaresinol		$C_{20}H_{17}O_6$	Casca	Cardoso, 2007
Etil-O-β-D-(6'-O- galoil)- glucopiranosídeo		$C_{15}H_{20}O_{10}$	Casca	Santos, C. C. de S., 2017

Fonte: Adaptado de (MOREIRA, 2014).

Tabela 1– Constituintes extraídos de algumas partes do organismo vegetal da espécie *S. brasiliensis* (continue).

Componentes	Estrutura	Fórmula Molecular	Orgão Vegetal	Referências
Etil- <i>O</i> -β-D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo		$C_{15}H_{20}O_{10}$	Casca	Santos, C. C. de S., 2017
Nikoenosídeo		$C_{16}H_{24}O_9$	Casca	Santos, C. C. de S., 2017
3,4-di- <i>O</i> -galoil-ácido quinico		$C_{21}H_{20}O_{14}$	Casca	Santos, C. C. de S., 2017

Fonte: Adaptado de (MOREIRA, 2014).

2.7 Metabólitos Secundários

Os compostos de grande interesse que são os principais alvos dentro da pesquisa em química de produtos naturais, são os metabólitos secundários, que desempenham inúmeras atividades importantes para os organismos que os contêm, e que estão associados a diversos tipos de ações seja de proteção, desenvolvimento, interação e, principalmente, de atividades biológicas exercidas pelo vegetal. Esses compostos são de grande utilidade também para espécie humana servindo como base para o desenvolvimento e produção de fármacos, produtos agroquímicos, alimentos, cosméticos e fragrâncias (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012; NOVA *et al.*, 2013).

São divididos em três grandes grupos:

- Terpenos

São substâncias naturais que são classificadas pelo número de unidades de isoprenos (C_5H_8), representam a maior classe de metabólitos secundários. Constituem os óleos essenciais das plantas, e estão associados à fisiologia vegetal. São utilizados nas indústrias como agroquímicos, fragrâncias e em produtos farmacêuticos (MEWALAL *et al.*, 2016).

Exemplos: limoneno e mentol.

- Compostos Fenólicos

É uma classe de compostos que são constituintes de diversos vegetais, produtos industrializados e frutas. A sua estrutura é composta de vários grupos benzênicos característicos, tendo hidroxilas como substituintes (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999). A posição dos átomos de hidrogênio dos grupamentos hidroxila, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo ($-C=O$) promove a esses compostos uma alta atividade antioxidante (CATHERINE A. RICE-EVANS; PAGANGA, 1996; HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970). Esse grupo complexo se divide em flavonóides e não flavonóides.

Os flavonóides são polifenóis amplamente encontrados em frutas como maçã e uva; em vegetais como cebola; e em produtos industrializados como vinho e cerveja. Subdivide-se em flavonas, flavononas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, flavonóis e chalconas.

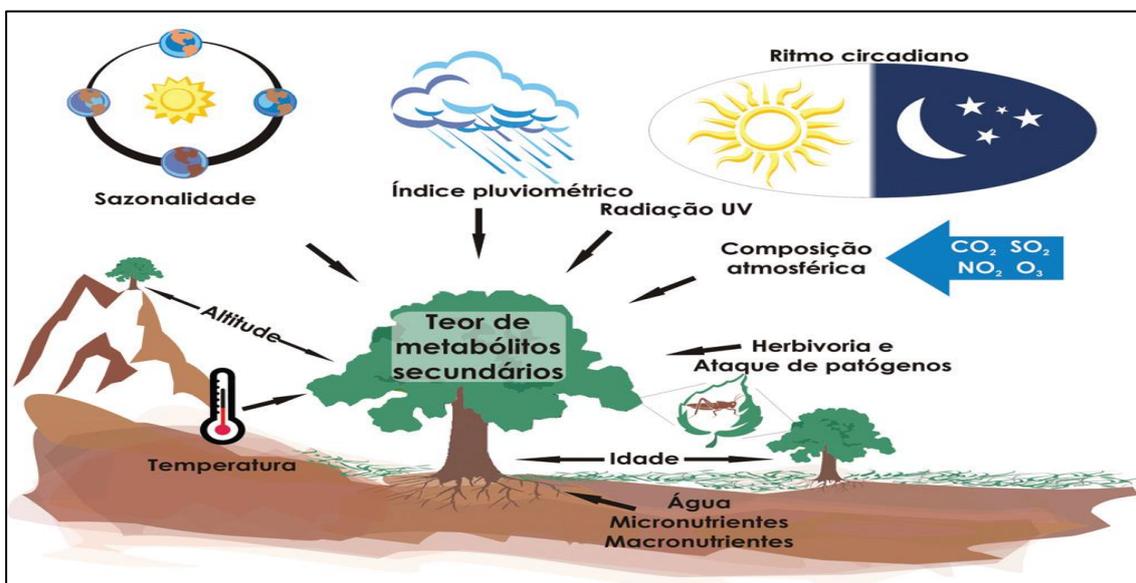
Os não flavonóides são fenóis simples ou ácidos como os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. A atividade antioxidante desses compostos depende da posição da hidroxila e da proximidade do grupo $-CO_2H$ em relação ao grupo fenil, quanto mais próximo, maior é a atividade (CATHERINE A. RICE-EVANS; PAGANGA, 1996; HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970).

▪ Alcaloides

São substâncias de caráter básico, presentes em fungos, bactérias, animais e principalmente em plantas. São compostas de nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Podem ser classificadas de acordo com a atividade biológica desempenhada, estrutura química e origem biossintética.

A concentração e os diferentes tipos de metabólitos secundários nas plantas variam bastante dependendo de diversos fatores. Os mais importantes são a sazonalidade, ou seja, o período em que é realizada a coleta do vegetal; a temperatura que afeta diretamente no desenvolvimento da planta, conseqüentemente afeta a produção de metabólitos secundários; a radiação ultravioleta, com estudos mostrando a relação entre a intensidade de radiação solar e a produção de compostos fenólicos; nutrientes que não afetam apenas os metabolitos primários, mas também os secundários; a altitude que apesar de haver poucos estudos acerca disso, é visto que há efeito na produção e desenvolvimento dos metabólitos; a poluição atmosférica que provoca o aumento de O₃ e CO₂ no ambiente favorecendo as alterações dos metabólitos; e por último, os ataques de patógenos e estímulos mecânicos que influenciam também as alterações (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 4 – Principais fatores que podem influenciar os metabólitos secundários



Fonte: Gobbo-neto, L., & Lopes, N. P. (2007). PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes*, 30(2), 374–381.

2.8 Metabolômica

Metaboloma é conjunto de todos os metabólitos presentes nas células, órgãos ou tecidos. A fim de identificar e quantificar todas essas moléculas de baixo peso molecular (até 1500 Da) foi criada uma ferramenta que está em contínuo desenvolvimento chamado de metabolômica que é uma análise valiosa que integra instrumentação, química, estatística e computação em sistemas biológicos (FIEHN, 2002). Esse estudo alia o método de preparo de amostras e extrações com técnicas analíticas como a ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). Dentre as diversas etapas envolvidas, as mais comumente usadas são o *metabolite fingerprinting* que objetiva determinar as diferenças metabólicas entre as amostras através de ferramentas estatísticas e *metabolite profiling* que tem o propósito de traçar o perfil químico da planta, por exemplo, com a identificação dos metabólitos podendo também quantificar as moléculas que são responsáveis pelas diferenças entre as amostras.

A metodologia mais utilizada para a identificação dos metabólitos em misturas complexas é a desrepliação que é um método que acopla técnicas de separação (cromatografia líquida e gasosa) com as de identificação (RMN, EM). É feita uma pré-triagem para detectar compostos já conhecidos através de bibliotecas e bancos de dados, reduzindo assim tempo e custo, focando em novas moléculas bioativas, conseqüentemente, evitando o reisolamento de substâncias conhecidas (BUTLER, 2004).

Os dados gerados pela desrepliação podem ser analisados por métodos estatísticos através de técnicas quimiométricas, que tem como uma de suas funções mostrar as diferenças metabólicas entre as amostras e correlacionar o perfil químico com uma determinada atividade biológica. A análise de componentes principais (PCA), a regressão dos mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) são alguns exemplos de mecanismos estatísticos utilizados (BUENO *et al.*, 2013).

Nesses últimos anos, a metabolômica vem avançando em diversas áreas, tais como na toxicologia, farmacologia, ambiental e genômica, entre outras. Nos produtos naturais, especificamente, nas plantas, a metabolômica está desempenhando um importante papel na prospecção molecular avaliando os importantes metabólitos com suas respectivas funções biológicas, promovendo a agregação de valor ao vegetal aliado ao uso sustentável e ao avanço tecnológico nessa área.

2.9 Instrumentação Analítica

2.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ultra Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método de separação, quantificação e identificação de compostos. É constituído de duas fases: a estacionária que pode ser um sólido ou um sólido recoberto por um líquido e a móvel que é um solvente líquido. O início da análise ocorre após a introdução da amostra por meio da válvula de injeção, em seguida, a fase móvel leva a amostra até a coluna onde se produz a separação, e finalmente os compostos já separados são observados na saída da coluna, e vão em direção ao detector adequado que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma. A separação dos compostos é realizada de acordo com as forças intermoleculares existentes, quanto maior a interação do analito com a fase estacionária mais lentamente as substâncias irão passar pela coluna, em contrapartida quanto menor for a interação mais rapidamente irão passar (LEITE, 2008).

Ao longo das últimas décadas o progresso na eficiência de separação por HPLC tem sido impulsionada por melhorias na fabricação de partículas a base de sílica, tais como a diminuição do tamanho das partículas. Entretanto, isso gerou um problema devido a insuficiência dos sistemas de bombeamento que limitava a velocidade cromatográfica e a capacidade de resolução dos picos. De forma a obter uma melhor eficiência foi desenvolvido novos sistemas que possibilita o bombeamento e a injeção de líquidos a pressões bastante elevadas acima de 10.000 psi sem danificar a coluna analítica juntamente com a diminuição das partículas (menor que 2 μ m) chamado de cromatografia de ultra-performance (UPLC) (CHURCHWELL *et al.*, 2005).

O UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) proporciona inúmeras vantagens significativas na sensibilidade, velocidade e resolução. A eficiência de separação permanece mantida ou pode ser ainda melhorada. Esse sistema permite reduzir o tempo de análise até nove vezes em comparação com o sistema convencional utilizando colunas com partículas de 5 μ m, e em até três vezes usando colunas empacotadas com partículas de 3 μ m, sem a perda de eficiência de separação. O uso do UPLC é bastante relevante, pois emprega volumes de amostras reduzidos, em razão à dimensão das colunas cromatográficas que são menores que as de HPLC. Além disso, outro fator é a economia do solvente que por empregar uma menor vazão para realizar a separação cromatográfica gera economia no custo total das análises. A técnica tem uma grande importância e pode desempenhar um papel significativo no futuro da

cromatografia líquida. As primeiras aplicações práticas de UPLC foram realizadas juntamente com a detecção por espectrometria de massa em aplicações genômicas e campo de metabolômicos (NOVÁKOVÁ; MATYSOVÁ; SOLICH, 2006; ZHAO *et al.*, 2015).

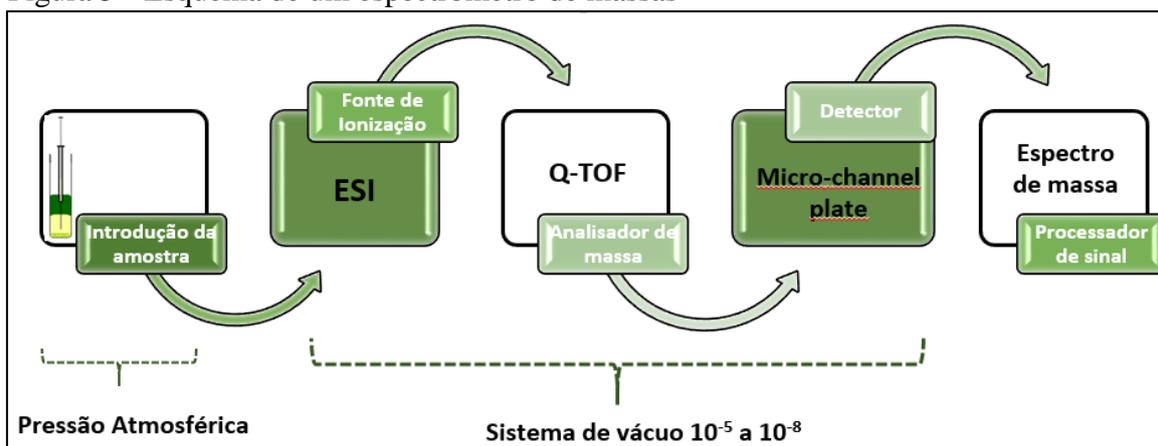
2.9.2 *Espectrometria de Massas*

Espectrometria de massas é uma técnica analítica em que as moléculas de uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são posteriormente separados de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z . Para esse fim, um feixe de elétrons é lançado sobre a amostra de maneira que os constituintes da mesma possam ser fragmentados formando íons, os quais são desviados pela aplicação de um campo magnético (SKOOG, 2009). O espectro de massas é um gráfico que indica a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparece como picos com m/z definidos. Além disso o espectro de massas fornece o sinal referente ao padrão isotópico da amostra, decorrente do padrão isotópico dos átomos constituintes do composto. O tamanho dos picos depende da abundância relativa natural dos isótopos. A utilização dessas informações podem presumir a presença de alguns átomos com padrões isotópicos bem característicos (Br, S, Cl, entre outros) (WALKER, 2010).

Em uma análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, após a passagem da amostra pela coluna, ela é levada ao espectrômetro de massas onde passa, inicialmente, pela fonte de ionização onde ocorre a formação dos íons em fase gasosa. Após isso, os íons são levados para o analisador de massa através de um campo eletromagnético, onde acontece a separação de acordo com a razão m/z , e por fim, os íons passam para o detector e o sinal gerado é registrado pelo sistema de dados (PAVIA *et al.*, 2010).

A Figura 5 representa os componentes de um espectrômetro de massas utilizado no trabalho de forma simplificada.

Figura 5 – Esquema de um espectrômetro de massas



Fonte: Autora

No processo de ionização os íons podem ser produzidos a partir de uma molécula neutra, ou pela adição de um elétron ou próton. São diversos os tipos de fonte de ionização, como impacto eletrônico, ionização química, eletrospray, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), ionização química a pressão atmosférica (APCI), entre outros.

O analisador de massas é outro componente de grande importância na espectrometria de massas. É responsável por separar os íons de acordo com sua m/z . Os analisadores são basicamente separados de acordo com a resolução que podem atingir na medida de massas (TRUFELLI *et al.*, 2011). Os analisadores podem ser simples e híbridos, como orbitrap e quadrupolo-tempo de voo, respectivamente.

2.9.2.1 *Electrospray*

O electrospray (ESI) é considerado uma técnica branda de ionização, e atualmente está sendo a melhor associação de custo e benefício para identificação e quantificação de substâncias em misturas complexas (FORCISI *et al.*, 2013).

Dentre as principais vantagens do electrospray, pode-se destacar a alta sensibilidade; fácil interface com técnicas de separação, visto que, os íons são gerados em solução, abrange uma vasta variedade de compostos, além de ser utilizada para compostos termicamente lábeis (CECH; ENKE, 2001; FORCISI *et al.*, 2013).

O processo consiste na aplicação de um potencial (3-6kV), positivo ou negativo, na extremidade do capilar onde passa o analito, gerando um spray formado por gotículas altamente carregadas. Conforme a densidade de carga aumenta nessas gotas, presas ao capilar, provoca uma deformação das gotas, chamado de Cone de Taylor. Quando a solução que compreende o cone de Taylor atinge o limite de Rayleigh (momento em que a tensão superficial da solução se

igual a repulsão coulombica da carga superficial), as gotículas que contêm excesso de carga se desprende do capilar subdividindo-se. Em seguida, as gotas desprendidas da ponta do capilar passam por processo de dessolvatação através de gases inertes, como $N_{2(g)}$, que tem o intuito de evaporar o solvente presente nas gotas. No momento em que a força de repulsão supera a tensão superficial, ocorre a explosão coulômbica, que resulta na formação de gotículas menores. A evaporação do solvente + fissão coulômbica ocorre repetidamente para gerar gotículas cada vez menores até a formação dos íons isolados que são levados ao analisador através de um campo elétrico (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CECH; ENKE, 2001; PAVIA *et al.*, 2010). O processo de ionização por eletrospray está representado na Figura 6.

Nessa fonte de ionização pode ocorrer três processos distintos, no interior do capilar: reações redox, reações ácido e base e coordenação com cátions ou ânions.

- Reações Redox

Nesse caso a fonte de ionização pode ser considerada uma célula eletrolítica à corrente alternada. Ocorre quando há espécies que tem facilidade de oxidar ou reduzir, produzindo assim os íons moleculares (M^+) ou (M^-) (CROTTI *et al.*, 2006).

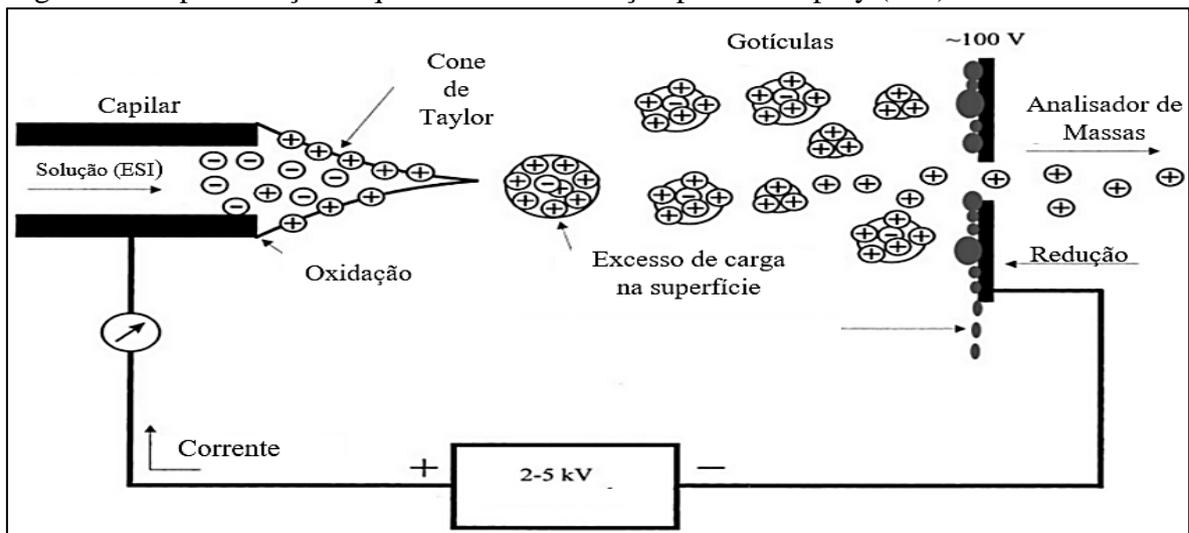
- Reações Ácido/Base

Na maioria das substâncias orgânicas que apresentam não apresentam sistemas com alta densidade eletrônica e potenciais redox não tão baixos. Em tal caso, ocorre a formação de íons precursores ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$), formados pela protonação em moléculas com maior afinidade protônica (modo positivo) ou pela desprotonação em moléculas com maior facilidade em perder hidrogênio (modo negativo) (CROTTI *et al.*, 2006).

- Coordenação com cátions ou ânions

Ocorre a formação de adutos, no modo positivo podendo ocorrer com Na, K, por exemplo, e no modo negativo com Cl e alguns ácidos (CROTTI *et al.*, 2006).

Figura 6 – Representação esquemática da ionização por eletrospray (ESI)



Fonte: Adaptado de (CECH; ENKE, 2001).

2.9.2.2 Analisador híbrido – Qtof

O sistema acoplado de análise utilizado no trabalho, UPLC-QTOF-MS^E, possui como analisador de massa um híbrido composto por dois analisadores: o quadrupolo e o tempo de voo. O sistema híbrido tem como diferencial a combinação de dois tipos de analisadores que combinam suas principais vantagens, fornecendo assim um melhor funcionamento.

O quadrupolo é um dos analisadores mais populares, de baixo preço e simplicidade. Além disso, esse analisador é bastante utilizado em análises quantitativas por apresentar uma boa linearidade. É formado por quatro barras cilíndricas dispostas em dois pares (um mantido em um potencial elétrico positivo para massas elevadas e outro, para massas pequenas em um potencial negativo), que geram um campo elétrico dependente da faixa de razão massa/carga requerida pelo analista. Se o íon estiver dentro da faixa, irá passar pelas barras do quadrupolo até o detector, em contrapartida, os outros íons são eliminados pela bomba de vácuo (LANÇAS, 2009).

No analisador tempo de voo é conhecido por apresentar rápida velocidade de varredura e alta resolução. Nesse caso, todos os íons formados são acelerados pela aplicação de um campo elétrico e adquirem velocidades proporcionais à raiz quadrada de sua razão m/z , que é inversamente proporcional a massa. Os íons são levados com uma energia cinética que mostra a dependência exclusivamente da massa, em que os íons mais leves chegam primeiro ao detector, ou seja, quanto maior o íon, mais tempo ele leva para percorrer o comprimento do tubo (“drift tube”) (LANÇAS, 2009).

No caso do Q-TOF, a elevada resolução e alta velocidade de varredura provém do analisador em tempo de voo e a alta sensibilidade do quadrupolo, sendo assim, esse tipo de analisador tem melhor excelente desempenho comparado ao analisador individualmente. Inicialmente, o íon é selecionado no quadrupolo, que serve como um focalizador de íons. Ao sair do quadrupolo, os íons são enviados para uma câmara de colisão, onde ocorre a variação de energia para a geração de espectros MS e MS/MS. E, em seguida, os íons são analisados pelo analisador em tempo de voo, e finalmente são levados ao detector.

Nesse sistema é possibilitado o modo MS^E em que o E significa varredura de alta energia, com a geração de espectros de massa de alta resolução MS e MS². Esse modo consiste na aquisição simultânea de dados de baixa e alta energia utilizando uma rampa entre 15 eV a 30 eV aplicada (WRONA *et al.*, 2016). Durante uma mesma varredura cromatográfica é obtido informações de íons precursores, com baixa energia de colisão e fragmentos, com alta. O modo MS^E é uma ferramenta essencial para a determinação de compostos não voláteis e duas de suas vantagens é a não necessidade de preparação de amostra demorada e a utilização de baixo consumo de solvente (WRONA *et al.*, 2016).

2.10 Identificação Estrutural

Para a identificação estrutural, foram consideradas as fórmulas moleculares e os valores de m/z obtidos a partir dos espectros de alta resolução, observados nos picos cromatográficos de maior intensidade. A partir de cada fórmula, foi determinado o erro relativo em ppm. Somente fórmulas moleculares com valores inferiores a 10 ppm de erro foram consideradas para estudos posteriores em MS/MS. As propostas estruturais das moléculas foram realizadas através dos dados de MS/MS, por meio do estabelecimento de padrões de fragmentação racionais (BOUSLIMANI *et al.*, 2014; KIND; FIEHN, 2007, 2010; MOCO *et al.*, 2007; YULIANA *et al.*, 2013).

Importante ressaltar que todos os compostos foram, apenas, parcialmente identificados, pois foi realizado o estudo de desreplicação com o objetivo de identificar de forma abrangente todos os metabólitos presentes nas amostras. Para ter uma exatidão de identificação são necessários mais estudos como isolamento das substâncias e utilização de técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN).

Os dados foram processados usando o software MassLynx, (Waters Corporation). A comparação de todos os picos de LC foi realizada utilizando uma tolerância de tempo de

retenção $\pm 0,05$ min e uma tolerância de massa exata de $\pm 0,05$ Da. Para picos não identificados, todas as possíveis fórmulas moleculares foram extraídas (elementos C, H, N, O, a tolerância de 10 ppm, pelo menos, 2 átomos de carbono) com a ferramenta composição elementar do MassLynx.

O erro dado em ppm leva em consideração a massa observada no espectro de massas e a massa calculada pela ferramenta de composição elementar do software MassLynx, de acordo com a equação (1):

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{(\text{massa observada} - \text{massa calculada})}{\text{massa observada}} \times 10^6 \quad (1)$$

2.11 Tratamento de Dados

Nos casos em que há uma grande quantidade de amostras, as análises realizadas geram um grande volume de dados brutos, e conseqüentemente, é mais difícil a visualização e interpretação dos resultados. Nesse caso, é de grande importância a utilização de métodos matemático capazes de organizar as informações e convertê-las em dados que possam ser visualizados no espaço bi e tridimensionais, facilitando, extremamente, o entendimento dos resultados obtidos (YI *et al.*, 2016). E, a quimiometria é um desses métodos matemáticos e estatísticos utilizado em dados de origem química, que compreende análises univariadas e multivariada de dados.

A quimiometria é um dos pilares da metabolômica, através de análises multivariadas de dados é possível correlacionar as diferenças metabólicas entre as amostras e a atividade biológica observada. As análises podem ser exploratórias (*untargeted*) e supervisionadas (*targeted*). Na exploratória, não há conhecimento prévio da amostra, nesse caso, elas são agrupadas naturalmente através das informações presentes nos dados experimentais, contribuem com uma visão imparcial dos dados, podendo-se destacar a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA). Nas supervisionadas, cada amostra analisada procede de uma classe predeterminada, e essa informação é aplicada durante a análise dos dados e na construção de modelos de classificação, a separação pode ser induzida pelo analista, destacando-se a regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais (OPLS-DA), regressão parcial por mínimos quadrados (PLS-DA), análise discriminante linear (LDA) (YI *et al.*, 2016).

2.11.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico exploratório que consiste em reduzir a complexidade de uma grande quantidade de dados, com a menor perda possível de informações (MARCHETTI *et al.*, 2015). Essa técnica permite observar, interpretar e correlacionar as diferenças existentes entre as amostras, além de promover a formação de grupos com semelhanças entre si (WORLEY; HALOUSKA; POWERS, 2013). Além disso, o PCA é sensível aos *outliers*, pois pode-se notar, claramente, o quanto os mesmos são diferentes, em relação as outras amostras analisadas. É utilizada, inicialmente, no tratamento de dados, com o propósito de se obter uma visão geral das amostras, suas semelhanças e dissemelhanças, de cada conjunto de dados (GOMES, 2013).

O PCA resulta de uma transformação matemática, uma matriz de dados X consistindo de T linhas (observações referentes às amostras) e P colunas (observações referentes às variáveis) (BRERETON, 2007). A equação básica da matriz de PCA é representada na equação (2).

$$X = T.P \quad (2)$$

A representação gráfica é formada por gráficos de escores, onde fornecem a composição das componentes principais em relação as amostras; e “*loadings*”, em relação as variáveis, responsável pela diferenciação do posicionamento entre as amostras. Os dois gráficos são sobreponíveis e complementares, e a direção de um gráfico corresponde a mesma do outro. Portanto, um padrão interessante visualizado no gráfico de escores pode ser interpretado observando ao longo desta direção no gráfico de *loading* (ALBERICE, 2014).

Os dados de *scores* de PCA são projetados em gráficos bi ou tridimensionais, em que os eixos são as componentes principais (PC). Cada PC é uma combinação linear das respostas originais, não são correlacionais e, ortogonais entre si. A informação contida em PC1, não está em PC2, portanto, as redundâncias são eliminadas, ou seja, é provável se utilize poucas componentes principais em quase todas as informações. A PC1 descreve a máxima variância dos dados originais, e coincide com o eixo de maior variabilidade entre as amostras. E, a PC2 que está perpendicular a PC1, representa a quantidade máxima dos dados não explicados pela PC1.

Após a análise de PCA, é essencial a utilização de técnicas supervisionadas, como análise de mínimos quadrados parciais (PLS), análise ortogonal de mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) e entre outras, com o intuito de produzir resultados mais confiáveis e relevantes.

2.11.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de análise supervisionado bastante utilizado. Esse método relaciona uma matriz de dados contendo variáveis independentes das amostras com uma ou mais variáveis respostas para essas amostras, baseada no uso de fatores.

O PLS pode ser combinado com a análise discriminante (DA) para melhor separar as classes, considerando o caso de duas classes (LINDON; NICHOLSON, 2008). O PLS-DA projeta os dados (X) em um espaço de baixa dimensão que potencializa a separação entre os diferentes grupos de dados nas primeiras dimensões (variáveis latentes). Essas variáveis são classificadas a partir do quão bem elas explicam a variância Y (XIA; WISHART, 2011). Essa análise visa melhorar a separação entre dois grupos usando as informações da classe.

2.11.3 OPLS-DA

A Análise Discriminante Ortogonal dos Mínimos Quadrados Parciais (OPS-DA) foi desenvolvida como uma extensão do PLS-DA, e é amplamente utilizado na metabolômica, em que integra um filtro de correção de sinal ortogonal, usado para remover partes irrelevantes dos dados não correlacionados, em que a variância Y não relacionada é removida de X. Sendo assim, tenta descrever a informação de classificação em um componente, simplifica a análise, reduz a complexidade dos dados por meio da remoção de variável não correlacionada, ou seja, apenas uma componente é descrita, no entanto o poder de predição é o mesmo (PLS-DA e OPLS-DA) (KHAKIMOV; GÜRDENIZ; ENGELSEN, 2015).

O OPLS-DA e o PLS-DA possuem uma tendência inata para ajustar os modelos aos dados, ainda que identificando uma excelente separação de classes em variáveis completamente aleatórias. Por isso, a validação é uma etapa crítica para garantir a confiabilidade do modelo. Dois parâmetros são utilizados para assegurar a boa qualidade do modelo, o Q^2 (variância predita) e o R^2Y (variância explicada). Através da variância predita sabe-se quanto o modelo prediz das variáveis, ou seja, é a capacidade preditiva do modelo, o valor máximo é 1,0, significa previsibilidade perfeita, e a literatura descreve que o valor aceitável é acima de 0,4 para um modelo biológico. A variância explicada mede o grau de explicação que o modelo possui sob os dados apresentados, o valor máximo também é 1,0, indicando a descrição perfeita dos dados pelo modelo (XIA; WISHART, 2011).

Além disso, outros problemas podem ser encontrados nas análises de OPLS-DA e PLS-DA como o overfitting, quando o algoritmo parece atingir uma boa separação, porém o fez captando ruídos aleatórios em vez de sinais reais. Nesse caso, algumas vezes a validação cruzada pode não detectar esse problema, por isso utiliza-se testes de permutação. Esse teste compreende a redistribuição aleatória dos rótulos de classe e a execução do PLS-DA nos conjuntos de dados recém-formados. Esse procedimento é repetido milhares de vezes e as medidas de desempenho são plotadas em um histograma para avaliação visual. É possível determinar se a atribuição original da classe é significativamente diferente ou não das classes permutadas através do histograma resultante. Um valor P empírico é obtido através do número de vezes que os dados permutados produziram um resultado melhor do que utilizando os dados originais. Suponha-se que nenhuma das classes permutadas for melhor que a observada em 2000 permutações, o valor P é relatado como $P < 0,0005$ (menor que $1/2000$). Sugere-se que a validação cruzada juntamente os testes de permutação sejam feitos para garantir a confiabilidade do modelo (XIA; WISHART, 2011).

A maneira mais fácil de visualizar um modelo de classificação do OPLS-DA é através dos gráficos de S-Plot, utilizado para detectar os compostos discriminantes. O gráfico é composto por dois eixos, o $p[1]$ que descreve a magnitude de cada variável em X, e o $p(\text{corr})$ que representa a confiabilidade de cada variável X. O S-Plot tem sido bastante utilizado para a detecção de biomarcadores, que são compostos discriminantes que desempenham alguma atividade biológica, em dados de NMR/GC/MS/LC/MS.

2.11.4 VIP

A variável de importância na projeção (VIP) classifica a contribuição geral de cada variável para o modelo de OPLS-DA. O VIP é uma forma de classificar a melhor faixa em que estão inseridos os compostos discriminantes. Esse método é um dos mais populares, e devido isso, há uma grande desvantagem por não saber ao certo o valor do limite adequado. Muitos estudos consideram a seleção das variáveis com $VIP > 1$, mas nem sempre esse critério é utilizado, e os resultados encontrados na literatura nem sempre são comparáveis (GORROCHATEGUI *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar estudo metabolômico dos extratos etanólico de folha, casca e galho da *Schinopsis brasiliensis* por meio da técnica de UPLC-QTOF-MS^E aliado a análise quimiométrica e ensaio citotóxico *in vitro* frente a diferentes linhagens de células cancerígenas a fim de gerar o conhecimento de compostos advindos de uma planta local com potencial atividade anticâncer.

3.1 Objetivos Específicos

- Identificar os compostos químicos dos extratos etanólico da folha, casca e galho de baraúna;
- Interpretar os diferentes perfis metabólitos a partir dos dados de análise quimiométricas (PCA);
- Listar as variáveis, ou compostos discriminantes, que influenciam a separação dos grupos através da OPLS-DA e S-plot;
- Correlacionar os dados de quimiometria e atividade citotóxica com a finalidade de determinar compostos ou grupos de compostos ligados a tal ação.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais, equipamentos, reagentes

4.1.1 Análise por UPLC-QTOF-MS

- Equipamentos

As análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas em um sistema *Acquity* UPLC (Waters, Milford, MA, EUA), acoplada com um espectrômetro de massa por um sistema de Quadrupolo / TOF (Waters, Milford, MA, EUA).

A coluna cromatográfica utilizada foi: Waters *Acquity* UPLC BEH C₁₈ (150 x 2,1 milímetros, 1,7 um).

O modo de aquisição MS utilizado foi Xevo G2-XS QTof. O equipamento foi gerenciado pelo software Masslynks.

- Reagentes

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas, acetonitrila e o ácido fórmico, utilizados no preparo da fase móvel foram grau LCMS da marca Merck da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). A água ultrapura utilizada na composição da fase móvel foi obtida em um sistema Milli-Q® Integral Purification System da Merck Millipore (Billerica, MA, USA) (resistividade de 18,2 MΩ cm).

As substâncias padrões utilizadas na identificação química foram: ácido clorogênico e corilagina obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EUA) e a urundevina A que foi previamente isolada em nosso laboratório.

4.1.2 Extração

- Equipamentos e Materiais

As amostras foram pesadas em uma balança analítica MARTE/SHIMADZU MOD AY-220. A homogeneização das amostras foi feita em agitador Vórtex de tubos de ensaio. Antes das análises todas as amostras foram filtradas em membranas de filtração millipore com poros de 0,20 µm de diâmetro (Supelco, USA).

- Reagentes

Os solventes hexano e etanol utilizados na preparação dos extratos foram de grau analítico e da marca LiChrosolv® da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

4.1.3 Análise citotóxica

- Equipamentos

Na análise foi utilizado um espectrofotômetro de placa (Multimode Detector, DTX 880, Beckman Coulter) à 595 nm.

- Reagentes e Materiais

As linhagens celulares utilizadas nos testes de citotoxicidade foram: HCT-116 e SW-620 (colorretal), SF-295 (glioblastoma), HL-60 e RAJI (leucemia), PC3 (próstata) e L929 (fibroblasto murino) obtidas do Instituto Nacional de Câncer (EUA).

O solvente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para diluir as amostras foram de grau analítico da marca Êxodo Científica.

O reagente utilizado no método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) foi obtido da marca Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA) com 98% de grau de pureza.

4.2 Coleta e tratamento do material vegetal

As amostras de folha, casca e galho de baraúna foram coletadas no campo experimental da Embrapa Semiárido, próximas ao limite entre os municípios de (Petrolina e Lagoa Grande, Pernambuco, Brasil) no dia 24 de agosto de 2016. As amostras foram secas em estufa de ar circulante por 168h, a 40 °C. Posteriormente, o material vegetal seco foi moído em moinho de facas, e em seguida as amostras foram condicionadas em sacos plásticos fechados e transparentes, devidamente identificadas, protegidas do calor excessivo, umidade e luz.

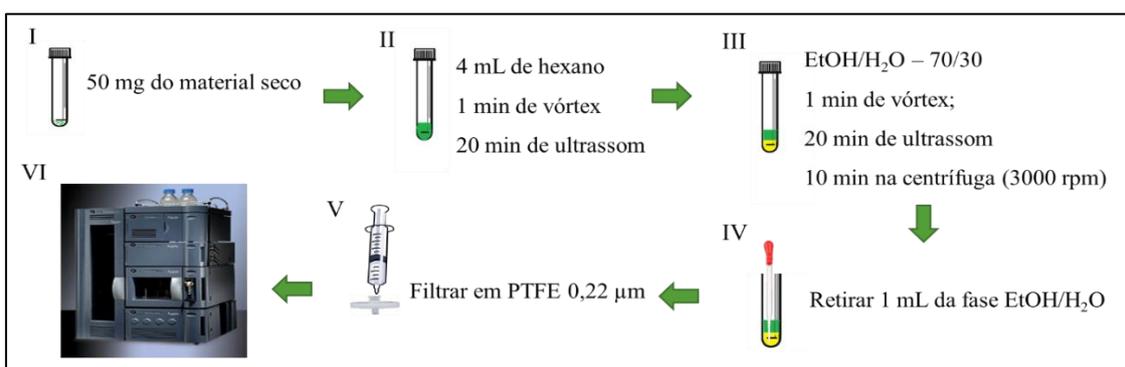
4.3 Metodologia de extração para análise exploratória em UPLC-QTOF-MS^E

A metodologia utilizada foi adaptada para a preparação dos extratos por partição líquido-líquido com ultrassom para análise em UPLC-QTOF-MS^E (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015; NEHME *et al.*, 2008).

Após a secagem e moagem do material, pesou-se, aproximadamente, 50 mg de cada seção da planta (folha, galho e casca). É importante ressaltar que o procedimento de extração das folhas, galhos e cascas foi realizado em quintuplicada, além disso foi realizado o branco da extração em triplicata, logo tem-se o total de 18 extrações. Após a pesagem do material seco, foi adicionado 4mL de hexano. A fim de homogeneizar a mistura, os tubos foram levados ao vórtex por 1 minuto. Em seguida, para a extração dos compostos apolares do material, foram colocados em banho ultrassom por 20 minutos com potência fixa de 135W. Adicionou-se 4 mL de uma solução Etanol/Água (70:30) a mistura. O mesmo procedimento descrito foi realizado para a homogeneização, com a posterior extração de compostos polares (fase etanólica de interesse) em banho ultrassom por 20 minutos. A separação do extrato não dissolvido da

solução foi realizada na centrifuga por 10 minutos à 3000 rpm. Finalmente, com o auxílio de uma pipeta de pasteur, foi retirado uma alíquota de 1mL da fase inferior (etanólica) e transferiu-a para a seringa acoplada ao filtro de PTFE 0,20 µm. O filtrado foi recolhido em *vials* e armazenados em ultrafreezer (-80°C) para posterior análise. O procedimento está descrito, a seguir, na forma de fluxograma para melhor entendimento, na Figura 7.

Figura 7- Fluxograma de extração líquido-líquido para análise em UPLC.



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

4.4 Condições das análises realizada em UPLC-QTOF-MS^E

A análise foi realizada em um sistema *Acquity* UPLC (Waters), acoplada com um sistema de Quadrupolo / TOF (Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As fases móveis foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; (15,1-17) min (100%) de B; (17,1-19,1) min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção da amostra de 5 µL.

O modo ESI (+) / ESI (-) foram adquiridos na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C. O fluxo do gás dessolvatação foi de 350 L/h e 500 L/h para ESI (+) / ESI (-), respectivamente. A voltagem capilar foi de 3kV e 2,6 kV para ESI (+) / ESI (-), respectivamente. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O espectrômetro foi operado com modo de aquisição MS^E centroide utilizando uma rampa de tensão de 20 a 40V.

4.5 Metodologia de extração para análise anticâncer

O procedimento de extração descrito na seção 4.3 foi novamente realizado, no entanto, em vez de recolher o filtrado em *vials* para UPLC, ele foi recolhido em frascos de vidro para sequente evaporação sob pressão reduzida, utilizando um rotaevaporador. A extração foi feita em triplicata, e todas as frações (de cada seção) foram colhidas no mesmo frasco com o propósito de obter maior massa possível. Após a evaporação, os extratos foram liofilizados, a fim de remover qualquer resíduo de água presente no extrato, e portanto, obter o extrato seco para a realização dos testes citotóxicos. Os respectivos tubos de cada amostra foram pesados para obtenção da massa final. Após a finalização da liofilização dos extratos, os frascos tiveram suas massas medidas para efetuar os cálculos de rendimento. Por fim, os tubos de vidro foram armazenados no ultrafreezer (-80°C) até a realização dos testes biológicos. É pertinente ressaltar que os tubos de vidro foram anteriormente tarados somente com a etiqueta para obtenção da massa inicial do tubo com o intuito de calcular a massa do extrato obtida após a liofilização.

4.6 Metodologia do ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A determinação de citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico do MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) (MOSMANN, 1983). As amostras foram diluídas em DMSO puro para concentrações de estoque de 20 mg/mL. As amostras foram testadas em concentração única em seis linhagens de células tumorais, sendo as que apresentaram resultados positivos para até duas linhagens tumorais foram realizados teste de CI_{50} . Os testes de citotoxicidade foram realizados frente às linhagens tumorais HCT-116 e SW-620 (Colorretal), SF-295 (Glioblastoma), HL-60 e RAJI (Leucemia), PC3 (Próstata) e L929 (Fibroblasto murinho), obtidas do Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SBF) e 1% de antibióticos (penicilina - 100U/mL, e estreptomicina - 100 μ g/mL), mantidas a 37°C com 5% de CO_2 . A linhagem L929 foi utilizada para avaliar a seletividade dos extratos, cultivada em condições padrão de DMEM com sais de Earle's. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, HCT-116/SW-620 ($0,7 \times 10^5$ céls/mL), SF-295/PC3/L929 ($0,1 \times 10^6$ céls/mL), HL60 ($0,3 \times 10^6$ céls/mL) e RAJI (4×10^5 céls/mL). Após 24 horas as amostras foram tratadas em concentração única e CI_{50} à 100 μ g/mL. As placas

foram incubadas com a substância por 72 horas. Ao término da incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de solução de MTT (10%) e RPMI 1640 e incubadas por 3h. Após a incubação as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 150 μ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa (Multimode Detector, DTX 880, Beckman Coulter) à 595 nm.

4.7 Parâmetros da análise estatística da atividade citotóxica

Todos os experimentos foram repetidos três vezes e realizados em duplicata. Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0.

4.8 Parâmetros de análise quimiométricas

Os dados UPLC-QTOF-MS^E das amostras determinadas foram analisados usando o software MarkerLynx (Waters) para identificar potenciais marcadores químicos discriminantes em diferentes partes da baráúna (folha, galho e casca). Apenas doze amostras foram incluídas no tratamento dos dados (quatro de cada parte da planta), as três restantes foram retiradas, pois foram consideradas outliers. Para a coleta de dados, os parâmetros do método foram definidos como intervalo de tempo de retenção, 0,70-7,0 min e intervalo de massa de 110-1200 Da, tolerância de massa 0,05 Da e nível de eliminação de ruído estabelecido em 5.

Para análise dos dados, foi feita uma lista gerada com a identificação dos picos detectados usando o tempo de retenção (t_r) - dados de massa (m/z). Uma identificação arbitrária foi atribuída a cada um desses pares (t_r) - (m/z) com base na ordem de eluição do sistema UPLC. A identificação dos íons foi baseada nos valores de t_r e m/z em comparação com os dados publicados anteriormente e comparados com padrões analíticos. As intensidades de íons para cada pico detectado foram normalizadas contra a soma das intensidades de pico dentro dessa amostra usando MarkerLynx. Os íons de diferentes amostras foram considerados os mesmos quando combinaram com seus valores t_r e m/z . Os dados brutos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) usando o modelo pareto. A análise discriminante dos mínimos quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA) foi utilizada para validar o modelo de PCA e

identificar os metabólitos diferenciais. Os biomarcadores foram selecionados pela variável de importância na projeção (VIP) juntamente com o S-Plot.

A segunda parte da análise quimiométrica foi realizada para investigar o perfil metabolômico das folhas, galhos e cascas de *S. brasiliensis*. A região entre 0,7 e 7,0 min nos 12 cromatogramas (quadruplicata de cada parte) foi convertida para arquivos *American Standard Code for Information Interchange* (ASCII) e importados pelo programa de software Origin™ 9.4 para a construção de matrizes numéricas.

Foi realizado um método hierárquico de análise de cluster resultando na visualização de um mapa de calor (*heat map*). A área dos 23 compostos das folhas, galhos e cascas foram importados para o software GENE-E para reconhecimento de padrões e a classificação foi realizada nas linhas e colunas. O método da distância de correlação de Pearson, usando o método de linkage completo, foi aplicado para aglomerar os tempos de retenção (linhas) e medir a proximidade entre as amostras (colunas). O resultado ilustra um dendrograma 3D (mapa de calor), onde a cor vermelho representa as intensidades relativas mais altas, azul claro as intensidades intermediárias e azul escuro, as intensidades relativas mais baixas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo e extração das amostras

Inicialmente, as amostras foram pesadas para obtenção da massa de amostra coletada e em seguida moídas em moinho de facas. Após a moagem, as amostras foram armazenadas em sacos de plástico com tara e guardadas a temperatura ambiente. Na Tabela 2 foi registrada as massas das amostras antes e após a pesagem com a respectiva tara dos sacos de plásticos cujos foram utilizados para a armazenagem do material moído.

Tabela 2- Valores de massa antes (m_a) e após a moagem (m_b) das folhas, cascas e galhos de *S. brasiliensis* com a respectiva tara (T).

Amostra	m_a (g)	m_b (g)	T (g)
Folha	134,39	134,63	2,88
Casca	229,37	225,13	2,88
Galho	123,86	123,08	2,88

Fonte: Elaborada pela autora

Posteriormente a moagem, foi realizada a pesagem em balança analítica de 50 mg, aproximadamente, de cada seção da planta (folha, galho e casca). As mesmas foram transferidas para os tubos de ensaio, em que se observa os valores de massa na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos de *S. brasiliensis* da extração para análise em UPLC.

Amostra	m(g)
SB-F-B	-
SB-F-1	0,0500
SB-F-2	0,0501
SB-F-3	0,0500
SB-F-4	0,0501
SB-F-5	0,0500
SB-C-B	-
SB-C-1	0,0501
SB-C-2	0,0501
SB-C-3	0,0500
SB-C-4	0,0500
SB-C-5	0,00501
SB-G-B	-
SB-G-1	0,0501
SB-G-2	0,0500
SB-G-3	0,0503
SB-G-4	0,0501
SB-G-5	0,0502

Fonte: Elaborada pela autora

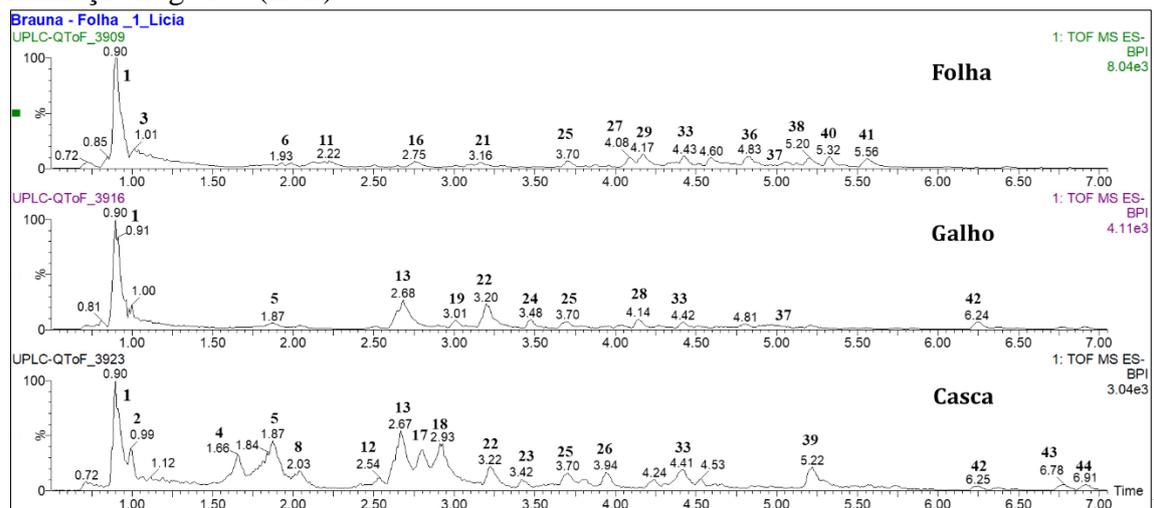
Onde, SB - *Schinopsis brasiliensis*; B= branco; 1 - 1º replicata; 2 - 2º replicata; 3 - 3º replicata; 4 - 4º replicata; 5 - 5º replicata

5.2 Análise de Identificação por UPLC-QTOF-MS^E

Seguida a realização dos experimentos de microextração líquido-líquido das três seções da planta, as amostras foram injetadas e analisadas pela técnica de UPLC-QTOF-MS^E seguindo os parâmetros relatados na seção 4.6, considerando os dois modos de ionização: positivo e negativo. Dessa forma foi possível obter uma análise comparativa entre o perfil dos metabólitos da folha, casca e galho da planta. Como resultado foram, tentativamente, identificados cerca de 40 metabólitos incluindo diversos compostos fenólicos como flavonóis e chalconas. A identificação foi realizada utilizando os espectros de MS e MS/MS de cada pico,

aliado as rotas de fragmentação, conjuntamente a uma intensa busca na literatura com artigos relacionados ao gênero (*Schinopsis*) e a família (Anacardiaceae) e com auxílio de bases de dados como Chempider e Pubchem. Como resultado, a folha apresentou o perfil mais diferenciado comparado às outras partes, na qual se observa diversos compostos derivados da quercetina e do ácido gálico. A composição química do galho e da casca são, aparentemente parecidas, apresentando alguns derivados de ácido quínico e compostos bastante conhecidos na literatura devido suas propriedades biológicas como corilagina, ácido clorogênico e urundevina A. As Figuras 8 e 9 apresentam os cromatogramas, no modo negativo (1) e positivo (2), dos extratos de folha, galho e casca de baraúna. Em seguida, está relatada a tabela de identificação dos extratos juntamente com as estruturas moleculares dos compostos identificados (Tabela 4).

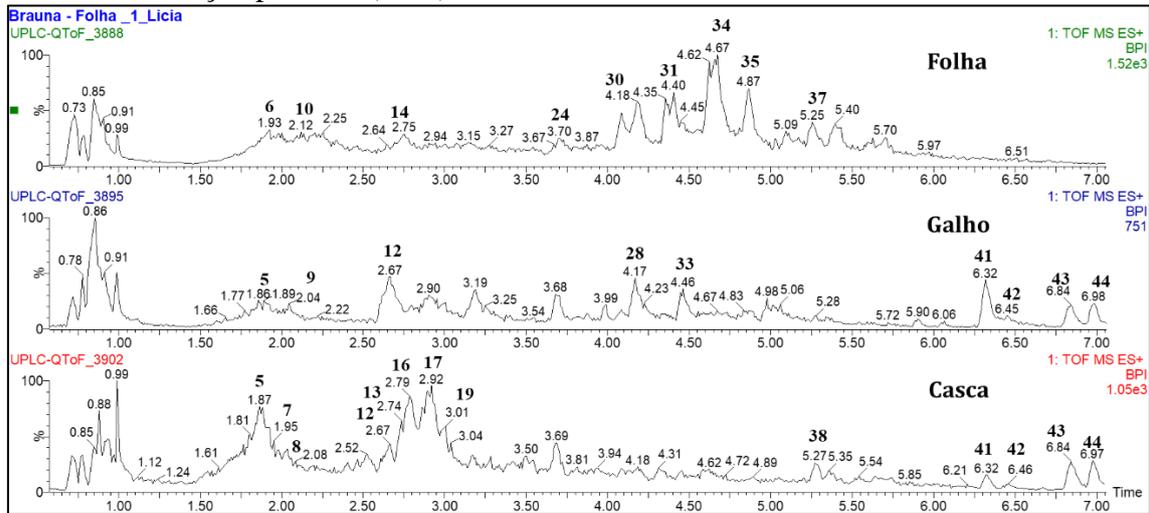
Figura 8- Cromatogramas dos extratos da folha, galho e casca de *S. brasiliensis* no modo de ionização negativo (ESI).



Fonte:

Elaborada pela autora (2017).

Figura 9- Cromatogramas dos extratos da folha, galho e casca de *Schinopsis brasiliensis* no modo de ionização positivo (ESI⁺).



Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Tabela 4- Tentativa de identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da folha, galho e casca de *S. brasiliensis*.

Picos	t _r (min)	Modo de ionização negativo			Modo de ionização positivo			Fórmula molecular	Tentativa de identificação	S. <i>brasiliensis</i> Folha	S. <i>brasiliensis</i> Galho	S. <i>brasiliensis</i> Casca	Referências
		MS [M-H] ⁻	MS/MS	ppm	MS [M+H] ⁺	MS/MS	ppm						
1	0,90	191,0549	173,0440 127,0401 85,0333	-3,7	-	-	-	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quínico ^a	+	+	+	(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a; SRIVASTAVA, 2016)
2	0,99	191,0189	133,0167 111,0075	-1,6	-	-	-	C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico ^a			+	(OJEWOLE, 2003)
3	1,00	191,0496	133,0151 85,0302	-3,7	-	-	-	C ₁₄ H ₈ O	n.i	+	+		-
4	1,66	343,0655	191,0497 169,0125 125,0265	-5,2	-	-	-	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	Ácido quínico galoil isômero I ^a			+	(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a; ERSAN <i>et al.</i> , 2016)
5	1,87	343,0634	191,0522 169,0082 125,0193	-2,9	345,0817	153,0187 125,0203	-1,4	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	Ácido quínico galoil isômero II ^a		+	+	(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a; ERSAN <i>et al.</i> , 2016)
6	1,93	465,1231	271,0438 169,0129 125,0238	-2,8	467,1385	315,0734 153,0202	-3,4	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₄	n.i	+			-
7	1,95	-	-	-	345,0824	153,0210	0,6	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	Ácido quínico galoil isômero III			+	(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a; ERSAN <i>et al.</i> , 2016)
8	2,03	343,0835	191,0540 169,0121 125,0247	2,3	345,0824	153,0209	0,6	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	Ácido quínico galoil isômero IV			+	(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a; ERSAN <i>et al.</i> , 2016)

Fonte : Elaborado pela autora (2017).

Tabela 4- Tentativa de identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da folha, galho e casca de *S. brasiliensis*.

9	2,04	-	-	-	315,0710	153,0193 125,0159	-1,9	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	Levoglucosan galato isômero I ^a	+		(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
10	2,12	-	-	-	315,0726	153,0215 125,0114	3,2	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	Levoglucosan galato isômero II ^a	+		(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
11	2,22	449,1292	271,0503 169,0157 125,0159	-0,7	-	-	-	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₃	n.i	+		-
12	2,54	495,0789	343,0688 191,0524 169,0148	2,8	-	-	-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ácido quínico digaloil isômero I	+		(FRAIGE <i>et al.</i> , 2017; SANTOS <i>et al.</i> , 2017)
13	2,65	353,0856	191,0531 179,0337 135,0439	-4,8	355,1042	163,0403 89,0397	3,7	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogênico ^a	+	+	(HASSAN <i>et al.</i> , 2011; WILLEMS <i>et al.</i> , 2016)
14	2,73	-	-	-	497,0946	479,0812 309,0629 153,0195	3,0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ácido quínico digaloil isômero II	+		(FRAIGE <i>et al.</i> , 2017; SANTOS <i>et al.</i> , 2017)
15	2,74	-	-	-	315,0729	153,0209 125,0215	4,1	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	Levoglucosan galato isômero III	+		(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
16	2,75	389,1086	271,0392 169,0164 125,0276	0,5	-	-	-	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	n.i	+		-
17	2,78	495,0750	343,0645 191,0562 169,0143	-5,0	497,0954	479,085630 9,0629 153,0203	4,6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ácido quínico digaloil isômero III	+		(FRAIGE <i>et al.</i> , 2017; SANTOS <i>et al.</i> , 2017)
18	2,93	495,0759	343,0643 191,0616 169,0119	-3,2	497,0956	479,0872 309,0630 153,0201	5,0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ácido quínico digaloil isômero IV	+		(FRAIGE <i>et al.</i> , 2017; SANTOS <i>et al.</i> , 2017)

Fonte : Elaborado pela autora (2017).

Tabela 4- Tentativa de identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da folha, galho e casca de *S. brasiliensis*.

19	3,01	359,0991	169,0140	3,6	-	-	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	etil- <i>O</i> -β-D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	+	(SANTOS <i>et al.</i> , 2017)	
20	3,01	-	-	-	497,0926	479,0812 309,0629 153,0195	-1,0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ácido quínico digaloil isômero IV	+	(FRAIGE <i>et al.</i> , 2017; SANTOS <i>et al.</i> , 2017)	
21	3,16	321,0239	169,0121 125,0238	-2,5	-	-	-	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	Ácido digálico ^a	+	(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)	
22	3,21	453,1016	313,0551 179,0317 169,0128	-3,8	-	-	-	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₂	2-hidroxi-4-metoxifenol 1- <i>O</i> -β-D-(6'- <i>O</i> -galoil) glucopiranosídeo	+	(SANTOS <i>et al.</i> , 2017)	
23	3,48	633,0762	463,0793 300,9986 169,0133	5,4	-	-	-	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Corilagina ^a	+	(SRIVASTAVA, 2016) Padrão analítico	
24	3,69	635,0938	457,0819 169,0127 125,0114	-0,8	-	-	-	C ₂₀ H ₂₈ O ₂₃	n.i	+	-	
25	3,70	631,0961	479,0884 169,0130 125,0231	4,1	633,1121	319,0495 153,0235	4,6	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₇	n.i	+	+	-
26	3,94	923,1716		4,9	-	-	-	C ₄₆ H ₃₆ O ₂₁	n.i		+	-
27	4,08	787,1006	635,0993 465,0739 169,0145	1,5	-	-	-	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	tetra- <i>O</i> -galoil-glucose isômero I ^a	+	(BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004)	
28	4,14	787,1068	615,0982 169,0111	-2,5	-	-	-	C ₄₅ H ₂₄ O ₁₄	n.i	+	-	

Fonte : Elaborado pela autora (2017).

Tabela 4- Tentativa de identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da folha, galho e casca de *S. brasiliensis*.

29	4,16	787,1042	635,0993 169,0068 617,1226	6,0	-	-	-	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	tetra- <i>O</i> -galoyl-glucose isômero II ^a	+			(BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004)
30	4,17	-	-	-	467,0858	153,0191	6,9	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₃	<i>O</i> -galoilnorbergenina ^a	+			(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
31	4,18	615,0983	-	-0,5	617,1168	303,0540 153,0210	4,1	C ₂₈ H ₂₄ O ₂₂	Miricitrina <i>O</i> -galato isômero I ^a	+			(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
32	4,40	-	-	-	617,1122	303,0524	-3,4	C ₂₈ H ₂₄ O ₂₂	Miricitrina <i>O</i> -galato isômero II ^a	+			(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
33	4,41	939,1135	787,1022 769,0886 467,0977	3,3	-	-	-	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	Penta- <i>O</i> -galoil-β-D ^a	+	+	+	(ERSAN <i>et al.</i> , 2016)
34	4,46	-	-	-	771,1117	153,0194	9,3	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₁	di- <i>O</i> -galoil-2,3-(<i>S</i>)-hexahidroxidifenol-silo-quercitol ^a	+			(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)
35	4,67	463,0877	301,0325		465,1042	303,0537	1,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina- <i>O</i> -hexosídeo ^a	+			(BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004)
36	4,83	615,0992	463,0869 301,0328 169,0112	1,0	617,1132	303,0486	-1,8	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	Quercetina- <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-hexosídeo	+			(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
37	5,05	1091,1239	939,1112 769,1029 433,0771	2,4	-	-	-	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	Hexagaloil-hexosídeo ^a	+	+		(ABU-REIDAH <i>et al.</i> , 2015a)

Fonte : Elaborado pela autora (2017).

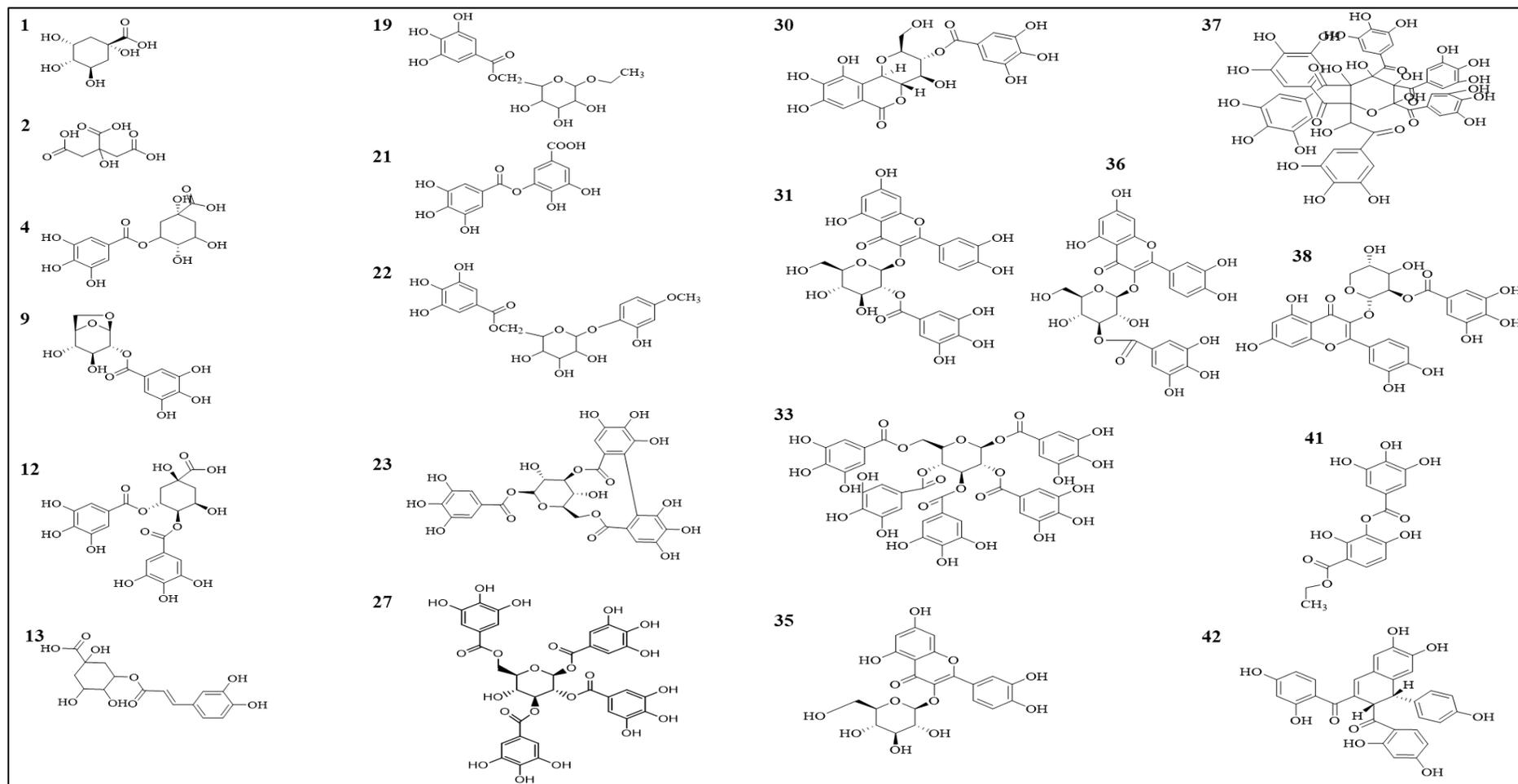
Tabela 4- Tentativa de identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da folha, galho e casca de *S. brasiliensis*.

38	5,20	585,0894	469,2008 301,0325 169,0166	2,4	587,1027	457,0462 303,0493 153,0224	-1,7	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	Quercetina galoil pentosídeo ^a	+			(ERSAN <i>et al.</i> , 2016)
39	5,22	619,1095	449,0901 169,0164 125,0459	1,1	621,1203	451,1079 301,0754 153,0187	-6,6	C ₃₁ H ₂₄ O ₁₄	n.i		+		-
40	5,32	523,2187	469,2070 169,0137 125,0575	1,5	-	-	-	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	n.i		+		-
41	5,55	349,0580	198,0759 197,0420 169,0096	5,7	-	-	-	C ₁₆ H ₁₄ O ₉	Etil 2,4-dihidroxi- 3-(3,4,5- trihidroxibenzoil) oxibenzoato		+		(DORTA <i>et al.</i> , 2014)
42	6,24	525,1210	389,1068 371,1021 169,0185 135,0057	4,6	527,1376	417,1063 137,0260	6,4	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Urundevina A isômero I ^a		+	+	(VIANA; BANDEIRA; MATOS, 2003) Padrão analítico
43	6,78	525,1205	389,1053 371,0912 169,0130 135,0101	3,6	527,1379	417,1101 137,0269	9,3	C ₃₀ H ₂₂ O ₉	Urundevina A isômero II ^a		+	+	Padrão analítico
44	6,92	523,1061	387,0897 135,0090	6,1	525,1228	415,0859 389,1020	8,0	C ₃₀ H ₂₀ O ₉	n.i			+	-

Fonte: Elaborado pela autora (2017).

^a Compostos que foram previamente identificados em várias espécies pertencentes à família Anacardiaceae, mas, a nosso conhecimento, foram relatados pela primeira vez em *S. brasiliensis*.

Figura 10- Estruturas química dos compostos tentativamente identificados.



Fonte : Elaborado pela autora (2017).

5.2.1 Perfil químico do extrato da folha de *S.brasiliensis*

O sinal **1**, observado apenas no modo de ionização negativo, apresenta íon precursor $[M-H]^-$ em m/z 191,0549 ($C_7H_{12}O_6$). No espectro MS^2 foi observado fragmentos em m/z 173,0440 $[M-H-H_2O]^-$ e 127,0401 $[M-H-CO-2H_2O]^-$ característico pela perda de uma molécula de H_2O e da saída de monóxido de carbono, juntamente, de duas moléculas de água, respectivamente. Com base na literatura foi identificado como ácido quínico já relato por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015) e (SRIVASTAVA, 2016).

O sinal **3** apresenta íon desprotonado $[M-H]^-$ m/z 191,0496 ($C_{14}H_8O$). O espectro de MS^2 exibe as seguintes fragmentações 133,0151 e 85,0302. Trata-se de um composto não identificado, após uma intensa busca na literatura.

Os sinais **6**, **11**, **16**, **25** e **40** de íons precursores de $[M-H]^-$ em m/z 465,1231; 449,1292; 389,1086; 631,0961 e 523,2187, respectivamente, tratam-se de compostos não identificados. Esses compostos exibem um padrão de fragmentação semelhante, com íons fragmentos MS/MS 169 e 125, correspondente ao íon desprotonado e um fragmento característico, respectivamente, do ácido gálico. Ou seja, é provável que essas moléculas sejam derivadas de ácido gálico.

Os sinais **9**, **10** e **15** apresentaram o mesmo íon protonado $[M+H]^+$ em m/z 315,0710 ($C_{13}H_{14}O_9$) com fragmentos MS/MS m/z 153,0193 e 125,0159, característicos do levoglucosano galato I, II e III, identificado anteriormente por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015).

No sinal **21**, foi observado no espectro de massas de primeira ordem o íon desprotonado $[M-H]^-$ 321,0239 ($C_{14}H_{10}O_9$), e no de segunda ordem foi verificada a presença dos íons fragmentos m/z 169,0121 e 125,0238. De acordo com a literatura consultada, a correlação das massas do MS e do MS/MS indica que o composto seja o ácido digálico (ABU-REIDAH *et al.*, 2015).

Os sinais **27** e **29** apresentaram o mesmo íon precursor $[M-H]^-$ em m/z 787,1068 ($C_{34}H_{28}O_{22}$), que de acordo com (BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004) indica a presença de tetra-*O*-galoil-glucose. Essa correlação foi baseada também nos íons fragmentos MS^2 635,0993 $[M-H-152]^-$ correspondente a saída de uma unidade galoil; 617,1226 $[M-H-170]^-$ referente a saída de um ácido gálico e 465,0739 $[M-H-152-170]^-$ indicando a perda de galoil e ácido gálico.

Os sinais **31** e **32** também apresentaram a mesma razão $[M+H]^+$ m/z 617,1168 ($C_{28}H_{24}O_{22}$). O espectro MS/MS exibiu fragmentos 303,0540 e 153,0210, correspondente ao

composto Miricitrina *O*-galato, relatado por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015) com o mesmo padrão de fragmentação.

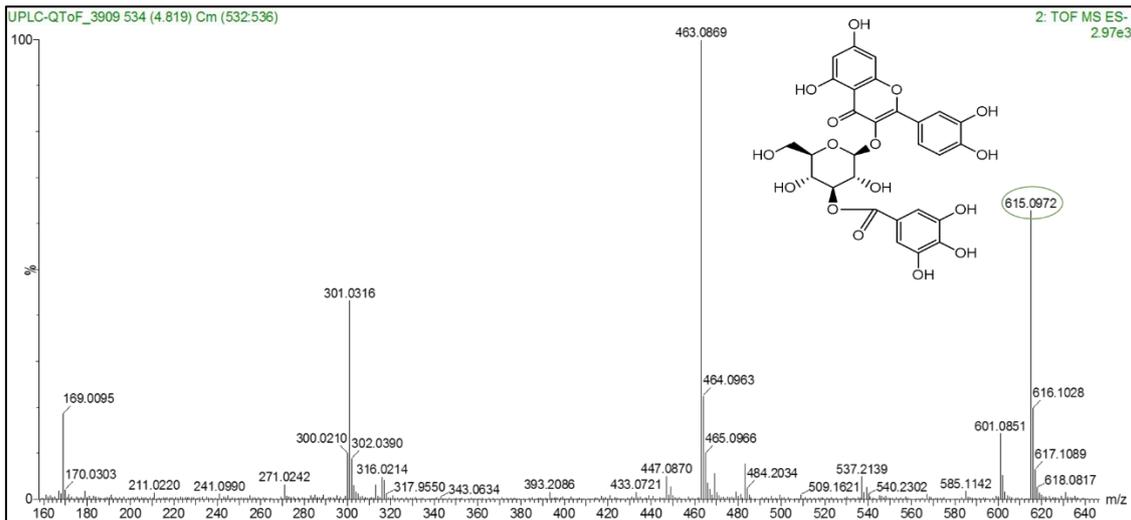
O composto **33** foi identificado como pentagaloil hexosídeo que apresenta íon precursor $[M-H]^-$ em m/z 939,1135 ($C_{41}H_{32}O_{26}$). Segundo (ERSAN *et al.*, 2016), o padrão de fragmentação exibe os íons 769 Da, 617 Da e 787 Da que corresponde ao mesmo obtido no espectro MS^2 . O íon fragmento em m/z 787,1022 $[M-H-152]^-$ indica a perda de uma unidade galoil, e o de m/z 769,0886 $[M-H-170]^-$ correspondente a saída de uma unidade de ácido gálico.

No extrato etanólico da folha, foram identificados três flavonóides glicosilados derivados da quercetina de íons precursores $[M-H]^-$ em m/z 463,0877 (sinal **35**), 615,0992 (sinal **36**) e 585,0894 (sinal **38**), que geram perdas de m/z 132 e 162 atribuídas a pentosídeos e hexosídeos, respectivamente. Entre este padrão de fragmentação, o íon fragmento m/z 301 é o mais característico correspondente a aglicona, quercetina.

O sinal **35** de íon precursor $[M-H]^-$ e $[M + H]^+$ m/z 463,0877 e 465,1073 ($C_{21}H_{20}O_{12}$), respectivamente, foi identificado por (FRAIGE *et al.*, 2017), como quercetina-*O*-hexosídeo. O íon fragmento mais característico do composto é o de m/z 301,0325 $[M-H-152]^-$ correspondente à perda de uma porção galoil.

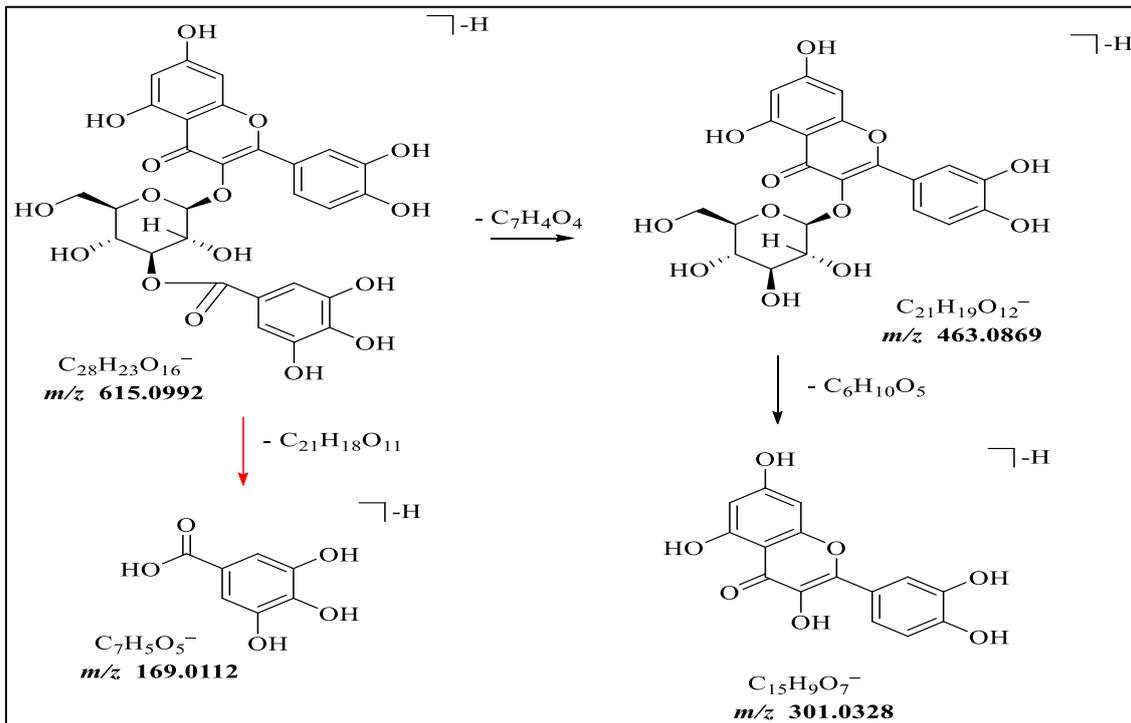
O sinal **36** exibe o íon precursor $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$ m/z 615,0992 e 617,1167 ($C_{28}H_{24}O_{16}$), respectivamente. Anteriormente relatado por (SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013) o composto é identificado como quercetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo. O espectro MS^2 , no modo de ionização negativo, apresenta íons fragmentos característicos em m/z 463,0851 $[M-H-152]^-$ equivalente à saída de uma unidade galoil e 301,0331 $[M-H-152-162]^-$ correspondente à quercetina desprotonada. O espectro de MS^2 e a rota de fragmentação observada neste composto está apresentado nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11-Espectro MS² da quercetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo.



Fonte : Elaborado pela autora (2017).

Figura 12-Padrão de fragmentação da quercetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo.



Fonte : Adaptado de (FRAIGE *et al.*, 2017).

O sinal **37** foi identificado como hexagaloiil-hexosídeo relatado por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015) de $[\text{M-H}]^-$ em m/z 1091,1239 ($\text{C}_{48}\text{H}_{36}\text{O}_{30}$). O padrão de fragmentação foi confirmado pela presença dos fragmentos em m/z 939,1112 $[\text{M-H}-152]$, 769,1029 $[\text{M-H}-152-170]$ e 393,2011, que correspondem a perdas sucessivas de unidades galoiil.

O sinal **38**, previamente relatado por (FRAIGE *et al.*, 2017), de $[M-H]^-$ m/z 615,0992 ($C_{27}H_{22}O_{15}$) identificado como quercetina galoil pentosídeo. O espectro MS^2 exibe o mesmo padrão de fragmentação que o outros, apresentando perdas adicionais de unidades de galloyl correspondentes à clivagem da ligação de éster de ácido gálico, além da saída de uma hexose.

O sinal **41**, foi descrito por (DORTA *et al.*, 2014) e tentativamente identificado como Etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxibenzoato de $[M-H]^-$ em m/z 349,0580, cuja fórmula molecular é $C_{16}H_{14}O_9$. De acordo com os autores, os íons fragmentos m/z 197,0420 $[M-H-152]^-$ e 169,0096 $[M-H-180]^-$ correspondem a presença de galato de etila e ácido gálico, respectivamente.

5.2.2 Perfil Químico do extrato dos galhos de *S. brasiliensis*

Os sinais **1**, **3**, **33** e **37** correspondem aos mesmos compostos encontrado no extrato das folhas com o mesmo tempo de retenção, 0,90; 1,0; 4,41 e 5,05 minutos. O sinal **1** foi identificado como ácido quínico de $[M-H]^-$ em m/z 191,0546 ($C_7H_{12}O_6$), o sinal **3** refere-se à um composto não identificado de íon precursor $[M-H]^-$ 191,0496. Os sinais **33** e **34** foram identificados como pentagaloil hexosídeo já relato por (ERSAN *et al.*, 2016) e hexagaloil hexosídeo por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015), respectivamente.

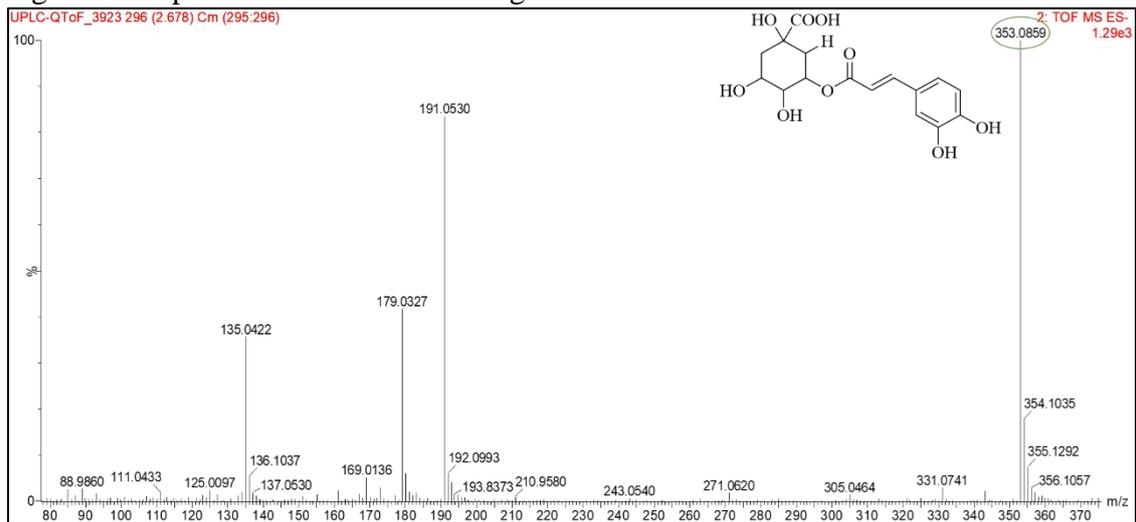
O sinal **5** refere-se à um derivado do ácido quínico, identificado por (ERSAN *et al.*, 2016) como ácido quínico galoil. O espectro de MS apresenta um íon precursor em m/z 343,0705 ($C_{14}H_{16}O_{10}$). A identificação foi baseada também no espectro de MS^2 indicando os íons fragmentos característicos 191,0533 $[M-H-152]^-$ que mostra a saída de uma unidade galoil, restando o precursor (ácido quínico), e os íons em m/z 169,0131 e 125,0265.

O sinal **9**, observados no modo de ionização positivo, apresenta o íon precursor desprotonado em m/z 315,0718 ($C_{13}H_{14}O_9$). Esse composto também foi identificado no extrato da folha com tempos de retenção parecidos. Segundo (ABU-REIDAH *et al.*, 2015), esse composto foi identificado como um isômero do levoglucosan galato isômero I.

O sinal **13** apresentou em seu espectro de primeira ordem o íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 353,0843 ($C_{16}H_{18}O_9$). Com base no seu espectro MS^2 , foi possível identificá-lo como ácido clorogênico, relatado por (WILLEMS *et al.*, 2016) através do padrão de fragmentação característico com íons fragmentos m/z 191,0531 $[M-H-162]^-$, formado pela clivagem da ligação éster entre as porções de ácido quínico e ácido cafeico, e o íon m/z

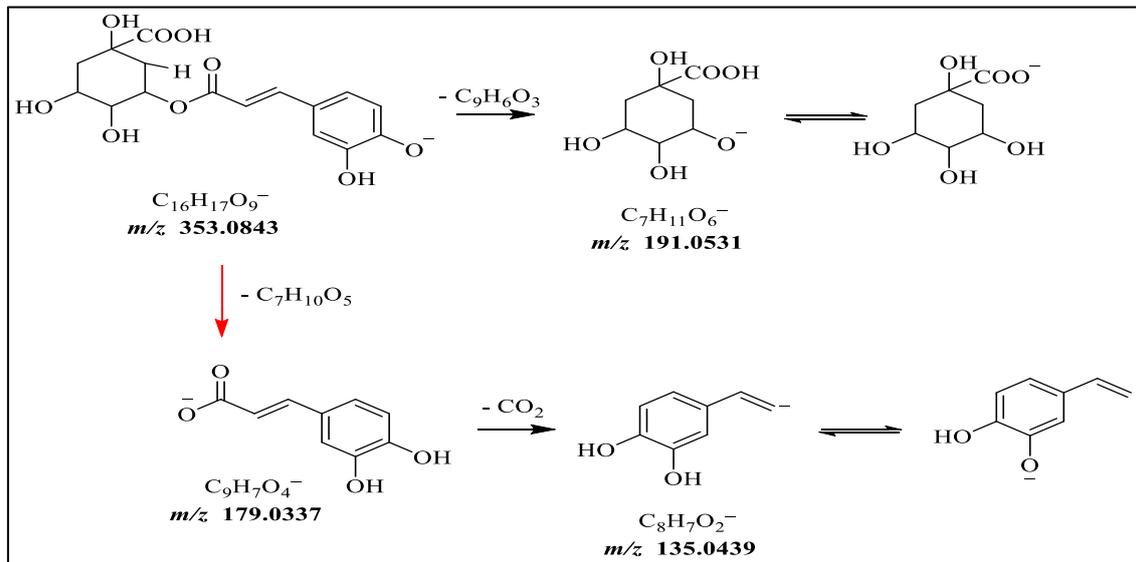
179,0337, que perde uma unidade de dióxido de carbono para produzir o íon m/z 135,0439. Além disso, a identificação é confirmada com base no espectro MS^2 do padrão de ácido clorogênico juntamente com a rota de fragmentação, observado nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13-Espectro MS^2 do ácido clorogênico



Elaborado pela autora (2017).

Figura 14- Padrão de fragmentação do ácido clorogênico.



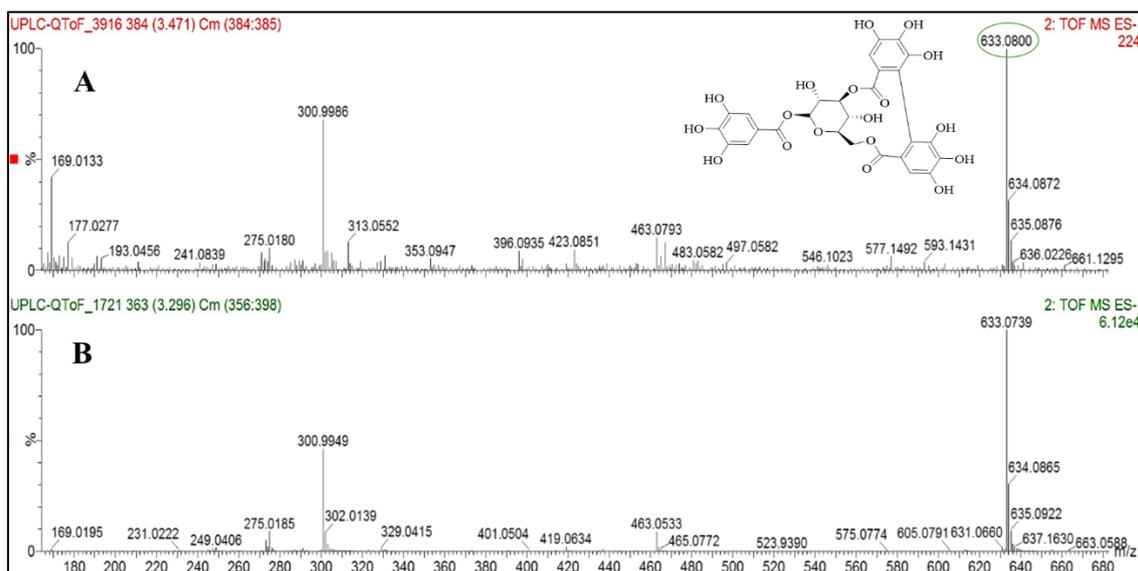
Adaptado de (WILLEMS *et al.*, 2016)

Os sinais **19** e **22** apresentaram íon precursor $[M-H]^-$ em m/z 359,0991 ($C_{15}H_{20}O_{10}$), 453,1030 ($C_{20}H_{22}O_{12}$), respectivamente. Foram identificados como etil-*O*-β-D-(6'-*O*-galoil)-

glucopiranosídeo (5) e 2-hidroxi-4-metoxifenol-1-*O*-(6'-*O*-galoil)- β -D-glucopiranosídeo (7). Anteriormente, foram relatados por (SANTOS *et al.*, 2017), os quais exibem um padrão de fragmentação característicos do que foi observado nos espectros de MS². Além do que, o íon fragmento *m/z* 169 é comum aos dois compostos, indicando que são derivados do ácido gálico.

O sinal **23** apresentou em seu espectro de primeira ordem, o íon desprotonado [M-H]⁻ em *m/z* 633,0762 (C₂₇H₂₂O₁₈) e fragmentos no modo MS² em *m/z* 463,0516 [M-H-152-H₂O]⁻, relativo às perdas sequenciais de galoil e H₂O; *m/z* 300,9986 [M-H-152-180]⁻ correspondente à perda de uma unidade de galoil com uma hexose, anteriormente identificada como corilagina, por (SRIVASTAVA, 2016). De acordo com a fragmentação dos íons do padrão analítico em comparação com o obtido, observado na Figura 15, a tentativa de identificação pode ser confirmada.

Figura 15- Espectro MS² da corilagina na amostra (A) e como padrão analítico (B).



Fonte :

Elaborado pela autora (2017).

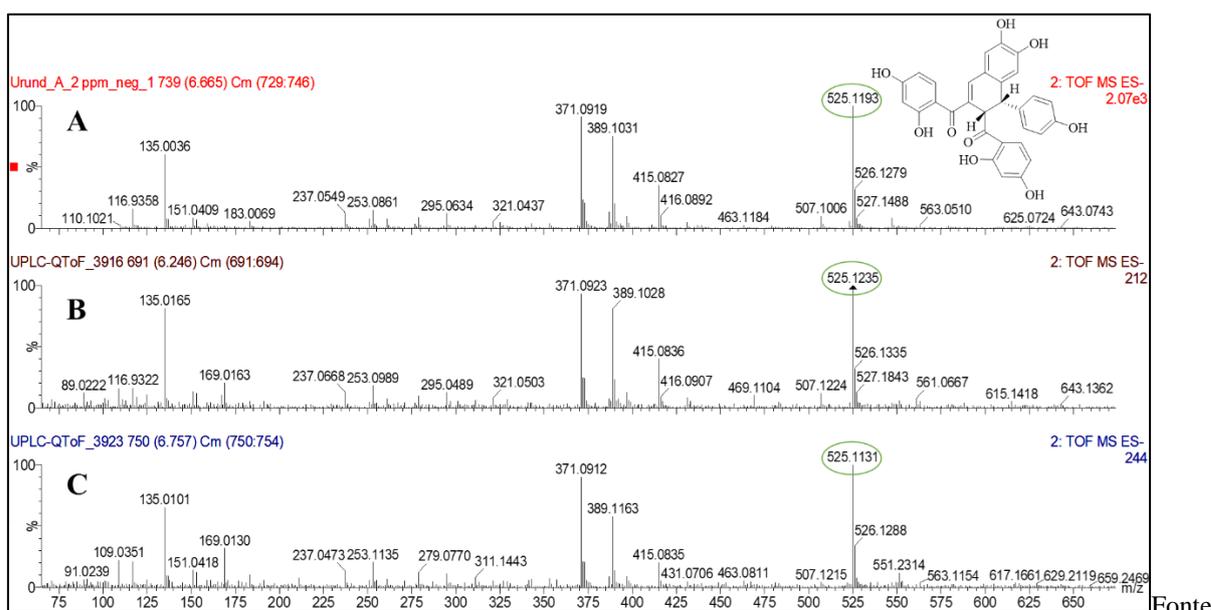
O sinal **30**, visto apenas no modo positivo, apresenta íon protonado [M+H]⁺ em *m/z* 467,0870 (C₂₀H₁₈O₁₃). Seu espectro MS² exibe um íon fragmento em *m/z* 153,0191, característico do composto *O*-galoil norbergenina, inicialmente identificado por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015a).

O sinal **34**, observado apenas no modo positivo, apresenta íon precursor em *m/z* 771,1119 [M+H]⁺ (C₃₄H₂₆O₂₁). O espectro de segunda ordem exibe um íon fragmento característico em *m/z* 153,0194 que também é observado no padrão de fragmentação relatado

por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015). O composto foi identificado como di-*O*-galoil-2,3-(*S*)-hexahidroxi-difenil-silo-quercitol.

Os sinais **42** e **43** apresentaram íons desprotonados de m/z 525,1233 e 525,1205 ($C_{30}H_{22}O_9$). Os compostos foram identificados como isômeros da urundevina A, de acordo com a fórmula molecular calculada, essas moléculas já foram identificadas anteriormente no gênero por (VIANA; BANDEIRA; MATOS, 2003) e na espécie *S. brasiliensis* por (MOREIRA, 2014). Para a confirmação da identificação, o padrão analítico, previamente isolado, foi injetado afim de comparar os tempos de retenção e espectros de massas com o composto observado no extrato e observou-se tempos de retenção similares e os mesmos fragmentos gerados pelo espectro MS^2 , como visto na Figura 16.

Figura 16-Espectro MS^2 da urundevina A, padrão analítico (A) e nas amostras (B, C).



: Elaborado pela autora (2017).

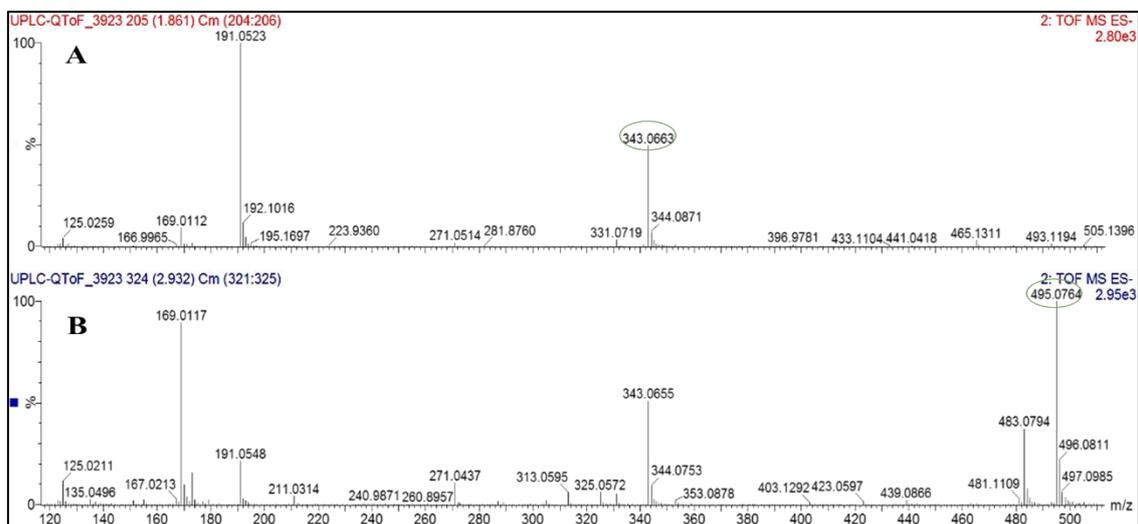
5.2.3 Perfil Químico do extrato da casca de *S. brasiliensis*

Os sinais **1** e **2** apresentaram em seus espectros de primeira ordem o íon precursor em m/z 191 $[M-H]^-$, contudo cada um obteve espectro de segunda ordem diferentes. Esses dois compostos foram previamente identificados por (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004). O sinal **1**, observado, anteriormente, na folha e no galho com o mesmo tempo de retenção (0,90 minutos), exibiu íons fragmentos em m/z 85, 93 e 127, característicos, apenas, do ácido quínico,

já identificado. O sinal **2**, baseado em seu espectro MS², foi possível identificá-lo como ácido cítrico, através de um íon fragmento em m/z 111, decorrente a perda de carboxilato juntamente de duas moléculas de água.

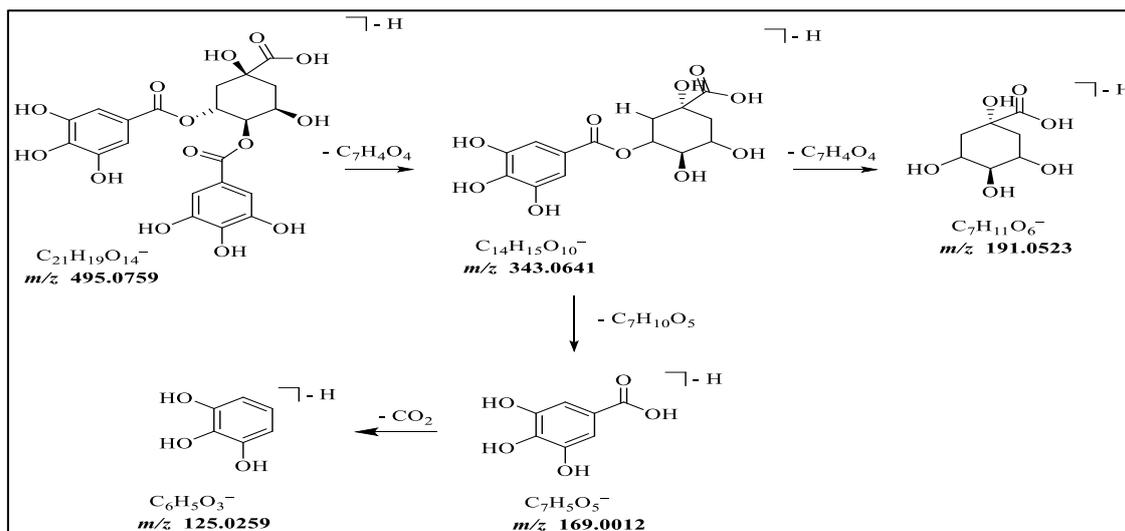
Os sinais **4, 5, 7, 8, 12, 14, 17, 18** e **20** foram identificados como derivados do ácido quínico. Os compostos **4, 5** e **8** apresentaram íon desprotonado [M-H]⁻ em m/z 343,0655 (C₁₄H₁₆O₁₀), exibindo fragmentos em modo MS² em m/z 191,0497 [M-H-152]⁻ e 169,0125 [M-H-174]⁻, correspondentes ao ácido quínico e ácido gálico, ambos desprotonados, respectivamente. Os compostos **12, 17** e **18** exibiram em seu espectro de primeira ordem o íon precursor [M-H]⁻ em m/z 495,07 (C₂₁H₂₀O₁₄), apresentando os mesmos íons fragmentos em m/z 191 e 169, com adição do íon m/z 343 [M-H-152]⁻, indicando perda de unidade galoil. Com base na literatura foram identificados como ácido quínico galoil (**4, 5, 6, 8**) e ácido quínico digaloil (**12, 14, 17, 18**). Os outros sinais **7, 14** e **20** são observados, apenas no modo de ionização positivo, apresentando razão m/z de 345,0818; 497,0975 e 497,0926, respectivamente, que confirmam a tentativa de identificação. O espectro de massas e as rotas de fragmentação desses compostos estão apresentados na Figura 17 e 18, respectivamente.

Figura 17-Espectro MS² do ácido quínico galoil (A) e do ácido quínico digaloil (B).



Fonte : Elaborado pela autora (2017).

Figura 18-Padrão de fragmentação do ácido quínico galoil e digaloil.



Fonte : Elaborado pela autora (2017).

Os sinais **13**, **22**, **33**, **42** e **43** equivale aos mesmo compostos identificados no extrato do galho. O sinal **13** refere-se ao ácido clorogênico m/z 353,0835 $[M-H]^-$, o sinal **22** ao 2-hidroxi-4-metoxifenol 1- O - β -D-(6'- O -galoil) glucopiranosídeo m/z 453,1016 $[M-H]^-$, o pico **33** de m/z 939,1160 $[M-H]^-$ correspondente ao pentagaloil hexosídeo. E os sinais **42** e **43** de íons moleculares $[M-H]^-$ em m/z 525,1210 e 525,1215, identificados como isômeros da urundeuvina A.

Os sinais **24**, **26** e **39** de íons precursores $[M-H]^-$ em m/z 635,0938; 923,1718 e 619,1095, respectivamente, tratam-se de compostos não identificados. Esses compostos exibem um padrão de fragmentação parecido, com íons fragmentos de m/z 169 e 125 que corresponde ao íon molecular desprotonado e um fragmento característico, respectivamente, do ácido gálico. Ou seja, provavelmente essas moléculas sejam derivadas do ácido gálico.

5.3 Análise da atividade citotóxica dos extratos de folha, galho e casca de *S. brasiliensis*

5.3.1 Extração para análise anticâncer

A metodologia de extração para a análise anticâncer foi realizada, como apresentada na seção 4.5. A Tabela 5 apresenta todos os valores de massa obtidos nessa metodologia, onde **m_{SB}** é a massa de cada amostra, **T** é a tara dos frascos de vidro, **m_f** é a massa do frasco com o extrato após a

liofilização e m_L é a massa do extrato liofilizado. Como as replicatas foram colhidas no mesmo frasco, o cálculo de rendimento (R%) levou em consideração a massa total de cada seção da planta.

Tabela 5-Valores de massa das amostras de folhas, cascas e galhos de *S. brasiliensis* para análise anticâncer bem como da tara dos frascos de vidro, massa final dos frascos e massa do extrato obtida.

Amostra	m_{SB} (g)	T (g)	m_f (g)	$m_L = m_f - T$ (g)	[R%]
SB-F-1	0,0505	20,8410	20,8611	0,0201	13,27%
SB-F-2	0,0505				
SB-F-3	0,0505				
SB-C-1	0,0503	21,0405	21,0651	0,0246	16,32%
SB-C-2	0,0502				
SB-C-3	0,0502				
SB-G-1	0,0503	21,0170	20,0391	0,0154	10,23%
SB-G-2	0,0501				
SB-G-3	0,0501				

Fonte: Elaborada pela autora.

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

5.3.2 Concentração Única e IC_{50}

Nesse trabalho, baseado nos experimentos realizados, exposto na seção 4.6, pôde-se analisar a eficiência dos extratos de folhas, cascas e galhos de baráúna frente às diversas linhagens de células tumorais. A Tabela 6, mostra os resultados do ensaio de citotoxicidade dos extratos através das médias das inibições de crescimento celular frente às linhagens tumorais.

Tabela 6- Percentual de inibição da proliferação celular (%) de extratos etanólico de casca, galho e folha de *S. brasiliensis* em concentração de 100 μ g/mL.

Extrato	Inibição da proliferação celular (%)									
	HL60	DP%	HCT-116	DP%	PC3	DP%	SF-295	DP%	RAJI	DP%
Galho	72,17	8,44	0	-	16,37	2,36	34,04	7,63	4,97	1,87
Folha	88,68	1,35	77,55	2,46	39,22	3,49	74,25	4,46	53,64	14,47
Casca	83,16	0,24	57,80	5,21	33,49	1,33	73,94	3,17	17,34	7,47

Fonte: Elaborada pela autora.

*Resultados são expressos com média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) e desvio padrão para dois experimentos independentes em triplicata.

Na análise de concentração única, o extrato etanólico da folha apresentou alta atividade citotóxica frente a linhagem leucêmica (HL60) e colorretal (HCT-116), e atividade moderada para linhagem de glioblastoma (SF-295). Ao avaliar o extrato etanólico da casca, esta apresentou atividade alta para leucemia e atividade moderada para glioblastoma, enquanto que o extrato do galho, por sua vez, apresentou atividade moderada, apenas, para linhagem leucêmica.

Nos extratos etanólico de folha e casca que apresentaram atividade citotóxica maior que 70%, em mais de uma linhagem, foram realizados testes de concentração inibitória média (CI₅₀) nas linhagens tumorais HCT-116 e SW-620 (Colorretal), SF-295 (Glioblastoma), HL-60 e RAJI (Leucemia), PC3 (Próstata) e linhagem não tumoral L929 (Fibroblasto murino).

Os resultados das CI₅₀ apresentados dos extratos etanólico da barauína que variaram de 25,68 a 93,64 µg/mL frente às linhagens tumorais testadas (Tabela 7). O extrato etanólico da casca mostrou melhor atividade citotóxica com CI₅₀ 25,68 µg/mL na linhagem colorretal SW620 enquanto que o extrato etanólico da folha apresentou melhor atividade frente a linhagem leucêmica com CI₅₀ 52,58µg/mL.

Tabela 7- Atividade citotóxica in vitro de extratos etanólico de casca e folha de *S.brasiliensis* em células tumorais e não tumoral.

Amostra	CI ₅₀ µg/mL (Intervalo)*						
	SF-295 (Glioblastoma)	PC3 (Próstata)	HL60 (Leucemia)	RAJI (Colorretal)	HCT-116 (Colorretal)	SW-620 (Colorretal)	L929 (Fibroblasto murino)
Casca	>100	>100	58,75 (52,98 - 65,13)	>100	93,64 (85,06 - 103,1)	25,68 (16,25 - 40,57)	82,0 (51,43 - 131)
Folha	78,57 (52,92 - 116,6)	71,54 (33,95 - 150,7)	52,58 (47,19 - 58,59)	55,90 (34,93 - 89,45)	61,73 (53,60 - 71,10)	65,46 (55,11 - 77,75)	49,53 (33,62 - 72,97)
Doxorrubicina ^a	0,25 (0,22-0,28)	0,44 (0,34-0,54)	0,01 (0,005-0,01)	0,46 (0,45-0,47)	0,11 (0,08-0,14)	0,03 (0,02-0,05)	0,99 (0,92-1,08)

Fonte: Elaborada pela autora

* Valores de CI₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de três experimentos independentes, realizados em duplicata em seis linhagens tumorais e uma linhagem não tumoral.

^aDoxorrubicina foi usada como controle positivo

A literatura descreve a alta atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos de folha e casca de *S. brasiliensis*, como foi relatado na introdução. Além disso, Santos e colaboradores avaliaram a atividade citotóxica de 16 compostos fenólicos de extrato da casca frente as linhagens de pulmão (A549) e câncer cervical (HeLa), dos quais nenhum mostrou atividade citotóxica entre as concentrações de 12,5 e 100mM (SANTOS *et al.*, 2017). Já no presente trabalho, foi avaliada a atividade citotóxica dos extrato de casca e folha da espécie frente a outras seis linhagens tumorais, com resultados satisfatórios e promissores frente as linhagens de Colorretal (SW-620) e Leucemia (HL60). Muitos pesquisadores associam a alta atividade antioxidante da espécie ao ácido gálico, considerado um biomarcador presente na planta, devido as suas diversas propriedades como ação anti-inflamatória, antimutagênica, antitumoral e antioxidante (LIMA-SARAIVA *et al.*, 2017).

5.3.3 Índice de Seletividade

Foi analisado o índice de seletividade (IS), para as seções da planta que tiveram os valores determinados de IC₅₀ para as linhagens tumorais e não tumoral (L929), correspondendo aos extratos da casca e folha de *S. brasiliensis*. O IS mede o quanto um composto é ativo contra às células tumorais sem causar danos às não tumorais, sendo esta resposta obtida por meio da razão entre o IC₅₀ das células não tumorais pelo IC₅₀ das células tumoral, nas linhagens. Os pesquisadores Suffness and Pezzuto (1991) estabeleceram uma correlação entre o potencial citotóxico de linhagens não tumorais e tumorais, e nomearam essa análise de “Índice de Seletividade”, considerando uma relação positiva quando o IS é maior que 2,0 (SUFFNESS M; JM, 1990). Desde a instituição do IS, muitos pesquisadores vêm utilizando-o para avaliar a seletividade para estudos citotóxicos (BADISA1 *et al.*, 2009). Segundo Bézivin e colaboradores, o IS é bem mais interessante nos casos em que os valores são superiores a 3, indica o quanto o resultado é promissor comparado às demais linhagens celulares de IS inferior a 2 (BÉZIVIN *et al.*, 2003).

A Tabela 8 apresenta os valores de IS para o extrato da folha e da casca. Observa-se que o extrato da casca é o mais seletivo frente às diversas linhagens como SW-620, em que obteve-se valor de 3,2. Para as linhagens SF-295, RAJI e PC3, os valores de IS foram não definidos, significa dizer que o valor de IS é ainda maior nesses casos, ou seja, a casca é ainda mais seletiva para essas células tumorais.

Tabela 8-Valores Índice de seletividade IC_{50} (células não tumorais)/ IC_{50} (célula tumoral) nas linhagens tumorais.

Índice de seletividade IC_{50} (células não tumorais)/IC_{50}(célula tumoral)						
	SF-295 (Glioblastoma)	PC3 (Próstata)	HL60 (Leucemia)	RAJI (Colorretal)	HCT-116 (Colorretal)	SW-620 (Colorretal)
Casca	ND	ND	1,4	ND	0,9	3,2
Folha	0,6	0,7	0,9	0,9	0,8	0,8

Fonte: Elaborada pela autora.

ND: não definida

Observando os resultados de IC_{50} e índice de seletividade, pode-se destacar a promissora atividade citotóxica da casca frente à linhagem SW-620 (cólون humano). Isso sugere que podem existir compostos específicos ou concentração elevada de alguns compostos que estejam relacionados com a melhor atividade anticâncer desempenhada por essa seção da planta, comparada com a folha e o galho dessa espécie. Foram identificados diversos derivados de ácido gálico, flavonóides glicosídicos, principalmente derivados da quercetina, ácido quínico, já validados na literatura como possíveis potenciais anticâncer, o que corrobora com os resultados apresentados de atividade citotóxica (BARATTO *et al.*, 2003; HIRPARA *et al.*, 2009; KAHRAMAN *et al.*, 2003; LESJAK *et al.*, 2018; LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013; LU *et al.*, 2006; MAMANI-MATSUDA *et al.*, 2006).

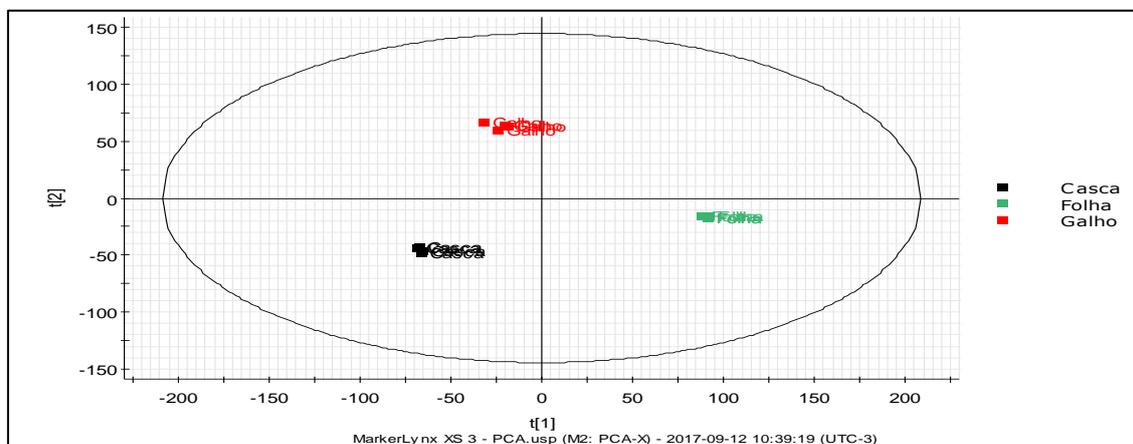
5.4 Tratamento quimiométrico

5.4.1 Análise dos Componentes Principais (PCA) dos extratos de folhas, galhos e casca de *baraúna*

A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico exploratório que consiste em reduzir a complexidade de uma grande quantidade de dados, com a menor perda possível de informações (MARCHETTI *et al.*, 2015). Essa técnica permite observar, interpretar e correlacionar as diferenças existentes entre as amostras, além de promover a formação de grupos com semelhanças entre si (WORLEY; HALOUSKA; POWERS, 2013).

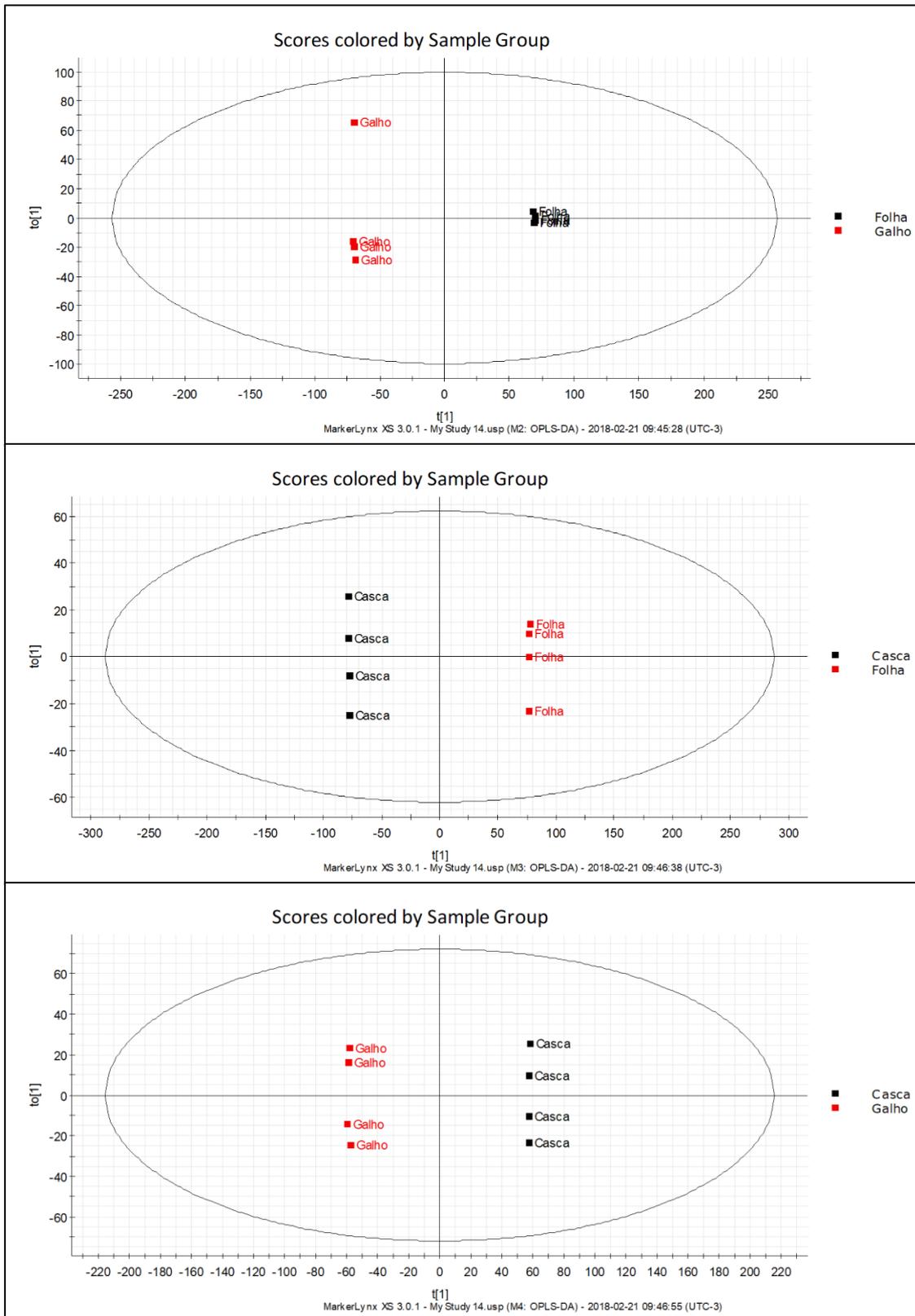
Com o propósito de verificar as diferenças entre os perfis metabolômicos das três seções da planta *S.brasiliensis*, as amostras de casca, galho e folha foram analisadas através da técnica de UPLC-QTOF-MS^E conjuntamente a análise quimiométrica. Os dados obtidos foram submetidos, inicialmente a uma abordagem com PCA utilizando a escala pareto, como representado nas Figuras 19 e 20, um gráfico de scores e um de loadings, respectivamente. O gráfico de scores e loadings PCA-X representou 77.73% da variância total ($R^2X[1]=0.5256$ e $R^2X[2]=0.2517$). As doze amostras foram claramente separadas e agrupadas em três grupos correspondentes a folha, galho e casca. Comparativamente, os agrupamentos formados, indicam que os metabólitos secundários das folhas, galho e casca divergem significativamente. A primeira componente principal (PC1) representa a maior variação no conjunto de dados, as amostras agrupadas da folha estão no lado positivo de PC1, enquanto as amostras do galho e da casca estão no lado negativo. E o segundo componente principal (PC2) corresponde a quantidade máxima de variância não explicada pelo PC1, nesse caso o galho está em positivo de PC2 e as folhas e a casca em negativo.

Figura 19- Gráfico de escores de PCA para as amostras de folhas, galho e casca de *S. brasiliensis*, analisados por UPLC-QTOF-MS^E.



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Figura 21-Análise de OPLS-DA dos grupos: folha-galho; folha-casca; casca-galho de *S. brasiliensis*.



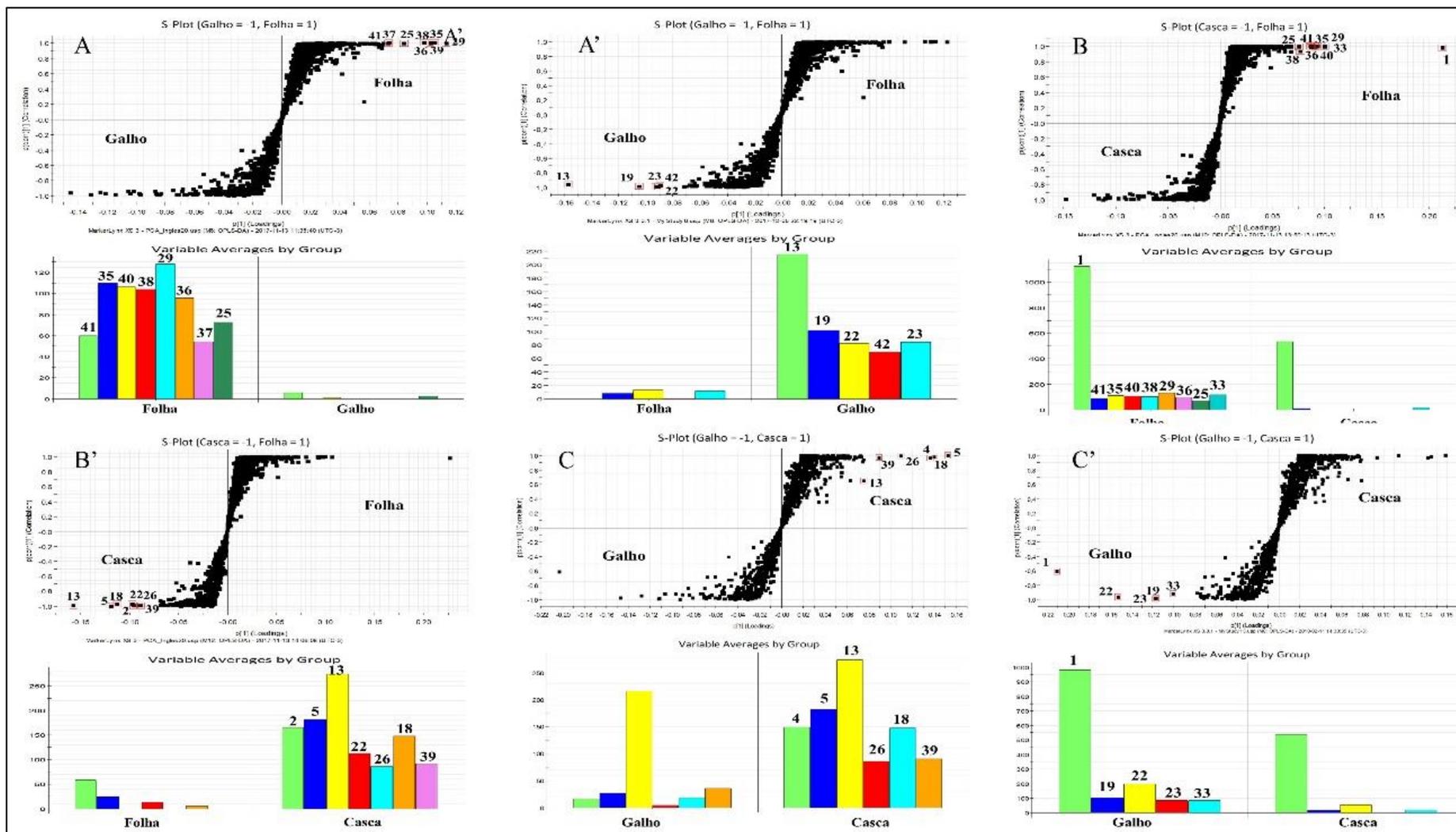
Fonte: Elaborado pela autora (2018).

5.4.3 Potenciais biomarcadores

Com o propósito de identificar os possíveis biomarcadores foram utilizadas outras ferramentas estatísticas, o VIP e S-Plot que foram obtidos a partir das análises de OPLS-DA para todas as amostras. A variável de importância na projeção (VIP), é uma forma de classificar a melhor faixa em que estão inseridos os metabólitos discriminantes, e é considerada estatisticamente significativa quando o valor é superior a 1,0 (MAO *et al.*, 2014). Nesse estudo foi utilizado um $VIP > 1$ e $p < 0,05$. O S-Plot permite identificar os compostos que se destacam em cada seção da planta, no gráfico observa-se dois eixos, um para cada grupo analisado, e os íons mais afastados da origem contribuem significativamente para a separação entre os grupos e, portanto, podem ser considerados marcadores. Assim, combinando o gráfico de VIP, o gráfico de S-Plot, a técnica analítica de UPLC-QTOF-MS^E que fornece tempo de retenção, massa molecular precisa e íons fragmentos, é possível detectar os potenciais biomarcadores.

A partir dos dados de OPLS-DA (Fig.21) foram gerados os gráficos de S-Plot apresentados abaixo na Figura 22. No total observa-se **23** potenciais marcadores químicos. Todos os compostos identificados no trabalho foram previamente descritos na Tabela 4.

Figura 22- Análise de S-Plot e gráficos de barras das variáveis: folha-galho; folha-casca; galho-casca



5.4.3.1 Avaliação da distribuição dos marcadores químicos nas folhas comparadas ao galho

Na Figura 22A, oito íons (**25, 29, 35, 36, 37, 38, 40 e 41**) foram identificados como biomarcadores da folha em relação ao galho, sendo tais moléculas encontradas em maiores concentrações relativas de área, como demonstrado através dos gráficos de barras. A Figura 22A' apresenta cinco íons (**13, 19, 22, 23 e 42**) que diferenciam as amostras de galho em comparação a folha. Por meio das tabelas 9 e 10 pode-se observar os compostos discriminantes.

Tabela 9- Relação dos compostos discriminantes da **folha** em comparação ao galho.

Compostos	t_r	m/z	VIP	$pvalue$
25. n.i	3,70	631,0961	3,54899	$3,07 \times 10^{-7}$
29. tetra- <i>O</i> -galoil-glucose isômero I	4,16	787,1081	4,77228	$1,87 \times 10^{-6}$
35. quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	4,67	463,0877	4,44097	$6,72 \times 10^{-11}$
36. quercetina- <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-hexosídeo	4,83	615,0992	4,13509	$1,64 \times 10^{-8}$
37. hexagaloil hexosídeo	5,05	1091,1239	3,11587	$1,07 \times 10^{-9}$
38. quercetina galoil pentosídeo	5,20	585,0894	4,32449	$6,4 \times 10^{-13}$
40. n.i	5,32	523,2187	4,3318	$1,3 \times 10^{-7}$
41. etil 2,4-diidroxí-3-(3,4,5-triidroxibenzoil)oxibenzoato	5,55	349,0580	3,10656	$8,81 \times 10^{-7}$

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Tabela 10- Relação dos compostos discriminantes do **galho** em comparação a folha.

Compostos	t_r	m/z	VIP	$pvalue$
13. ácido clorogênico	2,65	353,0843	6,57994	0,000123
19. etil- <i>O</i> - β -D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	3,01	359,0991	4,39644	$9,2 \times 10^{-6}$
22. 2-hidroxí-4-metoxifenol 1- <i>O</i> - β -D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	3,21	453,1016	3,8001	$7,14 \times 10^{-7}$
23. corilagina	3,48	633,0762	3,89244	$1,62 \times 10^{-6}$
42. urundeuvina A	6,24	525,1210	3,75589	$3,44 \times 10^{-5}$

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

A melhor atividade citotóxica exibida pelo extrato da folha frente as linhagens HCT-116 e SF-295 em comparação ao galho, pode ser atribuída aos compostos derivados da quercetina. A quercetina e seus derivados são bastantes conhecidos através de suas propriedades antioxidante, anti-histamínico e antiinflamatória (KAHRAMAN *et al.*, 2003; LESJAK *et al.*, 2018; MAMANI-MATSUDA *et al.*, 2006). Além disso, a quercetina está sendo considerada

um novo agente quimioterápico promissor, diversas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de explorar moléculas derivadas da quercetina que sejam mais potentes para a quimioterapia direcionada ao câncer (HIRPARA *et al.*, 2009).

5.4.3.2 Avaliação da distribuição dos marcadores químicos nas folhas comparadas a casca.

Comparando as amostras da folha com a casca, Figura 22B, pode-se constatar nove íons (**1, 25, 29, 33, 35, 36, 38, 40 e 41**) foram responsáveis por diferenciar a folha da casca, e na Figura 22B' sete íons (**2, 5, 13, 18, 22, 26, 39**) diferenciando a casca da folha. Através das Tabelas 11 e 12 pode-se observar os compostos discriminantes.

Tabela 11- Relação dos compostos discriminantes da **folha** em comparação a casca.

Compostos	t_r	m/z	VIP	pvalue
1. ácido quínico	0,90	191,0549	9,24661	$3,71 \times 10^{-5}$
25. n.i	3,70	631,0961	3,30132	$1,23 \times 10^{-7}$
29. n.i	4,14	787,1068	4,36522	$1,87 \times 10^{-6}$
33. penta- <i>O</i> -galoil- β -D	4,41	939,1135	3,80242	$6,54 \times 10^{-6}$
35. quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	4,67	463,0877	4,06218	$6,72 \times 10^{-11}$
36. quercetina- <i>O</i> -(<i>O</i> -galoil)-hexosídeo	4,83	615,0992	3,78238	$1,64 \times 10^{-8}$
38. quercetina galoil pentosídeo	5,20	585,0894	3,95563	$6,4 \times 10^{-13}$
40. n.i	5,32	523,2187	3,98375	$9,28 \times 10^{-8}$
41. etil 2,4-diidroxí-3-(3,4,5-triidroxibenzoil)oxibenzoato	5,55	349,0580	3,34409	0,000699

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Tabela 12- Relação dos compostos discriminantes da **casca** em comparação a folha.

Compostos	t_r	m/z	VIP	pvalue
2. ácido cítrico	0,99	191,0189	4,18578	$4,67 \times 10^{-5}$
5. ácido quínico galoil isômero	1,87	343,0634	5,14787	$1,73 \times 10^{-8}$
13. ácido clorogênico	2,65	353,0843	6,76891	$1,26 \times 10^{-6}$
18. ácido quínico digaloil isômero	2,93	495,0759	4,83278	$5,15 \times 10^{-5}$
22. 2-hidroxi-4-metoxifenol 1- <i>O</i> - β -D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	3,21	453,1016	4,11193	$8,31 \times 10^{-8}$
26. n.i	3,94	923,1716	3,79523	$2,94 \times 10^{-7}$
39. n.i	5,22	619,1095	3,90045	$1,75 \times 10^{-6}$

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Os extratos de folha e casca da baraúna foram os que apresentaram uma melhor atividade citotóxica frente a três linhagens tumorais. No entanto, a casca obteve um melhor resultado de IC₅₀ (25,68 µg/mL) para a linhagem SW620 (colorretal) quando comparada a folha com IC₅₀ (52,58µg/mL) para a linhagem HCT (Leucemia) isso pode ter contribuição de determinados compostos existentes apenas no extrato da casca, como o ácido clorogênico. Esse composto presente na casca, já foi descrito por Yamagata e colaboradores (YAMAGATA *et al.*, 2017) por regular a expressão de genes relacionados à apoptose e marcadores de células-tronco relacionados à auto-renovação em células cancerígenas, bem como diminuição da proliferação em células de câncer de pulmão. Li e colaboradores (LI *et al.*, 2017) também relatam que o ácido clorogênico induz a apoptose e parada do ciclo celular em G2/M. Em estudo realizado por Nama e colaboradores (NAM *et al.*, 2017) com a linhagem de cólon HT29, demonstraram que o ácido clorogênico resultou em uma taxa de crescimento significativamente diminuída de células HT29 em 46%.

5.4.3.3 Avaliação da distribuição dos marcadores químicos no galho comparado a casca.

Assim como, a figura 22C e 22C' é notado a separação entre as amostras de casca e galho devido aos íons (**4, 5, 13, 18, 26 e 39**) presentes na casca, e aos íons (**1, 19, 22, 23 e 33**) existentes no galho. Todos os íons exibidos nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Relação dos compostos discriminantes da **casca** em comparação ao galho.

Compostos	t _r	m/z	VIP	pvalue
4. ácido quínico galoil isômero I	1,65	343,0641	5,16828	2,61 x10 ⁻⁵
5. ácido quínico galoil isômero II	1,87	343,0634	5,62188	6,42 x10 ⁻⁸
13. ácido clorogênico	2,65	353,0843	2,76945	0,0865
18. ácido quínico digaloil isômero	2,93	495,0759	5,03905	0,000144
26. n.i	3,94	923,1716	4,05302	2,11 x10 ⁻⁶
39. n.i	5,22	619,1095	3,29957	6,48 x10 ⁻⁵
4. ácido quínico galoil isômero I	1,65	343,0641	5,16828	2,61 x10 ⁻⁵

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Tabela 14. Relação dos compostos discriminantes do **galho** em comparação a casca

Compostos	t_r	m/z	VIP	pvalue
1. ácido quínico	0,90	191,0549	7,81042	0,102
19. etil- <i>O</i> -β-D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	3,01	359,0991	4,25757	1,9 x10 ⁻⁵
22. 2-hidroxi-4-metoxifenol 1- <i>O</i> -β-D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	3,21	453,1016	5,63175	0,000442
23. corilagina	3,48	633,0762	4,30962	5,13 x10 ⁻⁷
33. penta- <i>O</i> -galoil-β-D	4,41	939,1135	3,68366	0,00091
1. ácido quínico	0,90	191,0549	7,81042	0,102
19. etil- <i>O</i> -β-D-(6'- <i>O</i> -galoil)-glucopiranosídeo	3,01	359,0991	4,25757	1,9 x10 ⁻⁵

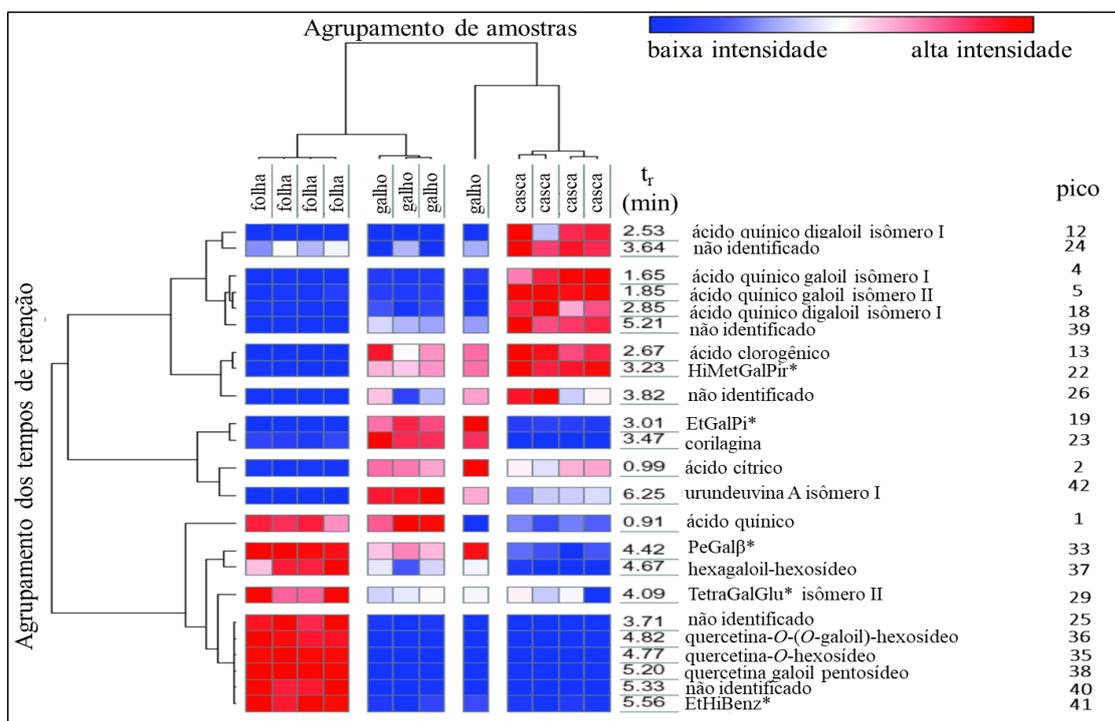
Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Observa-se que o extrato do galho de baraúna obteve como resultado uma baixa atividade citotóxica em relação às outras seções da planta, apesar dos seus compostos discriminantes já serem descritos na literatura com diversas propriedades biológicas, como a corilagina e a urundeuvina A. No entanto, a concentração relativa desses compostos no extrato não é considerada suficiente para atribuir ao galho uma boa atividade frente as linhagens estudadas. Diferentemente da casca, que possui como compostos majoritários derivados de ácido gálico e ácido clorogênico de concentração considerável, além de outras substâncias presente, que não foram indentificadas no trabalho, podem estar correlacionadas a atividade mais promissora frente à linhagem SW-620.

5.4.4 Mapa de Calor (Heatmap)

De acordo com os resultados observados de PCA, pode-se notar que os metabólitos presentes na espécie *S. brasiliensis* apresentam alta variabilidade de acordo com cada parte da planta. Devido ao grande volume de informações obtidos, foi realizada uma análise de agrupamentos por mapa de calor, com o objetivo de melhor entender a variação desses metabólitos nas diferentes seções da baraúna. Os resultados são mostrados na Figura 23 em dendograma 3D (amostras x tempos de retenção x sinais de intensidade).

Figura 23-Mapa de calor representando a variabilidade da composição química entre folhas, cascas e galhos de *S. brasiliensis*.



Fonte:

Elaborado pela autora (2018).

***HiMetGalPir**: 2-hidroxi-4-metoxifenol-1-*O*-β-D-(6'-*O*-galoil)-glucopiranosídeo; **EtGalPi**: etil-*O*-β-D-(6'-*O*-galoil)-glucopiranosídeo; **PeGalβ** – penta-*O*-galoil-β-D; **TetraGalGlu isômero II** – tetra-*O*-galoil-glucose isômero II; **EtHiBenz** – etil 2,4-dihidroxi-3-(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxibenzoato.

É observado que as amostras das folhas foram agrupadas devido à maior quantidade relativa de ácido quínico (0,91min) em comparação com as outras partes da planta. Por outro lado, as amostras de cascas foram agrupadas pela maior quantidade de isômeros de ácido quínico galoil e digaloil, corroborando com os resultados de PCA.

6 CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido comparou o perfil químico conjuntamente à atividade citotóxica dos extratos de folha, casca e galho de *S. brasiliensis*. A metodologia por microextração líquido-líquido aliada a técnica analítica UPLC-QTOF-MS, mostrou-se rápida e eficaz, podendo-se tentativamente identificar cerca de 33 compostos nos extratos das três seções da planta, e 16 deles foram relatados a primeira vez na espécie. Foram identificados principalmente metabólitos secundários da classe de taninos hidrolisáveis e flavonoides.

A atividade citotóxica, através do método MTT, mostrou-se que o extrato da casca pode ser considerado um forte potencial promissor frente à linhagem SW-620 (côlon-humano)

por apresentar um bom potencial de inibição, o menor valor de IC_{50} comparado aos outros extratos, além disso, exibiu um índice de seletividade relativamente alto. A predominância de derivados de ácido quínico, ácido clorogênico, e a presença de substâncias na casca que não foram detectadas no presente estudo, podem auxiliar a explicar o motivo da alta atividade citotóxica observada. As análises estatísticas realizadas contribuíram para diferenciar cada seção da planta de forma confiável e significativa.

O presente estudo de desreplicação demonstrou a relevância e o valor agregado a planta *S. brasiliensis*, que apresentou vários potenciais biomarcadores que podem ser correlacionados com a promissora atividade citotóxica exibida.

REFERÊNCIAS

- 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, 2015a.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.
- ALBERICE, J. V. **Avaliação Analítica de Potenciais Biomarcadores para Câncer de Bexiga em Urina**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.
- ANDRADE LIMA, D. DE. **Plantas das caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 243 p., p. 463–512, 1989.
- BADISA, R. B. et al. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Anticancer Res.**, [s.l.], v. 292, n. 3, p. 342–351, 2009.
- BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 2012, n. January, p. 1–40, 2012.
- BARATTO, M. C. et al. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 405–412, 2003.
- BERARDINI, N.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tommy Atkins”) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], p. 2208–2216, 2004.
- BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 10, n. 6-7, p. 499–503, 2003.
- BRANDON, K. et al. Conservação brasileira : desafios e oportunidades. In: **Megadiversidade**. [s.l.: s.n.]. v. 1.
- BRASIL. Ministério da Educação. Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior. Portaria nº 206, de 4 de setembro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, nº 172, 5 set. 2018. Seção 1, p. 22. Disponível em: http://www.impresanacional.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/39729251/do1-2018-09-05-portaria-n-206-de-4-de-setembro-de-2018-39729135. Acesso em: 19 out. 2018.
- BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. [s.l.: s.n.].
- BUENO, F. G. et al. METABOLÔMICA, UMA ABORDAGEM OTIMIZADA PARA EXPLORAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ESTADO DA ARTE, PERSPECTIVAS E DESAFIOS. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 35, n. 4, p. 822–826, 2013.
- 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.

CARDOSO, M. P. et al. A New Biflavonoid from *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 1–4, 2014.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural product research**, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 431–433, 2005.

CARLA, C. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant properties of *Schinopsis brasiliensis* bark. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 213, n. October 2017, p. 176–182, 2018.

CATHERINE A. RICE-EVANS, N. J. M.; PAGANGA, G. STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. **Free Radical Biology & Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, [s.l.], v. 20, n. 6, p. 362–387, 2001.

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.

CHAVES, T. P. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Revista de Biologia e Farmácia**, [s.l.], v. 05, p. 11–17, 2011.

CHURCHWELL, M. I. et al. Improving LC – MS sensitivity through increases in chromatographic performance : Comparisons of UPLC – ES / MS / MS to HPLC – ES / MS / MS. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 825, p. 134–143, 2005.

CORREIA, S. D. J. et al. Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 29, n. 6, p. 1287–1300, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

DA SILVA, E. C. et al. Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de caatinga no município de Cabaceiras, Paraíba, Brasil. **Iheringia, Sér. Bot.**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 201–205, 2004.

DE ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 30, 2006.

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, 2007.

DE ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 127–142, 2005.

DONATI, M. et al. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents : estragole , trans-anethole , β caryophyllene and myrcene. **Natural product reports**, [s.l.], n. January 2015, p. 37–41, 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. **FRIN**, [s.l.], v. 57, p. 51–60, 2014.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 112, p. 4–29, 2016.

ERSAN, S. et al. Identification of Phenolic Compounds in Red and Green Pistachio (*Pistacia vera* L .) Hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI- (HR) -MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], 2016.

FERNANDES, C. S.; TORRES, S. A flora de Pernambuco e a patologia animal. **Arqs Inst. Pesq. Agrotécnicas, Recife**, [s.l.], v. 3:35-63, 1941.

FERNANDES, F. H. A. et al. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 208–211, 2015.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiências**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2006.

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.

FRAIGE, K. et al. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, [s.l.], n. August, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOMES, L. A. L. **Investigação metabolômica da toxicidade da cocaína em ratos submetidos à privação de sono , utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

GORROCHATEGUI, E. et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 82, p. 425–442, 2016.

- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- HASSAN, F. A. et al. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Bambang (*Mangifera pajang* Kort .) Peels and Their Free Radical Scavenging Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], p. 9102–9111, 2011.
- HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica, Ciudad de la Habana**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 12–14, 1999.
- HIRPARA, K. V et al. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 138–61, 2009.
- HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. **Am. J. Enol. Vitic.**, [s.l.], v. 21, p. 201–204, 1970.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Quim. Nova**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- KAHRAMAN, A. et al. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, [s.l.], v. 183, n. 1-3, p. 133–142, 2003.
- KHAKIMOV, B.; GÜRDENİZ, G.; ENGELSEN, S. B. Trends in the application of chemometrics to foodomics studies. **Acta Alimentaria**, [s.l.], v. 44, n. 1, p. 4–31, 2015.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.
- LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 8, 2005.
- LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Campinas: [s.l.], [s.n.]. v. 5
- LESJAK, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 40, n. November 2016, p. 68–75, 2018.
- LI, W. et al. Mechanism of chlorogenic acid in apoptotic regulation through notch1 pathway in non-small cell lung carcinoma in animal level. **Chinese Journal of Lung Cancer**, [s.l.], v. 20, n. 8, p. 555–561, 2017.
- LIMA-SARAIWA, S. R. G. DE et al. Chemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Photoprotective Activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2017, p. 1–10, 2017.
- LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Spectroscopic and Statistical Techniques for Information Recovery in Metabonomics and Metabolomics. **Annual Review of Analytical**

Chemistry, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 45–69, 2008.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 60, p. 233–239, 2013.

LU, Z. et al. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 263–274, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JÚNIOR, V. F. . Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga: arvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D & Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MAMANI-MATSUDA, M. et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 72, n. 10, p. 1304–1310, 2006.

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.

MARCHETTI, M. et al. Retrieving visibility distance in fog combining infrared thermography, Principal Components Analysis and Partial Least-Square regression. **Infrared Physics and Technology**, [s.l.], v. 71, p. 289–297, 2015.

MEWALAL, R. et al. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 227–240, 2016.

MOREIRA, B. O. **Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae) e quantificação dos bioativos de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae)**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2014.

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

NAM, S. H. et al. Enzymatic synthesis of chlorogenic acid glucoside using dextransucrase and its physical and functional properties. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 107, n. October 2016, p. 15–21, 2017.

NASCIMENTO-SILVA, O.; CHINALIA, L. .; PAIVA, J. G. A. D. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* arruda (Anacardiaceae lindl.). **Revista Caatinga**, [s.l.], v. v.21, n.3, p. 62–68, 2008.

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.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NG, L. K.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extract - A novel and simple approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 24, p. 7251–7257, 2004.

NOVA, Q. et al. Quim. Nova., **Quim. Nova**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. S1–S7, 2013.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, [s.l.], v. 68, n. 3, p. 908–918, 2006.

OJEWOLE, J. A. O. Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Sclerocarya birrea* (A . Rich .) Hochst . (family : Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 85, p. 217–220, 2003.

PAES, J. B. et al. Resistência natural de nove espécies de madeiras do semi-árido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. **Revista Árvore**, [s.l.], v. 28, n. n.2, p. 275–282, 2004.

PARENTE, E. Plantas de valor econômico no Ceará. **O Ceará**, p. 12, [s.l.], [s.d.].

PAVIA, D. et al. **Introdução à espectroscopia**. [s.l: s.n.].

PESSOA, C. et al. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Advances in Phytomedicine**, [s.l.], v. 2, n. C, p. 197–211, 2006.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, [s.l.], p. 8402–8416, 2013.

SANTOS, C. C. DE S. et al. Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 140, p. 45–51, 2017.

SANTOS, C. C. S. et al. Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 298–303, 2014.

SANTOS, R. V.; BETÂNIA, M.; AMADOR, M. Baraúna: diálogo entre natureza e sociedade. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**, [s.l.], v. 9, p. 139–148, 2013.

SARAIVA, A. M. et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l.], v. 5, n. 14, p. 1724–1731, 2011.

SARAIVA, A. M. et al. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 199–207, 2013.

SILVA, M. S. P. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: Contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2012, 2012.

SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. [s.l:s.n.].

SRIVASTAVA, M. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC / MS / MS techniques. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], n. October, 2016.

SUFFNESS M; JM, P. Assays related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Vol. 6. [s.l: s.n.]. p. pp. 71–133.

TRIBA, M. N. et al. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Mol. BioSyst.**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 13–19, 2015.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 491–509, 2011.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, [s.l.], p. 189–195, 2003.

VOGL, O.; MITCHELL, J. Oriental lacquer .11. botany and chemistry of the active components of poisonous Anacardiaceae. **Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 33: 1581-1, p. 118, 1996.

WALKER, W. &. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. [s.l: s.n.].

WILLEMS, J. L. et al. Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 933, p. 164–174, 2016.

WORLEY, B.; HALOUSKA, S.; POWERS, R. Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 433, n. 2, p. 102–104, 2013.

WRONA, M. et al. Ultra high performance liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight with MS E technology used for qualitative analysis of non-volatile oxidation markers in sliced packed mushrooms (*Agaricus Bisporus*). **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1432, p. 73–83, 2016.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 743–760, 2011.

YAMAGATA, K. et al. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related

gene expression in A549 human lung cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s.l.], p. 1–11, 2017.

YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 914, p. 17–34, 2016.

ZHAO, Y. Y. et al. UPLC-based metabonomic applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry. **Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 15, p. 16–26, 2015.