

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

Flávia Gabriele dos Reis

Fingerprinting e anotação rápida de metabólitos secundários das
folhas e sementes de *Xylopia sericea*

ARARAQUARA
2021

Flávia Gabriele dos Reis

***Fingerprinting* e anotação rápida de metabólitos secundários das
folhas e sementes de *Xylopia sericea***

Monografia apresentada ao Instituto de Química,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalleiro

**Araraquara
2021**

FLÁVIA GABRIELE DOS REIS

Fingerprinting e anotação rápida de metabólitos secundários das folhas e sementes
de *Xylopia sericea*

Monografia apresentada ao Instituto de Química,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em Química.

Araraquara, 17 de janeiro de 2022

BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Dedico este trabalho aos meus pais, Elton Elbio Lima dos Reis e Carla Patrícia dos Reis, pelo apoio incondicional em cada etapa: do vestibular à conclusão do curso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elton Elbio Lima dos Reis e Carla Patrícia dos Reis, pelo incentivo, amor, dedicação e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro e supervisora Dra. Isabel Duarte Coutinho, pelo comprometimento, paciência, dedicação e pela amizade, principalmente.

Aos meus amigos de graduação, ingressantes de 2017, com quem compartilhei momentos especiais e que tornaram mais saudável todos esses anos na universidade. Em especial ao Alexandre, Bruno, Driely, Gustavo, Laerte, Lara, Leonardo, Marianne e Gleice.

Aos companheiros do Laboratório de NuBBE I, com quem troquei conhecimentos e que me auxiliaram em vários momentos. Em especial, à Júlia Moraes Fernandes, pelos ensinamentos e amizade. Sempre me lembrarei de todos com carinho.

Aos professores que ensinaram e participaram de minha formação.

Aos técnicos de laboratório, pelos conhecimentos práticos, dedicação e aprendizado.

A todos os servidores do Instituto de Química que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP.

Ao Instituto de Química, por toda infraestrutura e suporte para a realização deste trabalho.

“A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência, mas pela capacidade de começar de novo.”

F. Scott Fitzgerald

RESUMO

A espécie *Xylopia sericea* (pindaíba-branca), pertencente à família Annonaceae e nativa da Bacia do Rio Doce, possui ampla distribuição na região de Mariana, especialmente na comunidade de Furquim. As sementes da pindaíba branca possuem sabor picante e aromático e são utilizadas na culinária. Assim, o projeto teve como objetivo a análise do perfil químico da espécie *Xylopia sericea* empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas. As folhas e sementes de *X. sericea* foram coletadas na Comunidade de Furquim, Mariana, MG. As folhas e sementes foram secas e moídas em moinho analítico, pulverizadas e submetidas a extração com etanol/água 70:30 v/v. Os extratos foram preparados utilizando banho ultrassônico por 30 minutos. Os sobrenadantes foram analisados no sistema UHPLC-DAD-CAD e UHPLC-DAD-MS. Como estratégia de anotação dos metabólitos presentes nos extratos analisados, foi realizado um levantamento bibliográfico dos compostos já isolados no gênero *Xylopia* sp. Assim, uma planilha contendo a estrutura química, fórmula molecular e nomenclatura IUPAC de 209 metabólitos foi adicionada à plataforma UNIFI para facilitar o processo de identificação. As principais classes de metabólitos identificadas foram derivadas dos flavonoides quercetina e kaempferol com λ_{max} de 257 e 356 nm. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho buscam agregar conhecimento aos subprodutos da cadeia produtiva de *X. sericea*, possibilitando assim, que no futuro a comunidade possa obter vantagem econômica na exploração sustentável dos arranjos produtivos da biodiversidade.

Palavras-chave: Annonaceae. *Xylopia*. Cromatografia líquida. Metabólitos. Flavonoides.

ABSTRACT

The species *Xylopia sericea* (pindaiba-branca), belonging to the Annonaceae family and native to the Bacia do Rio Doce, is widely distributed in the Mariana region, especially in the Furquim community. The seeds of the white pindaíba have a spicy and aromatic flavor and are used in cooking. Thus, the project aimed to analyse the chemical profile of the *Xylopia sericea* species using high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector and mass spectrometry. The leaves and seeds of *X. sericea* were collected in the Community of Furquim, Mariana, MG. The leaves and seeds were dried and ground in an analytical mill, pulverized and submitted to extraction with 70:30 v/v ethanol/water. The extracts were prepared using an ultrasonic bath for 30 minutes. Supernatants were analysed using the UHPLC-DAD-CAD and UHPLC-DAD-MS systems. As an annotation strategy of the metabolites present in the analysed extracts, a bibliographic survey of the compounds already isolated in the genus *Xylopia* sp. Thus, a spreadsheet containing the chemical structure, molecular formula, and IUPAC nomenclature of 209 metabolites was added to the UNIFI platform to facilitate the identification process. The main classes of metabolites identified were derived from the flavonoids quercetin and kaempferol with λ_{max} of 257 and 356 nm. Therefore, the results obtained in this work seek to add knowledge to the by-products of the *X. sericea* production chain, thus enabling the community to gain economic advantage in the sustainable exploitation of the productive arrangements of biodiversity in the future.

Keywords: Annonaceae. *Xylopia*. Liquid chromatography. Metabolites. Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos da espécie <i>Xylopia sericea</i> St. Hill	15
Figura 2 – Cromatogramas do extrato hidroetanólico das folhas de <i>X. sericea</i> ..	21
Figura 3 – Cromatogramas do extrato hidroetanólico das sementes de <i>X. sericea</i>	22
Figura 4 – Espectro MS/MS e possível fragmentação de uma quercetina ramnosilada.	23
Figura 5 – Diferentes classes de metabólitos secundários anotados	34
Figura 6 – Perfil metabólico dos extratos das sementes (a) e folhas (b) de <i>X. sericea</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de metabólitos assinalados no extrato hidroetanólico das folhas de <i>X. sericea</i>	23
Tabela 2 – Lista de metabólitos assinalados no extrato hidroetanólico das sementes de <i>X. sericea</i>	27
Tabela 3 – Estudo da seletividade do método	30
Tabela 4 – Precisão intermediária do extrato das sementes de <i>X. sericea</i>	31
Tabela 5 – Precisão intermediária do extrato das folhas de <i>X. sericea</i>	32
Tabela 6 – Estabilidade dos extratos hidroetanólicos das folhas e sementes da <i>X. sericea</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAD	detector por aerossol carregado (Ing. <i>Charged Aerosol Detector</i>)
DAD	detector por arranjo de diodos
DPR	desvio padrão relativo
FID	decaimento livre de indução (Ing. <i>free induction decay</i>)
Ing.	inglês
K'	fator de retenção
LC	cromatografia líquida (Ing. <i>liquid chromatography</i>)
M	íon molecular
<i>m/z</i>	razão massa-carga
MS	espectrômetro de massa (Ing. <i>mass spectrometry</i>)
N	número de pratos teóricos
QTOF	quadrupolo-tempo de voo (Ing. <i>quadrupole time-of-flight</i>)
RMN	ressonância Magnética Nuclear
Rs	resolução
TSP	3-trimetilsilil-2,2,3,3-propionato-d4 de sódio
UAE	extração assistida por ultrassom (Ing. <i>ultrasound-assisted extraction</i>)
UHPLC	cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (Ing. <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>)
UNESP	universidade estadual paulista
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

AU	absorbância
Da	Dalton
eV	elétronvolt
h	hora
Hz	Hertz
K	Kelvin
kV	quilovolts
L	litro
mDa	milidalton
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
v/v	razão volume-volume
ppm	partes por milhão
psi	libra-força por polegada quadrada (Ing. <i>inglês pound force per square inch</i>)
s	segundo
V	Volt
λ	comprimento de onda
λ_{max}	comprimento de onda de absorção máxima
°C	graus Celsius
μL	microlitro
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Família Annonaceae e o gênero <i>Xylopia</i>	14
1.2. <i>Xylopia sericea</i> St. Hill	14
1.3. <i>Fingerprinting</i> cromatográfico	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Preparo da amostra.....	17
3.3. Estudo das condições cromatográficas	17
3.4. Softwares e base de dados	18
3.5. Otimização dos parâmetros para <i>fingerprinting</i>	18
3.5.1. <i>System suitability</i> e Seletividade	18
3.5.2 Estabilidade.....	19
3.5.3. Precisão.....	19
3.6. Análises por RMN de ¹ H.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
4.1. Análise do perfil químico das folhas	20
4.2. Análise do perfil químico das sementes	20
4.3. Anotação rápida dos metabólitos identificados	19
4.4. Otimização do método de <i>fingerprinting</i> para análise química dos metabólitos	30
4.4.1. <i>System suitability</i> e Seletividade	30
4.4.2. Precisão da amostra.....	31
4.4.3. Estabilidade da amostra	32
4.5. Diversidade metabólica das folhas e sementes da <i>X. sericea</i>	33
5. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Annonaceae e o gênero *Xylopia*

A família Annonaceae, pertencente à ordem Magnoliales, possui aproximadamente 2400 espécies descritas. A Annonaceae é um modelo ideal para os estudos de novas alternativas nas áreas química e medicinal devido aos padrões de diversificação filogenéticos. Dentre os gêneros contidos nessa família, destaca-se o gênero *Xylopia*, composto por plantas arbustivas ou arbóreas. No Brasil, espécies de *Xylopia* são encontradas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Centro-Sul^{1,2}. O gênero é muito estudado pela sua variedade de metabólitos, incluindo alcalóides, flavonóides, amidas, lignóides, acetogeninas e terpenóides^{3,4}. Além disso, possui um potencial amplo e variado de propriedades biológicas entre os quais podem ser destacadas citotoxicidade, propriedades antitumorais, antiparasitárias, antimicrobiais, inseticidas e antiplasmodiais^{5,6,7}. Além das propriedades medicinais, as espécies *X. sericea* e *X. brasilienses* possuem potencial econômico devido ao extrativismo sustentável das sementes por comunidades vulneráveis da região de Mariana, impactada pelo acidente com o rompimento da barragem em 2015.

Apesar da relevância dos dados químicos, biológicos e econômicos de espécies de *Xylopia*, não há na literatura científica método analítico abrangente que possibilite, em única análise, obter informação da diversidade metabólica dessas plantas. Os métodos cromatográficos já publicados são dedicados a classes específicas de metabólitos secundários de *Xylopia*: perfil de flavonóides em folhas⁸ e diterpenos caurânicos em frutos de *X. aethiopica*⁹, diterpenos caurânicos em *X. frutescens* e *X. brasiliensis*¹⁰, diterpenos traquilobânicos de *X. langsdorffiana*¹¹ e flavonoides de *X. sericea*¹². Este estudo mostra o desenvolvimento de um método analítico abrangente, em cromatografia líquida, que possibilite avaliação simultânea de várias classes de metabólitos secundários em duas espécies de *Xylopia*, apresentadas a seguir.

1.2. *Xylopia sericea* St. Hill

A *Xylopia sericea* St. Hill (Figura 1) é uma planta nativa do Brasil, porte arbustivo arbóreo, variando sua altura de 5 a 50 m¹³. A planta é conhecida popularmente como pimenta de macaco, pindaíba, pindaíba branca, entre outros nomes¹⁰. Os estudos fitoquímicos dessa espécie identificaram alcaloides aporfínicos, diterpenos do tipo caurano e flavonoides glicosilados derivados de kaempferol e quercetina presentes nas folhas da planta. Os ácidos *ent*-caurenóico e xylópico (ácido *ent*-15 α -acetóxicaur-16-en-19-oico) apresentam bioatividade antiparasitária, antimicrobiana e antiviral.^{14,15,16}

Figura 1. Frutos da espécie *Xylopia sericea* St. Hill



Fonte: Próprio autor. Comunidade de Furquim, Mariana – MG, fevereiro de 2020

1.3. *Fingerprinting* cromatográfico

A abordagem de *fingerprinting* cromatográfico ou “impressão digital”, envolve a análise do perfil químico de uma amostra ou conjunto de amostras utilizando técnicas analíticas de separação, como por exemplo a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), acopladas a técnicas espectroscópicas e/ou espectrométricas. Essa abordagem visa a análise qualitativa de forma rápida na qual a maior quantidade possível de metabólitos é identificada na matriz da amostra, tal como uma planta medicinal. Assim, é possível obter uma caracterização do perfil químico da planta

padronizado e observar ao haver variações em resposta a exposição de toxinas, perturbações ambientais, substâncias discriminantes ou biomarcadores^{17,18}.

Este trabalho está inserido no Projeto Plantas Medicinais e Úteis da Bacia do Rio Doce (CAPES 88887.124081/2016-00) e pode auxiliar na valorização das espécies de *Xylopia* utilizadas no extrativismo sustentável por populações vulneráveis na região de Mariana – MG. Neste estudo, os extratos das folhas das duas espécies e das sementes da *X. sericea* foram submetidas a análises químicas por Cromatografia a Líquido de Ultra-eficiência acoplada com detectores UV/Vis Arranjo de Diodo e Espectrômetro de Massas tipo triplo-quadrupolo de alta resolução (UHPLC-DAD-QTOF-MS^E), como também foi realizada a análise comparativa do perfil químico dos extratos das folhas e sementes da *Xylopia sericea* St. Hill.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de um método cromatográfico abrangente para detecção de flavonoides, diterpenos e alcaloides nas folhas e sementes da espécie *Xylopia sericea* St. Hill para obter um *fingerprinting* metabólico da espécie.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Construção de uma base de dados de metabólitos secundários para o gênero *Xylopia*;
- ✓ Otimização dos parâmetros do método cromatográfico
- ✓ Identificação dos metabólitos majoritários presentes nos extratos hidroalcoólicos das folhas e sementes de *Xylopia sericea*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O material vegetal (folhas e sementes) foi coletado na comunidade de Furquim em Minas Gerais pela equipe SAB-Territórios e pela Dra. Amanda Corrado da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Esse material foi enviado após a

secagem para o Instituto de Química da UNESP em Araraquara para as análises químicas do material vegetal. O material vegetal foi seco, moído e homogeneizado.

3.2. Preparo da amostra

Os extratos das folhas e sementes da *Xylopia sericea* foram preparados em triplicatas a partir de 30, 60 e 90 mg de material vegetal pesado diretamente em eppendorf. Para desenvolvimento do método analítico, os extratos foram preparados em 1 mL da mistura de etanol/água (70:30 v/v), submetidos a sonicação por 30 minutos e centrifugados por 10 minutos. Uma alíquota de 480 µL foi retirada de cada sobrenadante e transferida para um frasco de 1,5 mL para análise. Como padrão externo, foram adicionados em cada frasco de amostra 20 µL de uma solução 5 mg/mL de naringenina.

3.3. Estudo das condições cromatográficas

O método cromatográfico foi desenvolvido utilizando um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) da marca Ultimate3000, Dionex®, equipado com duas bombas (modelo DGP-3600RS, Dionex®), detector de arranjo de diodos (modelo DAD3000RS, Dionex®), amostrador automático (modelo WPS3000RS, Dionex®) e Detector por aerossol carregado Corona Veo (CAD). O processamento de dados foi realizado com o software Chromeleon 6.8 (Dionex®). Anotação metabólica foi realizada usando um sistema UHPLC-DAD-QToF-MS^E (bomba Water Acquity® H-Class; amostrador automático Acquity® FTN; detector Acquity® PDA) com um analisador quadrupolo por tempo de voo (Xevo G2-XS QToF). Os espectros de massa foram adquiridos nos modos negativos e positivos ao longo do intervalo de 50 a 1500 *m/z*, em execuções separadas. Os parâmetros para a fonte ESI foram voltagem capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30V, temperatura da fonte 100°C e fluxo de gás do cone 50 L/h. A temperatura de dessolvatação estava em 650°C com fluxo de gás de dessolvatação de 800L/h. Os dados MS^E foram adquiridos no modo centroide usando uma faixa de varredura de 50 a 1500 *m/z*, tempo de varredura de 0,1 s, energia inferior de 20 eV e rampa de energia de colisão de 20-50 eV.

A separação foi realizada em uma coluna Kinetex® C-18 (50 x 2,1 mm x 2,6 µm) e a temperatura do forno da coluna foi mantido a 40°C. A eluição foi conduzida

em um programa de gradiente linear contendo 0,1% de ácido fórmico – água (A) e 0,1% de ácido fórmico – etanol (B) como fase móvel. O gradiente iniciou de 7% a 40% de B no intervalo de 0 a 15 minutos, depois a 100% de B em 3 minutos e mantido por 2 minutos a um fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura foi ajustada para 40 °C. O volume de injeção foi de 5 µL. Os cromatogramas foram registrados a 254 nm para os extratos da semente e a 350 nm para os extratos das folhas. O detector UV-DAD foi configurado para uma faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm e os cromatogramas foram plotados em 254 nm para o extrato das sementes e 350 nm para o extrato das folhas. Uma resposta CAD foi definida em 100 pA, um filtro alto foi selecionado e o ar regulado a 40 psi foi introduzido no detector. Primeiramente, o eluato foi introduzido no DAD e depois diretamente no instrumento CAD.

3.4. Softwares e base de dados

O tratamento e aquisição dos dados espectrométricos foram realizados nos softwares UNIFI® Scientific Information System da Waters Technologies® e MassLynx 4.1 (Waters®) para o processamento dos dados empregando uma base de dados criada para substâncias já identificadas no gênero *Xylopi*a com base na literatura, pois fornece uma mesclagem dos dados cromatográficos e espectrométricos em relatório a fim obter o processamento e visualização dos dados. O banco de dados de metabólitos já identificados em *Xylopi*a foi construído manualmente a partir do levantamento de dados da literatura, utilizando uma planilha com nomenclatura, massa teórica e fórmula molecular de 209 metabólitos¹⁹⁻⁷⁵.

3.5. Otimização dos parâmetros para *finger*printing

3.5.1. *System suitability* e Seletividade

Seletividade é a capacidade do método em ser específico para o doseamento da substância em questão mesmo quando estiverem presentes possíveis interferentes. Verificar os tempos de retenção dados pelos cromatogramas e o espectro no UV, na presença de outros componentes da amostra. A solução de 0,100 mg/mL de naringenina foi utilizada como padrão, pois não apresentou interferência na análise. A seletividade será demonstrada pelos tempos de retenção e a pureza dos

picos da substância de referência e os extratos de folhas e sementes obtidos pelo detector de arranjo de diodos em três pontos diferentes dos picos.

Para a avaliação do *system suitability*, foram realizadas cinco análises da solução padrão de concentração 100 µg/mL. Os critérios de aceitação desse parâmetro são: fator de retenção $k' > 2$; Resolução $R_s > 2$; Fator de alargamento (TF) ≤ 2 ; número de pratos teóricos $N > 2000$; desvio padrão relativo DPR ≤ 3 . A verificação da seletividade foi realizada por meio de três análises do diluente, o qual o tempo de retenção não deve coincidir e/ou interferir com os picos de absorção máxima do marcador em questão, sendo que estes devem coincidir com o padrão.

3.5.2. Estabilidade

O estudo de Estabilidade das Soluções tem como objetivo determinar se 24 horas após a preparação das soluções os compostos de interesse permanecem estáveis à temperatura ambiente sob as condições de análise do laboratório. O critério de aceitação para a estabilidade é que a diferença entre o resultado inicial e após 24 horas para os extratos de folhas e sementes estocados deve ser menor ou igual a 3,0%, quando comparada aos extratos recentemente preparados e recuperação da leitura do analito no intervalo de 95 a 105%.

3.5.3. Precisão

A avaliação da precisão do método foi por meio das medidas de área dos analitos de interesse em diferentes quantidades de massa de material vegetal. O objetivo é avaliar a concordância entre os valores quando o método se aplica repetidamente a múltiplas soluções de uma mesma amostra.

A precisão por repetibilidade foi avaliada por meio do preparo e análise de três extratos, em triplicata, contendo diferentes quantidades de massa: 30, 60 e 90 mg de material vegetal. A precisão deve ser medida em condições repetitivas (mesmo analista, mesmo dia e mesmo instrumento). Uma análise de cada solução amostra totalizando nove análises. Os critérios de aceitação da repetibilidade são: O coeficiente de variação para o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises das réplicas de mesma concentração deve ser menor ou igual a 10,0%.

Os parâmetros descritos foram analisados de acordo com a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, sendo eles seletividade e precisão por repetibilidade e estabilidade.

3.6. Análises por RMN de ^1H

Integrantes do grupo de pesquisa, Dra. Isabel Duarte Coutinho e a Dra. Julia Fernandes Moraes (comunicação pessoal), por meio do Projeto Plantas Medicinais e Úteis da Bacia do Rio Doce (CAPES 88887.124081/2016-00), realizaram análises por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) de 28 frações coletadas no processo extração e separação das folhas da *X. sericea* utilizando um sistema MPLCELS-DAD com uma coluna C-18 (180 x 30 mm d.i., 40 μm , Buchi) como fase estacionária em um programa de gradiente linear contendo água (A) e etanol (B), com o gradiente variando de 5% a 95% de B a vazão de 7 mL/min.

Os espectros foram adquiridos sob uma temperatura de 300 K em um espectrômetro Avance III (operando a 600,1298 MHz, equipado com uma sonda BBFO-Z, 5mm). O sinal residual da água foi suprimido por pré-saturação, e os espectros adquiridos com o tempo de relaxação de 4,6 segundos (s), tempo de aquisição de 2,72 s (64 k pontos), acúmulo de 256 transientes e largura espectral de 20 ppm. Todos os espectros FIDs foram submetidos automaticamente a transformação de Fourier após a aplicação de uma função de janela exponencial com um alargamento de linha de 0,3 Hz. A correção da fase e da linha de base foram realizadas no software TopSpin. Os deslocamentos químicos foram referenciados a TSP-d $_4$ a δ 0,00.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise do perfil químico das folhas

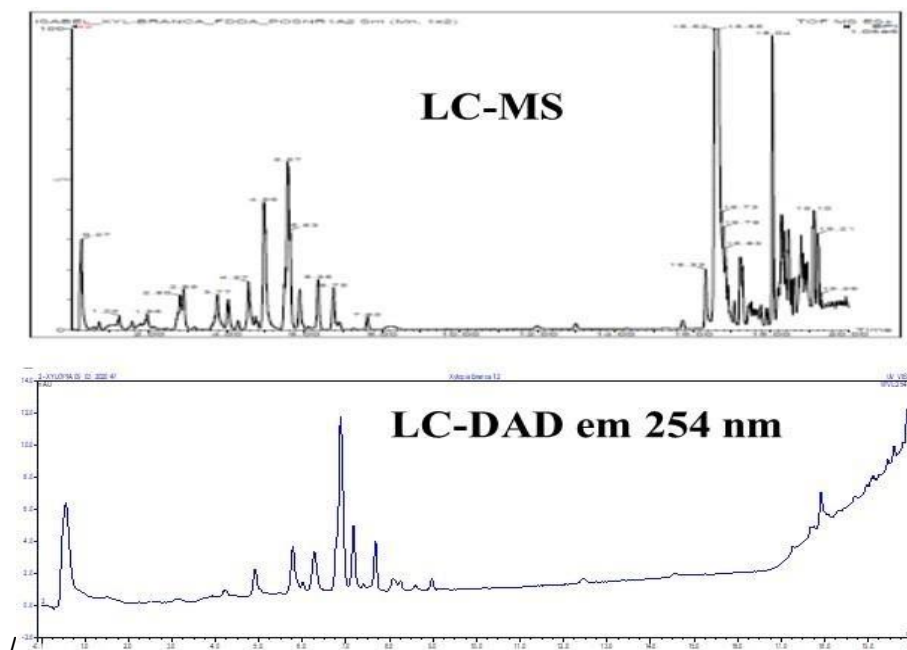
Os cromatogramas obtidos nos sistemas LC-DAD e LC-MS do extrato hidroetanólico das folhas de *X. sericea* estão ilustrados na Figura 2. As principais classes de metabólitos identificadas foram derivados dos flavonóides quercetina e kaempferol com λ_{max} de 257 e 356 nm. Pequenos deslocamentos em λ_{max} (356 $\rightarrow$ 353) foram importantes para distinguir quercetina e kaempferol devido ao padrão de substituição no anel B. O assinalamento dos metabólitos foi realizado a partir dos valores de m/z detectados no extrato das folhas de *X. sericea*. O uso combinado das

análises por RMN de ^1H e LC-MS foi muito importante para identificar os metabólitos diterpenos, que não possuem absorbância na região do UV.

4.2. Análise do perfil químico das sementes

Os cromatogramas obtidos nos sistemas LC-DAD e LC-MS do extrato hidroetanólico das sementes de *X. sericea* estão ilustrados na Figura 3. Análogo ao extrato das folhas, o extrato das sementes contém como principais classes de metabólitos derivados dos flavonóides quercetina e kaempferol. Derivados de diterpenos caurânicos e traquilobânicos também foram identificados no extrato. O assinalamento dos metabólitos foi realizado a partir dos valores de m/z detectados no extrato das sementes de *X. sericea*.

Figura 2. Cromatogramas do extrato hidroetanólico das folhas de *X. sericea*.

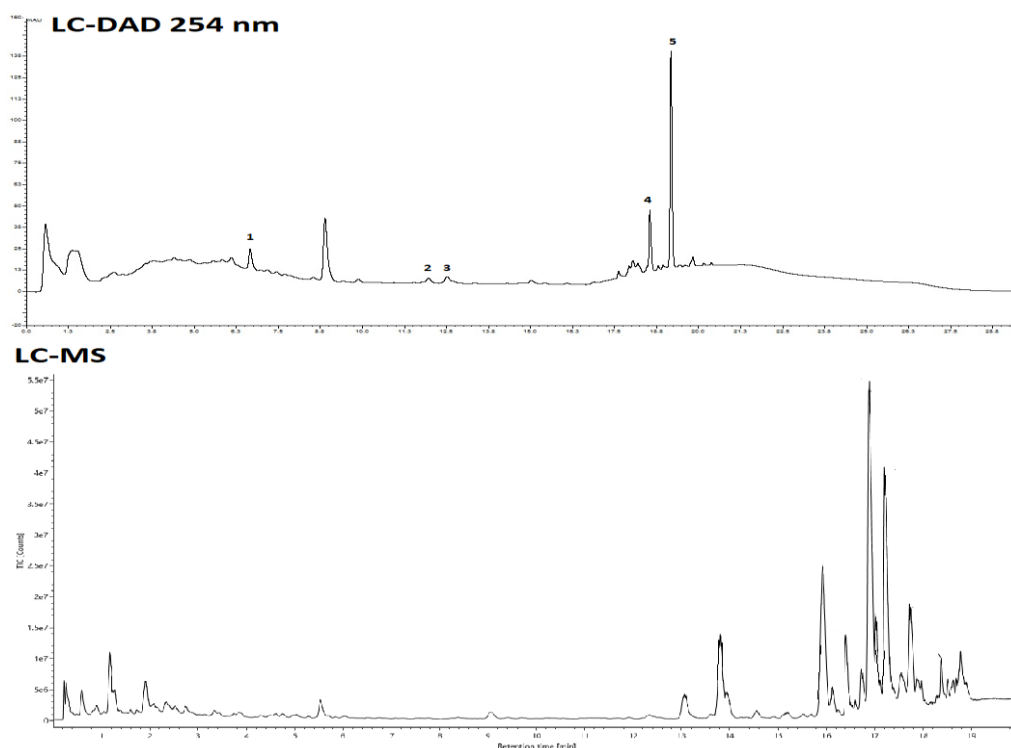


Fonte: Próprio autor

Além disso, observou-se que a *X. sericea* contém uma grande quantidade de taninos, tanto nas folhas quanto nas sementes, devido à oscilação da linha de base no início do cromatograma, visíveis na Figura 3 e sinais amplos a 6-7 ppm em espectros de RMN de ^1H . Os taninos são compostos muito polares e irreversivelmente adsorvidos em grupos de silanóis residuais da fase estacionária C18, consequentemente, diminuindo a eficiência.

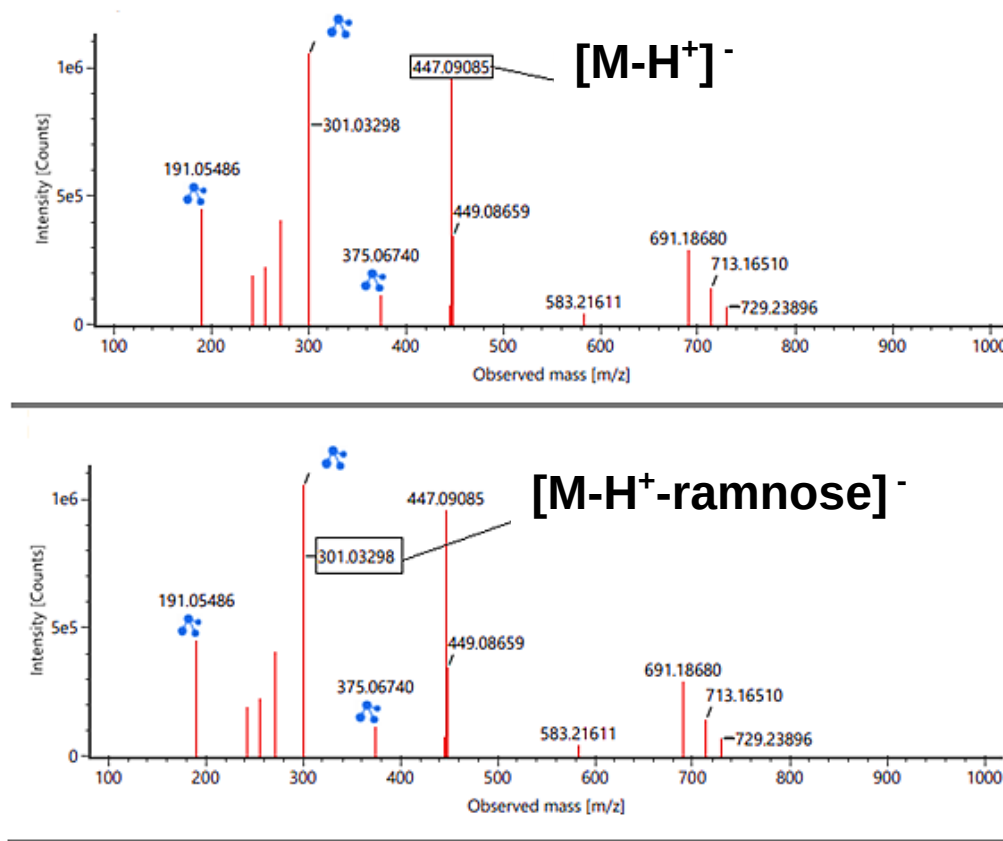
O uso do software UNIFI fornece informações cromatográficas e espectrométricas em comparação com o banco de dados inserido. O software obtém uma possível fragmentação e íons teóricos da substância alvo do arquivo.mol do banco de dados que são comparados com os valores experimentais de m/z . Um exemplo ilustrativo da abordagem citada é a anotação do flavonoide quercetina-3-O-ramnose, um metabólito já identificado na espécie *Xylopi*a (DA SILVA et al., 2009). Por meio do espectro na região UV característico dessa classe, massa molecular e fórmula molecular, há uma grande possibilidade de que esse metabólito, esteja presente no extrato da semente. Entretanto, essa possibilidade se aplica também aos isômeros dessa molécula, pois as informações tridimensionais da molécula não são fornecidas por análises de LC-MS. A Figura 4 mostra espectros de MS/MS da quercetina-3-O-ramnose. O $[M-H]$ de m/z 447,0925 observado no espectro obteve uma correspondência entre a base de dados do gênero *Xylopi*a e este metabólito. A quercetina-3-O-ramnose possui várias fragmentações, das quais é possível relacionar aos picos de maior intensidade representa a molécula ionizada de quercetina sem um hidrogênio e sem a ramnose (m/z 301,03298). O fragmento de m/z 191,05486 representa a perda do anel B contendo as duas hidroxilas (Figura 4).

Figura 3. Cromatogramas do extrato hidroetanólico das sementes de *X. sericea*.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4. Espectro MS/MS e possível fragmentação de uma quercetina ramnosilada.



Fonte: Próprio autor.

Os dados da lista foram comparados com banco de dados de metabólitos já identificados no gênero *Xylopi*, uma planilha com nomenclatura, massa teórica e fórmula molecular de 209 metabólitos. Dessa maneira, a plataforma sugeriu uma lista de 109 metabólitos e 51 dados de m/z tiveram as possíveis fórmulas moleculares atribuídas para as folhas mostrados na Tabela 1 e 56 dados de m/z foram atribuídas para as sementes mostrados na Tabela 2.

Tabela 1 – Lista de metabólitos assinalados no extrato hidroetanólico das folhas de *X. sericea*

(continua)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
1	0,71	Lauroilsina	314,1385	[+H]	313,1312	313,13141	-0,2
2	1,13	Coreximina	328,15	[+H]	327,1468	327,14706	-0,3

(Continuação)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
3	1,13	Laurotetanina	328,1541	[+H]	327,1468	327,14706	-0,3
4	1,19	Ácido 4-O-Cafeoilquinico	377,0842	[+Na]	354,0950	354,09508	-0,1
5	1,52	Reticulina	330,1699	[+H]	329,1626	329,16271	-0,1
6	1,78	Discretina	342,1698	[+H]	341,1625	341,16271	-0,2
7	2,67	Glaucina	356,1861	[+H]	355,1788	355,17836	0,5
8	2,79	Discretina	342,1698	[+H]	341,1625	341,16271	-0,2
9	2,89	Laurotetanina	328,154	[+H]	327,1467	327,14706	-0,3
10	3,18	Quercetina-di-glicosideo (649.13767 (Na), 627,15775 (+H))	303,0499	[+H]	302,0426	302,04265	0
11	3,30	Procianidina A2	577,1344	[+H]	576,1268	576,1271	0,3
12	3,70	(+)-Siringaresinol-O-β-D-glicopiranosideo	603,2057	[+Na]	580,2165	580,21559	0,9
13	3,76	Quercetina-3-O-glicosilpentosideo (465,1029, 303,0499)	619,127	[+Na,+H]	596,1378	596,13773	0,1
14	4,02	Fibrecisina	296,1286	[+H]	295,1214	295,12084	0,5
15	4,53	Roemerina	280,133	[+H]	279,1257	279,12593	-0,2
16	4,57	Quercetina-3-O-glicosideo (303,05001)	487,085	[+Na,+H]	464,0957	464,09548	0,3

(continuação)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
17	4,74	Nornantenina	326,1386	[+H]	325,1314	325,13141	0
18	4,78	Quercetina-3-O-glicosideo (303,05001)	487,085	[+Na,+H]	464,0958	464,09548	0,3
19	4,86	Nornuciferina	282,1493	[+H]	281,1420	281,14158	0,5
20	4,97	Anonaina	266,1175	[+H]	265,1103	265,11028	0
21	5,01	Tudurainaq	298,144	[+H]	297,1367	297,13649	0,2
22	5,01	Quercetina-3-O-glicosilpentosideo (303,0501)	619,1273	[+Na,+H]	596,1381	596,13773	0,4
23	5,07	Quercetina-3-O-arabinosideo	457,0745	[+Na]	434,0852	434,08491	0,3
24	5,53	Kaempferol-3-O-glicosideo (287,0554, kaempferol)*	471,0901	[+Na]	448,1009	448,10056	0,3
25	5,57	Quercetina-3-O-dipentosídio	589,1166	[+Na+K+H]	566,1274	566,12717	0,2
26	5,58	Quercetina-3-O-arabinosideo	435,0924	[+H]	434,0851	434,08491	0,2
27	5,63	Quercetina-3-O-arabinosideo	457,0741	[+Na]	434,0849	434,08491	0
28	5,88	Quercetina-3-O-raminopiranosideo (303,0499)	471,0899	[+Na]	448,1007	448,10056	0,1
29	5,90	Kaempferol-3-O-β-D-glicopiranosideo	471,0899	[+Na,+H]	448,1006	448,10056	0,3
30	5,98	“Stephalagin”	310,1441	[+H]	309,1368	309,13649	0,3
31	6,10	Quercetina-3-O-raminosilpentosideo (303,05)	603,1326	[+Na,+H]	580,1434	580,14282	0,6

(continuação)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
32	6,26	O-metil-liridinina	326,1754	[+H]	325,1681	325,16779	0,3
33	6,28	Kaempferol-3-O-rutinosideo	617,1485	[+Na]	594,1593	594,15847	0,8
34	6,36	Quercetina-3-O-raminosilpentoside (303,05)	603,1324	[+Na,+H]	580,1432	580,14282	0,3
35	6,36	Quercetina-3-O-arabinosideo	435,0929	[+H]	434,0856	434,08491	0,7
36	6,78	kaempferol-3-O-dipentosídio (287,055)	573,1217	[+Na]	550,1320	550,13226	0,2
37	6,90	kaempferol-3-O-pentosideo ((287,055))	441,0793	[+Na]	418,0901	418,09	0,1
38	7,27	Afzelina (287,0553, Kaempferol)	455,0952	[+Na]	432,1060	432,10565	0,4
39	7,63	kaempferol-3-O-pentosideo (Kaempferol, 287,055)	419,0983	[+H]	418,0910	418,09	1
40	7,79	Kaempferol-3-O-raminosilglicosideo (287,055)	633,1234	[+K]	594,1602	594,15847	1,8
41	16,90	Ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-15-ona-19-oico	339,193	[+Na,+H]	316,2038	316,20384	0
42	17,04	Biciclogermacreno	205,1951	[+H]	204,1878	204,1878	0

(conclusão)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
43	17,10	Ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-15-ona-19-oico	317,2082	[+H]	316,2009	316,20384	-2,9
44	17,22	Ácido <i>ent</i> -15 α -Acetoxikaur-16-en-19-oico	383,2192	[+Na]	360,2300	360,23006	-0,1
45	17,22	Ácido <i>ent</i> -15 α -Acetoxikaur-16-en-19-oico	383,2192	[+Na]	360,2300	360,23006	-0,1
46	17,32	<i>ent</i> -18-nor-atisano-4beta, 16alpha-diol	331,2241	[+Na]	308,2349	308,23514	-0,2
47	17,75	Ácido 7 beta-acetoxytrachyloban-18-oic	303,2318	[+H]	302,2245	302,22458	-0,1
48	17,81	Traquilobano	273,2575	[+H]	272,2502	272,2504	-0,2
49	18,22	Xilomatenina	645,4704	[+Na]	622,4812	622,48085	0,3
50	18,28	Sitosterol-3-O-galactopiranosideo	599,4282	[+Na]	576,4390	576,43899	0
51	18,75	Xilomaticina	663,4592	[+K]	624,4961	624,4965	-0,4

Fonte: Próprio autor.

Tabela 2 – Lista de metabólitos assinalados no extrato hidroetanólico das sementes de *X. sericea*.

(continua)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
1	0,60	Ácido 3-O-Cafeoilquínico	353,0875	-H	354,0947	354,09508	0,4
2	1,18	Ácido 3-O-Cafeoilquínico	353,0873	-H	354,0946	354,09508	0,5
3	1,26	Ácido 3-O-Cafeoilquínico	353,0872	-H	354,0945	354,09508	0,6
4	2,73	Kaempferol-3-O-ramnosilglicosídeo	593,1513	-H	594,1586	594,15847	0,1
5	3,15	Quercetina-3-O-dipentosídeo	625,1413	+CH ₃ COO	566,1275	566,12717	0,3

(continuação)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
6	3,31	Quercetina-3-O-dipentosídeo	625,1417	+CH ₃ COO	566,1278	566,12717	0,7
7	3,84	Quercetina-3-O-glicosilpentosídeo	595,1305	-H	596,1378	596,13773	0,0
8	3,99	kaempferol-3-O-dipentosídeo	609,1452	+CH ₃ COO	550,1313	550,13226	1,0
9	4,22	Quercetina-3-O-glicosilpentosídeo	595,1303	-H	596,1376	596,13773	0,1
10	4,47	Quercetina-3-O-dipentosídeo	565,1196	-H	566,1269	566,12717	0,3
11	4,51	Afzelin	431,0973	-H	432,1046	432,10565	1,0
12	4,54	Quercetina-3-O-glicosídeo	463,0874	-H	464,0947	464,09548	0,8
14	4,63	Kaempferol-3-O-glucosídeo	447,0924	-H	448,0996	448,10056	0,9
15	4,64	Kaempferol-3-O-dipentosídeo	565,1194	-H	566,1267	566,12717	0,5
16	4,74	Quercetina-3-O-glicosídeo	463,0872	-H	464,0945	464,09548	0,1
17	4,77	Quercetina-3-O-ramnosilglucosídeo	609,1456	-H	610,1529	610,15338	0,5
18	5,01	Quercetina-3-O-ramnosilpentosídeo	579,1353	-H	580,1425	580,14282	0,3
19	5,05	Quercetina-3-O-arabnofuranosídeo	433,0767	-H	434,0840	434,08491	1,0
20	5,36	Afzelin	431,0970	-H	432,1043	432,10565	1,4
21	5,42	Kaempferol-3-O-ramnosilglucosídeo	593,1499	-H	594,1572	594,15847	1,3
22	5,49	Quercetina-3-O-glucosídeo	447,0922	-H	448,0994	448,10056	1,1
23	5,53	Quercetina-3-O-dipentosídeo	565,1195	-H	566,1268	566,12717	0,4
24	5,58	Quercetina-3-O-arabnofuranosídeo	433,0769	-H	434,0842	434,08491	0,7
25	5,85	Kaempferol-3-O-glucosídeo	447,0925	-H	448,0998	448,10056	0,8
26	5,98	Kaempferol-3-O-ramnosilglucosídeo	593,1514	-H	594,1587	594,15847	0,2
27	5,98	kaempferol-3-O-pentosídeo	417,0819	-H	418,0891	418,09000	0,9
28	6,07	Quercetina-3-O-ramnosilpentosídeo	579,1351	-H	580,1424	580,14282	0,5
29	6,31	Quercetina-3-O-ramnosilpentosídeo	579,1350	-H	580,1423	580,14282	0,6
30	6,77	kaempferol-3-O-dipentosídeo	549,1244	-H	550,1317	550,13226	0,6
31	6,92	Quercetina-3-O-ramnosídeo	447,0925	-H	448,0997	448,10056	0,8
32	8,27	Kaempferol	285,0394	-H	286,0467	286,04774	1,1

(continuação)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
33	13,80	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico	375,2169	+CH ₃ COO, -H	316,2031	316,20384	0,8
34	15,21	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico	375,2168	+CH ₃ COO	316,2030	316,20384	0,9
35	15,53	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico	375,2163	+CH ₃ COO	316,2024	316,20384	1,4
36	15,93	<i>ent</i> -atisane-16alpha-ol-18-oic acid	379,2501	+CH ₃ COO	320,2363	320,23514	1,1
37	16,11	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico I	375,2169	+CH ₃ COO	316,2030	316,20384	0,8
38	16,26	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico I	375,2170	+CH ₃ COO	316,2032	316,20384	0,7
39	16,42	Ácido 7beta-Hydroxytrachyloban-18-oico	317,2122	-H	318,2194	318,21949	0,1
40	16,60	<i>ent</i> -18-nor-atisano-4beta-hidroxiperóxido-16alpha-ol	351,2536	+CH ₃ COO	292,2398	292,24023	0,4
41	16,61	Ácido Traquiloban-19-oico	361,2385	+CH ₃ COO	302,2246	302,22458	0,1
42	16,64	Ácido 7beta-Hydroxytrachyloban-18-oico	317,2117	-H	318,2190	318,21949	0,5
43	16,72	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico	375,2174	+CH ₃ COO	316,2035	316,20384	0,3
44	16,77	Ácido <i>ent</i> -atisane-16alpha-ol-18-oico	319,2272	-H	320,2345	320,23514	0,7
45	16,91	ácido <i>ent</i> -labda-15,16-epóxido-8(17), 13(16), 14-trien18-óico	315,1965	-H	316,2038	316,20384	0,1
46	17,03	Ácido 4-epi-transcomunico	359,2228	-H	360,2301	360,23006	0,0
47	17,09	<i>ent</i> -18-nor-atisano-4beta-hidroxiperóxido-16alpha-ol	351,2536	+CH ₃ COO	292,2398	292,24023	0,4

(conclusão)

Nº.	Tempo de retenção (min)	Metabólitos	m/z observada	Aduto	Massa Neutra observada	Neutral mass (Da)	Mass error (mDa)
48	17,23	Ácido 4-epi-transcomunico	359,2228	-H	360,2300	360,23006	0,0
49	17,24	Vielanina E	537,2845	-H	538,2918	538,29305	1,3
50	17,62	Vielanina D	597,3068	+CH ₃ COO	538,2930	538,29305	0,1
51	17,62	Vielanina E	597,3068	+CH ₃ COO	538,2930	538,29305	0,1
52	17,75	Ácido 7beta-acetoxytrachyloban-18-oico	301,2171	-H	302,2244	302,22458	0,2
53	17,75	Ácido traquiloban-19-oico	301,2171	-H	302,2244	302,22458	0,2
54	18,16	Geranylgeraniol	349,2741	+CH ₃ COO	290,2603	290,26097	0,7
55	18,34	E-phytol	355,3213	+CH ₃ COO	296,3075	296,30792	0,4

Fonte: Próprio autor.

4.4. Otimização do método de *fingerprinting* para análise química dos metabólitos

4.4.1. System Suitability e Seletividade

A seletividade foi determinada por análise e comparação de dados cromatográficos (tempo de retenção e pureza de pico) e por nenhuma coeluição visível entre o solvente e a amostra (Tabela 3). Deve-se notar também que os espectros de UV também foram examinados, não apresentando alterações. Assim, o método foi capaz de distinguir os analitos da matriz. O padrão de naringenina 0,100 mg/mL foi injetado cinco vezes e três injeções do diluente foram feitas para análise da seletividade do método.

Tabela 3- Estudo da seletividade do método.

(continua)

Nº de injeções	Tempo de Retenção (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)	Nº de Pratos Teóricos (N)	Pureza de Pico
1	8,879	4,5786	40,1241	39366	1000
2	8,883	4,7173	40,9489	39271	1000
3	8,887	4,7802	41,256	39184	1000

(conclusão)

Nº de injeções	Tempo de Retenção (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)	Nº de Pratos Teóricos (N)	Pureza de Pico
4	8,884	4,7093	41,0624	39661	1000
5	8,888	4,7359	41,4714	40200	1000
Média	8,884	4,704	40,973	39536	1000
DPR (%)	0,0036	0,0754	0,5142	0,0000	0,0000
Diluyente	0,0000 mAU*min				
Interferência (%)	0,0000				

Fonte: Próprio autor.

4.4.2. Precisão intermediária da amostra

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) da repetibilidade e da análise de precisão intermediária com massas diferentes de material vegetal em triplicata. A repetibilidade foi determinada analisando o composto majoritário em nove repetições. Portanto, as análises foram realizadas em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) dentro de um dia. O composto monitorado para a análise da semente foi o pico 5 de maior intensidade, como mostra a Figura 3, que corresponde ao composto 46 da Tabela 2, anotado como ácido ent-labda-15,16-epóxido8(17),13(16),14-trien18-óico. Para a análise da folha foi monitorado o pico 4 de maior intensidade indicado na Figura 2, que é correspondente ao composto 25 da Tabela 1 anotado como quercetina-3-O-dipentosideo.

Tabela 4 - Precisão intermediária do extrato das sementes de *X. sericea*.

(continua)

Amostra	Área (mAU*min)		
	Composto 46	Média	DPR (%)
30.1	5,5606	5,27577	4,28
30.2	6,0455		
30.3	5,7212		

(conclusão)

Amostra	Área (mAU*min)		
	Composto 46	Média	DPR (%)
60.1	8,8390	9,08850	3,94
60.2	8,9273		
60.3	9,4992		
90.1	13,6508	1,74757	6,86
90.2	12,6863		
90.3	11,9056		

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5 - Precisão intermediária do extrato das folhas de *X. sericea*.

Amostra	Área (mAU*min)		
	Composto 25	Média	DPR (%)
30.1	16,1895	15,5866	3,9806
30.2	15,6203		
30.3	14,9500		
60.1	24,0908	21,7117	11,8614
60.2	18,9771		
60.3	22,0672		
90.1	39,5246	39,7696	3,7248
90.2	38,4260		
90.3	41,3581		

Fonte: Próprio autor.

Em ambos os extratos, as amostras preparadas com 30 e 90 mg de material vegetal obedecem ao critério de coeficiente de variação menor ou igual à 10%, mostrando que o método é preciso para essas concentrações. Entretanto, o extrato da folha preparado com 60 mg de material vegetal ultrapassa o valor limite para o coeficiente de variação e mostra um desvio padrão relativo maior do que as demais concentrações, indicando que houve algum erro experimental na preparação/análise da amostra a 60 mg.

4.4.3. Estabilidade da amostra

O estudo da estabilidade, descrito na Tabela 5, foi realizado pela análise das áreas dos picos de maior intensidade em ambos os cromatogramas das amostras

preparadas com 60 mg de material vegetal. Verificou-se que as variações não foram superiores a 1,92% e 2,16% para o extrato das folhas e sementes, respectivamente, sugerindo que o método desenvolvido foi preciso. As recuperações dos componentes foram de 95,6–100% para a semente e de 99,2–105,0%, demonstrando que esse método é preciso. Além disso, a amostra permaneceu estável por pelo menos 24 h.

Tabela 6 - Estabilidade dos extratos hidroetanolicos das folhas e sementes da *X. sericea*

Amostra	Data e Hora	Área (mAU*min)	Recuperação (%)	Período de estabilidade (h)	DPR (%)
Composto 46 (semente)	30/10/20 00:20	8.87	100.00	0:00	1.92
	30/10/20 00:53	8.83	99.5	0:32	
	30/10/20 01:25	8.84	99.6	1:05	
	30/10/20 6:19	8.66	97.6	5:59	
	30/10/20 7:25	8.48	95.6	7:04	
	30/10/20 7:57	8.56	96.5	7:37	
	31/10/20 5:40	8.51	96.0	29:20.	
Composto 25 (folha)	30/10/20 9:35	13.75	100.00	0:00	2.16
	30/10/20 10:08	13.76	100.1	0:32	
	30/10/20 10:41	14.31	104.1	1:05	
	30/10/20 15:35	14.04	102.1	5:59	
	30/10/20 17:13	13.90	101.1	7:37	
	30/10/20 17:45	14.44	105.0	8:10	
	31/10/20 16:23	13.63	99.2	30:47:	

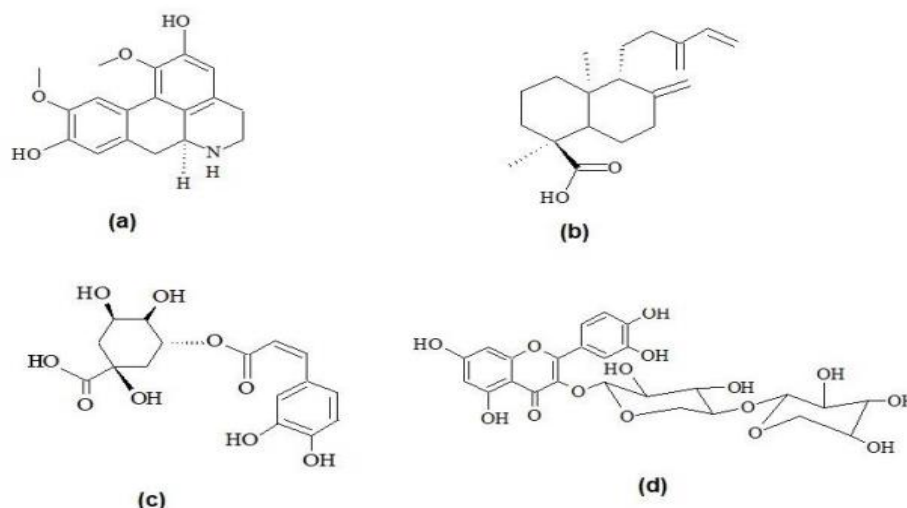
Fonte: Próprio autor.

4.5. Diversidade metabólica das folhas e sementes da *X. sericea*

Utilizando a estratégia da base de dados da literatura, é possível observar que os metabólitos secundários majoritários nas folhas da *X. sericea* estão distribuídos em 16 alcaloides, 11 terpenos e 21 flavonoides. Todos esses compostos já foram descritos no gênero *Xylopia*, e desses apenas 5 flavonoides já foram identificados no 33 extrato das folhas de *Xylopia sericea* (GONTIJO et al., 2019). Analogamente, o processo de identificação da distribuição metabólica das sementes assinalou 21 terpenos, 29 flavonoides e 3 ácidos clorogênicos já descritos na literatura. Um exemplo de cada classe desses metabólitos secundários majoritários está ilustrado na Figura 5, na qual está presente a laurolitsina (a), pertencente à classe dos alcaloides, o ácido ent-labda-15,16-epóxido-8(17),13(16),14-trien-18-óico (b) que pertence à classe dos diterpenos, o ácido 3-cafeoilquínico (c) que pertence à classe

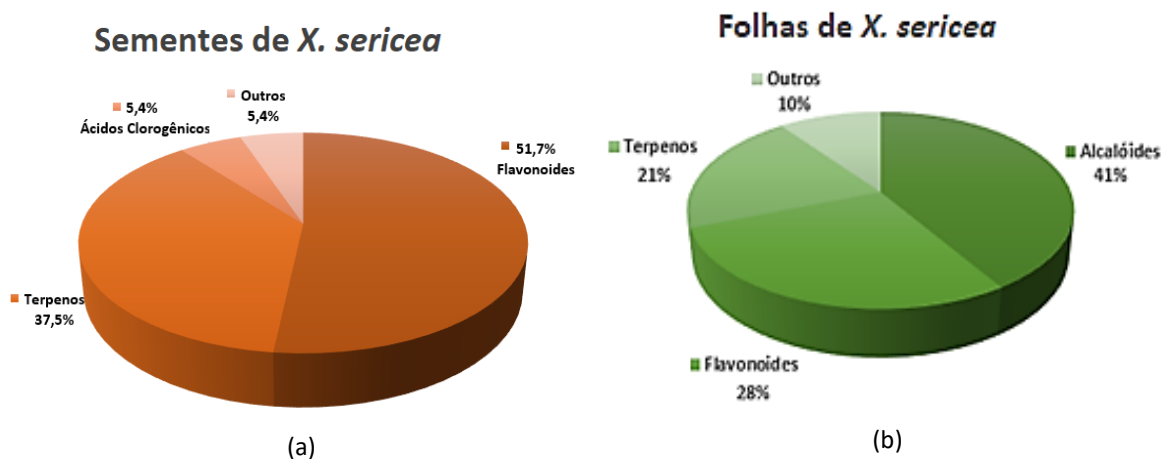
dos ácidos clorogênicos e a quercetina-3-O-dipentosídeo (d) que é derivado de um flavonoide. A análise comparativa dos perfis fitoquímicos permite observar que as folhas possuem atividade antioxidante e antimicrobiana (GONTIJO et al., 2019) devido à alta presença de alcalóides e flavonoides. O perfil fitoquímico das sementes aponta a presença majoritária de terpenos e flavonoides, que explica as atividades antiinflamatória e bactericida do óleo essencial da *X. sericea* (MENDES et al., 2017). A comparação entre os perfis fitoquímicos das folhas e sementes da *X. sericea* pode ser mais bem observada na Figura 6.

Figura 5. Diferentes classes de metabólitos secundários anotados.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6. Perfil metabólico dos extratos das sementes (a) e folhas (b) de *X. sericea*.



Fonte: Próprio autor.

5. CONCLUSÃO

O gênero *Xylopi*a é conhecido na medicina popular por conter uma grande variedade de metabólitos secundários com atividade biológica registrado na literatura, dos quais os flavonoides e alcaloides constituem majoritariamente o perfil químico do gênero. Nesse trabalho, cinquenta e um metabólitos foram anotados utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-QTOF/MS^E) e utilizando o software UNIFI. Essa metodologia permitiu a anotação do perfil metabólico dos compostos já relatados para o gênero *Xylopi*a de maneira qualitativa e rápida. A abordagem aqui descrita é útil para agregar conhecimento aos subprodutos da cadeia produtiva de *X. sericea* que é uma matriz com promissora atividade biológica, possibilitando assim, que no futuro a comunidade de Furquim possa obter vantagem econômica na exploração sustentável dos arranjos produtivos da biodiversidade.

REFERÊNCIAS

- ¹MAAS, P., Lobão, A., Rainer, H. 2015. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110583>>. Acesso em: 24 fev. 2020
- ²SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: Taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567–573, 2000.
- ³ADETEGHA, S. A. et al. A comparative study on the antioxidative activities, anticholinesterase properties and essential oil composition of Clove (*Syzygium aromaticum*) bud and Ethiopian pepper (*Xylopi aethiopica*). **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 92, n. 4, p. 257–268, 2015.
- ⁴CHAVES, T. L. et al. Useful Brazilian plants under the view of the writer-naturalist João Guimarães Rosa. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 5, p. 437–444, 2015.
- ⁵ANHESINE, Naira Buzzo. Perfil cromatográfico (fingerprinting) por LC-DAD-MS de espécies do gênero *Erythrina*: desenvolvimento e validação de método para controle de qualidade de drogas vegetais, 2018. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2018.
- ⁶LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 125-131, 2014.
- ⁷MENDES, R. DE F. et al. The essential oil from the fruits of the Brazilian spice *Xylopi aethiopica* A. St.-Hil. presents expressive in-vitro antibacterial and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 341–348, 2017.
- ⁸MACEDO, T. et al. Anti-inflammatory properties of *Xylopi aethiopica* leaves: Interference with pro-inflammatory cytokines in THP-1-derived macrophages and flavonoid profiling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, p. 112312, 2020.
- ⁹KYEKYEKU, J. O. et al. MALDI–HRMS imaging and HPLC–HRESI–MSn characterisation of kaurane diterpenes in the fruits of *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 349–354, 2020.
- ¹⁰DE MELO, A. C. et al. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi aethiopica* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40–45, 2001.
- ¹¹GONTIJO, D. C. et al. A Comprehensive View on (-)-7-Oxo-ent-kaur-16-en-19-oic Acid, the Major Constituent of *Xylopi aethiopica* Leaves Extract: Complete NMR

Assignments, X-Ray Crystallographic Structure, in Vitro Antimalarial Activity and Cytotoxicity, **Chem. Biodiversity**, v. 16, e1900141.

¹²BRASIL DA SILVA, T. et al. Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 3, p. 403–406, 2013.

¹³CAVALCANTI, B. C. et al. 'Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericea* (Annonaceae)', **Mutat. Res.** v. 701, p. 153–163, 2017.

¹⁴GONTIJO, D. C. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity, isolation of active alkaloids, and dereplication of *Xylopia sericea* leaves ethanol extract by UPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 260–269, 2019.

¹⁵TAKAHASHIJ. A. et al. 'Mono and diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*', **Quim. Nova**, v. 24, p.616–618, 2001.

¹⁶BARBOSA, L. T. C.; VEJA, M. R. G. Diterpenes from the Genus *Xylopia*, **Rev. Virtual Quim**, v. 9, 1712–1733, 2017.

¹⁷CABRAL, Elaine Cristina. Utilização da técnica de Fingerprinting por espectrometria de massas para a análise de extratos de produtos naturais. 2010. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

¹⁸RABELO, Diego de M. et al. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014.

¹⁹ABDUL GHANI, S. H. et al. Chemical compositions and antimicrobial activity of twig essential oils from three *Xylopia* (Annonaceae) species. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 10, p. 356–362, 2016.

²⁰AETHZOPZCA, X. (Acanthaceae) a plant from which an 8-methoxylated flavone wightin has previously been isolated.2. v. 311, n. 1968, p. 2823–2824, 1970.

²¹ALCANTARA, J. M. et al. Chemical Composition and Bactericidal Activity of the Essential Oils of Four Species of Annonaceae Growing in Brazilian Amazon. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 4, p. 1934578X1701200437, 2017.

²²ALITONOU, G. A. et al. Chemical composition, antiradical and anti-inflammatory activities of four annonaceae from Benin. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 914–923, 2013.

²³BAKARNGA-VIA, I. et al. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich, *Xylopia parviflora* (A. Rich) Benth.) and *Monodora*

myristica (Gaertn) growing in Chad and Cameroon. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 125/1-125/8, 8 pp., 2014.

²⁴BONIFACE, Y. et al. Chemical study and antimicrobial activities of fruit and leaf volatile extracts of *Xylopia aethiopica* (DUNAL) A. Rich. against foodborne pathogens. **Journal de la Societe Ouest-Africaine de Chimie**, v. 15, n. 29, p. 19–27, 2010.

²⁵CAMPOS DE ANDRADE, N. et al. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopia cayennensis* Maas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1055–1058, 2004.

²⁶COSTA, E. V. et al. Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, n. 15440, p. 331–334, 2013.

²⁷COSTA, E. V. et al. Chemical Composition of the Essential Oil from the Fresh Fruits of *Xylopia laevigata* and its Cytotoxic Evaluation. **Natural product communications**, v. 11, n. 3, p. 417–418, 2016.

²⁸DA SILVA, M. S. et al. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566–1570, 2009.

²⁹DE MEIRA JUNIOR, M. S. et al. Espécies potenciais para recuperação de Áreas de floresta estacional semidecidual com exploração de minério de ferro na serra do espinhaço. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 1, p. 283–295, 2015.

³⁰DE PAULA ARAUJO, F. et al. Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopia ochrantha* Mart. produces molluscicidal effects against different species of *Biomphalaria* (Schistosoma hosts). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 2, p. e180489, 2019.

³¹DEDOME, S.-L. O. et al. First report on chemical composition and acaricidal activity on the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *Microplus* of *Xylopia Parviflora* (a. Rich) Benth leave's essential oil in Benin, West Africa. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 149–154, 2017.

³²EKE-EJIOFOR, J.; BELEYA, E. A. Chemical, mineral, pasting and sensory properties of spiced Ogi (Gruel). **American Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n. 5, p. 204–209, 2017.

³³ELHASSAN, I. A.; ELAMIN, E. E.; AYOUB, S. M. H. Chemical composition of essential oil in dried fruits of *Xylopia aethiopica* from Sudan. **Open Access Journal of medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 1, p. 24–28, 2010.

³⁴ETSE, K. S. et al. Chemical composition and insecticidal activity of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) essential oil on *Callosobruchus maculatus*. **Journal de la Societe Ouest-Africaine de Chimie**, v. 17, n. 34, p. 71–77, 2012.

³⁵EZEKWESILI, C. N. et al. Investigation of the chemical composition and biological activity of *Xylopia aethiopica* Dunal (Annonaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 43, p. 7352–7356, 2010.

³⁶FERRAZ, R. P. C. et al. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 196–200, 2013.

- ³⁷FOURNIER, G. et al. Contribution to the study of various Annonaceae essential oils. **Rivista Italiana EPPOS**, v. 4, n. Spec. Num., p. 704–706, 1993.
- ³⁸FOURNIER, G. et al. Essential oils of Annonaceae. 4. Chemical and biological studies of *Xylopia aromatica* stem bark and leaf oils. **Planta Médica**, v. 60, n. 3, p. 283–284, 1994.
- ³⁹GONTIJO, D. C. et al. Antiplasmodial activity and cytotoxicity, isolation of active alkaloids, and dereplication of *Xylopia sericea* leaves ethanol extract by UPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 260–269, 2019.
- ⁴⁰GUO, Y. G. et al. Three new alkaloids from *Xylopia vielana* and their antiinflammatory activities. **Fitoterapia**, v. 127, n. February, p. 96–100, 2018.
- ⁴¹KEITA, B. et al. Chemical composition of the essential oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A.ch. from Mali. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 4, p. 267–269, 2003.
- ⁴²KYEKEYEKU, J. O. et al. MALDI–HRMS imaging and HPLC–HRESI–MSn characterisation of kaurane diterpenes in the fruits of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 349–354, 2020.
- ⁴³LAGO, J. H. G. et al. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 669–672, 2003.
- ⁴⁴LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Termite antifeedant activity in *Xylopia aethiopica*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1105–1112, 1995.
- ⁴⁵LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1980.
- ⁴⁶MASOTTI, V. et al. Chemical composition of essential oils from preserved *Xylopia aethiopica* fruits. **Rivista Italiana EPPOS**, n. Spec. Num., 15th Journées Internationales Huiles Essentielles, 1996, p. 757–760, 1997.
- ⁴⁷MENDES, R. DE F. et al. The essential oil from the fruits of the Brazilian spice *Xylopia sericea* A. St.-Hil. presents expressive in-vitro antibacterial and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 341–348, 2017.
- ⁴⁸MOREIRA, I. C. et al. Antifungal Aromadendrane Sesquiterpenoids from the Leaves of *Xylopia brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 828–831, 2003.
- ⁴⁹MOREIRA, I. C. et al. Genus *Xylopia* (Annonaceae): Chemical and biological aspects. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 1921–1943, 2013.
- ⁵⁰MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 5, p. 535–537, 2003.
- ⁵¹MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopia brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 9, p. 948–951, 2005.

- ⁵²MOURA, A. P. G. et al. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology (Abingdon, United Kingdom)**, v. 54, n. 12, p. 3093–3102, 2016.
- ⁵³NGO, V. T.; DONG, V. T.; NGUYEN, T. M. Chemical composition of *Xylopia vielana*, a medicinal plant used against malaria. **Tap San Hoa Hoc**, v. 12, n. 4, p. 46–48, 1974.
- ⁵⁴NIK ABDULLAH ZAWAWI, N. K. et al. Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopia ferruginea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 7–9, 2012.
- ⁵⁵NISHIYAMA, Y. et al. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 939–944, 2004.
- ⁵⁶NISHIYAMA, Y. et al. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 24, p. 2671–2675, 2006.
- ⁵⁷OLIVEIRA, V. B. et al. Chemical composition and inhibitory activities on dipeptidyl peptidase IV and pancreatic lipase of two underutilized species from the Brazilian Savannah: *Oxalis cordata* A.St.-Hil. and *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. **Food Research International**, v. 105, p. 989–995, 2018.
- ⁵⁸OPFERMANN, E.; FELDTMANN, G.-A. The possibility of using Brazilian woods for pulp and paper. **Papierfabrikant**, v. 28, p. 461–471, 1930.
- ⁵⁹PEDRALI, A. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil From the Bark of *Xylopia hypolampra*. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 6, p. 1934578X19857022, 2019.
- ⁶⁰PEREIRA, T. S. et al. Mutagenic and cytostatic activities of the *Xylopia laevigata* essential oil in human lymphocytes. **Natural product research**, p. 1–4, 2019.
- ⁶¹RIONDATO, I. et al. First ethnobotanical inventory and phytochemical analysis of plant species used by indigenous people living in the Maromizaha forest, Madagascar. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 73–89, 2019.
- ⁶²ROJAS RODAS, F. et al. Linkage mapping, molecular cloning and functional analysis of soybean gene Fg2 encoding flavonol 3-O-glucoside (1 → 6) rhamnosyltransferase. **Plant molecular biology**, v. 84, n. 3, p. 287–300, 2014.
- ⁶³SENA FILHO, J. G. et al. Preliminary phytochemical profile and characterization of the extract from the fruits of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 6, p. 536–538, 2008.
- ⁶⁴SILVA, L. E. et al. Plantas do Gênero *Xylopia*: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 814–826, 2015.
- ⁶⁵USMAN, L. A. et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Fruit Essential Oil of *Xylopia aethiopica* D. Grown in Nigeria. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 19, n. 3, p. 648–655, 2016.
- ⁶⁶WAHL, A.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Isolation and structure elucidation of xylobuxin, a new neolignan from *xylopia buxifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 786–789, 1995.

- ⁶⁷WALTER, A. et al. Composição florística no fragmento do Parque Municipal da Mata Virgem em Dom Silvério – MG, como subsídios para elaboração do plano de Floristic composition of the fragment in the Municipal Park of Virgin Forest in Dom Silvério – MG as a subsidy for the . v. 605, 2016.
- ⁶⁸YAPI, T. A. et al. Three new natural compounds from the root bark essential oil from *Xylopia aethiopica*. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 651–656, 2012a.
- ⁶⁹YAPI, T. A. et al. Chemical Variability of the Leaf Essential Oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A.Rich. from Cote d'Ivoire. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 12, p. 2802–2809, 2012b.
- ⁷⁰YAPI, T. A. et al. Composition of leaf and stem bark oils of *Xylopia villosa* Chipp. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 3, p. 253–257, 2012c.
- ⁷¹YAPI, T. A. et al. Chemical variability of *Xylopia quintasii* Engl. & Diels leaf oil from Cote d'Ivoire. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 2, p. 332–339, 2014.
- ⁷²YAPI, T. A. et al. Composition and Chemical Variability of Ivoirian *Xylopia staudtii* Leaf Oil. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p. 1934578X1501000666, 2015.
- ⁷³YAPI, T. A. et al. Composition and Chemical Variability of Ivorian *Xylopia rubescens* Trunk Bark Oil. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 6, p. 1934578X1801300628, 2018.
- ⁷⁴ZAFRA-POLO, M. C. et al. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 253–271, 1996.
- ⁷⁵ZHANG, Y. L. et al. Rare dimeric guaianes from *Xylopia vielana* and their multidrug resistance reversal activity. **Phytochemistry**, v. 158, n. November 2018, p. 26–34, 2019.