



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química – Câmpus Araraquara



JÚLIA SILVA SOARES

Sorocea bonplandii: Modelos vegetais para o isolamento de endófitos, visando a exploração racional da diversidade molecular.

Araraquara

2023

JÚLIA SILVA SOARES

Sorocea bonplandii: Modelos vegetais para o isolamento de endófitos,
visando a exploração racional da diversidade molecular.

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.

Orientador: Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Soares, Júlia Silva

Sorocea bonplandii: Modelos vegetais para o isolamento de endófitos, visando a exploração racional da diversidade molecular/ Júlia Silva Soares, Araraquara-SP, 2022, p. 126

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Química (IQ), Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE)

Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais, 2. Metabolômica, 3. *Sorocea bonplandii*, 4. *Chaetomiun atrobrunneoum*

JÚLIA SILVA SOARES

Sorocea bonplandii: Modelos vegetais para o isolamento de endófitos,
visando a exploração racional da diversidade molecular.

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.

Araraquara, 09 de janeiro de 2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof^a Dr^a Cintia Duarte Freitas Milagre
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof^a Dr^a Lorena Oliveira Pires
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Dedico esta pesquisa a
Mim, por todo empenho
Minha família
Meus amigos
Professor Ian

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e família pelo apoio, principalmente por terem me incentivado sempre a seguir essa carreira e a seguir meus sonhos. Aos meus amigos por todo apoio e incentivo, principalmente aos meus amigos criados no curso, em especial a Maria Leticia por todo carinho, paciência e amizade pelo tempo que moramos juntas durante a faculdade.

Aos professores do IQ pelas disciplinas ministradas, que contribuíram para minha formação e meu conhecimento durante todo o curso, em especial a Professora Kelly pelo projeto de engenharia química.

Ao Professor Ian pela receptividade calorosa, orientação, motivação, ensinamentos, profissionalismo e por todos os esforços envidados ao longo desses quatro anos. E pelo seu Grupo de Pesquisa com muita integração e apoio, em especial a Natália Vieira por todo o acompanhamento, orientação e apoio no início da pesquisa, ao Henrique, Marcus Vinicius e Vitor Emanuel por todo apoio no desenvolvimento da pesquisa, e ao Tiago e Rafael pela paciência e apoio nas análises dos dados.

Aos colegas de laboratório do NuBBE, em especial à Rafael, Tony e Maria pelos ensinamentos. Aos técnicos do IQ-UNESP pelo suporte, em especial à Dr^a Juliana Rodrigues e ao Dr. João Luiz Bronzel Júnior, pela prestatividade e proatividade frente aos laboratórios do NuBBE e na realização de análises.

Aos professores Dra. Carmen Lúcia Cardoso (FFCLRP-USP), Dra. Letícia V. C. Lotufo (ICB-USP) e Dra. Ilana L. B. C. Camargo (IFSC-USP) pela colaboração e realização dos ensaios biológicos.

Ao Instituto de Química da UNESP-Ar e ao NuBBE. E gostaria de agradecer a FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: Processo nº 2019/12632-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.”

Marie Curie

RESUMO

A exploração racional da biodiversidade pela humanidade levou a descoberta de Produtos Naturais (PNs) como fonte de agentes terapêuticos, assim, o Brasil com vários ecossistemas é um nicho promissor na descoberta dessas PNs. A planta nacional *Sorocea bonplandii* (Moraceae) se mostrou promissora para o estudo, dado os relatos anteriores sobre sua atividade biológica analgésica e antiulcerogênica. A metabolômica como estratégia metodológica foi utilizada para analisar o perfil químico com características polares do extrato etanólico das plântulas de *S. bonplandii* pelo uso de técnicas de cromatografia líquida (HPLC) para detecção de cromóforos e HPLC-MS para detecção de massa/carga e padrões de fragmentação. Permitindo a análise por desreplicação na plataforma do GNPS para a anotação de até 101 metabólitos secundários que orientou ações de fracionamento para purificação de compostos majoritários da planta. Nesse contexto e dado o grande potencial de microrganismos associados a plantas medicinais, foi isolado o endófito dessa espécie vegetal cuja identificação foi *Chaetomium atrobrunneum*. O fungo foi submetido ao cultivo fatorial, variando meio de cultivo, luminosidade e agitação, para a obtenção dos extratos e análise do perfil químico que mostrou o meio de malte e sem agitação com a maior diversidade de metabólitos secundários.

Palavras-Chave: produtos naturais; metabolômica, *Sorocea bonplandii*, *Chaetomium atrobrunneum*.

ABSTRACT

The rational exploration of biodiversity by humanity led to the discovery of Natural Products (NPs) as a source of therapeutic agents, thus, Brazil with several ecosystems is a promising niche in the discovery of these NPs. The national plant *Sorocea bonplandii* (Moraceae) showed promise for the study, given previous reports on its analgesic and antiulcerogenic biological activity. Metabolomics as a methodological strategy was used to analyze the chemical profile with polar characteristics of the ethanolic extract of *S. bonplandii* seedlings by using liquid chromatography (HPLC) techniques to detect chromophores and HPLC-MS to detect mass/charge and patterns of fragmentation. Allowing analysis by dereplication on the GNPS platform for the annotation of up to 101 secondary metabolites that guided fractionation actions for the purification of major plant compounds. In this context and given the great potential of microorganisms associated with medicinal plants, the endophyte of this plant species whose identification was *Chaetomium atrobrunneum* was isolated. The fungus was submitted to factorial cultivation, varying the culture medium, luminosity and agitation, to obtain the extracts and analysis of the chemical profile that showed the malt medium and without agitation with the greatest diversity of secondary metabolites.

Keywords: natural products, metabolomics, *Sorocea bonplandii*, *Chaetomium atrobrunneum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE_{ee}	Enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico
BChE_{hu}	Enzima butirilcolinesterase humana
DAD	<i>Diode Array Detector</i> ou Detector de Arranjo de Diodo
DIA	<i>Data-independent acquisition</i> ou aquisição independente de dados
DMSO	Dimetilsufóxido
ESI	<i>Electrospray ionization</i> ou Ionização por eletrospray
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry</i> ou Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICER	<i>Immobilized Capillary Enzyme Reactor</i>
IT	<i>Ion Trap</i> ou armadilha de íon
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry</i> ou Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas
MS	<i>Mass Spectrometry</i> ou Espectrômetro de Massas
NAP	<i>Networking Annotation Propagation</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biosíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ou Ressonância Magnética Nuclear
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i> ou Uma Via para Muitos Compostos
PCA	<i>Principial Component Analysis</i> ou Análise de Componentes Principais
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> ou Batata Dextrose Agar
PN	Produto Natural
PNs	Produtos Naturais
QTOF-MS^E	<i>Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (^E = collision energy) ou Quadrupolo Tempo de Voo Espectrômetro de Massas (^E = energia de colisão)

SB, Sb

Sorocea bonplandii

UPLC

Ultra Performance Liquid Chromatography ou Cromatografia

Líquida de Ultra Eficiência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oxidação da brazilina (1) em brazileína (2).	20
Figura 2 - Substâncias analgésicas derivadas da <i>Papaver somniferum</i>	22
Figura 3 - Plântula e folhas de <i>Sorocea bonplandii</i>	22
Figura 4 - Elucidação da estrutura do Sorocenol B (a) e Sorocenol D (b) obtido das raízes.	23
Figura 5 - Composto lovastatina.....	24
Figura 6 - Fungo <i>Chaetomium atrobrunneum</i>	25
Figura 7 - Compostos isolados de <i>Chaetomium atrobrunneum</i> : (a) Chaetoatrosin A e (b) Patulin.....	26
Figura 8 - Representação da obtenção dos espectros até a geração do <i>molecular networking</i>	30
Figura 9 - Passos do processo do DEREPLICATOR+ da Plataforma GNPS.....	31
Figura 10 – Processo de análise do NAP.	32
Figura 11 – Passo a passo do processo do NAP na rede molecular.	32
Figura 12 - Processo de análise do MolNetEnhancer.....	34
Figura 13 - Representação da obtenção dos dados no UNIFI: (a) obtenção dos espectros em MSE e (b) desenvolvimento do método.	36
Figura 14 - Equipamento utilizado na realização do clean-up com coluna de sílica C18..	38
Figura 15 - Equipamento utilizado no fracionamento do extrato de <i>Sorocea bonplandii</i> ..	42
Figura 16 - Procedimento de higienização das folhas de <i>S. bonplandii</i>	43
Figura 17 - Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 µM em linhagem de HCT 116 e MCF-7.....	49
Figura 18 - Espectro do extrato bruto de <i>Sorocea bonplandii</i>	51
Figura 19 - Espectro em modo Positivo do extrato de <i>Sorocea bonplandii</i>	51
Figura 20 - Espectro em modo Negativo do extrato de <i>Sorocea bonplandii</i>	52
Figura 21 - Molecular networking da <i>Sorocea bonplandii</i> , em cor cinza é o branco e em cor rosa é o extrato.....	53
Figura 22 - <i>Mirror Match</i> do molecular networking com identificação do Ácido Clorogênico no extrato bruto de <i>S. bonplandii</i>	54
Figura 23 - Espectros referentes as moléculas Quercetina-3-O-glc-1-3-ram-1-6-glucosídeo.	55

Figura 24 - Espectro de massas (modo positivo) da rutina e proposta de fragmentação. ..	57
Figura 25 - Espectro de massas (modo negativo) da rutina e proposta de fragmentação. ..	57
Figura 26 - Cromatograma das frações: (a) 3, (b) 7, (c) 10 e (d) 12.	59
Figura 27 - Cromatograma de íons totais em modo positivo para a fração 5 (a), fração 8 (b) e fração 12 do extrato de <i>S. bonplandii</i>	60
Figura 28 - Rede molecular (<i>molecular networking</i>) das frações de <i>Sorocea bonplandii</i> no modo positivo.	62
Figura 29 - Mirror match do GNPS para as moléculas (a) Karakolina e (b) Ftalato de dioctila.	63
Figura 30 - Cromatograma de íons totais com identificação de composto majoritário na fração 2 e fração 4.	64
Figura 31 - Estrutura molecular para compostos majoritários: (a) Fração 2, (b) Fração 4 e (c) Fração 11.	64
Figura 32 - MolNetEnhancer das frações de <i>Sorocea bonplandii</i> no modo positivo.	66
Figura 33 - Cromatograma de íons totais em modo negativo para a Fração 6 (a) e Fração 10 (b) do extrato de <i>S. bonplandii</i>	67
Figura 34 - <i>Molecular networking</i> das frações de <i>Sorocea bonplandii</i> no modo negativo.	68
Figura 35 - Mirror match do GNPS para as moléculas (a) Iridina e (b) Ácido cafeoilquínico.	69
Figura 36 - cromatograma de íons totais com identificação do composto majoritário: (a) Fração 1 e (b) Fração 7.	69
Figura 37 - Estrutura molecular para compostos majoritários: (a) Fração 1, (b) Fração 7 e (c) Fração 9.	70
Figura 38 - MolNetEnhancer das frações de <i>Sorocea bonplandii</i> no modo negativo.	71
Figura 39 - Cromatograma de íons totais para a Subfração 7.3 no modo positivo (a) e Subfração 5.2 no modo negativo (b) do extrato de <i>S. bonplandii</i>	73
Figura 40 - Procedimento de cultivo dos fungos endofíticos das folhas de <i>Sorocea bonplandii</i>	75
Figura 41 - Crescimento do fungo isolado das folhas de <i>S. bonplandii</i>	76
Figura 42 - Crescimento em meio líquido do fungo isolado das folhas de <i>S. bonplandii</i> . ..	77
Figura 43 - Filtrado do meio de cultivo líquido em Czapek e Malte.	77
Figura 44 - Extratos limpos do fungo.	79

Figura 45 - Cromatograma de íons totais para o modo positivo para o Ensaio 5.....	79
Figura 46 - <i>Molecular networking</i> no modo positivo obtido para todos os extratos.....	81
Figura 47 - MolNetEnhancer dos extratos brutos de <i>Chaetomium atrobrunneum</i> no modo positivo.	83
Figura 48 - Cromatograma de íons totais para o modo negativo para o Ensaio 5.....	84
Figura 49 - <i>Molecular networking</i> no modo negativo obtido para todos os extratos.....	85
Figura 50 - MolNetEnhancer dos extratos brutos de <i>Chaetomium atrobrunneum</i> no modo negativo.	86
Figura 51 - Gráfico 3D da Análise de Componentes Principais dos Extratos Fúngicos....	87
Figura 52 - Número de famílias da PCA dos Extratos Fúngicos.	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Planejamento fatorial do cultivo em meio líquido do fungo.	43
Quadro 2 - Cores respectivas de casa fração no <i>molecular networking</i>	61
Quadro 3 - Classificação por cor da classe de compostos do MolNetEnhancer.	65
Quadro 4 - Legenda do molecular networking dos extratos fúngicos.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa de material vegetal utilizado e do extrato obtido.	47
Tabela 2 - Triagem bacteriana para o extrato da planta <i>Sorocea bonplandii</i> (Sb).	48
Tabela 3 - Inibição do crescimento celular (%) da <i>S. bonplandii</i> em linhagem de HCT 116, com as concentrações de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (média \pm SEM) (n=2).....	48
Tabela 4 - Inibição do crescimento celular (%) da <i>S. bonplandii</i> em linhagem de MCF-7, com as concentrações de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (média \pm SEM) (n=2).....	49
Tabela 5 - Concentração inibitória média (IC ₅₀) do controle positivo dexorrubicina em linhagem de HCT 116 e MCF-7.....	49
Tabela 6 - Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE _{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE _{hu}).	50
Tabela 7 - Fragmentação dos compostos anotados no <i>molecular networking</i>	56
Tabela 8 – Dados de cada Fração e método otimizado para análise em HPLC-MS/MS. ..	58
Tabela 9 - Planejamento fatorial do cultivo do fungo com informação da massa do extrato bruto.....	78
Tabela 10 - Anotação de compostos do molecular networking do extrato bruto de <i>Sorocea bonplandii</i>	96
Tabela 11 - Compostos detectados no modo positivo via HPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de <i>S. bonplandii</i>	98
Tabela 12 - Compostos detectados no modo negativo via HPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de <i>S. bonplandii</i>	108
Tabela 13 - Compostos detectados no modo positivo via UPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de <i>S. bonplandii</i>	116
Tabela 14 - Compostos detectados no modo negativo via UPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de <i>S. bonplandii</i>	120
Tabela 15 - Compostos detectados no modo positivo via HPLC-MS/MS dos 8 extratos brutos de <i>C. atrobrunneum</i>	124
Tabela 16 - Compostos detectados no modo negativo via HPLC-MS/MS dos 8 extratos brutos de <i>C. atrobrunneum</i>	125

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	BREVE CONCEPÇÃO SOBRE PRODUTOS NATURAIS	19
1.2	A VISÃO SOBRE METABOLÔMICA	20
1.3	A PLANTA	21
1.3.1	Falsa Espinheira-Santa (<i>Sorocea bonplandii</i>)	22
1.4	O MUNDO FANTÁSTICO DOS MICRORGANISMOS	23
1.4.1	Fungos Endofíticos	24
1.4.2	<i>Chaetomium atrobrunneum</i>	25
1.5	DESREPLICAÇÃO	26
1.6	PLATAFORMAS DE ANÁLISE	28
1.6.1	Plataforma GNPS	29
<u>1.6.1.1</u>	<u>Rede Molecular (<i>Molecular Networking</i>)</u>	<u>29</u>
<u>1.6.1.2</u>	<u><i>DEREPLICATOR</i> +</u>	<u>30</u>
<u>1.6.1.3</u>	<u>Network Annotation Propagation (NAP)</u>	<u>31</u>
<u>1.6.1.4</u>	<u>MS2LDA</u>	<u>33</u>
<u>1.6.1.5</u>	<u>MolNetEnhancer</u>	<u>33</u>
1.6.2	UNIFI	34
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAL VEGETAL	38
3.1.1	Seleção e crescimento das espécies de plantas	38
3.1.2	Extração	38
3.1.3	Atividade biológica dos extratos	39
<u>3.1.3.1</u>	<u>Triagem antibacteriana</u>	<u>39</u>
<u>3.1.3.2</u>	<u>Análise de citotoxicidade</u>	<u>39</u>
<u>3.1.3.3</u>	<u>Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (<i>AChE_{ee}</i>) e butirilcolinesterase humana (<i>BChE_{hu}</i>)</u>	<u>40</u>
3.1.4	Isolamento dos Compostos Majoritários em HPLC-DAD	41
3.2	MICRORGANISMOS	42
3.2.1	Cultivo	42
3.2.2	Identificação do Microrganismo	44

3.3	ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	44
3.3.1	HPLC-UV/VIS	44
3.3.2	HPLC-ESI-IT-MS/MS e GNPS	45
3.3.3	UPLC-ESI-QTOF/MS ^E e UNIFI.....	45
3.3.4	Análise de Componentes Principais	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	PLANTA	47
4.1.1	Cultivo	47
4.1.2	Triagem Biológica do Extrato	47
4.1.2.1	<u>Análise de citotoxicidade</u>	<u>48</u>
4.1.2.2	<u>Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu})</u>	<u>50</u>
4.1.3	Análise do Extrato	50
4.1.3.1	<u>HPLC-UV/VIS</u>	<u>50</u>
4.1.3.2	<u>HPLC-ESI-IT-MS/MS e Molecular networking</u>	<u>51</u>
4.1.4	Fracionamento do Extrato	57
4.1.4.1	<u>HPLC-ESI-IT-MS, Molecular networking e Identificação de picos majoritários no modo positivo</u>	<u>60</u>
4.1.4.2	<u>HPL-ESI-IT-MS, Molecular networking e Identificação de picos majoritários no modo negativo</u>	<u>67</u>
4.1.4.3	<u>Análise das Frações – UPLC-ESI-QTOF/MS^E</u>	<u>72</u>
4.1.4.4	<u>UPLC-ESI-QTOF/MS^E, UNIFI e Identificação de compostos no modo positivo</u>	<u>72</u>
4.1.4.5	<u>UPLC-ESI-QTOF/MS^E, UNIFI e Identificação de compostos no modo negativo</u>	<u>72</u>
4.1.5	Fracionamento das Frações de Interesse	73
4.2	MICROORGANISMO.....	74
4.2.1	Crescimento em Meio Sólido	74
4.2.2	Crescimento em Meio Líquido.....	76
4.2.3	Análise dos Extratos Fúngicos – <i>Molecular networking</i>	78
4.2.3.1	<u>HPLC-ESI-IT-MS e Molecular networking no modo positivo.....</u>	<u>79</u>
4.2.3.2	<u>HPLC-ESI-IT-MS e Molecular networking no modo negativo.....</u>	<u>84</u>
4.2.4	Análise dos Extratos Fúngicos - PCA	87
5	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91

APÊNDICE A – Anotação Molecular do Extrato Bruto de <i>S. bonplandii</i>	96
APÊNDICE B – Anotação Molecular do GNPS das Frações do Extrato DE <i>S. bonplandii</i>	98
APÊNDICE C – Anotação Molecular do UNIFI das Frações do Extrato de <i>S. bonplandii</i>	116
APÊNDICE D – Anotação Molecular dos Extratos Brutos de <i>C. atrobrunneum</i>	
124	

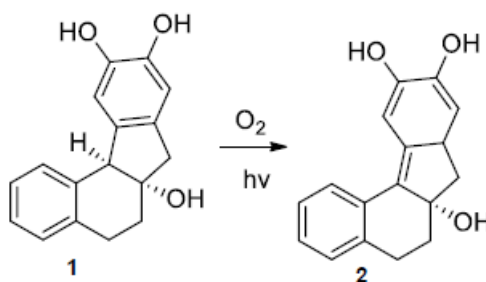
1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE CONCEPÇÃO SOBRE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais (PNs) podem ser definidos como um conjunto de moléculas produzidas por plantas, animais, bactérias, fungos, e organismos marinhos através de seu metabolismo primário e secundário. São fontes de agentes terapêuticos para atender às necessidades humanas, utilizando-os para o tratamento, alívio e cura de várias doenças pela ingestão de ervas e folhas, provavelmente uma das primeiras formas de utilização. Os metabólitos produzidos pelo metabolismo primário são essenciais para o desenvolvimento do indivíduo atuando no crescimento e reprodução, enquanto os metabólitos secundários são produzidos para finalidades de sobrevivência desses seres atuando em questão de proteção, interação com outros indivíduos e competição, de forma que essas moléculas garantem uma individualidade química para cada, assim, esses são os produtos naturais o qual são essas moléculas de interesse da indústria farmacêutica principalmente (PYE *et al.*, 2017; BERNARDINI *et al.*, 2018).

As plantas formaram a base do sistema de medicina tradicional com os primeiros relatos datados de 2600 a.C. na Mesopotâmia, documentando o uso de aproximadamente 1000 misturas de compostos derivados de plantas. Outras civilizações que merecem destaque são a Egípcia através dos relatos presentes no Papiro de Ebers, a Greco-romana com coleções de ervas medicinais e prescrições de “medicamento”, a Árabe e a Chinesa. No Brasil, inicia-se com a extração de um corante de cor vermelha da árvore do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*), um produto natural incolor brasileira Figura 1 (1), substância da classe dos catecóis, facilmente oxidada em brazileína Figura 1 (2) que apresenta coloração avermelhada cuja reação de oxidação está demonstrada na Figura 1. Esta molécula era utilizada como corante no tingimento de roupas e como tinta de escrever, sendo o principal produto de exportação brasileira durante os séculos XVI e XVII, e outros produtos naturais utilizados foram as drogas do sertão (cacau, baunilha, canela, cravo, urucum e etc.) (CRAG; NEWMAN, 2013; PINTO, 1995).

Figura 1 - Oxidação da brazilina (1) em brazileína (2).



Fonte: PAVANI (2018).

A fonte de conhecimento do uso de PNs é pelo resultado da experimentação humana ao longo dos séculos através de ensaios, em busca de alimentos disponíveis para a dieta e o tratamento de doenças, que no caso de plantas venenosas levaram a reações tóxicas. Atualmente, tecnologias têm sido desenvolvidas para a exploração de fontes exóticas com o objetivo de encontrar novos agentes quimioterapêuticos e a química de produtos naturais tem buscado por fontes naturais ainda pouco exploradas (a rizosfera e suas interações microbianas, a relação endofítica fungo/planta, entre outros) (DIAS *et al.*, 2012; CRAG; NEWMAN, 2013; YUAN *et al.*, 2016).

O avanço no descobrimento da composição dos produtos naturais provenientes de plantas evidenciou a descoberta de característica antifúngicas, como exemplo, o qual podem ser associadas a compostos alcaloídicos que tem função de defesa contra patógenos e herbívoros. Assim, os estudos já evidenciam a elucidação de mais de 12000 alcaloides como a morfina proveniente da papoula (*Papaver somniferum*) e o cafeína normalmente encontrada no café (*Coffea sp.*) e no chá verde (*Camellia sinensis*), o qual sua ampla capacidade de utilização se mostra promissora para novas descobertas principalmente de fármacos (REGINALDO, 2016).

1.2 A VISÃO SOBRE METABOLÔMICA

O modelo para descoberta de PNs implementado como padrão utiliza abordagens para descobrir moléculas, a partir de uma via única. Essa estratégia possibilita o conhecimento sobre a estrutura e a função de componentes individuais de sistemas biológicos complexos, consistindo em processo de isolamento e elucidação estrutural de compostos bioativos. Entretanto, essa metodologia apresenta um custo elevado e não

envolve a desreplcação de compostos já conhecidos (MAGUIRE, 2014; ZHAN *et al.*, 2013; YULIANA *et al.*, 2013).

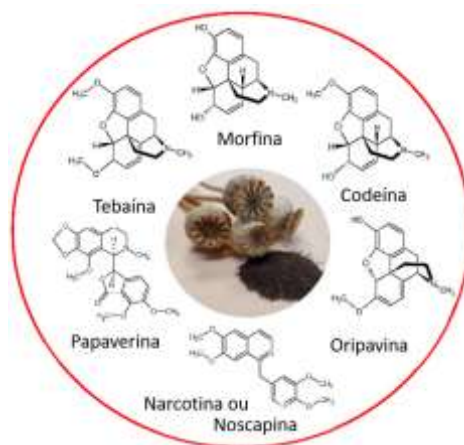
Uma alternativa é a utilização de uma abordagem holística em que bioensaios são combinados a análises metabolômicas cujo método é bastante promissor por trabalhar com o organismo inteiro sendo possível observar os efeitos de um conjunto de compostos presentes em extratos complexos e em misturas de extratos. Essa abordagem apresenta potencial para a descoberta de novas moléculas bioativas e também de novos modos de ação, ou seja, novos alvos (YULIANA *et al.*, 2013).

A metabolômica é o método de pesquisa para uma abordagem holística porque compreende a identificação do maior número possível de metabólitos presentes em determinado sistema biológico, a plataforma analítica utilizada em experimentos requer a aplicação de ferramentas quimiométricas adequadas para extrair informações dos conjuntos de dados gerados. As plataformas mais utilizadas em metabolômica devido às suas capacidades de detecção, são: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS); cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (FANG; GONZALEZ, 2014; MAREE *et al.*, 2014).

1.3 A PLANTA

As plantas têm como uma das primeiras fontes de agente terapêuticos utilizadas pelos seres humanos, de forma que constituem uma fonte medicinal cujo levantamento de compostos derivados de plantas no desenvolvimento de fármacos para a medicina tradicional indicou 122 compostos identificados. De maneira que 80% foram usados para os mesmos propósitos médicos ou finalidades similares, e foram derivados de 94 espécies de plantas, como por exemplo a molécula galegina presente na planta *Galega officinalis* que serviu de modelo para a síntese da metformina. Uma espécie relevante é a *Papaver somniferum* mais conhecida como uma fonte de analgésicos como a morfina, codeína, entre outros como exemplificado na Figura 2, e na descoberta e desenvolvimento de fármacos antimaláricos, principalmente quinina e artemisinina. As plantas como organismos complexos e com uma complexidade de metabólitos secundários, evidenciam sua importância como pilar do desenvolvimento humano cujo aliado são técnicas de síntese dessas moléculas promissoras para a produção em larga escala de medicamentos, essências, entre outras finalidades (CRAG; NEWMAN, 2013).

Figura 2 - Substâncias analgésicas derivadas da *Papaver somniferum*.



Fonte: Adaptado de CASADO-HIDALGO *et al.* (2021).

1.3.1 FALSA ESPINHEIRA-SANTA (*SOROCEA BONPLANDII*)

A espécie *Sorocea bonplandii* da família Moraceae, na Figura 3 suas plântulas e folhas, é uma planta arbórea que tem como sinônimos *Pseudosorocea bonplandii*, *Sorocea ilicifolia* entre outros, e nome popular de falsa-espinheira-santa e cincho, que ocorre nas regiões brasileiras: sul, sudeste e centro-oeste, sendo encontrada principalmente na região da Mata Atlântica e no Planalto Meridional, podendo atingir até 12 metros (LORENZI, 2002).

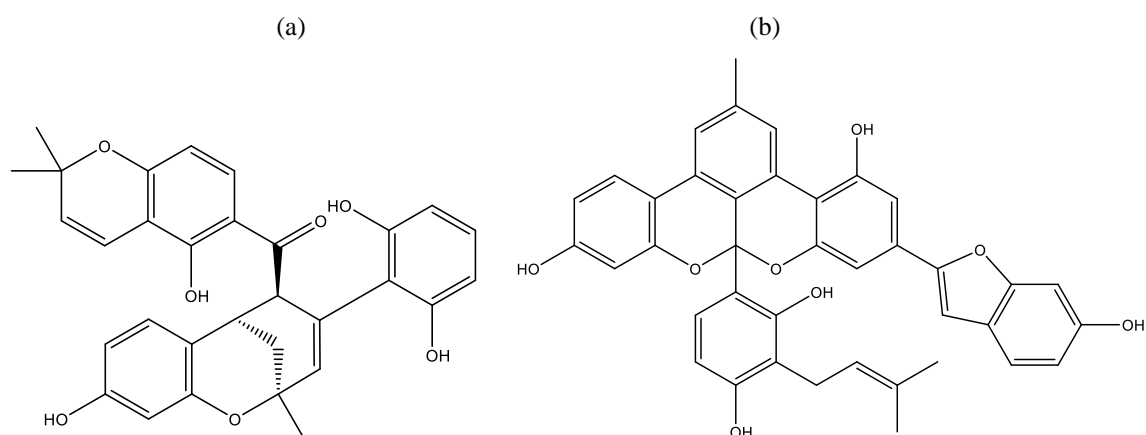
Figura 3 - Plântula e folhas de *Sorocea bonplandii*.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

A maioria dos estudos identifica e investiga compostos dos extratos obtidos das raízes da *S. bonplandii*, como a investigação da ação farmacológica do extrato metanólico das raízes e obtiveram como maior constituinte a Soroceína A, uma molécula que isolada teve ações neurológicas em ratos e porquinhos-da-índia. Nas raízes da planta também foram identificados novos fenóis isoprenilados como Sorocenol A, B, C, D, E e F o qual foram elucidados, como na Figura 4 o Sorocenol A (a) e D (b) (CALIXTO, 1993; HANO *et al.*, 1995; HANO *et al.*, 1995).

Figura 4 - Elucidação da estrutura do Sorocenol B (a) e Sorocenol D (b) obtido das raízes.



Fonte: Adaptado de HANO (1995).

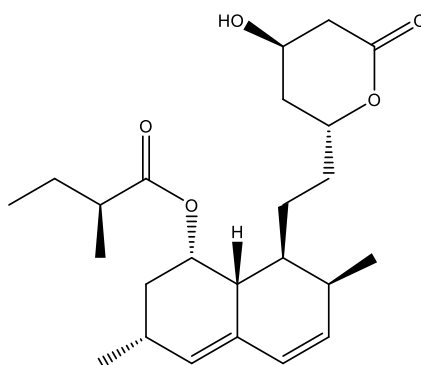
Outro estudo investigou o extrato metanólico das folhas que obtiveram atividade biológica antiulcerogênica e analgésica em ratos. A *Sorocea bonplandii* apresenta potencial alelopático o qual constata diferenças significativas entre os efeitos causados na germinação de aquênios de alface tratados com extratos a 4%, e a detecção de saponinas, flavonoides e taninos apresentou resultados negativo, ou seja, não foram detectados no extrato aquoso. Ainda não existem dados de estudos químicos sobre as plântulas e sobre fungos endofíticos dessa espécie. (GONZALEZ *et al.*, 2001; MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006)

1.4 O MUNDO FANTÁSTICO DOS MICRORGANISMOS

Na história, os microrganismos demonstraram ser uma fonte de metabólitos bioativos os quais fornecem alguns dos fármacos mais importantes para indústria farmacêutica. Uma descoberta muito famosa foi a Penicilina proveniente do fungo *Penicillium notatum*, realizada por Fleming em 1929, de maneira a revolucionar o tratamento de infecções

bacterianas, levando à procura intensiva por produtos bioativos derivados desses seres, com a finalidade de obtenção de um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas. Como exemplo, agentes redutores de colesterol pertencentes à classe das estatinas (como a lovastatina, Figura 5). Com isso, é evidente o potencial do fungo como agente terapêutico o qual tem sua aplicação para diversas finalidades como antibiótica, antifúngica e fármacos (BERTRAND *et al.*, 2014).

Figura 5 - Composto lovastatina.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

O rico potencial dos microrganismos na produção de compostos quimioterapêuticos e, de importantes substâncias biologicamente ativas, apenas um subconjunto de vias biossintéticas são expressas em condições normais de cultivo em laboratório. Neste sentido, a utilização de novas metodologias está sendo aplicadas, como a OSMAC (*One Strain Many Compounds*), engenharia metabólica e co-cultivo. Os micróbios são uma fonte interessante de produtos naturais e os principais motivos são a biodiversidade extensiva e a quimiodiversidade ampla. Outro aspecto importante e vantajoso é que os microrganismos podem ser cultivados em laboratório permitindo a otimização e ampliação da produção de produtos naturais (BERTRAND *et al.*, 2014).

1.4.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem e residem na parte interna das plantas, e podem causar efeito benéfico, nenhum efeito ou causar efeito negativo por serem patogênicos para o hospedeiro. Os endófitos são transmitidos às suas plantas hospedeiras através de esporos ou via sementes, quando dentro do tecido do hospedeiro, o endófito assume um estado em que pode durar a vida toda da planta ou um período de tempo, até que

as condições sejam favoráveis ao desenvolvimento do fungo (ALY *et al.*, 2011; HARTLEY; GANGE, 2008; SIEBER, 2007).

O desenvolvimento de tecnologias revelou o potencial de endófitos como uma fonte de compostos biologicamente ativos, com aplicações promissoras. Trata-se de uma oportunidade para a descoberta de novos produtos naturais, os quais representam uma nova fonte de estruturas químicas únicas. Os fungos endofíticos pela sua relação interna com a planta é capaz de biossintetizar compostos produzidos pela planta hospedeira, assim evidenciando uma grande aplicabilidade na produção de moléculas bioativas cujo desenvolvimento do fungo é mais simples e rápido comparando com a planta, de modo que é uma alternativa mais rápida para o isolamento de produtos medicinais (ALY *et al.*, 2011; GARYALI *et al.*, 2013).

1.4.2 *CHAETOMIUM ATROBRUNNEUM*

A espécie fúngica *Chaetomium atrobrunneum*, evidenciado na Figura 6, pertence ao filo Ascomiceto que incluem fungos com hifas septadas e certas leveduras. A esporulação é normalmente assexual e seus esporos são conídios, que são como um pó ou poeira que dispersam facilmente pelo ar e liberados pelo conidióforo. Os esporos são produzidos em forma de saco chamado de asco, assim esse filo também é chamado por “fungos de saco” (OKEKE *et al.*, 1993; TORTORA *et al.*, 2010).

Figura 6 - Fungo *Chaetomium atrobrunneum*.

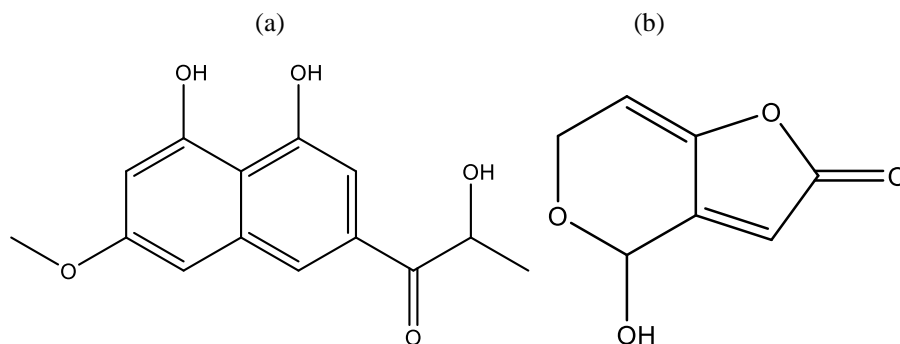


Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Os fungos *Chaetomium* são encontrados no solo e restos de plantas e também em áreas quentes e secas como papel de palha, tecidos e penas de pássaros, esses fungos também são conhecidos por estar associado a algumas doenças. Assim, o fungo *Chaetomium Atrobrunneum* tem relatos de causar infecções em pacientes imunocomprometidos como por exemplo abscesso cerebral, conjuntivite e celulite ocular, ceratite, retinite e pneumonia. O tratamento não é definido, como por exemplo a resposta ao antifúngico Anphotericina B que teve resposta baixa (WANG *et al.*, 2016).

O *Chaetomium Atrobrunneum* possui atividade biológica antifúngica com certas espécies de fungos, como *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton mentagrophytes*, pela inibição da segunda síntese da quitina (*chitin synthase II*) o qual a inibição é causada pelo composto Chaetoatrosin A, descrito na Figura 7 (a), que foi isolado em meio líquido por técnicas espectrométricas de UV, Espectro de Massa, Infravermelho e RMN. Outra atividade antifúngica associada é a fungos que causam doença no arroz, como *Pyricularia oryzae*, *Drechslera oryzae* e *Gerlachia oryzae*, pela presença da micotoxina Patulin, descrita na Figura 7 (b) (HWANG *et al.*, 2000; OKEKE *et al.*, 1993).

Figura 7 - Compostos isolados de *Chaetomium atrobrunneum*: (a) Chaetoatrosin A e (b) Patulin.



Fonte: HWANG *et al.* (2000); OKEKE *et al.* (1993).

1.5 DESREPLICAÇÃO

A desrepliação refere-se à detecção e identificação de metabólitos conhecidos nos extratos brutos. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massas (MS) são as duas técnicas principais para a detecção da composição metabólica (metaboloma) de um determinado sistema (TANG *et al.*, 2009).

O método baseado na MS é sensível e fornece informações sobre a massa molecular e padrões de fragmentos para uma ampla gama de compostos. No entanto, requer a confirmação a partir de padrões, os quais nem sempre estão disponíveis, principalmente para substâncias desconhecidas. A espectroscopia de NMR bidimensional permite observar as conectividades atômicas pertencentes a uma molécula, possibilitando sua subsequente elucidação estrutural. Porém, esta técnica apresenta sensibilidade baixa para pequenas concentrações, e a sobreposição de sinais, principalmente em misturas complexas, dificulta a elucidação estrutural dos compostos pouco abundantes (TANG *et al.*, 2009).

Com a finalidade de reunir ambas as técnicas, se desenvolveu uma combinação: separação por HPLC, detecção por DAD e MS extração em fase sólida para o enriquecimento do metabólito de interesse, e NMR para revelar a conectividade entre os núcleos (HPLC-DAD-MS-EFS-NMR). Essa técnica pode fornecer informação compreensiva sobre os metabólitos em extratos brutos, auxiliando na decisão de continuidade de um processo de isolamento. O fracionamento orientado por metabolômica possibilita a identificação de componentes ativos na primeira etapa de fracionamento, ajudando a priorizar frações para purificação adicional dos compostos alvo (JOHANSES *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2009).

Diversos avanços também foram obtidos para a análise rápida e eficiente de conjunto de dados de bibliotecas de PNs. Essas abordagens inovam ao analisar dados de massas (por exemplo, usando MZmatch, XCMS e *Molecular Networking* que podem ser usadas com análise diferencial e bases de dados online (tais como ChemSketch, Dictionary of Natural Products e GNPS), ou bases de dados in-house. A análise diferencial envolve uma série de processos, incluindo o alinhamento, seguido pela filtração de sinais autênticos de espectros de massas da amostra, e finalmente, pela detecção de picos, de modo que os metabólitos conhecidos são associados aos compostos correspondentes através de uma base de dados (HARVEY *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

A GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking), conhecida como redes moleculares, é uma plataforma de armazenamento, análise e disseminação de conhecimento de espectros de MS/MS que permite compartilhar e realizar anotações contínuas dos dados armazenados. Usada para gerar redes de interações moleculares, uma abordagem de correlação e visualização espectral que detecta o conjunto de dados de moléculas relacionadas, mesmo quando os espectros não são atribuídos a compostos conhecidos (WANG *et al.*, 2016).

O processo de desreplicação de alto rendimento de dados de MS/MS é implementado pela GNPS pela comparação dos dados adquiridos com todos os espectros de referência das bibliotecas espectrais. Num segundo estágio de desreplicação, a GNPS executa uma identificação preliminar, utilizando desreplicação de variáveis, que consiste em uma busca na biblioteca espectral tolerante a modificação, mediada por um algoritmo de alinhamento espectral. A desreplicação de variáveis permite a detecção de análogos de compostos conhecidos (diferindo por uma modificação estrutural ou substituição de um grupo químico) ou compostos pertencentes a uma mesma classe (WANG *et al.*, 2016).

1.6 PLATAFORMAS DE ANÁLISE

A cromatografia é uma técnica usada para separação e identificação baseada na interação dos componentes de uma mistura (soluto) com uma fase estacionária (sólido ou líquido) e uma fase móvel (gás ou líquido). A fase móvel transporta o soluto através da fase estacionária (retida em uma coluna) e, pelas diferenças de afinidade do soluto com as duas fases, assim, cada componente é separado da mistura. O cromatógrafo é o instrumento eletrônico utilizado em análise para a detecção da separação (DEGANI *et al.*, 1998).

O surgimento do termo cromatografia no início do século XX foi através do botânico russo Mikhail S. Tswett ao realizar trabalhos experimentais na separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas. Verificou-se a formação de bandas de cores diferentes nas colunas devido as interações dos pigmentos corados e que se mostravam com velocidades diferentes e separadamente na coluna. Sua aplicabilidade se baseia na identificação de compostos por meio de padrões existentes, podendo ser separados e identificados compostos voláteis como cetonas, aldeídos, alcoóis, etc, além de vitaminas, aminoácidos e ácido nucléicos (DEGANI *et al.*, 1998; COLLINS *et al.*, 1997).

Uma das técnicas mais utilizadas é a cromatografia líquida que pelo avanço da técnica de análise, atualmente, é vastamente utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que acoplada com um espectrômetro de massas (MS) geram espectros parecidos com cromatogramas e há uma ionização final dessas massas para determinar sua massa/ carga, e com a possibilidade de determinação desses compostos por plataformas como GNPS ou UNIFI Scientific Information System que analisam esses dados dos espectros e os espectros de ionização de cada molécula para determinar juntamente com um banco de dados (WANG *et al.*, 2016).

1.6.1 PLATAFORMA GNPS

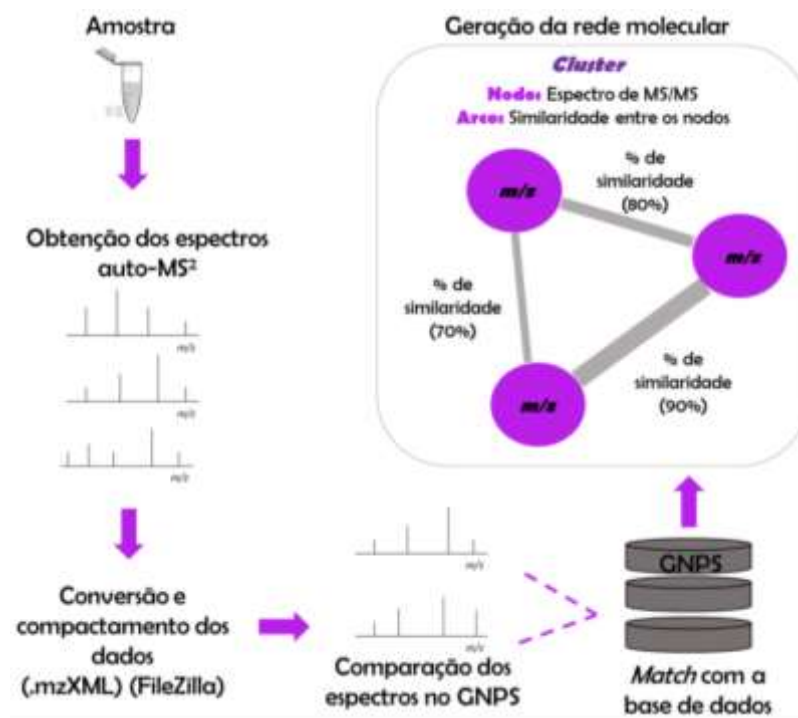
1.6.1.1 Rede Molecular (*Molecular Networking*)

Com base em ferramentas de análise de espectrometria de massas e os dados obtidos visa a utilização de novas abordagens como a rede molecular com a finalidade de otimizar a anotação de metabólitos presentes nos extratos obtidos do organismo de interesse. A rede molecular ou molecular networking, termo em inglês, é uma abordagem que reúne em agrupamentos ou clusters os compostos que apresentam perfil de fragmentação parecidos de acordo com os dados obtidos da espectrometria de massas sequencial que são comparados com o banco de dados do GNPS que fornece uma anotação dos compostos presentes. Assim, associando metabolitos da mesma classe de moléculas, como por exemplo de clusters são agrupamentos de flavonoides glicosilados, como rutina e nicotiflorina, o qual sua fragmentação apresenta perda de glucose, ramnose e hexose (WANG *et al.*, 2016).

A rede molecular é representada pelos agrupamentos que são formados por nodos e arcos, de modo que os nodos representam os espectros obtidos no cromatógrafo acoplado ao espectrômetros de massa e os arcos são conectores entre os nodos que representam a similaridade espectral entre os nodos, como observado na Figura 8 que exemplifica todo o processo de formação da rede molecular. Os espectros do extrato são classificados de acordo com a suas similaridades que são obtidas a partir do cálculo do cosseno que varia entre 0 e 1 (0 – espectros totalmente diferentes e 1 – espectros idênticos), e assim, agrupados nos clusters. Valores de cosseno que representam espectros similares variam de 0,70 e 0,95, valores acima de 0,95 são considerados espectros idênticos, ou seja, dado pela alta similaridade é considerado a mesma molécula (WANG *et al.*, 2016).

A manipulação da rede molecular pode ser evidenciada pelo cosseno o qual é possível determinar que metabolitos mais similares apresentem maiores espessuras enquanto compostos menos similares com menores espessuras. Também é possível a manipulação do nodo para variar de tamanho de acordo com o precursor de intensidade (sum), de maneira que aqueles que tem maior precursor de intensidade vai ter um nodo maior que aquele com menos intensidade (WANG *et al.*, 2016).

Figura 8 - Representação da obtenção dos espectros até a geração do *molecular networking*.

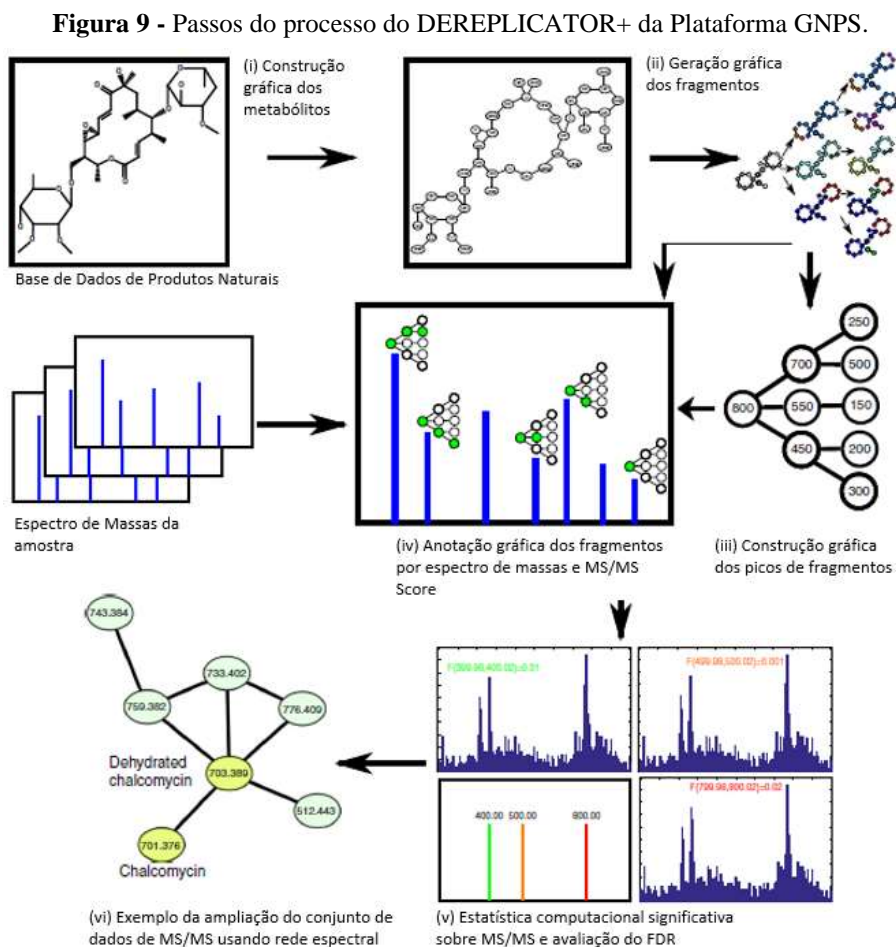


Fonte: VIEIRA (2020).

Dessa forma, com a plataforma do GNPS é possível a geração da rede molecular, como descrito na Figura 8, e obter várias informações químicas de várias amostras concomitantemente. Por ser uma plataforma por estar em ampla expansão de uso principalmente pelo banco de dados, por ser gratuita e fornecer diversas informações, entretanto sua base se mostra mais eficiente na análise de extratos de planta enquanto para extratos de fungos se mostra em déficit. Assim, seu aprimoramento baseado no seu potencial de apresentar resultados ainda mais abrangentes e precisos para os pesquisadores de produtos naturais (VIEIRA, 2020).

1.6.1.2 DEREPLICATOR+

A desrepliação é uma forma de identificação de compostos dentro de uma amostra a partir da informação de compostos com estrutura conhecida nas bases de dados como exemplo PubChem, ChemSpider, entre outros. A plataforma do GNPS tem como opção o DEREPLICATOR+ como forma de análise com algoritmo para desrepliação a partir dos dados de espectrometria de massas, o qual procura na base de dados de espectros do GNPS para corresponder com o espectro dos metabólitos presentes na amostra. O processo de análise segue os passos da Figura 9 (MOHIMANI *et al.*, 2018).

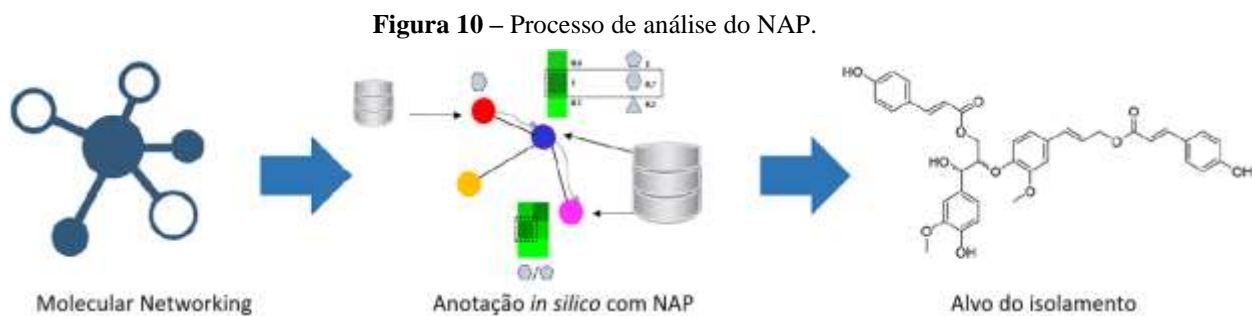


Fonte: Adaptado de MOHIMANI *et al.* (2018).

Assim, o DEREPLICATOR+ possibilita um desenvolvimento da análise dos dados de espectro de massas e de redes moleculares por permitir pesquisas de espectro de massas com bibliotecas de espectros para a identificação de produtos naturais e identificação de variantes (MOHIMANI *et al.*, 2018).

1.6.1.3 Network Annotation Propagation (NAP)

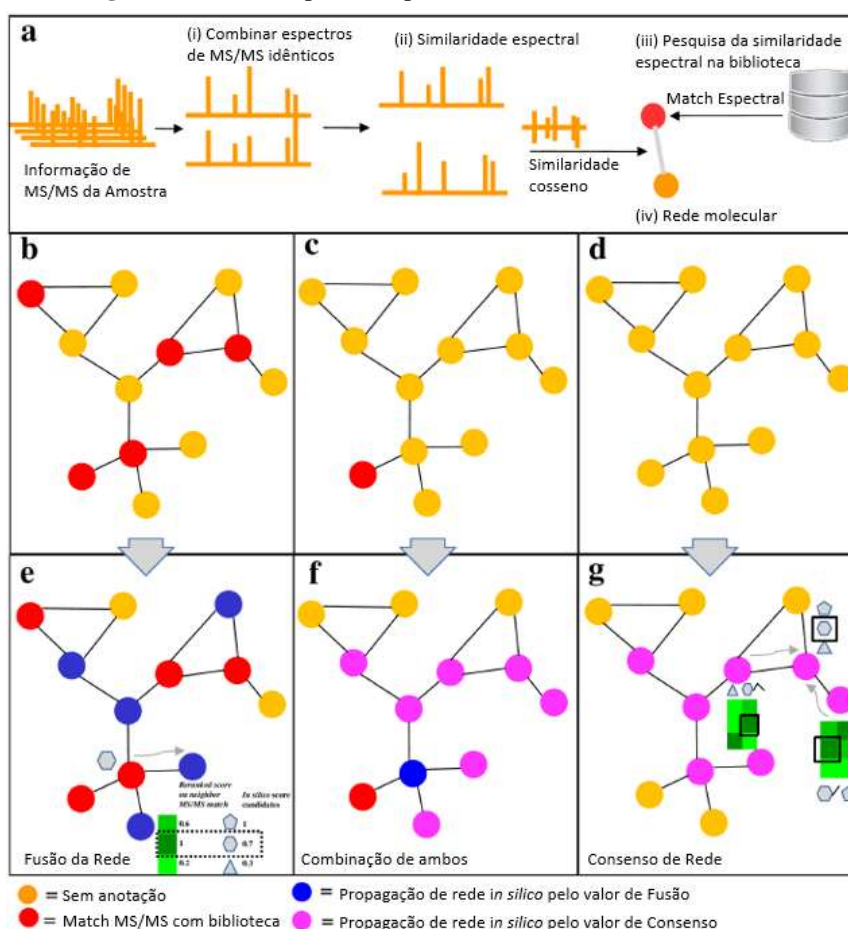
O NAP é uma plataforma de análise do MassIVE o qual é conectada com o GNPS e é baseada na integração dos dados da rede molecular obtida em LC-MS/MS e a fragmentação MS/MS *in silico* como método para a desrepliação de PNs com a finalidade de anotação de compostos para um alvo de isolamento molecular, como descrito na Figura 10 (KANG *et al.*, 2018).



Fonte: Adaptado de KANG *et al.* (2018).

Dessa forma, o processo do NAP como finalidade para um melhor entendimento da complexidade de amostras e de PNs se relaciona com uma maior anotação dos espectros obtidos, o qual o passo a passo da anotação de moléculas com base nos espectros obtidos e no molecular networking realizado está descrito na Figura 11 (SILVA *et al.*, 2018).

Figura 11 – Passo a passo do processo do NAP na rede molecular.



Fonte: Adaptado de SILVA *et al.* (2018).

Com base na Figura 11, é possível evidenciar que o NAP realiza uma classificação de compostos correlacionados na biblioteca espectral do GNPS e na fragmentação preditiva *in silico* para uma maior assertividade da estrutura da molécula, que tem como denominação Fusão de Rede. Para o Consenso de Rede e a Combinação entre ambos, é para a situação de poucos espectros correspondentes na biblioteca utiliza-se da similaridade de estruturas semelhantes dos candidatos *in silico*, de maneira a expandir a anotação de compostos mesmo sem uma equivalência espectral para os dados de MS/MS. Assim, é gerado um ranking das estruturas de maior probabilidade (SILVA *et al.*, 2018).

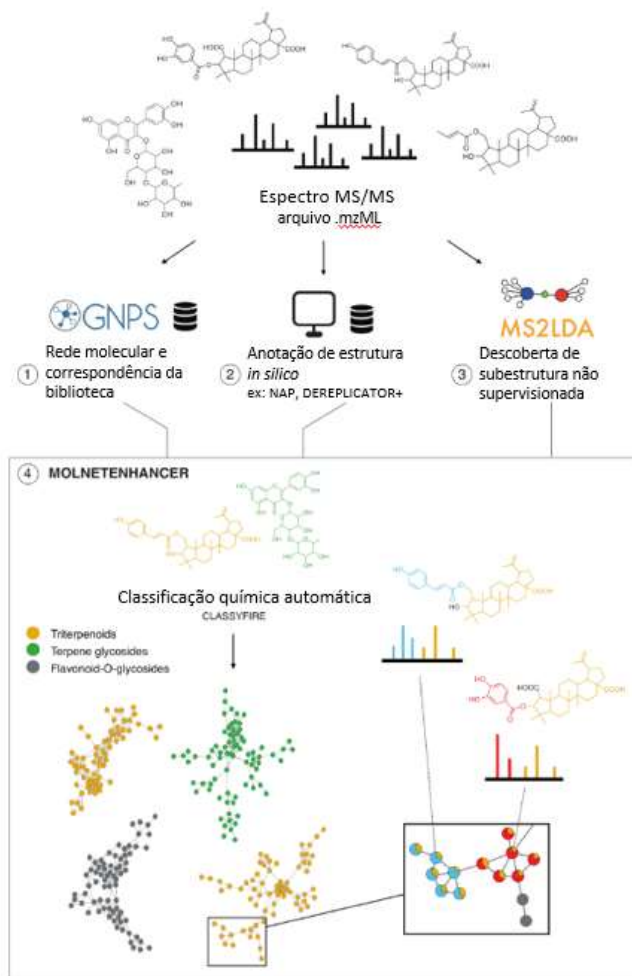
1.6.1.4 MS2LDA

O MS2LDA é um método de análise da plataforma do GNPS baseado nos dados de fragmentação dos compostos presentes na amostra, de forma a que decompõe o espectro de fragmentação em fragmentos conservados e de massa neutra cujo potencial existe na indicação de famílias estruturais. Assim, a análise auxilia na caracterização de moléculas desconhecidas presentes na amostra com a finalidade de aumentar as informações e refinar os dados obtidos (WANDY *et al.*, 2018).

1.6.1.5 MolNetEnhancer

O MolNetEnhancer é um processo de análise na plataforma do GNPS que combina análises realizadas no GNPS como *molecular networking*, MS2LDA e ferramentas de anotação *in silico* como DEREPLICATOR+ e NAP, e a partir desses dados classifica automaticamente os compostos de maior probabilidade relacionando com seus espectros. Essa integração de análises proporciona um aumento dos resultados e detalhamento das informações obtidas com finalidade de uma análise mais compreensiva e completa dos dados. O processo do MolNetEnhancer está descrito na Figura 12 (ERNST *et al.*, 2019).

Figura 12 - Processo de análise do MolNetEnhancer.



Fonte: Adaptado de ERNEST *et al.*, 2019.

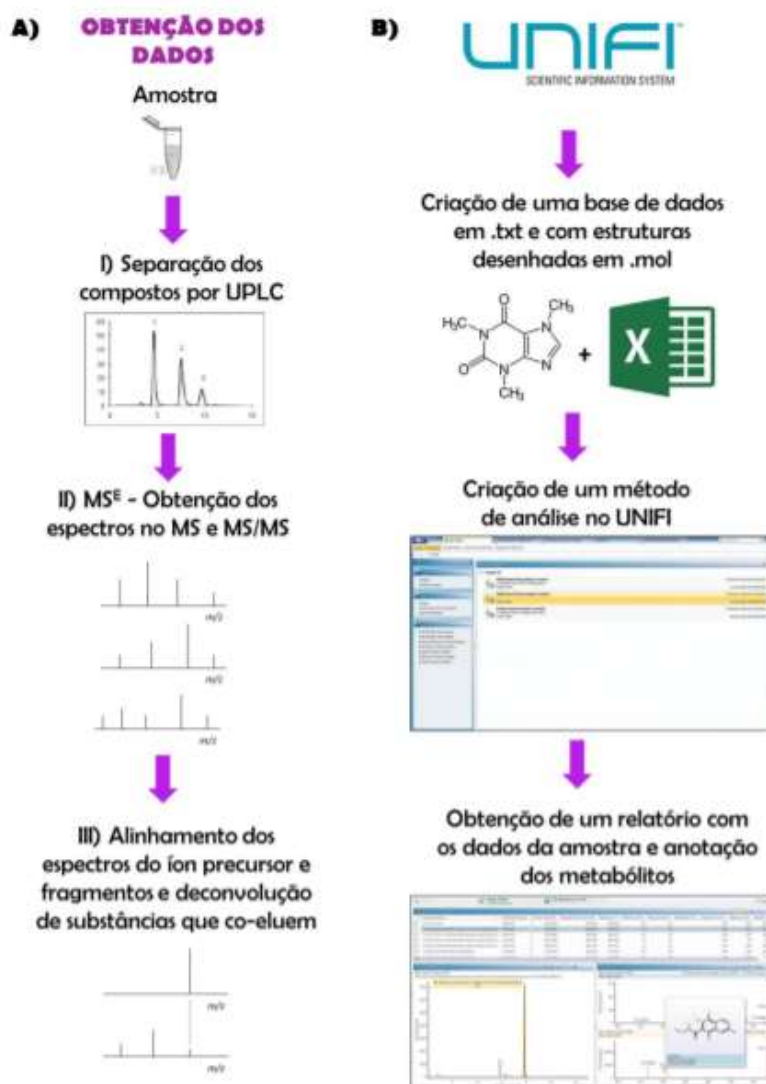
1.6.2 UNIFI

A plataforma do UNIFI Scientific Information System, ou só UNIFI, é um sistema de informação científica disponível pela Waters Corporation que apresenta bons resultados, o qual é possível integrar a separação de substâncias em um extrato através do equipamento de análise UPLC com aquisição de dados em QTOF-MS^E, o E significa a energia de colisão, e com bibliotecas de substâncias que podem ser construídas e inseridas para comparação. Dessa forma, é gerado um relatório com as informações e a anotação dos possíveis metabólitos presentes no extrato. O método de aquisição de dados (MS^E) é uma análise DIA (*data-independent acquisition*) o qual atende a uma busca de informações de amostras complexas, é um método de alta performance na detecção em MS (*full-scan*) com a finalidade de fornecer informações do padrão de fragmentação dos compostos com alta precisão (WHITE PAPER WATERS B, 2020).

A obtenção dos dados pode ser dividida em três partes, como evidenciado na Figura 13 (a), o qual se inicia no UPLC pela separação das substâncias do extrato, ou seja, amostra complexa por um método eficiente que influencia na resolução e na sensibilidade do equipamento. Depois ocorre a geração rápida dos dados em MS e MS/MS mantendo a resolução e sensibilidade. E posteriormente acontece o alinhamento dos espectros pelo algoritmo de acordo com o íon precursor e os fragmentos através do tempo de retenção. Com a análise no UPLC-ESI-QTOF/MS^E feita, os dados são exportados para a plataforma do UNIFI que é necessário a criação de um método na plataforma para otimizar os parâmetros e melhorar a sensibilidade com a finalidade de comparar os dados obtidos com a base de dados (WHITE PAPER WATERS B, 2020).

O UNIFI compara as análises em MS^E com a base de dados, essa base de dados pode ser própria do sistema UNIFI o qual possui bibliotecas com substâncias inseridas ou pode ser inserida com base na biblioteca criada pelo próprio pesquisador. A biblioteca criada pelo usuário precisa ser na extensão .txt o qual fornece uma tabela com os nomes das substâncias e o nome do arquivo em .mol, e o arquivo na extensão .mol que são as substâncias desenhadas, como evidenciado na Figura 13 (b). Com isso, aliado ao método é possível a obtenção de informações da amostra em relação massa molecular do íon precursor, o erro em ppm comparando com os metabolitos da biblioteca e com a sugestão de fragmentação gerada das estruturas inseridas na base de dados com a finalidade de uma anotação de metabólitos da amostra (WHITE PAPER WATERS B, 2020).

Figura 13 - Representação da obtenção dos dados no UNIFI: (a) obtenção dos espectros em MSE e (b) desenvolvimento do método.



Fonte: VIEIRA, 2020.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho são:

01 – Determinar o perfil químico do extrato etanólico das plântulas de *Sorocea bonplandii*;

02 – Detectar e anotar compostos do extrato de *S. bonplandii* através de abordagens de desreplicação: utilizando a técnica HPLC-MS em conjunto com GNPS para a criação do *molecular networking* e utilizando a técnica UPLC-QTOF-MS^E em conjunto com a plataforma UNIFI;

03 – Isolar compostos majoritários da espécie vegetal através do fracionamento do extrato bruto de *S. bonplandii*;

04 – Avaliar o potencial biológicos do extrato das plântulas de *S. bonplandii*;

05 – Cultivar em meio sólido e isolar o fungo endofíticos da *Sorocea bonplandii* para identificação do fungo *Chaetomium atrobrunneum*;

06 – Cultivar em meio líquido o fungo endofítico pelo planejamento fatorial para obtenção dos extratos brutos;

07 – Detectar e anotar os constituintes majoritários dessa espécie fúngica através de abordagens de desreplicação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 SELEÇÃO E CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES DE PLANTAS

Plântulas de *Sorocea bonplandii* foram adquiridas em abril de 2019, Sítio de Frutas Raras (Projeto Colecionando frutas) em Campina do Monte Alegre – SP. As plântulas foram replantadas e cultivadas na casa de vegetação do NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), em Araraquara – SP (coordenadas geográficas 21.8068° S, 48.1926° O).

3.1.2 EXTRAÇÃO

Após crescimento adequado das plântulas, as folhas de *Sorocea bonplandii* foram coletadas, limpas e secas em estufa a 40 °C, trituradas em moinho analítico e submetidas a extração com uma solução 7:3 etanol/ água, utilizando 10 mL de solução para cada 1 grama de folhas secas trituradas e a extração foi realizada em ultrassom, por 3 vezes durante 20 minutos. Em seguida a solução foi filtrada e o extrato foi concentrado em rotaevaporador. Após esse processo parte do extrato passou por um processo de *clean-up* utilizando um cartucho C18 e outra parte passou utilizando uma coluna de sílica C-18 a vácuo, demonstrado na Figura 14.

Figura 14 - Equipamento utilizado na realização do clean-up com coluna de sílica C18.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

3.1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS

3.1.3.1 Triagem antibacteriana

A triagem e as porcentagens de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos foi realizada no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) na Universidade Federal de São Carlos, sob orientação da Prof. Dra Ilana L. B. C. Camargo.

Cada composto foi diluído em DMSO para a preparação de uma solução estoque 100x concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD Lot. 3322206). A partir disso, cada composto foi testado a $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1% DMSO, ou na maior concentração em que foi possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação, de acordo com o preconizado pelo CLSI (2017). A adição do inóculo foi realizada de acordo com CLSI (2015) para o método de microdiluição em caldo. Para os controles negativo e positivo, foram adicionados caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO (ANVISA, 2019). No controle positivo foi adicionado bactéria sem o composto para se observar o crescimento da mesma em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO. No controle negativo, há apenas o meio de cultura caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado 1% DMSO, sem bactéria, para mostrar que não há contaminação do mesmo.

A incubação foi realizada a 37°C e a leitura visual dos resultados foi feita após 24h. Quando não houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada positiva e indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada. Neste caso, a concentração inibitória mínima pode ser $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou menos ($\leq 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Quando houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada negativa e indica que não há atividade antibacteriana na concentração testada. A triagem negativa não exclui a possibilidade deste composto apresentar atividade antibacteriana em concentrações maiores, por isso, o resultado foi expresso como “ $> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ”. Os testes foram realizados em duplicata.

3.1.3.2 Análise de citotoxicidade

As análises citotóxicas foram realizadas no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob orientação da Professora Dra. Leticia Lotufo. Os extratos foram diluídos em DMSO na concentração de 10mg.mL^{-1} e testados em linhagens de HCT 116 (carcinoma de cólon) e MCF-7 (carcinoma de mama).

Foram plaqueadas 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células/ml em 200 μL de meio). Após 24 horas, as substâncias foram adicionadas em concentrações de 5 μM e 50 μM , cada concentração em duplicata, e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 μL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm. Os valores de concentração inibitória média (IC_{50}) juntamente com intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 5 com concentrações das substâncias de 0,00032 a 50 μM (MOSMANN, 1983).

3.1.3.3 Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu})

As amostras foram submetidas ao ensaio de inibição para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}). Para este ensaio foram utilizadas as enzimas AChE_{ee} (peixe elétrico) e BChE_{hu} (soro humano) imobilizadas covalentemente em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375mm x 100 μm d.i.) sendo nominadas ICER (*Immobilized Capillary Enzyme Reactor*) ICER- AChE_{ee} e ICER- BChE_{hu} .

Os ICER- AChE_{ee} e ICER- BChE_{hu} foram utilizados como biorreatores enzimáticos acoplados individualmente entre um instrumento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e um espectrômetro de massas (MS) formando um sistema *on-flow* para a realização de ensaios de *screening* de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática foi monitorada pela quantificação direta do produto de hidrólise enzimática *m/z* 104, utilizando a galantamina como inibidor padrão.

A triagem de inibição pontual foi conduzida da seguinte forma:

- Fase móvel: solução de acetato de amônio 15 mM, pH 8,0
- Vazão de 0,05 mL.min^{-1}
- Volume de injeção: 10 μL da solução contendo 70 μM de acetilcolina (ACh) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do composto candidato a inibidor
- Inibidor padrão utilizado: Galantamina (100 μM)

A partir de cada solução estoque de cada um dos compostos ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram aliqüotados $10 \text{ }\mu\text{L}$ ($200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentração final) e adicionados $20 \text{ }\mu\text{L}$ da solução estoque de ACh $350 \text{ }\mu\text{M}$ ($70 \text{ }\mu\text{M}$ concentração final) e $70 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de acetato de amônio 15 mM , pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de $100 \text{ }\mu\text{L}$. As soluções foram preparadas em triplicatas e alíquotas de $10 \text{ }\mu\text{L}$ foram injetadas no sistema HPLC-MS contendo separadamente os ICER-AChE_{ee} e ICER-BChE_{hu}.

Entre a análise de cada amostra foi realizado um controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o composto candidato a inibidor, sendo o meio reacional constituído por $70 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de acetato de amônio 15 mM , pH 8,0, $20 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de ACh e $10 \text{ }\mu\text{L}$ do solvente de solubilização dos compostos (metanol).

Também foi realizado um controle negativo, que consiste da avaliação de um branco de cada composto na presença do substrato da enzima, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada (capilar vazio). Esse ensaio foi realizado para avaliar a interferência do composto na auto-hidrólise do substrato.

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando a área da atividade da enzima na presença do inibidor (P_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (P_0), de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \left[\left(\frac{P_i - S_b}{P_0 - S_b} \right) \times 100 \right] \quad (1)$$

onde S_b representa a área da colina resultante da hidrólise espontânea do substrato, para esse controle um capilar vazio foi utilizado.

3.1.4 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS EM HPLC-DAD

A amostra do extrato da plântula de *S. bonplandii* foi fracionada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) em escala semi-preparativa no equipamento Waters (*1525 binary HPLC pump* e *2998 photodiode arraydetector*), o detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm Waters, como mostrado na Figura 15. A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o software ChromNAV (Cromatec®), a coluna utilizada é uma coluna C18 da marca Phenomenex (P/ No: OOF-4252-PO, Desc.: Luna 5u C18 (2) 100, Size: 150 mm x 21,20 mm 5 micron, S/ No: 463658-

1), com vazão de $10,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção de $500,0 \mu\text{L}$ e monitoramento a 254 e 310 nm, fornecendo as subfrações.

Figura 15 - Equipamento utilizado no fracionamento do extrato de *Sorocea bonplandii*.



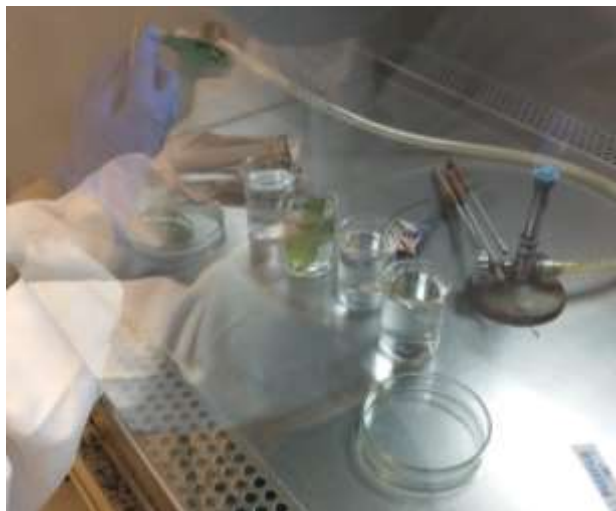
Fonte: Elaborado pela AUTORA (2020).

A análise das frações foi realizada no HPLC como descrito no tópico 3.3.2.. Em relação ao solvente utilizados, foram realizadas análises de 0 à 100% de solvente B como B sendo Acetonitrila ou Metanol, e otimizado.

3.2 MICRORGANISMOS

3.2.1 CULTIVO

O cultivo dos fungos endofíticos das folhas da planta *S. bonplandii* foi realizado em meio sólido, PDA (*Potato Dextrose Agar*) à $32 \text{ }^\circ\text{C}$, o qual a higienização das folhas foi realizada seguindo o procedimento de 2 minutos em EtOH, 2 minutos em água sanitária na concentração de 1%, 4 minutos em água ultrapura e, novamente, 4 minutos em água ultrapura, como evidenciado na Figura 16. Depois foi adicionado 4 partes de cada folha em cada placa de petri para desenvolvimento do fungo.

Figura 16 - Procedimento de higienização das folhas de *S. bonplandii*.

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

O cultivo do fungo para a obtenção dos extratos foi realizado em meio sólido, PDA e CZAPEK durante 10 dias, à 32 °C. Após esse período, o ágar foi cortado em pedaços com tamanhos de 1/3 ou 1/4 da placa de petri para cada fungo e adicionados aos frascos contendo os meios líquidos para o desenvolvimento e crescimento, nos estudos de OSMAC de acordo com o planejamento fatorial que envolve o meio de cultivo (Malte, 1, e CZAPECK, -1), agitação (com, 1, e sem, -1) e luminosidade (com, 1, e sem, -1), de acordo com a Quadro 1.

Quadro 1 - Planejamento fatorial do cultivo em meio líquido do fungo.

Ensaio	A (meio de cultivo)	B (agitação)	C (luminosidade)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Os cultivos líquidos em pequena escala foram realizados em 750 mL (3 erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura) de meio líquido malte e 750,0 mL de czapek, durante 28 dias à 25 °C (Protocolo NuBBE) em modo estático ou sob agitação à 100 rpm, com ou sem luminosidade para a obtenção dos extratos iniciais para estudos de OSMAC. Para o cultivo dos brancos (contendo apenas os meios de cultura) foi realizado com 250 mL de cada meio de cultura para cada experimento em triplicata.

Após o período de incubação de 28 dias, a cultura de cada fungo foi filtrada à vácuo para eliminar a massa do micélio, e então foi realizada uma extração líquido-líquido do caldo utilizando 3 porções de 300 mL de acetato de etila para cada 500 mL de cultura. E posteriormente o extrato foi concentrado a pressão reduzida em rotaevaporador, fornecendo os extratos brutos que foram armazenados em frascos limpos. Em seguida os extratos foram solubilizados em 95:5 (MeOH:H₂O) e foi realizada uma etapa de *clean-up* (Strata X, C18).

3.2.2 IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

Foi realizado o sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3730 xl DNA Analyzer Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank. A sequência do microrganismo obtida foi comparada com um banco de dados de DNA O resultado dessa comparação demonstrou maior identidade com o fungo da espécie *Chaetomium atrobrunneum* (nº acesso FJ595483.1).

Apesar da região genômica utilizada para identificação entre as espécies ser padrão internacional para essa análise não se deve descartar a identificação de mais de uma espécie por amostra devido a semelhança entre os DNAs das espécies encontradas (WHITE *et al.*, 1990).

3.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

3.3.1 HPLC-UV/VIS

Para o método cromatográfico inicial foi realizado em HPLC, foi utilizada uma coluna Kinetex C18 100R, 150 x 4,60 mm, e 5 mg de amostra. Os parâmetros cromatográficos foram: a fase móvel uma mistura do solvente com água ultra pura Mili-Q (bomba A, solvente aquoso) e Acetonitrila/ Metanol (bomba B, solvente orgânico).

3.3.2 HPLC-ESI-IT-MS/MS E GNPS

As análises de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram realizadas em um HPLC Shimadzu® (composto pelos seguintes módulos bomba: LC-20AD, Detector de Arranjo de Diodos: SPD-M20A; forno de coluna: CTO- 20A; injetor automático: SIL-20AHT e módulo de Comunicação: CBM-20A), acoplado a um espectrômetro de massas Amazon SL Bruker®, (fonte de ionização por *electrospray* - ESI; analisador de massas: *IonTrap*). E os dados obtidos foram submetidos ao protocolo do GNPS a fim de anotar metabólitos presentes nos extratos através da similaridade espectral pelo *Molecular Networking*. Os dados passaram por uma conversão para mzxml utilizando o software MSConvert e depois submetidos à plataforma GNPS.

A plataforma GNPS abrangeu outras análises complementares a anotação do *molecular networking* o qual foram aplicadas as frações do extrato de *S. bonplandii* e aos extratos do fungo *C. atrobrunneum*, que são o Dereplicator+ e MS2LDA o qual os dados foram submetidos ao GNPS no formato mzxml. Para a submissão dos dados no *Networking Annotation Propagation* (NAP) foi realizado com o ID (identificação da análise) do *Molecular Networking* na plataforma MassIVE que é conectada ao GNPS.

Assim, com as análises de *molecular networking*, Dereplicator+, NAP e MS2LDA foi possível submeter esses dados no MolNetEnhancer na plataforma do GNPS para uma análise mais robusta dos dados da planta e do fungo.

3.3.3 UPLC-ESI-QTOF/MS^E E UNIFI

Para realizar as análises da plataforma UNIFI os espectros de massas foram adquiridos no espectrômetro de massas ACQUITY UPLC I - Class System coupled to Xevo G2-S QTOF (Waters Corporation). Parâmetros utilizados para UPLC: fase móvel A: água, fase móvel B: metanol; o método foi realizado em gradiente linear: de 5-100 % de B em 20 minutos; fluxo: 0,4 mL.min⁻¹; volume de injeção: 0,1 µL; fase estacionária: coluna de fase reversa Acquity UPLC®HSS T3 Column (1.8 µm; 2.1 mm x 100 mm) e temperatura de 35 °C. As condições do MS^E foram realizadas em modo ESI+ e ESI-, aplicando uma voltagem ao capilar de 3 kV, cone de amostragem: 40 V, temperatura da fonte: 100 °C, temperatura de dessolvatação: 650 °C, gás dessolvatador: 800 L.h⁻¹, amplitude de aquisição: 50-1200 D, razão de amostragem: 20 ponto.s⁻¹, energia de colisão foi de baixa energia: 10 - 20 eV e

collision energy ramp high energy: 20-50 eV; *MS Collision Energy*: 10 eV. Concentração das amostras: 1 mg.mL⁻¹ (solubilizadas em metanol grau HPLC).

Uma base de dados com metabólitos já relatados para as famílias Annonaceae, Moraceae, Malphigeaceae e Sapotaceae e para a espécie *Sorocea bonplandii* foram construídas e inseridas no UNIFI, contendo 288 e 26 metabólitos respectivamente, para o *match* (ou correspondência) dos dados espectrais das amostras com os bancos de dados. As bases foram construídas em formato .txt no excel e as estruturas desenhadas no ChemDraw Professional 17.1 em formato .mol para compor essas bases de dados. As análises foram realizadas a fim de comparar os metabólitos do extrato com aqueles do banco de dados levando em conta: a massa de alta resolução, cálculo do erro em ppm (limite estabelecido de 5 ppm) e o possíveis padrões de fragmentações das substâncias. Todos os metabólitos identificados nos brancos dos meios de cultura foram excluídos das análises.

3.3.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A Análise das Componentes Principais (PCA) foi realizada com as informações obtidas no HPLC-ESI-IT-MS/MS e tratadas no GNPS (metodologia descrita na sessão 3.3.3). Os dados foram analisados e tratados em código computacional para a realização da PCA pelo programa computacional Anaconda aliado ao Jupyter o qual foi utilizada linguagem Python. Assim, pelo próprio código computacional da análise foi gerado os gráficos.

A análise da PCA só foi possível ser realizada com auxílio do NuBBE, especificamente com a ajuda do Pós-doutorando do Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, Dr. Tiago Leão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANTA

4.1.1 CULTIVO

O cultivo das folhas foi realizado a partir do cuidado diário das mudas de *Sorocea bonplandii* na estufa do NuBBE. A partir da preparação das folhas e posteriormente do extrato bruto, foi obtido as massas dispostas na Tabela 1, assim com um rendimento da extração de 17,3%. O rendimento se mostrou abaixo do esperado na extração, isso pode ser devido a escolha dos solventes e as perdas durante o processo.

Tabela 1 - Massa de material vegetal utilizado e do extrato obtido.

Parte vegetal	Massa seca (g)	Massa de extrato (g)
Folhas	12,9665	2,2432

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

A clorofila e outros pigmentos foram retirados com um cartucho C18 para obter 100 mg de extrato sem clorofila para a realização dos testes de atividade biológica e de análise, HPLC e HPLC-MS/MS. Com outra parte do extrato a retirada da clorofila foi realizada a partir de uma coluna de sílica C18, e a massa utilizada, cerca de 1,4 g, para a realização do isolamento dos compostos majoritários.

4.1.2 TRIAGEM BIOLÓGICA DO EXTRATO

Dada a realização da triagem antibacteriana foi obtido os resultados descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Triagem bacteriana para o extrato da planta *Sorocea bonplandii* (Sb).

Linhagens bacterianas	100%	Sb Julia
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512

Fonte: CAMARGO; CRUZ (2019).

Como a concentração testada na triagem foi apenas a de 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a concentração inibitória mínima (CIM) pode ser 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou uma concentração menor que esta quando o houver atividade antibacteriana. Com base nos dados obtidos, foi possível verificar que o extrato não apresentou atividade significativa frente às linhagens bacterianas testadas.

4.1.2.1 Análise de citotoxicidade

As amostras testadas não apresentaram alto potencial citotóxico, pois nenhuma delas apresentou um percentual de inibição do crescimento celular superior a 70%, dispostos nas Tabelas 3, 4 e 5, e na Figura 17.

Tabela 3 - Inibição do crescimento celular (%) da *S. bonplandii* em linhagem de HCT 116, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média \pm SEM) (n=2).

Extrato	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Média	SEM	Média	SEM
<i>S. bonplandii</i>	0,0	3,5	0,0	11,6

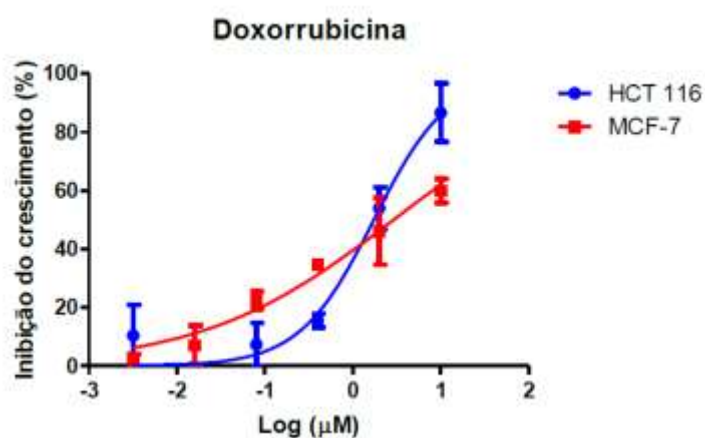
Fonte: LOTUFO; ALMEIDA (2019).

Tabela 4 - Inibição do crescimento celular (%) da *S. bonplandii* em linhagem de MCF-7, com as concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (média \pm SEM) (n=2).

Extrato	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Média	SEM	Média	SEM
<i>S. bonplandii</i>	0,0	4,7	0,0	7,8

Fonte: LOTUFO; ALMEIDA (2019).

Figura 17 - Regressão não linear do controle positivo doxorrubicina com concentrações de 0,0032 a 10 μM em linhagem de HCT 116 e MCF-7.



Fonte: LOTUFO; ALMEIDA (2019).

Tabela 5 - Concentração inibitória média (IC_{50}) do controle positivo doxorrubicina em linhagem de HCT 116 e MCF-7.

	HCT 116	MCF-7
IC_{50}	1,7	2,9
Intervalo de Confiança 95%	1,0 – 2,8	1,4 – 6,0

Fonte: LOTUFO; ALMEIDA (2019).

Dessa forma, o extrato das plântulas de *Sorocea bonplandii* não apresentou alto potencial citotóxico para linhagens celulares HCT-116 e MCF-7.

4.1.2.2 Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu})

Os resultados obtidos do ensaio de triagem pontual com os compostos em concentração final de 200 µg.mL⁻¹ foram compilados na Tabela 6 de acordo com o material enviado.

Tabela 6 - Resultados dos ensaios de triagem pontual para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}).

Compostos	% Inibição	
	ICER-AChE _{ee}	ICER-BChE _{hu}
Galantamina^a	94,4 ± 1,0	93,7 ± 1,0
<i>S. bonplandii</i>	6,8 ± 1,2	20,2 ± 1,8

^a Inibidor padrão de AChE_{ee} e BChE_{hu}

Fonte: CARDOSO; CARVALHO; MARTINS (2020).

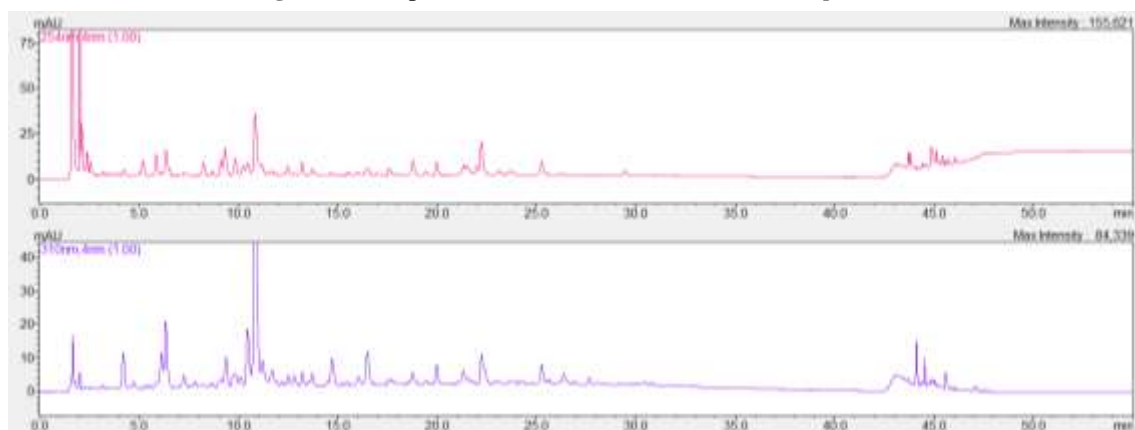
Os extratos das plantas não obtiveram sucesso, ou seja, os extratos não apresentaram atividade biológica na inibição de enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE_{ee}) e butirilcolinesterase humana (BChE_{hu}).

4.1.3 ANÁLISE DO EXTRATO

4.1.3.1 HPLC-UV/VIS

Foram realizadas análises em HPLC para amostras de *Sorocea bonplandii*, a cromatografia que se mostrou mais eficiente foi a utilizando até 30% de solvente orgânico, bomba B, mostrando que a amostra contém compostos muito polares. Realizando as análises cromatográficas, com as imagens obtidas na Figura 18 nas ondas de 254 e 310 nm.

Figura 18 - Espectro do extrato bruto de *Sorocea bonplandii*.



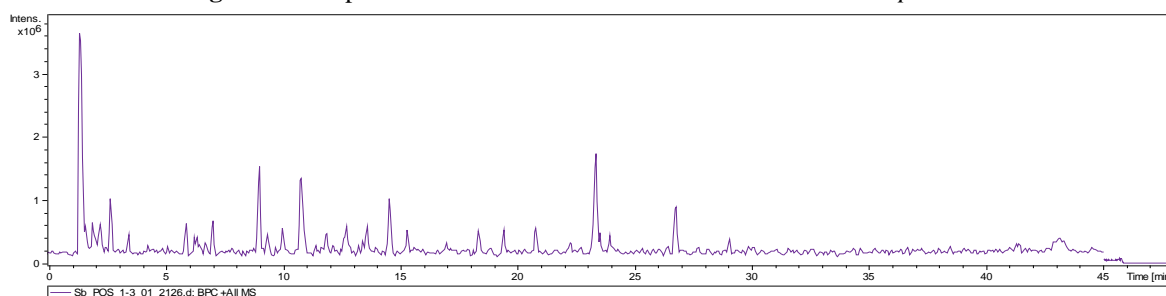
Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

Foi possível analisar que as substâncias presentes no extrato tem tendência a serem mais polares devido a porcentagem de Acetonitrila, bomba B, que foi realizada a cromatografia.

4.1.3.2 HPLC-ESI-IT-MS/MS e Molecular networking

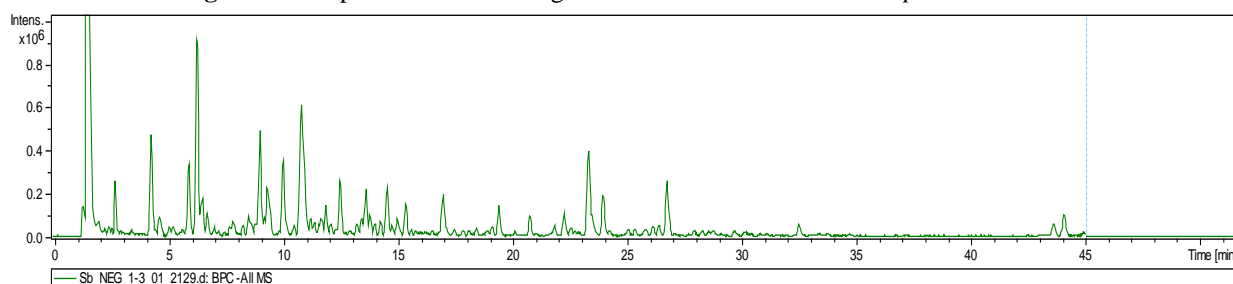
Os espectros de massa obtidos de modo positivo e negativo foram realizados num tempo de 45 minutos de 0 a 30% de solvente B elucidados no DataAnalysis, foram dispostos nas Figuras 19 e 20, para o modo positivo e negativo, respectivamente.

Figura 19 - Espectro em modo Positivo do extrato de *Sorocea bonplandii*.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

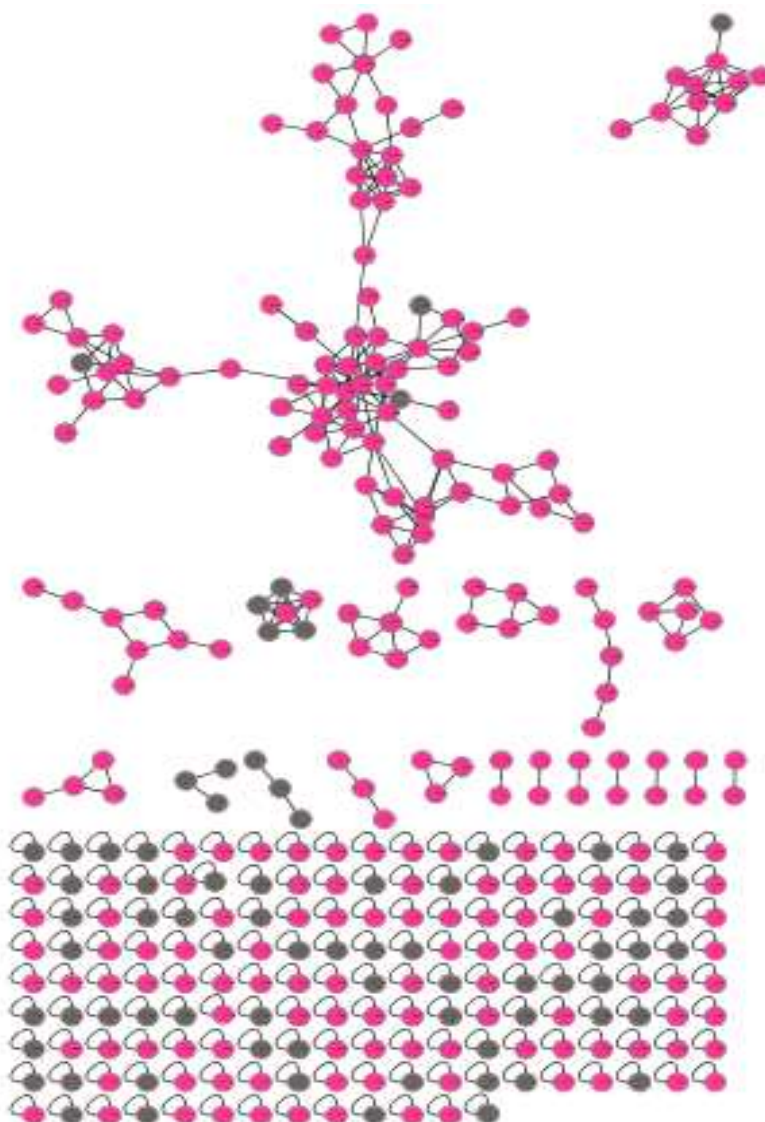
Figura 20 - Espectro em modo Negativo do extrato de *Sorocea bonplandii*.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

Com base nos espectros de massa e a conversão para o modelo GNPS, foi obtido o *molecular networking* mostrado na Figura 21.

Figura 21 - Molecular networking da *Sorocea bonplandii*, em cor cinza é o branco e em cor rosa é o extrato¹.



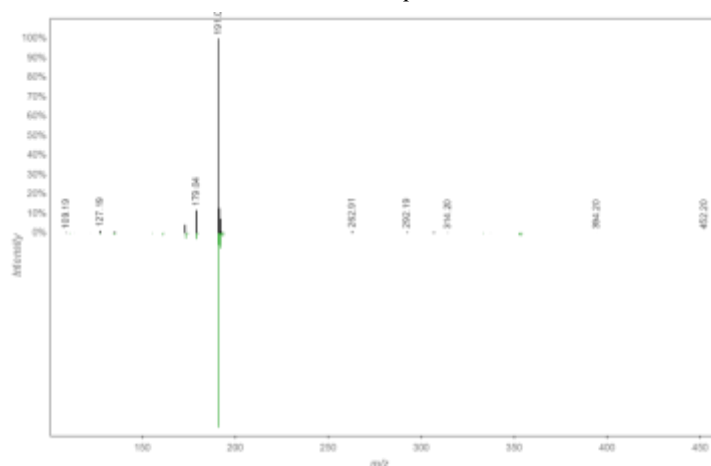
Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

A análise do GNPS como plataforma para a anotação de compostos com base nos dados obtidos dos cromatogramas de íons totais pelo equipamento de cromatografia aliado a espectrômetro de massa forneceu a massa e um padrão de fragmentação para cada molécula ionizada. Assim, foi gerado um mirror match para cada amostra anotada juntamente com seu valor de cosseno/MQscore que quanto mais próximo seu valor perto de 1 mais a fragmentação da molécula anotada corresponde a fragmentação do banco de dados do GNPS, gerando a possibilidade de uma possível identificação do composto. Como exemplo,

¹Molecular networking do extrato da planta pode ser acessado pelo link: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1f4b0393b8e945e9b8fbc11df289f83f> >.

temos o mirror match na Figura 22, ácido clorogênico, um alcaloide o qual tem seu cosseno igual a 0,95, de maneira que evidencia que o match foi preciso, podendo indicar a identificação do composto.

Figura 22 - *Mirror Match* do molecular networking com identificação do Ácido Clorogênico no extrato bruto de *S. bonplandii*.



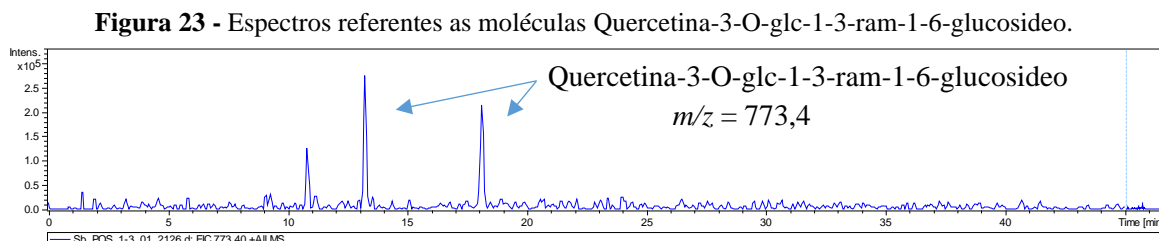
Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

Com base no *molecular networking* formado na Figura 21, foi possível a anotação de 24 compostos em nomenclatura de acordo com a base de dados GNPS que é em língua inglesa, com seu modo de ionização (positivo ou negativo), seu tempo de retenção em minutos, sua massa por carga (m/z) e o tipo de aduto formado, estão expostos na Tabela 10 no APÊNCIDE A.

Com base nos espectros de massa da Figuras 19 e 20, os dados obtidos na Tabela 10 e a partir do *molecular networking* foi possível obter algumas informações sobre as moléculas encontradas no GNPS e comparar com os espectros de acordo com o modo e o tempo de retenção. Esses compostos são majoritariamente flavonoides, de forma mais específica flavonoides glicosilados, e outros compostos identificados como ácidos orgânicos e dissacarídeos.

No entanto, foi observado divergências com a molécula 2 no modo negativo, ácido clorogênico, com a molécula 7, quercetina-3-O-glc-1-3-ram-1-6-glucosideo, e com a molécula 10, quercetina-hexosideo-di-ramnosídeo, pois o programa MSCluster agrupa os diastereoisómeros em um tempo de retenção médio, e a partir dos dados dos espectros no

DataAnalysis foi possível a elucidação dos dois tempos de retenção diferentes com mesma massa e mesma fragmentação, como por exemplo a molécula 7 disposta na Figura 23.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

Assim, com esses dados foi possível propor as fragmentações a partir da imagem dessas moléculas, as imagens obtidas no GNPS e no PUBCHEM (site de dados químicos) (PUBCHEM, 2020), e do seu respectivo espectro de fragmentação obtido no DataAnalysis. Outro contratempo foi com a molécula 10, Quercetina-hexosideo-di-rhamnosideo, e com a molécula 18, Metoxi-quercetina-3-O-hexosideo, que encontramos seu perfil de fragmentação no DataAnalysis mas não encontramos dados ou informações sobre a molécula nas literaturas. Com isso temos Tabela 7, com as fragmentações observadas.

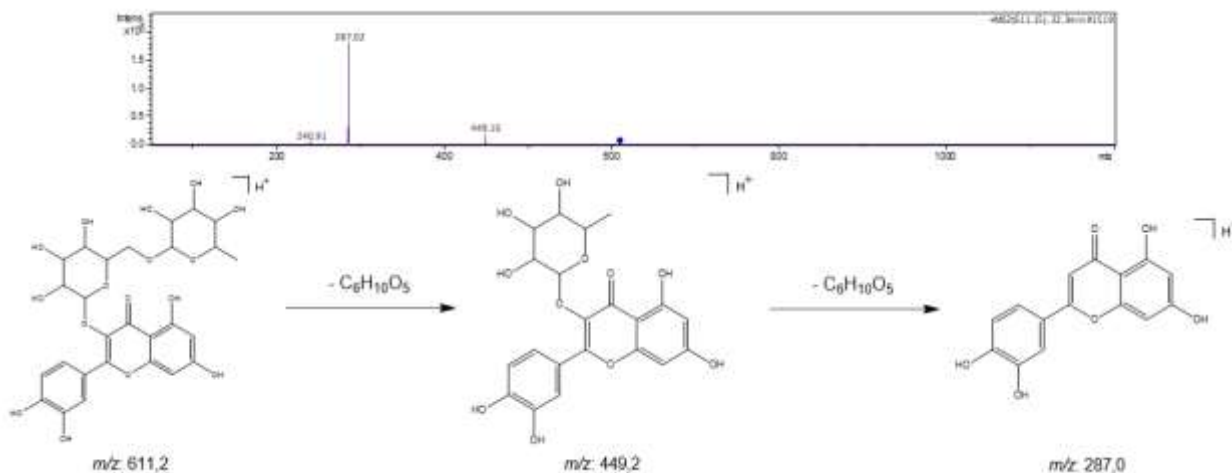
Tabela 7 - Fragmentação dos compostos anotados no *molecular networking*.

N°	Modo	t _r (min)	Massa (m/z)	Aduto	Fragmentação
1	Positivo	23,793	525,0	[M+Na] ⁺	393,24
2	Negativo	10,164	353,5	M-H	191,0
	Positivo	9,733	355,2	[M+H] ⁺	162,9
3	Positivo	17,016	369,0	M+H	176,91 144,95
	Negativo	16,725	367,6	[M-H] ⁻	191,1
4	Positivo	1,596	325,0	M+H-H ₂ O	162,9
5	Positivo	13,853	469,4	M+Na	317,1
6	Positivo	3,391	328,0	M+H	310,16
7	Positivo	15,710	773,4	M+H	611,2 465,1 303,1
8	Positivo	23,312	611,3	M+H	449,2 287,0
	Negativo	23,222	609,6	[M-H] ⁻	301,2
9	Positivo	19,444	627,2	[M+H] ⁺	465,1 303,1
10	Positivo	18,782	757,3	M+H	-
11	Positivo	26,079	595,4	M+H	449,1 287,0
12	Negativo	26,283	593,6	[M-H] ⁻	285,1
13	Positivo	21,163	611,2	[M+H] ⁺	449,2 287,0
	Negativo	22,306	609,6	[M-H] ⁻	429,3 285,1
14	Positivo	22,619	741,6	[M+H] ⁺	595,2 449,1
15	Negativo	19,496	625,6	M-H	445,2 300,1
16	Negativo	20,206	755,7	[M-H] ⁻	593,3
17	Positivo	1,399	326,4	[M+H] ⁺	163,8
18	Positivo	21,399	478,6	M+H	-
19	Negativo	15,858	755,7	[M-H] ⁻	593,3
20	Positivo	18,811	494,6	M+H	332,3
21	Negativo	24,280	463,4	M-H	301,1
22	Positivo	10,484	449,4	M+H	287,1
23	Positivo	33,281	462,5	Cat	300,3
24	Positivo	24,337	465,1	M+H	303,1

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

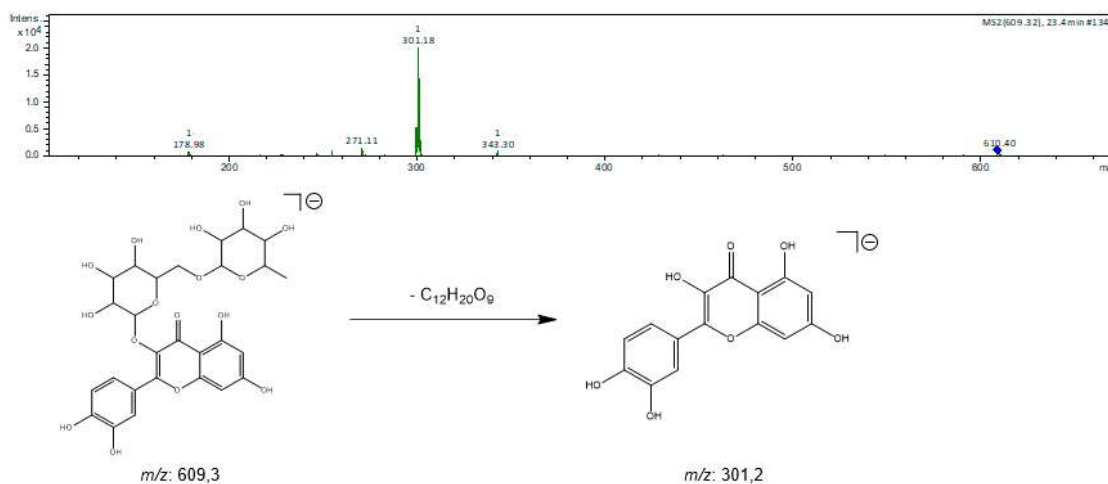
Analisando a Tabela 7, foi observado que a maioria tem uma perda ramnose ou glicose que confere uma perda de 146 ou 162 em massa, respectivamente. Como por exemplo a molécula 8, rutina, que está exposto sua fragmentação nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Espectro de massas (modo positivo) da rutina e proposta de fragmentação.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

Figura 25 - Espectro de massas (modo negativo) da rutina e proposta de fragmentação.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2019).

4.1.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO

A realização do fracionamento do espectro dos compostos majoritários foi baseada nos cromatogramas e espectros de ultravioleta obtidos, assim como alguns picos

identificados no *molecular networking*, evidenciados nas Figuras 18, 19, 20 e 21, e na Tabela 7.

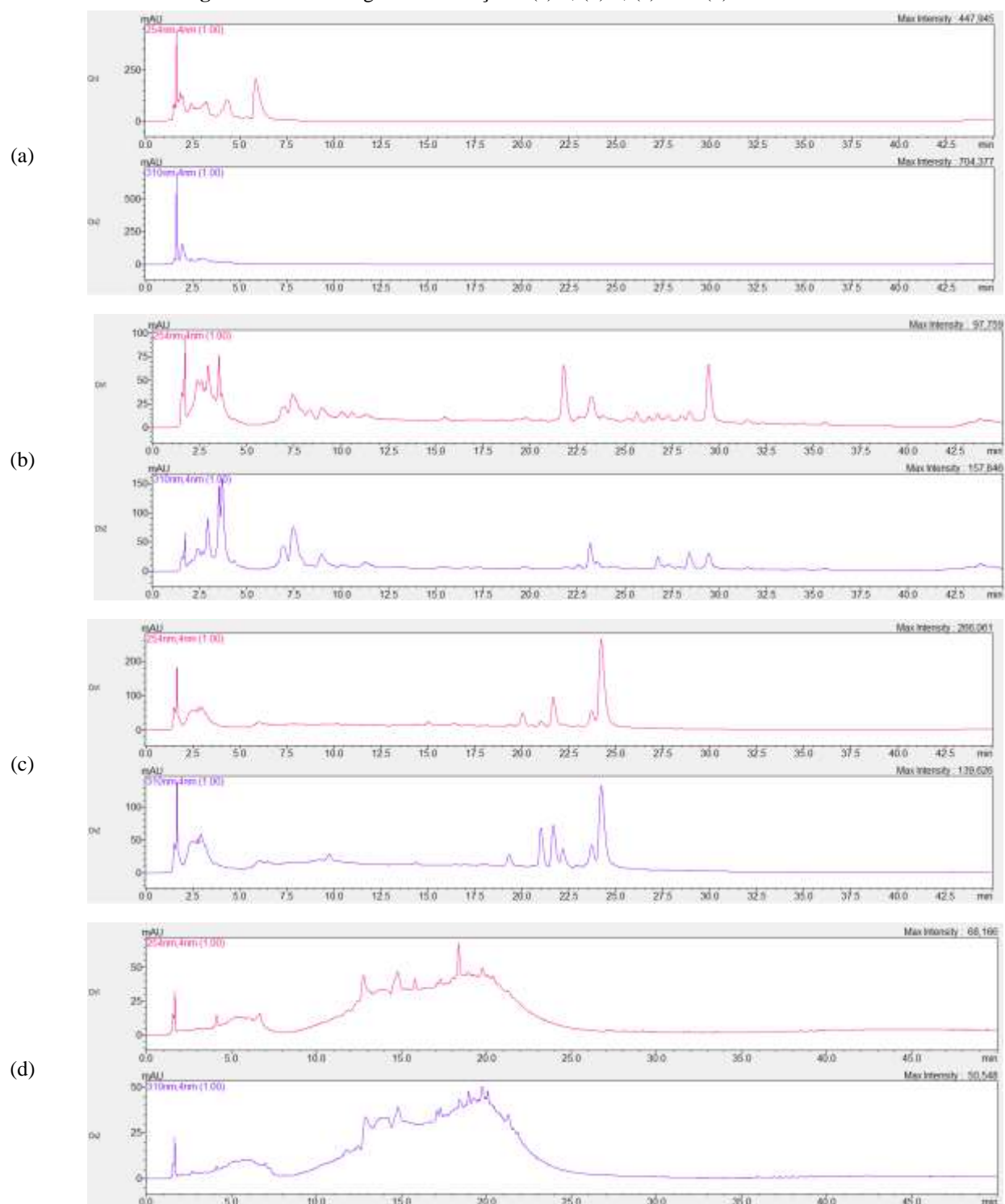
O fracionamento foi realizado com base no cromatograma da Figura 18, o fracionamento no HPLC-DAD com um tempo de 52 min para cada cromatografia foram necessárias 24 injeções no equipamento. Analisando as frações obtidas no HPLC, otimizamos o método para cada fração de acordo com a porcentagem de solvente B, metanol. Com isso, foi obtido os seguintes tempos, as massas para cada fração, e as %B na análise no HPLC, descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados de cada Fração e método otimizado para análise em HPLC-MS/MS.

Fração	Tempo (min)	Massa (mg)	%B HPLC
1	1-4	673,9	5 a 15%
2	4-6	27,0	Isocrático 8%
3	6-9	14,9	5 a 10%
4	9-12	11,1	5 a 15%
5	12-16	12,2	5 a 20%
6	16-20	14,9	5 a 30%
7	20-23	9,5	5 a 30%
8	23-26	11,6	5 a 45%
9	26-30	13,0	5 a 40%
10	30-34	12,1	20 a 45%
11	34-38	10,9	20 a 50%
12	38-48	19,9	5 a 100%
13	48-52	16,8	5 a 100%

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2020).

Com a análise das frações obtidas no HPLC, o método foi otimizado para o solvente B sendo o metanol quem mostrou melhores resultados para a análise, obtivemos os cromatogramas para cada fração. Podemos demonstrar alguns cromatogramas da Fração 3, Fração 7, Fração 10 e Fração 12 realizados em 254 e 310 nm como o exposto da Figura 26.

Figura 26 - Cromatograma das frações: (a) 3, (b) 7, (c) 10 e (d) 12.

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2020).

Analisando a Tabela 8 e a Figura 26 foi observado que as Frações 1, 2, 3, 4 e 5 precisam ser otimizadas, atentando à possibilidade da presença de moléculas sem grupos cromóforos, não sendo possível a detecção via ultravioleta. As Frações 6, 7, 8 e 9 foram

obtidos bons resultados, tendo em vista os cromatogramas de forma que existem picos nítidos com possibilidade de análise desses picos que representam compostos majoritários na fração. E o refinamento dessas subfrações poderiam indicar novos compostos que não foram elucidados no *molecular networking* e indicar alguns picos de interessa para isolamento, para isso é necessárias maiores investigações sobre seus compostos.

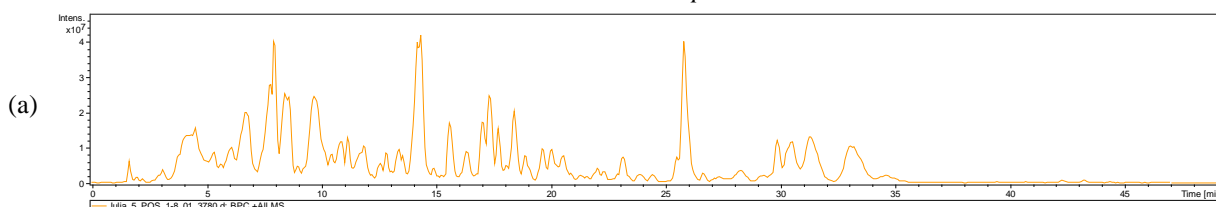
As Frações 10 e 11 foram os que obtiveram os melhores resultados otimizados, de forma que há picos nítidos com possibilidade de análise desses picos que representam compostos majoritários na fração e indicando alguns picos mais finos o qual pode indicar pico de um composto único. Diante deste cenário foram necessárias maiores investigações nessas frações em HPLC-MS/MS e UPLC-MS/MS, visando a obtenção de informações estruturais que possam inclusive evidenciar moléculas inéditas. As Frações 12 e 13 mostram a possível presença de taninos visto a distorção na linha base do cromatograma. No entanto, são necessários mais dados para concluir apropriadamente sobre este tipo de molécula.

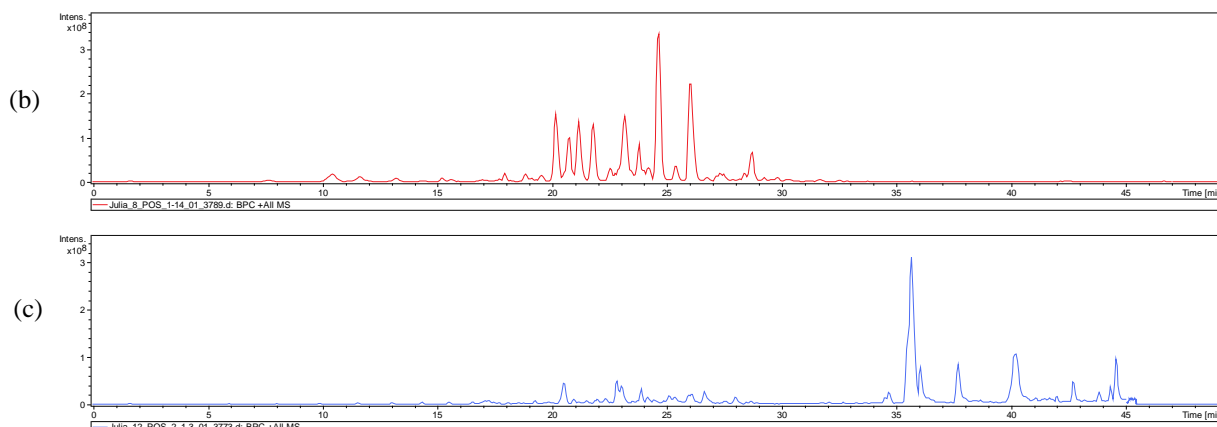
Assim, as treze frações do extrato de *Sorocea bonplandii* obtidos foram processados em HPLC-MS no modo positivo e negativo, em um tempo de 45 minutos utilizando como solventes água (solvente A) e metanol (solvente B) de acordo com o método otimizado no HPLC, Tabela 9. Os dados foram posteriormente processados e analisados fazendo uso do software DataAnalysis.

4.1.4.1 HPLC-ESI-IT-MS, *Molecular networking* e Identificação de picos majoritários no modo positivo

Na Figura 27 foi possível observar os cromatogramas de íons totais para as Frações 5, 8 e 12.

Figura 27 - Cromatograma de íons totais em modo positivo para a fração 5 (a), fração 8 (b) e fração 12 do extrato de *S. bonplandii*



















Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Analisando os cromatogramas de íons totais pode-se observar vários picos que pela sua feição simétrica sugerem se tratar de compostos específicos para cada banda. Posteriormente, foi realizado o tratamento dos dados dos espectros de massa junto ao banco de dados da plataforma GNPS, sendo possível obter o gráfico do *molecular networking* para os dados gerados no modo positivo das 13 frações, o Quadro 2 evidencia como cada fração e o branco fazem parte da rede molecular.

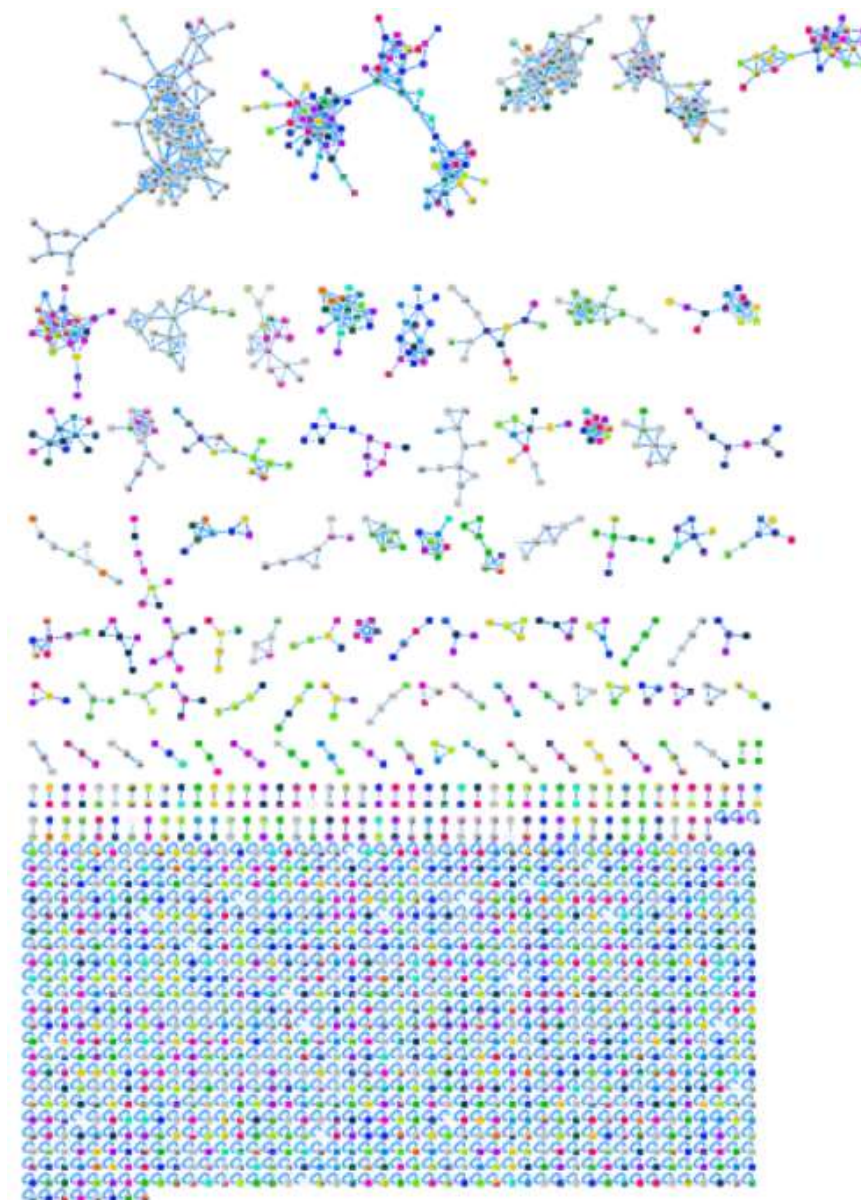
Quadro 2 - Cores respectivas de cada fração no *molecular networking*.

Amostra	Cor	
Branco	Cinza	
Fração 1	Laranja	
Fração 2	Amarelo	
Fração 3	Amarelo esverdeado	
Fração 4	Verde claro	
Fração 5	Verde	
Fração 6	Verde escuro	
Fração 7	Azul esverdeado ou Verde azulado	
Fração 8	Azul claro	
Fração 9	Azul royal	
Fração 10	Azul escuro	
Fração 11	Roxo	
Fração 12	Rosa	
Fração 13	Vermelho	

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

O *molecular networking* é uma rede de interações moleculares gerada pela plataforma GNPS, Figura 28, o qual é bastante eficiente em análises de misturas complexas. Nesta análise foi possível obter 1975 nodos e aproximadamente 106 *clusters*, os *clusters* são agrupamentos de compostos estruturalmente relacionados. Uma série de algoritmos presentes na GNPS faz uma correlação espectral associando os compostos estruturalmente similares.

Figura 28 - Rede molecular (*molecular networking*) das frações de *Sorocea bonplandii* no modo positivo².

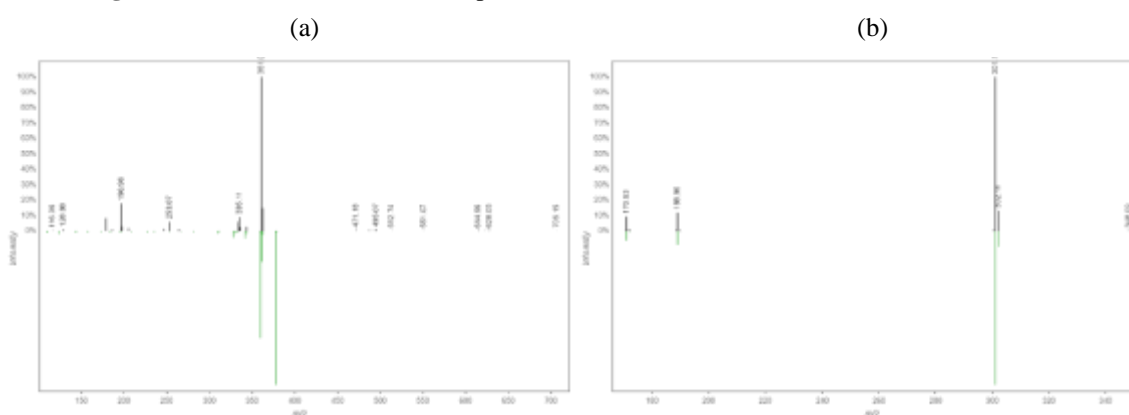


Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

²*Molecular networking* no modo positivo para as frações está disponível pelo link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1823466042f1472aaa9dfcbe383350ed>.

Assim, foi gerado um mirror match para cada anotação juntamente com seu valor de cosseno/MQscore que quanto mais próximo seu valor perto de 1 mais a fragmentação da molécula identificada corresponde a fragmentação do banco de dados do GNPS. Como exemplo, temos o mirror match na Figura 29, a karakolina, um alcaloide o qual tem seu cosseno igual a 0,75, e o ftalato de dioctila que tem um cosseno de 0,99, de maneira que evidencia que o match para o ftalato de dioctila é mais preciso que o da karakolina.

Figura 29 - Mirror match do GNPS para as moléculas (a) Karakolina e (b) Ftalato de dioctila.

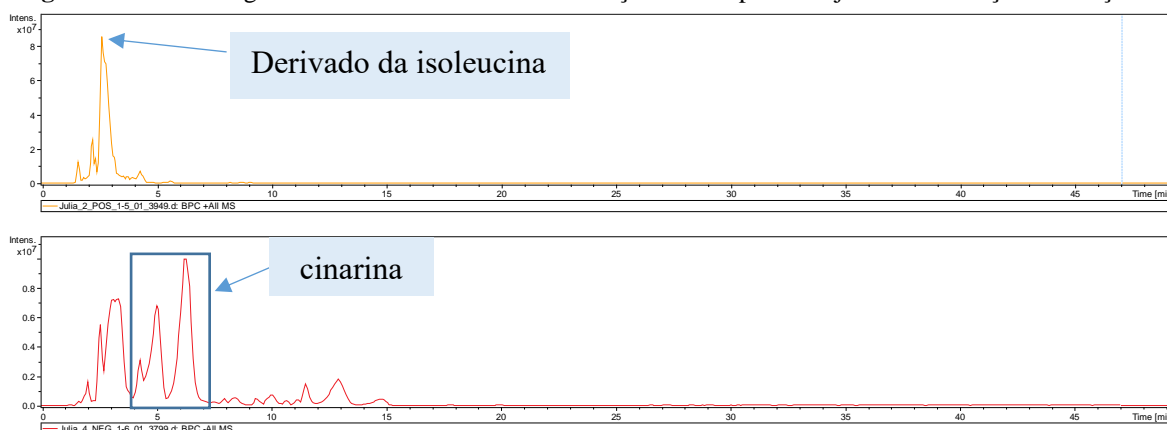


Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Com base na rede molecular gerada pela plataforma GNPS (Figura 28) aliada aos valores de cosseno obtidos, foi possível anotar 220 metabólitos que estão descritos na Tabela 11 no APÊNDICE B. Como visto alguns compostos estão presentes em mais de uma fração de forma que, após a eliminação das redundâncias detectadas, foram anotados 101 metabólitos para o modo positivo.

Assim, com as informações dos compostos conhecidos e detectados pelo GNPS aliado ao programa Data Analysis foi possível a detecção de compostos majoritários, como um derivado da isoleucina identificado na Fração 2 e a cinarina identificado na Fração 4 no modo positivo, como evidenciado na Figura 30.

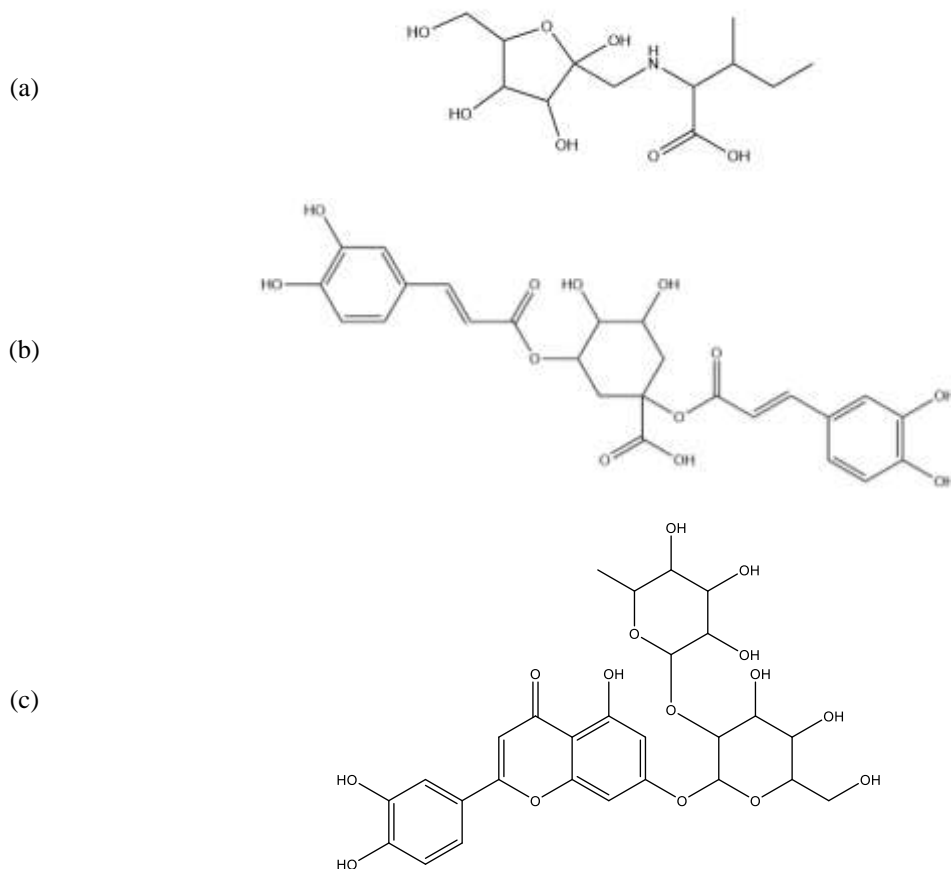
Figura 30 - Cromatograma de íons totais com identificação de composto majoritário na fração 2 e fração 4.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Para a Fração 11 foi possível detectar derivados de aminoácidos com pentoses, derivados de fenilpropanóides, flavonoides, como pode ser observado a estrutura molecular na Figura 31.

Figura 31 - Estrutura molecular para compostos majoritários: (a) Fração 2, (b) Fração 4 e (c) Fração 11.

















Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Com as informações do *molecular networking*, foi possível a visibilidade de alguns compostos presentes em cada fração, identificar alguns picos do cromatograma de íons totais com base na informação de massa, tempo de retenção e fragmentação. E assim, elucidar estruturalmente essas moléculas. Entretanto temos informações apenas dos compostos identificados, mas temos muitos outros compostos não identificados na amostra.

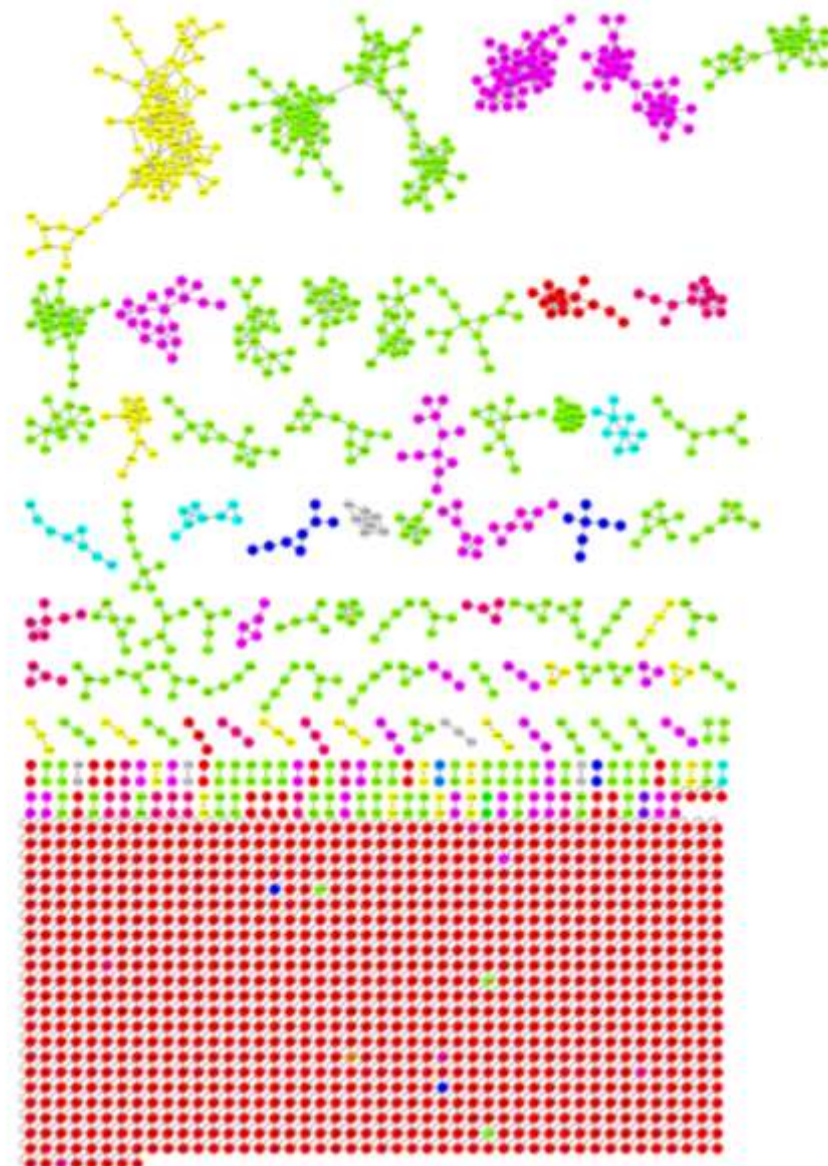
Dessa forma, foi necessário evoluir nas análises dentro da plataforma do GNPS com o DEREPLICATOR+, NAP e MS2LDA, juntamente com o *molecular networking* são relacionadas pelo MolNetEnhancer. Essa análise identifica as similaridades dos compostos presentes com a finalidade de identificação de Classes de Compostos gerando a rede molecular colorida de acordo com essa classificação, como evidenciado na Figura 32 e a Quadro 3 descreve a cor de cada classe de compostos.

Quadro 3 - Classificação por cor da classe de compostos do MolNetEnhancer.

Cor	Classe dos Compostos
	Cinza Composto não-metal homogêneo
	Cinza claro Hidrocarbonetos
	Laranja Alcaloides e derivados
	Amarelo Benzenoides
	Verde claro Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios
	Verde Nucleosídeos, nucleotídeos e análogos
	Verde azulado Polímeros orgânicos
	Azul claro Ácidos orgânicos e derivados
	Azul Compostos orgânicos nitrogenados
	Azul escuro Compostos orgânicos oxigenados
	Roxo Compostos organohalogenados
	Rosa Compostos orgânicos heterocíclicos
	Rosa escuro Fenilpropanoides e Policetideo
	Vermelho Sem identificação/ correspondência

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2022).

Figura 32 - MolNetEnhancer das frações de *Sorocea bonplandii* no modo positivo³.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2022).

Com a análise da Figura 32, fica evidente o agrupamento do *molecular networking* pela semelhança estrutural o qual o maior cluster representa a classe de Benzenoides, ou seja, compostos com presença de anéis aromáticos. Em contrapartida, a maior quantidade de clustes são representados por compostos lipídicos ou similares e compostos orgânicos heterocíclicos. Assim, a identificação dos compostos dessas classes com o *molecular*

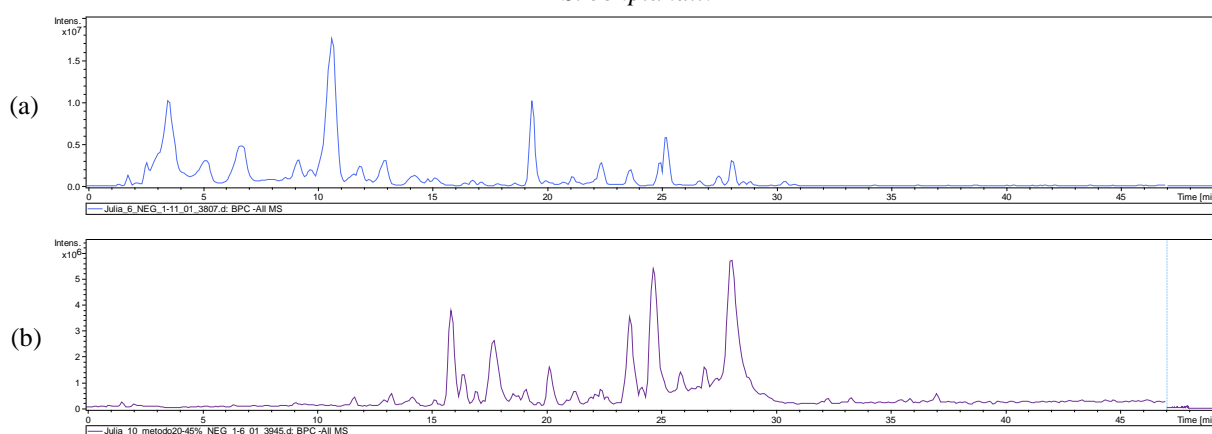
³*Molecular networking* do MolNetEnhancer no modo positivo para as frações está disponível no link: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=c4cd020bc6054a42a9cf4192f2aef1f4>>.

networking é uma forma de identificar semelhanças entre estruturas não identificadas para a finalidade de elucidação desses compostos e isolamento dos mesmos.

4.1.4.2 HPL-ESI-IT-MS, Molecular networking e Identificação de picos majoritários no modo negativo

Os espectrogramas elucidados, de acordo com a Tabela 8, para o modo negativo ficaram semelhantes ao da Fração 6 e da Fração 10 como exemplos na Figura 33.

Figura 33 - Cromatograma de íons totais em modo negativo para a Fração 6 (a) e Fração 10 (b) do extrato de *S. bonplandii*.

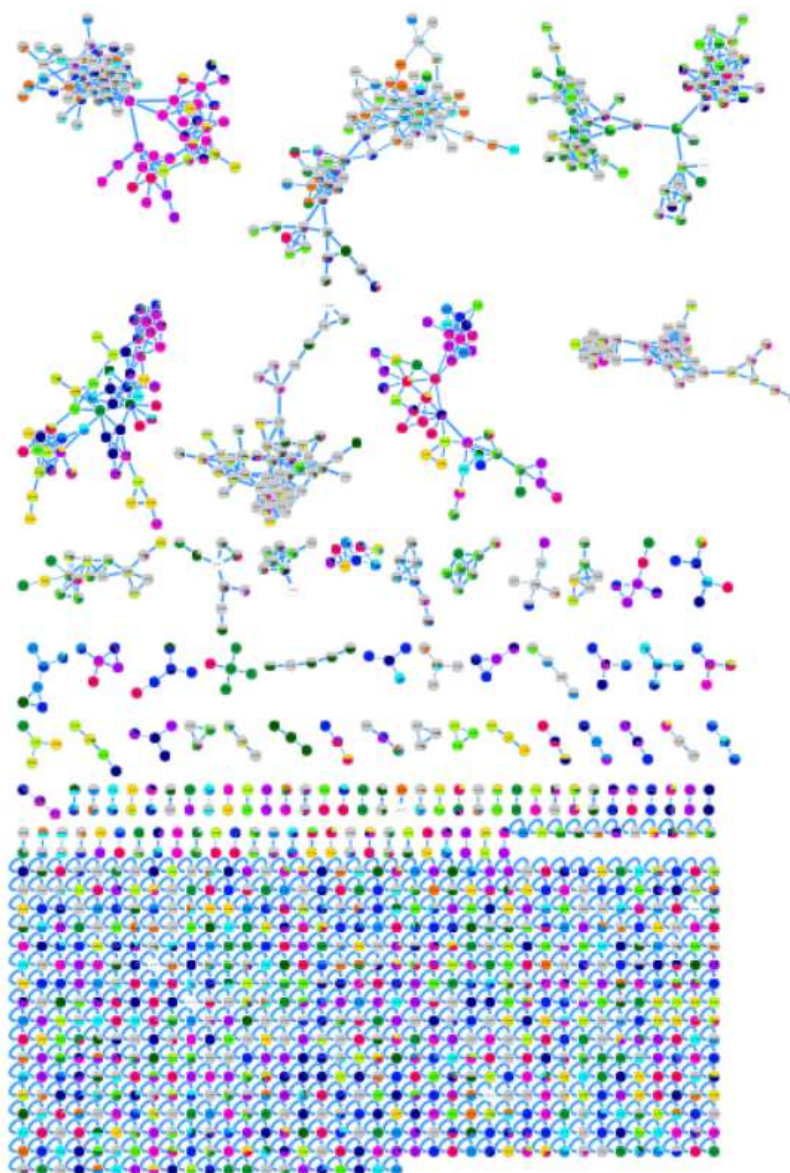


Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Analisando os espectros pode-se observar vários picos os quais por não serem picos finos que caracterizariam um único composto pode-se ter compostos co-eluidos juntos, alguns desses picos tem similaridades nos modos positivo e negativos, com o tratamento dos dados espectrométricos no banco de dados GNPS, obtemos o *molecular networking* para o modo negativo mostrado na Figura 34 o qual as cores de cada fração estão de acordo com a Quadro 2.

Através da análise do *molecular networking* obtivemos 1343 nodos e aproximadamente 108 *clusters*.

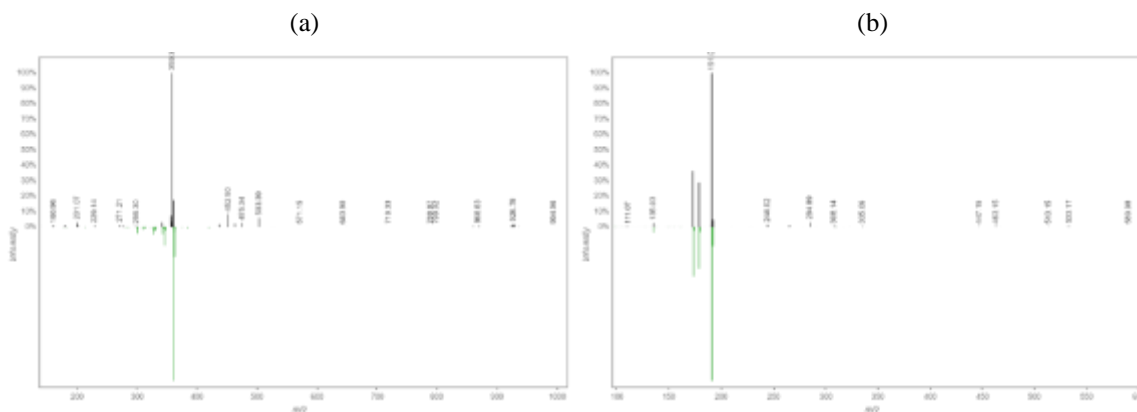
Figura 34 - *Molecular networking* das frações de *Sorocea bonplandii* no modo negativo⁴.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

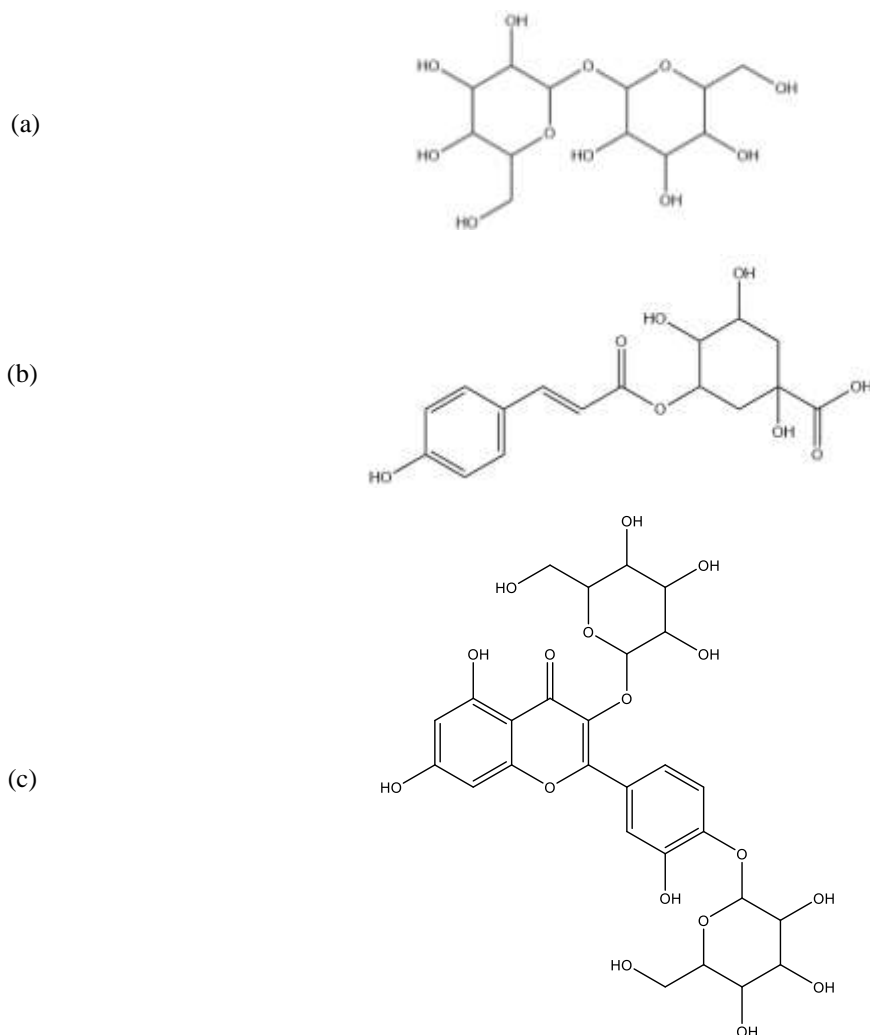
A análise do GNPS gera um mirror match para cada amostra identificada juntamente com seu valor de cosseno/MQscore, como exemplo para o modo negativo temos a Figura 35, a iridina, uma isoflavona o qual tem seu cosseno igual a 0,77, e o ácido cafeoilquínico que tem um cosseno de 0,96, de maneira que evidencia que o *match* para o ácido cafeoilquínico é mais preciso que o da iridina.

⁴*Molecular networking* no modo negativo para as frações está disponível através do link: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e23818170d3846bda2577316f974183d>>.

Figura 35 - Mirror match do GNPS para as moléculas (a) Iridina e (b) Ácido cafeoilquínico.

Com a identificação do composto majoritário e da plataforma do GNPS é possível a elucidação desses compostos. Assim, temos para a Figura 37, para a Fração 1 um composto majoritário (trealose), para a Fração 7 o ácido coumaroilquínico. Para a Fração 9 foi possível detectar derivados fenilpropanoídicos assim como flavonoides.

Figura 37 - Estrutura molecular para compostos majoritários: (a) Fração 1, (b) Fração 7 e (c) Fração 9.



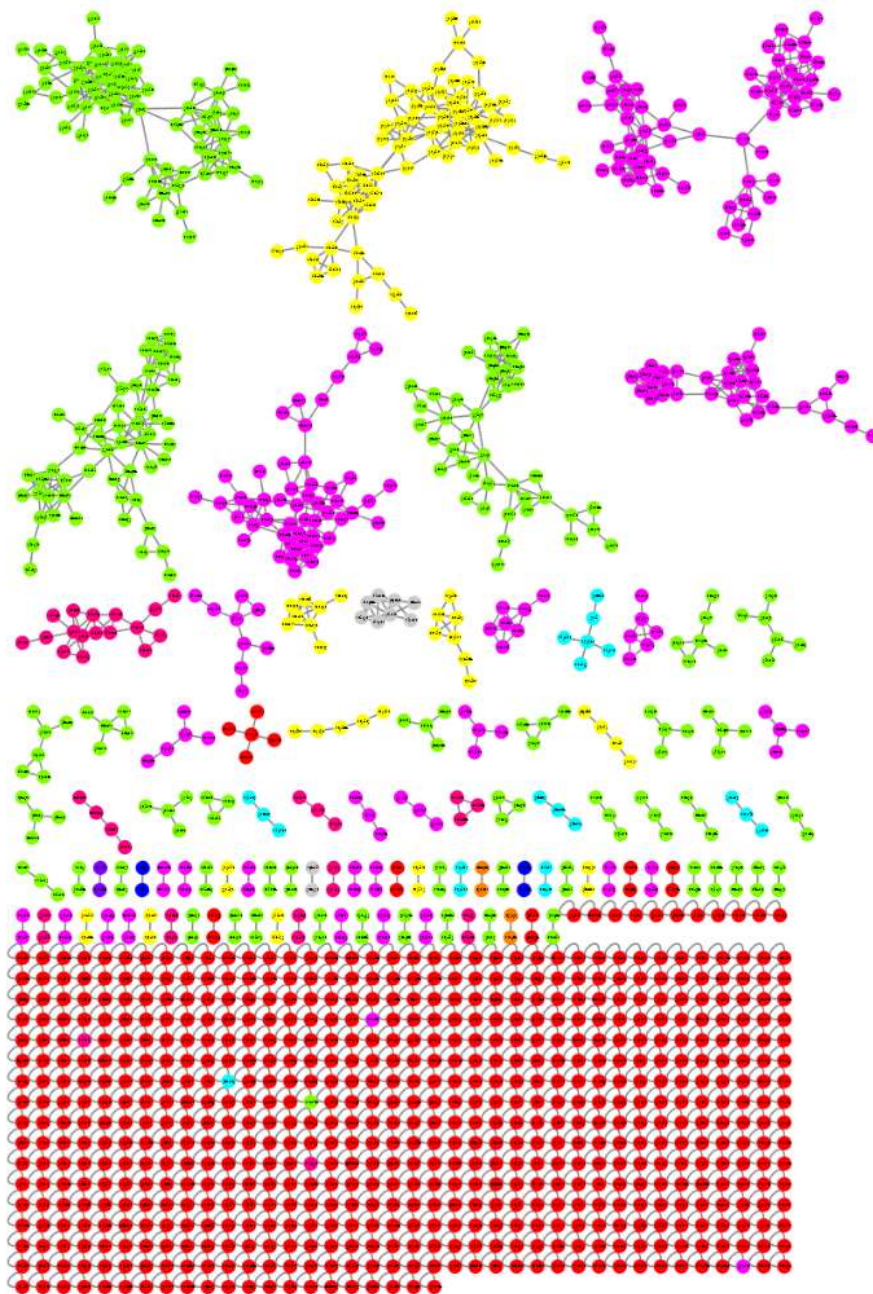
Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Com as informações do *molecular networking*, foi possível anotar alguns compostos presentes em cada fração, identificar alguns picos do cromatograma de íons totais com a finalidade de elucidar estruturalmente essas moléculas.

Assim para os compostos não identificados, as análises evoluíram na plataforma do GNPS com o DEREPLICATOR+, NAP e MS2LDA, juntamente com o *molecular*

networking foram relacionadas pelo MolNetEnhancer para identificar as Classes de Compostos da rede molecular o qual a classificação está descrita por cor no Quadro 3 e a rede molecular está evidenciada na Figura 38.

Figura 38 - MolNetEnhancer das frações de *Sorocea bonplandii* no modo negativo⁵.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2022).

⁵Molecular networking do MolNetEnhancer do modo negativo das frações está disponível no link: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2a4197ba061e447784ac75e0dfad2588>>.

Com a análise da Figura 38, o agrupamento do *molecular networking* pela semelhança estrutural evidenciou que os maiores clusters representam as classes de Benzenoides, compostos lipídicos ou similares e compostos orgânicos heterocíclicos. A similaridade com a análise de modo positivo corroborou como uma validação da mesma fonte de dados que são as frações de *S. bonplandii*, entretanto os agrupamentos foram maiores conseguindo gerar uma maior conexão entre uma maior quantidade de compostos.

4.1.4.3 Análise das Frações – UPLC-ESI-QTOF/MS^E

Os espectros de massa para as treze frações do extrato de *Sorocea bonplandii* obtidos no modo positivo e negativo, foram realizados num tempo de 20 minutos, fazendo uso dos solventes água (solvente A) e metanol (solvente B) de acordo com o método de 5 a 100% no UPLC.

4.1.4.4 UPLC-ESI-QTOF/MS^E, UNIFI e Identificação de compostos no modo positivo

Com base no banco de dados formado pela autora e a identificação realizada pela plataforma UNIFI, foram anotados 185 metabólitos que estão dispostos na Tabela 13 no APÊNDICE C, após a eliminação de compostos redundantes foi possível anotar 67 metabólitos.

Comparando os compostos identificados pela plataforma GNPS é possível fazer uma correlação, sendo possível detectar metabólitos como o ácido clorogênico, rutina e derivados de pentoses, entre outros, que foram comuns tanto na rede molecular como na plataforma UNIFI. E realizando uma comparação com a literatura o qual o banco de dados utilizado foi criado, foi possível a anotação de moléculas presentes nas raízes de acordo com a literatura e pela análise nas folhas também como por exemplo o Soroceal, Soroceina A e Soroceina B, observando a similaridade de alguns compostos característicos na planta como um todo.

4.1.4.5 UPLC-ESI-QTOF/MS^E, UNIFI e Identificação de compostos no modo negativo

Com base no banco de dados formados pela autora e a identificação realizada pela plataforma UNIFI, foram anotados 125 metabólitos que estão evidenciados na Tabela 14 no

APÊNDICE C, após a subtração de compostos redundantes foi possível anotar 47 metabólitos.

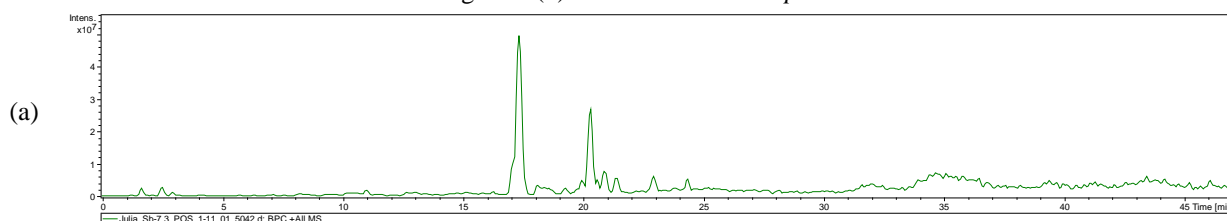
Comparando os compostos identificados pela plataforma GNPS é possível fazer uma convergência, sendo possível detectar metabólitos como o ácido quínico, ácido clorogênico, rutina e monotropitosídeo (metil 2- $\{[6-O-(\beta\text{-D-xilopiranosil})-\beta\text{-D-glucopiranosil}]\text{oxi}\}$ benzoato), entre outros, que foram comuns tanto na rede molecular como na plataforma UNIFI. E realizando uma comparação com a literatura, foi possível a anotação de moléculas presentes nas raízes de acordo com a literatura e pela análise nas folhas também como por exemplo o Sorocein A, observando a similaridade de alguns compostos característicos na planta como um todo.

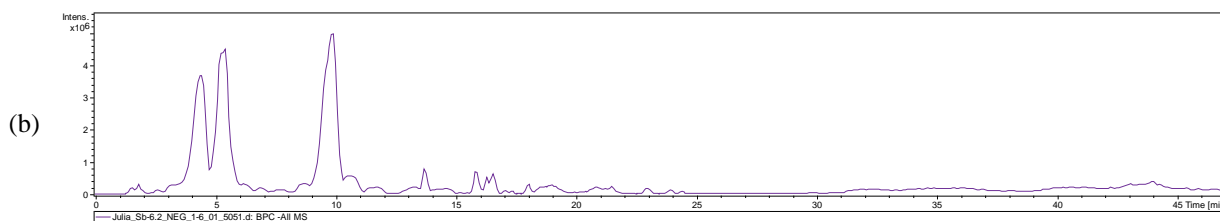
4.1.5 FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES DE INTERESSE

A realização do fracionamento das frações do extrato bruto de *S. bonplandii* com o objetivo de isolamento de compostos majoritários foi baseada nos cromatogramas de íons totais gerados em HPLC-MS/MS com o tratamento dos dados realizados na plataforma do GNPS, com o *molecular networking* e MolNetEnhancer, e UNIFI. Assim, foram selecionadas as frações para a realização do subfracionamento que foram as frações 5, 6 e 7, seguindo o mesmo processo do primeiro fracionamento, só que nessa cada amostra foi dividida em 4 subfrações, gerando massas entre 0,9 mg e 6,7 mg.

Com isso, foi necessário para identificar se as frações estavam purificadas foi realizado análises em HPLC-MS/MS para a visibilidade de picos majoritários puros, ou seja, amostras com picos únicos. A visibilidade dos cromatogramas de íons totais está na Figura 39 para a Subfração 7.3 no modo positivo e para a Subfração 5.2 no modo negativo.

Figura 39 - Cromatograma de íons totais para a Subfração 7.3 no modo positivo (a) e Subfração 5.2 no modo negativo (b) do extrato de *S. bonplandii*.





Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

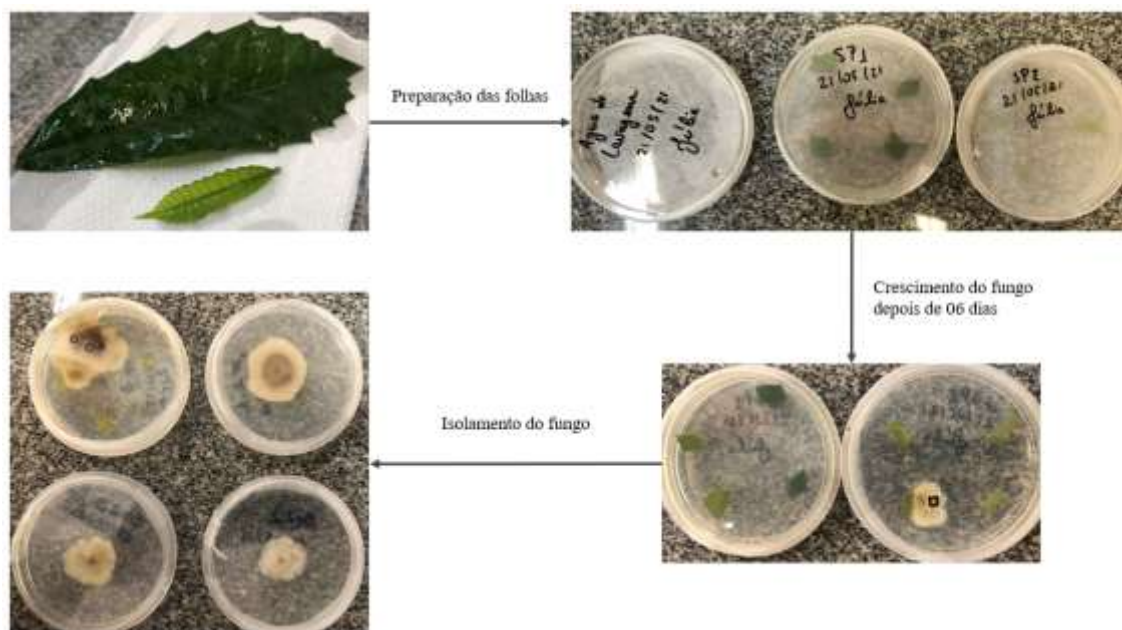
Entretanto, as subfrações ainda não estavam totalmente purificadas, sendo necessário mais fracionamentos para a purificação e o isolamento desses picos, mas analisando as massas obtidas, se mostrou inviável o isolamento do composto por existir perdas grandes de massa durante o fracionamento e para a elucidação é necessário mínimo 1 mg de massa para a realização de análises em UPLC-MS/MS, RMN, o qual idealmente é necessária uma maior quantidade para a realização de testes de atividade biológica em paralelo.

4.2 MICRORGANISMO

4.2.1 CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO

O crescimento do fungo endofítico foi realizado pelo armazenamento de parte das folhas de *Sorocea bonplandii* em uma placa de petri contendo PDA (*Potato-Dextrose-Agar* – Batata-Dextrose-Ágar) previamente higienizada para evitar possíveis contaminações, sob condições favoráveis o aparecimento do mesmo o qual é necessário a espera de alguns dias. Entretanto, na abordagem utilizada foi isolado apenas um fungo, isso foi devido as condições de processo de isolamento que pode criar um meio resistente ao crescimento de outros microrganismos. O processo de crescimento do fungo endofítico a partir de uma folha madura e uma folha jovem da planta está evidenciado na Figura 40.

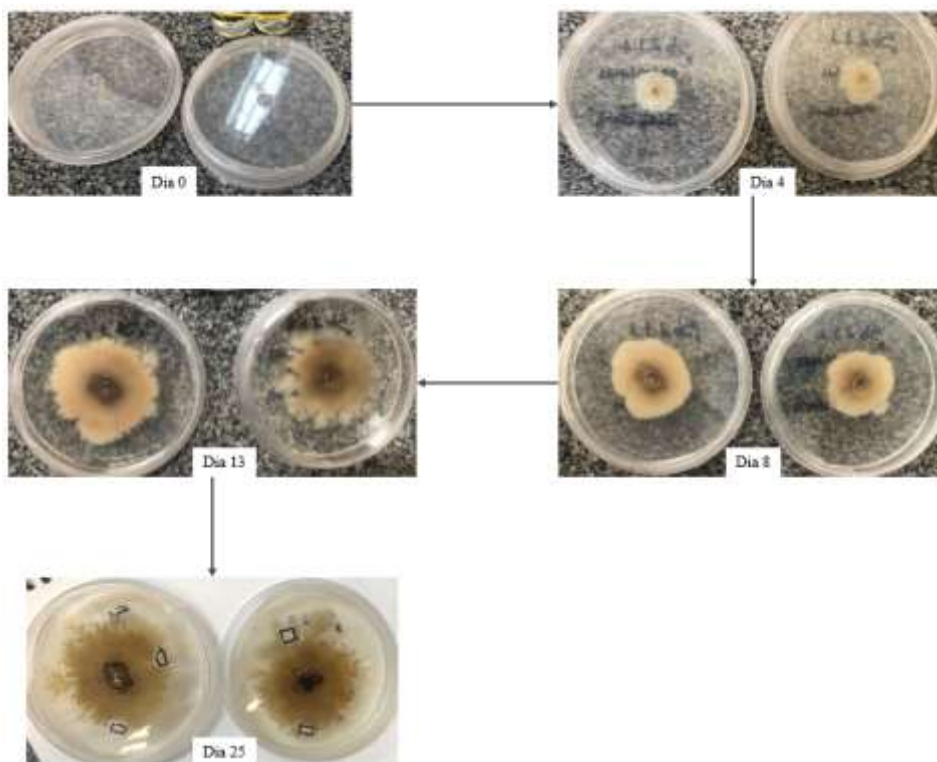
Figura 40 - Procedimento de cultivo dos fungos endofíticos das folhas de *Sorocea bonplandii*.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Assim, com o crescimento do fungo foi necessário a realização de repiques em suas extremidades, que são suas partes mais jovens, para o isolamento do fungo. Assim, foi necessário observar seu crescimento para a comprovação visual do isolamento e a comprovação de obtenção de apenas um fungo endofítico de *S. bonplandii* proveniente da folha jovem, de maneira a prover uma observação da capacidade antifúngica da planta principalmente quando madura, dado que não houve crescimento de fungos na folha madura. A Figura 41 mostra o crescimento do fungo ao longo de 25 dias.

Figura 41 - Crescimento do fungo isolado das folhas de *S. bonplandii*.



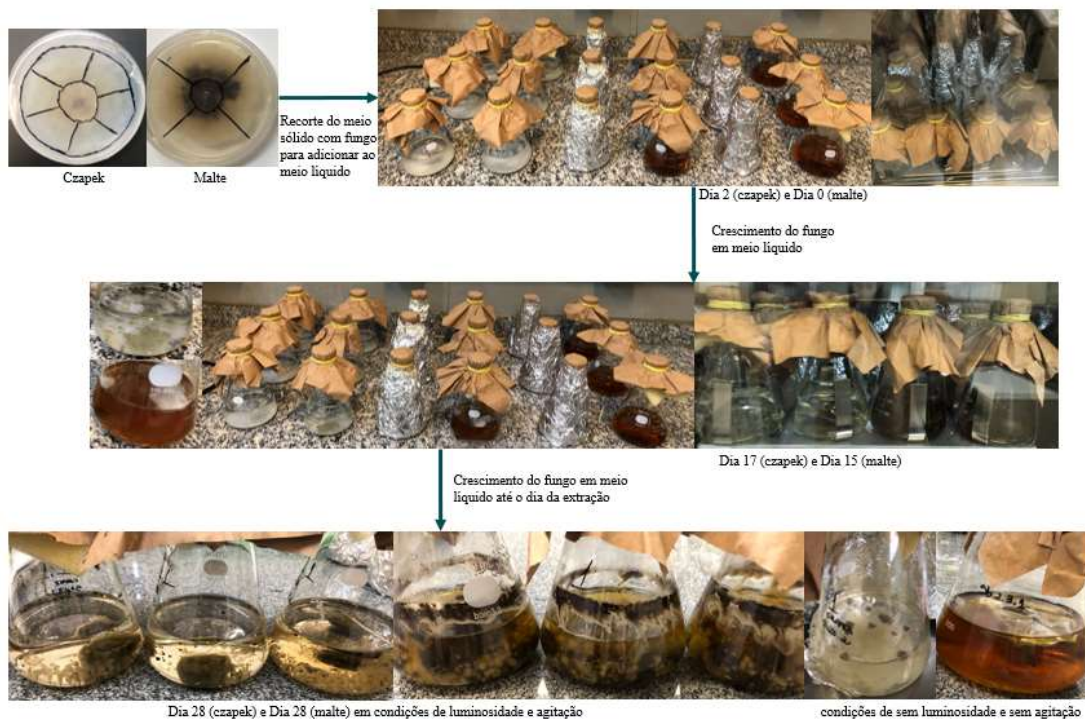
Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Com isso, foi possível o isolamento visual de um fungo endofítico da planta o qual foi identificado como *Chaetomium atrobrunneum* e, prosseguir para o cultivo em meio líquido visando a detecção dos metabólitos secundários desse microrganismo.

4.2.2 CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO

O cultivo em meio líquido tem o objetivo de focar na obtenção dos metabólitos secundários pelo crescimento do fungo por 28 dias, seguido pela extração. A Figura 42 evidencia o crescimento do fungo ao longo dos 28 dias dada as variáveis de cultivo a partir de uma parte da placa de petri com o fungo crescido por cerca de 10 dias, o qual para o cultivo em malte foi utilizado 1/4 da placa de petri com PDA e para czapek foi utilizado 1/6 de placa de petri com czapek dado a contaminação de uma das placas, excluindo o miolo das placas.

Figura 42 - Crescimento em meio líquido do fungo isolado das folhas de *S. bonplandii*.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Com o crescimento do fungo foi necessária sua filtração para a obtenção do meio líquido, na Figura 43 mostra o meio líquido filtrado, o qual evidencia colorações diferentes de acordo com cada condição indicando variação no crescimento do fungo e possivelmente gerações diferentes de metabólitos.

Figura 43 - Filtrado do meio de cultivo líquido em Czapek e Malte.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Assim, foi possível a realização da extração do meio líquido com acetato de etila seguido pela utilização do rotaevaporador para a retirada do solvente, obtendo os extratos dos fungos de acordo com cada condição e do branco, que é referente ao meio de cultivo. A Tabela 9 evidencia a massa de extrato bruto obtida de acordo com o planejamento fatorial.

Tabela 9 - Planejamento fatorial do cultivo do fungo com informação da massa do extrato bruto.

Ensaio	A (meio de cultivo)	B (agitação)	C (luminosidade)	Extrato bruto (mg)
1	-1	-1	-1	245,6
2	-1	-1	1	44,9
3	-1	1	-1	46,9
4	-1	1	1	101,0
5	1	-1	-1	96,7
6	1	-1	1	111,4
7	1	1	-1	41,2
8	1	1	1	34,9
Branco Czapek	-	-	-	152,6
Branco Malte	-	-	-	10,0

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

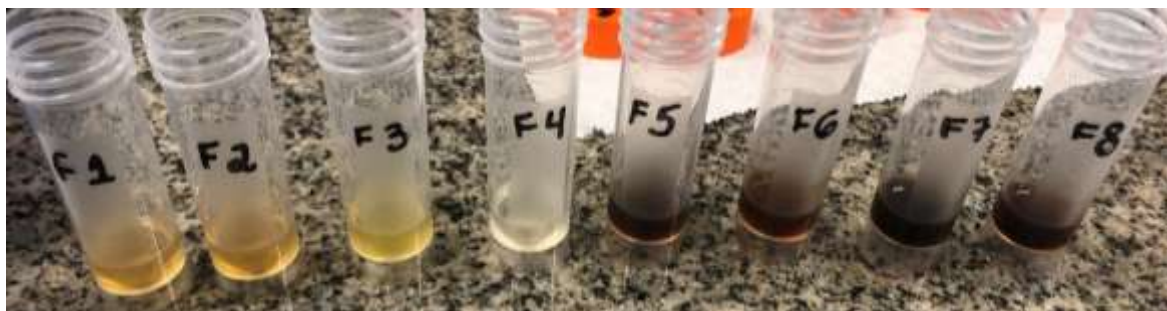
As informações de massa dos extratos brutos foram importantes para futuras análises as quais requerem uma alíquota e para a realização de algumas análises estatísticas. Foi observado na Tabela 9 que os ensaios do branco em Czapek (ensaio 1) possuiu uma massa muito alta, devido à presença de sais ou compostos sólidos que decantaram, pela sua insolubilidade no acetato de etila.

4.2.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS FÚNGICOS – *MOLECULAR NETWORKING*

Com os extratos brutos foi necessário uma investigação mais profunda da sua composição e evidenciou a importância do planejamento fatorial para uma diversificação de metabólitos secundários, de maneira a clarear o comportamento do fungo e possivelmente

suas preferências quanto as condições de cultivo. A Figura 44 mostra os extratos passados pelo *clean up*, prontos para a análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas (HPLC-ESI-IT-MS) o qual mostram uma diferença de coloração.

Figura 44 - Extratos limpos do fungo.

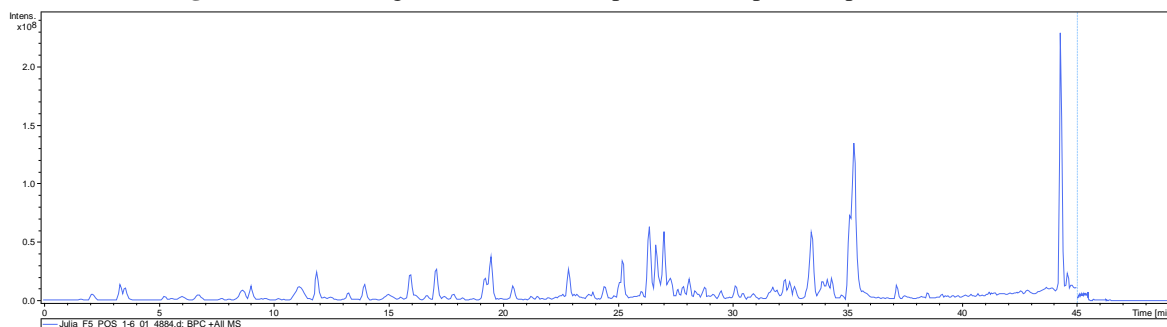


Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

4.2.3.1 HPLC-ESI-IT-MS e Molecular networking no modo positivo

A análise do modo positivo permite a observação de cátions. Observa-se na Figura 45 o cromatograma de íons totais.












Figura 45 - Cromatograma de íons totais para o modo positivo para o Ensaio 5.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Analisando os cromatogramas de íons totais pode-se observar vários picos que posteriormente, foi realizado o tratamento dos dados dos espectros de massa junto ao banco de dados da plataforma GNPS, sendo possível obter o gráfico do *molecular networking* para os dados gerados no modo positivo dos 8 ensaios mais os brancos. O Quadro 4 evidencia como cada ensaio integrou a arquitetura da rede molecular.

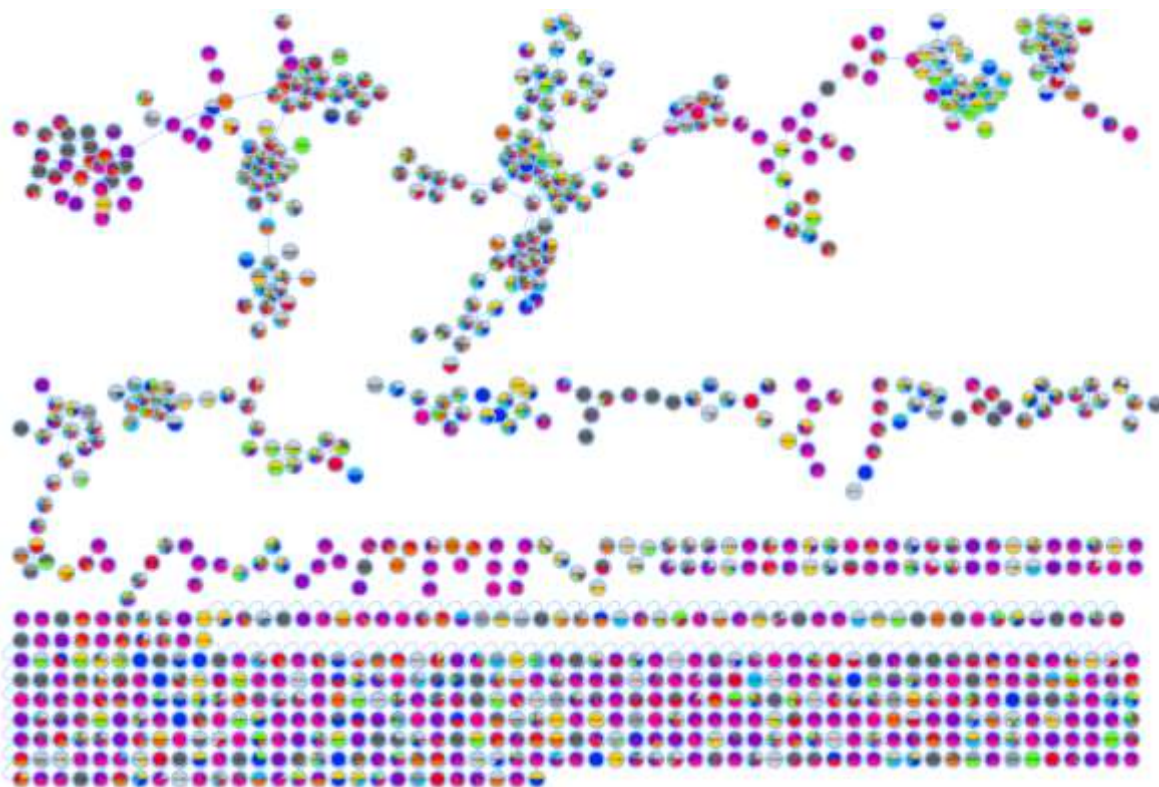
Quadro 4 - Legenda do molecular networking dos extratos fúngicos.

Cor	Ensaio	A (meio de cultivo)	B (agitação)	C (luminosidade)
	Amarelo	1	-1	-1
	Verde	2	-1	1
	Azul claro	3	-1	-1
	Azul	4	-1	1
	Roxo	5	1	-1
	Rosa	6	1	-1
	Vermelho	7	1	1
	Laranja	8	1	1
	Cinza	Branco Czapek	-	-
	Cinza escuro	Branco Malte	-	-
	Cinza claro	Branco	-	-

Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Nesta análise foi possível obter na rede molecular 907 nodos e aproximadamente 60 *clusters*, evidenciados na Figura 46. Uma série de algoritmos presentes na GNPS faz uma correlação espectral associando os compostos estruturalmente similares.

Figura 46 - *Molecular networking* no modo positivo obtido para todos os extratos⁶.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Com base na Figura 46, o qual representa o molecular networking no modo positivo dos extratos, foi possível a anotação de 24 compostos. Assim, a Tabela 15 no APÊNDICE D fornece informações como o ensaio que foi encontrado o composto, como o nome, o m/z , o erro em ppm do m/z , tempo de retenção em segundos, o MQScore que representa o cosseno, ou seja, a similaridade da fragmentação com a base de dados, e o aduto.

A análise do GNPS como plataforma para a anotação de compostos com base nos dados obtidos dos cromatogramas de íons totais pelo equipamento de cromatografia aliado a espectrômetro de massa forneceu a massa e um padrão de fragmentação para cada molécula ionizada. Assim, foi gerado um *mirror match* para cada amostra identificada juntamente com seu valor de cosseno/MQscore que quanto mais próximo seu valor perto de 1 mais a fragmentação da molécula identificada corresponde a fragmentação do banco de dados do GNPS.

⁶*Molecular networking* no modo positivo para os extratos fúngicos está disponível pelo link: <<http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a09b5877424846c9a0c1c9c2504bae49>>.

Com a anotação dos 24 compostos dispostos no Quadro 4, foi possível evidenciar que os ensaios 5 e 6 tem uma similaridade grande de compostos. Isso pode ser explicado pelas similaridades de cultivo que foi o meio de cultivo em malte e sem agitação o qual a luminosidade aparentemente não interferiu significativamente. Temos algumas identificações similares que foram obtidas dos ensaios 1 e 2 que representa meio de cultivo em CZAPEK e sem agitação como evidenciado na Tabela 15.

Com as informações do *molecular networking*, foi possível a visibilidade de alguns compostos presentes em cada fração, identificar alguns picos do cromatograma de íons totais com base na informação de massa, tempo de retenção e fragmentação. Entretanto foi obtido informações apenas dos compostos identificados, mas existem muitos outros compostos não identificados na amostra.

Dessa forma, evoluindo nas análises na plataforma do GNPS com o DEREPLICATOR+, NAP e MS2LDA, junto do *molecular networking* que foram relacionadas pelo MolNetEnhancer. Foi possível a identificação de Classes de Compostos pela geração da rede molecular diferenciando sua classe por cor como descrito no Quadro 3, e evidenciado na Figura 47.

Figura 47 - MolNetEnhancer dos extratos brutos de *Chaetomium atrobrunneum* no modo positivo⁷.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2022).

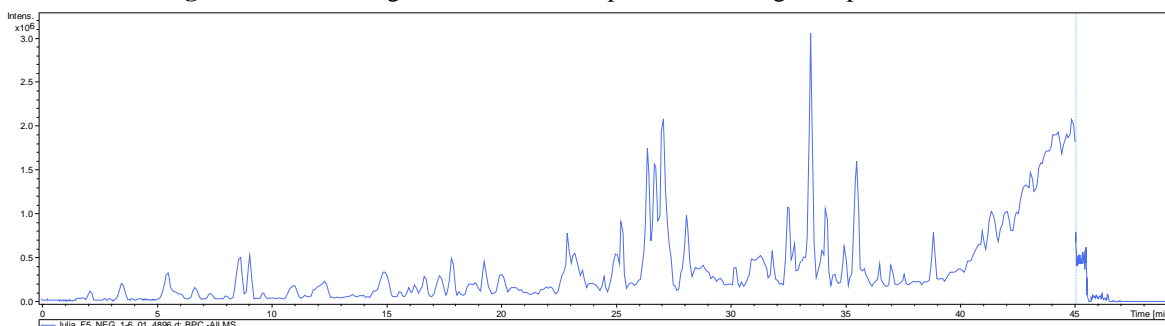
Com a análise da Figura 47, os agrupamentos do *molecular networking* evidenciam uma dominância da classe de compostos orgânicos heterocíclicos nos extratos brutos de *C. atrobrunneum* no modo positivo. Comparando em relação as classes identificadas na análise da planta, Figura 32, é possível observar uma variedade de classes moleculares maiores para o fungo, podendo evidenciar uma maior diversidade química.

⁷ Molecular netowking do MolNetEnhancer no modo positivo do extrato fúngico está disponível: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=7029f19e9a3a4878ac2fc52dd87a8ade>>.

4.2.3.2 HPLC-ESI-IT-MS e Molecular networking no modo negativo

A análise do modo negativo permite a observação de ânions. Observa-se na Figura 48 o cromatograma de íons totais.

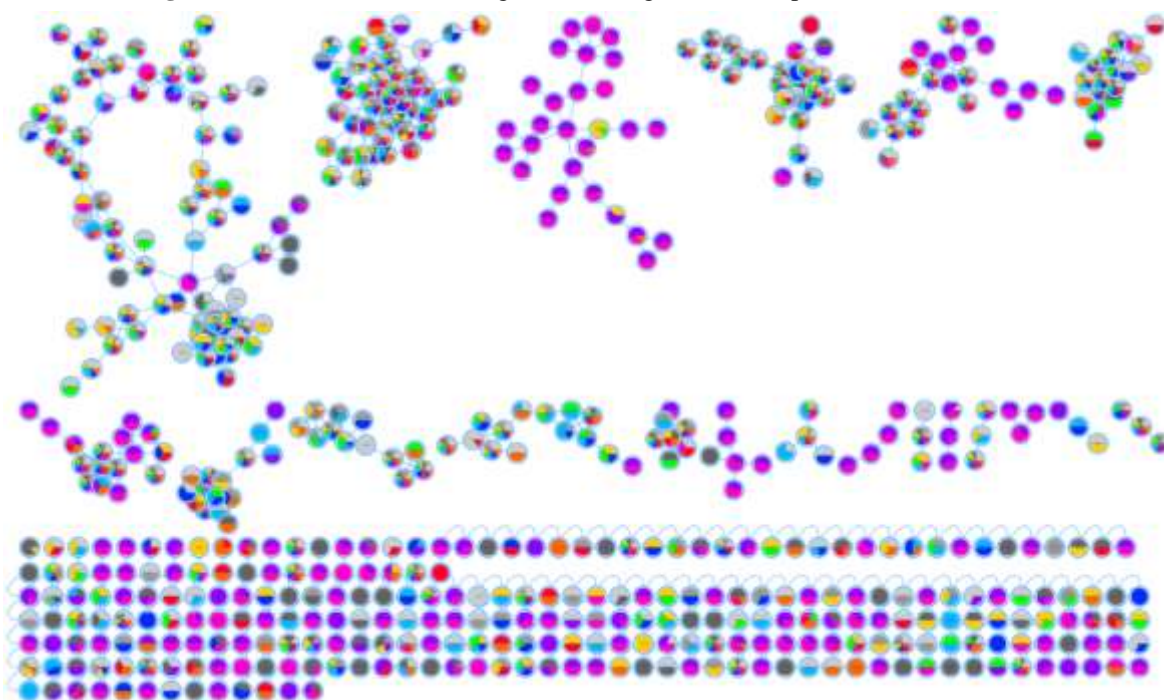
Figura 48 - Cromatograma de íons totais para o modo negativo para o Ensaio 5.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

Analisando os cromatogramas de íons totais foi observado vários picos, assim, foi realizado o tratamento dos dados dos espectros de massa junto ao banco de dados da plataforma GNPS, sendo possível obter o gráfico do *molecular networking*, demonstrado na Figura 49. Os dados gerados no modo negativo dos 8 ensaios mais os brancos estão evidenciados na Tabela 16 no APÊNDICE D o qual cada ensaio integrou a arquitetura da rede molecular. Nesta análise foi possível obter 589 nodos e aproximadamente 40 clusters.

Figura 49 - Molecular networking no modo negativo obtido para todos os extratos⁸.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2021).

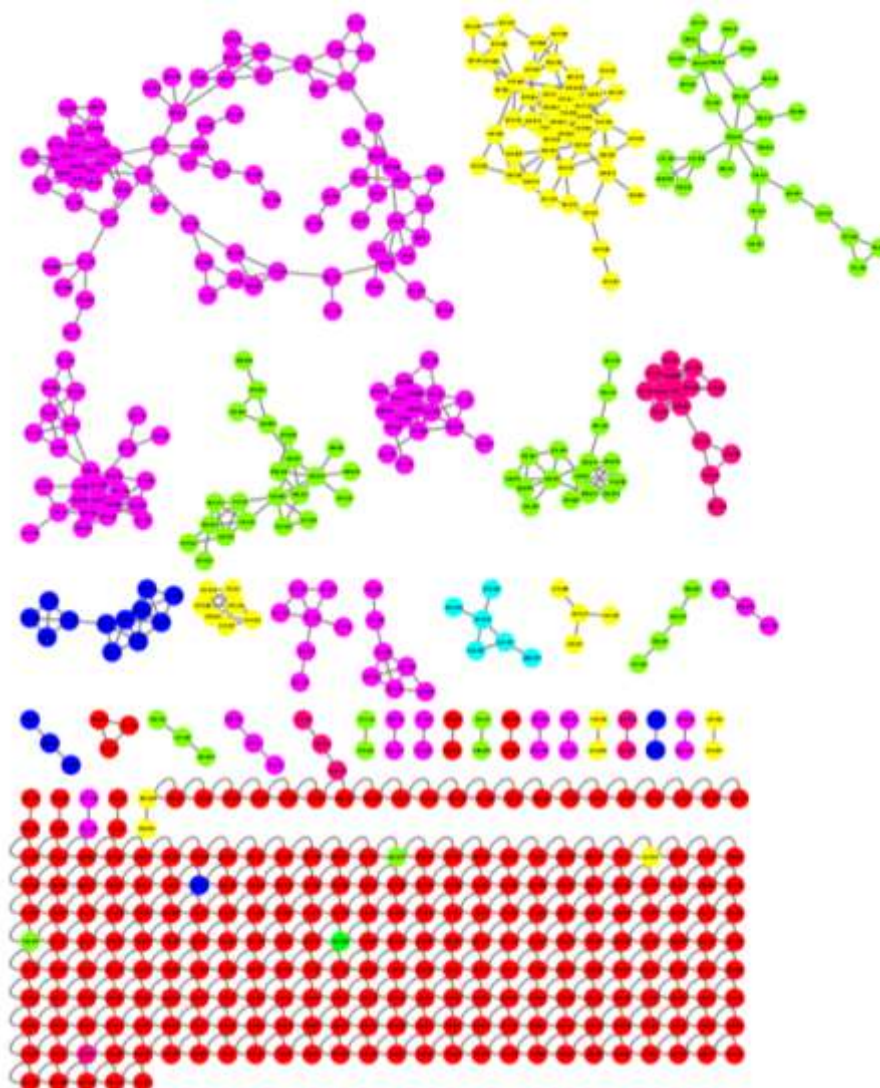
Com base na Figura 49, foi possível a anotação de 14 compostos. Assim, a Tabela 16 fornece informações como o ensaio que foi encontrado o composto, como o nome, o m/z , o erro em ppm do m/z , tempo de retenção em segundos, o MQScore que representa o cosseno, ou seja, a similaridade da fragmentação com a base de dados, e o aduto.

Com a anotação de 14 compostos dispostos na Tabela 16 foi possível a observação que os ensaios 5 e 6 tem uma similaridade grande de compostos. Isso pode ser explicado pelas similaridades de cultivo que foram o meio de cultivo em malte e sem agitação, o qual a luminosidade aparenta não interferir significativamente.

Dessa forma, utilizando o DEREPLICATOR+, NAP, MS2LDA somado ao *molecular networking* que foram relacionadas pelo MolNetEnhancer. Essa análise identificou as similaridades dos compostos presentes com a finalidade de identificação de As Classes de Compostos foi identificado pela rede molecular de acordo com a designação de cor descrita no Quadro 3, como evidenciado na Figura 50.

⁸*Molecular networking* do MolNetEnhancer no modo negativo dos extratos fúngicos está disponível: <<http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2062eb16a9dd4f3bbb9c46f41278e27d>>.

Figura 50 - MolNetEnhancer dos extratos brutos de *Chaetomium atrobrunneum* no modo negativo⁹.



Fonte: Elaborado pela AUTORA (2022).

Com a análise da Figura 50, fica evidente o agrupamento do *molecular networking* pela semelhança estrutural e de classe, mas evidência um grande cluster da classe de compostos orgânicos heterocíclicos, e também a presença de benzenoides e compostos lípidicos nos extratos brutos de *C. atrobrunneum* no modo negativo. Entretanto, em relação ao modo positivo de análise do extrato do fungo, é notável uma maior variedade de compostos gerando grandes clustes de várias classes ao invés de uma única classe. E comparando em relação as classes identificadas na análise da planta, Figura 38, é possível observar uma variedade semelhante de classes moleculares e também da clusterização.

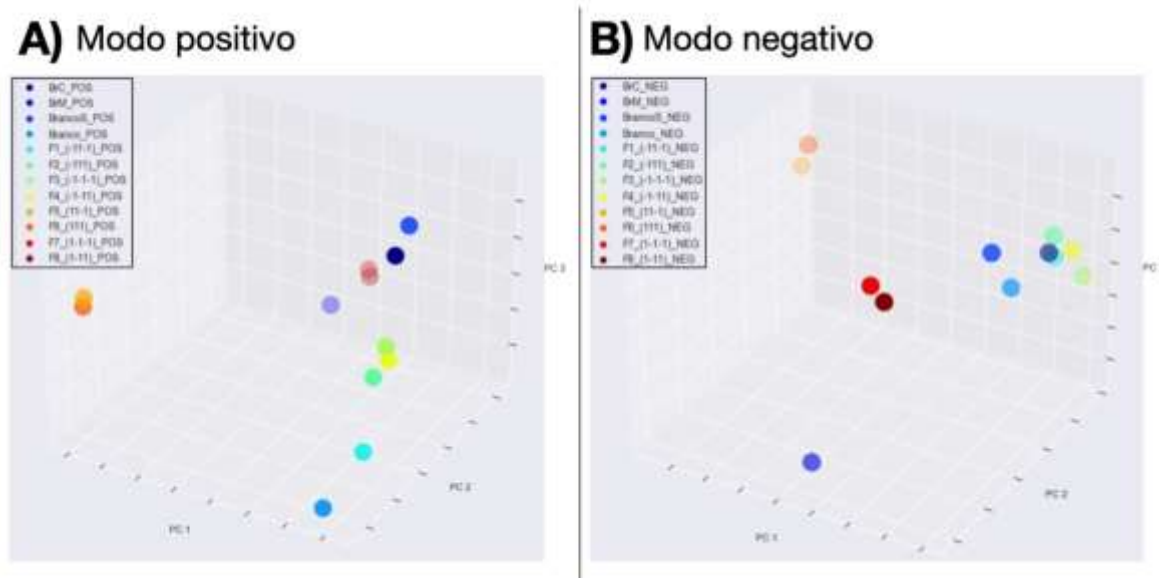
⁹*Molecular networking* do MolNetEnhancer no modo negativo do extrato fúngico está disponível no link: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=c2b9f51f04484eb19be5187ba998fb2a>>.

Assim, a identificação dos compostos dessas classes com o *molecular networking* é uma forma de identificar semelhanças entre estruturas não identificadas para a finalidade de elucidação desses compostos e isolamento do mesmo.

4.2.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS FÚNGICOS - PCA

A análise de componentes principais realizadas por software para o tratamento dos dados obtidos pelo GNPS, assim foi possível a geração do gráfico da PCA o qual agrupa as amostras com maior similaridade em um gráfico tridimensional como evidenciado na Figura 51.

Figura 51 - Gráfico 3D da Análise de Componentes Principais dos Extratos Fúngicos

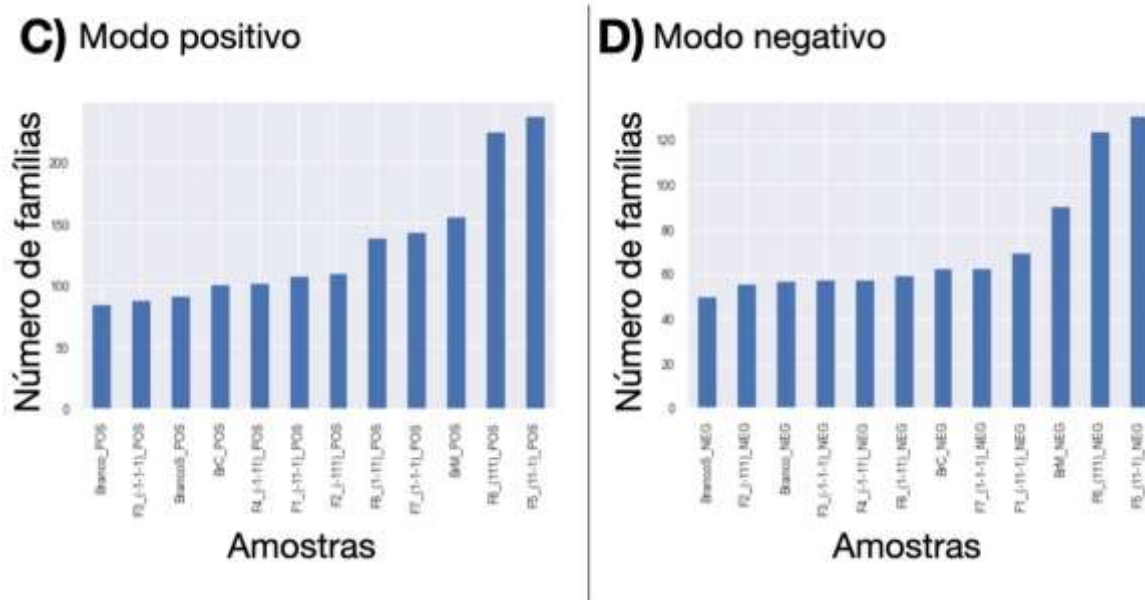


Fonte: NuBBE (2022).

Com a geração dos gráficos tridimensionais evidenciados na Figura 51 para os modos positivos e negativos que evidência similaridades entre as amostras e, assim, associando a diversidade molecular pela quantidade de famílias como demonstrado na Figura 52. A Figura 51 (a) para o modo positivo, mostra que as amostras de extrato de Malte sem agitação ficaram de um lado do gráfico enquanto as outras amostras ficaram do lado oposto, instigando a uma maior diferença de composição. A Figura 51 (b) para o modo negativo, evidencia que as amostras de Branco, com exceção da amostra BrancoM que é o Branco em meio de malte, e as amostras dos extratos realizados em CZAPEK (F1, F2, F3 e F4) mostram

semelhanças por terem ficado agrupadas, enquanto para os extratos realizados em Malte seu agrupamento se dá pela diferença de agitação.

Figura 52 - Número de famílias da PCA dos Extratos Fúngicos.



Fonte: NuBBE (2022).

Com base na Figura 52, é possível analisar que para ambos os modos realizados as amostras 5 e 6 se mostram com maior diversidade molecular por terem um maior número de famílias. O modo positivo se mostra com uma quantidade ainda maior de famílias evidenciando uma maior tendência da amostra a se protonar. As amostras 5 e 6 mostram uma tendência do fungo na produção de metabólitos que é no meio de Malte e sem agitação, evidenciando uma proposta para um estudo mais aprofundado dos metabólitos do *C. atrobrunneum*.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a análise do extrato da *Sorocea bonplandii* em HPLC mostrou que os compostos presentes na plântula são mais polares, estando majoritariamente numa porcentagem de Acetonitrila de 5 a 30%, que através do *molecular networking* foi possível a descoberta de 24 compostos, com possíveis propostas de fragmentação, e a uma classificação da maioria dos compostos como sendo flavonoides, de forma mais precisa flavonoides glicosilados porque na fragmentação as perdas mais comuns foram de açúcares como ramnoses e glicoses.

Com o *molecular networking* e os cromatogramas de íons totais do extrato (modo negativo e positivo) foi possível a elencar alguns compostos majoritários através de dados de m/z e tempo de retenção, mas alguns picos majoritários não foram identificados indicando uma necessidade de um refinamento na análise como o fracionamento e a análise do extrato na plataforma UNIFI.

O fracionamento do extrato com o objetivo de isolamento de compostos majoritários teve como início a separação do extrato em 13 frações o qual foram analisadas fazendo uso da abordagem do *molecular networking*, e foi possível anotar 101 e 57 metabólitos, no modo positivo e no modo negativo respectivamente. Associando as informações da rede molecular e os cromatogramas de íons totais do extrato (modo negativo e positivo) foi possível a elencar alguns compostos majoritários através de dados de m/z e tempo de retenção. E infelizmente alguns dos picos majoritários não foram identificados, indicando a possibilidade de serem inéditos e nos orientando a tomar ações para uma possível purificação visando a elucidação estrutural fazendo uso de MS e RMN.

A análise das frações do extrato na plataforma UNIFI permitiu anotar 67 e 47 metabólitos, (no modo positivo e no modo negativo respectivamente), permitindo uma comparação dos dados obtidos com a plataforma GNPS. E a detecção de compostos presentes na literatura para essa planta apesar dos estudos serem das raízes da planta, evidenciando uma característica de compostos da planta como um todo. Assim, a evolução da análise com o MolNetEnhancer junto com o *molecular networking* possibilitou a identificação de classes de compostos desconhecidos pelas semelhanças entre estruturas para um maior entendimento da complexidade de *S. bonplandii* com a finalidade de elucidação desses compostos e isolamento dos mesmos.

O cultivo dos fungos endofíticos das folhas de *S. bonplandii* permitiu o isolamento de um único fungo em meio sólido, o qual foi submetido ao cultivo em meio líquido de acordo com procedimento da análise fatorial proposta. Foram obtidos oito extratos para a anotação dos metabólitos.

A análise realizada permitiu a identificação de 24 e 14 compostos no modo positivo e negativo, respectivamente, o qual majoritariamente foram dos ensaios 5 e 6 que representam um meio de cultivo de malte e estático, ou seja, sem agitação. Podendo ser a evidência da preferência de produção metabólica, pelo fungo, em comparação ao meio de cultivo em czapek que é um meio menos. A quantidade de nodos presentes e de compostos anotados, deixa em evidência a grande possibilidade de descobertas por novos metabólitos em fungos endofíticos de plantas nativas brasileiras. De forma, que as análises da rede molecular do MolNetEnhancer possibilitaram a identificação das classes desses compostos não identificados e a PCA evidenciou os extratos com maior diversidade molecular, com o intuito de direcionar as análises.

Esse trabalho mostra inúmeros potenciais da *Sorocea bonplandii* como produto natural desde sua composição com capacidade antiulcerogênica até a descoberta de seu fungo endofítico, mas isso se mostra só o início para um futuro para isolamento de compostos da planta, isolamento de compostos do fungo, avaliar a composição das plantas jovens e maduras em relação a crescimento fúngico e a biotransformação. Dessa forma, é evidente a importância da exploração racional da biodiversidade como alavanca para o desenvolvimento da humanidade em agregar estudo, técnicas e tecnologia a medicina popular, principalmente a biodiversidade brasileira o qual se mostra pouco explorada, como fonte de produtos de valor agregado como conhecimento, fármacos e outros que deveriam ser acessíveis a todos e pilar para a sustentabilidade.

REFERÊNCIAS

- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-45, 2011.
- BERNARDINI, S. *et al.* Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.
- BERTRAND, S. *et al.* Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- BODE, H. B. *et al.* Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBiochem**, v. 3, n. 7, p. 619-27, 2002.
- CARNEIRO, E. **A conquista da Amazônia**. Ministério da Viação e Obras Públicas, Coleção Mauá, Rio de Janeiro, 1956.
- CALIXTO, J. B. *et al.* Pharmacological analysis of the methanolic extract and Sorocein A, a new diels-alder compound isolated from the roots of *Sorecea bonpladii* bailon in the rat uterus and guinea pig ileum. **General Pharmacology: The Vascular System**. v. 24, n. 4, p. 983-989, 1993.
- CARDOSO, C. L.; CARVALHO, D. R.; MARTINS, O. P. **Triagem pontual de inibidores para as enzimas acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE) e butirilcolinesterase humana (BChE)**. Relatório, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, 2020.
- CASADO-HIDALGO, G. *et al.* Mesostructured Silica-Coated Magnetic Nanoparticles to Extract Six Opium Alkaloids in Poppy Seeds Prior to Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1587, 2021.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Unicamp, p. 281, 1997.
- CRAG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Natural product drug discovery in the next millennium**. *Pharmaceutical Biology*, v. 39, suppl. 1, p. 8-17, 2001.
- DEGANI, A. L. G. *et al.* Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na escola**, n° 7, 25 p., 1998.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. **A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery**. *Metabolites*, v. 2, n. 2, 2012.

- ERNEST, M. et al. **MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools**. *Metabolites*, v. 9, n. 7, p. 144–, 2019.
- FANG, Z. Z.; GONZALEZ, F. LC–MS-based metabolomics: an update. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 8, p. 1491–1502, 2014.
- GARYALI, S.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan yew. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1372-80, 2013.
- GONZALEZ, F. G. *et al.* Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bonplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001.
- HANO, Y. *et al.* Sorocenols A and B, two new isoprenylated phenols from the root bark of *Sorocea bonplandii* baillon. **Heterocycles**, v. 41, n. 5, p. 1035-1043, 1995.
- HANO, Y. *et al.* **Sorocenols C-F, four new isoprenylated phenols from the root bark of *Sorocea bonplandii* baillon**. Elsevier science, 1995.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.
- HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 323-342, 2008.
- HWANG, E. I. *et al.* Chaetoatrosin A, a Novel Chitin Synthase II Inhibitor Produced by *Chaetomium atrobrunneum* F449. **The Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 3, p. 248–255, 2000.
- JOHANSEN, K. T.; WUBSHET, S. G.; NYBERG, N. T. HPLC–NMR Revisited: Using Time-Slice High-Performance Liquid Chromatography–Solid-Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance with Database-Assisted Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 6, p. 3183-3189, 2013.
- KANG, K. B. *et al.* Targeted Isolation of Neuroprotective Dicoumaroyl Neolignans and Lignans from *Sageretia theezans* Using *in Silico* Molecular Network Annotation Propagation-Based Dereplication. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 8, p. 1819–1828, 2018.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 2, 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

- MAGUIRE, G. Systems Biology Approach to Developing “Systems Therapeutics”. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 5, p. 453-455, 2014.
- MARASCHIN-SILVA, F.; AQÜILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n.1, p. 61-69, 2006.
- MAREE, J. *et al.* The application of GC–MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 130, n. 0, p. 172-181, 2014.
- MOHIMANI, H. *et al.* Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4035, 2018.
- MONTEIRO, A. F. **Perfil metabólico das raízes de *Senna spectabilis* e exploração de fungos associados à sua microbiota para produção e biotransformação de metabólitos secundários**, Dissertação de Doutorado, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55 - 63, 1983.
- OKEKE, B. *et al.* **Identification of mycotoxin-producing fungal strains: A step in the isolation of compounds active against rice fungal diseases**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 10, p. 1731–1735, 1993.
- PAVANI, V. D., **Co-cultivo de micro-organismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis***, Dissertação de Doutorado, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2018.
- PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.
- PYE, C. R. *et al.* Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601, 2017.
- REGINALDO, F. P. S. **Alcaloides de *Selaginella convoluta*: investigação química e do potencial antifúngico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.
- SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 75-89, 2007.

SILVA, B. A. da *et al.* **Antioxidant capacity and phenolics of *Pouteria macrophylla*, an under-utilized fruit from Brazilian Amazon.** *European Food Research and Technology*, 2012.

SILVA, R. da *et al.* Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. ***PLOS Computational Biology***, v. 14, n. 4, p. e1006089, 2018.

SPRINGER. **Appendix A – Recipes for chemical test reagents.** Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/bbm%3A978-1-4615-5809-5%2F1.pdf>>. Acessado em 02 de novembro de 2021.

TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPENMR technique in metabonomics. ***Magnetic Resonance in Chemistry***, v. 47, n. S1, p. S157-S162, 2009.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. ***Microbiologia***. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VIEIRA, N. C. **Estudo químico de fungos da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando abordagem OSMAC e ferramentas analíticas do estado da arte para anotação e caracterização de metabólitos.** Tese de Doutorado parcial, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/192846/vieira_nc_dr_araiq_par.pdf>.

WANDY, J. *et al.* MS2LDA.org: web-based topic modelling for substructure discovery in mass spectrometry. ***Bioinformatics***, v. 34, n. 2, p. 317-318, 2018.

WANG, H. *et al.* *Chaetomium atrobrunneum* and *Aspergillus fumigatus* in multiple tracheal aspirates: Copathogens or symbiosis. ***Journal of Microbiology, Immunology and Infection***, v. 49, n. 2, p. 281 – 285, 2016.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. ***Nature Biotechnology***, v. 34, p. 828–837, 2016.

WHITE, T J; BRUNS T LEE, S; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** PCR protocols. A guide to methods and applications (Innis, M. A.; Gelfaud, D. H.; Sninsky, J. J. & White, T. J. eds), p. 315 – 322. Academic Press, San Diego, CA, 1990.

WHITE PAPER WATERS B. **An overview of the principles of MSE the engine that drives MS performance.** Disponível em: <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004036en.pdf>>. Acesso em: 13 de julho de 2021.

YUAN, H. *et al.* The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016

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

ZHAN, M.; CHINGOZHA, L.; LU, H. Enabling Systems Biology Approaches Through Microfabricated Systems. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 19, p. 8882 – 8894, 2013.

APÊNDICE A – ANOTAÇÃO MOLECULAR DO EXTRATO BRUTO DE *S. BONPLANDII*

Os resultados da análise dos dados de HPLC-MS/MS associados à plataforma do GNPS, para cada fração (análises em modo negativo e positivo, como descrito na Tabela 10) forneceram o seguinte conjunto de moléculas (dados *ipsis litteris*), permitindo a anotação de 24 compostos únicos.

Tabela 10 - Anotação de compostos do molecular networking do extrato bruto de *Sorocea bonplandii*.

Nº	Nome	Modo	t _r (min)	Massa (m/z)	Aduto
1	4-[(E)-3-[-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-ona	Positivo	23,793	525,0	[M+Na] ⁺
2	Chlorogenic acid	Negativo	10,164	353,5	M-H
		Positivo	9,733	355,2	[M+H] ⁺
3	3-Feruloylquinic acid 3-O-Feruloylquinic acid	Positivo	17,016	369,0	M+H
		Negativo	16,725	367,6	[M-H] ⁻
4	Maltose	Positivo	1,596	325,0	M+H-H ₂ O
5	Methyl 2-[[6-O-(beta-D-xylopyranosyl)-beta-D-glucopyranosyl]oxy]benzoate	Positivo	13,853	469,4	M+Na
6	Labetalol	Positivo	3,391	328,0	M+H
7	Quercetin-3-O-glc-1-3-rham-1-6-glucoside	Positivo	15,710	773,4	M+H
8	Rutin	Positivo	23,312	611,3	M+H
		Negativo	23,222	609,6	[M-H] ⁻
9	Quercetin-3,4'-O-di-beta-glucopiranoside Que 3,4'-di-Glc Quercetin 3,4'-diglucoside	Positivo	19,444	627,2	[M+H] ⁺
10	Quercetin-hexoside-di-ramnoside	Positivo	18,782	757,3	M+H
11	Luteolin-7-O-beta-rutinoside	Positivo	26,079	595,4	M+H

12	Nicotiflorin	Negativo	26,283	593,6	[M-H] ⁻
13	Kaempferol-3- <i>O</i> -sophroside	Positivo	21,163	611,2	[M+H] ⁺
		Negativo	22,306	609,6	[M-H] ⁻
14	Kaempferol 3- <i>O</i> -ramninoside	Positivo	22,619	741,6	[M+H] ⁺
15	3-[3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-5-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	Negativo	19,496	625,6	M-H
16	Manghaslin	Negativo	20,206	755,7	[M-H] ⁻
17	4-amino-2-hydroxy-5-[[1-hydroxy-1-(5-oxo-6-bicyclo[4.1.0]hept-3-enyl)propan-2-yl]amino]-5-oxopentanoic acid	Positivo	1,399	326,4	[M+H] ⁺
18	Methoxy-quercetin-3- <i>O</i> -hexoside	Positivo	21,399	478,6	M+H
19	Kaempferol 3-rutinoside 4'-glucoside	Negativo	15,858	755,7	[M-H] ⁻
20	Methoxy-myricetin-3- <i>O</i> -hexoside	Positivo	18,811	494,6	M+H
21	Spiraeoside	Negativo	24,280	463,4	M-H
22	Kaempferol-7- <i>O</i> -hexoside	Positivo	10,484	449,4	M+H
23	Peonidin 3- <i>O</i> -glucoside cation	Positivo	33,281	462,5	Cat
24	Hyperoside	Positivo	24,337	465,1	M+H

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2019.

APÊNDICE B – ANOTAÇÃO MOLECULAR DO GNPS DAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE *S. BONPLANDII*

Os resultados da análise dos dados de HPLC-MS/MS associados à plataforma do GNPS, para cada fração (análises em modo negativo e positivo, como descrito nas Tabelas 11 e 12 respectivamente) forneceram o seguinte conjunto de moléculas (dados *ipsis litteris*), permitindo a anotação de 102 e 58 compostos diferentes respectivamente para cada modo de ionização.

Tabela 11 - Compostos detectados no modo positivo via HPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de *S. bonplandii*.

Fração	Nome do Composto	Massa <i>m/z</i>	Cosseno	Tempo de retenção (s)	Modo	Aduto
1	L-Arginine	175,15	0,929848	162,96	Positivo	M+H
	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	326,25	0,802995	118,82	Positivo	2M+H
	7,8-Dihydro-L-Biopterin	224,10	0,803763	551,43	Positivo	M+H-H ₂ O
	Linoleic acid linoleate	280,16	0,887204	130,27	Negativo	M-H
	sweroside	358,29	0,820763	295,86	Positivo	[M+H] ⁺
	Inosine, 2'-deoxy-	268,15	0,913028	586,14	Positivo	M+NH ₄
	Hexaethylene glycol	283,24	0,85734	1636,54	Positivo	M+H
	Colchicine	326,25	0,755262	190,14	Positivo	325.1
	<i>cis</i> -7-Hexadecenoic acid methyl ester	268,12	0,800906	617,15	Positivo	M+H
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Carnosol	329,20	0,766805	185,37	Positivo	M+H
	α , β -Trehalose	364,02	0,839623	246,13	Positivo	M+Na
	Quercetin-3-O-pentoside	434,38	0,91543	359,78	Positivo	M+H
2	Polysaccharide Hexose x3	527,41	0,716945	326,18	Positivo	M+Na
	NCGC00385348-01!7-[3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-3-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one	562,24	0,730458	908,51	Positivo	M+H
	NCGC00384944-01_C21H28O14_	525,26	0,900374	618,04	Positivo	M+Na
	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]benzoate	470,66	0,801809	667,80	Positivo	M+Na
	Camptothecin	347,20	0,807185	320,49	Positivo	M+H
	<i>N</i> -Fructosyl isoleucine	294,27	0,784814	236,77	Positivo	M+H
	Linoleic acid linoleate (18:2(n-6))	280,16	0,887204	130,27	Negativo	M-H
	IAA-Val	276,21	0,783481	277,11	Positivo	[M+H] ⁺
	9-methoxy-7-[4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-	473,30	0,743341	1148,11	Positivo	[M+H] ⁺

	yl]oxyphenyl)-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one					
	2-(3-hydroxy-5-methoxyphenoxy)-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol sweroside	302,18	0,741011	184,46	Negativo	[M-H] ⁻
	<i>trans</i> -EKODE-(<i>E</i>)-Ib	358,29	0,820763	295,86	Positivo	[M+H] ⁺
	Pantothenic acid	310,26	0,74328	375,65	Negativo	M-H
		242,18	0,911112	168,46	Positivo	M+Na
	Inosine, 2'-deoxy-	220,11	0,775321	173,93	Positivo	M+H
	Chlorogenic acid	268,15	0,913028	586,14	Positivo	M+NH ₄
	α , β -Trehalose	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Rubranoside B	364,02	0,839623	246,13	Positivo	M+Na
		464,20	0,77335	648,58	Negativo	M-H
	Saponarin Apig-6-C-Glc-7-Glc apigenin-6-C-glucoside -7-O-glucoside Isovitexin-7-O-glucoside Saponaretin-7-O-glucoside Isovitexin-7-O- β -D-glucopyranoside	595,32	0,771027	911,89	Positivo	[M+H]
	quercetin-3-O-pentoside	434,38	0,91543	359,78	Positivo	M+H
3	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-{{6-O-(β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy}benzoate	470,66	0,801809	667,80	Positivo	M+Na
	NCGC00180266-02!3,8-dihydroxy-6-methyl-9-oxoxanthene-1-carboxylic acid	286,09	0,734333	84,85	Positivo	M+H
	Camptothecin	347,20	0,807185	320,49	Positivo	M+H
	<i>N</i> -Fructosyl isoleucine	294,27	0,784814	236,77	Positivo	M+H
	Napelline	361,08	0,779175	134,62	Positivo	M+H
	Indole-3-acetyl-L-aspartic acid Indoleacetylaspartate IAASP Indolyl-3-aspartic acid IAA-L-Asp (Indoleacetyl) aspartic acid Indol-3-ylacetylaspartic acid Indole-3-acetylasparaginic acid (Indole-3-acetyl	292,28	0,721657	347,63	Positivo	[M+H] ⁺
	IAA-Val	276,21	0,783481	277,11	Positivo	[M+H] ⁺
	Leuconolam	328,26	0,73288	387,82	Positivo	M+H
	<i>trans</i> -EKODE-(<i>E</i>)-Ib	310,26	0,74328	375,65	Negativo	M-H
	Inosine, 2'-deoxy-	268,15	0,913028	586,14	Positivo	M+NH ₄
	Hexaethylene glycol	283,24	0,85734	1636,54	Positivo	M+H
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Carnosol	329,20	0,766805	185,37	Positivo	M+H
	Sotalol	274,37	0,837268	724,41	Positivo	M+H
	salazinic_acid	387,22	0,867264	560,25	Negativo	M-H
4	Saponarin Apig-6-C-Glc-7-Glc apigenin-6-C-glucoside -7-O-glucoside Isovitexin-7-O-glucoside Saponaretin-7-O-glucoside Isovitexin-7-O- β -D-glucopyranoside	595,32	0,771027	911,89	Positivo	[M+H]
	quercetin-3-O-hexoside	463,25	0,709071	888,89	Positivo	M+H
	purpactin A	414,26	0,708344	765,14	Negativo	[M-H] ⁻
	NCGC00385348-01!7-[3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-	562,44	0,750223	961,43	Positivo	M+H

	(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-3-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one					
	NCGC00384944-01_C21H28O14_	525,31	0,873632	703,80	Positivo	M+Na
	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]benzoate	470,66	0,801809	667,80	Positivo	M+Na
	Anthocyanidin base + 4O, 2MeO, O-Hex	494,49	0,703515	2249,29	Positivo	M
	Camptothecin	347,20	0,807185	320,49	Positivo	M+H
	Disaccharide(Hex-Pen) + C4H5N3O2	436,36	0,764471	758,77	Positivo	M+H
	Leuconolam	328,26	0,73288	387,82	Positivo	M+H
	9-methoxy-7-[4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-[1,3]dioxolo[4,5- <i>g</i>]chromen-8-one	474,39	0,803466	1212,57	Positivo	[M+H] ⁺
	3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-6-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxy-2-methylpyran-4-one	443,28	0,868169	629,16	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>E</i>)-5-[(1 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-5,5,8 <i>a</i> -trimethyl-2-methylidene-3,4,4 <i>a</i> ,6,7,8-hexahydro-1 <i>H</i> -naphthalen-1-yl]-3-(hydroxymethyl)-2-oxopent-3-enoic acid	331,23	0,81653	246,89	Negativo	[M-H] ⁻
	Prostaglandin F2 α Dimethylamine	367,30	0,780127	589,04	Positivo	M+H
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Chlorogenic Acid (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-[(<i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	355,22	0,915252	335,32	Positivo	[M+H] ⁺
	Carnosol	329,20	0,766805	185,37	Positivo	M+H
	salazinic_acid	387,22	0,867264	560,25	Negativo	M-H
	Saponarin Apig-6- <i>C</i> -Glc-7-Glc apigenin-6- <i>C</i> -glucoside -7- <i>O</i> -glucoside Isovitexin-7- <i>O</i> -glucoside Saponaretin-7- <i>O</i> -glucoside Isovitexin-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	595,32	0,771027	911,89	Positivo	[M+H]
	PitavastatinCa	421,41	0,702689	1237,24	Positivo	M+H
5	NCGC00385345-01_C17H26O12_Cyclopenta[<i>c</i>]pyran-4-carboxylic acid, 1-(β -D-glucopyranosyloxy)-1,4 <i>a</i> ,5,6,7,7 <i>a</i> -hexahydro-5,6-dihydroxy-7-(hydroxymethyl)-, methyl ester, (1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-	443,33	0,776124	1966,82	Positivo	M+Na
	NCGC00384944-01_C21H28O14_	525,26	0,900374	618,04	Positivo	M+Na
	NCGC00380979-01_C15H22O9_ β -D-Glucopyranoside, (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)methyl	369,24	0,704623	750,79	Positivo	M+Na
	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]benzoate	470,66	0,801809	667,80	Positivo	M+Na
	Quercetin-3- <i>O</i> -xyloside	433,33	0,789869	1027,39	Positivo	M+H
	Dihomo- α -linolenic acid (20:3(n-3)) dihomo- α -linolenate (20:3(n-3))	307,11	0,830921	167,07	Negativo	M-H

	Corticosterone (8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-11-hydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15, 16,17-dodecahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-one	348,41	0,742691	2276,07	Positivo	M+H
	CY-25	346,45	0,717549	1793,32	Negativo	M-H
	4-hydroxy-5-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1H-benzo[<i>f</i>][2]benzofuran-3-one	377,94	0,717414	768,25	Negativo	[M-H] ⁻
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-(3,4,5-trimethoxyphenoxy)oxane-3,4,5-triol	501,33	0,709085	1288,43	Positivo	[M+Na] ⁺
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-[[[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[(2 <i>E</i>)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]oxane-3,4,5-triol	487,39	0,850124	1625,55	Positivo	[M+K] ⁺
	Spiraeoside	464,27	0,870018	867,07	Positivo	M+H
	Sphaerophorin	413,23	0,77807	927,42	Negativo	M-H
	Prostaglandin F2α Dimethylamine	367,30	0,780127	589,04	Positivo	M+H
	<i>N</i> -(Dodecanoyl)-1-β-glucosyl-sphing-4-enine	644,42	0,709784	1788,38	Positivo	M+H
	D-(+)-Cellotriose	525,33	0,81252	1437,57	Positivo	M+Na
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Chlorogenic Acid (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-[(<i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	355,22	0,915252	335,32	Positivo	[M+H] ⁺
	Carnosol from	329,20	0,766805	185,37	Positivo	M+H
	salazinic_acid	387,22	0,867264	560,25	Negativo	M-H
	Saponarin Apig-6- <i>C</i> -Glc-7-Glc apigenin-6- <i>C</i> -glucoside -7- <i>O</i> -glucoside Isovitexin-7- <i>O</i> -glucoside Saponaretin-7- <i>O</i> -glucoside Isovitexin-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	595,32	0,771027	911,89	Positivo	[M+H]
6	NCGC00385810-01!	450,06	0,757691	1115,40	Positivo	M+K
	NCGC00385221-01_C23H32O15_α- <i>D</i> -Glucopyranoside, β- <i>D</i> -fructofuranosyl 6- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]-	569,33	0,81333	1011,85	Positivo	M+Na
	NCGC00385084-01_C23H32O15_α- <i>D</i> -Glucopyranoside, 3- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]- β- <i>D</i> -fructofuranosyl	572,88	0,766501	1486,79	Positivo	M+Na
	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6- <i>O</i> -(β- <i>D</i> -xylopyranosyl)- β- <i>D</i> -glucopyranosyl]oxy]benzoate	470,66	0,801809	667,80	Positivo	M+Na
	Feruloyltyramine	265,23	0,807486	1991,26		[M+H] ⁺
	Anthocyanidin base + 4O, 2MeO, O-Hex	494,49	0,703515	2249,29	Positivo	M
	Dihomo-α-linolenic acid (20:3(n-3)) dihomo-α-linolenate (20:3(n-3))	307,11	0,830921	167,07	Negativo	M-H
	Chloramphenicol	321,25	0,821035	503,33	Positivo	[M+H] ⁺

	Corticosterone (8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-11-hydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-one	348,41	0,742691	2276,07	Positivo	M+H
	CY-25	346,45	0,717549	1793,32	Negativo	M-H
	Bungeiside C	453,34	0,723722	992,97	Positivo	[M+Na] ⁺
	7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxochromen-4-one	925,50	0,711309	1838,54	Positivo	[M+Na] ⁺
	4-[(<i>E</i>)-3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	525,44	0,808073	1532,56	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>Z</i>)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	469,34	0,777988	608,92	Positivo	[M+Na] ⁺
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-[[[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[(2 <i>E</i>)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]oxane-3,4,5-triol	487,39	0,850124	1625,55	Positivo	[M+K] ⁺
	Syringin	395,33	0,700131	1524,17	Positivo	[M+Na] ⁺
	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	326,25	0,802995	118,82	Positivo	2M+H
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Chlorogenic Acid (1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3-[(<i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	355,22	0,915252	335,32	Positivo	[M+H] ⁺
7	NCGC00385345-01_C17H26O12_Cyclopenta[<i>c</i>]pyran-4-carboxylic acid, 1-(β -D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-5,6-dihydroxy-7-(hydroxymethyl)-, methyl ester, (1 <i>S</i> ,4a <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7a <i>S</i>)-	443,33	0,776124	1966,82	Positivo	M+Na
	NCGC00385299-01_C17H24O11_Cyclopenta[<i>c</i>]pyran-4-carboxylic acid, 1-(hexopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-4a-hydroxy-7-methyl-5-oxo-, methyl ester	425,31	0,716143	1405,97	Positivo	M+Na
	NCGC00385221-01_C23H32O15_ α -D-Glucopyranoside, β -D-fructofuranosyl 6- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]-	571,36	0,725035	1289,40	Positivo	M+Na

NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl)- β -D- glucopyranosyl]oxy]benzoate	468,99	0,788265	1146,26	Positivo	M+Na
NCGC00169934-02_C25H32O13_2H- Pyran-4-acetic acid, 2-(β -D- glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-3-(2- hydroxyethylidene)-5-(methoxycarbonyl)-, 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl ester, (2 <i>S</i> ,3 <i>Z</i> ,4 <i>S</i>)- methyl chlorogenate	563,37	0,764871	1306,29	Positivo	M+Na
Anthocyanidin base + 4O, 2MeO, O-Hex	391,26	0,808589	778,44	Positivo	[M+Na] ⁺
Delphinidin 3-glucoside	494,49	0,703515	2249,29	Positivo	M
Okanin-4'- <i>O</i> -glucoside	466,49	0,851216	1422,98	Positivo	M
Karakoline	452,47	0,83108	2228,85	Positivo	M+H
Iso-gamma-fagarine	379,40	0,749395	869,93	Positivo	M+H
Isocitrate Isocitric acid 1- Hydroxytricarballic acid 1- Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid DL-Isocitric acid	231,08	0,717915	813,20	Positivo	M+H
Corticosterone (8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)- 11-hydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13- dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- dodecahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3- one	224,09	0,878572	408,78	Positivo	[M+H]
FruLeuIIe	348,41	0,742691	2276,07	Positivo	M+H
CY-25	407,22	0,72411	1653,42	Positivo	M+H
Alteramide A	346,45	0,717549	1793,32	Negativo	M-H
7-hydroxy-2-(4-hydroxy-3,5- dimethoxyphenyl)-5-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- 3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2- yl]oxychromen-4-one	511,79	0,718585	1215,54	Positivo	M+H
4-[(<i>E</i>)-3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- 3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2- yl]oxy-4,5-dihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]- 3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	489,39	0,717551	1189,30	Negativo	[M-H] ⁻
(<i>Z</i>)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan- 2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept- 5-enoic acid	525,44	0,808073	1532,56	Positivo	[M+Na] ⁺
(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>aR</i> ,6 <i>bS</i> ,8 <i>aS</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>R</i> ,14 <i>bR</i>)-3,12- dihydroxy-4,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,11,12,14 <i>b</i> -hexamethyl- 8 <i>a</i> -[3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxycarbonyl- 1,2,3,4 <i>a</i> ,5,6,7,8,9,10,11,12 <i>a</i> ,14,14 <i>a</i> - tetradecahydricene-4-carboxylic acid	469,34	0,777988	608,92	Positivo	[M+Na] ⁺
(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-[[[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4- dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2- yl]oxymethyl]-6-(3,4,5- trimethoxyphenoxy)oxane-3,4,5-triol	665,34	0,781859	1691,41	Negativo	[M-H] ⁻
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>aR</i> ,6 <i>bS</i> ,8 <i>aR</i> ,14 <i>bR</i>)-2,3,12- trihydroxy-4,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,11,11,14 <i>b</i> -hexamethyl- 8 <i>a</i> -[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-	501,33	0,709085	1288,43	Positivo	[M+Na] ⁺
	678,51	0,742239	2221,58	Negativo	[M-H] ⁻

	(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxycarbonyl-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a-tetradecahydricene-4-carboxylic acid					
	Stachyose	689,48	0,709047	1602,04	Positivo	M+Na
	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	326,25	0,802995	118,82	Positivo	2M+H
	D-(+)-Cellotriose	525,33	0,81252	1437,57	Positivo	M+Na
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Astragalin	449,32	0,766431	978,46	Positivo	M+H
	Aloenin	434,31	0,839934	1782,86	Positivo	M+Na
	7,8-Dihydro-L-Biopterin	223,99	0,759387	1836,03	Positivo	M+H-H ₂ O
	NCGC00385299-01_C17H24O11_Cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid, 1-(hexopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-4a-hydroxy-7-methyl-5-oxo-, methyl ester	425,31	0,716143	1405,97	Positivo	M+Na
	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6-O-(β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]oxy]benzoate	469,30	0,810311	1215,79	Positivo	M+Na
	methyl chlorogenate	391,26	0,808589	778,44	Positivo	[M+Na] ⁺
	methoxy-quercetin-3-O-hexoside	478,47	0,749634	2187,23	Positivo	M+H
	Anthocyanidin base + 4O, 2MeO, O-Hex	494,49	0,703515	2249,29	Positivo	M
	N-Fructosyl isoleucine	294,27	0,784814	236,77	Positivo	M+H
	IAA-Val	276,21	0,783481	277,11	Positivo	[M+H] ⁺
	Isorhamnetin 3-galactoside	480,39	0,855634	1486,94	Positivo	[M+H] ⁺
	CY-25	346,45	0,717549	1793,32	Negativo	M-H
8	9-methoxy-7-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one	473,30	0,743341	1148,11	Positivo	[M+H] ⁺
	4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	525,44	0,808073	1532,56	Positivo	[M+Na] ⁺
	(Z)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	469,34	0,777988	608,92	Positivo	[M+Na] ⁺
	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3R,4R,5S)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]oxane-3,4,5-triol	487,28	0,726912	1505,02	Positivo	[M+K] ⁺
	(2R,3R,4R,6aR,6bS,8aR,14bR)-2,3,12-trihydroxy-4,6a,6b,11,11,14b-hexamethyl-8a-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxycarbonyl-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a-tetradecahydricene-4-carboxylic acid	678,51	0,742239	2221,58	Negativo	[M-H] ⁻
	methyl (4R)-4-((5R,8S,9S,10R,13R,17R)-10,13-dimethyl-3,6-dioxohexadecahydro-	827,06	0,867798	1211,26	Positivo	2M+Na

	1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoate					
	Prostaglandin F2 α Dimethylamine	367,30	0,780127	589,04	Positivo	M+H
	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	326,25	0,802995	118,82	Positivo	2M+H
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	NCGC00385507-01_C14H17NO9_(2S)-7-Hydroxy-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin-2-yl β -D-glucopyranoside	367,27	0,759434	1392,98	Positivo	M+Na
	NCGC00385299-01_C17H24O11_Cyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid, 1-(hexopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-4a-hydroxy-7-methyl-5-oxo-, methyl ester	425,31	0,716143	1405,97	Positivo	M+Na
	NCGC00385221-01_C23H32O15_ α -D-Glucopyranoside, β -D-fructofuranosyl 6-O-[(2E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]-	571,36	0,725035	1289,40	Positivo	M+Na
	NCGC00385068-02_C20H28O13_Benzoic acid, 4-methoxy-2-[(6-O- β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-, methyl ester	499,28	0,796188	1389,29	Positivo	M+Na
	NCGC00180731-02_C19H26O12_Methyl 2-[[6-O-(beta-D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]benzoate	469,30	0,810311	1215,79	Positivo	M+Na
	methyl chlorogenate	391,26	0,808589	778,44	Positivo	[M+Na] ⁺
	Anthocyanidin base + 4O, 2MeO, O-Hex	494,49	0,703515	2249,29	Positivo	M
9	Cyanidin-3-O- α -arabinoside	417,40	0,704625	1575,41	Positivo	M
	Quercetin-3-O-xyloside	433,33	0,789869	1027,39	Positivo	M+H
	Karakoline	379,40	0,749395	869,93	Positivo	M+H
	FruLeuIle	407,22	0,72411	1653,42	Positivo	M+H
	CY-25	346,45	0,717549	1793,32	Negativo	M-H
	Cer(d18:1/18:1); [M+H] ⁺ C36H70N1O3	564,47	0,748028	2197,29	Positivo	M+H
	9-methoxy-7-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one	473,30	0,743341	1148,11	Positivo	[M+H] ⁺
	7-[(2E,5E)-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienoxy]chromen-2-one	337,23	0,779203	880,49	Positivo	[M+Na] ⁺
	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-3-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-5,7-dihydroxychromen-4-one	779,56	0,703263	2201,63	Positivo	[M+Na] ⁺
	(Z)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	469,34	0,777988	608,92	Positivo	[M+Na] ⁺
	(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[4-[(3S,3aR,6S,6aR)-6-[3,5-dimethoxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-	765,52	0,869292	1971,20	Positivo	[M+Na] ⁺

	trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[3,4-c]furan-3-yl]-2,6-dimethoxyphenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol					
	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-[[<i>(2R,3R,4R,5S)</i> -3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[(<i>2E</i>)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]oxane-3,4,5-triol	487,39	0,850124	1625,55	Positivo	[M+K] ⁺
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Astragalín	449,32	0,766431	978,46	Positivo	M+H
	Rutin	611,07	0,955362	1436,28	Positivo	M+H
	Rutin	633,35	0,816475	1395,85	Positivo	[M+Na] ⁺
	PC(20:0/0:0); [M+H] ⁺ C28H59N1O7P1	551,43	0,772974	1648,64	Positivo	M+H
	NCGC00381138-01_C20H30O5_Oxacyclotetradeca-7,11-diene-2,6,10-trione, 14-ethyl-13-hydroxy-3,5,7,9,13-pentamethyl-, (<i>7E</i> , <i>11E</i>)-	371,26	0,766162	597,19	Positivo	M+Na
	NCGC00380979-01_C15H22O9_β-D-Glucopyranoside, (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)methyl	367,23	0,709547	715,65	Positivo	M+Na
	methoxy-quercetin-3- <i>O</i> -hexoside	478,47	0,749634	2187,23	Positivo	M+H
	Cyanidin-3- <i>O</i> -α-arabínoside	417,40	0,704625	1575,41	Positivo	M
	CY-25	346,45	0,717549	1793,32	Negativo	M-H
	7-[(<i>2E</i> , <i>5E</i>)-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienoxy]chromen-2-one	337,23	0,779203	880,49	Positivo	[M+Na] ⁺
10	4-[(<i>E</i>)-3-[(<i>2R,3R,4S,5S,6R</i>)-3-[(<i>2S,3R,4R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	525,44	0,808073	1532,56	Positivo	[M+Na] ⁺
	[(<i>2R,3S,4S,5R,6S</i>)-6-[(<i>2S,3R,4R,5R,6S</i>)-2-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-methyloxan-3-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methyl (<i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate	763,52	0,762068	1589,26	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>Z</i>)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	469,34	0,777988	608,92	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>2R,3S,4S,5R,6R</i>)-2-[[<i>(2R,3R,4R,5S)</i> -3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[(<i>2E</i>)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]oxane-3,4,5-triol	487,39	0,850124	1625,55	Positivo	[M+K] ⁺
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Astragalín	449,32	0,766431	978,46	Positivo	M+H
11	Rutin	633,35	0,816475	1395,85	Positivo	[M+Na] ⁺
	Polysaccharide Hexose x4	687,53	0,733138	1684,27	Positivo	M+Na
	PE(16:0/16:0); [M+H] ⁺ C37H75N1O8P1	693,42	0,759932	1435,57	Positivo	M+H

	NCGC00385221-01_C23H32O15_α-D-Glucopyranoside, β-D-fructofuranosyl 6-O-[(2E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]-	571,36	0,725035	1289,40	Positivo	M+Na
	NCGC00384791-01!7-[4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxychromen-4-one	595,23	0,914211	1862,80	Positivo	M+H
	NCGC00381138-01_C20H30O5_Oxacyclotetradeca-7,11-diene-2,6,10-trione, 14-ethyl-13-hydroxy-3,5,7,9,13-pentamethyl-, (7E,11E)-	371,26	0,766162	597,19	Positivo	M+Na
	NCGC00381132-01_C23H38O17_methoxy-quercetin-3-O-hexoside	608,57	0,739811	2603,14	Positivo	M+Na
	7-[(2E,5E)-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienoxy]chromen-2-one	478,47	0,749634	2187,23	Positivo	M+H
	4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	337,23	0,779203	880,49	Positivo	[M+Na] ⁺
	[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl](1S,4aR,6aS,6bR,10R,11R,12aR)-1,10,11-trihydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydricene-4a-carboxylate	525,44	0,808073	1532,56	Positivo	[M+Na] ⁺
	(Z)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	671,46	0,744192	1405,53	Positivo	[M+Na] ⁺
	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3R,4R,5S)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]oxane-3,4,5-triol	469,34	0,777988	608,92	Positivo	[M+Na] ⁺
	Hexaethylene glycol	487,39	0,850124	1625,55	Positivo	[M+K] ⁺
	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	283,24	0,85734	1636,54	Positivo	M+H
	Diisooctyl phthalate	326,25	0,802995	118,82	Positivo	2M+H
	Chlorogenic acid	413,58	0,945162	2674,02	Positivo	M+Na
	7,8-Dihydro-L-Biopterin	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	Polysaccharide Hexose x4	224,10	0,803763	551,43	Positivo	M+H-H ₂ O
12	Isocitrate Isocitric acid 1-Hydroxytricarballic acid 1-Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid DL-Isocitric acid	687,53	0,733138	1684,27	Positivo	M+Na
	Aceroside VIII	224,09	0,878572	408,78	Positivo	[M+H]
	4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	594,70	0,769468	1861,25	Negativo	M-H
	4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3-[(2S,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	525,44	0,808073	1532,56	Positivo	[M+Na] ⁺

	[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] (1 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,6 <i>aS</i> ,6 <i>bR</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>aR</i>)-1,10,11-trihydroxy-2,2,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,9,9,12 <i>a</i> -heptamethyl-1,3,4,5,6,6 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> ,10,11,12,13,14 <i>b</i> -tetradecahydronicene-4 <i>a</i> -carboxylate	671,46	0,744192	1405,53	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>Z</i>)-2,6-dimethyl-7-(4-methyl-5-oxoxolan-2-yl)-3-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]hept-5-enoic acid	469,30	0,728492	688,12	Positivo	[M+Na] ⁺
13	Papaverine	339,28	0,755807	1641,98	Positivo	M+H
	Diisooctyl phthalate	413,58	0,945162	2674,02	Positivo	M+Na
	Chlorogenic acid	377,22	0,896133	388,03	Positivo	M+Na
	7,8-Dihydro-L-Biopterin	223,99	0,759387	1836,03	Positivo	M+H-H ₂ O
	Polysaccharide Hexose x4	687,53	0,733138	1684,27	Positivo	M+Na
	7-[(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienoxy]chromen-2-one	337,23	0,779203	880,49	Positivo	[M+Na] ⁺

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2021.

Tabela 12 - Compostos detectados no modo negativo via HPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de *S. bonplandii*.

Fração	Nome do Composto	Massa <i>m/z</i>	Cosseno	T retenção (s)	Modo	Aduto
1	D-(+)-Trehalose	341,40	0,9132	104,02	Negativo	M-H
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
2	D-(+)-Trehalose	341,40	0,9132	104,02	Negativo	M-H
	Chlorogenic acid	353,29	0,9013	320,37	Negativo	M-H
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	Cynarine	515,38	0,7122	477,95	Negativo	M-H
	Caffeoylquinic acid	353,29	0,9372	418,14	Negativo	M-H
3	Guanosine	282,14	0,8593	307,46	Positivo	M+H
	9-Octadecenamide, (<i>Z</i> -)	565,42	0,7971	309,26	Positivo	2M+H
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	NCGC00263645-02_C11H15N5O3S_5'-Methylthioadenosine	299,31	0,8911	166,50	Positivo	M+H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Cynarine	515,33	0,7881	616,11	Negativo	M-H
	Caffeoylquinic acid	353,29	0,9372	418,14	Negativo	M-H
	4_0_demethylbarbatic_acid	343,28	0,9143	255,04	Negativo	M-H
4	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	NCGC00385259-01!3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	433,40	0,7328	588,33	Positivo	M+H
	NCGC00385084-01_C23H32O15_α-D-Glucopyranoside, 3- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-	569,38	0,7650	898,05	Positivo	M+Na

	hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]- β -D-fructofuranosyl					
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3- {(E)-2-[4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Cynarine	515,33	0,7881	616,11	Negativo	M-H
	Malyngamide 2	509,33	0,7218	718,86	Positivo	M+Na
	Isorhamnetin 3-galactoside	477,20	0,7097	848,67	Positivo	[M+H] ⁺
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
	9-methoxy-7-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one	473,25	0,7094	1545,99	Positivo	[M+H] ⁺
	4_O_demethylbarbatic_acid	343,28	0,9143	255,04	Negativo	M-H
	4-Hydroxynonenal glutathione	307,29	0,8203	1224,40	Positivo	308.1
	4 β -Galactobiose	365,33	0,7187	600,24	Positivo	M+Na
	(-)Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	NCGC00385084-01_C23H32O15_ α -D-Glucopyranoside, 3-O-[(2E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]- β -D-fructofuranosyl	569,38	0,7650	898,05	Positivo	M+Na
	NCGC00381139-01!6-benzyl-3-butan-2-yl-9-(7-hydroxy-6-oxooctyl)-1,4,7,10-tetrazabicyclo[10.4.0]hexadecane-2,5,8,11-tetrone	613,52	0,7418	1421,44	Negativo	M+FA-H
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3- {(E)-2-[4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
5	NCGC00380460-01!5-hydroxy-3-(5-hydroxy-2,4-dimethoxyphenyl)-6-methoxy-7-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	523,39	0,7049	684,42	Positivo	M+H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Cynarine	515,38	0,7122	477,95	Negativo	M-H
	Tryptophan	203,22	0,9337	525,81	Negativo	M-H
	Malyngamide 2	509,33	0,7218	718,86	Positivo	M+Na
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
	9-methoxy-7-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one	473,25	0,7094	1545,99	Positivo	[M+H] ⁺
	4_O_demethylbarbatic_acid	343,28	0,9143	255,04	Negativo	M-H
	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-	597,42	0,7336	731,94	Positivo	[M+H] ⁺

	trihydroxyoxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one					
	Glycerol 1-stearate	361,31	0,8096	493,08	Positivo	M+H
	4-Hydroxynonenal glutathione	307,29	0,8203	1224,40	Positivo	308.1
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	quercetin-3-O-hexosyl(1-2)-deoxyhexosyl-7-O-hexoside	771,56	0,7361	1766,85	Negativo	M-H
	NCGC00381139-01!6-benzyl-3-butan-2-yl-9-(7-hydroxy-6-oxooctyl)-1,4,7,10-tetrazabicyclo[10.4.0]hexadecane-2,5,8,11-tetrone	613,52	0,7418	1421,44	Negativo	M+FA-H
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3-{(E)-2-[4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl β-D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
	NCGC00380170-01_C19H26O11_5-{[4-(β-D-Glucopyranosyloxy)benzyl]oxy}-3-hydroxy-3-methyl-5-oxopentanoic acid	429,37	0,7204	697,43	Negativo	M-H
	NCGC00169081-02_C23H34O16_β-D-Glucopyranose, 1-[2-[(2S,3E,4S)-3-ethylidene-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-5-(methoxycarbonyl)-2H-pyran-4-yl]acetate]	589,41	0,8282	1652,68	Positivo	M+Na
6	7-hydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	339,28	0,8076	1054,45		[M-H] ⁻
	Feruloyl quinic acid	367,33	0,8528	829,80	Negativo	M-H
	Coumaroyl quinic acid	337,31	0,8864	731,99	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Cynarine	515,38	0,7122	477,95	Negativo	M-H
	GalCer(d18:0/22:0); [M+H] ⁺ C46H92N1O8	787,55	0,7659	1329,22	Positivo	M+H
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
	9-methoxy-7-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-8-one	473,25	0,7094	1545,99	Positivo	[M+H] ⁺
	7-hydroxy-3-(2-oxochromen-7-yl)oxy-8-[2-oxo-7-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-8-yl]chromen-2-one	645,48	0,7453	1120,15	Positivo	[M+NH ₄] ⁺
	5,7-dihydroxy-2-[4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	755,60	0,8497	1957,17	Negativo	[M-H] ⁻
	[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl] (2E,6E)-	343,32	0,8541	385,68	Negativo	[M-H] ⁻

	8-hydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-dienoate					
	(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1,3,4-trihydroxy-5-[(<i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxycyclohexane-1-carboxylic acid	337,31	0,7689	601,30	Negativo	[M-H] ⁻
	Strepsilin	539,44	0,7449	1054,76	Negativo	[2M-H]
	Glycerol 1-stearate	361,31	0,8096	493,08	Positivo	M+H
	D-erythro-C18-Sphingosine	300,24	0,7755	1009,30	Positivo	M+H
	D-(+)-Trehalose	341,40	0,9132	104,02	Negativo	M-H
	4-Hydroxynonenal glutathione	307,29	0,8203	1224,40	Positivo	308.1
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	quercetin-3- <i>O</i> -hexosyl(1-2)deoxyhexosyl-7- <i>O</i> -hexoside	771,56	0,7361	1766,85	Negativo	M-H
	NCGC00385506-01!5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	625,42	0,7855	1901,69	Negativo	M-H
	NCGC00385224-01_C24H42O12_6-Hydroxy-2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl 6- <i>O</i> -[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furanyl]-β-D-glucopyranoside	565,70	0,8053	1387,60	Negativo	M+FA-H
7	NCGC00384564-01_C22H30O14_3- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl]-β-D-fructofuranosyl α-D-glucopyranoside	539,47	0,7676	1310,92	Positivo	M+Na
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3-{(<i>E</i>)-2-[4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl β-D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
	7-hydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one	339,28	0,8076	1054,45		[M-H] ⁻
	Feruloyl quinic acid	367,33	0,8528	829,80	Negativo	M-H
	Coumaroyl quinic acid	337,31	0,8864	731,99	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	dimethyl-quercetin- <i>O</i> -hexoside	491,21	0,7365	181,36	Positivo	M+H
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
	7-hydroxy-3-(2-oxochromen-7-yl)oxy-8-[2-oxo-7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-8-yl]chromen-2-one	645,48	0,7453	1120,15	Positivo	[M+NH ₄] ⁺
	5,7-dihydroxy-2-[4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-	755,60	0,8497	1957,17	Negativo	[M-H] ⁻

	[[<i>(2R,3R,4R,5R,6S)</i> -3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one					
	(<i>1S,3R,17S,19S</i>)-3-hydroxy-9,9,16,16-tetramethyl-8-oxa-14,23,25-triazaheptacyclo [17.5.2.0,?.0,?.0?,.0?,.0?,]hexacos-4,6,10,12,14-pentaene-24,26-dione	469,31	0,7430	1346,79	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>1R,3R,4S,5R</i>)-1,3,4-trihydroxy-5-[(<i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxycyclohexane-1-carboxylic acid	337,31	0,7689	601,30	Negativo	[M-H] ⁻
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	NCGC00385224-01_C24H42O12_6-Hydroxy-2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl 6-O-[(<i>2R,3R,4R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furanyl]- β -D-glucopyranoside	567,59	0,8291	1680,48	Negativo	M+FA-H
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3-{(<i>E</i>)-2-[4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl β -D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
	Feruloyl quinic acid	367,33	0,8528	829,80	Negativo	M-H
	Coumaroyl quinic acid	337,31	0,8864	731,99	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
8	5,7-dihydroxy-2-[4-[(<i>2S,3R,4S,5S,6R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(<i>2S,3R,4S,5S,6R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[[<i>(2R,3R,4R,5R,6S)</i> -3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	755,60	0,8497	1957,17	Negativo	[M-H] ⁻
	(<i>1S,3R,17S,19S</i>)-3-hydroxy-9,9,16,16-tetramethyl-8-oxa-14,23,25-triazaheptacyclo [17.5.2.0,?.0,?.0?,.0?,.0?,]hexacos-4,6,10,12,14-pentaene-24,26-dione	469,31	0,7430	1346,79	Positivo	[M+Na] ⁺
	(<i>1R,3R,4S,5R</i>)-1,3,4-trihydroxy-5-[(<i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxycyclohexane-1-carboxylic acid	337,31	0,7689	601,30	Negativo	[M-H] ⁻
	Strepsilin	539,44	0,7449	1054,76	Negativo	[2M-H]
	Glycerol 1-stearate	361,31	0,8096	493,08	Positivo	M+H
	D-erythro-C18-Sphingosine	301,31	0,7263	1092,07	Positivo	M+H
	D-(+)-Trehalose	341,40	0,9132	104,02	Negativo	M-H
9	quercetin-3- <i>O</i> -hexosyl(1-2)deoxyhexosyl-7- <i>O</i> -hexoside	771,56	0,7361	1766,85	Negativo	M-H
	NCGC00385506-01!5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(<i>2S,3R,4S,5S,6R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-	625,42	0,7855	1901,69	Negativo	M-H

	(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one					
	NCGC00385224-01_C24H42O12_6-Hydroxy-2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl 6- <i>O</i> -[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furanyl]-beta-D-glucopyranoside	565,70	0,8053	1387,60	Negativo	M+FA-H
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3-{(E)-2-[4-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl β-D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
	Feruloyl quinic acid	367,33	0,8528	829,80	Negativo	M-H
	Coumaroyl quinic acid	337,31	0,8864	731,99	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Cynarine	515,38	0,7122	477,95	Negativo	M-H
	Cascarside C	585,38	0,8657	1968,16	Positivo	M+Na
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
	5,7-dihydroxy-2-[4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[[2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	755,60	0,8497	1957,17	Negativo	[M-H] ⁻
	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6-[[2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-5,7-dihydroxychromen-4-one	755,46	0,7559	2205,85	Negativo	[M-H] ⁻
	[6-[3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate	539,57	0,7498	2026,05	Positivo	[M+Na] ⁺
	(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1,3,4-trihydroxy-5-[(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxycyclohexane-1-carboxylic acid	337,31	0,7689	601,30	Negativo	[M-H] ⁻
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	RUTOSIDE (rutin)	609,39	0,8419	1228,44	Negativo	[M-H] ⁻
10	NCGC00385506-01!5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-	649,55	0,7014	1505,55	Positivo	M+Na

	[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one					
	NCGC00385224-01_C24H42O12_6-Hydroxy-2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl 6-O-[(2R,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furanyl]-beta-D-glucopyranoside	565,70	0,8053	1387,60	Negativo	M+FA-H
	NCGC00380545-01_C26H32O14_3-{(E)-2-[4-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-2-hydroxyphenyl]vinyl}-5-hydroxyphenyl beta-D-glucopyranoside	567,51	0,7094	1315,32	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,32	0,7859	483,31	Negativo	M-H
	Caffeoylquinic acid	353,29	0,9372	418,14	Negativo	M-H
	3-[4,5-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy-6-[(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	739,61	0,7156	1586,17	Negativo	[M-H] ⁻
	[6-[3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate	539,57	0,7498	2026,05	Positivo	[M+Na] ⁺
	D-erythro-C18-Sphingosine	301,31	0,7263	1092,07	Positivo	M+H
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	Rutin	609,39	0,8037	1605,49	Negativo	[M-H] ⁻
	NCGC00385506-01!5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	649,55	0,7014	1505,55	Positivo	M+Na
11	NCGC00385204-01!5-hydroxy-2-[2-hydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-7,8-dimethoxychromen-4-one	489,41	0,7519	1107,04	Negativo	M-H
	Seco-isolariciresinol diglucoside	685,79	0,7140	2450,39	Positivo	M+H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,32	0,7859	483,31	Negativo	M-H
	kampferol-O-hexosyl-deoxyhexoside	596,46	0,7674	1869,31	Positivo	M+H
	kaempferol-3-O-rutinoside	593,50	0,8614	1860,47	Negativo	[M-H] ⁻
	Caffeoylquinic acid	353,28	0,9600	348,94	Negativo	M-H
	[6-[3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]methyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate	539,57	0,7498	2026,05	Positivo	[M+Na] ⁺

	[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl](4 <i>aS</i> ,6 <i>aS</i> ,6 <i>bR</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,12 <i>aR</i>)-11-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-2,2,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,9,12 <i>a</i> -hexamethyl-10-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]oxy-1,3,4,5,6,6 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> ,10,11,12,13,14 <i>b</i> -tetradecahydricene-4 <i>a</i> -carboxylate	781,63	0,7034	1718,19	Negativo	[M-H] ⁻
	D-erythro-C18-Sphingosine	301,31	0,7263	1092,07	Positivo	M+H
	D-(+)-Trehalose	341,40	0,9132	104,02	Negativo	M-H
12	NCGC00385506-01!5,7-dihydroxy-2-[3-hydroxy-4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	649,55	0,7014	1505,55	Positivo	M+Na
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H
	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside - 20eV	447,39	0,7493	1348,16	Negativo	M-H
	Iridin	521,60	0,7721	1536,11	Positivo	[M+H] ⁺
	Caffeoylquinic acid	353,29	0,9372	418,14	Negativo	M-H
	apiosylskimmin	455,41	0,7172	1246,01	Positivo	[M+H] ⁺
	D-erythro-C18-Sphingosine	301,31	0,7263	1092,07	Positivo	M+H
	D-(+)-Trehalose	341,40	0,9132	104,02	Negativo	M-H
13	9 <i>S</i> -Hydroxy-10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i> -octadecatrienoic acid	293,44	0,8824	2092,12	Negativo	M-H
	9(<i>S</i>)-HpOTrE	310,35	0,7880	1913,02	Negativo	M-H
	(-)-Quinic acid	191,11	0,7258	155,06	Negativo	M-H
	FA 18:4+2O	307,39	0,7213	1747,18	Negativo	M-H
	Linolenic acid (omega-3-or-omega-6) linolenate (omega-3-or-omega-6)	275,39	0,8247	2094,61	Negativo	M-H
	Chlorogenate Chlorogenic acid	353,27	0,9220	357,35	Negativo	M-H

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2021.

APÊNDICE C – ANOTAÇÃO MOLECULAR DO UNIFI DAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE *S. BONPLANDII*

Relação dos metabólitos encontrados na análise no UPLC-MS/MS associados à plataforma do UNIFI associados à base de dados *in house*, para cada fração (análises em modo negativo e positivo, descritos nas Tabelas 17 e 18 respectivamente) gerando o seguinte conjunto de moléculas (dados *ipsis litteris*), permitindo a anotação de 67 e 47 compostos.

Tabela 13 - Compostos detectados no modo positivo via UPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de *S. bonplandii*.

Fração	Nome do Composto	Massa observada (Da)	Erro (mDa)	Tempo de retenção (min)	Possível aduto formado
1	4-hydroxyphenyl	110,0362	-0,5357	0,6492	+NH ₄
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,1008	0,2460	0,7080	+Li
	maltose	342,1158	-0,3654	0,7760	+Na, +H, +NH ₄ , +K
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0472	-0,1181	0,6972	+NH ₄
	2,4,5-trimethoxystyrene	194,0936	-0,7114	1,8781	+NH ₄
	2-phenylethyl_acetate	164,0827	-1,0061	0,8466	+NH ₄
	3-feruloylquinic_acid	368,1082	-2,5429	2,0622	+H
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1110	0,2332	2,4185	+Li
	4-amino-2-hydroxy-5-[[1-hydroxy-1-(5-oxo-6-bicyclo[4	326,1495	1,7094	1,9659	+Li
	asaraldehyde	196,0729	-0,6852	1,5461	+H
2	caffeic_acid	180,0407	-1,5589	1,1568	+NH ₄
	catechin	290,0788	-0,1928	1,6796	+NH ₄
	cuminaldehyde	148,0879	-0,8917	1,1968	+NH ₄
	epicatechin	290,0788	-0,1928	1,6796	+NH ₄
	ethyl_salicylate	166,0621	-0,9206	2,4722	+Li
	maltose	342,1156	-0,5715	0,7686	+Na, +K
	methyl_salicylate	152,0484	1,0862	0,8518	+Li
	NCGC00180731-02	446,1425	0,1194	2,2137	+Li
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0486	1,2232	2,3827	+Li
	<i>p</i> -hydroxybenzoic_acid	138,0330	1,3527	1,5393	+Li
	quinic_acid	192,0627	-0,7264	0,9509	+Na
	rutin	612,1701	1,1110	2,4913	+Li
	xylopina	295,1195	-1,3519	2,6194	+Li
3	xylopinina	339,1804	-3,0110	1,4019	+K
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1108	0,1027	3,0172	+Li
	asaraldehyde	196,0733	-0,2532	2,6283	+H
	benzaldehyde	106,0410	-0,8311	3,1343	+NH ₄
	chlorogenic_acid	354,0953	0,1847	2,6850	+Li
	ethyl_salicylate	166,0625	-0,5026	3,1030	+H
	ethylbenzene	106,0776	-0,6298	2,1598	+NH ₄
hyperoside	464,0956	0,1524	2,9426	+Li	

	indole	117,0573	-0,5963	2,6872	+H
	maltose	342,1155	-0,6718	0,7626	+Na
	methoxy-myricetin-3-O-hexoside	494,1039	-2,1824	2,4261	+NH ₄
	morusin	420,1599	2,6605	3,5846	+H
	NCGC00180731-02	446,1399	-2,5459	2,4135	+NH ₄
	nicotiflorin	594,1544	-4,1120	2,7153	+NH ₄
	<i>n</i> -nitrosoanonaine	294,0984	-2,0563	3,2474	+NH ₄
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0465	-0,8537	2,3999	+H
	piperitol	356,1255	-0,5049	2,1435	+Li
	xylopina	295,1198	-1,0873	2,6253	+Li
	1-deoxycapsidiol	220,1808	-1,8679	3,8470	+Na
	2 α ,3 β -dihydroxyolean-12-en-28-oic_acid	472,3524	-2,8586	15,5962	+Na
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1078	-2,9467	3,0880	+H
	acido_ursolico	456,3581	-2,2435	16,7897	+K
	chlorogenic_acid	354,0950	-0,0936	3,2302	+Li
	epicatechin	290,0798	0,7944	3,2297	+Li
	ethyl_salicylate	166,0628	-0,1984	2,4567	+Li
4	hyperoside	464,0951	-0,3837	2,8926	+Li
	kaempferol-7-O-hexoside	448,0981	-2,4720	3,2119	+NH ₄
	maltose	342,1194	3,1842	3,2595	+H
	morusin	420,1604	3,1365	4,1445	+H
	NCGC00180731-02	446,1406	-1,7825	3,4090	+H
	<i>n</i> -nitrosoanonaine	294,1000	-0,4420	3,7685	+K
	Quercetin	304,0580	-0,3456	3,1783	+Li
	rutin	612,1676	-1,4327	3,2125	+NH ₄
	14-oxy- α -muurolene	218,1668	-0,3138	12,7028	+H
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1082	-2,5507	3,8644	+H
	4-amino-2-hydroxy-5-[[1-hydroxy-1-(5-oxo-6-bicyclo[4	326,1498	2,0624	3,9746	+Na
	chlorogenic_acid	354,0926	-2,4489	3,5286	+H
	cryptone	138,1037	-0,8119	3,8593	+NH ₄
	epicatechin	290,0808	1,7381	3,3922	+Li
	ethyl_salicylate	166,0621	-0,8557	2,4499	+Li
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,1002	-0,4019	3,6330	+Li
5	hyperoside	464,0995	3,9772	4,4694	+H
	indole	117,0573	-0,5298	3,7028	+H
	maltose	342,1157	-0,5025	0,7619	+Na
	methyl_salicylate	152,0489	1,5972	3,3650	+Na
	morusin	420,1606	3,3392	4,9271	+H
	NCGC00180731-02	446,1426	0,1625	3,8357	+H
	nicotiflorin	594,1581	-0,3852	9,0112	+Na
	pelargonidin_3-glucoside	433,1141	0,6213	4,4397	+NH ₄
	rutin	612,1693	0,3022	4,0902	+Na
	spiraoside_40eV	464,0995	3,9910	4,3701	+H
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1105	-0,2715	3,9570	+Li
	b-sitosterol	414,3901	3,9058	4,3888	+K
	chlorogenic_acid	354,0949	-0,2290	3,4086	+Na
6	epicatechin	290,0813	2,2325	4,2562	+Li
	ethyl_salicylate	166,0623	-0,6802	2,4549	+Li
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,1005	-0,0290	5,1936	+H
	hyperoside	464,0940	-1,5075	3,7445	+NH ₄
	kaempferol	286,0479	0,1326	5,1955	+H

	kaempferol_3- <i>o</i> -rhamnoside	740,2148	-1,5528	5,3015	+H
	maltose	342,1151	-1,0654	0,7623	+Na
	manghaslin	756,2042	-7,0721	4,4955	+Li
	methoxy-myricetin-3- <i>O</i> -hexoside	494,1036	-2,4175	4,8714	+H, +Na
	morusin	420,1596	2,3595	4,7388	+H
	NCGC00180731-02	446,1453	2,8314	15,2416	+Li
	nicotiflorin	594,1593	0,8157	4,4267	+Li
	quercetin-3- <i>O</i> -glc-1-3-rham-1-6-glucoside	772,2062	-0,0007	5,1888	+Na
	rutin	612,1682	-0,7856	5,0076	+Na
	soroceal	524,1881	4,5787	5,0618	+Li
	sorocein_B	658,2212	0,8982	5,0137	+H
	3-feruloylquinic_acid	368,1101	-0,5951	4,6459	+Na
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1083	-2,3990	5,0621	+H
	chlorogenic_acid_2	354,0951	-0,0025	3,8085	+Na
	cyanidin_3-glucoside	449,1084	-0,0350	5,9384	+NH ₄
	digalloylquinic_acid	496,0895	4,2003	4,5756	+H
	ethyl_salicylate	166,0622	-0,8346	2,4529	+Li
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,0997	-0,8217	5,1238	+Li
	hex-3-enyl-2-methylbutanoate	184,1481	1,8166	5,9365	+Na
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1540	0,6204	7,6940	+Na
	maltose	342,1156	-0,5670	0,7623	+Na
	manghaslin	756,2117	0,3816	6,5602	+Na
7	methoxy-myricetin-3- <i>O</i> -hexoside	494,1044	-1,6534	5,4663	+H
	morusin	420,1607	3,4284	6,3831	+Li
	NCGC00180731-02	446,1428	0,3350	5,2926	+Na
	NCGC00385380	626,1489	0,6091	5,8096	+Na
	nicotiflorin	594,1578	-0,6527	5,4485	+NH ₄
	quercetin_3- <i>o</i> - α -arabinopyranoside	434,0883	3,4139	5,8874	+H
	quercetin-3- <i>O</i> -glc-1-3-rham-1-6-glucoside	772,2060	-0,1681	5,9540	+Na
	rutin_1	612,1702	1,1437	5,4410	+Na
	soroceal_1	524,1883	4,8312	6,4726	+NH ₄
	sorocein_B	658,2251	4,8166	5,3800	+Li
	xanthone	196,0530	0,5616	5,0192	+NH ₄
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1079	-2,8239	5,0686	+H
	α -ionene	174,1400	-0,8593	7,0317	+H
	β -amyrin_acetate	468,3985	1,7536	6,0468	+H
	cyanidin_3-glucoside	449,1096	1,1957	5,7698	+NH ₄
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,1003	-0,2360	5,1180	+Li
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1539	0,5431	6,4002	+Na
	maltose	342,1158	-0,3936	0,7628	+Na
8	manghaslin	756,2118	0,4706	6,5691	+Na, +H
	methoxy-myricetin-3- <i>O</i> -hexoside	494,1043	-1,6980	5,7898	+H
	NCGC00180731-02	446,1453	2,8958	15,2493	+Li
	nicotiflorin	594,1572	-1,2394	5,4513	+NH ₄
	rutin	610,1539	0,5431	6,4002	+Na
	soroceal	524,1886	5,1275	6,1531	+Li
	sorocein_B	658,2242	3,9121	5,7340	+H
	xanthone	196,0521	-0,3178	6,6773	+NH ₄
9	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1106	-0,1183	5,4227	+Na
	catechin_monogallate	442,0928	2,8009	5,9206	+Na

	ethyl_salicylate	166,0625	-0,5146	2,4496	+Li
	kaempferol	286,0477	0,0119	7,4865	+H
	kaempferol_3-rutinoside_4-glucoside	756,2120	0,6891	7,4846	+Na, +H, +K
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1540	0,6459	7,2437	+Na
	kaur-16-en-19-oic_acid	302,2241	-0,4427	15,5446	+Li
	maltose	342,1158	-0,4129	0,7595	+Na
	manghaslin	756,2115	0,2180	7,3231	+Na
	NCGC00180731-02	446,1425	0,1028	6,3226	+Na
	NCGC00385380	626,1497	1,3883	6,8649	+Na
	nicotiflorin	594,1569	-1,5644	7,1507	+Na
	quercetin-3- <i>O</i> -glc-1-3-rham-1-6-glucoside	772,2074	1,2015	7,6722	+Na
	rutin	612,1694	0,3482	6,3683	+Na
	soroceal	524,1885	5,0279	6,0254	+Na
	sorocein_B	658,2231	2,7975	6,7083	+Li
	14-oxy- α -muurolene	218,1664	-0,6934	13,4671	+H
	3-feruloylquinic_acid 3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1107	-0,0058	6,9324	+Na
	kaempferol	286,0476	-0,1761	7,6836	+H
	kaempferol_3- <i>o</i> -rhamninoside	740,2166	0,1833	7,8287	+Na
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1534	0,0428	7,6854	+Na, +K
10	maltose	342,1158	-0,3923	0,7603	+Na
	manghaslin	756,2122	0,9221	7,4818	+Na
	morusin	420,1582	0,9439	7,4044	+Li
	NCGC00180731-02	446,1453	2,9213	15,2369	+Li
	rutin	610,1532	-0,1648	9,4614	+Na
	sorocein_A	630,2318	6,4194	6,1443	+Na
	sorocein_B	658,2241	3,8409	8,9709	+H
	xanthone	196,0513	-1,1159	7,4015	+NH ₄
	ethyl_salicylate	166,0622	-0,7652	2,4476	+Li
	hyperoside	464,0956	0,0835	8,3058	+Na
	kaempferol	286,0476	-0,1694	8,9902	+H
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1539	0,4997	8,2779	+Na
	maltose	342,1158	-0,3715	0,7627	+Na, +K
11	morusin	420,1576	0,3374	7,4003	+Li
	nicotiflorin	594,1582	-0,2557	8,9897	+Na, +K
	p-cymene	134,1088	-0,7350	7,3301	+H
	rutin	610,1541	0,7224	8,6464	+Na
	rutin_1	612,1674	-1,6646	7,8540	+Li
	soroceal	524,1877	4,2010	6,5307	+K
	sucrose_octaacetate	678,2068	6,0366	8,7392	+Li
	acido_ursolico	456,3582	-2,1848	16,8126	+K
	ethyl_salicylate	166,0622	-0,7852	2,4499	+Li
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,1004	-0,1575	8,9692	+Na
12	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1542	0,8047	7,6819	+Na
	maltose	342,1162	-0,0315	0,7611	+Na
	nicotiflorin	594,1582	-0,2313	8,9947	+Na
	sorocein_A	630,2316	6,2382	10,2413	+Li
	sorocein_B	658,2236	3,2819	8,9643	+H
13	4-amino-2-hydroxy-5-[[1-hydroxy-1-(5-oxo-6-bicyclo[4	326,1494	1,5949	13,6023	+H
	maltose	342,1162	-0,0048	0,7614	+Na

octadeca-9,11-dienoic_acid	280,2399	-0,3763	11,8411	+NH ₄
rutin	610,1540	0,6294	7,6765	+Na

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2021.

Tabela 14 - Compostos detectados no modo negativo via UPLC-MS/MS das 13 frações obtidas de plântulas de *S. bonplandii*.

Fração	Nome do Composto	Massa observada (Da)	Observed m/z	Mass error (mDa)	Observed RT (min)	Aduto
1	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1129	367,1056	2,1269	0,7003	-H
	epicatechin	290,0764	349,0903	-2,6300	0,7227	+CH ₃ COO
	maltose	342,1163	341,1090	0,0585	0,7660	-H, +Cl, +HCOO
	quinic_acid	192,0631	191,0558	-0,3131	0,8158	-H
2	16-hydroxy-kauran-19-oic_acid	320,2379	319,2307	2,7937	14,4200	-H
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1124	367,1052	1,6977	0,7020	-H
	maltose	342,1160	341,1087	-0,2179	0,7634	-H, +Cl, +HCOO
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0467	163,0394	-0,6776	1,3731	-H
	<i>p</i> -hydroxybenzoic_acid	138,0311	197,0449	-0,6121	1,6054	+CH ₃ COO
3	quinic_acid	192,0629	191,0556	-0,5114	0,6620	-H
	amentoflavone	538,0917	537,0844	1,6603	2,7979	-H
	ethyl_salicylate	166,0625	211,0607	-0,4500	2,7104	+HCOO
	maltose	342,1157	341,1085	-0,4714	0,7616	-H
	NCGC00180731-02	446,1430	505,1569	0,6236	2,7207	+CH ₃ COO
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0466	163,0393	-0,7644	2,2390	-H
	<i>p</i> -hydroxybenzoic_acid	138,0309	137,0236	-0,7888	2,4316	-H
4	quercetin	304,0556	363,0694	-2,7069	3,1607	+CH ₃ COO
	quinic_acid	192,0627	191,0554	-0,7228	0,6674	-H
	16-hydroxy-kauran-19-oic_acid	320,2378	319,2306	2,6972	14,6840	-H
	amentoflavone	538,0920	537,0847	1,9938	2,7840	-H
	caryophyllene_1	204,1888	239,1582	0,9509	12,2993	+Cl
	chlorogenic_acid_2	354,0950	353,0877	-0,1175	2,8484	-H
	maltose	342,1157	341,1085	-0,4621	0,7629	-H
	NCGC00180731-02	446,1424	505,1563	-0,0229	4,0478	+CH ₃ COO
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0466	223,0605	-0,7374	3,2829	+CH ₃ COO
5	<i>p</i> -hydroxybenzoic_acid	138,0309	137,0236	-0,7860	2,4032	-H
	quercetin	304,0556	363,0694	-2,7406	3,1524	+CH ₃ COO
	quinic_acid	192,0627	191,0554	-0,7178	0,6710	-H
	14-oxy- α -muurolene	218,1698	277,1837	2,7382	13,1722	+CH ₃ COO
	16-hydroxy-kauran-19-oic_acid	320,2382	319,2309	3,0465	14,1922	-H
	2-(4-methoxyphenyl) ethanol	152,0831	211,0970	-0,5901	4,4831	+CH ₃ COO
	caffeic_acid	180,0413	179,0341	-0,9147	6,3470	-H
	chlorogenic_acid	354,0953	353,0880	0,2044	3,6758	-H
	epicatechin	290,0786	289,0713	-0,4332	5,1627	-H
	indole	117,0570	116,0497	-0,8927	3,6677	-H
5	maltose	342,1157	341,1084	-0,4991	0,7617	-H
	nicotiflorin	594,1592	593,1519	0,7064	8,9567	-H
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0466	223,0604	-0,7708	3,2908	+CH ₃ COO

	peonidin_3- <i>O</i> -glucoside_cation	463,1249	522,1387	0,8273	4,0979	+CH ₃ COO
	quinic_acid	192,0625	191,0553	-0,8400	2,8690	-H
	13(2)(s)-hidroxy-17(3)-etoxifeoforbideo	636,2994	681,2977	4,6649	5,6000	+HCOO
	4-amino-2-hidroxy-5-[[1-hidroxy-1-(5-oxo-6-bicyclo[4	326,1485	385,1624	0,7480	5,8299	+CH ₃ COO
	caffeic_acid	180,0413	179,0340	-0,9381	5,1700	-H
	chlorogenic_acid_2	354,0943	353,0871	-0,7496	4,2681	-H
	epicatechin	290,0785	289,0712	-0,5785	5,1712	-H
	ethyl_salicylate	166,0622	225,0760	-0,8188	3,9930	+CH ₃ COO
	glicosilato_quercetina-3- α -raminosideo	448,0979	493,0961	-2,6580	4,8370	+HCOO
6	kaempferol_3-rutinoside_4-glucoside	756,2127	755,2054	1,3647	5,4241	-H
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1530	609,1457	-0,3652	5,1523	-H
	maltose	342,1159	341,1086	-0,2878	0,7615	-H
	manghaslin	756,2123	755,2050	0,9963	5,1854	-H
	methoxy-myricetin-3- <i>O</i> -hexoside	494,1033	539,1015	-2,7333	4,8369	+HCOO, -H, +Cl
	NCGC00180731-02	446,1422	445,1349	-0,2726	4,3966	-H
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0468	223,0607	-0,5004	3,2518	+CH ₃ COO
	piperitol	356,1235	415,1374	-2,4678	5,6081	+CH ₃ COO
	quercetin-3- <i>O</i> -glc-1-3-rham-1-6-glucoside	772,2066	771,1993	0,3818	5,1524	-H, +Cl
	quinic_acid	192,0624	191,0552	-0,9496	3,7382	-H
	13(2)(s)-hidroxy-17(3)-etoxifeoforbideo	636,3000	681,2982	5,2274	6,3614	+HCOO
	16-hidroxy-kauran-19-oic_acid	320,2381	319,2308	2,9796	14,1894	-H
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1103	367,1030	-0,4213	4,3183	-H
	4-amino-2-hidroxy-5-[[1-hidroxy-1-(5-oxo-6-bicyclo[4	326,1493	385,1631	1,4658	6,2993	+CH ₃ COO
	chlorogenic_acid_2	354,0949	353,0876	-0,2286	3,7363	-H
7	kaempferol_3-rutinoside_4-glucoside	756,2130	755,2057	1,7119	6,2408	-H
	maltose	342,1154	341,1081	-0,8184	0,7616	-H
	NCGC00385380	626,1489	625,1417	0,6395	5,7611	-H
	nicotiflorin	594,1552	653,1691	-3,2663	5,4430	+CH ₃ COO
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0464	163,0391	-0,9438	7,2463	-H
	piperitol	356,1237	415,1376	-2,2754	5,6075	+CH ₃ COO
	quercetin-3- <i>O</i> -glc-1-3-rham-1-6-glucoside	772,2087	771,2014	2,5041	5,1098	-H
	quinic_acid_1	192,0624	191,0551	-0,9783	4,0803	-H
	rutin_1	612,1694	611,1621	0,3580	5,3978	-H
	sorocein_A	630,2192	629,2119	-6,2013	5,7500	-H
8	13(2)(s)-hidroxy-17(3)-etoxifeoforbideo	636,3003	681,2985	5,5072	6,5652	+HCOO
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1101	367,1028	-0,6525	4,5716	-H
	chlorogenic_acid_2	354,0949	413,1088	-0,1611	6,0123	+CH ₃ COO

	kaempferol_3-rutinoside_4-glucoside	756,2123	755,2051	1,0465	6,5146	-H
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1545	609,1472	1,1062	6,3452	-H
	NCGC00180731-02	446,1419	445,1347	-0,4923	6,0124	-H, +Cl, +HCOO
	nicotiflorin	594,1588	593,1515	0,3429	6,5138	-H
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0462	163,0389	-1,1740	7,2418	-H
	quinic_acid	192,0626	191,0553	-0,8361	4,1068	-H
	rutin_1	612,1693	611,1620	0,2745	5,9275	-H
	sorocein_A	630,2193	629,2121	-6,0192	6,1049	-H
	xanthone	196,0515	241,0497	-0,8903	5,9280	+HCOO
	14-oxy- α -muurolene	218,1698	277,1837	2,7682	13,0422	+CH ₃ COO
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1105	367,1032	-0,2561	5,3554	-H
	catechin_monogallate_1	442,0936	487,0918	3,5724	6,7501	+HCOO
	kaempferol_3-rutinoside_4-glucoside	756,2117	755,2044	0,3806	7,2812	-H
	manghaslin	756,2120	755,2047	0,6875	7,4373	-H, +Cl
	NCGC00385380	626,1485	625,1412	0,1960	7,0850	-H
9	<i>n</i> -heptanal_1	114,1037	159,1019	-0,7813	5,6050	+HCOO
	PR100456_Quercetin-3,4- <i>O</i> -di-beta-glucopyranoside_Quercetin_3,4-diglucoside	626,1493	625,1421	1,0273	6,3838	-H
	quercetin-3- <i>O</i> -glc-1-3-rham-1-6-glucoside	772,2075	771,2003	1,3399	6,8718	-H
	quinic_acid_1	192,0626	191,0553	-0,8252	0,6763	-H
	14-oxy- α -muurolene	218,1698	277,1837	2,7526	13,0428	+CH ₃ COO
	3- <i>o</i> -feruloylquinic_acid	368,1106	367,1033	-0,1766	6,8929	-H
	catechin_monogallate_1	442,0931	487,0913	3,0637	6,8078	+HCOO
	hex-3-enyl_formate_1	128,0828	187,0967	-0,9144	5,7193	+CH ₃ COO
10	kaempferol_3- <i>o</i> -rhamninoside	740,2169	739,2096	0,5154	7,7858	-H
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1533	609,1460	-0,0931	8,2566	-H
	manghaslin	756,2134	755,2061	2,0690	7,4336	-H
	<i>n</i> -methylglaucine	370,1986	429,2125	-3,2322	6,5830	+CH ₃ COO
	quinic_acid	192,0626	191,0554	-0,7396	0,6886	-H
	rutin	610,1537	609,1464	0,2820	7,4019	-H
	14-oxy- α -muurolene	218,1697	277,1836	2,6598	13,0348	+CH ₃ COO
	16-hydroxy-kauran-19-oic_acid	320,2378	319,2305	2,6557	14,1702	-H
	4- <i>ipr</i> -benzenemethanol	150,1035	195,1017	-1,0142	7,3070	+HCOO
	hyperoside	464,0949	463,0876	-0,5559	8,2725	-H
	kaempferol-3- <i>o</i> -sophroside	610,1540	609,1468	0,6537	8,3392	-H
11	limonene_dioxide	168,1141	213,1123	-0,9508	7,3074	+HCOO, +CH ₃ COO
	<i>n</i> -heptanal_1	114,1035	173,1174	-0,9638	7,4103	+CH ₃ COO
	nicotiflorin	594,1587	593,1514	0,2297	8,9553	-H
	<i>n</i> -methylglaucine	370,1997	429,2136	-2,1025	6,9003	+CH ₃ COO
	quinic_acid	192,0626	191,0553	-0,7785	0,6816	-H
	sorocein_b_1	658,2249	717,2387	4,5694	8,4561	+CH ₃ COO
	14-oxy- α -muurolene	218,1698	277,1837	2,7318	13,0349	+CH ₃ COO
12	16-hydroxy-kauran-19-oic_acid	320,2378	319,2306	2,6965	14,6849	-H

	kaempferol-7- <i>O</i> -hexoside	448,1001	447,0928	-0,4744	8,9281	-H
	maltose	342,1159	341,1086	-0,2913	0,7616	-H
	nicotiflorin	594,1589	593,1516	0,4491	8,9540	-H
	quinic_acid	192,0625	191,0553	-0,8524	0,6734	-H
	benzyl_salicylate	228,0780	227,0707	-0,6590	9,2146	-H
13	maltose	342,1158	341,1085	-0,4228	0,7619	-H
	<i>p</i> -coumaric_acid	164,0464	163,0391	-0,9451	11,0582	-H

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2021.

APÊNDICE D – ANOTAÇÃO MOLECULAR DOS EXTRATOS BRUTOS DE *C. ATROBRUNNEUM*

Os resultados da análise dos dados de HPLC-MS/MS associados à plataforma do GNPS, para cada fração (análises em modo negativo e positivo, descritos nas Tabelas 15 e 16 respectivamente) forneceram o seguinte conjunto de moléculas (dados *ipsis litteris*), permitindo a anotação de 24 e 14 compostos diferentes respectivamente para cada modo de ionização.

Tabela 15 - Compostos detectados no modo positivo via HPLC-MS/MS dos 8 extratos brutos de *C. atrobrunneum*.

Ensaio	Nome do composto	m/z	M/Z erro PPM	t (s)	MQScore	Aduto
5, 6, 7	Venlafaxine	277.107	3971.83	638.286	0.785	M+H
7, 8	Trans-EKODE-(E)-Ib from NIST14	310.194	3182.33	298.220	0.772	M-H
5	L-Saccharopine from NIST14	275.206	6978.50	517.695	0.836	M+H
5, 6	Cholic acid	375.172	5122.40	726.880	0.772	M+H-2H ₂ O
5, 6	9S-Hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid	295.045	6248.02	317.629	0.746	M-H
2, 7	7,8-Dihydro-L-Biopterin	224.026	8689.97	451.431	0.827	M+H-H ₂ O
5, 6	Niflumic acid	281.178	6680.32	1.029.510	0.710	[M+H]
5, 6	NCGC00381253-01_C22H29NO7_2H-Isoindole-2-acetic acid, 7-carboxy-1,3-dihydro-6-methoxy-5-methyl-4-[(3-methyl-2-buten-1-yl)oxy]-alpha-(1-methylpropyl)-1-oxo-	440.304	4251.63	1.509.646	0.739	M+Na
5, 6	MoNA:3485103 (9Z,12Z,15Z)-Octadecatrienoic acid	277.079	796.89	345.852	0.827	[M-H] ⁻
5, 6, 7, 8	Mefloquine hydrochloride	377.423	4491.92	1.588.792	0.799	[M+H]
5, 6	UT000156 4-HDoHE 4-hydroxy-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid (+-)4-HDoHE	345.063	5346.28	815.154	0.796	M-H
5, 6	UT000066 13-HPODE 13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid 13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoic acid 13(S)-HpODE (9Z,11E)-(13S)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-dienoate (9Z,11E)-(13S)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11	309.256	6320.16	1.229.783	0.771	M-H
5, 6	PR310626 Karakoline	379.281	2688.59	1.668.772	0.813	M+H
4	PR307073 Sinapic acid 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)prop-2-enoic acid	224.149	4877.58	312.968	0.742	M-H
5, 6	PR300518 Isotalatizidine	409.866	3899.37	1.861.117	0.721	M+H
7, 8	KO008928 Diclofenac	294.176	6162.18	178.285	0.790	[M+H] ⁺
4	KNA00419 sn-Glycerol 3-phosphate Glycerophosphoric acid sn-Gro-1-P Glycerol-3-phosphate	391.233	145.69	2.658.775	0.912	[M+H]

1, 2	Cinnamic acid	149.068	53.64	3.142.675	0.721	[M+H] ⁺
7, 8	8-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]-1,3,7-trimethyl-1,3,7-trihydropurine-2,6-dione	328.220	5864.18	295.884	0.797	M+H
1, 2	6,4'-Dimethoxyisoflavone-7-glucoside (Wistin) - 40eV	298.967	6622.93	1.814.560	0.723	M-H
5, 6	2-[5-[2-[2-[5-(2-hydroxypropyl)oxolan-2-yl]propanoyloxy]propyl]oxolan-2-yl]propanoic acid	427.163	4630.81	216.048	0.850	[M+K] ⁺
5, 6	10-Hydroxycamptothecin	361.198	5234.49	968.627	0.752	M-H
8	(Z)-9-benzylidene-3-methyl-9H-indeno[2,1-c]pyridin-2-ium chloride	329.224	3486.99	1.170.420	0.794	[M+Na] ⁺
5, 6	2,4-Di-O-methylolivetonide	575.077	321.59	777.226	0.980	[2M+Na]

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2021.

Tabela 16 - Compostos detectados no modo negativo via HPLC-MS/MS dos 8 extratos brutos de *C. atrobrunneum*.

Ensaio	Nome do composto	m/z	M/Z erro PPM	t (s)	MQScore	Aduto
5, 6	methyl 2-{{4-(3-methylbutoxy)phenyl}methylene}-3-oxobenzobifuran-5-carboxylate	365.456	4624.84	2134.10	0.71323	M+H
5, 6	Cis-15-Tetracosenoic acid	365.556	4902.57	1515.45	0.71212	M+H
5, 6	Pinolenic acid	275.369	6669.84	1683.86	0.82329	M-H
7, 8	Linoelaidic acid	279.492	931.16	2415.84	0.79657	M-H
5, 6	2-Arachidonoylglycerol	381.276	5257.27	732.83	0.70647	M+H
5, 6	15-HETE	318.543	2152.09	1770.11	0.71473	M-H
5, 6	Norfloxacin (Norxacin)	321.323	3692.14	1073.31	0.82471	[M+H]
6	NCGC00385489-0113-[4-methyl-1-(2-methylpropanoyl)-3-oxocyclohexyl]butanoic acid	253.106	7730.78	340.85	0.70031	[M-H ₂ O+H] ⁺
5, 6	PR304854 Kainic acid	211.241	4017.13	471.25	0.87275	M-H
5, 6	FFF00027 Coprostanone	385.476	5092.26	1570.87	0.70836	[M+H] ⁺
5, 6	Divarinol	151.075	6.67	311.75	0.70520	M-H
5, 6	Cortisone	359.462	768.41	1369.76	0.73102	[M-H] ⁻
5, 6	7-Hydroxy-3-Methylflavone	249.232	7326.03	1003.92	0.70064	M-H
5, 6	3-(5-hydroxy-2,2,7,8-tetramethyl-6-oxo-7,8-dihydropyrano[3,2-g]chromen-10-yl)hexanoic acid	386.429	1942.28	1865.07	0.70477	[M-H] ⁻

Fonte: Elaborado pela AUTORA, 2021.