

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA CAROLINE ZANATTA SILVA

Abordagem multidisciplinar e multicomponente aplicada à
caracterização e desenvolvimento de fitopreparados de
Byrsonima intermedia, *Serjania marginata* e *Terminalia*
catappa



Araraquara
2021

ANA CAROLINE ZANATTA SILVA

Abordagem multidisciplinar e multicomponente aplicada à
caracterização e desenvolvimento de fitopreparados de
Byrsonima intermedia, *Serjania marginata* e *Terminalia*
catappa

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

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Araraquara
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Ana Caroline Zanatta
Abordagem multidisciplinar e multicomponente aplicada à
caracterização e desenvolvimento de fitopreparados de
Byrsonima intermedia, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa* /
Ana Caroline Zanatta Silva. – Araraquara : [s.n.], 2021
202 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Química
Orientador: Wagner Vilegas
Coorientador: Daniel Rinaldo

1. Plantas medicinais. 2. Controle de qualidade.
3. Espectrometria de massa. 4. Química verde.
5. Beta-ciclodextrina. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Abordagem multidisciplinar e multicomponente aplicada à caracterização e desenvolvimento de fitopreparados de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*

AUTORA: ANA CAROLINE ZANATTA SILVA

ORIENTADOR: WAGNER VILEGAS

COORIENTADOR: DANIEL RINALDO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. WAGNER VILEGAS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências - UNESP - São Vicente



Prof. Dra. CLAUDIA MARIA FURLAN (Participação Virtual)
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - USP São Paulo



Prof. Dr. JOÃO HENRIQUE GHILARDI LAGO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC



Prof.ª Dr.ª ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ÁDLEY ANTONINI NEVES DE LIMA (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Centro De Ciências da Saúde - UFRN - Natal

Araraquara, 17 de setembro de 2021

Dados curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Ana Caroline Zanatta Silva

Nome em citações bibliográficas: Silva, A. C. Z.; SILVA, ANA C.Z.; Zanatta, A. C.; Zanatta, Ana C.; Zanatta, Ana Caroline; ZANATTA, A. C.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

08/2016 – 08/2021 **Doutorado em Química**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título da tese: “Abordagem multidisciplinar e multicomponente aplicada à caracterização e desenvolvimento de fitopreparados de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*”

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bolsas:

período 08/2016 – 09/2016: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

período 10/2016 – 11/2017: Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq);

período 12/2017 – 06/2021: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), No. do processo: 2016/21044-4.

03/2014 – 06/2016 **Mestrado em Química**

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título da dissertação: “Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinoccephalus divaricatus* (Körn.) Sano (Eriocaulaceae)”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos.

Bolsas:

período 03/2014 – 05/2014: Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq);

período 06/2014 – 06/2016: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), No. do processo: 2014/04593-9.

03/2009 – 12/2013 **Dupla Licenciatura em Química**

Dupla titulação entre a Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil e Universidade de Coimbra (UC), Coimbra, Portugal

Bolsa no exterior: *período 09/2010 – 07/2012:* Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Licenciaturas Internacionais (PLI).

Prêmio: 3% dos Melhores Estudantes no ano letivo 2011/2012, Universidade de Coimbra.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

01/2020 – 10/2020 Estágio no exterior

University of Strathclyde, Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences (SIPBS), Glasgow, Reino Unido

Título do projeto: “*Metabolomic study of Brazilian plants used in the treatment of chronic diseases*”.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. RuAngelie Edrada-Ebel.

Bolsa: FAPESP – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), No. do processo: 2019/18673-8.

02/2017 – 07/2017 Estágio de docência

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista, São Vicente, SP, Brasil

Curso de Graduação em: Ciências Biológicas – Bacharelado.

Nome da Disciplina: Química.

Carga Horária Total: 60 horas.

Professor Responsável pela Disciplina: Prof. Ari José Scattone Ferreira.

04/2015 – 07/2015 Estágio no exterior

Università degli Studi di Salerno (UniSa), Departamento de Farmácia (DIFARMA), Fisciano, Itália

Título do projeto: “*Metabolite fingerprinting of aerial parts of Actinocephalus divaricatus (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) by LC-ESI-MS*”.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Piacente.

Bolsista: FAPESP – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), No. do processo: 2015/00809-0.

04/2013 – 12/2013 Iniciação científica

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título do projeto: “*Estudo dos extratos de Actinocephalus divaricatus (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) pelo HPLC-PDA*”

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lourdes Campaner dos Santos.

Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), No. do processo: 2013/01227-9.

02/2012 – 07/2012 Estágio Laboratorial

Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Título do projeto: “*Caracterização estrutural de anti-inflamatórios não-esteróides por espectroscopia de infravermelho*”.

Título monografia: “*Análise estrutural e pesquisa de co-cristais de 1,1'-Bi-2-naftol com compostos de interesse farmacêutico*”.

Orientador: Prof. Dr. Mário Túlio dos Santos Rosado.

03/2009 – 07/2010 Iniciação científica
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título do projeto: “Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Pouteria* ssp. (Sapotaceae)”.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas.

Bolsa: *período 08/2009 – 07/2010*: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq.

2007 – 2008 Técnico em Química
Escola Municipal Adelino Bordinon, Matão, SP, Brasil

Prêmio: Melhor aluno do curso de Técnico em Química em 2007-2008, Conselho Regional de Química - IV Região.

Estágio em Instituto de Química - UNESP Araraquara: *período 10/2007 – 12/2008*:

Título do projeto: “Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Pouteria* ssp. (Sapotaceae)”.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

02/2019 – 07/2019 Atividade de docência
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, Brasil

Participou do Programa de Aperfeiçoamento e Apoio à Docência no Ensino Superior – PAADES.

Curso de Graduação em: Licenciatura em Química.

Nome da Disciplina: Química Orgânica II (curso teórico).

Carga Horária Total: 60 horas.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; EDRADA-EBEL, R. UHPLC-(ESI)-HRMS and NMR-based metabolomics approach to access the seasonality of *Byrsonima intermedia* and *Serjania marginata* from Brazilian Cerrado flora diversity. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 534, 2021.

2. ALMEIDA, A. A.; LIMA, G. D.; EITERER, M.; RODRIGUES, L. A.; DO VALE, J. A.; ZANATTA, A. C.; BRESSAN, G. C.; DE OLIVEIRA, L. L.; LEITE, J. P. A Withanolide-rich Fraction of *Athenaea velutina* Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Melanoma B16F10 Cells. **Planta Medica**, 2021.

3. DANTAS-MEDEIROS, R.; **ZANATTA, A. C.**; DE SOUZA, L. B. F. C.; FERNANDES, J. M.; AMORIM-CARMO, B.; TORRES-RÊGO, M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; VILEGAS, W.; ARAÚJO, T. A. S.; MICHEL, S.; GROUGNET, R.; CHAVES, G. M.; ZUCOLOTTI, S. M. Antifungal and Antibiofilm Activities of B-Type Oligomeric Procyanidins From *Commiphora leptophloeos* Used Alone or in Combination With Fluconazole Against *Candida* spp. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 613155, 2021.
4. BORGES, M. S.; **ZANATTA, A. C.**; SOUZA, O. A.; PELISSARI, J. H.; CAMARGO, J. G.; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; BOLZANI, V. S.; RINALDO, D. A green and sustainable method for monitoring the chemical composition of soybean: an alternative for quality control. **Phytochemical Analysis**, p. pca.3006, 2020.
5. DANTAS-MEDEIROS, R.; FURTADO, A. A.; **ZANATTA, A. C.**; TORRES-RÊGO, M.; LOURENÇO, E. M. G.; ALVES, J. S. F.; GALINARI, H. A. O. R.; GUERRA, B. G. C.; VILEGAS, W.; ARAÚJO, A. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ZUCOLOTTI, S. M. Mass spectrometry characterization of *Commiphora leptophloeos* leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113229, 2021.
6. VALERINO-DÍAZ, A. B.; ZANATTA, A. C.; GAMIOTEA-TURRO, D.; CANDIDO, A. C. B. B.; MAGALHÃES, L. G.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. An enquiry into antileishmanial activity and quantitative analysis of polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 191, p. 113635, 2020.
7. SALLES, T. H. C.; VOLPE-ZANUTTO, F.; DE OLIVEIRA SOUSA, I. M.; MACHADO, D.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; LANCELLOTTI, M.; FOGGIO, M. A.; D'ÁVILA, M. A. Electrospun PCL-based nanofibers *Arrabidaea chica* Verlot – *Pterodon pubescens* Benth loaded: synergic effect in fibroblast formation. **Biomedical Materials**, v. 15, n. 6, p. 065001, 2020.
8. DEL ROSARIO, X. T.; CASAO, L.; PINHEIRO, C. G.; SARANDY, M.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; DIAS NOVAES, R.; GONÇALVES, R.V.; LEITE, J. P. V. Croton urucurana Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113042, 2020.
9. ALMEIDA, A. A.; LIMA, G. D.; SIMÃO, M. V.; MOREIRA, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; MACHADO-NEVES, M.; BRESSAN, G. C.; LEITE, J. P. Screening of plants from the Brazilian Atlantic Forest led to the identification of *Athenaea velutina* (Solanaceae) as a novel source of antimetastatic agents. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 3-4, p. 106-121, 2020.
10. OHARA, R.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; **ZANATTA, A. C.**; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; CONSTATINO, F. B.; JUSTULIN, L. A.; HIRUMA-LIMA, C. A. Terminalia catappa L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 256, p. 112793, 2020.
11. DE ALMEIDA, G. V. B.; ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S. O.; PAVAN, E.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; MACHO, A.; MARTINS, D. T. O. Chemical characterization and evaluation of gastric antiulcer properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Virola elongata* (Benth.) Warb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 113-124, 2019.

12. DOS SANTOS, R. D. C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; **ZANATTA, A. C.**; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA M.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1112-1123, 2019.
13. BENTO, C.C.; TANGERINA, M. M. P.; ZANATTA, A. C.; SARTORI, Â. L. B.; FRANCO, D. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; DE ALMEIDA, L. F. R.; SANNOMIYA M. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural product research**, p. 1-5, 2018.
14. VALERINO-DÍAZ, A. B.; GAMIOTEA-TURRO, D.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; GOMES MARTINS, C. H.; DE SOUZA SILVA, T.; RASTRELLI, L.; SANTOS, L. C. New polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaf alcohol tincture with antibacterial activity against oral pathogens. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 66, n. 33, p. 8703-8713, 2018.
15. SOARES, A. M. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROCHA, C. Q.; FERREIRA, A. T. S.; PERALES, J.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; SILVA, C. R.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Myracrodruon urundeuva seed exudates proteome and anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 17, p. 1-12, 2018.
16. **ZANATTA, A. C.**; MARI, A.; MASULLO, M.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W. PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. Chemical metabolome assay by high-resolution Orbitrap mass spectrometry and assessment of associated antitumoral activity of *Actinocephalus divaricatus*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 3, p. 241-250, 2018.
17. COSTA, D. L. M. G.; RINALDO, D.; VARANDA, E. A.; SOUSA, J. F.; NASSER, A. L. M.; **SILVA, A. C. Z.**; BALDOQUI, D. C.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) leaves by HPLC-DAD and the determination of its mutagenic activity. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 10, p. 1103-12, 2014.

Apresentação de trabalho e/ou palestra

• Apresentação de trabalho (comunicação oral)

1. **ZANATTA, A. C.** Molecular Networking as a Tool in Plant Extract Analysis. In: Universidad de la Habana, Havana, Cuba, 2019 (Palestra).
2. **SILVA, A. C.** Estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas e avaliação da atividade antioxidante das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae). In: 54º Congresso Brasileiro de Química, Natal - RN, 2014.

• Apresentação de trabalho (pôster)

1. **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; EDRADA-EBEL, R. UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS and NMR-based metabolomics approach to access the seasonality of *Terminalia catappa* L. from Brazilian biodiversity. In: 16th Annual Conference of the Metabolomics Society, Metabolomics 2020 Online, Online, 2020.

2. **ZANATTA, A. C.**; VIEIRA, N. C.; VILEGAS, W. Molecular networking based-analysis and assessment of total flavonoid content of *Byrsonima intermedia*. In: XXVIII Congress of the Italo-Latinamerican of Ethnomedicine (SILAE), Havana, Cuba, 2019.
3. COSTA, G. M.; LAVEZZO, G. A.; **ZANATTA, A. C.**; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Evaluation of the effect of the solvent on the determination of punicalagin in *T. catappa* leaves using mixtures design. In: 7th Brazilian Conference on Natural Product e XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, Brasil, 2019.
4. LAVEZZO, G. A.; COSTA, G. M.; **ZANATTA, A. C.**; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Development of green method extraction of leaves of *Serjania marginata* Casar. using mixture design. In: 7th Brazilian Conference on Natural Product e XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, Brasil, 2019.
5. **ZANATTA, A. C.**; RUSSO, H. M.; MEDEIROS, R. D.; RINALDO, D.; VILEGAS, W. Perfil químico e screening de atividades biológicas para os extratos de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latino Americano de Farmacobotânica, Petrópolis, Brazil, 2019.
6. BASTOS, R. G.; SALLES, B. C. C.; OLIVEIRA, C. M.; MICHELONI, A. L. C.; SILVA, P. H. C.; SOBRAL, M. E. G.; ROCHA, C. Q.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W.; PAULA, F. B. A.; SILVA, G. A.; SILVA, M. A. Extrato de *Eugenia sonderiana* (Myrtaceae): Fitoquímica e efeitos sobre o estresse oxidativo in vivo em ratos Wistar diabéticos. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latino Americano de Farmacobotânica, Petrópolis, Brasil, 2019.
7. BORGES, M. S.; **ZANATTA, A. C.**; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; RINALDO, D. Novo método de análise de soja por HPLC: uma alternativa de baixo custo e baixo impacto ambiental. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latino Americano de Farmacobotânica, Petrópolis, Brasil, 2019.
7. BRITTO, I. O.; PINHEIRO, C. G.; ALMEIDA, A. A; GONÇALVES, R. G.; SOUZA, M. M. S.; VILEGAS, W.; **ZANATTA, A. C.**; ALVARENGA, A. P.; LEITE, J. P. V. Caracterização química por LC/MS e atividade antioxidante in vivo de extratos etanólicos de casca e látex de *Croton urucurana* Baillon. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latino Americano de Farmacobotânica, Petrópolis, Brazil, 2019.
5. SILVA, M. A.; SILVA, G. A.; PAULA, F. B. A.; BASTOS, R. G.; SALLES, B. C. C.; OLIVEIRA, C. M; SANTOS, L. L.; BINI, I. F.; CASTALDINI, L. P.; SILVA, L. C. D.; VILELA, A. A.; SILVA, G. M.; SOBRAL, M. E. G.; ROCHA, C. Q.; **ZANATTA, A. C.**; VILEGAS, W. Estudo de *Eugenia florida* (Myrtaceae) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos diabéticos crônicos. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latino Americano de Farmacobotânica, Petrópolis, Brazil, 2019.
7. **ZANATTA, A. C.**; BORGES, M. S.; RINALDO, D.; VILEGAS, W. HPLC-PDA green chromatographic method for the standardization of *Serjania marginata* extracts. In: XXVII Congress of the Italo-Latinamerican of Ethnomedicine (SILAE), Milazzo, Itália, 2018.
8. FIGUEIREDO, B.; **ZANATTA, A. C.**; PRATA, L. N.; VILEGAS, W. Perfil químico do extrato das folhas de *Serjania marginata*. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, São Paulo, Brazil, 2018.

9. SANNOMYIA, M.; TINO, R. A.; TANGERINA, M. M. P.; **SILVA, A. C. Z.**; SARTORI, A. L. B.; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L. F. R.; VILEGAS, W. Chemical and allelopathic effects of *Machaerium* extracts. In: 46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly, São Paulo, Brazil, 2017.
10. **SILVA, A. C. Z.**; SANTOS, L. C. Quantificação de flavonoides das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* por HPLC-PAD. In: XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simpósio Latino Americano de Farmacobotânica, Curitiba, Brazil, 2017.
11. MARCONDES, T. H.; TURRO, D. G.; **SILVA, A. C. Z.**; SANTOS, L. C. Avaliação do potencial antirradicalar e determinação do teor de flavonoides totais das frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) coletadas em Havana, Cuba. In: VI Congresso Farmacêutico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016, Araraquara. Suplemento 1-QM-Química. Araraquara: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2016. v.37.
12. SOUZA, T. P.; **SILVA, A. C. Z.**; SANTOS, L. C. Estudo fitoquímico, determinação do teor de fenóis e flavonoides totais e avaliação do potencial antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae) In: VI Congresso Farmacêutico da Unesp e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016, Araraquara. Suplemento 1-QM-Química. Araraquara: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2016. v.37.
13. AMORIM, M. R.; BOTERO, W. B.; **SILVA, A. C. Z.**; ARAUJO, A. R.; CARLOS, I. Z.; SANTOS, L. C. Cytotoxic activities of endophytic fungi extracts from *Paepalanthus planifolius*: A Brazilian evergreen. In: 9th Joint Natural Products Conference, Copenhagen, Denmark, 2016.
14. **SILVA, A. C. Z.**; SANTOS, L. C. Metabolite profiling of the aerial parts of *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) by LC-ESI-MS. In: 5th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM), Atibaia, Brazil, 2015.
15. WYREPKOWSKI, C. C.; SINHORIN, A. P.; **SILVA, A. C. Z.**; COSTA, D. L. G.; SANTOS, L. C. Avaliação da atividade antiradicalar, fenóis e flavonoides totais das cascas do caule de *Caesalpinia férrea*. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, Natal, Brazil, 2014.
16. COSTA, D. L. G.; RINALDO, D.; NASSER, A. L. M.; **SILVA, A. C. Z.**; BALDOQUI, D. C.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of flavonoids from the leaves of *Pouteria torta* (Sapotaceae) by HPLC-PAD. In: 4th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM), Natal, Brazil, 2013.
17. **SILVA, A. C. Z.**; LIMA NETO, J. S.; COSTA, D. L. G.; SANO, P. T.; SANTOS, L. C. Scale up from analytical HPLC to preparative MPLC for the separation of flavonoid from *Actinocephalus divaricatus* leaves. In: 4th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM), Natal, Brazil, 2013.
18. **SILVA, A. C. Z.**; LIMA NETO, J. S.; SANTOS, L. C. Scale-up de HPLC analítico para MPLC preparativo para a separação de flavonoide das folhas de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae). In: XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP e I Fórum Internacional de Iniciação Científica da UNESP, Barra Bonita, Brazil, 2013.

19. **SILVA, A. C. Z.**; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W. Isolamento e identificação de flavonoides de espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) por HPLC-PAD. In: 57ª Jornada Farmacêutica da Unesp, Araraquara, Brazil, 2010.
20. NASSER, A. L. M.; SILVA, A. C. Z.; TOZZO, J. G.; SANTOS, R. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Tamashiro, J. Y.; Vilegas, W. Phenolic compounds obtained by HSCCC from *Pouteria torta* leaves and their antioxidant activity In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2009), Ribeirão Preto, Brazil, 2009.
21. **SILVA, A. C. Z.**; VILEGAS, W.; RODRIGUES, C. M. Predição estrutural de flavonóides baseada em dados de HPLC-PAD. In: 17º Encontro Regional da SBQ - Regional IPWS, Araraquara, Brazil, 2009.
22. **SILVA, A. C. Z.**; BORGES, M. S.; NASSER, A. L. M.; VILEGAS, W. Isolamento e identificação de flavonóides em *Pouteria torta*. In: XXI Congresso de Iniciação Científica, São José do Rio Preto, Brazil, 2009.
23. **SILVA, A. C. Z.**; VILEGAS, W.; NASSER, A. L. M.; SILVA, M. A. Estudo fitoquímico de *Pouteria torta* utilizando cromatografia em contra corrente de alta velocidade. In: XXXVIII Semana da Química, Araraquara, Brazil, 2008.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **SILVA, A. C. Z.**, AMARAL, F. P., SEVERI, J. A. Participação em banca de Émerson Gálio. **Análise de Tintas**, (Técnico em Química) E.M. Adelino Bordignon, Matão – SP, 2009.
2. **SILVA, A. C. Z.**, AMARAL, F. P., SEVERI, J. A. Participação em banca de Genildo Sirineu Tomé. **Extração de metabólitos**, (Técnico em Química) E.M. Adelino Bordignon, Matão – SP, 2009.
3. **SILVA, A. C. Z.**, AMARAL, F. P., SEVERI, J. A. Participação em banca de Matheus dos Santos Alves. **Tintas Emulsionadas**, (Técnico em Química) E.M. Adelino Bordignon, Matão – SP, 2009.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. **16th Annual Conference of the Metabolomics Society – Metabolomics 2020 Online**, Online, 27 a 29 de outubro de 2020. (Conferência)
2. **VII Workshop Etnofarmacologia: Desafios fundamentais**, Cuiabá-MT, Brasil, 18 a 29 de novembro de 2019. Curso “*Utilização da Plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)*”, proferido pelo Dr. Andres Mauricio Caraballo Rodriguez (University of California San Diego), carga horária 32 horas. (Workshop; Curso de curta duração)
3. **XXVIII Congreso Internacional de la Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina**, Havana, Cuba, 16 a 20 de setembro de 2019. (Congresso)
4. **12º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e 17º Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica**, Petrópolis-RJ, Brasil, 07 a 10 de maio de 2019. (Simpósio)

5. **Workshop Bioenergia e Quimiometria**, Araraquara-SP, Brasil, 18 a 20 de fevereiro de 2019. Disciplina “*Calibração multivariada de segunda ordem*”, proferida pelo Prof. Dr. Alejandro Olivieri (Universidad Nacional de Rosario), carga horária 30 horas. (Workshop; Curso de curta duração)
6. **27th Congress of the Italo-Latinamerican Asian & African Society Of Ethnomedicine (SILAE)**, Milazzo, Sicília, Itália, 09 a 13 de setembro de 2018. (Congresso)
7. **XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simpósio Latino-americano de Farmacobotânica**, Curitiba-PR, Brasil, 09 a 11 de agosto de 2017. (Simpósio)
8. **5th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM)**, Atibaia-SP, Brasil, 26 a 29 de outubro de 2015. (Congresso)
9. **54º Congresso Brasileiro de Química**, Natal-RN, Brasil, 03 a 07 de novembro de 2014. (Congresso)
10. **4th Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Brazilian Conference on Systematic and Ecology (RESEM)**, Natal-RN, Brasil, 28 a 31 de outubro de 2013. (Congresso)
11. **XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP e I Fórum Internacional de Iniciação Científica da UNESP**, Barra Bonita-SP, Brasil, 10 a 12 de novembro de 2013. (Congresso)
12. **X Evento de Educação em Química - A Química como Ferramenta Interdisciplinar**, Araraquara-SP, Brasil, 29 a 31 de agosto de 2012. (Outra)
13. **3rd Portuguese Young Chemists Meeting**, Porto, Portugal, 09 a 11 de maio de 2012. (Encontro)
14. **III Congresso de Investigação Criminal - Novas Perspectivas e Desafios**, Figueira da Foz, Portugal, 29 e 30 de março de 2012. (Congresso)
15. **57ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara-SP, Brasil, 21 a 27 de agosto de 2010. (Outra)
16. **XV Encontro Nacional de Ensino de Química**, Brasília-DF, Brasil, 21 a 24 de julho de 2010. (Encontro)
17. **XXI Congresso de Iniciação Científica**, São José do Rio Preto-SP, 03 a 07 de novembro de 2009. (Congresso)
18. **17º Encontro Regional da SBQ - Regional IPWS**, Araraquara-SP, Brasil, 18 a 20 de outubro de 2009. (Encontro)
19. **XXXIX Semana da Química**, Araraquara-SP, Brasil, 18 a 23 de outubro de 2009. (Outra)
20. **VII Evento de Educação em Química - Materiais Didáticos: Suas Aplicações**, Araraquara-SP, Brasil, 27 a 30 de agosto de 2009. (Outra)
21. **XXXVIII Semana da Química**, Araraquara-SP, Brasil, 05 a 10 de outubro de 2008. (Outra)

22. **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**, Araraquara-SP, Brasil, 08 a 12 de julho de 2008. (Simpósio)

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

1. **SILVA, A. C. Z. et al.** VIII Evento de Educação em Química - Os Instrumentos de Avaliação no Ensino de Química, Araraquara – SP, 2010.

2. **SILVA, A. C. Z. et al.** XXXIX Semana da Química, Araraquara – SP, 2009.

SUPERVISÃO CIENTÍFICA

Iniciação científica

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, SP, Brasil

Título do projeto: Estudo das frações polares de *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) por HPLC-PDA.

Aluna: Thais Pezza (Graduanda em Bacharel em Química, Instituto de Química - UNESP Araraquara).

Bolsista: PIBIC/CNPq Pró-reitoria; período: agosto/2015 a dezembro/2016.

Título do projeto: Desenvolvimento tecnológico do extrato vegetal das folhas de *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae)

Aluna: Gabriela Aparecida Lavezzo (Graduanda em Licenciatura em Química, Instituto de Química - UNESP Araraquara).

Bolsista: Não bolsista; período: janeiro/2019 a dezembro/2019.

Título do projeto: Estudo fitoquímico do extrato hidroalcóolico das folhas de *Serjania marginata*

Aluna: Gisla Maria Costa (Graduanda em Licenciatura em Química, Instituto de Química - UNESP Araraquara).

Bolsista: Não bolsista; período: janeiro/2019 a dezembro/2019.

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente, SP, Brasil

Título do projeto: *Serjania marginata*: isolamento de substâncias marcadoras e desenvolvimento de um fitopreparado

Aluna: Luciana Nogueira Prata (Graduanda em Biomedicina, Universidade Paulista – UNIP Santos).

Bolsista: PIBIC/CNPq; período: agosto/2017 a janeiro/2018.

Aluna: Bruna Figueiredo Daniel (Graduanda em Biomedicina, Universidade Paulista – UNIP Santos).

Bolsista: PIBIC/CNPq, período: janeiro/2018 a agosto/2018.

Dedico este trabalho a todas aquelas pessoas que me apoiaram e encorajaram durante todo o meu caminho até aqui, em especial a meus pais, família, amigos e aos professores Wagner e Lourdes.

Agradecimentos

À UNESP e ao Instituto de Química (UNESP Araraquara) e ao Instituto de Biociências (UNESP São Vicente) pela oportunidade de realizar o meu Doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Vilegas, pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante todos esses anos. Muito obrigada por me inspirar e me mostrar a beleza dos produtos naturais! Ao meu co-orientador Prof. Dr. Daniel Rinaldo por toda a ajuda e ensinamento durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora de coração Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos pela amizade, confiança, por acreditar sempre em mim e por me incentivar sempre.

Ao Jardim Botânico Municipal de Bauru pela autorização concedida para a realização das coletas de *Byrsonima intermedia* e à Dra. Viviane Camila de Oliveira por todo auxílio e identificação botânica.

À Maiara Borges por ter me ajudado nas coletas no Jardim Botânico e nas análises de quimiometria e à Natália Vieira por toda a ajuda nas análises de espectrometria de massas; agradeço a vocês principalmente pela amizade e por todo apoio e incentivo em todos os momentos.

À Silvia Heredia Vieira por toda ajuda nas coletas da espécie *Serjania marginata* e a Profa. Dra. Maria José do Carmo pela identificação botânica.

À Carol Costa por ter me ajudado nas coletas na orla de Santos, por toda troca de conhecimento, por ter me ensinado tanto sobre a Biologia e principalmente por todo seu apoio, incentivo e sua incrível amizade.

À Camila Cunha pela sua amizade e por ter sido extremamente solícita sempre que precisei. Aos meus amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais – LBPN (UNESP São Vicente). Agradeço em especial ao Douglas e ao Marcelo pelo acolhimento, pela colaboração, pela amizade, pelas risadas e pelas trocas de conhecimento.

À pesquisadora Cris Hardoim pela amizade, conselhos, convivência e colaboração.

Às meninas Bruna, Gabriela, Gislá e Luciana pelo trabalho de iniciação científica.

Aos amigos do Departamento de Orgânica (UNESP Araraquara) pela amizade e convivência, em especial ao Wesley, Alexander, Daylin, Tony, Maria, Isabela, Tiago, Rafael, Marcus e Helena pelo companheirismo e ajuda.

Ao meu grande amigo Renato Dantas, pela constante colaboração e por sempre me ajudar em todos os momentos.

Ao grupo da *University of Strathclyde*, Dana, Flore, Ignacio, Katharina e Saif pela amizade, acolhida e convivência.

À Profa. Dra. RuAngelie Edrada-Ebel pela oportunidade, por ter me recebido em seu grupo de uma maneira tão acolhedora e pela sua gentileza em compartilhar seus conhecimentos.

Aos amigos, professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica, em especial ao Professor Ian Castro-Gamboa por ter me recebido tão gentilmente em seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade e pelas análises de RMN.

Às funcionárias da biblioteca e da pós-graduação pela dedicação, competência e por serem sempre tão prestativas.

Aos funcionários do Instituto de Química da UNESP de Araraquara e do Instituto de Biociências da UNESP de São Vicente que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho. Em especial à Zilá (UNESP São Vicente) pela sua amizade, caronas e por ter sempre me socorrido nas prestações de contas.

Ao Prof. Dr. Adley Lima e ao aluno de Doutorado Renato Dantas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN Natal) pela colaboração no desenvolvimento da pré-formulação dos extratos com as ciclodextrinas.

Ao Prof. Dr. Flavio Junior Caires (Faculdade de Ciências – UNESP Bauru) e ao aluno Bruno Ekawa (Instituto de Química – UNESP Araraquara) pela colaboração nas análises de caracterização dos sistemas complexos.

À CAPES e ao CNPq através dos financiamentos de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas no país, processo nº 2016/21044-4 e no exterior (BEPE) processo nº 2019/18673-8.

*“Não tenha medo de pensar diferente dos outros,
tenha medo de pensar igual e descobrir que
todos estão errados!”*

(Eça de Queiroz)

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo dos extratos das plantas medicinais *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) e *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) a fim de permitir o desenvolvimento e caracterização de fitopreparações que possam ser utilizadas no tratamento de doenças crônicas. Para isso, foi fundamental aprofundar o conhecimento da composição química, avaliar a sazonalidade, aperfeiçoar os métodos analíticos para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e desenvolver complexos de inclusão para a incorporação dos extratos. No estudo da sazonalidade, os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-ESI-MS/MS). As amostras foram coletadas bimestralmente durante os períodos do verão, outono, inverno e primavera. Os dados de HPLC-MS/MS foram analisados na plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), que permitiu a anotação de 39 substâncias nos extratos de *B. intermedia*, 38 substâncias nos extratos de *S. marginata* e 42 substâncias nos extratos de *T. catappa*. Os agrupamentos das amostras nas redes moleculares mostraram que os fatores sazonais desempenharam um papel importante na produção de metabólitos em cada espécie vegetal, sendo as condições de temperatura, seca e radiação solar os principais fatores que afetaram a variabilidade das substâncias em cada espécie. O conteúdo de flavonoides totais, capacidade antioxidante e antiglicante também foram determinados para ajudar a estudar a variabilidade química sazonal dessas espécies. A fim de contribuir para a sustentabilidade ambiental, para a padronização do extrato de *S. marginata* foi desenvolvido um método cromatográfico verde por HPLC-PDA utilizando apenas etanol e água como solventes, seguindo um planejamento fatorial fracionário na triagem das variáveis e aplicando a matriz de Doehlert foi utilizada no procedimento de otimização. O método verde desenvolvido foi comparado com o método da literatura, e o desempenho cromatográfico e o impacto ambiental de ambos foram avaliados por meio de métricas, como GCFR (*Green Chromatographic Fingerprinting Response*), HPLC-EAT (EAT - *Environmental Assesment Tool*) e AGREE (*Analytical GREENness metric*). O método foi validado através da avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e robustez. A padronização do extrato foi realizada pela quantificação do ácido protocatecuico e derivados de (+)-catequina, (-)-epicatequina e apigenina. O método desenvolvido foi preciso e robusto e combinado com os princípios que regem a Química Verde foi considerado ambientalmente amigável. Finalmente, para conferir melhorias nas propriedades químicas e biológicas dos ingredientes ativos dos extratos, investigamos a complexação de cada um deles com β -ciclodextrina por mistura física e malaxagem. A caracterização dessas amostras por espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e ressonância magnética nuclear, permitiu propor a complexação parcial dos metabólitos dos extratos na cavidade da β -ciclodextrina. Assim, este estudo traz novas informações sobre o potencial dos extratos de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* contribuindo para aperfeiçoar o controle químico de qualidade do material vegetal, para aumentar seu potencial de aplicação como um futuro fitoterápico e colaborando para a implementação de marchas analíticas ambientalmente mais amigáveis.

Palavras-chave: *Byrsonima intermedia*; *Serjania marginata*; *Terminalia catappa*; metabolômica; química verde; complexos de inclusão.

ABSTRACT

This work describes the study of the extracts of the medicinal plants *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) and *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) in order to allow the development and characterization of phytopreparations that can be used in the treatment of chronic diseases. For this, it was fundamental to deepen the knowledge of the chemical composition, to evaluate the seasonality, to improve the analytical methods for the quality control of the vegetal raw material and to develop inclusion complexes for the incorporation of the extracts. In the seasonality study, the extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). The samples were collected bimonthly during the summer, autumn, winter and spring periods. The HPLC-MS/MS data were analyzed in the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) platform, which allowed the annotation of 39 compounds in *B. intermedia* extracts, 38 compounds in *S. marginata* extracts and 42 compounds in *T. catappa* extracts. The clustering of the samples in the molecular networks showed that seasonal factors played an important role in the production of metabolites in each plant species, with temperature, drought and solar radiation conditions being the main factors that affected the variability of substances in each species. The content of total flavonoids, antioxidant and antiglycant capacity were also determined to help study the seasonal chemical variability of these species. In order to contribute to environmental sustainability, for the standardization of *S. marginata* extract, a green chromatographic method by HPLC-PDA was developed using only ethanol and water as solvents, following a fractional factorial planning in the screening of variables and applying Doehlert matrix was used in the optimization procedure. The developed green method was compared with the literature method, and the chromatographic performance and environmental impact of both were evaluated using metrics, such as GCFR (Green Chromatographic Fingerprinting Response), HPLC-EAT (EAT - Environmental Assessment Tool) and AGREE (Analytical GREENness metric). The method was validated through the evaluation of the parameters of selectivity, linearity, detection and quantification limits, precision and robustness. The standardization of the extract was performed by quantification of protocatechuic acid and (+)-catechin, (-)-epicatechin and apigenin derivatives. The developed method was accurate and robust and combined with the principles of Green Chemistry was found to be environmentally friendly. Finally, to confer improvements in the chemical and biological properties of the active ingredients of the extracts, we investigated the complexation of each of them with β -cyclodextrin by physical mixing and malaxation. The characterization of these samples by spectroscopy in the infrared region, thermal analysis, X-ray diffraction, scanning electron microscopy and nuclear magnetic resonance, allowed to propose the partial complexation of the metabolites of the extracts in the cavity of β -cyclodextrin. Thus, this study brings new information about the potential of the extracts of *B. intermedia*, *S. marginata* and *T. catappa* contributing to improve the chemical quality control of the vegetal material, to increase its potential of application as a future phytomedicine and collaborating to the implementation of more environmentally friendly analytical methods.

Key words: *Byrsonima intermedia*; *Serjania marginata*; *Terminalia catappa*; metabolomics, green chemistry; inclusion complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhes das espécies de estudo: (A) <i>Byrsonima intermedia</i> ; (B) <i>Serjania marginata</i> ; (C) <i>Terminalia catappa</i>	29
Figura 2 - Exemplos de alguns metabólitos encontrados nas espécies <i>Byrsonima intermedia</i> , <i>Serjania marginata</i> e <i>Terminalia catappa</i>	31
Figura 3 - Estrutura química da β -ciclodextrina (BCD) (A) e forma de cone truncado da BCD (B)....	39
Figura 4 - Cromatogramas do pico base por HPLC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de <i>Byrsonima intermedia</i>	62
Figura 5 - Cromatogramas do pico base por LC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de <i>Serjania marginata</i>	63
Figura 6 - Cromatogramas do pico base por LC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de <i>Terminalia catappa</i>	63
Figura 7 - Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os extratos de <i>Byrsonima intermedia</i>	65
Figura 8 - Representação de parte do <i>cluster</i> para os flavonoides glicosilados em <i>Byrsonima intermedia</i> e espectros de massas MS/MS	67
Figura 9 - Representação dos <i>clusters</i> para os flavonoides glicosilados com substituição do grupo galoil em <i>Byrsonima intermedia</i> e espectros de massas MS/MS	68
Figura 10 - Representação dos <i>clusters</i> para as proantocianidinas e os derivados galato em <i>Byrsonima intermedia</i> e espectros de massas MS/MS	70
Figura 11 - Representação dos <i>clusters</i> para os ésteres de galato do ácido quínico em <i>Byrsonima intermedia</i> e espectros de massas MS/MS	72
Figura 12 - Representação de parte do <i>cluster</i> para os ésteres do ácido galoil e coumaroil em <i>Byrsonima intermedia</i> e espectros de massas MS/MS	73
Figura 13 - Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os extratos de <i>Serjania marginata</i>	77
Figura 14 - Representação do <i>cluster</i> para flavonoides glicosilados em <i>Serjania marginata</i> . (A) flavonas di-C-glicosiladas; (B) flavonóis e flavonas contendo pelo menos um açúcar hexose e (C) flavonóis e flavonas contendo pelo menos um açúcar deoxihexose	78
Figura 15 - Espectros de massas MS/MS representativos do cluster dos flavonoides glicosilados em <i>Serjania marginata</i> . (A) flavonoides di-C-glicosilados (fragmentação cruzada do glicosídeo e eliminação de água); (B) flavonoides contendo pelo menos um açúcar hexose (perdas de 162 Da) e (C) flavonoides contendo pelo menos um açúcar deoxihexose (perdas de 146 Da)	79
Figura 16 - Mecanismo de fragmentação de perda de molécula de água em flavonoides C-glicosilados e representação do equilíbrio ceto-enólico	80
Figura 17 - Ampliação dos espectros de segunda ordem na região de m/z 200-400 para os íons precursores de flavonoides C,O-diglicosilados.....	81
Figura 18 - Representação do <i>cluster</i> para as proantocianidinas em <i>Serjania marginata</i> e espectros de massas MS/MS	83
Figura 19 - Representação do <i>cluster</i> para as saponinas em <i>Serjania marginata</i> e espectros de massas MS/MS	85
Figura 20 - Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os extratos de <i>Terminalia catappa</i>	89
Figura 21 - Representação de parte do <i>cluster</i> para os galotaninos e elagitaninos em <i>Terminalia catappa</i> e espectros de massas MS/MS.....	92
Figura 22 - Representação do <i>cluster</i> para flavonas C-glicosiladas em <i>Terminalia catappa</i> e espectros de massas MS/MS. (A) apigenina-8-C-hexose (B) apigenina-6-C-hexose (C) luteolina-8-C-hexose (D) luteolina-6-C-hexose	94
Figura 23 - Representação do <i>cluster</i> para flavonas C-glicosiladas e O-galoil flavonas em <i>Terminalia catappa</i> e espectros de massas MS/MS.....	95

Figura 24 - Curva para o padrão quercetina	104
Figura 25 - Teores de flavonoides expressos em mg g ⁻¹ de quercetina nos extratos de <i>Byrsonima intermedia</i> , <i>Serjania marginata</i> e <i>Terminalia catappa</i>	105
Figura 26 - Capacidade antioxidante (ensaio DPPH [•] , ABTS ^{•+} , ROO [•]) dos extratos de (A) <i>Byrsonima intermedia</i> , (B) <i>Serjania marginata</i> e (C) <i>Terminalia catappa</i>	107
Figura 27 - Porcentagem de inibição dos extratos de <i>Byrsonima intermedia</i> , <i>Serjania marginata</i> e <i>Terminalia catappa</i> na formação de produtos avançados de glicação (AGEs).....	110
Figura 28 - Gráfico de Pareto dos principais efeitos obtidos para o planejamento fracionário (2 ^v ⁷⁻²) para (A) número de bandas e (B) GCFR.....	115
Figura 29 - Valores preditos <i>versus</i> valores observados para as respostas (a) e (b).....	119
Figura 30 - Superfície de resposta para o modelo otimizado que representa o número de picos (n) (A) e GCFR (B) em função da vazão (mL min ⁻¹), % final de EtOH e tempo de análise (min).....	120
Figura 31 - Perfis para os valores previstos e de desejabilidade para as respostas número de bandas cromatográficas (a) e GCFR (b) considerando: (A) o valor <i>D</i> ótimo e (B) os níveis de ajuste especificados pelo usuário para a % final de EtOH (X ₅).....	123
Figura 32 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA utilizando o método otimizado verde na análise do extrato etanólico 70% das folhas de <i>Serjania marginata</i> . (A) Cromatograma em λ = 270 nm. (B) Espectro de absorção UV: banda 1, ácido fenólico; bandas 2 a 10, derivados de catequina/epicatequina; bandas 11 e 13, derivados de flavonóis; bandas 12, 14, 15 a 23, derivados de flavonas; bandas 24 a 28, não identificado.....	125
Figura 33 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA do extrato etanólico 70% das folhas de <i>Serjania marginata</i> . (A) Cromatograma em λ = 270 nm, de acordo com o método de referência desenvolvido por VIEIRA (2014). (B) Espectro de absorção UV: picos 1 a 9, derivados de catequina/epicatequina; 10, derivados de flavonas; estão abaixo do limite de detecção	126
Figura 34 - Gráfico pictograma gráfico da análise pela métrica AGREE para o (A) método verde otimizado e para o (B) método da literatura.....	128
Figura 35 - Espectros no infravermelho para: (A) extrato hidroetanólico das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (BIEH), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL); (B) extrato hidroetanólico das folhas de <i>Serjania marginata</i> (SMEH), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL); (C) extrato etanólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (TCEE), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)	141
Figura 36 - Curvas TG-DSC simultâneas para: (A) amostras de <i>Byrsonima intermedia</i> ; (B) amostras de <i>Serjania marginata</i> e (C) amostras de <i>Terminalia catappa</i> . (I) extrato, (II) β-ciclodextrina e os complexos obtidos por (III) MF e (IV) MAL.....	143
Figura 37 - Difrátogramas de raios X para: (A) extrato hidroetanólico das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (BIEH), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL); (B) extrato hidroetanólico das folhas de <i>Serjania marginata</i> (SMEH), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL); (C) extrato etanólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (TCEE), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)	145
Figura 38 - Eletromicrografias das superfícies extrato hidroetanólico das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (BIEH), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos entre BIEH e BCD. (A) BIEH (200x); (B) BIEH (1000x); (C) BCD (200x); (D) BCD (1000x); (E) complexo BCD-BIEH por MF (200x); (F) complexo BCD-BIEH por MF (1000x); (G) complexo BCD-BIEH por MAL (200x); (H) complexo BCD-BIEH por MAL (1000x)	147
Figura 39 - Eletromicrografias das superfícies extrato hidroetanólico das folhas de <i>Serjania marginata</i> (SMEH), β-ciclodextrina (BCD) e os complexos entre SMEH e BCD. (A) SMEH (200x); (B) SMEH (1000x); (C) BCD (200x); (D) BCD (1000x); (E) complexo BCD-SMEH por MF (200x); (F) complexo BCD-SMEH por MF (1000x); (G) complexo BCD-SMEH por MAL (200x); (H) complexo BCD-SMEH por MAL (1000x)	148

Figura 40 - Eletromicrografias das superfícies extrato etanólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos entre TCEE e BCD. (A) TCEE (200x); (B) TCEE (1000x); (C) BCD (200x); (D) BCD (1000x); (E) complexo BCD-TCEE por MF (200x); (F) complexo BCD-TCEE por MF (1000x); (G) complexo BCD-TCEE por MAL (200x); (H) complexo BCD-TCEE por MAL (1000x).....	149
Figura 41 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (BIEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL).....	151
Figura 42 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Serjania marginata</i> (SMEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL).....	152
Figura 43 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) do extrato etanólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL).....	153
Figura 44 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) com expansão na região de δ 5,85-8,00 para o extrato hidroetanólico das folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> (BIEH) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL).....	156
Figura 45 – Estruturas das substâncias fenólicas identificadas no extrato hidroetanólico de <i>Byrsonima intermedia</i> . (A) derivados de quercetina; (B) derivados de catequina; (C) derivados do ácido gálico (ésteres galato).....	157
Figura 46 - Representação do possível mecanismo de interação para a inclusão de derivados de quercetina glicosilados presentes nos extratos de <i>Byrsonima intermedia</i> na cavidade da BCD.....	158
Figura 47 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) com expansão na região de δ_{H} 6,00 a δ_{H} 9,00 para o extrato hidroetanólico das folhas de <i>Serjania marginata</i> (SMEH) e os complexos de obtidos por MF (SMEH -MF) e MAL (SMEH -MAL).....	160
Figura 48 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) com expansão na região de δ_{H} 6,00 a δ_{H} 8,50 para o extrato hidroetanólico das folhas de <i>Terminalia catappa</i> (TCEE) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL).....	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química e atividade biológica das folhas das espécies <i>Byrsonima intermedia</i> , <i>Serjania marginata</i> e <i>Terminalia catappa</i>	32
Tabela 2 - Período de coleta das espécies vegetais estudadas	44
Tabela 3 - Fatores e níveis investigados no planejamento fracionário	51
Tabela 4 - Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método otimizado	56
Tabela 5 - Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez do método otimizado pelo teste de Youden	56
Tabela 6 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de <i>Byrsonima intermedia</i> , através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas	74
Tabela 7 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de <i>Serjania marginata</i> , através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas	86
Tabela 8 - Proposta de identificação dos principais metabólitos do extrato etanólico de <i>Terminalia catappa</i> , através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas	96
Tabela 9 - Características climáticas para Bauru-SP no ano de 2017: temperatura média, radiação solar, umidade do ar e precipitação	99
Tabela 10 - Características climáticas para Dourados-MS no ano de 2017: temperatura média, radiação solar, umidade do ar e precipitação	100
Tabela 11 - Características climáticas para Santos-SP no ano de 2017: temperatura média, radiação solar, umidade do ar e precipitação	100
Tabela 12 - Teores de flavonoides expressos em mg g ⁻¹ de quercetina nos extratos de <i>Byrsonima intermedia</i> , <i>Serjania marginata</i> e <i>Terminalia catappa</i>	104
Tabela 13 - Capacidade antioxidante (ensaios DPPH [•] , ABTS ^{•+} , ROO [•]) dos extratos de <i>Byrsonima intermedia</i> , <i>Serjania marginata</i> e <i>Terminalia catappa</i> e dos padrões quercetina e ácido gálico	106
Tabela 14 - Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores (2 ^{v⁷⁻²}) e as respostas obtidas para cada análise	113
Tabela 15 - Variáveis e as respostas obtidas para cada análise de acordo com o modelo Doehlert....	117
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo representando a resposta número de bandas cromatográficas (a) de acordo com o planejamento Doehlert	118
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo representando a resposta GCFR de acordo com o planejamento Doehlert	118
Tabela 18 - Critérios avaliados e classificação para o método verde otimizado e o método da literatura pelo software AGREE	129
Tabela 19 - Valores de escores obtidos nas métricas verdes para a avaliação dos impactos dos procedimentos analíticos	130
Tabela 20 - Curvas de calibração, faixa linear, dados LD e LQ, para os padrões de referência determinados por HPLC-PDA	131
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão linear para os padrões de referência	132
Tabela 22 - Resultados de robustez do método para tempo de retenção (<i>t_r</i>) e área de pico (A)	133
Tabela 23 - Teores para o ácido protocatecuico e derivados de catequina, epicatequina e apigenina no extrato hidroetanólico das folhas de <i>S. marginata</i>	135
Tabela 24 - Percentuais de retenção no tamis para determinação da granulometria dos pós vegetais	138
Tabela 25 - Quantidade obtida dos extratos preparados das espécies vegetais	138
Tabela 26 - Deslocamentos químicos dos ¹ H da β-ciclodextrina (BCD) e a diferença nos complexos para <i>Byrsonima intermedia</i> obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL)	154
Tabela 27 - Deslocamentos químicos dos ¹ H da β-ciclodextrina (BCD) e a diferença nos complexos para <i>Serjania marginata</i> obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL)	154

Tabela 28 - Deslocamentos químicos dos ^1H da β -ciclodextrina (BCD) e a diferença nos complexos para <i>Terminalia catappa</i> obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)	155
Tabela 29 - Deslocamentos químicos dos ^1H aromáticos dos metabólitos de interesse no extrato hidrotetanólico de <i>Byrsonima intermedia</i> (BIEH) e a diferença nos complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL).....	157

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGREE	<i>Analytical GREENness metric</i> (Métrica de Analítica Verde)
BCD	β -ciclodextrina
d.i.	Diâmetro interno
EAT	<i>Environmental Assesment Tool</i> (Ferramenta de avaliação ambiental)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por <i>electrospray</i>)
EtOH	Etanol
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprinting Response</i> (Resposta de Impressão Digital Cromatográfica Verde)
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
kJ/m^2	Quilojoule por metro quadrado (intensidade de radiação, quantidade de energia radiante por unidade de área)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-PDA	<i>High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
MAL	Malaxagem
m/z	Relação massa carga
MeOH	Metanol
MF	Mistura física
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
Ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
®	Marca registrada
SPE	<i>Solid Fase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 As espécies vegetais de estudo	28
1.2 Padronização de extratos vegetais	32
2 OBJETIVOS	40
3 PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1 Materiais, reagentes e soluções	41
3.2 Instrumentação e procedimentos gerais.....	41
3.3 Metodologia.....	44
3.3.1 PARTE A: Estudo sazonal das espécies vegetais.....	44
3.3.1.1 Coletas do material vegetal	44
3.3.1.2 Preparação dos extratos vegetais.....	45
3.3.1.3 Dados meteorológicos	45
3.3.1.4 Análises LC-MS e MS/MS.....	45
3.3.1.5 Processamento dos dados e construção das redes moleculares (molecular networking)	46
3.3.1.6 Determinação do teor de flavonoides totais	47
3.3.1.7 Avaliação da capacidade antioxidante.....	47
3.3.1.8 Avaliação da atividade antiglicante.....	49
3.3.2 PARTE B: Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato de <i>S. marginata</i> usando princípios da Química Verde	49
3.3.2.1 Obtenção e preparo da amostra	50
3.3.2.2 Análises por HPLC-PDA	50
3.3.2.3 Triagem e otimização do método cromatográfico verde	51
3.3.2.4 Métrica para o método cromatográfico verde	54
3.3.2.5 Validação do método cromatográfico verde.....	54
3.3.2.6 Análises por UFLC-ESI-IT-MS e MS/MS.....	57
3.3.3 PARTE C: Desenvolvimento de complexos com ciclodextrina.....	57
3.3.3.1 Determinação da granulometria dos pós vegetais	57
3.3.3.2 Preparação dos extratos	58
3.3.3.3 Preparação dos sistemas complexos.....	58
3.3.3.4 Análises de caracterização dos extratos vegetais e complexos sólidos	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
4.1 PARTE A: Estudo sazonal das espécies vegetais.....	61
4.1.1 Anotação do perfil de metabólitos por espectrometria de massas.....	61
4.1.1.1 Análise da rede molecular para <i>B. intermedia</i>	64
4.1.1.2 Análise da rede molecular para <i>S. marginata</i>	76
4.1.1.3 Análise da rede molecular para <i>T. catappa</i>	88
4.1.2 Avaliação da composição química e sazonalidade com base na análise das redes moleculares	98
4.1.3 Determinação do teor de flavonoides totais	103
4.1.4 Avaliação das atividades antioxidantes	105
4.1.5 Avaliação da atividade antiglicante	109
4.2 PARTE B: Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato de <i>S. marginata</i> usando princípios da Química Verde	111

4.2.1 Triagem das variáveis.....	111
4.2.2 Otimização do método cromatográfico	116
4.2.3 Função desejabilidade.....	120
4.2.4 Avaliação do desempenho e do impacto ambiental do método desenvolvido	126
4.2.5 Validação do método otimizado	131
4.2.6 Aplicação do método otimizado na análise qualitativa e quantitativa de <i>S. marginata</i>	134
4.3 PARTE C: Desenvolvimento de pré-formulações com ciclodextrina.....	136
4.3.1 Determinação granulométrica dos pós vegetais e rendimento de extração	137
4.3.2 Caracterização dos extratos vegetais e complexos sólidos.....	138
4.3.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	139
4.3.2.2 Termogravimetria simultânea e calorimetria de varredura diferencial (TG-DSC)	142
4.3.2.3 Difração de Raio X (DRX).....	144
4.3.2.4 Microscopia de varredura eletrônica (MEV).....	146
4.3.2.5 Análise ¹ H-RMN	150
5 CONCLUSÕES.....	162

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais derivados do metabolismo secundário vegetal têm desempenhado um papel essencialmente importante no tratamento de doenças e enfermidades ao longo da história de vida dos seres humanos. Por milênios, as plantas medicinais têm sido uma fonte valiosa de agentes terapêuticos, e os progressos na terapêutica moderna tem estimulado o uso de produtos naturais em todo o mundo (CRAGG; NEWMAN, 2013; KATZ; BALTZ, 2016).

A diversidade de estruturas moleculares e a capacidade de a natureza fornecer moléculas de complexidades estruturais dificilmente imaginadas ou elaboradas por síntese é o resultado de vias biossintéticas diferentes que estão envolvidas na produção dos metabólitos secundários de uma planta, e o que também leva esses metabolitos a exibir vasta gama de atividades biológicas (BERNARDINI *et al.*, 2018; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

A produção de metabólitos secundários por plantas é caracterizada pela individualidade da espécie vegetal e é considerada uma resposta adaptativa essencialmente relevante em termos de lidar com estímulos ambientais e/ou externos aos quais as plantas estão expostas (GHORBANPOUR; VARMA, 2017). Além disso, esses metabólitos desempenham um papel fundamental na regulação do crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas, bem como na mediação das interações planta-ambiente, incluindo a proteção contra várias condições de mudança ambiental estressantes e desafiadoras (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020; ISAH, 2019; PANDEY; SENTHIL-KUMAR, 2019; RAI; SAITO; YAMAZAKI, 2017).

Nas últimas décadas, tem havido um interesse científico cada vez maior em obter um entendimento abrangente a respeito das mudanças no metabolismo secundário vegetal, e um número considerável de estudos tem sido conduzido com o objetivo de investigar os efeitos das mudanças nos fatores ambientais (por exemplo, temperatura, mudança climática, precipitação, seca, salinidade, radiação UV, luz e umidade) e sazonalidade (de acordo com as estações do ano) na biossíntese e acúmulo de metabólitos especializados em plantas medicinais (BERINI *et al.*, 2018; SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016; YANG *et al.*, 2018).

Devido a vários fatores, o teor de metabólitos secundários pode variar qualitativa e/ou quantitativamente nas espécies de plantas. Como muitos desses metabólitos são princípios ativos, essa variação pode eventualmente alterar a resposta terapêutica da planta medicinal quando aplicada para fins farmacológicos específicos. Em vista disso, estudar os efeitos de fatores que podem determinar ou modificar a concentração dessas substâncias nas plantas, tais como condições de cultivo e/ou coleta, estação e hora do dia, é extremamente importante caso se pretenda obter produtos de boa qualidade à base de plantas com concentrações desejáveis de

princípios ativos (KUNLE; EGHAREVBA; AHMADU, 2012; LIEBELT; JORDAN; DOHERTY, 2019).

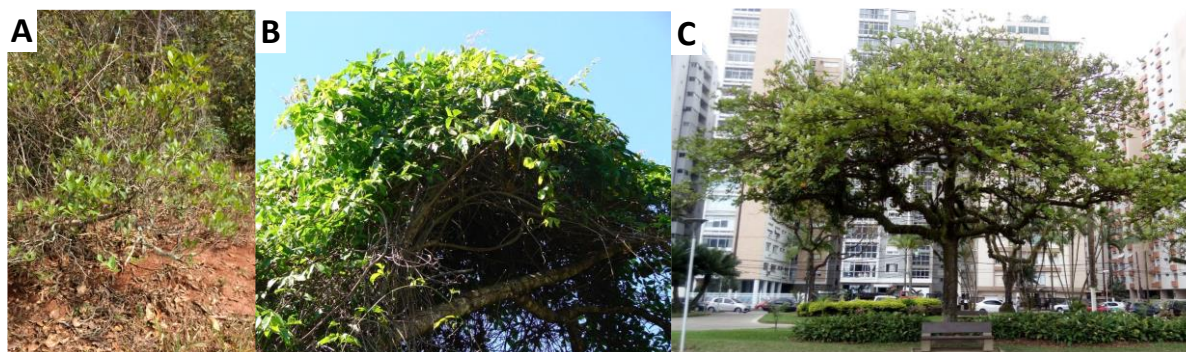
1.1 As espécies vegetais de estudo

Dentro do contexto do trabalho realizado pelo grupo nos últimos anos em pesquisas desenvolvidas nos projetos temáticos do programa Biota/FAPESP: (I) “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: Prospecção químico-farmacológica de plantas superiores” e (II) “Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas”, foi possível selecionar algumas espécies para a continuidade dos estudos com vistas à obtenção de fitopreparados padronizados, de forma a complementar as opções de tratamento a partir de plantas medicinais, para além daquelas disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

As espécies foram selecionadas segundo os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde: ampla distribuição geográfica, disponibilidade atual, facilidade de cultivo, produtividade e identificação botânica, baixa toxicidade, baixa incidência de efeitos colaterais, caracterização química qualitativa e quantitativa e propriedades terapêuticas cientificamente avaliadas (BRASIL, 2006b). Assim para o desenvolvimento desse trabalho, foram selecionadas as espécies *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae), *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) e *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) (Figura 1) que apresentam características etnofarmacológicas similares e se mostraram promissoras para aplicação futura de fitoterapia para o tratamento de doenças inflamatórias.

Os extratos alcóolicos obtidos das folhas de cada uma dessas espécies demonstraram potencial efeito gastroprotetor (ARRUDA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2019; OHARA *et al.*, 2020; PÉRICO *et al.*, 2015; PINHEIRO SILVA *et al.*, 2015), anti-inflamatório (MOREIRA *et al.*, 2011; SALINAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2017), antioxidante (CHYAU; KO; MAU, 2006; GUILHON-SIMPLICIO *et al.*, 2017; HEREDIA-VIEIRA *et al.*, 2015), analgésico (DI STASI *et al.*, 1988; HAÏDARA *et al.*, 2020; VERDAM *et al.*, 2017) e ausência de toxicidade nos modelos agudos avaliados (DOS SANTOS *et al.*, 2019; MININEL *et al.*, 2014; PÉRICO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 1 - Detalhes das espécies de estudo: (A) *Byrsonima intermedia*; (B) *Serjania marginata*; (C) *Terminalia catappa*



Fonte: Foto (A): Maiara Stefanini Borges Caires; Foto (B): Silvia Cristina Heredia Vieira; Foto (C): Carolina Mendes Costa.

(A) Jardim Botânico de Bauru-SP; (B) Fazenda Santa Madalena, Dourados-MS; (C) Orla de Santos-SP.

A espécie *B. intermedia* (Figura 1A) é popularmente conhecida como murici-do-cerrado, cajuzinho do cerrado ou murici-mirim. Esse nome, murici, que significa pequena árvore em língua tupi guarani, foi dado à espécie pelos povos indígenas. Ela é nativa do Cerrado brasileiro, e como o nome indica, tem características semelhantes a arbustos e geralmente atinge uma altura máxima de 1,60 m. A população local do cerrado usa a casca e as folhas de *B. intermedia* como infusões, as quais são relatadas como tendo propriedades anti-sépticas, antimicrobianas, anti-hemorragicas, cicatrizantes e anti-inflamatórias (NOGUEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

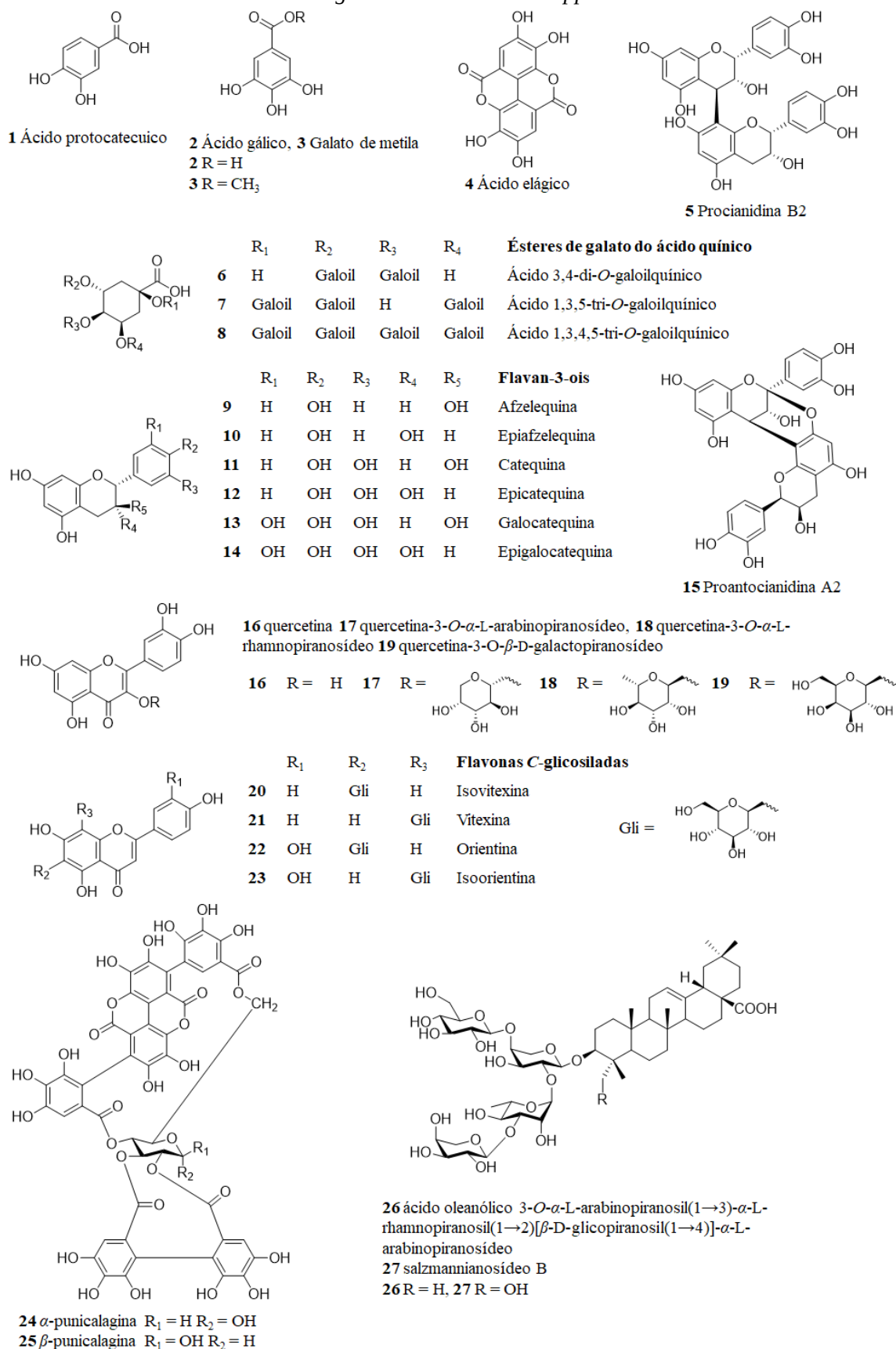
A espécie *S. marginata* (Figura 1B) é uma planta trepadeira popularmente conhecida como cipó-uva, cipó-timbó ou barbasco, cujas folhas são utilizadas na medicina popular na forma de infusão ou suco para o tratamento de dores de estômago (ARRUDA *et al.*, 2009). Essa espécie é considerada nativa do Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina. No Brasil, está presente em florestas decíduas, campos inundáveis e na região de Chaquenha no Mato Grosso do Sul, bem como em 18 fragmentos florestais no noroeste do Estado de São Paulo e na densa floresta do Estado de Pernambuco (MOREIRA *et al.*, 2013; RODAL; NASCIMENTO, 2002; SPRENGEL-LIMA; REZENDE, 2013). Seu cultivo agrônômico demonstrou que o rendimento e a composição química do extrato das espécies cultivadas foram similares aos das espécies nativas, comprovando que a planta pode ser cultivada *ex situ* (TABALDI *et al.*, 2012; VIEIRA, 2014). Além disso, o cultivo reduz o uso contínuo de plantas nativas, preservando assim seu habitat natural, assim como é um fator relevante que permite a padronização dos rendimentos para obter um produto de qualidade uniforme e consistente (CANTER; THOMAS; ERNST, 2005; KUNLE; EGHAREVBA; AHMADU, 2012).

A espécie *T. catappa* (Figura 1C) pode ser encontrada em todas as regiões do Brasil, e especialmente na região sudeste do país devido ao clima quente nessa área, que é adequado para o desenvolvimento e crescimento da planta. As espécies do gênero *Terminalia* são predominantes tanto nas regiões tropicais como subtropicais do Brasil, e mais particularmente nas áreas costeiras, onde são conhecidas por sua extensa sombra ao longo da orla das praias do país. Ela é muito conhecida entre a população brasileira, que frequentemente atribui a ela diversos nomes, incluindo amendoeira-da-praia, cuca e chapéu de sol (THOMSON; EVANS, 2006). Além disso, as espécies do gênero *Terminalia* são amplamente utilizadas na medicina ayurvédica para tratar dores abdominais e nas costas, tosse e resfriados, conjuntivite, diarreia e disenteria, inflamação e úlceras (COCK, 2015).

Estudos fitoquímicos anteriores que analisaram os extratos de folhas das espécies vegetais acima mencionadas mostraram que *B. intermedia* tem como principais constituintes ácidos fenólicos, proantocianidinas oligoméricas e flavonoides glicosilados derivados de quercetina (FRAIGE *et al.*, 2018; MANNOCHIO-RUSSO *et al.*, 2020; PEREIRA; BOREL; SILVA, 2015; RODRIGUES, 2007; SANNOMIYA *et al.*, 2007; ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021). *S. marginata* contém flavonoides C-glicosilados derivados de apigenina, proantocianidinas oligoméricas e saponinas (HEREDIA-VIEIRA *et al.*, 2015; VIEIRA, 2014; ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021). *T. catappa* apresenta principalmente ácidos fenólicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis (CHANG *et al.*, 2019; LIN; HSU, 1999; LIN *et al.*, 2000; MANDLOI *et al.*, 2013; MININEL, 2015; MININEL *et al.*, 2014; VENKATALAKSHMI P; VADIVEL V; BRINDHA P, 2016).

A Figura 2 e a Tabela 1 apresentam um panorama do estudo químico e biológico realizado com as espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*.

Figura 2 - Exemplos de alguns metabólitos encontrados nas espécies *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*



Fonte: próprio autor.

Tabela 1 - Composição química e atividade biológica das folhas das espécies *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*

Espécie	Composição química	Atividade biológica	Referências
<i>B. intermedia</i>	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	anti-inflamatória, antiulcerogênica e anti-colite; antimutagênica	ESPANHA <i>et al.</i> , 2014; FRAIGE <i>et al.</i> , 2018; MANNOCHIO-RUSSO <i>et al.</i> , 2020; MOREIRA <i>et al.</i> , 2011; PEREIRA; BOREL; SILVA, 2015; RINALDO <i>et al.</i> , 2010; RODRIGUES, 2007; SANNOMIYA <i>et al.</i> , 2007; ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
<i>S. marginata</i>	1, 5, 12, 15, 17, 26, 27	ação protetora da mucosa gástrica e anti-inflamatória; efeito antimutagênico seletivo	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015; PÉRICO <i>et al.</i> , 2015; SERPELONI <i>et al.</i> , 2021; VIEIRA, 2014; ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
<i>T. catappa</i>	2, 3, 4, 16, 20, 21, 22, 23, 24, 25	anti-inflamatória e anti-úlceras gástricas, com simultânea ação sobre <i>H. pylori</i>	CHANG <i>et al.</i> , 2019; COCK, 2015; LIN; HSU, 1999; LIN <i>et al.</i> , 2000; MANDLOI <i>et al.</i> , 2013; MININEL, 2015; MININEL <i>et al.</i> , 2014; OHARA <i>et al.</i> , 2020; PINHEIRO SILVA <i>et al.</i> , 2015; VENKATALAKSHMI; VADIVEL; BRINDHA, 2016

Fonte: próprio autor.

1.2 Padronização de extratos vegetais

O crescimento da fitoterapia nos últimos anos tem sido significativo, fazendo com que uma grande parte da população mundial utilize a medicina tradicional à base de plantas para tratar uma grande variedade de doenças. Isso decorre da crescente perda de credibilidade na medicina comum em relação aos efeitos adversos, da falta de acesso a medicamentos sintéticos e da baixa disponibilidade dos medicamentos distribuídos pela rede de saúde pública (BRASIL, 2019).

O mercado fitoterápico no Brasil e no mundo é muito promissor, e apenas a indústria farmacêutica movimenta bilhões de dólares anualmente. Atualmente, encontram-se no mercado mundial centenas de produtos à base de plantas medicinais que cobrem várias categorias terapêuticas e que são descritos em diferentes farmacopeias e monografias, tais como: o ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) que é usado como antiinflamatório, antioxidante, antibacteriano, antiviral e antifúngico (EMA, 2014a, 2014b; Formulário de Fitoterápicos, 2021; WHO, 2002);

hipericum (*Hypericum perforatum* L.) como antidepressivo (EMA, 2009; WHO, 2002); valeriana (*Valeriana officinalis* L.) como sedativo e no tratamento de distúrbios do sono (EMA, 2016; Formulário de Fitoterápicos, 2021; WHO, 1999); kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst) e passiflora ou flor da paixão (*Passiflora incarnata* L.) como tratamento natural para casos de instabilidade nervosa, insônia e ansiedade (EMA, 2014c; Formulário de Fitoterápicos, 2021; WHO, 2002, 2007); ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) como anti-inflamatório e antioxidante e para tratar distúrbios do sistema nervoso central, como a doença de Alzheimer e déficits cognitivos (EMA, 2015; WHO, 1999); e o chá verde [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] como anti-inflamatório, anticancerígeno, antimicrobiano e hipolipidêmico (EMA, 2013a, 2013b). No comércio brasileiro também é possível encontrar muitos produtos à base de plantas nativas, como o guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) que é usado para a fadiga, como estimulante e antidepressivo suave; a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) como antidiarreico, antiácido e protetor da mucosa gástrica; a erva baleeira (*Cordia verbenaceae* DC.) como anti-inflamatório; o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) como anti-séptico, anti-inflamatório, cicatrizante e antifúngico; o guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) como expectorante, e muitas outras espécies medicinais (BRASIL, 2014a; Formulário de Fitoterápicos, 2021).

No entanto, dada a ampla tradição de uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas enfermidades, difundiu-se a crença de que os medicamentos fitoterápicos, por serem considerados como uma “medicina verde”, são totalmente inofensivos e não tóxicos, levando a um consumo inadequado por grande parte da população. Isso pode resultar em potenciais riscos à saúde, os quais são ainda agravados pela dificuldade de acesso e até mesmo pela falta de informações confiáveis sobre possíveis efeitos tóxicos.

No Brasil, grande parte das espécies vegetais utilizadas pela população não possui ação farmacológica comprovada, composição química definida e nem mesmo estudos toxicológicos realizados. Isso é devido à falta de pesquisa e desenvolvimento, além da falta de investimentos na área de controle da qualidade, eficácia e segurança de produtos padronizados (DUTRA *et al.*, 2016).

Desse modo, o Ministério da Saúde deu início a ações para implementar políticas públicas destinadas a introduzir o uso de plantas medicinais e fitoterápicos à Fitoterapia no SUS, conhecida como “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS”; assim como fomentado o desenvolvimento do setor ao longo de todo o processo produtivo. Essa política tem como diretrizes fundamentais promover a integração dos setores público e privado (universidades, centros de pesquisa e organizações não governamentais); incentivar o uso de

plantas medicinais e medicamentos caseiros; apoiar as boas práticas no cultivo e manuseio de plantas medicinais, bem como no manuseio e produção de medicamentos fitoterápicos; incentivar o uso sustentável da biodiversidade brasileira com a preservação e valorização dos benefícios decorrentes do conhecimento tradicional e do patrimônio genético associados; e, acima de tudo, garantir que a aquisição de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos seja realizada de forma segura, eficaz e de qualidade (BRASIL, 2006a, 2016).

As definições empregadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RDC nº 26/2014) (BRASIL, 2014b) para fitoterápicos consideram duas categorias: o Medicamento Fitoterápico (MF) que é obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade; e o Produto Tradicional Fitoterápico (PTF) que é obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que seja concebido para ser utilizado sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Adicionalmente, o PTF não pode se referir a doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, não pode conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido e não deve ser administrado pelas vias injetável e oftálmica.

Tanto para MF quanto para PTF, fica clara a necessidade de se garantir a eficácia (avaliação farmacológica) e a segurança (avaliação toxicológica). Além disso, é fundamental o conhecimento da composição química (perfil cromatográfico), a determinação do marcador (qualidade), a avaliação da sazonalidade e o desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos validados para o controle de qualidade da matéria prima vegetal (a própria planta ou derivados vegetais, tais como os extratos) e dos produtos acabados (MF e PTF). O conjunto de ensaios de qualidade envolve ainda a identificação botânica, os estudos de estabilidade e a conformidade com as normas para bulas e rótulos, entre outros (BRASIL, 2014b).

A padronização dos extratos vegetais é uma das etapas primordiais no desenvolvimento de um novo fitoterápico e requer muito cuidado e cumprimento rigoroso das diretrizes adequadas sugeridas por agências como a Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*) (ICH, 2005) e a ANVISA (BRASIL, 2017).

Esse procedimento é essencial para analisar fatores que afetam significativamente a composição química e a eficácia da fitoterapia, tais como variações entre espécies ou

variedades, adulteração, mudanças ambientais durante o crescimento e coleta, tratamento pós-coleta, método de extração, e preparação de amostras, entre outros (SALEM *et al.*, 2020; YULIANA *et al.*, 2011). Para isso, tal padronização deve ser realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados (BRASIL, 2017; DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004).

Nesse contexto, a determinação das substâncias marcadoras em extratos de espécies torna-se imprescindível. A RDC nº 26/2014 define marcador como uma substância ou classe de substâncias químicas presentes na matéria-prima vegetal com correlação com o efeito terapêutico (marcador ativo) ou não (marcador analítico) (BRASIL, 2014b).

Por outro lado, a abordagem multicomponente na investigação de plantas medicinais é apreciada por diferentes agências reguladoras internacionais, especialmente pela US Food and Drug Administration (FDA) (FDA *et al.*, 2016), pela Agência Europeia de Medicamentos (European Medicines Agency - EMA) (EMA, 2018) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1991, 2017), que sugerem que em vez de um marcador, o perfil químico qualitativo (identificação de seus componentes) e quantitativo (teor dos principais componentes da mistura) de uma planta pode ser mais apropriado para estabelecer o controle de qualidade químico dos preparados herbais, garantindo segurança e eficácia, assim como a padronização da consistência e reprodutibilidade dos princípios ativos e/ou marcadores químicos das espécies vegetais (KUNLE; EGHAREVBA; AHMADU, 2012; ORY *et al.*, 2019).

A realização de uma análise rápida, precisa e de alta qualidade dos constituintes químicos de uma matriz vegetal complexa é indispensável no sentido de que ela permite caracterizar os marcadores ativos na matriz e também facilita a compreensão da relação entre a composição química e a possível eficácia, toxicidade e o alvo terapêutico do produto à base de plantas (WOLFENDER *et al.*, 2019).

Um grande obstáculo para estabelecer uma estrutura confiável de controle de qualidade química de um extrato vegetal é que as plantas têm composição extremamente complexa com grande número de substâncias, das quais ainda há conhecimento muito limitado. A diversidade química das substâncias presentes nas plantas medicinais está diretamente associada à alta variabilidade das propriedades físico-químicas intrínsecas dos produtos naturais, e isto torna a separação, detecção e identificação dos substratos naturais das plantas tecnicamente desafiadora (DUNN *et al.*, 2011; WOLFENDER *et al.*, 2015).

Avanços significativos nas técnicas analíticas juntamente com novas ferramentas de bioinformática e análises estatísticas multivariadas contribuíram significativamente para o

avanço dos estudos químicos de amostras complexas. Abordagens metabolômicas que empregam técnicas de última geração, como a espectrometria de massas de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry* - HRMS) e a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional e bidimensional, são formas rápidas e eficientes de maximizar os resultados da análise de impressões digitais de metabólitos de um grande número de conjuntos de dados (HAN *et al.*, 2018; HOURIET *et al.*, 2020; KELLOGG *et al.*, 2017; SUT *et al.*, 2019).

No desenvolvimento e otimização do método cromatográfico a ser utilizado nas análises quantitativas, o estabelecimento das condições apropriadas (tipo de fase estacionária, composição de fase móvel, pH, temperatura da coluna, volume de injeção, entre outras) é fundamental para se obter uma resposta ótima na separação e detecção de um maior número de componentes (FEKETE *et al.*, 2018). Para esse fim, os métodos de otimização multivariada podem ser considerados uma estratégia racional mais apropriada do que a tradicional abordagem “um fator de cada vez” (*one-factor-at-time* - OFAT) ou também conhecido como tentativa-e-erro. No método OFAT, os parâmetros são alterados um de cada vez, mantendo sempre os outros em níveis constantes. Dessa forma, não são consideradas quaisquer possíveis interações de fatores que influenciam a resposta final (BEZERRA *et al.*, 2019; MONTGOMERY, 2019).

A abordagem multivariada aplicada ao desenvolvimento de métodos analíticos oferece numerosas vantagens sobre os métodos tradicionais, como o uso de planejamento experimental (*Design of Experiments* - DoE) e de Metodologias de Superfície de Resposta (MSE), que promovem a otimização simultânea de respostas múltiplas com um número reduzido de experimentos, permitindo assim aos pesquisadores identificar interações entre fatores e desenvolver modelos de resposta que podem prever os parâmetros analíticos ideais dentro de faixas aceitáveis estabelecidas (BEZERRA *et al.*, 2008, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2021). Além disso, com essa abordagem muitas vezes o tempo experimental é minimizado, o consumo de solventes utilizados e a geração de resíduos durante a análise são reduzidos, o que também reduz os custos de desenvolvimento do método analítico.

O planejamento experimental Doehlert é facilmente aplicado para otimizar variáveis, pois envolve número reduzido de experimento e é considerado mais eficiente na otimização das variáveis. Os níveis determinados pelo modelo Doehlert são atribuídos de acordo com a importância do efeito de cada variável, resultando na atribuição de mais níveis às variáveis com maior efeito sobre a resposta experimental. Tudo isso o torna mais vantajoso em relação aos planejamentos denominados Composto Central e Box-Behnken (ARAUJO; JANAGAP, 2012; FERREIRA *et al.*, 2004; MONTGOMERY, 2019).

Outro ponto a considerar é que a maioria dos estudos químicos que utilizam técnicas cromatográficas utilizam solventes orgânicos tóxicos e voláteis como fase móvel, tais como acetonitrila e metanol, gerando grandes quantidades de resíduos de solventes não amigáveis, bem como proporcionam riscos à saúde do analista, e exigem tratamentos dispendiosos para evitar maior contaminação do meio ambiente (PACHECO-FERNÁNDEZ; PINO, 2019).

Um dos principais objetivos dos estudos com plantas medicinais é fornecer alternativas naturais (de baixo custo e sustentáveis) para o tratamento de doenças. Nessa direção, percebe-se uma contradição: estudos visando alternativas naturais utilizam solventes/reagentes tóxicos que prejudicam os seres humanos e o meio ambiente. Essa contradição levou ao desenvolvimento de novas estratégias para estudos químicos, com a busca de alternativas que minimizem a produção de resíduos, chamada “química verde” (ANASTAS, 1999; ANASTAS; ZIMMERMAN, 2019).

Uma maneira de implementar a química verde durante as análises é realizar todo o processo de acordo com seus princípios, abordando aspectos fundamentais, como a redução do uso de reagentes e energia, bem como a eliminação de resíduos, riscos e perigos, além do uso de solventes verdes (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

A substituição dos solventes nocivos, utilizados nas análises cromatográficas, por solventes mais verdes, como o etanol, tem sido uma boa estratégia devido à sua toxicidade relativamente baixa, fácil geração a partir de biomassa e biodegradabilidade (FUNARI *et al.*, 2014a; OLIVES; GONZÁLEZ-RUIZ; MARTÍN, 2017).

Atualmente, o número de estudos específicos sobre a aplicação da cromatografia verde na análise de extratos vegetais bioativos é muito menor do que o número total de estudos fitoquímicos publicados e a aplicação desse conceito nas indústrias fitoterápicas é inexistente. Alguns estudos têm demonstrado com sucesso o desenvolvimento de métodos de HPLC altamente robustos e ecologicamente corretos utilizando etanol como solvente orgânico na impressão digital de plantas e outras matrizes naturais complexas (BORGES *et al.*, 2021; FUNARI *et al.*, 2016; PELISSARI *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2018, 2021). Esses trabalhos demonstraram tanto boas seletividades e separação satisfatória cromatográfica satisfatória, quanto "verde" para o método de HPLC.

O uso de métricas pode ser uma abordagem muito adequada que pode fornecer critérios quantitativos para o desempenho analítico, bem como na determinação da natureza "verde" dos procedimentos analíticos realizados (TOBISZEWSKI, 2016). Como exemplo, a métrica HPLC-EAT (EAT - *Environmental Assesment Tool*) (GABER *et al.*, 2011) é usada principalmente para medir o impacto ambiental com base nas características dos solventes empregados como

fase móvel nas análises cromatográficas. Outra métrica que também pode ser usada para medir o impacto ambiental de um procedimento analítico é a Métrica de Analítica Verde - AGREE (AGREE - *Analytical GREEnness metric approach and software*) que é uma ferramenta para avaliar os riscos ambientais e ocupacionais de um procedimento analítico com base nos 12 princípios da Química Analítica Verde (GAC, *Green Analytical Chemistry*) (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020).

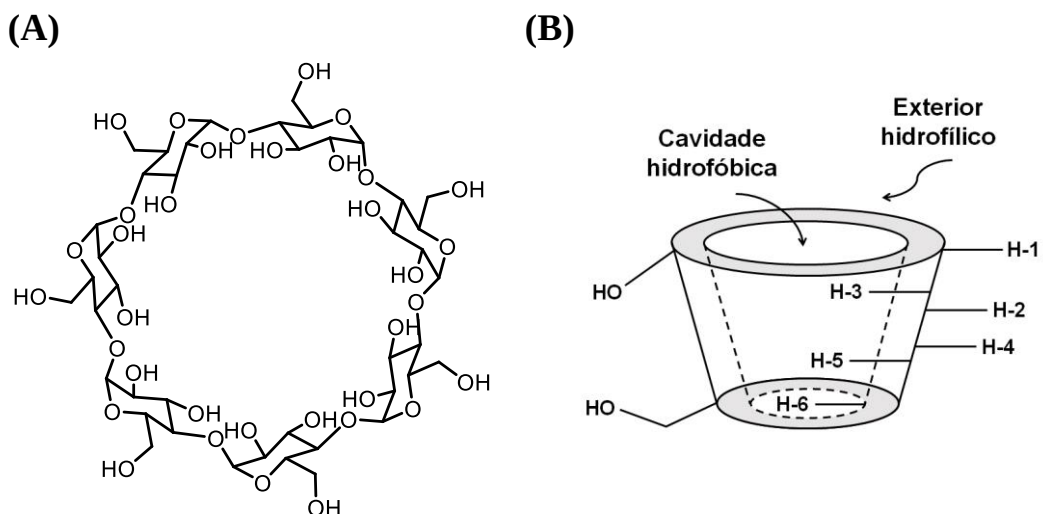
Um outro fator que coopera para otimizar a atividade e/ou a aplicação dos extratos é a tecnologia farmacêutica. A escolha do sistema de liberação mais apropriada para um fitomedicamento deve considerar a eficácia e a segurança do componente ativo e garantir sua qualidade. Portanto, sistemas de liberação devem incluir algumas propriedades fundamentais, tais como: facilitar a aplicação do medicamento, através da via de administração mais apropriada; contornar problemas de estabilidade; e orientar a entrega dos componentes ativos, seja em termos do local de absorção mais apropriado, seja em termos do perfil de liberação (DE TORRE *et al.*, 2020).

Nesse contexto, as ciclodextrinas têm sido consideradas como uma alternativa adequada para o uso como sistemas poliméricos de liberação, cujo principal objetivo é prevenir a oxidação, prolongar a estabilidade térmica/propriedades bioativas e melhorar a solubilidade das substâncias presentes no extrato vegetal, o que possivelmente resulta em sua maior biodisponibilidade (JASKI *et al.*, 2019; SUNG; KIM, 2020).

As unidades de açúcar nas ciclodextrinas formam macrociclos quirais, truncados em forma de cone, conhecidos por suas cavidades hidrofóbicas e por seu exterior hidrofílico (Figura 3). Seus complexos de inclusão fazem com que as moléculas de interesse fiquem temporariamente presas dentro da cavidade hospedeira, dando origem a modificações benéficas, tais como protegem a molécula contra eventuais interações com a microbiota intestinal e o aumentam a permeabilidade através dos tecidos da mucosa (DEL VALLE, 2004).

Dentre os vários tipos, a β -ciclodextrina (BCD) (Figura 3) é a mais indicada para o transporte de fármacos devido ao tamanho de sua cavidade, eficiência de complexação, fácil disponibilidade e custo relativamente baixo (SUNG; KIM, 2020). Algumas das principais propriedades da BCD referem-se à sua baixa absorção pelo trato intestinal, enquanto não sofrem qualquer metabolismo no organismo (DEL VALLE, 2004).

Figura 3 - Estrutura química da β -ciclodextrina (BCD) (A) e forma de cone truncado da BCD (B)



Fonte: adaptado de UPADHYAY, S. K.; KUMAR, G. NMR and molecular modelling studies on the interaction of fluconazole with β -cyclodextrin. **Chemistry Central Journal**, v. 3, n. 1, p. 9, 2009.

2 OBJETIVOS

Aplicar procedimentos de metabolômica, de Química Verde e de tecnologia farmacêutica para aprofundar o estudo da composição química dos extratos vegetais de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* de modo a viabilizar o desenvolvimento e caracterização de fitopreparados destinados ao tratamento de doenças crônicas.

- **Objetivos específicos:**

- Avaliar a variabilidade sazonal da composição química de cada uma das espécies utilizando abordagens de metabolômica;
- Desenvolver métodos de química verde para a preparação dos extratos e para a análise dos fitopreparados de *S. marginata*;
- Desenvolver e caracterizar complexos de inclusão baseados nos extratos de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* utilizando β -ciclodextrina.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, reagentes e soluções

Metanol e ácido fórmico (grau LC-MS) foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Alemanha) e água ultrapurificada (Millipore®, EUA) foram utilizados como componentes de fase móvel.

Etanol de cereais 95% (EtOH grau alimentício, Quimisul SC®), água ultrapurificada (Millipore®), e ácido acético (AcOH, grau PA; Synth®, Brasil) foram utilizados como componentes de fase móvel e extração.

Os padrões analíticos ácido protocatecuico (PCA, abreviado do inglês *protocatechuic acid*) ($\geq 99.0\%$), (+)-catequina [(+)-C] ($\geq 99.0\%$), (-)-epicatequina [(-)-EC] ($\geq 99.0\%$) e apigenina (AP) ($\geq 99.0\%$) foram utilizadas como padrão externo e o diclofenaco de sódio ($\geq 98.0\%$) foi utilizado como padrão interno. Os padrões foram adquiridos da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA).

A substância β -ciclodextrina foi adquirida da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, Estados Unidos). Todos os experimentos foram realizados utilizando água destilada (Millipore®, EUA) e solvente de grau analítico etanol (LiChrosolv® marca registrada da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

3.2 Instrumentação e procedimentos gerais

Balanças

As balanças analíticas Shimadzu® modelo BL3200H (capacidade 3200 g e precisão de 0,1 mg) e Sartorius® (capacidade para 210 g e precisão de 0,1 mg) foram usadas na pesagem dos extratos, frações, substâncias e padrões.

Evaporador rotativo

Os extratos e frações foram concentrados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba a vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control).

Equipamentos de cromatografia líquida

a) MPLC Buchi®

As separações utilizando cromatografia líquida de media pressão (MPLC) foram realizadas em um sistema Buchi®, equipado com uma bomba Gerente C-615 que comporta outras duas bombas (módulos C-601), permitindo a formação do gradiente binário de solventes 0% - 100% e uma vazão de 2,5 a 250 mL min⁻¹.

b) HPLC-PDA analítico Jasco®

Os perfis cromatográficos das amostras foram realizados em um sistema analítico de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (Jasco®, Japão) equipado com bomba quaternária (modelo PU-2089 plus), forno de coluna (modelo CO-2060 plus), injetor automático (modelo AS-2055 plus) e acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco®, Japão). O software ChromNAV (Chromatec®) foi utilizado para adquirir e processar os dados cromatográficos e espectrais.

c) HPLC-PDA semipreparativo Jasco®

A purificação das frações utilizando HPLC-PDA foram realizadas em um cromatógrafo líquido preparativo de gradiente binário (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm (Jasco®). A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o *software ChromNAV* (Chromatec®).

Espectrômetros de massas

a) UFLC-ESI-IT-MS Bruker Daltonics®

A análise do perfil químico cromatográfico dos extratos de cada espécie foi realizada por espectrometria de massas utilizando o sistema Shimadzu UFLC (Kyoto, Japão) acoplado a um detector de fotodiodos (PDA), modelo SPD-M20A (Shimadzu®) e um espectrômetro de massas amaZon SL, com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador Ion Trap (Bruker Daltonics®, Billerica, MA, EUA).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN monodimensional: ^1H e bidimensional: HSQC, HMBC e TOCSY foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker® Avance III HD 600 (14,1 Tesla) com uma criossonda de 5 mm com detecção inversa (Triple Inverse TCI Cryo-probehead) contendo pré-amplificadores resfriados para melhorar a sensibilidade; três canais dedicados, ^1H , ^{13}C e ^{15}N ; sistema de sintonia automática ATMA (*Automatic Tuning and Matching*); refrigeração BCU I (*Bruker Cool Unit*); bobina de gradiente em z (50 G cm^{-1}); e controle de temperatura (0 a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) BSVT (*Bruker Smart Temperature Control*). O equipamento também conta com trocador automático para 60 amostras (*SampleXpress*).

Material vegetal

As folhas de *B. intermedia* foram coletadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru (JBMB), Bauru, estado de São Paulo, Brasil ($22^{\circ}20'36''\text{S}$ e $49^{\circ}01'02''\text{W}$, altitude 546 m). Os espécimes dos vouchers foram depositados no Herbarium JBMB sob o número JBMB 00013 e responsabilidade da Dra. Viviane Camila de Oliveira.

As folhas de *S. marginata* foram coletadas em um fragmento do Cerrado localizado na Fazenda Santa Madalena, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil ($22^{\circ}08'05''\text{S}$ e $55^{\circ}08'17''\text{W}$, altitude de 452 m). Os espécimes dos vouchers foram depositados no Herbário DDMS, da Universidade Federal de Grande Dourados (UFGD), sob o número 41054 e responsabilidade do Dr. Emerson Silva.

As folhas de *T. catappa* foram coletadas na orla da cidade de Santos-SP ($23^{\circ}58'13''\text{S}$ e $46^{\circ}19'53''\text{W}$, altitude 17 m) com a autorização da prefeitura. A espécie foi identificada pelo botânico Paulo Salles Penteado e foi depositada no herbário da Universidade Santa Cecília (HUSC), sob o número M Tomaz 01.

Os dados coletados foram acrescentados na plataforma SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados) como patrimônio genético com número de registro A3476AF.

O material vegetal (folhas de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*) coletado e identificado foi lavado e seco em estufa em ar circulante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o material seco de cada espécie vegetal foi finamente moído em um moinho analítico de laboratório modelo IKA® A11 basic (dimensões e velocidade máxima de 28.000 rpm) a fim de se facilitar a

extração de seus constituintes químicos na etapa seguinte. O material foi armazenado em local seco, sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

3.3 Metodologia

Para melhor compreensão, a abordagem empregada está apresentada em três partes: 1) PARTE A: Estudo sazonal das espécies vegetais; 2) PARTE B: Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato de *S. marginata* usando princípios da Química Verde; e 3) PARTE C: Desenvolvimento de pré-formulações com ciclodextrina.

3.3.1 PARTE A: Estudo sazonal das espécies vegetais

Nessa etapa, foi avaliada a composição química das três espécies vegetais (*B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*) utilizando abordagem metabolômica empregando as redes moleculares na análise dos dados de espectrometria de massas. Para complementar o estudo sazonal, avaliamos também algumas propriedades químicas (teor de flavonoides totais) e biológicas (ensaios de capacidade antioxidante e antiglicante) dos extratos referentes a cada coleta.

3.3.1.1 Coletas do material vegetal

A coleta das espécies vegetais foi realizada sempre no mesmo período entre 9h e 10h por dois anos consecutivos (2017 e 2018) para estudar a variabilidade sazonal de seus metabólitos secundários. Os dados detalhados para cada coleção estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Período de coleta das espécies vegetais estudadas

<i>B. intermedia</i>			<i>S. marginata</i>			<i>T. catappa</i>		
Código	Mês	Estação	Código	Mês	Estação	Código	Mês	Estação
Bi1	Mar/17	Verão	Sm1	Fev/17	Verão	Tc1	Fev/17	Verão
Bi2	Abr/17	Outono	Sm2	Abr/17	Outono	Tc2	Mai/17	Outono
Bi3	Jun/17	Outono	Sm3	Jun/17	Outono	Tc3	Jun/17	Outono
Bi4	Ago/17	Inverno	Sm4	Ago/17	Inverno	Tc4	Ago/17	Inverno
Bi5	Out/17	Primavera	Sm5	Out/17	Primavera	Tc5	Out/17	Primavera
Bi6	Dez/17	Primavera	Sm6	Dez/17	Verão	Tc6	Dez/17	Primavera

Fonte: próprio autor.

3.3.1.2 Preparação dos extratos vegetais

Os extratos foram preparados em pequena escala para análise da composição química de cada extrato associada à sazonalidade.

A extração foi realizada em eppendorf utilizando 100 mg de pó de planta em banho ultrassônico com 1 mL de etanol 70% (v/v) para as espécies *B. intermedia* e *S. marginata* e etanol 95% para *T. catappa*. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 13.000 rpm e o sobrenadante filtrado em filtro Millex 0,22 µm. Em seguida, os extratos foram submetidos à etapa de *clean-up* por extração em fase sólida (SPE) em cartuchos de fase reversa C18 com 500 mg 6 mL⁻¹ (45 µm, Chromabond®). Os cartuchos foram previamente ativados com MeOH (4,5 mL) e equilibrados com H₂O (4,5 mL) e MeOH/H₂O (85:15, v/v) (4,5 mL). Os extratos (10 mg) foram previamente solubilizados em 1,5 mL da solução MeOH/H₂O (85:15, v/v), carregados no cartucho e eluídos com a mesma proporção de fase móvel. Após a secagem, 2 mg de cada amostra foram ressuspensos em 2 mL de uma solução MeOH/H₂O (1:1, v/v) fornecendo uma solução com uma concentração de 1 mg mL⁻¹. Ao fim, as soluções foram filtradas em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm.

3.3.1.3 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos para todas as colheitas de cada planta foram fornecidos pela Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos (SADMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os dados meteorológicos foram temperatura (°C), umidade (%), radiação solar (kJ/m²) e pluviosidade (mm) para o ano 2017.

3.3.1.4 Análises LC-MS e MS/MS

Os extratos de cada espécie vegetal foram analisados por espectrometria de massas em um equipamento UFLC-ESI-IT-MS (Bruker Daltonics®). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando a coluna C18 (Kinetex C18 100 R, 150 x 4,60 mm, 5 µm). O volume de injeção e a vazão aplicados foram 1 µL e 1,00 mL min⁻¹, respectivamente. Para a eluição das amostras, foi empregado um gradiente linear com fase móvel composta de água (solvente A) e metanol, (solvente B) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, de 5 a 100% (B) durante 45 min. Os seguintes parâmetros foram utilizados no espectrômetro de massas: HV End Plate Offset -500 V, nebulizador (Set) 50 psi, gás de secagem (Set) (N₂) com fluxo de 10 L min⁻¹,

temperatura do capilar (Set) de 300 °C e voltagem do capilar de -4500 V. Os espectros (m/z 100-1800) foram registrados a cada 0,2 s. Os experimentos de fragmentação foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) rodando em MSⁿ automático (fragmentação inteligente) usando o modo UltraScan para aquisição de MS/MS e com aumento de energia de colisão usando a amplitude máxima de fragmentação de 60%. Os espectros de massas foram obtidos em modo positivo e processados no software Data Analysis (versão 4.3, Bruker®).

3.3.1.5 Processamento dos dados e construção das redes moleculares (molecular networking)

As redes moleculares foram criadas usando o fluxo de trabalho on-line (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do Global Natural Products Social (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>). Primeiramente, os dados LC-MS/MS foram convertidos para o formato mzML no software MSConvert (ProteoWizard) usando o filtro *Peak Picking* e então, foram carregados na plataforma GNPS. Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentos MS/MS dentro de +/- 17 Da dos íons precursores m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados através da escolha apenas dos 6 íons fragmento superiores na janela +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi ajustada para 2,0 Da e a tolerância dos íons fragmento MS/MS para 0,9 Da. Foi então criada uma rede onde os arcos foram filtrados para ter um escore de cosseno acima de 0,65 e mais de 6 picos combinados. Além disso, os arcos entre dois nodos foram mantidos na rede se e somente se cada um dos nodos aparecesse nos 10 nodos superiores mais similares um do outro. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi fixado em 100, e os arcos com escore mais baixo foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular ficasse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados em relação às bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca tiveram um escore acima de 0,65 e pelo menos 4 picos combinados (WANG *et al.*, 2016a).

As redes moleculares foram visualizadas usando o *software* Cytoscape v. 3.7.0 (SHANNON, 2003). As informações sobre as redes moleculares podem ser acessadas publicamente em:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=8ebb99e2cf5842a2a51a824befcfc784> para as amostras de *B. intermedia*;

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e64c24376b38421b89ae04aadf2bb477> para as amostras de *S. marginata* e

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=71c683972c5d40feb10348675575447a> para as amostras de *T. catappa*.

As amostras do branco (injeções da fase móvel) foram analisadas como um grupo separado no GNPS e submetidas à filtragem no *software* Cytoscape sendo excluídas das redes moleculares.

3.3.1.6 Determinação do teor de flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada com base na metodologia de PEIXOTO SOBRINHO *et al.* (2008).

A quercetina foi utilizada como padrão na construção da curva analítica, que consistiu na preparação de diluições seriadas a partir de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (62,50 – 0,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando etanol como diluente. Os extratos de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* foram solubilizados em etanol numa concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A análise foi feita pela adição de 100 μL da solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% (m/v) com EtOH:H₂O (80:20, v/v) em 100 μL de solução das amostras a serem analisadas, incluindo as soluções do padrão. A mistura foi incubada por 1 h e o teor de flavonoides foi determinado espectrofotometricamente em um leitor de microplacas Thermo Plate TP-READER Basic com a medida de absorbância de 415 nm.

O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.1.7 Avaliação da capacidade antioxidante

3.3.1.7.1 Ensaio antiradicalar DPPH $\cdot$

O ensaio antiradicalar por DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi desenvolvido de acordo com a metodologia adaptada de PAULETTI *et al.* (2003) e BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET (1995). A eliminação dos radicais livres foi determinada para todas as coletas das espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* utilizando uma solução do radical DPPH.

Os extratos foram solubilizados em etanol numa concentração de 4 mg mL^{-1} e diluídos em sete concentrações. A análise foi feita pela adição de 215 μL da solução de DPPH (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em 35 μL de solução de cada amostra, obtendo-se a concentração final de 0,4, 4,0, 10,0, 20,0, 40,0, 70,0 e 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após 30 minutos de reação no escuro, a absorbância foi

medida em um leitor de microplacas (Synergy2 Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EUA) em 517 nm. A mesma metodologia foi empregada para os padrões quercetina e ácido gálico.

As respostas foram calculadas considerando a redução dos radicais livres em 50% (IC_{50}) que foram definidos pelas curvas dose-resposta sigmoidal.

3.3.1.7.2 Ensaio antiradicalar $ABTS^{\cdot+}$

O ensaio antiradicalar por $ABTS$ [2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] foi baseado na metodologia de RE *et al.* (1999).

O radical $ABTS^{\cdot+}$ foi produzido pela reação de 1 mL de solução $ABTS$ (10 mmol L^{-1}) com 430 μL ($8,17 \text{ mmol L}^{-1}$) de persulfato de amônio. A mistura foi agitada e deixada no escuro à temperatura ambiente por 16h. Em seguida, a solução foi diluída 60 vezes em água. A análise foi feita pela adição de 215 μL da solução diluída de $ABTS$ em 35 μL de solução de cada amostra preparadas em diferentes concentrações em etanol ($0,4$ a $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após 30 minutos de reação no escuro, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Synergy2 Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EUA) em 755 nm. A mesma metodologia foi empregada para os padrões quercetina e ácido gálico.

As respostas foram calculadas considerando a redução dos radicais livres em 50% (IC_{50}) que foram definidos pelas curvas dose-resposta sigmoidal.

3.3.1.7.3 Ensaio antiradicalar $ROO^{\cdot}$ (radical peroxila)

A atividade sequestrante do radical peroxila ($ROO^{\cdot}$) foi determinada pelo decaimento da fluorescência da piranina (sal trissódico do ácido 8-hidroxi-pireno-1,3,6-trissulfônico) quando oxidada pelos radicais peroxilados originados pelo AAPH [2,20-azobis (2-metilpropionamida)]. A análise foi feita pela adição de 12,5 μL das amostras preparadas em etanol ($0,4$, $1,0$, $2,5$, $4,0$, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 62,5 μL de AAPH em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 40 mmol L^{-1}) em 75 μL de piranina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). O decaimento da fluorescência da piranina foi medido em um leitor de microplacas (Synergy2 Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EUA) a 485 nm (λ de excitação) e 528 nm (λ de emissão) com uma temperatura de 37°C . A quercetina e o ácido gálico foram usados como padrões e piranina com AAPH (controle 1) e sem AAPH (controle 2) foram utilizados como controles.

As respostas foram determinadas considerando a porcentagem de redução dos radicais livres expressos nos valores das áreas das curvas cinéticas após 90 min de leitura:

$[(\text{área da amostra} - \text{área do controle 1})/(\text{área do controle 2} - \text{área do controle 1})] \times 100$.

3.3.1.8 Avaliação da atividade antiglicante

O ensaio antiglicante foi baseado na metodologia descrita por LUNCEFORD; GUGLIUCCI (2005). A atividade foi determinada pela interação da solução da proteína albumina do soro bovino (BSA) (1mg mL^{-1}) em tampão fosfato de sódio (10 mmol L^{-1} , pH 7,4, contendo 150 mmol L^{-1} de cloreto de sódio) com o agente glicante metilglioxal (MGO) (5 mmol L^{-1}). Os extratos ($200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e o MGO foram adicionados à solução de BSA e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram incubadas na presença e ausência do controle negativo MGO. A aminoguanidina (10 mmol L^{-1}) foi utilizada como controle positivo. Após 3 dias de incubação foram monitorados em um leitor de microplacas (Synergy2 Multi-Mode, BioTek, Winooski, VT, EUA) os comprimentos de onda de 370 nm de excitação e 440 nm de emissão.

As respostas foram determinadas considerando a porcentagem de inibição da formação dos AGEs (*Advanced Glycated End-Products* – Produtos finais da glicação avançada) de acordo com a seguinte equação:

$$[(\text{FL}_{\text{CN}} - \text{FL}_{\text{bCN}}) - (\text{FL}_{\text{E}} - \text{FL}_{\text{bE}})]/(\text{FL}_{\text{CN}} - \text{FL}_{\text{bCN}}) \times 100,$$

onde FL_{CN} e FL_{bCN} são as intensidades de fluorescência da mistura do controle negativo e o seu branco, respectivamente, e FL_{E} e FL_{bE} são as intensidades de fluorescência dos extratos e do seu branco, respectivamente.

3.3.2 PARTE B: Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato de *S. marginata* usando princípios da Química Verde

Nessa etapa, foi realizado o desenvolvimento de um método analítico de acordo com os princípios da Química Analítica Verde para a caracterização qualitativa e quantitativa do extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata*. No desenvolvimento do método analítico foi utilizada a abordagem de planejamento experimental para a triagem e otimização dos parâmetros analíticos utilizados. Além disso, a metodologia foi validada e os extratos padronizados de acordo com as substâncias marcadoras presentes no extrato.

3.3.2.1 Obtenção e preparo da amostra

A extração foi realizada utilizando 1 g de pó de planta com 10 mL de etanol 70% (v/v) em banho ultrassom, três vezes por 20 min. O líquido extraído foi seco em atmosfera N₂.

O extrato de *S. marginata* obtido foi submetido à Extração por Fase Sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE) (Chromabond®, 45 µm, 500,0 mg, 6,0 mL). Para as análises químicas verdes, os cartuchos foram pré-ativados com EtOH (3,0 mL) e equilibrados com EtOH/H₂O (7:3, v/v) (3,0 mL). 50,0 mg do extrato seco foram dissolvidos em 1,5 mL de EtOH/H₂O 7:3 (v/v), carregados em um cartucho C18 e eluídos sequencialmente com 1,5 mL da mesma fase móvel. O eluato depois de seco foi redissolvido em 100% EtOH a uma concentração de 10,0 mg mL⁻¹.

Para uma posterior comparação com uma metodologia não verde, a amostra também foi preparada seguindo as mesmas etapas desenvolvidas no trabalho de VIEIRA (2014). Os cartuchos foram pré-ativados com MeOH (4,0 mL) e equilibrados com MeOH/H₂O (8:2, v/v) (5,0 mL). 3,0 mg do extrato seco foram dissolvidos em 1,0 mL de MeOH/H₂O 8:2 (v/v), carregados em um cartucho C18 e eluídos sequencialmente com 5,0 mL a mesma fase móvel. A solução obtida foi seca à temperatura ambiente, redissolvida em MeOH/H₂O (8:2, v/v) obtendo-se a concentração de 3,0 mg mL⁻¹. No final, as soluções foram filtradas através de um filtro Millex® PTFE (0,22 µm, 25 mm).

3.3.2.2 Análises por HPLC-PDA

As análises cromatográficas foram conduzidas em um cromatógrafo líquido analítico HPLC-PDA (Jasco®, Japão).

O método verde otimizado empregou um gradiente linear com fase móvel composta de água acidificada com ácido acético 0,1% (solvente A) e bioetanol 95 °GL (solvente B), com uma rampa de eluição de 10% a 55% (B) em 35 minutos, vazão de 1,11 mL min⁻¹ e temperatura de 35 °C para o forno da coluna.

As condições do método relatadas na literatura por VIEIRA (2014) para análise cromatográfica das amostras de *S. marginata* foram reproduzidas para fins de comparação. O método descrito anteriormente empregou um gradiente linear com fase móvel composta de água acidificada com ácido acético 0,1% (solvente A) e metanol (solvente B), de 25% a 75% (B) em 45 min, vazão de 1,00 mL min⁻¹ em uma coluna Luna (Phenomenex®, Torrance, CA, EUA) de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm).

Antes de cada experimento, as colunas foram equilibradas durante 15 minutos para recondição com a proporção inicial da fase móvel do método utilizado. Ao final de cada análise cromatográfica, o solvente orgânico B foi mantido a 100% durante 10 min para limpeza das colunas. Como não foi mencionado no trabalho a temperatura de aquecimento para a coluna, as análises foram realizadas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Todos os experimentos foram monitorados em um comprimento de onda de 270 nm.

3.3.2.3 Triagem e otimização do método cromatográfico verde

A avaliação das variáveis empregadas para o desenvolvimento do método cromatográfico verde foi realizada por meio do planejamento fatorial fracionário com dois níveis, 7 fatores (2^{7-2}) e seis réplicas, que resultou em 38 experimentos. As estimativas dos erros para o planejamento fracionário foram obtidas a partir das réplicas considerando as piores respostas de acordo com a métrica GCFR - *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (Resposta de Impressão Digital Cromatográfica Verde) (FUNARI *et al.*, 2014a, 2014b) (experimentos 2, 6 e 9) e as melhores repostas (experimentos 8, 31 e 32).

As variáveis selecionadas e ajustadas foram: percentagem inicial de EtOH, percentagem final de EtOH, temperatura de análise, percentagem ácido acético em H₂O, vazão, tempo de corrida e fase estacionária. Os fatores e níveis investigados no planejamento fracionário estão apresentados na Tabela 3. O volume de injeção e a concentração da amostra foram fixados em 20 µL e 10 mg mL⁻¹. O comprimento de onda escolhido para as análises foi de 270 nm. Os experimentos foram realizados aleatoriamente a fim de reduzir a chance de erros sistemáticos nas medidas realizadas.

Tabela 3 - Fatores e níveis investigados no planejamento fracionário

Fatores	Níveis	
	-1	+1
X1. % inicial de EtOH	10,0	15,0
X2. % final de EtOH	55	75
X3. Temperatura da análise (°C)	35,0	60,0
X4. % ácido acético na H ₂ O	0,10	1,00
X5. Vazão (mL min ⁻¹)	0,50	1,00
X6. Tempo de análise	30	60
X7. Fase estacionária (coluna) ^a	Luna C18	Luna fenil hexil

^a colunas de fase reversa C18 e fenil hexil, ambas Phenomenex®, 250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm.

Fonte: próprio autor.

Duas respostas foram avaliadas nas etapas de triagem e otimização do método

cromatográfico verde: o número de bandas cromatográficas com a maior intensidade (a) e a distribuição das bandas ao longo do cromatograma (b) medida pela métrica GCFR - *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (Resposta de Impressão Digital Cromatográfica Verde) (FUNARI *et al.*, 2014a, 2014b).

Os dados cromatográficos foram analisados usando a *gadget* Quick Peaks do *software* Origin Pro 9.0 (OriginLab, Northhampton, Massachusetts, USA). Para a contagem das bandas cromatográficas (resposta a), foram empregados os seguintes parâmetros: o modo de linha de base foi constante e, no mínimo, a região de interesse foi escolhida considerando a faixa entre o valor de tempo de retenção de um analito não retido (t_0) e o tempo total de análise para cada análise, o método para encontrar os picos foi o máximo local com direção positiva, pontos locais de 3 e coeficiente/altura limite de 5%.

As respostas do GCFR (resposta b) foram calculadas de acordo com a seguinte equação (Equação 1) (FUNARI *et al.*, 2014a, 2014b):

$$GCFR = n^x (FP/MP)(n/t) \quad (1)$$

onde n é o número total de picos de um determinado cromatograma, o expoente x é o peso dado a n (no nosso caso, o valor de x foi fixado em 1, com o objetivo de estabelecer a mesma importância para os termos da equação), t é o tempo de eluição do último pico cromatográfico, FP é o número de picos na seção do cromatograma com menos picos e MP é o número de picos na seção do cromatograma de igual comprimento, mas com mais picos. Além disso, para obter os valores de GCFR, o volume morto correspondente a cada análise foi descontado para calcular a divisão das seções do cromatograma (FUNARI *et al.*, 2014a, 2014b).

Para as variáveis mais significativas, a matriz Doehlert (DOEHLERT, 1970) foi aplicada a fim de obter com maior precisão um modelo com a combinação ótima dos fatores que têm maior influência para as respostas experimentais. O número total de experimentos é dado por $N = k^2 + k + c_p$, em que k é o número de variáveis independentes e c_p é o número de experimentos no ponto central.

O modelo polinomial quadrático foi utilizado para descrever as interações dos efeitos e determinar cada resposta obtida (a e b) (Equação 2):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad (2)$$

onde Y é a resposta prevista, b_0 é o intercepto, b_i é um coeficiente linear, b_{ii} é um coeficiente quadrático, b_{ij} é um coeficiente de interação e X_i e X_j estão relacionadas às variáveis independentes avaliadas e seus valores codificados (ARAÚJO; JANAGAP, 2012; BEZERRA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2004).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi realizada para estimar o efeito das variáveis sobre as respostas, por meio do ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada na validação dos modelos empíricos com a significância estatística definida em $p < 0,05$.

Além disso, a função de desejabilidade foi utilizada para encontrar os melhores níveis de cada variável e simultaneamente otimizar as respostas obtidas. De acordo com DERRINGER; SUICH (1980), traçar o perfil da desejabilidade das respostas envolve primeiro especificar a função de desejabilidade individual (d_i) para cada resposta, atribuindo aos valores previstos um *score*, em que $0 \leq d_i \leq 1$. Portanto, para otimizar as respostas, a desejabilidade individual é definida como apresentado na equação abaixo (Equação 3):

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 0 & \text{if } Y_i < L_i \\ \left(\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & \text{if } L_i \leq Y_i \leq T_i \\ 1 & \text{if } Y_i > T_i \end{cases} \quad (3)$$

onde Y_i é a resposta avaliada, L_i e T_i são os valores mais baixos e alvo, respectivamente, que são aceitáveis para a resposta Y_i , com o expoente s determinando o peso da resposta. Em seguida, os resultados individuais de desejabilidade para os valores previstos para cada resposta são combinados calculando-se sua média geométrica que resulta na desejabilidade global D , de acordo com a seguinte Equação 4:

$$D = [d_1(Y_1) \times d_2(Y_2) \dots \times d_k(Y_k)]^{1/k} \quad (4)$$

em que k indica o número de respostas avaliadas.

Todos os cálculos, processamento dos dados e análise dos gráficos foram realizados utilizando o *software* STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

3.3.2.4 Métrica para o método cromatográfico verde

O impacto ambiental do método otimizado foi avaliado por duas métricas: a Ferramenta de Avaliação Ambiental HPLC-EAT (EAT - *Environmental Assesment Tool*) (GABER *et al.*, 2011) e a Métrica de Analítica Verde - AGREE (AGREE - *Analytical GREEnness metric approach and software*) (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020).

A métrica HPLC-EAT foi empregada com base nos procedimentos de cada etapa, que incluíram desde as etapas de extração, o preparo da amostra até a análise cromatográfica. No caso das análises cromatográficas, a métrica foi empregada para classificar os experimentos do Planejamento Fracionário e da Matriz Doehlert de acordo com o seu caráter verde. Além disso, os resultados do HPLC-EAT foram utilizados para avaliar o impacto do método verde otimizado em comparação com o método de referência da literatura empregado nas análises do perfil químico de *S. marginata*. Os resultados do HPLC-EAT foram calculados de acordo com a Equação 5:

$$HPLC - EAT = m_i (S_i + H_i + E_i) + m_{i+1} (S_{i+1} + H_{i+1} + E_{i+1}) + \dots (5)$$

onde *S*, *H* e *E* referem-se aos riscos de segurança (*safety*), saúde (*health*) e ambientais (*environmental*), respectivamente, atribuídos a cada solvente (*i*). Cada fator é multiplicada pela massa (*m*) do solvente utilizado. Essas informações e o software utilizado foram obtidos a partir do trabalho de GABER *et al.* (2011).

O AGREE é uma ferramenta para avaliar os riscos ambientais e ocupacionais de um procedimento analítico e foi desenvolvido com base nos 12 princípios da Química Analítica Verde (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020). Os resultados foram plotados em um gráfico com o *score* de cada procedimento analítico realizado associado a cada um dos 12 princípios; essa avaliação foi feita para o método verde otimizado e o método de referência da literatura.

3.3.2.5 Validação do método cromatográfico verde

O método cromatográfico verde foi validado de acordo com as recomendações dos documentos da ICH para Validação de Procedimentos Analíticos e Metodologia (ICH..., 2005) e pela ANVISA em termos dos princípios ativos presentes nas matérias primas vegetais

(BRASIL, 2017). A metodologia foi validada através da avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade (curva de calibração), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (análise intra e inter-dia) e robustez.

A quantificação das substâncias (numeradas de **1-5**, **7**, **8** e **16-18**) no extrato de *S. marginata* foi realizada pelo método de padronização interna. Portanto, no procedimento de preparação da amostra, as soluções dos padrões e o extrato foram enriquecidas (do inglês *spiked*) com uma solução padrão de diclofenaco de sódio; o padrão foi preparado na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando etanol absoluto como solvente.

As soluções das misturas dos padrões [PCA, (+)-C, (-)-EC e AP] foram utilizadas na obtenção da curva analítica, que consistiu em preparar diluições em série a partir de uma solução estoque de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($500 - 7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$). As soluções da mistura de padrões foram injetadas em triplicata para cada concentração da curva analítica ($n = 3$). A curva de calibração para cada padrão foi construída a partir dos níveis de concentração avaliados em função da razão entre as áreas das bandas cromatográficas de cada padrão e do padrão interno.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir das curvas de calibração dos padrões de acordo com as expressões $LD = DP \times 3/IC$ e $LD = DP \times 10/IC$, respectivamente, nas quais DP é o desvio padrão da resposta e IC é a inclinação da curva de calibração (AGÊNCIA..., 2017; ICH..., 2005).

Os parâmetros intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária) para o método analítico foram determinados pelas análises consecutivas (6 réplicas) dos extratos, variando o dia de análise (três dias diferentes). A porcentagem do desvio padrão relativo (DPR%) dos tempos de retenção e áreas das bandas cromatográficas das substâncias **1-5**, **7**, **8** e **16-18** foram usados para medir a precisão do método.

A robustez do método analítico foi avaliada através do teste de Youden (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; YODEN, 1967). Foram realizados oito experimentos para avaliar o efeito da variação de quatro parâmetros analíticos em dois níveis cada um: vazão (-5% e +5%), concentração de ácido acético (-0,1% e +0,1% v/v), temperatura da coluna (-1 e +1 °C) e porcentagem de EtOH na composição da fase móvel inicial e final (-1% e +1%) (Tabelas 7 e 8). A influência dos parâmetros foi avaliada para os tempos de retenção (t_r) e áreas das bandas cromatográficas e o teste t com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) foi aplicado.

A quantidade das substâncias presentes no extrato de *S. marginata* foi determinada interpolando a razão entre as áreas das bandas cromatográficas das substâncias de interesse e do padrão interno na curva de calibração de cada padrão de referência. O padrão de referência

para cada substância foi escolhido de acordo com a similaridade dos espectros de absorção UV entre o padrão e as substâncias no perfil cromatográfico dos extratos. Os índices de semelhança espectral foram obtidos utilizando o software ChromNAV (Chromatec®).

Todas as soluções preparadas foram filtradas em um microfiltro Millex® PTFE (0,22 µm, 25 mm) antes de serem injetadas no HPLC. A resposta UV de absorção foi monitorada a 270 nm para todas as análises realizadas.

As áreas das bandas cromatográficas foram calculadas usando a ferramenta *Peak Analyzer* do software OriginPro 9.0 (OriginLab, Northhampton, Massachusetts, EUA), sendo que foram realizadas as seguintes etapas de processamento: a linha de base foi corrigida pelo método assimétrico de alinhamento dos mínimos quadrados (EILERS; BOELEN, 2005), o método da segunda derivada foi aplicado para a detecção de bandas sobrepostas nos dados, e as bandas foram ajustadas com a função Gaussiana. As áreas das bandas, sob o melhor ajuste de desconvolução, foram determinadas e usadas na análise quantitativa do extrato de *S. marginata*.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando LibreOffice Calc 5 (*The Document Foundation*) e GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todos os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão (DP).

Tabela 4 - Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método otimizado

Fatores	Níveis	
	-1	+1
P1: Vazão	1,099 mL min ⁻¹	1,121 mL min ⁻¹
P2: Concentração do ácido acético	0,0%	0,2%
P3: Temperatura da coluna	59 °C	61 °C
P4: Composição da fase móvel	9,90%-54,45% EtOH	10,10%-55,55% EtOH

Fonte: próprio autor.

Tabela 5 - Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez do método otimizado pelo teste de Youden

Experimentos	P1	P2	P3	P4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	-1
4	-1	1	1	-1
5	1	-1	-1	1
6	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	1
8	1	1	1	1

Fonte: Adaptado de YOUNDEN, W. J. **Statistical Techniques for Collaborative Tests**. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1967.

3.3.2.6 Análises por UFLC-ESI-IT-MS e MS/MS

O perfil químico cromatográfico do extrato hidroetanólico das folhas *S. marginata* por espectrometria de massas foi realizado no equipamento UFLC-ESI-IT-MS (Bruker Daltonics®). Para realizar a análise, a amostra foi suspensa em EtOH a uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹, centrifugada, e em seguida o sobrenadante foi transferido para o *vial* para posterior análise.

As separações por HPLC foram realizadas em uma coluna Luna (Phenomenex®, Torrance, CA, EUA) de fase reversa fenil hexil (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm). O volume de injeção foi de 1 µL, a vazão foi de 1,11 mL min⁻¹ e a temperatura do forno da coluna foi ajustada para 60 °C. Para a eluição das amostras, foi utilizado um gradiente linear com fase móvel composta de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e etanol (solvente B), de 10% a 55% (B) em 35 min.

Os parâmetros de aquisição no espectrômetro de massas foram: pressão do gás nebulizador (N₂) 50 psi, gás de secagem com vazão constante 10 L min⁻¹, temperatura de secagem 300 °C, HV capilar 4500 V, HV offset da placa final -500 V, saída capilar -140 V, e trap drive 51,6. As medições foram realizadas em modo de ionização negativa, com resolução melhorada, sob condições de controle de carga iônica (ICC) (10000), e na faixa de aquisição de *m/z* 50-1200. Os experimentos de fragmentação foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) rodando em MSⁿ automático (fragmentação inteligente) usando o modo UltraScan para aquisição de MS/MS e um aumento de energia de colisão com a amplitude máxima de fragmentação definida para 75%. Os espectros de massas foram processados no software DataAnalysis (versão 4.3, Bruker®).

3.3.3 PARTE C: Desenvolvimento de complexos com ciclodextrina

O desenvolvimento dos complexos foi realizado utilizando os extratos das espécies vegetais *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* com a substância β-ciclodextrina (BCD). Para cada extrato das espécies vegetais estudadas foram empregadas duas metodologias de complexação para a incorporação das amostras, a mistura física (MF) e a malaxagem (MAL).

3.3.3.1 Determinação da granulometria dos pós vegetais

A granulometria foi determinada por um dispositivo mecânico com o auxílio de tamises (Granutest®) com abertura nominal de malha de: 710, 500, 250, 180 e 125 µm.

Na análise granulométrica foram pesados 20 g de amostra de cada planta que foram transferidas para o tamis superior. A intensidade de vibração de operação do equipamento foi de 10 e o tempo cerca de 15 minutos. Após o término, toda a amostra retida na superfície superior de cada malha foi transferida para um papel impermeável e pesada.

O percentual retido em cada tamis foi calculado para a descrição da granulometria de cada pó vegetal.

3.3.3.2 Preparação dos extratos

Os pós das folhas de *B. intermedia* e *S. marginata* foram extraídos com etanol 70% (v/v) e o pó das folhas de *T. catappa* foi extraído com etanol 96%, percolação exaustiva (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995).

O pó foi intumescido com o solvente extrator (200 g/1400 mL, m/v) durante 2 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + solvente extrator), com altura de enchimento de 5:1 (percolador:pó das folhas). A vazão do solvente foi de 1,0 -2,0 mL/min/Kg (BRASIL, 2019).

Após a extração, o líquido extraído foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo em temperatura inferior a 40 °C até eliminação do solvente orgânico. Os extratos foram congelados e liofilizados com vácuo a 200 mT por 48 h a -60 °C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados e armazenados sob refrigeração a -26°C até a utilização.

3.3.3.3 Preparação dos sistemas complexos

Os complexos foram preparados com a mistura dos extratos das espécies vegetais *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* com a substância β -ciclodextrina (BCD). Para incorporação das amostras foram empregadas duas metodologias de complexação: mistura física (MF) e malaxagem (MAL).

Os experimentos foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Adley Antonini Neves de Lima do Laboratório Escola de Farmácia Industrial (LEFI) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN e com colaboração do doutorando Renato Dantas de Medeiros.

3.3.3.3.1 Mistura física (MF)

Os complexos obtidos por mistura física (MF) consistiram de uma mistura de BCD com cada extrato na proporção 4:1 (p/p). A mistura BCD+extrato foi adicionada a um gral de porcelana e foi macerada com pistilo até obtenção de uma mistura homogênea. Em seguida, a MF resultante foi mantida em um dessecador até o momento das análises.

3.3.3.3.2 Malaxagem (MAL)

Os complexos obtidos por malaxagem foi realizada de acordo com a metodologia adaptada descrita por GALVÃO *et al.* (2015). Primeiramente, a mistura BCD+extrato (4:1, p/p) foi homogeneizada com pistilo em um gral de porcelana e, em seguida, foi adicionado lentamente etanol (99 %) (aproximadamente 10 mL de solvente para cada 1 g de mistura BCD+extrato) até a formação de um aspecto pastoso. Logo após, as misturas obtidas foram secas em estufa a uma temperatura de até 60 °C. As amostras secas foram armazenadas em dessecador até o momento das análises.

3.3.3.4 Análises de caracterização dos extratos vegetais e complexos sólidos

Os extratos vegetais e os complexos com ciclodextrina de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* foram caracterizados utilizando as seguintes técnicas:

Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR): os experimentos foram realizados em um Espectrofotômetro Nicolet IS 10 FTIR, utilizando o acessório ATR com janela Ge. Os espectros FTIR foram registrados na região entre 4000-650 cm⁻¹, com 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹.

Termogravimetria simultânea e calorimetria de varredura diferencial (TG-DSC): os experimentos foram realizados em um sistema TG-DSC 1 STAR^e da Mettler-Toledo. As análises foram realizadas em atmosferas de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹. Foi adotada uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, com amostras pesando cerca de 5 mg, aquecidas de 30 a 600 °C. Cadinhos de alumina (70 µL) foram utilizados para o registro das curvas TG-DSC.

Difração de Raio X (DRX): os perfis de DRX das amostras foram obtidas em um equipamento DIFFRAC PLUS XRD Commander da marca SIEMENS modelo D5000, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) com um filtro de Ni. A análise foi feita na faixa de $5\text{--}45^\circ$ (2θ), com passo de $0,02^\circ$, corrente de 10 mA e voltagem de 30 kV.

Microscopia de varredura eletrônica (MEV): as análises foram realizadas usando uma emissão de campo frio em um microscópio eletrônico de varredura (FE-SEM; JEOL modelo 7500F). Para obtenção das fotomicrografias, as amostras foram depositadas sobre fitas adesivas de carbono fixadas no suporte (*stub*) do microscópio eletrônico de varredura. As condições operacionais foram utilizadas de acordo com BARRETO; TITA; ORLANDI (2019): tensão acelerada de 2 kV, corrente de emissão de 10 uA, sonda de corrente de 9, distância de trabalho a 7,7 mm, modo de imagem eletrônica secundária (SE), com aumento na magnitude de até 1000 vezes.

RMN: os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Bruker de 600 MHz (14,1 T). Todas as amostras (extratos e misturas com ciclodextrina de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*) foram solubilizadas em 200 μL de $\text{DMSO-}d_6$ (Sigma Aldrich®) para se obter a concentração de 10 mg mL^{-1} e transferidas para tubos de RMN de 3 mm/7". A aquisição dos dados de ^1H RMN foram realizados a 296,2 K utilizando 64 varreduras (*ns*) e com o programa de sequência de pulso padrão zg30. Os espectros de ^1H RMN foram processados utilizando o software MestReNova x64 (versão 14.1.2). Todos os espectros foram manualmente ajustados com referência ao sinal residual do solvente deuterado $\text{DMSO-}d_6$ em 2,500 ppm, e a linha de base foi corrigida usando a função *Whittaker Smoother*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PARTE A: Estudo sazonal das espécies vegetais

Vários estudos publicados na literatura mostraram que as substâncias encontradas em cada uma das espécies vegetais *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* exibem ampla gama de atividades biológicas (ARRUDA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2019; MININEL *et al.*, 2014; OHARA *et al.*, 2020; PÉRICO *et al.*, 2015; PINHEIRO SILVA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2012). Os ácidos fenólicos, taninos e derivados de flavonoides encontrados nessas espécies vegetais demonstraram possuir boas propriedades antioxidantes, que contribuem para a prevenção e tratamento de várias doenças inflamatórias, incluindo úlcera gástrica, diabetes e obesidade (BAKOYIANNIS *et al.*, 2019; MA *et al.*, 2019; SALINAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

Além de suas propriedades farmacológicas, os metabólitos secundários encontrados nas espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* também são considerados responsáveis por desempenhar importantes papéis ecológicos, e seus grupos quimicamente distintos atuam de diferentes maneiras na defesa dessas plantas. Entretanto, o conhecimento ainda é muito limitado quanto à relação entre a composição química dessas espécies vegetais e a variação observada nos metabólitos quando as espécies são colhidas em diferentes períodos do ano. Assim, para compreender melhor a influência da sazonalidade na produção de metabólitos em *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*, empregamos técnicas de espectrometria de massas em conjunto com a de redes moleculares, obtendo um conjunto de dados que permitiu correlacionar a variação sazonal na concentração dos metabólitos secundários com algumas atividades biológicas importantes, como as atividades antioxidantes e antiglicantes.

4.1.1 Anotação do perfil de metabólitos por espectrometria de massas

Cada uma das espécies vegetais foi coletada sazonalmente e seus respectivos extratos foram analisados por HPLC-MS. Para uma mesma espécie, inspeção visual dos cromatogramas de cada uma dessas coletas evidenciou pequenas alterações qualitativas e proeminentes variações quantitativas para alguns dos metabólitos (Figuras 4 a 6).

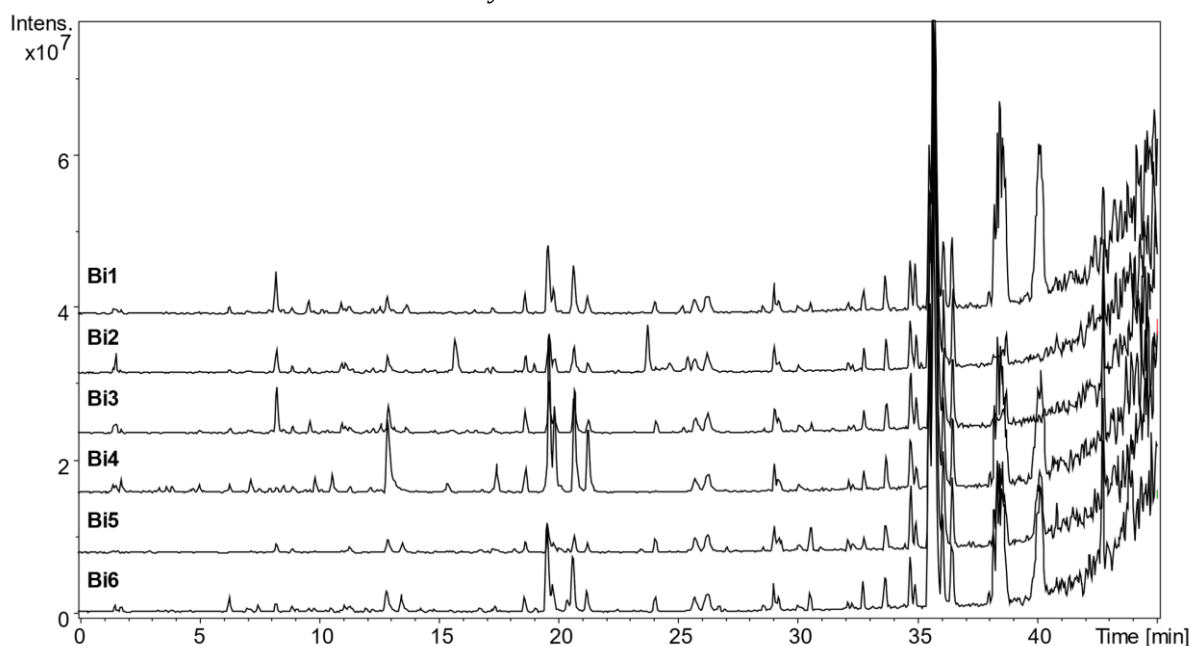
O registro do perfil químico por HPLC-MS mostrou ser uma abordagem adequada e rápida para a detecção da eventual variação sazonal dos metabólitos secundários presentes nas coletas das espécies em estudo. Em contrapartida, essas análises podem gerar um grande

conjunto de dados, que muitas das vezes dificultam a análise de todas as informações obtidas, devido às múltiplas fragmentações que podem ocorrer.

Nesse sentido, as bibliotecas de banco de dados, como a plataforma GNPS, têm desempenhado um papel crucial como centros de aquisição, organização e distribuição desses dados (PILON *et al.*, 2019). Assim, ao avaliar os espectros de fragmentação (MS/MS) utilizando a plataforma GNPS, foi possível fazer anotações mais rápidas, de substâncias conhecidas e seus análogos, nas amostras de extrato de cada espécie vegetal, devido ao agrupamento por similaridade dos íons moleculares e seus fragmentos, que constituem as redes moleculares formadas (PILON *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2016a).

Por isso, as substâncias detectadas nas análises de cada extrato por HPLC-MS foram então anotadas de acordo com a correspondência dos dados MS/MS com a referência espectral com a biblioteca GNPS. Para assegurar maior confiabilidade, as atribuições foram estabelecidas com base em informações previamente relatadas na literatura para as classes representativas de metabólitos ou marcadores químicos para cada gênero e/ou família estudada (base de dados *in-house*). A anotação completa das substâncias detectadas em cada espécie está apresentada nas Tabelas 9 a 11.

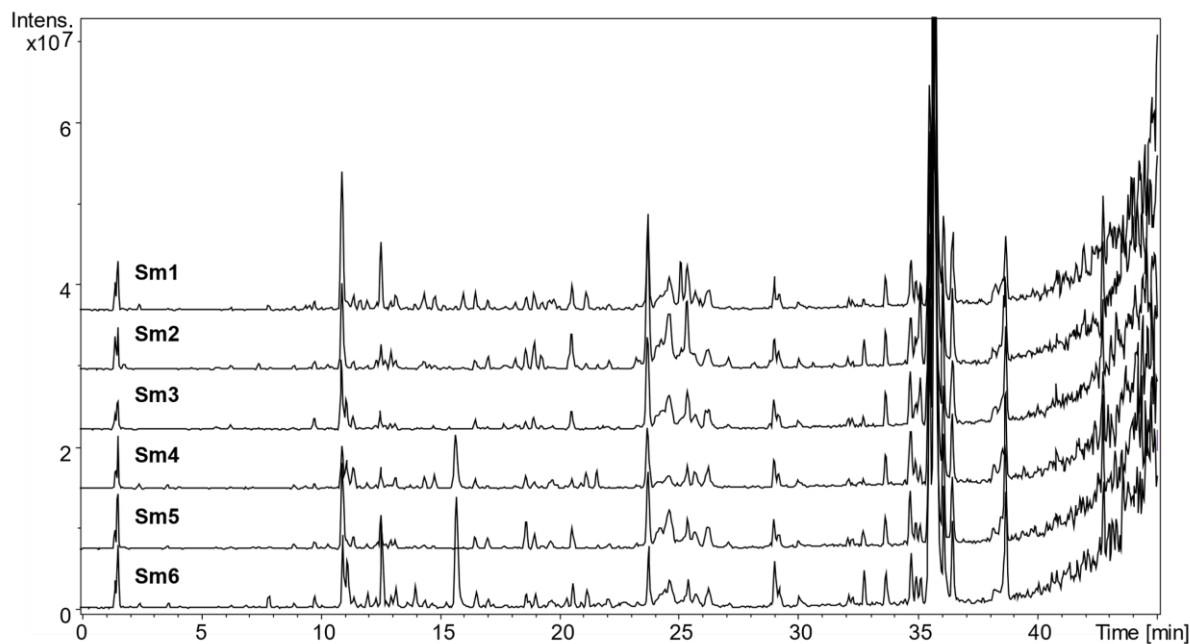
Figura 4 - Cromatogramas do pico base por HPLC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de *Byrsonima intermedia*



Verão (Bi1); Outono (Bi2, Bi3); Inverno (Bi4); Primavera (Bi5, Bi6)

Fonte: próprio autor.

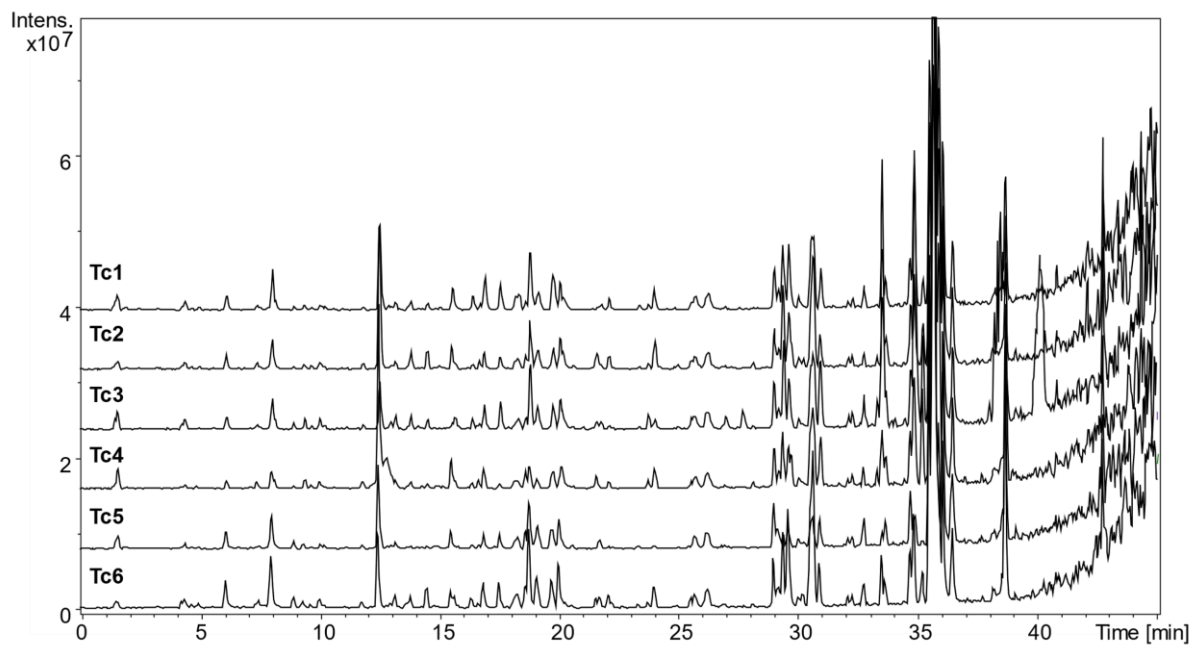
Figura 5 - Cromatogramas do pico base por LC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de *Serjania marginata*



Verão (Sm1, Sm6); Outono (Sm2, Sm3); Inverno (Sm4); Primavera (Sm5)

Fonte: próprio autor.

Figura 6 - Cromatogramas do pico base por LC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de *Terminalia catappa*



Verão (Tc1); Outono (Tc2, Tc3); Inverno (Tc4); Primavera (Tc5, Tc6)

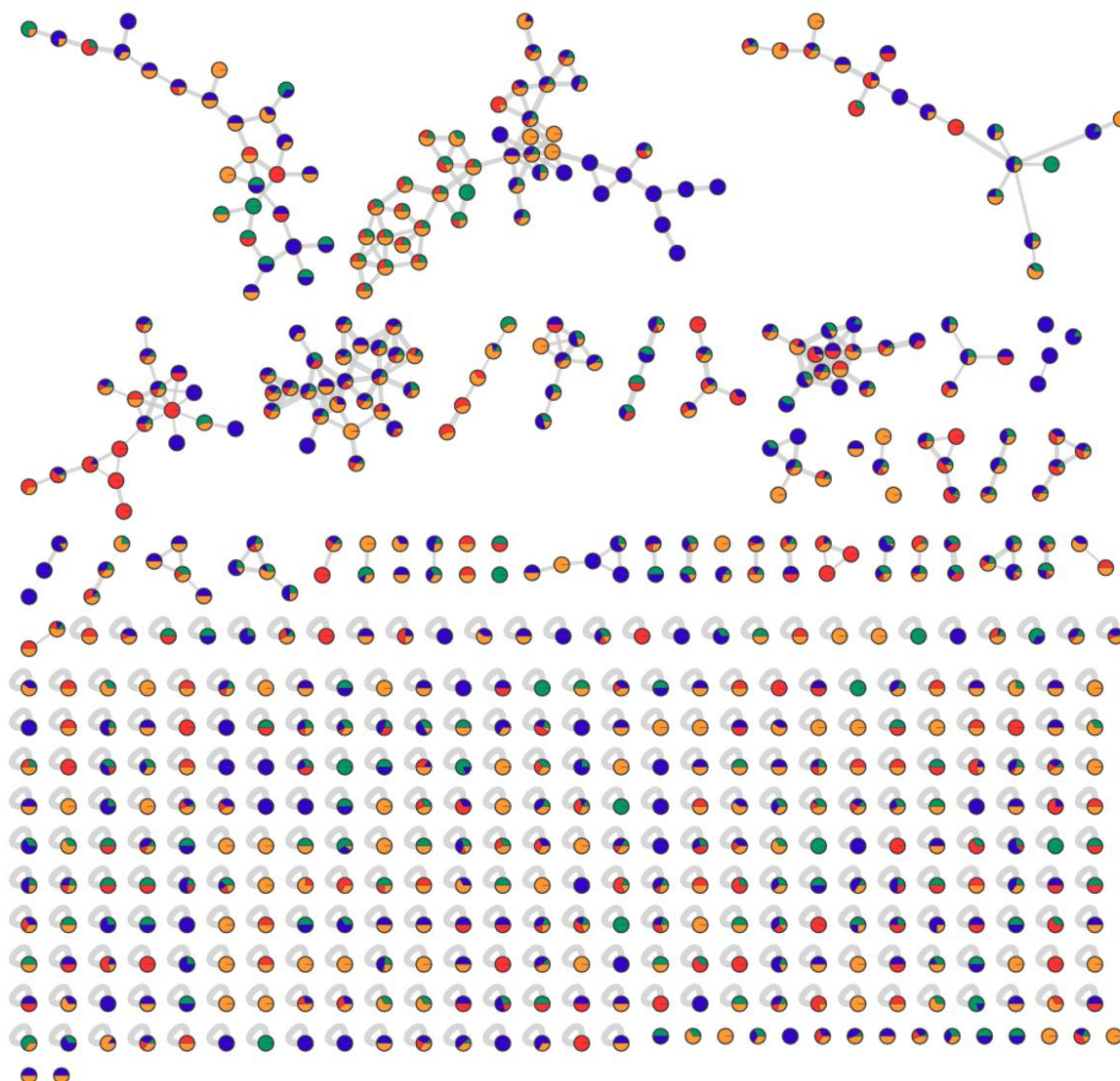
Fonte: próprio autor.

4.1.1.1 Análise da rede molecular para *B. intermedia*

Os dados analisados na plataforma GNPS para os extratos de *B. intermedia* geraram uma rede molecular com 803 íons precursores representados como nodos, que foram agrupados em 46 *clusters* de acordo com a sua similaridade química (escore cosseno) (Figura 7).

A análise do padrão de fragmentação dos íons das moléculas protonadas de acordo com dados da literatura permitiu anotar 39 substâncias nos extratos hidroetanólicos de *B. intermedia*. As redes moleculares foram formadas de acordo com os íons precursores e as perdas neutras características de cada classe, e revelou que essa planta é uma rica fonte de ácidos fenólicos derivados dos ácidos galoilquínico e chiquímico, proantocianidinas, flavonoides glicosilados, e outros fenóis (Tabela 6).

Figura 7 - Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os extratos de *Byrsonima intermedia*



Legenda: ● Verão (Bi1); ● Outono (Bi2, Bi3); ● Inverno (Bi4); ● Primavera (Bi5, Bi6)

Fonte: próprio autor.

Os flavonoides glicosilados estão entre as principais classes de substâncias encontradas nos extratos de *B. intermedia* e foram agrupados em um mesmo *cluster* da rede molecular. Os íons precursores dessa classe de substância em m/z 435 $[M+H]^+$ (**38**), m/z 465 $[M+H]^+$ (**35**), m/z 611 $[M+H]^+$ (**36**), m/z 649 $[M+Na]^+$ (**23**) e m/z 757 $[M+H]^+$ (**34**), foram agrupados devido a fragmentações características relacionadas à perda do glicosídeo, e que resultaram na formação dos íons Y_0^+ em m/z 303 e $[Y_0+Na]^+$ em m/z 325; esses íons produto formados puderam ser atribuídos à aglicona da quercetina (Figura 8).

O glicosídeo foi estabelecido pelo padrão de clivagem da ligação *O*-glicosídica com o rearranjo dos átomos de hidrogênio do grupo hidroxila da unidade de sacarídeo seguida da eliminação do monossacarídeo com perdas de 132 Da (pentose), 146 Da (deoxihexose) e 162

Da (hexose) (VUKICS; GUTTMAN, 2010). Dessa análise foram então anotados flavonoides monoglicosilados (**35** e **38**), diglicosilados (**23** e **36**) e triglicosilado (**34**).

A posição do glicosídeo ligado à aglicona foi proposta como sendo em C-3, baseando-se no estudo realizado por RODRIGUES (2007) para as folhas da espécie *B. intermedia*, no qual foram isolados e identificados os derivados de quercetina 3-*O*-glicosilados. No caso dos flavonoides di-glicosilados, m/z 611 $[M+H]^+$ (**36**) e m/z 649 $[M+Na]^+$ (**23**), essa atribuição mostrou-se evidente, já que a sequência e a distribuição dos resíduos de açúcar para esses flavonoides puderam ser distinguidas pela análise dos íons produto formados (Figura 8, Tabela 6).

No espectro de segunda ordem do íon m/z 611 $[M+H]^+$ (**36**), a presença do íon Z_1^+ em m/z 447 $[M+H-164]^+$ sugere uma ligação interglicosídica no flavonoide *O*-diglicosilado contendo uma deoxihexose como o açúcar terminal. Além disso, a intensidade dos íons produto Y_0^+ $[M+H-146-162]^+$ e Y_1^+ $[M+H-146]^+$, sendo os íons Y_0^+ muito mais intensos que o íon Y_1^+ , indica que a ligação de açúcar ocorre na posição C-3 do núcleo do flavonoide (DOMON; COSTELLO, 1988; VUKICS; GUTTMAN, 2010; ZANATTA *et al.*, 2018) (Figura 8, Tabela 6).

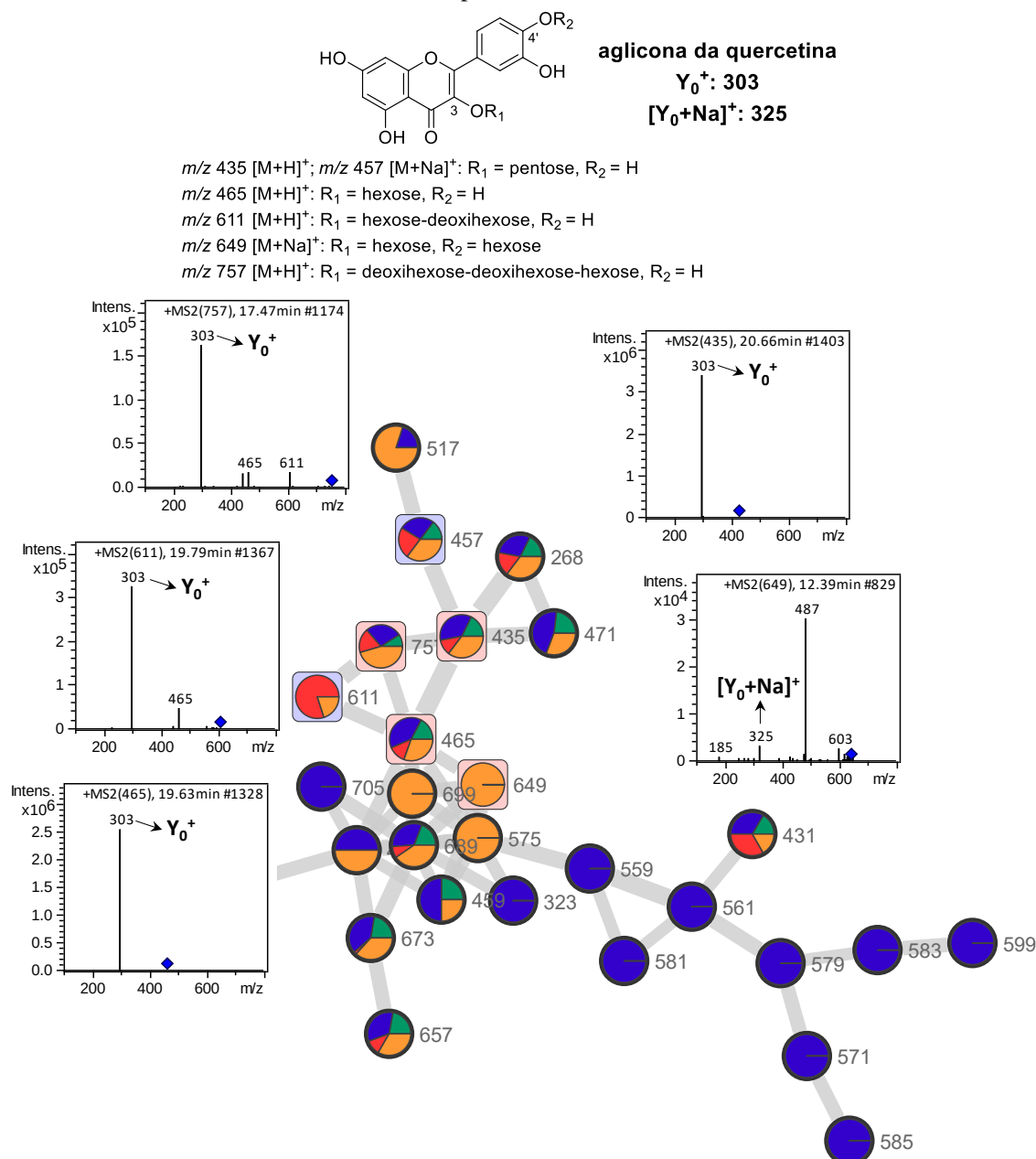
O espectro de massas CID-MS/MS para o íon precursor em m/z 649 $[M+Na]^+$ (**23**), por outro lado, mostrou que o íon Y_1^+ em m/z 487 $[M+H-162]^+$ (perda de uma unidade de hexose) foi o íon mais intenso. Esse padrão de fragmentação sugere que as unidades de açúcar estão ligadas em diferentes posições na aglicona. Além disso, os íons diagnóstico em m/z 308 $[Z_0-H]^+$, m/z 185 $[B_1]^+$ e m/z 271 $[M+H-C_9H_6O_5-Na]^+$, que é um fragmento do anel B que contém o resíduo de açúcar, indicam claramente uma *O*-glicosilação na posição C-4' do flavonoide (CUYCKENS; CLAEYS, 2005; DOMON; COSTELLO, 1988; VUKICS; GUTTMAN, 2010) (Figura 8, Tabela 6).

Os íons referentes aos flavonoides glicosilados com substituição do grupo galoil foram observados em nós separados na rede molecular (Figura 9). A clivagem favorável da ligação *O*-glycosídica para os íons m/z 587 $[M+H]^+$ (**39**) e m/z 617 $[M+H]^+$ (**37**), resultou na eliminação da aglicona quercetina (perda de 302 Da), produzindo o fragmento de maior intensidade B_1^+ em m/z 285 e m/z 315, que estão associados aos grupos pentose-*O*-galoil e hexose-*O*-galoil, respectivamente (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; DOMON; COSTELLO, 1988) (Figura 9, Tabela 6).

Pela representação das coletas realizadas nos nodos (Figura 8 e 9), é possível supor que os flavonoides glicosilados derivados de quercetina tiveram maior concentração durante a primavera e valores menores durante o inverno. Alguns íons precursores agrupados nesse

cluster, de m/z 571 a 599, parecem ter sido produzidos apenas durante a estação do outono (coloridos em azul). Uma análise preliminar dos espectros MS/MS para esses íons mostrou padrão de fragmentação semelhante ao das flavonas C-glicosiladas, porém, experimentos adicionais devem ser realizados para confirmar essa proposição.

Figura 8 - Representação de parte do *cluster* para os flavonoides glicosilados em *Byrsonima intermedia* e espectros de massas MS/MS



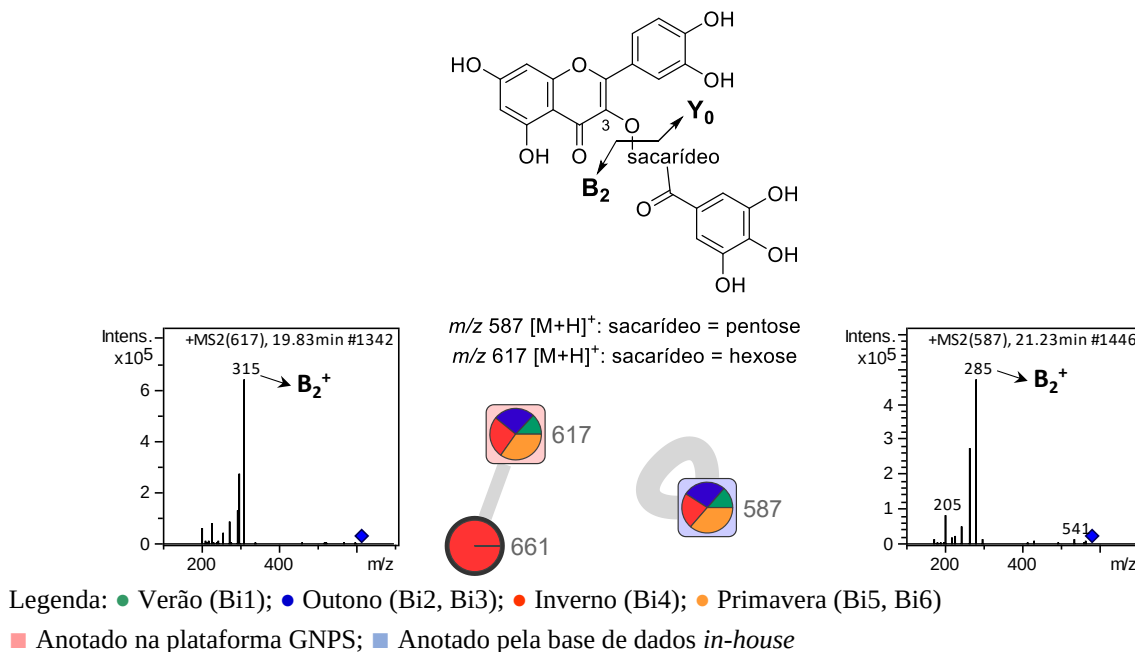
Legenda: ● Verão (Bi1); ● Outono (Bi2, Bi3); ● Inverno (Bi4); ● Primavera (Bi5, Bi6)

■ Anotado na plataforma GNPS; ■ Anotado pela base de dados *in-house*

Fragmentos anotados no espectro MS/MS de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON; COSTELLO (1988).

Fonte: próprio autor.

Figura 9 - Representação dos *clusters* para os flavonoides glicosilados com substituição do grupo galoil em *Byrsonima intermedia* e espectros de massas MS/MS



Fonte: próprio autor.

Os derivados de catequina, proantocinidinas e galato de proantocianidinas foram observados em três *clusters* diferentes na rede molecular (Figura 10). O íon da molécula protonada em m/z 291 (**13** e **24**) foi encontrado como um nodo individual na rede molecular. A fragmentação de segunda ordem desse íon levou à formação dos íons produtos em m/z 273 $[M+H-18]^+$ que corresponde à perda de uma molécula de água, em m/z 165 $[M+H-126]^+$, atribuídas à eliminação do anel A pelo mecanismo de fissão heterocíclica do anel (HRF), em m/z 139 $[M+H+152]^+$ que representa a clivagem do anel em C através de um mecanismo retro-Diels-Alder (RDA) e em m/z 151 $[M+H-18-122]^+$ e m/z 123 $[M+H-18-150]^+$, a partir do íon precursor m/z 273 por uma fissão formadora de benzofurano (BFF) (LI; DEINZER, 2007) (Figura 10, Tabela 6). Esses dados dos espectros de massa MS/MS estão de acordo com os resultados da literatura que indicam a presença de catequina e/ou epicatequina.

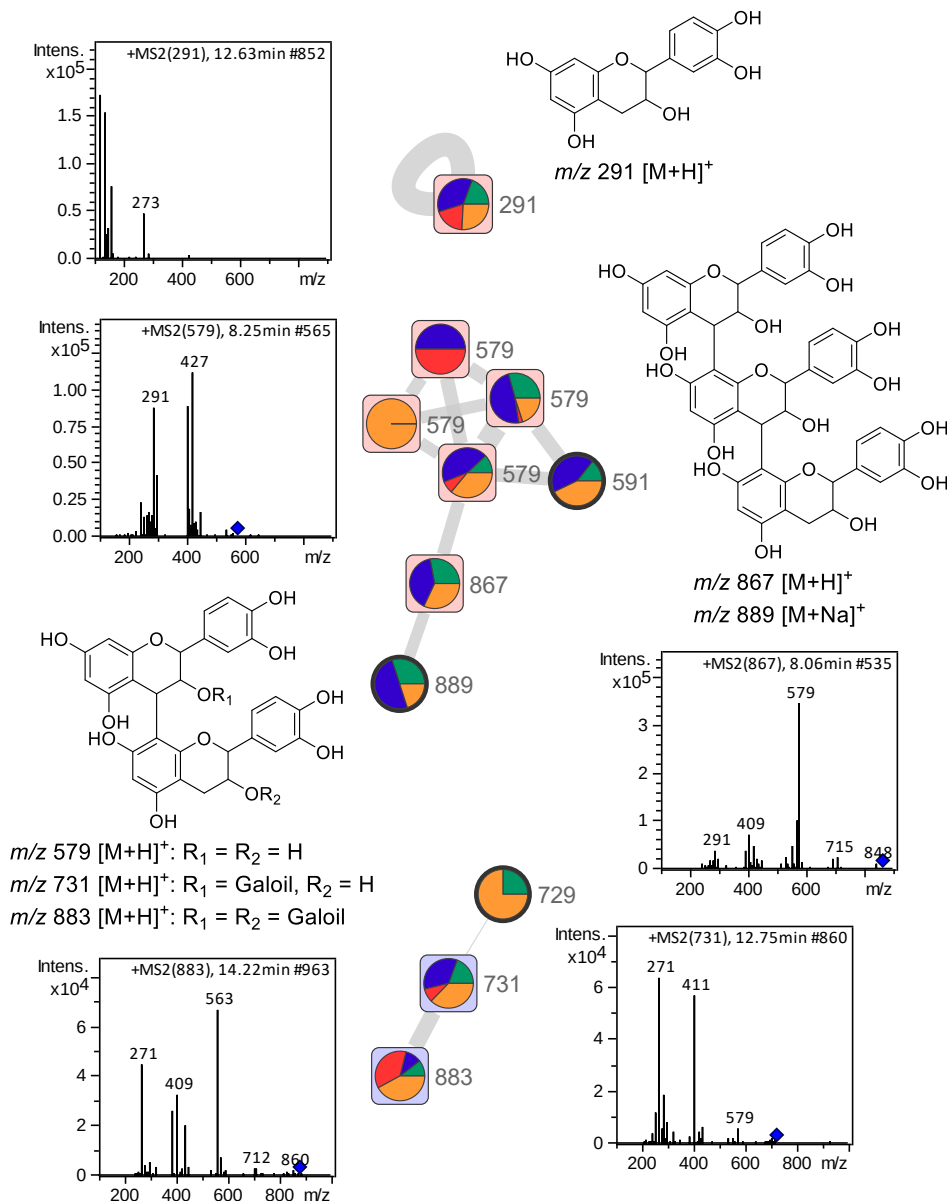
Os íons precursores em m/z 579 $[M+H]^+$ (**8**, **11**, **16** e **19**) e m/z 867 $[M+H]^+$ (**10**), agrupados em um dos *clusters* (Figura 10), apresentaram padrões representativos de fragmentação das proantocianidinas formadas pela ligação interflavana entre as unidades flavan-3-óis. A análise dos espectros de massa MS/MS registrados para esses íons mostrou perdas características similares de 152 Da, referente à eliminação do anel B através da reação de fragmentação RDA do anel C, seguido pela perda de 18 Da, referente à uma molécula de água; e 288 Da, como resultado da eliminação de uma unidade flavan-3-ol através da clivagem

quinona metídeo (QM). Esse padrão de fragmentação é indicativo de proantocianidinas do tipo B formadas por unidades de (epi)catequina (GU *et al.*, 2003); esses resultados, como tal, sugerem que os íons precursores em m/z 579 e m/z 867 são as moléculas protonadas para o dímero e trímero de (epi)catequina, respectivamente (Figura 10, Tabela 6).

Os dímeros de catequina esterificados por unidades de galoil foram anotados como m/z 731 $[M+H]^+$ (**21**, **22** e **25**) e m/z 883 $[M+H]^+$ (**30** e **31**), e foram agrupados em outro *cluster* da rede molecular (Figura 10). A fragmentação de segunda ordem para os íons precursores $[M+H]^+$ em m/z 731 e m/z 883 produziu os fragmentos em m/z 411 $[M+H-320]^+$ e m/z 563 $[M+H-320]^+$, respectivamente, resultante da clivagem do anel C por um mecanismo de fragmentação RDA (Figura 10, Tabela 6). A perda de 320 Da indica a eliminação do anel B que contém o grupo galoil ligado (DELCAMBRE; SAUCIER, 2012; GU *et al.*, 2003; LI; DEINZER, 2007).

Assim, como observado para os flavonoides glicosilados, as proantocinidinas também apresentaram maiores concentrações durante a primavera e valores menores durante o inverno (Figura 10).

Figura 10 - Representação dos *clusters* para as proantocianidinas e os derivados galato em *Byrsonima intermedia* e espectros de massas MS/MS



Legenda: ● Verão (Bi1); ● Outono (Bi2, Bi3); ● Inverno (Bi4); ● Primavera (Bi5, Bi6)

■ Anotado na plataforma GNPS; ■ Anotado pela base de dados in-house

Fonte: próprio autor.

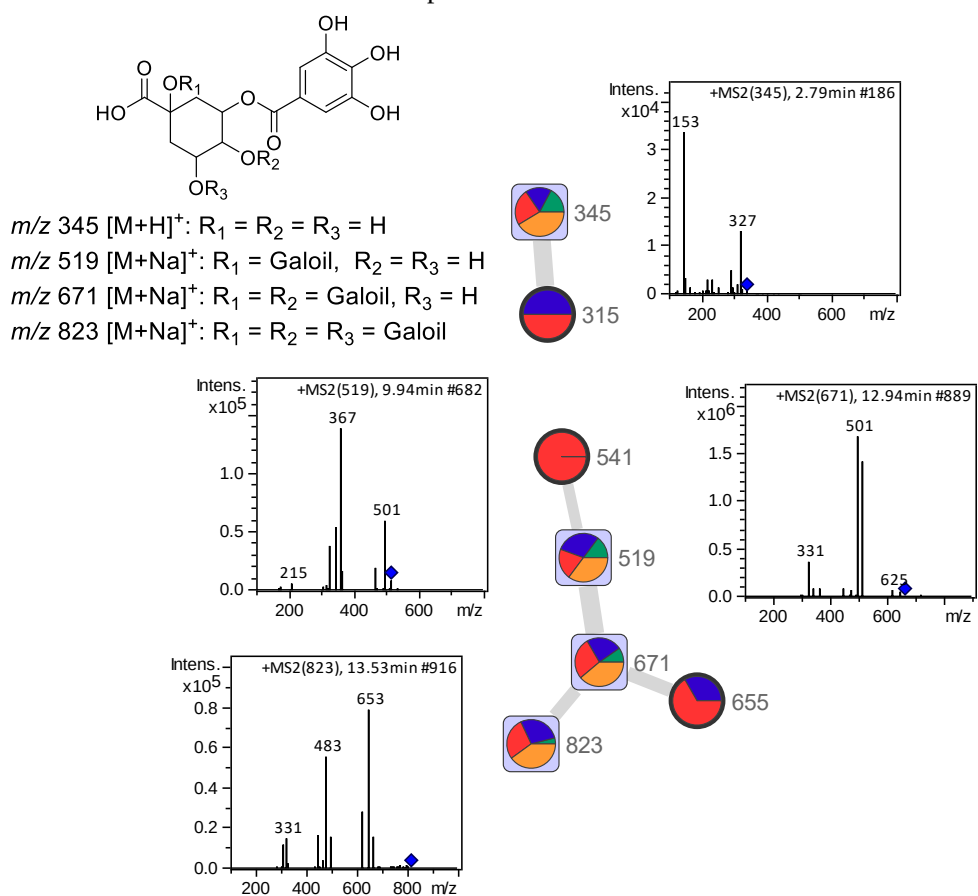
Os derivados do ácido quínico e chiquímico contendo o grupo galato como substituinte também foram uma das principais classes de substâncias encontradas em *B. intermedia*. A análise do espectro de massas de MS/MS registrados para os íons com m/z 345 $[M+H]^+$ (2), m/z 519 $[M+Na]^+$ (1, 9 e 15), m/z 671 $[M+Na]^+$ (6 e 27) e m/z 823 $[M+Na]^+$ (12, 20, 29 e 33) mostraram padrões de fragmentação representativos de derivados do ácido galoilquínico (RODRIGUES, 2007). A série dos ésteres de galato do ácido quínico foi encontrada em dois *clusters* da rede molecular e foi identificada pela formação dos íons produtos $[M+H-152]^+$ e/ou

$[M+H-170]^+$ que correspondem às eliminações do grupo galoil e da molécula de ácido gálico, respectivamente (Figura 11, Tabela 6).

No caso dos derivados do ácido chiquímico $[m/z 479 [M+H]^+ (14, 18 \text{ e } 26)$ e $m/z 631 [M+H]^+ (28)$], esses foram agrupados em um *cluster* com outras substâncias esterificadas, tais como (epi)catequina galato $[m/z 465 [M+Na]^+ (32)]$, *O*-coumaroilhexose $[m/z 349 [M+Na]^+ (17)]$ e *O*-galoilhexose $[m/z 355 [M+Na]^+ (3 \text{ e } 7)]$. Os ésteres galatos do ácido chiquímico e catequina, assim como apresentado para os derivados do ácido galoilquínico, mostraram similaridade devido às perdas neutras de 152 Da (grupo galoil) e 170 Da (molécula de ácido gálico). Já os derivados de hexose esterificados mostraram em comum a formação do fragmento em $m/z 185$, atribuído à unidade hexose, e que foi formado por perdas de 164 Da (unidade de ácido coumaroil) e 170 Da (molécula de ácido gálico) a partir dos íons precursores $m/z 349 [M+Na]^+ (17)$ e $m/z 355 [M+Na]^+ (3 \text{ e } 7)$, respectivamente (Figura 12, Tabela 6).

Pela representação dos nodos na rede molecular para cada coleta é possível supor maior concentração de derivados do ácido galoilquínico e alguns ésteres galato nas amostras de outono e inverno (Figura 11 e 12), enquanto que os derivados ácido galoilchiquímico tiveram maiores concentrações na primavera (Figura 12).

Figura 11 - Representação dos *clusters* para os ésteres de galato do ácido quínico em *Byrsonima intermedia* e espectros de massas MS/MS



Legenda: ● Verão (Bi1); ● Outono (Bi2, Bi3); ● Inverno (Bi4); ● Primavera (Bi5, Bi6)
 ■ Anotado pela base de dados *in-house*

Fonte: próprio autor.

Figura 12 - Representação de parte do *cluster* para os ésteres do ácido galoil e coumaroil em *Byrsonima intermedia* e espectros de massas MS/MS

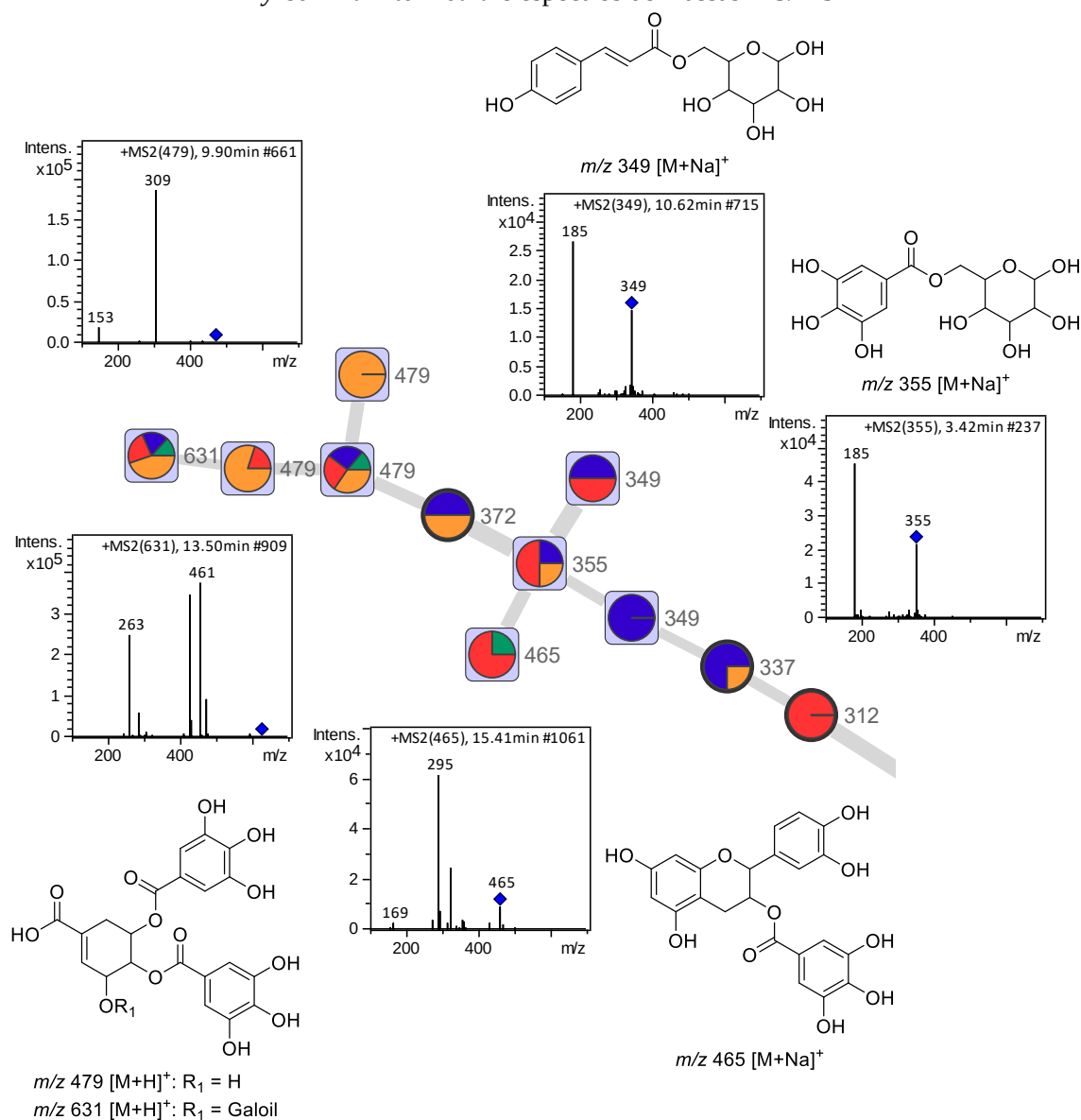


Tabela 6 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de *Byrsonima intermedia*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas

(*Continua*)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Substância	Estação	Referência
1	1,68	519 [M+Na] ⁺	502, 421, 367, 349, 331, 197	Ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	INV; PRI	RODRIGUES, 2007
2	2,79	345 [M+H] ⁺	327, 153	Ácido galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
3	3,42	355 [M+Na] ⁺	204, 185	<i>O</i> -galoilhexose	OUT; INV; PRI	FRAIGE <i>et al.</i> , 2018
4	4,13	171 [M+H] ⁺	153, 127, 109	Ácido gálico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
5	4,82	367 [M+Na] ⁺	321, 215	Ácido galoilquínico	VER; OUT	RODRIGUES, 2007
6	4,99	671 [M+Na] ⁺	518, 462, 327	Ácido tri- <i>O</i> -galoilquínico	INV; PRI	RODRIGUES, 2007
7	6,37	355 [M+H] ⁺	193, 185	Ácido cafeoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
8	7,16	579 [M+H] ⁺	427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
9	7,23	519 [M+Na] ⁺	367, 349, 331, 197	Ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
10	8,06	867 [M+H] ⁺	715, 579, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; PRI	RODRIGUES, 2007
11	8,25	579 [M+H] ⁺	543, 427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
12	9,36	823 [M+Na] ⁺	671, 653, 462, 327	Ácido tetra- <i>O</i> -galoilquínico		RODRIGUES, 2007
13	9,66	291 [M+H] ⁺		(epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
14	9,90	479 [M+H] ⁺	309, 153	Ácido di- <i>O</i> - galoilchiquímico	INV; PRI	MANNOCHIO- RUSSO <i>et al.</i> , 2020
15	9,94	519 [M+Na] ⁺	501, 473, 367, 349, 331	Ácido di- <i>O</i> -galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
16	10,42	579 [M+H] ⁺	427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
17	10,62	349 [M+Na] ⁺	185	<i>O</i> -coumaroilhexose	OUT; INV	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
18	10,63	479 [M+H] ⁺	309, 153	Ácido di- <i>O</i> - galoilchiquímico	VER; OUT; INV; PRI	MANNOCHIO- RUSSO <i>et al.</i> , 2020
19	11,00	579 [M+H] ⁺	427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
20	11,02	823 [M+Na] ⁺	671, 462, 327	Ácido tetra- <i>O</i> -galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007

Tabela 6 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de *Byrsonima intermedia*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas

(Continuação)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Substância	Estação	Referência
21	11,22	731 [M+H] ⁺	579, 441, 411, 331, 291, 271, 259	Galato do dímero (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
22	12,07	731 [M+H] ⁺	579, 411, 331, 291, 271	Galato do dímero (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
23	12,39	649 [M+Na] ⁺	487, 325, 308, 271	Quercetina-3,4'-di-O- hexose	PRI	GNPS
24	12,63	291 [M+H] ⁺	273, 165, 151, 139, 123	(epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
25	12,75	731 [M+H] ⁺	579, 411, 331, 291, 271	Galato do dímero (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
26	12,91	479 [M+H] ⁺	327, 309, 171, 153	Ácido di-O- galoilchiquímico	PRI	MANNOCHIO- RUSSO <i>et al.</i> , 2020
27	12,94	671 [M+Na] ⁺	519, 501, 367	Ácido tri-O-galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
28	13,50	631 [M+H] ⁺	479, 461, 433, 309, 291, 263	Ácido tri-O- galoilchiquímico	VER; OUT; INV; PRI	MANNOCHIO- RUSSO <i>et al.</i> , 2020
29	13,53	823 [M+Na] ⁺	671, 653, 625, 501, 483, 455, 331, 313	Ácido tetra-O-galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
30	14,22	883 [M+H] ⁺	713, 563, 441, 409, 393, 331, 271	Digalato do dímero (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
31	15,23	883 [M+H] ⁺	713, 591, 579, 563, 441, 409, 393, 331, 271	Digalato do dímero (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
32	15,41	465 [M+Na] ⁺	361, 327, 295, 277, 169	(epi)catequina galato	VER; INV	RODRIGUES, 2007
33	15,56	823 [M+Na] ⁺	671, 653, 519, 501, 483, 331, 313, 303	Ácido tetra-O-galoilquínico	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
34	17,47	757 [M+H] ⁺	611, 465, 449, 303	Quercetina-3-O-hexose- deoxihexose-deoxihexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
35	19,63	465 [M+H] ⁺	303	Quercetina-3-O-hexose	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007
36	19,79	611 [M+H] ⁺	465, 303	Quercetina-3-O-hexose- deoxihexose	INV; PRI	RODRIGUES, 2007
37	19,83	617 [M+H] ⁺	315, 303, 261	Quercetina-3-O-(galoil)- hexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
38	20,66	435 [M+H] ⁺	303	Quercetina-3-O-pentose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
38	20,66	457 [M+Na] ⁺	325	Quercetina-3-O-pentose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS

Tabela 6 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de *Byrsonima intermedia*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas

(Conclusão)						
No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Substância	Estação	Referência
39	21,23	587 [M+H] ⁺	303, 285, 267	Quercetina-3-O-(galoil)- pentose	VER; OUT; INV; PRI	RODRIGUES, 2007

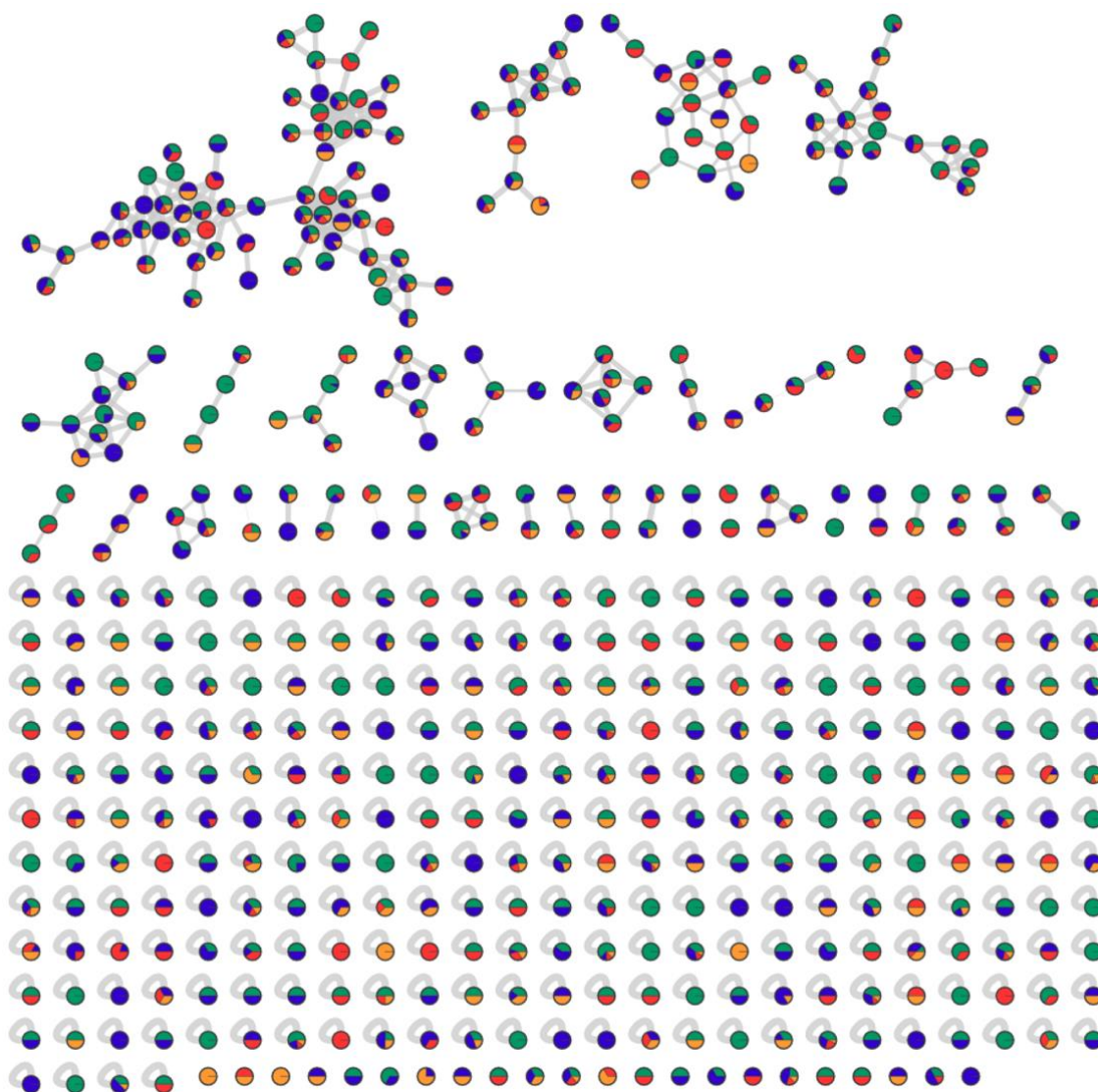
VER: Verão (Bi1); OUT: Outono (Bi2, Bi3); INV: Inverno (Bi4); PRI: Primavera (Bi5, Bi6)

Fonte: próprio autor.

4.1.1.2 Análise da rede molecular para *S. marginata*

Os dados analisados na plataforma GNPS para os extratos de *S. marginata* gerou uma rede molecular com 712 nodos e 58 *clusters* (Figura 13). A análise da rede molecular para *S. marginata* permitiu anotar 38 substâncias (Tabela 7), sendo principalmente substâncias derivadas do ácido quínico, de flavonoides glicosilados, de catequinas e proantocianidinas oligoméricas e de saponinas.

Figura 13 - Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os extratos de *Serjania marginata*



Legenda: ● Verão (Sm1, Sm6); ● Outono (Sm2, Sm3); ● Inverno (Sm4); ● Primavera (Sm5)

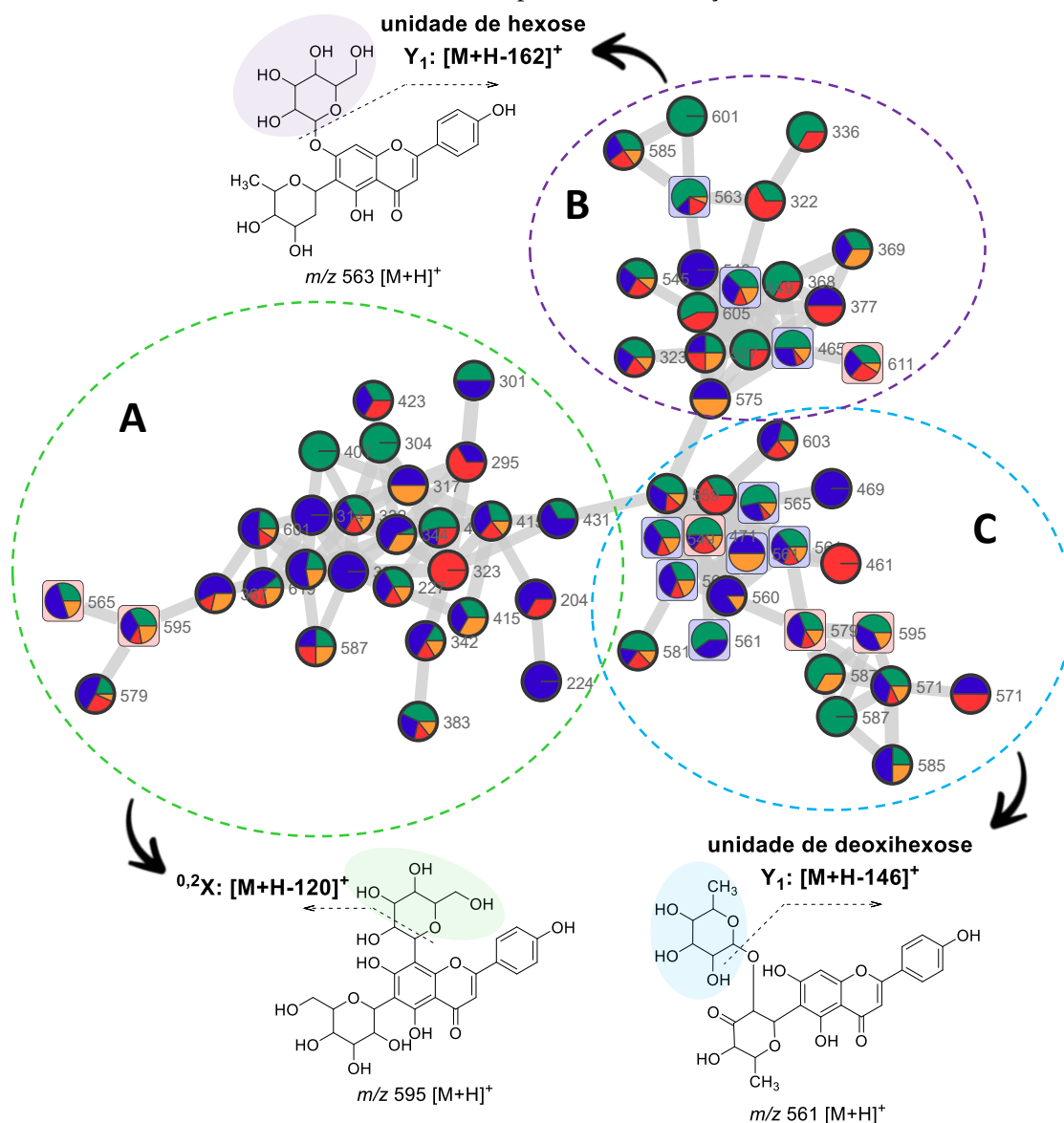
Fonte: próprio autor.

Os íon precursores m/z 193 $[M+H]^+$ (1) e m/z 355 $[M+H]^+$ (2) foram encontrados como nodos individuais na rede molecular a apresentaram padrão de fragmentação característicos do ácido quínico (1) e do ácido *O*-cafeoilquínico (2). A fragmentação de segunda ordem para o íon precursor m/z 355 $[M+H]^+$ (2) resultou na perda característica de 162 Da atribuída ao grupo cafeoil (Tabela 7).

Os flavonoides glicosilados foram agrupados em um mesmo *cluster*, sendo anotados três grupos de acordo com o tipo de ligação glicosídica: flavonoides *O*-glicosilados e *C,O*-diglicosilados e *C*-diglicosilados (Figura 14, Tabela 7). Nesse *cluster* podemos ver ainda três conjuntos diferentes de agrupamentos devido à perda do glicosídeo, sendo observadas perdas

de 120 Da (grupo A), 162 Da (grupo B) e 146 Da (grupo C) (Figura 15). A perda neutra de 120 Da é característica de flavonas C-glicosiladas e está relacionada à clivagem cruzada do anel da unidade de açúcar, que indica que uma hexose está ligada diretamente à aglicona (VUKICS; GUTTMAN, 2010; WARIDEL *et al.*, 2001), enquanto as perdas de 162 Da (hexose) e 146 Da (deoxihexose) estão associadas à clivagem da ligação O-glicosídica, levando à eliminação desses açúcares e são típicos dos flavonoides O-glicosilados e C,O-diglicosilados (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FERRERES *et al.*, 2007).

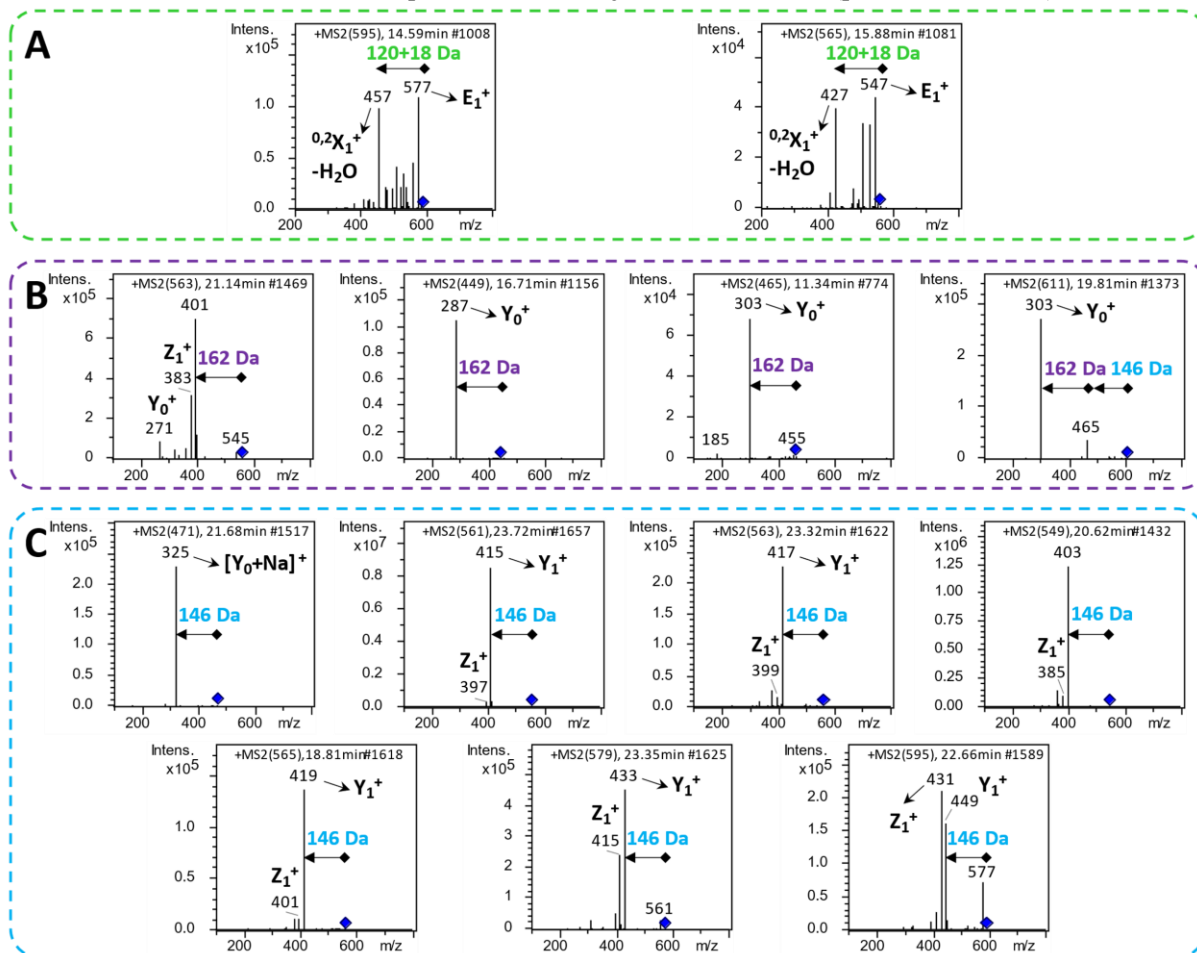
Figura 14 - Representação do *cluster* para flavonoides glicosilados em *Serjania marginata*. (A) flavonas di-C-glicosiladas; (B) flavonóis e flavonas contendo pelo menos um açúcar hexose e (C) flavonóis e flavonas contendo pelo menos um açúcar deoxihexose



Legenda: ● Verão (Sm1, Sm6); ● Outono (Sm2, Sm3); ● Inverno (Sm4); ● Primavera (Sm5)
 ■ Anotado na plataforma GNPS; ■ Anotado pela base de dados *in-house*

Fonte: próprio autor.

Figura 15 - Espectros de massas MS/MS representativos do cluster dos flavonoides glicosilados em *Serjania marginata*. (A) flavonoides di-C-glicosilados (fragmentação cruzada do glicosídeo e eliminação de água); (B) flavonoides contendo pelo menos um açúcar hexose (perdas de 162 Da) e (C) flavonoides contendo pelo menos um açúcar deoxihexose (perdas de 146 Da)



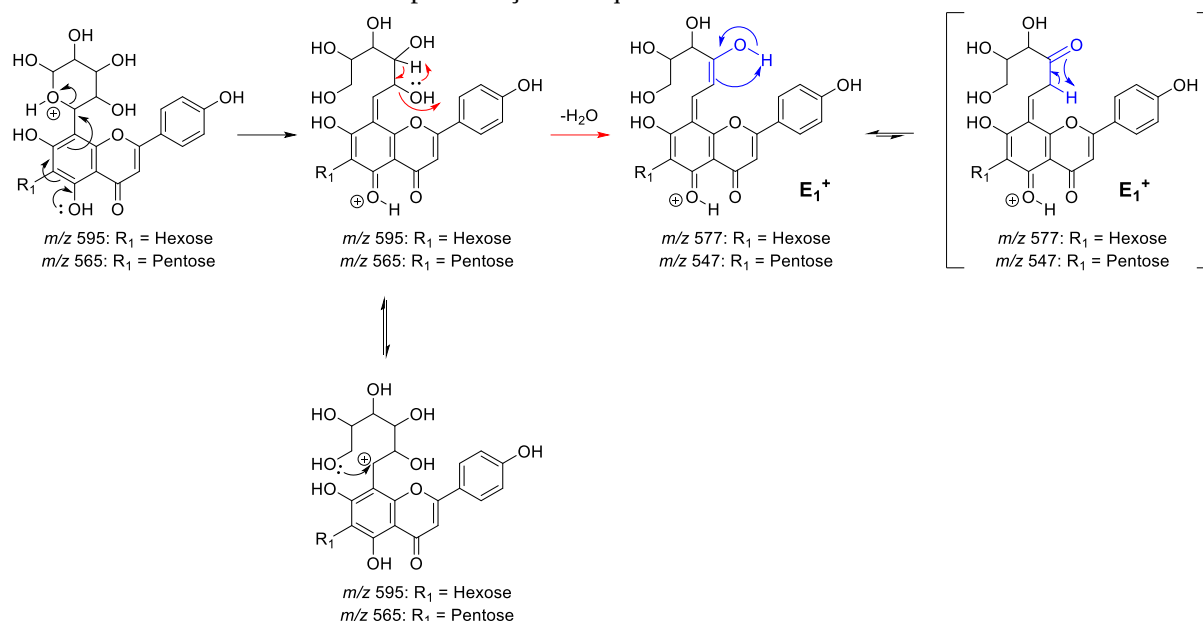
Fragmentos anotados no espectro MS/MS de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON; COSTELLO (1988).

Fonte: próprio autor.

A análise dos espectros de massa MS/MS dos íons precursores $[M+H]^+$ em m/z 595 (**14**) e m/z 565 (**16**) (Tabela 7), encontrados no grupo A, mostrou, além da perda de 120 Da, a formação do íon E_1^+ $[M+H-18]^+$, que é atribuída à eliminação de uma molécula de água, como o íon de maior abundância no espectro MS/MS (Figura 15). A proposta de fragmentação para a formação do íon E_1^+ começa com a protonação do átomo de oxigênio do açúcar seguido pela abertura do anel, que é auxiliado pelo par de elétrons do grupo hidroxila OH-5 do flavonoide. Após a abertura do anel de açúcar, ocorre o processo de desidratação por eliminação nas posições C2'-C3' do açúcar. Posteriormente, o fragmento de enol resultante é equilibrado com a sua forma ceto por tautomerismo, justificando, entre outras coisas, a intensidade do sinal observado (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 1992; WARIDEL *et al.*, 2001) (Figura 16).

Outro fragmento intenso observado nos espectros dos íons m/z 595 (**14**) e m/z 565 (**16**) foi gerado pela perda de 120 Da seguida pela eliminação de uma molécula de água que corresponde ao íon $^{0,2}X^+ - H_2O$ (VUKICS; GUTTMAN, 2010; WARIDEL *et al.*, 2001) (Figura 15).

Figura 16 - Mecanismo de fragmentação de perda de molécula de água em flavonoides C-glicosilados e representação do equilíbrio ceto-enólico



→ mecanismo de perda de uma molécula de água; → mecanismo simplificado do equilíbrio ceto-enólico.

Fonte: Adaptado de DE OLIVEIRA, G.; CARNEVALE NETO, F.; DEMARQUE, D.; DE SOUSA PEREIRA-JUNIOR, J.; SAMPAIO PEIXOTO FILHO, R.; DE MELO, S.; DA SILVA ALMEIDA, J.; LOPES, J.; LOPES, N. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 07, p. 636–646, 2 nov. 2016.

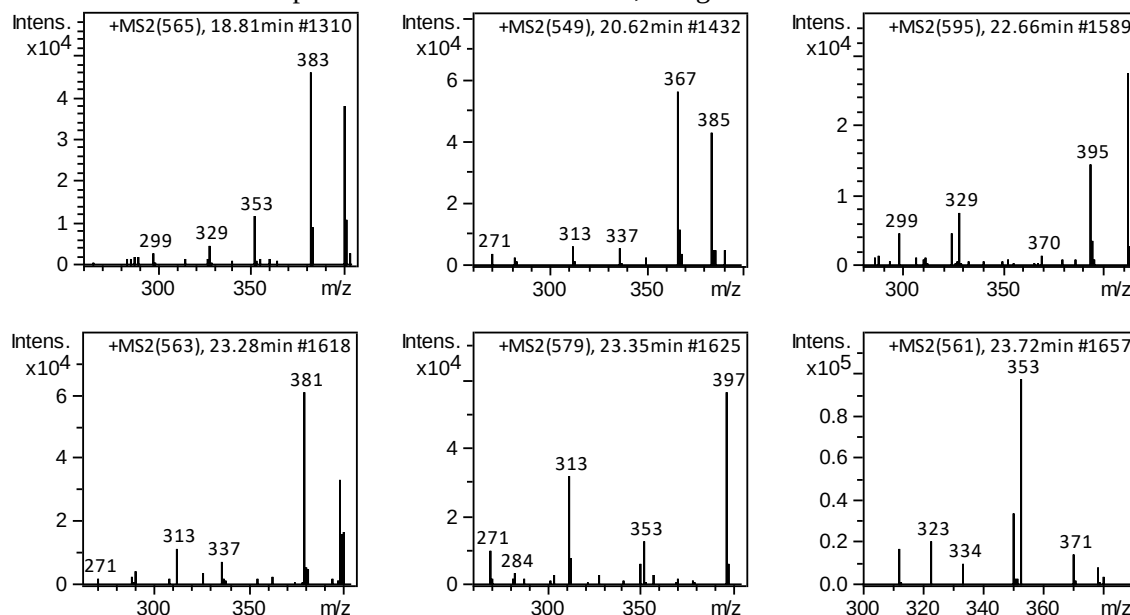
A análise dos espectros de massa MS/MS para os íons precursores em m/z 549 (**24**), m/z 561 (**30 a 32**), m/z 563 (**28**), m/z 565 (**20**), m/z 579 (**21 e 29**) e m/z 595 (**27**) mostrou padrões de fragmentação representativos dos flavonoides C,O-diglicosilados (VUKICS; GUTTMAN, 2010). Esses íons precursores mostraram fragmentações semelhantes, como a clivagem da unidade de açúcar O-glucosil através de reações de rearranjo dos átomos de hidrogênio nas ligações interglicosídicas para produzir os íons Y_1^+ e Z_1^+ que indicam a perda do açúcar terminal, bem como as clivagens cruzadas dos anéis dos resíduos de sacarídeos ligados à aglicona por uma ligação C-glicosídica (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; DOMON; COSTELLO, 1988; FERRERES *et al.*, 2007). A fragmentação a partir dos íons Y_1^+ ou Z_1^+ evidenciou as clivagens cruzadas típicas das unidades de açúcar, levando a perdas neutras de 90 e 104 Da para unidades de pentose e deoxihexose; 44 e 74 Da para unidades de ulose e, 120

Da para unidades de hexose (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FERRERES *et al.*, 2007). A Figura 17 mostra uma ampliação da região do espectro de segunda ordem que evidencia as fragmentações dos C-glicosídeos para os íons precursores dos flavonoides C,O-diglicosilados.

Como exemplo, no espectro de segunda ordem da molécula protonada em m/z 561 (**30** a **32**), a formação do íon Y_1^+ em m/z 415 $[M+H-146]^+$ e do íon Z_1^+ em m/z 397 $[M+H-164]^+$ sugerem a perda do açúcar terminal no flavonoide C,O-diglicosilado, correspondendo a uma deoxihexose ligada muito provavelmente na posição 2"-O da outra fração de açúcar (FERRERES *et al.*, 2007). A fragmentação por CID-MS/MS do íon precursor m/z 397 levou à formação dos íons produtos em m/z 353 $[Z_1-74]^+$ (perda da molécula C_2H_4O) e em m/z 323 $[Z_1-44]^+$ (perda da molécula $C_3H_6O_2$) que estão relacionados com as clivagens cruzadas dos anéis da unidade de açúcar C-glicosídica (Figura 17); esses fragmentos indicam a presença de um 3-oxoglicosídeo (ulose) ligado diretamente à aglicona por uma ligação C-glicosídica.

Também foi possível caracterizar as agliconas dos flavonoides, devido à perda do dissacarídeo que levou à formação dos íons Y_0^+ em m/z 271 e em m/z 287, que foram atribuídos às agliconas das flavonas apigenina e luteolina, respectivamente (DOMON; COSTELLO, 1988; FERRERES *et al.*, 2007).

Figura 17 - Ampliação dos espectros de segunda ordem na região de m/z 200-400 para os íons precursores de flavonoides C,O-diglicosilados



Íons precursores: m/z 565 (**20**), m/z 549 (**24**), m/z 595 (**27**), m/z 563 (**28**), m/z 579 (**21 e 29**) e m/z 561 (**30 a 32**).

Fonte: próprio autor.

A análise do espectro MS/MS do íon precursor em m/z 563 (**25**) indicou padrão de fragmentação de flavonoide di-C,O-glicosilado com os glicosídeos ligados em diferentes

posições da aglicona por ligações C- e O-glicosídicas. O principal íon produto para essa substância foi em m/z 401 Y_0^+ , que corresponde à clivagem da ligação O-glicosídica levou à perdas neutras de uma unidade de hexose. Outros fragmentos de menor intensidade também foram observados, que indicam as clivagem cruzadas do anel do C-glicosídeo, como os íons produtos em m/z 327 $^{0,3}X^+ [Y_0-74]^+$ e m/z 297 $^{0,2}X^+ [Y_0-104]^+$, que sugerem a presença de uma boivinose (DOMON; COSTELLO, 1988; FERRERES *et al.*, 2007; VIEIRA, 2014).

Da mesma maneira, para os flavonoides O-glicosilados em 465 $[M+H]^+$ (**8**), m/z 611 $[M+H]^+$ (**23**), m/z e m/z 471 $[M+Na]^+$ (**26**), é observada a clivagem da ligação O-glicosídica, levando a eliminação do açúcar com perdas de 146 Da (deoxihexose) e 162 Da (hexose) e à formação dos íons produtos mais abundante Y_0^+ em m/z 287 e 303, atribuídos às agliconas dos flavonóis kaempferol e quercetina, respectivamente (Figura 15, Tabela 7) (DOMON; COSTELLO, 1988; VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Assim como na rede molecular de *B. intermedia*, para *S. marginata* também foi encontrado o agrupamento dos íons precursores de proantocianidinas do tipo B (Figura 18). A análise dos espectros de massas MS/MS permitiu identificar os íons precursores de proantocianidinas formadas pela ligação interflavonoídica entre unidades da (epi)catequina em m/z 579 (dímero) (**3**, **5**, **13** e **17**) e, em m/z 867 (trímero) (**4**) (Figura 18, Tabela 7).

Nesse mesmo *cluster*, o íon precursor em m/z 563 $[M+H]^+$ (**12**) também foi anotado como um dímero de proantocianidina do tipo B, porém o espectro de massas de segunda ordem mostrou algumas diferenças na fragmentação. A fragmentação MS/MS de m/z 563 (**12**) levou à formação dos íons produto principais em m/z 427 $[M+H-136]^+$, em m/z 411 $[M+H-152]^+$ e o pico base em m/z 291 $[M+H-272]^+$. A perda neutra de 136 Da indica que o anel B da unidade superior do dímero tem apenas um grupo hidroxila, o que permite sugerir que esse íon é formado pela ligação interflavona de unidades distintas de proantocianidina (GU *et al.*, 2003). Além disso, a clivagem QM levou à formação dos íons diagnóstico em m/z 291 e m/z 273, que foram o resultado das perdas das unidades (epi)afzelequina (272 Da) e (epi)catequina (290 Da), respectivamente, suportando a evidência de conectividade entre as diferentes unidades no dímero (GU *et al.*, 2003) (Figura 18, Tabela 7).

Em outra série homóloga foram anotadas as proantocianidinas do tipo A que contêm ligações interflavanas duplas entre unidades de (epi)catequina com os íons precursores em m/z 577 $[M+H]^+$ (dímero) (**15** e **19**) e m/z 865 $[M+H]^+$ (trímero) (**7**) (Figura 18, Tabela 7). Como observado para o íon m/z 563 $[M+H]^+$ (**12**), o íon precursor m/z 849 $[M+H]^+$ (**9**) mostrou perdas características de um trímero do tipo A que tem a (epi)afzelequina como uma das unidades ligadas a outras duas unidades de (epi)catequina. As proantocianidinas do tipo A foram

Os íons precursores m/z 1068 (**33**), m/z 936 (**34**), m/z 934 (**35**), m/z 1052 (**36**), m/z 1052 (**37**), m/z 920 (**38**) (Tabela 7) mostraram padrões de fragmentação semelhantes com fragmentos de cadeias glicosídicas, que resultaram nos seus agrupamentos no mesmo *cluster* (Figura 19). Além disso, esses íons precursores apresentaram alta abundância e correspondem aos adutos iônicos com sódio contendo um isótopo na molécula $[M+Na+1]^+$, que poderia ser atribuído aos átomos de ^{13}C , 2H ou ^{17}O (mais provavelmente devido ao ^{13}C por causa de sua abundância relativa muito maior) (LIU; LAM; DASGUPTA, 2011).

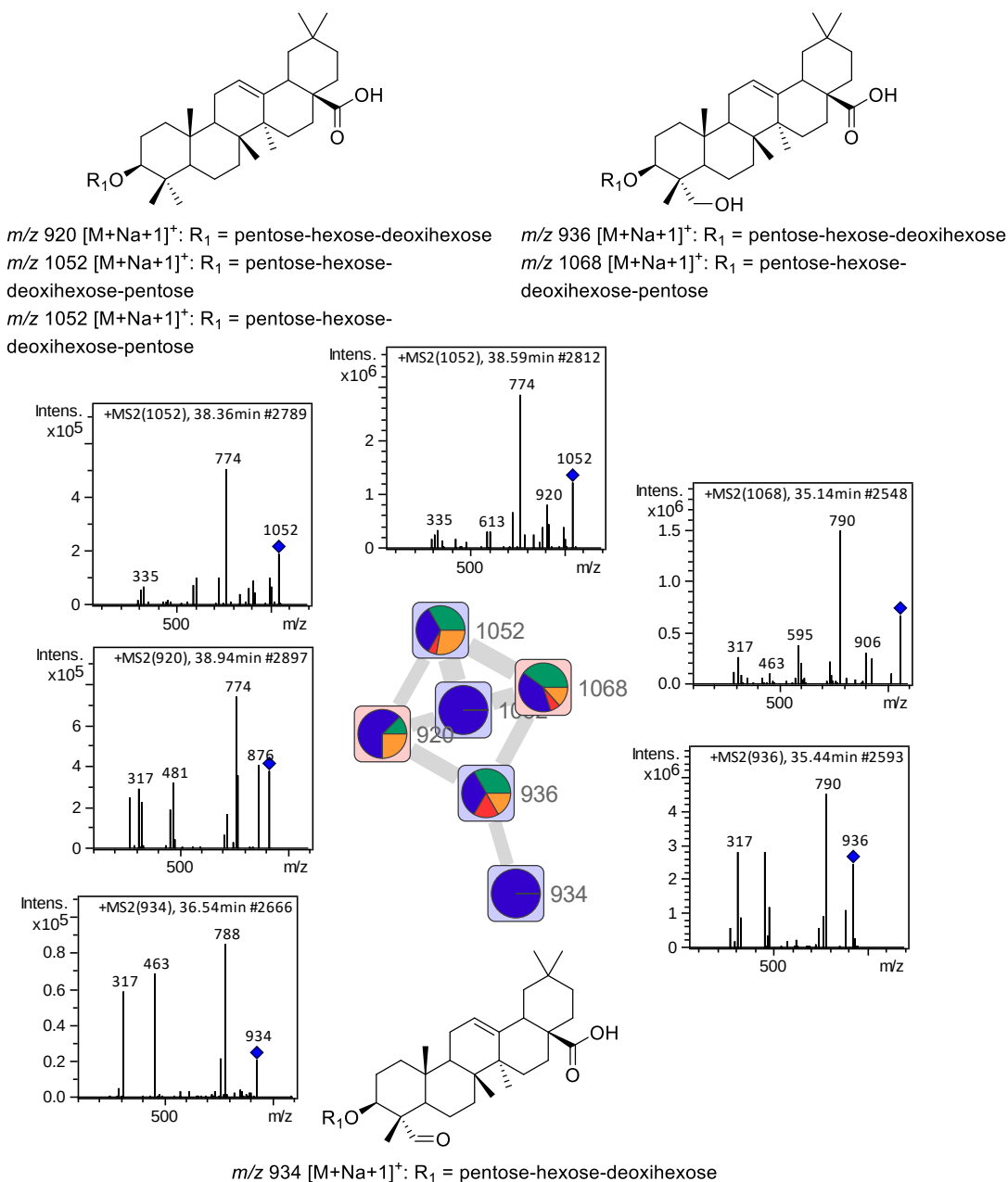
A análise dos espectros de MS/MS indicou a presença de saponinas triterpênicas derivadas do ácido oleanólico (ácido olean-12-en-28-óico) (**36** e **38**), hederagenina (ácido 3,23-di-hidroiolean-12-en-28-óico) (**33**, **34** e **37**) e gipsogenina (ácido 3-hidroxi-23-xo-olean-12-en-28-óico) (**34**) (VIEIRA, 2014; ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021).

Os principais íons produtos observados foram referentes às perdas de sequências dos monossacarídeos e a fragmentação da sapogenina (ZHENG *et al.*, 2007), com perdas de 456 Da (ácido oleanólico), 470 Da (gipsogenina) e 472 Da (hederagenina). Esse tipo de fragmentação com a perda da estrutura de sapogenina como molécula neutra sugere que a cadeia de açúcar está ligada por apenas uma posição, que geralmente é a posição C-3 da sapogenina. Também foram observadas perdas de moléculas neutras como H_2O (18 Da) e CO_2 (44 Da), que são características dessa classe de substância (LI *et al.*, 2010).

Assim, para ilustrar o padrão de fragmentação para as saponinas encontradas em *S. marginata*, temos que a fragmentação de segunda ordem para o íon m/z 1068 $[M+Na+1]^+$ (**33**) resultou na formação dos principais íons produto em m/z 1024 $[M+Na+1-44]^+$, que corresponde à perda neutra de uma molécula de CO_2 ; m/z 936 $[M+Na+1-132]^+$, que corresponde à perda de uma unidade de pentose; m/z 906 $[M+Na+1-162]^+$, que corresponde à perda de uma unidade de hexose; m/z 790 $[M+Na+1-132-146]^+$, que corresponde às perdas de unidades de pentose e deoxihexose) e, m/z 595 $[M+Na-1-472]^+$, que corresponde à perda da molécula de hederagenina. O íon produto em m/z 595 sugere que a cadeia de açúcar é formada pela sequência de glicosídeos pentose-hexose-deoxihexose-pentose.

O *clusters* representativos das classes de substâncias anotadas para *S. marginata*, indicam que as amostras coletadas durante o outono foram provavelmente as que apresentaram a maior concentração de flavonoides glicosilados (Figura 17) e saponinas (Figura 19), enquanto que o verão apresentou maior teor em proantocianidinas (Figura 18).

Figura 19 - Representação do *cluster* para as saponinas em *Serjania marginata* e espectros de massas MS/MS



Legenda: ● Verão (Sm1, Sm6); ● Outono (Sm2, Sm3); ● Inverno (Sm4); ● Primavera (Sm5)

■ Anotado na plataforma GNPS; ■ Anotado pela base de dados *in-house*

$[M+Na+1]^+$: isotópos dos adutos iônicos com um isótopo na molécula (^{13}C , 2H ou ^{17}O).

Fonte: próprio autor.

Tabela 7 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de *Serjania marginata*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas

(Continua)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Anotação	Estação	Referência
1	1,85	193 [M+H] ⁺	165, 147, 105, 85	Ácido quínico	INV; PRI	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
2	6,30	355 [M+H] ⁺	295, 193	Ácido O-cafeoilquínico	VER; INV; PRI	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
3	9,55	579 [M+H] ⁺	427, 409, 291, 289, 163	(epi)catequina-	OUT; INV	GNPS
4	10,15	867 [M+H] ⁺	715, 697, 579, 451, 427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	VIEIRA, 2014
5	10,95	579 [M+H] ⁺	561, 427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
6	11,01	593 [M+H] ⁺	471, 441, 423, 307, 289	(epi)galocatequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
7	11,21	865 [M+H] ⁺	713, 695, 533, 453, 413, 301, 287	(epi)catequina-A- (epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
8	11,34	465 [M+H] ⁺	303	Quercetina-O-hexose	VER; OUT; INV; PRI	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
9	12,12	849 [M+H] ⁺	713, 679, 517, 395, 287	(epi)afzelequina-A- (epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
10	12,41	889 [M+Na] ⁺	737, 719, 601, 449, 313	(epi)catequina- (epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
11	12,61	291 [M+H] ⁺	273, 165, 151, 139, 123	(epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
12	13,07	563 [M+H] ⁺	544, 427, 411, 393, 329, 291, 273	(epi)afzelequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA- EBEL, 2021
13	13,43	579 [M+H] ⁺	427, 409, 301, 291, 247	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; PRI	GNPS
14	14,59	595 [M+H] ⁺	577, 529, 511, 475, 457, 427, 409	Apigenina-6,8-di-C-hexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS

Tabela 7 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de *Serjania marginata*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas

(Continuação)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Anotação	Estação	Referência
15	15,71	577 [M+H] ⁺	559, 437, 425, 287	(epi)catequina-A- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015 GNPS
16	15,88	565 [M+H] ⁺	547, 529, 511, 427, 409	Apigenina-C-hexose-C- pentose	VER; OUT; PRI	GNPS
17	16,56	579 [M+H] ⁺	453, 427, 409, 291	(epi)catequina- (epi)catequina	VER; OUT; INV; PRI	VIEIRA, 2014
18	16,71	449 [M+H] ⁺	287	Kaempferol-O-hexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
19	18,32	577 [M+H] ⁺	559, 425, 299, 287	(epi)catequina-A- (epi)catequina	VER; OUT; INV	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
20	18,81	565 [M+H] ⁺	419, 401, 383, 353, 315, 299, 287	Luteolina-C-[-O- (deoxihexose)-pentose]	VER; OUT; INV; PRI	BEZERRA <i>et al.</i> , 2016
21	19,01	579 [M+H] ⁺	433, 367, 313, 271	Apigenina-C-[-O- (deoxihexose)-hexose]	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
22	19,12	595 [M+H] ⁺	449, 287	Luteolina-O-hexose- deoxihexose	VER; OUT; INV; PRI	BEZERRA <i>et al.</i> , 2016
23	19,81	611 [M+H] ⁺	465, 303	Quercetina-O-hexose- deoxihexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
24	20,62	549 [M+H] ⁺	403, 385, 367, 351, 337, 313, 271	Apigenina-C-[-O- (deoxihexose)-pentose]	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
24	20,62	571 [M+Na] ⁺	481, 425, 407, 389, 365, 335 305	Apigenina-C-[-O- (deoxihexose)-pentose]	VER; OUT; INV; PRI	Proposta
25	21,14	563 [M+H] ⁺	545, 401, 383, 271	Apigenina-C-boivinose-O- hexose	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
25	21,14	585 [M+Na] ⁺	567, 423, 405, 349, 319	Apigenina-C-boivinose-O- hexose	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
26	21,68	471 [M+Na] ⁺	325	Quercetina-O-deoxihexose	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA- VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
27	22,66	595 [M+H] ⁺	577, 449, 431, 413, 395, 329, 299, 287	Luteolina-C-[-O- (deoxihexose)-hexose]	VER; OUT; PRI	GNPS
28	23,28	563 [M+H] ⁺	417, 399, 337, 313, 271	Apigenina-C-[-O- (deoxihexose)- deoxihexose]	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
28	23,28	585 [M+Na] ⁺	439, 421, 305	Apigenina-C-[-O- (deoxihexose)- deoxihexose]	VER; OUT; INV; PRI	GNPS

Tabela 7 - Proposta de identificação dos principais metabólitos dos extratos de *Serjania marginata*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas

(Conclusão)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Anotação	Estação	Referência
29	23,35	579 [M+H] ⁺	561, 433, 415, 397, 353, 313, 271	Apigenina-C-[-O-(deoxihexose)-hexose]	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
30	23,76	561 [M+H] ⁺	415, 397, 371, 353, 313, 271	Apigenina-6-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] (cassiaoccidentalina A)	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
31	24,38	561 [M+H] ⁺	415, 397, 371, 353, 313, 271	Apigenina-8-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] (tetrastigma B)	VER; OUT; INV; PRI	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
32	25,42	561 [M+H] ⁺	415, 397, 371, 353, 313, 271	Apigenina-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose]	OUT; PRI	Proposta
33 ^a	35,14	1068 [M+Na+1] ⁺	1024, 936, 906, 790, 595, 613, 481, 463	Hederagenina 3-O-(pentose-hexose-deoxihexose-pentose)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
34 ^a	35,44	936 [M+Na+1] ⁺	892, 790, 628, 481, 463	Hederagenina 3-O-(pentose-hexose-deoxihexose)	VER; OUT; INV; PRI	VIEIRA, 2014
35 ^a	36,54	934 [M+Na+1] ⁺	788, 772, 463, 317	Ácido 3-O-(pentose-hexose-deoxihexose)-23-oxo-olean-12-en-28-óico	OUT	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
36 ^a	38,36	1052 [M+Na+1] ⁺	1008, 920, 890, 774, 730, 613, 568, 463	Ácido oleanólico 3-O-(pentose-hexose-deoxihexose-pentose)	OUT	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
37 ^a	38,59	1052 [M+Na+1] ⁺	1008, 920, 890, 774, 730, 613, 568, 481, 433	Ácido oleanólico 3-O-(pentose-hexose-deoxihexose-pentose)	VER; OUT; INV; PRI	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
38 ^a	38,94	920 [M+Na+1] ⁺	876, 774, 481, 463	Ácido oleanólico 3-O-(pentose-hexose-deoxihexose)	VER; OUT; PRI	GNPS

VER: Verão (Sm1, Sm6); OUT: Outono (Sm2, Sm3); INV: Inverno (Sm4); PRI: Primavera (Sm5)

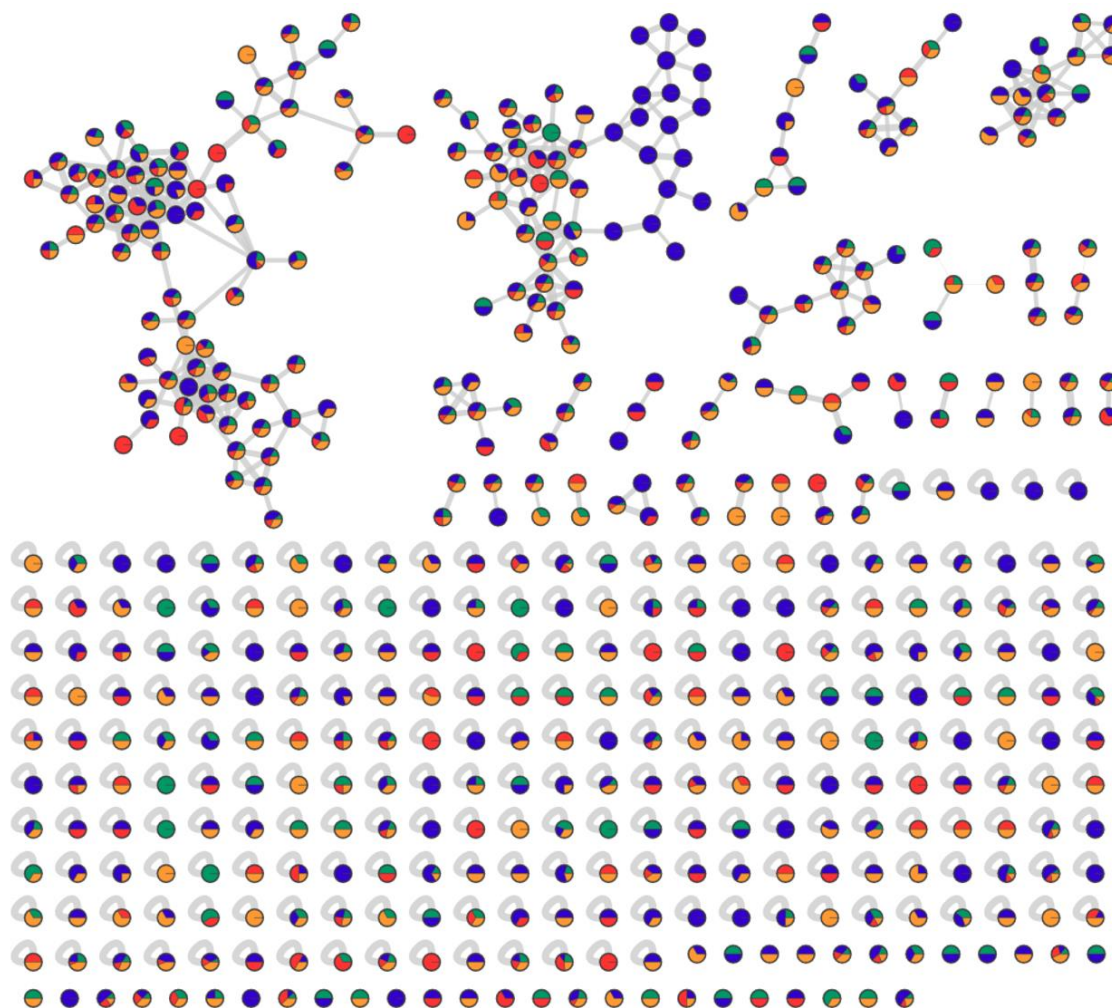
^aIsotópos dos adutos iônicos com um [M+Na+1]⁺ isótopo na molécula (¹³C, ²H ou ¹⁷O).

Fonte: próprio autor.

4.1.1.3 Análise da rede molecular para *T. catappa*

Os dados analisados na plataforma GNPS para os extratos de *T. catappa* gerou uma rede molecular com 762 nodos e 40 *clusters* (Figura 20). A análise da rede molecular para *T. catappa* permitiu identificar 42 substâncias, da classe dos taninos hidrolisáveis, flavonoides glicosilados e derivados do ácido elágico (Tabela 8).

Figura 20 - Mapa das redes moleculares geradas pelo GNPS para os extratos de *Terminalia catappa*



Legenda: ● Verão (Tc1); ● Outono (Tc2, Tc3); ● Inverno (Tc4); ● Primavera (Tc5, Tc6)

Fonte: próprio autor.

Dois tipos diferentes de taninos hidrolisáveis foram anotados, incluindo a classe dos galotaninos, que contêm grupos galoil, e elagitaninos, que contêm grupos hexahidroxidifenóis (HHDP) em sua estrutura (CHANG *et al.*, 2019) (Tabela 8). Os íons precursores dessas substâncias foram agrupados em um mesmo *cluster* da rede molecular.

Os galotaninos com íons precursores em m/z 355 $[M+Na]^+$ (**1** e **7**), m/z 507 $[M+Na]^+$ (**17**) e m/z 659 $[M+Na]^+$ (**13** e **20**) foram agrupados devido à formação dos íons produto $[M+Na-170]^+$ e $[M+Na-152]^+$, que correspondem às perdas neutras de ácido gálico e do grupo galoil, respectivamente. Para fins de ilustração, as substâncias **13** e **20** com o íon $[M+Na]^+$ em m/z 659 gerou perdas neutras consecutivas de 170 Da (perda da molécula de ácido gálico) e/ou 152 Da (perda do grupo galoil) em m/z 489 $[M+Na-170]^+$, m/z 337 $[M+Na-170-152]^+$ e m/z 319 $[M+Na-170-170]^+$. Esse padrão de fragmentação, que está de acordo com os dados publicados

na literatura, permitiu sugerir a presença da substância tri-*O*-galoilhexose (PFUNDSTEIN *et al.*, 2010).

Análise dos espectros MS/MS dos íons precursores em m/z 807 $[M+Na]^+$ (**4**), m/z 657 $[M+Na]^+$ (**12** e **19**), m/z 809 $[M+Na]^+$ (**16**, **23** e **26**), m/z 959 $[M+Na]^+$ (**18**) e m/z 483 $[M+H]^+$ (**22**) mostrou perdas características similares de 152 Da, referente à perda do grupo galoil, de 302 Da referente à eliminação do grupo HHDP e de 320 Da referente às perdas sequenciais de 18 Da (perda neutra de água) e 302 Da (perda neutra do grupo HHDP). Esse padrão de fragmentação corresponde aos elagitaninos que contêm grupos HHDP ligados ao açúcar hexose (CHANG *et al.*, 2019) (Figura 21, Tabela 8).

O espectro de segunda ordem para os íons precursores em m/z 805 $[M+Na]^+$ (**2**), m/z 957 $[M+Na]^+$ (**6**) e m/z 1107 $[M+Na]^+$ (**8** e **11**), também foram atribuídos à classe dos elagitaninos. Esses íons apresentaram as principais perdas de 320 Da, referente às perdas sequenciais de uma molécula de água e do grupo HHDP, e de 446 Da correspondente à eliminação ao grupo galagil. Para ilustrar esse padrão de fragmentação, as substâncias **8** e **11** que apresentam o íon $[M+Na]^+$ em m/z 1107, foram anotados como isômeros da punicalagina. Para esses íons precursores, a fragmentação de segunda ordem resultou na formação dos íons produto principais em m/z 787 $[M+Na-18-302]^+$, que correspondem às perdas sequenciais de 18 Da (perda de uma molécula de água) e 302 Da (perda neutra do grupo HHDP); m/z 805 $[M+Na-302]^+$ (perda neutra do grupo HHDP); e m/z 661 $[M+Na-446]^+$, o que indica a presença do grupo ácido galágico (MININEL *et al.*, 2014) (Figura 21, Tabela 8).

Os íons precursores em m/z 975 $[M+Na]^+$ (**10**) e m/z 977 $[M+Na]^+$ (**23**) também foram anotados como pertencentes à classe dos elagitaninos, porém os espectros de massa de segunda ordem para esses íons mostraram algumas diferenças no padrão de fragmentação em comparação com o resto dos elagitaninos e, portanto, foram encontrados como nós individuais na rede molecular (Figura 21, Tabela 8). A fragmentação do íon precursor m/z 975 $[M+Na]^+$ (**10**) produziu os fragmentos principais em m/z 673 $[M+Na-302]^+$, referente à perda neutra do grupo HHDP e em m/z 505 $[M+Na-470]^+$, referente à perda do grupo valoneoil, que consiste de um grupo HHDP ligado a um grupo galoil através da ligação C-O-C (MOILANEN; SINKKONEN; SALMINEN, 2013) (Figura 21, Tabela 8). Para o íon m/z 977 $[M+Na]^+$ (**24**), a principal diferença observada em comparação com os outros elagitanos, foi devida à perda de 320 Da, que foi atribuída ao grupo quebuloil na molécula (FANG *et al.*, 2019) (Figura 21, Tabela 8).

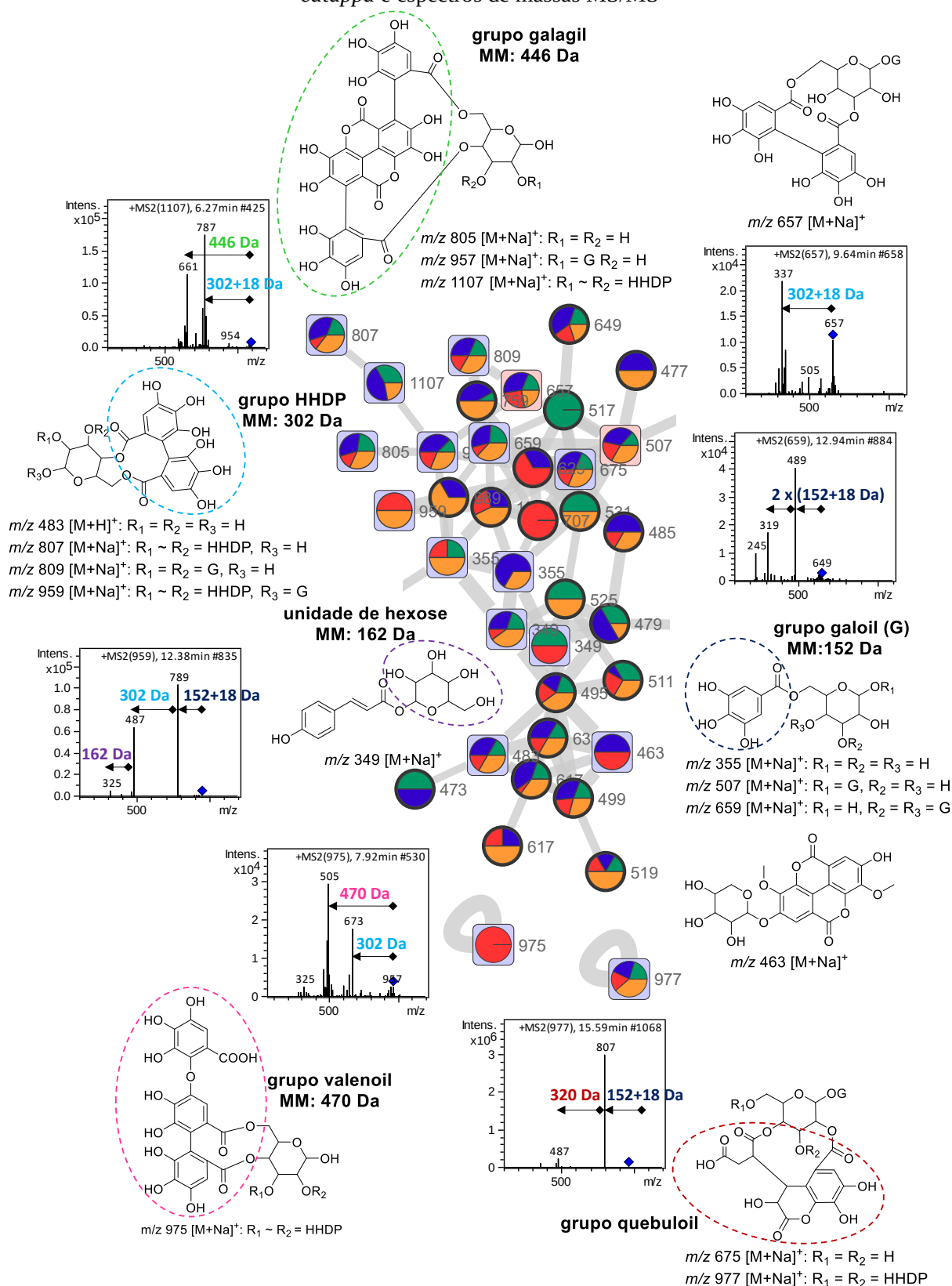
O íon precursor em m/z 603 $[M+H]^+$ (**3**) foi encontrado em outro *cluster* da rede molecular, sendo que a fragmentação desse íon levou à formação do íon produto de maior

intensidade em m/z 303 como resultado da lactonização do grupo HHDP em ácido elágico (perda neutra de 300 Da) (LIU; SEERAM, 2018).

Outros íons precursores também foram anotados nesse *cluster*, como os íons m/z 349 $[M+H]^+$ (**14** e **15**) e m/z 463 $[M+H]^+$ (**40**), que foram atribuídos às substâncias O-coumaroilhexose e ácido elágico di-O-metil-O-(pentose) (Figura 21, Tabela 8).

Alguns derivados do ácido elágico não foram agrupados em um mesmo *cluster*. Os íon precursores m/z 303 $[M+H]^+$ (**36**), m/z 449 $[M+H]^+$ (**37**) e m/z 317 $[M+H]^+$ (**42**) apresentaram padrão de fragmentação característicos do ácido elágico, do ácido elágico O-metil-O-(pentose) e do ácido elágico O-metil, respectivamente (Tabela 8).

Figura 21 - Representação de parte do *cluster* para os galotaninos e elagitaninos em *Terminalia catappa* e espectros de massas MS/MS



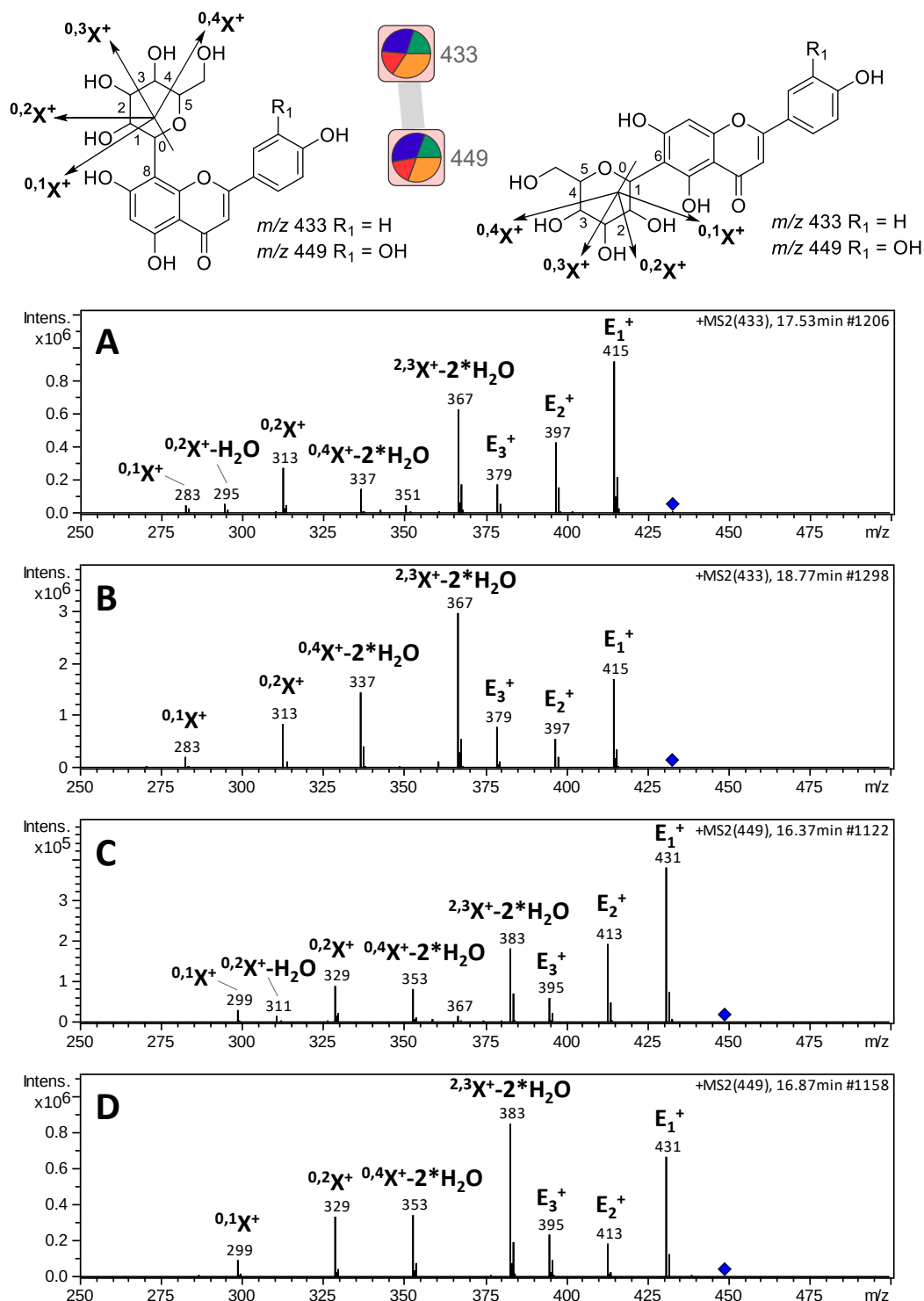
A família dos flavonoides glicosilados foi provisoriamente identificada de acordo com três grupos: C-glicosilados, O-glicosilados, divididos em mono e di-glicosilados, e O-galoil flavonoides.

A análise dos espectros de massa MS/MS dos íons precursores em m/z 611 $[M+H]^+$ (33), m/z 465 $[M+H]^+$ (34), m/z 449 $[M+H]^+$ (38) e m/z 595 $[M+H]^+$ (39) mostraram fragmentações características dos flavonoides O-glicosilados (primeiro *cluster* da rede molecular apresentado na Figura 20). Assim como discutido previamente para *B. intermedia* e *S. marginata*, o glicosídeo foi identificado pela eliminação da unidade de açúcar, sendo observadas perdas de 146 Da (deoxihexose) e 162 Da (hexose) levando à formação dos íons produtos em m/z 287 e m/z 303, que foram atribuídos às agliconas dos flavonois kaempferol e quercetina, respectivamente (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; VUKICS; GUTTMAN, 2010).

A análise dos espectros de massa MS/MS registrados para os íons precursores com m/z 449 (25 e 27) e m/z 433 (28 e 31) mostraram padrões de fragmentação representativos de isômeros de flavonoides 6-C e 8-C glicosilados. Estudos relatados na literatura mostram que os isômeros 8-C-glicosilados, luteolina-8-C-hexose (orientina) (25) e apigenina-8-C-hexose (vitexina) (28), podem ser distinguidos dos isômeros 6-C-glicosilados pela intensidade do íon E_1^+ $[M+H-18]^+$, com os íons produto em m/z 431 (25) e m/z 415 (28) sendo formados com maior abundância. O fragmento em $^{0,2}X^+-H_2O$ $[M+H-120-18]^+$ foi observado em m/z 311 (25) e 295 (28), apenas para os isômeros 8-C-glicosilados. Adicionalmente, foram observados outros íons produto característicos obtidos pelas clivagens do resíduo de açúcar hexose para essas substâncias em: E_2^+ $[M+H-36]^+$, E_3^+ $[M+H-54]^+$, $^{2,3}X^+-2xH_2O$ $[M+H-30-36]^+$, $^{0,4}X^+-2xH_2O$ $[M+H-60-36]^+$, $^{0,2}X^+$ $[M+H-120]^+$ e $^{0,1}X^+$ $[M+H-150]^+$ (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; DOMON; COSTELLO, 1988; LI *et al.*, 1992; WARIDEL *et al.*, 2001) (Figura 22, Tabela 8).

Os espectros de segunda ordem para os íons precursores em m/z 601 $[M+H]^+$ (29 e 30) e m/z 585 $[M+H]^+$ (32 e 35) indicaram padrões de fragmentação característicos de flavonas C-glicosiladas com substituição do grupo galoil. Esses íons precursores foram agrupados no mesmo *cluster* devido à formação dos íons produto $[M+H-170]^+$ (perda da molécula de ácido gálico) (LIN *et al.*, 2000) e $[M+H-120]^+$, que corresponde às clivagens cruzadas do anel do glicosídeo C-hexose (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FERRERES *et al.*, 2007) (Figura 23, Tabela 8).

Figura 22 - Representação do *cluster* para flavonas C-glicosiladas em *Terminalia catappa* e espectros de massas MS/MS. (A) apigenina-8-C-hexose (B) apigenina-6-C-hexose (C) luteolina-8-C-hexose (D) luteolina-6-C-hexose



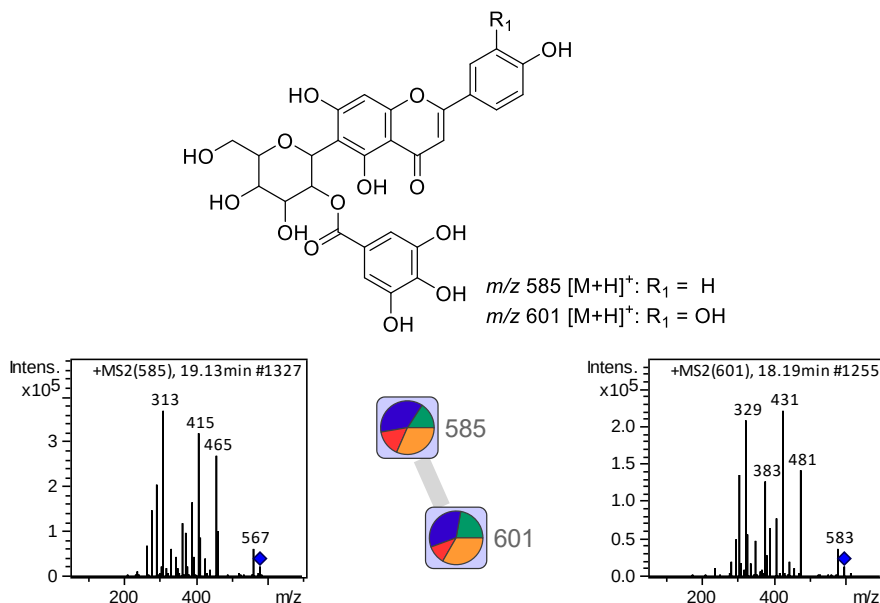
Legenda: ● Verão (Tc1); ● Outono (Tc2, Tc3); ● Inverno (Tc4); ● Primavera (Tc5, Tc6)

■ Anotado na plataforma GNPS

Fragmentos anotados no espectro MS/MS de acordo com a nomenclatura adotada por DOMON; COSTELLO (1988).

Fonte: Adaptado de WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, n. 1, p. 29–41, 2001.

Figura 23 - Representação do *cluster* para flavonas C-glicosiladas e O-galoil flavonas em *Terminalia catappa* e espectros de massas MS/MS



Legenda: ● Verão (Tc1); ● Outono (Tc2, Tc3); ● Inverno (Tc4); ● Primavera (Tc5, Tc6)

■ Anotado pela base de dados *in-house*

Fonte: próprio autor.

Considerando a distribuição relativa das substâncias encontradas nas coletas de *T. catappa*, a concentração de taninos hidrolisáveis não parecia seguir um padrão sazonal, sendo que algumas substâncias tiveram concentrações mais elevadas durante os períodos de verão e primavera e outras tiveram concentrações mais elevadas no outono e inverno (Figura 21). Quanto às flavonas C-glicosiladas, as maiores concentrações foram observadas no período da primavera (Figura 22).

Tabela 8 - Proposta de identificação dos principais metabólitos do extrato etanólico de *Terminalia catappa*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas
(*Continua*)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Anotação	Estação	Referência
1	3,40	355 [M+Na] ⁺	193, 185	O-galoilhexose	VER; OUT; INV; PRI	MENA <i>et al.</i> , 2012
2	4,35	805 [M+Na] ⁺	787, 745, 661, 643, 625, 473, 303	O-galagil-hexose (punicalina)	VER; OUT; INV; PRI	MININEL <i>et al.</i> , 2014
3	4,43	603 [M+H] ⁺	559, 303	Galagil dilactona (terminalina)	VER; OUT; INV; PRI	OELRICHS <i>et al.</i> , 1994
4	4,87	807 [M+Na] ⁺	746, 505, 487, 361, 325, 299	Bis HHDP-hexose (peduncalagina)	VER; OUT; INV; PRI	MENA <i>et al.</i> , 2012
5	5,08	333 [M+H] ⁺	171	O-galoilhexose	OUT; PRI	Proposta
6	5,61	957 [M+Na] ⁺	939, 787, 745, 727, 661, 643, 625, 599	O-galoil-O-galagil-hexose (O-galoilpunicalina)	VER; OUT; INV; PRI	CHANG <i>et al.</i> , 2019
7	6,09	783 [M+H] ⁺	765, 603	O-galagil-hexose (punicalina)	VER; OUT; INV; PRI	MININEL <i>et al.</i> , 2014
8	6,27	1107 [M+Na] ⁺	1089, 954, 805, 787, 769, 725, 661, 643, 625, 599	HHDP-O-galagil-hexose (punicalagina)	VER; OUT; INV; PRI	MININEL <i>et al.</i> , 2014
9	6,33	355 [M+Na] ⁺	193, 185	O-galoilhexose	VER; OUT; INV; PRI	MENA <i>et al.</i> , 2012
10	7,92	975 [M+Na] ⁺	957, 807, 673, 505, 325	HHDP-valoneoil-hexose	INV	MOILANEN; SINKKONEN; SALMINEN, 2013
11	8,07	1107 [M+Na] ⁺	1089, 954, 805, 787, 769, 725, 661, 643, 625, 599	HHDP-O-galagil-hexose (punicalagina)	VER; OUT; INV; PRI	MININEL <i>et al.</i> , 2014
12	9,66	657 [M+Na] ⁺	505, 487, 403, 337, 361, 355, 343, 299	O-galoil-HHDP-hexose (corilagina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
13	10,34	659 [M+Na] ⁺	489, 337, 319	Tri-O-galoilhexose	VER; OUT; INV; PRI	MININEL, 2015
14	10,56	349 [M+Na] ⁺	277, 229, 185	O-coumaroilhexose	VER; OUT; INV; PRI	Proposta
15	10,64	349 [M+Na] ⁺	185	O-coumaroilhexose	VER; INV	Proposta
16	10,92	809 [M+Na] ⁺	639, 507, 489, 471, 361	Di-O-galoil-HHDP-hexose	VER; OUT; INV; PRI	ABDULLA <i>et al.</i> , 2017
17	11,19	507 [M+Na] ⁺	423, 337	Di-O-galoilhexose	VER; OUT; INV; PRI	MININEL, 2015
18	12,38	959 [M+Na] ⁺	789, 487, 325	Bis HHDP-O-galoilhexose	INV; PRI	ABDULLA <i>et al.</i> , 2017
19	12,46	657 [M+Na] ⁺	505, 487, 403, 361, 343, 299	O-galoil-HHDP-hexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS

Tabela 8 - Proposta de identificação dos principais metabólitos do extrato etanólico de *Terminalia catappa*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas
(Continuação)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Anotação	Estação	Referência
20	12,94	659 [M+Na] ⁺	489, 337, 319	Tri- <i>O</i> -galoilhexose	VER; OUT; INV; PRI	MININEL, 2015
21	13,23	675 [M+Na] ⁺	505, 361	<i>O</i> -galoil- <i>O</i> -quebuloil- hexose (quebulanina)	VER; OUT; INV; PRI	PFUNDSTEIN <i>et al.</i> , 2010
22	14,53	483 [M+H] ⁺	331, 305, 185	HHDP-hexose	VER; OUT; INV; PRI	MININEL, 2015
23	15,13	809 [M+Na] ⁺	639, 595, 487, 469, 427, 343, 319	Di- <i>O</i> -galoil-HHDP-hexose	VER; OUT; INV; PRI	ABDULLA <i>et al.</i> , 2017
24	15,59	977 [M+Na] ⁺	807, 487, 469, 361	<i>O</i> -galoil- <i>O</i> -quebuloil- <i>O</i> - HHDP-hexose (ácido quebulágico)	VER; OUT; INV; PRI	MININEL, 2015
25	16,47	449 [M+H] ⁺	431, 413, 395, 383, 353, 329, 311	Luteolina-8- <i>C</i> -hexose (orientina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
26	16,65	809 [M+Na] ⁺	639, 487, 469, 361, 319	Di- <i>O</i> -galoil-HHDP-hexose (telimagrandina I)	VER; OUT; INV; PRI	PFUNDSTEIN <i>et al.</i> , 2010
27	16,96	449 [M+H] ⁺	431, 413, 395, 383, 353, 329, 299	Luteolina-6- <i>C</i> -hexose (isoorientina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
28	17,53	433 [M+H] ⁺	415, 397, 379, 367, 337, 313, 295, 271	Apigenina-8- <i>C</i> -hexose (vitexina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
29	18,14	601 [M+H] ⁺	583, 481, 431, 413, 383, 353, 329, 311, 299, 287	Luteolina-8- <i>C</i> -(- <i>O</i> -galoil)- hexose	VER; OUT; INV; PRI	LIN <i>et al.</i> , 2000
30	18,39	601 [M+H] ⁺	583, 481, 431, 413, 383, 353, 329, 311, 299, 287	Luteolina-6- <i>C</i> -(- <i>O</i> -galoil)- hexose	VER; OUT; INV; PRI	LIN <i>et al.</i> , 2000
31	18,83	433 [M+H] ⁺	415, 397, 379, 367, 337, 313, 283, 271	Apigenina-6- <i>C</i> -hexose (isovitexina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
32	19,13	585 [M+H] ⁺	567, 465, 415, 397, 379, 367, 337, 313, 295, 283, 271	Apigenina-8- <i>C</i> -(- <i>O</i> -galoil)- hexose	VER; OUT; INV; PRI	LIN <i>et al.</i> , 2000
33	19,68	611 [M+H] ⁺	465, 303	Quercetina- <i>O</i> -hexose- deoxihexose (rutina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
33	19,68	633 [M+Na] ⁺	487, 331, 325	Quercetina- <i>O</i> -hexose- deoxihexose (rutina)	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
34	19,75	465 [M+H] ⁺	303	Quercetina- <i>O</i> -hexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS

Tabela 8 - Proposta de identificação dos principais metabólitos do extrato etanólico de *Terminalia catappa*, através da combinação das redes moleculares - GNPS e espectrometria de massas
(Conclusão)

No.	t_r (min)	Aduto (m/z)	MS/MS	Anotação	Estação	Referência
35	20,01	585 [M+H] ⁺	567, 529, 465, 433, 415, 397, 379, 367, 337, 313, 295, 271	Apigenina-6-C-(-O-galoil)- hexose	VER; OUT; INV; PRI	LIN <i>et al.</i> , 2000
36	20,42	303 [M+H] ⁺	-	Ácido elágico	VER; OUT; INV; PRI	MININEL <i>et al.</i> , 2014
37	21,56	449 [M+H] ⁺	317, 287	Ácido elágico O-metil-O- (pentose)	OUT; INV	PFUNDSTEIN <i>et al.</i> , 2010
38	21,66	449	287	Kaempferol-O-hexose	VER; OUT; INV; PRI	GNPS
39	21,75	595 [M+H] ⁺	449, 287	Kaempferol-O-hexose- deoxihexose	VER; OUT; INV; PRI	SINGH <i>et al.</i> , 2016
39	21,75	617 [M+Na] ⁺	471, 331, 309	Kaempferol-O-hexose- deoxihexose	VER; OUT; INV; PRI	Proposta
40	22,19	463 [M+H] ⁺	331, 301	Ácido elágico di-O-metil- O-(pentose)	OUT; INV	PFUNDSTEIN <i>et al.</i> , 2010
41	22,28	463 [M+H] ⁺	315	Di-O-galoilhexose	OUT; INV; PRI	MININEL, 2015
42	37,15	317 [M+H] ⁺	299	Ácido elágico O-metil	VER; OUT; PRI	PFUNDSTEIN <i>et al.</i> , 2010

VER: Verão (Tc1); OUT: Outono (Tc2, Tc3); INV: Inverno (Tc4); PRI: Primavera (Tc5, Tc6)

Fonte: próprio autor.

4.1.2 Avaliação da composição química e sazonalidade com base na análise das redes moleculares

Com base nas redes moleculares formadas pelos dados de espectrometria de massas, foi possível visualizar as diferenças entre as amostras de acordo com as coletas realizadas para as espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*.

Os resultados deste estudo mostraram que a concentração de diferentes substâncias pode ter sido diretamente afetada pelo período de coleta. Essa variação de concentração pôde ser observada visualmente pelas intensidades das bandas cromatográficas e pela representação dos nodos das redes moleculares. Essas diferenças observadas entre as amostras podem estar relacionadas à influência das condições ambientais típicas de cada período, tais como temperatura, radiação solar, umidade relativa e precipitação.

Tendo em vista as características climáticas do local onde as folhas de *B. intermedia* foram coletadas (valores médios são mostrados na Tabela 9), é possível notar uma menor quantidade de chuva durante o outono (Bi2 e Bi3) e o inverno (Bi4), e uma maior quantidade durante a primavera (Bi5 e Bi6). Além disso, os períodos de primavera (Bi5 e Bi6) e verão

(Bi1) tiveram as temperaturas mais quentes e a incidência mais intensa de radiação solar. Em relação ao período de coletas para *S. marginata* (valores médios são mostrados na Tabela 10), as principais condições climáticas indicam temperaturas mais altas durante os períodos de verão (Sm1 e Sm6) e outono (Sm2 e Sm3), altos níveis de umidade no verão e maiores quantidades de chuva na primavera (Sm5).

B. intermedia e *S. marginata* são espécies vegetais que pertencem ao bioma do cerrado brasileiro, e por essa razão, o local de coleta dessas espécies apresentou condições climáticas muito semelhantes. As características climatológicas do cerrado indicam a existência de dois períodos/épocas principais: a estação longa, seca e quente [abril/maio (outono – Bi2, Bi3, Sm2, Sm3) a agosto/setembro (inverno – Bi4, Sm4)] e a estação curta, chuvosa e quente [setembro/outubro (primavera – Bi5, Bi6, Sm5) a dezembro/março (verão – Sm1, Sm6)] (ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021).

Em relação à espécie *T. catappa*, o clima da região onde essa espécie vegetal foi coletada é caracterizado por um clima úmido, tropical e costeiro e, portanto, as condições climáticas ao longo do ano foram muito similares tendo pequenas diferenças em alguns períodos (valores médios são mostrados na Tabela 11). Os períodos de verão (Tc1) foram quentes e úmidos; o inverno (Tc4) apresentou temperaturas mais amenas e uma menor incidência de chuvas; e o outono (Tc2 e Tc3) e a primavera (Tc5, Tc6) apresentaram características de estações de transição. Além disso, as frentes frias são um fenômeno muito comum nessa região costeira, o que leva a mais precipitações no período de verão (ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021).

Tabela 9 - Características climáticas para Bauru-SP no ano de 2017: temperatura média, radiação solar, umidade do ar e precipitação

Período	Temperatura média (°C)	Radiação solar média (kJ/m ²)	Humidade relativa do ar média (%)	Quantidade cumulativa de chuva (mm)
Mar/17	26,9	2328,87	68	0,17
Abr/17	21,7	1755,32	79	0,14
Jun/17	16,0	325,76	92	0,03
Ago/17	14,2	401,02	88	0,08
Out/17	20,1	2639,78	82	0,14
Dez/17	25,4	1818,86	72	0,13

Fonte: Os dados meteorológicos foram fornecidos pela Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos (SADMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Acesso em: www.inmet.gov.br.

Tabela 10 - Características climáticas para Dourados-MS no ano de 2017: temperatura média, radiação solar, umidade do ar e precipitação

Período	Temperatura média (°C)	Radiação solar média (kJ/m ²)	Humidade relativa do ar média (%)	Quantidade cumulativa de chuva (mm)
Fev/17	19,6	18,44	93	0,07
Abr/17	20,7	29,13	74	0,05
Jun/17	15,8	0,42	96	0,00
Ago/17	13,6	1,88	97	0,07
Out/17	14,6	158,22	91	0,13
Dez/17	21,2	72,54	95	0,00

Fonte: Os dados meteorológicos foram fornecidos pela Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos (SADMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Acesso em: www.inmet.gov.br.

Tabela 11 - Características climáticas para Santos-SP no ano de 2017: temperatura média, radiação solar, umidade do ar e precipitação

Período	Temperatura média (°C)	Radiação solar média (kJ/m ²)	Humidade relativa do ar média (%)	Quantidade cumulativa de chuva (mm)
Fev/17	29,4	2503,34	61	0,10
Mai/17	23,9	1551,68	70	0,19
Jun/17	23,1	1324,92	72	0,26
Ago/17	22,2	988,16	66	0,22
Out/17	24,7	1079,44	75	0,19
Dez/17	25,2	771,04	84	0,43

Fonte: Os dados meteorológicos foram fornecidos pela Seção de Armazenamento de Dados Meteorológicos (SADMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Acesso em: www.inmet.gov.br.

De acordo com alguns estudos relatados na literatura, a seca é o principal fator de estresse ambiental que afeta o rendimento e a qualidade das plantas; esse fator afeta particularmente o acúmulo de substâncias bioativas nas plantas, levando a mudanças significativas na quantidade de substâncias fenólicas presentes na composição química dessas plantas (ALMEIDA *et al.*, 2020; LAMBERS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2016b). A deficiência de água em períodos de seca aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva a planta a ativar seu mecanismo de defesa; a planta ativa esse mecanismo alterando o caminho da biossíntese em resposta ao estresse da seca para produzir substâncias antioxidantes, tais como, derivados do ácido galoilquínico para *B. intermedia* e flavonoides glicosilados em *S. marginata*, que têm a capacidade de capturar radicais livres e reduzir os danos oxidativos (PAUDEL *et al.*, 2016).

O estudo realizado por VELASQUE; DEL-CLARO (2016) relatou que a produção de novas folhas na espécie *B. intermedia* segue um padrão sazonal e ocorre após períodos de chuva, com crescimento predominante em períodos secos. Assim, o aumento dos níveis de substâncias fenólicas durante o outono e o inverno também pode estar associado ao mecanismo

de defesa da planta que está relacionado à resistência dos tecidos das folhas jovens aos patógenos vegetais (ANDRADE *et al.*, 2017).

A variação observada no conteúdo de metabólitos da classe dos derivados de quercetina glicosilados e de proantocianidinas para *B. intermedia*, proantocianidinas para *S. marginata* e taninos hidrolisáveis para *T. catappa*, pode ser atribuída aos níveis de temperatura e radiação solar prevalentes no período do verão e primavera. Alguns estudos mostraram que a alta incidência de luz e radiação UV durante esses períodos pode estar relacionada com o aumento do conteúdo desses metabólitos, uma vez que a intensidade da luz induz fortemente a biossíntese de substâncias fenólicas através da estimulação de várias enzimas ao longo da via biossintética (JI *et al.*, 2018). Além disso, o acúmulo desses metabólitos também pode estar relacionado ao mecanismo de proteção da planta contra a incidência extrema de radiação ultravioleta. O espectro de absorção ultravioleta de derivados de quercetina mostra máximos de absorção na faixa de 240-385 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; MERKEN; BEECHER, 2000), proantocianidinas, de 190 a 280 nm (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; WANG; HELLIWELL; YOU, 2000) e, taninos hidrolisáveis, de 220-380 nm (MININEL *et al.*, 2014); isso indica a capacidade dessas substâncias de absorver a radiação UV e proteger as folhas da planta contra os danos causados pela prejudicial radiação UV-B incidente (280-315 nm) (ROBSON *et al.*, 2015).

Sob condições de estresse, como altas temperaturas e radiação solar, o metabolismo das plantas sofre um desequilíbrio entre a formação e a remoção de EROs, induzindo o acúmulo de substâncias antioxidantes que protegem as plantas dos danos causados pelo estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006). Assim, o aumento dos níveis dos derivados de quercetina glicosilados e de proantocianidinas em *B. intermedia*, proantocianidinas em *S. marginata* e taninos hidrolisáveis em *T. catappa*, durante os períodos de verão e primavera, é induzido pelo relevante papel desempenhado por essas substâncias no mecanismo de defesa da planta contra o estresse abiótico, que é mediado pela capacidade dessas substâncias de capturarem ROS uma vez que elas são geradas.

As diferentes concentrações de saponinas observadas em diferentes períodos de coleta para *S. marginata* mostraram que a planta registrou níveis mais altos de saponinas durante a primavera e o outono, e teve níveis de saponinas extremamente baixos durante o inverno. Fatores de estresse abiótico, como umidade, altas temperaturas e radiação solar, podem ter influenciado o conteúdo de saponinas em *S. marginata* durante as estações outono/primavera, enquanto que as condições de seca durante o inverno podem ter contribuído para a diminuição dessas substâncias na planta. De acordo com essas observações, estudos publicados na literatura

mostraram que, para algumas espécies vegetais, as condições de estresse ambiental associadas ao aumento dos níveis de saponina são responsáveis pelo mecanismo de ativação de alguns agentes de sinalização que promovem a biossíntese dessas substâncias (DE COSTA *et al.*, 2013; MOSES; PAPADOPOULOU; OSBOURN, 2014; SZAKIEL; PĄCZKOWSKI; HENRY, 2011).

Vale ressaltar que, em geral, as saponinas possuem propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias e inseticidas, e essas propriedades lhes permitem desempenhar um papel fundamental no mecanismo de defesa das plantas contra micróbios patogênicos, pragas e herbívoros (BISWAS; DWIVEDI, 2019; MOSES; PAPADOPOULOU; OSBOURN, 2014; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004).

Outros estudos relataram que a presença de maiores quantidades de saponinas derivadas da hederagenina em algumas plantas está associada à resposta de defesa das plantas contra herbívoros; segundo esses autores, a hidroxilação que ocorre na posição C-23 do ácido oleanólico e que promove a formação da estrutura da hederagenina é uma modificação na composição química da planta que melhora seu mecanismo de defesa (LIU *et al.*, 2019).

A espécie vegetal *T. catappa* é uma árvore decídua e com isso as suas folhas caem todos os anos durante a estação de inverno nos meses de julho e agosto devido ao estágio de senescência. A senescência das folhas começa durante o período de diminuição da luz no final do verão e envolve o armazenamento de nutrientes que serão consumidos na primavera, quando a planta começa a crescer novamente (WOO *et al.*, 2019). Essa fase desencadeia o surgimento de diversos processos na planta, que são impulsionados principalmente por redes reguladoras responsáveis pela expressão de hormônios e pela superprodução de EROs (HUANG *et al.*, 2019; JAJIC; SARNA; STRZALKA, 2015). Nesse sentido, substâncias fenólicas com propriedades antioxidantes são produzidas a fim de regular o metabolismo celular da planta e reduzir o estresse oxidativo.

Alguns estudos relatados na literatura mostraram que as folhas apresentam um conteúdo relativamente maior de substâncias fenólicas no início de seu desenvolvimento e crescimento, e isto explica o aumento de flavonas C-glicosiladas nas coletas da primavera em relação ao inverno para *T. catappa*. Esse resultado é atribuído à função fotoprotetora desses metabólitos e sua efetiva proteção da planta contra herbívoros de insetos (JIANG; DOSEFF; GROTEWOLD, 2016; KARAGEORGOU; MANETAS, 2006). Além disso, após um longo período seco no outono/inverno, a taxa de pluviosidade aumenta na primavera, permitindo que a planta se recupere do estresse hídrico. Como relatado por ALMEIDA *et al.* (2020), os resultados do estudo aqui apresentado mostraram que a espécie *T. catappa* exibiu maior teor de flavonas C-

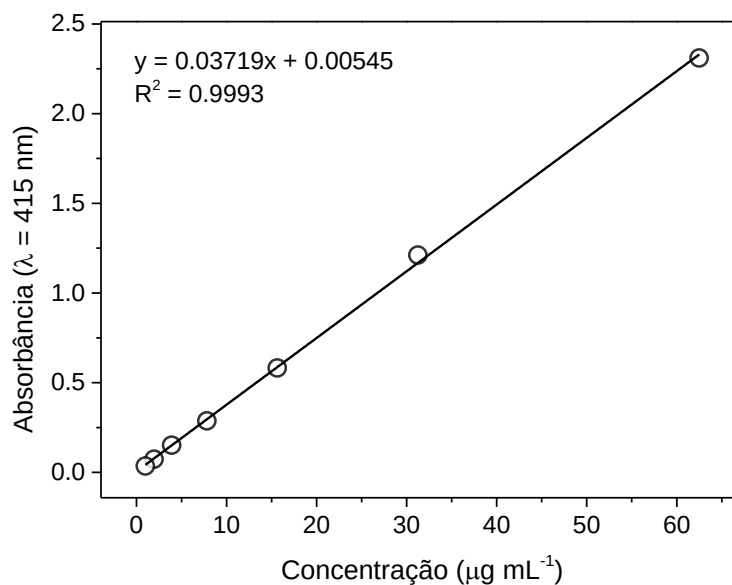
glicosiladas durante a fase de reidratação, e isto parece ter auxiliado o processo de recuperação da planta. Entretanto, ainda não está claro quais mecanismos são responsáveis pelo acúmulo dessas substâncias nos tecidos vegetais em resposta ao processo de recuperação da planta após um período sem chuvas.

4.1.3 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pela reação de complexação estável entre o cátion Al^{2+} e os flavonoides. A reação ocorre nas posições do catecol (3' e 4'), formando um complexo de coloração amarela havendo um deslocamento batocrômico de absorção do flavonoide para 415 nm (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014).

O método espectrofotométrico utilizado na quantificação dos flavonoides totais expressos em quercetina, mostrou linearidade no comprimento de onda analisado de 415 nm para a faixa de concentração avaliada (0,97 – 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

A partir dos dados obtidos para o padrão de referência, foi possível construir um gráfico de absorbância *versus* concentração afim de se obter a equação da reta para o padrão quercetina (Figura 24). A curva de calibração para a quercetina apresentou coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99, indicando uma boa proporcionalidade entre a concentração do padrão e a absorbância medida na faixa de concentração analisada. Os LDs e LQs foram determinados a partir da curva da quercetina, sendo obtido os valores de 0,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o LD e de 2,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o LQ. Esses resultados demonstram que o procedimento utilizado apresenta sensibilidade para a quantificação dos flavonoides totais nos extratos das folhas das espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*.

Figura 24 - Curva para o padrão quercetina

Fonte: próprio autor.

A concentração de flavonoides totais para cada amostra foi obtida pela interpolação da medida de absorbância na equação da reta. Os resultados para cada espécie estão apresentados na Tabela 12 e na Figura 25.

Tabela 12 - Teores de flavonoides expressos em mg g^{-1} de quercetina nos extratos de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*

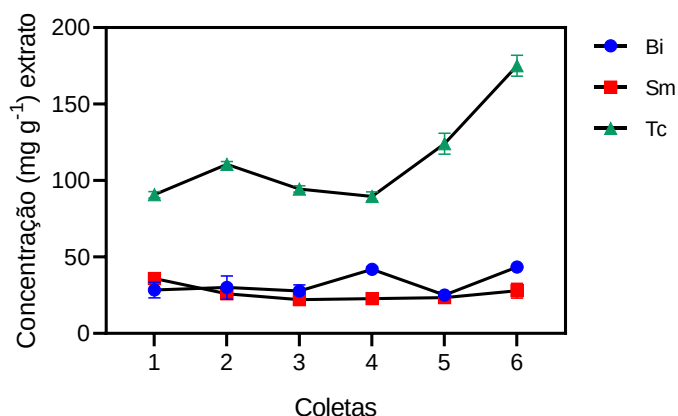
[] $\pm$ DP ^a (mg g^{-1}) extrato					
<i>B. intermedia</i>					
Bi1	Bi2	Bi3	Bi4	Bi5	Bi6
$28,35 \pm 5,07$	$30,01 \pm 7,65$	$27,81 \pm 3,90$	$41,93 \pm 1,56$	$25,08 \pm 0,68$	$43,36 \pm 0,21$
<i>S. marginata</i>					
Sm1	Sm2	Sm3	Sm4	Sm5	Sm6
$35,83 \pm 1,77$	$25,89 \pm 0,68$	$22,12 \pm 0,21$	$22,71 \pm 0,76$	$23,42 \pm 3,64$	$27,90 \pm 2,90$
<i>T. catappa</i>					
Tc1	Tc2	Tc3	Tc4	Tc5	Tc6
$90,72 \pm 2,08$	$110,56 \pm 1,77$	$94,48 \pm 2,06$	$89,55 \pm 3,04$	$124,09 \pm 2,03$	$175,08 \pm 2,77$

^a DP: desvio padrão para $n = 3$.

*Coletas: Verão (Bi1, Sm1, Sm6, Tc1); Outono (Bi2, Bi3, Sm2, Sm3, Tc2, Tc3); Inverno (Bi4, Sm4, Tc4); Primavera (Bi5, Bi6, Sm5, Tc5, Tc6)

Fonte: próprio autor.

Figura 25 - Teores de flavonoides expressos em mg g^{-1} de quercetina nos extratos de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa*



Verão (Bi1, Sm1, Sm6, Tc1); Outono (Bi2, Bi3, Sm2, Sm3, Tc2, Tc3); Inverno (Bi4, Sm4, Tc4); Primavera (Bi5, Bi6, Sm5, Tc5, Tc6)

Fonte: próprio autor.

Como observado na Tabela 12 e na Figura 25, as amostras de *B. intermedia* e *S. marginata* não apresentaram variações significativas na concentração do total de flavonoides para todas as coletas realizadas, sugerindo que fatores sazonais não afetaram de forma significativa o teor total de flavonoides para essas coletas.

Para *T. catappa*, foi possível notar o aumento progressivo da concentração de flavonoides do inverno (Tc4) para a primavera (Tc5 e Tc6). Esse resultado está de acordo com o que foi encontrado na análise dos dados de espectrometria de massas, na qual foi observado o aumento nos flavonoides C-glicosilados, que foram associados com a proteção das folhas durante sua fase de crescimento (JIANG; DOSEFF; GROTEWOLD, 2016; KARAGEORGOU; MANETAS, 2006).

4.1.4 Avaliação das atividades antioxidantes

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos para todas as coletas das espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*, foi realizada pelos métodos de eliminação dos radicais livres DPPH $\cdot$, ABTS $^{\cdot+}$ e peroxila (ROO $\cdot$).

Os ensaios de atividade antiradicalar *in vitro* foram escolhidos, por se tratarem de medidas baratas e rápidas. No entanto, devido à interferência que os ensaios *in vitro* podem estar sujeitos, foram utilizados três métodos diferentes com diferentes mecanismos de eliminação dos radicais livres, a fim de proporcionar melhor entendimento acerca da capacidade antioxidante desse conjunto de amostras.

Os ensaios DPPH[·] e ABTS^{•+} se baseiam na transferência de elétrons e promovem a redução de um oxidante colorido, enquanto que o ensaio da piranina é baseado na transferência de átomos de hidrogênio para a estabilização dos radicais peroxila gerados (GRANATO *et al.*, 2018; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

A avaliação do potencial antiradicalar foi determinada pela relação dose resposta das variações das concentrações de cada amostra com o percentual de captura dos radicais livres. Os valores foram determinados considerando a redução dos radicais livres em 50% (IC₅₀) (Tabela 13, Figura 26). A partir dos valores obtidos para cada ensaio, é possível constatar que esses experimentos mostraram resultados comparáveis em termos de capacidade antioxidante.

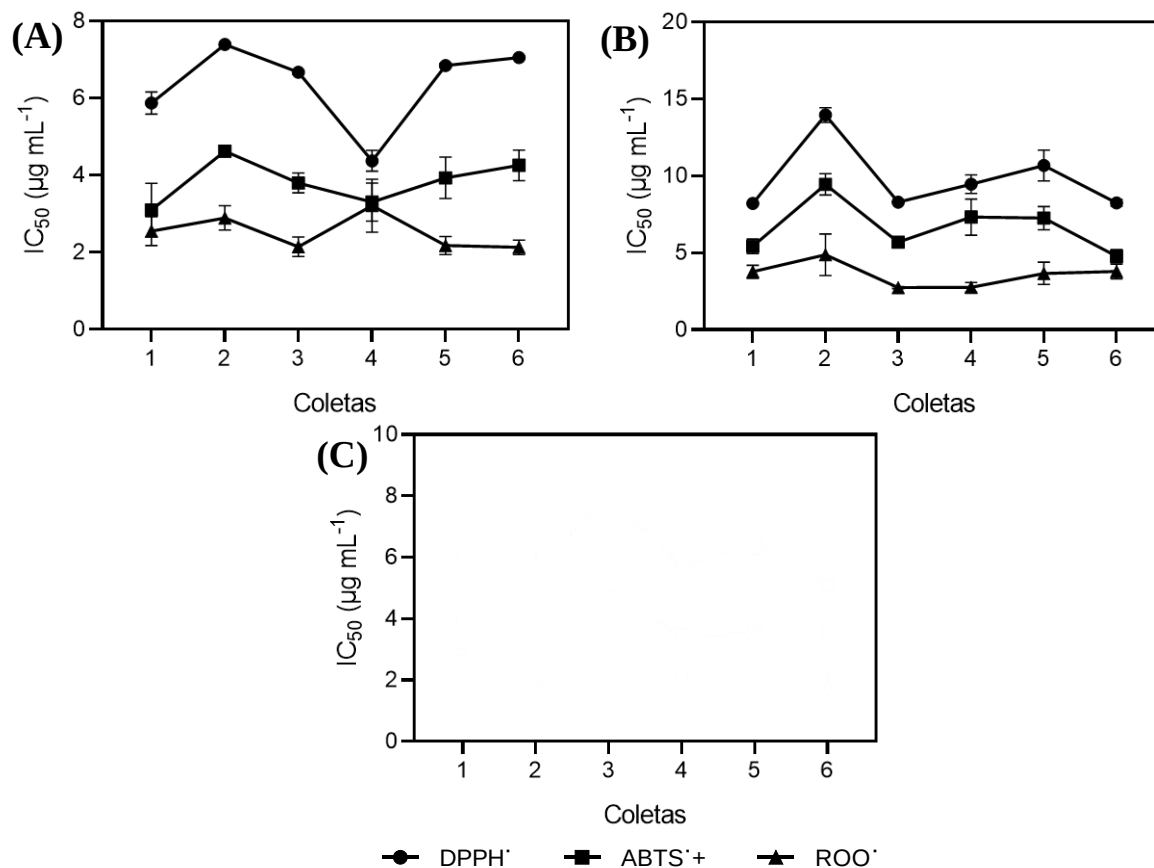
Tabela 13 - Capacidade antioxidante (ensaios DPPH[·], ABTS^{•+}, ROO[·]) dos extratos de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa* e dos padrões quercetina e ácido gálico

Amostras	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)		
	DPPH [·]	ABTS ^{•+}	ROO [·]
<i>B. intermedia</i>			
Bi1	5,87 ± 0,29	3,10 ± 0,69	2,55 ± 0,38
Bi2	7,39 ± 0,11	4,63 ± 0,15	2,89 ± 0,32
Bi3	6,67 ± 0,05	3,80 ± 0,26	2,14 ± 0,25
Bi4	4,37 ± 0,27	3,30 ± 0,49	3,21 ± 0,68
Bi5	6,85 ± 0,05	3,93 ± 0,53	2,17 ± 0,23
Bi6	7,05 ± 0,03	4,25 ± 0,40	2,13 ± 0,19
<i>S. marginata</i>			
Sm1	8,20 ± 0,24	5,42 ± 0,47	3,77 ± 0,42
Sm2	13,95 ± 0,48	9,45 ± 0,69	4,88 ± 1,36
Sm3	8,30 ± 0,05	5,70 ± 0,32	2,74 ± 0,07
Sm4	9,46 ± 0,61	7,32 ± 1,18	2,76 ± 0,31
Sm5	10,68 ± 1,00	7,25 ± 0,76	3,66 ± 0,72
Sm6	8,24 ± 0,22	4,77 ± 0,43	3,79 ± 0,47
<i>T. catappa</i>			
Tc1	6,08 ± 0,27	3,95 ± 0,18	2,71 ± 0,31
Tc2	5,71 ± 0,48	3,73 ± 0,14	1,86 ± 0,01
Tc3	8,02 ± 0,11	4,67 ± 0,29	2,87 ± 0,06
Tc4	5,70 ± 0,11	3,46 ± 0,24	2,24 ± 0,14
Tc5	6,45 ± 0,36	3,49 ± 0,37	2,13 ± 0,07
Tc6	5,10 ± 0,05	3,50 ± 0,26	1,81 ± 0,39
Padrões			
Quercetina	1,52 ± 0,24	0,87 ± 0,01	0,82 ± 0,04
Ácido gálico	1,66 ± 0,02	0,96 ± 0,03	0,89 ± 0,05

*Coletas: Verão (Bi1, Sm1, Sm6, Tc1); Outono (Bi2, Bi3, Sm2, Sm3, Tc2, Tc3); Inverno (Bi4, Sm4, Tc4); Primavera (Bi5, Bi6, Sm5, Tc5, Tc6)

Fonte: próprio autor.

Figura 26 - Capacidade antioxidante (ensaio DPPH[•], ABTS^{•+}, ROO[•]) dos extratos de (A) *Byrsonima intermedia*, (B) *Serjania marginata* e (C) *Terminalia catappa*



*Coletas: Verão (Bi1, Sm1, Sm6, Tc1); Outono (Bi2, Bi3, Sm2, Sm3, Tc2, Tc3); Inverno (Bi4, Sm4, Tc4); Primavera (Bi5, Bi6, Sm5, Tc5, Tc6)

Fonte: próprio autor.

As três espécies apresentaram potencial antiradicalar significativo como apresentado na Tabela 13 e Figura 26, apresentando apenas pequenas variações entre as coletas realizadas. Isso demonstra que a atividade deve estar relacionada à natureza e ao teor das substâncias fenólicas.

No caso dos flavonoides, como já mencionado, *B. intermedia* possui majoritariamente flavonóis derivados da quercetina, enquanto que *S. marginata* e *T. catappa* possuem majoritariamente flavonoides derivados de flavonas, como a apigenina.

Dentre os requisitos para a boa atividade antiradicalar, flavonoides devem ter em sua estrutura principalmente um grupo catecol no anel B (3'-OH e 4'-OH) e o grupo 3-OH ao lado do grupo 4-ceto, sendo assim mais susceptíveis para a captura dos radicais livres (HENDRICKSON; KAUFMAN; LUNTE, 1994; VAN ACKER *et al.*, 1996).

As flavonas, como a apigenina e luteolina, não possuem o grupo hidroxila na posição 3, diminuindo a oxidabilidade dessas substâncias e consequente a capacidade de captura dos radicais livres. Esse menor potencial antioxidante para as flavonas justifica o maior valor de

IC₅₀ para a amostra Tc3 coletada durante o outono, dado que maiores concentrações de flavonas foram observadas no outono. Para *T. catappa*, apesar da alta concentração de flavonas atribuída as amostras da primavera (Tc5 e Tc6), essas coletas apresentaram os menores valores de IC₅₀, sendo assim a capacidade antioxidante dessas amostras associadas a outras classes de substâncias.

No caso das coletas de *B. intermedia*, o valor mais baixo de IC₅₀ foi obtido para a amostra coletada durante o inverno. Esse valor pode estar associado à maior concentração de flavonoides totais nessa amostra, assim como pode ser atribuído aos derivados do ácido galoilquínico presentes em maior concentração. As propriedades antioxidantes para esses derivados são atribuídas ao grupo galoil, sendo que o incremento no número de grupos galoil aumenta a atividade antioxidante da substância (BARATTO *et al.*, 2003; KARAS; ULRICHOVÁ; VALENTOVÁ, 2017). Além disso, alguns estudos relataram que a adição de um grupo galoil à estrutura de glicosídeos e proantocinidinas provoca o aumento da atividade de captura de radicais livres em comparação com as substâncias não-galoiladas (KARAS; ULRICHOVÁ; VALENTOVÁ, 2017).

Os valores mais baixos de IC₅₀ obtidos para as coletas do verão podem estar associados ao conteúdo de proantocianidinas para *B. intermedia* e *S. marginata* e taninos hidrolisáveis para *T. catappa*. As proantocianidinas são bons antioxidantes e de fato, de acordo com estudos relatados na literatura, a biodisponibilidade dessas substâncias é maior em monômeros e pequenos oligômeros, como os encontrados nos extratos das espécies vegetais aqui investigados (COS *et al.*, 2004; RAUF *et al.*, 2019). Os taninos hidrolisáveis, como os elagitaninos punicalagina e punicalina, considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Terminalia* (YOSHIDA; AMAKURA; YOSHIMURA, 2010), também são relatados como bons antioxidantes devido aos anéis fenólicos ligados nessas estruturas (REDDY *et al.*, 2007).

Alguns estudos na literatura relataram a correlação das propriedades antioxidantes das substâncias fenólicas dos extratos das espécies investigadas com as propriedades terapêuticas promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias.

DOS SANTOS *et al.* (2019) demonstraram o potencial farmacológico das substâncias presentes nas frações aquosa e acetato de etila de *B. intermedia*, sendo as proantocianidinas oligoméricas e os ácidos galoilquínicos considerados as substâncias mais efetivas na prevenção de úlceras gástricas e duodenais devido a seus efeitos antioxidantes, enquanto os flavonoides derivados da quercetina foram mais efetivos por sua atividade anti-inflamatória no tecido gástrico e duodenal.

O estudo realizado por PÉRICO *et al.* (2015) atribuiu a ação gastroprotetora do extrato hidroetanólico de *S. marginata* à combinação de proantocianidinas e flavonoides glicosilados presentes no extrato. Em outro estudo, HEREDIA-VIEIRA *et al.* (2015) demonstrou que os principais flavonoides encontrados em *S. marginata*, cassiaoccidentalina A e tetrastigma B, não apresentam propriedades significativas de captura de radicais livres para o ensaio de DPPH, sendo atribuída às proantocianidinas a atividade antioxidante encontrada para o extrato dessa espécie.

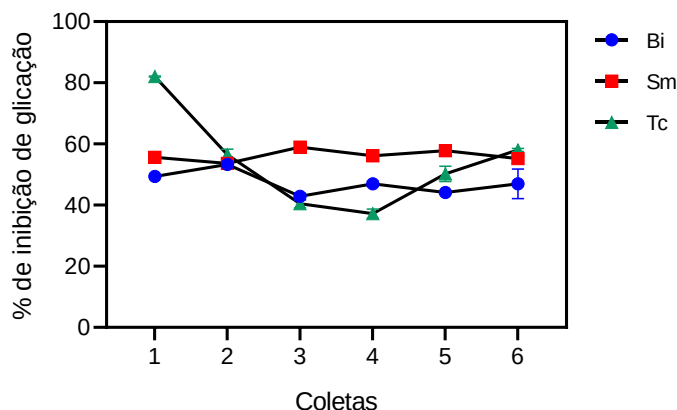
Por último, o estudo realizado por PINHEIRO SILVA *et al.* (2015), constatou que a fração aquosa do extrato hidroetanólico das folhas de *T. catappa* tinha em sua composição química em sua maioria os elagitaninos punicalina e punicalagina, sugerindo que essas substâncias foram responsáveis por atenuar o estresse oxidativo e proporcionar efeitos tanto preventivos quanto curativos em úlceras gástricas agudas e cronicamente induzidas.

4.1.5 Avaliação da atividade antiglicante

A formação de produtos de glicação avançada (AGEs) podem alterar irreversivelmente a estrutura e a função biológica das moléculas. Esse processo causa estresse oxidativo, respostas inflamatórias e promove o desenvolvimento de diversas doenças crônicas (RAMKISSOON *et al.*, 2013). A atividade antiglicante avaliada permite determinar a capacidade de inibição para formação dos AGEs.

Os extratos avaliados apresentaram um percentual médio de antiglicação e não apresentaram grandes diferenças entre as coletas realizadas, estando na faixa de 42,8 - 53,3 % para *B. intermedia*, 53,6 - 59,0% para *S. marginata* e 37,2 - 82,0% para *T. catappa* (Figura 27).

Figura 27 - Porcentagem de inibição dos extratos de *Byrsonima intermedia*, *Serjania marginata* e *Terminalia catappa* na formação de produtos avançados de glicação (AGEs)



*Coletas: Verão (Bi1, Sm1, Sm6, Tc1); Outono (Bi2, Bi3, Sm2, Sm3, Tc2, Tc3); Inverno (Bi4, Sm4, Tc4); Primavera (Bi5, Bi6, Sm5, Tc5, Tc6)

*Controle positivo: aminoguanidina (AG), 92,9% de inibição.

Fonte: próprio autor.

O potencial antiglicante é associado na literatura às propriedades antioxidantes das substâncias fenólicas que podem exercer efeitos protetores contra a formação e ação de produtos de glicação avançada, atuando de forma benéfica na prevenção de doenças relacionadas à glicação, como a diabetes (DIL; RANJKESH; GOODARZI, 2019).

FRAIGE *et al.* (2018) atribuiu que os constituintes fenólicos, como catequina, epicatequina e procianidina B2, presentes nos extratos polares de espécies do gênero *Byrsonima*, podem estar associados aos efeitos inibidores na formação dos AGEs. Esses metabólitos também são encontrados nos extratos de *S. marginata* o que justifica o potencial semelhante apresentado para as duas espécies.

As coletas de *T. catappa* foram as que apresentaram maior variação na atividade antiglicante avaliada, sendo possível observar uma redução progressiva no percentual de inibição a partir do verão (Tc1) até atingir valores mínimos no inverno (Tc4), seguida de um aumento no percentual para as coletas realizadas na primavera (Tc5 e Tc6). Essa variação de atividade pode estar associada com a variação de alguns elagitaninos. Estudos anteriores para os extratos aquosos das folhas de *T. catappa* demonstraram significativa atividade anti-hiperglicêmica, sendo o alto teor de taninos hidrolisáveis responsáveis pela atividade antidiabética (ANAND; DIVYA; KOTTI, 2015; MANSOOR AHMED *et al.*, 2005).

4.2 PARTE B: Caracterização qualitativa e quantitativa do extrato de *S. marginata* usando princípios da Química Verde

Como vimos, o estudo de uma espécie vegetal exige um grande número de análises cromatográficas, que implicam no emprego de consideráveis volumes de solventes orgânicos que podem ser tóxicos ao meio ambiente. Por isso, nesta parte do trabalho elegemos uma das espécies para investigar a possibilidade de implementar métodos da Química Verde, que são ambientalmente mais amigáveis.

Há muitas variáveis que podem interferir em uma análise cromatográfica: tipo de fase estacionária, composição de fase móvel, pH, temperatura da coluna, volume de injeção, entre outras. Muitas delas atuam em conjunto, o que torna o desenvolvimento do método em cromatografia bastante complexo. Além disso, quando se trabalha com matrizes com grande número de substâncias, tem se utilizado a análise quimiométrica dos dados multivariados associados à análise de HPLC (BELAZ; PEREIRA-FILHO; OLIVEIRA, 2013; TISTAERT; DEJAEGER; HEYDEN, 2011).

Assim, o planejamento fatorial fracionário de dois níveis foi aplicado para definir as variáveis que têm maior efeito sobre o resultado do método analítico, enquanto a matriz de Doehlert foi utilizada no procedimento de otimização das condições experimentais. Além disso, para empregar o método desenvolvido no controle de qualidade do extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata*, a metodologia foi validada, avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e robustez. A padronização dos extratos foi realizada através da quantificação da catequina, epicatequina e derivados da apigenina.

4.2.1 Triagem das variáveis

A avaliação das variáveis empregadas para o desenvolvimento do método cromatográfico verde, foi realizada por meio do planejamento fatorial fracionário com dois níveis, 7 fatores (2^{7-2}) e seis réplicas, que resultou em 38 experimentos. As estimativas dos erros para o planejamento fracionário foram obtidas a partir das réplicas considerando as piores respostas de acordo com a métrica GCFR (experimentos 2, 6 e 9) e as melhores repostas (experimentos 8, 31 e 32).

A matriz de experimentos e as respostas obtidas estão apresentados na Tabela 14. Os cromatogramas referentes às triagens de variáveis estão apresentados no Apêndice Figuras A1 a A5.

Tabela 14 - Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores (2^{7-2}) e as respostas obtidas para cada análise

Exp.	Fatores ^{a,b}							Respostas ^d	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆ (1234)	X ₇ (1245)	n	GCFR
1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	22	3,85
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	13	2,53
2(1) ^c	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	14	2,67
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	17	3,02
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	23	6,86
5	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	15	2,77
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	15	2,64
6(1) ^c	1	-1	1	-1	-1	1	-1	15	5,10
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	23	6,87
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	21	11,17
8(1) ^c	1	1	1	-1	-1	-1	1	22	13,62
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	11	1,55
9(1) ^c	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	11	1,56
10	1	-1	-1	1	-1	1	1	19	3,94
11	-1	1	-1	1	-1	1	1	19	4,17
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	20	4,80
13	-1	-1	1	1	-1	1	-1	17	3,54
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	15	3,87
15	-1	1	1	1	-1	-1	1	18	5,50
16	1	1	1	1	-1	1	-1	16	3,07
17	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	24	5,81
18	1	-1	-1	-1	1	-1	1	21	7,73
19	-1	1	-1	-1	1	-1	1	22	8,50
20	1	1	-1	-1	1	1	-1	18	3,57
21	-1	-1	1	-1	1	-1	-1	19	9,90
22	1	-1	1	-1	1	1	1	22	9,45
23	-1	1	1	-1	1	1	1	21	7,62
24	1	1	1	-1	1	-1	-1	18	5,91
25	-1	-1	-1	1	1	-1	1	18	5,73
26	1	-1	-1	1	1	1	-1	20	3,94
27	-1	1	-1	1	1	1	-1	19	3,56
28	1	1	-1	1	1	-1	1	19	7,23
29	-1	-1	1	1	1	1	1	22	7,90
30	1	-1	1	1	1	-1	-1	13	4,64
31	-1	1	1	1	1	-1	-1	21	12,90
31(1) ^c	-1	1	1	1	1	-1	-1	22	12,57
32	1	1	1	1	1	1	1	20	11,17
32(1) ^c	1	1	1	1	1	1	1	19	8,46

^a X₁, porcentagem inicial de EtOH; X₂, porcentagem final de EtOH; X₃, temperatura (°C); X₄, porcentagem de ácido acético na água; X₅, vazão (mL min⁻¹); X₆, tempo de análise (min), X₇, fase estacionária.

^b Valores codificados.

^c Número da réplica correspondente.

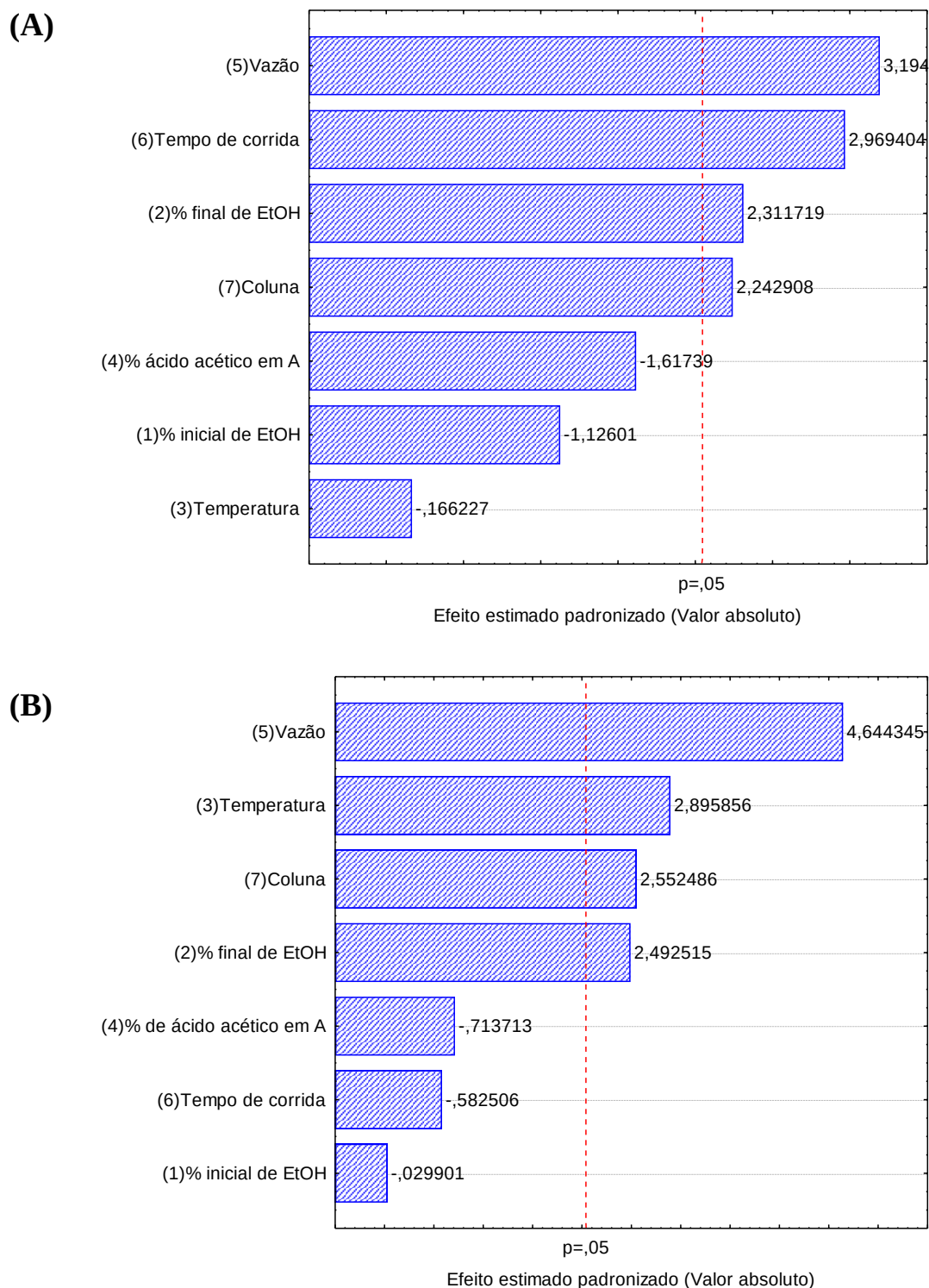
^d Dados obtidos em 270 nm.

Fonte: próprio autor.

A etapa de triagem permitiu identificar as variáveis significativamente importantes e que influenciaram na separação cromatográfica dos constituintes químicos do extrato de *S. marginata* de acordo com o número e distribuição das bandas cromatográficas obtidas em cada experimento. O comprimento de onda de 270 nm empregado permitiu obter a melhor resposta de absorção para os derivados de ácidos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas.

A relevância dos efeitos de cada variável foi avaliada pela ANOVA e os resultados normalizados do planejamento foram analisados com uma significância de 5% pelo gráfico de Pareto padronizado (Figura 28) que foram estimados pelo teste *t* de Student.

Figura 28 - Gráfico de Pareto dos principais efeitos obtidos para o planejamento fracionário (2^{7-2}) para (A) número de bandas e (B) GCFR



Fonte: próprio autor.

De acordo com os gráficos de Pareto (Figura 28), a vazão (X_5) foi a variável mais significativa, tendo efeito positivo (maior vazão) para as respostas denominadas número de bandas (a) e GCFR (b). Aumentando a vazão de eluição dos analitos, as bandas cromatográficas

tornaram-se mais estreitas e a eluição mais rápida, diminuindo então o tempo de eluição dos analitos no cromatograma.

A variável tempo de análise (X_6) foi a segunda variável mais significativa para a resposta (a) (Figura 28A), indicando uma relação positiva da quantidade de bandas obtidas em função da unidade de tempo.

A percentagem final de etanol na fase móvel (X_2) apresentou significância para as duas respostas analisadas (a) e (b) (Figura 28). Essa variável é de extrema importância para o processo de separação, uma vez que interfere com a força de eluição da fase móvel e afeta a interação das substâncias com a fase estacionária.

Para a otimização do método, as variáveis que não apresentaram significância na triagem, foram fixadas. As variáveis X_1 e X_4 apresentaram um efeito negativo para a resposta, sendo estabelecidos os níveis inferiores para percentagem inicial de EtOH na fase móvel ($X_1 = 10\%$) e para a % de ácido acético na água ($X_4 = 0,1\%$). Apesar de a temperatura (X_3) ter sido significativa para a resposta (b), ela apresentou efeito positivo, o que implicaria o uso de temperaturas superiores a 60°C , que, no entanto, é a temperatura limite das colunas utilizadas. Desse modo, devido a viscosidade do etanol, o valor máximo de temperatura foi estabelecido em 60°C para a otimização do método.

A variável coluna (X_7) também foi fixada por ser qualitativa. Ela pode interferir significativamente na separação das substâncias devido às interações intermoleculares dos analitos com a fase estacionária. Portanto, a coluna fenil hexil foi selecionada devido ao efeito positivo encontrado para as respostas, o que pode estar relacionado com a seletividade da coluna, baseada nas interações hidrofóbicas e do tipo π - π entre as diferentes substâncias fenólicas da amostra com a fase estacionária (GALAON *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2005).

4.2.2 Otimização do método cromatográfico

A otimização do método cromatográfico foi realizada usando o modelo Doehlert para as variáveis significativas determinadas na etapa de triagem, seguindo a ordem de importância $X_5 > X_6 > X_2$. Portanto, para um planejamento experimental Doehlert de três variáveis, foram realizadas 15 análises cromatográficas (número de experimentos total), incluindo três réplicas no ponto central (Apêndice Figuras A6 a A8). As condições empregadas e as respostas obtidas são mostradas na Tabela 15 e as respostas analisadas foram o número de bandas cromatográficas (a) e a métrica GCFR (b).

Tabela 15 - Variáveis e as respostas obtidas para cada análise de acordo com o modelo Doehlert

Experimentos	Variáveis ^{a,b}			Respostas ^c	
	X ₆	X ₅	X ₂	n	GCFR
1	35 (0)	1,00 (0)	55 (0)	25	12,56
2	35 (0)	1,00 (0)	55 (0)	24	10,47
3	35 (0)	1,00 (0)	55 (0)	25	12,64
4	50 (1)	1,00 (0)	55 (0)	25	7,84
5	42,5 (0,5)	1,25 (0,866)	55 (0)	24	9,07
6	42,5 (0,5)	1,08 (0,289)	65 (0,817)	25	10,38
7	20 (-1)	1,00 (0)	55 (0)	17	4,54
8	27,5 (-0,5)	0,75 (-0,866)	55 (0)	18	6,04
9	27,5 (-0,5)	0,92 (-0,289)	45 (-0,817)	16	4,48
10	42,5 (0,5)	0,75 (-0,866)	55 (0)	25	8,46
11	42,5 (0,5)	0,92 (-0,289)	45 (-0,817)	20	5,69
12	27,5 (-0,5)	1,25 (0,866)	55 (0)	23	11,42
13	35 (0)	1,17 (0,577)	45 (-0,817)	20	9,86
14	27,5 (-0,5)	1,08 (0,289)	65 (0,817)	23	8,79
15	35 (0)	0,83 (-0,577)	65 (0,817)	26	7,48

^a X₆, tempo de análise (min); X₅, vazão (mL min⁻¹); X₂, % final de EtOH.

^b Valores codificados das variáveis em parênteses.

^c Dados obtidos em 270 nm.

Fonte: próprio autor.

Os modelos matemáticos, que representam as respostas (a) e (b) de *S. marginata*, foram obtidos pela correlação entre as respostas obtidas e as variáveis experimentais correspondentes e são mostrados nas equações seguintes (Equações 6 e 7, respectivamente):

$$a = 24,67_{(\pm 1,43)} + 3,67_{(\pm 1,24)}X_2 + 0,87_{(\pm 1,24)}X_5 + 3,75_{(\pm 1,24)}X_6 - 2,12_{(\pm 3,20)}X_2X_5 + 1,41 \times 10^{-3}_{(\pm 3,21)}X_2X_6 - 3,46_{(\pm 2,87)}X_5X_6 - 3,16_{(\pm 2,15)}X_2^2 - 1,67_{(\pm 2,27)}X_5^2 - 3,67_{(\pm 2,27)}X_6^2 \quad (6)$$

$$b = 11,89_{(\pm 3,06)} + 1,35_{(\pm 2,65)}X_2 + 2,29_{(\pm 2,65)}X_5 + 1,18_{(\pm 2,65)}X_6 - 0,68_{(\pm 6,83)}X_2X_5 + 1,21_{(\pm 6,83)}X_2X_6 - 2,75_{(\pm 6,11)}X_5X_6 - 4,16_{(\pm 4,58)}X_2^2 - 2,29_{(\pm 4,83)}X_5^2 - 5,70_{(\pm 4,83)}X_6^2 \quad (7)$$

De acordo com a análise de variância (ANOVA) (Tabelas 16 e 17), o modelo calculado não apresenta falta de ajuste, indicando que o modelo quadrático se ajusta aos dados experimentais. O modelo foi ainda avaliado pelo gráfico de valores previstos *versus* observados (Figura 29). Nesse gráfico, pode-se notar que o modelo apresenta boa concordância entre os resultados experimentais e as respostas previstas pelo modelo, com nível de confiança de 95% e coeficientes de determinação (R²) de 0,9843 e 0,9129 para as respostas (a) e (b),

respectivamente. Além disso, os resultados da análise estatística fornecem evidências de que o modelo pode prever com precisão as condições ótimas das respostas avaliadas.

Considerando a significância dos efeitos ($p < 0,05$), somente os efeitos lineares e quadráticos das variáveis tempo de análise (X_6) e percentagem % final de EtOH (X_2) foram significativos para a resposta (a). Para a resposta (b), somente o efeito quadrático para a variável tempo de análise (X_6) foi significativo, enquanto que os efeitos das interações entre as variáveis não foram estatisticamente significativos para nenhuma das respostas (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo representando a resposta número de bandas cromatográficas (a) de acordo com o planejamento Doehlert

Fator ^a	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F	Valor-p	Resultado ^b
(1) X_6 (L)	56,2500	1	56,25000	168,7500	0,005874	Significativo
X_6 (Q)	16,1333	1	16,13333	48,4000	0,020042	Significativo
(2) X_5 (L)	3,0000	1	3,00000	9,0000	0,095466	
X_5 (Q)	3,3333	1	3,33333	10,0000	0,087129	
(3) X_2 (L)	53,9896	1	53,98960	161,9688	0,006117	Significativo
X_2 (Q)	13,3631	1	13,36305	40,0892	0,024048	Significativo
1L e 2L	9,0000	1	9,00000	27,0000	0,035099	
1L e 3L	0,0000	1	0,00000	0,0000	0,998658	
2L e 3L	2,6972	1	2,69716	8,0915	0,104560	
Falta de ajuste	1,7500	1	0,58333	1,7500	0,383785	
Erro puro	0,6667		0,33333			
Total SS	153,6000	14				

^a L, fator linear; Q, fator quadrático.

^b valores de p são estatisticamente significativos para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: próprio autor.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo representando a resposta GCFR de acordo com o planejamento Doehlert

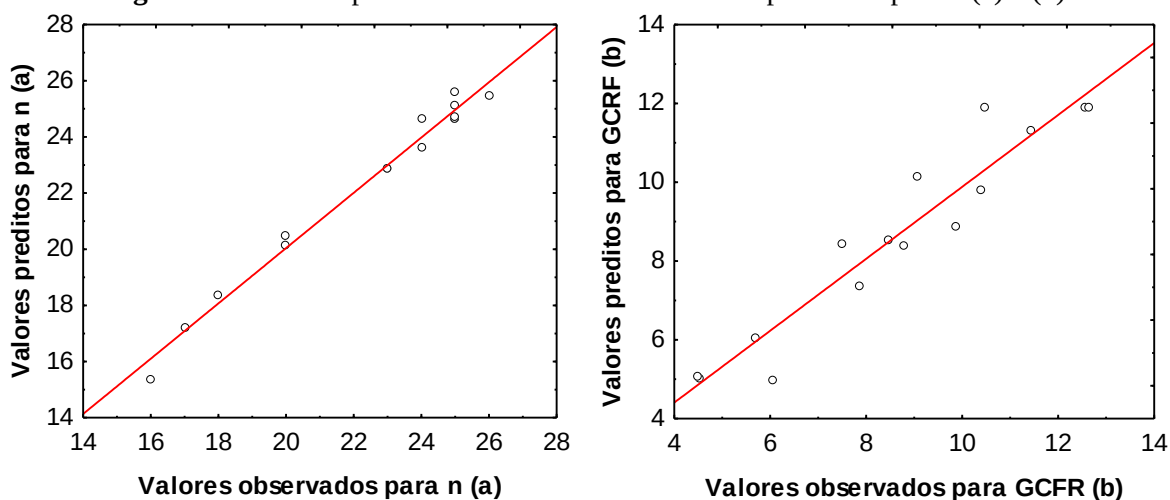
Fator ^a	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F	Valor-p	Resultado ^b
(1) X_6 (L)	5,60506	1	5,60506	3,70240	0,194227	
X_6 (Q)	38,98800	1	38,98800	25,75335	0,036705	Significativo
(2) X_5 (L)	20,97485	1	20,97485	13,85485	0,065198	
X_5 (Q)	6,29292	1	6,29292	4,15676	0,178323	
(3) X_2 (L)	7,29396	1	7,29396	4,81799	0,159370	
X_2 (Q)	23,15431	1	23,15431	15,29447	0,059598	
1L e 2L	5,68822	1	5,68822	3,75733	0,192153	
1L e 3L	0,87463	1	0,87463	0,57773	0,526582	
2L e 3L	0,27790	1	0,27790	0,18357	0,710056	
Falta de ajuste	5,57448	3	1,85816	1,22740	0,478342	
Erro puro	3,02780	2	1,51390			
Total SS	98,76224	14				

^a L, fator linear; Q, fator quadrático.

^b valores de p são estatisticamente significativos para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: próprio autor.

Figura 29 - Valores preditos versus valores observados para as respostas (a) e (b)

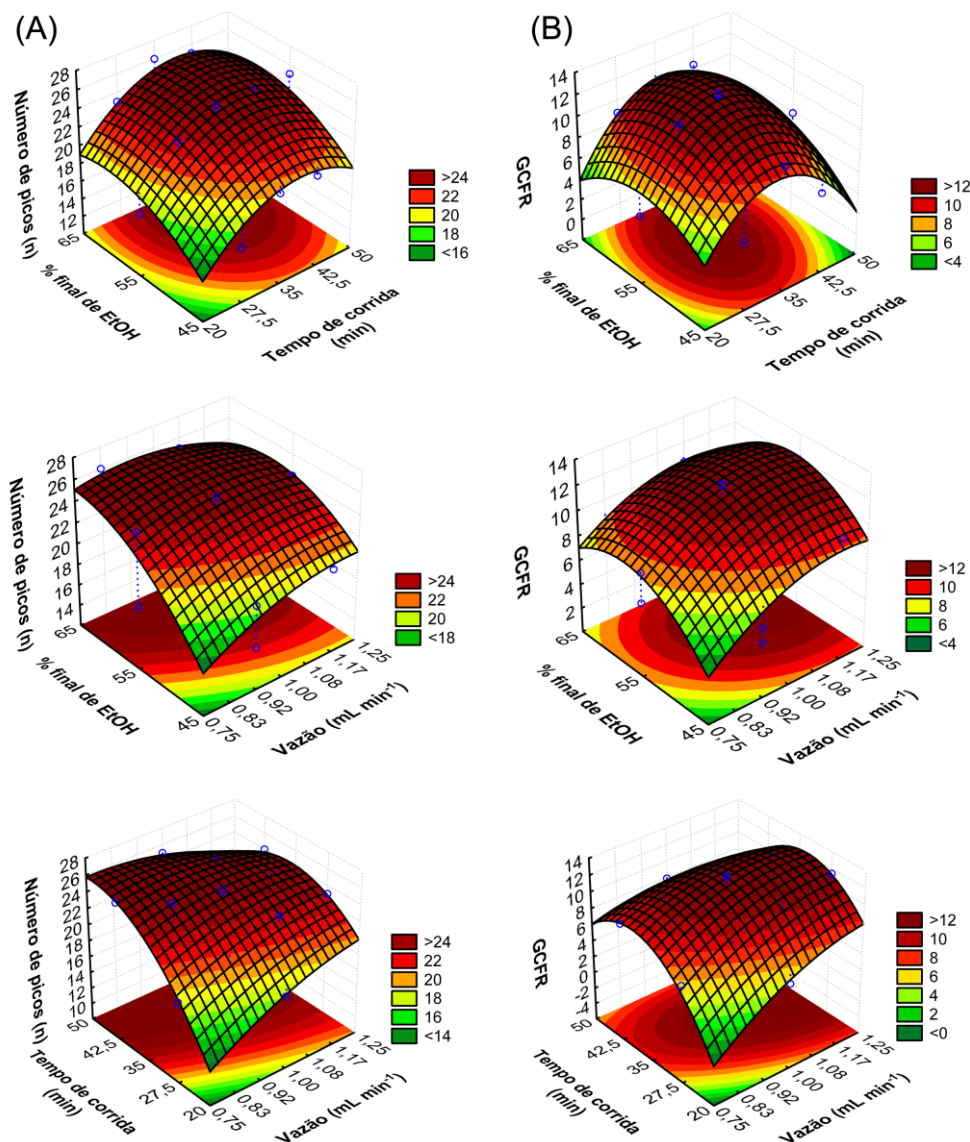


Fonte: próprio autor.

A Figura 30 apresenta os gráficos de superfície de resposta para as variáveis percentagem final de EtOH (X_2), vazão (X_5) e tempo de análise (X_6) para as respostas número de picos (a) (Figura 30A) e GCFR (b) (Figura 30B). As maiores respostas (a e b) foram observadas quando as variáveis X_2 , X_5 e X_6 aproximam-se do nível central (55%, 35 min e 1,00 mL min⁻¹, respectivamente). Foi observado também que a diminuição dos valores das variáveis levando aos níveis inferiores provoca diminuição no número de bandas observadas no cromatograma. Valores inferiores de X_2 , X_5 e X_6 podem causar a retenção na eluição das substâncias. Considerando que os metabólitos presentes no extrato de *S. marginata* são substâncias fenólicas, um maior percentual de solvente orgânico é necessário, a fim de diminuir as interações existentes com a fase estacionária.

Para a resposta GCFR, os níveis superiores provocam diminuição da resposta observada. Valores em níveis superiores de X_2 e X_6 estão associados a uma menor razão entre as bandas adquiridas por unidade de tempo, diminuindo o valor do escore final de GCFR (FUNARI *et al.*, 2014a).

Figura 30 - Superfície de resposta para o modelo otimizado que representa o número de picos (n) (A) e GCFR (B) em função da vazão (mL min^{-1}), % final de EtOH e tempo de análise (min)



Fonte: próprio autor.

4.2.3 Função desejabilidade

A avaliação simultânea do número de picos e respostas GCFR por meio da desejabilidade geral (D), foi de primordial importância para a otimização do método cromatográfico verde. Assim, para maximizar a desejabilidade do método cromatográfico analítico verde, após a obtenção dos modelos apropriados (equações de previsão), foi então encontrado um valor adequado entre as variáveis independentes (X_2 , X_5 e X_6) a fim de se determinar os seus níveis ótimos que resultassem simultaneamente na máxima desejabilidade de acordo com o modelo utilizado para prever cada resposta (a e b). Como resultado, os valores

de cada resposta convertidos em desejabilidade podem variar de 0,0 para indesejáveis a 1,0 para muito desejáveis.

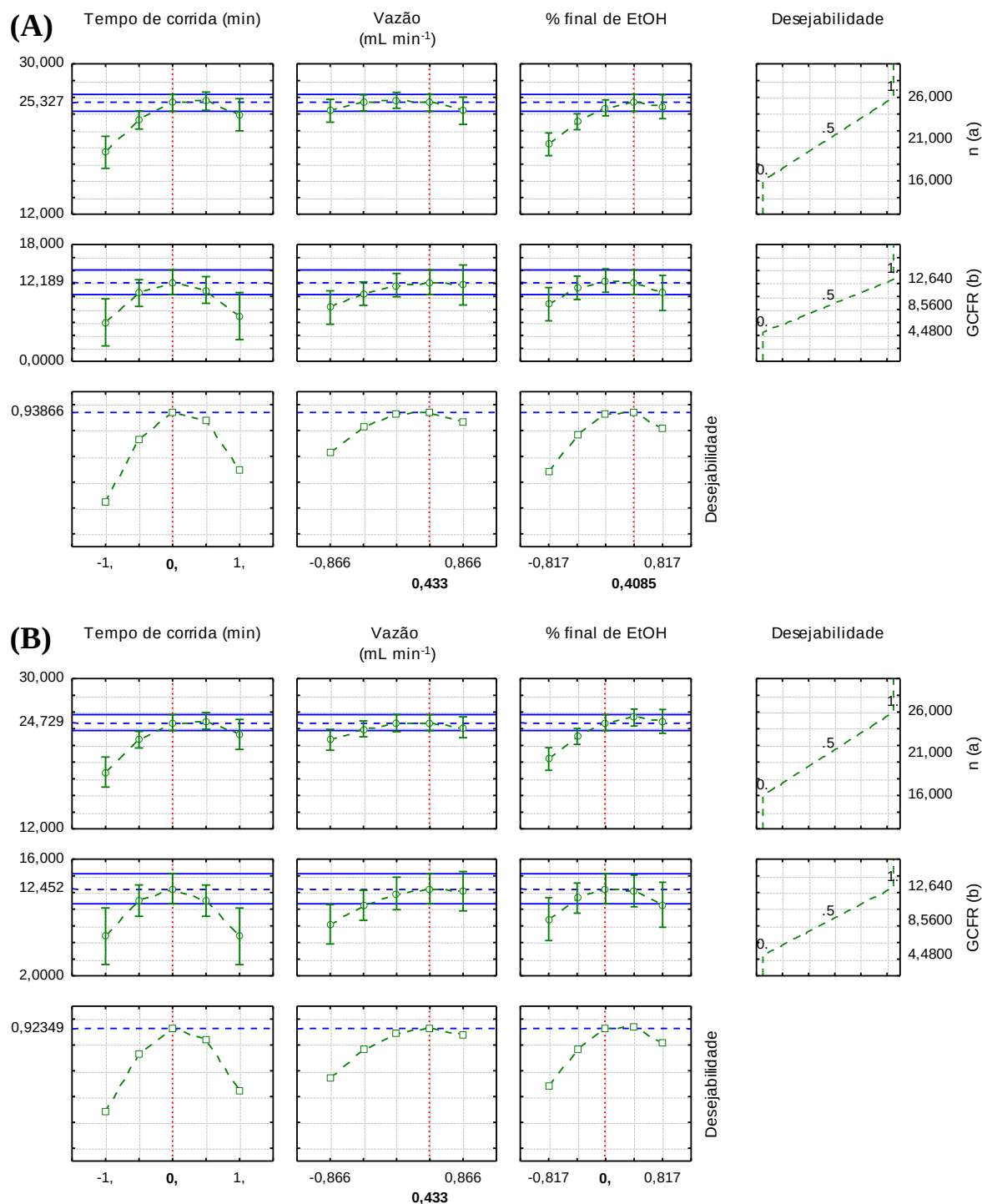
A partir do perfil de desejabilidade mostrado na Figura 31, é possível visualizar os valores previstos para as respostas (a) e (b) em diferentes combinações de níveis das variáveis X_2 , X_5 e X_6 , bem como verificar os níveis que maximizam as respostas. Um alto valor de desejabilidade geral de 0,93866 foi encontrado tendo como níveis ótimos de 35 min (valor codificado 0,0) para o tempo de análise, de 1,11 mL min⁻¹ (valor codificado 0,433) para a vazão e percentagem final de EtOH de 60% (valor codificado 0,4085). Nessas condições, foi possível obter respostas máximas para o número de picos de 25,327 e GCFR de 12,189. Além disso, considerando um intervalo de confiança de 95%, o número de picos (a) varia de 23,923 a 26,730 e o GCFR varia de 9,198 a 15,180. Portanto, valores empíricos utilizados para os níveis de variáveis independentes que forneçam respostas dentro dos limites do intervalo de confiança podem ser considerados significativos.

Após estabelecer os limites aceitáveis para as respostas a e b, as combinações de níveis para as variáveis X_2 , X_5 e X_6 foram cuidadosamente investigadas, tendo em conta a aplicabilidade dos princípios da química verde. Na prática, foram avaliados os níveis que minimizariam o consumo de solvente orgânico na composição da fase móvel e que, consequentemente, teriam menor impacto ambiental. No caso das análises cromatográficas de *S. marginata*, a métrica GCFR contribui de forma mais significativa com a obtenção de métodos mais verdes para etapa posterior de padronização dos fitopreparados, pois forneceu pontuação satisfatória e que permitiu quantificar o desempenho da análise cromatográfica, alcançando o desejado equilíbrio entre separação e sustentabilidade (FUNARI *et al.*, 2014a, 2014b; SOUZA *et al.*, 2021). Além disso, considerando os termos avaliados na equação de GCFR (Equação 1), podemos assumir que esse conjunto de variáveis selecionadas foi eficiente para a obtenção do método de separação mais otimizado, uma vez que, compreendeu não só a maximização da qualidade da separação cromatográfica (uniformidade da distribuição das bandas cromatográficas ao longo do cromatograma), mas também, a maximização da quantidade total das bandas cromatográficas contabilizadas em cada análise (FUNARI *et al.*, 2014a, 2014b).

Baseando-se nas considerações acima, foram então selecionados os níveis que levariam à maximização da resposta GCFR (b). Assim, foi observado no gráfico da Figura 31A que, para a variável X_5 , o ponto máximo para a resposta GCFR está no nível 0,0 (percentagem final EtOH de 55%). Esse nível foi então plotado para a variável X_5 no software STATISTICA e foram obtidos os valores previstos correspondentes 24,729, 12,452 e 0,92349 para as respostas número de picos (a), GCFR (b) e desejabilidade geral (D), respectivamente (Figura 31B). Com

essa mudança, foi encontrado o maior valor para GCFR, como esperado, bem como todas as respostas obtidas tiveram seus valores dentro dos limites de confiança previamente estabelecidos. Além disso, a diminuição da percentagem final de B causa uma leve redução na inclinação do gradiente linear de aproximadamente 1,43% EtOH min⁻¹ para 1,29% EtOH min⁻¹, o que, em HPLC de fase reversa, não provoca alteração significativa na força da fase móvel e, portanto, não influencia na resolução da separação, mantendo o desempenho do método cromatográfico.

Figura 31 - Perfis para os valores previstos e de desejabilidade para as respostas número de bandas cromatográficas (a) e GCFR (b) considerando: **(A)** o valor D ótimo e **(B)** os níveis de ajuste especificados pelo usuário para a % final de EtOH (X_5)



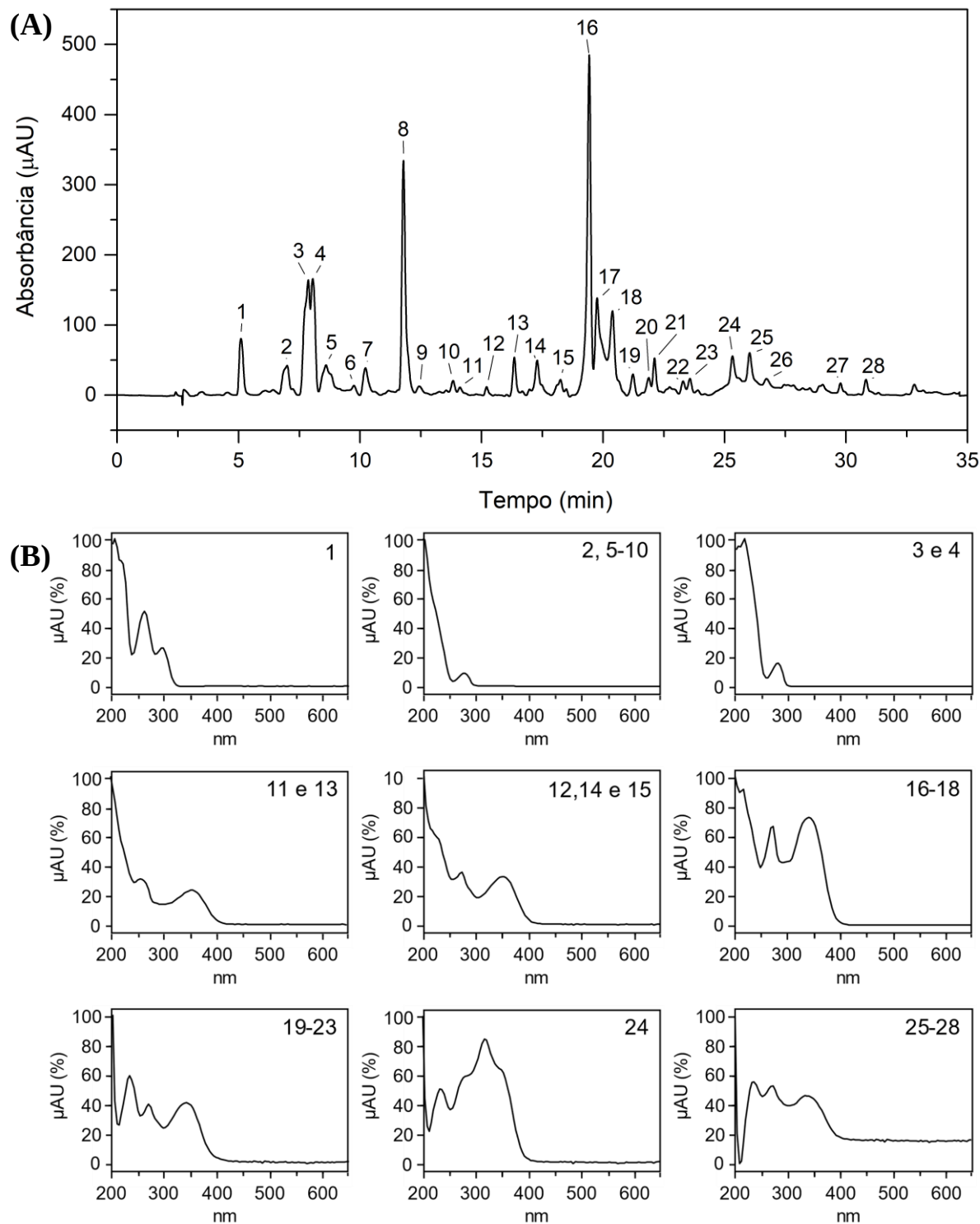
Fonte: próprio autor.

Por fim, a condição prevista pelo modelo selecionado foi testada usando 55% (valor codificado de 0,0) para a percentagem final de EtOH (X_2), 1,11 mL min⁻¹ (valor codificado de 0,433) para a vazão (X_5) e 35 min (valor codificado de 0,0) para tempos de análise (X_6). Usando

esses parâmetros, obtivemos o valor médio de $28,00 \pm 1,29$ para o número de picos (a) (média $\pm$ DP, n = 6) e $12,21 \pm 1,90$ (média $\pm$ DP, n = 6) para GC/MS (b) foram obtidos, mostrando que o modelo tem alta qualidade de estimativa.

A otimização do modelo permitiu obter um cromatograma com boa linha de base e resolução suficiente para que fosse possível obter os espectros no ultravioleta para cada pico cromatográfico (Figura 32). Assim, foi possível atribuir as classes de substâncias fenólicas encontradas no extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata* [ácidos fenólicos (**1**), 190-220 e 260- 280 nm; proantocianidinas (**2** a **9**), 190-220 e 270-280 nm (ROHR; MEIER; STICHER, 2000; WANG; HELLIWELL; YOU, 2000); flavonóis (**11** e **13**) 240-290 nm e 352-385 nm e, flavonas (**12**, **14**, **15** a **23**), 240-290 nm e 304-350 nm (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; MERKEN; BEECHER, 2000) (Figura 32B)].

Figura 32 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA utilizando o método otimizado verde na análise do extrato etanólico 70% das folhas de *Serjania marginata*. **(A)** Cromatograma em $\lambda = 270$ nm. **(B)** Espectro de absorção UV: banda **1**, ácido fenólico; bandas **2 a 10**, derivados de catequina/epicatequina; bandas **11 e 13**, derivados de flavonóis; bandas **12, 14, 15 a 23**, derivados de flavonas; bandas **24 a 28**, não identificado



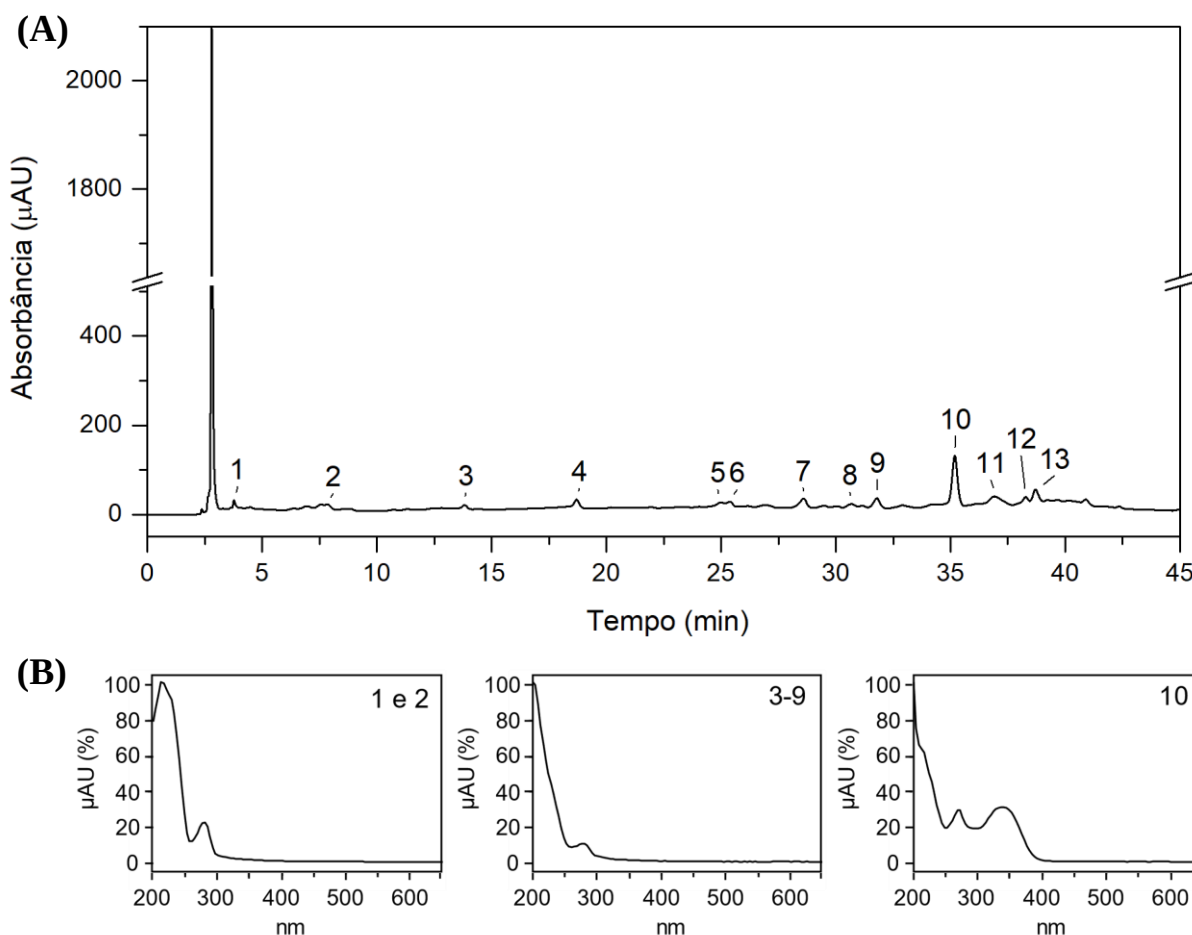
Condições cromatográficas: Coluna: Luna Phenomenex® Fenil Hexil, 250 x 4,6 mm. Fase móvel: H₂O + 0,1% de ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 10-55% de B em 35 min. Vazão: 1,11 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 60 °C; volume de injeção: 10 μL.

Fonte: próprio autor.

4.2.4 Avaliação do desempenho e do impacto ambiental do método desenvolvido

O método desenvolvido nesse trabalho foi comparado com o método desenvolvido anteriormente por VIEIRA (2014) para a análise do extrato 70% etanol das folhas de *S. marginata*. As condições do método relatadas na literatura foram reproduzidas para fins de comparação e são mostradas na Figura 33. O método descrito anteriormente empregou um gradiente linear com fase móvel composta de água acidificada com ácido acético 0,1% (solvente A) e metanol (solvente B), de 25 a 75% (B) em 45 min, vazão de 1,00 mL min⁻¹ e coluna C18 Phenomenex Luna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm).

Figura 33 - Perfil cromatográfico por HPLC-PDA do extrato etanólico 70% das folhas de *Serjania marginata*. (A) Cromatograma em $\lambda = 270$ nm, de acordo com o método de referência desenvolvido por VIEIRA (2014). (B) Espectro de absorção UV: picos **1** a **9**, derivados de catequina/epicatequina; **10**, derivados de flavonas; estão abaixo do limite de detecção



Condições cromatográficas utilizadas baseadas no trabalho de VIEIRA, S. C. H. **Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas:** *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae). 2014. Tese (Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

Coluna: Luna Phenomenex® C18, 250 x 4,6 mm. Fase móvel: H₂O + 0,1% de ácido acético (A) e MeOH (B) no seguinte gradiente: 25-75% de B em 45 min. Vazão: 1,00 mL min⁻¹. Temperatura de análise: temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C; volume de injeção: 50 µL.

Comparando os perfis cromatográficos, o método de referência (VIEIRA, 2014) mostrou apenas 13 bandas cromatográficas e valor GCFR de 1,67, demonstrando que o método desenvolvido nessa pesquisa mostrou melhor desempenho cromatográfico na análise das substâncias fenólicas de *S. marginata*, com maior número de picos (28), além de GCFR de 12,21.

Além do desempenho da metodologia verde medida pelo GCFR, também é importante considerar os impactos ambientais causados pelas análises cromatográficas e, para isso, foram utilizadas as métricas HPLC-EAT e AGREE.

A métrica HPLC-EAT foi utilizada para comparar os métodos cromatográficos líquidos quanto à composição e consumo da fase móvel utilizada nas análises, o que permitiu uma avaliação dos riscos que os solventes representam, em termos de impacto ambiental, saúde e segurança. Como resultado, quanto menor a pontuação obtida, menor o impacto ambiental do método cromatográfico líquido e, conseqüentemente, mais verde ele é (GABER *et al.*, 2011). Usando essa métrica, as pontuações de 25,40 *versus* 47,58 foram obtidas para o método verde e o método da literatura (VIEIRA, 2014), respectivamente, ou seja, nosso método é duas vezes mais seguro para o meio ambiente.

A maior contribuição para a diferença dos impactos medidos observados para os dois métodos está relacionada ao fator de segurança, já que o metanol é muito mais volátil que o etanol, e evapora rapidamente à temperatura ambiente. O metanol é altamente inflamável e os seus vapores liberados no ambiente durante a análise podem formar misturas explosivas que podem ser facilmente inflamadas pelo calor, faíscas ou chamas. Além disso, exposição excessiva do operador aos vapores desse solvente pode resultar em irritação dos olhos, dor de cabeça, tonturas, náuseas, fadiga, entre outros sintomas (GABER *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2021; NCBI, 2021).

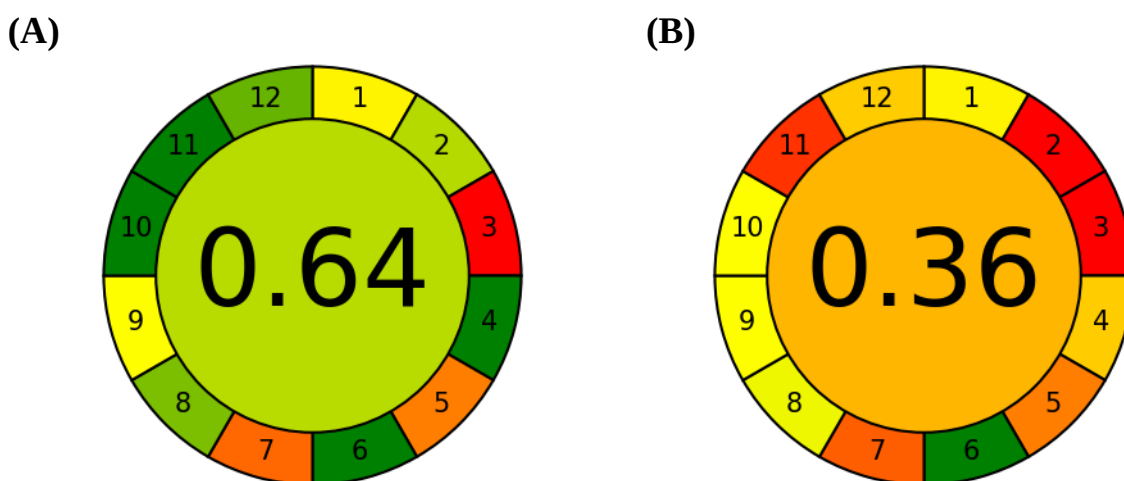
Portanto, embora o metanol tenha viscosidade menor quando comparado com o etanol, ele apresenta toxicidade para os seres humanos, organismos aquáticos e terrestres (PRITCHARD, 2011). No entanto, a alta viscosidade das combinações de fase móvel contendo etanol pode ser facilmente superada pelo aumento da temperatura, resolvendo os problemas de pressão que se teria no sistema de cromatografia líquida (OLIVES; GONZÁLEZ-RUIZ; MARTÍN, 2017; PACHECO-FERNÁNDEZ; PINO, 2019; WELCH *et al.*, 2010).

Assim, nosso resultado evidencia que a substituição do metanol pelo etanol é uma alternativa muito mais verde nas análises HPLC de amostras de *S. marginata*. Além disso, o volume de solvente orgânico consumido em nossas análises foi reduzido em 43% quando comparado com o volume utilizado por VIEIRA (2014), o que também o torna mais econômico,

uma vez que o custo do bioetanol de grau alimentício é muito menor quando comparado ao metanol de grau HPLC (em média de R\$ 30,00 *versus* R\$ 350,00 por litro, respectivamente).

Finalmente, considerando a métrica do AGREE, os métodos foram avaliados de acordo com os 12 Princípios da Química Analítica Verde (GAC, *Green Analytical Chemistry*) (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013; PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020). O desempenho dos métodos é mostrado nos gráficos dos pictogramas (Figura 34). A pontuação mostrada no meio do gráfico indica o quão verde é o procedimento analítico e, à medida que os valores se aproximam de 1, mais verde o método é considerado e está de acordo com os 12 princípios (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020).

Figura 34 - Gráfico pictograma gráfico da análise pela métrica AGREE para o (A) método verde otimizado e para o (B) método da literatura



Fonte: próprio autor (figura obtida no software AGREE com dados da pesquisa).

A Tabela 18 apresenta os parâmetros detalhados para cada item da métrica AGREE para o método verde método otimizado e o método desenvolvido por VIEIRA (2014), respectivamente. Comparando as pontuações dos dois métodos, 0,64 (método verde otimizado) e 0,36 [método VIEIRA (2014)] (Figura 34), a diferença de desempenho de cada procedimento é notável, principalmente devido à toxicidade dos solventes utilizados.

Tabela 18 - Critérios avaliados e classificação para o método verde otimizado e o método da literatura pelo software AGREE

Princípios	Método verde otimizado		Método VIEIRA, 2014	
	Procedimento	Escore	Procedimento	Escore
1. Tratamento da amostra	Análise <i>off-line</i>	0,48	Análise <i>off-line</i>	0,48
2. Quantidade de amostra	1 g de pó vegetal para extração por ultra-som	0,65	500 g de pó vegetal para extração por percolação	0,00
3. Posicionamento do aparelho	Medida <i>off-line</i>	0,00	Medida <i>off-line</i>	0,00
4. Etapas de preparação das amostras	3 etapas diferentes ou menos	0,80	6 etapas diferentes	0,40
5. Automação, miniaturização	Semi-automática/não miniaturizado	0,25	Semi-automática/não miniaturizado	0,25
6. Derivatização	Sem agentes de derivatização	1,00	Sem agentes de derivatização	1,00
7. Resíduos	38,85 mL de fase móvel	0,20	45,00 mL de fase móvel	0,18
8. Desempenho da análise*	28 analitos foram determinados em uma única execução e o desempenho da amostra é de aproximadamente 1,00 amostras por hora	0,73	13 analitos foram determinados em uma única execução e o desempenho da amostra é de aproximadamente 0,86 amostras por hora	0,53
9. Consumo de energia	HPLC foi a técnica analítica mais consumidora de energia	0,50	HPLC foi a técnica analítica mais consumidora de energia	0,50
10. Fonte dos reagentes	Todos os solventes são <i>bio-based</i> (bioetanol e água)	1,00	Alguns solventes são <i>bio-based</i> (água)	0,50
11. Toxicidade	Nenhum solvente tóxico	1,00	22,75 mL de solvente tóxico como fase móvel (MeOH)	0,10
12. Segurança do operador	EtOH é altamente inflamável	0,80	MeOH é tóxico para a vida aquática, bioacumulativo e altamente inflamável	0,40

* considerando tempo de total da análise, 10 min de limpeza da coluna e 15 min de condicionamento.

O uso de etanol como solvente orgânico na análise HPLC leva em conta os princípios do 10º, 11º e 12º GAC, devido ao uso de solventes renováveis, redução de resíduos tóxicos e maior segurança do operador (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Outros critérios importantes foram o uso de quantidade mínima de material vegetal (2º) e a abordagem multiparâmetros (8º) (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). O uso do planejamento de experimentos no desenvolvimento do método cromatográfico também é considerado uma abordagem com base nos princípios da química verde, uma vez que economiza tempo e recursos para ter respostas mais confiáveis de um número menor de experimentos, estando de acordo com os princípios 7º e 9º do GAC (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

A Tabela 19 mostra um resumo das métricas utilizadas e os escores atribuídos a cada etapa realizada nos desenvolvimentos dos métodos (por exemplo, pré-tratamento da amostra e, condicionamento, eluição e limpeza da coluna) e o impacto atribuído a cada fator. O método verde otimizado nesse trabalho mostrou uma consistente redução do impacto ambiental quando comparado com o método de VIEIRA (2014).

Tabela 19 - Valores de escores obtidos nas métricas verdes para a avaliação dos impactos dos procedimentos analíticos

		Escore dos impactos				
	Método	Segurança (S)	Saúde (H)	Ambiental (E)	HPLC-EAT ^b	AGREE
Pré-tratamento da amostra	Método otimizado verde	10,62	1,14	2,73	14,49	-
	Método VIEIRA (2014)	19,46	4,36	3,24	27,07	-
Eluição da fase móvel	Método otimizado verde	18,63	1,99	4,78	25,40	-
	Método VIEIRA (2014)	34,21	7,66	5,70	47,58	-
Soma de todos os procedimentos analíticos ^c	Método otimizado verde	32,61	3,49	8,37	44,47	0,67
	Método VIEIRA (2014)	60,52	13,55	10,09	84,16	0,36

^a para os escores de S, H, E e HPLC-EAT quanto menor o valor, mais verde o método, enquanto que para os escores AGREE, os valores maiores estão relacionados com o melhor desempenho verde do método.

^b O escore HPLC-EAT é a soma dos três impactos: segurança (S), saúde (H) e ambiental (E).

^c incluiu as seguintes etapas: pré-tratamento da amostra, eluição (tempo total de funcionamento), limpeza da coluna durante 10 min e 15 min de condicionamento.

Fonte: próprio autor.

4.2.5 Validação do método otimizado

O método cromatográfico aqui desenvolvido foi validado com base nas diretrizes da ANVISA e ICH a fim de padronizar o extrato das folhas de *S. marginata* e quantificar as substâncias marcadoras presentes. A validação do método foi realizada pelas curvas de calibração dos padrões externos ácido protocatecuico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e apigenina. O estudo dos parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e robustez) gerou informações sobre o desempenho da validação do método, assim como consistência, confiabilidade e a estimativa das incertezas associadas aos resultados.

A linearidade do método analítico foi determinada pelo método de regressão linear de acordo com as curvas de calibração dos padrões externos. As curvas de calibração para cada analito apresentaram coeficientes de correlação (R^2) superiores a 0,99 (Tabela 20) estando de acordo com os valores necessários para a análise dos princípios ativos na matéria-prima vegetal (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo (PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

Os LDs e LQs foram determinados a partir das curvas de calibração a fim de estabelecer a sensibilidade do método (Tabela 20). Os valores de LD e LQ encontrados foram os seguintes: 4,41 e 13,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido protocatecuico, 1,25 e 3,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a (+)-catequina, 5,80 e 17,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a (-)-epicatequina, e 3,74 e 11,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a apigenina, respectivamente.

Tabela 20 - Curvas de calibração, faixa linear, dados LD e LQ, para os padrões de referência determinados por HPLC-PDA

Parâmetros de validação	Padrões			
	ácido protocatecuico	(+)-catequina	(-)-epicatequina	apigenina
Linearidade (n = 3)				
Equação de regressão	y = 0,0066x + 0,0086	y = 0,0015x - 0,0008	y = 0,0018x - 0,0168	y = 0,0121x - 0,0474
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	13,37 - 500	3,79 - 500	17,56 - 1000	7,82 - 500
R^2 ^a	0,9941	0,9996	0,9977	0,9998
Sensitividade (n = 3)				
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,41	1,25	5,80	3,74
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	13,37	3,79	17,56	11,33

^a R^2 , coeficiente de determinação.

Fonte: próprio autor.

A avaliação do ajuste do modelo linear e da validade da regressão foi realizada pela análise das variâncias (teste F de significância). Os valores de F experimental, para cada padrão de referência, foram calculados a partir da razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos ($F_{\text{exp}} = \text{MQR}/\text{MQr}$) e a partir da razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro ($F_{\text{exp}} = \text{MQFa}/\text{MQep}$); esses valores de F_{exp} foram então comparados com os valores críticos de 4,38 ($F_{1,19,95\%}$) para a significância da regressão e 2,96 ($F_{5,14,95\%}$) para o ajuste. A relação entre os valores de F (Tabela 21) constatam que a regressão linear é estatisticamente significativa ($F_{\text{exp}} \geq F_{\text{crítico}}$ e valor- $p < 0,05$), ou seja, indica a existência proporcionalidade entre a concentração do padrão e a área da banda cromatográfica na faixa de concentração analisada; e não apresenta falta de ajuste devido a erros aleatórios ($F_{\text{exp}} \leq F_{\text{crítico}}$ e valor- $p > 0,05$) (CASSIANO *et al.*, 2009; PIMENTEL; NETO, 1996). Isto significa que os modelos de regressão linear obtidos para cada padrão de referência mostram homoscedasticidade, sugerindo que os modelos estão bem definidos e que as curvas de calibração podem ser usadas em análises quantitativas para prever a concentração dos analitos presentes no extrato da planta.

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão linear para os padrões de referência

Curva ^a	Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{exp}	$F_{\text{crítico}}^b$	Valor- p
PCA	Regressão	25,09	1	25,09	3217,84	4,38	1,15E-22
	Resíduos	0,15	19	7,80E-03			
	Falta de ajuste	0,11	5	2,19E-02	7,90E-03	2,96	1,00
	Erro puro	38,82	14	2,77			
	Total	25,23					
(+) - C	Regressão	1,38	1	1,38	50369,34	4,38	5,41E-34
	Resíduos	5,20E-04	19	2,74E-05			
	Falta de ajuste	7,49E-05	5	1,50E-05	0,47	2,96	0,79
	Erro puro	4,46E-04	14	3,18E-05			
	Total	1,38					
(-) - EC	Regressão	8,17	1	8,17	9468,99	4,30	1,75E-30
	Resíduos	1,90E-02	22,00	8,63E-04			
	Falta de ajuste	2,78	6	0,46	2,50	2,74	0,067
	Erro puro	2,97	16,00	0,19			
	Total	8,19					
AP	Regressão	84,66	1	84,66	89573,03	4,38	2,28E-36
	Resíduos	1,80E-02	19	9,45E-04			
	Falta de ajuste	1,74E-03	5	3,48E-04	0,30	2,96	0,90
	Erro puro	1,62E-02	14	1,16E-03			
	Total	84,68					

^a modelo de regressão linear para as curvas analíticas dos padrões de referência: PCA, ácido protocatecuico; (+) - C, (+) - catequina; (-) - EC, (-) - epicatequina; AP, apigenina.

^b nível de confiança de 95%.

Fonte: próprio autor.

A repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia) para o método cromatográfico foram avaliadas em relação ao tempo de retenção e às áreas das bandas cromatográficas das substâncias quantificadas durante a análise do extrato de *S. marginata* (bandas **1-5**, **7**, **8** e **16-18**). O DPR máximo para a área total das bandas cromatográficas foi de 4,93%, enquanto o DPR máximo observado para o tempo de retenção foi de 0,95%. Os resultados de DPR encontrados para os experimentos intra e inter-dia estão dentro dos limites estabelecidos pela RE 899/03, sendo considerados métodos precisos aqueles com desvio padrão relativo menor que 5% (BRASIL, 2017). Portanto, o método desenvolvido apresenta precisão satisfatória e confiabilidade nas medidas para a análise quantitativa dos metabólitos **1-5**, **7**, **8** e **16-18** presentes no extrato de *S. marginata*.

A robustez do método foi avaliada pelo teste de Youden (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; YOUDEN, 1967). Os quatro parâmetros, vazão (P1), concentração de ácido acético (P2), temperatura da coluna (P3) e composição da fase móvel (P4), foram selecionados de acordo com as condições experimentais. A influência dos parâmetros no método foi avaliada pelos valores de efeito e pela distribuição *half-normal* que permitiu a análise da significância dos parâmetros para a resposta (Tabela 22).

O parâmetro P2 apresentou o maior efeito sobre os resultados tanto para o tempo de retenção quanto para a área de pico. Esse resultado demonstra que pequenas variações no pH podem ter efeitos sobre o tempo de retenção, forma de pico, resolução e reprodutibilidade. Entretanto, as variações dos parâmetros não mostraram diferença significativa para a resposta ($p < 0,05$) (Tabela 22). Portanto, esse método pode ser considerado bastante robusto e capaz de resistir a variações pequenas e deliberadas nos parâmetros analíticos, indicando sua confiabilidade para aplicação na análise de extratos de *S. marginata*, que é necessária para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos.

Tabela 22 - Resultados de robustez do método para tempo de retenção (t_r) e área de pico (A)

Parâmetro	Efeito		Distribuição <i>half-normal</i>		<i>p</i> -valor		Critério de aceitação	Resultado
	t_r	A	t_r	A	t_r	A		
P1	3,49	-0,88	0,46	0,09	0,62	0,85	$p > 0,05$	Efeito Nulo
P2	-5,06	-5,18	0,92	1,24	0,49	0,33		Efeito Nulo
P3	-4,80	-2,07	0,67	0,27	0,51	0,67		Efeito Nulo
P4	1,21	-2,82	0,09	0,67	0,86	0,56		Efeito Nulo

Fonte: próprio autor.

4.2.6 Aplicação do método otimizado na análise qualitativa e quantitativa de *S. marginata*

O método cromatográfico otimizado foi então aplicado tanto na análise qualitativa como quantitativa do extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata*. As condições otimizadas para o método verde foram transpostas para a análise do perfil metabólico do extrato de *S. marginata* por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A análise por UFLC-ESI-IT-MS permitiu identificar no espectro de massas os íons moleculares das moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ e com o padrão de fragmentação de massa por CID-MS/MS em conjunto com dados da literatura foi possível propor a anotação das substâncias fenólicas para as bandas cromatográficas: **1**, ácido protocatecuico; **2**, (epi)catequina-(epi)catequina; **3**, (epi)catequina-A-(epi)catequina-(epi)catequina (-A- representa uma ligação interflavona do tipo A); **4**, (epi)catequina; **5**, (epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina; **6**, (epi)afzelequina-(epi)catequina; **7**, (epi)catequina-A-(epi)catequina; **(8)** (epi)catequina-A-(epi)catequina; **(10)** (epi)catequina-A-(epi)catequina; **11**, quercetina-O-hexose; **(12)** apigenina-C-[2"-O-(deoxihexose)-pentose]; **(13)** quercetina-O-deoxihexose; **14**, luteolina-6-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose]; **15**, luteolina-8-C-[O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose]; **16**, cassiaoccidentalina A; **17**, tetrastigma B; **18**, apigenina-C-hexos-3-ulose-2"-O-deoxihexose; **21**, metil-luteolina-6-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] e **23**, metil-luteolina-8-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose]. O perfil cromatográfico por UFLC-ESI-IT-MS, os espectros de massas de segunda ordem e a anotação para cada substância, estão fornecidos no Apêndice Figuras A9-A31 e Apêndice Tabela A1.

A boa seletividade do método (condições determinadas pelo modelo) permitiu diferenciar e comparar o tempo de retenção e a similaridade entre os espectros de UV das principais substâncias marcadoras presentes no extrato hidroetanólico de *S. marginata* (Figura 32).

A concentração individual das substâncias presentes no extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata* foi estabelecida a partir das curvas analíticas validadas para os padrões de referência ácido protocatecuico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e apigenina. De acordo com a resposta de detecção no PDA, os espectros de UV das bandas no perfil cromatográfico do extrato foram comparados aos espectros UV dos padrões. Desse modo, a curva analítica empregada na quantificação das substâncias no extrato foi escolhida com base no índice de similaridade espectral entre o analito alvo e o padrão, sendo considerados apenas aqueles com valores de similaridade maiores que 0,98. Assim, a substância **1** foi quantificada com base na curva analítica do ácido protocatecuico, as substâncias **2**, **5** e **7** com base na curva da (+)-

catequina, as substâncias **3**, **4** e **8** com base na curva da (-)-epicatequina e as substâncias **16** a **18** com base na curva da apigenina (Tabela 23).

Com relação aos dados de repetibilidade das análises do extrato, foi aceito um valor máximo de 5% para o coeficiente de variação (CV) nas determinações quantitativas bandas cromatográficas, estando em conformidade com os padrões normativos estabelecidos para as medições de produtos à base de plantas.

Usando o ajuste matemático (Peak Analyzer, software OriginPro) foi possível corrigir a linha de base e desconvoluir as bandas sobrepostas no cromatograma permitindo estimar com mais precisão as áreas de cada banda e determinar as quantidades das substâncias. O teor de cada substância quantificada está apresentado na Tabela 23.

Tabela 23 - Teores para o ácido protocatecuico e derivados de catequina, epicatequina e apigenina no extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata*

t_R (min)	[] $\pm$ DP ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[] $\pm$ DP ^b (mg g^{-1}) extrato	CV (%) ^c	Teor (%)	Curva ^d	Índice de similaridade
5,10 (1)	28,91 $\pm$ 0,91	2,89 $\pm$ 0,09	3,15	0,29	PCA	0,9990
6,99 (2)	161,10 $\pm$ 4,09	16,11 $\pm$ 0,41	2,54	1,61	(+)-C	0,9923
7,87 (3)	510,24 $\pm$ 4,85	51,02 $\pm$ 0,48	0,95	5,10	(-)-EC	0,9874
8,03 (4) ^a	278,93 $\pm$ 4,85	27,89 $\pm$ 0,48	1,72	2,79	(-)-EC	0,9992
8,60 (5)	203,66 $\pm$ 3,14	20,37 $\pm$ 0,31	1,54	2,04	(+)-C	0,9934
10,23 (7)	170,36 $\pm$ 4,88	17,04 $\pm$ 0,49	2,87	1,69	(+)-C	0,9898
11,79 (8)	974,78 $\pm$ 3,08	97,48 $\pm$ 0,31	0,92	9,75	(+)-EC	0,9859
19,84 (16)	155,42 $\pm$ 3,50	15,54 $\pm$ 0,35	2,25	1,54	AP	0,9975
20,19 (17)	47,93 $\pm$ 1,39	4,79 $\pm$ 0,14	2,91	0,48	AP	0,9815
20,79 (18)	49,03 $\pm$ 2,42	4,90 $\pm$ 0,24	4,93	0,49	AP	0,9978
Total ácidos fenólicos (1)	28,91 $\pm$ 0,91	2,89 $\pm$ 0,09	-	0,29	PCA	-
Total catequinas (2-8)	2299,07 $\pm$ 24,89	229,91 $\pm$ 2,48	-	22,98	(+)-C; (-)-EC	-
Total flavonas (16-18)	250,87 $\pm$ 7,31	25,09 $\pm$ 0,73	-	2,51	AP	-

^a (-)-epicatequina (identificada pela co-injeção do padrão no extrato e a comparação dos espectros de UV)

^b DP: desvio padrão para $n = 6$.

^c CV: coeficiente de variação.

^d Curva analítica empregada na quantificação com base na similaridade espectral com os padrões de referência: PCA, ácido protocatecuico; (+)-C, (+)-catequina; (-)-EC, (-)-epicatequina; AP, apigenina.

Fonte: próprio autor.

Os resultados da análise quantitativa por HPLC-PDA indicam que a substância mais abundante no extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata*, contribuindo com até 9,75% do extrato em peso, foi a (epi)catequina-A-(epi)catequina (**8**), seguido por (epi)catequina-A-(epi)catequina-(epi)catequina (**3**) com 5,10% e a (-)-epicatequina (**4**) com 2,79%.

As substâncias pertencentes à classe das proantocianidinas foram aquelas com maior quantidade no extrato de folhas de *S. marginata*, com teor total de 22,98% do extrato em peso, expressos em (+)-catequina e (-)-epicatequina.

Como visto previamente, as proantocianidinas são consideradas as substâncias responsáveis pela ação gastroprotetora do extrato hidroetanólico de *S. marginata* (HEREDIA-VIEIRA *et al.*, 2015; PÉRICO *et al.*, 2015). Outros estudos da literatura demonstram que essas substâncias podem atuar como agentes anti-inflamatórios (CZERWIŃSKA *et al.*, 2018), antioxidantes, antivirais (SHAHAT *et al.*, 2002), anti-neuroinflamatórios, sensibilizantes da insulina (TANG *et al.*, 2018; XIONG *et al.*, 2020), entre outros.

Os valores de quantificação podem ser comparados com o estudo de VIEIRA (2014), no qual foram quantificadas as substâncias cinamtanino B-1 (equivalente à substância **3**) e tetrastigma B (equivalente à substância **17**) por UPLC-QTOF-MS/MS, sendo determinado que o extrato etanólico 70% de *S. marginata*, havia 2,80% da substância **3** e 0,10% da substância **17**. Essas diferenças no teor das substâncias quantificadas podem ser atribuídas a vários fatores que podem afetar significativamente a sua concentração nos extratos vegetais, tais como mudanças ambientais durante o crescimento, período de coleta, tratamento da amostra pós-coleta, extração, método de preparação de amostras, entre outros (SALEM *et al.*, 2020; YULIANA *et al.*, 2011; ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021).

4.3 PARTE C: Desenvolvimento de pré-formulações com ciclodextrina

Extratos herbais das espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* constituem ricas fontes de substâncias com propriedades antioxidantes, e que podem atuar no tratamento/prevenção de muitas doenças inflamatórias, como mencionado previamente. Entretanto, embora existam vários benefícios farmacológicos atribuídos às substâncias presentes nesses extratos, em razão de suas baixas solubilidades em meio aquoso, suas absorções por via oral são dificultadas e por isso podem diminuir suas biodisponibilidades e os seus efeitos potenciais na saúde.

Como exemplo, a possível eficácia no corpo humano das substâncias fenólicas é determinada por dois fatores: 1) a bioacessibilidade, que é a liberação dos princípios ativos da matriz e a estabilidade deles durante o processo de digestão e 2) a biodisponibilidade das moléculas bioativas, que é a fração da substância ingerida atinge locais específicos pela circulação. No caso dos flavonoides, apenas 5-10% do total ingerido é absorvido no intestino

delgado, sendo que o restante chega ao cólon, onde são metabolizados pela microbiota intestinal (KAMILOGLU *et al.*, 2020).

Uma alternativa para contornar essa situação é o desenvolvimento de sistemas de liberação através da complexação com ciclodextrinas, que têm sido amplamente utilizados para melhorar a solubilidade das substâncias fenólicas em solução aquosa, melhorando a absorção oral e a taxa de dissolução e consequentemente aumentando a biodisponibilidade e os efeitos farmacológicos.

Como exemplo dessa estratégia, VOINOVICH *et al.* (2009) VOINOVICH *et al.*, (2009) complexaram o extrato seco de *Silybum marianum* (cardo-mariano) com β -ciclodextrina (BCD), verificando um aumento de 6,5 vezes na biodisponibilidade dos flavonoides derivados da taxifolina em relação ao extrato bruto. Esses e outros resultados indicaram que a baixa solubilidade e a barreira de absorção intestinal podem ser superadas com a formulação BCD+extrato seco (DOS SANTOS LIMA *et al.*, 2019).

4.3.1 Determinação granulométrica dos pós vegetais e rendimento de extração

O processo de pulverização da matéria prima vegetal constitui uma etapa importante para obtenção dos extratos vegetais visto que, influencia diretamente na reprodutibilidade e eficiência do processo de extração. O grau de divisão ou a granulometria dos pós vegetais de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* foi estabelecido de acordo com as metodologias dispostas na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

A determinação do percentual retido em cada tamis (Tabela 24) foi realizada pelo cálculo:

$$\% \text{ retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \cdot 100$$

onde P_1 é o peso da amostra retida em cada tamis (em gramas) e P_2 é a soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas) (BRASIL, 2019).

Tabela 24 - Percentuais de retenção no tamis para determinação da granulometria dos pós vegetais

Abertura nominal (µm)	<i>B. intermedia</i> (%)	<i>S. marginata</i> (%)	<i>T. catappa</i> (%)
710	26,36	2,18	22,03
500	7,35	1,35	7,02
250	36,61	22,77	40,89
180	9,77	36,06	7,49
125	5,75	16,92	5,64
Fundo	14,16	20,73	16,93

Fonte: próprio autor.

As espécies *B. intermedia* e *T. catappa* apresentaram partículas com maior retenção no tamis de 250 µm, com 36,61% e 40,89%, respectivamente, sendo o pó do material vegetal considerado como grosso (BRASIL, 2019). As partículas do pó da espécie *S. marginata* apresentaram maior retenção no tamis de 180 µm, com percentual de 36,06% sendo o pó classificado como semi-fino (BRASIL, 2019).

A preparação dos extratos das folhas dessas espécies foi feita por percolação usando como solvente extrator etanol 70% para *B. intermedia* e *S. marginata* e etanol 95% para *T. catappa* (Tabela 25). Essas condições de extração foram seguidas devido aos resultados obtidos em trabalhos anteriores em que foram alcançados maiores rendimentos associados à extração dos metabólitos de interesse e tendo em vista os resultados dos ensaios biológicos previamente obtidos (PÉRICO *et al.*, 2015; PINHEIRO SILVA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2012).

Tabela 25 - Quantidade obtida dos extratos preparados das espécies vegetais

Espécie vegetal	Massa de planta seca moída (g)	Rendimento extrato (g - %)
<i>B. intermedia</i>	150,00	30,90 – 20,60
<i>S. marginata</i>	150,00	23,19 – 15,46
<i>T. catappa</i>	150,00	11,70 – 7,80

Fonte: próprio autor.

A obtenção do extrato seco é uma etapa tecnológica importante, pois o produto assim obtido pode ter maior estabilidade química, físico-química e microbiológica. Além disso, a etapa de secagem pode garantir maiores concentrações do insumo farmacêutico ativo vegetal, e maior facilidade de padronização (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

4.3.2 Caracterização dos extratos vegetais e complexos sólidos

A caracterização analítica dos sistemas complexos sólidos contendo ciclodextrinas não é uma tarefa simples e requer o uso combinado de várias técnicas que evidenciem a formação

do complexo (MURA, 2015). Os extratos das folhas de *B. intermedia* (BIEH), *S. marginata* (SMEH) e *T. catappa* (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por mistura física (MF) e malaxagem (MAL) foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), análise térmica (TG-DSC), difração de raio X, microscopia eletrônica de varredura, e ressonância magnética nuclear.

Os espectros FTIR permitem a identificação de mudanças vibracionais das moléculas presentes nos extratos vegetais, como deslocamento, desaparecimento ou aparecimento de novas bandas, bem como variações em suas intensidades, que são o resultado da inserção dessas moléculas na cavidade da BCD e de suas interações com grupos externos, que apontam para a formação do complexo entre o extrato e a BCD (MURA, 2015).

A análise térmica é uma técnica muito útil para caracterizar estes complexos, pois possibilita determinar várias propriedades destas amostras, tais como transição de fase ou outra mudança de massa através da termogravimetria, bem como os processos físicos e/ou químicos endotérmicos e exotérmicos que ocorrem durante o aquecimento do material através da análise térmica diferencial e calorimetria de varredura diferencial (HĂDĂRUGĂ *et al.*, 2019). As diferenças nas curvas térmicas entre as formas puras (BCD e extratos) e os complexos obtidos, podem sugerir mudanças no estado sólido e/ou interações entre os componentes que constatarem a complexação.

A análise por MEV permite investigar os aspectos morfológicos das partículas dos extratos, da BCD e dos complexos formados (MF e MAL), sendo possível observar as mudanças morfológicas que podem estar relacionadas com as interações entre os componentes, e revelar a existência de complexação nas preparações obtidas (MURA, 2015).

A análise de ^1H -RMN é muito útil no sentido de que fornece evidências da complexação dos extratos com BCD devido às variações dos deslocamentos químicos dos hidrogênios internos H-3 e H-5 da cavidade da BCD. Essa variação nos deslocamentos químicos de ^1H indica a inserção das moléculas presentes nos extratos na cavidade interna da BCD, causando, portanto, alterações nos ambientes químicos desses hidrogênios (PESSINE; CALDERINI; ALEXANDRINO, 2012).

4.3.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR dos extratos vegetais, BCD e os complexos por MF e MAL para *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* estão apresentadas na Figura 35, respectivamente. Os espectros dos extratos mostraram bandas características em comum correspondentes às

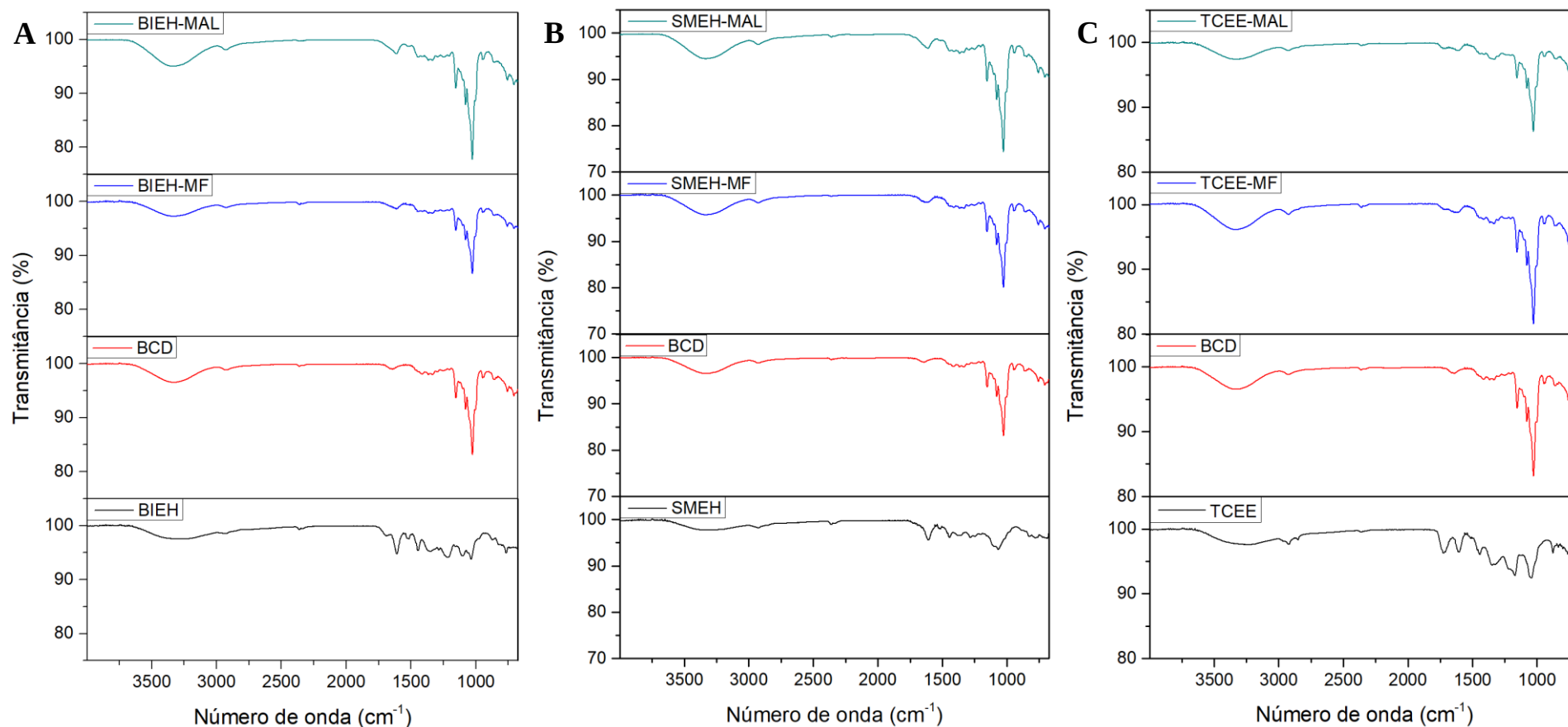
substâncias fenólicas, de 3315-3250 cm^{-1} , relativas aos modos vibracionais de estiramento O-H (ligação intermolecular de hidrogênio), que podem ser atribuídos às hidroxilas dos grupos fenólicos ou ácidos carboxílicos terminais; de 2930-2850 cm^{-1} , relativas aos modos vibracionais de estiramento C-H; de 1615-1605 cm^{-1} , relativas aos modos vibracionais de deformação angular O-H, e de 779-746 cm^{-1} , relativas à deformação angular fora do plano O-H. Para *T. catappa* também foi observada a banda em 1726 cm^{-1} , relativas aos modos vibracionais de estiramento C=O do grupo carbonila de ésteres e banda fraca de 876 cm^{-1} , referente à deformação angular aromática fora do plano C-H.

O espectro FTIR da BCD mostrou bandas características de 3344 cm^{-1} (modos vibracionais de estiramento O-H), 2925 cm^{-1} (modos vibracionais de estiramento C-H), 1155 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} (modos vibracionais de estiramento simétricos e assimétricos de C-O, respectivamente), conforme dados da literatura (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019).

Os espectros de MFs e MALs foram semelhantes ao espectro de BCD, sendo as principais diferenças observadas nas intensidades das bandas de BCD em cada complexo formado. Em todos os complexos, obtidos tanto por MF quanto por MAL as bandas dos extratos na faixa de 1615-1605 cm^{-1} diminuíram a intensidade e ficaram mais largas e as bandas em 1500-1200 cm^{-1} não foram perceptíveis nos espectros dos complexos. Essas modificações em bandas específicas de moléculas presentes no extrato pode ser um indicativo de que apenas parte da molécula foi incorporada na cavidade da BCD ou até mesmo indicar maior ou menor interação entre os grupos químicos presentes nos extratos e nas BCDs, indicando maior ou menor índice de complexação.

Em relação às bandas da BCD das MFs de *B. intermedia* (Figura 35A) e de *S. marginata* (Figura 35B), foi observado que a intensidade das bandas é menor quando comparada com as bandas da BCD, enquanto que as MALs desses extratos tiveram maior intensidade. Para *T. catappa* (Figura 35C), as intensidades para cada complexo mostraram comportamento diferente, sendo as bandas mais intensas para a MF e menos para a MAL. O aumento na intensidade das bandas pode ser um indicativo da formação dos complexos entre os extratos e a BCD para BIEH-MAL, SMEH-MAL e TCEE-MF.

Figura 35 - Espectros no infravermelho para: **(A)** extrato hidroetanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BIEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL); **(B)** extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* (SMEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL); **(C)** extrato etanólico das folhas de *Terminalia catappa* (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)



Fonte: próprio autor.

4.3.2.2 Termogravimetria simultânea e calorimetria de varredura diferencial (TG-DSC)

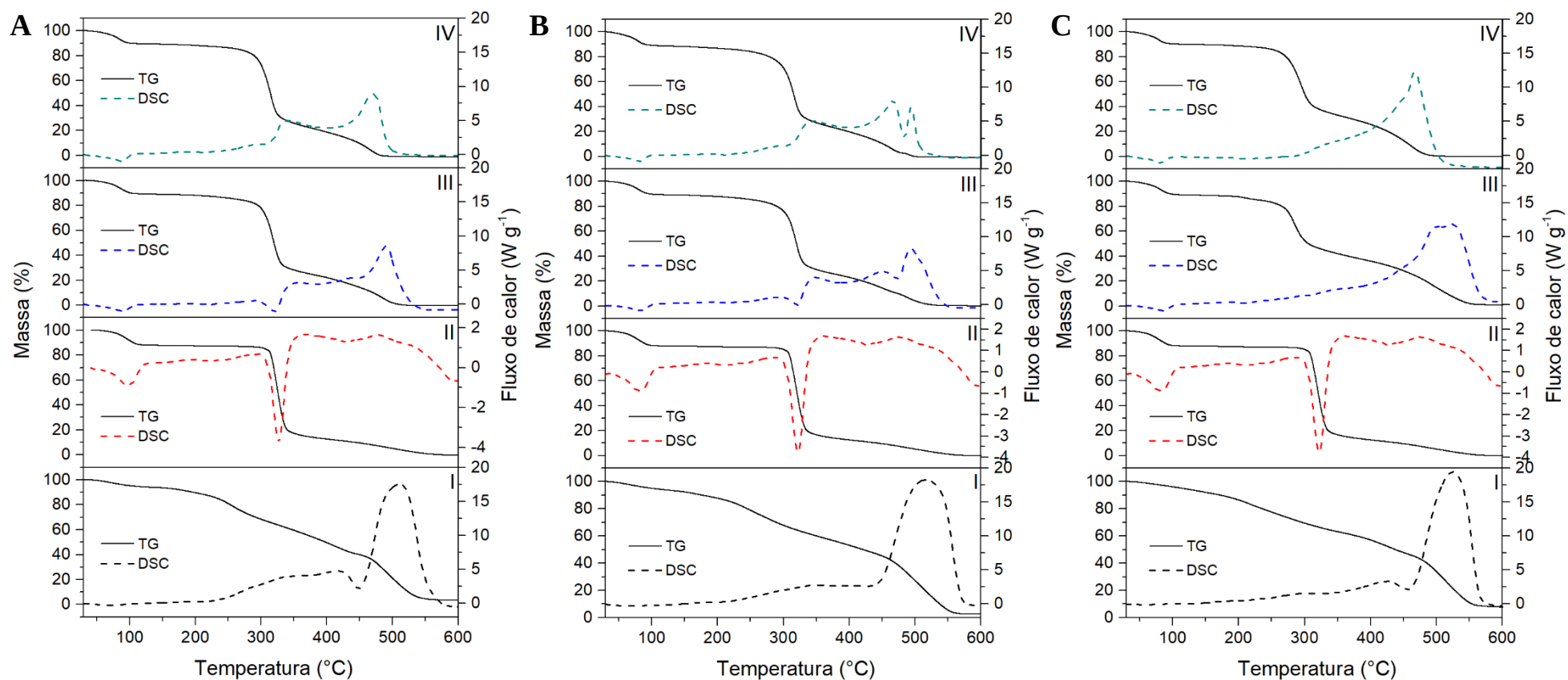
As curvas TG-DSC dos extratos vegetais, BCD e os complexos por MF e MAL para *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* estão apresentadas na Figura 36, respectivamente.

As curvas TG-DSC para os extratos de cada espécie foram bastante semelhantes. A primeira perda de massa observada na faixa de 30-120 °C foi de 4,80% para *B. intermedia*, 5,96% para *S. marginata* e 8,19% para *T. catappa*, com um pico endotérmico na curva DSC que pode ser atribuído à eliminação de água dos extratos. As últimas perdas de massa observadas foram atribuídas à degradação oxidativa de substâncias orgânicas nos extratos e ocorreram entre 220-450 °C e 450-600 °C, com picos exotérmicos máximos de menor intensidade em 346 °C e 417 °C para *B. intermedia* ($\Delta m = 43,80\%$), 351 °C para *S. marginata* ($\Delta m = 40,50\%$), e 300 °C e 423 °C para *T. catappa* ($\Delta m = 33,56\%$) e um pico mais intenso em 512 °C para *B. intermedia*, 517 °C para *S. marginata*, e 526 °C para *T. catappa*.

Na análise da curva TG-DSC da BCD foram observadas duas perdas de massa significativas uma de 11,71% na faixa de 30-100 °C, com um pico máximo endotérmico de 83 °C, que corresponde à eliminação de água e outra perda de 69,37% observada na faixa de temperatura de 275-350 °C, com um pico endotérmico máximo em 323 °C atribuído à degradação e combustão da BCD (HĂDĂRUGĂ *et al.*, 2019).

Nos sistemas complexos obtidos por MF e MAL, foi observado que ocorreram mudanças nas curvas TG-DSC (Figura 36). A curva TG desses complexos mostrou que a decomposição da amostra começou a uma temperatura mais alta do que aquela observada para o extrato livre, sendo em torno de 335 °C para os complexos de *B. intermedia*, 330 °C para *S. marginata* e 315 °C para *T. catappa*. Este aumento na temperatura indica que os complexos preparados por MF e MAL têm maior estabilidade térmica do que os extratos devido à complexação das substâncias presentes no extrato com a BCD (MURA, 2015). Quanto à curva DSC, a redução do tamanho do pico de decomposição exotérmica pode ser uma consequência das interações das substâncias no extrato com a BCD. Além disso, nos MFs de *B. intermedia* e *S. marginata*, o pico de degradação residual da BCD foi observado, o que sugere que a inclusão não foi completa.

Figura 36 - Curvas TG-DSC simultâneas para: **(A)** amostras de *Byrsonima intermedia*; **(B)** amostras de *Serjania marginata* e **(C)** amostras de *Terminalia catappa*. **(I)** extrato, **(II)** β -ciclodextrina e os complexos obtidos por **(III)** MF e **(IV)** MAL



Condições de análise: taxa de aquecimento de placas de alumina de 10°C min⁻¹, amostras de 5 mg aquecidas de 30 a 600 °C.

Fonte: próprio autor.

4.3.2.3 Difração de Raio X (DRX)

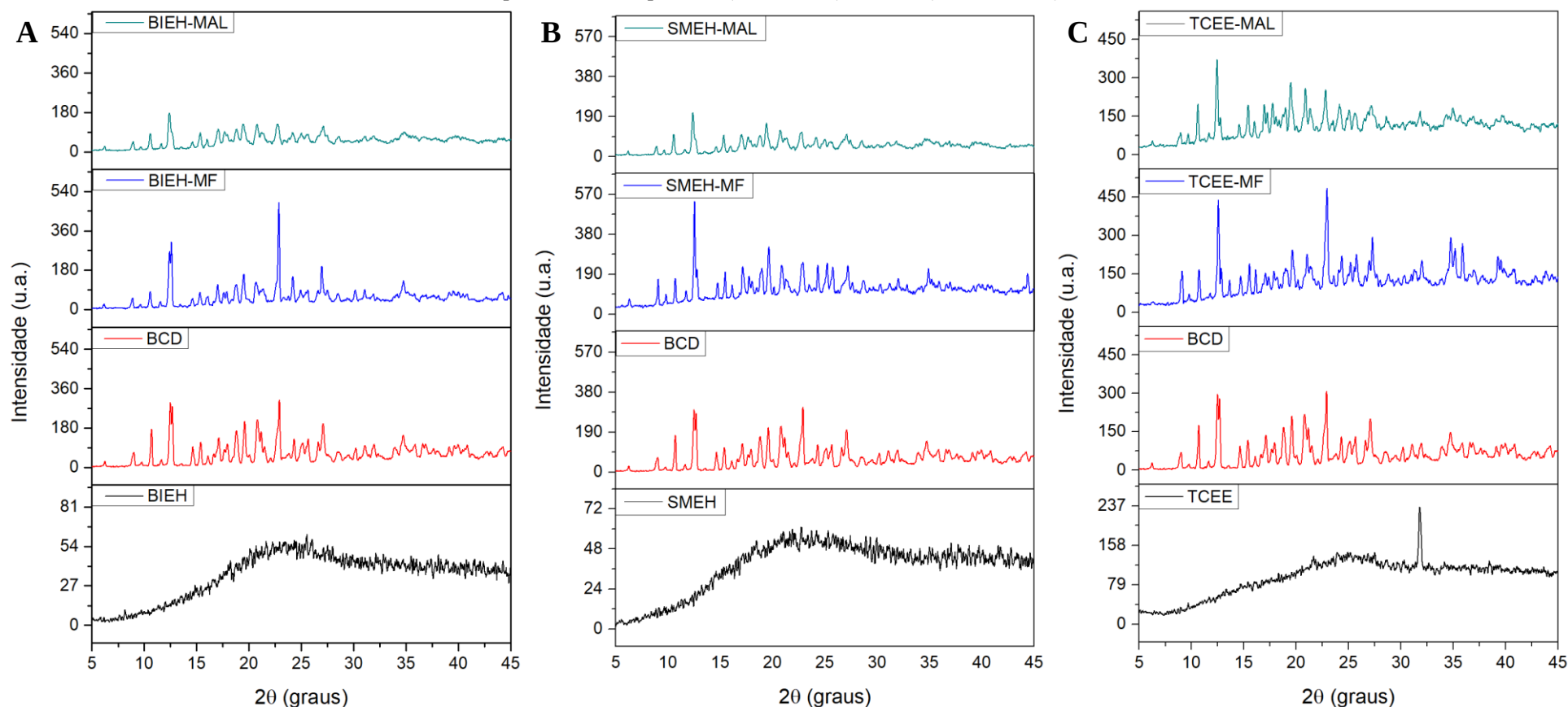
A análise de difração de raios X foi realizada a fim de estabelecer o padrão de difração dos pós dos extratos, BCD e misturas MF e MAL e, assim, constatar a formação de complexos entre os extratos e BCD. Então, por meio dessa análise, o sólido é considerado cristalino quando resulta em picos de reflexão muito característicos e bem definidos no difratograma (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019).

Na Figura 37, o perfil de difração da BCD revelou a presença de uma série de picos referentes às reflexões cristalinas a 2θ em $9,00^\circ$, $10,70^\circ$, $12,48^\circ$, $12,68^\circ$, $18,80^\circ$, $19,58^\circ$, $20,80^\circ$ e $22,90^\circ$ além de reflexões cristalinas secundárias de menor intensidade. Esses picos no perfil da BCD evidenciam a natureza tipicamente cristalina dessa substância.

O perfil de difração dos extratos vegetais mostrou um comportamento bem diferente do apresentado para a BCD. No perfil dos extratos de *B. intermedia* (Figura 37A) e *S. marginata* (Figura 37B) não foram observadas as reflexões cristalinas que caracterizam o caráter cristalino, sendo então a estrutura do pó desses extratos considerada como amorfa. Em relação ao extrato de *T. catappa* (Figura 37C), foi observado um único pico distinto a 2θ em torno de $31,80^\circ$, sugerindo que alguma substância presente nesse extrato apresenta caráter cristalino.

Da mesma forma, no perfil de difração das misturas MF e MAL, foram observados alguns picos da BCD, havendo algumas diferenças quanto às intensidades dos picos. Nas MFs, os picos de $12,68^\circ$ e $22,90^\circ$ tiveram maior intensidade para BIEH-MF e TCEE-MF, enquanto que SMEH-MF apenas o pico $12,68^\circ$ foi mais intenso quando comparados com a BCD. Em relação às MALs foi observada menor intensidade nos picos, possivelmente devido à interação da BCD com o extrato, sugerindo que, portanto, as características amorfas do extrato devem ter proporcionado uma diminuição da cristalinidade. Entretanto, é necessário utilizar outras técnicas de caracterização para melhor explicar os difratogramas e compreender melhor os fenômenos observados.

Figura 37 - Difratogramas de raios X para: **(A)** extrato hidroetanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BIEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL); **(B)** extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* (SMEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL); **(C)** extrato etanólico das folhas de *Termianlia catappa* (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)

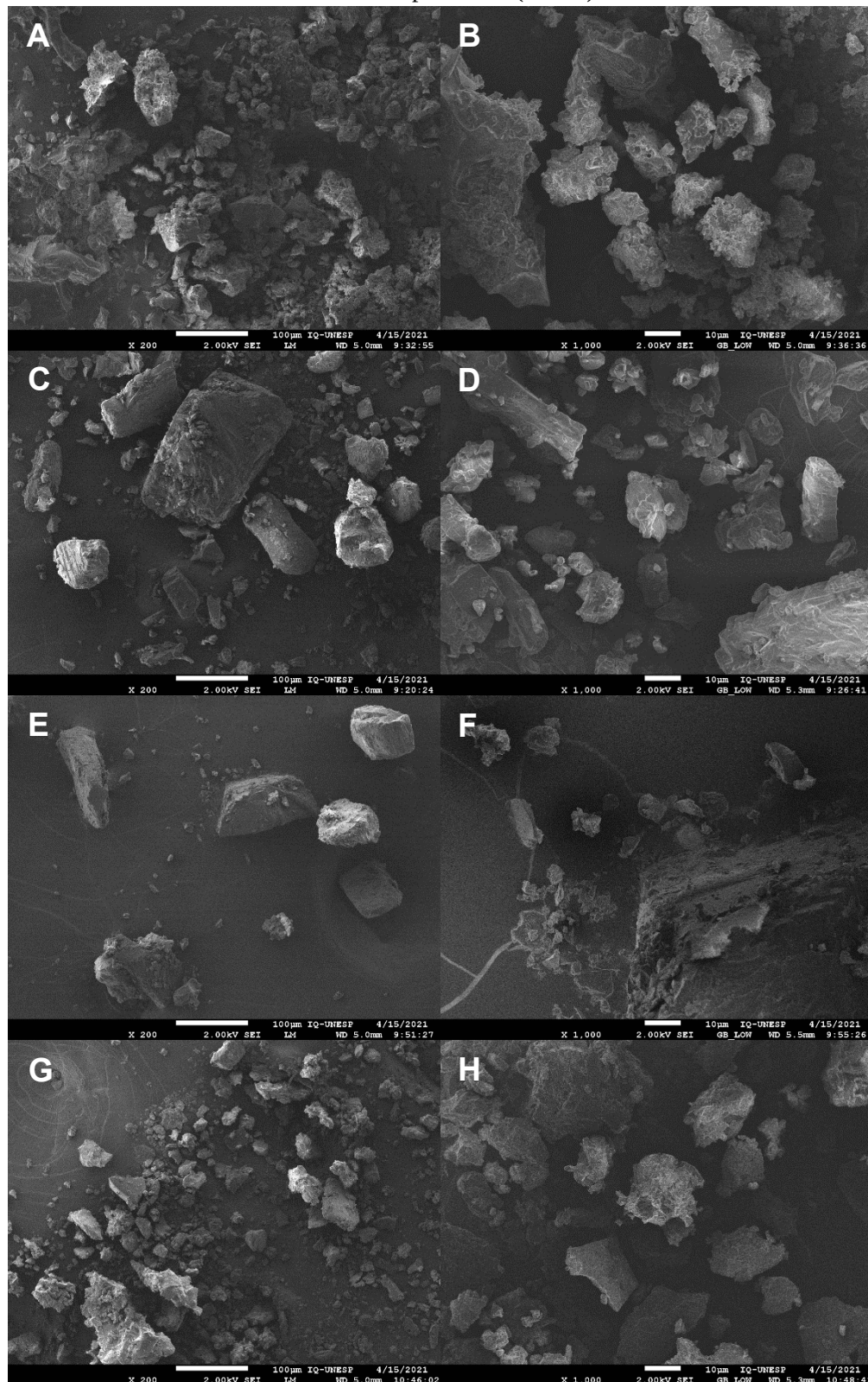


Fonte: próprio autor.

4.3.2.4 Microscopia de varredura eletrônica (MEV)

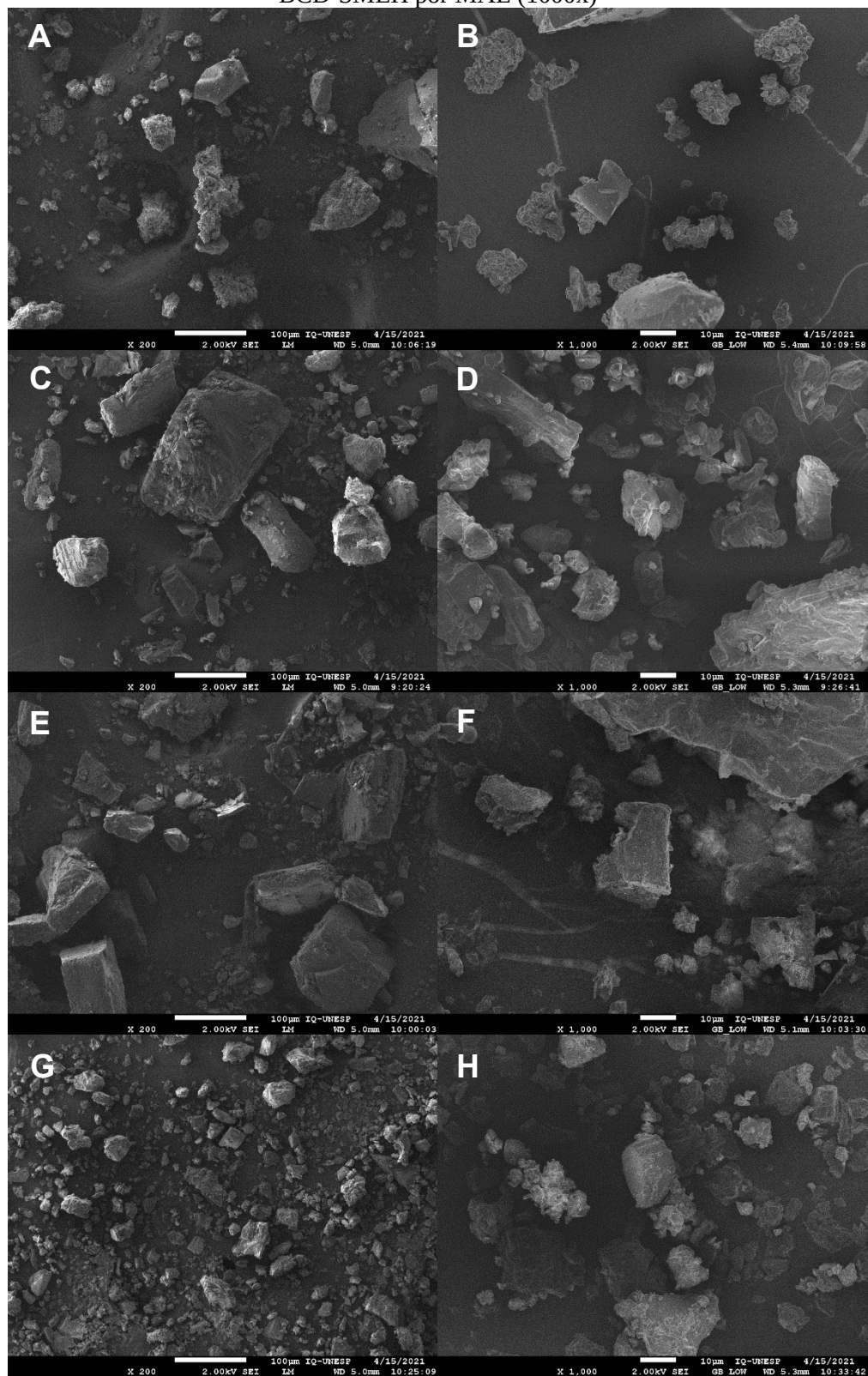
As eletromicrografias das superfícies dos extratos vegetais, BCD e os complexos por MF e MAL para *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* estão apresentadas nas Figuras 38 a 40, respectivamente. A análise das eletromicrografias indica que as morfologias dos sistemas complexos são relativamente diferentes quando comparado com o extrato (Figuras 38 a 40, A-B) e BCD em suas formas puras (Figuras 38 a 40, C-D). Além da mudança na morfologia das partículas, foi possível observar também uma redução no tamanho das partículas nos sistemas complexos, sugerindo a associação do extrato com a BCD. Esse comportamento foi mais acentuado para as amostras preparadas por malaxagem (Figuras 38 a 40, G-H).

Figura 38 - Eletromicrografias das superfícies extrato hidroetanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BIEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos entre BIEH e BCD. (A) BIEH (200x); (B) BIEH (1000x); (C) BCD (200x); (D) BCD (1000x); (E) complexo BCD-BIEH por MF (200x); (F) complexo BCD-BIEH por MF (1000x); (G) complexo BCD-BIEH por MAL (200x); (H) complexo BCD-BIEH por MAL (1000x)



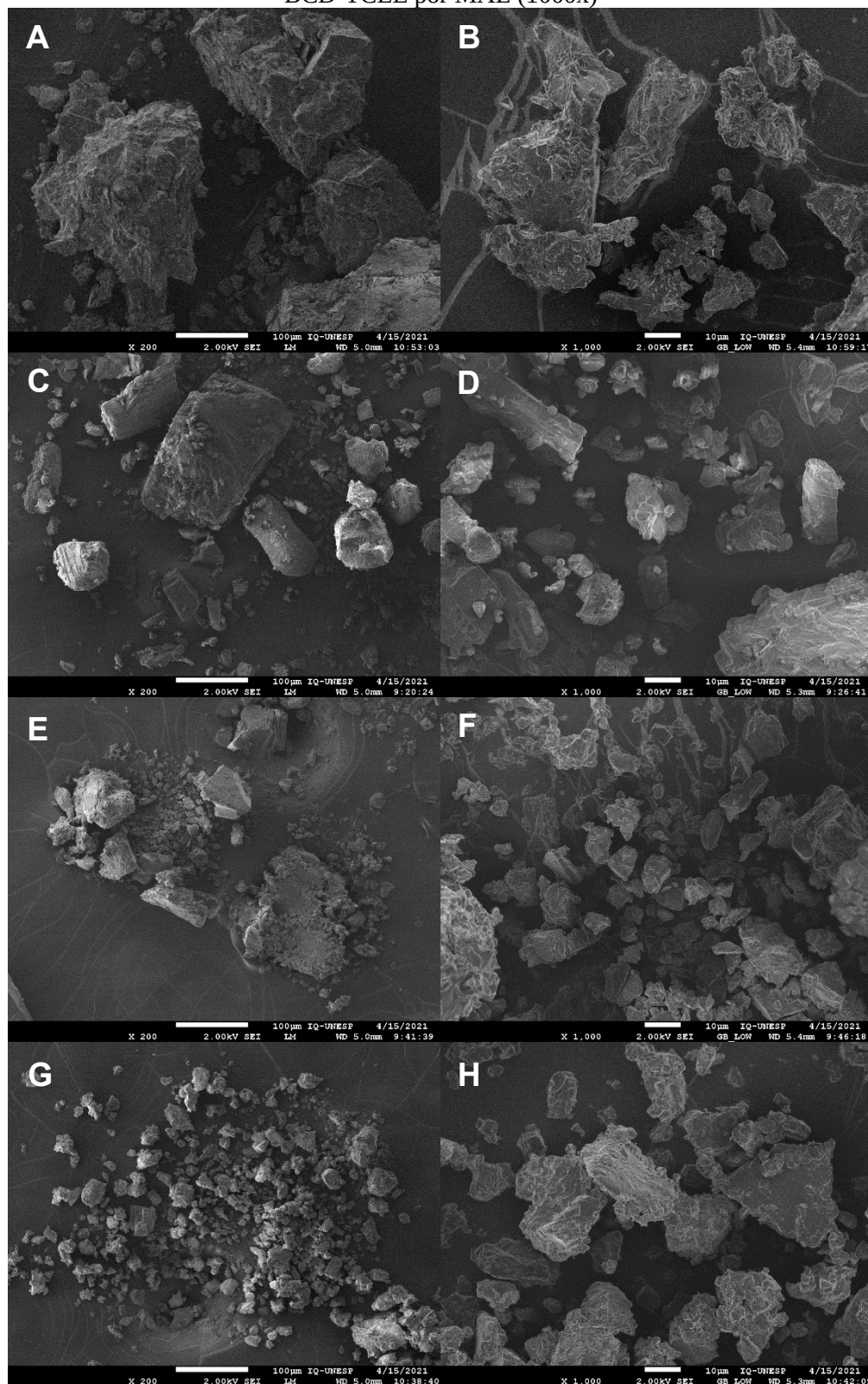
Fonte: Imagens obtidas em um Microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) do laboratório multiusuários do IQ-UNESP Araraquara.

Figura 39 - Eletromicrografias das superfícies extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* (SMEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos entre SMEH e BCD. (A) SMEH (200x); (B) SMEH (1000x); (C) BCD (200x); (D) BCD (1000x); (E) complexo BCD-SMEH por MF (200x); (F) complexo BCD-SMEH por MF (1000x); (G) complexo BCD-SMEH por MAL (200x); (H) complexo BCD-SMEH por MAL (1000x)



Fonte: Imagens obtidas em um Microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) do laboratório multiusuários do IQ-UNESP Araraquara.

Figura 40 - Eletromicrografias das superfícies extrato etanólico das folhas de *Terminalia catappa* (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos entre TCEE e BCD, (A) TCEE (200x); (B) TCEE (1000x); (C) BCD (200x); (D) BCD (1000x); (E) complexo BCD-TCEE por MF (200x); (F) complexo BCD-TCEE por MF (1000x); (G) complexo BCD-TCEE por MAL (200x); (H) complexo BCD-TCEE por MAL (1000x)



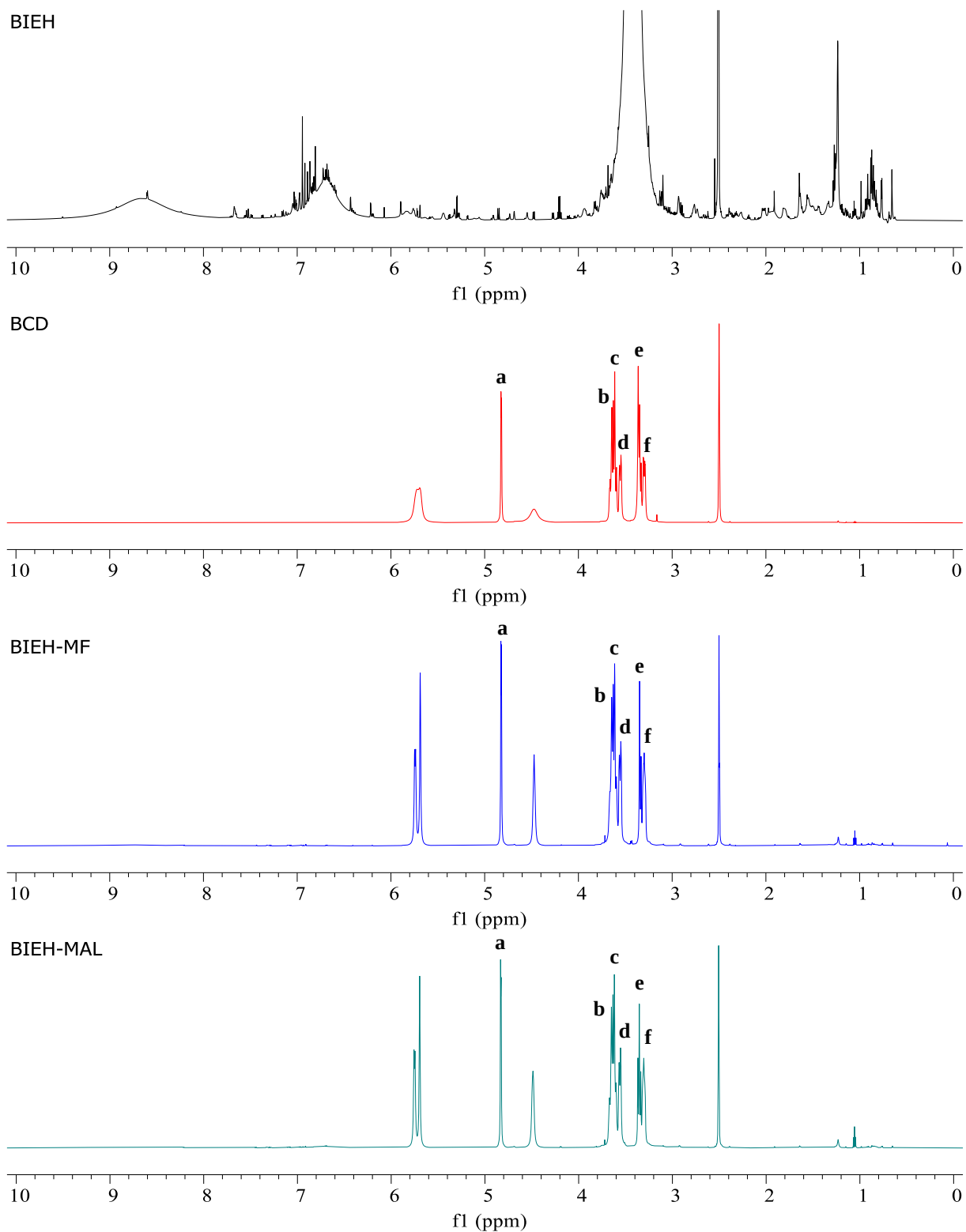
Fonte: Imagens obtidas em um Microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) do laboratório multiusuários do IQ-UNESP Araraquara.

4.3.2.5 Análise ^1H -RMN

O espectro de ^1H -RMN dos extratos vegetais de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* e os sistemas complexos obtidos por MF e MAL estão apresentados nas Figuras 41 a 43, respectivamente.

Considerando os espectros dos extratos, três principais regiões de deslocamento químico foram claramente distinguidas, sendo observado sinais na região alifática (0,50-2,00 ppm), açúcar e ácidos orgânicos (3,00-6,00 ppm) e região aromática (6,00-9,00 ppm) (Figuras 41 a 43). Em relação à porção de carboidratos das substâncias, a região de 4,00-6,00 ppm pode ser atribuída aos sinais dos hidrogênios anoméricos dos açúcares.

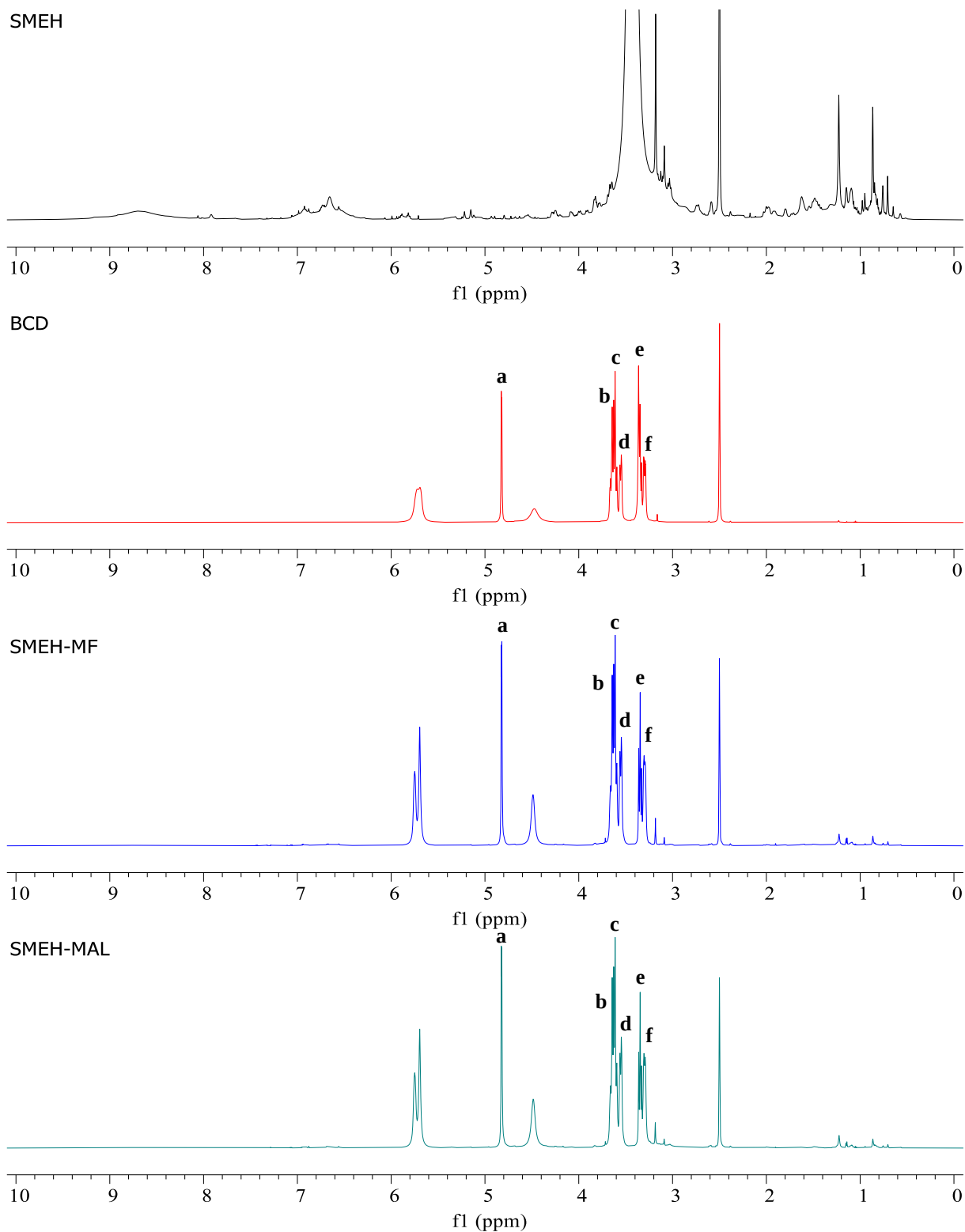
Figura 41 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) do extrato hidroetanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BIEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL)



* em destaque hidrogênios para os sinais da BCD: **a**, H-1; **b**, H-3; **c**, H-6/H-6'; **d**, H-5; **e**, H-2; **f**, H-4.

Fonte: próprio autor.

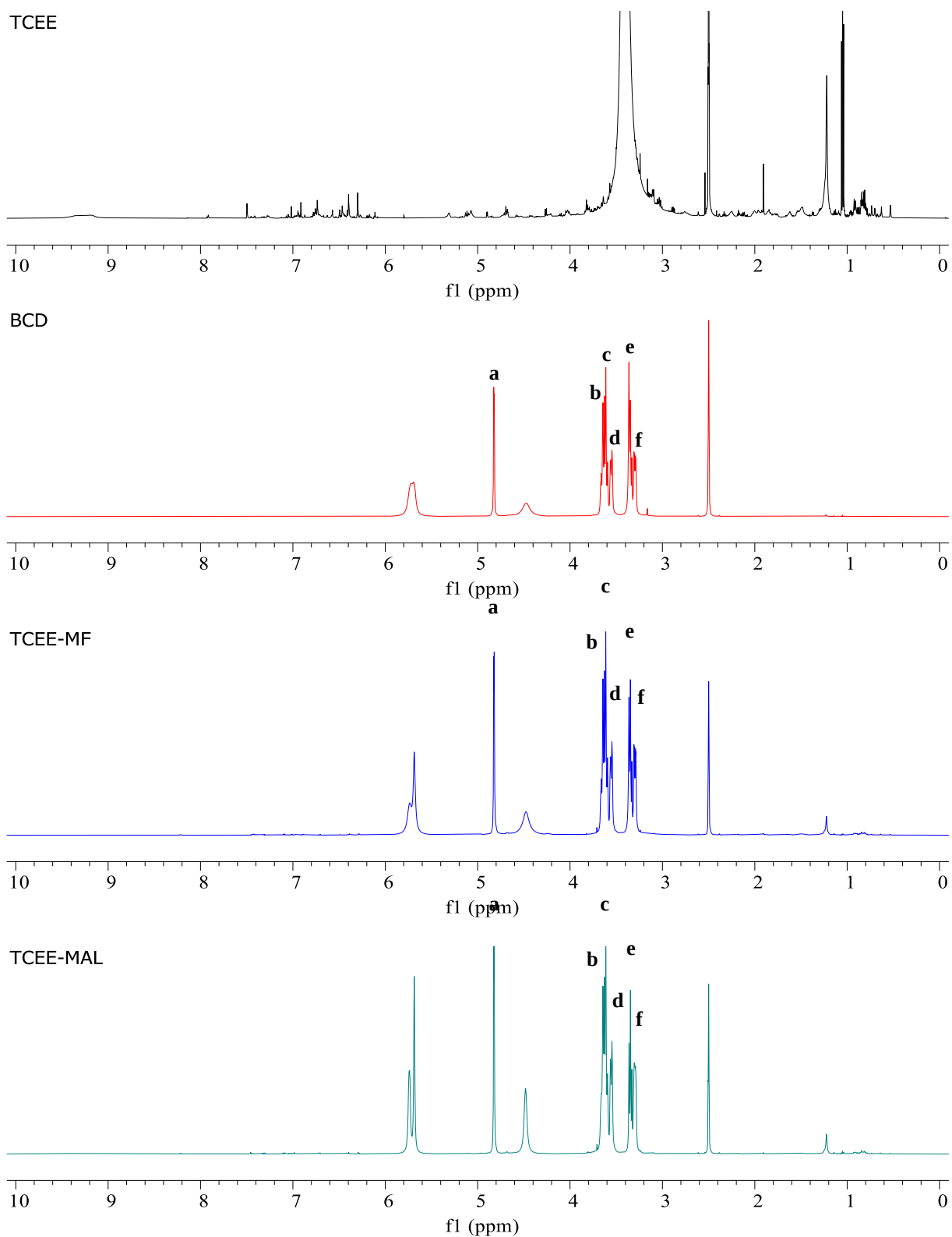
Figura 42 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T) do extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* (SMEH), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL)



* em destaque hidrogênios para os sinais da BCD: **a**, H-1; **b**, H-3; **c**, H-6/H-6'; **d**, H-5; **e**, H-2; **f**, H-4.

Fonte: próprio autor.

Figura 43 - Espectro de ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 14,1 T) do extrato etanólico das folhas de *Terminalia catappa* (TCEE), β -ciclodextrina (BCD) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)



* em destaque hidrogênios para os sinais da BCD: **a**, H-1; **b**, H-3; **c**, H-6/H-6'; **d**, H-5; **e**, H-2; **f**, H-4.

Fonte: próprio autor.

Nesses espectros, foram analisadas as variações nos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios H-3 e H-5 da cavidade hidrofóbica da BCD em sua forma livre e no sistema complexo BCD+extratos (Tabelas 26 a 28).

Os dados da literatura relatam que quando $\Delta\delta$ H-3 > $\Delta\delta$ H-5, pode ser uma indicação que ocorreu a inclusão parcial das moléculas presentes nos extratos na cavidade da BCD (GREATBANKS; PICKFORD, 1987). Além disso, os sinais do hidrogênio H-3 se tornaram mais desblindados ($\Delta\delta$ positivo), indicando a inclusão de moléculas com anéis aromáticos e grupos hidroxila. As substâncias fenólicas, como as encontradas nos extratos das espécies vegetais estudadas, podem interagir com as cavidades da ciclodextrina e afetar o ambiente químico de seus átomos de hidrogênio tanto através das forças van der Waals fornecidas pelo anel aromático quanto pela ligação H do grupo fenólico (HĂDĂRUGĂ *et al.*, 2019; SHI; CHEN; XU, 2014).

Os deslocamentos químicos e atribuição dos hidrogênios da BCD na sua forma livre e nos sistemas complexos com os extratos estão apresentadas nas Tabelas 26 a 28. A atribuição dos hidrogênios da BCD foi realizada com base nos dados da literatura (TAKAHASHI; HAMAMURA; SEI, 2019).

Tabela 26 - Deslocamentos químicos dos ^1H da β -ciclodextrina (BCD) e a diferença nos complexos para *Byrsonima intermedia* obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL)

Posição	BCD	BIEH-MF		BIEH-MAL	
	δ_{BCD}	$\delta_{\text{BIEH-MF}}$	$\Delta\delta_{\text{BIEH-MF}}$	$\delta_{\text{BIEH-MAL}}$	$\Delta\delta_{\text{BIEH-MAL}}$
H-1	4,8234	4,8244	0,0010	4,8302	0,0068
H-2	3,3465	3,3396	-0,0069	3,3529	0,0064
H-3	3,6514	3,6550	0,0036	3,6619	0,0105
H-4	3,2975	3,2985	0,0010	3,3053	0,0078
H-5	3,5532	3,5543	0,0011	3,5621	0,0089
H-6/H-6'	3,6115	3,6125	0,0010	3,6183	0,0068

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complexado}} - \delta_{\text{livre}}$$

Fonte: próprio autor.

Tabela 27 - Deslocamentos químicos dos ^1H da β -ciclodextrina (BCD) e a diferença nos complexos para *Serjania marginata* obtidos por MF (SMEH-MF) e MAL (SMEH-MAL)

Posição	BCD	SMEH-MF		SMEH-MAL	
	δ_{BCD}	$\delta_{\text{SMEH-MF}}$	$\Delta\delta_{\text{SMEH-MF}}$	$\delta_{\text{SMEH-MAL}}$	$\Delta\delta_{\text{SMEH-MAL}}$
H-1	4,8234	4,8229	-0,0005	4,8231	-0,0003
H-2	3,3465	3,3451	-0,0014	3,3454	-0,0011
H-3	3,6514	3,6517	0,0003	3,6519	0,0005
H-4	3,2975	3,2982	0,0007	3,2983	0,0008
H-5	3,5532	3,5527	-0,0005	3,5529	-0,0003
H-6/H-6'	3,6115	3,6110	-0,0005	3,6112	-0,0003

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complexado}} - \delta_{\text{livre}}$$

Fonte: próprio autor.

Tabela 28 - Deslocamentos químicos dos ^1H da β -ciclodextrina (BCD) e a diferença nos complexos para *Terminalia catappa* obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)

Posição	BCD	TCEE-MF		TCEE-MAL	
	δ_{BCD}	$\delta_{\text{TCEE-MF}}$	$\Delta\delta_{\text{TCEE-MF}}$	$\delta_{\text{TCEE-MAL}}$	$\Delta\delta_{\text{TCEE-MAL}}$
H-1	4,8234	4,8236	0,0002	4,8234	0,0000
H-2	3,3465	3,3463	-0,0002	3,3459	-0,0006
H-3	3,6514	3,6526	0,0012	3,6521	0,0007
H-4	3,2975	3,298	0,0005	3,2979	0,0004
H-5	3,5532	3,5538	0,0006	3,5533	0,0001
H-6/H-6'	3,6115	3,6119	0,0004	3,6116	0,0001

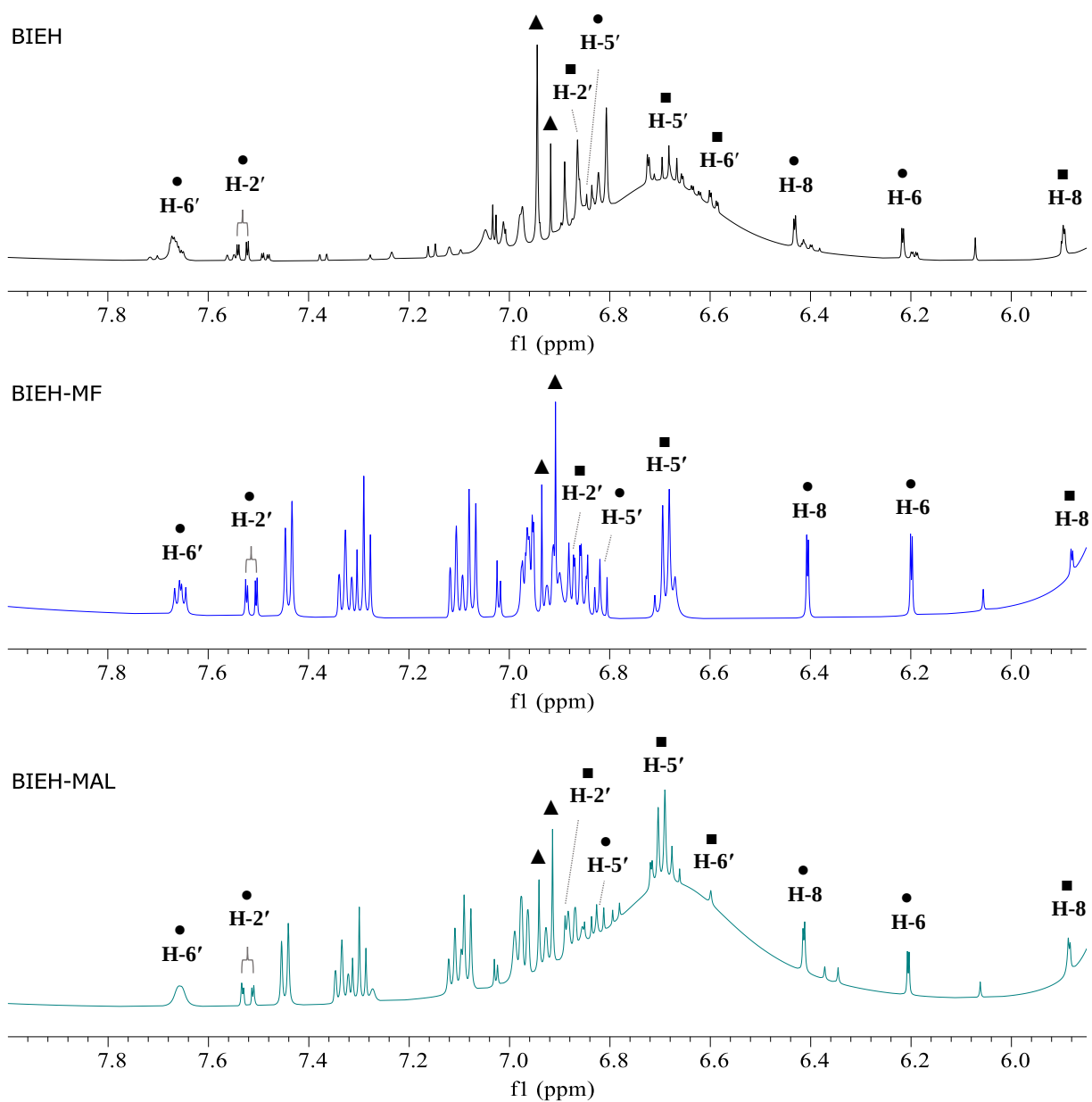
$$\Delta\delta = \delta_{\text{complexado}} - \delta_{\text{livre}}$$

Fonte: próprio autor.

Além de ter sido verificada a variação dos sinais de BCD, foi possível analisar as variações nos deslocamentos químicos dos sinais característicos dos metabólitos presentes em cada extrato e que foram atribuídos à interação entre a molécula hóspede e a cavidade de BCD.

No espectro de ^1H -RMN para o extrato hidroetanólico de *B. intermedia*, os principais sinais foram observados na região aromática (δ 5.50-8.00) e podem ser atribuídos aos anéis aromáticos das substâncias derivadas do ácido gálico, quercetina e catequina (Figura 44 e Tabela 29, BIEH). Os sinais em δ 7,66 (dd, $J = 2,2$; 8,5 Hz, H-6'), δ 7,52-7,54 (d, $J = 2,2$ Hz, H-2') e δ 6,84 (d, $J = 8,5$ Hz, H-5') foram atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático trissubstituído. Dois dupletos com deslocamentos químicos em δ 6,43 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8) e 6,21 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6) indicam um acoplamento meta correspondente aos hidrogênios do flavonoide do anel A, que são consistentes com o núcleo da quercetina (HARBORNE, 1994). Já os prótons do anel A dos derivados da catequina são mais protegidos que os do núcleo da quercetina e, portanto, foram atribuídos aos dupletos em δ 5,89 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8) e δ 5,72 (d, $J = 2,3$ Hz, H-6). Os simpletos em δ 6,94 (H-2/H-6) e δ 6,92 (H-2/H-6) são característicos dos hidrogênios do anel aromático do grupo ácido gálico/galoil (ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021).

Figura 44 - Espectro de ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 14,1 T) com expansão na região de δ 5,85-8,00 para o extrato hidroetanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BIEH) e os complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL)



● sinais de derivados de quercetina; ■ sinais de derivados de catequina; ▲ sinais do grupo galoil.

Fonte: próprio autor.

Tabela 29 - Deslocamentos químicos dos ^1H aromáticos dos metabólitos de interesse no extrato hidrotetanólico de *Byrsonima intermedia* (BIEH) e a diferença nos complexos obtidos por MF (BIEH-MF) e MAL (BIEH-MAL)

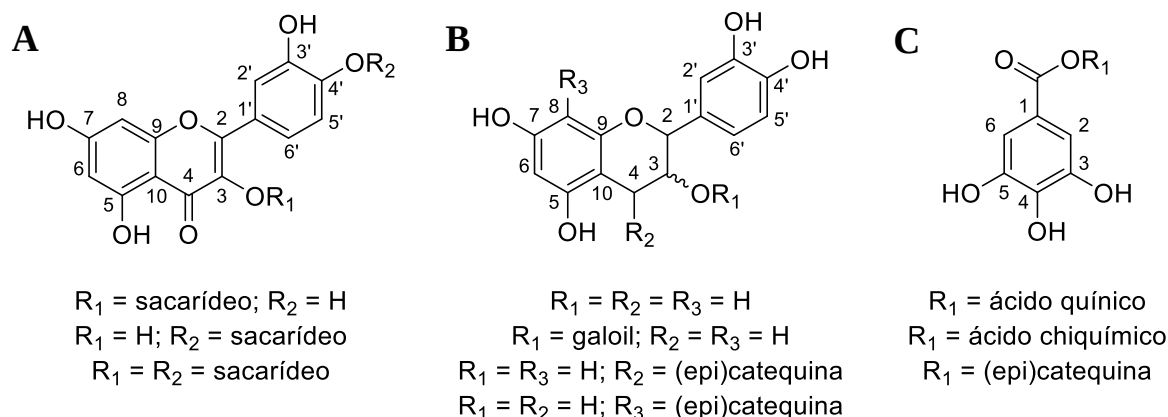
δ (ppm) multiplicidade, J em Hz					
Posição	BIEH	BIEH-MF		BIEH-MAL	
	δ_{BIEH}	$\delta_{\text{BIEH-MF}}$	$\Delta\delta_{\text{BIEH-MF}}$	$\delta_{\text{BIEH-MAL}}$	$\Delta\delta_{\text{BIEH-MAL}}$
<i>Derivados de quercetina</i>					
H-6	6,2163 d, $J = 2,1$	6,1987	-0,0176	6,2057	-0,0106
H-8	6,4315 d, $J = 2,1$	6,4060	-0,0255	6,4138	-0,0177
H-2'	7,5407 d, $J = 2,2$	7,5235	-0,0172	7,5319	-0,0088
	7,5220 d, $J = 2,2$	7,5043	-0,0177	7,5117	-0,0103
H-5'	6,8427 d, $J = 8,5$	6,8124	-0,0303	6,8195	-0,0232
H-6'	7,6557 dd, $J = 2,2; 8,5$	7,6557	0,0000	7,6556	-0,0001
<i>Derivados de catequina e proantocianidinas</i>					
H-6	5,7200 d, $J = 2,3$	nd	-	nd	-
H-8	5,8949 d, $J = 2,1$	5,8789	-0,016	5,8849	-0,01
H-2'	6,8884 d, $J = 1,7$	6,8708	-0,0176	6,8832	-0,0052
H-5'	6,6889 d, $J = 8,0$	6,6878	-0,0011	6,6972	0,0083
H-6'	6,5928 dd, $J = 2,0; 8,2$	nd	-	6,5991	-0,029
<i>Ácido gálico e ésteres de galato</i>					
H-2/H-6	6,9444 (s)	6,9353	-0,0091	6,9414	-0,003
H-2/H-6	6,9177 (s)	6,9079	-0,0098	6,9145	-0,0032

$\Delta\delta = \delta_{\text{complexado}} - \delta_{\text{livre}}$

nd: não detectado.

Fonte: próprio autor.

Figura 45 – Estruturas das substâncias fenólicas identificadas no extrato hidroetanólico de *Byrsonima intermedia*. (A) derivados de quercetina; (B) derivados de catequina; (C) derivados do ácido gálico (ésteres galato)



Fonte: próprio autor.

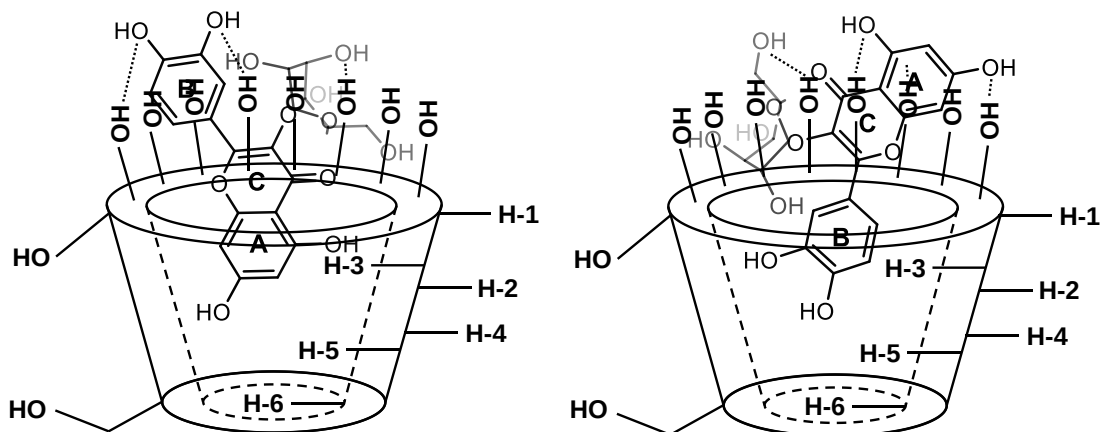
A análise dos espectros de ^1H -RMN dos sistemas complexos do extrato de *B. intermedia* (BIEH-MF e BIEH-MAL) permitiu observar que os sinais de hidrogênio dos derivados de quercetina, catequina e ácido gálico também foram afetados pela presença da BCD (Figura 44, Tabela 35). Os valores encontrados para os sistemas complexos foram menores que os sinais

do extrato livre, o que indica que ocorreu a blindagem desses sinais. No caso dos flavonoides derivados da quercetina e da catequina, a blindagem dos sinais H-6, H-8, H-2' e H-5', pode indicar que são possíveis duas possibilidades de inclusão das estruturas dessas substâncias na cavidade da BCD, uma em que o anel aromático B do flavonoide é incluído e outra em que a inclusão pode ocorrer através do anel A (PACZKOWSKA *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2014).

Alguns estudos demonstraram que as substâncias glicosiladas, como os derivados de quercetina presentes no extrato de *B. intermedia*, são parcialmente incluídas devido à porção de açúcar que afeta a inclusão devido a impedimentos estéricos (ÇELIK *et al.*, 2015). Além disso, os grupos hidroxila da unidade sacarídica interagem melhor com os grupos hidroxila externos da estrutura BCD por ligações de hidrogênio em vez de por forças hidrofóbicas com a cavidade BCD (HĂDĂRUGĂ *et al.*, 2019). A Figura 46 apresenta as possíveis interações para a inclusão dos derivados de quercetina glicosilados na cavidade da BCD.

As maiores variações nos deslocamentos químicos foram observadas para os complexos preparados por mistura física, o que sugere que as moléculas em BIEH-MF têm uma interação mais forte com a BCD do que em BIEH-MAL.

Figura 46 - Representação do possível mecanismo de interação para a inclusão de derivados de quercetina glicosilados presentes nos extratos de *Byrsonima intermedia* na cavidade da BCD



Fonte: próprio autor.

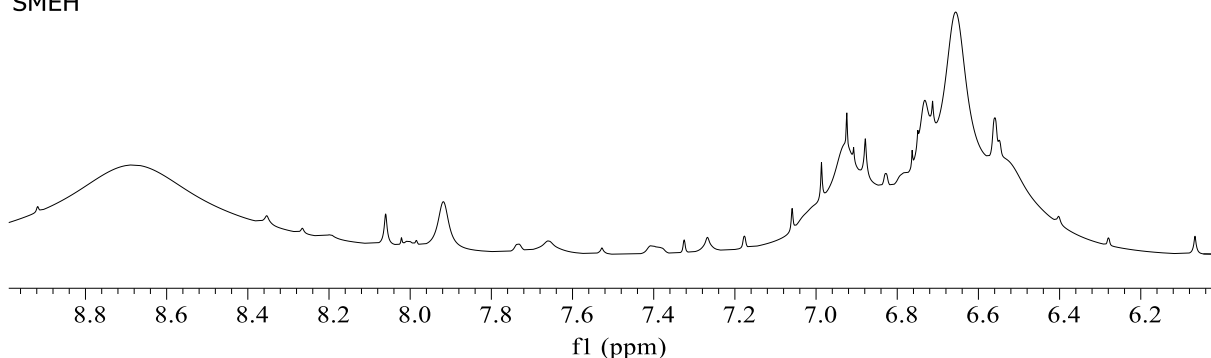
O espectro de ^1H -RMN do extrato hidroetanólico de *S. marginata* apresentou baixa resolução na região dos hidrogênios aromáticos, sendo difícil atribuir os sinais dos hidrogênios das substâncias fenólicas presentes nesse extrato (Figura 47, SMEH). Isso se deve à complexidade da matriz vegetal, resultando na sobreposição de muitos sinais, principalmente em decorrência da separação inerente dos mesmos e da ocorrência de vários padrões de multiplicidade.

Os únicos sinais nos espectros do ^1H -RMN a partir dos quais a atribuição foi possível nessa região foram os simpletos em δ 6,07 e δ 5,99 (Figura 47, SMEH). Esses sinais são alguns exemplos de deslocamentos químicos dos hidrogênios dos anéis das unidades de (epi)catequinas de proantocianidinas (HEREDIA-VIEIRA *et al.*, 2015; KOLODZIEJ, 1992). Além disso, os sinais em δ 4,00-4,95 com constantes de acoplamento de 3,3-3,7 Hz são característicos dos sistemas de acoplamento AB das proantocianidinas do tipo A (JACQUES *et al.*, 1974; KOLODZIEJ, 1992; LOU *et al.*, 1999). Entretanto, para os sistemas complexos SMEH-MF e SMEH-MAL, não foi possível verificar a variação de deslocamento químico para esses sinais, isso devido à sobreposição com os sinais intensos dos grupos hidroxila da BCD nessa região do espectro.

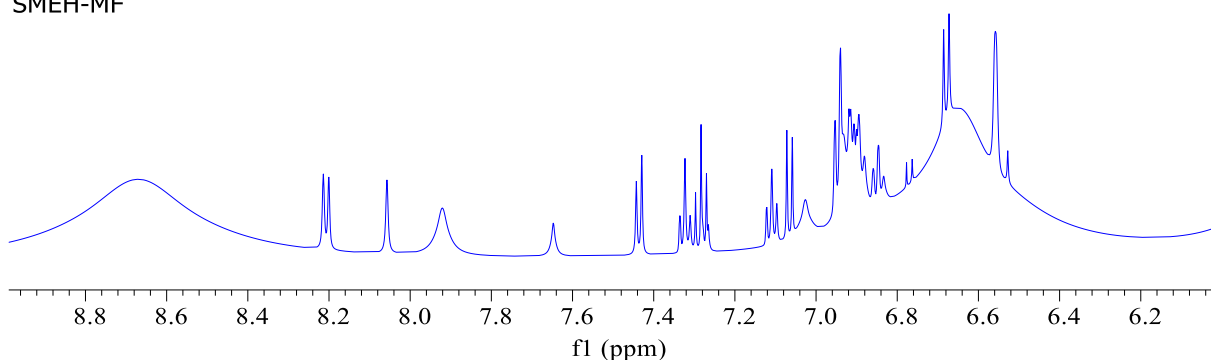
Além disso, os espectros ^1H -RMN dos sistemas complexos mostraram um perfil muito diferente quando comparados ao do extrato livre, apresentando diferenças em muitos sinais e também multiplicidades que não foram observadas no extrato (Figura 47, SMEH-MF e SMEH-MAL). Esses sinais podem ser devidos às interações intermoleculares entre as hidroxilas dos grupos fenólicos das substâncias do extrato com os grupos -OH externos à cavidade da estrutura da BCD. Isso evidencia a forte interação das substâncias do extrato com a parte externa da BCD e, por isso, pode estar relacionado com a formação de sistemas complexos binários. É pertinente observar que os sinais dos grupos OH do extrato e da BCD foram observados com suas multiplicidades devido ao fato de que os espectros foram adquiridos em $\text{DMSO}-d_6$. Sob essas condições, a taxa de troca dos prótons -OH é menor nesse solvente, permitindo que sejam observados no espectro (CHARISIADIS *et al.*, 2014; CLARIDGE, 2016). Assim, nós nos deparamos com duas situações: 1) para entender melhor a interação das substâncias do extrato de *S. marginata* com a cavidade BCD e para reduzir a complexidade do espectro e a interferência dos sinais dos grupos -OH, análises adicionais devem ser realizadas com outros solventes deuterados utilizados nas análises de RMN, nos quais estes sinais não sejam observados no espectro; 2) uma análise apurada dos deslocamentos químicos e multiplicidades dos grupamentos OH da BCD já permite sugerir de que forma ocorre a interação entre extrato e BCD.

Figura 47 - Espectro de ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T) com expansão na região de δ_{H} 6,00 a δ_{H} 9,00 para o extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* (SMEH) e os complexos de obtidos por MF (SMEH -MF) e MAL (SMEH -MAL)

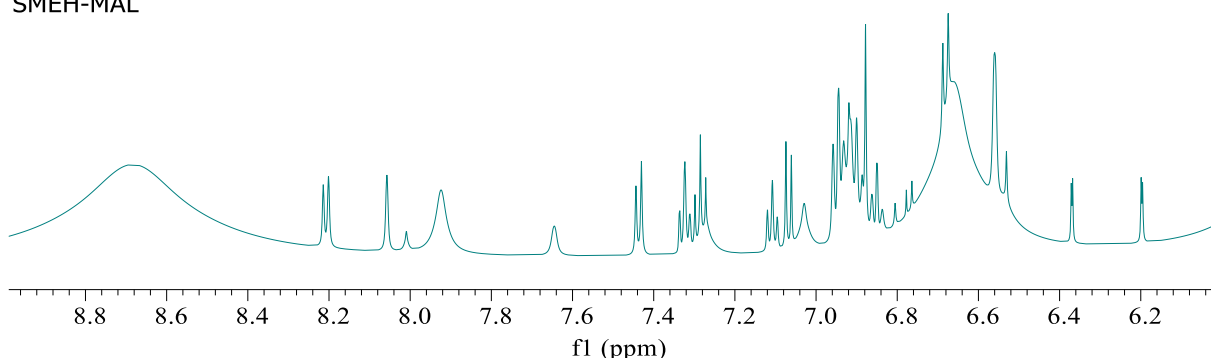
SMEH



SMEH-MF



SMEH-MAL



Fonte: próprio autor.

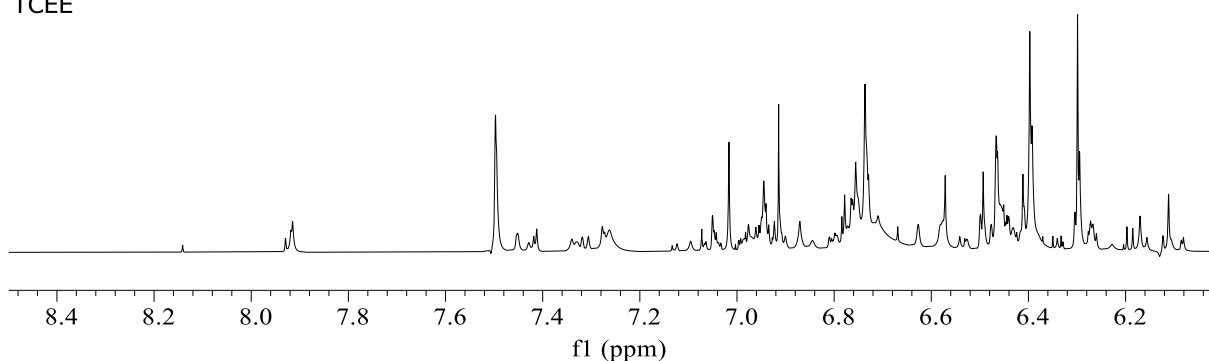
O espectro de ^1H -RMN do extrato etanólico de *T. catappa* apresentou alguns simpletos característicos de algumas substâncias fenólicas presentes nesse extrato na região dos hidrogênios aromáticos (Figura 48). Os simpletos em δ 7,50, δ 7,02, δ 6,91 e δ 6,73 podem ser atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios do grupo ácido elágico, galoil, galagil e HHDP, respectivamente. Esses dados são consistentes com os valores encontrados na literatura para as substâncias da classe dos elagitaninos (KRASZNI; MAROSI; LARIVE, 2013; MININEL *et al.*, 2014).

Comparando o extrato (TCEE) com os sistemas complexos (TCEE-MF e TCEE-MAL), também foi observada uma mudança no perfil dos sinais dos hidrogênios (Figura 48). Os

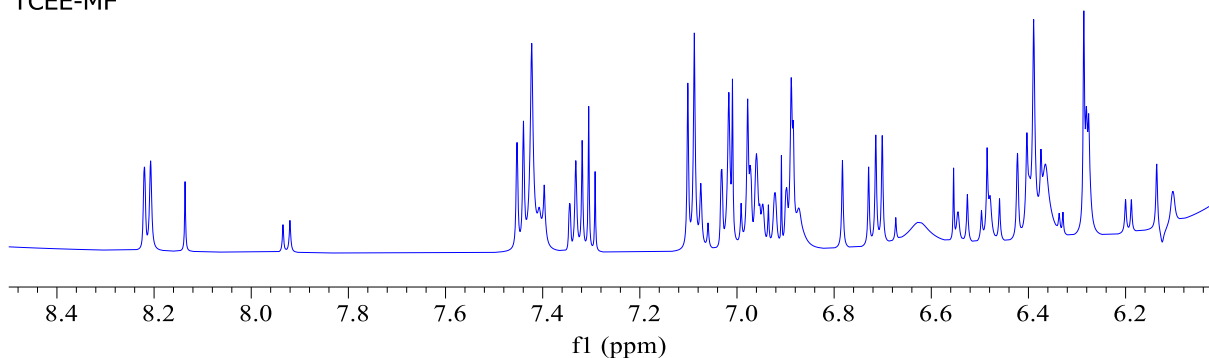
elagitaninos, encontradas em maiores quantidades nos extratos de *T. catappa*, apresentam muitos grupos fenólicos e que, similar ao que foi observado para os complexos *S. marginata*, a diferença de sinais e multiplicidades observadas nos sistemas complexos, indicam a interação desses grupos por ligações de hidrogênio com os grupos externos -OH da estrutura BCD.

Figura 48 - Espectro de ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 14,1 T) com expansão na região de δ_{H} 6,00 a δ_{H} 8,50 para o extrato hidroetanólico das folhas de *Terminalia catappa* (TCEE) e os complexos obtidos por MF (TCEE-MF) e MAL (TCEE-MAL)

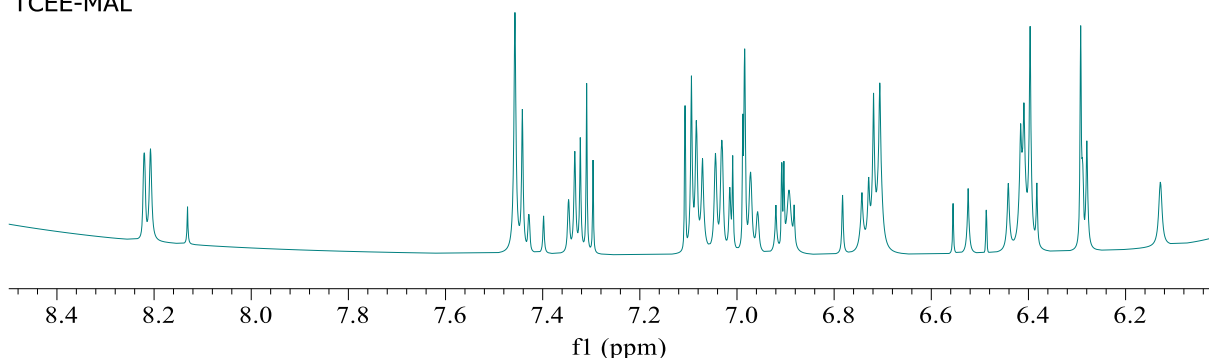
TCEE



TCEE-MF



TCEE-MAL



Fonte: próprio autor.

5 CONCLUSÕES

A análise dos extratos das folhas de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* por espectrometria de massas usando a abordagem de redes moleculares ou molecular networking permitiu uma rápida anotação dos metabólitos secundários presentes em cada espécie por comparação com a biblioteca de dados GNPS e pela similaridade apresentada no agrupamento dos padrões de fragmentação. Neste estudo foi possível a anotação de ácidos fenólicos derivados dos ácidos galoilquínico e chiquímico, proantocianidinas, flavonoides glicosilados, e outros fenóis em *B. intermedia*, substâncias derivadas do ácido quínico, de flavonoides glicosilados, de catequinas e proantocianidinas oligoméricas e de saponinas em *S. marginata* e taninos hidrolisáveis, flavonoides glicosilados e derivados do ácido elágico em *T. catappa*.

Considerando o perfil químico qualitativo dos extratos, não foram observadas variações sazonais marcantes dos principais metabólitos secundários. Entretanto, algumas diferenças encontradas no perfil metabólico podem estar relacionadas ao período de coleta e à influência das condições ambientais, que podem ter afetado a produção e/ou concentração de alguns metabólitos secundários envolvidos principalmente nos processos de regulação do crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas contra fatores bióticos e abióticos. A seca, a radiação UV e a temperatura foram os principais fatores ambientais que afetaram a formação de EROs e o acúmulo de metabólitos secundários com capacidade antioxidante nessas plantas. A atividade antioxidante de muitos desses metabólitos presentes nessas plantas é uma indicação dos efeitos benéficos dessas plantas sobre a saúde humana. Os resultados deste estudo mostraram que as espécies de plantas aqui investigadas possuem propriedades medicinais adequadas que podem ser úteis para o tratamento de doenças inflamatórias.

Quanto às atividades antioxidante e antiglicante, as amostras apresentaram valores notavelmente próximos e os extratos poderiam ser considerados como o "ingrediente ativo total" da formulação, devido ao sinergismo das substâncias presentes.

A associação da análise cromatográfica com a quimiometria para o planejamento e otimização dos experimentos, nos ajudou a obter uma metodologia verde ótima nas análises qualitativa e quantitativa do extrato hidroetanólico das folhas de *S. marginata*. Os principais princípios que regem a Química Analítica Verde foram empregados desde a preparação das amostras até a otimização do método. Além disso, a abordagem sustentável levou ao desenvolvimento e validação de um método com melhor desempenho cromatográfico, mais barato e mais verde do que os métodos normalmente utilizados na literatura para a análise de substâncias fenólicas para *S. marginata*. Os resultados obtidos demonstraram que é possível

aplicar a filosofia da Química Verde em estudos fitoquímicos, abrindo caminho para outros estudos mais amigáveis ao meio ambiente. O método utilizado não exigiu investimentos dispendiosos, pois foi utilizada a instrumentação comum dos estudos fitoquímicos tradicionais, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com detector de arranjo de fotodiodos (PDA). Entretanto, o método de estudo exigiu uma mudança na abordagem na qual a eficiência foi considerada em conjunto com os parâmetros ambientais.

Os resultados mostraram que o método desenvolvido é preciso e robusto e pode ser aplicado à padronização dos princípios ativos dessa espécie vegetal, sendo a determinação dos parâmetros de validação analítica extremamente importante para a avaliação do controle de qualidade de um produto fitoterápico.

O desenvolvimento da pré-formulação com a complexação dos extratos com β -ciclodextrina mostrou resultados bastante promissores da incorporação e interação das moléculas dos extratos com a molécula receptora. A formação desses sistemas complexos pode conferir melhorias nas propriedades químicas e biológicas dos princípios ativos complexados, além de proporcionar melhor solubilidade e estabilidade em solução aquosa.

As análises de caracterização físico-química e morfológica mostraram que houve mudanças significativas nas características dos extratos vegetais. Dentre os resultados obtidos, pode-se dizer que as substâncias presentes no extrato de *B. intermedia* foram parcialmente incorporadas à cavidade do β -ciclodextrina formando complexos de inclusão parcial. Para os extratos de *S. marginata* e *T. catappa*, foram encontradas indicações da interação das moléculas desses extratos e da formação de sistemas complexos, entretanto, outros experimentos precisam ser realizados para verificar o tipo de complexação que foi formada. Além disso, é necessário a realização de testes farmacológicos e toxicológicos de modo a garantir a eficácia e segurança do uso dessas formulações como produto medicinal.

Assim, este estudo traz novas informações para a caracterização dos extratos das espécies *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa* que podem ser úteis para estabelecer critérios de padronização para os extratos visando melhorar o controle de qualidade dessas plantas medicinais.

Como perspectivas futuras, em relação à padronização das preparações contendo extratos de *B. intermedia*, *S. marginata* e *T. catappa*, a variação no conteúdo de substâncias em cada coleta, causada principalmente pelos fatores ambientais, poderá eventualmente ser normalizada ajustando a concentração dessas substâncias com a adição de adjuvantes de formulação ou combinando extratos de diferentes coletas com menor e maior concentração das substâncias ativas, a fim de obter a dosagem terapêutica apropriada. Nesse caso, os órgãos que

regulamentam os produtos herbais recomendam o uso de marcadores químicos analíticos na avaliação do controle de qualidade.

Referências

- ABDULLA, R.; MANSUR, S.; LAI, H.; UBUL, A.; SUN, G.; HUANG, G.; AISA, H. A. Qualitative Analysis of Polyphenols in Macroporous Resin Pretreated Pomegranate Husk Extract by HPLC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 465–473, 2017.
- ALMEIDA, T.; PINTO, G.; CORREIA, B.; GONÇALVES, S.; MEIJÓN, M.; ESCANDÓN, M. In-depth analysis of the *Quercus suber* metabolome under drought stress and recovery reveals potential key metabolic players. **Plant Science**, v. 299, p. 110606, 2020.
- ANAND, A. V.; DIVYA, N.; KOTTI, P. An updated review of *Terminalia catappa*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 9, n. 18, p. 93, 2015.
- ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999.
- ANASTAS, P. T.; ZIMMERMAN, J. B. The periodic table of the elements of green and sustainable chemistry. **Green Chemistry**, v. 21, n. 24, p. 6545–6566, 2019.
- ANDRADE, B. S.; MATIAS, R.; CORRÊA, B. O.; OLIVEIRA, A. K. M.; GUIDOLIN, D. G. F.; ROEL, A. R. Phytochemistry, antioxidant potential and antifungal of *Byrsonima crassifolia* on soil phytopathogen control. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 140–146, 2017.
- ARAUJO, P.; JANAGAP, S. Doehlert uniform shell designs and chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 14–21, 2012.
- ARRUDA, A. P. C. C. B. N.; COELHO, R. G.; HONDA, N. K.; FERRAZOLI, C.; POTT, A.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gastroprotective Effect of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae): Involvement of Sensory Neurons, Endogenous Nonprotein Sulfhydryls, and Nitric Oxide. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p. 1411–1415, 2009.
- BAKOYIANNIS, I.; DASKALOPOULOU, A.; PERGIALIOTIS, V.; PERREA, D. Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1488–1497, 2019.
- BARATTO, M. C.; TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; ROMANI, A.; VISIOLI, F.; BASOSI, R.; POGNI, R. Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. **Free Radical Research**, v. 37, n. 4, p. 405–412, 2003.
- BARRETO, J.; TITA, D.; ORLANDI, M. Development of an automated method to perform a quantitative study of particle size distribution and the effect of a conductive layer in scanning electron microscopy. **Química Nova**, v. 42, n. 4, p. 447–452, 2019.
- BELAZ, K. R. A.; PEREIRA-FILHO, E. R.; OLIVEIRA, R. V. Development of achiral and chiral 2D HPLC methods for analysis of albendazole metabolites in microsomal fractions using multivariate analysis for the in vitro metabolism. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 26–33, 2013.

- BERINI, J. L.; BROCKMAN, S. A.; HEGEMAN, A. D.; REICH, P. B.; MUTHUKRISHNAN, R.; MONTGOMERY, R. A.; FORESTER, J. D. Combinations of Abiotic Factors Differentially Alter Production of Plant Secondary Metabolites in Five Woody Plant Species in the Boreal-Temperate Transition Zone. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 1257, 2018.
- BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; LAGHEZZA MASCI, V.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.
- BEZERRA, A. G.; NEGRI, G.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SMAILI, S. S.; CARLINI, E. A. Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 56–63, 2016.
- BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; DOS SANTOS, A. M. P.; VALASQUES, G. S.; DA MATA CERQUEIRA, U. M. F.; DOS SANTOS ALVES, J. P. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941–959, 2019.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.
- BISWAS, T.; DWIVEDI, U. N. Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance. **Protoplasma**, v. 256, n. 6, p. 1463–1486, 2019.
- BORGES, M. S.; ZANATTA, A. C.; SOUZA, O. A.; PELISSARI, J. H.; CAMARGO, J. G. S.; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; BOLZANI, V. S.; RINALDO, D. A green and sustainable method for monitoring the chemical composition of soybean: an alternative for quality control. **Phytochemical Analysis**, v. 32, n. 4, p. 562–574, 2021.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6.ed. Brasília: ANVISA, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2021.
- BRASIL. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. a.
- BRASIL. Instrução normativa nº 02 de 13 de maio de 2014. **Publica a "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado"**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2014a.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2014. b.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União nº 141, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BRASIL. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 4.ed. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política e Programa nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

CANTER, P. H.; THOMAS, H.; ERNST, E. **Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges for biotechnology**, Elsevier Current Trends, 2005.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

ÇELİK, S. E.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Antioxidant capacity of quercetin and its glycosides in the presence of β -cyclodextrins: influence of glycosylation on inclusion complexation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 83, n. 3–4, p. 309–319, 2015.

CHANG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, W.; ZHOU, K.; JIAN, P.; SHE, G.; ZHANG, L. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Tannins from Terminalia Linn. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–26, 2019.

CHARISIADIS, P.; KONTOGIANNI, V.; TSIAFOULIS, C.; TZAKOS, A.; SISKOS, M.; GEROTHANASSIS, I. ^1H -NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13643–13682, 2014.

CHYAU, C.-C.; KO, P.-T.; MAU, J.-L. Antioxidant properties of aqueous extracts from Terminalia catappa leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1099–1108, 2006.

CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry: Third Edition. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry: Third Edition**, p. 1–541, 2016.

COCK, I. E. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus *Terminalia* (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 203–229, 2015.

COS, P.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; APERS, S.; BERGHE, D.; VLIETINCK, A. Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1345–1359, 2004.

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

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

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. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 3, p. 364–372, 2005.

CZERWIŃSKA, M. E.; DUDEK, M. K.; PAWŁOWSKA, K. A.; PRUŚ, A.; ZIAJA, M.; GRANICA, S. The influence of procyanidins isolated from small-leaved lime flowers (*Tilia cordata* Mill.) on human neutrophils. **Fitoterapia**, v. 127, p. 115–122, 2018.

DA SILVA JÚNIOR, W. F.; BEZERRA DE MENEZES, D. L.; DE OLIVEIRA, L. C.; KOESTER, L. S.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, P. D.; LIMA, E. S.; DE AZEVEDO, E. P.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F.; NEVES DE LIMA, Á. A. Inclusion Complexes of β and HP β -Cyclodextrin with α , β Amyrin and In Vitro Anti-Inflammatory Activity. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 241, 2019.

DAVID, J. P. de L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9/10, p. 71–76, 2004.

DE COSTA, F.; YENDO, A. C. A.; FLECK, J. D.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A. G. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 56–62, 2013.

DE OLIVEIRA, G.; CARNEVALE NETO, F.; DEMARQUE, D.; DE SOUSA PEREIRA-JUNIOR, J.; SAMPAIO PEIXOTO FILHO, R.; DE MELO, S.; DA SILVA ALMEIDA, J.; LOPES, J.; LOPES, N. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximiliani* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 07, p. 636–646, 2016.

DE TORRE, M. P.; VIZMANOS, J. L.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. Improvement of antioxidant activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) with an oral pharmaceutical form. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110424, 2020.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DELCAMBRE, A.; SAUCIER, C. Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 6, p. 727–736, 2012.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DI STASI, L. C.; COSTA, M.; MENDAÇOLLI, S. L. J.; KIRIZAWA, M.; GOMES, C.; TROLIN, G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 205–211, 1988.

DIL, F. A.; RANJKESH, Z.; GOODARZI, M. T. A systematic review of antiglycation medicinal plants. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1225–1229, 2019.

DOEHLERT, D. H. Uniform Shell Designs. **Applied Statistics**, v. 19, n. 3, p. 231–239, 1970.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397–409, 1988.

DOS SANTOS LIMA, B.; SHANMUGAM, S.; DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS, J.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A. Inclusion complex with cyclodextrins enhances the bioavailability of flavonoid compounds: a systematic review. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 5, p. 1337–1359, 2019.

DOS SANTOS, R. de C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; ZANATTA, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; DA ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Byrsonima intermedia A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1112–1123, 2019.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; ATHERTON, H. J.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: The roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387–426, 2011.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EILERS, P. H. C.; BOELEN, H. F. M. Baseline correction with asymmetric least squares smoothing. **Leiden University Medical Centre Report**, v. 1, n. 1, p. 5, 2005.

EMA, European Medicines Agency. **Community herbal monograph on *Hypericum perforatum* L., herba**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2009. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-traditional-use_en.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **Assessment report on *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, non fermentatum folium**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) Assessment, 2013. a. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2014/04/WC500165886.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **Community herbal monograph on *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, non fermentatum folium**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2013. b. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-camellia-sinensis-l-kuntze-non-fermentatum-folium_en.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **Assessment report on *Panax ginseng* C.A. Meyer, radix**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014. a. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-panax-ginseng-ca-meyer-radix_en.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **Community herbal monograph on *Panax ginseng* C.A.Meyer, radix**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014. b. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-panax-ginseng-ca-meyer-radix_en.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **Community herbal monograph on *Passiflora incarnata* L., herba**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014. c. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2014/06/WC500168966.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **European Union herbal monograph on *Ginkgo biloba* L., folium**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) European, 2015. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-ginkgo-biloba-l-folium_en.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **European Union herbal monograph on *Valeriana officinalis* L., radix**. London: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2016. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-valeriana-officinalis-l-radix_en.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2021.

EMA, European Medicines Agency. **Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products**. 2011.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020.

ESPANHA, L. G.; RESENDE, F. A.; DE SOUSA LIMA NETO, J.; BOLDRIN, P. K.; NOGUEIRA, C. H.; DE CAMARGO, M. S.; DE GRANDIS, R. A.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian Byrsonima species assessed by the Ames test. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 182, 2014.

FANG, Z.; SUN, K.; LIU, X.; ZHOU, H.; SONG, W.; CHEN, H.; WEI, S. Structural characterization of ellagitannin-rich fractions from leaves of three Sonneratia species, and their antioxidant activity and α -amylase inhibitory effect and mechanism. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 1760–1772, 2019.

FDA. Food and Drug Administration. Botanical drug development guidance for industry. **Pharmaceutical Quality/CMC Revision**, v. 1, 2016.

FEKETE, S.; SADAT-NOORBAKHSH, V.; SCHELLING, C.; MOLNÁR, I.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Implementation of a generic liquid chromatographic method development workflow: Application to the analysis of phytocannabinoids and Cannabis sativa extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 116–124, 2018.

FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. .; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.

FERREIRA, S. L.; LEMOS, V. A.; DE CARVALHO, V. S.; DA SILVA, E. G. P.; QUEIROZ, A. F.; FELIX, C. S.; DA SILVA, D. L.; DOURADO, G. B.; OLIVEIRA, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1–2, p. 214–223, 2007.

FRAIGE, K.; DAMETTO, A. C.; ZERAIK, M. L.; DE FREITAS, L.; SARAIVA, A. C.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of Byrsonima Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 196–204, 2018.

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. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 1–2, p. 37–44, 2014. a.

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; CAVALHEIRO, A. J.; HILDER, E. F. A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 34–42, 2014. b.

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; CREESE, M. E.; LEME, G. M.; CAVALHEIRO, A. J.; HILDER, E. F. On Track for a Truly Green Propolis-Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 12, p. 7110–7117, 2016.

GABER, Y.; TÖRNVALL, U.; KUMAR, M. A.; ALI AMIN, M.; HATTI-KAUL, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2021–2025, 2011.

GALAON, T.; BACALUM, E.; CHEREGI, M.; DAVID, V. Retention Studies for Large Volume Injection of Aromatic Solvents on Phenyl-Silica Based Stationary Phase in RP-LC. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 2, p. 166–172, 2013.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.

GALVÃO, J. G.; SILVA, V. F.; FERREIRA, S. G.; FRANÇA, F. R. M.; SANTOS, D. A.; FREITAS, L. S.; ALVES, P. B.; ARAÚJO, A. A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; NUNES, R. S. β -cyclodextrin inclusion complexes containing Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control Aedes aegypti larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 2015.

GHORBANPOUR, M.; VARMA, A. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D.; HIDALGO, F. J.; MIYASHITA, K.; CAMP, J. Van; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A. B.; ELMORE, S.; BIRCH, G. G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; ASTLEY, S. B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471–475, 2018.

GREATBANKS, D.; PICKFORD, R. Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 208–215, 1987.

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

GUILHON-SIMPLICIO, F.; MACHADO, T. M.; DO NASCIMENTO, L. F.; SOUZA, R. da S.; KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, F. M. A.; ACHO, L. D. R.; DOS SANTOS, A. R. S.; COS, P.; PEREIRA, M. de M.; LIMA, E. S. Chemical Composition and Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-inflammatory Activities of Four Amazonian Byrsonima Species. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 11, p. 1686–1693, 2017.

HĂDĂRUGĂ, N. G.; BANDUR, G. N.; DAVID, I.; HĂDĂRUGĂ, D. I. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 349–373, 2019.

HAÏDARA, M.; DÉNOU, A.; HADDAD, M.; CAMARA, A.; TRAORÉ, K.; AUBOUY, A.; BOURDY, G.; SANOGO, R. Evaluation of Anti-inflammatory, Anti-pyretic, Analgesic, and Hepatoprotective Properties of Terminalia macroptera. **Planta Medica International Open**, v. 7, p. 58–67, 2020.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HAN, Y.; ZHANG, A.-H.; ZHANG, Y.-Z.; SUN, H.; MENG, X.-C.; WANG, X.-J. Chemical metabolomics for investigating the protective effectiveness of Acanthopanax senticosus Harms leaf against acute promyelocytic leukemia. **RSC Advances**, v. 8, n. 22, p. 11983–11990, 2018.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids**: Advances in Research Since 1986. London: Chapman & Hall, 1994.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HENDRICKSON, H. P.; KAUFMAN, A. D.; LUNTE, C. E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 325–334, 1994.

HEREDIA-VIEIRA, S. C.; SIMONET, A. M.; VILEGAS, W.; MACÍAS, F. A. Unusual C,O-Fused Glycosylapigenins from Serjania marginata Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 1, p. 77–84, 2015.

- HOURIET, J.; ALLARD, P.-M.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; GAUDRY, A.; VALLIN, L.; LI, S.; LIN, Y.; WANG, R.; KUCHTA, K.; WOLFENDER, J.-L. A Mass Spectrometry Based Metabolite Profiling Workflow for Selecting Abundant Specific Markers and Their Structurally Related Multi-Component Signatures in Traditional Chinese Medicine Multi-Herb Formulae. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 578346, 2020.
- HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.
- HUANG, H.; ULLAH, F.; ZHOU, D.-X.; YI, M.; ZHAO, Y. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.
- ICH. International Conference on Harmonization. **ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. **PubChem Annotation Record for Methanol**. Hazardous Substances Data Bank (HSDB), 2021. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/93>>. Acesso em: 07 jul. 2021.
- ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019.
- JACQUES, D.; HASLAM, E.; BEDFORD, G. R.; GREATBANKS, D. Plant proanthocyanidins. Part II. Proanthocyanidin-A2 and its derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2663–2671, 1974.
- JAJIC, I.; SARNA, T.; STRZALKA, K. Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. **Plants**, v. 4, n. 3, p. 393–411, 2015.
- JASKI, J. M.; BARÃO, C. E.; MORAIS LIÃO, L.; SILVA PINTO, V.; ZANOELO, E. F.; CARDOZO-FILHO, L. β -Cyclodextrin complexation of extracts of olive leaves obtained by pressurized liquid extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 662–672, 2019.
- JI, H. G.; LEE, Y. R.; LEE, M. S.; HWANG, K. H.; PARK, C. Y.; KIM, E. H.; PARK, J. S.; HONG, Y. S. Diverse Metabolite Variations in Tea (*Camellia sinensis* L.) Leaves Grown under Various Shade Conditions Revisited: A Metabolomics Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1889–1897, 2018.
- JIANG, N.; DOSEFF, A.; GROTEWOLD, E. Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits. **Plants**, v. 5, n. 2, p. 27, 2016.
- KAMILOGLU, S.; TOMAS, M.; OZDAL, T.; CAPANOGLU, E. Effect of food matrix on the content and bioavailability of flavonoids. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.
- KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 131–139, 2014.

KARAGEORGOU, P.; MANETAS, Y. The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. **Tree Physiology**, v. 26, n. 5, p. 613–621, 2006.

KARAS, D.; ULRICHOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 223–240, 2017.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, p. 155–176, 2016.

KELLOGG, J. J.; GRAF, T. N.; PAINE, M. F.; MCCUNE, J. S.; KVALHEIM, O. M.; OBERLIES, N. H.; CECH, N. B. Comparison of Metabolomics Approaches for Evaluating the Variability of Complex Botanical Preparations: Green Tea (*Camellia sinensis*) as a Case Study. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1457–1466, 2017.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B. A.; THIESSEN, P. A.; YU, B.; ZASLAVSKY, L.; ZHANG, J.; BOLTON, E. E. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D1388–D1395, 2021.

KOŁODZIEJ, H. ¹H NMR spectral studies of procyanidin derivatives: diagnostic ¹H NMR parameters applicable to the structural elucidation of oligomeric procyanidins. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (Eds.). **Plant Polyphenols - Synthesis, Properties, Significance**. New York: Plenum Press, 1992. p. 295–319.

KRASZNI, M.; MAROSI, A.; LARIVE, C. K. NMR assignments and the acid–base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 17, p. 5807–5816, 2013.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101–112, 2012.

LAMBERS, H.; DE BRITTO COSTA, P.; OLIVEIRA, R. S.; SILVEIRA, F. A. O. Towards more sustainable cropping systems: lessons from native Cerrado species. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 32, n. 3, p. 175–194, 2020.

LI, H.-J.; DEINZER, M. L. Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 1739–1748, 2007.

LI, Q. M.; VAN DEN HEUVEL, H.; DILLEN, L.; CLAEYS, M. Differentiation of 6-C- and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**, v. 21, n. 4, p. 213–221, 1992.

LI, Y.-J.; WEI, H.-L.; QI, L.-W.; CHEN, J.; REN, M.-T.; LI, P. Characterization and identification of saponins in *Achyranthes bidentata* by rapid-resolution liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 20, p. 2975–2985, 2010.

LIEBELT, D. J.; JORDAN, J. T.; DOHERTY, C. J. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 6, p. 1409–1433, 2019.

LIN, T.-C.; HSU, F.-L. Tannin and Related Compounds from *Terminalia catappa* and *Terminalia parviflora*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 46, p. 1–6, 1999.

LIN, Y.-L.; KUO, Y.-H.; SHIAO, M.-S.; CHEN, C.-C.; OU, J.-C. Flavonoid Glycosides from *Terminalia catappa* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, n. 1, p. 253–256, 2000.

LIU, H.; LAM, L.; DASGUPTA, P. K. Expanding the linear dynamic range for multiple reaction monitoring in quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry utilizing natural isotopologue transitions. **Talanta**, v. 87, n. 1, p. 307–310, 2011.

LIU, Q.; KHAKIMOV, B.; CÁRDENAS, P. D.; COZZI, F.; OLSEN, C. E.; JENSEN, K. R.; HAUSER, T. P.; BAK, S. The cytochrome P450 CYP72A552 is key to production of hederagenin-based saponins that mediate plant defense against herbivores. **New Phytologist**, v. 222, n. 3, p. 1599–1609, 2019.

LIU, Y.; SEERAM, N. P. Liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry for comprehensive phenolic characterization of pomegranate fruit and flower extracts used as ingredients in botanical dietary supplements. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 15, p. 3022–3033, 2018.

LOU, H.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; UCHIDA, M.; TANAKA, H.; OKA, S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. **Phytochemistry**, v. 51, n. 2, p. 297–308, 1999.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419–427, 2005.

MA, X.; MOILANEN, J.; LAAKSONEN, O.; YANG, W.; TENHU, E.; YANG, B. Phenolic compounds and antioxidant activities of tea-type infusions processed from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) leaves. **Food Chemistry**, v. 272, p. 1–11, 2019.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970. p. 41–164.

MANDLOI, S.; MISHRA, R.; VARMA, R.; VARUGHESE, B.; TRIPATHI, J. A study on phytochemical and antifungal activity of leaf extracts of *Terminalia catappa*. **International of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 13, p. 85–93, 2013.

MANNOCHIO-RUSSO, H.; BUENO, P. C. P.; BAUERMEISTER, A.; DE ALMEIDA, R. F.; DORRESTEIN, P. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Can Statistical Evaluation Tools for Chromatographic Method Development Assist in the Natural Products Workflow? A Case Study on Selected Species of the Plant Family Malpighiaceae. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 11, p. 3239–3249, 2020.

MANSOOR AHMED, S.; SWAMY, V. B.; GOPKUMAR DHANAPAL, P. R.; CHANDRASHEKARA, V. Anti-Diabetic Activity of Terminalia catappa Linn. Leaf Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 36–39, 2005.

MENA, P.; CALANI, L.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRUNI, R.; CROZIER, A.; DEL RIO, D. Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic compounds in pomegranate (Punica granatum L.) Juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14821–14840, 2012.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577–599, 2000.

MININEL, F. J. **Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão polares e infusão das folhas de Terminalia catappa L. (COMBRETACEAE) e avaliação das suas atividades antiulcerogênica e mutagênica**. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

MININEL, F. J.; LEONARDO JUNIOR, C. S.; ESPANHA, L. G.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. Characterization and Quantification of Compounds in the Hydroalcoholic Extract of the Leaves from Terminalia catappa Linn. (Combretaceae) and Their Mutagenic Activity . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

MOILANEN, J.; SINKKONEN, J.; SALMINEN, J.-P. Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. **Chemoecology**, v. 23, n. 3, p. 165–179, 2013.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 10th ed. Wiley, 2019.

MOREIRA, L. Q.; VILELA, F. C.; ORLANDI, L.; DIAS, D. F.; SANTOS, A. L. A.; DA SILVA, M. A.; PAIVA, R.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of Byrsonima intermedia A. Juss. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 610–615, 2011.

MOREIRA, R. P. de M.; AUGUSTO, C.; BATISTA, S.; NETO, G. G. “Check List” de Angiospermas da vegetação marginal da estrada Santo Antônio de Leverger - Mimoso, Pantanal de Mato Grosso. **FLOVET - Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica**, v. 1, n. 5, p. 1–21, 2013.

MOSES, T.; PAPADOPOULOU, K. K.; OSBOURN, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 439–462, 2014.

- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226–238, 2015.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H. De; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação in vitro de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1053–1059, 2004.
- OELRICHS, P. B.; PEARCE, C. M.; ZHU, J.; FILIPPICH, L. J. Isolation and structure determination of terminalin A toxic condensed tannin from *Terminalia oblongata*. **Natural toxins**, v. 2, n. 3, p. 144–50, 1994.
- OHARA, R.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; ZANATTA, A. C.; CAMPANER DOS SANTOS, L.; VILEGAS, W.; CONSTATINO, F. B.; JUSTULIN, L. A.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 256, p. 112793, 2020.
- OLIVEIRA, M. I. B.; POLIDO, C. do A.; COSTA, L. C.; FAVA, W. S. Sistema reprodutivo e polinização de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 756–758, 2007.
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.
- OLIVES, A. I.; GONZÁLEZ-RUIZ, V.; MARTÍN, M. A. Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 7, 5618–5634, 2017.
- ORY, L.; NAZIH, E. H.; DAOUD, S.; MOCQUARD, J.; BOURJOT, M.; MARGUERITTE, L.; DELSUC, M. A.; BARD, J. M.; POUCHUS, Y. F.; BERTRAND, S.; ROULLIER, C. Targeting bioactive compounds in natural extracts - Development of a comprehensive workflow combining chemical and biological data. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 29–42, 2019.
- PACHECO-FERNÁNDEZ, I.; PINO, V. Green solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 18, p. 42–50, 2019.
- PACZKOWSKA, M.; MIZERA, M.; PIOTROWSKA, H.; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; LEWANDOWSKA, K.; GOSCIANSKA, J.; PIETRZAK, R.; BEDNARSKI, W.; MAJKA, Z.; CIELECKA-PIONTEK, J. Complex of Rutin with β -Cyclodextrin as Potential Delivery System. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120858, 2015.
- PANDEY, P.; SENTHIL-KUMAR, M. Plant-pathogen interaction in the presence of abiotic stress: What do we know about plant responses? **Plant Physiology Reports**, v. 24, n. 4, p. 541–549, 2019.

- PAUDEL, G.; BILOVA, T.; SCHMIDT, R.; GREIFENHAGEN, U.; BERGER, R.; TARAKHOVSKAYA, E.; STÖCKHARDT, S.; BALCKE, G. U.; HUMBECK, K.; BRANDT, W.; SINZ, A.; VOGT, T.; BIRKEMEYER, C.; WESSJOHANN, L.; FROLOV, A. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 22, p. 6283–6295, 2016.
- PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; DA SILVA BOLZANI, V. New Antioxidant C - Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384–1387, 2003.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. da S.; SILVA, C. H. T. P. Da; NASCIMENTO, J. E. Do; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. De; AMORIM, E. L. C. De. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683–689, 2008.
- PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776–1782, 2014.
- PELISSARI, J. H.; BRAGAGNOLO, F. S.; PEREIRA, F. M. V.; BORGES, M. S.; DE FUNARI, C. S.; RINALDO, D. Green and Multivariate Approach to Obtain a Fingerprint of Red Wines by HPLC-PAD. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 8, p. 1654–1665, 2021.
- PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE – Analytical GREEnness metric approach and software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 2020.
- PEREIRA, V. V.; BOREL, C. R.; SILVA, R. R. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of *Byrsonima* species. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1461–1465, 2015.
- PÉREZ-MAGARIÑO, S.; REVILLA, I.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. .; BELTRÁN, S. Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 847, n. 1–2, p. 75–81, 1999.
- PÉRICO, L. L.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; BESERRA, F. P.; DE CÁSSIA DOS SANTOS, R.; WEISS, M. B.; RESENDE, F. A.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; VARANDA, E. A.; DE GOBBI, J. I. F.; DA ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 312–324, 2015.
- PESSINE, F. B. T.; CALDERINI, A.; ALEXANDRINO, G. L. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. In: DONG-HYUN, K. (ed.). **Magnetic Resonance Spectroscopy**. Rijeka: InTech, 2012.

PFUNDSTEIN, B.; EL DESOUKY, S. K.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; ERBEN, G.; OWEN, R. W. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. **Phytochemistry**, v. 71, n. 10, p. 1132–1148, 2010.

PILON, A. C.; GU, H.; RAFTERY, D.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; CARNEVALE NETO, F. Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 16, p. 10413–10423, 2019.

PILON, A.; VIEIRA, N.; AMARAL, J.; MONTEIRO, A.; SILVA, R.; SPÍNDOLA, L.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 00, p. 1–12, 2021.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.

PINHEIRO SILVA, L.; DAMACENA DE ANGELIS, C.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; JOSÉ MININEL, F.; CAMPANER DOS SANTOS, L.; KARINA DELELLA, F.; LUIS FELISBINO, S.; VILEGAS, W.; REGINA MACHADO DA ROCHA, L.; APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, M.; MARIA BAUAB, T.; TOMA, W.; AKIKO HIRUMA-LIMA, C. *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285–295, 2015.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. I e II.

PRITCHARD, J. D. Health Protection Agency Compendium of Chemical Hazards: Methanol. **Public Health England**, 2011.

QUIFER-RADA, P.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; CHIVA-BLANCH, G.; JÁUREGUI, O.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, v. 169, p. 336–343, 2015.

RAI, A.; SAITO, K.; YAMAZAKI, M. Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 764–787, 2017.

RAMKISSOON, J. S.; MAHOMOODALLY, M. F.; AHMED, N.; SUBRATTY, A. H. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 7, p. 561–569, 2013.

RAUF, A.; IMRAN, M.; ABU-IZNEID, T.; HAQ, I.-U.; PATEL, S.; PAN, X.; NAZ, S.; SANCHES SILVA, A.; SAEED, F.; RASUL SULERIA, H. A. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108999, 2019.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- REDDY, M.; GUPTA, S.; JACOB, M.; KHAN, S.; FERREIRA, D. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. **Planta Medica**, v. 73, n. 5, p. 461–467, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RINALDO, D.; BATISTA, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; FURLAN, M.; VILEGAS, W. Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. **Chirality**, v. 22, n. 8, p. 726–733, 2010.
- ROBSON, T. M.; KLEM, K.; URBAN, O.; JANSEN, M. A. K. Re-interpreting plant morphological responses to UV-B radiation. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 5, p. 856–866, 2015.
- RODAL, M. J. N.; NASCIMENTO, L. M. Do. Levantamento florístico da floresta serrana da reserva biológica de Serra Negra, microrregião de Itaparica, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 4, p. 481–500, 2002.
- RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- ROHR, G. E.; MEIER, B.; STICHER, O. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode array and electrochemical detection. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 106–112, 2000.
- SALEM, M. A.; DE SOUZA, L. P.; SERAG, A.; FERNIE, A. R.; FARAG, M. A.; EZZAT, S. M.; ALSEEKH, S. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 37, 2020.
- SALINAS-SÁNCHEZ, D.; JIMÉNEZ-FERRER, E.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, V.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; TORTORIELLO, J.; HERRERA-RUIZ, M. Anti-Inflammatory Activity of a Polymeric Proanthocyanidin from *Serjania schiedeana*. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 863, 2017.
- SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29265, 2016.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R. P.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; DOS SANTOS, F. V.; SERPELONI, J. M.; CÓLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 319–326, 2007.

SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 203–212, 2012.

SERPELONI, J. M.; SPECIAN, A. F. L.; RIBEIRO, D. L.; TUTTIS, K.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; VILEGAS, W.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. Selective anticancer effects of *Serjania marginata* Casar. extract in gastric cells are mediated by antioxidant response. **Environmental Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 1544–1556, 2021.

SHAHAT, A. A.; COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HAMMOUDA, F. M.; ISMAIL, S. I.; AZZAM, S.; CLAEYS, M.; GOOVAERTS, E.; PIETERS, L.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. J. Antiviral and Antioxidant Activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 539–541, 2002.

SHANNON, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

SHI, J.-H.; CHEN, K.; XU, Y. Characterization of the inclusion interaction between prednisolone and di-O-methyl- β -cyclodextrin: Spectroscopic methods and molecular modeling. **Journal of Molecular Liquids**, v. 194, p. 172–178, 2014.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, M.; RAMESHKUMAR, K. B. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 236–246, 2016.

SOUZA, O. A.; CARNEIRO, R. L.; VIEIRA, T. H. M.; FUNARI, C. S.; RINALDO, D. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by Means of a Green Statistically Developed HPLC-PAD Method. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1977–1985, 2018.

SOUZA, O. A.; FURLANI, R. P.; RAMALHÃO, V. G. da S.; BORGES, M. S.; FUNARI, C. S.; BOLZANI, V. da S.; RINALDO, D. Eco-friendly and inexpensive food grade bioethanol for *Eugenia uniflora* L. chromatographic fingerprinting: A trade-off between separation and sustainability. **Phytochemistry Letters**, v. 43, p. 200–207, 2021.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2–3, p. 219–243, 2004.

SPRENGEL-LIMA, C.; REZENDE, A. A. Sapindaceae do noroeste paulista: Lista de espécies e chave de identificação baseada em caracteres vegetativos. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 270–282, 2013.

STÖGGL, W. M.; HUCK, C. W.; BONN, G. K. Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 7–8, p. 524–528, 2004.

SUNG, Y. K.; KIM, S. W. Recent advances in polymeric drug delivery systems. **Biomaterials Research**, v. 24, n. 1, p. 12, 2020.

SUT, S.; DALL'ACQUA, S.; UYSAL, S.; ZENGİN, G.; AKTUMSEK, A.; PICOT-ALLAIN, C.; MAHOMOODALLY, F. LC-MS, NMR fingerprint of *Potentilla argentea* and *Potentilla recta* extracts and their in vitro biopharmaceutical assessment. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 125–133, 2019.

SZAKIEL, A.; PAĆZKOWSKI, C.; HENRY, M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 4, p. 471–491, 2011.

TABALDI, L. A.; VIEIRA, M. do C.; ZÁRATE, N. A. H.; SILVA, L. R. Da; GONÇALVES, W. L. F.; PILECCO, M.; FORMAGIO, A. S. N.; GASSI, R. P.; PADOVAN, M. P. Cover crops and their effects on the biomass yield of *Serjania marginata* plants. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 614–620, 2012.

TAKAHASHI, K.; HAMAMURA, K.; SEI, Y. Unique nuclear magnetic resonance behaviour of γ -cyclodextrin in organic solvents. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 93, n. 1–2, p. 97–106, 2019.

TANG, Y.; XIONG, R.; WU, A.-G.; YU, C.-L.; ZHAO, Y.; QIU, W.-Q.; WANG, X.-L.; TENG, J.-F.; LIU, J.; CHEN, H.-X.; WU, J.-M.; QIN, D.-L. Polyphenols Derived from Lychee Seed Suppress A β (1-42)-Induced Neuroinflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 2109, 2018.

THOMSON, L. A. J.; EVANS, B. *Terminalia catappa* (tropical almond), ver. 2.2. In: ELEVITCH, C. R. (ed.). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. Hōlualoa: Permanent Agriculture Resources (PAR), 2006.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. Vander. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 2, p. 148–161, 2011.

TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 2993–2999, 2016.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 331–342, 1996.

VELASQUE, M.; DEL-CLARO, K. Host plant phenology may determine the abundance of an ecosystem engineering herbivore in a tropical savanna. **Ecological Entomology**, v. 41, n. 4, p. 421–430, 2016.

VENKATALAKSHMI P; VADIVEL V; BRINDHA P. Identification of Flavonoids in Different Parts of Terminalia catappa L. Using LC-ESI-MS/MS and Investigation of Their Anticancer Effect in EAC Cell Line Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 4, p. 176–183, 2016.

VERDAM, M. C. D. S.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; ANDRADE, K. C. De; FERNANDES, K. L. M.; MACHADO, T. M.; DA SILVA, F. M. A.; SOUZA, M. P. De; KOOLEN, H. H. F.; PAULA, C. D. S.; HIROTA, B. C. K.; OLIVEIRA, V. B. De; MIYAZAKI, C. M. S.; KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; STUELP-CAMPELO, P. M.; MIGUEL, O. G. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of Byrsonima duckeana W. R. Anderson (Malpighiaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

VIEIRA, S. C. H. **Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: Serjania marginata Casar. (Sapindaceae)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

VOINOVICH, D.; PERISSUTTI, B.; GRASSI, M.; PASSERINI, N.; BIGOTTO, A. Solid State Mechanochemical Activation of Silybum marianum Dry Extract With Betacyclodextrins: Characterization and Bioavailability of the Coground Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4119–4129, 2009.

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

WANG, H.; HELLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 115–121, 2000.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016. a.

WANG, W.; XIN, H.; WANG, M.; MA, Q.; WANG, L.; KALERI, N. A.; WANG, Y.; LI, X. Transcriptomic Analysis Reveals the Molecular Mechanisms of Drought-Stress-Induced Decreases in Camellia sinensis Leaf Quality. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. MAR2016, p. 385, 2016. b.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, n. 1, p. 29–41, 2001.

WELCH, C. J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 667–680, 2010.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for the assessment of herbal medicines**. Geneva: World Health Organization, 1991.

WHO, World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO Press, World Health Organization, 1999. v. 1

WHO, World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization, 2002. v. 2

WHO, World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO Press, World Health Organization, 2007. v. 3

WHO, World Health Organization. Annex 1 WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines. *In: Fifty-first report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations*. Geneva: World Health Organization, 2017. p. 71–86.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015.

WOLFENDER, J. L.; NUZILLARD, J. M.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; RENAULT, J. H.; BERTRAND, S. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704–742, 2019.

WOO, H. R.; KIM, H. J.; LIM, P. O.; NAM, H. G. Leaf Senescence: Systems and Dynamics Aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 347–376, 2019.

XIONG, R.; WANG, X.-L.; WU, J.-M.; TANG, Y.; QIU, W.-Q.; SHEN, X.; TENG, J.-F.; PAN, R.; ZHAO, Y.; YU, L.; LIU, J.; CHEN, H.-X.; QIN, D.-L.; YU, C.-L.; WU, A.-G. Polyphenols isolated from lychee seed inhibit Alzheimer's disease-associated Tau through improving insulin resistance via the IRS-1/PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, p. 112548, 2020.

YANG, L. Y.; YANG, S. L.; LI, J. Y.; MA, J. H.; PANG, T.; ZOU, C. M.; HE, B.; GONG, M. Effects of different growth temperatures on growth, development, and plastid pigments metabolism of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants. **Botanical Studies**, v. 59, n. 1, p. 5, 2018.

YANG, M.; FAZIO, S.; MUNCH, D.; DRUMM, P. Impact of methanol and acetonitrile on separations based on π - π interactions with a reversed-phase phenyl column. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, n. 1–2, p. 124–129, 2005.

YAO, Y.; XIE, Y.; HONG, C.; LI, G.; SHEN, H.; JI, G. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization, and evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 329–337, 2014.

YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M. Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 1, p. 79–106, 2010.

YOU DEN, W. J. **Statistical Techniques for Collaborative Tests**. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1967.

YUAN, T.; GUO, X.-F.; SHAO, S.-Y.; AN, R.-M.; WANG, J.; SUN, J. Characterization and identification of flavonoids from *Bambusa chungii* leaves extract by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. **Acta Chromatographica**, v. 33, n. 3, p. 281–294, 2021.

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

ZANATTA, A. C.; MARI, A.; MASULLO, M.; ZEPPONE CARLOS, I.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; CAMPANER DOS SANTOS, L. Chemical metabolome assay by high-resolution Orbitrap mass spectrometry and assessment of associated antitumoral activity of *Actinocephalus divaricatus*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 3, p. 241–250, 2018.

ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; EDRADA-EBEL, R. UHPLC-(ESI)-HRMS and NMR-Based Metabolomics Approach to Access the Seasonality of *Byrsonima intermedia* and *Serjania marginata* From Brazilian Cerrado Flora Diversity. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 534, 2021.

ZHENG, Z.; ZHANG, W.; KONG, L.; LIANG, M.; LI, H.; LIN, M.; LIU, R.; ZHANG, C. Rapid identification of C21 steroidal saponins in *Cynanchum versicolor* Bunge by electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 279–285, 2007.

APÊNDICE

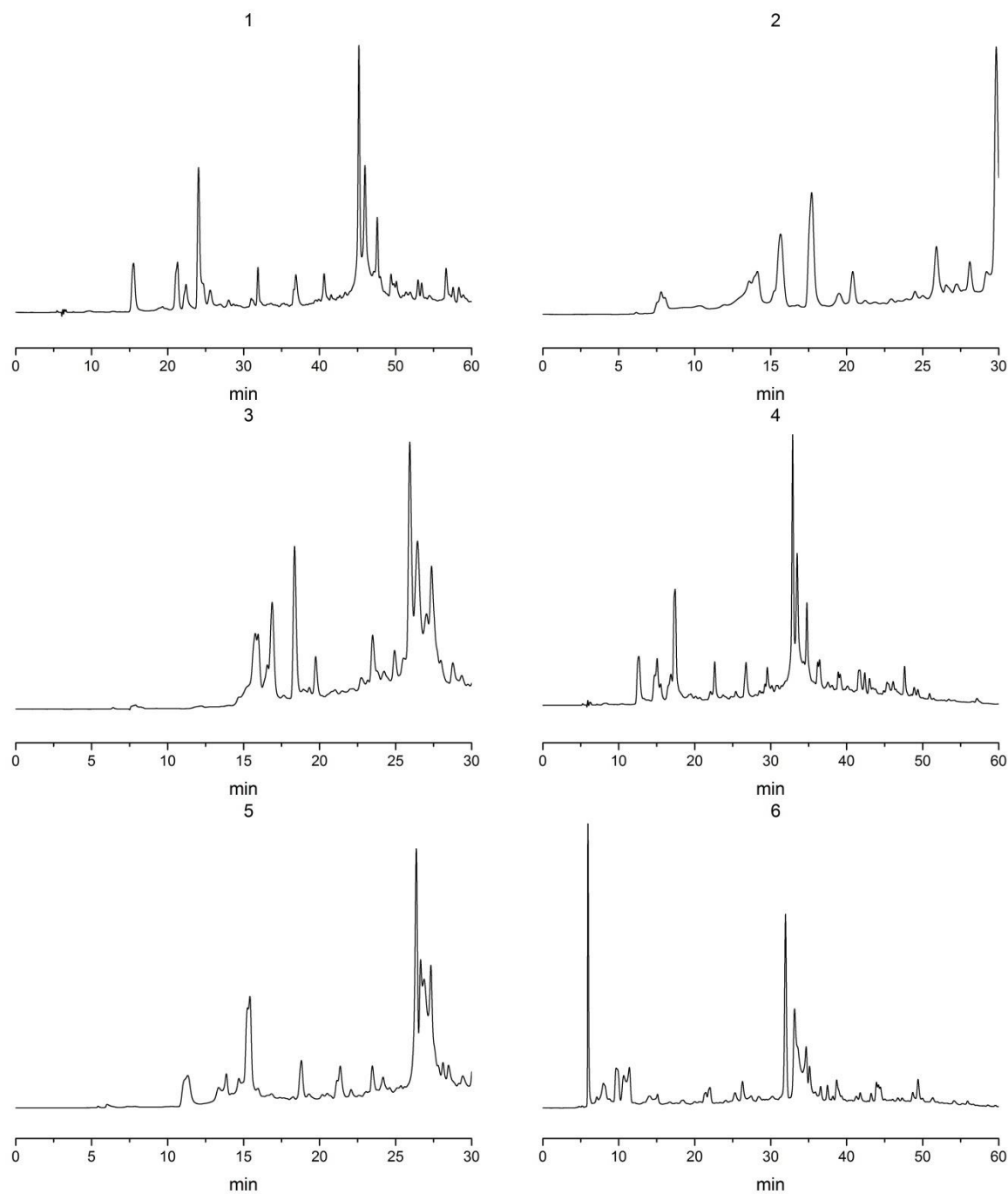
Figura A1 - Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 6 da etapa de triagem.

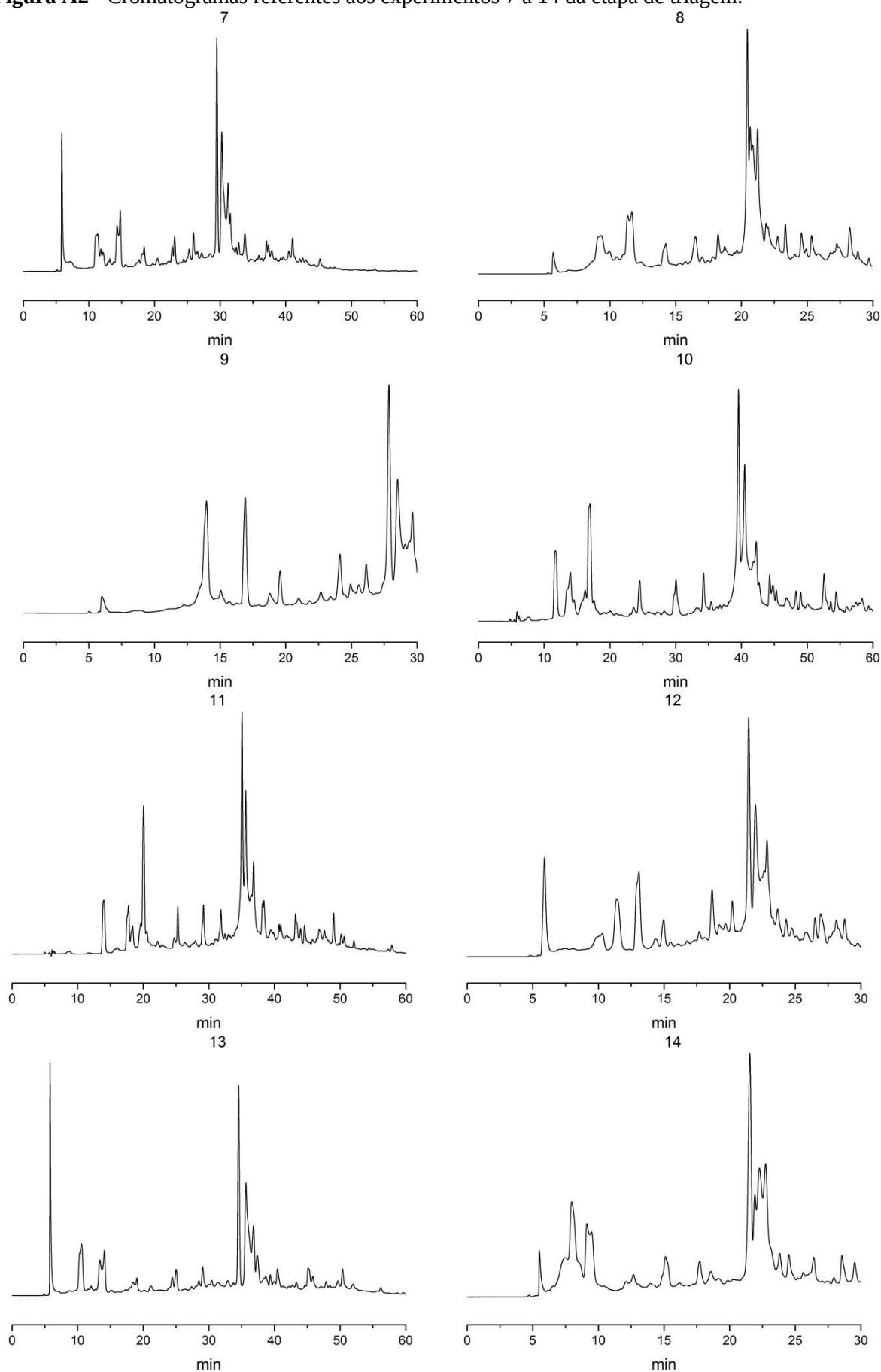
Figura A2 - Cromatogramas referentes aos experimentos 7 a 14 da etapa de triagem.

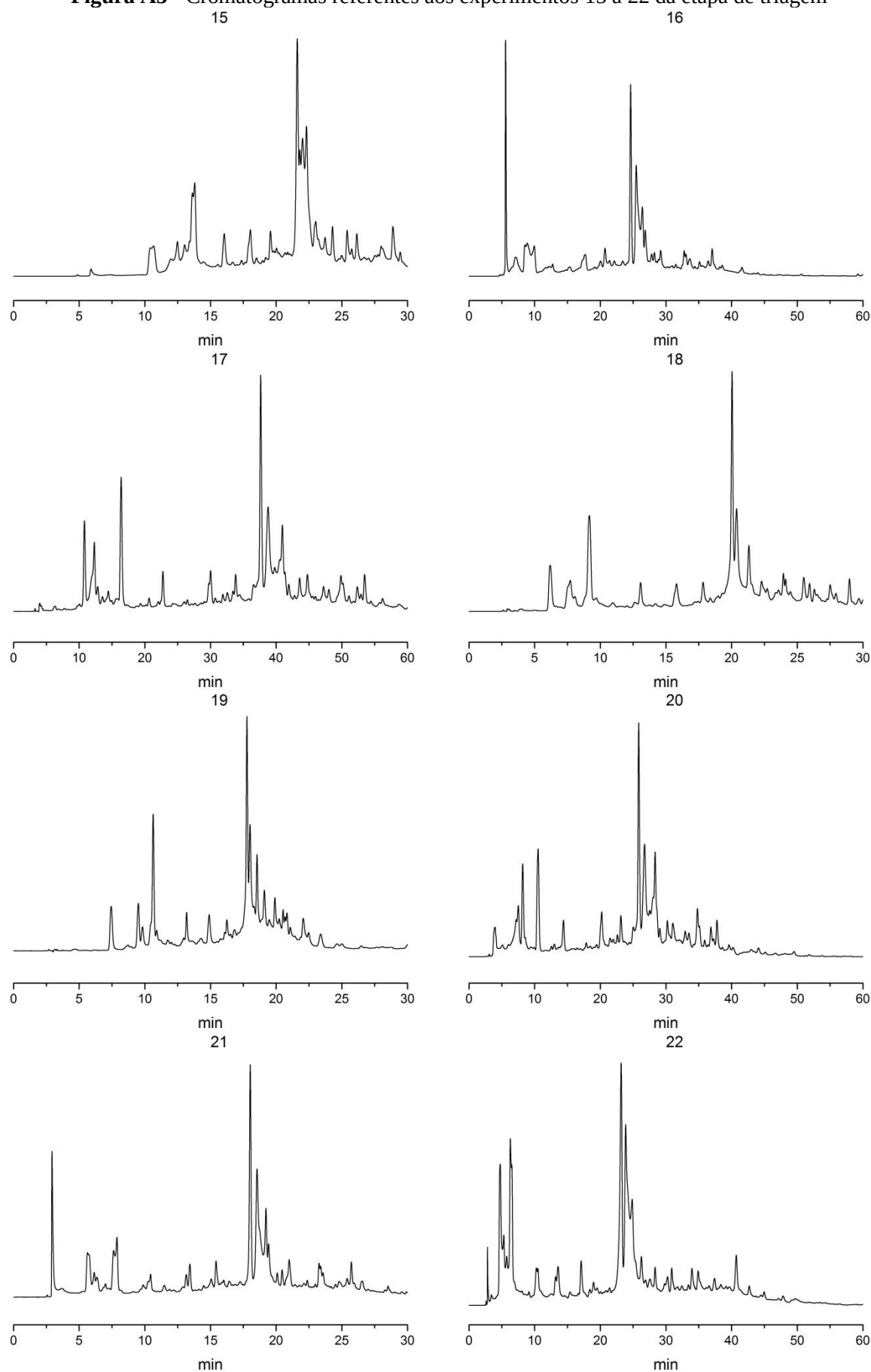
Figura A3 - Cromatogramas referentes aos experimentos 15 a 22 da etapa de triagem

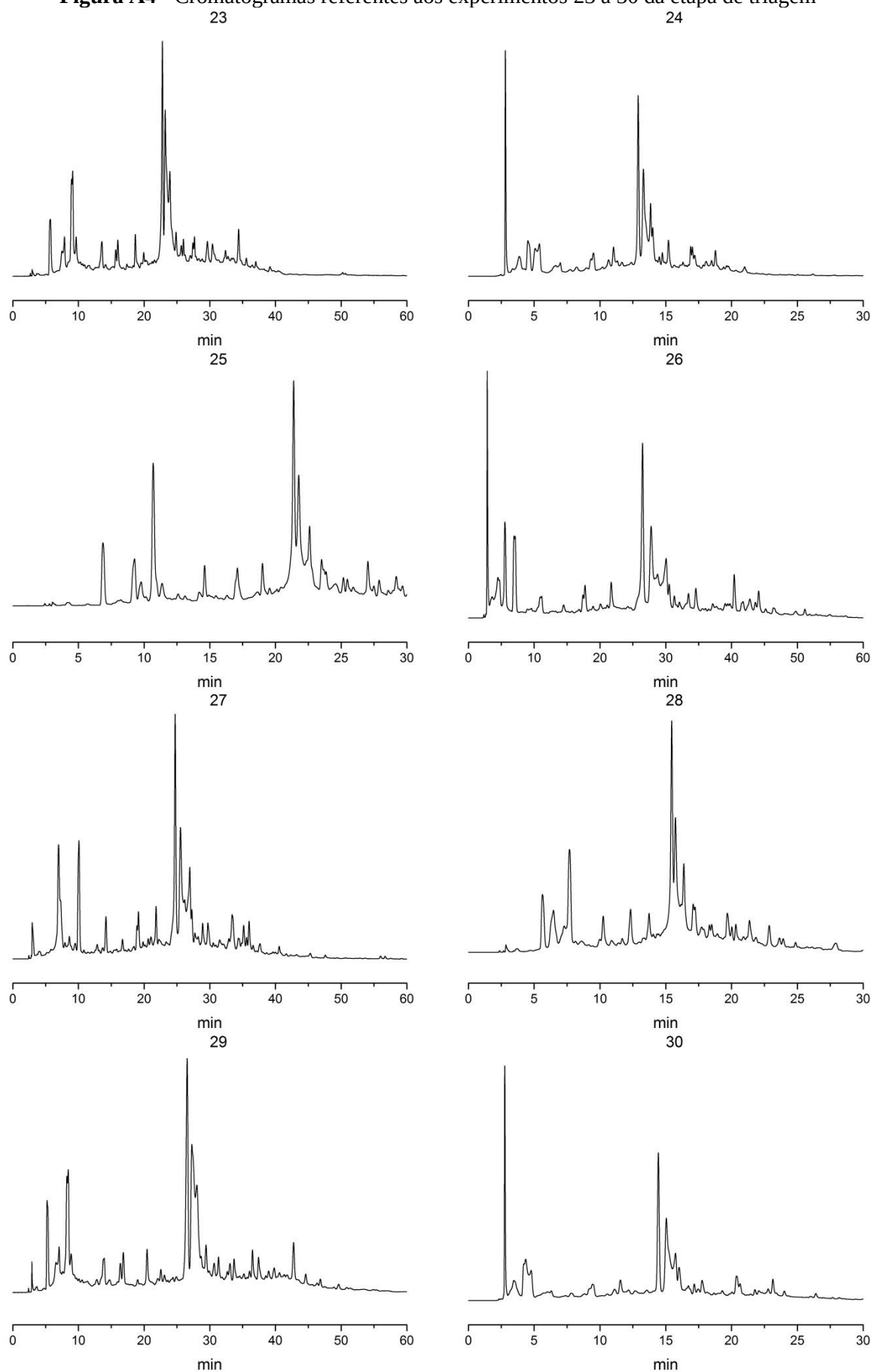
Figura A4 - Cromatogramas referentes aos experimentos 23 a 30 da etapa de triagem

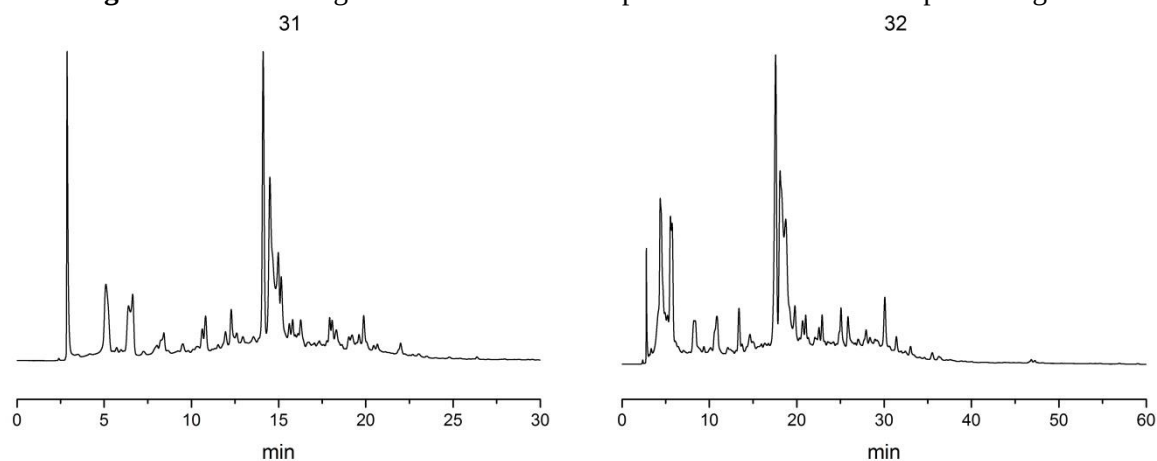
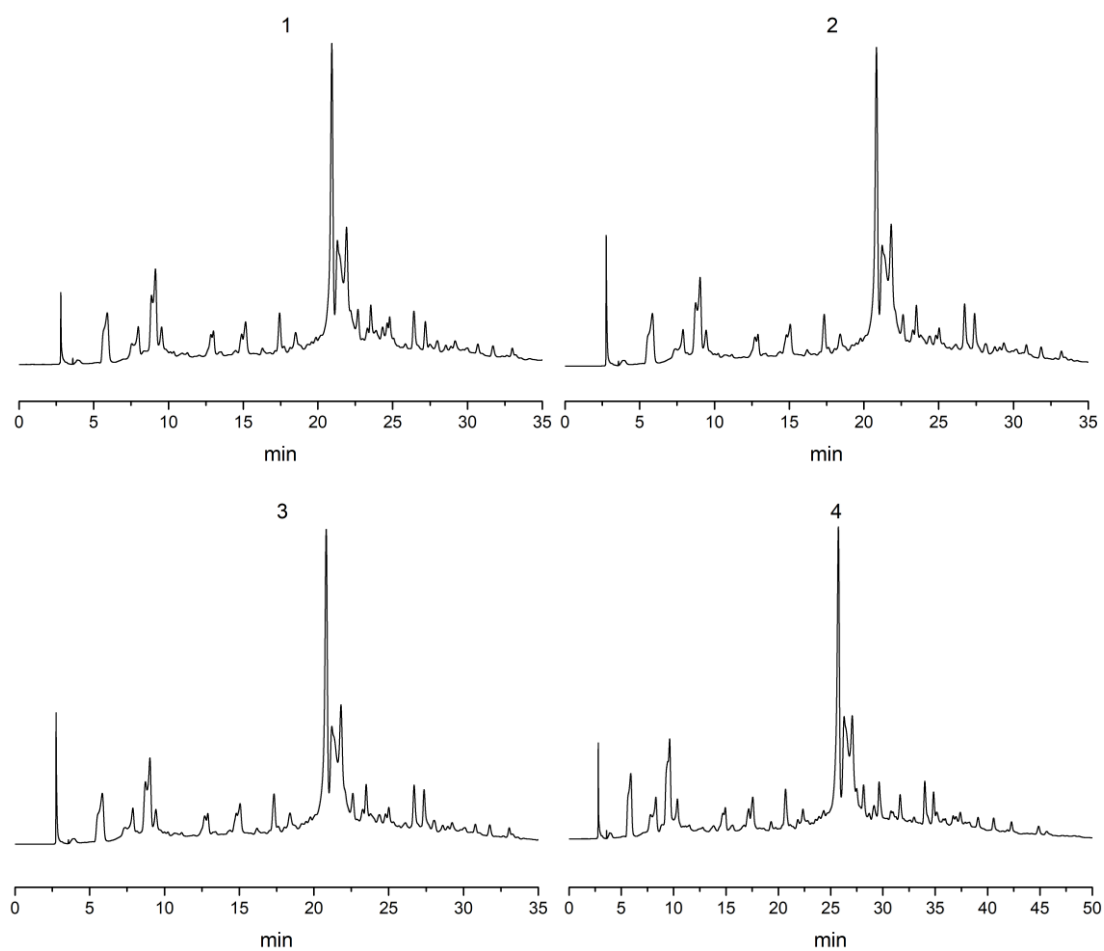
Figura A5 - Cromatogramas referentes aos experimentos 31 a 32 da etapa de triagem**Figura A6** Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 4 da etapa de otimização

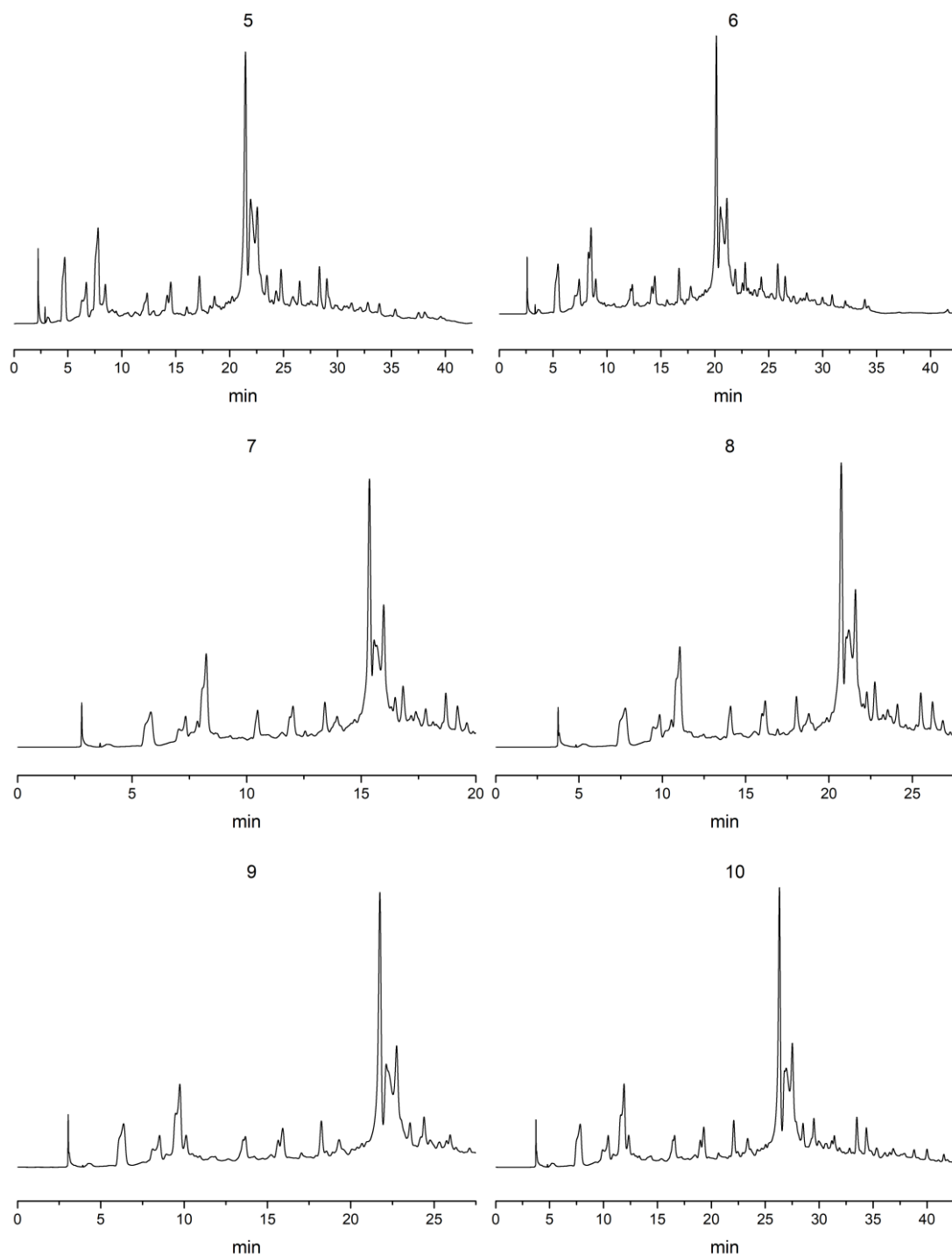
Figura A7 Cromatogramas referentes aos experimentos 5 a 10 da etapa de otimização

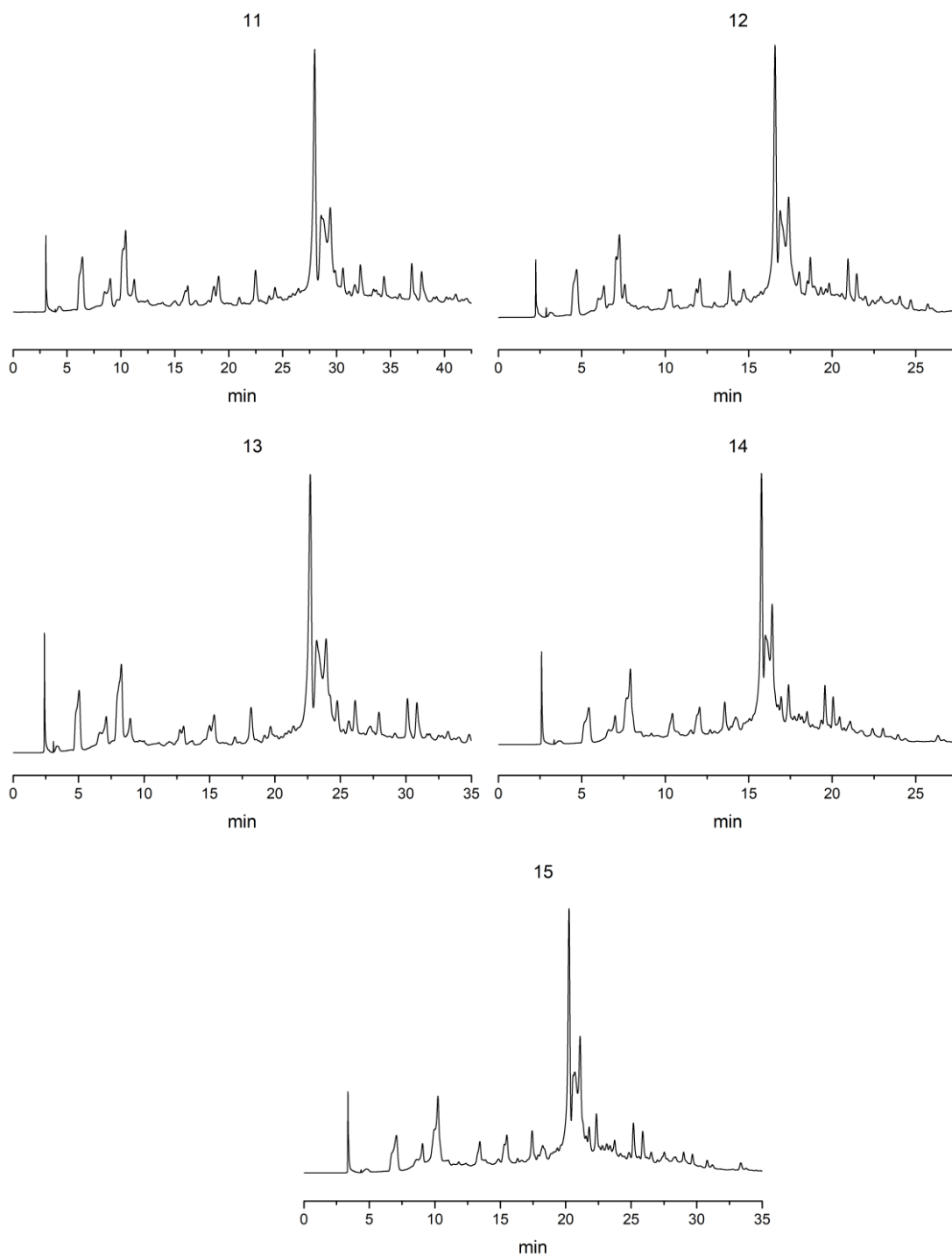
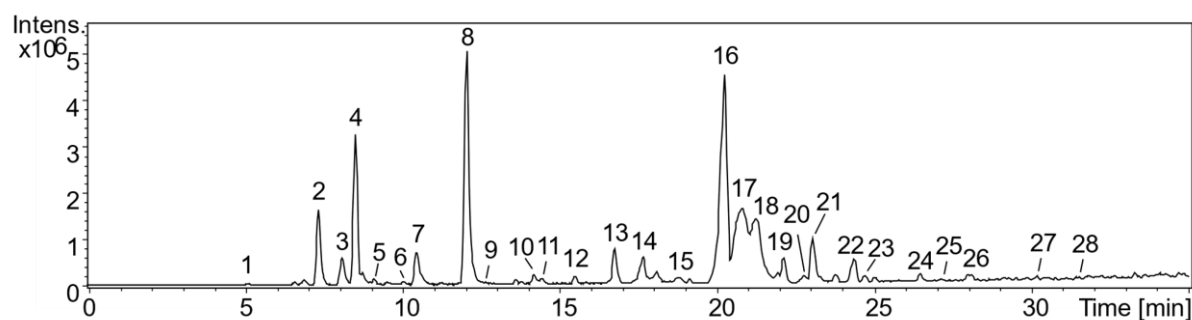
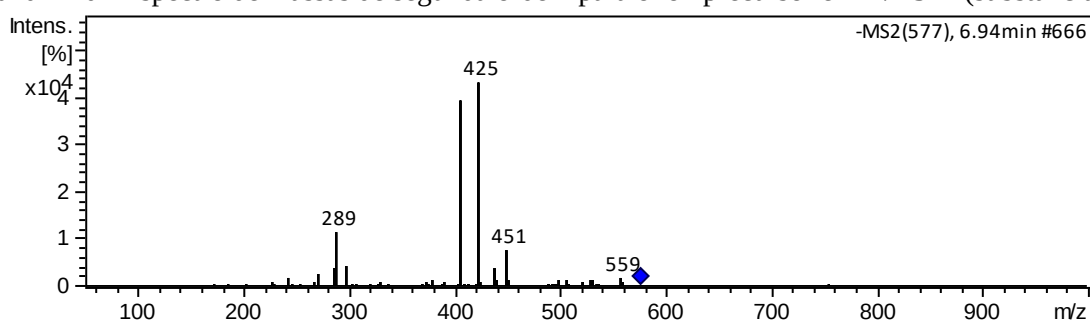
Figura A8 Cromatogramas referentes aos experimentos 11 a 15 da etapa de otimização

Figura A9 - Cromatogramas do pico base por LC-ESI-MS no modo positivo para os extratos de *S. marginata*



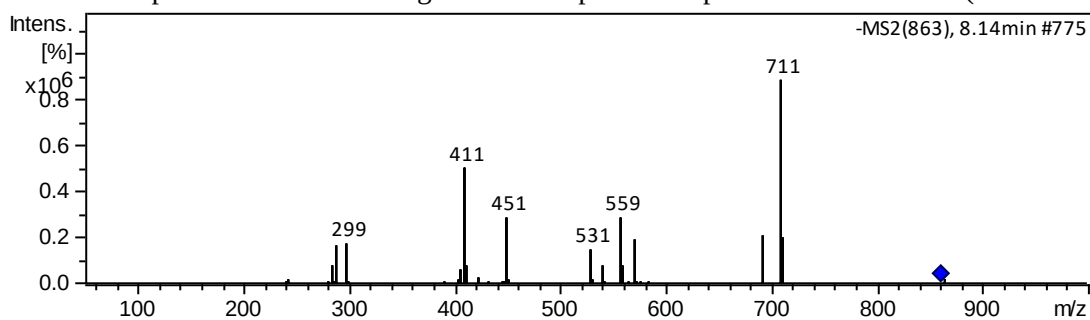
Fonte: próprio autor.

Figura A10 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 577 (substância 2)

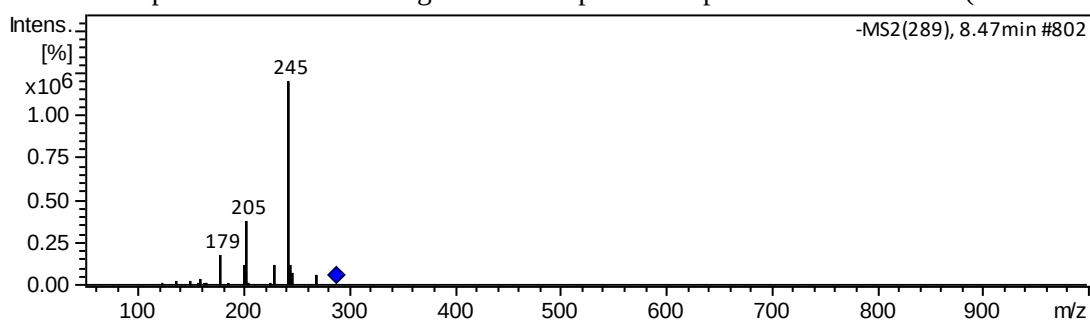


Fonte: próprio autor.

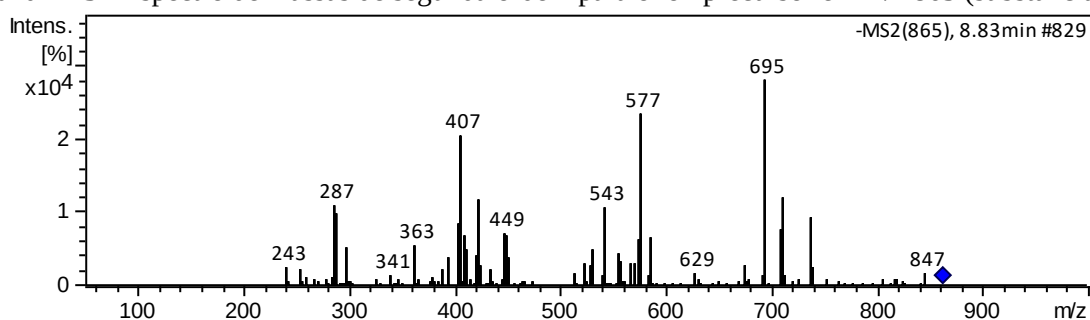
Figura A11 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 863 (substância 3)



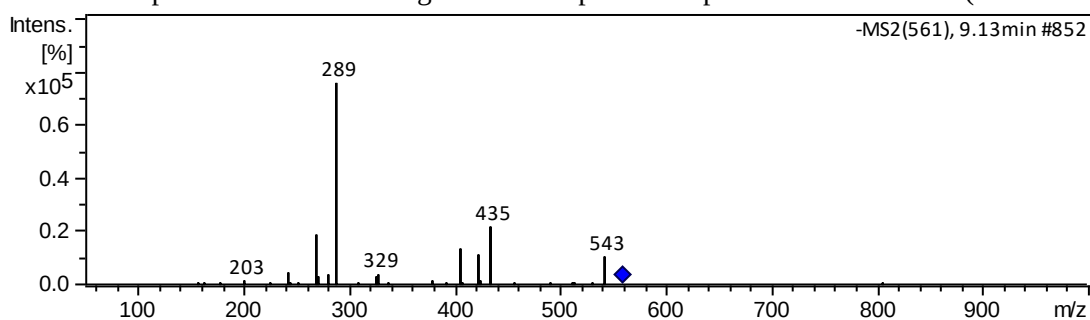
Fonte: próprio autor.

Figura A12 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 289 (substância 4)

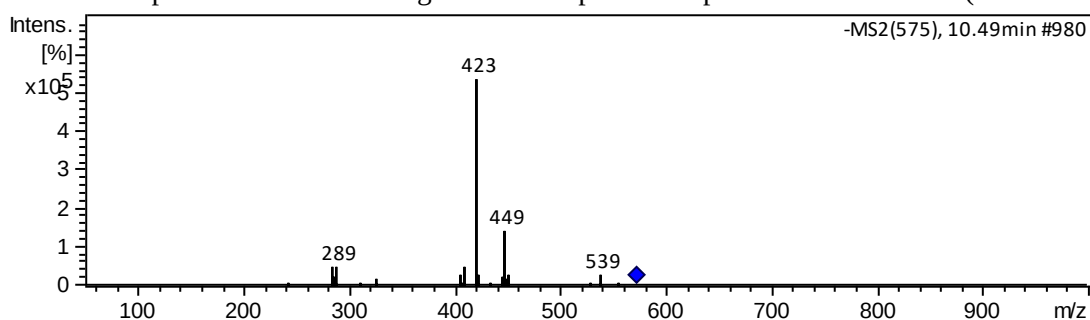
Fonte: próprio autor.

Figura A13 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 865 (substância 5)

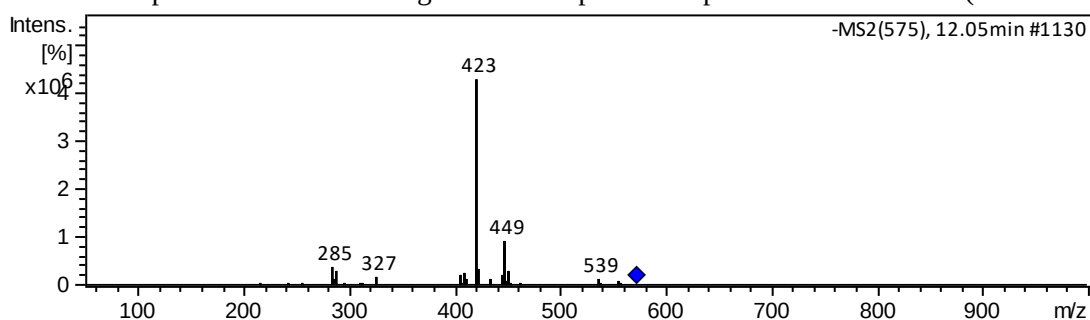
Fonte: próprio autor.

Figura A12 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 561 (substância 6)

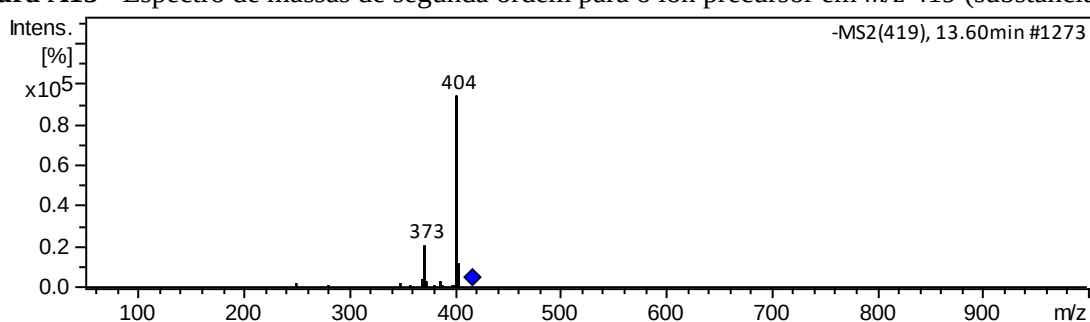
Fonte: próprio autor.

Figura A13 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 575 (substância 7)

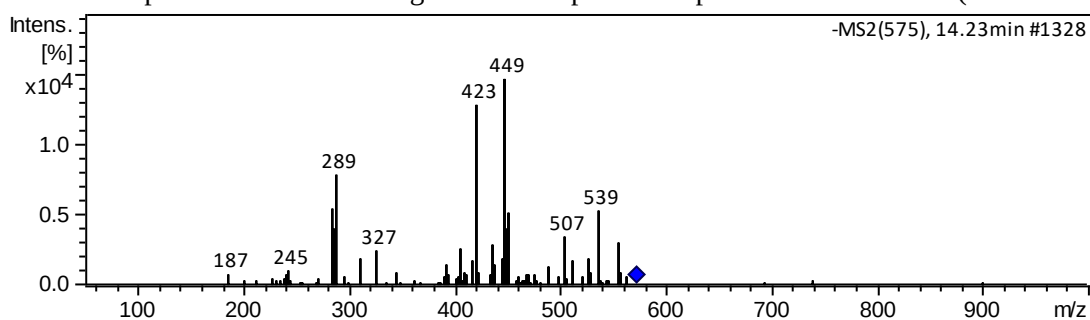
Fonte: próprio autor.

Figura A14 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 575 (substância **8**)

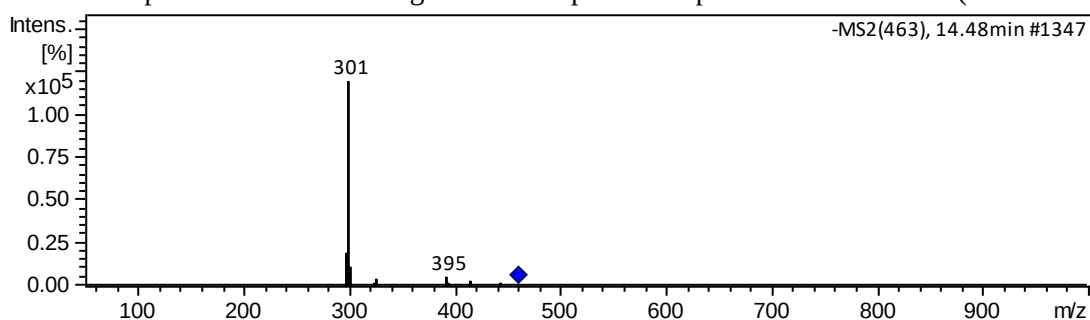
Fonte: próprio autor.

Figura A15 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 419 (substância **9**)

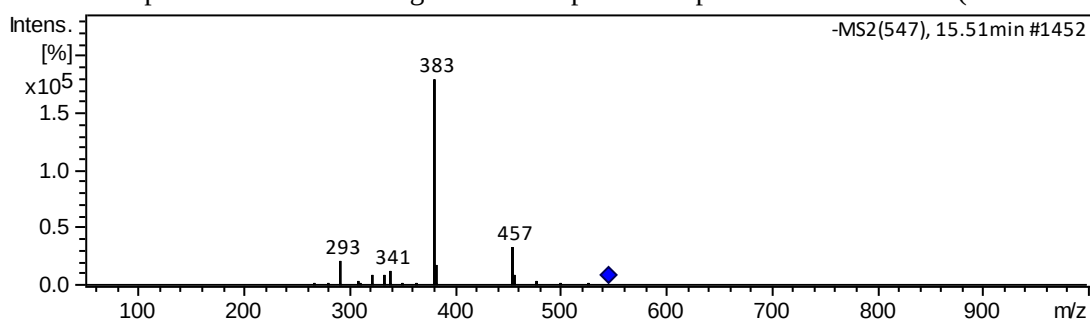
Fonte: próprio autor.

Figura A16 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 575 (substância **10**)

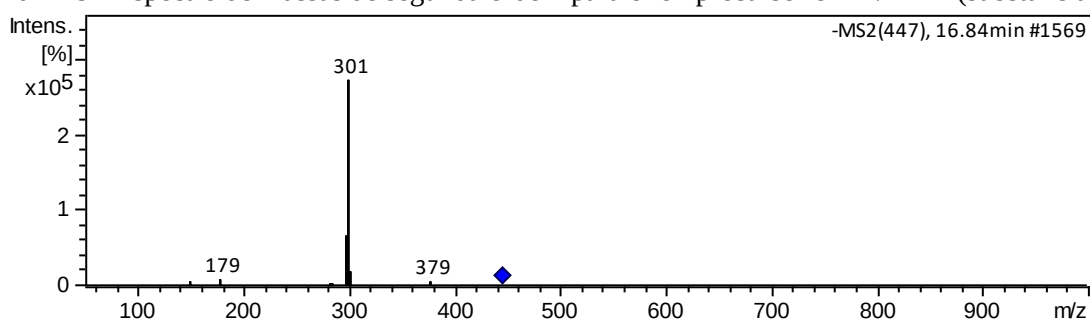
Fonte: próprio autor.

Figura A17 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 463 (substância **11**)

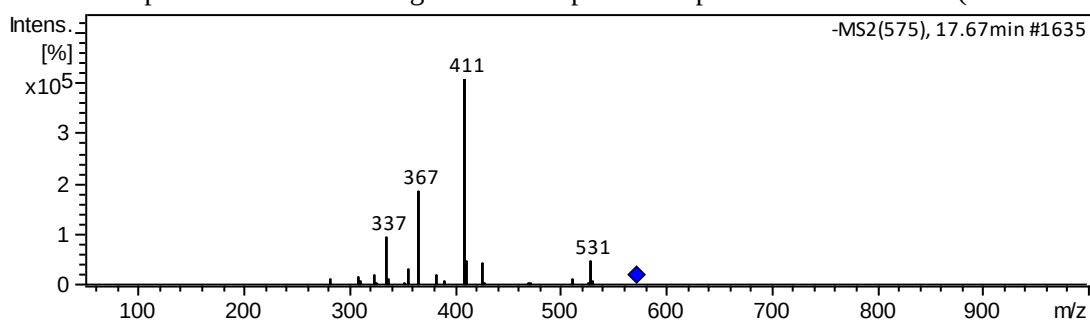
Fonte: próprio autor.

Figura A18 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 547 (substância 12)

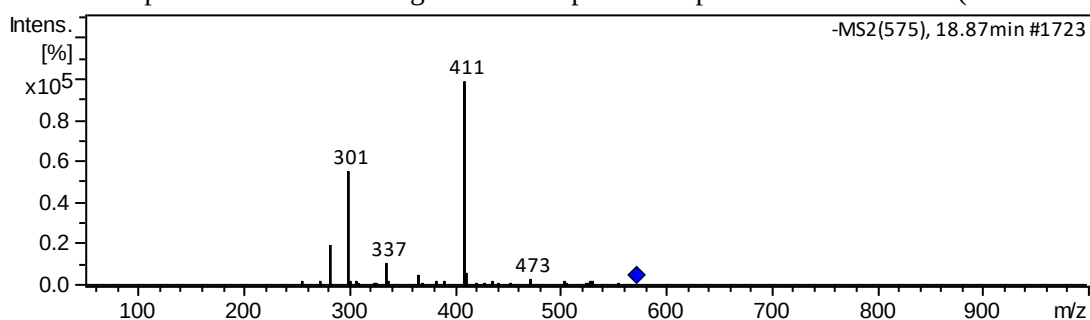
Fonte: próprio autor.

Figura A19 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 447 (substância 13)

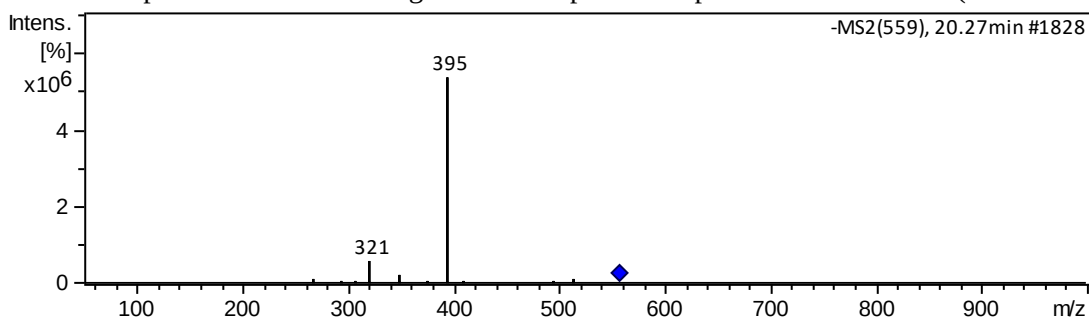
Fonte: próprio autor.

Figura A20 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 575 (substância 14)

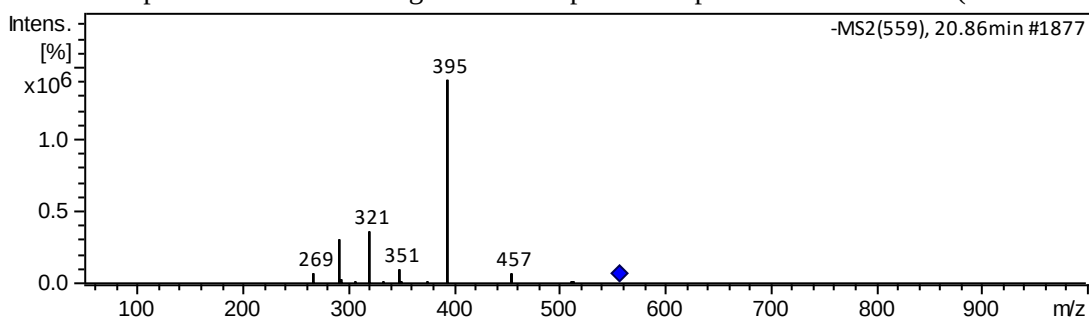
Fonte: próprio autor.

Figura A21 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 575 (substância 15)

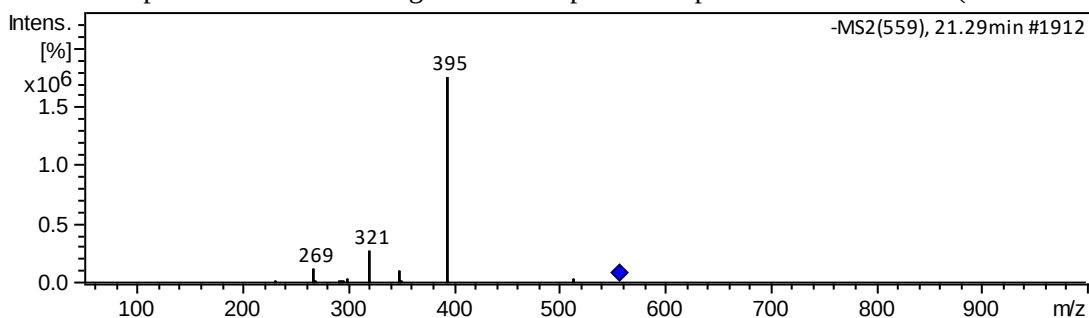
Fonte: próprio autor.

Figura A22 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 559 (substância **16**)

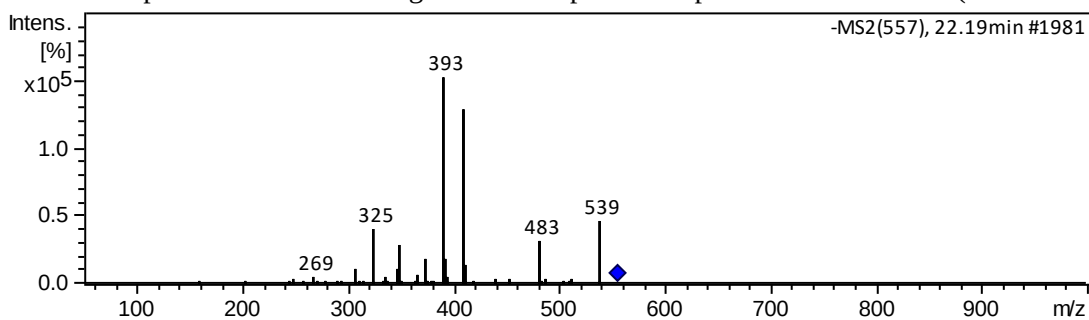
Fonte: próprio autor.

Figura A23 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 559 (substância **17**)

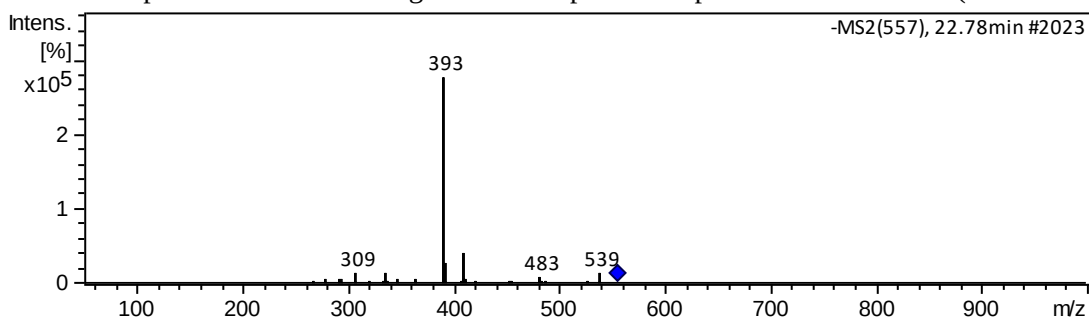
Fonte: próprio autor.

Figura A24 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 559 (substância **18**)

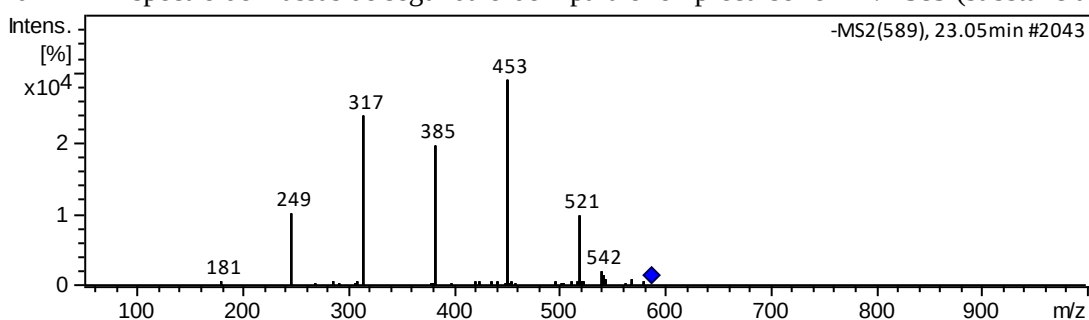
Fonte: próprio autor.

Figura A25 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 557 (substância **19**)

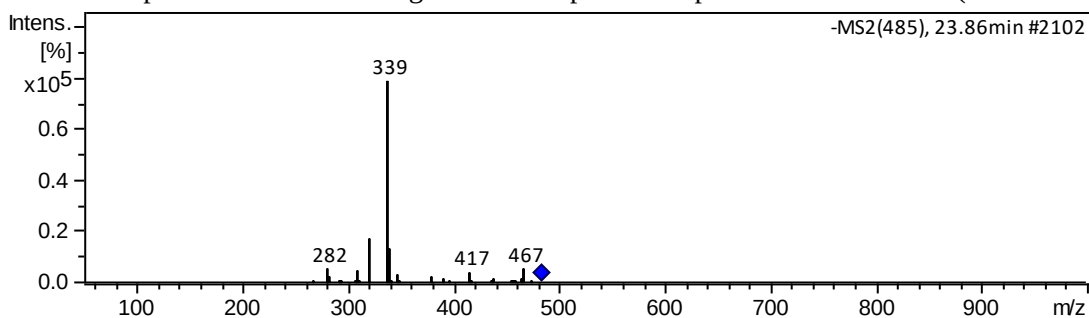
Fonte: próprio autor.

Figura A26 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 557 (substância 20)

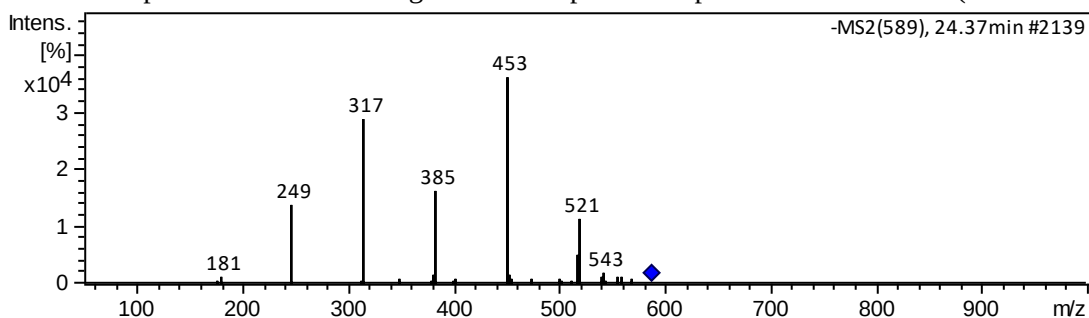
Fonte: próprio autor.

Figura A27 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 589 (substância 21)

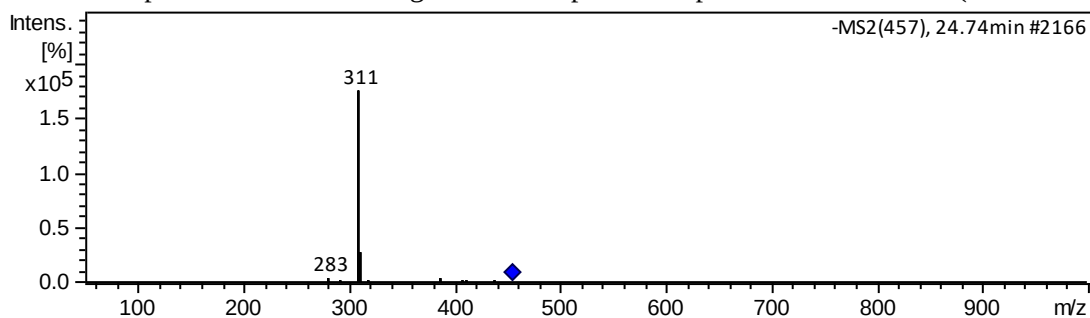
Fonte: próprio autor.

Figura A28 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 485 (substância 22)

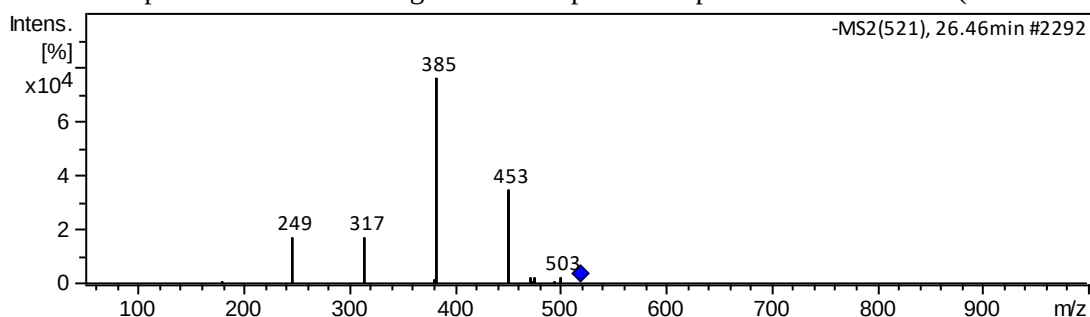
Fonte: próprio autor.

Figura A29 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 589 (substância 23)

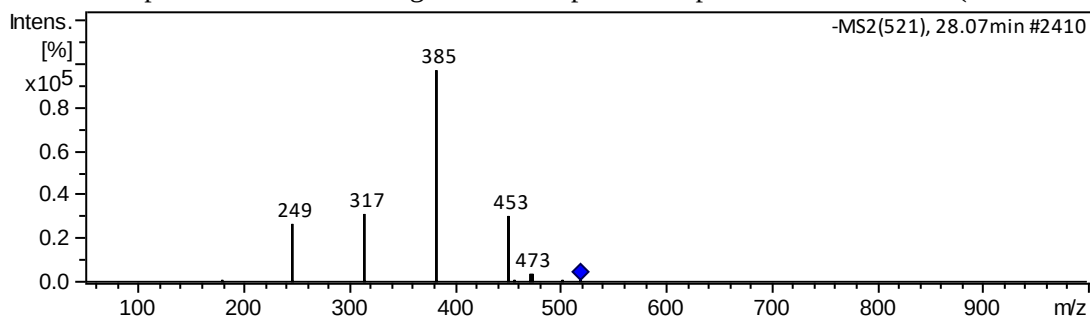
Fonte: próprio autor.

Figura A30 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 457 (substância 24)

Fonte: próprio autor.

Figura A31 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 521 (substância 25)

Fonte: próprio autor.

Figura A31 - Espectro de massas de segunda ordem para o íon precursor em m/z 521 (substância 26)

Fonte: próprio autor.

Tabela A1 - Anotação dos principais metabólitos do extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* por LC-MS e os dados MS/MS correspondentes

(Continua)

No.	[M-H] ⁻	MS/MS	Anotação	Referência
1	153	-	Ácido protocatecuico	QUIFER-RADA <i>et al.</i> , 2015
2	577	559, 451, 425, 407, 289	(epi)catequina-(epi)catequina	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
3	863	711, 693, 559, 451, 411, 299, 289	(epi)catequina-A-(epi)catequina-(epi)catequina	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
4	289	271, 245, 205, 179	(epi)catequina	PÉREZ-MAGARIÑO <i>et al.</i> , 1999; STÖGGL; HUCK; BONN, 2004
5	865	847, 739, 713, 695, 577, 543, 425, 407, 289	(epi)catequina-(epi)catequina-(epi)catequina	VIEIRA, 2014
6	561	543, 435, 425, 407, 329, 289, 271	(epi)afzelequina-(epi)catequina	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
7	575	539, 449, 423, 411, 327, 289, 285	(epi)catequina-A-(epi)catequina	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
8	575	539, 449, 423, 411, 327, 289, 285	(epi)catequina-A-(epi)catequina	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
9	419	404, 373	Não anotado	-
10	575	557, 539, 507, 449, 423, 327, 289, 245	(epi)catequina-A-(epi)catequina	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
11	463	301	Quercetina-O-hexose	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
12	547	529, 457, 383, 341, 293	Apigenina-C-[2"-O-(deoxihexose)-pentose]	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
13	447	301	Quercetina-O-deoxihexose	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015
14	575	531, 429, 411, 367, 337, 285	Luteolina-6-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] (cassiaoccidentalina B)	BEZERRA <i>et al.</i> , 2016
15	575	411, 367, 337, 301, 285	Luteolina-8-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose]	BEZERRA <i>et al.</i> , 2016

Tabela A1 - Anotação dos principais metabólitos do extrato hidroetanólico das folhas de *Serjania marginata* por LC-MS e os dados MS/MS correspondentes

				(Conclusão)
16	559	395, 351, 321, 269	Apigenina-6-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] (cassiaoccidentalina A)	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015; YUAN <i>et al.</i> , 2021
17	559	457, 395, 351, 321, 293, 269	Apigenina-8-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] (tetrastigma B)	HEREDIA-VIEIRA <i>et al.</i> , 2015; YUAN <i>et al.</i> , 2021
18	559	395, 351, 321, 269	Apigenina-C-hexos-3-ulose-2"-O-deoxihexose	Proposta
19	557	539, 483, 411, 393, 325, 269	Derivado de apigenina O-deoxihexose-C-glicosídeo	Proposta
20	557	539, 411, 393, 337, 309, 269	Derivado de apigenina O-deoxihexose-C-glicosídeo	Proposta
21	589	571, 521, 453, 385, 317, 249	Metil-luteolina-6-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose] (cassiaoccidentalina C)	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
22	485	467, 339, 321, 282, 269	Derivado de apigenina O-deoxihexose	Proposta
23	589	571, 521, 473, 453, 385, 351, 317, 249	Metil-luteolina-8-C-[2"-O-(deoxihexose)-hexos-3-ulose]	ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021
24	457	311, 283	Não anotado	-
25	521	503, 453, 385, 317, 249	Não anotado	-
26	521	503, 473, 453, 385, 317, 249	Não anotado	-
27 ^a	-	-	-	-
28 ^a	-	-	-	-

–A– representa uma ligação interflavona do tipo A.

^a sinal com baixa intensidade.

Fonte: próprio autor.