

FAUSTO CARNEVALE NETO

**Estudo de espécies de Chrysobalanaceae com ação citotóxica:
análise metabolômica visando ao entendimento de associações
sinérgicas e da complexidade micromolecular**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2014

DADOS CURRICULARES

Formação acadêmica

- 2010-atual** Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Estudo de espécies de *Chrysobalanaceae* com ação citotóxica: Análise metabolômica visando ao entendimento de associações sinérgicas e da complexidade micromolecular.
Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008 - 2010** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Elaboração de métodos analíticos de desreplicação para o estudo metabolômico em espécies de *Qualea* (Vochysiaceae): Detecção e elucidação *in situ* de micromoléculas com potencial antioxidante.
Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Coorientador: Prof^a. Dr.^a Marcia Nasser Lopes
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2003 - 2008** Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Formação acadêmica complementar

- 03/2013 -03/2014** Estágio de doutorado sanduíche.
University of Washington, Seattle, Estados Unidos
Título: Metabolomics studies for the determination of cytotoxic activity of *Chrysobalanaceae* plant species from the Brazilian Cerrado.
Orientador: Prof. Dr. Daniel Raftery
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2006 - 2007** Iniciação Científica em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Estudo fitoquímico de *Qualea grandiflora* Mart (Vochysiaceae): Busca por moléculas com potencial antimalárico.
Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Disciplinas cursadas durante o doutorado

1. RMN de Produtos Naturais (08 créditos), **conceito A**
2. Introdução a espectroscopia de RMN: Processamento e análise de dados multivariáveis (02 créditos), **conceito A**
3. Fisiologia vegetal – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (06 créditos), **conceito B**
4. Análise multivariada de dados experimentais em química - UFSCar (12 créditos), **conceito A**
5. Quimiometria I - UFSCar (04 créditos), **conceito B**
6. Quimiometria II - UFSCar (04 créditos), **conceito A**
7. Quimiometria III - UFSCar (04 créditos), **conceito A**
8. Confiabilidade analítica (06 créditos), **conceito A**

Total: 84 créditos

Atuação profissional

1. **Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - CRISTÁLIA**
Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Colaborador, Enquadramento: analista jr. CQ físico-químico

Artigos completos publicados em periódicos

1. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. da S., CASTRO-GAMBOA, I. Vochysiaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. *Phytochemistry Reviews*, v. 10, p. 413-429, 2011.
2. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., BOLZANI, V. da S., CASTRO-GAMBOA, I. Chrysobalanaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, p. 121-146, 2013.
3. CARNEVALE NETO, F., SIQUITELLI, C. D., PILON, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. da S., CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of phenolic derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using liquid chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 758-764, 2013.
4. PILON, A. C., CARNEIRO, R. L., CARNEVALE NETO, F., BOLZANI, V. da S., CASTRO-GAMBOA, I. Interval multivariate curve resolution in the dereplication of HPLC-DAD data from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemical Analysis*, v. 24, p. 401-406, 2013.

5. GU, H., GOWDA, G. A. N., CARNEVALE NETO, F., OPP, M. R., RAFTERY, D. RAMSY: ratio analysis of mass spectrometry to improve compound identification. *Analytical Chemistry*, v. 85, p. 10771-10779, 2013.

Participação em eventos científicos

1. FREIRE, R. T., PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., CASTRO-GAMBOA, I. Investigation of the NMR parameters analyses by a made-up MATLAB GUI (guide user interface) on an in-house database. International Conference on Omics Studies, 2013, Orlando.
2. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., FREIRE, R. T., CARDOSO, P., GU, H., DJUKOVIC, D., RAFTERY, D., CASTRO-GAMBOA, I. Metabolomics as a tool for anticancer lead-finding from Natural Products. International Conference on Omics Studies, 2013, Orlando.
3. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., FREIRE, R. T., CARDOSO, P., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of Brazilian Chrysobalanaceae plant species using Interval MCR-ALS based on recovery of pure compounds from HPLC-DAD-ESI-QToF-MS/MS metabolomics data. 8th Annual Meeting of the Metabolomics Society and the Plant Metabolomics Forum, 2012, Washington DC.
4. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., CARNEIRO, R. L., FREIRE, R. T., BOLZANI, V. S., Castro-Gamboa, I. Chemometric-assisted tool on plant metabolomics: chemotypes distribution from *Solanum* species using PARAFAC-HCA method. 8th Annual Meeting of the Metabolomics Society and the Plant Metabolomics Forum, 2012, Washington DC.
5. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., FREIRE, R. T., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. HPLC-DAD-ESI-QToF-MS/MS dereplication and chemotaxonomy approach of Chrysobalanaceae species. 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto.
6. FREIRE, R. T., PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., CASTRO-GAMBOA, I. Construction of a versatile NMR in-house database: searching for adequate acquisition parameters, production of scripts and multivariate analysis. 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto.
7. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., FREIRE, R. T., CARNEIRO, R. L., CASTRO-GAMBOA, I. Development of a deconvolution method using Multivariate Curve Resolution (MCR) for dereplication studies on leaves extracts from *Jatropha multifida*. 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto.
8. PILON, A. C., CARNEIRO, R. L., CARNEVALE NETO, F., CASTRO-GAMBOA, I. Interval multivariate curve resolution in the dereplication of HPLC-DAD data from *Jatropha gossypifolia* In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa.

9. CARNEVALE NETO, F., CASTRO-GAMBOA, I. Metabolomic analysis for the understanding of pharmacological response of bioactive complex matrices. São Paulo School of Advanced Science, 2011, Campinas.
10. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., QUEIROZ, M. M. F., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Desreplicação de *Qualea grandiflora* e *Qualea cordata* (Vochysiaceae) através de HPLC-HRMS/MS e RMN. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química SBQ, 2011, Florianópolis.
11. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., QUEIROZ, M. M. F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Planejamento e otimização de extração em espécies de *Jatropha* para estudos metabolômicos. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química SBQ, 2011, Florianópolis.

Outros

- Co-autor de painel premiado intitulado "Investigation of the NMR parameters analyses by a made-up MATLAB GUI (guide user interface) on an in-house database", International Conference on Omics Studies, 2013.
- Painel premiado intitulado "Metabolomics as a tool for anticancer lead-finding from Natural Products", International Conference on Omics Studies, 2013.
- Voto de Congratulações consignado nos anais da seção de 17/09/2013, da Câmara Municipal de Araraquara, SP, pelo prêmio recebido em "International Conference on Omics Studies", Orlando, EUA., Câmara Municipal de Araraquara, 2013.
- Co-autor em trabalho premiado intitulado "Chemometric-assisted tool on plant metabolomics: chemotypes distribution from *Solanum* species using PARAFAC-HCA method", The Noble Foundation Awards Best Young Investigator Oral Presentation in Plant Metabolomic, 2012.
- Painel premiado intitulado "HPLC-DAD-ESI-QToF-MS/MS dereplication and chemotaxonomy approach of Chrysobalanaceae species". 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011.
- Painel premiado intitulado "Development of a deconvolution method using Multivariate Curve Resolution (MCR) for dereplication studies on leaves extracts from *Jatropha multifida*". 3rd Brazilian Conference on Natural Products, 2011.
- Painel premiado intitulado "Interval multivariate curve resolution in the dereplication of HPLC-DAD data from *Jatropha gossypifolia*". 23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe Maria Lúcia, meu pai Francisco, meu irmão Fernando, à Francine e à minha querida avó Maura (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Ian, pela orientação, pelos incentivos e apoio durante todo este trabalho de doutoramento.

Aos Professores do NuBBE (IQ-UNESP) pelas enriquecedoras conversas sobre o mundo científico e a sua filosofia.

Ao Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade de realização de trabalhos em minha área de pesquisa.

Ao Prof. Daniel Raftery, pela acolhimento na University of Washington e pelos ensinamentos durante a realização de estágio nos EUA.

Ao Prof. Norberto Peporine Lopes, pelas análises CLAE-DAD-EM/EM realizadas em seu laboratório

Aos amigos do Instituto de Química, por tornarem o dia a dia agradável e mais rico.

Aos amigos Rafael Teixeira Freire e Alan Cesar Pilon, pela grande amizade e parceria nas mais diversas esferas da vida.

Aos meus pais, por me ensinarem importantes valores de vida (amor, respeito, dedicação) e me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Ao sr. Antônio José Siqueira César, sra. Fátima Aparecida Siqueira César, Bruno e Ariel, pelo apoio e amizade.

Ao meu irmão Fernando (Nanki) Medeiros Carnevale, pela inestimada amizade e carinho.

À Francine César, pelo amor, paciência e incentivo no trabalho e na vida.

À FAPESP pela provisão das bolsas de doutorado e estágio no exterior.

EPÍGRAFE

"Reduccionismo e holismo, análise e síntese, são enfoques complementares que, usados em equilíbrio adequado, nos ajudam a chegar a um conhecimento mais profundo da vida."

FRITJOF CAPRA, O Ponto de mutação, 1982

RESUMO

A abordagem reducionista na busca por substâncias bioativas em produtos naturais nem sempre é capaz de compreender em sua totalidade a dinâmica envolvida nas respostas farmacológicas de matrizes complexas como extratos vegetais. Inserido neste paradigma, este trabalho visou ao desenvolvimento de métodos e abordagens racionais que permitissem o entendimento das relações moleculares em produtos naturais bioativos. Para tanto, espécies vegetais da família Chrysobalanaceae com potencial citotóxico, depositadas na extratoteca do NuBBE, foram os objetos de estudo na aplicação de metodologias para a determinação de sua composição metabólica e para a avaliação do potencial citotóxico. Os extratos hidroalcoólicos de *Couepia grandiflora*, *Hirtella hebeclada*, *Licania hoehnei*, *Licania kunthiana*, *Licania huminis* e *Parinari excelsa* foram analisados por CG-EM, CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM para a identificação *in situ* de sua composição metabólica, através de comparação dos dados espectrais a uma base de dados contendo valores de massas de alta resolução e espectros de UV de todos os metabólitos secundários já relatados para a família Chrysobalanaceae. O uso de ferramentas de análise multivariada, como a deconvolução empírica proposta pelo software AMDIS e a extração espectral desenvolvidas pelos algoritmos RAMSY e MCR-ALS, assistiram à desreplicação ao extrair os espectros dos compostos, mesmo em baixa resolução cromatográfica. A desreplicação das espécies de Chrysobalanaceae permitiu a detecção *in situ* de metabólitos primários (aminoácidos, ácidos e açúcares) e secundários (flavonoides-*O*-glicosilados e polímeros de proantocianidinas). Adicionalmente ao estudo de determinação metabólica das matrizes vegetais, realizaram-se ensaios de atividade citotóxica. Resultados preliminares da bioatividade ante diferentes linhagens de *Saccharomyces cereviceae*, obtidos na construção da extratoteca, indicaram potencial citotóxico para as espécies estudadas, com destaque para *Hirtella hebeclada* e *Parinari excelsa*. Já a análise diante de diferentes linhagens tumorais demonstrou que os extratos não são ativos, o que pode estar relacionado a presença de compostos fenólicos citoprotetores, como flavonoides glicosilados.

Palavras-chaves: Chrysobalanaceae, desreplicação, metabolômica, análise multivariada, ensaio citotóxico.

ABSTRACT

The reductionist approach for the search of bioactive compounds in natural products is not always being able to understand the complete dynamics involved in the pharmacological responses of complex matrices such as plant extracts. Based on this paradigm, this study aimed to develop rational methods approaches to understand the molecular relationships present in bioactive natural products. Chrysobalanaceae plant species with cytotoxic potential, deposited NuBBE's bank of extracts, were the objects of study in the application of methodologies for defining the metabolic composition and evaluate their cytotoxic potential. *Couepia grandiflora*, *Hirtella hebeclada*, *Licania hoehnei*, *Licania kunthiana*, *Licania huminis* and *Parinari excelsa* ethanol extracts were analyzed by GC-MS, HPLC-DAD-MS/MS and HPLC-autoMS/MS for *in situ* metabolic identification based on spectral comparison with a high resolution mass spectra and UV spectral database developed using previously reported data for Chrysobalanaceae. The use of multivariate analysis tools, the empirical deconvolution software AMDIS and the spectral extraction algorithms RAMSY and MCR-ALS assisted the dereplication by extracting spectral data for "pure" compounds even at low chromatographic resolution. The dereplication of Chrysobalanaceae species allowed the *in situ* detection of primary metabolites (amino acids, and sugars) and secondary (O-glycosylated-flavonoids and proanthocyanidins polymers). In addition to the metabolic determination of Chrysobalanaceae extracts, were performed cytotoxicity bioassays. Preliminary results of cytotoxicity against *Saccharomyces cereviceae*, carried out during the construction of the bank of extracts, indicated cytotoxic potential, especially for *Hirtella hebeclada* and *Parinari excelsa*. However, the cytotoxic assay against different tumor cell lines showed that the extracts were not active, which may be related to which may be related to the extraction of citoprotective phenolic compounds, such as glycosilated flavonoids.

Keywords: Chrysobalanaceae, dereplication, metabolomics, multivariate analysis, cytotoxicity assay.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS	11
1.2	BIOLOGIA SISTÊMICA	15
1.3	METABOLÔMICA	15
1.4	QUIMIOMETRIA	17
1.5	DESREPLICAÇÃO	18
1.5.1	Cromatografia a gás (CG)	19
1.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	20
1.5.3	Detector de arranjo de diodos (DAD)	21
1.5.4	Espectrometria de massas (EM)	21
1.6	TÁXON CHRYSOBALANACEAE	25
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAIS	30
3.1.1	Solventes e reagentes	30
3.1.2	Extração e secagem	30
3.1.3	Cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM)	30
3.1.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massas	31
3.1.5	Softwares	31
3.2	MÉTODOS	32
3.2.1	Coleta e classificação do material vegetal	32
3.2.2	Metodologia de extração	32
3.2.3	Construção da base de dados	33
3.2.4	Preparação das amostras para análises cromatográficas	33
3.2.5	Análises por CG-EM	35
3.2.6	Análises por CLAE-DAD-EM/EM	41
3.2.7	Análises por CLAE-autoEM/EM	44
3.2.8	Bioensaios para verificação de atividade citotóxica	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	49
4.2	ANÁLISES POR CG-EM	50
4.3	ANÁLISES POR CLAE-DAD-EM/EM E CLAE-AUTOEM/EM	60
4.3.1	Proantocianidinas	65
	Flavonoides-O-glicosilados	77
4.4	BIOENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA	90
4.4.1	Avaliação da citotoxicidade com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
4.4.2	Avaliação da citotoxicidade com linhagens tumorais	91
5	CONCLUSÕES	93
6	REFERÊNCIAS	96
7	APÊNDICE	104

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de processo de ionização por elétrons a 70 eV: Formação do cátion radical, seguida de fragmentação e rearranjos moleculares (ARDREY, 2003).	23
Figura 2 - Modelo de triplo quadrupolo preparado para <i>tandem</i> -EM. (A) Triplo quadrupolo, (B) esquema de seleção do íon precursor e sua fragmentação.	24
Figura 3 - Distribuição geográfica da família Chrysobalanaceae, acessado de http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/maps/ em 20 abril de 2010.	25
Figura 4 - Flavonóides isolados da família Chrysobalanaceae. Gli = glicose, xil = xilose, RAM = ramnose, Gal = galactose, ara = arabinose, rut = rutinose.	26
Figura 5 – A) ácido 10 α ,13 α -diidroxí-9 α -metil-15-oxo-20-nor-kauran-19-óico γ -lactona e B) 10 α ,13 α ,17-triidroxí-9 α -metil-15-oxo-20-nor-kauran-19-óico com atividade citotóxica.	28
Figura 6 - Preparação das amostras para análises por CG-EM, CLAE-autoEM/EM e CLAE-DAD-EM/EM	34
Figura 7 - Esquema ilustrativo do RAMSY. No exemplo há co-eluição dos compostos A (pico cromatográfico vermelho) e B (pico cromatográfico azul). Após seleção do <i>driving peak</i> * (valor de <i>m/z</i> específico para o composto A) aplica-se RAMSY nos espectros de massas colhidos a cada <i>scan</i> (representados por 1, 2 e 3). A razão entre os sinais relativos ao mesmo composto A são relativamente constantes e o desvio padrão pequeno. Em contraste, para os valores de <i>m/z</i> referentes ao composto B, o desvio padrão resultante das razões é elevado. Assim o espectro calculado RAMSY destaca os sinais do composto A em detrimento do composto B, permitindo visualizar os íons características apenas para este composto.	38
Figura 8 - Reação de redução do reagente MTT em azul de formazan.	47
Figura 9 - Gráfico da equação do cálculo do índice de Kovats.	51
Figura 10 - Diagrama de caixa contendo o total de alvos detectados nas amostras de Chrysobalanaceae após variação de parâmetros de deconvolução no software AMDIS.	52
Figura 11 - TIC de (A) mistura de padrões, (B) extrato EOH das folhas de <i>Couepia grandiflora</i> , (C) região entre 7,45-7,60 min da mistura de padrões e (D) região entre 7,45-7,60 min das folhas de <i>Couepia grandiflora</i>	55
Figura 12 - (A) espectro de massas entre 7,45-7,60 min, (B) espectro de massas para ácido piroglutâmico deconvoluido por AMDIS e RAMSY, (C) espectro de massas para éster metílico de ácido dodecanóico por AMDIS e RAMSY, (D) espectro de massas para ácido treônico por AMDIS e RAMSY.	56
Figura 13 - Espectro de massas para ácido 4-aminobutírico deconvoluido por RAMSY.	57
Figura 14 - TIC de (A) mistura de padrões, (B) extrato EOH das folhas de <i>Couepia grandiflora</i> , (C) região entre 37,75-38,00 min. da mistura de padrões e (D) região entre 37,75-38,00 min. das folhas de <i>Couepia grandiflora</i>	58
Figura 15 - (A) espectro de massas entre 37,75-38,00 min, (B) espectro de massas para α -tocoferol deconvoluido por AMDIS e RAMSY, (C) espectro de	

massas para éster metílico de ácido octacosanóico por AMDIS e RAMSY, (D) espectro de massas para rafinose por AMDIS e RAMSY.	59
Figura 16 - Cromatograma de Pico-Base (CLAE-EM ESI+) de (a) folhas de <i>Couepia grandiflora</i> ; (b) ramos de <i>Couepia grandiflora</i> ; (c) ramos de <i>Licania humilis</i> ; (d) folhas de <i>Licania humilis</i> ; (e) folhas de <i>Hirtella hebeclada</i> coletadas no P.E. Serra do Mar; (f) folhas de <i>Hirtella hebeclada</i> coletadas na E.E. da Juréia; (g) ramos de <i>Hirtella hebeclada</i> coletadas na E.E. da Juréia; (h) folhas de <i>Parinari excelsa</i> ; (i) folhas de <i>Licania kunthiana</i> ; e (j) folhas de <i>Licania hoehnei</i>	60
Figura 17 - Cromatograma de Pico-Base (CLAE-autoEM ESI+) de (a) folhas de <i>Couepia grandiflora</i> ; (b) ramos de <i>Couepia grandiflora</i> ; (c) ramos de <i>Licania humilis</i> ; (d) folhas de <i>Licania humilis</i> ; (e) folhas de <i>Hirtella hebeclada</i> coletadas no P.E. Serra do Mar; (f) folhas de <i>Hirtella hebeclada</i> coletadas na E.E. da Juréia; (g) ramos de <i>Hirtella hebeclada</i> coletadas na E.E. da Juréia; (h) folhas de <i>Parinari excelsa</i> ; (i) folhas de <i>Licania kunthiana</i> ; e (j) folhas de <i>Licania hoehnei</i>	62
Figura 18 - Análise das folhas de <i>H. hebeclada</i> por CLAE-autoEM/EM (ESI +). (a) Cromatograma total de íons (TIC), (b) Região do TIC entre 22-23 min. indicando as aquisições de EM e EM/EM para os íons mais intensos 1 e 2. (c) espectro de massas mostrando os íons precursores $[M+H]_1^+$ e $[M+H]_2^+$ de 567.1299 e 303.0501 <i>m/z</i> . (d) íons produto de $[M+H]_1^+$ e (e) íons produto de $[M+H]_2^+$	64
Figura 19 - Perfis cromatográficos dos extratos EtOH de (a) folhas de <i>C. grandiflora</i> , (b) ramos de <i>C. grandiflora</i> , (c) ramos de <i>L. humilis</i> , (d) folhas de <i>L. humilis</i> , (e) folhas de <i>H. hebeclada</i> coletadas na E. E. da Juréia e (f) ramos de <i>P. excelsa</i> , obtidos por CLAE-DAD em gradiente de eluição: 5-100% MeOH + 0,1% HAc por 35 min. $\lambda = 280$ nm.	66
Figura 20 - Cromatograma CLAE-DAD λ 280nm e λ 350nm dos ramos de <i>C. grandiflora</i> e os espectros de UV recuperados por MCR-ALS para (1) miricetina-hexose, (2) miricetina-pentose, (3) quercetina-hexose, (4) metoxi-miricetina-deoxihexose, (5) quercetina-pentose Abs _{350nm} foi aumentada 10X para evidenciar efeito de comparação com CLAE-DAD _{280nm}).	67
Figura 21 - Proposta da via mecanística de fragmentação de <i>epi</i> *-galocatequina (<i>m/z</i> 307) a partir de EM/EM, em modo positivo.	71
Figura 22 - Proposta da via mecanística de fragmentação de (E)Gal-(E)Cat (<i>m/z</i> 595) a partir de EM/EM, em modo positivo.	74
Figura 23 - (a) espectro de massas (ESI -) entre tR 3,0-20,0 min - 245 scans -, dos ramos de <i>C. grandiflora</i> , (b) aumento dos sinais 595.2 <i>m/z</i> e 752.1 <i>m/z</i> indicando a distribuição isotópica para íon com uma carga $[M-H]^-$ e íon dimérico $[M-2H]^{2-}$	76
Figura 24 - Nomenclatura de fragmentação para flavonoides-O-glicosilados segundo DOMON e COSTELLO (1988).	77
Figura 25 - Mecanismo proposto para a formação do íon Y* formado durante experimentos EM/EM (ESI +) de quercetina-3-O-hexose(1→2)deoxihexose protonada $[M+H]^+$	82
Figura 26 - Espectros de CID-MS em modo positivo mostrando o perfil de fragmentação de quercetina-3-O-hexose(1→2)deoxihexose protonada $[M+H]^+$	82

Figura 27 - Espectro UV dos padrões quercetina (azul) e rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo, verde).....	83
Figura 28 - CID-EM (ESI-) evidenciando a formação dos íons regular e radical de (a) miricetina, (b) quercetina, (c) campferol e (d) taxifolina.	84
Figura 29 - Proposta da via mecanística de fragmentação da quercetina (m/z 303) a partir de EM/EM, em modo positivo.....	86
Figura 30 - Proposta da via mecanística de fragmentação da taxifolina (m/z 305) a partir de EM/EM, em modo positivo.....	87
Figura 31 - Proposta da via mecanística de fragmentação da metoxiquercetina (m/z 317) a partir de EM/EM, em modo positivo.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais de coleta das espécies de Chrysobalanaceae.	32
Tabela 2 - Gradiente de eluição para as análises por CLAE.	41
Tabela 3 - Gradiente de eluição para as análises por CLAE-autoEM/EM.	45
Tabela 4 - tR e IK para a mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos.	50
Tabela 5 - Variação de parâmetros para a deconvolução por AMDIS.	51
Tabela 6 - Metabólitos identificados por CG-EM utilizando tempo de retenção (tR), índice de Kovats (IR) e nível de similaridade do perfil de fragmentação (<i>match factor</i> - MF).	53
Tabela 7 - Composição de taninos detectada por CLAE-DAD-EM/EM e CLAE- autoEM/EM em espécies de Chrysobalanaceae.	68
Tabela 8 - Principais íons formados em CID-EM (ESI -) dos monômeros de flavan- 3-ol.	69
Tabela 9 - Principais íons formados em CID-EM (ESI +) dos monômeros de flavan- 3-ol.	70
Tabela 10 - Principais íons obtidos em CID-EM (ESI + e -) para dímeros de proantocianidinas.	73
Tabela 11 - flavonoides-O-diglicosilados detectados por CLAE-DAD-EM e CLAE- autoEM, nos modos positivo e negativo.	78
Tabela 12 - flavonoides-O-monoglicosilados detectados por CLAE-DAD-EM e CLAE-autoEM, nos modos positivo e negativo.	79
Tabela 13 - Principais íons-produto formados para as agliconas por EM/EM, ESI +.	85
Tabela 14 - Erros calculados para as fórmulas moleculares propostas para <i>m/z</i> 595, 309 e 147.	89
Tabela 15 - Atividade citotóxica dos extratos de Chrysobalanaceae frente as diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	90
Tabela 16 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em 3 linhagens tumorais testadas na concentração de 50µg.mL ⁻¹	91
Tabela 17 - Distribuição dos metabólitos nas seis espécies de Chrysobalanaceae analisadas por CLAE-DAD-EM/EM, CLAE-autoEM/EM e CG-EM.	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
ALS	Mínimos quadrados alternados (<i>alternate least squares</i>)
AMDIS	Automated mass spectral deconvolution and identification system
BS	Biologia sistêmica (<i>systems biology</i>)
C-18	octadecilsilano
CAD	Detector de aerossol carregado (<i>charged aerosol detector</i>)
CG	Cromatografia a gás
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas sequencial
Deo	deoxihexose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dicionário de Produtos Naturais (<i>Dictionary of Natural Products</i>)
DPM	Desvio padrão médio
EI	Ionização por elétrons

ELSD	Detector por espalhamento de luz evaporativo (<i>evaporative light scattering detector</i>)
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Espectrometria de Massas sequencial
(E)Cat	catequina ou <i>epi</i> -catequina
(E)Gal	galocatequina ou <i>epi</i> -galocatequina;
ESI	Ionização por eletrospray
EtOH	etanol
eV	eletronvolt
FAME	ésteres metílicos de ácidos graxos (<i>fatty acid methyl esters</i>)
HAc	ácido acético
HRF	clivagem heterocíclica do anel (<i>heterocyclic ring fission</i>)
HCT-8	Linhagem celular de carcinoma colorretal
Hex	hexose
HTS	ensaios biológicos automatizados (<i>High-throughput screening</i>)
IK	Índice de retenção de Kovats
IR	Infravermelho
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
MCR	Resolução multivariada de curvas (<i>multivariate curve resolution</i>)
MDAMB-435	Linhagem celular de melanoma
MeOH	metanol
MF	Fator de similaridade (<i>match factor</i>)

MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -[trimetilsilil]-trifluoracetamida
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-3-H-brometo de tetrazólio
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
Pen	pentose
QPN	Química de produtos naturais
QqToF	Analísadores do tipo quadrupolo e de tempo de voo
Rad 321N	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> selvagem
Rad 52Y	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> associada a topoisomerase I
Rad+	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> associada a topoisomerase II
RAMSY	Ratio analysis of mass spectrometry
RANSY	Ratio analysis of nmr spectroscopy
RDA	Reação de Retro Diels-Alder
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SF-295	Linhagem celular de glioblastoma
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
SVD	Decomposição em valores singulares (<i>singular value decomposition</i>)
TMCS	trimetilclorosilano
tR	Tempo de retenção
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS

Desde os tempos imemoriais o homem busca na natureza recursos que melhorem suas condições de sobrevivência e de qualidade de vida. A exploração destes recursos colocou os produtos naturais na base das atividades humanas e hoje podem ser vistos em todos os lugares, desde os combustíveis dos automóveis até as fibras e cores de nossas roupas. Na terapêutica, a busca pelo alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais e ainda hoje muitas espécies vegetais e preparados medicinais são estudados para o entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento de seus princípios ativos (PINTO et al., 2002; VIEGAS et al., 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A história é rica em exemplos do uso dos recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa. Um dos primeiros documentos que comprovam isto é o papiro de Ebers, do Egito Antigo, que descreve mais de cem doenças e um grande número de drogas de origem animal e vegetal. Na cultura clássica, diversas obras sobre a aplicação dos recursos naturais na medicina foram elaboradas por filósofos como Hipócrates, Aristóteles e Galeno, e cujos conhecimentos se estenderam por toda a Idade Média. Neste período, os estudos dos produtos naturais ganhou destaque entre os árabes, com nomes como Rhazés (Al-Razi) e Avicena (Ibn Sina), e permitiu a incorporação de conhecimentos orientais (especialmente chineses e indianos). Essas informações acerca dos produtos naturais penetrou a idade moderna e, com as Grandes Navegações, receberam novas plantas bioativas como a quina e a coca (NEWMAN et al., 2000; PINTO et al., 2002).

Do ponto de vista científico, a cura era considerada como uma interdependência de fenômenos espirituais e materiais e seus estudos tinham como principal finalidade

compreender o significado e não em exercer seu controle. Deste modo a terapêutica realizada por ervas medicinais era baseada na observação dos efeitos do extrato no indivíduo, através do método empírico. Isto muitas vezes gerava interpretações equivocadas como, por exemplo, a teoria da “assinatura dos corpos” proposta por Paracelso no sec. XIII, segundo a qual a “atividade farmacológica” de uma planta estaria relacionada com o seu aspecto morfológico. Assim, a serpentária, erva da família das aráceas cuja haste lembra o corpo de uma serpente, serviria para a cura de picadas de cobra (NEWMAN et al., 2000; PINTO et al., 2002).

A partir do século XVI, com o iluminismo, a noção de universo orgânico, vivo e espiritual foi substituída pela noção de mundo mecanicista. O corpo passou a ser tratado como uma máquina que pode ser analisada em termos de suas peças, e os extratos medicinais, em misturas de substâncias biologicamente ativas com mecanismos fisiológicos definidos. Assim, a partir do século XVIII, diversos preparados, geralmente incorporados às farmacopeias da época, foram estudados sob a óptica reducionista e resultaram no isolamento dos princípios ativos, como a morfina (1803), a estriquinina (1818), a quinina (1820), a salicina (1828), a digitoxina (1867) entre outras (CAPRA, 1982; PINTO et al., 2002).

No início, o isolamento baseava-se em precipitações em meio ácido e básico, o que limitava o estudo apenas a moléculas ionizáveis, em geral ácidos orgânicos e alcaloides. Com o advento das diferentes modalidades de cromatografia, método de separação fundamentado em propriedades físico-químicas como polaridade ou tamanho molecular, o processo tornou-se mais eficiente e novas classes de compostos puderam ser isoladas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Ainda hoje esta abordagem, conhecida como fitoquímica clássica, é o método preferencial em muitos grupos de pesquisa, especialmente com o uso de técnicas espectrométricas e espectroscópicas de identificação, tais como a espectrometria de massas (EM), a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

e do infravermelho (IV). Contudo, o isolamento cromatográfico ainda é dispendioso tanto em relação ao tempo e custo do estudo como em relação a quantidade de extrato vegetal necessário. (COLEGATE; MOLYNEUX, 2007).

Estas limitações do isolamento de compostos naturais, somado à crescente importância destas moléculas, estimularam novos métodos para sua obtenção, como a síntese orgânica e a modificação dos compostos isolados. Já no final do século XIX e início do século XX, diversos produtos naturais haviam sido produzidos em laboratório, como a quinina (1945), o colesterol (1951), estriquinina (1954) e reserpina (1958) e novos produtos foram elaborados, como a aspirina (1898) (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

A abordagem sintética levou à descoberta de diversas classes de fármacos como anti-histamínicos, anti-psicóticos, ansiolíticos, etc., o que estimulou investimentos na área de síntese orgânica, como *drug design*, síntese combinatória e HTS (ensaios biológicos automatizados - *high-throughput screening*). Contudo, abordagens inteiramente sintéticas e randômicas, como a síntese combinatória, não têm obtido o sucesso esperado. Por exemplo, nos últimos 30 anos, apenas uma nova classe de fármaco obtida por este tipo de síntese foi colocada no mercado (Sorafenib, aprovado pelo FDA em 2005) (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Ao mesmo tempo em que a síntese orgânica se desenvolvia, a fitoquímica permaneceu como estratégia interessante na busca por novos agentes terapêuticos, apesar das desvantagens inerentes ao processo de isolamento. De acordo com a literatura, cerca de 50% dos fármacos de uso clínico colocados no mercado nos últimos 30 anos são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Para o tratamento do câncer e de doenças infecciosas, mais de 60% dos fármacos provêm de produtos naturais ou análogos sintéticos, o que evidencia o sucesso da química de produtos naturais e sua associação com síntese na descoberta de fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; GIDDINGS, 2013).

Contudo, apesar dos avanços gerados nos últimos 60 anos, tem-se observado uma queda na descoberta de moléculas bioativas, especialmente na última década. Na química de produtos naturais, isto pode ser justificado pela baixa eficiência nos processos tradicionais de isolamento, i.e., embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas poucos quimiotipos - em maior concentração -, são geralmente identificados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Dentro desta perspectiva, alternativas têm sido propostas na pesquisa por agentes bioativos. Uma delas (talvez a mais importante) envolve o retorno ao paradigma holístico da saúde com o intuito de se observar fenômenos multifatoriais negligenciados na abordagem reducionista, por exemplo as interações sinérgicas e ou antagônicas de uma planta medicinal (VERPOORTE, et al., 2005; WANG et al., 2005; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009; ULRICH-MERZENICH et al., 2010; YULIANA et al., 2011; FUNARI et al., 2013).

Metodologias integrativas que, de maneira geral, buscam avaliar o organismo e o agente terapêutico como um todo, também estão sendo desenvolvidas. Na química de produtos naturais, temos por exemplo a **biologia sistêmica**, que considera as patologias e os mecanismos terapêuticos como processos multifatoriais, a **metabolômica**, que busca, no perfil metabólico total (do doente e do agente terapêutico), informações e correlações relevantes ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, a **quimiometria**, que permite a análise dos complexos processos multifatoriais e sua interpretação, e a **desreplicação**, que simplifica o processo analítico através da detecção *in silico* de moléculas previamente conhecidas (ULRICH-MERZENICH et al., 2007; LANG et al., 2008; NICHOLSON; LINDON, 2008; LI; VEDERAS, 2009; HUR et al., 2013; TAWFIKE et al., 2013).

1.2 BIOLOGIA SISTÊMICA

Fundamentada na Teoria Geral dos Sistemas, a biologia sistêmica (BS - *systems biology*) estuda a relação entre genótipo e fenótipo. Porém, diferentemente da abordagem em nível molecular ‘um gene/uma enzima’ para o entendimento do organismo como um todo, a BS trata o organismo como uma complexa rede de interação de agentes moleculares (mRNA, DNA, proteínas e metabólitos) e o ambiente que o cerca. Desta forma, a partir do estudo integrado dos componentes e comportamentos dinâmicos dos sistemas biológicos, através da combinação de modelagem matemática e biologia experimental, é possível obter informações impossíveis de serem determinadas com o estudo individualizado de cada componente (VON BERTALANFFY, 1975; LEVESQUE; BENFEY, 2004; NICHOLSON; LINDON, 2008; FUNARI et al., 2013).

Na área dos produtos naturais, BS visa determinar a bioatividade utilizando sistemas celulares ou organismos íntegros (órgãos animais, cultura de tecidos, etc.) e avaliar o maior número de parâmetros possíveis, utilizando bibliotecas de DNA, dados proteômicos e metabolômicos. A análise multivariada dos efeitos dos extratos ou compostos puros sobre um sistema vivo permite a caracterização diferenciada dos efeitos e a comparação com efeitos conhecidos. Desse modo podem ser descobertos novos mecanismos de ação, com a possibilidade de encontrar um composto com múltiplos efeitos. No caso de misturas, o sinergismo pode ser analisado e demonstrado (FUNARI et al., 2013; WOLFENDER et al., 2013).

1.3 METABOLÔMICA

A metabolômica é definida como a análise qualitativa e quantitativa dos eventos moleculares primários e secundários de um dado organismo para a elaboração do perfil metabólico, i.e metaboloma (NICHOLSON et al., 1999; NICHOLSON; LINDON, 2008). Nos

últimos anos, o número de publicações envolvendo este conceito com a química de produtos naturais tem crescido exponencialmente, o que mostra a importância desta abordagem (WOLFENDER et al., 2013).

Pesquisas em metabolômica têm sido utilizadas para diversas finalidades, desde uma melhor compreensão do metabolismo secundário, até para a identificação de relações taxonômicas e quimiossistemáticas, além de controle da qualidade de fitoterápicos ou mesmo estudos de biossíntese e regulação genética (transcriptoma e proteoma) (VERPOORTE et al., 2005; FUNARI et al., 2013; WOLFENDER et al., 2013).

O objetivo da metabolômica é compreender importantes processos biológicos, muitas vezes de caráter multifatorial, através de variações fenotípicas frente a diferentes estímulos, como por exemplo, doença, dieta ou intervenções terapêuticas (NICHOLSON et al., 1999; NIELSEN; JEWETT, 2007; NICHOLSON; LINDON, 2008; PATTI et al., 2012).

Esta abordagem pode ser associada a filosofia da BS, uma vez que fornece uma visão integrada da composição bioquímica, para avaliar os efeitos biológicos de substâncias puras e matrizes complexas a partir da resposta metabólica. Estes estudos de determinação de bioatividade podem ser realizados de duas maneiras distintas. Uma delas, denominada análise metabolômica *in silico*, correlaciona os perfis metabólicos do agente terapêutico com os resultados de atividade biológica, através do uso de modelos matemáticos. Assim, é possível verificar quais compostos presentes na matriz complexa são responsáveis pela atividade biológica e se há possíveis interações sinérgicas e/ou antagônicas (KIM et al., 2010).

Outra maneira de se determinar a atividade biológica corresponde à análise metabolômica *in situ* que consiste no monitoramento das mudanças metabólicas dos sistemas biológicos, por exemplo, linhagens celulares e tumorais, microorganismos, ou fluidos biológicos, em resposta aos estímulos farmacológicos ou toxicológicos do agente terapêutico. Desta forma, pode-se verificar a possível ação biológica do agente e também o provável

mecanismo de ação, identificado pelas alterações metabólicas no sistema biológico (KIM et al., 2010).

Contudo o uso de BS na exploração de moléculas biologicamente ativas em matrizes complexas apresenta um desafio às técnicas analíticas modernas devido ao grande número de compostos distintos e às interações moleculares (antagonistas ou sinérgicas) ainda pouco compreendidas e exploradas (WOLFENDER et al., 2013).

Assim, métodos automatizados são necessários para a identificação do perfil metabólico dos complexos sistemas biológicos, bem como modelos computacionais matemáticos e estatísticos para extrair informações significativas dos dados obtidos (WOLFENDER et al., 2013).

1.4 QUIMIOMETRIA

A Quimiometria corresponde ao ramo da química que utiliza métodos matemáticos e de estatística multivariada para definir/selecionar as condições ótimas de medição de um determinado experimento ou ainda extrair uma maior quantidade de informações a partir da resposta analítica (HIBBERT et al., 2009).

Na química de produtos naturais a quimiometria permite a otimização de processos extrativos, através da seleção multivariada dos solventes e de suas proporções relativas, a obtenção de um perfil metabólico (*fingerprints*) mais rico, com a adequada seleção dos parâmetros instrumentais como condições cromatográficas e/ou de aquisição de dados espectrais, e até mesmo a interpretação de comportamentos e tendências a partir da observação "completa" dos dados químicos obtidos (LIANG et al., 2010; RAJALAHTI; KVALHEIM, 2011; FUNARI et al., 2014).

Na busca por compostos bioativos através da biologia sistêmica, a quimiometria é fundamental para "extrair" as informações obtidas na análise simultânea dos componentes e interações envolvidos nas respostas farmacológicas das matrizes bioativas, não fornecidas pela abordagem "reducionista", e torna viável o entendimento do pluralismo de causas e efeitos que emergem das matrizes complexas (por exemplo, plantas medicinais) e/ou, do organismo tratado pelo agente terapêutico (FUNARI et al., 2013; WOLFENDER et al., 2013).

1.5 DESREPLICAÇÃO

A desreplicação (*dereplication*) pode ser definida como a identificação de compostos conhecidos sem a necessidade de isolamento, usualmente através da análise por diferentes métodos espectroscópicos e a comparação com bases de dados. O termo foi inicialmente utilizado no final dos anos 70 e anos 80 com a busca por antibióticos em diferentes linhagens de microrganismos e em processos de triagem de extratos vegetais com atividade anti-HIV. Nestes trabalhos, utilizava-se da desreplicação para racionalizar o processo de isolamento de substâncias que apresentavam dados espectroscópicos semelhantes aos compostos bioativos presentes na base de dados, por exemplo penicilina ou cefalosporina com atividade antimicrobiana, levando ao isolamento de derivados bioativos. (MILLER; NEUSS, 1978; CRAGG et al., 1994).

Na desreplicação, a matriz complexa é analisada por uma ou mais técnicas de detecção (usualmente hifenadas às técnicas de separação e aos bioensaios *in vitro* ou *in vivo*) para a obtenção de dados físico-químicos, e.g., absorção em determinado comprimento de onda, relação massa/carga, tempo de retenção, etc. Aqueles metabólitos de interesse (bioativos por exemplo) são comparados a bases de dados para a detecção dos compostos já descritos e a partir da comparação é possível então realizar a detecção dos metabólitos já conhecidos, sem a necessidade de seu isolamento (LANG et al., 2008).

Diferentes técnicas analíticas podem ser utilizadas para a detecção *in situ* de moléculas. Os principais métodos envolvem a hifenação de técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia a gás (CG) à um ou mais detectores como o detector de arranjo de (foto)diodos (DAD), o espectrômetro de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN), e a um bioensaio, normalmente *in vitro*. A separação cromatográfica permite a análise de uma ou poucas substâncias de cada vez, o que simplifica o dado espectroscópico obtido, além de fornecer uma informação relevante, que é o tempo de retenção (LANG et al., 2008; TANG et al., 2009; WOLFENDER, 2009).

Já os detectores são os responsáveis pela identificação química uma vez que fornecem os dados espectroscópicos/espectrométricos. Como cada detector apresenta características específicas, usualmente estudos de desreplicação os utilizam em hifenação, de maneira a fornecer a maior quantidade de dados possíveis por análise. Entre as principais detectores utilizados estão o DAD, o EM e a RMN, mas outros detectores podem ser utilizados dependendo da mistura a ser analisada, como o detector de aerossol carregado (*charged aerosol detector* - CAD) e o detector por espalhamento de luz evaporativo (*evaporative light scattering detector* - ELSD) (WOLFENDER, 2009).

1.5.1 Cromatografia a gás (CG)

A cromatografia a gás foi introduzida por James e Martin em 1952 (JAMES; MARTIN, 1952). A separação dos analitos ocorre devido à volatilidade relativa, propriedade fortemente relacionada com o ponto de ebulição, e permite a distribuição diferencial dos compostos entre as fases móvel e estacionária a partir da variação de temperatura no sistema. Apesar da ampla aplicação desta técnica, devido especialmente às elevadas reprodutibilidade e resolução, a cromatografia a gás restringe-se a análise de substâncias voláteis e termoestáveis, o que de fato inibiu seu uso em estudos metabolômicos e na QPN. Para

contornar esta limitação, métodos de derivatização, i.e., reações de modificação dos grupos funcionais de moléculas orgânicas, têm sido desenvolvidos para permitir o aumento da volatilidade, a diminuição da polaridade e a melhora da termoestabilidade, características necessárias à análise por CG (LANÇAS; MCNAIR, 1983; HALKET et al., 2005).

A partir da derivatização, a cromatografia a gás pode ser uma ferramenta de eleição no que se refere a identificação *in situ* de compostos orgânicos em matrizes complexas, principalmente através de seu acoplamento com a espectrometria de massas, uma vez que fornece dados espectrais passíveis de comparação com bases de dados, ainda que o processo de modificação química possa levar a falsas interpretações (HALKET et al., 2005).

1.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE (*High-performance liquid chromatography* - HPLC) é um método muito popular na análise *in situ* e no isolamento de produtos naturais bioativos devido a boa resolução e flexibilidade para a análise de diversas moléculas. Diferentemente da cromatografia a gás, onde o analito e a fase móvel estão na fase gasosa, na cromatografia líquida a amostra é dissolvida em um solvente, introduzida na coluna a pressões de 150-200 bar, e a separação procede a partir das interações físico-químicas diferenciais entre as moléculas na fase móvel e a fase estacionária (LANÇAS, 2009).

A separação dos metabólitos para estudos de desreplicação é realizada em nível analítico, utilizando predominantemente a fase reversa C-18 (octadecilsilano), em modo de eluição gradiente a partir de misturas de solventes ACN-H₂O ou MeOH-H₂O. Uma vez que os extratos vegetais são misturas altamente complexas, a CLAE é uma opção interessante ao permitir a separação *online* de metabólitos de diferentes polaridades a baixa temperatura, sendo necessário apenas que as moléculas sejam solúveis na fase móvel (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013).

1.5.3 Detector de arranjo de fotodiodos (DAD)

Este detector é amplamente utilizado na química de produtos naturais devido ao menor custo do equipamento e das análises. É utilizado na desreplicação normalmente associado a outros detectores, como o EM, em um sistema *online* (HANSEN et al., 2005; LARSEN; HANSEN, 2007).

Há diversos exemplos da aplicação do DAD na desreplicação. Inclusive este detector foi um dos primeiros a ser utilizados nesta abordagem. Por exemplo, em trabalho de 1984, diferentes linhagens da bactéria *Streptomyces tendae* foram desreplicadas na busca por compostos antimicrobianos derivados da nicomicina contendo anel pirimidínico (λ_{max} 260nm) ou anel imidazolônico (λ_{max} 290nm) (FIEDLER, 1984).

Apesar da popularidade, o uso do DAD é restrito aos compostos que apresentam grupos cromóforos, i.e., regiões da molécula com orbitais π e n capazes de absorver luz na região do UV/Vis, por exemplo, polifenóis. Além disto, a informação estrutural fornecida é limitada aos grupos cromóforos e, em sistemas *online*, a absorção da fase móvel compromete a detecção de compostos que absorvam em menores comprimentos de onda (LARSEN; HANSEN, 2007; WOLFENDER, 2009).

1.5.4 Espectrometria de massas (EM)

Outro detector utilizado na desreplicação é o espectrômetro de massas (EM) devido à sua rapidez nas análises e elevada sensibilidade, o que permite o uso de menores quantidades de amostra. Neste tipo de detector, as moléculas são ionizadas e identificadas por sua relação massa/carga que, no geral, corresponde a massa molecular. A detecção *in situ* de produtos naturais ocorre através da determinação da fórmula molecular a partir da massa molecular, acurada no caso de analisadores que permitam a alta resolução, e ela é justificada por

propostas mecanísticas de fragmentação a partir do espectro de íons produto, obtidos em experimentos EM/EM sequenciais (*tandem*) (CROTTI et al., 2006; WOLFENDER, 2009).

Uma metodologia comum na desreplicação por EM envolve a análise do extrato por CLAE-EM. Neste método, os compostos são separados e então detectados pelo espectrômetro. Obtém-se o espectro de massas, em baixa ou alta resolução e, a partir dos íons gerados, propõem-se as fórmulas moleculares. Comparam-se estas fórmulas moleculares com bases de dados (criadas no próprio grupo ou publicas como o Dicionário de Produtos Naturais - DNP) para a detecção das substâncias. Neste ponto, além da fórmula molecular, outros fatores podem ser considerados, como o tempo de retenção, o espectro no UV se o DAD estiver acoplado, etc. A seguir, após as propostas de detecção serem elaboradas, realizam-se experimentos sequencias em célula de colisão (*tandem*) para a fragmentação do(s) íon(s) de interesse. A partir dos fragmentos obtidos, a substância proposta é então justificada através de vias mecanísticas de fragmentação (EL-ELIMAT et al., 2013).

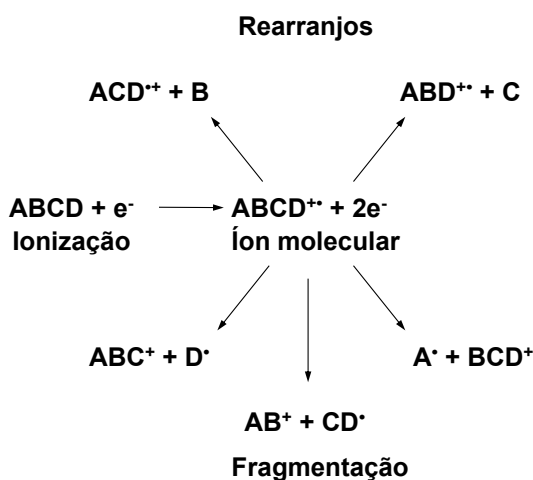
Outra metodologia possível é a injeção direta ao espectrômetro. Ou seja, o extrato é injetado diretamente no detector para a obtenção dos íons e fragmentos. Neste caso, como não há prévia separação dos compostos, a complexidade do espectro gerado pode limitar a detecção apenas para compostos majoritários, mesmo o EM sendo bastante sensível. Contudo esta opção é interessante, principalmente nos casos em que a separação cromatográfica é inviável, por exemplo na análise de taninos, compostos polifenólicos com alta capacidade de absorção de luz UV e extremamente lábeis que polimerizam facilmente na presença de luz e calor, o que torna a cromatografia um desafio, especialmente quando se trabalha com o extrato bruto (RODRIGUES et al., 2007).

Os diferente tipos de ionização tornam o EM um detector praticamente universal, abrangendo uma grande quantidade de moléculas, de diferentes tamanhos e polaridades. Por exemplo, para compostos apolares saturados, cuja estabilidade é maior, utilizam-se modos de

ionização mais energéticos como ionização por elétrons (*electron ionization* - EI). Já para compostos polares conjugados, a ionização pode ser feita por técnicas menos energéticas como o eletrospray (*electrospray ionization* - ESI).

Na ionização por EI, um feixe de elétrons é acelerado a energias entre 10 e 150 eV por um ânodo e, ao interagir com as moléculas do analito em fase gasosa, remove um ou mais elétrons. Como a energia do feixe é maior que as energias de ligação típicas de moléculas orgânicas (4-5 eV), o processo de remoção eletrônica é seguido por sucessivas clivagens e rearranjos moleculares, o que gera um perfil de fragmentação - Figura 1 (ARDREY, 2003; GROSS, 2004).

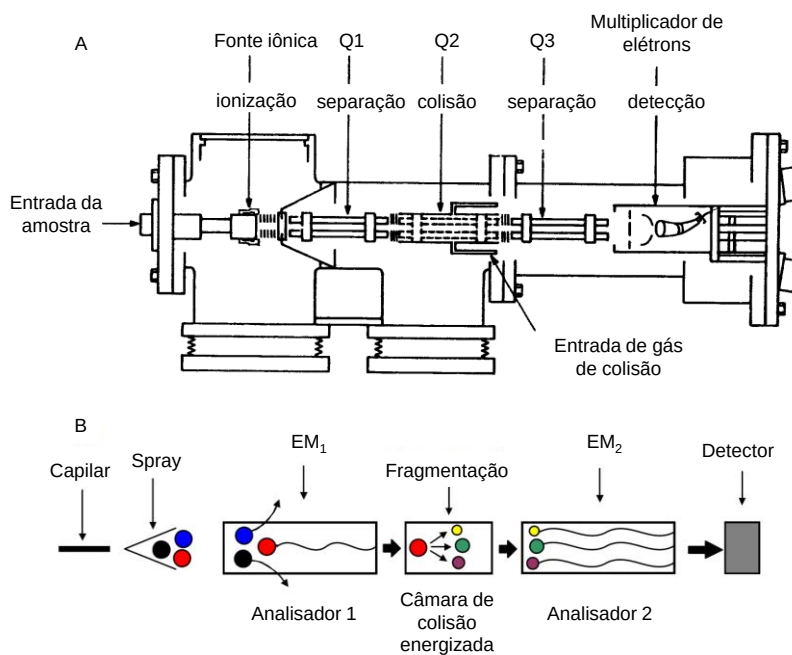
Figura 1 - Esquema de processo de ionização por elétrons a 70 eV: Formação do cátion radical, seguida de fragmentação e rearranjos moleculares (ARDREY, 2003).



Já na ESI, um campo elétrico dispersa uma amostra líquida em um gás a pressão atmosférica, na forma de um spray (nebulização) de gotas carregadas que, por evaporação, resultam em íons na fase gasosa. Contudo, como pouca energia residual é retida nos íons após a ionização, a ESI acarreta em uma baixa fragmentação, ao contrário do que é observado na EI. Assim, para a desreplicação, é necessário o uso de equipamentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM), na qual os íons gerados por ESI podem ser seletivamente fragmentados (FENN, 2003; GROSS, 2004; CROTTI et al., 2006).

Em uma análise por EM/EM são necessários ao menos três estágios. O primeiro envolve a seleção de um íon precursor (assim chamado porque dele serão formados outros íons) e sua transferência para uma célula de colisão. O segundo estágio consiste na fragmentação do íon precursor através, por exemplo, de dissociação induzida por colisão (*collision-induced dissociation* - CID) utilizando um gás inerte (Ar, Xe, He, N₂ ou CO₂) e o terceiro estágio compreende a detecção destes fragmentos (íons produto) - Figura 2 (MORAES; LAGO, 2003; CROTTI et al., 2006).

Figura 2 - Modelo de triplo quadrupolo preparado para *tandem*-EM. (A) Triplo quadrupolo, (B)



1.6 TÁXON CHRYSOBALANACEAE

A família Chrysobalanaceae é composta por 17 gêneros e aproximadamente 525 espécies de árvores e arbustos distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia – Figura 3 (YAKANDAWALA et al., 2010; CARNEVALE NETO et al., 2013).

Figura 3 - Distribuição geográfica da família Chrysobalanaceae, acessado de <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/maps/> em 20 abril de 2010.



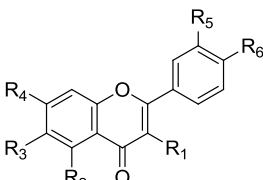
Entre os gêneros descritos, há *Acioa* (possuindo quatro espécies na região tropical da América do Sul), *Chrysobalanus* (com três espécies localizadas na América Central e nas regiões litorâneas da América do Sul), *Couepia* (com 71 espécies no neotrópico), *Exellodendron* (com cinco espécies na região central e ocidental da América do Sul), *Hirtella* (com 105 espécies na América e África), *Licania* (com 215 espécies distribuídas entre os continentes americano, africano e asiático), *Maranthes* (com apenas uma espécie encontrada na Costa Rica, Panamá e Nicarágua) e *Parinari* (com 45 espécies localizadas entre a América Central e do Sul, África e Ásia) (BUENO; CASTILHO, 2004; CASTILHO; KAPLAN, 2008; YAKANDAWALA et al., 2010).

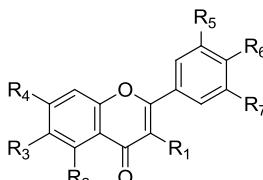
Os gêneros de Chrysobalanaceae se diferenciam pelas características anatômicas de suas flores, actinomórficas ou zigomórficas, e frutos, apresentando diferentes formas de carpo e número de sementes (uma ou raramente duas por fruto) (CARNEVALE NETO et al., 2013).

Estudos fitoquímicos em espécies de Chrysobalanaceae revelaram a presença de flavonoides, cromonas, triterpenos ursanos, oleanos e diterpenos kaurânicos com propriedade citotóxica (BRACA et al., 2003; CASTILHO; KAPLAN, 2008; CARVALHO; COSTA, 2009; CARNEVALE NETO et al., 2013).

Entre os flavonóides detectados, destacam-se os derivados glicosilados de quercetina, miricetina e campferol, importantes marcadores quimiossistemáticos de Chrysobalanaceae – Figura 4 (BARBOSA et al., 2006).

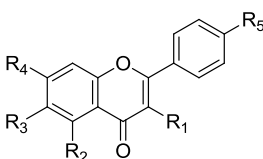
Figura 4 - Flavonóides isolados da família Chrysobalanaceae. Gli = glicose, xil = xilose, RAM = ramnose, Gal = galactose, ara = arabinose, rut = rutinose.

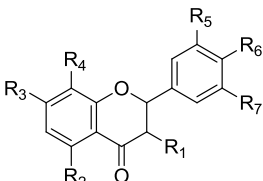




R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
O-gli	OH	OH	OH	OH	OH	OH
O-rut	OH	OH	OH	OH	OH	OH
O-ram	OH	OH	OH	OH	OH	OH
O-xil-ram	OH	OH	OH	OH	OH	OH
O-gal	OH	OH	OH	OH	OH	OH
O-rut	OH	OH	OH	CH ₃	OH	OH
O-gli	OH	OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH
O-ram-ram	O-gal	OH	OH	OH	OH	OH
O-ram	OH	OH	OH	OH	O-ram	OH
O-ram	OH	OH	OCH ₃	OH	O-ram	OH
O-gal	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	OH
O-ara	OH	OH	OH	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH	OH	O-ram	OH
OH	OH	OH	OH	OH	O-ram	OH

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
O-ram	OH	OH	OH	OH	OH
O-rut	OH	OH	OH	OH	OH
O-gli	OH	OH	OH	OH	OH
O-gal	OH	OH	OH	OH	OH
O-ara	OH	OH	OH	OH	OH
O-gli	O-gal	OH	OH	OH	OH
O-gli	O-gli	O-gli	OH	OH	OH





R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
O-xil-ram	OH	H	OH	OH		
O-cumaroil-gli	OH	H	OH	OH		
O-ara	OH	H	OH	OH		
O-ram	OH	H	OH	OH		
O-rut	OH	H	OH	OH		
O-gli	OH	H	OH	O-gli		
O-gli	OH	O-gli	OH	O-gli		
O-gli	OH	H	OH	OH		
OH	OH	H	OH	OH		

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
H	OH	OH	H	H	OH	H
H	OH	OH	OH	H	OH	H
H	OH	OH	OH	H	OCH ₃	H
O-ram	OH	OH	H	OH	OH	OH
O-ram	OH	OH	H	H	OH	OH
O-xil-ara	OH	OH	H	H	OH	OH
O-ara	OH	OH	H	H	OH	OH

A composição flavonoídica característica da família foi utilizada na comparação entre 31 espécies do gênero *Parinari* coletadas na América, África e Ásia, e os indivíduos africanos

foram observados como os únicos capazes de produzir miricetina, metabólito considerado por este trabalho um flavonol primitivo, e que sugere a migração deste gênero da África para as outras regiões do mundo (CORADIN et al., 1985).

Diversas espécies de Chrysobalanaceae são utilizadas na medicina tradicional, principalmente para o tratamento de diarreia, disenteria e malária. A infusão de folhas e caule de *Chrysobalanus icaco* é utilizada para o tratamento de leucorreia, hemorragias e diarreias. A decocção das folhas de *Parinari curatellifolia* é usada no combate à febre, infecção oral e no tratamento de feridas, enquanto a infusão quente das cascas do caule é utilizada para o tratamento de pneumonia (FERREIRA-MACHADO et al., 2004; HALILU et al., 2008).

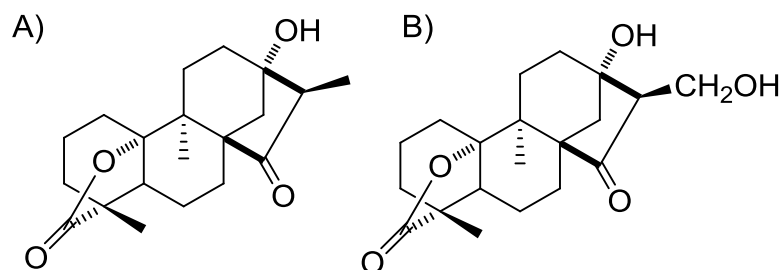
Estudos farmacológicos visando validar as propriedades etnofarmacológicas foram realizados. Os extratos hexânico e etanólico das folhas de *Couepia grandiflora* foram avaliados quanto às atividades citotóxica, antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Ambos foram ativos na ação citotóxica e antioxidante. O extrato etanólico também apresentou ação antibacteriana diante das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ZUQUE et al., 2004).

O extrato etanólico das sementes de *P. curatellifolia* demonstrou ação hipoglicemiante e hipercolesterêmica em ratos com diabetes induzida depois de tratados diariamente com 250,0 mg.kg⁻¹, durante 30 dias. Além disso, não houve sinais de toxicidade em ensaio *in vivo* em administração de dose única via oral a 20,0 g.kg⁻¹. Paralelamente, o extrato aquoso das raízes de *Parinari excelsa* apresentou ação hipoglicemiante em ensaio semelhante, em ratos tratados com 100 e 300 mg.kg⁻¹ via oral, durante 7 dias (NDIAYE et al., 2008; OGBONNIA et al., 2008).

Lactonas diterpênicas com esqueleto kaurânico, presentes em diversas espécies de Chrysobalanaceae, foram isoladas nas raízes de *Parinari curatellifolia* e apresentaram ação citotóxica no ensaio citométrico *in vitro* em linhagens ZR-75 de câncer de mama.

Adicionalmente, as moléculas não causaram ação mutagênica no teste *in vitro* de Ames frente à *Salmonella typhimurium* cepa TM677. Outros 20 diterpenos kaurânicos foram isolados das folhas de *Parinari sprucei* e demonstraram ação antitumoral *in vitro* em seis diferentes linhagens tumorais (língua, cólon, carcinoma epidermóide, próstata, retina e umbilical), com destaque para os ácidos 10 α ,13 α -diidroxi-9 α -metil-15-oxo-20-nor-kauran-19-óico γ -lactona e 10 α ,13 α ,17-triidroxi-9 α -metil-15-oxo-20-nor-kauran-19-óico, com IC₅₀ 10 e 20 $\mu\text{M.mL}^{-1}$, respectivamente - Figura 5 (BRACA et al., 2004) .

Figura 5 – A) ácido 10 α ,13 α -diidroxi-9 α -metil-15-oxo-20-nor-kauran-19-óico γ -lactona e B) 10 α ,13 α ,17-triidroxi-9 α -metil-15-oxo-20-nor-kauran-19-óico com atividade citotóxica.



Lactonas diterpênicas isoladas da fração diclorometânica do caule de *Parinari capensis* apresentaram atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa FCR-3 de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina com IC₅₀ de 0.54 a 1.57 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ (LEE et al., 1996; UYS et al., 2002).

Apesar do mecanismo de ação citotóxico dos diterpenos kauranos não ter sido proposto, acredita-se que esteja envolvido na alquilação de componentes celulares e de DNA através de reação de adição de Michael, fato este que corrobora com a ação antimalárica uma vez que aceptores de Michael são inespecíficos. Adicionalmente, a presença de grupos γ -lactona internalizado na estrutura destes kauranos também podem estar envolvidos na atividade contra *P. falciparum*, uma vez que γ -lactona são reconhecidamente grupos farmacofóricos no tratamento do *Plasmodium* (CARNEVALE NETO et al., 2013).

2 OBJETIVO

Determinar a composição metabólica *in situ* das espécies vegetais da família Chrysobalanaceae: *Couepia grandiflora* Benth., *Hirtella hebeclada* Moric. ex DC., *Licania hoehnei* Pilg., *Licania kunthiana* Hook.f., *Licania humilis* Cham. e *Parinari excelsa* Sab., através do uso de CLAE-DAD-EM/EM, CLAE-autoEM/EM e CG-EM em associação com ferramentas quimiométricas de deconvolução espectral, e avaliar o potencial citotóxico das espécies sob a óptica da biologia sistêmica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Solventes e reagentes

Para a preparação das amostras e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados: ácido acético glacial (HAc), metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) grau HPLC (Mallinckrodt, Paris, Kentucky, USA) e H₂O deionizada (18mΩ; Milli-Q, Millipore). Os solventes foram degaseificados com auxílio de vácuo e banho de ultrassom. Para as reações de derivatização, empregou-se cloridrato de metoxiamina, MSTFA (*N*-metil-*N*-[trimetilsilil]-trifluoracetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) e piridina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

3.1.2 Extração e secagem

A extração do material vegetal seco e pulverizado se deu por fluido pressurizado através do uso de sistema extrator Dionex ASE 300 (Dionex Canada Ltd., Oakville, ON, CA). A eliminação do solvente utilizado no preparo das amostras (EtOH 96%, v/v) foi realizada em evaporador rotativo a baixa pressão Eppendorf Vacufuge (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA).

3.1.3 Cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM)

As amostras foram analisadas em cromatográfico a gás Agilent 7890A GC-5975C acoplado a um espectrômetro de massas MSD com modo de ionização por elétrons (IE) e analisador do tipo quadrupolo (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Utilizou-se coluna capilar Agilent DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm + 10 m pré-coluna Duraguard) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e hélio como gás de arraste.

3.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e espectrômetro de massas (EM)

A identificação dos compostos também foi realizada em cromatógrafo analítico ternário Shimadzu (Kyoto, Japan) modelo LC-20A acoplado a um detector UV-DAD Shimadzu CBM20A e a um espectrômetro de massas UltrOTof (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com modo de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo QqToF (analisadores do tipo quadrupolo e de tempo de voo, sequenciais). Utilizou-se coluna monolítica Onyx® C-18, (100 X 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA) e pré-coluna: Onyx® C-18, (5 X 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA).

Também fez-se o uso de um sistema CL Agilent 1200 SL LC acoplado a um espectrômetro de massas Q-ToF Agilent 6520 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (100 X 3,0 mm, 1,8 µm) acoplada a uma pré-coluna de material equivalente (4,6 × 5,0 mm). As amostras analisadas por CLAE passaram pelo processo de remoção de interferentes apolares através de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) utilizando cartuchos de C-18 Strata de 55 µm, 5 g/20 mL, 70 Å (Phenomenex, Torrance, CA).

3.1.5 Softwares

Os dados foram analisados pelos softwares: Bruker DataAnalysis ver. 4.3 (Bruker Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), MassHunter Workstation software ver. B.06.00 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System ver. 2.64 (AMDIS, NIST, EUA).

O método cromatográfico utilizado em CLAE-autoEM/EM foi adaptado de método descrito na literatura através do software *HPLC Calculator* ver. 3.0, disponível em <http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/index.htm> (GUILLARME et al., 2008). Os

métodos quimiométricos foram desenvolvidos e aplicados no Software MATLAB ver. 7.10 (R2010a) (The MathWorks Inc., Natick, EUA). Os algoritmos de rotina MCR-ALS e PURE foram obtidos através de <http://www.mcrals.info/>.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta e classificação do material vegetal

As amostras vegetais foram coletadas em diferentes localidades no estado de São Paulo, conforme tabela 1, e identificadas pela botânica Giselda Durigan. Exsiccatas foram depositadas no herbário do Instituto de Botânica da cidade de São Paulo.

Tabela 1 - Locais de coleta das espécies de Chrysobalanaceae.

Espécie vegetal	Parte	Código	Local da coleta
<i>Licania hoehnei</i>	Folhas	M847	Estação Ecológica da Juréia-Itatins / Núcleo Arpoador
<i>Licania kunthiana</i>	Folhas	M846	Estação Ecológica da Juréia-Itatins / Núcleo Arpoador
<i>Licania humilis</i>	Ramos	AM253	Estação Ecológica e Experimental de Assis
<i>Licania humilis</i>	Folhas	AM254	Estação Ecológica e Experimental de Assis
<i>Couepia grandiflora</i>	Folhas	AM229	Estação Ecológica e Experimental de Assis
<i>Couepia grandiflora</i>	Ramos	AM230	Estação Ecológica e Experimental de Assis
<i>Hirtella hebeclada</i>	Folhas	M491	Parque Estadual da Serra do Mar / Núcleo Cunha
<i>Hirtella hebeclada</i>	Folhas	M799	Estação Ecológica da Juréia-Itatins / Núcleo Arpoador
<i>Hirtella hebeclada</i>	Ramos	M851	Estação Ecológica da Juréia-Itatins / Núcleo Arpoador
<i>Parinari excelsa</i>	Folhas	M821	Estação Ecológica da Juréia-Itatins / Núcleo Arpoador

3.2.2 Metodologia de extração

O material vegetal, separado em ramos e folhas, foi seco à temperatura ambiente, triturado em moinho de facas e submetido à extração por fluido pressurizado. No protocolo, estabelecido pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), utilizou-se EtOH (96%, v/v), a temperatura de 60°C e pressão de 1500 psi e tempo de extração 15 minutos.

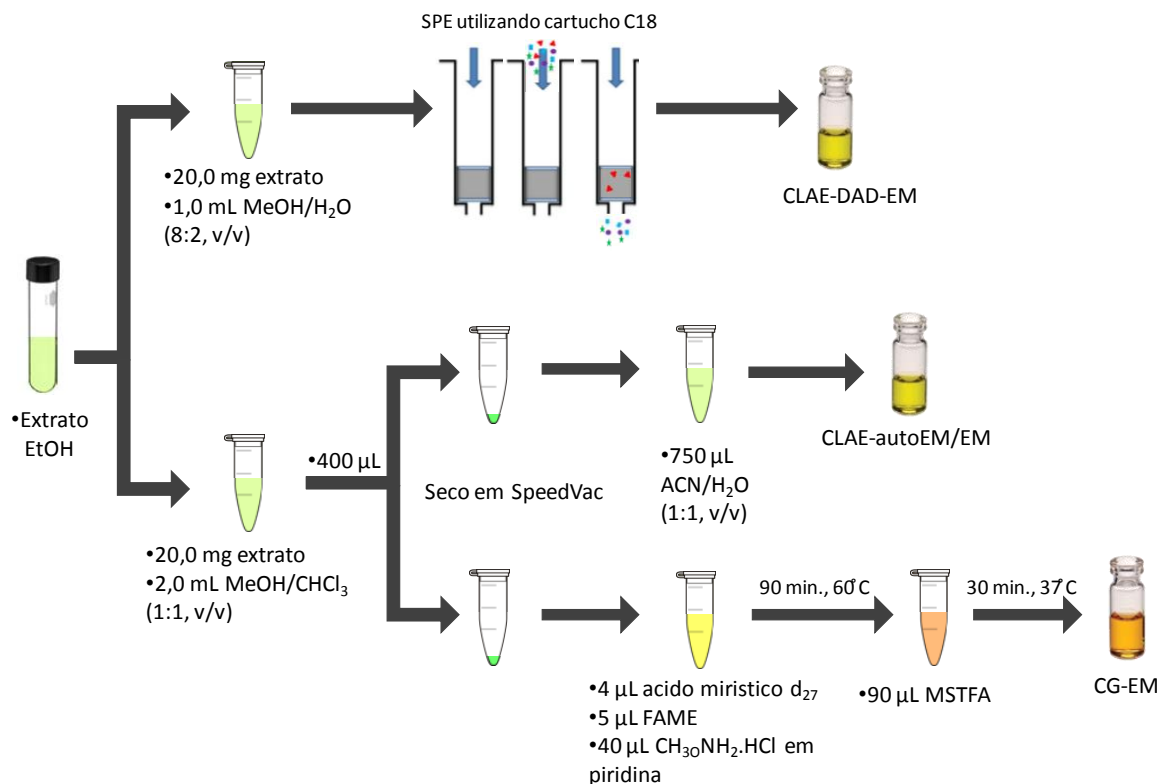
3.2.3 Construção da base de dados

Para a desreplicação das espécies vegetais foi necessária a construção de uma base de dados contendo todas as moléculas e respectivos dados espectroscópicos reportados na família Chrysobalanaceae. Deste modo, através de análise comparativa entre a base de dados e os resultados experimentais, é possível determinar a presença de substâncias previamente descritas. Para tanto, construiu-se uma base de dados a partir da identificação de 167 moléculas obtidas através do levantamento bibliográfico de todos os artigos publicados até julho de 2012 envolvendo Chrysobalanaceae. As moléculas reportadas são classificadas em: 70 terpenos, sendo 6 triterpenos ursanos, 12 triterpenos oleananos, 11 triterpenos lupanos, 1 triterpeno cucurbitano, 38 diterpenos do tipo kaurano e 2 diterpenos do tipo clerodano; 7 fitoesteróis; 2 ácidos graxos; 11 alquilcromonas e 52 flavonoides, sendo 41 flavonois, 2 flavanois, 4 flavanonas, 3 flavanonois e 2 flavonas. Foram inseridos na base de dados a fórmula molecular, a massa de alta resolução e os comprimentos de onda máximos de absorção no UV (λ_{max}) de cada substância (CARNEVALE NETO et al., 2013).

3.2.4 Preparação das amostras para as análises cromatográficas

O processo de preparação das amostras para as análises por CLAE-DAD-EM/EM, CLAE-EM/EM e CG-EM são representados na Figura 6.

Figura 6 - Preparação das amostras para análises por CG-EM, CLAE-autoEM/EM e CLAE-DAD-EM/EM



Para as análises por CG-EM, realizou-se a derivatização através de reações metoximação e sililação, a fim de permitir a volatilização e estabilização térmica dos compostos polares presentes nas matrizes. O processo iniciou com a adição dos padrões internos ácido mirístico-d₂₇ (5 µL) e FAME (*fatty acid methyl esters* - 4 µL) (Fiehn GC/MS Metabolomics Standards Kit, KIND et al., 2009) para o cálculo do índice de retenção. Em seguida, adicionaram-se 40 µL de solução de cloridrato de metoxiamina (20 mg.mL⁻¹, em piridina), que foram mantidas a 60° C por 90 minutos para formação das oximas a partir de função carbonila. Posteriormente as amostras foram sililadas a partir da adição de 90 µL de MSTFA (*N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) em reação a 37°C por 30 min (KIND ET al., 2009).

Para as análises por CLAE-DAD-EM/EM, os extratos passaram por processo de remoção de interferentes apolares através de *clean-up* por extração de fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de C-18, previamente ativados com 5,0 mL de MeOH e equilibrados com

5,0 mL de MeOH/H₂O (8:2, v/v). 20,0 mg de cada extrato foram dissolvidos em 1,0 mL da mistura MeOH/H₂O (8:2, v/v). Esta solução foi aplicada ao cartucho de SPE e eluída com 5,0 mL de MeOH/H₂O (8:2, v/v) e posteriormente secas em ar comprimido. Após secarem, as amostras foram dissolvidas em MeOH/H₂O (1:1, v/v) e filtradas em microfiltro de polipropileno de 0,45 µm de poro.

3.2.5 Análises por CG-EM

3.2.5.1 Aquisição de dados

Foram injetadas 1,0 µL das amostras derivatizadas no cromatógrafo a gás, utilizando método adaptado de Kind e colaboradores (KIND et al., 2009). As condições experimentais foram: modo de injeção split 1:10; temperatura no injetor a 250°C; programa de aquecimento da coluna: 100°C isotérmico por 1 min, seguido por aumento da temperatura a uma taxa de 20°C/min até 200°C, então a uma taxa de 3°C/min até 325°C, totalizando um tempo de corrida de 47,7 min; temperatura no detector a 250°C; gás de arraste: Hélio a uma vazão de 0,7 mL.min⁻¹.

Os parâmetros instrumentais utilizados no detector de EM foram: impacto de elétrons a 70 eV; temperatura de transferência de linha de 290 °C, temperatura do filamento da fonte em 230 °C, temperatura do quadrupolo em 150 °C, intervalo de detecção de 50-1000 *m/z* a 2 espectros.s⁻¹, tempo de início de coleta dos espectros de massas 6,10 min. (para se evitar a saturação do detector com subprodutos de derivatização) e interrupção da detecção no intervalo 10,0-13,0 min. (evitar a saturação do detector com a elevada concentração de monossacarídeos). Para a calibração e *tuning* utilizou-se autotune FC43 (perfluorotributilamina), de acordo com as especificações do equipamento.

3.2.5.2 Métodos multivariados

3.2.5.2.1 Deconvolução espectral

A deconvolução dos picos cromatográficos obtidos no CG-EM foi realizada a partir do método estatístico desenvolvido por DROMEY e col. (1976) e empregado por STEIN (1999) no software AMDIS.

3.2.5.2.2 *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS)*

Neste processo de deconvolução, parâmetros empíricos são utilizados em quatro etapas sequenciais: análise do ruído (1), percepção dos componentes (2), determinação do formato do pico (2) e extração do espectro de massas "puro" (4).

AMDIS calcula o ruído de fundo a partir da segmentação do cromatograma total de íons (TIC, *total ion current*) em porções de 13 *scans* (1). Em seguida, analisa o TIC em busca de aumentos na abundância dos íons de tal maneira que, ao encontrar outros íons com um padrão de variação de abundância semelhante ao íon selecionado (em um intervalo de 12 *scans* em direções opostas), presume a presença de um composto (2). A partir da percepção deste novo pico cromatográfico (composto), é calculado o formato do pico a partir de modelos de maximização, interpolação e centralização (3), e o espectro de massas "puro" é extraído, através do método de mínimos quadrados (4) (STEIN, 1999).

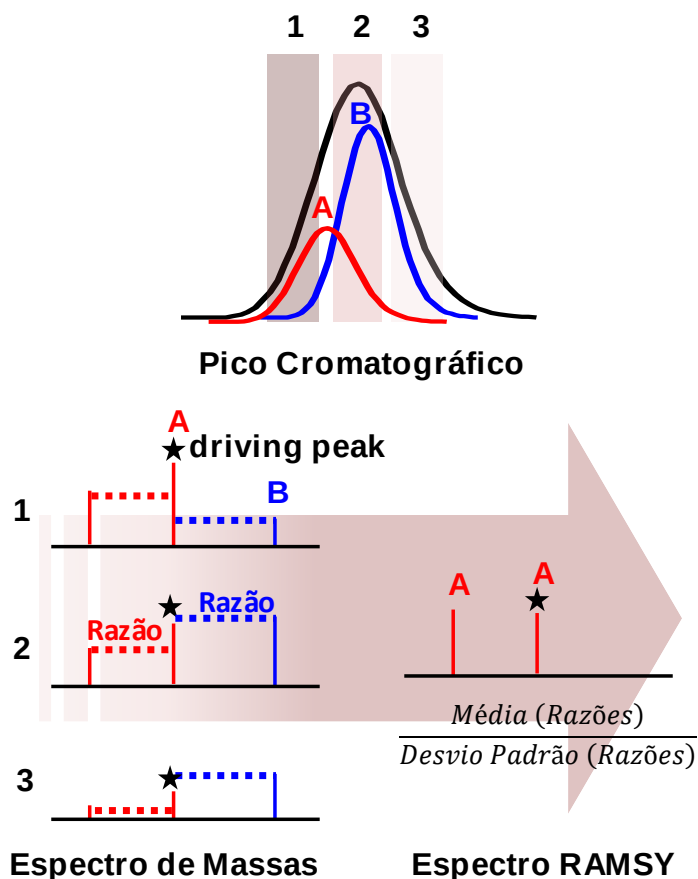
Adicionalmente ao método estatístico realizado pelo software AMDIS, cujo uso de regras arbitrárias e parâmetros puramente empíricos (nº de *scans*, determinação do ruído etc) podem gerar falsos-positivos, aplicou-se o método matricial RAMSY (*Ratio analysis of mass spectrometry*) à deconvolução dos dados de CG-EM.

3.2.5.2.3 RAMSY

O princípio de funcionamento do RAMSY deriva do algoritmo RANSY (*Ratio Analysis of NMR Spectroscopy*), capaz de extrair os sinais de ^1H RMN relacionados a uma mesma molécula através da razão entre as intensidades dos sinais de diferentes amostras de ^1H RMN (WEI et al., 2011).

Em RAMSY, a obtenção dos sinais relativos a um único composto é feita através do uso dos diferentes *scans* que compõem um mesmo pico cromatográfico, em uma mesma amostra. Assim, para os sinais de m/z de uma mesma molécula, as taxas de intensidade destes sinais tendem a ser relativamente constantes dentro do pico cromatográfico (baixo desvios padrão), sob as mesmas condições experimentais - Figura 7 (GU, H. et al., 2013).

Figura 7 - Esquema ilustrativo do RAMSY. No exemplo há co-eluição dos compostos A (pico cromatográfico vermelho) e B (pico cromatográfico azul). Após seleção do *driving peak** (valor de m/z específico para o composto A) aplica-se RAMSY nos espectros de massas colhidos a cada *scan* (representados por 1, 2 e 3). A razão entre os sinais relativos ao mesmo composto A são relativamente constantes e o desvio padrão pequeno. Em contraste, para os valores de m/z referentes ao composto B, o desvio padrão resultante das razões é elevado. Assim o espectro calculado RAMSY destaca os sinais do composto A em detrimento do composto B, permitindo visualizar os íons características apenas para este composto.



Portanto, quando sistemas em co-eluição formados por moléculas diferentes, capazes de gerar fragmentos distintos entre si, são analisados, a razão entre os sinais de m/z da mesma molécula serão constantes, o que não ocorrerá quando comparado aos sinais de m/z da outra molécula.

O procedimento para o cálculo do RAMSY inicia-se com a seleção de um íon piloto (*driving peak*) a partir dos espectros de massa. Em seguida, as razões entre o *driving peak* e todos os outros sinais m/z no espectro são calculados:

$$D_{i,j} = \frac{X_{i,j}}{X_{i,k}} \quad (1),$$

onde o vetor X_i é o $i_{\text{ésimo}}$ espectro de um conjunto de n espectros de massas, e $X_{i,j}$ é o $j_{\text{ésimo}}$ ponto de um total de m pontos neste espectro. $X_{i,k}$ corresponde ao *driving peak*. D representa a matriz $n \times m$.

Os valores de RAMSY, denotado como um vetor R de m elementos, corresponde aos quocientes das médias e desvios-padrão das colunas da matriz D . O desvio padrão é zero para o próprio *driving peak* e, portanto, seu valor RAMSY é zero. Os outros valores de RAMSY são calculados como elementos do vetor R como se segue:

$$R_j = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_{i,j}}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=0}^n (D_{i,j} - \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n D_{i,j})^2}} \quad (2).$$

Uma vez que as razões dos desvios-padrão são utilizadas no denominador, um desvio-padrão pequeno irá produzir um grande valor de R , gerando um sinal que é relativo ao mesmo sinal de m/z responsável pelo baixo valor de desvio-padrão. Assim, para os sinais de m/z relativos ao mesmo composto, será gerado um sinal intenso de valor RAMSY, enquanto sinais relacionados a outros compostos irão gerar grandes desvios-padrão, e consequentemente um pequeno valor RAMSY, de maneira semelhante ao ruído. Notadamente, os valores RAMSY são adimensionais.

3.2.5.3 Desreplicação

A identificação metabólica por CG-EM foi efetuada através dos parâmetros independentes: índice de Kovats e perfil de fragmentação. Os valores do índice de Kovats foram calculados a partir da regressão linear entre os tempos de retenção obtidos experimentalmente com valores da literatura. Para tanto, fez-se uso de mistura de padrões internos de índice de retenção, composta por ésteres metílicos de ácidos graxos (C₈, C₉, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C₂₀, C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₈ e C₃₀), dissolvidos em clorofórmio na concentração de 0,8 mg.mL⁻¹ (C₈-C₁₆) e 0,4 mg.mL⁻¹ (C₁₈-C₃₀) (KIND et al., 2009).

Os perfis de fragmentação, obtidos após deconvolução cromatográfica realizado pelo software AMDIS, foram comparados com as bases de dados Golm Metabolome Database (GMD_20111121_VAR5_FAME, Max Planck Institute, Potsdam–Golm, Germany) e FiehnLib (University of California, Davis, CA, EUA) a partir do cálculo do fator de similaridade (*match factor* MF).

3.2.5.3.1 Fator de similaridade (*match factor*, MF)

O MF foi determinado segundo método de similaridade dos cossenos, conforme utilizado no software AMDIS, em que convertem-se os espectros de massas em vetores e então calcula-se o "ângulo" entre os dois vetores (F_1):

$$F_1 = \frac{\sum M(A_S A_U)^{1/2}}{[\sum M A_S \sum M A_U]^{1/2}} \quad (3),$$

onde M é o valor de m/z , A_S e A_U são as abundâncias normalizadas dos picos-base do espectro de referência e o espectro desconhecido, respectivamente. Em seguida calcula-se F_2 :

$$F_2 = \left(\frac{1}{N_{U\&S}-1} \right) \sum_{i=2}^{N_{U\&S}} \left(\frac{A_{S,i}}{A_{S,i-1}} \right)^n \left(\frac{A_{U,i}}{A_{U,i-1}} \right)^{-n} \quad (4),$$

onde F_2 é baseado nas intensidades relativas entre os pares de picos adjacentes presentes em ambos os espectros, $N_{U\&S}$ é o número de picos em comum entre os espectros, e $n = 1$ (-1) se a razão entre as abundâncias do primeiro espectro for maior que do segundo. Assim o MF é calculado:

$$MF = \frac{1000}{N_U + N_{U\&S}} (N_U F_1 + N_{U\&S} F_2) \quad (5).$$

A detecção metabólica levou em consideração apenas moléculas que apresentavam erros no índice Kovats menores que 5,0% e perfil de fragmentação com MF igual ou maior à 70.

3.2.6 Análises por CLAE-DAD-EM/EM

3.2.6.1 Aquisição de dados

Alíquotas de 20,0 μL das amostras, na concentração de 15,0 mg mL^{-1} , foram injetadas no sistema cromatográfico utilizando-se como fase móvel MeOH/HAc (0,1%, v/v) e H_2O /HAc (0,1%, v/v) na vazão de 3,0 mL.min^{-1} , em método de gradiente exploratório conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Gradiente de eluição para as análises por CLAE.

Tempo (min.)	Porcentagem de B (MeOH)
0,00	5
30,00	100
35,00	100
40,00	5

O eluente da coluna foi dividido fazendo uso de um *splitter* na proporção de 5:1, sendo o maior fluxo direcionado ao DAD, e injeção no espectrômetro de massas à vazão de 150 $\mu\text{L.min}^{-1}$. A detecção no DAD foi realizada no λ entre 200 e 800 nm. As condições instrumentais utilizadas no detector de EM foram: sonda *eletrospray* de 3kV e cone de 25V; Gás N_2 para nebulização em fluxo de 345 L.h^{-1} e 27 L.h^{-1} , respectivamente, e temperatura em

180 °C. A célula de colisão foi preenchida com N₂ à pressão de 7 psi e a energia de colisão foi variada de 15 a 40 eV para os experimentos de EM/EM obtidos em modo positivo. Para a obtenção de massas moleculares acuradas em alta resolução, realizou-se a calibração interna com uma solução de Na-TFA (10 mg mL⁻¹) ao final de cada análise cromatográfica.

3.2.6.2 Métodos multivariados

Dada a complexidade química dos extratos vegetais e a baixa resolução cromatográfica, fez-se o uso de ferramentas quimiométricas de análise multivariada para a deconvolução computacional dos picos cromatográficos a fim de se recuperar os espectros "puros", auxiliando na estratégia de desreplicação.

A deconvolução dos picos cromatográficos detectados pelo espectrofotômetro de arranjo de fotodiodos foi realizada por decomposição em valores singulares (SVD), seguida de resolução multivariada de curvas (MCR), a partir dos dados de CLAE-DAD, conforme proposto por PILON et al. (2013).

Para tanto, as informações espectrais contidas em cada análise cromatográfica foram convertidas na matriz $D_{\text{tempo de retenção} \times \text{espectro}}$ e estes dados foram decompostos de maneira bilinear entre matrizes contendo os espectros puros de UV (250 a 450 nm - $S_{\text{espectro} \times \text{composto}}$) e os respectivos valores de intensidade da matriz ($C_{\text{tempo de retenção} \times \text{composto}}$) (MAS et al., 2007; MAGGIO et al., 2011; PILON et al., 2013).

3.2.6.2.1 Multivariate Curve Resolution (MCR-ALS)

O método de MCR-ALS se utiliza do SVD para extrair informações qualitativas e quantitativas de um conjunto de dados compostos pela combinação de diversas propriedades. No caso da cromatografia, o MCR-ALS é capaz de analisar sistemas em co-eluição

permitindo a triagem de todas as informações (MAS et al., 2007; MAGGIO et al., 2011; PARASTAR; TAULER, 2013).

A deconvolução de experimentos CLAE-DAD através da aplicação do método de MCR-ALS segue um modelo bilinear de acordo com a equação 6,

$$D_{(m,n)} = C_{(m,k)} \times S_{(k,n)}^T + E_{(m,n)} \quad (6),$$

em que $D_{(m,n)}$ é a matriz original contendo os dados do experimento cromatográfico; as linhas (m) representam a dimensão do tempo e as colunas (n) o comprimento de onda; k é o número de compostos puros calculados através da rotina PURE. Nesta etapa o algoritmo busca em D compostos que apresentam a menor combinação linear da matriz. Assim, $S_{(k,n)}^T$ representa o espectro puro obtido para cada k e $C_{(n,k)}$ refere-se a intensidade destes espectros, enquanto E é a matriz residual (MAGGIO et al., 2011; PARASTAR; TAULER, 2013).

A resolução da equação 6 foi determinada por cálculos iterativos utilizando o algoritmo do mínimos quadrados alternados (ALS). O processo de iteração do ALS termina quando a diferença no desvio padrão dos resíduos, dada pela equação 7, entre valor experimental e o calculado (valores da matriz E) é menor que um valor previamente estabelecido. Neste trabalho foi de 0,1%.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{ij}^2}{n_{linhas} \times n_{colunas}}} \quad (7),$$

A variância explicada significa o quanto da matriz D é ajustada pelo modelo de predição. A porcentagem da variância é dada pela multiplicação da equação 8 pelo fator de 100.

$$R^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} d_{ij}^2 - \sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2}} \quad (8),$$

A falta de ajuste do modelo, ao qual representa a porcentagem da matriz D contida no matriz residual (E), é calculada de acordo com a equação 9,

$$Falta\ de\ ajuste\ (\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2}} \quad (9).$$

3.2.6.3 Estratégia de desreplicação

Os picos cromatográficos obtidos nas análises por CLAE-DAD-EM/EM e deconvoluídos por MCR-ALS (somente os dados de CLAE-DAD) foram identificados através de avaliação comparativa com as moléculas descritas na literatura para a família Chrysobalanaceae, a partir dos seguintes parâmetros: espectros de UV puro, obtido por MCR-ALS, massa acurada dos íons (molécula protonada $[M+H]^+$) em alta resolução e espectros de íons produto gerados em experimentos EM/EM a partir de dissociação induzida por colisão. Considerou-se a detecção de substâncias cujo erro entre a massa observada e calculada (teórica) não ultrapassasse 15 ppm.

3.2.7 Análises por CLAE-autoEM/EM

3.2.7.1 Aquisição de dados

10,0 μL das amostras, na concentração de 15,0 mg mL^{-1} , foram injetadas em CLAE-ESI-QToF-EM/EM em condições de separação adaptadas de GÓMEZ-ROMERO e col., 2010. As condições cromatográficas correspondem: fase móvel $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (0,5%, v/v, solvente A) e ACN/HAc (0,5%, v/v, solvente B), vazão de 0,7 mL.min^{-1} , temperatura de coluna em 50 $^{\circ}\text{C}$ e gradiente de eluição conforme tabela 3:

Tabela 3 - Gradiente de eluição para as análises por CLAE-autoEM/EM.

Tempo (min.)	Porcentagem de B (ACN)
0,00	3
1,00	3
14,00	9
32,00	35
39,00	100
45,00	100

Os espectros de autoEM/EM foram adquiridos em fonte ESI nos modos positivo e negativo em janela espectral Δ 100-1000 m/z . Os íons precursores foram selecionados a partir de analisador quadrupolo em utilizando Δ 4,0 m/z .

O sistema de fragmentação CID EM/EM foi realizado utilizando N_2 como gás de colisão e potencial de voltagem entre 0–40 eV (ESI +) e 15, 25 e 35 eV (ESI -).

Os parâmetros do QToF-EM foram: temperatura do gás 250 °C, gás de arraste 6,0 L min^{-1} , pressão do nebulizador 35 psi, voltagem do capilar em 3500 V e taxa de aquisição de espectros 8 Hz. A calibração foi realizada com padrões internos purina 2 μM e HP-921 (BROECKER et al., 2011).

O modo de aquisição autoEM/EM utilizou ciclos EM-EM/EM de 4,0 s, com 2,0 s para aquisição no modo EM e 1,0 s para cada aquisição EM/EM para os 2 íons mais intensos (> 1000 counts), excluindo os íons interferentes determinados previamente no branco do método.

3.2.7.2 Estratégia de Desreplicação

A estratégia de desreplicação por CLAE-autoEM/EM envolveu a determinação das fórmulas moleculares calculadas pela massa acurada (erro < 10 ppm), comparação com as bases de dados e proposta de elucidação estrutural por experimentos EM/EM em modos positivo e negativo.

3.2.8 Bioensaios para verificação de atividade citotóxica

3.2.8.1 Avaliação de citotoxicidade com *Saccharomyces cerevisiae*

Estes ensaios foram realizados no laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young. A atividade antitumoral potencial foi determinada em extratos brutos (2,0 – 3,0 mg), através de bioensaio utilizando as seguintes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, proeficientes e deficientes no reparo do DNA:

Rad+: linhagem selvagem;

Rad 52Y: linhagem mutante recombinante (associada ao reparo na dupla hélice e recombinação meiótica);

Rad 321N: linhagem mutante associada a topoisomerase II (enzima vital no processo de divisão celular);

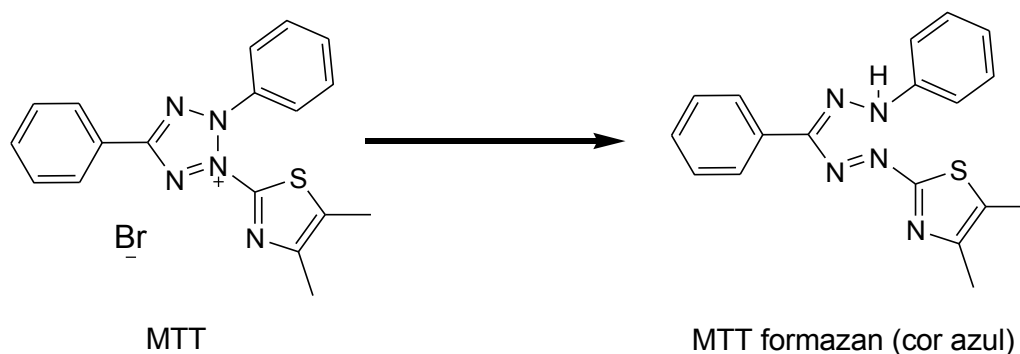
Este teste é fundamentado no fato de que as células tumorais não fazem reparo do DNA como as células normais. Assim, agentes ou drogas com toxicidade seletiva dirigida para células deficientes em um desses mecanismos de reparo, podem agir como agentes antitumorais potenciais. A metodologia baseou-se na resposta diferencial entre as leveduras normais Rad+ (células sadias que fazem reparo de DNA) e leveduras que não possuem a capacidade de fazer reparo ou reconstituir a dupla hélice do DNA, Rad 321N e Rad 52Y, quando submetidas à ação de uma determinada amostra. O resultado do bioensaio é dado pela medida diferencial dos halos de inibição da cultura de cada linhagem em relação à linhagem normal, podendo indicar um potencial citotóxico. O diâmetro do halo de inibição é medido para o mínimo de quatro diluições distintas, sendo os resultados expressos através de uma curva da concentração da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em função do diâmetro do halo de inibição. O coeficiente da equação calculada representa a concentração mínima inibitória para se obter um halo de inibição de 12 mm (IC_{12}). Os padrões positivos utilizados foram: camptotecina:

Rad+ 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (16,0 mm) e Rad 52Y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (21,0 mm) e estreptonigrina: Rad 321N 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (20,0 mm) (GUNATILAKA et al., 1994).

3.2.8.2 Avaliação de citotoxicidade em linhagens tumorais

O potencial citotóxico dos extratos foi avaliado através de bioensaios com diferentes linhagens celulares, realizados em colaboração com o Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, sobre a orientação da Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo. O teste do MTT consiste em análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), de cor amarela, a formazan, púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas - Figura 8 (MOSMANN, 1983; SKEHAN et al., 1990; BERRIDGE et al., 1996).

Figura 8 - Reação de redução do reagente MTT em azul de formazan.



As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ para a linhagem MDA/MB-435 (células de câncer de mama humano) e SF-295 (células de câncer de cólon humano) e $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HCT-8 (células de câncer no sistema nervoso humano). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término da incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de MTT, e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após a dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO puro em espectrofotômetro

de placa a 595 nm. As amostras foram diluídas em DMSO puro e estéril e testadas em concentração na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os experimentos foram analisados segundo a média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Os extratos foram preparados em projeto colaborativo para a construção de extratoteca do estado de São Paulo, envolvendo o NuBBE (Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) e o Instituto Botânico de São Paulo utilizando método de extração por fluido pressurizado.

A utilização de fluido pressurizado para a obtenção de extratos vegetais é recomendada devido a rapidez e eficiência, já que as propriedades físico-químicas do solvente pressurizado podem ser ajustadas por meio da variação de pressão e temperatura, i.e., a elevada temperatura aumenta a capacidade de solubilização do solvente, enquanto o emprego de altas pressões diminui a viscosidade, facilitando a difusão (HASSAS-ROUDSARI et al., 2009).

De acordo com a literatura, o uso de etanol é eficiente na extração de compostos polifenólicos, por exemplo, flavonóides. Contudo, para o aumento na extração de compostos de menor polaridade, como diterpenos, há a necessidade de uso de temperaturas elevadas (200 °C) (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

Os perfis metabólicos obtidos na extração das espécies de Chrysobalanaceae a partir do protocolo proposto destaca a eficiência na extração de compostos polifenólicos, facilmente detectados nas análises por CLAE-DAD-EM/EM. Este perfil metabólico polar sugere relação direta com os resultados de citotoxicidade, apresentados posteriormente.

4.2 ANÁLISES POR CG-EM

A estratégia de desreplicação por CG-EM iniciou com a determinação da equação que relaciona o tempo de retenção (tR) obtido experimentalmente com os valores teóricos de índice de retenção de Kovats (IR). Para tanto, utilizou-se a média dos tempos de retenção observados para a mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme tabela 4.

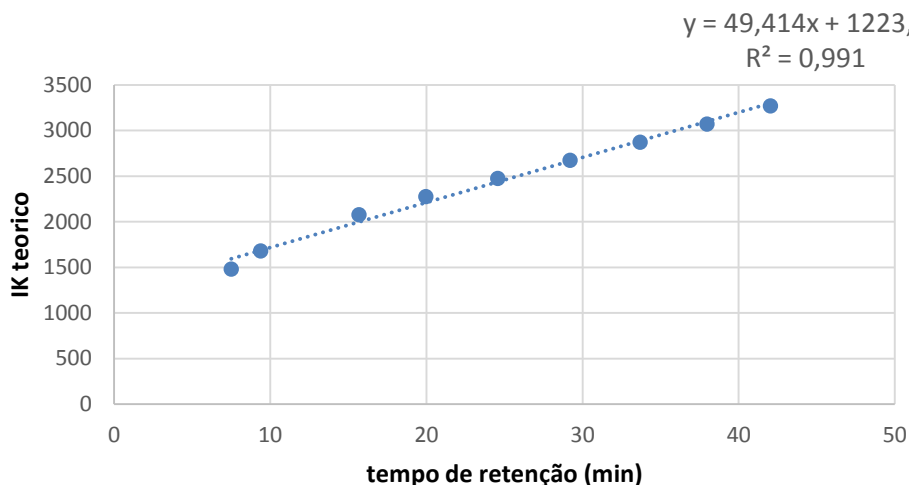
Tabela 4 - tR e IK para a mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos.

IK (teórico)	Tempo de Retenção (tR) - em minutos												
	C ₈ *	C ₉ *	C ₁₀ *	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆ *	C ₁₈	C ₂₀	C ₂₂	C ₂₄	C ₂₆	C ₂₈	C ₃₀
	1083	1183	1282	1481	1680	1878	2077	2276	2475	2624	2872	3071	3270
AMOSTRAS	AM253			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	AM254			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	M491			7,5	9,4		15,7	19,9	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	M799			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	M821			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	M847			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	M846			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	AM229			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	M851			7,5	9,4		15,7	19,9	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	AM230			7,5	9,4		15,7	19,9	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	Branco			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	Valor médio			7,5	9,4		15,7	20,0	24,6	29,2	33,7	38,0	42,0
	Desvio Padrão			0,0	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

* Padrões não encontrados nas amostras.

Os padrões de ésteres C₈, C₉, C₁₀ não foram detectados devido aos tRs serem inferiores ao início da aquisição de dados pelo EM (6,10 min.). O padrão C₁₆ também não está presente nas amostras devido a interrupção da detecção pelo EM no intervalo de 10,0-13,0 min.

O gráfico da equação relacionando o Índice de retenção de Kovats e o tempo de retenção está representado na Figura 9.

Figura 9 - Gráfico da equação do cálculo do índice de Kovats.

Além da equação para o cálculo do índice de Kovats, realizou-se a deconvolução dos cromatogramas, a fim de se recuperar o espectro "puro" de substâncias em co-eluição.

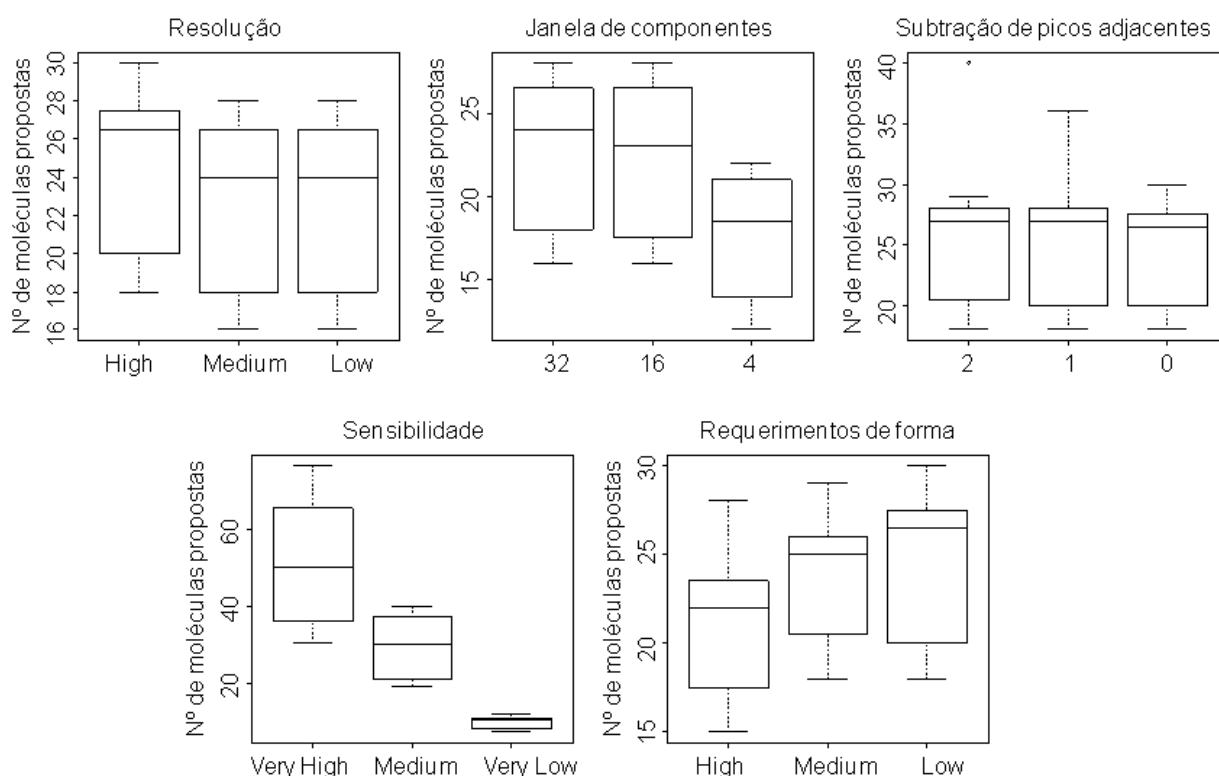
O processo computacional foi realizado no software AMDIS e baseou-se na configuração de cinco parâmetros: "janela de componentes", referente ao número de *scans* capaz de formar um pico cromatográfico, "subtração de pico adjacente", relacionado ao número de picos subjacentes que devem ser subtraídos caso exista co-eluição, "resolução", associado a capacidade do software em "separar" picos próximos, "sensibilidade", que delimita a intensidade mínima de sinais a ser considerada, e "requisitos de forma", que determina a distribuição das intensidades dos íons na formação do pico cromatográfico (tabela 5). A avaliação da melhor configuração do sistema, i.e., aquela capaz de fornecer o maior número de propostas moleculares na comparação com as bases de dados, deu-se a partir da análise univariada dos parâmetros (variando um único parâmetro por vez e mantendo os outros constantes).

Tabela 5 - Variação de parâmetros para a deconvolução por AMDIS.

Janela de componentes	4	16	32
Subtração de pico adjacente	0	1	2
Resolução	low	medium	high
Sensibilidade	very low	medium	very high
Requisitos de forma	low	medium	high

Os resultados (Figura 10) forneceram a configuração capaz de gerar o maior número de propostas na comparação com as bases de dados (janela de componentes = 32; subtração de pico adjacente = 1; resolução = *high*; sensibilidade = *very high*; e requerimentos de forma = *low*).

Figura 10 - Diagrama de caixa contendo o total de alvos detectados nas amostras de *Chrysobalanaceae* após variação de parâmetros de deconvolução no software AMDIS.



A identificação metabólica a partir dos cromatogramas deconvoluídos se deu através da comparação dos espectros de massas com as bases de dados (determinados pelo AMDIS *match factor* - MF). A partir dos metabólitos propostos, os valores de índice de Kovats foram calculados através da equação e fez-se a comparação com os valores descritos na literatura para a mesma coluna cromatográfica. Considerou-se a detecção apenas quando os erros no índice Kovats foram menores que 5,0% e os perfis de fragmentação, similaridade MF igual ou maior à 70.

A Tabela 6 apresenta as propostas moleculares junto aos índices de retenção experimentais calculados, os índices de retenção fornecidos pelas bases de dados, os íons principais provenientes da fragmentação e o valor de similaridade.

Tabela 6 - Metabólitos identificados por CG-EM utilizando tempo de retenção (tR), índice de Kovats (IR) e nível de similaridade do perfil de fragmentação (*match factor* - MF).

Metabólito	tR (min)	IR _{cal}	IR _{lit}	Erro (%)	MF (%)
Hidroquinona 2TMS	6,58	1548	1492	-3,6	77
Ácido málico 3TMS	7,11	1574	1537	-2,4	77
Treitol 4TMS	7,25	1581	1525	-3,6	98
Eritritol 4TMS	7,25	1581	1533	-3,1	80
Ácido piroglutâmico 2TMS	7,48	1593	1562	-1,9	81 ¹
Ácido γ -aminobutírico 3TMS	7,52	1595	1567	-1,7	84 ²
Ácido treônico 4TMS	7,66	1602	1585	-1,0	71 ³
Ácido <i>trans</i> cinâmico 1TMS	8,17	1627	1597	-1,8	88
Ácido glutâmico 3TMS	8,21	1629	1655	1,6	71
Ácido tartárico 4TMS	8,34	1635	1669	2,1	74
Ácido 4-hidroxi-benzóico 2TMS	8,38	1637	1633	-0,3	75
Ribose 1MEOX 4TMS	8,57	1647	1650	0,2	75
Arabinose 1MEOX 4TMS	8,57	1647	1651	0,3	74
Xilose 1MEOX 4TMS	8,57	1647	1646	0,0	74
Ribitol 5TMS	9,19	1677	1703	1,5	98
Xilitol 5TMS	9,19	1677	1695	1,1	97
Arabitol 5TMS	9,19	1677	1708	1,8	80
Ramnose 1MEOX 4TMS	9,29	1682	1707	1,5	75
Putrescina 4TMS	9,54	1695	1737	2,5	86
Ácido vanílico 2TMS	9,80	1707	1766	3,4	70
Ononitol 5TMS	13,19	1875	1946	3,8	75
Ácido glucônico 6TMS	13,19	1875	1947	3,9	76
Ácido sacárico 6TMS	13,44	1887	1960	3,9	72
Xantina 3TMS	13,49	1890	1977	4,6	72
Ácido hexadecanóico 1TMS	14,09	1919	2006	4,5	79
Mio-inositol 6TMS	14,85	1957	2040	4,2	80
Ácido úrico 4TMS	14,94	1961	2055	4,8	78
Ácido ferúlico 2TMS	14,96	1962	2055	4,7	72
Fitol 1TMS MP	16,55	2041	2141	4,9	89
α,α -trealose 8TMS	29,29	2670	2726	2,1	74
Maltose 1MEOX 8TMS	29,98	2705	2720	0,6	87
Guanosina 5TMS	30,02	2707	2762	2,1	95
Melibiose 1MEOX 8TMS	32,10	2809	2837	1,0	77
Isomaltose 1MEOX 8TMS	32,24	2816	2847	1,1	74
Catequina 5TMS	32,48	2828	2864	1,3	93
Epicatequina 5TMS	32,48	2828	2864	1,3	78

Epigallocatequina 6TMS	33,50	2878	2915	1,3	82
Luteolina 4TMS	36,46	3025	3078	1,8	75
Caempferol 5TMS	36,47	3025	3078	1,7	79
α -tocoferol 1TMS	37,87	3094	3161	2,2	80 ⁴
Rafinose 11TMS	37,87	3094	3075	-0,6	80 ⁵
Quercetina 5TMS	38,81	3141	3169	0,9	84
Estigmasterol 1TMS	40,59	3229	3319	2,8	73
β -sitosterol 1TMS	41,81	3289	3386	2,9	71
Lanosterol 1TMS	43,24	3360	3391	0,9	79
Ácido oleanólico 2TMS	46,08	3500	3620	3,4	88
Ácido ursólico 2TMS	47,00	3546	3649	2,9	89

MEOX, metoxima. TMS, trimetilsilil, valores de MF após aplicação de RAMSY ⁽¹⁾97, ⁽²⁾84, ⁽³⁾92, ⁽⁴⁾90, ⁽⁵⁾94.

A deconvolução cromatográfica permitiu detectar compostos co-eluídos nas amostras de Chrysobalanaceae com MF >70. Contudo, para metabólitos em baixa concentração (menor intensidade do sinal) e/ou menor similaridade (MF entre 70 e 80), a extração do espectro de massas "puro" não evitou a incorporação de íons interferentes, o que pode gerar falsos-positivos, como descrito na literatura (LIKIĆ, 2009).

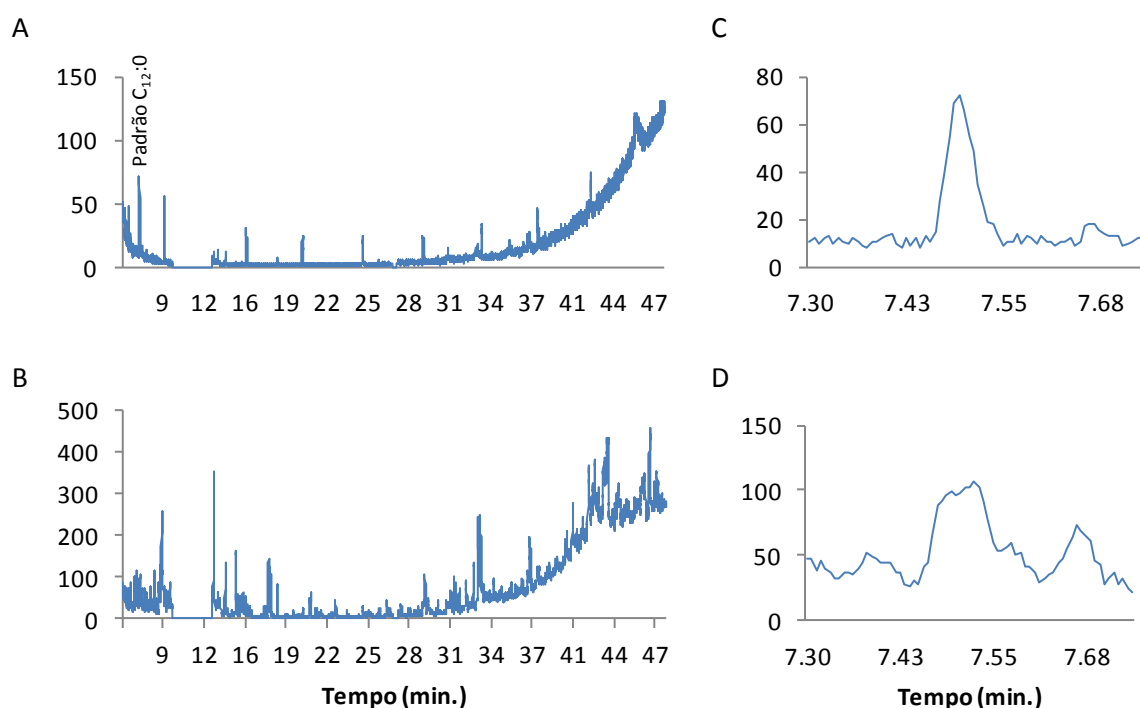
Deste modo, realizou-se também a deconvolução dos picos cromatográficos por RAMSY. Este método é baseado no fato de que, em condições experimentais semelhantes, as relações de abundância/intensidade entre os fragmentos de massa do mesmo metabólito são relativamente constantes. Portanto, os quocientes das razões dos picos e seus desvios-padrão, obtidos a partir do cromatograma de íons, permite a recuperação estatística dos espectros dos metabólitos, mesmo em completa co-eluição (GU, H. et al., 2013).

Para demonstrar o desempenho do método em comparação aos resultados obtidos pelo AMDIS, fez-se o uso de regiões com diferentes níveis de sobreposição cromatográfica.

No primeiro exemplo da aplicação do RAMSY, utilizou-se um pico largo entre 7,45-7,60 min. (Figura 11). Segundo a detecção proposta, este pico corresponde a co-eluição de ácido piroglutâmico (tR 7,48 min, MF = 81), éster metílico de ácido dodecanóico (tR 7,49 min, MF = 75) e ácido treônico (tR=7,53 min, MF = 71). Apesar dos valores de MF serem

próximos ou superiores ao limite proposto, 70, nota-se a presença de sinais não relacionados aos compostos propostos, por exemplo os íons m/z 304 e m/z 174. Além, há significativa diminuição do MF quando compara-se o mesmo éster metílico na amostra contendo apenas os padrões (tR 7,49 min, MF = 95).

Figura 11 - TIC de (A) mistura de padrões, (B) extrato EOH das folhas de *Couepia grandiflora*, (C) região entre 7.45-7.60 min da mistura de padrões e (D) região entre 7.45-7.60 min das folhas de *Couepia grandiflora*.

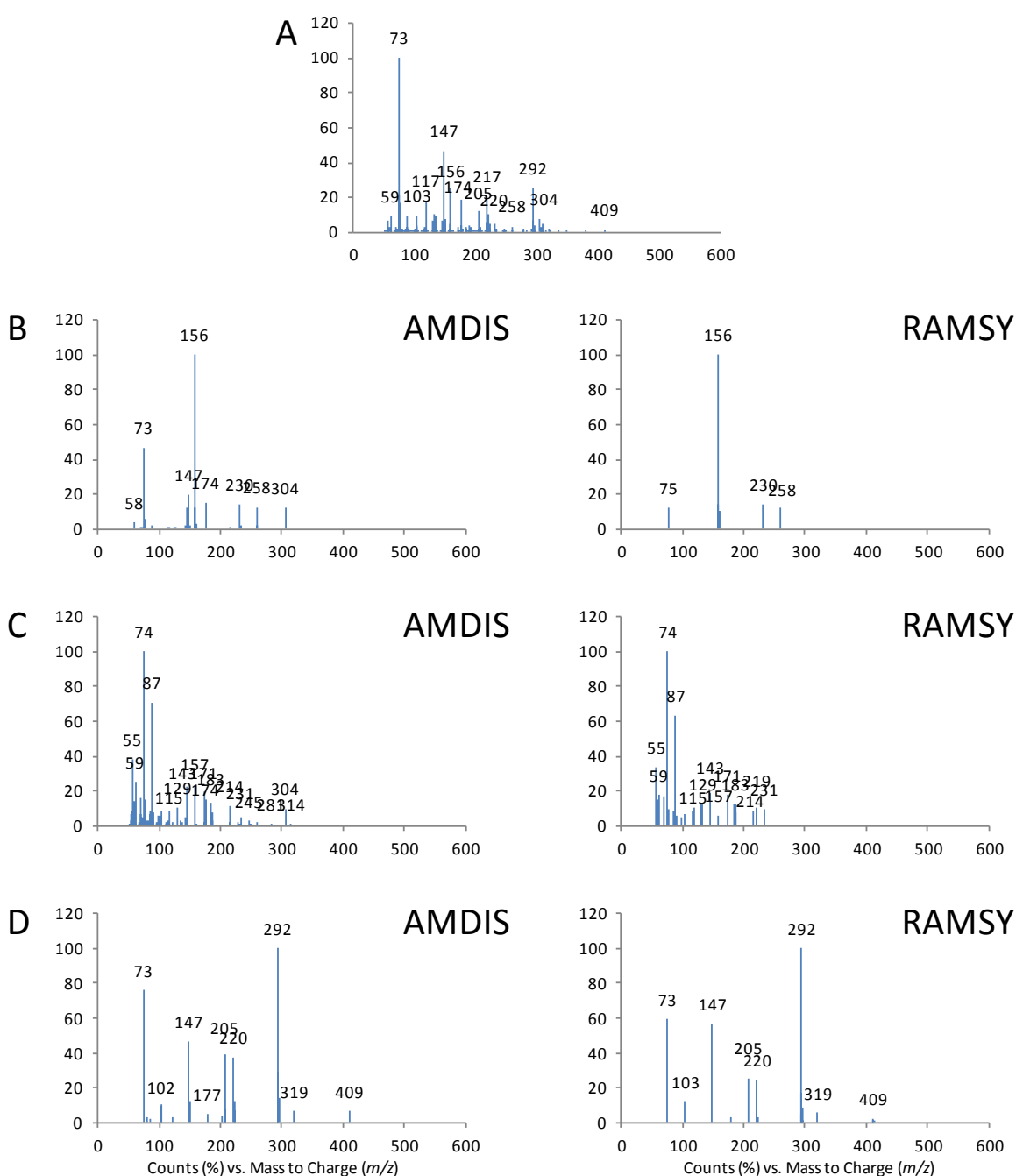


A aplicação do RAMSY foi realizada a partir de 15 *scans* que compõem o pico cromatográfico 7,45-7,60 min (figura 12a). Para *driving peaks* foram selecionados íons característicos para cada molécula proposta, segundo as bases de dados. Assim, selecionou-se o fragmento m/z 156 para a extração do espectro de massas do ácido piroglutâmico, o fragmento m/z 87 para o padrão éster e o fragmento m/z 292 para o ácido treônico.

Os espectros calculados pelo RAMSY geraram sinais específicos para cada molécula proposta, permitindo uma melhora no MF (após filtrar o espectro de massas do pico largo com os 8 picos mais intensos do espectro RAMSY - incluindo o *driving peak*, conforme GU, H. et al., 2013).

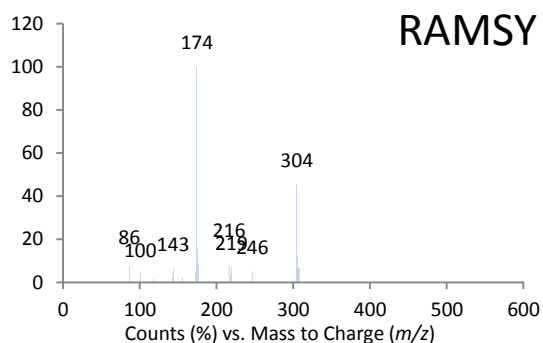
Para o éster metílico de ácido dodecanóico, RAMSY conseguiu extrair os íons mais intensos 55, 59, 74 e 87, obtendo um MF = 92 (figura 12c). De maneira semelhante, RAMSY elevou o valor de similaridade MF para ácido piroglutâmico (MF = 97, figura 12b) e ácido treônico (MF = 92, figura 12d).

Figura 12 - (A) espectro de massas entre 7,45-7,60 min, (B) espectro de massas para ácido piroglutâmico deconvolvido por AMDIS e RAMSY, (C) espectro de massas para éster metílico de ácido dodecanóico por AMDIS e RAMSY, (D) espectro de massas para ácido treônico por AMDIS e RAMSY.



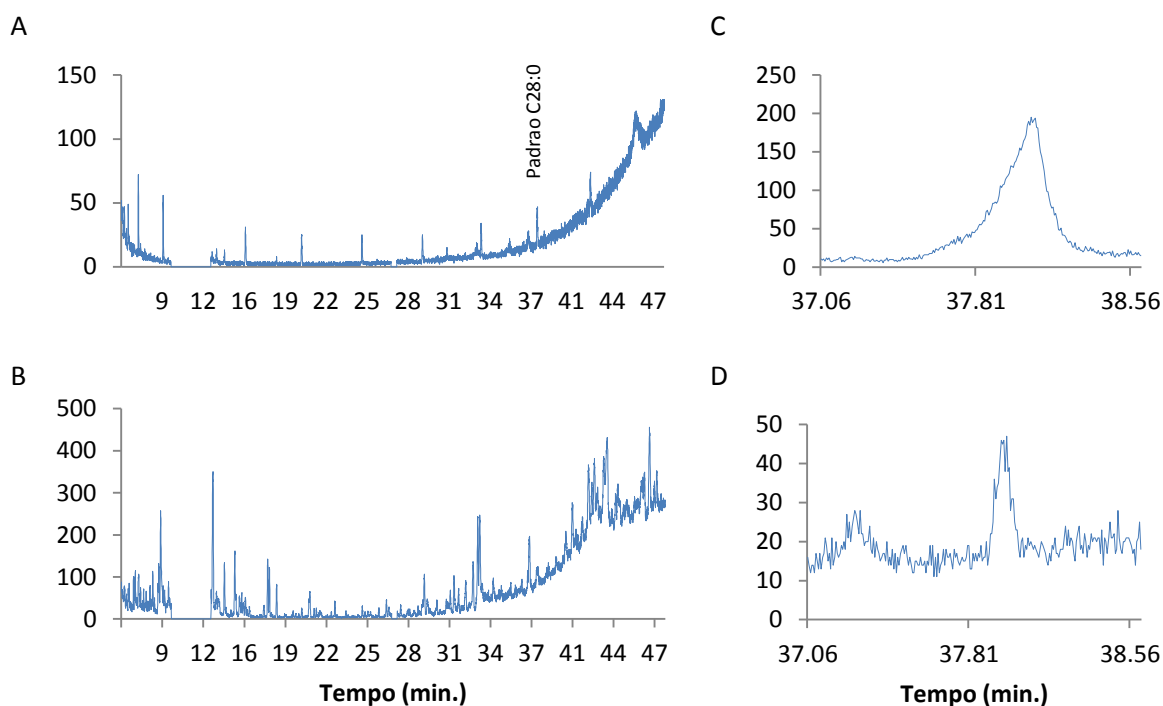
Adicionalmente, de acordo com o espectro de massas do pico cromatográfico em co-eluição e alguns espectros obtidos pelo AMDIS, é possível observar o valor intenso de m/z 304. A aplicação do RAMSY forneceu um espectro de massas que, quando comparado com a base de dados, sugere a presença do ácido 4-aminobutírico (MF = 84 - Figura 13).

Figura 13 - Espectro de massas para ácido 4-aminobutírico deconvolvido por RAMSY.



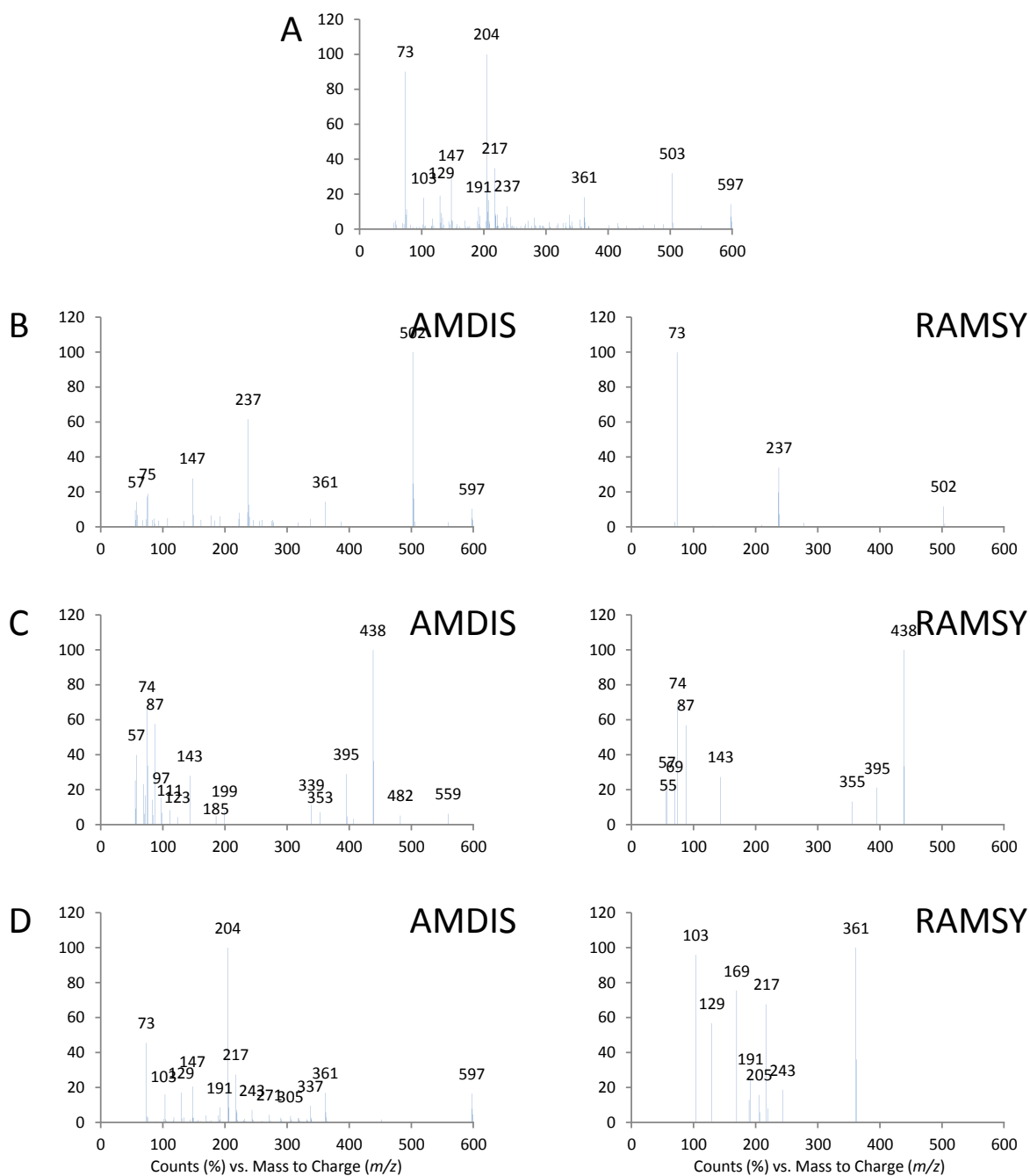
Em outra região do TIC, dois compostos em co-eluição encontram-se sobrepostos em um pico cromatográfico entre 37,75-38,00 min. (Figura 14). Estes metabólitos foram propostos pelo AMDIS como alfa-tocoferol (MF = 80), o padrão de éster metílico do ácido octacosanóico (MF = 70) e o trissacarídeo rafinose - MF = 80.

Figura 14 - TIC de (A) mistura de padrões, (B) extrato EOH das folhas de *Couepia grandiflora*, (C) região entre 37,75-38,00 min. da mistura de padrões e (D) região entre 37,75-38,00 min. das folhas de *Couepia grandiflora*.



RAMSY foi calculado a partir dos 26 *scans* que constituem o pico cromatográfico em estudo - figura 15a. A extração do espectro de massas do alfa-tocoferol foi realizada a partir do *driving peak* íon m/z 237, e permitiu um aumento no valor de similaridade (MF = 90, figura 15b), assim como para o padrão (MF = 87, figura 15c). A extração do espectro do trissacarídeo a partir do *driving peak* m/z 361 forneceu valores de similaridade para rafinose (MF = 94, figura 15d).

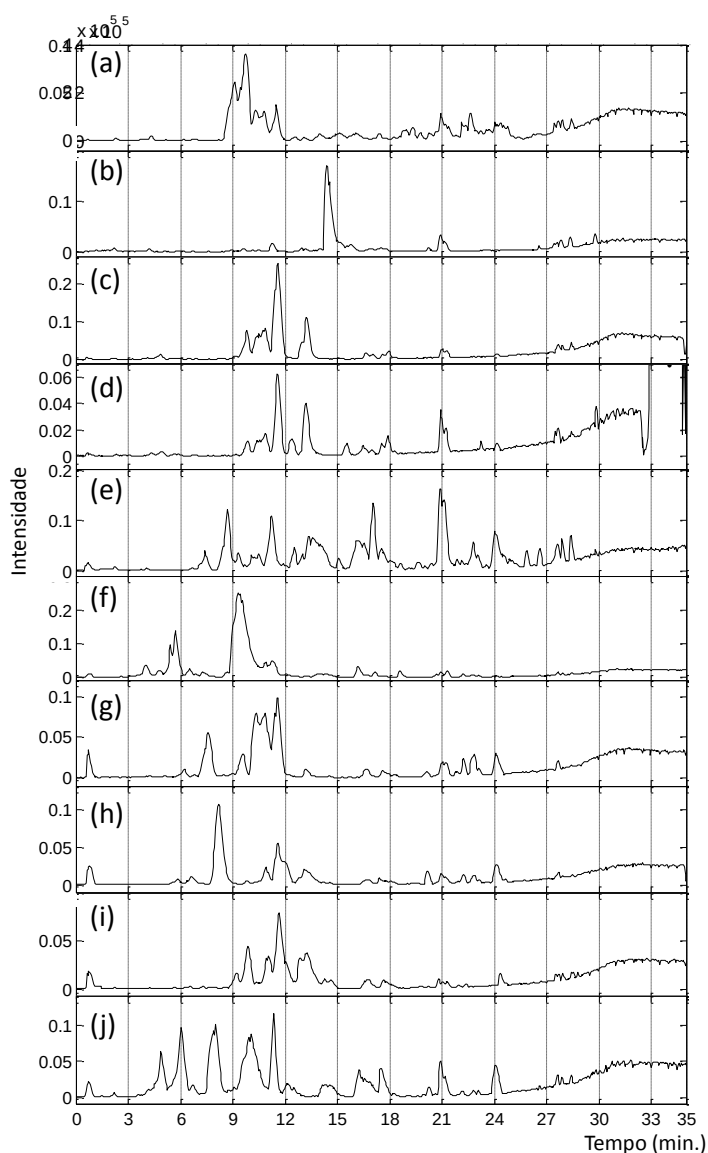
Figura 15 - (A) espectro de massas entre 37,75-38,00 min, (B) espectro de massas para α -tocoferol deconvolvido por AMDIS e RAMSY, (C) espectro de massas para éster metílico de ácido octacosanóico por AMDIS e RAMSY, (D) espectro de massas para rafinose por AMDIS e RAMSY.



4.3 ANÁLISES POR CLAE-DAD-EM/EM E CLAE-AUTOEM/EM

A desrepliação das espécies de Chrysobalanaceae iniciou-se pela análise em CLAE-DAD-EM/EM utilizando método de separação em gradiente exploratório com $\Delta 5$ -100% de solvente B (MeOH + 0,1% HAc) em 35 min. Os cromatogramas obtidos apresentaram um grande número de picos, especialmente na região de tR 5-15 min., e baixa resolução cromatográfica - Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma de Pico-Base (CLAE-EM ESI+) de (a) folhas de *Couepia grandiflora*; (b) ramos de *Couepia grandiflora*; (c) ramos de *Licania humilis*; (d) folhas de *Licania humilis*; (e) folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; (f) folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; (g) ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; (h) folhas de *Parinari excelsa*; (i) folhas de *Licania kunthiana*; e (j) folhas de *Licania hoehnei*.



A baixa resolução cromatográfica se deve a complexidade química dos extratos vegetais, formado por metabólitos de diferentes polaridades em diversas faixas de concentração, e dificulta a identificação *in situ* uma vez que a baixa resolução cromatográfica pode levar a incorreta interpretação dos dados espectrais e à falso-positivos (TAUTENHAHN et al., 2008; WOLFENDER, 2009).

Deste modo, a detecção por CLAE-DAD-EM/EM foi assistida por métodos de deconvolução de íons, como o algoritmo *dissect* disponível no software *Bruker DataAnalysis*, e de deconvolução dos espectros UV, a partir do MCR-ALS, ferramenta quimiométrica capaz de diferenciar substâncias em co-eluição e extrair os respectivos espectros "puros" por análise multivariada (PARASTAR; TAULER, 2013; PILON et al., 2013).

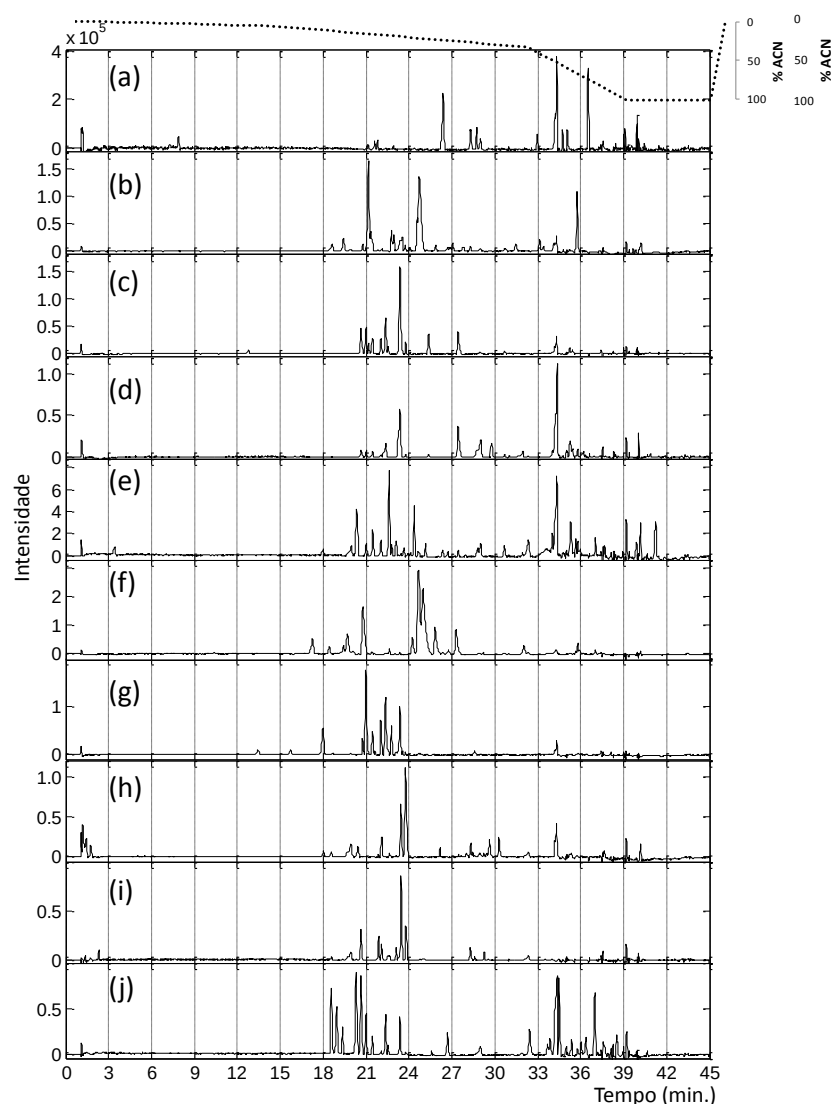
Neste trabalho, a deconvolução dos dados espectrais de UV pelo MCR-ALS foi obtida pela determinação do número de combinações não-lineares a partir da decomposição por valores singulares (SVD), o que de fato corresponde ao número de metabólitos, e na obtenção dos espectros UV pelo algoritmo PURE (PILON et al., 2013).

Adicionalmente ao uso de ferramentas matemáticas no auxílio à detecção metabólica por CLAE-DAD-EM/EM, realizaram-se análises por CLAE-autoEM/EM utilizando método otimizado de separação cromatográfica. Para tanto, foram utilizadas condições cromatográficas adaptadas do trabalho de Gutiérrez et al., 2010, em que 135 metabólitos polares foram caracterizados no extrato metanólico de *Solanum esculentum* (GÓMEZ-ROMERO et al., 2010).

A transferência do método de separação aos equipamentos disponíveis se deu através do software *HPLC Calculator* ver. 3.0, levando em consideração as dimensões da coluna cromatográfica (comprimento, diâmetro, tamanho de partícula), e algumas condições experimentais (vazão e volume de injeção), e forneceu um modo de eluição com resolução

cromatográfica semelhante ao observado no trabalho com espécie de *Solanum* - Figura 17 (GUILLARME et al., 2008).

Figura 17 - Cromatograma de Pico-Base (CLAE-autoEM ESI+) de (a) folhas de *Couepia grandiflora*; (b) ramos de *Couepia grandiflora*; (c) ramos de *Licania humilis*; (d) folhas de *Licania humilis*; (e) folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; (f) folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; (g) ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; (h) folhas de *Parinari excelsa*; (i) folhas de *Licania kunthiana*; e (j) folhas de *Licania hoehnei*.



Para a identificação dos picos cromatográficos obtidos por CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM, determinaram-se as fórmulas moleculares dos íons majoritários a partir das massas de alta resolução. Em seguida, compararam-se as fórmulas moleculares com a base de dados contendo as moléculas reportadas para a família Chrysobalanaceae. Foram

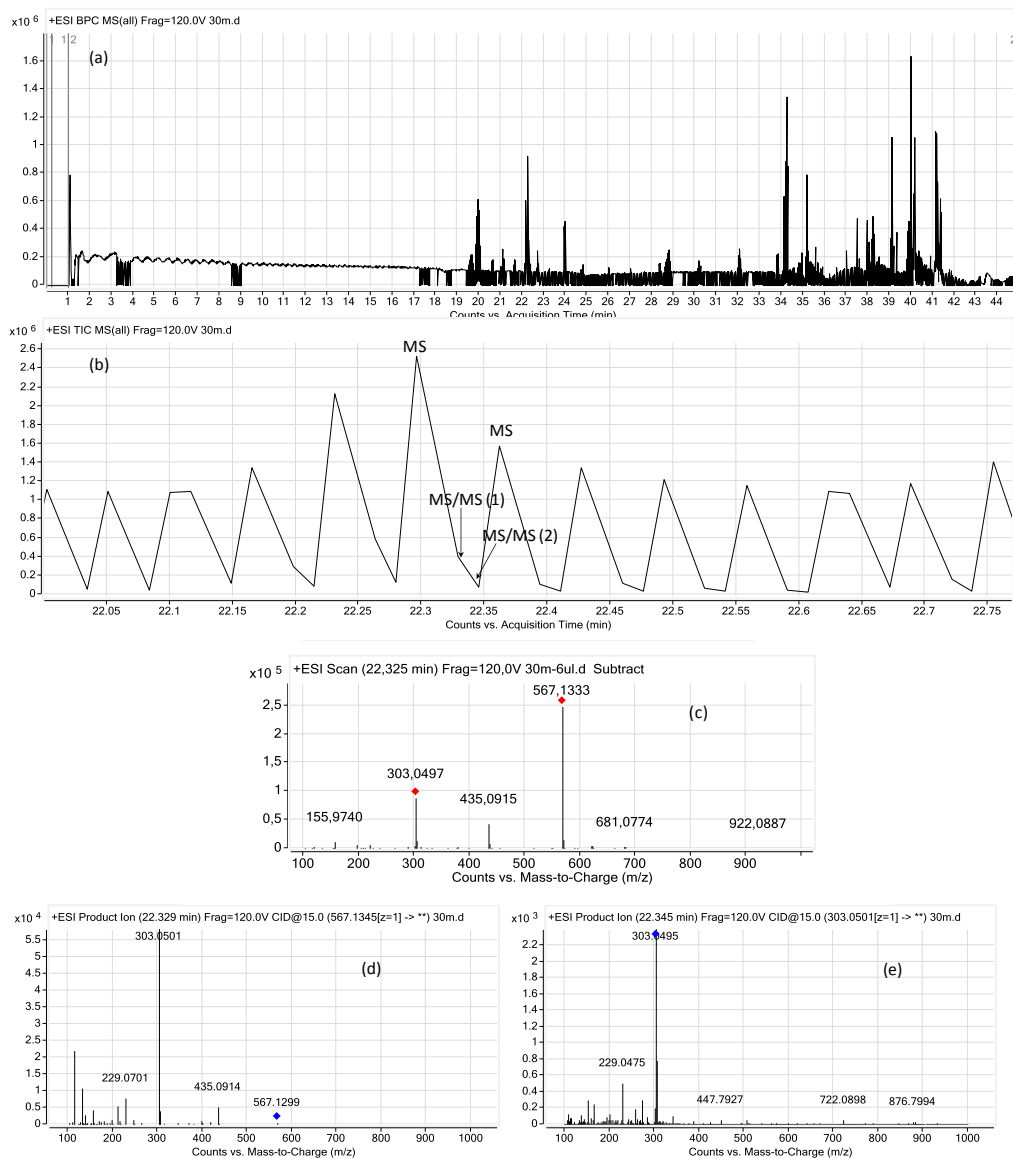
consideradas as fórmulas moleculares cuja diferença da massa observada e calculada (teórica) não ultrapassasse 15 ppm (KIND; FIEHN, 2007).

Os metabólitos detectados foram justificados através de propostas de fragmentação baseada nos íons-produto obtidos nos experimentos de EM/EM a partir de dissociação induzida por colisão (CID), além de comparação entre os espectros UV e os dados descritos na literatura.

Os espectros de íons produto (EM/EM) foram obtidos, em CLAE-DAD-EM/EM, a partir da seleção manual dos íons de interesse, neste trabalho limitado aos picos cromatográficos de maior intensidade. Uma vez que esta abordagem fornece poucos dados de EM/EM, também foram realizados experimentos *tandem* no modo autoEM/EM.

Neste modo de aquisição, os modos EM e EM/EM alternam automaticamente de tal maneira que, a cada *scan*, um espectro de EM é obtido, íons precursores são selecionados para CID e os espectros de EM/EM são adquiridos, gerando um cromatograma contendo espectros de EM e EM/EM em sequência - Figura 18 (BROECKER et al., 2011).

Figura 18 - Análise das folhas de *H. hebeclada* por CLAE-autoEM/EM (ESI +). (a) Cromatograma total de íons (TIC), (b) Região do TIC entre 22-23 min. indicando as aquisições de EM e EM/EM para os íons mais intensos 1 e 2. (c) espectro de massas mostrando os íons precursores $[M+H]_1^+$ e $[M+H]_2^+$ de 567.1299 e 303.0501 m/z . (d) íons produto de $[M+H]_1^+$ e (e) íons produto de $[M+H]_2^+$.



Nas análises de extratos de Chrysobalanceae, o modo de aquisição autoEM/EM utilizou para cada ciclo EM-EM/EM 4,0 s, com 2,0 s para aquisição no modo EM e seleção dos dois íons precursores mais intensos (> 1000 counts) - excluindo os íons interferentes removidos por comparação com branco -, e 1,0 s para a aquisição de cada espectro de EM/EM.

Os espectros de massas foram realizados no modo de ionização positivo para CLAE-DAD-EM/EM e nos modos positivo e negativo em CLAE-autoEM/EM. Os possíveis adutos a

serem formados foram considerados a partir das condições experimentais utilizadas, i.e, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ ou $[M]^\bullet$ no modo negativo.

Através das análises por CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM foi possível detectar derivados de quercetina, miricetina, caempferol (flavonol), taxifolina (dihidroflavonol) e proantocianidina (flavan-3-ol), distribuídos entre as espécies estudadas - Anexo I.

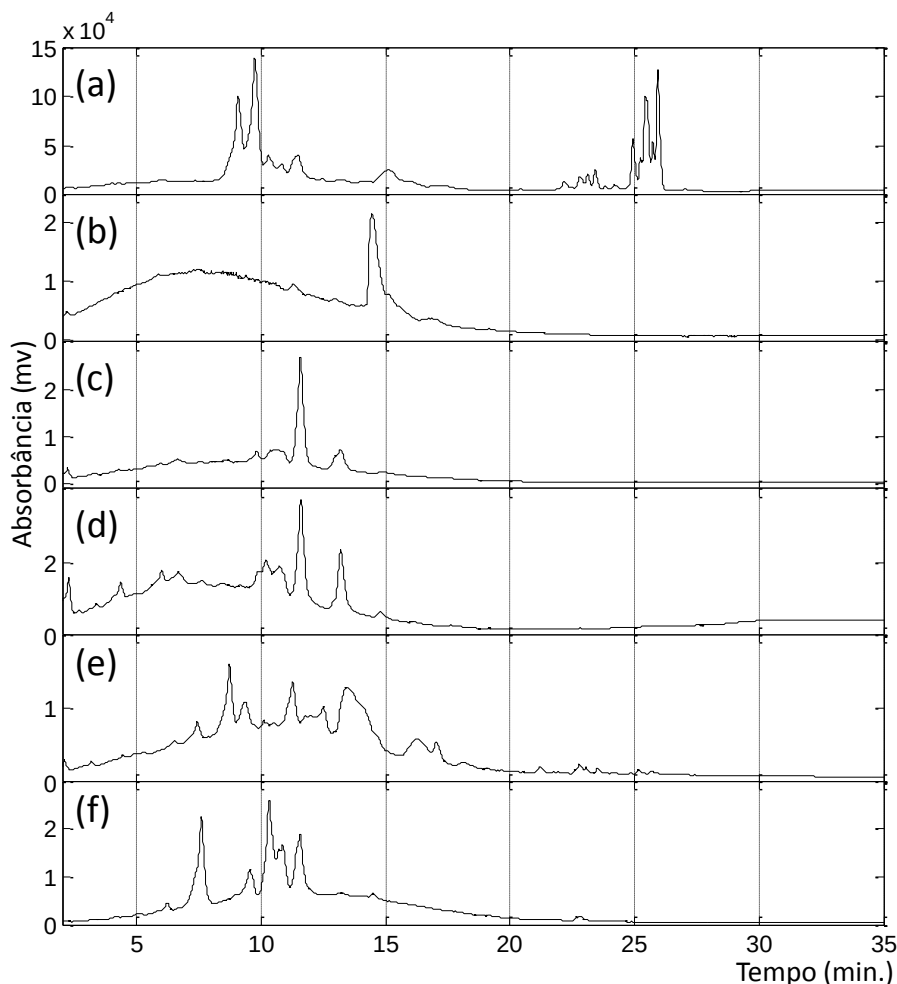
4.3.1 Proantocianidinas

Proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol formados por ligações C-C, usualmente em C-4 e C-8 ou, mais raramente, C-4 e C-6, podendo também apresentar uma ligação éter adicional, normalmente entre C-2 e O-7. Proantocianidinas que contêm uma única ligação interflavonoídica são denominados de tipo-B, enquanto aquelas que apresentam duas ligações são chamadas tipo-A (FRIEDRICH et al., 2000).

A identificação *in situ* de proantocianidinas é pouco explorada em comparação a outras estruturas polifenólicas devido ao elevado grau de polimerização e a consequente complexidade estrutural, com a formação de diversos isômeros (FRIEDRICH et al., 2000).

As análises por CLAE-DAD-EM/EM indicaram a presença de proantocianidinas em *H. hebeclada*, *L. huminis*, *P. excelsa* e *C. grandiflora*. Nas amostras de *Couepia grandiflora*, estas substâncias eluíram em um pico bastante largo e intenso, com tR entre 3-15 min e com λ_{max} 280 nm - Figura 19.

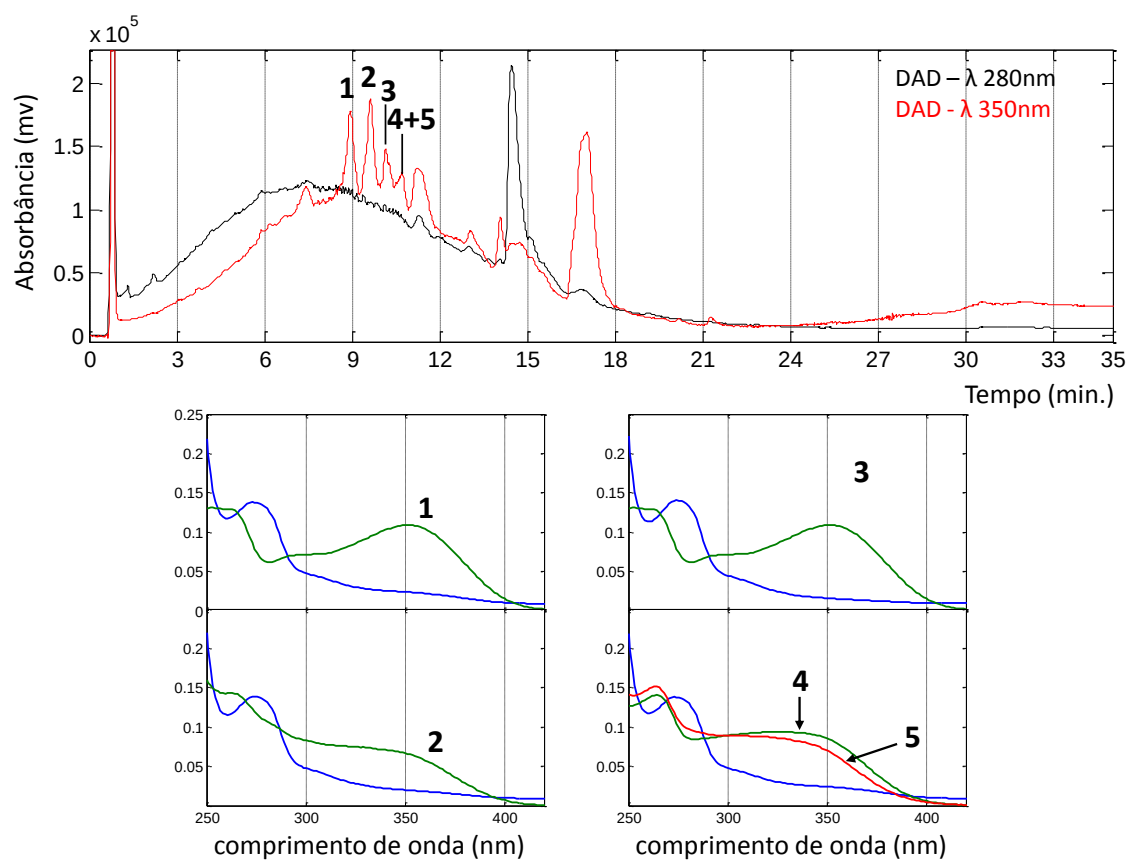
Figura 19 - Perfis cromatográficos dos extratos EtOH de (a) folhas de *C. grandiflora*, (b) ramos de *C. grandiflora*, (c) ramos de *L. humilis*, (d) folhas de *L. humilis*, (e) folhas de *H. hebeclada* coletadas na E. E. da Juréia e (f) ramos de *P. excelsa*, obtidos por CLAE-DAD em gradiente de eluição: 5-100% MeOH + 0,1% HAc por 35 min. $\lambda = 280$ nm.



De acordo com a literatura, a baixa resolução cromatográfica observada no DAD se deve a presença de proantocianidinas > tetrâmeros, incapazes de serem plenamente separadas em fase reversa, além da grande absorção de luz na região do UV (KELM et al., 2005).

Os espectros UV dos metabólitos em co-eluição sob o pico largo entre 3-15 min foram recuperados a partir do método de deconvolução MCR-ALS e permitiram, mesmo para esta região altamente sobreposta, a extração dos espectros "puros" de diferentes flavonoides-O-glicosilados e oligômeros ($\leq$ trímeros) de proantocianidinas, estes com λ_{max} em 280 nm - Figura 20.

Figura 20 - Cromatograma CLAE-DAD λ 280nm e λ 350nm dos ramos de *C. grandiflora* e os espectros de UV recuperados por MCR-ALS para (1) miricetina-hexose, (2) miricetina-pentose, (3) quercetina-hexose, (4) metoxi-miricetina-deoxihexose, (5) quercetina-pentose. Abs_{350nm} foi aumentada 10X para evidenciar efeito de comparação com CLAE-DAD $_{280nm}$)



A detecção das proantocianidinas por EM e EM/EM levou em consideração a massa acurada dos íons obtidos em alta resolução e os espectros de íons produto gerados a partir de dissociação induzida por colisão (CID) - tabela 7.

Tabela 7 - Composição de taninos detectada por CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM em espécies de Chrysobalanceae.

Composto	[M-H] ⁻ observado	[M-2H] ²⁻ observado	erro (ppm)	[M+H] ⁺ observado	erro (ppm)	Principais fragmentos (ESI -)
<i>epi</i> *-catequina	289.0712	-	-2.1	291.0856	-2.4	271, 245, 221, 203, 164, 151, 137, 123, 109
<i>epi</i> *-galocatequina	305.0662	-	-1.6	307.0798	-4.6	287, 261, 243, 237, 219, 203, 191, 179, 165, 149, 137, 125, 105
(E)Cat-A-(E)Cat	577.1330	-	-3.6	579.1493	-0.7	451, 425, 407, 381, 339, 289, 273, 245, 205, 161, 125, 109
(E)Cat-B-(E)Gal	591.1120	-	-4.1	593.126	-5.1	529, 467, 423, 305, 287, 261, 243, 217, 177, 161, 137, 125, 103
(E)Cat-A-(E)Gal	593.1276	-	-4.2	595.1455	-0.3	529, 467, 407, 350, 289, 245, 177, 125
(E)Gal-A-(E)Gal	609.1229		-3.4	611.1398	0.5	547, 483, 441, 433, 397, 355, 305, 273, 219, 177, 125
(E)Cat-A-(E)Cat-A-(E)Gal	881.1876	-	-6.7	-	-	863, 813, 787, 755, 729, 711, 671, 635, 614, 593, 575, 561, 532, 467, 441, 423, 413, 397, 379, 369, 327, 316, 305, 287, 281, 261, 245, 177, 167, 125
(E)Cat-A-(E)Gal-A-(E)Gal	897.1812	-	-8.0	-	-	799, 729, 651, 593, 543, 423, 289, 261, 243, 177, 167, 139, 125, 109
(E)Gal-A-(E)Gal-A-(E)Gal	913.1768	-	-7.1	-	-	895, 879, 861, 832, 812, 787, 779, 745, 727, 711, 688, 671, 651, 635, 621, 607, 578, 559, 549, 515, 483, 469, 439, 423, 371, 303, 287, 261, 245, 177, 167, 141, 125, 105
(E)Cat-A-(E)Cat-B-(E)Cat-A-(E)Cat	-	575.1190	-0.9	-	-	515, 449, 407, 363, 289, 261, 243, 209, 161, 151, 137, 125, 119
(E)Gal-A-(E)Gal-B-(E)Gal-A-(E)Gal	-	607.1078	-2.5	-	-	571, 545, 481, 471, 463, 439, 423, 411, 385, 343, 305, 273, 243, 201, 177, 167, 137, 125
(E)Gal-A-(E)Gal-A-(E)Gal-B-(E)Gal-A-(E)Gal	-	759.1317	-9.0	-	-	725, 674, 572, 519, 481, 427, 305, 259, 207, 177, 167, 125
(E)Gal-A-(E)Cat-A-(E)Gal-B-(E)Gal-A-(E)Cat-A-(E)Gal	-	895.1683	-4.9	-	-	846, 729, 661, 591, 547, 467, 427, 411, 383, 353, 305, 287, 254, 210, 177, 167, 151, 125

p.b. = pico base

O modo de ionização negativo foi mais sensível na detecção das proantocianidinas, especialmente para os metabólitos com maior grau de polimerização. Contudo, monômeros e dímeros de *epi**-catequina e *epi**-galocatequina (representação *epi** foi utilizada uma vez que a estereoquímica dos carbonos C-2 e C-3 não pode ser diferenciada por EM) também foram detectados no modo positivo.

Em ambos os modos de ionização, as vias mecanísticas propostas para a fragmentação da *epi**-galocatequina e *epi**-catequina envolveram reações de retro-Diels-Alder (RDA) e diferentes clivagens heterocíclica do anel C (HRF - *heterocyclic ring fission*), além de desidratações, perdas de etinol ou CO. No modo negativo, outros fragmentos não foram elucidados, provavelmente devido a ocorrência de clivagens hetero e homolíticas - Tabelas 8 e 9, Figura 21 (FRIEDRICH et al., 2000; LI; DEINZER, 2007).

Tabela 8 - Principais íons formados em CID-EM (ESI -) dos monômeros de flavan-3-ol.

Íon observado	<i>epi</i> *-galocatequina	<i>epi</i> *-catequina
[M-H] ⁻	305	289
[M-H ₂ O-H] ⁻	287	271
[M-C ₂ H ₄ O-H] ⁻	261	245
[M-C ₄ H ₆ O-H] ⁻	-	205
HRF ₁	179	179
HRF ₂	167	167
HRF ₁ - H ₂ O	165	165
HFF ₂ - H ₂ O	151	151
RDA	137	137
RDA	125	125
C ₆ H ₅ O ₂ ⁻	109	109

HRF₁ = clivagem do anel C com saída de floroglucinol, HRF₂ = clivagem do anel C

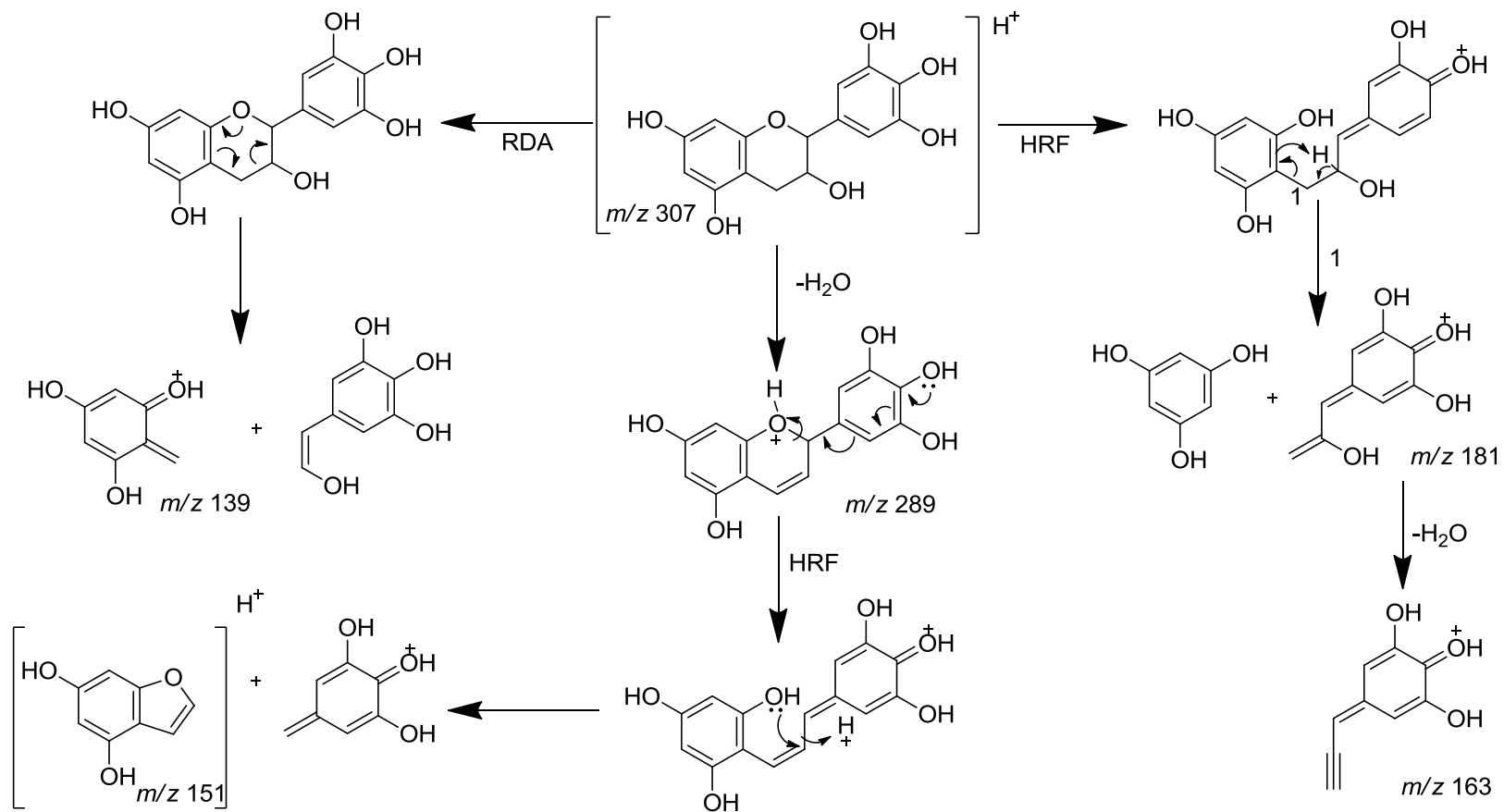
com formação de benzofurano, RDA = reação de Retro-Diels-Alder.

Tabela 9 - Principais íons formados em CID-EM (ESI +) dos monômeros de flavan-3-ol.

Íon observado	<i>epi</i> *-galocatequina	<i>epi</i> *-catequina
$[M+H]^+$	307	291
$[M-H_2O+H]^+$	289	273
$[M-C_2H_4O+H]^+$	265	-
$[M-C_4H_6O+H]^+$	209	207
HRF ₁	181	-
HRF ₂	169	-
HRF ₁ - H ₂ O	163	147
HFF ₂ - H ₂ O	151	-
RDA	139	139

HRF₁ = clivagem do anel C com saída do anel A, HRF₂ = clivagem do anel C com formação de benzofurano, RDA = reação de Retro-Diels-Alder.

Figura 21 - Proposta da via mecanística de fragmentação de *epi**-galocatequina (m/z 307) a partir de EM/EM, em modo positivo.



Experimentos CID-EM/EM também foram realizados para dímeros de proantocianidinas e permitiram determinar a sequência monomérica de flavan-3-ol. De acordo com a literatura, as proantocianidinas oligoméricas são divididas em unidade T (*top* - superior) que corresponde a unidade flavan-3-ol que realiza a ligação interflavonoídica em C-4, unidade M (*middle* - intermediária) com ligações em C-4 e C-6 ou C-8 (se as 3 posições estão ligadas, denomina-se unidade J), e unidade B (*base* - inferior) que corresponde ao monômero com ligação C-C em C-6 ou C-8 (FRIEDRICH et al., 2000; LI; DEINZER, 2007).

Em polímeros de flavan-3-ol do tipo A, o íon molecular apresenta 2H a menos que o correspondente tipo B devido a ligação interflavonoídica adicional (GU, L. et al., 2003; SARNOSKI et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos, três principais vias mecanísticas foram observadas: retro-Diels-Alder (RDA), formação de quinona metídeo (QM) e clivagem heterocíclica do anel C (HRF - *heterocyclic ring fission*), além de desidratações e outras perdas – Figura 22 (GU et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; SARNOSKI et al., 2012).

No modo negativo, a reação de RDA da unidade T mostrou-se a fragmentação mais importante, com a subsequente desidratação como o íon mais intenso. Além disso, a clivagem da ligação interflavonoídica através da formação de uma quinona metídeo indica o tipo de flavan-3-ol da unidade T, observado como $[M_T-3H]^-$, e da unidade B, observado como $[M_B-H]^-$.

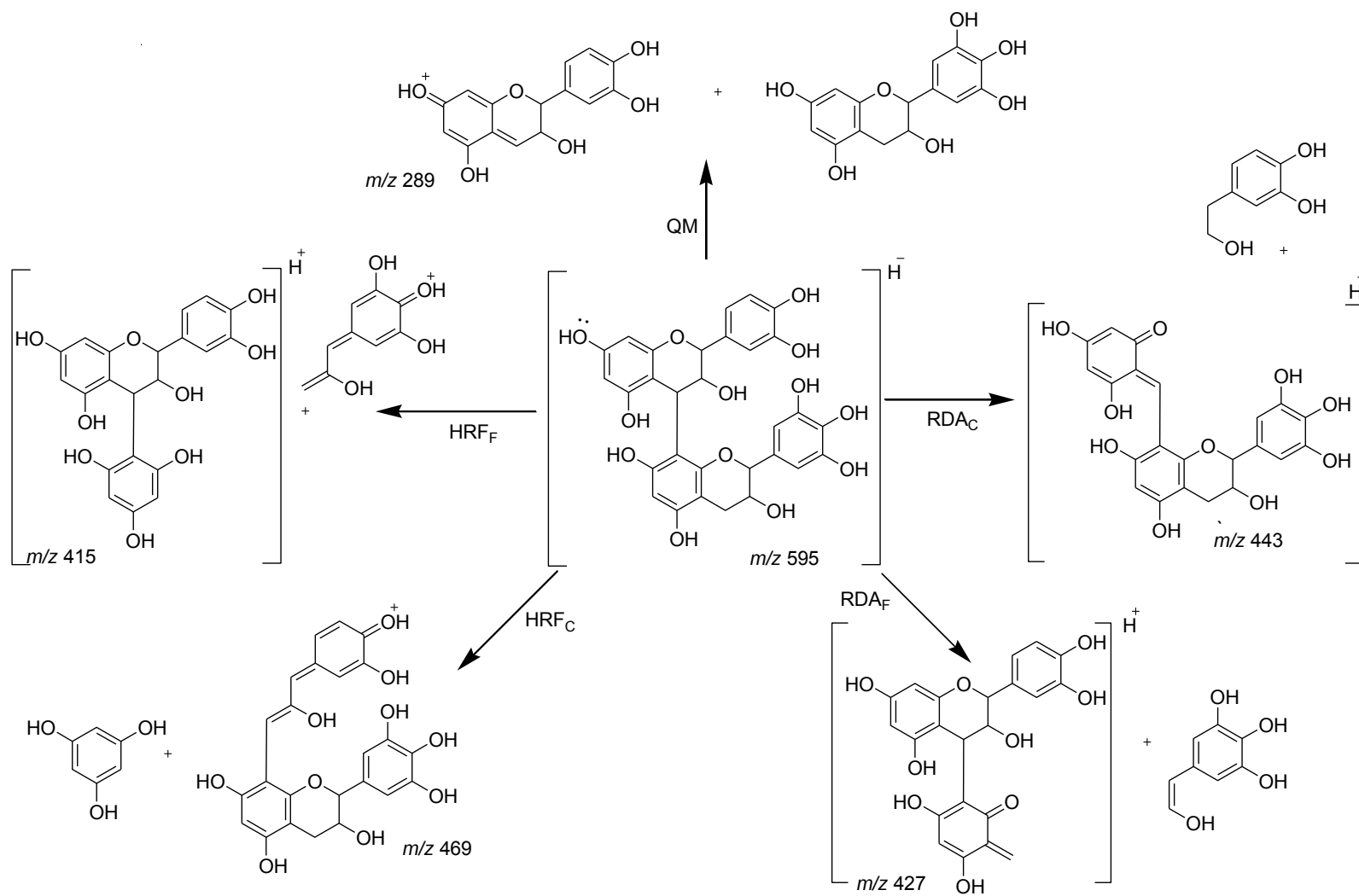
Em modo positivo, as unidades T e B apresentaram padrão de formação de quinona metídeo semelhante ao modo de ionização negativo, i.e., capaz de informar a posição dos monômeros, porém a reação de RDA na unidade B e a consequente desidratação gerou íons mais intensos que a fragmentação da unidade T. Este comportamento distinto em diferentes modos de ionização deve ser levado em consideração para a correta detecção *in situ*.

Tabela 10 - Principais íons obtidos em CID-EM (ESI + e -) para dímeros de proantocianidinas.

íon observado	(E)Cat-(E)Cat	(E)Cat-(E)Gal	(E)Gal-(E)Cat	(E)Gal-(E)Gal
$[M-H]^-$	577	593	593	609
RDA unidade T	425	441	425	441
HRF unidade T	451	467	467	483
$[M_T-3H]^-$	287	287	303	303
$[M_B-H]^-$	289	305	289	305
$[M+H]^+$	579	595	595	611
RDA unidade B	427	427	443	443
HRF unidade B	415	415	431	431
$[M_T-2H+H]^+$	289	289	305	305
$[M_T+H]^+$	291	307	291	307

HRF = clivagem do anel C, RDA = reação de Retro-Diels-Alder, (E)Cat = *epi**-catequina, (E)Gal = *epi**-galocatequina.

Figura 22 - Proposta da via mecanística de fragmentação de (E)Gal-(E)Cat (m/z 595) a partir de EM/EM, em modo positivo.

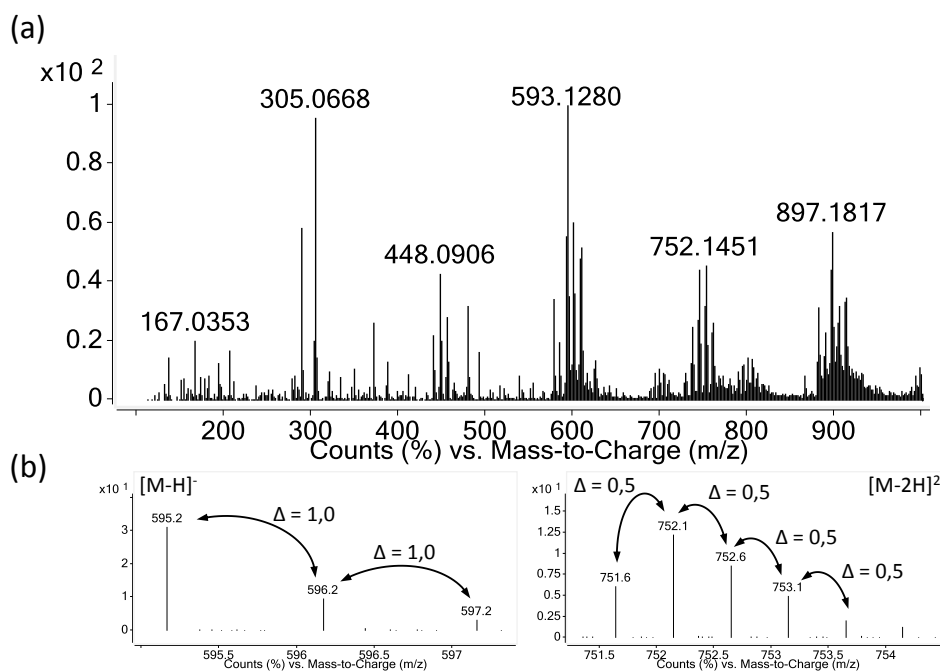


Em trímeros, a fragmentação só foi determinada no modo de ionização negativo e apresentou um perfil semelhante aos dímeros, i.e., a clivagem da ligação interflavonoídica gera o íon $[M_T-3H]^-$ e o íon $[M_M-H]^-$ através de formação de quinona metídeo. Houve também a formação de íons menos intensos relacionados a $[M_B-H]^-$, HRF da unidade T etc (GU, L. et al., 2003).

Não foi possível observar íons de proantocianidinas > trímeros uma vez que estes experimentos foram registrados em $\Delta m/z$ 100-1000. Contudo, em EM, macromoléculas podem gerar íons multi-carregados que podem ser identificados através do padrão isotópico obtido experimentalmente, i.e., variação isotópica de $\Delta m=1,0$ u é característico de íons com uma carga, enquanto $\Delta m=0,5$ u é característico de íons diméricos, $\Delta m=0,33$ u para íons triméricos etc. (GUYOT et al., 1997).

Nos experimentos em modo negativo, observou-se $\Delta m=1,0$ u para as proantocianidinas detectadas em *H. hebeclada*, *L. huminis* e *P. excelsa*, enquanto que para as amostras de *C. grandiflora* verificou-se $\Delta m=1,0$ e $0,5$ u. Estes resultados corroboram com o perfil cromatográfico específico para as amostras de *Couepia* e é justificado pela presença de hexâmeros de *epi**-catequina e/ou *epi**-galocatequina - Figura 23 (ZEEB et al., 2000; GU, L. et al., 2003).

Figura 23 - (a) espectro de massas (ESI -) entre tR 3,0-20,0 min - 245 scans -, dos ramos de *C. grandiflora*, (b) aumento dos sinais 595.2 m/z e 752.1 m/z indicando a distribuição isotópica para íon com uma carga $[M-H]^-$ e íon dimérico $[M-2H]^{2-}$.



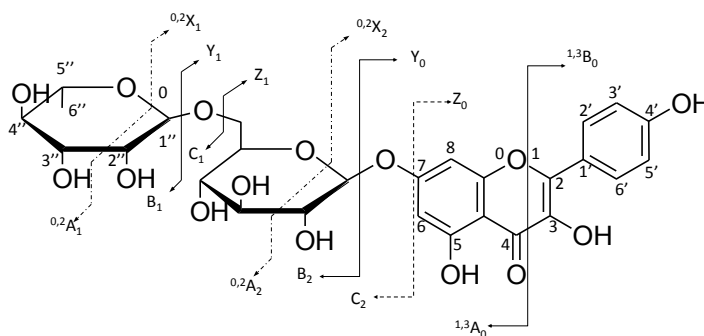
Flavonoides-*O*-glicosilados

Os flavonoides constituem um dos mais característicos grupos de metabólitos presentes em plantas. Em Chrysobalanaceae, desempenham papel importante no potencial etnofarmacológico, além de serem importantes quimiomarcadores taxonômicos (CARNEVALE NETO et al., 2013).

Os flavonóides são encontrados na forma livre ou na forma de glicoconjugados, os quais podem estar ligados via substituintes hidroxila, dando origem aos *O*-glicosídeos, ou ainda ligados diretamente ao carbono, na forma de *C*-glicosídeos.

Neste trabalho, a identificação *in situ* desta classe de metabólitos baseou-se na determinação das fórmulas moleculares a partir das massas acuradas, na comparação dos espectros de UV com a literatura e em propostas de fragmentação a partir dos experimentos EM/EM, seguindo a nomenclatura proposta por DOMON e COSTELLO (1988) - Figura 24.

Figura 24 - Nomenclatura de fragmentação para flavonoides-*O*-glicosilados segundo DOMON e COSTELLO (1988).



Os resultados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM indicam a presença de isômeros de flavonoides mono- e di-*O*-glicosilados - tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - flavonoides-*O*-diglicosilados detectados por CLAE-DAD-EM e CLAE-autoEM, nos modos positivo e negativo.

tR (min.)	flavonoide- <i>O</i> -diglicosilado	[M-H]- observado	erro (ppm)	ESI (-) - fragmentacao na fonte			R	[M+H]+ observado	erro (ppm)	ESI (+) - fragmentacao na fonte		
				[Y ₀ -H] ⁺ :Y ₀ ⁻	Y ₁ ⁻	Y ₂ ⁻				Y ₀ ⁺	Y ₁ ⁺	Y ₂ ⁺
18.96	miricetina-3- <i>O</i> -deo(1→2)hex	625.1428	-2.9	316:317	463	-	3.0	627.1568	-1.9	319	465	-
18.15	miricetina-3- <i>O</i> -hex(1→2)deo	625.1410	0.0	316:317	-	-	3.0	627.1560	-0.6	319	481	-
19.05	quercetina-di- <i>O</i> -hex	625.1394	2.6	300:301	463	-	3.0	627.1550	1.0	303	465	-
19.35	metoxi-miricetina-di- <i>O</i> -hex	655.1486	4.6	330:331	493	-	-	657.1622	5.9	333	495	-
19.83	quercetina-3- <i>O</i> -hex(1→2)pen	595.1292	2.2	300:301	463	-	3.0	597.1453	-0.5	303	465	-
19.85	quercetina-7- <i>O</i> -hex(1→2)deo	609.1462	-0.2	300:301	-	-	1.0	611.1560	3.3	303	465	-
20.64	quercetina- <i>O</i> -hex-deo	609.1455	1.0	300:301	447	-	2.0	611.1598	1.5	303	465	-
20.70	quercetina- <i>O</i> -hex-pen	595.1290	2.5	300:301	463	-	0.5	567.1412	6.7	303	465	-
20.79	metoxi-miricetina- <i>O</i> -hex-deo	639.1557	1.6	330:331	493	-	-	641.1712	0.0	333	495	-
20.86	quercetina-3- <i>O</i> -hex(1→6)deo	609.1432	4.8	300:301	463	-	2.0	611.1616	-1.5	303	465	-
21.32	quercetina-7- <i>O</i> -deo(1→2)hex	609.1421	6.6	300:301	447	-	1.0	611.1618	-1.8	303	449	-
21.54	quercetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	565.1191	1.4	300:301	-	-	3.0	567.1339	0.9	303	435	-
21.73	campferol-7- <i>O</i> -hex(1→2)deo	593.1497	2.5	284:285	-	-	1.0	595.1636	3.5	287	449	-
23.33	metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -hex(1→2)deo	623.1602	2.6	314:315	-	-	1.0	625.1728	5.6	317	449	-
23.5	metoxi-miricetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	595.1295	1.7	330:331	463	-	3.0	597.1440	1.7	333	465	-
23.88	metoxi-miricetina-3- <i>O</i> -deo(1→2)deo	623.1611	1.1	330:331	463	-	-	625.1782	-3.0	333	479	-
23.75	quercetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)deo	579.1343	2.1	300:301	-	-	3.0	581.1500	0.2	303	435	-
24.49	campferol-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	549.1244	1.1	284:285	-	-	3.0	551.1332	2.4	287	419	-
25.22	metoxi-quercetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	579.1335	3.5	314:315	-	-	3.0	581.1462	6.7	317	449	-
26.07	metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -pen(1→2)deo	593.1499	2.2	314:315	-	-	0.3	595.1445	-1.0	317	463	-
26.26	metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -deo(1→2)deo	607.1659	1.5	314:315	-	-	1.0	609.1815	-0.2	317	463	-
26.97	dimetoxi-miricetina-7- <i>O</i> -deo(1→2)deo	637.1758	2.5	345:346	-	-	1.0	639.1862	9.1	347	493	-

R: razão entre as intensidades [Y₀-H]⁺:Y₀⁻; hex = hexose; deo = deoxihexose; pen = pentose

Tabela 12 - flavonoides-*O*-monoglicosilados detectados por CLAE-DAD-EM e CLAE-autoEM, nos modos positivo e negativo

tR (min.)	flavonoide- <i>O</i> -monoglicosilado	UV	[M-H] ⁻ observado	erro (ppm)	[Y ₀ -H] ⁻ :Y ₀ ⁻	R	[M+H] ⁺ observado	erro (ppm)	Y ₀ ⁺
18.78	taxifolina- <i>O</i> -pentose	288; 340(sh)	435.0934	-0.2	303	-	437.1057	4.8	305
19.03	miricetina-3- <i>O</i> -hexose	254; 355	479.0828	0.6	316:317	3.0	481.0976	-1.0	319
19.46	miricetina-3- <i>O</i> -pentose	260; 350	449.0759	-7.6	316:317	3.0	451.0864	0.4	319
20.80	miricetina-3- <i>O</i> -deoxihexose	260; 350	463.0883	-0.2	316:317	3.0	465.103	-1.7	319
21.04	quercetina-3- <i>O</i> -hexose	254; 353	463.0903	-4.5	300:301	3.0	465.1036	-3.0	303
21.52	taxifolina- <i>O</i> -deoxihexose	287; 341(sh)	449.1085	0.9	303	-	451.1238	-0.7	305
21.76	taxifolina- <i>O</i> -pentose	289; 340(sh)	435.0944	-2.5	303	-	437.1054	5.5	305
22.15	quercetina-3- <i>O</i> -pentose	254; 353	433.0807	-7.2	300:301	3.0	435.0939	-2.8	303
22.21	metoxi-miricetina-7- <i>O</i> -hexose	264; 344	493.0986	0.4	330:331	2.0	495.1143	-3.0	333
22.66	campferol-3- <i>O</i> -hexose	264; 280(sh); 320(sh); 355	447.0934	-0.2	284:285	3.0	449.1081	-0.7	287
22.71	metoxi-miricetina- <i>O</i> -pentose	-	463.0878	0.9	330:331	-	465.103	-1.7	333
23.50	metoxi-miricetina- <i>O</i> -deoxihexose	-	477.1042	-0.8	330:331	-	479.1197	-3.8	333
23.50	quercetina-7- <i>O</i> -deoxihexose	254; 300(sh); 353	447.0947	-3.1	300:301	1.0	449.1089	-1.1	303
23.85	campferol-7- <i>O</i> -pentose	-	417.0851	-5.8	284:285	3.0	419.0993	-4.8	303
25.10	metoxi-miricetina- <i>O</i> -hexose	-	507.1139	1.0	344:345	-	509.1295	-2.2	347
25.50	campferol-7- <i>O</i> -deoxihexose	-	431.1011	-6.3	284:285	0.7	433.1144	-3.5	287
25.97	metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -deoxihexose	-	461.1074	3.3	314:315	1.0	463.1241	-0.2	317
27.95	metoxi-quercetina-3- <i>O</i> -hexose	-	477.1017	4.4	314:315	3.0	479.1163	5.6	317

R: razão entre [Y₀-H]⁻:Y₀⁻, sh = "ombro" do espectro de UV.

De acordo com os espectros de UV, deconvoluídos por MCR-ALS, os valores de $\lambda_{\max}$ observados para estas moléculas foram entre 250-350 nm, similares aos descritos na literatura para flavonol, e atribuídos às absorções do sistema benzoil ($\lambda_{\max}$ 250-290 nm) e cinamoil ($\lambda_{\max}$ 300-350 nm) (MARKHAM; MABRY, 1975).

A partir dos experimentos de EM (ESI+), dois íons principais para os flavonoides-O-glicosilados foram observados: $[M+H]^+$, favorecido pelo uso de solventes ácidos na separação cromatográfica, e íons produzidos pela perda de fragmentos neutros de 162, 146 e/ou 132 u. Estes íons (Y_j^+) foram justificados pela eliminação do substituinte açúcar após clivagem da ligação éter na fonte de ionização, em um processo denominado dissociação na fonte. A remoção destas unidades de monossacarídeos a partir de $[M+H]^+$ na fonte de ionização pode levar a uma falsa interpretação dos glicosídeos uma vez que Y_1^+ (tri-O-glicosídeo sem um açúcar) pode ser considerado $[M+H]^+$ de um di-O-glicosídeo (VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Já os experimentos de EM (ESI-) produziram preferencialmente íons $[M-H]^-$, não sendo observada a dissociação da ligação O-glicosídica na fonte de ionização.

Para as análises por EM/EM, foram selecionados os íons $[M+H]^+/[M-H]^-$ e/ou as respectivas agliconas $[M-\text{açúcar}+H]^+/[M-\text{açúcar}-H]^-$, em experimentos realizados com diferentes energias de colisão (15 à 40eV). Nos experimentos de CLAE-autoEM/EM, a seleção dos 2 íons mais intensos também permitiu a fragmentação das moléculas protonadas (ESI+) ou desprotonadas (ESI-) e suas respectivas agliconas para energias de colisão de 15, 25 e 35eV.

O comportamento dos flavonoides-O-glicosilados nos experimentos de EM/EM variou ante diferentes condições de energia e modo de ionização, e forneceu informações importantes sobre as estruturas das agliconas e quanto à sequência e posição da(s) glicosilação(ões).

Nos experimentos EM/EM (ESI-), observaram-se íons da aglicona desprotonada Y_0^- e íons radiculares das respectivas agliconas desprotonadas $[Y_0-H]^\bullet$, gerados a partir da clivagem hetero- e homolítica do substituinte açúcar. De acordo com a literatura, a abundância deste íon radical está diretamente relacionado ao sítio de glicosilação, sendo mais intenso para flavonóis-3-O-glicosídeos (CUYCKENS; CLAEYS, 2005).

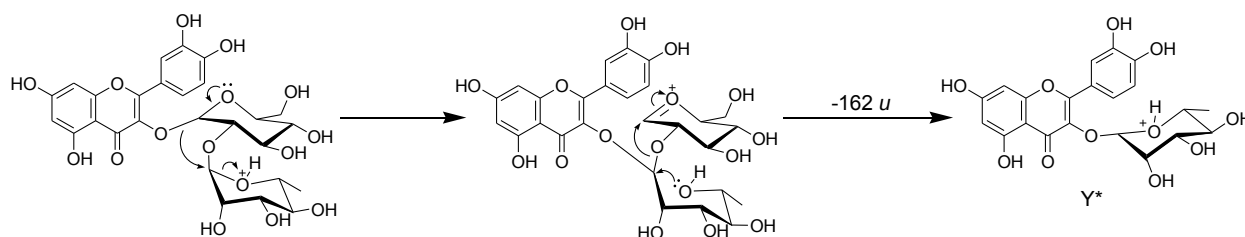
Assim, de acordo com os resultados obtidos, é possível sugerir que a principal glicosilação em Chrysobalanaceae ocorre em O-3, onde a proporção $[Y_0-H]^\bullet:Y_0^-$ é 3-4 vezes maior quando comparada as glicosilações em O-7 e O-4' (CUYCKENS; CLAEYS, 2005; YANG et al., 2014).

A diferenciação entre di-O-glicosídeos (monossacarídeos ligados em diferentes posições da aglicona) e O-di-glicosídeos (substituinte dissacarídeos) basearam-se nas abundâncias relativas dos íons Y_0 e Y_1 , onde $Y_0 < Y_1$ é característico em espectros de di-O-glicosídeos, e $Y_0 > Y_1$ é observado em O-di-glicosídeos. Já para a determinação das ligações interglicosídicas ($1 \rightarrow 2$) ou ($1 \rightarrow 6$) em dissacarídeos, considera-se a abundância dos íons-produto Y_1^+ ante o íon pico-base, caracterizado por Y_0^+ , obtidos em experimentos EM/EM. Assim, em ligações ($1 \rightarrow 2$) a intensidade de Y_1 varia de 13-89%, enquanto que em ligações ($1 \rightarrow 6$) a intensidade $Y_1 < 13\%$ (CUYCKENS et al., 2000; FERRERES et al, 2004).

Nos resultados obtidos, é proposta a presença dos dois tipos de substituição e um predomínio de substituintes dissacarídeos com padrão de ligação ($1 \rightarrow 2$) - tabela 12.

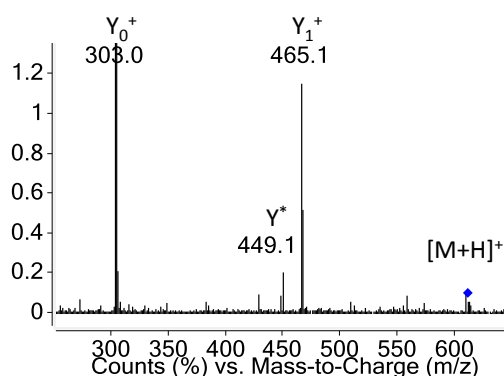
Ainda na análise de O-di-glicosídeos, a formação do íon Y^* foi observada em experimentos EM/EM (ESI +), que corresponde à perda de uma unidade hexose interna em mecanismo envolvendo a transferência do próton localizado no oxigênio carbonílico em C-4 ao resíduo de açúcar terminal, presente no substituinte dissacarídeo - Figura 25 (MA et al., 2000).

Figura 25 - Mecanismo proposto para a formação do íon Y^* formado durante experimentos EM/EM (ESI +) de quercetina-3-*O*-hexose(1→2)deoxihexose protonada $[M+H]^+$



Estes íons são gerados em condições de baixa energia de colisão e normalmente encontram-se em baixa intensidade em flavonóis, como observado nos resultados obtidos - Figura 26 (MA et al., 2000; YANG et al., 2014).

Figura 26 - Espectros de CID-MS em modo positivo mostrando o perfil de fragmentação de quercetina-3-*O*-hexose(1→2)deoxihexose protonada $[M+H]^+$



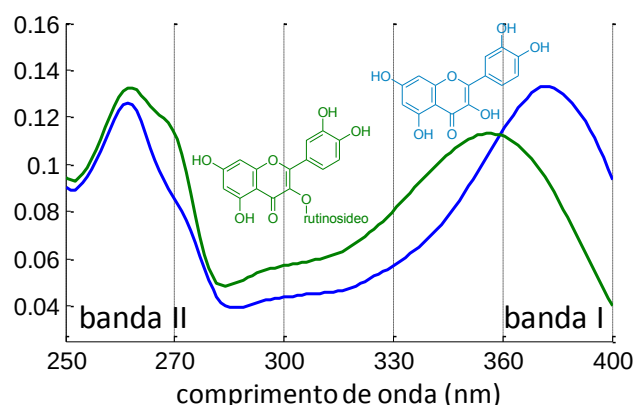
Adicionalmente aos resultados propostos, foi observado que os flavonoides-*O*-glicosilados detectados apresentavam diferenças no espectro UV quando comparados aos dados referentes às agliconas livres, tanto em relação aos deslocamentos no $\lambda_{\max}$ quanto entre as intensidades das bandas I e II (A_I/A_{II}), o que poderia estar relacionado à posição da ligação glicosídica.

Uma análise criteriosa dos espectros UV recuperados por MCR em associação com os dados de EM e EM/EM mostrou que estas variações poderiam ser consequência da posição da *O*-glicosilação. De acordo com a literatura, apenas o deslocamento no $\lambda_{\max}$ - efeito

hipsocrômico de até 30 nm - foi descrito como consequência de sítio de *O*-glicosilação em flavonoides (SINGH et al., 2010; ANOUAR et al., 2012).

Na tentativa de confirmar estas observações, padrões de quercetina e rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) foram analisadas por CLAE-DAD e comparadas, evidenciando a variação do espectro UV (efeito hipsocrômico e $\Delta A_I/A_{II}$) - Figura 27.

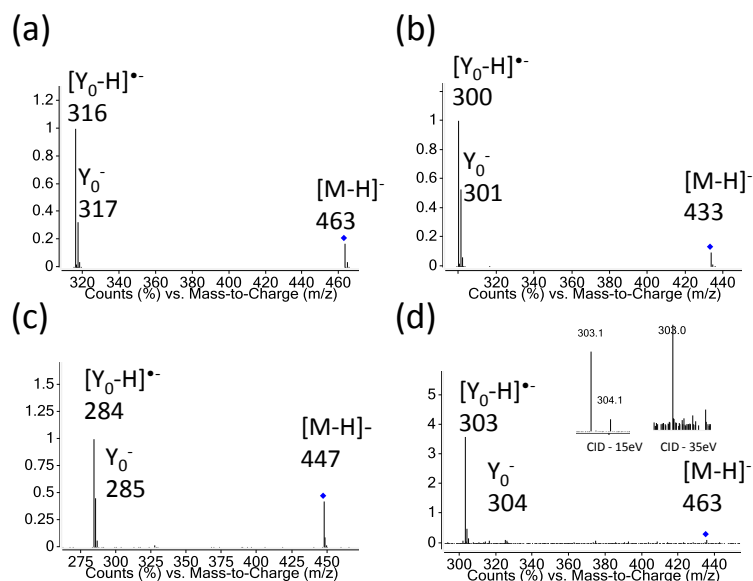
Figura 27 - Espectro UV dos padrões quercetina (azul) e rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo, verde).



Pela metodologia de EM utilizada os açúcares epiméricos não são diferenciáveis pois são diastereoisômeros distinguindo apenas na configuração do centro estereogênico, o que não influi no valor de massas. Logo, a partir dos dados obtidos não se pode determinar, por exemplo, se a eliminação de 162 u corresponde a uma molécula de glicose ou galactose. Assim considerou-se apenas a classe do açúcar (hexose, desoxihexose ou pentose).

A identificação das agliconas foi baseada nos espectros UV, na massa acurada dos íons Y_0^+ e Y_0^- , e em experimentos EM/EM, obtidos em ESI (+) e ESI (-), e permitiu a detecção de campferol ($[Y_0-H]^+/Y_0^- = 284-285$), quercetina ($[Y_0-H]^+/Y_0^- = 300-301$), miricetina ($[Y_0-H]^+/Y_0^- = 316-317$) e taxifolina ($Y_0^- = 303$, não apresentou $[Y_0-H]^+$, provavelmente devido a ausência da ligação π entre C-3 e C-2) - Figura 28 (YANG et al., 2014).

Figura 28 - CID-EM (ESI-) evidenciando a formação dos íons regular e radical de (a) miricetina, (b) quercetina, (c) campferol e (d) taxifolina.



A análise dos dados de EM/EM das agliconas indicou um padrão de fragmentação semelhante ao descrito na literatura, com eliminação de H_2O , CO , e clivagens no anel C como, por exemplo, Retro-Diels-Alder (RDA). Derivados metoxilados de quercetina e miricetina, ainda não descritos na família, foram detectadas nas amostras analisadas por CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM. Observou-se a perda de 15 u , proposta como a eliminação do radical $CH_3^{\bullet+}$ por reação redox e estabilizado pelo sistema de conjugação π , característico de flavonol, e de fragmentos neutros CH_4 (16 u) e/ou CH_3OH (32 u) obtidos por reações ácido-base - tabela 13, Figuras 29 a 31 (MA et al., 1997; CROTTI et al., 2006; JUSTINO et al., 2009).

Tabela 13 - Principais íons-produto formados para as agliconas por EM/EM, ESI +.

Ions	Taxifolina	Campferol	Quercetina	Miricetina	Metoxi-Quercetina	Metoxi-Miricetina	Dimetoxi-Miricetina
$[M+H]^+$	305	285	303	319	317	333	347
$[M+H-CH_3]^+$	—	—	—	—	302	318	330
$[M+H-CH_4]^+$	—	—	—	—	—	—	331
$[M+H-H_2O]^+$	287	269	285	301	299	—	—
$[M+H-CHO]^+$	—	258	274	290	288	—	—
$[M+H-CO]^+$	—	259	275	291	289	—	—
$[M+H-CH_3OH]^+$	—	—	—	—	285	301	—
$[M+H-2CH_3OH]^+$	—	—	—	—	285	301	—
$[M+H-2H_2O]^+$	—	—	267	283	—	—	—
$[M+H-COCH_3]^+$	—	—	—	—	274	290	—
$[M+H-H_2O-CO]^+$	259	241	257	273	—	287	—
$[M+H-H_2O-CHO]^+$	258	—	—	—	—	286	—
$[M+H-CH_3OH-CO]^+$	—	—	—	—	257	273	285
$[M+H-2CO]^+$	—	231	247	263	—	—	—
$[M+H-2H_2O-CO]^+$	241	—	—	255	—	—	—
$[M+H-2CO-H_2O]^+$	231	213	229	245	—	—	—
$[M+H-C_2H_2O]^+$	—	—	—	—	275	—	303
$[M+H-2C_2H_2O]^+$	213	—	219	—	233	249	287
$[M+H-C_2H_2O_2]^+$	—	—	245	—	—	—	—
$[M+H-2C_2H_2O_2]^+$	—	—	187	—	—	—	—
$[M+H-2CO-C_4H_4O_2]^+$	—	147	163	—	177	—	—
$^{0,2}A^+$	167	165	165	165	165	165	165
$^{0,2}A^+-CO$	139	137	137	137	—	—	—
$^{0,2}A^+-H_2O$	149	—	—	—	—	—	—
$^{0,2}B^+$	—	121	139	153	167	167	167
$^{1,2}B^+$	123	—	—	—	—	—	—
$^{1,3}A^+$	153	153	153	153	153	153	153
$^{1,3}B^+-2H$	—	133	149	165	163	149	149
$^{0,4}B^+-H_2O$	—	—	—	—	191	—	—

Figura 29 - Proposta da via mecanística de fragmentação da quercetina (m/z 303) a partir de EM/EM, em modo positivo.

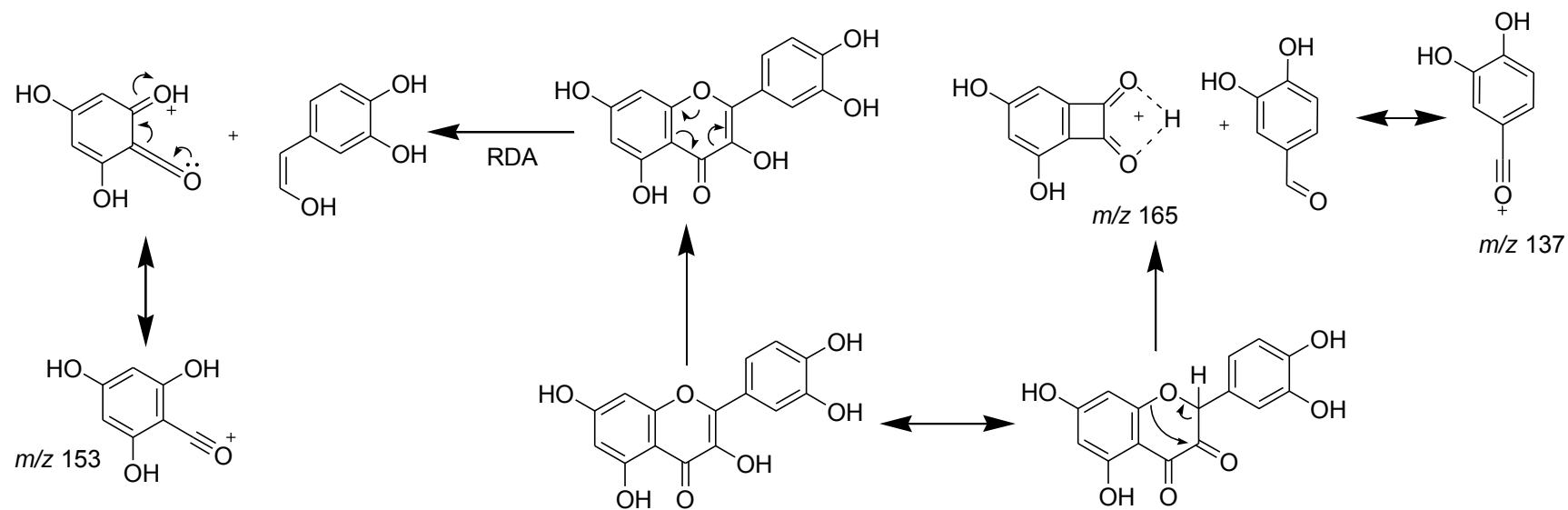


Figura 30 - Proposta da via mecanística de fragmentação da taxifolina (m/z 305) a partir de EM/EM, em modo positivo.

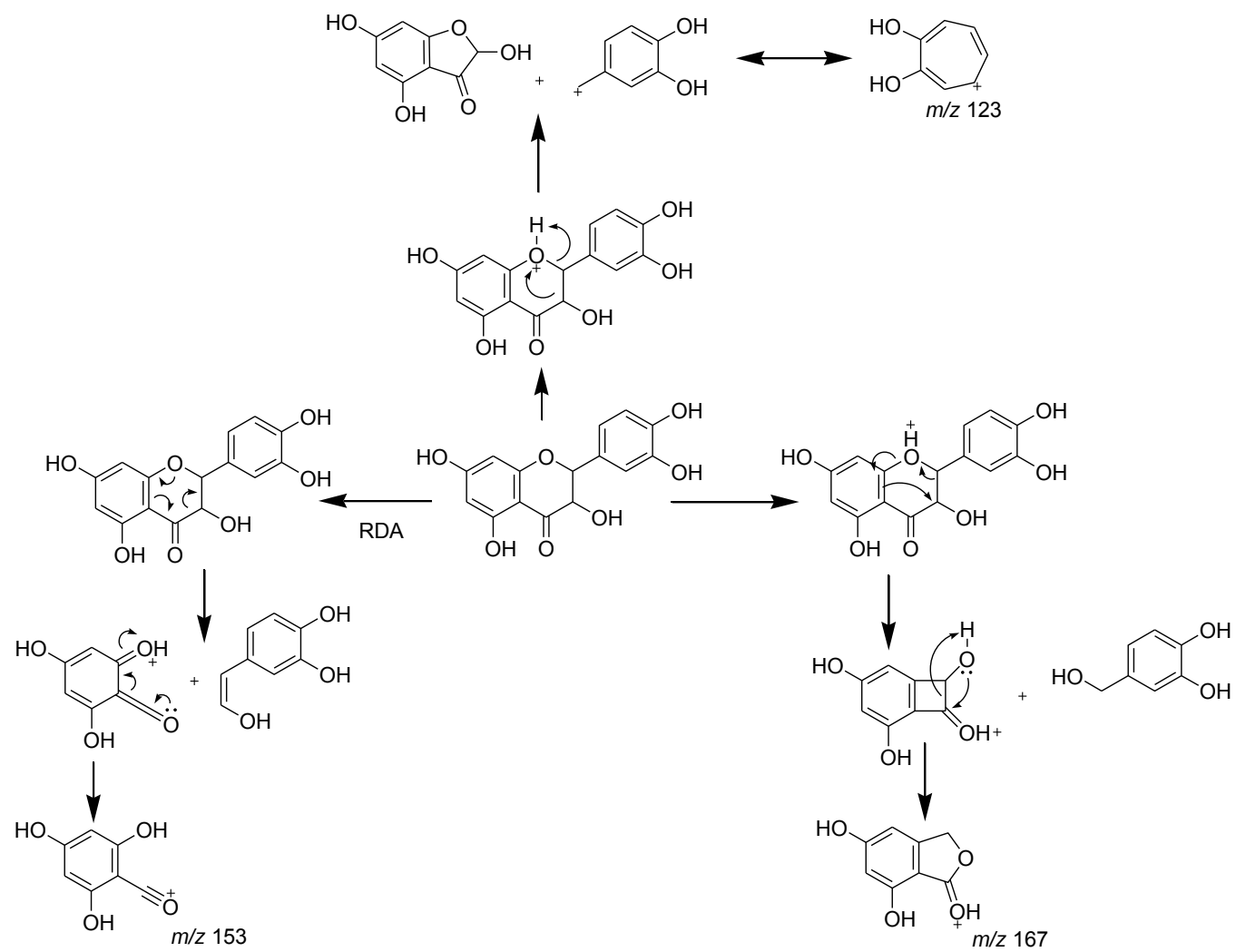
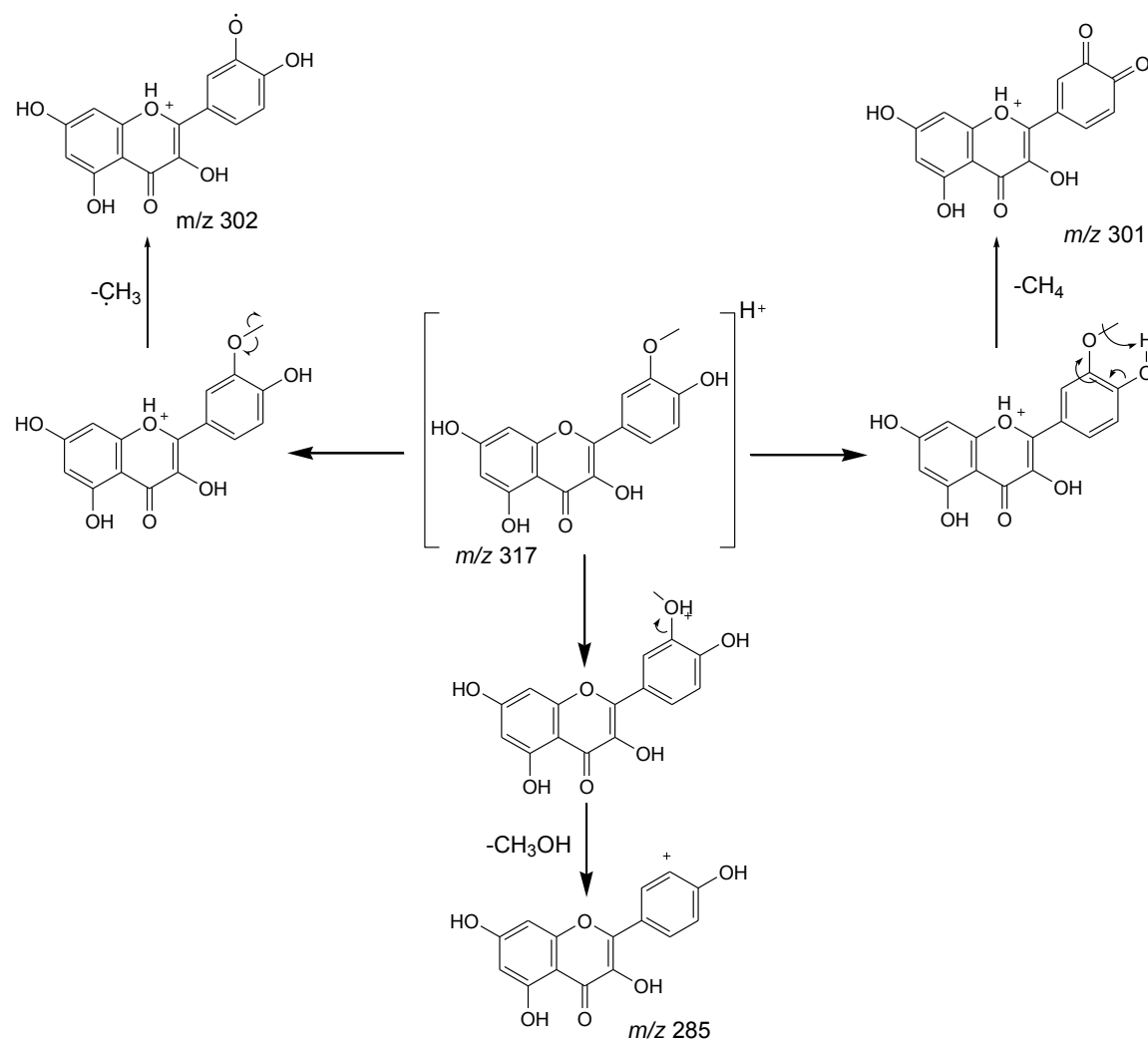


Figura 31 - Proposta da via mecanística de fragmentação da metoxiquercetina (m/z 317) a partir de EM/EM, em modo positivo.



Na análise das folhas de *Licania hoehnei*, detectou-se um cumaroilhexose-flavonol ($[M+H]^+$ m/z 595,1429). Como a unidade cumaroilhexose possui a mesma massa molecular nominal (309 u) de uma unidade (rutinose) hexose+deoxihexose e ambas foram reportadas no gênero *Licania*, e são substituições de ocorrência relativamente comum em flavonoides, a obtenção dos íons com massas moleculares em alta resolução foi utilizada para a diferenciação entre as duas possibilidades (tabela 11). Assim, a relação m/z observada para o íon $[M+H]^+$ apresentou um erro de 3,8 ppm em relação ao derivado cumariolhesoxe ($C_{30}H_{27}O_{13}^+$), e um erro de 39,3 ppm quando comparado o derivado hexose-deoxihexose ($C_{27}H_{31}O_{15}^+$). Para confirmar a detecção, os experimentos EM/EM também foram obtidos em alta resolução. Para tanto, fez-se a calibração das análises com o padrão interno Na-TFA. Para o íon produto m/z 309,0970, referente à liberação da aglicona, o erro relativo da unidade cumaroilhexose ($C_{15}H_{17}O_7^+$) foi de 1,3 ppm, ao passo que para a unidade de hexose-deoxihexose ($C_{12}H_{21}O_9^+$) é de 69,9 ppm. Para o íon produto m/z 147,0436, um erro de 6,8 ppm foi relacionado à uma unidade cumaroil ($C_9H_7O_2^+$), enquanto que um erro de 150,3 ppm, a uma unidade de deoxihexose ($C_6H_{11}O_4^+$).

Tabela 14 - Erros calculados para as fórmulas moleculares propostas para m/z 595, 309 e 147.

	fórmula molecular	m/z observado	m/z calculado	erro (ppm)
caempferol-3-(6"- <i>p</i> -cumaroil)-hexose	$C_{30}H_{27}O_{13}^+$	595,1429	595,1452	3,8
caempferol-3- <i>O</i> -rutinopiranosideo	$C_{27}H_{31}O_{15}^+$		595,1663	39,3
cumaroilhexose	$C_{15}H_{17}O_7^+$	309,0970	309,0974	1,2
rutinose	$C_{12}H_{21}O_9^+$		309,1186	69,8
cumaroil	$C_9H_7O_2^+$	147,0436	147,0446	6,8
deoxihexose	$C_6H_{11}O_4^+$		147,0657	150,2

4.4 BIOENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.4.1 Avaliação da citotoxicidade com *Saccharomyces cerevisiae*

A atividade citotóxica das espécies de Chrysobalanaceae foi avaliada durante a elaboração da extratoteca em ensaio de reparo do DNA em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste bioensaio, a inibição seletiva do crescimento de linhagens mutantes de leveduras (proficientes ou deficientes no reparo do DNA) é um indicativo de atividade citotóxica (GUNATILAKA et al., 1994).

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos das folhas de *Parinari excelsa*, *Licania kunthiana* e *Hirtella hebeclada* (100µL a 4mg.mL⁻¹), possuem atividade citotóxica ante cepas de *S. cerevisiae*, em especial para *H. hebeclada* (M491) com seletividade para a cepa RS 321N deficiente em topoisomerase II e para *P. excelsa*, ativa diante da linhagem selvagem Rad+ e linhagem Rad 52Y deficiente em topoisomerase I - tabela 12.

Tabela 15 - Atividade citotóxica dos extratos de Chrysobalanaceae frente as diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Espécie vegetal	Parte	Código	Saccharomyces cerevisiae IC ₁₂ (µg.mL ⁻¹)		
			Rad+	Rad 52Y	RS 321N
<i>Licania hoehnei</i>	Folhas	M847	i	i	i
<i>Licania kunthiana</i>	Folhas	M846	10,0	i	i
<i>Licania humilis</i>	Ramos	AM253	NT	NT	NT
<i>Licania humilis</i>	Folhas	AM254	NT	NT	NT
<i>Couepia grandiflora</i>	Folhas	AM229	NT	NT	NT
<i>Couepia grandiflora</i>	Ramos	AM230	NT	NT	NT
<i>Hirtella hebeclada</i>	Folhas	M491	i	i	12,5
<i>Hirtella hebeclada</i>	Folhas	M799	11,0	i	i
<i>Hirtella hebeclada</i>	Ramos	M851	i	i	i
<i>Parinari excelsa</i>	Folhas	M821	11,5	11,0	i

i = inativo, NT = não testado

A resposta das linhagens selvagem e mutante indica a influência da complexidade metabólica na atividade biológica, i.e., as amostras apresentam compostos atuando de maneira

associada em um processo multifatorial, assim a bioatividade não pode ser facilmente explicada em termos mecanísticos reduzidos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

4.4.2 Avaliação da citotoxicidade com linhagens tumorais

Devido ao resultados de citotoxicidade obtidos em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, os extratos de Chrysobalanaceae também foram submetidos a avaliação da citotoxicidade diante das linhagens tumorais.

A viabilidade celular foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico quantitativo com o sal tetrazolina amarelo (MTT). Quando este reagente é incubado com células vivas, é clivado por enzimas mitocondriais, convertendo-se em um composto azul denominado formazan. Assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória celular.

Os resultados apresentados na Tabela 13 não evidenciam atividade citotóxica, i.e., inibição da viabilidade celular $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens.

Tabela 16 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em 3 linhagens tumorais testadas na concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Espécie vegetal	Parte	Código	HCT-8		MDAMB-435		SF-295	
			Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
<i>Licania hoehnei</i>	Folhas	M847	24,0	$\pm 1,4$	-31,9	$\pm 4,6$	14,3	$\pm 0,0$
<i>Licania kunthiana</i>	Folhas	M846	29,3	$\pm 1,7$	-47,6	$\pm 20,6$	-14,7	$\pm 1,5$
<i>Licania humilis</i>	Ramos	AM253	14,4	$\pm 1,0$	38,4	$\pm 2,0$	42,6	$\pm 2,2$
<i>Licania humilis</i>	Folhas	AM254	26,8	$\pm 1,7$	47,0	$\pm 1,5$	65,1	$\pm 1,8$
<i>C. grandiflora</i>	Folhas	AM229	43,3	$\pm 6,9$	19,2	$\pm 5,4$	20,2	$\pm 19,3$
<i>C. grandiflora</i>	Ramos	AM230	23,7	$\pm 0,2$	-7,8	$\pm 11,8$	16,3	$\pm 8,9$
<i>Hirtella hebeclada</i>	Folhas	M491	26,2	$\pm 2,3$	-27,1	$\pm 18,5$	12,0	$\pm 10,7$
<i>Hirtella hebeclada</i>	Folhas	M799	25,5	$\pm 2,1$	-37,0	$\pm 31,7$	-5,3	$\pm 9,4$
<i>Hirtella hebeclada</i>	Ramos	M851	16,2	$\pm 0,2$	-3,9	$\pm 11,4$	6,2	$\pm 5,6$
<i>Parinari excelsa</i>	Folhas	M821	28,4	$\pm 1,4$	-35,1	$\pm 11,1$	-11,2	$\pm 2,5$

A inatividade observada neste bioensaio contrasta com o potencial citotóxico descrito na literatura e observado no ensaio com levedura *S. cerevisiae*, contudo pode ser justificado

pela rica composição flavonoídica que, segundo a literatura, está mais relacionado à citoproteção (CARNEVALE NETO et al., 2013).

Com o intuito de se entender a dinâmica envolvida na citotoxicidade dos extratos de *Chrysobanaceae*, sugere-se o uso de métodos que associem a análise metabólica à atividade citotóxica através do monitoramento das mudanças metabólicas das linhagens celulares e tumorais em resposta aos estímulos farmacológicos ou toxicológicos dos extratos vegetais. Assim, a partir da comparação entre as composições metabólicas dos extratos e das linhagens celulares, é possível traçar um perfil de variação na bioquímica celular (se esta ocorrer) e os compostos vegetais que estão mais relacionados a esta toxicidade (de maneira positiva e negativa) (KIM et al., 2010; ULRICH-MERZENICH et al., 2010).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, espécies vegetais da família Chrysobalanaceae foram estudadas visando à determinação de sua composição metabólica e ao entendimento do potencial citotóxico sob a óptica da biologia sistêmica.

Os extratos de *Couepia grandiflora*, *Hirtella hebeclada*, *Licania hoehnei*, *Licania kunthiana*, *Licania huminis* e *Parinari excelsa* foram obtidos do banco de extratos construído pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) em parceria com o Instituto Botânico de São Paulo.

As amostras vegetais foram analisadas por CG-EM, CLAE-DAD-EM/EM e CLAE-autoEM/EM para a determinação do perfil químico e para a obtenção de dados espectrais dos metabólitos presentes nos extratos.

A metodologia de desreplicação iniciou com a construção de uma base de dados contendo valores de massas de alta resolução e espectros UV de todos os metabólitos secundários já relatados para a família Chrysobalanaceae.

A análise dos extratos por CG-EM exigiu etapas de derivatização (metoximação e sililação) e permitiu, através dos espectros de massas e cálculo do índice de retenção, a detecção de metabólitos primários (aminoácidos, ácidos e açúcares) e secundários (flavonoides e terpenos). O uso de ferramentas matemáticas de análise multivariada, como a deconvolução empírica proposta pelo software AMDIS e a extração espectral desenvolvida pelo algoritmo RAMSY, assistiram à desreplicação ao "superar" a baixa resolução cromatográfica típica de extratos vegetais. Contudo, a ausência dos metabólitos relatados para a família nas bases de dados limitaram o alcance da identificação metabólica.

A análise dos extratos por CLAE-DAD-EM/EM possibilitou a detecção de metabólitos, na sua maioria, derivados de flavonoides já descritos em Chrysobalanaceae.

Polímeros de *epi**-catequina e *epi**-galocatequina foram identificados nos extratos vegetais, especialmente nas amostras de *Couepia grandiflora*. Estas moléculas foram detectadas através dos espectros de UV deconvoluidos por MCR-ALS, uma vez que a separação cromatográfica não foi adequada, e dos experimentos CID-EM, nos modos positivo e negativo, este fornecendo melhor sensibilidade. O grau de polimerização foi proposto a partir da variação isotópica em razão da ausência dos íons protonados e desprotonados devido a seleção de janela de detecção até 1000 *m/z*.

Os extratos de Chrysobalanaceae apresentaram uma grande variabilidade de flavonol-O-glicosilados, compostos principalmente por campferol, quercetina e miricetina. Os substituintes glicosídeos ligados aos flavonoides eram mono- ou dissacarídeos formados por hexose, deoxihexose e/ou pentose. A posição na qual o sacarídeo está ligado à aglicona foi determinada através de razões específicas entre os fragmentos formados a partir dos íons precursores em espectrometria de massas no modo de ionização negativo.

Adicionalmente, em dissacarídeos, a posição das ligações interglicosídicas foi proposta de acordo com as intensidades dos íons formados a partir das clivagens das ligações éter entre os açúcares e entre o açúcar e a aglicona. De acordo com os resultados obtidos tanto pela razão entre o íon radical e regular quanto pelas intensidades dos íons formados a partir das clivagens da ligação éter, foi proposta a presença de flavonoides-O-glicosilados na posição O-3, e dissacarídeos de ligação interglicosídica (1→2). Ainda, durante as análises dos flavonoides-O-glicosilados por CLAE-DAD-EM/EM, observou-se o efeito hipsocrômico da banda II de absorção UV, além de alterações na intensidade entre as bandas I e II, que sugerem a partir de comparações com a literatura, a posição de glicosilação em O-3.

Os resultados de atividade citotóxica obtidos durante a elaboração da extratoteca sugeriu o potencial antitumoral das espécies de Chrysobalanaceae. Contudo a avaliação do potencial citotóxico dos extratos brutos diante das diferentes linhagens tumorais demonstrou

que os extratos não são ativos, o que pode estar relacionado à limitações quanto a extração de compostos de menor polaridade, como os diterpenos. Esta hipótese está de acordo com dados apresentados na literatura, em que o uso de método extrativo por fluido pressurizado, utilizando etanol, é eficiente na extração de compostos polifenólicos, em especial flavonóides-*O*-glicosilados, usualmente relacionados à citoproteção.

Diante dos resultados apresentados, fica evidente a importância do desenvolvimento de métodos racionais que auxiliem na identificação metabólica em matrizes vegetais, tornando o estudo de produtos naturais mais eficiente, por exemplo, na busca por moléculas bioativas. Adicionalmente, novas abordagens que explorem a biodiversidade e suas aplicações nas ciências terapêuticas são necessárias para fornecer informações ainda desconhecidas, como o pluralismo de efeitos em misturas, sinergismos e antagonismos. Deste modo, reducionismo e holismo, como enfoques complementares, usados de maneira conjunta, poderão nos ajudar a chegar a um conhecimento mais profundo da vida, e de como podemos mantê-la em perfeita harmonia.

REFERÊNCIAS

- ANOUAR, E. H.; GIER SCHNER, J.; DUROUX, J-L.; TROUILLAS, P. UV/Visible spectra of natural polyphenols: a time-dependent density functional theory study. **Food Chem.**, v. 131, n. 1, p. 79-89, 2012.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry**: an introduction. Chichester: John Wiley & Sons, 2003, 276 p.
- BARBOSA, W. L. R.; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L.(Chrysobalanaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 3, p. 333-337, 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 1, p. 15-19, 1996.
- BRACA, A.; BILIA, A. R.; MENDEZ, J.; PIZZA, C.; MORELLI, I.; TOMMASI, N. de Chemical and biological studies on *Licania* genus. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 28, p. 35-67, 2003.
- BRACA, A.; ARMENISE, A.; MORELLI, A.; MENDEZ, J.; MI, Q.; CHAI, H. B.; SWANSON, S. M.; KINGHORN, A. D.; TOMMASI, N. de Structure of kaurane-type diterpenes from *Parinari sprucei* and their potential anticancer activity. **Planta Med.**, v. 70, n. 6, p. 540-550, 2004.
- BROECKER, S.; HERRE, S.; WURST, B.; ZWEIGENBAUM, J.; PRAQST, F. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 400, n. 1, p. 101-117, 2011.
- CAPRA, F. A máquina do mundo newtoniana. In: CAPRA, F. **O ponto de mutação**. São Paulo: Cultrix, 1982. p. 49-69.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1089, n. 1, p. 1-17, 2005.
- CARNEVALE NETO, F.; PILON, A. C.; BOLZANI, V. da S.; CASTRO-GAMBOA, I. Chrysobalanaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. **Phytochem. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 121-146, 2013.
- CARVALHO, M. G. D.; COSTA, P. M. D. Other constituents isolated from *Licania arianee* (Chrysobalanaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 1B, p. 290-293, 2009.

CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents of *Licania tomentosa* Benth.(Chrysobalanaceae). **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 66-69, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products**: detection, isolation, and structural determination. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 624 p.

CORADIN, L.; GIANNASI, D. E.; PRANCE, G. T. Chemosystematic studies in the Chrysobalanaceae. I. Flavonoids in *Parinari*. **Brittonia**, v. 37, n. 2, p. 169-178, 1985.

CRAGG, G.; NEWMAN, D. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. **Phytochem. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 313-331, 2009.

CRAGG, G. M.; BOYD, M. R.; CARDELLINA II, J. H.; NEWMAN, D. J.; SNADER, M. K.; McCLOUD, T. G. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. In: CHARDWICK, D. J.; MARSH, J. (Ed.). **Ethnobotany and the search for new drugs**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 178-196, 1994.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, n. 3, p. 364-372, 2005.

CUYCKENS, F.; MA, Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAEYS, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analisis**, v. 28, n. 10, p. 888-895, 2000.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate J.**, v. 5, p. 397-409, 1988.

DROMEY, R.; STEFIK, M. J.; RINDFLEISH, T. C.; DUFFIELD, A. M. Extraction of mass spectra free of background and neighboring component contributions from gas chromatography/mass spectrometry data. **Anal. Chem.**, v. 48, n. 9, p. 1368-1375, 1976.

EL-ELIMAT, T.; FIGUEROA, M.; EHRMANN, B. M.; CECH, N. B.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. **J. Nat. Prod.**, v. 76, n. 9, p. 1709-1716, 2013.

FENN, J. B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 42, n. 33, p. 3871-3894, 2003.

FERREIRA-MACHADO, S.; RODRIGUES, M. P.; NUNES, A. M. P.; DANTAS, F. J. S.; MATTOS, J. C. P. de; SILVA, C. R.; MOURA, E. G.; BEZERRA, R. J. A. C.; CALDEIRA-de-ARAUJO, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. **Toxicol. Lett.**, v. 151, n. 3, p. 481-487, 2004.

FERRERES, F.; LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 39, n. 3, p. 312-321, 2004.

FIELDLER, H-P. Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector. **J. Chromatogr.**, v. 316, p. 487-494, 1984.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 211, n. 1, p. 56-64, 2000.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S. Metabolomics, an optimized approach for the rational exploitation of Brazilian biodiversity: state of the art, new scenarios, and challenges. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; ANDRADE, A. M.; HILDER, E. F.; CAVALHEIRO, A. J. Green chromatographic fingerprinting: an environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **J. Sep. Sci.**, v. 37, n. 1-2, p. 37-44, 2014.

GÓMEZ-ROMERO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71, n. 16, p. 1848-1864, 2010.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry**: a textbook. Berlin: Springer, 2004, 518 p.

GU, H.; NAGANA GOWDA, G. A.; CARNEVALE NETO, F.; OPP, M. R.; RAFTERY, D. RAMSY: ratio analysis of mass spectrometry to improve compound identification. **Anal. Chem.**, v. 85, n. 22, p. 10771-10779, 2013.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **J. Mass Spectrom.**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: gradient experiments. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, n. 2, p. 430-440, 2008.

GUNATILAKA, A. L.; KINGSTON, D. G.; JOHNSON, R. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. **Pure Appl. Chem.**, v. 66, n. 10/11, p. 2219-2222, 1994.

GUYOT, S.; DOCO, T.; SOUQUET, J.-M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J.-F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. kermierren) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

HALILU, M.; AGUNU, A.; IBRAHIM, H.; ABDURAHMAN, E. M. Pharmacognostic evaluation of the stem bark of *Parinari curatellifolia* Planch ex benth (Chrysobalanaceae). **Niger J. Pharm. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 79-85, 2008.

HANSEN, M. E.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O. X-Hitting: an algorithm for novelty detection and dereplication by UV spectra of complex mixtures of natural products. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 21, p. 6805-6817, 2005.

HASSAS-ROUDSARI, M.; CHANG, P. R.; PEGG, R. B.; TYLER, R. T. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. **Food Chem.**, v. 114, n. 2, p. 717-726, 2009.

HIBBERT, D. B.; MINKKINEN, P.; WISE, B. M. IUPAC project: a glossary of concepts and terms in chemometrics. **Anal. Chim. Acta**, v. 642, n. 1, p. 3-5, 2009.

HUR, M.; CAMPBELL, A. A.; ALMEIDA-de-MACEDO, M.; LI, L.; RANSOM, N.; JOSE, A.; CRISPIN, M.; NIKOLAU, B. J.; WURTELE, E. S. A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, n. 4, p. 565-583, 2013.

KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in foods: how good are the datas? **Clin. Dev. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 35-41, 2005.

KIM, H. K.; WILSON, E. G.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics: a tool for anticancer lead-finding from natural products. **Planta Med.**, v. 76, n. 11, p. 1094-1102, 2010.

KIND, T.; FIEHN, O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. **BMC Bioinf.**, v. 8, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-105.

KIND, T.; WOHLGEMUTH, G.; LEE DO, Y.; LU, Y.; PALAZOGLU, M.; SHAHBAZ, S.; FIEHN, O. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 81, n. 24, p. 10038-10048, 2009.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO M. H. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **J. Nat. Prod.**, v. 71, n. 9, p. 1595-1599, 2008.

LARSEN, T. O.; HANSEN, M. A. E. Dereplication and discovery of natural products by UV spectroscopy. In: COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. Cap. 8, p. 221-244.

LEE, I. S.; SHAMON, L. A.; CHAI, H. B.; CHAGWEDERA, T. E.; BESTERMAN, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cell-cycle specific cytotoxicity mediated by rearranged *ent*-kaurene diterpenoids isolated from *Parinari curatellifolia*. **Chem. Biol. Interact.**, v. 99, n. 1, p. 193-204, 1996.

LEVESQUE, M. P.; BENFEY, P. N. Systems biology. **Curr. Biol.**, v. 14, n. 5, p. 179-180, 2004.

LI, H.-J.; DEINZER, L. M. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. **Anal. Chem.**, v. 79, n. 4, p. 1739-1748, 2007.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAU, F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. **J. Sep. Sci.**, v. 33, n. 3, p. 410-421, 2010.

MA, Y.-L.; VEDERNIKOVA, I.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Internal glucose residue loss in protonated *O*-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 11, n. 2, p. 136-144, 2000.

MAGGIO, R. M.; DAMIANI, P. C.; OLIVIERI, A. C. Multivariate curve-resolution analysis of pesticides in water samples from liquid chromatographic-diode array data. **Talanta**, v. 83, n. 4, p. 1173-1180, 2011.

MARKHAM, K. R.; MABRY, T. J. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (Ed.). **The flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1975. Cap. 2, p. 45-77.

MAS, S.; FONRODONA, G.; TAULER, R.; BARBOSA, J. Determination of phenolic acids in strawberry samples by means of fast liquid chromatography and multivariate curve resolution methods. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1455-1463, 2007.

MILLER, R. D.; NEUSS, N. High performance liquid chromatography of natural products. II. direct biological correlation of components in the fermentation broth. **J. Antibiot.**, v. 31, n. 11, p. 1136-1136, 1978.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. D. Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

NDIAYE, M.; DIATTA, W.; SY, A. N.; DIÈYE, A. M.; FAYE, B.; BASSÈNE, E. Antidiabetic properties of aqueous barks extract of *Parinari excelsa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 79, n. 4, p. 267-270, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; GIDDINGS, L-A. Natural products as leads to antitumor drugs. **Phytochem. Rev.**, p. 1-15, 2013.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054-1056, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181-1189, 1999.

NIELSEN, J. H.; JEWETT, M. C. (Ed.). **Metabolomics: a powerful tool in systems biology**. Berlin: Springer, 2007.

OGBONNIA, S. O.; ADEKUNLE, A.; OLAGBENDE-DADA, S. O.; ENWURU, V. N.; OROLEPE, M. Assessing plasma glucose and lipid levels, body weight and acute toxicity following oral administration of an aqueous ethanolic extract of *Parinari curatellifolia* Planch.(Chrysobalanaceae) seeds in alloxan-induced diabetes in rats. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n. 17, p. 2998-3003, 2008.

PARASTAR, H.; TAULER, R. Multivariate curve resolution of hyphenated and multidimensional chromatographic measurements: a new insight to address current chromatographic challenges. **Anal. Chem.**, v. 86, n. 1, p. 286-297, 2013.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nat. Rev. Mol. Cell.**, v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.

PILON, A. C.; CARNEIRO, R. L.; CARNEVALE NETO, F.; BOLZANI, V. da S.; CASTRO-GAMBOA, I. Interval multivariate curve resolution in the dereplication of HPLC-DAD data from *Jatropha gossypifolia*. **Phytochem. Anal.**, v. 24, n. 4, p. 401-406, 2013.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAJALAHTI, T.; KVALHEIM, O. M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. **Int. J. Pharm.**, v. 417, n. 1, p. 280-290, 2011.

- RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. dos; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, n. 12, p. 1907-1914, 2007.
- SARNOSKI, P. J.; JOHNSON, J. V.; REED, K. A.; TANKO, J. M.; O'KEEFE, S. F. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSⁿ. **Food Chem.**, v. 131, n. 3, p. 927-939, 2012.
- SINGH, R.; WU, B.; TANG, L.; LIU, Z.; HU, M. Identification of the position of mono-*O*-glucuronide of flavones and flavonols by analyzing shift in *online* UV spectrum ($\lambda_{\max}$) generated from an *online* diode array detector. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 17, p. 9384-9395, 2010.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- STEIN, S. E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 10, n. 8, p. 770-781, 1999.
- STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 237-256, 2000.
- TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magn. Reson. Chem.**, v. 47, n. 1, p. 157-162, 2009.
- TAUTENHAHN, R.; BÖTTCHER, C.; NEUMANN, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. **BMC Bioinf.**, v. 9, n. 1, 2008. doi: 10.1186/1471-2105/9/504.
- TAWFIKE, A. F.; VIEGELMANN, C.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics and dereplication strategies in natural products. In: _____. **Metabolomics tools for natural product discovery**. New York: Springer, 2013. p. 227-244.
- ULRICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H.; WAGNER, H. Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 70-82, 2007.
- ULRICH-MERZENICH, G.; PANEK, D.; ZEITLER, H.; VETTER, H.; WAGNER, H. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 48, n. 3, p. 208-219, 2010.
- UYS, A. C.; MALAN, S. F.; VAN DYK, S.; VAN ZYL, R. L. Antimalarial compounds from *Parinari capensis*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 12, n. 16, p. 2167-2169, 2002.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1, p. 53-56, 2005.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VON BERTALANFFY, L. **Teoria geral dos sistemas**. 2. ed. Petrópolis: Vozes, 1975, 351 p.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

WANG, M.; LAMERS, R. J.; KORTHOUT, H. A.; VAN NESSELROOIK, J. H.; WITKAMP, R. F.; CAN DER HEIJDEN, R.; VOSHOL, P. J.; HAVEKES, L. M.; VERPOORTE, R.; VAN DER GREEF, J. Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology. **Phytother. Res.**, v. 19, n. 3, p. 173-182, 2005.

WEI, S.; ZHANG, J.; LIU, L.; YE, T.; NAGANA GOWDA, G. A.; TAYYARI, F.; RAFTERY, D. Ratio analysis nuclear magnetic resonance spectroscopy for selective metabolite identification in complex samples. **Anal. Chem.**, v. 83, n. 20, p. 7616-7623, 2011.

WOLFENDER, J.-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Med.**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER, J.-L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

YAKANDAWALA, D.; MORTON, C. M.; PRANCE, G. T. Phylogenetic relationships of the chrysobalanaceae inferred from chloroplast, nuclear, and morphological data. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 97, n. 2, p. 259-281, 2010.

YANG, W. Z.; QIAO, X.; BO, T.; WANG, Q.; GUO, D. A.; YE, M. Low energy induced homolytic fragmentation of flavonol 3-O-glycosides by negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 28, n. 4, p. 385-395, 2014.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytother. Res.**, v. 25, n. 2, p. 157-169, 2011.

ZEEB, D. J.; NELSON, B. C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J. J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

ZUQUE, A. L. F.; WATANABE, E. S.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA A. L. A.; RESENDE, U. M.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth.(Chrysobalanaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 2, p. 129-136, 2004.

APÊNDICE:

Tabela 17 - Distribuição dos metabólitos nas seis espécies de Chrysobalanaceae analisadas por CLAE-DAD-EM/EM, CLAE-autoEM/EM e CG-EM.

Substâncias	Cg_F	Cg_R	Hh_F01	Hh_F02	Hh_R	Lh_F	Lk_F	Lhu_F	Lhu_R	Pe_F
<i>epi</i> *-catequina	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>epi</i> *-galocatequina	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
(E)Cat-A-(E)Cat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Cat-B-(E)Gal	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
(E)Cat-A-(E)Gal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Gal-A-(E)Gal	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
(E)Cat-A-(E)Cat-A-(E)Gal	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Cat-A-(E)Gal-A-(E)Gal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Gal-A-(E)Gal-A-(E)Gal	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Cat-A-(E)Cat-B-(E)Cat-A-(E)Cat	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Gal-A-(E)Gal-B-(E)Gal-A-(E)Gal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Gal-A-(E)Gal-A-(E)Gal-B-(E)Gal-A-(E)Gal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)Gal-A-(E)Cat-A-(E)Gal-B-(E)Gal-A-(E)Cat-A-(E)Gal	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
taxifolina-O-pentose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
miricetina-3-O-hexose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
miricetina-3-O-pentose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
miricetina-3-O-deoxihexose	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
quercetina-3-O-hexose	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
taxifolina-O-deoxihexose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
taxifolina-O-pentose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
quercetina-3-O-pentose	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
metoxi-miricetina-7-O-hexose	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
taxifolina-O-pentose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
campferol-3-(6"- <i>p</i> -cumaroil)-hexose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Cg_F: Folhas de *Couepia grandiflora*; Cg_R: Ramos de *Couepia grandiflora*; Hh_F01: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; Hh_F02: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Hh_R: Ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Lh_F: Folhas de *Licania hoehnei*; Lk_F: Folhas de *Licania kunthiana*; Lhu_F: Folhas de *Licania humilis*; Lhu_R: Ramos de *Licania humilis*; Pe_F: Folhas de *Parinari excelsa*.

Tabela 17 - Continuação

Substâncias	Cg_F	Cg_R	Hh_F01	Hh_F02	Hh_R	Lh_F	Lk_F	Lhu_F	Lhu_R	Pe_F
campferol-3- <i>O</i> -hexose	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
metoxi-miricetina- <i>O</i> -pentose	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
metoxi-miricetina- <i>O</i> -deoxihexose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
quercetina-7- <i>O</i> -deoxihexose	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
campferol-7- <i>O</i> -pentose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metoxi-miricetina- <i>O</i> -hexose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
campferol-7- <i>O</i> -deoxihexose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -deoxihexose	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
metoxi-quercetina-3- <i>O</i> -hexose	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
miricetina-3- <i>O</i> -deo(1→2)hex	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
miricetina-3- <i>O</i> -hex(1→2)deo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
quercetina-di- <i>O</i> -hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
metoxi-miricetina-di- <i>O</i> -hex	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
quercetina-3- <i>O</i> -hex(1→2)pen	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
quercetina-7- <i>O</i> -hex(1→2)deo	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
quercetina- <i>O</i> -hex-deo	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
quercetina- <i>O</i> -hex-pen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
metoxi-miricetina- <i>O</i> -hex-deo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
quercetina-3- <i>O</i> -hex(1→6)deo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
quercetina-7- <i>O</i> -deo(1→2)hex	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
quercetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
campferol-7- <i>O</i> -hex(1→2)deo	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -hex(1→2)deo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
metoxi-miricetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Cg_F: Folhas de *Couepia grandiflora*; Cg_R: Ramos de *Couepia grandiflora*; Hh_F01: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; Hh_F02: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Hh_R: Ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Lh_F: Folhas de *Licania hoehnei*; Lk_F: Folhas de *Licania kunthiana*; Lhu_F: Folhas de *Licania humilis*; Lhu_R: Ramos de *Licania humilis*; Pe_F: Folhas de *Parinari excelsa*.

Tabela 17 - Continuação

Substâncias	Cg_F	Cg_R	Hh_F01	Hh_F02	Hh_R	Lh_F	Lk_F	Lhu_F	Lhu_R	Pe_F
metoxi-miricetina-3- <i>O</i> -deo(1→2)deo	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
quercetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)deo	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
campferol-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
metoxi-quercetina-3- <i>O</i> -pen(1→2)pen	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -pen(1→2)deo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
metoxi-quercetina-7- <i>O</i> -deo(1→2)deo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
dimetoxi-miricetina-7- <i>O</i> -deo(1→2)deo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Cg_F: Folhas de *Couepia grandiflora*; Cg_R: Ramos de *Couepia grandiflora*; Hh_F01: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; Hh_F02: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Hh_R: Ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Lh_F: Folhas de *Licania hoehnei*; Lk_F: Folhas de *Licania kunthiana*; Lhu_F: Folhas de *Licania humilis*; Lhu_R: Ramos de *Licania humilis*; Pe_F: Folhas de *Parinari excelsa*.

Tabela 17 - Continuação

Substâncias	Cg_F	Cg_R	Hh_F01	Hh_F02	Hh_R	Lh_F	Lk_F	Lhu_F	Lhu_R	Pe_F
Hidroquinona 2TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ácido málico 3TMS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treitol 4TMS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol 4TMS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido piroglutâmico 2TMS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido γ -aminobutírico 3TMS	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Ácido treônico 4TMS	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Ácido trans cinâmico 1TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ácido glutâmico 3TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ácido tartárico 4TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido 4-hidroxi-benzóico 2TMS	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Ribose 1MEOX 4TMS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose 1MEOX 4TMS	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Xilose 1MEOX 4TMS	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ribitol 5TMS		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilitol 5TMS	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Arabitol 5TMS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnose 1MEOX 4TMS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Putrescina 4TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido vanílico 2TMS	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Ononitol 5TMS	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-

Cg_F: Folhas de *Couepia grandiflora*; Cg_R: Ramos de *Couepia grandiflora*; Hh_F01: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; Hh_F02: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Hh_R: Ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Lh_F: Folhas de *Licania hoehnei*; Lk_F: Folhas de *Licania kunthiana*; Lhu_F: Folhas de *Licania humilis*; Lhu_R: Ramos de *Licania humilis*; Pe_F: Folhas de *Parinari excelsa*.

Tabela 17 - Continuação

Substâncias	Cg_F	Cg_R	Hh_F01	Hh_F02	Hh_R	Lh_F	Lk_F	Lhu_F	Lhu_R	Pe_F
Xantina 3TMS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ácido hexadecanóico 1TMS	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Mio-inositol 6TMS	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Ácido úrico 4TMS	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Ácido ferúlico 2TMS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fitol 1TMS MP	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
α,α -trealose 8TMS		+	+	+	-		+	+	+	-
Maltose 1MEOX 8TMS	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Guanosina 5TMS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Melibiose 1MEOX 8TMS	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Isomaltose 1MEOX 8TMS	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Catequina 5TMS	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Epicatequina 5TMS	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Epigallocatequina 6TMS	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Luteolina 4TMS	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Kaempferol 5TMS	-	-	+	-	+	+		+	-	+
α -tocoferol 1TMS	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Rafinose 11TMS	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Quercetina 5TMS	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Estigmasterol 1TMS	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
β -sitosterol 1TMS	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Lanosterol 1TMS	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Ácido oleanólico 2TMS	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Ácido ursólico 2TMS	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+

Cg_F: Folhas de *Couepia grandiflora*; Cg_R: Ramos de *Couepia grandiflora*; Hh_F01: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas no P.E. Serra do Mar; Hh_F02: Folhas de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Hh_R: Ramos de *Hirtella hebeclada* coletadas na E.E. da Juréia; Lh_F: Folhas de *Licania hoehnei*; Lk_F: Folhas de *Licania kunthiana*; Lhu_F: Folhas de *Licania humilis*; Lhu_R: Ramos de *Licania humilis*; Pe_F: Folhas de *Parinari excelsa*.