



Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Programa de Pós-Graduação em Química



WELTON ROSA

**BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES VEGETAIS DA FAMÍLIA FABACEAE, DA
MATA ATLÂNTICA MINEIRA, VISANDO A OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

Alfenas/MG
2021

WELTON ROSA

**BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES VEGETAIS DA FAMÍLIA FABACEAE, DA
MATA ATLÂNTICA MINEIRA, VISANDO A OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Química pelo
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica
Orientadora: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares

**Alfenas/MG
2021**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Rosa, Welton

R788b Bioprospecção em espécies vegetais da família Fabaceae, da mata atlântica mineira, visando a obtenção de substâncias com potencial anti-inflamatório / Welton Rosa – Alfenas, MG, 2021.
208 f.: il. –

Orientadora: Marisi Gomes Soares.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Inflamação. 2. Metabolômica. 3. Produtos Naturais. 4. Fabaceae.
5. Validação. 6. Anti-inflamatório. 7. *Ex vivo*. 8. *In vivo*. 9. LC-MS/MS.
10. PGE₂. 11. LTB₄. 12. Quantificação. 13. Anotação. 14 IL-10.
15 MetFrag. 16. COX. 17. LOX. I. Soares, Marisi Gomes. II. Título.

CDD- 547

BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES VEGETAIS DA FAMÍLIA FABACEAE, DA MATA ATLÂNTICA MINEIRA, VISANDO A OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 12 de março de 2021

Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. João Batista Fernandes
Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. João Luiz Baldim Zanin
Instituição: IFSuldeMinas

Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozin
Instituição: Universidade Federal de Alfenas.



Documento assinado eletronicamente por **João Batista Fernandes, Usuário Externo**, em 12/03/2021, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Regina Pepe Ambrozin, Professor do Magistério Superior**, em 12/03/2021, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Luiz Baldim Zanin, Usuário Externo**, em 12/03/2021, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Quezia Bezerra Cass, Usuário Externo**, em 12/03/2021, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marisi Gomes Soares, Professor do Magistério Superior**, em 12/03/2021, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0478449** e o código CRC **517DFF87**.

Dedico este trabalho a Deus, aos meus queridos pais, Lázaro e Maria, ao meu irmão William (*in memoriam*), tios, primos, amigos e a todos que me apoiaram e contribuíram para que este trabalho se tornasse possível e um pouco menos árduo.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus por toda graça, força e sabedoria durante todo o período de realização deste trabalho. Sabemos que a vida é feita de obstáculos e desafios e é tão bom saber que há uma força divina e misericordiosa que nos prepara para sermos fortes lá fora para podermos contribuir com nossos conhecimentos e ajudar aqueles que mais precisam!

Aos meus pais, sou imensamente grato por toda a confiança e apoio incondicional. Essa vitória é de vocês também. Dedico ainda a meu irmão (*in memoriam*) que me ensinou que apesar da batalha ser dura e exigir total dedicação é necessário que saibamos enxergar a vida como um todo, para que possamos desfrutar da caminhada sem esperar somente pelas chegadas.

Aos meus familiares, pelo apoio, carinho e admiração. Com certeza, a força de todos vocês direta ou indiretamente foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui. Em especial às minhas primas Geisi, Gisele, Ágatha, Akemi e Analice e às minhas tias Cidinha, Rosa e Joana. Obrigado por serem tão especiais pra mim e fazer eu sentir o mesmo.

Aos membros da banca: professora Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozin, professor Dr. João Batista Fernandes, professor Dr. João Luiz Baldim Zanin e professora Dra. Quezia Bezerra Cass. Obrigado pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho!

À minha orientadora, amiga e irmã de coração, professora Dra. Marisi Gomes Soares, por todos os ensinamentos e conselhos, pessoais e profissionais. Obrigado por me ajudar a tornar esse profissional e ser humano melhor que sou hoje. Só gratidão pela confiança em mim em todos os momentos! Sem palavras para agradecer por tudo!

À professora Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula por ser parte de todo este trabalho, pelos ensinamentos e paciência. Obrigado por tudo!

À professora Dra. Daniele Ferreira Dias, pela amizade, ensinamentos e conselhos. Obrigado por ser esse exemplo de mãe, amiga e profissional. Gratidão por todos os momentos com que pude compartilhar contigo.

Ao professor Dr. Ivo Santana Caldas por todos os ensinamentos e apoio com a paciência e dedicação com que sempre teve comigo e todos os envolvidos neste trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos e colegas que fiz durante essa trajetória no LFQM, em especial Laís (Lalá), Tatiane (Tati), Victor Hugo, Luiza Zanini, Bruna Lidiane, Patrícia Altifuldisch, Felipe

Policarpo, Jaqueline, Olívia, Bárbara, Tayná, Karen, João Baldim, Felipe Bley e muitos outros. Obrigado por fazerem parte desta história e terem feito esta caminhada mais feliz e agradável.

Agradeço também aos amigos externos ao LFQM que também foram muito importantes nesta caminhada: Nathália Campos, Cíntia Simosono, Pedro Lúcio, Daniel Swerts, Rhuan Fagundes, Wander Saldanha, Yaggo Wisley, Bruna Albergaria, Fernando Primo e todos que acompanharam de perto esse desafio. Obrigado por terem sido suporte nas horas duras e felizes.

Agradeço à valiosa contribuição do Me. João Pedro Costa Elias na coleta e identificação das amostras de plantas deste trabalho com toda paciência e dedicação. Muita gratidão a você e todo grupo de pesquisa liderado pelos professores Dr. Flávio Ramos Nunes e Dr. Marcelo Polo.

À técnica do Departamento de Patologia e Parasitologia da Unifal-MG Maria Ângela Rodrigues por ter doado generosamente amostras de LPS para o andamento da pesquisa.

A todos os colaboradores que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta pesquisa.

À Glorinha por todo seu esforço e dedicação para manter nosso ambiente de trabalho sempre limpo e organizado. Obrigado pela sua amizade, carinho, preocupação e zelo para com todos!

A todos os técnicos e professores do Instituto de Química e demais funcionários da Unifal-MG por todo amparo acadêmico e social durante esse período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e à Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, por todo suporte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e por isso deixo meus agradecimentos em especial. Agradeço também aos demais órgãos de fomento: FAPEMIG, CNPq e Finep por todo suporte financeiro à pesquisa.

Muito Obrigado a todos!

*“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem
de muita fadiga e persistência.”*
(Henry Ford)

RESUMO

Extratos brutos das folhas de 47 espécies diferentes de Fabaceae foram explorados quanto à atividade anti-inflamatória em diferentes mecanismos de ação na busca por compostos com potencial anti-inflamatório. Inicialmente, os extratos foram testados quanto à atividade antioxidante *in vitro* onde nove espécies apresentaram grande potencial, comparável ao ácido ascórbico. Em seguida, um bioensaio *ex vivo* com sangue humano foi desenvolvido quanto à produção de IL-10, sob condições inflamatórias. Assim, foi possível avaliar o potencial das amostras de extrato das espécies de Fabaceae em inibir a produção desta citocina e 22 destas apresentaram potencial de inibição comparável à dexametasona, com CE_{50} médias inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando-se a mesma metodologia *ex vivo* no sangue humano, outro ensaio foi desenvolvido para avaliação da atividade anti-inflamatória por meio do monitoramento da produção de PGE_2 por detecção em LC-MS/MS. O método validado apresentou-se eficaz para triagem da atividade anti-inflamatória de grande número de amostras, no qual cinco do total de espécies estudadas neste trabalho apresentaram potencial de inibição da produção de PGE_2 . Dentre as 47 amostras testadas, a espécie *P. Pluviosa* apresentou-se ativa nestes três diferentes mecanismos de ação testados contra a inflamação, corroborando o grande potencial anti-inflamatório desta espécie com relatos da literatura. Dentre as cinco espécies ativas no ensaio *ex vivo* no sangue quanto à inibição da produção de PGE_2 , quatro delas apresentaram também potencial anti-inflamatório na inibição de edema de orelha *in vivo*, confirmando a eficácia do ensaio *ex vivo* desenvolvido no sangue para triagem da atividade anti-inflamatória. Além disso, dentre estas quatro espécies, duas delas (*A. polyphylla* e *P. pluviosa*) apresentaram ainda potencial de inibição de recrutamento de neutrófilos, avaliadas pelo ensaio de MPO nos fragmentos de orelha, demonstrando o grande potencial anti-inflamatório destas espécies, sendo *A. polyphylla* inédita quanto a esta propriedade farmacológica até o momento. O estudo da composição das amostras ativas contra inflamação foi feito por duas abordagens: a primeira delas consistiu da anotação de picos de forma bioguiada, utilizando-se a ferramenta moderna de fragmentação *in silico* MetFrag, dos compostos majoritários presentes nos extratos das amostras inibidoras da produção de PGE_2 no sangue e comparação qualitativa destes compostos nestes extratos, a fim de se buscar identificar putativamente os compostos ali presentes e possivelmente responsáveis pela inibição da produção de PGE_2 no sangue. A outra abordagem utilizou estudos metabolômicos na qual os biomarcadores simultâneos nos diferentes mecanismos de ação (neste caso a atividade antioxidante e inibição da produção de

IL-10 e PGE₂) foram determinados e posteriormente anotados, também com o auxílio do MetFrag, como forma de identificação putativa mais abrangente e objetiva dos compostos mais importantes contra a inflamação entre as amostras de Fabaceae testadas. Dentre os compostos anotados nas duas diferentes abordagens, destacam-se flavonoides glicosilados ou agliconas, triterpenos, saponinas, esfingolipídios, alcaloides, elagitaninas e derivados de ácido elágico, e ainda outros menos comuns como flavonoides clorado, sulfurado ou nitrogenado. Estes resultados permitirão guiar o isolamento para confirmação da estrutura e atividade anti-inflamatória destes compostos, em trabalhos futuros. Por fim, um método para comparação dos níveis de PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de orelha advindos do ensaio *in vivo* foi desenvolvido, permitindo comparar os grupos de amostras dos controles negativo e positivos (indometacina e dexametasona), bem como da espécie *P. pluviosa*. O método apresentou-se eficaz como ensaio limite para diferenciação dos níveis de PGE₂ e LTB₄ entre os grupos de amostras testados no ensaio de edema de orelha, permitindo inferir que *P. pluviosa* possa agir inibindo possivelmente nas vias COX e LOX simultaneamente, ou ainda da PLA₂, como os anti-inflamatórios esteroidais, corroborando com trabalhos na literatura sobre esta espécie. Por fim, este trabalho possibilitou o desenvolvimento de diferentes metodologias para avaliação da atividade anti-inflamatória *ex vivo*, como métodos de triagem prévios à avaliação em ensaios *in vivo* e, os métodos de quantificação de PGE₂ no sangue ou PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de orelha poderão ser utilizados em trabalhos futuros, seja em estudos com amostras de produtos naturais ou sintéticas, para avaliação da possível inibição das vias COX e LOX contra a inflamação.

Palavras-chave: Inflamação. Metabolômica. Produtos Naturais. Fabaceae. Validação. Anti-inflamatório. *Ex vivo*. *In vivo*. LC-MS/MS. PGE₂. LTB₄. Quantificação. Anotação. IL-10. MetFrag. COX. LOX

ABSTRACT

Crude leaf extracts from 47 different Fabaceae species were explored for anti-inflammatory activity in different mechanisms of action in the search for compounds with anti-inflammatory potential. Initially, the extracts were tested for antioxidant activity *in vitro*, and nine species showed great potential, comparable to ascorbic acid. Then, an *ex vivo* bioassay with human whole blood was developed for the production of IL-10, under inflammatory conditions. It was possible to evaluate the potential of Fabaceae species samples to inhibit the production of this cytokine, and 22 of these species showed inhibition potential comparable to dexamethasone, with EC₅₀ averages below 50 µg/mL. Using the same methodology *ex vivo* in human whole blood, another assay was developed to assess the anti-inflammatory activity by monitoring the production of PGE₂ by detection in LC-MS/MS. The validated method proved to be effective for screening the anti-inflammatory activity of a large number of samples, and five of the total species studied in this work had the potential to inhibit the production of PGE₂. Among the 47 samples tested, the species *P. pluviosa* was active in these three different mechanisms of action tested against inflammation, corroborating the great anti-inflammatory potential of this species with reports from the literature. Among the five species active in the *ex vivo* blood test for inhibiting the production of PGE₂, four of them also exhibited anti-inflammatory potential in inhibiting ear edema *in vivo*, confirming the efficacy of the *ex vivo* assay developed in the blood for screening activity anti-inflammatory. In addition, among these four species, two of them (*A. polyphylla* and *P. pluviosa*) still presented potential to inhibit neutrophil recruitment, evaluated by the MPO assay in the ear fragments, demonstrating the great anti-inflammatory potential of these species, being *A. polyphylla* unprecedented in terms of this pharmacological property so far. The composition study of the active samples against inflammation was carried out by two approaches: the first consisted in peak annotation in a bioguided way, using the modern *in silico* fragmentation tool MetFrag, of the major compounds present in extract samples that inhibited the production of PGE₂ in the blood and qualitative comparison of these compounds in these extracts, to seek to putatively identify the compounds present there and possibly responsible for the inhibition of the production of PGE₂ in the blood. The other approach used metabolomic studies in which the main simultaneous biomarkers in the different mechanisms of action (in this case the antioxidant activity and inhibition of the production of IL-10 and PGE₂) were determined and later annotated, also with the aid of MetFrag, as a more comprehensive and objective putative

identification of the most important compounds against inflammation among the tested Fabaceae samples. Different compounds were annotated in the two approaches, as glycosylated flavonoids or aglycone, triterpenes, saponins, sphingolipids, alkaloids, ellagitannins, and ellagic acid derivatives, and still less common ones such as chlorinated, sulfurized, or nitrogenous flavonoids. These results will allow guiding the isolation to confirm the structure and anti-inflammatory activity of these compounds, in future works. Finally, a method for comparing the levels of PGE₂ and LTB₄ in the ear fragments from *in vivo* test was developed, allowing to compare the groups of samples from the negative and positive controls (indomethacin and dexamethasone), as well as the *P. pluviosa* species. The method proved to be effective as a limit test to differentiate the levels of PGE₂ and LTB₄ between the groups of tested samples in the ear edema test, allowing us to infer that *P. pluviosa* may act inhibiting possibly in the COX and LOX pathways simultaneously, or even the PLA₂, like steroidal anti-inflammatory drugs, corroborating with other works in the literature about this species. Finally, this work enabled the development of different methodologies for the evaluation of anti-inflammatory activity *ex vivo*, such as screening methods before evaluation in *in vivo* tests, and the quantitation methods of PGE₂ in blood or PGE₂ and LTB₄ in the ear fragments may be used in future works, with natural products or synthetic compounds, to evaluate the possible inhibition of the COX and LOX pathways against inflammation.

Key-words: Inflammation. Metabolomic. Natural Products. Fabaceae. Validation. Anti-inflammatory. *Ex vivo*. *In vivo*. LC-MS/MS. PGE₂. LTB₄. Quantification. Annotation. IL-10. MetFrag.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de compostos isolados de Fabaceae com atividade biológica.	23
Figura 2 - Figura esquemática de produção e metabolismo do ácido araquidônico pelas principais vias, COX e LOX.	26
Figura 3 - Exemplos de AIE's disponíveis no mercado atualmente.	27
Figura 4 - Exemplos de AINE's disponíveis no mercado atualmente.	28
Figura 5 - Estrutura química do zileuton, um AI seletivo a LOX.	29
Figura 6 - Figura esquemática exemplificando do fluxo de trabalho em estudo metabolômico: (a) coleta de amostra; (b) preparo de extratos; (c) aquisição de dados; (d) processamento de dados; (e) análise de dados.	35
Figura 7 - Diferentes etapas para realização do ensaio de ELISA sanduíche para detecção e quantificação de IL-10.	47
Figura 8 - Figura esquemática simplificada da reação de oxidação TMB catalisada pela enzima MPO.	52
Figura 9 - Figura esquemática das etapas de anotação dos compostos por meio da ferramenta MetFrag.	56
Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos, obtidos por análise em UPLC-ESI-QTOF-MS ² no modo negativo, de todas as amostras de extratos das espécies de Fabaceae coletadas, detectados no modo <i>full scan</i> no primeiro analisador (MS ¹).	60
Figura 11 - Comparação da atividade antioxidante dos extratos de espécies com valores de CI ₅₀ (em µg/mL) inferiores a 500 µg/mL.	65
Figura 12 - Comparação do estímulo inflamatório e tratamento sob diferentes condições:	70
Figura 13 - Figura esquemática da produção de IL-10 a partir de outros mediadores inflamatórios.	74
Figura 14 - Valores médios de CE ₅₀ das amostras de Fabaceae quanto à inibição da produção de IL-10 e fármacos de referência (n = 2).	75
Figura 15 - Figura esquemática do mecanismo de ação da 15d-PGJ ₂ na cascata do ácido araquidônico.	78
Figura 16 - Espectros dos íons produtos formados a partir da fragmentação dos respectivos íons precursores de PGE ₂ e AA.	80
Figura 17 - Reações de fragmentação para formação dos íons produtos a partir dos respectivos íons precursores de PGE ₂ , LTB ₄ , AA e 15d-PGJ ₂	82
Figura 18 - Gráfico comparativo das médias das áreas de cada padrão a 1 ppm para cada fase móvel (FM), obtidas pelos métodos SRM otimizados no modo negativo.	82
Figura 19 - Representação da reação de fragmentação do CAP para formação do íon produto a partir do respectivo íon precursor.	84

Figura 20 - Cromatogramas SRM obtidos para detecção de PGE ₂ e PI em amostras de plasma fortificadas do limite superior de quantificação (LSQ).....	85
Figura 21 - Teste inicial da análise da produção de PGE ₂ por LC-MS/MS sob diferentes condições de incubação no ensaio anti-inflamatório <i>ex vivo</i> em sangue humano, para determinação da concentração dos fármacos de referência a serem usados como controle positivo	91
Figura 22 - Comparação dos níveis de PGE ₂ (em ng/mL) produzidos pelo sangue humano induzido por LPS e tratado com diferentes amostras de extratos vegetais e fármacos de referência. 94	
Figura 23 - Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> em ratos por inibição do edema de orelha das amostras ativas no ensaio de triagem <i>ex vivo</i> em sangue humano.	96
Figura 24 - Avaliação da atividade anti-inflamatória por inibição do recrutamento de neutrófilos das amostras testadas no ensaio <i>in vivo</i> de edema de orelha.....	99
Figura 25 - Cromatogramas obtidos por LC-UV-DAD para comparação dos níveis de PGE ₂ nos fragmentos de orelha em amostras padrão	100
Figura 26 - Cromatogramas obtidos com novo método cromatográfico em solução e em matriz biológica do (limite superior de quantificação – LSQ) do PI, PGE ₂ e LTB ₄ por detecção por SRM no modo negativo.	102
Figura 27 - Curvas analíticas para PGE ₂ e LTB ₄ em matriz de fragmentos de orelha e em solução. .	103
Figura 28 - Níveis de PGE ₂ e LTB ₄ (média ± DP) de quatro diferentes grupos de amostras testadas no ensaio <i>in vivo</i> de edema de orelha (n = 8).	108
Figura 29 - Resumo da atividade anti-inflamatória das espécies de Fabaceae avaliada pelos diferentes ensaios <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	111
Figura 30 - Estruturas química de compostos isoladas de <i>P. pluviosa</i> com atividade anti-inflamatória por diferentes mecanismos de ação	112
Figura 31 - Comparação do perfil cromatográfico obtido no modo de ionização negativo dos extratos das espécies de Fabaceae ativas no ensaio <i>ex vivo</i> no sangue.	114
Figura 32 - Perfil metabólico dos compostos anotados (C1-C146) entre os cinco extratos de espécies ativas no ensaio <i>ex vivo</i> no sangue.....	116
Figura 33 - Relação entre porcentagem de variância total do modelo (R ²) explicada e o número de componentes principais, pela análise por PCA.	119
Figura 34 - Gráficos <i>Score Plot</i> de PCA obtidos com todas as amostras de extratos após processamento para os modos: (A) negativo e (B) positivo.....	120
Figura 35 - Método de seleção do número de componentes principais a ser utilizado na análise por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto à atividade antioxidante.....	123
Figura 36 - Representação dos gráficos de <i>Score Plot</i> e <i>Loading Plot</i> das análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto à atividade antioxidante, nos modos positivo e negativo....	124
Figura 37 - (A) Representação de gráfico <i>VIP-Plot</i> obtido da análise por PLS-DA das amostras no modo negativo quanto à atividade antioxidante, com o número de compostos com VIP	

maiores que 1 em destaque. (B) Representação do gráfico de coeficientes das variáveis que contribuem para o grupo de amostras ativas.	125
Figura 38 - Gráficos <i>Coeficiente versus VIP</i> com os biomarcadores da atividade antioxidante nas amostras de Fabaceae destacados em vermelho: (A) modo negativo; (B) modo positivo.	126
Figura 39 - Gráficos de <i>Score Plot</i> e <i>Loading Plot</i> das análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de PGE ₂ , nos modos positivo e negativo.	129
Figura 40 - Gráficos <i>Coeficiente versus VIP</i> com os potenciais biomarcadores inibitórios da produção de PGE ₂ nas amostras de Fabaceae em destaque em vermelho: (A) modo negativo; (B) modo positivo.	129
Figura 41 - Gráficos de <i>Score Plot</i> e <i>Loading Plot</i> das análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de IL-10 no modo negativo.	131
Figura 42 - Gráfico <i>Coeficiente versus VIP</i> com os potenciais biomarcadores responsáveis pela inibição da produção de IL-10 nas amostras de Fabaceae em destaque em vermelho, dos dados no modo negativo.	131
Figura 43 - Diagramas de <i>Venn</i> com a sobreposição do número de biomarcadores identificados como de grande potencial para a atividade anti-inflamatória por se apresentarem em comum e importantes nas amostras de plantas de Fabaceae, analisados por metabolômica nos diferentes bioensaios realizados.	133
Figura 44 - Sugestão de fragmentos formados a partir do íon precursor do biomarcador P14 (siringina) no modo positivo, proposto pela ferramenta MetFrag.	135
Figura 45 - Sugestão de fragmentos formados a partir do íon precursor do biomarcador N45 (1-O-galoil-6-O-luteoil-alfa-D-glucose) no modo negativo, proposto pela ferramenta MetFrag.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de espécies vegetais coletadas com seus respectivos códigos, N° exsiccatas, massa vegetal e rendimento de extração.	58
Tabela 2 - Parâmetros utilizados no processamento final dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS ² das amostras para os modos negativo e positivo.	62
Tabela 3 - Valores de CI ₅₀ para o teste antioxidante avaliado pela capacidade sequestrante de radicais DPPH para cada um dos extratos testados ou padrão ácido ascórbico (média ± DP, n = 3).	64
Tabela 4 - Valores das médias de CE ₅₀ para o teste de produção de IL-10 para cada uma das amostras de extratos vegetais e fármacos testados (n = 2).	73
Tabela 5 - Parâmetros otimizados do método SRM de cada analito para as fases móveis ácida e básica testadas.	81
Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos e de detecção de PGE ₂ e CAP em plasma de sangue humano.	84
Tabela 7 - Variabilidade da influência do efeito da matriz na determinação de PGE ₂ em amostras de plasma (n = 5).	86
Tabela 8 - Resultados de precisão e exatidão intra e interdia obtidos por análises em LC-MS/MS para determinação dos níveis de PGE ₂ em plasma (média ± DP).	88
Tabela 9 - Recuperação absoluta e relativa média em três diferentes concentrações em triplicatas (n = 3).	88
Tabela 10 - Estabilidade da PGE ₂ em amostras de plasma sob diferentes condições analisadas (média ± DP, n = 3).	89
Tabela 11 - Níveis de PGE ₂ (em ng/mL) produzidos no sangue humano estimulado por LPS e tratados com diferentes extratos de plantas ou fármacos de referência (média ± DP, n = 4).	92
Tabela 12 - Valores de % de inibição do edema de orelha das amostras testadas no ensaio anti-inflamatório <i>in vivo</i> em camundongos (n = 8).	95
Tabela 13 - Valores médios de absorvância do ensaio de recrutamento de neutrófilos das espécies de Fabaceae testadas no ensaio <i>in vivo</i>	98
Tabela 14 - Equações das retas das curvas de calibração para PGE ₂ e LTB ₄ e seus respectivos coeficientes de correlação.	101
Tabela 15 - Valores de % de efeito de matriz para PGE ₂ e LTB ₄ baseado em cálculos segundo Preste (2008).	104
Tabela 16 - Valores da média de % de recuperação absoluta e relativa para PGE ₂ e LTB ₄ nos fragmentos de orelha em duas concentrações controle.	104
Tabela 17 - Valores médios de precisão intra e inter-dia, em CV (%), para PGE ₂ e LTB ₄ em duas concentrações controle.	105
Tabela 18 - Valores médios de exatidão intra e inter-dia, em EPR (%), para PGE ₂ e LTB ₄ em duas concentrações controle.	106

Tabela 19 - Valores de concentração de PGE ₂ e LTB ₄ em amostra de fragmentos de orelha a 200 ng/mL, injetada em dois tempos distintos (0 e 9 h), mantidos a 22 °C (n = 3).	106
Tabela 20 - Relação de 15 biomarcadores da atividade antioxidante, em ordem decrescente dos valores de VIP, com os respectivos dados cromatográficos (TR e m/z – MS1), obtidos de acordo com o gráfico Coeficiente versus VIP da análise por PLS-DA das amostras de Fabaceae no modo negativo.	126
Tabela 21 - Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA em função do número de componentes para correlação dos dados com a atividade de inibição da produção de PGE ₂ .	128
Tabela 22 - Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA em função do número de componentes para correlação dos dados com a atividade de inibição da produção de IL-10.	130
Tabela 23 - Quantidade de biomarcadores obtidos pelos estudos metabolômicos de correlação da composição química das amostras de Fabaceae e a atividade farmacológica, em cada um dos ensaios.	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
IL-1, IL-10	interleucina 1, interleucina 10
15d-PGJ ₂	15-deoxi-prostaglandina J ₂
AAS	ácido acetilsalicílico
ACN	acetonitrila
AI	anti-inflamatório
AIE	anti-inflamatório esteroideal
AINE	anti-inflamatório não-esteroideal
CAP	cloranfenicol (do inglês, <i>chloramphenicol</i>)
COX	ciclo-oxigenase
CQ	amostras controle de qualidade (CQB, CQM, CQA)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila (do inglês, <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial (do inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERO	espécie reativa de oxigênio
ESI	ionização por electrospray (do inglês, <i>electrospray ionization</i>)
EtOH	etanol
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>)
iNOS	óxido nítrico sintase induzível (do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
LC-HRMS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (do inglês, <i>liquid chromatography-high resolution mass spectrometry</i>)
LC-UV-DAD	cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta com arranjo de diodos (do inglês, <i>liquid chromatography-ultraviolet-diode array detector</i>)
LIQ	limite inferior de quantificação

LOX	lipo-oxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
LSQ	limite superior de quantificação
LTB ₄	leucotrieno B ₄
<i>m/z</i>	razão massa-carga
MeOH	metanol
MPO	enzima mieloperoxidase
OPLS-DA	(do inglês, <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
PBMC	células mononucleares do sangue periférico (do inglês, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	solução tampão-fosfato (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCA	análise por componentes principais (do inglês, <i>principal component analysis</i>)
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PHA	fitoemaglutinina (do inglês, <i>phytohemagglutinin</i>)
PI	padrão interno
PLA ₂	fosfolipase A ₂ (do inglês phospholipase A ₂)
PLS-DA	(do inglês, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
Q1, Q2	quadropolo 1, quadropolo 2
Q ²	coeficiente de predição dos dados (do inglês, <i>goodness of prediction</i>)
R ²	coeficiente de correlação dos dados (do inglês, <i>goodness of fitness</i>)
SIM	monitoramento de único íon (do inglês, <i>Single Ion Monitoring</i>)
SRM	monitoramento de reações selecionadas (do inglês, <i>Selected Reaction Monitoring</i>)
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
T _R	tempo de retenção
VIP	importância da variável na projeção (do inglês, <i>Variable Importance in the Projection</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	A FAMÍLIA FABACEAE.....	22
1.2	A INFLAMAÇÃO E OS ANTI-INFLAMATÓRIOS	23
1.3	DIFERENTES METODOLOGIAS E ABORDAGENS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO	30
1.4	A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS	31
1.5	OS ESTUDOS EM METABOLÔMICA.....	33
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	METODOLOGIA	40
3.1	SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAIS	40
3.2	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	40
3.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	41
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	41
3.5	PREPARO DE AMOSTRAS DE EXTRATOS PARA ANÁLISES	41
3.6	OBTENÇÃO DOS PERFIS METABÓLICOS DOS EXTRATOS POR UPLC-ESI-QTOF- MS ²	42
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE RADICAIS DPPH.....	43
3.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS EM HUMANOS	43
3.9	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE	44
3.10	TESTES DE PRODUÇÃO DE IL-10 EM SANGUE TOTAL OU CÉLULAS ISOLADAS DO SANGUE	44
3.11	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IL-10 EM AMOSTRAS DE PLASMA POR ELISA	45
3.12	ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO <i>EX VIVO</i> NO SANGUE HUMANO DE PRODUÇÃO DE IL-10 E PGE ₂	47

3.13	OBTENÇÃO DA MATRIZ DE PLASMA DE SANGUE HUMANO PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂	48
3.14	PREPARO DE AMOSTRAS DE PLASMA PARA ANÁLISES POR LC-MS/MS	48
3.15	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂ EM AMOSTRAS DE PLASMA POR LC-MS/MS	49
3.16	PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO LC-MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂ EM PLASMA	49
3.17	ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO <i>IN VIVO</i> DE INIBIÇÃO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON.....	50
3.18	DOSAGEM DE MPO EM FRAGMENTOS DE ORELHA ADVINDOS DO ENSAIO <i>IN VIVO</i>	51
3.19	PROCESSAMENTO E PREPARO DE AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA PARA ANÁLISE EM LC-UV-DAD E LC-MS/MS	52
3.20	ANÁLISE DE PGE ₂ EM FRAGMENTOS DE ORELHA POR LC-UV-DAD.....	52
3.21	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂ e LTB ₄ POR LC-MS/MS EM AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA	54
3.22	DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS ATIVOS NO ENSAIO <i>EX VIVO</i> E ANOTAÇÃO DOS BIOMARCADORES OBTIDOS PELOS ESTUDOS METABOLÔMICOS.....	55
3.23	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E EXTRATOS.....	58
4.2	ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS VEGETAIS POR UPLC-ESI-QTOF-MS ²	60
4.3	PROCESSAMENTO DE DADOS DE UPLC-ESI-QTOF-MS ² PARA ESTUDO METABOLÔMICO.....	61
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS AMOSTRAS DE FABACEAE	62
4.4.1	Avaliação da atividade sequestrante de radicais DPPH e atividade antioxidante <i>in vitro</i>	62
4.4.2	Avaliação do potencial anti-inflamatório de amostras de extrato vegetal pela inibição da produção de IL-10	66
4.4.2.1	Determinação do método para avaliação de produção de IL-10 no ensaio <i>ex vivo</i> em sangue humano	66

4.4.2.2	Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos vegetais pela inibição da produção de IL-10 usando o ensaio <i>ex vivo</i> em sangue humano.....	71
4.4.3	Desenvolvimento de métodos para quantificação de eicosanoides em plasma de sangue humano	77
4.4.3.1	Determinação da fase móvel e método de detecção SRM de eicosanoides.....	77
4.4.3.2	Validação do método de quantificação de PGE ₂ em amostras de plasma de sangue humano...	83
4.4.3.3	Otimização da concentração do fármaco dexametasona como controle positivo no ensaio <i>ex vivo</i> no sangue humano.....	90
4.4.3.4	Avaliação do potencial anti-inflamatório de extratos vegetais pela inibição da produção de PGE ₂ usando o ensaio <i>ex vivo</i> em sangue humano	91
4.4.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> por inibição do edema de orelha.....	95
4.4.5	Dosagem da atividade de MPO nos fragmentos de orelha advindos do ensaio <i>in vivo</i>.....	97
4.5	DETERMINAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PGE ₂ EM FRAGMENTOS DE ORELHA E ANÁLISE POR LC-UV-DAD.....	99
4.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂ e LTB ₄ POR LC-MS/MS EM AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA ORIUNDOS DE ENSAIO <i>IN VIVO</i>	101
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE PGE ₂ E LTB ₄ EM AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA ORIUNDOS DE ENSAIO <i>IN VIVO</i>	107
4.8	RESUMO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS AMOSTRAS DE FABACEAE NOS BIOENSAIOS AVALIADOS	110
4.9	PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS ATIVOS NO ENSAIO <i>EX VIVO</i> DE INIBIÇÃO DE PGE ₂ NO SANGUE HUMANO.....	113
4.10	ESTUDOS METABOLÔMICOS DAS AMOSTRAS DE FABACEAE	117
4.10.1	Análises por Componentes Principais dos dados.....	118
4.10.2	Metabolômica das amostras Fabaceae quanto à atividade antioxidante.....	121
4.10.3	Metabolômica das amostras Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de PGE₂.....	127
4.10.4	Metabolômica das amostras Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de IL-10.....	130
4.11	ANÁLISE DOS BIOMARCADORES ANTI-INFLAMATÓRIOS POR DIAGRAMAS DE <i>VENN</i>	131

4.12	ANOTAÇÃO DOS PRINCIPAIS BIOMARCADORES DE FABACEAE CONTRA A INFLAMAÇÃO.....	134
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	139
	REFERÊNCIAS.....	143
	APÊNDICE A	164
	APÊNDICE B.....	166
	APÊNDICE C	195
	APÊNDICE D	202

1 INTRODUÇÃO

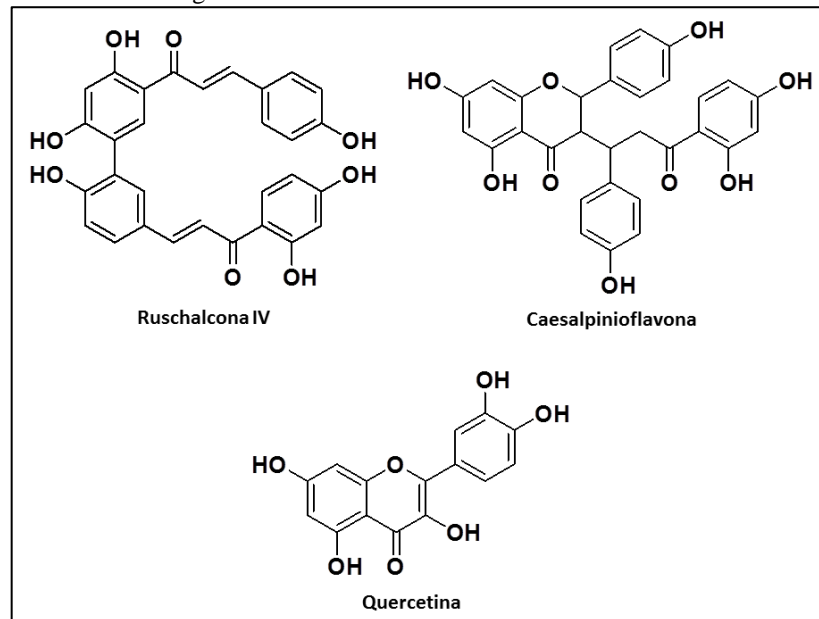
1.1 A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas no mundo, com aproximadamente 685 gêneros e 18.860 espécies, separados em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae. Suas espécies se distribuem desde regiões temperadas às tropicais e subtropicais (KNOTHE *et al.*, 2016).

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, possui a característica principal de ter frutos do tipo legume ou “vagem” e suas espécies são por isso, reconhecidas no mundo todo pelo seu potencial alimentício (RAHMAN, PARVIN, 2014). Esta compreende a família de maior número de espécies vegetais das angiospermas no Brasil (ANDRADE, MIOTTO, SANTOS, 2009). Algumas delas são utilizadas na ornamentação de vias e calçadas. Além disso, diversas atividades farmacológicas têm sido descritas na literatura para extratos das folhas e frutos de diversas espécies desta família, como atividade fungicida e leishmanicida (SANTANA *et al.*, 2015), antimicrobiana, antipirética e também potencial contra doenças gastrointestinais, respiratórias e hepatite (NGHONJUYI *et al.*, 2016). Muitas espécies têm sido reportadas também com atividade anti-inflamatória notória como *Glycine max* L. (soja), *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), *Pisum sativum* L. (ervilha) (SIBUL *et al.*, 2016), *Codariocalyx motorius* (KIM *et al.*, 2014), *Tetrapleura tetráptera* (OJEWOLE, ADEWUNMI, 2004), *Piptadenia stipulacea* (QUEIROZ *et al.*, 2010), dentre outras, o que faz de grande interesse o estudo de espécies dessa família, principalmente na busca por novas substâncias com potencial anti-inflamatório.

Muitos compostos com atividades biológicas diversas têm sido isoladas de espécies esta família. Por exemplo, ruschalcona IV e caesalpinioflavona foram isolados de *P. pluviosa* com atividade anti-inflamatória, agindo na inibição de edema de orelha e recrutamento de neutrófilos em ensaio com camundongos (DOMINGOS *et al.*, 2019), sendo também reportada com potencial citotóxico (BALDIM *et al.*, 2015). Já Cesarino e colaboradores (2020) isolaram a quercetina de *A. polyphylla* e comprovaram seu alto potencial antioxidante *in vitro*. As estruturas dos compostos citados anteriormente, isolados de espécies de Fabaceae são mostrados na figura 1 a seguir:

Figura 1 - Exemplos de compostos isolados de Fabaceae com atividade biológica.



FONTE: Do autor.

1.2 A INFLAMAÇÃO E OS ANTI-INFLAMATÓRIOS

A inflamação é um fenômeno imunofisiológico de recuperação de um organismo frente a algum dano físico (corte, contusão), químico (queimadura ou corrosão por agentes irritantes) ou biológico (infecção por micro-organismos como vírus, fungos, bactérias ou protozoários) a fim de defender e restabelecer as funções biológicas da área afetada (MUNN, 2016). No caso de doenças autoimunes, a inflamação ocorre sem a presença de um agente causal externo, e assim os componentes do sistema imune são ativados e agem sobre o próprio tecido do organismo, desenvolvendo mecanismos de autodestruição (NGO, STEYN, MCCOMBE, 2014).

Como a própria origem da palavra inflamação sugere (inflamar = pôr fogo, produzir chama, queimar) (FERREIRA, 2010), os mecanismos biológicos envolvidos no processo inflamatório desenvolvem algumas respostas fisiológicas ao tecido lesado, como a dor e febre local. Além destes, outros sinais também são característicos e assim conhecidos como sinais cardinais da inflamação:

- a) dor ou algesia é causada pela pressão causada pelo dano (físico) a algumas terminações nervosas ou por ação de proteínas ou moléculas sinalizadoras naquelas;

- b) calor ou febre é o aumento da temperatura no local da lesão, ocasionada pelo aumento do fluxo sanguíneo devido à vasodilatação e da permeabilidade vascular;
- c) rubor ou vermelhidão é causado pela vasodilatação e o consequente aumento do fluxo sanguíneo local e também pelo aumento da permeabilidade vascular, onde células sanguíneas saem dos vasos para o interstício;
- d) edema, inchaço ou tumor é o aumento do volume local do tecido lesionado ocasionado pelo aumento da permeabilidade vascular, havendo um acúmulo de líquido, células sanguíneas e algumas moléculas;
- e) perda de função é consequência do edema e da dor, que dificultam a atividade no local lesionado (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2019).

Em qualquer processo inflamatório, o mecanismo de ação é sempre o mesmo: o agente inflamatório age sobre os tecidos, induzindo a liberação de mediadores da inflamação por células do hospedeiro no local da inflamação. Estes mediadores podem ser químicos ou biológicos e irão controlar as características fisiológicas daquele local, a fim de remover o agente causal e restabelecer as condições normais. A produção desses mediadores pode ter curta duração, sendo horas ou poucos dias, configurando a inflamação aguda e caracterizada pelos sinais cardinais já citados. Caso não haja a recuperação do tecido, o processo inflamatório pode se estender por períodos maiores, onde maior número de células e constituintes químicos e biológicos será envolvido na tentativa da eliminação do agente causador da inflamação, caracterizando a inflamação crônica (CARDINAL *et al.*, 2016). Como exemplos de doenças inflamatórias crônicas podem ser citados artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e diabetes (FURMAN *et al.*, 2019).

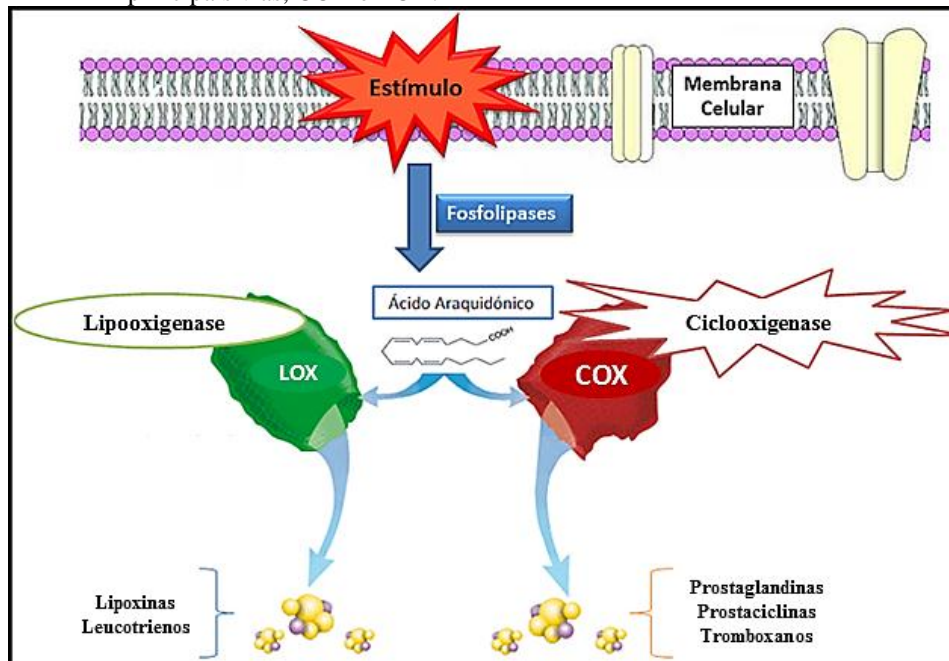
Dentre os diversos mediadores biológicos envolvidos no processo inflamatório estão as diferentes células do sistema imune como, por exemplo, os leucócitos. Há também as citocinas que são proteínas ou glicopeptídeos produzidos por diferentes células e agem como sinalizadores celulares, permitindo a comunicação e deslocamento das células do sistema imune. Existem diferentes tipos de citocinas, que podem ser classificadas de acordo com suas diferentes estruturas, funções, e sítios de atuação no organismo, como por exemplo, as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , etc.) e as quimiocinas, sendo estas últimas um grande grupo de citocinas de mais baixo peso molecular, que regulam a ativação, a migração e a

diferenciação das células nas quais são produzidas (KEUSTERMANS *et al*, 2013; PALOMINO, MARTI, 2015).

Algumas citocinas bastante estudadas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 entre outras, são conhecidas como pró-inflamatórias, ou seja, o aumento de seus níveis resulta no aumento nas respostas inflamatórias do organismo. Já como exemplo de citocinas anti-inflamatórias podem ser citadas IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, que apresentam mecanismos de ação no sentido da diminuição das respostas inflamatórias. Estas agem principalmente no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG, AN, 2007). Vale a pena ressaltar que o mecanismo de ação de cada citocina no organismo envolve diferentes células e outros mediadores inflamatórios de modo sistêmico, ou seja, o aumento ou diminuição dos níveis de uma acarretará na mudança nos níveis de outros mediadores. Logo, apesar de bastante conhecidas e muito estudadas, as citocinas apresentam mecanismos de ação bastante distintos e complexos nos processos inflamatórios. Ainda assim, o estudo de uma ou mais delas pode auxiliar o maior entendimento de seu envolvimento nos processos inflamatórios na busca de novas substâncias anti-inflamatórias (KANY, VOLLRATH, RELJA, 2019).

Os mediadores químicos compreendem substâncias de peso molecular relativamente baixo e que também participam na regulação, ativação ou movimentação das células no processo inflamatório. Os eicosanoides são os principais mediadores químicos da inflamação e recebem este nome por serem produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) [ácido (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-eicosatetraenoico], um ácido graxo de vinte carbonos em sua estrutura (*eicosa* = *vinte*). A ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂ – *phospholipase A₂*) presente na membrana celular, quando ativada por sinalizadores específicos, promove a quebra de fosfolipídios ali presentes, havendo a formação e liberação de ácido araquidônico. Este poderá ser metabolizado por duas diferentes vias enzimáticas: a via das ciclooxigenases (COX) que levará à produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos e a via da lipooxigenases (LOX), que conduzirá à formação de leucotrienos e lipoxinas (figura 2) (HARIZI, CORCUFF, GUALDE, 2008; SAEKI, YOKOMIZO, 2017). Há ainda a via das enzimas do complexo citocromo P450 onde há a conversão do AA em ácidos epoxieicosatrienos (MEIRER, STEINHILBER, PROSCHAK, 2014).

Figura 2 - Figura esquemática de produção e metabolismo do ácido araquidônico pelas principais vias, COX e LOX.



FONTE: Adaptado de página da internet¹.

Os eicosanoides formados a partir do metabolismo do ácido araquidônico, em baixas concentrações, possuem funções fisiológicas importantes no organismo, como por exemplo:

- tromboxano A_2 (TXA_2) age na regulação da agregação de plaquetas e consequente coagulação sanguínea (DENNIS, NORRIS, 2015);
- prostaglandina E_2 (PGE_2) que atua na regulação da pressão e fluxo sanguíneo, contrações do músculo liso de diversos órgãos, secreção do suco gástrico, bom funcionamento renal e também na agregação plaquetária (KHANAPURE *et al.*, 2007; HARIZI, CORCUFF, GUALDE, 2008);
- leucotrieno B_4 (LTB_4), importante na constrição da musculatura bem como participa na quimiotaxia de células que auxiliarão na eliminação do agente causador da inflamação (KHANAPURE *et al.*, 2007; HARIZI, CORCUFF, GUALDE, 2008).

Sob estímulos inflamatórios, há uma grande liberação de ácido araquidônico, havendo assim altas taxas de metabolismo do mesmo pelas duas vias, COX e LOX, produzindo grande quantidade de metabólitos destas enzimas. Altos níveis de prostaglandinas no organismo, principalmente a prostaglandina E_2 (PGE_2), podem causar aumento do fluxo sanguíneo e sensibilização das terminações nervosas promovendo alguns sinais cardinais da inflamação como dor, edema e vermelhidão no local. Os leucotrienos, principalmente o leucotrieno B_4 (LTB_4), em conjunção com as prostaglandinas além de promover a dor e o edema, quando em

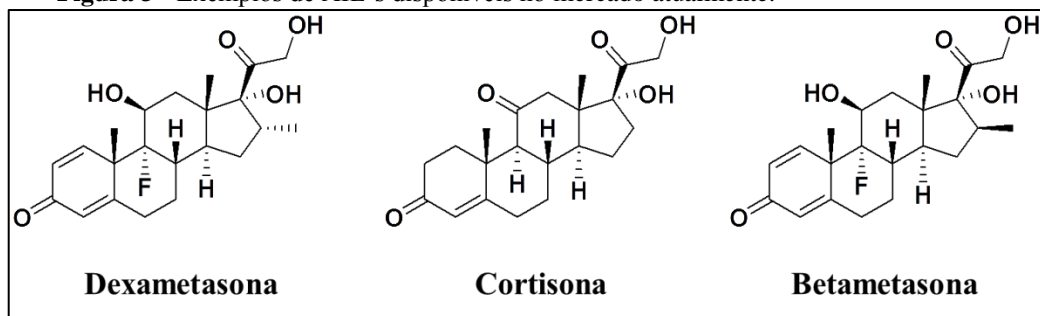
¹ Disponível em: <http://fenilbutazonacaval.wixsite.com/fenilbutazona/untitled-c22uk>. Acesso em maio/2018.

elevados níveis ocasionam recrutamento de neutrófilos e macrófagos, principais células do sistema imune que geram radicais livres na tentativa de eliminação do agente causador. Além disso, LTB_4 age também como broncoconstritores, como estimulantes na liberação de citocinas e ainda responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular (DENNIS, NORRIS, 2015; PARENTE, 2001; SAEKI, YOKOMIZO, 2017). Dependendo do trauma, não há condições do próprio organismo controlar a reação inflamatória, como a dor e a febre, sendo que nessas situações há a necessidade do uso de fármacos anti-inflamatórios (GOLLAN, ARMSTRONG, ARMSTRONG, 2017).

Os anti-inflamatórios (AI) estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos, sendo necessária a busca por substâncias com potencial AI que eventualmente possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos, ou mesmo para auxiliarem no processo de investigação de mecanismos de ação de substâncias (BATLOUNI, 2010; WHO, 2020).

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIE's) ou glicocorticoides são uma classe desses medicamentos com estruturas químicas que se assemelham ao colesterol. Eles agem principalmente na inibição da PLA_2 , impedindo assim a liberação de ácido araquidônico e consequente produção dos eicosanoides envolvidos na inflamação. Embora sejam muito utilizados atualmente, o uso prolongado deles pode desencadear uma série de danos ao organismo como supressão adrenal, osteoporose, úlceras, retenção de líquidos e maior suscetibilidade a infecções. Como exemplo de AIE's tem-se a betametasona, dexametasona, cortisona, entre outros (figura 3 a seguir) (MCLAIN, KAPURAL, MEKHAIL, 2004).

Figura 3 - Exemplos de AIE's disponíveis no mercado atualmente.

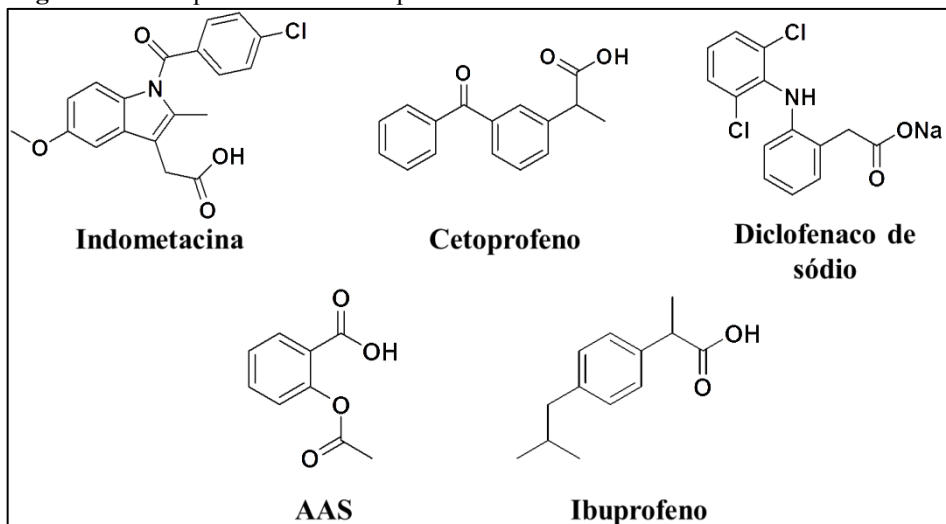


FONTE: Do autor.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) consistem de uma classe genérica de compostos sintéticos com estruturas químicas e mecanismos de ação diversificados. Os AINE's atuais são capazes de inibir COX, mas não são capazes de inibir as LOX. Dentre os

principais AINE's disponíveis no mercado podem-se citar o ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco de sódio, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, dentre vários outros (figura 4 a seguir) (BATLOUNI, 2010; BRUNE, PATRIGNANI, 2015).

Figura 4 - Exemplos de AINE's disponíveis no mercado atualmente.

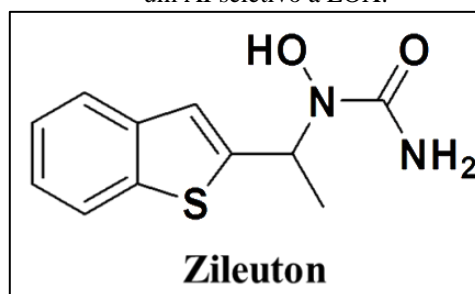


FONTE: Do autor.

Muitos estudos permitiram inferir sobre a existência de diferentes isoformas da COX, em que todas elas seriam responsáveis pela oxidação do ácido araquidônico levando à produção de prostanoídeos, diferenciando-se entre elas apenas em suas estruturas ou presença no organismo (PANNUNZIO, COLUCCIA, 2018). Desde então e durante muitos anos, COX-1 foi reconhecida como a enzima constitutiva do organismo para produção de níveis basais de prostaglandinas e responsável pela manutenção das funções fisiológicas no organismo enquanto COX-2 seria indutiva, sendo sua presença marcada principalmente em tecidos inflamados. Neste sentido, muitos anti-inflamatórios com inibição seletiva a COX-2 surgiram, os coxibes, como celecoxibe e parecoxibe (MENDES *et al.*, 2012; ONIGA *et al.*, 2017). Contudo, estudos com ratos *knock-out* a COX-2 (aqueles com ausência de genes para expressão de enzimas COX-2) mostraram que esta não é a única enzima presente em tecidos inflamados; ela está presente constitutivamente em diferentes órgãos agindo sinergisticamente com a COX-1 na manutenção da homeostase (CELOTTI, LAUFER, 2001). Além disso, outros estudos afirmam também a participação da COX-1 em respostas inflamatórias, podendo ser induzida nestas situações (PARENTE, PERRETTI, 2003). Adicionalmente, estudos recentes demonstram ainda a existência de uma terceira isoforma da ciclooxigenase, a COX-3 (PUPPOLO, VARMA, JANSEN, 2014).

Assim, o uso de AINE's causa um desvio da via de metabolização do ácido araquidônico e ele passa a ser metabolizado apenas pelas LOX, resultando na formação ainda maior de leucotrienos, sendo estes considerados como os responsáveis pelos principais efeitos adversos dos AINE's (FIORUCCI *et al.*, 2001; PARENTE, 2001). A produção de PGE₂ em condições de homeostase é essencial na regulação da secreção do suco gástrico ou no bom funcionamento renal, por exemplo. Neste sentido, entre os principais efeitos adversos decorrentes da administração de AINE's estão a gastrite, úlceras e problemas renais e cardiovasculares, principalmente quando administrados frequentemente e por longos períodos (HUANG *et al.*, 2019; ONIGA *et al.*, 2017). Existem ainda alguns inibidores específicos para LOX, como zileuton (figura 5), utilizado para tratamento de asma, porém possui fraca potência terapêutica além de ser rapidamente eliminado do organismo, o que o torna pouco eficaz (CELOTTI, LAUFER, 2001; KHANAPURE *et al.*, 2007).

Figura 5 - Estrutura química do zileuton, um AI seletivo a LOX.



FONTE: Do autor.

Desta forma, faz-se necessário destacar a importância da busca por novos agentes anti-inflamatórios que sejam capazes de inibir tanto COX como LOX a fim de se obter fármacos mais seguros e eficazes, com efeitos adversos reduzidos ou nulos e de maior eficácia (CHARLIER, MICHAUX, 2003; HUANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2009; SCHNEIDER, BUCAR, 2005). Adicionalmente, tanto as COX quanto as LOX têm sido descritas como enzimas superexpressadas em muitos tipos de tumores, sendo que inibidores simultâneos dessas enzimas são candidatos potenciais a substâncias com propriedade anti-câncer ou mesmo como coadjuvantes (KENNEDY, HARRIS, 2018; LI *et al.*, 2009; YAMAMOTO, GAYNOR, 2001). Para isso, a busca por novos terapêuticos anti-inflamatórios faz-se de grande importância através da utilização de diferentes métodos para a avaliação de tal atividade farmacológica.

1.3 DIFERENTES METODOLOGIAS E ABORDAGENS DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO

A avaliação do potencial farmacológico de uma amostra é um passo importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. O uso de diferentes formas na experimentação científica permite avaliar certa atividade biológica de diferentes amostras com objetivos diversos como o uso de testes de triagem, em estudos iniciais, para seleção daquelas com algum potencial biológico ou o uso de técnicas que permitam avaliar um ou mais mecanismos de ação no organismo vivo, etc.

Para isso, os testes e experimentos de avaliação farmacológica utilizam-se de metodologias que representem o organismo em questão, bem como seu metabolismo, ou que ao menos mimetizem o ambiente biológico ali presente. Dentre as abordagens utilizadas na avaliação de atividades biológicas mais comuns estão os ensaios *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (BORGSTRÖM, 1999, HUNG *et al.*, 2019).

Ensaio *in vitro* fazem uso de kits com reagentes químicos ou enzimáticos, ou ainda células ou tecidos extraídos e cultivados em um ambiente completamente artificial, fora do organismo vivo, mas que permite representar de modo simplificado um evento ocorrente em seu metabolismo. Embora compreendam experimentos simples e relativamente rápidos, consistem de resultados não totalmente representativos e concretos, uma vez que permitem a avaliação de uma ou poucas vias de ação das amostras testadas. Desta forma, não permite levar em consideração os efeitos farmacocinéticos, sinérgicos ou de biodisponibilidade, decorrentes do metabolismo do organismo. Além disso, muitos desses kits são relativamente caros ou que ainda precisam ser importados, o que torna a pesquisa mais demorada e financeiramente dispendiosa. Entretanto, quando se trata da avaliação do potencial de grande número de amostras sem quaisquer conhecimentos farmacológicos prévios, esta abordagem pode ser valiosa e eticamente correta (BORGSTRÖM, 1999; HUNG *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2019).

Os ensaios *in vivo* fazem uso de animais em que as amostras testadas serão submetidas diretamente ao metabolismo ali ocorrente, de tal forma que os resultados de atividade biológica obtidos sejam fielmente representativos ou bastante próximos da realidade. Entretanto, o uso indiscriminado de animais em pesquisas científicas deve ser evitado de modo que o desenvolvimento científico possa se dar de forma íntegra e ética, o que impede sua aplicação às metodologias de ensaios de triagem, principalmente de amostras sem

qualquer estudo prévio da atividade farmacológica (BORGSTRÖM, 1999; HUNG *et al.*, 2019).

Já a experimentação *ex vivo* compreende uma abordagem intermediária entre os modelos *in vitro* e *in vivo*. Para isso, recorre-se a metodologias previamente validadas de utilização de materiais biológicos (células, fluidos, nutrientes, enzimas, etc.) advindos do organismo vivo, porém cultivados e monitorados fora do mesmo por pouco tempo, consistindo de um microambiente quase natural, sendo bastante similar e representativo daquele do indivíduo (MOLEIRO *et al.*, 2017). Além disso, esta abordagem pode consistir de metodologias mais simples e baratas, uma vez que se utiliza em sua grande parte, materiais biológicos e pouca quantidade de reagentes específicos. Desta forma, o ensaio *ex vivo* pode representar uma forma alternativa de experimentação, na qual é possível se obter informações farmacológicas de diversas amostras de modo ético, e relativamente simples, versátil e barato (HUNG *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2019;).

Apesar das vantagens e limitações de cada uma das abordagens anteriormente apresentadas, o uso das diferentes metodologias em conjunto pode representar uma estratégia valiosa na busca por novos compostos com potencial farmacológico, como o anti-inflamatório, a partir de um grande número de amostras e diversidade química, como aquelas advindas da Química Orgânica Sintética aliada à Química Medicinal e também dos Produtos Naturais, apresentando-se esta como fonte de uma vasta gama de compostos com estruturas e propriedades farmacológicas inéditas e promissoras para o desenvolvimento da bioprospecção.

1.4 A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

A Química de Produtos Naturais é o ramo da Química que estuda os compostos advindos de organismos vivos, como animais, plantas e micro-organismos, como fungos e bactérias, ou ainda organismos marinhos. Os produtos naturais compreendem duas classes distintas na composição dos sistemas vivos: os metabólitos primários, como carboidratos, lipídios, aminoácidos e ácidos nucleicos, que participam das reações essenciais do metabolismo, sendo uma classe comum a todos os organismos; e os metabólitos secundários, que compreendem os compostos derivados dos metabólitos primários a partir das reações metabólicas, e que ainda que não essenciais, desempenham papéis fundamentais para o organismo, mesmo que de forma indireta, como no crescimento, na reprodução, na proteção, na adaptação, entre outras funções (GARCIA, CARRIL, 2009).

A grande contribuição da bioprospecção de produtos naturais na descoberta de novos compostos biologicamente ativos se deve a alguns fatores como o conhecimento etnofarmacológico das espécies, com suas bases na medicina popular antiga, e a diversidade química, onde diferentes estruturas e/ou grupos químicos apresentados pelos mesmos permitem interações ou reações distintas com sítios ativos dos quais possam apresentar atividade biológica, o que lhes atribui diversos potenciais farmacológicos. Outro fator que contribui na busca por substâncias bioativas é a biodiversidade da fauna e flora devido à grande diversidade de compostos produzidos pelas diferentes espécies. Além disso, pode-se considerar que ainda que não ativas estas moléculas podem ser fontes de inspiração na síntese de novos compostos com maior eficácia. Diversos compostos derivados de produtos naturais têm sido isolados e relatados na literatura com as mais diversas atividades biológicas. Muitos deles estão disponíveis atualmente no mercado e são importantes no tratamento de algumas patologias, como por exemplo, a avermectina, a artemisinina e seus derivados (SHEN, 2015).

Estima-se que 68,8 % dos compostos aprovados como fármacos entre os anos de 1981 e 2019 tenham alguma base em produtos naturais, sendo isolados e/ou inspirados de alguma forma, o que representa a grande importância desse ramo da Química na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN, CRAGG, 2020). Isso se deve em grande parte ao desenvolvimento e evolução das diferentes técnicas que permitem a separação e isolamento de compostos ou grupos dos mesmos, dentre as quais se destaca a cromatografia.

A cromatografia consiste de método físico-químico de separação baseado no uso de duas fases, estacionária e móvel. O avanço das diferentes formas e tipos da técnica acompanharam, nas últimas décadas do século XX, grandes descobertas de derivados de produtos naturais. A modernização e automatização das ferramentas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG), acopladas às diversas técnicas espectroscópicas como espectroscopia no ultravioleta (UV), e ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrométrica (espectrometria de massas – EM), têm permitido o estudo direcionado de moléculas bioativas, diminuindo o tempo e custo no isolamento delas. Além disso, a abordagem HTS (*High Throughput Screening*) com intuito de automatizar e acelerar o processo de avaliação da atividade biológica, também tem contribuído muito no processo de descoberta de compostos bioativos, permitindo a avaliação de grande número de amostras em tempos reduzidos de análise (ATANASOV *et al.*, 2015; FUNARI *et al.*, 2013). Apesar da disponibilidade de todas essas metodologias e equipamentos modernos, o isolamento de compostos já conhecidos ou com potencial farmacológico em

estudos clínicos pouco efetivos são ainda inevitáveis. Neste sentido, são necessárias abordagens mais modernas utilizando-se tais métodos analíticos e ferramentas avançadas em conjunto, como a metabolômica, que permite o estudo, caracterização e identificação de compostos bioativos de interesse previamente, levando ao isolamento direcionado destes, resultando em uma maior economia e rapidez na busca e desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais (FUNARI *et al.*, 2013).

1.5 OS ESTUDOS EM METABOLÔMICA

Pode-se definir o metaboloma como o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da, aproximadamente) produzidos em um organismo vivo. A metabolômica, por conseguinte, é o ramo da ciência que permite o estudo abrangente do metaboloma, visando identificar e/ou quantificar estes metabólitos no indivíduo em estudo. Paralelamente, alguns autores definem ainda o termo metabonômica como sendo estudos de quantificação de metabólitos produzidos em um organismo vivo frente a algum efeito patofisiológico ou genético (CANUTO *et al.*, 2018; RAMSDEN, 2009).

A principal inovação apresentada pela metabolômica na área de estudos de produtos naturais é a abordagem holística que permite considerar todo o conjunto de metabólitos em uma amostra e associá-lo a certa propriedade, como a farmacológica. Nessa perspectiva, a atividade biológica de uma amostra não é atribuída a somente um ou outro constituinte, mas a um conjunto deles, considerando seus efeitos sinérgicos, o que tem permitido grandes avanços na busca por novos agentes terapêuticos potenciais (VERPOORTE, CHOI, KIM, 2005).

Muito embora suas bases sejam na área da Química, a metabolômica se dá de forma multidisciplinar e pode ser aplicada nas mais diversas áreas das Ciências como Farmácia, Medicina, Nutrição, Agronomia, entre outras. Apesar de ser uma técnica de estudo relativamente recente, o grande número de publicações e estudos na área tem permitido inferir o grande desenvolvimento e avanços na Química de Produtos Naturais (DEIDDA *et al.*, 2015).

Os métodos de separação clássicos em Química, como cromatografia em coluna aberta e cromatografia em camada delgada, são técnicas menos sensíveis e por isso leva, geralmente, ao isolamento e identificação de compostos majoritários de uma amostra, com grande demanda de tempo e solventes. Além disso, tantos esforços podem ser inúteis, quando resultam no isolamento e caracterização de substâncias não inéditas, quanto à estrutura e/ou potencial farmacológico. Deste modo, faz-se necessário o uso de metodologias mais

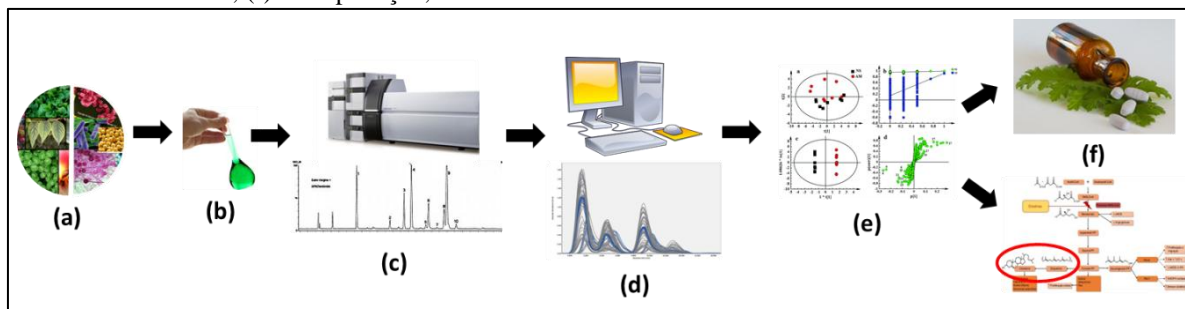
modernas, como as ferramentas metabolômicas, para descoberta de novos compostos bioativos de modo mais rápido, sensível e menos laborioso, inclusive de plantas ou outros organismos já estudados (LANG, 2008; VERPOORTE, CHOI, KIM, 2005; WOLFENDER, MARTI, QUEIROZ, 2010; YULIANA *et al.*, 2011b).

Os estudos em metabolômica podem ter duas estratégias:

- a) *untarget* ou não-direcionada, em que a composição química das amostras em estudo é completamente desconhecida ou pouco conhecida e a análise de todos os componentes ali presentes permite comparar “padrões de presença e ausência de compostos mais importantes” entre as amostras, que as diferenciem (os chamados biomarcadores);
- b) *target* ou direcionada, em que se estuda um pequeno grupo específico de substâncias, visando o monitoramento quantitativo delas a fim de se estabelecer uma relação entre rotas metabólicas individuais ou para observação de modificações metabólicas específicas. Esta estratégia utiliza-se geralmente de padrões dos compostos estudados e de metodologias de validação principalmente para a quantificação dos mesmos (GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; WOLFENDER *et al.*, 2015).

Os estudos do metaboloma podem ainda englobar três diferentes abordagens: metabolômica, perfil metabólico e impressão digital metabólica. Essas abordagens se diferenciam de acordo com o objetivo do estudo, que determinará a técnica analítica empregada, o método de extração e preparo de amostra. Independentemente da abordagem utilizada, todas elas requerem algumas etapas essenciais para extração e análise de informações acerca da composição química das diferentes amostras em estudo, o que permitirá inferir acerca dos possíveis compostos ativos ali presentes. São elas: coleta da amostra, extração, aquisição, processamento e análises de dados, e conclusões do estudo (CANUTO *et al.*, 2018; ERNST *et al.*, 2014; ULRICH-MERZENICH, 2007). A figura 6 traz um resumo simplificado de cada uma destas etapas de um estudo em metabolômica.

Figura 6 - Figura esquemática exemplificando do fluxo de trabalho em estudo metabolômico: (a) coleta de amostra; (b) preparo de extratos; (c) aquisição de dados; (d) processamento de dados; (e) análise de dados; (f) desrepliação, isolamento e conclusões do estudo.



FONTE: Do autor.

Com o advento da tecnologia, técnicas de separação mais refinadas foram desenvolvidas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (GC). A CG apresenta grande poder de resolução de picos e alta reprodutibilidade, porém é usada somente para análise de amostras com compostos voláteis e termoestáveis. Caso contrário, deve-se realizar a derivatização para que os compostos ali presentes possam ser analisados, o que não é muito utilizado em amostras de produtos naturais (CANUTO *et al.*, 2018). Sob outra perspectiva, a CLAE apresenta-se como uma técnica de separação automatizada mais versátil, possibilitando a separação de compostos com grandes diferenças de polaridade, permitido pelo uso de diferentes fases móveis e fases estacionárias (LANÇAS, 2009). Concomitantemente, as técnicas espectroscópicas e espectrométrica, tais como as espectroscopias no ultravioleta (UV), no infra-vermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (RMN) e também a espectrometria de massas (EM) também tiveram uma grande evolução, permitindo-se obter uma infinidade de informações acerca da identidade dos metabólitos no estudo de produtos naturais.

A hifenação de duas ou mais técnicas analíticas tem sido um importante avanço no estudo de amostras complexas, como as de organismos vivos. Como exemplo de técnicas hifenadas, podem ser citadas CG-EM, CLAE-RMN e CLAE-EM que permitem a obtenção de informação acerca da composição química e da estrutura de cada componente de uma amostra, de forma rápida e eficaz. Em metabolômica, utiliza-se principalmente, as hifenações CLAE-RMN e CLAE-EM. Embora a espectroscopia de RMN seja uma técnica mais reprodutível, além de fornecer informações mais precisas na identificação de metabólitos sem ambiguidades, a EM é uma técnica muito mais sensível, o que permite detectar e obter informações daqueles compostos em níveis traços na amostra (HARVEY *et al.*, 2015).

Geralmente, o modo de ionização dos equipamentos CLAE-EM utilizados na etapa de aquisição de dados em metabolômica é o *eletrospray*. Este ionizador, além de ser mais

versátil e abrangente o que permite a análise de compostos com grande diferença de polaridade e peso molecular, fornece ainda uma ionização mais branda dos mesmos, evitando-se maior grau de fragmentação dos íons gerados, tornando possível a identificação do íon molecular (CROTI *et al.*, 2006; WOLFENDER *et al.*, 2015). Além disso, diferentes analisadores podem ser utilizados nestes equipamentos, os quais se destacam os de alta resolução, que fornecem valores de m/z com maior exatidão. Entretanto, tais informações podem ainda não se apresentar suficientes para uma identificação correta, onde então há a possibilidade de acoplamento de outro analisador, em série, (CLAE-EM/EM) a fim de se obter informações mais detalhadas de um composto pelos padrões de fragmentação apresentados (VILLAS-BÔAS, GOMBERT, 2006; WOLFENDER *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2012).

A etapa de aquisição de dados gera uma grande quantidade de informações sobre a composição química das amostras. Os cromatogramas e espectros necessitam passar por um refinamento, etapa esta conhecida como processamento, para eliminação de ruídos, deconvolução e alinhamento de picos, bem como a normalização dos dados. Para isso, existem diversos softwares comerciais ou gratuitos, como MZmine 2, MassLynx®, Chenomx Inc., entre outros, que permitem o tratamento minucioso destes dados (KATAJAMAA, ORESIC, 2007; SUGIMOTO *et al.*, 2012).

A análise de dados já processados, pode ser realizada também por diversos softwares livres ou comerciais, como MarkerLynx™, SIMCA-P, Weka, e outros, onde através do uso de diferentes modelos estatísticos multivariados, é possível criar correlações para descoberta de compostos bioativos. Dentre as análises estatísticas multivariadas utilizadas em metabolômica, estão os métodos não supervisionados, que levam em consideração somente a composição química para construção e análise de correlação entre as amostras (como as análises por PCA – *Principal Component Analysis* e HCA – *Hierarchical Clustering Analysis*) e os métodos supervisionados (como OPLS-DA – *Orthogonal Partial Least Square - Discrimant Analysis*), que além da composição química, relacionam ainda alguma propriedade da amostra, como a farmacológica, no caso de estudo por novos compostos bioativos (WORLEY, POWERS, 2013).

As etapas seguintes num estudo metabolômico, pode se dar pela desreplicação que consiste da identificação putativa dos de maior interesse, de acordo com os resultados das análises estatísticas. Segundo Wolfender *et al.* (2015), a desreplicação dos extratos permite a anotação do pico, ou a identificação a certo nível de confiança, dependendo do tipo de análise

utilizada para este fim, bem como a técnica de aquisição de dados. Tal identificação ou anotação consiste da comparação dos dados cromatográficos e/ou espectrométricos de tais substâncias com diversas bases de dados disponíveis. Os casos em que não se tem *hits* (compostos anotados) com as informações contidas nas bases de dados, podem indicar que tal composto possa possivelmente possuir uma estrutura inédita (LONGNECKER *et al.*, 2015).

Sequencialmente às etapas da metabolômica, podem ser utilizados os métodos analíticos clássicos, para o isolamento, caracterização e identificação daqueles compostos de interesse que possam apresentar estrutura e/ou potencial farmacológico inéditos. Além disso, pode-se ainda através dos estudos metabolômicos estudar as vias metabólicas de um indivíduo para determinação de relações com propriedade patofisiológicas ou mesmo filogenia (SULEK *et al.*, 2014; VARMA *et al.*, 2018).

2 OBJETIVOS

Considerando-se a necessidade da busca por novos compostos com atividade anti-inflamatória, a grande diversidade de compostos de espécies da família Fabaceae e as diferentes ferramentas e abordagens disponíveis para tal estudo, este trabalho objetivou:

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar e desenvolver diferentes metodologias e abordagens para avaliação e estudo da atividade anti-inflamatória de amostras de extrato de espécies vegetais da família Fabaceae, e relacionar com sua composição química por desreplicação direta de extratos ou por anotação de biomarcadores apontados por meios de estudos de correlação *in silico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Testar as amostras de extratos em ensaio *in vitro* e relacionar a atividade antioxidante delas nos processos inflamatórios;
- b) Desenvolver um método de testagem *ex vivo* no sangue total humano para avaliação da regulação da produção de IL-10 pelas amostras vegetais de Fabaceae;
- c) Usar a mesma metodologia *ex vivo* no sangue e padronizar a mesma, como método de triagem da atividade anti-inflamatória, pela avaliação da regulação da produção de PGE₂ pelas amostras vegetais;
- d) Confirmar a atividade anti-inflamatória das amostras ativas no ensaio *ex vivo* de produção de PGE₂ em ensaio *in vivo* de edema de orelha em ratos bem como obter informações da atividade antiedematogênica;
- e) Avaliar a atividade de inibição de recrutamento de neutrófilos (pelo ensaio de MPO) das amostras testadas no ensaio *in vivo*;
- f) Desenvolver e validar um método de quantificação de PGE₂ e LTB₄ por LC-MS/MS em fragmentos de orelha oriundos de ensaio anti-inflamatório *in vivo* para avaliação do potencial de possível inibição das vias COX e/ou LOX, de diferentes amostras testadas;
- g) Comparar o perfil metabólico das amostras ativas no ensaio *ex vivo* de inibição da produção de PGE₂ por desreplicação;
- h) Analisar a correlação *in silico* por estudos metabolômicos para determinação das principais substâncias responsáveis (biomarcadores) pela atividade antioxidante e de inibição da produção de IL-10 e PGE₂ nas amostras de Fabaceae.

- i) Anotar os biomarcadores fortemente correlacionados à atividade anti-inflamatória, entre as amostras de extrato testadas, pelos três mecanismos de ação simultaneamente (antioxidante, inibição da produção de IL-10 e inibição da produção de PGE₂).

3 METODOLOGIA

3.1 SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAIS

Todos os solventes utilizados para as análises em cromatografia seja por LC-UV-DAD, LC-MS/MS ou LC-HRMS foram grau HPLC de alto grau de pureza, como água ultrapura purificada em equipamento Millipore, acetonitrila (ACN) e hexano Sigma-Aldrich[®], metanol (MeOH) e etanol (EtOH) Tedia[®] para testes e preparo de amostra, ácido acético glacial J. T. Baker[®], acetato de amônio Isofar[®] (97% pureza). Os padrões PGE₂, LTB₄ e 15d-PGJ₂, bem como cloranfenicol (CAP), dexametasona, óleo de cróton, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O26:B6, fitohemaglutinina (PHA), ácido fórmico, indometacina, Ficoll Histopaque[®] 1077 e o reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. Já o padrão de ácido araquidônico (AA) foi adquirido da Cayman Chemical[®]. LPS e PHA foram diluídos em PBS para serem utilizados como indutores da inflamação nos ensaios anti-inflamatórios *ex vivo* em sangue humano (tanto para avaliação da inibição da produção de PGE₂ quanto da produção de IL-10). A purificação das amostras de plasma foi realizada por extração em fase sólida (SPE - *solid-phase extraction*) utilizando-se um sistema Manifold Supelco e cartuchos Supelclean[™] LC-18 SPE (de 500 mg de sorvente and 2.8 mL de capacidade). Microfiltros SimplePure de politetrafluoroetileno (PTFE) (poros de 45 µm) foram usados para filtrar os extratos de plantas ressuspensos após o clean up por partição líquido-líquido com hexano. Ficoll-Histopaque para isolamento de células do sangue foi obtido pela Sigma-Aldrich[®]. O kit de detecção por ELISA para IL-10 foram adquiridos da PeproTech[®]. O kit para avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) foi adquirido pela BD OptEIA[™]. O manuseio e processamento de dados de UPLC-ESI-QTOF-MS² foram realizados no software MassLynx V4.1[™] da Waters. Os softwares MarkerLynx XS e EZInfo foram utilizados para análises estatísticas multivariadas nos estudos metabolômicos. O software MZmine 2 foi utilizado para obtenção dos cromatogramas sobrepostos, das amostras de extratos, obtidos em MS¹ no modo *full scan*.

3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Este trabalho consistiu no estudo de extratos das folhas de 47 diferentes espécies da família Fabaceae. Muitas delas foram coletadas na Mata Atlântica ou no perímetro urbano da região do município de Alfenas-MG com o auxílio do pesquisador e mestre João Pedro Elias da Costa, de acordo com a disponibilidade das espécies na região. Foram inclusas no estudo

espécies com relatos tanto da medicina popular ou da literatura quanto à atividade anti-inflamatória, algumas de importância alimentícia bem como outras inéditas, sem qualquer estudo químico prévio. Todas as espécies foram identificadas pelo grupo de pesquisa liderado pelos professores Dr. Flávio Nunes Ramos e Dr. Marcelo Polo da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG e as exsiccatas foram depositadas no herbário UALF da mesma universidade. Os números das exsiccatas e os códigos identificadores de cada espécie estão relacionados na tabela 1.

Todas as espécies foram cadastradas no Sistema Nacional de Acesso de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, de acordo com as normas vigentes, podendo ser identificadas no sistema sob o número de cadastro A642B9B.

3.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas das diferentes espécies obtidas foram secas em estufa com circulação de ar por 72 horas a 50 °C. Após isso, o material vegetal foi triturado em moinho de facas e o pó de cada uma delas foi armazenado em sacos de papel e ao abrigo da luz e umidade.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos de cada uma das espécies foram obtidos utilizando-se uma mistura etanol: água (3:1, V/V) e 0,1% de ácido acético glacial, numa proporção 1:50 solvente: massa de material vegetal (m/V, em g/mL). O uso da mistura extratora foi baseado no trabalho de De Vos *et al.* (2007) com algumas modificações, a fim de se obter a maior diversidade química possível em cada extrato.

O material vegetal foi mantido com a solução de extração sob agitação por 24 h a 25 °C em incubadora Shaker SL222 a 125 rpm, sob ausência de luz (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015). Após o período de incubação, os extratos tiveram o material vegetal separado por filtração a vácuo. O solvente foi eliminado dos extratos por rotaevaporação (a 40° C) e em seguida foram submetidos à liofilização para eliminação completa de água e obtenção dos extratos brutos secos e livres de solventes.

3.5 PREPARO DE AMOSTRAS DE EXTRATOS PARA ANÁLISES

Os extratos secos obtidos, como descrito na seção 3.4 anterior, foram ressuspensos em água ultrapura (1 mg) (grau HPLC) na concentração de 1 mg/mL e submetidos a banho ultrassônico por 3 minutos para completa solubilização. Em seguida, eles foram submetidos

ao particionamento com hexano (*clean up*), por duas vezes de 300 µL cada, para eliminação de substâncias lipofílicas. Em seguida, as soluções foram filtradas em microfiltros de PTFE para eliminação de quaisquer resíduos sólidos ali presentes. Tais soluções foram submetidas às análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) (especificado a seguir) e aos ensaios para avaliação de atividade farmacológica antioxidante *in vitro* e anti-inflamatórias *ex vivo* em sangue humano (de inibição de PGE₂ e de produção de IL-10), descritos nas próximas seções.

3.6 OBTENÇÃO DOS PERFIS METABÓLICOS DOS EXTRATOS POR UPLC-ESI-QTOF-MS²

As amostras de extratos obtidas como descrito na seção 3.5 foram submetidas a análise por LC-HRMS para obtenção dos perfis metabólicos de cada um deles. As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo da Waters ACQUITY UPLC® equipado com quatro bombas para fase móvel, automostrador e forno com controle de temperatura para coluna, acoplado a espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QToF. Foi utilizado um sistema binário de fase móvel: fase móvel A consistindo de uma solução aquosa 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B acetonitrila. O método cromatográfico foi gradiente: 2 a 95% de fase B em 8 minutos, mantendo-se nesta proporção de fase móvel por mais 0,6 min e então retornando para 2% de B em 0,1 min, mantendo-se a proporção por mais 1,3 min para restabelecimento das condições iniciais da coluna para a próxima corrida, totalizando 10 min de corrida cromatográfica para cada amostra. O fluxo total de fase móvel foi de 0,5 mL/min. Utilizou-se uma coluna de fase reversa da Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 tamanho de partículas de 1,8 µm, diâmetro interno de 2,1 mm e 30 mm de comprimento, mantida à temperatura de 45 °C durante as análises. Foram injetados 10 µL de amostra para cada análise.

O espectrômetro de massas operou análises com ionizador por eletrospray (ESI) em ambos os modos de ionização (positivo e negativo). Utilizou-se gás nitrogênio para dessolvatação (900 L/h a 450 °C) e fluxo no cone de 50L/h. A tensão do capilar de ionização foi mantida a 3 kV e temperatura da fonte a 130 °C. Argônio foi utilizado como gás de colisão (0,3 mL/min e $9,67 \cdot 10^{-2}$ mbar). O espectrômetro de massas utilizou infusão de Lockmass para calibração do analisador Tof de alta resolução, empregando leucina encefalina como calibrante. O analisador Tof trabalhou sob vácuo a $4,01 \cdot 10^{-7}$ mbar. Os íons foram analisados por ambos analisadores em série MS² (quadrupolo e Tof - QTOF) no modo *full scan* na faixa

de m/z entre 100 e 900 no modo positivo, e 100 e 1000 no negativo, e energias de colisão de 15 kV e 6 kV, respectivamente.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE RADICAIS DPPH

Este ensaio *in vitro* avalia a capacidade de um extrato ou composto isolado sequestrar (reagir por reações radicalares) o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) permitindo inferir acerca do potencial antioxidante destas amostras (OLIVEIRA, 2015; CESARINO *et al.*, 2020). O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por Poojary, Vishnumurthy e Adhikari (2015) com pequenas modificações. A partir de uma solução estoque a 1 mg/mL das amostras dos extratos a serem testadas (preparadas como descritas no item 3.5) e do controle positivo (ácido ascórbico), foram feitas diluições destas em diferentes concentrações (0-200 µg/mL) em metanol. Adicionou-se então 300 µL de cada uma das soluções em diferentes concentrações a 2,7 mL de uma solução metanólica de DPPH a 40 µg/mL. As misturas foram agitadas vigorosamente e incubadas por 30 minutos sob ausência de luz. Em seguida, os valores das absorbâncias foram obtidos a 517 nm onde foi possível o cálculo da % atividade sequestrante pela equação 1:

$$\% \text{ Ativ. Seq.} = \frac{(Abs_{Cont Neg} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Cont Neg}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Os valores de concentração de 50% da atividade inibitória do radical DPPH (CI₅₀) foram calculados plotando-se os valores de % de atividade sequestrante *versus* concentração por regressão não linear no software GraphPad Prism®. O ensaio foi realizado em triplicata e os testes de diferenciação estatística foram feitos por ANOVA *one-way*, seguidos por comparações múltiplas pelo teste de Dunnett daquelas amostras com CI₅₀ inferiores a 500 µg/mL, concentração esta determinada limítrofe para comparação estatística entre as amostras quanto à atividade antioxidante.

3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS EM HUMANOS

Sangue venoso foi obtido de voluntários saudáveis de ambos os sexos, masculino e feminino, com idades entre 20 e 30 anos. Eles assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) e a participação dos voluntários na pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) sob número 89325818.1.0000.5142. O sangue foi coletado dos doadores que não fizeram uso de anti-inflamatórios ou do antibiótico cloranfenicol (CAP) a pelo menos 15 dias antes da coleta.

O sangue dos doadores foi coletado em tubos contendo heparina de sódio como anticoagulante e utilizado para o teste de inibição da produção de PGE₂ e IL-10. Toda a coleta de sangue dos doares teve o suporte técnico do Laboratório de Análises Clínicas (LACEN) da Unifal-MG e os ensaios *ex vivo* tiveram a contribuição do Departamento de Patologia e Parasitologia, em especial do professor Dr. Ivo Santana Caldas.

3.9 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE

Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) foram isoladas do sangue por diferença de densidade, utilizando-se o reagente Ficoll Histopaque[®] 1077, seguindo-se o protocolo sugerido pelo fornecedor. De forma sucinta, o sangue fresco e heparinizado foi transferido para um tubo falcon com o meio de cultura RPMI e o reagente Ficoll. A mistura foi centrifugada por 40 minutos a 4 °C e 180 rpm. O anel de células imediatamente inferior à camada de sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo contendo também RPMI. A mistura foi então novamente centrifugada a 1500 rpm por 10 min e 4 °C. A camada superior obtida desta foi separada e diluída com mais RPMI, onde as células ali presentes (PBMC) foram contadas em câmara de Neubauer para incubação no teste a ser realizado para avaliação da quantidade de IL-10 produzida (seção 3.10 a seguir).

3.10 TESTES DE PRODUÇÃO DE IL-10 EM SANGUE TOTAL OU CÉLULAS ISOLADAS DO SANGUE

Inicialmente, um teste da produção de IL-10 foi realizado com o sangue total ou células isoladas do mesmo (PBMC), utilizando-se dois diferentes indutores da inflamação (PHA ou LPS, ambos a 10 µg/mL de concentração final em cada poço). O sangue total foi diluído com PBS e testado em dois períodos de incubação: 12 e 24 h. Já as PBMC foram testadas somente em 24 h e incubadas na concentração de 1x10⁴ células por poço, utilizando-se RPMI como meio de cultura. Toda metodologia utilizada nos ensaios com sangue total ou PBMC para avaliação de IL-10 foi adaptada baseando-se em trabalhos da literatura (AI *et al.*, 2013; CROUVEZIER *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2009; THOMET *et al.*, 2002; THURM, HALSEY, 2005; VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2012).

Em seguida, o ensaio *ex vivo* no sangue total foi realizado para avaliação da produção de IL-10 por extratos vegetais de espécies da família Fabaceae em diferentes concentrações (100; 10; 1 e 0,1 µg/mL). Foram inclusos no teste, fármacos de referência (dexametasona e indometacina a 10; 5; 1 e 0,1 µg/mL). LPS ou PHA a 10 µg/mL de concentração final foram

utilizados como indutores da inflamação no teste do ensaio para IL-10. O ensaio incluiu sangue puro, sangue incubado somente com indutor (sangue + LPS ou sangue + PHA) ou sangue somente com amostras de extratos, sem indutor, ou ainda de células isoladas na concentração já citada anteriormente. Em todas as amostras, PBS foi utilizado como meio de cultura diluente.

Todos os testes descritos anteriormente foram realizados em duplicatas e o sobrenadante obtido após incubação do sangue ou das células foi submetido ao ensaio por ELISA para quantificação de IL-10 de acordo com o manual do fornecedor (seção 3.11). A metodologia acerca da manipulação do sangue para o teste *ex vivo* de produção de IL-10 é descrita detalhadamente na seção 3.12 a seguir.

3.11 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IL-10 EM AMOSTRAS DE PLASMA POR ELISA

Os mesmos passos do bioensaio em sangue humano induzido à inflamação seguido do tratamento com amostras de extratos vegetais de Fabaceae ou fármacos de referência, indometacina e dexametasona (controles positivos) (descrito na seção 3.10 anterior) foram realizados e as amostras de plasma obtidas foram submetidas ao ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) para quantificação da citocina IL-10.

Os ensaios por ELISA consistem de métodos de grande reprodutibilidade que permitem a detecção de moléculas diversas (hormônios, vitaminas, proteínas/peptídeos, fármacos ou outras moléculas) nos quais são utilizados anticorpos próprios para detecção de cada componente de interesse de uma amostra, que se ligam de modo específico à molécula analisada. Existem diferentes formas para condução destes ensaios as quais se diferenciam no número de passos bem como da quantidade de reagentes/constituintes a serem utilizados à sua realização. Dentre os diversos tipos de detecção por ELISA se destaca o tipo sanduíche, no qual a proteína ou molécula a ser detectada/quantificada fica “presa” entre duas moléculas de anticorpos que se ligam especificamente àquela, e por isso recebem este nome. Além da alta especificidade da técnica e sua facilidade na realização, o método de ELISA do tipo sanduíche apresenta ainda uma sensibilidade muito alta quando comparada com os outros tipos de detecção enzimática, permitindo a detecção de moléculas em níveis traços (LENG *et al.*, 2008; AYDIN, 2015).

Inicialmente foram testados dois indutores da inflamação descritos na literatura: LPS (utilizado também no ensaio no sangue para avaliação da inibição da produção de PGE₂) e fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin* – PHA), ambos a 10 µg/mL, para comparação dos níveis de IL-10 produzidos. Todos os passos seguiram a metodologia descrita na seção 3.12 e baseada no trabalho de Liu *et al.* (2009). Após este teste, foi realizada a avaliação da produção de IL-10 no sangue induzido à inflamação e tratado com as diferentes amostras, onde a detecção e quantificação da citocina foram realizadas por kit ELISA-sanduíche. O ensaio para a detecção de IL-10 nas amostras de plasma foi realizado seguindo-se as instruções do manual do fornecedor do kit e descrito de forma sucinta a seguir.

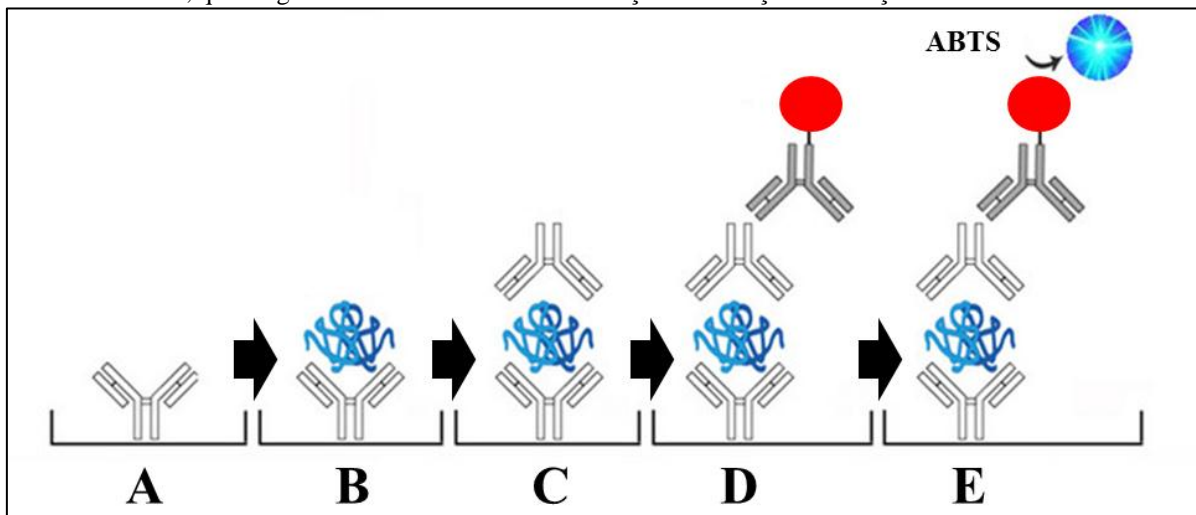
Inicialmente, todos os componentes do kit (anticorpos de captura e de detecção e padrão de IL-10) foram ressuspensos em água Mili-Q e armazenados como soluções estoques. Além disso, foram preparadas também previamente algumas soluções:

- a) Solução tampão de bloqueio, preparada com 1 % de albumina sérica bovina em PBS;
- b) Solução diluente, contendo 0,1 % de albumina sérica bovina e 0,05 % de Tween-20 em PBS;
- c) Solução de lavagem, compreendendo solução de PBS contendo 0,05 % de Tween-20.

Em suma, o primeiro passo consistiu da sensibilização da placa de 96 poços de alta afinidade (específica para ensaios ELISA) por meio do plaqueamento dos poços com 100 µL da solução do anticorpo de captura diluído em PBS. Após repouso da placa selada durante uma noite à temperatura ambiente, esta solução foi descartada e os poços foram lavados quatro vezes com 300 µL da solução de lavagem. Na sequência, 300 µL da solução de bloqueio foram adicionados a cada poço e a placa mantida em repouso, selada e à temperatura ambiente, por 1 h. Após esse período de incubação, a placa foi novamente lavada com a solução de lavagem (4 vezes de 300 µL) e na sequência, 100 µL das soluções padrão de IL-10 (diluídas com a solução diluente em diferentes concentrações) ou das amostras de plasma do teste no sangue foram incubadas por 2 h, à temperatura ambiente com a placa selada. Após isso, a placa foi novamente lavada com solução de lavagem e o anticorpo de detecção previamente diluído em solução diluente foi plaqueado a 100 µL e a placa incubada por 2h. Em seguida, realizou-se novamente a lavagem da placa (nas mesmas quantidades e proporções com a mesma solução de lavagem) e posteriormente uma solução de Avidina foi adicionada a 100 µL por poço. Após incubação por 30 minutos, seguida novamente da

lavagem da placa com a devida solução, solução de ABTS (reagente colorimétrico que reage com Avidina) foi adicionada a 100 μL em cada poço e a leitura da absorção das soluções foi realizada em leitor espectrofotômetro de placas a 405 nm com correções em 650 nm. Os cálculos foram realizados comparando-se as absorbâncias dos padrões de IL-10 adicionados em concentrações conhecidas com as das amostras de testadas, para determinação da quantidade de IL-10. O teste foi realizado em duplicatas. Um resumo das etapas realizadas no ensaio por ELISA sanduíche é mostrado na figura 7 a seguir.

Figura 7 - Diferentes etapas para realização do ensaio de ELISA sanduíche para detecção e quantificação de IL-10. **A)** Sensibilização da placa por adição do anticorpo de captura. **B)** Adição do padrão de IL-10 ou da amostra de plasma contendo a citocina. **C)** Adição do anticorpo de detecção, que também se liga à IL-10, o que sugere um “sanduíche” da citocina entre os dois anticorpos. **D)** Adição da Avidina, uma proteína que se liga ao anticorpo de detecção. **E)** Adição do reagente colorimétrico ABTS, que reage com a Avidina e causa mudança de coloração da solução.



FONTE: Figura adaptada de site de internet, disponível em <https://www.lsbio.com/elisakits/human-coceptin-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f26731/26731>, acesso em 23/10/2019.

3.12 ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO *EX VIVO* NO SANGUE HUMANO DE PRODUÇÃO DE IL-10 E PGE_2

O sangue humano, fresco e heparinizado, foi plaqueado em placas de 96 poços (200 μL por poço), e incubados com as diferentes amostras de extratos (como descrito na seção 3.10) na concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ juntamente com uma solução de LPS (diluído em PBS) também na concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, este último para estímulo inflamatório. Os fármacos padrões de referência (indometacina e dexametasona) foram inicialmente diluídos em uma mistura $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, V:V) como solução estoque a 1 mg/mL e foram incubados na placa com o sangue (na concentração final de 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para serem testados como controles positivos no teste da produção de PGE_2). O controle negativo utilizado no teste foi tido como o sangue incubado juntamente com o indutor da inflamação (LPS) sem nenhum

tratamento. O volume final em cada poço foi de 250 μL e todas as diluições foram feitas utilizando-se PBS (*Phosphate Buffered Saline*), uma solução tampão de sais de fosfato utilizada como meio de cultura de células. O teste para cada amostra foi feita em quatro replicatas para o teste de PGE_2 e duplicatas para IL-10. Após incubação em estufa a 37 °C e atmosfera a 5% de CO_2 por 24h, a placa foi centrifugada a 1000 rpm por 5 min e a 4 °C, obtendo-se assim o plasma da replicata de cada amostra. Este ensaio foi baseado em trabalhos da literatura (BRIDEAU *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2009; MILES *et al.*, 2005) com algumas adaptações. Esta metodologia foi utilizada tanto para avaliação da inibição da produção PGE_2 (por detecção por LC-MS/MS) quanto da produção de IL-10 (detecção por kit ELISA).

3.13 OBTENÇÃO DA MATRIZ DE PLASMA DE SANGUE HUMANO PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE_2

Amostras de plasma obtidas do sangue fresco e heparinizado de diferentes doadores foram misturadas e homogeneizadas, a fim de se obter uma matriz uniforme do plasma para realização dos testes de validação do método de quantificação de PGE_2 .

3.14 PREPARO DE AMOSTRAS DE PLASMA PARA ANÁLISES POR LC-MS/MS

As amostras de plasma advindas do teste anti-inflamatório *ex vivo* no sangue humano para avaliação da inibição da produção de PGE_2 foram submetidas aos passos de precipitação de proteínas e purificação. Para isso, foram adicionados inicialmente 500 μL de uma mistura MeOH: ACN (1:1, V:V) a 100 μL de plasma de cada replicata. Após homogeneização das amostras em agitador do tipo vórtex e completa precipitação das proteínas, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram diluídos em água para redução da quantidade da mistura MeOH:ACN com 4,5 mL de água ultrapura. Na sequência, elas foram conduzidas à purificação por SPE. A primeira etapa da purificação, consistindo do condicionamento do cartucho, foi feita passando-se 2 mL de MeOH no cartucho e depois 2 mL de uma solução aquosa 0,1 % de ácido acético. Após isso, a amostra foi aplicada ao cartucho, sendo passado a este mais 2 mL da solução 0,1 % de ácido acético para purificação e eliminação de interferentes da matriz do plasma. Para eluição da amostra do cartucho passou-se 2 mL de MeOH contendo 0,1 % de ácido acético. As amostras de PGE_2 purificadas obtidas foram completamente secas sob vácuo por 6 h em equipamento *Speed Vacuum*, sob ausência de luz e calor. Após isso, as amostras foram mantidas em baixas temperaturas e ressuspensas em 100 μL de uma solução de CAP em ACN a 25 ng/mL e posteriormente

analisadas por LC-MS/MS. As amostras foram mantidas no freezer ou em gelo até o momento exato da análise por LC-MS/MS para quantificação de PGE₂.

3.15 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂ EM AMOSTRAS DE PLASMA POR LC-MS/MS

As soluções estoque de PGE₂ e CAP a 1 ppm foram preparadas em ACN. A solução de CAP foi diluída a 25 ng/mL em ACN para ser usada como padrão interno (PI) e ressuspensão das amostras de PGE₂ purificadas, obtidas como descrito na seção 3.14 anterior. A mistura de plasmas de amostras de sangue humano (descrito na seção 3.13) foi fortificada com a solução estoque PGE₂ a fim de se obter soluções padrões de PGE₂ na matriz biológica em diferentes concentrações, variando de 400 a 0,105 ng/mL, para a construção das curvas de calibração em triplicatas. Amostras controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) foram preparadas a 30, 100 e 200 ng/mL, respectivamente, tanto na matriz do plasma quanto em solução (em ACN). Todas as figuras de mérito do método de quantificação foram determinadas como linearidade, limite inferior de quantificação (LIQ), precisão, exatidão, efeitos de matriz, recuperação e estabilidade.

3.16 PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO LC-MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂ EM PLASMA

As análises por LC-MS/MS para quantificação de PGE₂ nas amostras de plasma advindos do teste anti-inflamatório *ex vivo* foram conduzidas em cromatógrafo líquido da Shimadzu equipado com duas bombas de fase móvel LC-20AD e degaseificador DGU-20A 3R, auto-injetor SIL-20A HT, forno para coluna CTO-20A, e comunicador CBM-20A, acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu LCMS-8030 com ionizador por eletrospray (ESI) e analisador triplo quadrupolo (tQUAD), fazendo-se diferentes experimentos de análises como *Full Scan*, *SIM*, *Product Scan* e *SRM*.

O método cromatográfico foi conduzido em coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (da Agilent, CA, USA) de 15 cm e 4,6 mm de diâmetro interno com partículas de 2.7 µm, acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária. Duas fases móveis foram utilizadas: solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (fase móvel A) e ACN (fase B). Método cromatográfico gradiente foi utilizado com um fluxo total de 0,3 mL/min, variando-se a fase B de 40 a 100% em 3 min, mantendo-se em 100% por 1 min. Na sequência, o método retornava de 100 para 40% de fase B em 0,5 min, mantendo-se nesta proporção por mais 4

min para recondicionamento da coluna, totalizando 8,5 min de corrida para cada amostra. O volume de injeção de todas as amostras foi de 20 µL e as amostras processadas foram mantidas em gelo ou freezer até o momento da injeção e análise por LC-MS/MS.

A detecção de PGE₂ e do CAP (PI) no espectrômetro de massas foi por método de monitoramento de reação selecionada (*Selected Reaction Monitoring* – SRM) no modo de ionização negativo onde os íons precursores são formados principalmente da desprotonação das moléculas dos analitos [M-H]⁻ (MESAROS, LEE, BLAIR, 2009). Gás nitrogênio foi utilizado como gás secante (a 450 °C e 15 L/min) e nebulizador (a 2 L/min). As transições de razão massa-carga (*m/z*) monitorados pelo método SRM foram otimizados a fim de se aumentar a sensibilidade na detecção destes compostos.

3.17 ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VIVO* DE INIBIÇÃO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON

Este ensaio foi realizado com camundongos machos Swiss e é baseado em metodologia já descrita na literatura (TUBARO *et al.*, 1985; SANTOS *et al.*, 2019). O Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) aprovou previamente o estudo (protocolos de números 506/2013, 561/2014 e 16/2016). Inicialmente, a inflamação cutânea foi induzida na orelha esquerda de camundongos (n=8) pela aplicação tópica do óleo de cróton (5%) dissolvido em acetona (veículo). Na orelha direita somente o veículo foi aplicado, que pode ser acetona ou uma mistura água e glicerina. Trinta minutos após a aplicação de 20 µL da solução irritante (óleo de cróton), fez-se o tratamento tópico com diferentes amostras de extrato diluído no veículo. Os extratos brutos testados foram diluídos no veículo a 0,5 mg/orelha. Os animais do grupo controle negativo receberam como tratamento apenas o veículo, enquanto os do grupo controle positivo são tratados topicamente com os fármacos de referência (indometacina ou dexametasona, ambos na mesma concentração que as amostras de extrato). Os animais foram sacrificados, por inalação de isoflurano, 6 h após a indução da inflamação para a excisão de um fragmento de orelha de 6 mm de diâmetro de ambas orelhas de cada animal. A quantificação do edema foi determinada pela diferença de peso entre os fragmentos das orelhas esquerdas e das respectivas orelhas direitas. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA *one-way* seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett.

3.18 DOSAGEM DE MPO EM FRAGMENTOS DE ORELHA ADVINDOS DO ENSAIO *IN VIVO*

As amostras de fragmentos de orelha advindos do teste *in vivo* (descrito na seção 3.17 anterior) foram armazenadas em 200 μL de tampão de pH = 4,7 NaEDTA/NaCl a -20°C até serem processadas e analisadas, baseado na metodologia de Santos *et al.* (2019) descrita a seguir.

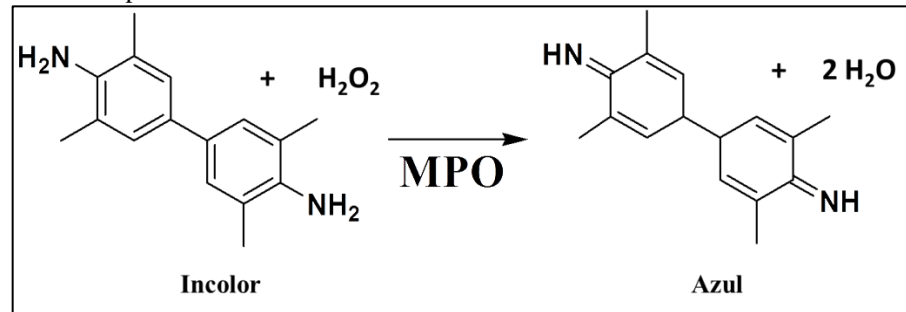
Inicialmente, o fragmento de orelha de cada replicata do ensaio *in vivo* foi triturado em 400 μL do tampão pH 4,7, com o auxílio de um homogeneizador tipo Túrrax a 13000 rpm por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C . Os sobrenadantes foram reservados para posteriores análises de PGE_2 e LTB_4 por LC-MS/MS (descrito na seção 3.19 a seguir). Os precipitados foram ressuspensos em 600 μL de tampão pH = 5,4 contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio e novamente homogeneizados (13000 rpm, 3 vezes). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a 4°C . Os sobrenadantes obtidos foram utilizados no ensaio para quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO).

Para a dosagem de MPO, todo o manuseio e realização do ensaio foi realizado sob baixas temperaturas e ausência de luz. Numa placa de 96 poços, 50 μL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados em cada poço, em triplicatas. Ao teste foram incluídas ainda as amostras dos controles negativo (não tratado) e positivo (dexametasona). Em seguida, uma mistura 1:1 (v:v) dos reagentes A (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - TMB a 1,6 mM) e B (H_2O_2 a 0,5 mM) do kit BD OptEIA™ foi previamente preparada. Então, 50 μL desta mistura foram adicionados em cada poço, contendo as amostras já plaqueadas. Após 10 min de incubação, 50 μL de solução aquosa de ácido sulfúrico foram adicionados em cada poço para interrupção da reação enzimática ali ocorrente. Após outros 10 min de incubação, a leitura de absorbância das soluções resultantes foi realizada em 450 nm. Os valores de absorbância obtidos a partir dos grupos de amostras foram analisados por ANOVA *one-way* seguido por teste de comparações múltiplas de Dunnett.

O ensaio colorimétrico descrito para dosagem de MPO é possível devido à oxidação do TMB por H_2O_2 . O TMB, inicialmente incolor, sofre oxidação pelo H_2O_2 , tornando-se seu derivado di-imínico de coloração azul (vide equação simplificada da reação da figura 8 a seguir). Esta reação é catalisada pelas enzimas MPO contidas nas amostras testadas. Desta forma, quanto maior a quantidade de MPO maior quantidade de TMB será oxidada num intervalo de tempo e, portanto maior a mudança de coloração haverá no meio. Por fim, a

solução de ácido sulfúrico é adicionada para interrupção da reação, o que torna a coloração da solução amarela (LI *et al.*, 2009).

Figura 8 - Figura esquemática simplificada da reação de oxidação TMB catalisada pela enzima MPO.



FONTE: Adaptado de Li *et al.* (2009).

3.19 PROCESSAMENTO E PREPARO DE AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA PARA ANÁLISE EM LC-UV-DAD E LC-MS/MS

Os passos iniciais de preparo de amostras de fragmentos de orelha para quantificação de eicosanoides por LC-MS/MS foram inicialmente apresentados na seção 3.18 anterior e são descritos de forma sucinta a seguir.

O fragmento de orelha de cada replicata do ensaio *in vivo* foi triturado em 400 μ L do tampão pH 4,7, com o auxílio de um homogeneizador tipo Túrrax a 13000 rpm por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi liofilizado por 8 horas aproximadamente, ou até completa secagem. As amostras secas foram então ressuspensas em 100 μ L de solução de CAP (padrão interno - PI) a 25 ng/mL em acetonitrila e levadas em banho ultrassônico por 2 minutos, para solubilização dos eicosanoides envolvidos na inflamação, posteriormente analisados por LC-MS/MS) e precipitação de proteínas, sendo então centrifugada novamente por 10 minutos, desta vez a 10000 rpm para recuperação do sobrenadante sem as proteínas. O sobrenadante obtido foi armazenado em ausência de luz e baixas temperaturas (*freezer* ou gelo) até o exato momento da injeção em LC-UV-DAD ou LC-MS/MS.

3.20 ANÁLISE DE PGE₂ EM FRAGMENTOS DE ORELHA POR LC-UV-DAD

A determinação do método de extração e quantificação de biomarcadores da inflamação (como PGE₂ e LTB₄) em fragmentos de orelha teve como intuito avaliar a inibição da via da COX e/ou LOX por diferentes amostras, advindos do teste biológico *in vivo* de edema de orelha, como descrito no trabalho de Santos *et al.* (2019). Em suma, o ensaio de

edema de orelha *in vivo* (descrito na seção 3.17) consiste na avaliação da atividade antiedematogênica que permite inferir indiretamente numa possível inibição na via das COX na inflamação uma vez que seus metabólitos, as prostaglandinas (PGE₂ principalmente), estão relacionadas com a formação do edema. Vale a pena ressaltar que este ensaio não é específico para avaliação da inibição de COX, uma vez que a formação do edema tem contribuição de diversos outros agentes inflamatórios, inclusive leucotrienos (PARENTE, 2001).

Já para a avaliação da inibição da via das LOX, nessas mesmas amostras, é necessário o uso de kits específicos, que após o processamento do material biológico (fragmentos de orelha) permitem quantificar alguns biomarcadores ali presentes, como o LTB₄. O alto custo desses kits além da demora na importação torna inviável muitas das vezes a avaliação da inibição da via das LOX. É importante destacar que a relação entre a atividade de MPO em amostras biológicas, propostas em alguns trabalhos na literatura e no ensaio descrito anteriormente (seção 3.18), é uma medida indireta da quantidade de LTB₄; este ensaio avalia de modo geral o potencial anti-inflamatório pela inibição do recrutamento de neutrófilos (principais células do sistema imune contendo MPO) (AFONSO *et al.*, 2012). Isto porque apesar dos neutrófilos serem recrutados ao local da inflamação principalmente pelo LTB₄, eles têm sua quimiotaxia determinada também por outros mediadores da inflamação como citocinas, quimiocinas e mediadores químicos (HAVIXBECK *et al.*, 2016). Deste modo, o desenvolvimento de um método de extração e quantificação de PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de orelha utilizando-se equipamentos já disponíveis como cromatógrafo líquido de alta eficiência e espectrômetro de massas permite avaliar a inibição de ambas as vias COX e LOX ou ainda da PLA₂ nos ensaios *in vivo*, de modo mais rápido e eficaz, uma vez que essa aparelhagem pode apresentar alta sensibilidade e seletividade, dependendo do detector o qual se utiliza.

Neste sentido, para desenvolvimento do método de extração foram realizadas análises de padrão de PGE₂ diluída em acetonitrila. O método cromatográfico foi desenvolvido e baseado em estudo anterior da literatura, sendo necessárias algumas modificações (EBERHARD *et al.*, 2000). Foi utilizado um cromatógrafo analítico modelo Shimadzu[®] UFLC Prominence, com controlador CBM-20A detector UV-DAD SPD-MD20A, forno para coluna CTO-20A, injetor SIL-20AHT, bomba LC-20AD, degaseificador DGU-20A3 e coletor FRC-10A. O método cromatográfico foi isocrático onde se utilizou a fase móvel constituída em água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido acético (60%) (A) e acetonitrila (40%) (B)

em coluna de fase reversa C₁₈ da Shimadzu[®] Shim-pack VP-ODS (150 x 4,6mm x 5µm), em fluxo total de 1,2 mL/min, com volumes de injeção em todas as análises de 20 µL.

3.21 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂ e LTB₄ POR LC-MS/MS EM AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA

O método para quantificação de PGE₂ e LTB₄ nas amostras de fragmentos de orelha advindas do ensaio *in vivo* foi desenvolvido e validado no mesmo equipamento LC-MS/MS utilizado do método de quantificação de PGE₂ no plasma (descrito na seção 3.15 anterior). Entretanto, por se tratar de um tipo diferente de amostra bem como mais de uma substância a serem quantificadas, as condições de separação cromatográfica e de detecção, no espectrômetro de massas, foram diferentes e são descritas na sequência.

Para otimização dos métodos SRM de cada analito foram utilizadas as soluções padrão de PGE₂, LTB₄ em acetonitrila a 1 ppm. O volume de injeção em todas as análises seja para as substâncias puras, mistura delas ou das amostras de fragmentos de orelhas processadas foi de 20 µL. As análises cromatográficas foram realizadas com o forno da coluna a 33 °C, com fluxo total de fase móvel de 0,3 mL/min. A separação cromatográfica foi feita em coluna ultra-analítica de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 da Agilent, com 3 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento e partículas de 2,7 µm. Para injeções diretas (sem uso de coluna cromatográfica) para otimização dos métodos SRM utilizou-se um tubo restritor de 110 cm e 0,2 mm de diâmetro interno.

A fase móvel utilizada foi binária onde o solvente orgânico utilizado foi acetonitrila (linha B) e solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % na linha A. O método cromatográfico foi gradiente: iniciou-se com 60% de acetonitrila (ACN), indo a 90% em 4,5 min e depois indo de 90 a 100% por 1 min, mantendo-se em 100% por mais 1 min. Após isso, a coluna era recondicionada para a próxima análise indo de 100 a 60% de ACN em 1 min e mantendo-se nessa proporção por mais 2,5 min, totalizando 10 minutos, num fluxo total de 0,3 mL/min.

A detecção de PGE₂, LTB₄ e PI no espectrômetro de massas foi por SRM no modo de ionização negativo onde os íons precursores são formados principalmente da desprotonação das moléculas dos analitos [M-H]⁻ (MESAROS, LEE, BLAIR, 2009). Gás nitrogênio foi utilizado como gás secante (a 450 °C e 15 L/min) e nebulizador (a 2 L/min). As transições de razão massa-carga (*m/z*) monitorados pelo método SRM foram otimizados a fim de se aumentar a sensibilidade na detecção destes compostos.

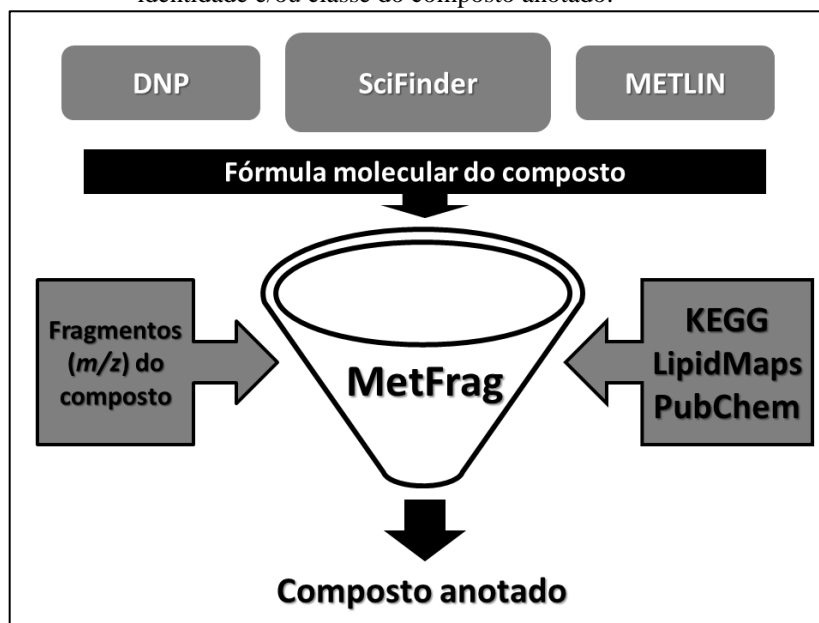
Para desenvolvimento e validação de método para quantificação de PGE₂ e LTB₄ nas amostras de fragmento de orelha foi utilizado o método de padronização interna (assim como no método utilizado para as amostras de plasma anteriormente descrito), onde além de soluções padrões em diferentes concentrações da(s) substância(s) de interesse(s), utiliza-se também solução a uma concentração constante de um padrão interno. O método de padronização interna é extremamente útil uma vez que permite desconsiderar pequenas variações como temperatura de coluna, quantidade de amostra injetada, ionização e detecção no espectrômetro de massas, entre outras (CASSIANO *et al.*, 2009).

3.22 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS ATIVOS NO ENSAIO *EX VIVO* E ANOTAÇÃO DOS BIOMARCADORES OBTIDOS PELOS ESTUDOS METABOLÔMICOS

Os dados obtidos pelas análises por UPLC-ESI-QTOF-MS² dos extratos vegetais de espécies ativas no ensaio *ex vivo* no sangue foram processados no software Masslynx 4.1 (Waters) para detecção, deconvolução e correção do tempo de retenção (RT) e *m/z* dos picos, bem como eliminação de isótopos e de ruídos. Assim, cada pico foi relacionado com um RT e *m/z* característicos, os quais foram usados para comparação do perfil metabólico entre os extratos analisados.

A anotação dos compostos majoritários dos extratos ativos nos ensaios *ex vivo* e *in vivo*, ou dos biomarcadores apontados pelos estudos metabolômicos, foi feita inicialmente comparando-se *m/z* dos íons precursores com os de bases de dados abrangentes como *Dictionary of Natural Products*[®] (DNP), METLIN (GUIJAS *et al.*, 2018) e SciFinder. Após isso, foi feita também a comparação dos padrões de fragmentação *in silico* por meio da ferramenta online MetFrag Web (RUTTKIES *et al.*, 2016) em conjunto com outras bases de dados como PubChem, LipidMaps e KEGG, comparando-se os íons produtos experimentais com os das bases de dados. A figura 9 a seguir resume os passos adotados na anotação dos compostos.

Figura 9 - Figura esquemática das etapas de anotação dos compostos por meio da ferramenta MetFrag. Primeiro passo consistiu em se obter possíveis fórmulas moleculares do composto a ser anotado pelas bases de dados DNP, SciFinder e METLIN. Em seguida, a comparação das possíveis fórmulas e o padrão de fragmentação experimental obtido com os de compostos contidos nas bases de dados KEGG, LipidMaps e PubChem permitiu selecionar a identidade e/ou classe do composto anotado.



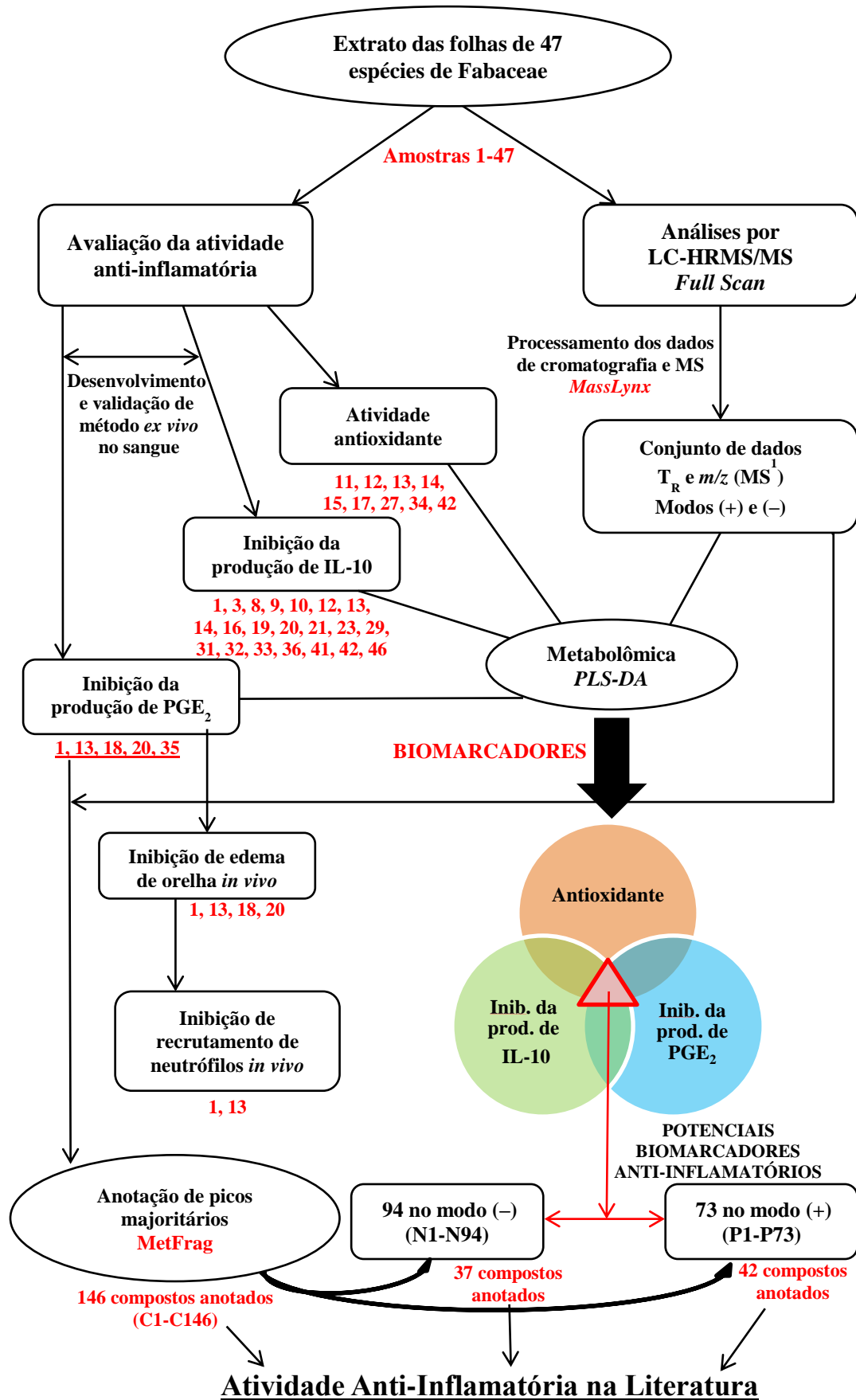
FONTE: Do autor.

Wolfender e colaboradores (2015) reportaram bons resultados para anotação de picos com até 15 ppm de diferença entre a massa dos sinais no espectro de massa do composto detectado e a fórmula molecular sugerida para o mesmo. Deste modo, o erro máximo permitido na comparação entre os valores de m/z experimentais e das bases de dados para este trabalho foi de 10 ppm e os compostos foram anotados considerando os adutos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ no modo positivo e $[M-H]^-$ no modo negativo.

3.23 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os cálculos de validação e quantificação de PGE₂, LTB₄, IL-10, porcentagem de inibição de DPPH e do edema de orelha foram realizados no software Microsoft Excel (Microsoft® Office® 2010, Microsoft Corporation, WA, USA) e os resultados de ANOVA *one-way* seguida pelo teste comparativo de Dunnett foi feito no programa GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software, CA, USA). As análises estatísticas multivariadas por PCA e PLS-DA, foram realizadas nos softwares Markerlynx™ e EZInfo da Waters®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO



O fluxograma apresentado anteriormente resume de forma geral os resultados obtidos neste trabalho. A descrição e discussão detalhada destes resultados são dadas nas subseções a seguir.

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E EXTRATOS

Foram obtidos os extratos brutos das folhas de 47 espécies diferentes de plantas da família Fabaceae, obtidos de acordo com a disponibilidade das espécies na região considerando a presença ou não de estudos prévios da atividade anti-inflamatória das mesmas. Neste sentido, foram inclusas no conjunto de espécies coletadas, aquelas inéditas e não inéditas quanto a este potencial farmacológico. Na tabela 1 são relacionados cada uma delas com os respectivos números das exsiccatas e seus códigos identificadores, bem como o valor do rendimento de extração e a massa vegetal utilizada. Amostras foram listadas na tabela 1 em ordem alfabética. Entretanto, duas espécies, tiveram os nomes substituídos por seus respectivos homônimos atualizados, mantendo-se assim sua ordem na tabela de acordo com seus basônimos. São elas: **(12)** (*Caesalpinia ferrea* substituído por *Libidibia ferrea*) e **(13)** (*Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* substituído por *Poincianella pluviosa* var. *peltophoroides*)

Tabela 1 - Lista de espécies vegetais coletadas com seus respectivos códigos, N° exsiccatas, massa vegetal e rendimento de extração (continua).

Código ID	Espécie / nome popular	N° Exsicata	Massa Vegetal (g)	% Rendimento de Extração
1	<i>Acacia polyphylla</i> DC. (juqueri-guaçu)	3050	38,63	10,09
2	<i>Albizia lebbbeck</i> (L.) Benth. (língua-de-sogra)	3056	4,41	22,47
3	<i>Albizia polycephala</i> (Benth.) Killip ex Record (angico-branco)	2721	21,38	11,64
4	<i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) J.F.Macbr. (garapa)	2640	1,12	7,83
5	<i>Arachis hypogaea</i> L. (amendoim)	3063	0,348	23,60
6	<i>Bauhinia galpinii</i> N.E.Br. (unha-de-vaca-vermelha)	3054	0,54	19,60
7	<i>Bauhinia longifolia</i> (Bong.) Steud. (pata-de-vaca-do-campo)	2831	26,00	9,93
8	<i>Bauhinia purpurea</i> L. (pata-de-vaca-roxa)	2973	4,77	18,76
9	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud. (pata-de-vaca)	3066	2,05	15,72
10	<i>Bauhinia variegata</i> L. (pata-de-vaca-branca)	3049	4,41	20,44
11	<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (pau-brasil)	3051	4,96	9,81
12	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (pau-ferro)	3061	4,72	21,28
13	<i>Poincianella pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> (Benth.) L.P. Queiroz (sibipiruna)	3067	4,50	20,33
14	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw. (flamboianzinho)	3065	4,45	29,56
15	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (copaíba)	2755	55,22	32,40
16	<i>Dalbergia villosa</i> (Benth.) Benth. (canafístula-brava)	2729	36,94	8,17

Tabela 2 - Lista de espécies vegetais coletadas com seus respectivos códigos, N° exsicatas, massa vegetal e rendimento de extração (conclusão).

Código ID	Espécie / nome popular	N° Exsicata	Massa Vegetal (g)	% Rendimento de Extração
17	<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf. (flamboião)	3047	4,49	28,06
18	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong (tamboril)	144	0,70	12,06
19	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. (soja)	3055	2,87	28,77
20	<i>Holocalyx balansae</i> Micheli (alecrim)	767	0,59	12,47
21	<i>Hymenaea courbaril</i> L. (jatobá)	2724	48,19	10,47
22	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	964	0,38	10,32
23	<i>Inga edulis</i> Mart. (ingá-cipó)	1592	0,74	8,19
24	<i>Inga semialata</i> (Vell.) Mart.	2604	0,39	27,95
25	<i>Inga vera</i> Willd. (ingá-pequeno)	2754	20,03	13,03
26	<i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet (feijão-mangalô)	3060	4,16	13,71
27	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit (leucena)	3058	5,06	28,92
28	<i>Machaerium aculeatum</i> Raddi (pau-de-angu)	1094	0,46	10,45
29	<i>Machaerium dimorphandrum</i> Hoehne	2725	47,50	9,89
30	<i>Machaerium isadelphum</i> (E.Mey.) Standl.	2722	17,71	9,49
31	<i>Machaerium nyctitans</i> (Vell.) Benth. (bico-de-pato)	2728	18,11	9,06
32	<i>Machaerium stipitatum</i> (DC.) Vogel (sapuva)	2731	41,71	6,17
33	<i>Machaerium villosum</i> Vogel (jacarandá-paulista)	2730	42,16	7,60
34	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth. (sansão-do-campo)	3062	4,77	25,92
35	<i>Peltophorum dubium</i> (Spreng.) Taub. (canafístula)	2152	2,42	19,66
36	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (feijão)	3064	2,97	36,06
37	<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F.Macbr. (pau-jacaré)	2727	34,26	8,65
38	<i>Platycomus regnellii</i> Benth. (pau-pereira)	2753	21,57	14,37
39	<i>Platycomium elegans</i> Vogel (amendoim-bravo)	3057	23,45	19,87
40	<i>Pogonophora schomburgkiana</i> Miers ex Benth. (cocão)	840	0,17	9,65
41	<i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby (pau-fava)	3048	8,68	17,49
42	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (barbatimão)	2726	41,51	19,00
43	<i>Sweetia fruticosa</i> Spreng. (sucupira-amarela)	2723	26,30	17,50
44	<i>Tachigali rugosa</i> (Mart. ex Benth.) Zarucchi & Pipoly (jataíba)	2692	0,99	4,17
45	<i>Tamarindus indica</i> L. (tamarindo)	3053	4,90	16,94
46	<i>Vicia faba</i> L. (fava)	3077	0,72	28,76
47	<i>Zollernia ilicifolia</i> (Brongn.) Vogel (fura-olho)	162	1,40	10,89

FONTE: Do autor.

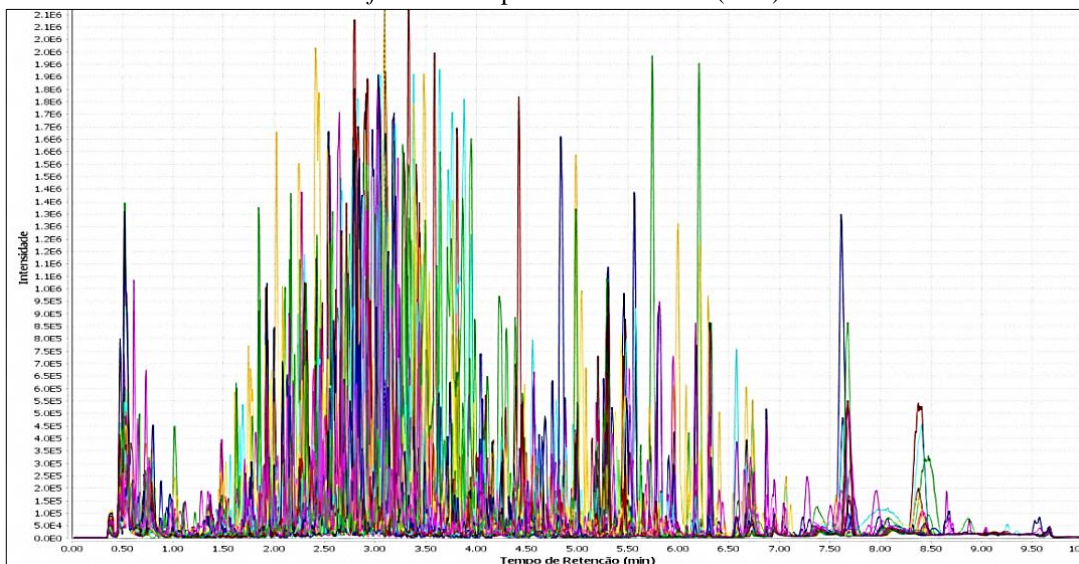
É possível se observar que o método de extração utilizado é bastante eficaz, e permitiu a obtenção de valores de rendimento relativamente bons, que variaram entre 4,17 e 36,06 %, considerando-se amostras complexas como as de extratos brutos. Apesar da maior quantidade de solvente utilizada (50 vezes o valor da massa vegetal), esta forneceu rendimentos

consideráveis, o que foi relevante ao estudo levando-se em consideração que a quantidade de material vegetal obtido para algumas espécies era pequena.

4.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS VEGETAIS POR UPLC-ESI-QTOF-MS²

As amostras de extratos das espécies de plantas obtidos como descrito na seção 3.5 foram submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução para obtenção dos perfis cromatográficos de cada um deles. A figura 10 a seguir apresenta os cromatogramas sobrepostos no modo negativo de todas as amostras, os quais se permite observar a grande variedade de compostos químicos entre as diferentes espécies, evidenciada pela grande quantidade de picos, além de um grande número de substâncias com mesmo tempo de retenção, indicando também a presença de compostos em comum entre as amostras, fato este confirmado pelos valores de m/z do sinal base (pico base) de seus espectros de massas. Além disso, é possível perceber que o método cromatográfico utilizado é bastante eficaz na separação dos diferentes compostos presentes nas amostras, como demonstrado nos cromatogramas, com substâncias de alta a baixa polaridade, de acordo com os diferentes tempos de retenção em que se apresentam.

Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos, obtidos por análise em UPLC-ESI-QTOF-MS² no modo negativo, de todas as amostras de extratos das espécies de Fabaceae coletadas, detectados no modo *full scan* no primeiro analisador (MS¹).



FONTE: Do autor.

Uma amostra branco consistindo somente de solvente (água), utilizado na solubilização das amostras de extrato bruto, também foi inclusa e submetida a todos os passos de preparo de amostra bem como às análises por UPLC-ESI-QTOF-MS² (cromatograma não

incluso na figura 10 anterior). Em seguida, todos os dados de UPLC-ESI-QTOF-MS² foram processados de acordo com seu modo de ionização separadamente, positivo ou negativo, no software Masslynx™ a fim de se obter uma tabela de dados representativa da composição química das amostras analisadas.

4.3 PROCESSAMENTO DE DADOS DE UPLC-ESI-QTOF-MS² PARA ESTUDO METABOLÔMICO

Sabe-se que um mesmo composto contido em diferentes amostras analisadas por UPLC-ESI-QTOF-MS² pode sofrer pequenos desvios em seus valores de T_R e m/z no cromatograma. Sendo assim, o processamento de dados é uma etapa importante, pois por meio deste os picos serão detectados, deconvoluídos, alinhados entre as amostras, sendo organizados numa tabela final de dados de acordo com sua presença ou ausência em cada extrato (indicados pelos valores das áreas dos picos). Os dados de UPLC-ESI-QTOF-MS² foram processados de forma a se obter uma tabela relacionando os diferentes picos cromatográficos detectados em MS¹ e caracterizados individualmente por valores específicos de T_R e m/z com sua presença e intensidade (área) em cada amostra de extrato. Assim, o conjunto de dados final obtido com o processamento dos dados cromatográficos e de espectrometria de massas representa a composição química do grupo de amostras em estudo após a otimização do processamento, que foi realizado variando-se os valores dos parâmetros de processamento de dados apresentados na tabela 2 a seguir com base em estudos prévios da literatura (PETERS, VELZEN, JANSEN, 2009). É possível observar que os dados obtidos no modo positivo resultam numa quantidade menor de compostos detectados comparados com os mesmos dados obtidos no modo negativo.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados no processamento final dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS² das amostras para os modos negativo e positivo.

Parâmetros	Modo Negativo	Modo Positivo
<i>Function</i>	1	1
<i>Analysis Type</i>	Peak Detection	Peak Detection
<i>Initial Retention Time (min)</i>	0,34	0,34
<i>Final Retention Time (min)</i>	9,7	9,7
<i>Low Mass (Da)</i>	100	100
<i>High Mass (Da)</i>	1000	900
<i>XIC Window (Da)</i>	0,05	0,05
<i>Relative Retention Time</i>	No	No
<i>Peak Width at 5% Height (sec)</i>	1,00	1,00
<i>Peak-to-Peak Baseline Noise</i>	0,00	0,00
<i>Smoothing</i>	No	No
<i>Intensity Threshold</i>	25000	25000
<i>Mass Window</i>	0,05	0,05
<i>Retention Time Window (min)</i>	0,3	0,3
<i>Noise Elimination Level</i>	6	6
<i>Deisotope Data</i>	Yes	Yes
Nº total de picos	5511	3460

FONTE: Do autor.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS AMOSTRAS DE FABACEAE

As amostras de extratos das espécies de Fabaceae apresentadas na tabela 1 foram submetidas a ensaios para avaliação de sua ação contra os processos inflamatórios. Para isso, os ensaios a que estas amostras foram submetidas compreenderam testes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, o que permitiu obter informação sobre o potencial anti-inflamatório destas sob diferentes mecanismos de ação. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

4.4.1 Avaliação da atividade sequestrante de radicais DPPH e atividade antioxidante *in vitro*

O teste *in vitro* de avaliação de atividade sequestrante de radicais DPPH (descrito na seção 3.7) consiste de um ensaio que permite associar à atividade antioxidante das amostras testadas. Isso se deve ao fato de que no teste, os compostos com potencial de atividade sequestrante das amostras reagem com o radical DPPH, que mimetiza os radicais livres presentes no organismo e produzidos, por exemplo, nos processos inflamatórios. Sabe-se que na inflamação há a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) que consistem de espécies radicalares que podem reagir prontamente com os lipídios de membrana das células causando morte e destruição das mesmas ou agindo ainda como agentes quimiotáticos,

recrutando outros componentes do sistema imune para o local da inflamação. As ERO's podem causar ainda danos ao DNA no interior das células, causando conseqüentemente alterações genéticas a elas, que por sua vez podem gerar mutações, caracterizando assim o surgimento do câncer (SOUSA *et al.*, 2007). Além disso, os radicais livres também podem contribuir para o desenvolvimento de outras doenças como as cardiovasculares, Alzheimer e Parkinson (ZARIN *et al.*, 2016).

Deste modo, a avaliação da atividade antioxidante das amostras de extratos de espécies da família Fabaceae poderia servir como uma triagem prévia em um mecanismo de ação bastante específico do processo inflamatório. Vale a pena ressaltar que, em geral, embora os processos de avaliação de atividade *in vitro* permitam a análise de grande quantidade de amostras (triagem) ainda que em mecanismos de ação específicos em certa abordagem biológica (SHI *et al.*, 2019), como na inflamação, eles ainda são úteis, pois se evita o uso indiscriminado de animais (nos testes *in vivo*), além de consistir de ensaios mais simples e rápidos. Entretanto, uma vez que eles permitem a análise de mecanismos de ação bastante específicos, faz-se necessária a avaliação ou triagem dessas mesmas amostras em ensaios adicionais que abordem diferentes mecanismos de ação, para que assim se possa prosseguir com os ensaios *in vivo* de forma segura e ética. Tem-se que ainda que uma amostra possa se mostrar ativa num ensaio *in vitro*, isso não significa que ela vá necessariamente apresentar os mesmos resultados de atividade em modelos *in vivo* (BUTTERWECK, NAHRSTEDT, 2012).

O ensaio antioxidante foi realizado para todas as 47 amostras de extratos de diferentes espécies de plantas, listadas na tabela 1. Como controle positivo, foi utilizado o ácido ascórbico, composto já bem descrito na literatura como um composto natural de alto potencial antioxidante, e de grande importância principalmente por participar no processo de reciclagem da vitamina E nas reações de peroxidação de lipoproteínas e lipídios de membranas, além de outras funções fisiológicas (SOUSA *et al.*, 2007). Os valores de CI_{50} foram obtidos em triplicatas para cada uma das amostras e foram consideradas inativas antes mesmo de qualquer cálculo estatístico, todas aquelas com valores de média de CI_{50} superiores a 500 $\mu\text{g/mL}$ (BUTTERWECK, NAHRSTEDT, 2012), um critério fundamental para comparação e diferenciação por ANOVA *one-way* e por teste de Dunnett ($p < 0,05$), o que permitiu eliminar muitas amostras com baixa ou nenhuma atividade antioxidante as quais os resultados poderiam interferir no teste de comparação entre elas.

Os resultados da média e desvio padrão (DP) dos valores de CI_{50} obtidos em triplicatas para cada amostra são mostrados na tabela 3 a seguir. É possível observar que dentre as 47 amostras de extratos testadas no ensaio de atividade sequestrante de DPPH, 20 delas apresentaram valores de CI_{50} inferiores a 500 $\mu\text{g/mL}$. Considerando-se que a média do CI_{50} do padrão positivo utilizado no teste, ácido ascórbico, foi de 41,6 $\mu\text{g/mL}$, o valor limitante para amostras inativas como sendo aquelas com CI_{50} superiores a 500 $\mu\text{g/mL}$, leva em consideração valores de concentração de CI_{50} pouco maior que 10 vezes da média do padrão utilizado. Neste sentido, somente aquelas com $CI_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ foram comparadas pelo teste ANOVA *one-way* seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). O gráfico comparativo a seguir (figura 11) mostra somente as amostras analisadas pelo teste estatístico e não incluíram aquelas com CI_{50} acima de 500 $\mu\text{g/mL}$.

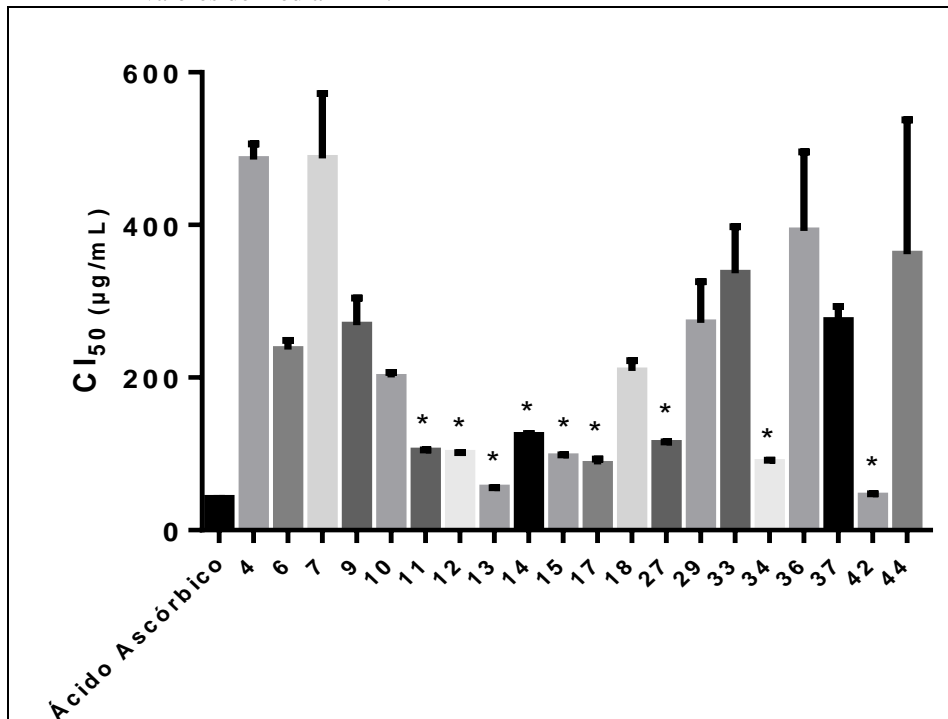
Tabela 4 - Valores de CI_{50} para o teste antioxidante avaliado pela capacidade sequestrante de radicais DPPH para cada um dos extratos testados ou padrão ácido ascórbico (média \pm DP, $n = 3$).

Código da Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Código da Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	> 500	25	> 500
2	> 500	26	> 500
3	> 500	27	113,7 \pm 2,3
4	485,9 \pm 20,5	28	> 500
5	> 500	29	271,9 \pm 53,9
6	236,8 \pm 12,0	30	> 500
7	487,3 \pm 85,1	31	> 500
8	> 500	32	> 500
9	268,9 \pm 35,5	33	336,9 \pm 60,7
10	200,5 \pm 6,5	34	88,8 \pm 3,0
11	104,0 \pm 1,2	35	> 500
12	100,9 \pm 0,9	36	392,3 \pm 103,3
13	55,4 \pm 0,5	37	274,6 \pm 18,6
14	124,2 \pm 2,5	38	> 500
15	96,3 \pm 2,2	39	> 500
16	> 500	40	> 500
17	86,2 \pm 6,9	41	> 500
18	208,6 \pm 13,6	42	44,6 \pm 3,0
19	> 500	43	> 500
20	> 500	44	361,8 \pm 175,9
21	> 500	45	> 500
22	> 500	46	> 500
23	> 500	47	> 500
24	> 500	Ácido Ascórbico	41,6 \pm 0,3

FONTE: Do autor.

É possível observar pelo gráfico da figura 11 que dentre as amostras com CI_{50} inferiores a 500 $\mu\text{g/mL}$ avaliadas por ANOVA *one-way* seguidas do teste comparativo de Dunnett ($p < 0,05$), nove delas apresentaram potencial de atividade sequestrante de DPPH sem diferenças estatísticas com o ácido ascórbico, permitindo inferir acerca do considerável potencial antioxidante delas. Os extratos das folhas das espécies de plantas em estudo neste trabalho determinadas como ativas quanto ao potencial antioxidante pelo ensaio *in vitro* são: *C. echinata* (11), *L. ferrea* (12), *P. pluviosa* (13), *C. pulcherrima* (14), *C. langsdorffii* (15), *D. regia* (17), *L. leucocephala* (27), *M. caesalpiniifolia* (34) e *S. adstringens* (42).

Figura 11 - Comparação da atividade antioxidante dos extratos de espécies com valores de CI_{50} (em $\mu\text{g/mL}$) inferiores a 500 $\mu\text{g/mL}$. O teste foi realizado em triplicatas ($n = 3$) e os grupos foram comparados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação de Dunnett. O gráfico apresenta os valores de média \pm DP.



FONTE: Do autor.

Legenda: *Amostras sem diferenças estatísticas quando comparadas ao padrão ácido ascórbico, analisadas por ANOVA *one-way* e teste de Dunnett com $p < 0,0001$.

Estas espécies já foram relatadas na literatura não somente quanto ao potencial antioxidante como também anti-inflamatório por algum mecanismo de ação específico (ARAÚJO *et al.*, 2014; DOMINGOS *et al.*, 2019; DZOYEM, ELOFF, 2015; GOMES *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 1998; RAJARAM *et al.*, 2015; SHEWALE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2009; SILVA, 2016). Nesta perspectiva, o estudo destas espécies pode ser de grande importância na busca por novos agentes anti-inflamatórios. A atividade antioxidante de

amostras de extratos de plantas pode estar relacionada principalmente à presença de compostos fenólicos como cumarinas, flavonoides, lignanas e ligninas, derivados do ácido benzoico e taninos, além de diversas outras classes de compostos de produtos naturais, que apresentam tal propriedade devido às suas estruturas químicas e potencial redutor (SOUSA *et al.*, 2007).

4.4.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório de amostras de extrato vegetal pela inibição da produção de IL-10

4.4.2.1 Determinação do método para avaliação de produção de IL-10 no ensaio *ex vivo* em sangue humano

A citocina IL-10 compreende uma proteína produzida por diversas células do sistema imune como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos, sob condições inflamatórias e que está envolvida na comunicação intercelular (OUYANG *et al.*, 2011). É uma citocina bem descrita na literatura e associada a efeitos anti-inflamatórios por inibir a resposta das células diversas do sistema imune bem como a produção de vários mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, quimiocinas, PGE₂, entre outros (LEVITZ *et al.*, 1996; LINDMARK *et al.*, 1998; OUYANG *et al.*, 2011; PERANTEAU *et al.*, 2008; SCHNEIDER, SCHWACHA, CHAUDRY, 2004; TONINI, 2009). Desta forma, a avaliação dos níveis de IL-10 produzidos no sangue humano após certo período de incubação, sob estímulos inflamatórios e na presença de certas amostras como tratamento, permite comparar os resultados destas com amostras controles (negativo e positivo) a fim de se compreender os efeitos anti-inflamatórios delas.

Desta forma, um teste inicial foi realizado variando-se alguns fatores que poderiam influenciar acentuadamente na produção da citocina IL-10: utilização de dois indutores inflamatórios distintos (PHA e LPS); uso de sangue ou células isoladas deste na incubação com as amostras junto com o indutor da inflamação; e período de incubação do sangue de 12 e 24 h. Todos estes parâmetros testados foram baseados em diferentes trabalhos descritos na literatura (CROUVEZIER *et al.*, 2001; DE GROOTE *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013; SWENNEN, BAST, DAGNELIE, 2005; VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2012) e foram importantes para determinação das melhores condições que forneceriam melhor responsividade na produção de IL-10 no ensaio *ex vivo* no sangue para comparação entre as amostras de extratos em estudo.

Todos os passos à realização desta etapa nos experimentos, principalmente com o sangue, foram minuciosamente reproduzidos com o máximo de cautela, atentando-se a todos os efeitos interferentes possíveis na resposta inflamatória no sangue. Assim, além dos cuidados acerca dos doadores apresentados na seção 3.8, e dos parâmetros a serem comparados, outros fatores também foram controlados, uma vez que fatores genéticos, a tipagem sanguínea, a alimentação, condições fisio e/ou patológicas do doador, manuseio das amostras de sangue, entre outros, podem influenciar na resposta do sangue em relação aos estímulos inflamatórios (KEUSTERMANS *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2009; VAN DER LINDEN *et al.*, 1998). Neste sentido:

- a) as amostras de sangue dos doadores foram coletadas aproximadamente nos mesmos horários do dia (pela manhã) e utilizados no ensaio imediatamente após a coleta, uma vez que o atraso na incubação do sangue poderia causar uma redução na produção de mediadores da inflamação (VAN DER LINDEN *et al.*, 1998);
- b) o sangue de diferentes doadores não foram misturados para evitar coagulação devido às suas diferentes tipagens e/ou condições genéticas que poderiam influenciar nas diferenças na resposta inflamatória (ESKDALE *et al.*, 1998), e por isso para cada teste, o sangue de um único doador foi utilizado;
- c) manuseio do sangue coletado e heparinizado foi feito com o mínimo de agitação a fim de se evitar o estímulo inflamatório possivelmente ocorrente sob estas condições (BEER, 2013);
- d) a incubação e estimulação do sangue com amostras e indutor da inflamação foram realizados em períodos curtos após a coleta, a fim de se maximizar a resposta inflamatória (VAN DER LINDEN *et al.*, 1998). Todos os cuidados aqui descritos também foram tomados na realização do ensaio de avaliação da produção de PGE₂, descrito na seção 3.12.

O teste inicial incluiu amostras branco (sem indutor da inflamação nem qualquer tratamento) para comparação dos níveis basais de IL-10 produzidos entre os diferentes grupos de amostras, em duplicatas. A figura 12 a seguir apresenta os resultados obtidos que permitem comparar os níveis de IL-10 produzidos no sangue entre: os dois indutores testados num mesmo tempo de incubação, a incubação no sangue total ou células isoladas num mesmo tempo de incubação e ainda os dois tempos de incubação no sangue utilizando-se um mesmo indutor inflamatório, de acordo com os gráficos de 12A a 12F.

Comparando-se os testes realizados no sangue total (gráficos da figura 12A-D) é possível observar que em todos os casos estudados o sangue induzido à inflamação, seja por LPS ou PHA, apresentou níveis de IL-10 superiores aos níveis basais, do sangue não induzido (amostras branco de sangue – sem indutores de inflamação). Este resultado corrobora com os diversos trabalhos já descritos os quais relatam um aumento nos níveis de IL-10 sob estímulos inflamatórios (ESKDALE *et al.*, 1998; LEVITZ *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2009). O mesmo fato pôde ser observado para o ensaio realizado com PBMC, também para ambos os indutores, embora os níveis de IL-10 não tenham sido apresentados para a amostra branco neste caso (células sem indução à inflamação) por apresentarem níveis basais da citocina abaixo do limite de detecção no ensaio de ELISA. O aumento dos níveis de IL-10 sob condições inflamatórias tem sido relacionado com a ativação de células do sistema imune. Entretanto esta ativação pode ocorrer de modo diferente para cada indutor, o que justifica os diferentes níveis da citocina produzidos.

Comparando-se o estímulo inflamatório por PHA e LPS com incubação de 12 h no sangue total, observa-se que as quantidades médias de IL-10 produzidas são aproximadamente equivalentes (gráfico A e C, figura 12). Entretanto, é possível observar que após 24 h de incubação, a quantidade média de IL-10 no sangue induzido por LPS é quase o dobro da produzida no sangue quando se utiliza PHA (gráficos B e D, figura 12). Isto também pôde ser observado com as células isoladas do sangue (PBMC), porém não tão acentuadamente, onde os níveis de IL-10 também foram sutilmente superiores para células estimuladas com LPS do que quando com PHA (figura 12, gráfico E e F). Este resultado demonstra que o LPS representa um melhor estimulante inflamatório no ensaio *ex vivo* proposto, por apresentar uma responsividade maior na produção de IL-10 no sangue. O PHA consiste de uma aglutinina presente no feijão e que pode causar principalmente a aglutinação de eritrócitos e leucócitos. Desta forma, seja na incubação do sangue ou das células isoladas deste, o PHA age não somente como mitógeno, levando ao estímulo inflamatório, mas também à aglutinação delas. Por outro lado, LPS não apresenta efeito aglutinador sendo estimulante inflamatório principalmente de monócitos e macrófagos, devido à presença de receptores deste mitógeno nestas células (MAYRINGER, REINDL, BERGER, 2000). Estes dados explicam a diferença na produção de IL-10 pelas células sanguíneas, no sangue bruto ou isoladas, quando estimuladas por PHA ou LPS.

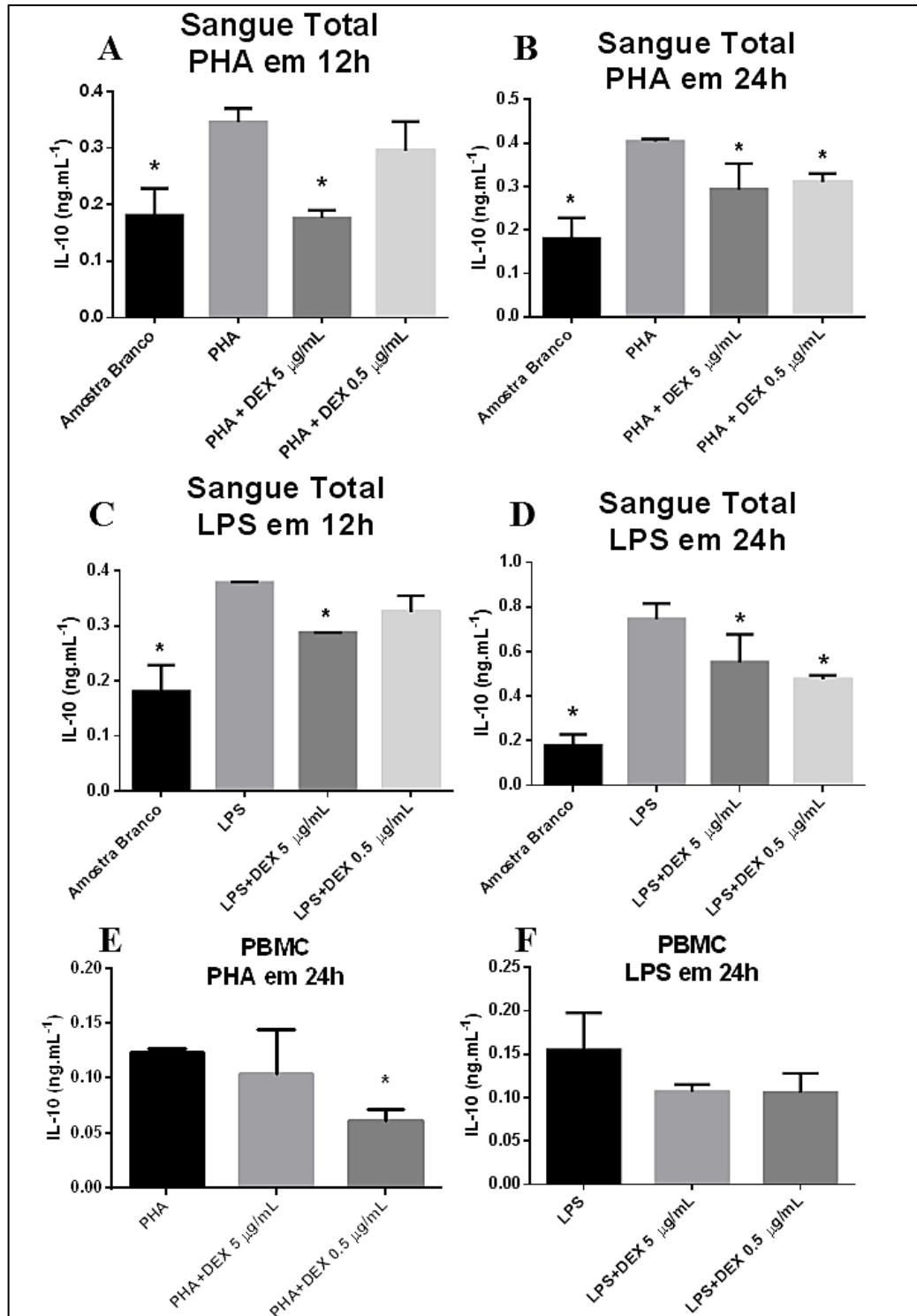
Ainda na figura 12, é possível observar que o maior tempo de incubação do sangue (24 h) resulta em uma maior produção de IL-10 quando comparado com o tempo de 12 h

(gráficos **A**, **B**, **C** e **D**). Os dados apresentados com PBMC incubadas por 12 h não foram apresentados, uma vez que os níveis de IL-10 não puderam ser determinados, sendo por isso, apresentados somente os resultados em 24 h.

Outra observação notável foi tal que em todos os testes realizados no sangue total, as médias dos níveis de IL-10 foram superiores aos apresentados nas condições correspondentes com PBMC. Esta maior produção da citocina no sangue total se deve ao fato de que a ausência de lavagens ou diluições de células com meios de cultura faz com que não haja alteração do material biológico utilizado, sem eliminação ou diluição de nutrientes ou componentes ali presentes. Desta forma, tem-se que o microambiente representado pelo sangue total mimetiza bem o organismo como um todo e é capaz de responder mais ativamente a estímulos inflamatórios quando comparado com as células isoladas do mesmo (KEUSTERMANS *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2009).

Além disso, o uso de PBMC estimuladas à inflamação e tratadas com dexametasona (gráficos 12E e 12F) não demonstraram diferenças claras com o controle negativo (células estimuladas sem tratamento). Por outro lado, o sangue total apresentou diferença estatística entre os grupos positivo (tratado com dexametasona) e negativo, pelo menos na maior concentração testada de dexametasona (gráficos 12A-D). Isto levou a utilizar o sangue total no ensaio *ex vivo* com as amostras de extratos vegetais ao invés das células isoladas. Adicionalmente, o isolamento de PBMC (utilizando-se toda a metodologia descrita na seção 3.9) demanda maior tempo à sua realização, maior gasto (pelo uso de reagente específico para o isolamento das células) e como já apresentado, é menos responsivo a estímulos inflamatórios na produção da IL-10 e possivelmente também a outros mediadores inflamatórios. Todos estes resultados demonstram a grande vantagem em se utilizar o sangue bruto humano no ensaio *ex vivo*, compreendendo um método simples, relativamente rápido e eficaz para o teste de amostras na resposta inflamatória.

Figura 12 - Comparação do estímulo inflamatório e tratamento sob diferentes condições:
 (A) Sangue induzido com PHA em 12 h. (B) Sangue induzido com PHA em 24 h.
 (C) Sangue induzido com LPS em 12 h. (D) Sangue induzido com LPS em 24 h.
 (E) PBMC induzido com PHA em 24 h. (F) PBMC induzido com LPS em 24 h.
 Grupos foram comparados por ANOVA *one-way* e os dados são apresentados como média \pm DP.



FONTE: Do autor.

Legenda: *Representa a diferença estatística entre os grupos comparados com o controle negativo (somente estimulante, PHA ou LPS) com $p \leq 0,05$.

Os resultados apresentados nos gráficos da figura 12 corroboram com os apresentados com alguns trabalhos da literatura. Liu e colaboradores (2009), por exemplo, observaram também que a dexametasona inibe de forma dose-dependente a produção de IL-10 no sangue estimulado por LPS, além de outros indutores, num ensaio *ex vivo*. Entretanto, o tempo de incubação utilizado no ensaio foi diferente do realizado neste presente trabalho. Deve-se considerar que o tempo de incubação influencia na produção de citocinas, como já relatado na literatura (AI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2009). Al-Harbi *et al.* (2016) mostrou em seu trabalho que a dexametasona inibe principalmente a ação de NF- κ B, COX-2, PLA₂, neutrófilos e linfócitos, que estão diretamente ligados à resposta inflamatória. Entretanto, neste mesmo trabalho é apresentado ainda que os níveis de IL-10 aumentam sob a ação da dexametasona. Vale a pena destacar, que em seu trabalho, Al-Harbi e colaboradores (2016) utilizaram-se de um modelo *in vivo* e um tempo diferente de experimentação (considerando o estímulo inflamatório e ação da dexametasona no organismo). Desta forma, é fato que o resultado obtido com nosso trabalho poderia ser diferente de outros já relatados na literatura, levando-se em consideração ainda que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que age em diversos mediadores envolvidos na inflamação de forma sistêmica (OUYANG *et al.*, 2011). Assim, o desempenho das amostras a serem testadas quanto à produção de IL-10 no sangue induzido por LPS, proposto no ensaio *ex vivo* aqui descrito, sugere que a comparação entre elas e o controle positivo (dexametasona) deve ser feita dentro de experimentos padronizados, usando-se sangue de um mesmo doador e minimizando as variações entre seus resultados. Deste modo, as amostras tomadas como ativas seriam aquelas tais com efeito inibidor da produção de IL-10 no sangue induzido à inflamação por LPS, comparável com os resultados do fármaco de referência, dexametasona.

4.4.2.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos vegetais pela inibição da produção de IL-10 usando o ensaio *ex vivo* em sangue humano

O ensaio realizado e descrito anteriormente permitiu determinar as condições otimizadas para realização do teste anti-inflamatório das amostras de extratos pela inibição da produção de IL-10. A partir dele, foram definidos que o uso de sangue bruto humano induzido à inflamação com LPS e incubado por 24 h com as amostras a serem testadas permitiria avaliar o desempenho destas amostras acerca da inibição da produção de IL-10 sob condições inflamatórias em um modelo *ex vivo*.

Para isso, o sangue foi incubado por 24 h com as amostras de extratos em diferentes concentrações e LPS, nesta ordem e quase no mesmo instante, utilizando-se PBS para diluição. O controle negativo foi tido como sangue com LPS, porém sem tratamento. Já o controle positivo, foi tomado como o sangue induzido com LPS e tratado com o fármaco de referência dexametasona. No ensaio foram realizados testes com as amostras de extratos ou fármacos de referência em diferentes concentrações, em duplicatas, para o cálculo do CE_{50} . CE_{50} é a concentração de eficiência de 50 %, ou seja, a concentração necessária de uma amostra para que haja 50 % de inibição da produção de IL-10, neste caso. Desse modo, quanto menor o valor de CE_{50} de uma amostra, melhor seu efeito inibidor da produção de IL-10 e conseqüentemente, maior potencial anti-inflamatório ela terá. Os resultados foram obtidos comparando-se a concentração de IL-10 determinada por ELISA, dos diferentes grupos de amostras testados. Cada seis amostras diferentes de extrato aleatórias foram testadas simultaneamente com o controle negativo e controle positivo (dexametasona), utilizando-se sangue de um mesmo doador, para que se pudesse ter um controle da variação inter-indivíduo da resposta inflamatória na produção de IL-10. Com isso, o grupo do controle positivo (dexametasona) foi utilizado para comparação das amostras testadas pelos seus respectivos valores de CE_{50} para avaliação quanto ao potencial regulador delas na produção de IL-10 no sangue induzido à inflamação por LPS. Os resultados são apresentados na tabela 4 a seguir, onde o valor de CE_{50} apresentado para dexametasona representa a média dos valores obtidos para cada ensaio com o sangue de cada doador diferente.

Como já apresentado anteriormente, é ideal que se busque amostras com menores valores de CE_{50} . Butterweck e Nahrstedt (2012) sugerem que para ensaios *in vitro* com extratos brutos, o limite seja de 100 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, aquelas amostras com CE_{50} inferiores a este valor apresentariam potencial biológico ao qual está sendo testado. O ensaio aqui realizado cujos resultados são apresentados na tabela 4 é *ex vivo* e se aproxima mais do modelo *in vivo* do que de um *in vitro*. Entretanto, considerando-se as limitações do modelo, é possível utilizar-se de tal argumento na determinação das amostras com maior potencial de inibição na produção de IL-10. Assim, todas as amostras com valores de CE_{50} superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$, não tiveram seus valores apresentados precisamente, sendo assim consideradas inativas de imediato. Observando os resultados da tabela 4, tem-se que algumas amostras testadas apresentaram consideráveis valores de desvio padrão, indicando a grande variabilidade do teste no sangue para a avaliação das amostras em diferentes concentrações na regulação da produção de IL-10. Este fato já havia sido observado em outros trabalhos que

utilizaram cultura de sangue estimulado para avaliação de produção de citocinas (VAN DER LINDEN *et al.*, 1998; YAQOOB, NEWSHOLME, CALDER, 1999).

Tabela 5 - Valores das médias de CE_{50} para o teste de produção de IL-10 para cada uma das amostras de extratos vegetais e fármacos testados (n = 2).

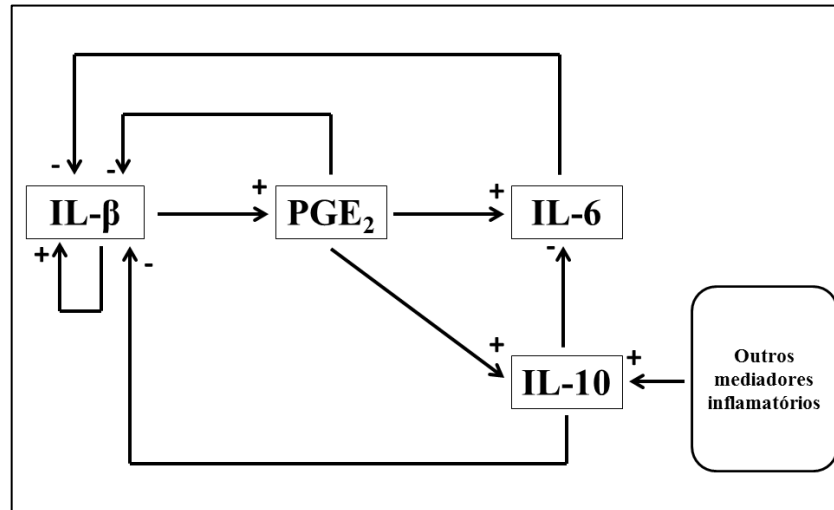
Código da Amostra	Média do $CE_{50} \pm DP(\mu\text{g.mL}^{-1})$	Código da Amostra	Média do $CE_{50} \pm DP (\mu\text{g.mL}^{-1})$
1	14,32 ± 16,09	26	71,07 ± 12,44
2	77,86 ± 19,28	27	> 100
3	11,41 ± 59,78	28	89,61 ± 31,73
4	> 100	29	3,04 ± 34,69
5	> 100	30	> 100
6	> 100	31	11,72 ± 11,04
7	> 100	32	0,05 ± 34,89
8	34,44 ± 20,92	33	7,62 ± 3,93
9	12,08 ± 26,17	34	> 100
10	15,69 ± 18,95	35	82,45 ± 29,28
11	86,29 ± 76,61	36	13,25 ± 14,71
12	12,72 ± 22,53	37	55,68 ± 30,15
13	11,99 ± 13,12	38	> 100
14	36,35 ± 10,12	39	> 100
15	> 100	40	88,24 ± 46,72
16	8,93 ± 34,72	41	15,09 ± 61,65
17	> 100	42	12,96 ± 21,71
18	> 100	43	> 100
19	13,25 ± 29,40	44	> 100
20	12,88 ± 18,55	45	> 100
21	1,19 ± 52,98	46	15,61 ± 44,58
22	98,12 ± 29,01	47	98,47 ± 9,14
23	13,26 ± 26,57	Dexametasona	4,65 ± 5,93
24	98,74 ± 17,18	Indometacina	113,50 ± 68,03
25	> 100	-	-

FONTE: Do autor.

Pode-se observar ainda que dentre as 47 espécies vegetais testadas, 30 delas apresentaram médias de CE_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$. Tomando-se como base os valores médios de CE_{50} , tem-se que o baixo valor de CE_{50} do controle positivo, dexametasona, que foi de 4,65 $\mu\text{g/mL}$, indica seu alto poder de inibição na produção de IL-10. Já indometacina, outro fármaco de referência utilizado na terapia da inflamação, apresentou valor de CE_{50} médio igual a 113,5 $\mu\text{g/mL}$, indicando sua baixa eficiência na inibição da produção de IL-10. Sabe-se que a indometacina é um AINE utilizado na terapia de alguns casos de inflamação e tem sido bem descrito como sendo inibidor seletivo da via COX-dependente (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004). Desta forma, seu mecanismo de ação seletivo justifica

sua baixa eficácia na inibição da produção de IL-10. Para um melhor entendimento, é necessário considerar o modo sistêmico de ação dos mediadores inflamatórios, como exemplificado de modo simples no esquema da figura 13 a seguir.

Figura 13 - Figura esquemática da produção de IL-10 a partir de outros mediadores inflamatórios.



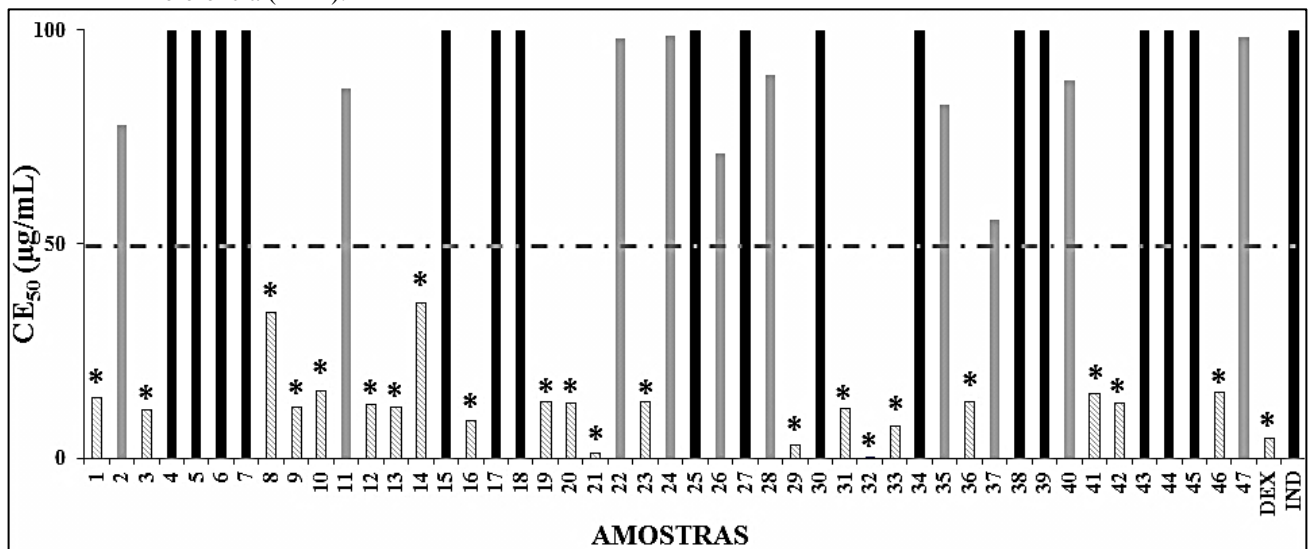
FONTE: Adaptado de Bour *et al.* (2000).

Sabe-se que a citocina IL-10 é produzida por diversas células do sistema imune de modo sistêmico (OUYANG *et al.*, 2011). O estímulo inflamatório, como observado no esquema da figura 13, causa aumento na produção de IL-10 através dos diversos mediadores inflamatórios, envolvendo não somente os biológicos (células ou outras citocinas), mas também os químicos, como a PGE₂ (OUYANG *et al.*, 2011; TONINI, 2009). Entretanto, a produção de IL-10 por si só pode causar a redução na produção de alguns mediadores pró-inflamatórios. O uso de um AINE como a indometacina, que age na via da COX, causa diminuição da produção de PGE₂ e conseqüentemente de IL-10. Entretanto, a produção de IL-10 pode ainda ser regulada por outros mediadores da inflamação (BOUR *et al.*, 2000), o que explica os níveis elevados de IL-10 no sangue para a indometacina e conseqüentemente, seu maior CE₅₀.

Ainda sobre os valores médios de CE₅₀, segundo Butterweck e Nahrstedt (2012) é conveniente considerar concentrações inferiores a 100 µg/mL como critério para avaliação de atividades biológicas em bioensaio com amostras de extrato. Assim, considerando-se as amostras testadas acerca da inibição de IL-10 neste trabalho e com CE₅₀ inferiores a 50 µg/mL (valor superior ao CE₅₀ médio da dexametasona), pode-se inferir que criteriosamente tais amostras apresentam considerável potencial inibidor de produção de IL-10, estando intimamente relacionadas com uma possível atividade anti-inflamatória por este mecanismo

de ação e comparável ao da dexametasona. Aquelas amostras com valor de CE_{50} intermediário (entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) podem ser então definidas como intermediárias em relação à tal atividade farmacológica. Utilizando-se tais limites, pôde-se inferir a partir dos resultados do gráfico da figura 14 a seguir, que vinte e uma espécies vegetais dentre as testadas apresentaram considerável potencial de inibição de produção de IL-10, sendo assim consideradas ativas quanto a este mecanismo de ação. São elas: *A. polyphylla* (1), *A. polycephala* (3), *B. purpurea* (8), *B. rufa* (9), *B. variegata* (10), *L. ferrea* (12), *P. pluviosa* (13), *C. pulcherrima* (14), *D. villosa* (16), *G. max* (19), *H. balansae* (20), *H. courbaril* (21), *I. edulis* (23), *M. dimorphandrum* (29), *M. nyctitans* (31), *M. stipitatum* (32), *M. villosum* (33), *P. vulgaris* (36), *S. macranthera* (41), *S. adstringens* (42) e *V. faba* (46). Os valores de CE_{50} das amostras não puderam ser comparados estatisticamente com o do controle positivo (dexametasona) por ANOVA *one-way*, uma vez que o experimento foi realizado em duplicatas. Entretanto, o valor de CE_{50} do fármaco padrão foi fundamental para determinação do valor limite para estabelecimento do potencial anti-inflamatório das amostras testadas no ensaio *ex vivo* aqui descrito, bem como para controle do bom funcionamento do bioensaio proposto.

Figura 14 - Valores médios de CE_{50} das amostras de Fabaceae quanto à inibição da produção de IL-10 e fármacos de referência (n = 2).



FONTE: Do autor.

Legenda: *Representa valores de CE_{50} inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$, assim como o padrão de referência dexametasona (DEX). Colunas em preto representa as amostras com média de CE_{50} superior a 100 $\mu\text{g/mL}$ e em cinza as amostras com CE_{50} médio entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Dentre as espécies vegetais listadas anteriormente com forte potencial de inibição de produção de IL-10 sob estímulos inflamatórios, algumas já têm sido relatadas na literatura com algum outro mecanismo de ação das folhas ou outras partes como *Bauhinia purpurea*

(BOONPHONG *et al.*, 2007; SHREEDHARA *et al.*, 2009), *Bauhinia variegata* (FILHO, 2009; NEGI, SHARMA, SINGH, 2012), *Libidibia ferrea* (ARAÚJO *et al.*, 2009), *Poincianella pluviosa* (DOMINGOS *et al.*, 2019), *Caesalpinia pulcherrima* (PATEL *et al.*, 2010; RAO, FANG, TZENG, 2005), *Glycine max* (KANCHANA, SANTHA, RAJA, 2015), *Holocalyx balansae* (LÓ, DUARTE, 2011), *Hymenaea courbaril* (BEZERRA *et al.*, 2013; HENRIQUES *et al.*, 2016), *Inga edulis* (SOUZA *et al.*, 2007), *Phaseolus vulgaris* (OOMAH, CORBÉ, BALASUBRAMANIAN, 2010), *Senna macranthera* (GUARIZE *et al.*, 2012), *Stryphnodendron adstringens* (HENRIQUES *et al.*, 2016; LIMA, MARTINS, SOUZA Jr., 1998) e *Vicia faba* (BOUDJOU *et al.*, 2013). Estas informações corroboram assim o potencial anti-inflamatório apresentado por estas espécies no ensaio *ex vivo* realizado. Entretanto, vale a pena considerar que o bioensaio proposto e realizado para avaliação do potencial de inibição da produção de IL-10 compreende somente uma das vias envolvidas do processo inflamatório, sendo um mecanismo de ação bastante específico. Nele, as amostras foram comparadas ao fármaco de referência, dexametasona (que é um anti-inflamatório esteroide) quanto à regulação na produção de IL-10 no sangue induzido por LPS após 24h. Embora a IL-10 apresente mecanismos de atividade anti-inflamatória (como já descrito anteriormente) sua produção e ação nos processos inflamatórios é sistêmica e bastante complexa, e ainda pouco esclarecida. Assim, para obtenção de informações adicionais acerca da atividade anti-inflamatória destas amostras é necessária a avaliação por outros mecanismos de ação, utilizando-se outros testes para avaliação desta atividade farmacológica.

O ensaio descrito nesta seção apresenta uma metodologia simplificada e bastante versátil para avaliação da atividade anti-inflamatória, uma vez que permite avaliar a produção de diversos outros mediadores da inflamação, pelo uso de kits ELISA específicos para detecção de outras citocinas, quimionas, e outros agentes químicos, envolvidos na inflamação. Neste sentido, foi proposto o uso da mesma metodologia de incubação do sangue induzido à inflamação por LPS com amostras de extratos ou fármacos de referência a fim de se avaliar os níveis de PGE₂, LTB₄ e outros biomarcadores da inflamação por meio da detecção por LC-MS/MS. A utilização desta técnica é bem descrita na literatura para detecção de compostos ainda que em níveis traços, principalmente os biomarcadores da inflamação derivados do AA (ARAÚJO *et al.*, 2014; GALVÃO *et al.*, 2016; MARGALIT, DUFFIN, ISAKSON, 1996; SHINDE *et al.*, 2012).

4.4.3 Desenvolvimento de métodos para quantificação de eicosanoides em plasma de sangue humano

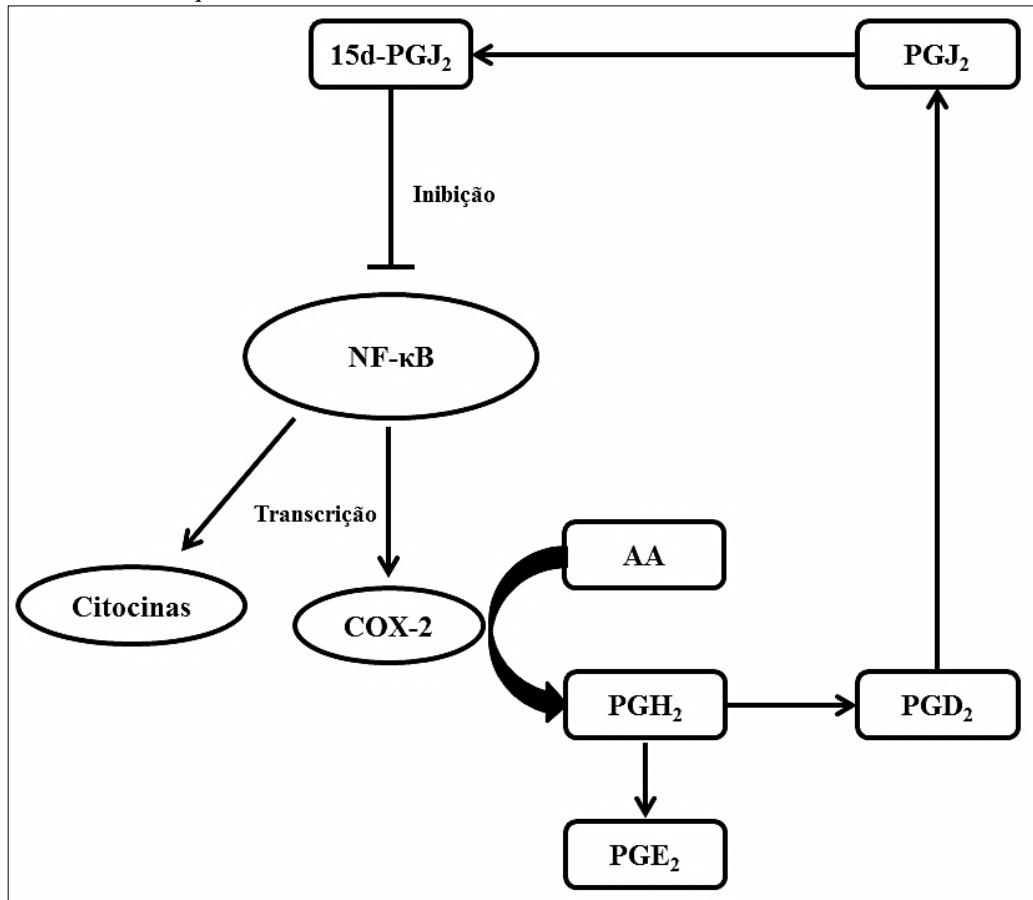
4.4.3.1 Determinação da fase móvel e método de detecção SRM de eicosanoides

Foi feito inicialmente o desenvolvimento de método de detecção para quantificação de biomarcadores da inflamação no plasma de sangue por LC-MS/MS. Neste sentido, foram incluídas nesta etapa do estudo soluções padrão de PGE₂, LTB₄, 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) e também de ácido araquidônico (AA). PGE₂ e LTB₄ por se apresentarem como mediadores principais envolvidos na inflamação permitiria obter resultados sobre a inibição das vias COX e/ou LOX, respectivamente.

A dosagem de AA, por ser esta parte inicial da cascata da inflamação na produção dos eicosanoides, permitiria não somente confirmar fatos acerca da inibição dual ou não das vias COX e LOX, como também permitiria inferir sobre um possível mecanismo de ação de inibição de PLA₂, comparável aos anti-inflamatórios esteroidais (AIE's), dos compostos testados no ensaio *ex vivo* a ser validado no sangue.

Já a 15d-PGJ₂ tem como precursor a PGJ₂. Ambas por sua vez, são derivadas de ocorrência natural da PGD₂, a prostaglandina presente em maior abundância em tecidos em estado de homeostase. A 15d-PGJ₂ tem sido relatada na literatura com importantes efeitos nos diversos processos biológicos de um organismo como crescimento celular, inflamação e apoptose. Os efeitos anti-inflamatórios da 15d-PGJ₂ são atribuídos principalmente à inibição de NF- κ B, uma proteína que controla a transcrição do DNA na produção de algumas proteínas envolvidas na inflamação, como a COX-2 e algumas citocinas (STRAUS *et al.*, 2000) (figura 15 a seguir).

Figura 15 - Figura esquemática do mecanismo de ação da 15d-PGJ₂ na cascata do ácido araquidônico.



FONTE: Adaptado de Straus *et al.* (2000).

Além disso, altos níveis de 15d-PGJ₂ tem sido relacionado com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) dentro das células, tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\cdot$), que levam à apoptose e indução da ativação de outros mediadores da inflamação por estresse ativado (BORGES, 2017; MARTÍNEZ, PÉREZ-CASTILLO, SANTOS, 2005; SOUSA *et al.*, 2007; STRAUS *et al.*, 2000). Tendo-se em vista a importância da 15d-PGJ₂ na regulação do processo inflamatório, a quantificação desta prostaglandina nas amostras biológicas advindas do teste *ex vivo* permitiria um estudo detalhado do mecanismo de ação das amostras testadas como anti-inflamatório.

Decidiu-se inicialmente pelo teste de duas diferentes fases móveis a fim de se avaliar o grau de ionização dos compostos a serem estudados nelas. Para isso, fez-se a injeção direta de cada uma das soluções padrão 1 ppm de cada um dos analitos em dois tipos de fase móvel no modo isocrático, baseando-se em estudos já realizados da literatura (CAO *et al.*, 2008; FOGH, HERLIN, KRAGBALLE, 1989; WHORTON, SWEETMAN, OATES, 1979; YANG *et al.*, 2006), variando-se a fase aquosa de cada uma delas:

- a) 50% solução aquosa ácido fórmico 0,1 % e 50% acetonitrila, a 0,3 mL/min de fluxo total;
- b) 50% solução aquosa básica 10 mM de acetato de amônio (pH 8,5) e 50% acetonitrila, a 0,3mL/min de fluxo total.

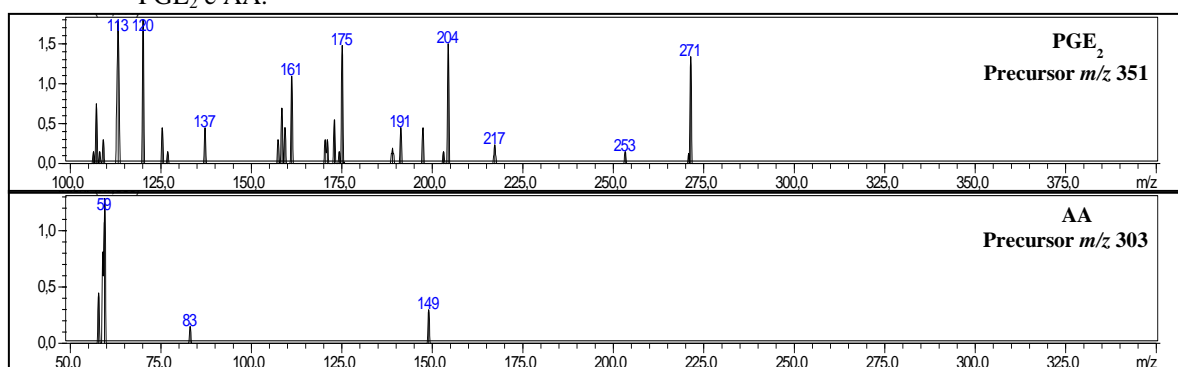
Assim, pelo método de detecção SIM (*Single Ion Monitoring*), foram feitas análises por LC-MS/MS por injeção direta no modo negativo (como descrito na literatura) (MURPHY *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006) das soluções padrões de PGE₂, LTB₄, AA e 15d-PGJ₂, selecionando-se para cada um deles o respectivo íon molecular desprotonado [M-H]⁻.

Sendo assim, a primeira etapa para o desenvolvimento do método de quantificação dos mediadores químicos da inflamação descritos anteriormente consistiu na construção do método de detecção seletiva de íons característicos de cada analito. Para isso, utilizaram-se métodos de análise e detecção seletiva de íons por monitoramento de reações selecionadas (SRM - *Selected Reaction Monitoring*) onde um íon precursor formado durante a ionização é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e direcionado para a câmara de colisão (Q2) (onde será fragmentado em diferentes outros íons produtos). Por sua vez, somente íons produtos específicos (selecionados de acordo com sua razão *m/z*, assim como no primeiro quadrupolo) passam pelo terceiro quadrupolo (Q3), permitindo assim uma detecção mais seletiva ou específica de determinado composto em uma amostra com uma maior sensibilidade (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2006).

Para a montagem do método SRM, inicialmente foram selecionados os sinais de *m/z* referente aos íons moleculares [M-H]⁻ (no modo de ionização negativo), de acordo com dados da literatura. Em seguida, cada uma das soluções padrões a 1 ppm foram injetadas com uso de tubo restritor (injeção direta) numa proporção de fase móvel 50 % solução aquosa de 0,1 % ácido fórmico e 50 % acetonitrila, a fim de se obter os espectros de massas no modo SIM (*Single Ion Monitoring*) para que na sequência, o método SRM pudesse ser otimizado e o íon produto escolhido automaticamente pelo equipamento durante a otimização do método para cada analito na fase móvel ácida. Para PGE₂ e AA, o equipamento não pôde fazer a seleção automática do íon produto; conseqüentemente o método SRM não pôde ser otimizado automaticamente. Deste modo, estes dois padrões foram novamente injetados por injeção direta na mesma fase móvel para obtenção dos espectros *Product Scan* no modo de ionização negativo, que fornece a relação de todos os íons formados (íons produtos) da fragmentação, no segundo quadrupolo (câmara de colisão), a partir do íon precursor selecionado [M-H]⁻. Os espectros dos íons produtos obtidos da PGE₂ e AA a partir de seus respectivos íons

precursores de m/z 351 e 303 (figura 16) permitiu analisar e escolher os íons produtos (m/z 271 e 59, respectivamente) para detecção dos mesmos pelo método SRM. Os espectros de íons produtos para LTB_4 e 15-d-PGJ_2 não foram obtidos uma vez que o próprio equipamento fez a seleção automática dos respectivos íons produtos. A escolha do íon produto para cada analito foi baseada e de acordo com estudos prévios da literatura, nos quais se utilizou pares de íons (precursor e produto) específicos para que não houvesse detecção de outros compostos (detecção cruzada) e que ao mesmo tempo fosse mais sensível (CAO *et al.*, 2008; MARGALIT, DUFFIN, ISAKSON, 1996; MESAROS, LEE, BLAIR, 2009; MURPHY *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006).

Figura 16 - Espectros dos íons produtos formados a partir da fragmentação dos respectivos íons precursores de PGE_2 e AA.



FONTE: Do autor.

Deste modo, foi possível determinar as transições dos íons precursor e produto para a montagem do método SRM da PGE_2 e AA. Utilizando-se as transições determinadas para detecção de cada analito (tabela 5), os métodos SRM para cada analito foram otimizados quanto aos parâmetros de voltagem dos quadropolos e câmara de colisão e valores mais precisos das transições, para melhor detecção dos compostos em estudo na fase móvel ácida. Os mesmos íons precursor e produto de cada analito também foram utilizados para otimização do método SRM utilizando-se a fase móvel básica (tabela 5 a seguir).

Tabela 6 - Parâmetros otimizados do método SRM de cada analito para as fases móveis ácida e básica testadas.

Analito	FM ácida			FM básica				
	Transição (<i>m/z</i>)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)	Transição (<i>m/z</i>)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
CAP (PI)	320,9>152,1	16	20	29	-	-	-	-
PGE ₂	351,1>271,2	18	20	16	351,3>271,0	21	18	10
LTB ₄	335,1>195,1	25	15	18	334,9>195,3	26	19	18
AA	303,0>59,0	18	24	19	303,1>59,2	19	23	28
15d-PGJ ₂	315,1>271,2	16	14	26	315,1>271,5	16	16	16

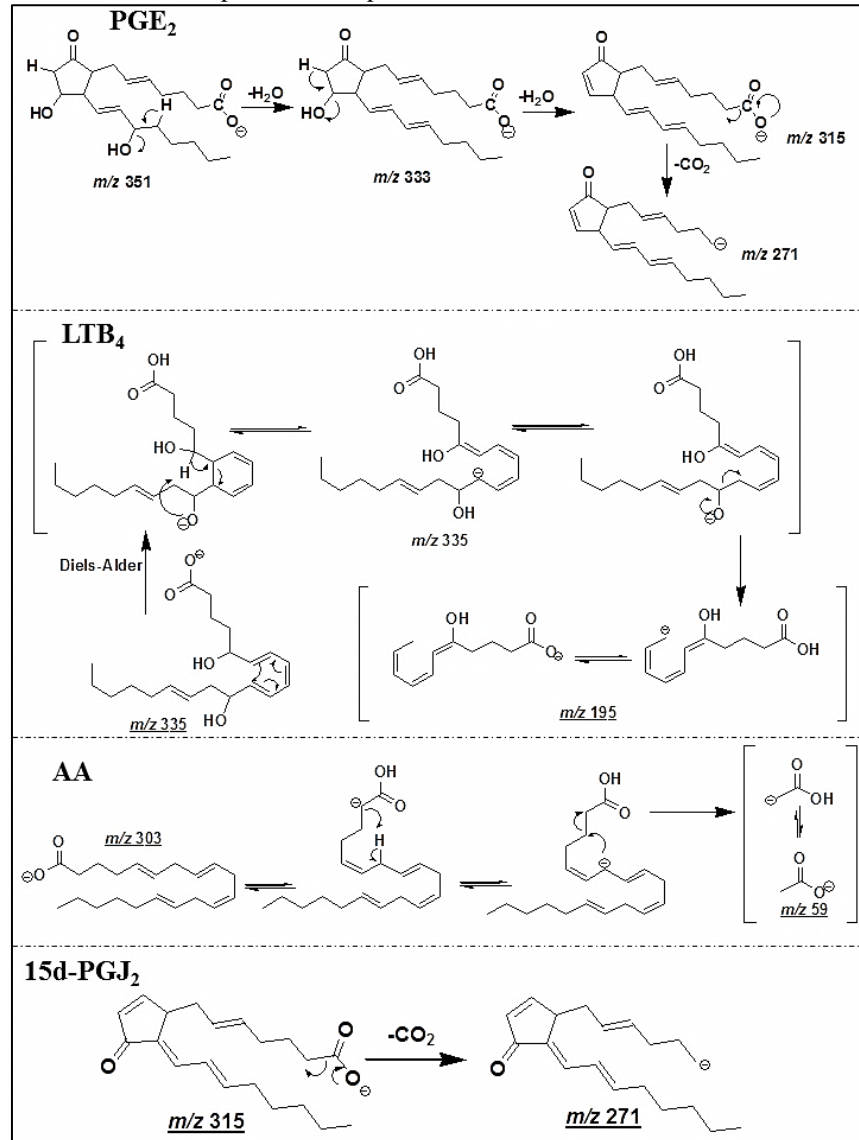
FONTES: Do autor.

Os mecanismos das reações de fragmentação para formação dos íons produtos a partir dos respectivos íons precursores de cada analito nos métodos SRM de detecção são esquematizados na figura 17 a seguir.

Em seguida, as soluções padrões foram analisadas por cada um dos métodos SRM otimizados em suas respectivas fases móveis, também por injeção direta, a fim de se comparar a detecção e sensibilidade entre elas. As injeções para cada analito em cada uma das fases móveis foram feitas em duplicatas e os valores das médias das áreas dos picos para cada analito nas duas fases móveis são apresentadas no gráfico da figura 18 a seguir.

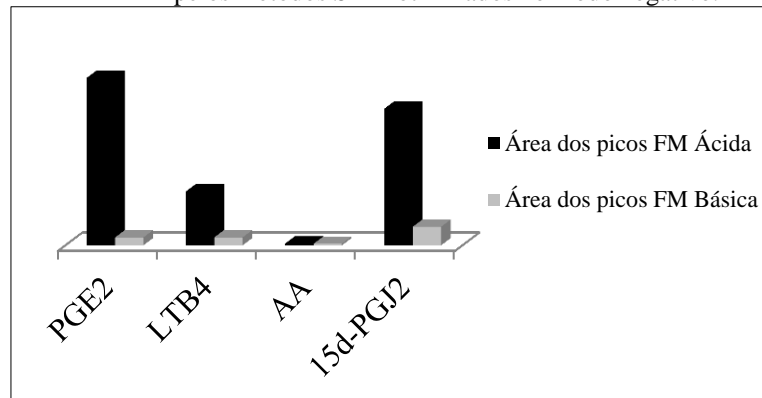
Em geral, os analitos apresentaram áreas muito maiores na fase móvel ácida daquelas obtidas para a fase móvel básica. Isso permite inferir que o ácido presente na fase móvel permite uma maior ionização dos íons desses analitos, propondo que esta fase móvel fornece maior sensibilidade na detecção das transições analisadas. É possível se observar também que o AA aparentemente não apresentou grandes diferenças nas áreas utilizando-se a fase móvel ácida e básica, além de um baixo valor de área mesmo na fase móvel ácida, que se demonstrou melhor para os outros analitos. Isso se deve possivelmente à dificuldade de ionização das moléculas desse composto, mesmo com o método SMR otimizado. Por outro lado, comparando-se os valores de área dos demais analitos na fase ácida, é possível inferir que a PGE₂ é o composto que possivelmente mais se ioniza, sendo dentre eles o mais detectável.

Figura 17 - Reações de fragmentação para formação dos íons produtos a partir dos respectivos íons precursoros de PGE₂, LTB₄, AA e 15d-PGJ₂.



FONTE: Adaptado de Murphy *et al.* (2005).

Figura 18 - Gráfico comparativo das médias das áreas de cada padrão a 1 ppm para cada fase móvel (FM), obtidas pelos métodos SRM otimizados no modo negativo.



FONTE: Do autor.

4.4.3.2 Validação do método de quantificação de PGE₂ em amostras de plasma de sangue humano

Inicialmente pretendia-se quantificar os quatro biomarcadores da inflamação, citados na seção anterior, nas amostras de plasma advindas do teste *ex vivo* no sangue humano a ser validado. Para isso, foram injetadas amostras do controle negativo (induzidas à inflamação e sem tratamento e, portanto onde se espera maior quantidade desses compostos) após o processamento para purificação em SPE (descrito na seção 3.14). Utilizando-se os métodos SRM para detecção seletiva desses analitos (otimizados como descrito na anteriormente), as amostras de plasma do sangue processadas foram injetadas. Entretanto, somente PGE₂ pôde ser detectada pelo método de detecção SRM desenvolvido sugerindo que a indução à inflamação por LPS no sangue humano não produzia quantidades significativas e detectáveis de LTB₄, AA e 15d-PGJ₂ (considerando-se a quantidade de sangue utilizada para o ensaio) ou que ainda o método de extração por SPE não era seletivo a estes compostos. Desta forma, o ensaio no sangue humano proposto seguiu-se de forma a avaliar o potencial anti-inflamatório das amostras testadas de acordo com seu potencial de inibição da produção de PGE₂. Este ensaio funcionaria como um método de triagem do potencial anti-inflamatório seja de inibição da via COX ou PLA₂, o qual permitiria a seleção daquelas espécies promissoras para análises de tal potencial por outros ensaios posteriores, principalmente *in vivo*.

Como padrão interno (PI), inicialmente foram testadas diferentes substâncias como ácido gálico, ácido cinâmico, ácido oxálico, dentre outros. Contudo, o PI deve ser uma substância que não esteja presente nas amostras em análise e conter propriedades físico-químicas semelhantes ou que se aproximem dos analitos em estudo e não reagir com os analitos de interesse ou outros componentes da matriz (RIBANI *et al.*, 2004). Deste modo, optou-se pelo uso de cloranfenicol (CAP), um antibiótico lipossolúvel de fórmula molecular C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅ e massa molecular 323,13 Da. A escolha deste composto foi feita considerando-se sua massa molecular que é relativamente próxima da do composto em estudo (PGE₂), sua lipossolubilidade (característica esta também atribuída ao analito de interesse), além da presença de átomos de halogênio (átomos de cloro) o que garante a sua ausência nas amostras biológicas em estudo.

Uma vez que a detecção de todos os analitos inicialmente propostos (PGE₂, LTB₄, AA e 15d-PGJ₂) não foi possível, o método SRM foi novamente otimizado (usando-se as mesmas etapas descritas anteriormente) para detecção, nas amostras de plasma, de PGE₂ e CAP (PI). O método cromatográfico (descrito na seção 3.16) foi determinado a fim de se obter melhor

resolução na separação entre os picos destes compostos, bem como na detecção deles com o menor tempo de análise. A corrida para cada amostra teve os parâmetros de separação e detecção de PGE₂ e PI determinados e são exibidos na tabela 6 a seguir.

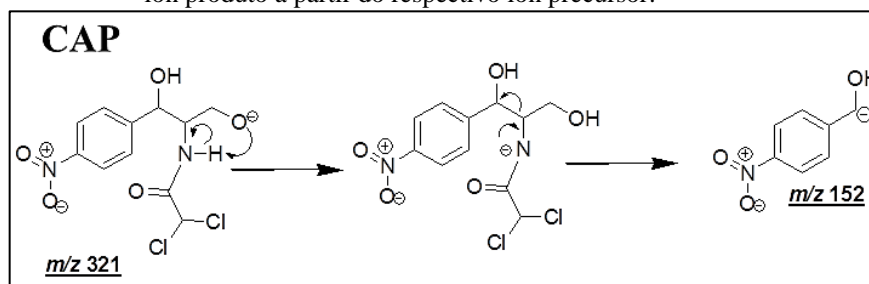
Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos e de detecção de PGE₂ e CAP em plasma de sangue humano.

Composto	T _R (min)	Transição (m/z)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
CAP (PI)	2,78	320,90 → 152,10	16	20	29
PGE ₂	3,70	351,10 → 271,30	13	18	28

FONTE: Do autor.

A transição apresentada na tabela 6 representa o par dos respectivos íons precursor e produto utilizados para detecção de cada analito. A reação de formação do íon produto a partir do respectivo íon precursor do CAP é esquematizada na figura 19 a seguir.

Figura 19 - Representação da reação de fragmentação do CAP para formação do íon produto a partir do respectivo íon precursor.



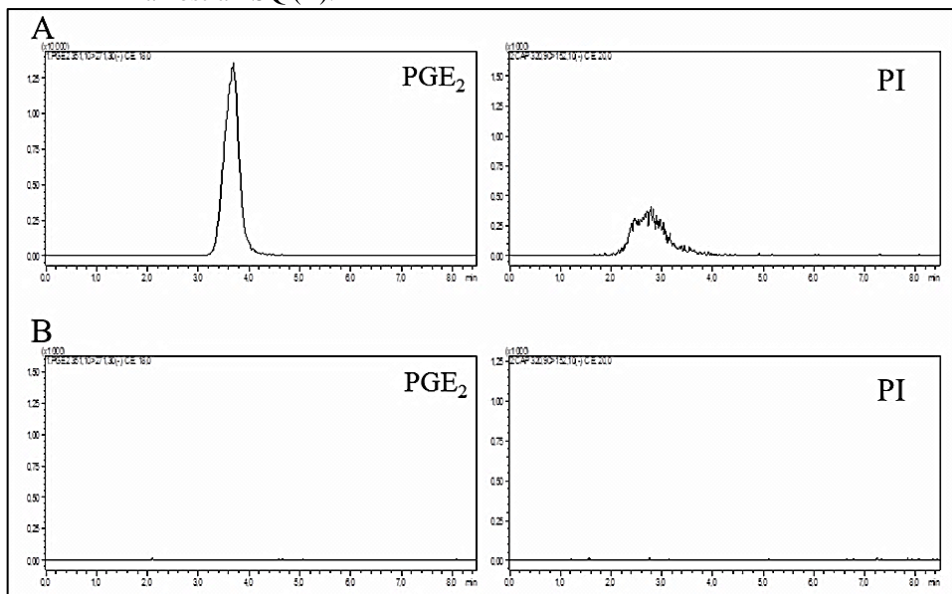
FONTE: Adaptado de Martins-Júnior *et al.*, (2006).

O método cromatográfico desenvolvido permitiu análises com 8,5 min de corrida no total, para cada amostra de plasma. Os parâmetros do método SRM obtidos foram sutilmente diferentes daqueles obtidos inicialmente com outros mediadores da inflamação. Isso se deve possivelmente a alguma mudança no funcionamento do equipamento ou mesmo das condições de análise (temperatura, variação da estabilidade da fonte de ionização ou analisador, etc.). É possível perceber que os picos referentes a PGE₂ e PI puderam ser claramente diferenciados pelos respectivos tempos de retenção e método SRM (tabela 6), demonstrando a grande seletividade e sensibilidade na detecção destes compostos. Os métodos SRM são bem conhecidos por permitir a detecção de compostos com alta sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, além da grande seletividade, o que torna esta técnica bastante proeminente em métodos de quantificação (SONG *et al.*, 2016).

O cromatograma obtido pelo método SRM a partir da análise de amostras de plasma fortificadas com PGE₂ e PI são comparados na figura 20 com aquele obtido de amostras branco (somente matriz biológica de plasma, sem adição de padrões PGE₂ ou PI). As amostras fortificadas comparadas foram as do limite superior de quantificação (LSQ), aquelas

de maior concentração utilizadas como padrões na construção das curvas de calibração do método de quantificação. Foi possível observar que não houve detecção de picos nos mesmos tempos de retenção que PGE₂ e PI nas amostras de plasma branco (sem adição de padrão), mesmo após a injeção das amostras do LSQ. Desta forma, é possível inferir que não há efeito residual considerável no método de quantificação proposto. Adicionalmente, a comparação dos cromatogramas SRM da figura 20 permite observar ainda a ausência ou indetectabilidade de PGE₂ ou PI na matriz de plasma de sangue humano sem indução de inflamação. Isso sugere que PGE₂ não pode ser detectado por este método em amostras de plasma de sangue humano que não foi induzido à inflamação por LPS (de acordo com a metodologia apresentada para o ensaio *ex vivo*). Além disso, a seleção dos doadores voluntários de sangue os quais não haviam administrado o antibiótico CAP alguns dias antes da coleta do sangue pode ser fundamental para ausência de detectabilidade desse composto em amostras de plasma não fortificadas.

Figura 20 - Cromatogramas SRM obtidos para detecção de PGE₂ e PI em amostras de plasma fortificadas do limite superior de quantificação (LSQ) (A) e em amostras de plasma branco (sem adição de padrão) após a injeção da amostra LSQ (B).



FONTE: Do autor.

O efeito de matriz foi avaliado comparando-se as amostras controle de qualidade de concentração alta e baixa (CQA e CQB) em matriz biológica (plasma) e em solução. O fator de matriz normalizado (FMN) foi calculado de acordo com a fórmula apresentada na equação 2 a seguir.

$$FMN = \frac{\text{Área do analito na matriz} / \text{Área do PI na matriz}}{\text{Área do analito em solução} / \text{Área do PI em solução}} \quad (\text{eq. 2})$$

Os coeficientes de variação (% C.V.) dos efeitos do FMN de CQA e CQB foram calculados de acordo com a equação 3 e são mostrados na tabela 7 a seguir, os quais exibiram valores aceitáveis (inferiores a 15%), de acordo com os guias de validação (BRASIL, 2012; GONZÁLEZ *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2018).

$$\% C.V. = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Experimental Média}} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

Tabela 8 - Variabilidade da influência do efeito da matriz na determinação de PGE₂ em amostras de plasma (n = 5).

Concentration (ng/mL)	C.V. (%)
30	11,28
200	12,37

FONTE: Do autor.

A partir dos resultados da figura 20 é possível inferir que a matriz biológica do plasma não interfere na detecção da PGE₂, uma vez que não há a presença de picos no cromatograma da amostra branco de plasma no respectivo tempo de retenção deste analito. Junto disso, os efeitos de matriz (dados pelos valores de % C.V. em amostras de alta e baixa concentração de PGE₂, apresentados na tabela 7 anterior) corroboram para o fato de que a matriz do plasma não interfere expressivamente na detecção deste biomarcador da inflamação em amostras de plasma do ensaio anti-inflamatório *ex vivo* proposto.

A curva analítica para quantificação de PGE₂ foi obtida pela média de três curvas construídas individualmente a partir de 11 padrões de calibração de amostras de plasma fortificadas com diferentes concentrações de PGE₂ numa faixa entre 400 a 0,195 ng/mL. A curva de calibração foi plotada usando-se as razões entre as áreas dos picos de PGE₂ e PI contra a concentração correspondente de PGE₂ de cada padrão de calibração. A equação da curva analítica foi obtida por regressão linear ($y = 0.04341.x + 0.07256$) e o coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9996, demonstrando o ajuste linear adequado da curva.

Precisão e exatidão foram determinadas em quatro diferentes concentrações CQA, CQM, CQB (controle de qualidade de alta, média e baixa concentração, respectivamente) e LIQ – limite inferior de quantificação. A precisão de um método analítico representa a variação da concentração determinada para um analito em uma amostra, considerando-se ensaios diferentes. Estes diferentes ensaios podem compreender ensaios em um mesmo dia e num mesmo equipamento, consistindo da precisão intradia. A precisão intradia visa avaliar a dispersão dos resultados obtidos entre análises sucessivas de um método em um mesmo dia a fim de se determinar a repetitividade do mesmo. Além disso, pode-se determinar também a precisão interdia, que visa a avaliação da variabilidade dos resultados entre diferentes dias e

que é conhecida também por precisão intermediária (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009). Já a exatidão representa o grau de confiança entre valores determinados para uma amostra e um valor teórico de referência, tido como nominal. Os valores de exatidão também podem ser determinados para corridas em um mesmo dia (intradia) ou em dias distintos (interdia), assim como para a precisão (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009). Precisão é apresentada pelos valores de porcentagem do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (% C.V) (equação 3) e a exatidão como o erro padrão relativo (% E.P.R.), de acordo com a equação 4 a seguir.

$$\% E.P.R. = \frac{(\text{Concentração Média Experimental} - \text{Concentração Nominal})}{\text{Concentração Nominal}} \cdot 100 \quad (\text{eq. 4})$$

Todos os resultados de precisão e exatidão apresentaram valores adequados (inferiores a 15%) de acordo com o guia de validação (BRASIL, 2012) e são mostrados na tabela 8 a seguir. A concentração de 6,25 ng/mL testada, em ambos os experimentos intra e interdia, foi determinada como LIQ, uma vez que esta concentração foi a menor dentre as testadas e que forneceu valores adequados de precisão e exatidão.

A recuperação foi determinada comparando-se valores de concentração de PGE₂ nas amostras controle de qualidade (CQA, CQM e CQB) tanto na matriz do plasma quanto em solução. A recuperação pode ser entendida como a porcentagem do analito em uma determinada concentração em matriz biológica que pode ser extraída em relação ao mesmo analito em solução em concentração correspondente. Este parâmetro está diretamente relacionado à eficiência do método de extração utilizado no preparo de amostras e é também denominado mais especificamente como recuperação absoluta (CASSIANO *et al.*, 2009). Outro termo também definido por alguns autores é a recuperação relativa que compreende a razão das concentrações determinadas de um analito entre as amostras na matriz numa concentração correspondente (teoricamente iguais), antes e depois das etapas de preparo de amostra (SHINDE *et al.*, 2012). Os valores de recuperação absoluta e relativa foram calculados de acordo com as equações 5 e 6 e são mostradas na tabela 9 a seguir.

Tabela 9 - Resultados de precisão e exatidão intra e interdia obtidos por análises em LC-MS/MS para determinação dos níveis de PGE₂ em plasma (média ± DP).

Concentração Nominal (ng/mL)	Intradia (n = 6)			Interdia (n = 6)		
	Concentração Experimental (ng/nL) (média ± DP)	% C.V.	% E.P.R	Concentração Experimental (ng/nL) (média ± DP)	% C.V.	% E.P.R
6,25	5,47 ± 0,76	13,81	-12,54	5,34 ± 0,03	0,56	-14,52
30	31,75 ± 3,77	11,88	5,82	25,85 ± 2,66	10,30	-13,84
100	95,57 ± 13,79	14,43	-4,43	87,75 ± 7,52	8,57	-12,25
200	225,87 ± 16,80	7,44	12,93	184,73 ± 23,19	12,55	-7,63

FONTE: Do autor.

$$\% \text{ Recuperação Absoluta} = \frac{\text{Concentração Experimental na matriz biológica}}{\text{Concentração Experimental em Solução}} \cdot 100 \quad (\text{eq.5})$$

$\% \text{ Recuperação Relativa} =$

$$\frac{\text{Concentração na matriz biológica do analito adicionado antes do preparo de amostra}}{\text{Concentração na matriz biológica do analito adicionado depois do preparo de amostra}} \cdot 100 \quad (\text{eq. 6})$$

É possível observar pelos resultados da tabela 9 que o método apresentou taxas de recuperação absoluta que variaram entre 40 e 45%, aproximadamente. Já os valores de recuperação relativa foram aproximadamente o dobro, variando-se entre cerca de 70 a 91%. As altas taxas de recuperação relativa demonstram que a grande diferença da quantidade de PGE₂ entre amostras fortificadas com o padrão antes e depois da purificação por SPE deve-se principalmente ao método de extração no preparo das amostras.

Tabela 10 - Recuperação absoluta e relativa média em três diferentes concentrações em triplicatas (n = 3).

Concentração (ng/mL)	% Recuperação Absoluta	% Recuperação Relativa
30	42,54	70,44
100	39,73	90,72
200	44,65	90,74

FONTE: Do autor.

É importante destacar que embora a recuperação absoluta tenha apresentado taxas médias de cerca de 42%, o método de preparo de amostras de plasma por SPE mostrou-se preciso e exato e de acordo com os valores obtidos por Galvão *et al.* (2016), no qual o método utilizado neste presente trabalho foi baseado. Além disso, a metodologia utilizada propõe o uso de poucos passos na purificação de PGE₂ e menor quantidade de solventes, compreendendo um método de preparo de amostra mais rápido e barato quando comparado com outros descritos na literatura e que provêm resultados adequados de validação de acordo com os guias de validação (BRASIL, 2012; GONZÁLEZ *et al.*, 2014; MEIRELLES, 2016).

Os efeitos da temperatura e tempo na estabilidade de diversos eicosanoides, entre eles PGE₂ e LTB₄ foram estudados em alguns trabalhos na literatura. Foi mostrado que a estabilidade destes compostos é favorecida quando mantidos a baixas temperaturas e que mesmo sob estas condições, ainda assim existe degradação dos mesmos (MADDIPATI, ZHOU, 2011). Baseando-se neste trabalho, é que o manuseio das amostras durante todo o seu preparo até o momento da injeção em LC-MS/MS foram mantidas em gelo e protegidas da luz.

Uma vez que as amostras de plasmas foram mantidas no gelo desde o processamento até o momento exato da injeção e análise por LC-MS/MS, o estudo de estabilidade da PGE₂ nestas amostras foi feito somente sob duas condições nas concentrações CQA e CQB: estabilidade de curta duração, que compreendeu o tempo de preparo e análise de um pequeno conjunto de apenas 10 amostras, e a estabilidade de longa duração que inclui o tempo em que todas as amostras processadas foram mantidas no gelo e em baixas temperaturas, desde o seu processamento até a análise da última amostra testada no ensaio *ex vivo* (cerca de 36 h). O estudo de estabilidade foi realizado analisando-se os valores de precisão e exatidão das amostras os quais são exibidos na tabela 10 a seguir.

Tabela 11 - Estabilidade da PGE₂ em amostras de plasma sob diferentes condições analisadas (média ± DP, n = 3).

Concentração Nominal	30 ng/mL			200 ng/mL		
	Concentração Experimental (ng/mL)	% C.V.	% E.P.R.	Concentração Experimental (ng/mL)	% C.V.	% E.P.R.
Pós-Processamento	32,07 ± 4,46	13,91	6,91	225,87 ± 16,80	7,44	12,93
Curta Duração	34,06 ± 1,91	5,59	13,55	228,33 ± 11,55	5,06	14,16
Longa Duração	26,87 ± 0,10	0,37	-10,45	200,88 ± 0,19	0,10	0,44

FONTE: Do autor.

Os valores da tabela 10 anterior apontam que nenhuma degradação substancial da PGE₂ foi observada durante os diferentes períodos de análise das amostras (de acordo com a variação da precisão e exatidão, que foram inferiores a 15 %).

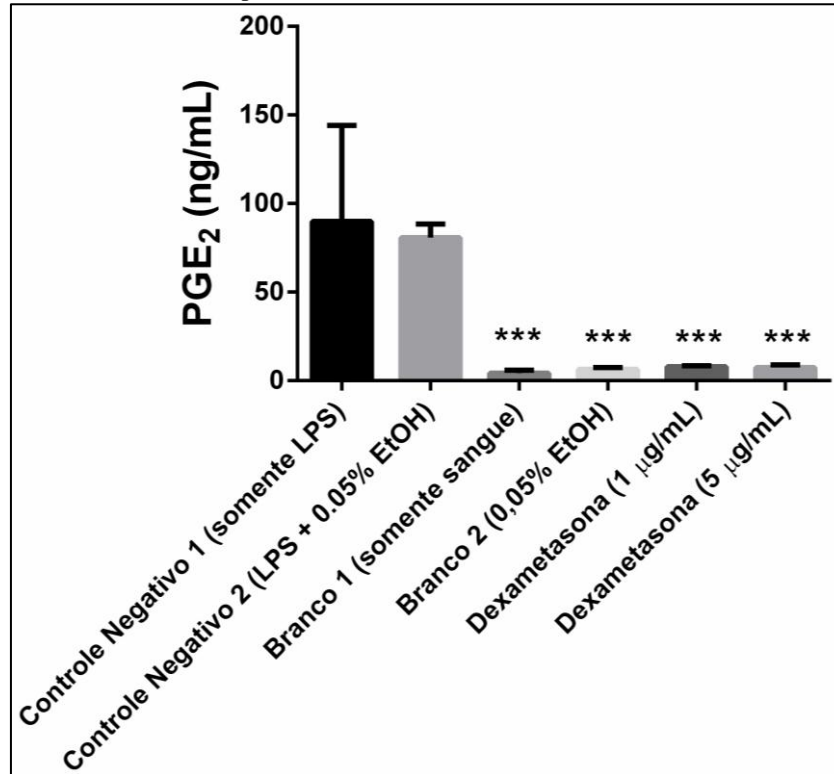
Em suma, tendo-se em vista todas as figuras de mérito determinadas e com valores satisfatórios, de acordo com os guias de validação, tem-se que a metodologia proposta para extração e análise por LC-MS/MS para quantificação de PGE₂ nas amostras de plasma advindas do ensaio *ex vivo* é eficiente e confiável.

4.4.3.3 Otimização da concentração do fármaco dexametasona como controle positivo no ensaio *ex vivo* no sangue humano

Duas diferentes concentrações (1 e 5 µg/mL) da dexametasona (fármaco de referência a ser utilizado como controle positivo no ensaio *ex vivo*) foram testadas e comparadas com amostras do controle negativo 1 (sangue induzido à inflamação com LPS e sem tratamento) e controle negativo 2 (sangue induzido à inflamação com LPS e 0,05% de etanol). Foram incluídas ainda neste teste amostras branco (sem indutor da inflamação), contendo somente o sangue (Branco 1) ou sangue e etanol a 0,05% de concentração final (Branco 2). O teste foi realizado em 4 replicatas e PBS foi o meio de cultura utilizado como diluente para todos os grupos de amostra testados (considerando-se o volume final de 250 µL em cada poço da placa). Os resultados são mostrados no gráfico da figura 21 a seguir e visou comparar a redução ou inibição da produção de PGE₂ entre as amostras testadas. A redução da produção de PGE₂ por ação de amostras diversas, quando comparado com o controle negativo (sem a ação de uma amostra) representa a capacidade de inibição destas na via da COX ou mesmo de liberação do AA (inibição da PLA₂) no processo inflamatório. Desta forma, a avaliação da inibição da produção de PGE₂ neste bioensaio proposto permitiu avaliar o potencial anti-inflamatório destas amostras.

Pelo gráfico da figura 21 é possível notar que dexametasona na concentração de 1 µg/mL mostrou-se tão eficiente na inibição da produção de PGE₂ quanto a 5 µg/mL quando comparados com o controle negativo 1 (grupo induzido à inflamação porém não tratado). Isto levou ao uso dos controles positivos (dexametasona e indometacina) na concentração de 1 µg/mL no ensaio *ex vivo* para triagem dos extratos de plantas da família Fabaceae (descrito na seção 4.4.3.4 a seguir). Além disso, não foi possível observar produção significativa de PGE₂ nas amostras branco 1 e 2 (sem indução da inflamação por LPS) quando comparados com o controle negativo 1. Este fato mostrou que o LPS é realmente eficaz e necessário na indução da produção de PGE₂ no ensaio *ex vivo*. Adicionalmente, foi possível observar ainda que a concentração final de etanol (0,05%) contida nos controles positivos não influencia significativamente na produção de PGE₂, uma vez que não houve redução considerável na produção deste analito (comparando-se os controles negativos 1 e 2). Por fim, foi possível inferir ainda que o etanol na concentração utilizada no controle positivo não afeta a eficácia do fármaco de referência (comparando-se os brancos 1 e 2), por não apresentarem diferenças significativas nas quantidades de PGE₂ produzidas entre esses grupos.

Figura 21 - Teste inicial da análise da produção de PGE₂ por LC-MS/MS sob diferentes condições de incubação no ensaio anti-inflamatório *ex vivo* em sangue humano, para determinação da concentração dos fármacos de referência a serem usados como controle positivo.



FONTE: Do autor.

Legenda: O teste foi realizado em quadruplicatas ($n = 4$) e os grupos de amostras foram comparados usando ANOVA *one-way* seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett. O gráfico apresenta a média \pm desvio padrão (DP) e *** representa diferença estatística comparado com o controle negativo ($p \leq 0,001$).

4.4.3.4 Avaliação do potencial anti-inflamatório de extratos vegetais pela inibição da produção de PGE₂ usando o ensaio *ex vivo* em sangue humano

O ensaio *ex vivo* em sangue humano foi realizado como teste de triagem, dentre as 47 espécies da família Fabaceae obtidas, para seleção daquelas mais promissoras para o estudo com outros ensaios complementares de avaliação farmacológica anti-inflamatória. Para isso, sangue humano fresco e heparinizado foi incubado em 4 replicatas com amostras de cada extrato de planta preparado (a 10 µg/mL de concentração final) ou fármacos de referência a 1 µg/mL de concentração final – dexametasona ou indometacina (controles positivos do ensaio) – juntamente com LPS para indução da inflamação (a 10 µg/mL de concentração final) (usando PBS como meio de cultura para diluição em todas as amostras). Controle negativo foi incluído no ensaio contendo somente sangue e LPS para comparação dos níveis de produção de PGE₂ entre as amostras. O volume final em cada poço foi de 250 µL. Os resultados da

triagem do potencial anti-inflamatório *ex vivo* foram obtidos por comparação entre os níveis de PGE₂ produzidos nas amostras testadas e os controles negativo e positivo. A tabela 11 a seguir mostra a média e o desvio padrão (DP) da produção de PGE₂ em cada amostra.

Tabela 12 - Níveis de PGE₂ (em ng/mL) produzidos no sangue humano estimulado por LPS e tratados com diferentes extratos de plantas ou fármacos de referência (média ± DP, n = 4).

Amostra	[PGE ₂] (ng/mL)	Amostra	[PGE ₂] (ng/mL)	Amostra	[PGE ₂] (ng/mL)
Controle Negativo	8,95 ± 1,27	15	33,98 ± 18,70	32	44,71 ± 31,41
Dexametasona	5,37 ± 0,55*	16	32,60 ± 13,62	33	41,24 ± 20,16
Indometacina	3,86 ± 0,29*	17	13,58 ± 3,90	34	7,41 ± 1,38*
1	5,57 ± 0,69*	18	5,58 ± 1,17*	35	5,18 ± 0,66*
2	11,42 ± 3,85*	19	29,41 ± 14,84	36	19,98 ± 11,55
3	18,66 ± 8,14	20	8,37 ± 5,06*	37	35,91 ± 18,81
4	17,27 ± 7,66	21	27,35 ± 11,13	38	48,10 ± 20,51
5	21,35 ± 7,26	22	12,72 ± 4,57	39	51,88 ± 23,73
6	46,54 ± 22,88	23	19,31 ± 8,82	40	12,50 ± 5,16
7	46,27 ± 23,43	24	37,54 ± 17,50	41	17,00 ± 6,10
8	13,92 ± 4,09	25	41,48 ± 19,95	42	8,01 ± 0,71*
9	13,30 ± 4,63	26	9,26 ± 2,21*	43	20,46 ± 24,62
10	23,27 ± 11,27	27	13,73 ± 5,23	44	12,91 ± 5,99
11	20,63 ± 12,64	28	13,38 ± 4,22	45	9,23 ± 1,75*
12	16,36 ± 6,23	29	41,77 ± 24,38	46	13,36 ± 3,84
13	6,62 ± 0,42*	30	28,95 ± 3,05	47	28,53 ± 14,12
14	8,57 ± 1,21*	31	39,51 ± 20,50	-	-

FONTE: Do autor.

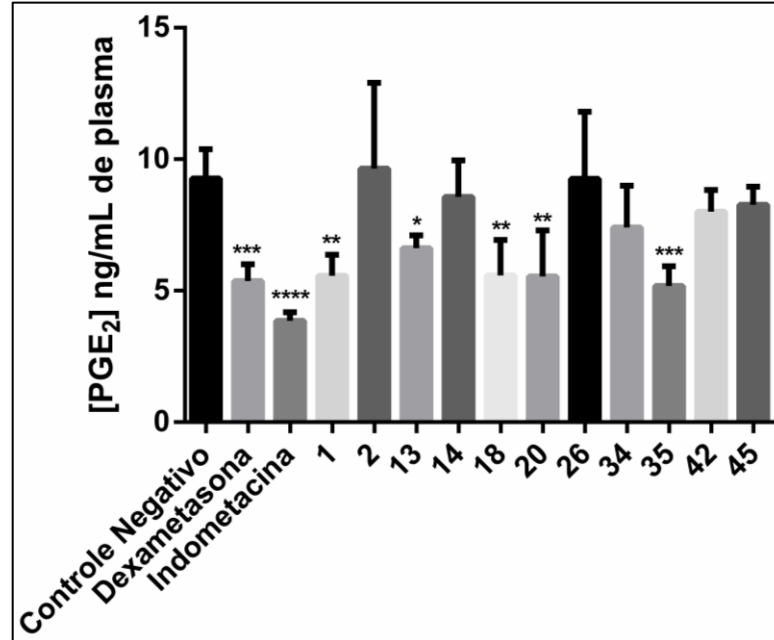
Legenda: *Valores de concentração média de PGE₂ inferiores a 12 ng/mL.

A partir dos valores de concentração de PGE₂ produzida no sangue induzido à inflamação e tratado com diferentes amostras (tabela 11) é possível observar que algumas das espécies de plantas testadas resultaram na produção de PGE₂ a níveis mais altos do que o controle negativo. Isso permite inferir que os extratos destas espécies possivelmente possuem propriedades pró-inflamatórias no sangue. O ensaio *ex vivo* proposto visa a selecionar somente aquelas espécies que causem diminuição na produção deste mediador da inflamação (atividade anti-inflamatória). Desta forma, determinou-se que somente aquelas amostras de extrato que apresentaram níveis de PGE₂ de até 12 ng/mL fossem comparadas estatisticamente com o controle negativo. Assim, somente tais amostras foram comparadas estatisticamente com as do controle negativo por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e os resultados são mostrados no gráfico da figura 22 a seguir.

Os resultados da tabela 11 mostram que dentre os 47 extratos de espécies vegetais testados no ensaio *ex vivo* no sangue, somente onze exibiram concentração de PGE₂ inferiores a 12 ng/mL. As análises estatísticas de comparação destas espécies com o controle negativo (figura 22 a seguir) apontaram que somente cinco espécies apresentaram valores de PGE₂ inferiores e significativamente diferentes do controle negativo; além disso, elas não apresentaram diferença estatística quando comparadas com os controle positivos (dexametasona e indometacina) indicando o potencial anti-inflamatório destas espécies. São elas: *A. polyphylla* (1), *P. pluviosa* (13), *E. contortisiliquum* (18), *H. balansae* (20) e *P. dubium* (35). Todos os extratos foram testados a 10 µg/mL e os fármacos de referência a 1 µg/mL. Butterweck and Nahrstedt (2012) sugerem que para bioensaios *in vitro*, a concentração máxima aceitável para extratos brutos seja de até no máximo 100 µg/mL. Assim, pode-se considerar que a concentração relativamente baixa em que as amostras vegetais foram testadas neste trabalho reflete o potencial farmacológico promissor no tratamento da inflamação, tendo-se em vista que o ensaio *ex vivo* se aproxima mais da abordagem *in vivo* que da *in vitro*.

É importante ressaltar também que nem todas as amostras inativas no bioensaio *ex vivo* no sangue humano também devem necessariamente se apresentar como inativas no teste anti-inflamatório *in vivo*, uma vez que naquele avalia-se apenas um dos principais mediadores da inflamação e uma única dose (BUTTERWECK, NAHRSTEDT, 2012). Assim, as outras espécies deste estudo podem se apresentar ativas quanto à atividade anti-inflamatória em doses mais altas ou mesmo por outros mecanismos de ação. Assim, a abordagem aqui apresentada representa somente mais uma das alternativas para seleção de amostras para estudos quanto ao potencial anti-inflamatório.

Figura 22 - Comparação dos níveis de PGE₂ (em ng/mL) produzidos pelo sangue humano induzido por LPS e tratado com diferentes amostras de extratos vegetais e fármacos de referência. A triagem para determinação da atividade anti-inflamatória das amostras foi feita em quadruplicatas (n = 4) e os grupos foram comparados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação de Dunnett.



FONTE: Do autor

Legenda: O gráfico apresenta os valores de média \pm DP. Diferenças estatísticas apresentadas por *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$), ***($p \leq 0.001$), ****($p \leq 0.0001$) quando comparados com o controle negativo.

Os resultados até aqui apresentados comprovam que a produção de IL-10 e PGE₂ é fortemente induzida sob condições inflamatórias. Sabe-se que a produção de ambos mediadores está fortemente correlacionada, onde o aumento dos níveis de PGE₂ leva ao aumento da produção de IL-10. Vale a pena ressaltar que este mecanismo orquestrado de produção entre estes dois mediadores, caracterizam principalmente o início da resolução das respostas inflamatórias (TANG *et al.*, 2017). Entretanto, a resolução por si e restabelecimento da homeostase do sistema é complexo e envolve diversos outros mediadores. Desta forma, é plausível que a ação das amostras de extratos vegetais das diferentes espécies testadas não tenha apresentado redução dos níveis de IL-10 e PGE₂ simultaneamente. Contudo, a ação destas amostras nos níveis destes mediadores representa o mecanismo de ação em específico delas, onde assim quanto maior o número de mecanismos de ação em que uma amostra está envolvida maior seu potencial anti-inflamatório.

4.4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* por inibição do edema de orelha

Os extratos das cinco espécies que apresentaram potencial anti-inflamatório no ensaio *ex vivo* em sangue humano de inibição da produção de PGE₂ [*A. polyphylla* (1), *P. pluviosa* (13), *E. contortisiliquum* (18), *H. balansae* (20) e *P. dubium* (35)] foram seguidamente avaliadas quanto à atividade anti-inflamatória *in vivo* em ratos. O teste foi realizado em 8 replicatas (n = 8) para cada grupo de amostra e avaliou o potencial de inibição do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os resultados são apresentados a seguir, onde a tabela 12 mostra os valores de porcentagem de inibição do edema de orelha das amostras de extrato testadas (considerando-se a média do edema de cada grupo). O gráfico da figura 23 apresenta a análise estatística comparativa delas com os controles positivo e negativo por ANOVA *one-way* seguida do teste comparativo de Dunnett entre elas.

Tabela 13 - Valores de % de inibição do edema de orelha das amostras testadas no ensaio anti-inflamatório *in vivo* em camundongos (n = 8).

Amostra	% Inibição
Dexametasona	64.10*
Indometacina	61.89*
<i>Acacia polyphylla</i> (1)	50.12*
<i>Poincianella pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> (13)	70.90**
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (18)	41.52*
<i>Peltophorum dubium</i> (20)	34.62
<i>Holocalyx balansae</i> (35)	41.26*

FONTE: Tabela adaptada com dados próprios do autor e de Domingos *et al.* (2019).

Legendas: *Amostras com valores de edema estatisticamente diferentes do controle negativo, comparados por ANOVA *one-way* seguido de teste comparativo de Dunnett ($p \leq 0.05$).

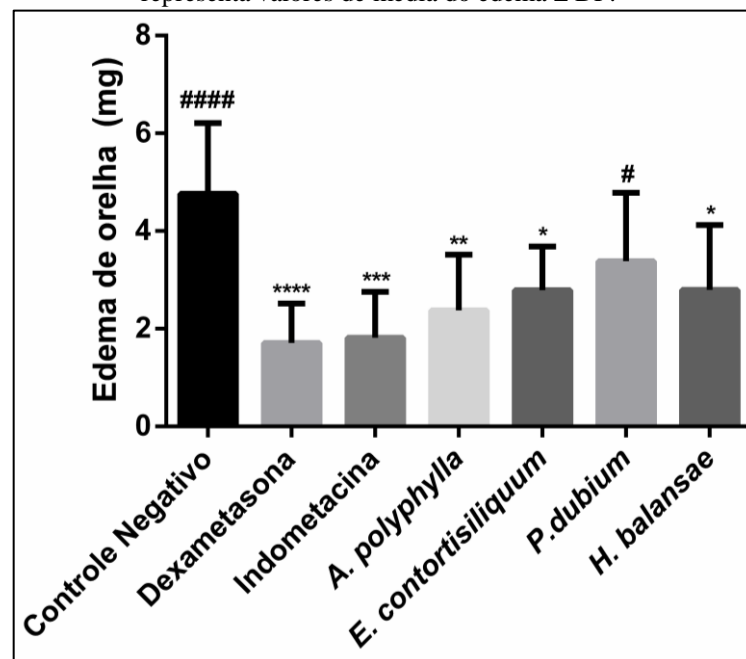
**Resultado obtido de DOMINGOS *et al.* (2019).

O valor da porcentagem de inibição do edema de orelha no ensaio *in vivo* do extrato de *P. pluviosa* (13) foi obtido do trabalho de Domingos e seus colaboradores (2019), e por isso o resultado desta espécie não foi incluso no gráfico da análise de comparação estatística da figura 23. Contudo, analisando-se a tabela 12 observou-se que o extrato desta espécie exibiu uma média de 70% na inibição do edema de orelha o que indica o grande potencial farmacológico da espécie no tratamento da inflamação (DOMINGOS *et al.*, 2019). Além disso, comparando-se com os resultados das outras espécies de Fabaceae analisadas, esta foi a que apresentou melhor resultado na inibição do edema de orelha dentre aquelas ativas no ensaio *ex vivo* deste trabalho.

De modo geral, a análise estatística comparativa do gráfico da figura 23 juntamente com os dados da tabela 12 permitiram inferir que quatro dentre as cinco espécies vegetais ativas no ensaio anti-inflamatório *ex vivo* no sangue exibiram inibição considerável do edema de orelha *in vivo*. Foram elas: *A. polyphylla* (1), *P. pluviosa* (13), *E. contortisiliquum* (18), e *H. balansae* (20). Os

resultados estatísticos apontaram valores de inibição similares com os fármacos de referência indometacina e dexametasona e diferentes do controle negativo, destacando o grande e promissor potencial anti-inflamatório destas espécies de Fabaceae. A espécie *P. dubium* (35) apesar de ter apresentado redução do edema sem diferenças estatísticas quando comparado com indometacina, apresentou diferença quando comparado com os resultados da dexametasona, o que não permitiu inferir seguramente acerca de sua atividade anti-inflamatória na inibição do edema de orelha.

Figura 23 - Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* em ratos por inibição do edema de orelha das amostras ativas no ensaio de triagem *ex vivo* em sangue humano. O teste foi realizado em grupos de oito replicatas ($n = 8$) e comparados estatisticamente por ANOVA *one-way* seguido do teste comparativo de Dunnett. O gráfico representa valores de média do edema \pm DP.



FONTE: Do autor.

Legenda: A diferença estatística entre os grupos comparados com o controle negativo é representada por *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$) e ****($p \leq 0.0001$).

#($p \leq 0.05$) e #####($p \leq 0.0001$), comparados com dexametasona.

Os extratos da maioria das espécies vegetais da família Fabaceae, ativos em ambos os ensaios *ex vivo* e *in vivo* neste trabalho, já foram relatados na literatura quanto ao potencial anti-inflamatório com diferentes mecanismos de ação. Um inibidor de proteinase da espécie *E. contorsiliquum* apresentou uma redução significativa do número de moléculas e células envolvidas na inflamação, bem como de células positivas para iNOS e eNOS, o que determina o potencial de inibição do estresse oxidativo (THEODORO-JÚNIOR *et al.*, 2017). Estudos de moléculas, com atividade anti-inflamatória, isoladas a partir de *H. balansae* também já foram

mencionados na literatura (LÓ, DUARTE, 2011; POONGOTHAI, SRIPATHI, 2013). Apesar de amostras de extrato e frações de outras espécies do gênero *Acacia* já terem sido apresentadas na literatura com potencial anti-inflamatório (BUKHARI *et al.*, 2010; LEAL *et al.*, 2016), é a primeira vez que a espécie *A. polyphylla* é relatada com propriedades anti-inflamatórias. Domingos *et al.* (2019) relatou a atividade anti-inflamatória de diferentes extratos e frações de *P. pluviosa* em diferentes mecanismos de ação.

Apesar da maioria das espécies ativas nos ensaios *ex vivo* e *in vivo* já terem relatos quanto ao potencial anti-inflamatório, este trabalho apresenta uma nova abordagem para avaliação desta atividade farmacológica, seja de extratos de espécies vegetais ou de outros organismos vivos ou mesmo substâncias isoladas (sintéticas ou de produtos naturais). O ensaio *ex vivo* desenvolvido e proposto neste trabalho representa um método de triagem para um grande número de amostras diversas, principalmente aquelas que não possuem relatos de sua atividade anti-inflamatória. A partir dele é possível selecionar aquelas que apresentem tal propriedade, pela inibição da produção de PGE₂, para que possam ser submetidas a outros testes como ensaios *in vitro* com kits específicos ou *in vivo* em animais, para estudo de seus diferentes mecanismos de ação na terapia da inflamação. Além disso, o uso de grande número de animais foi evitado uma vez que o ensaio *ex vivo* no sangue humano permitiu guiar somente algumas das amostras para o *in vivo*.

4.4.5 Dosagem da atividade de MPO nos fragmentos de orelha advindos do ensaio *in vivo*

A partir dos fragmentos de orelha obtidos do ensaio de inibição de edema *in vivo* em ratos pôde-se quantificar a atividade de enzimas MPO presentes nestas amostras. É comum se relacionar a atividade de MPO, uma enzima presente principalmente nos neutrófilos, à quantidade de LTB₄ em amostras biológicas. Os neutrófilos são células do sistema imune envolvidas nos processos inflamatórios e recrutadas por quimiotaxia no local da inflamação principalmente pelo LTB₄, um dos metabólitos da via das LOX. Deste modo, a quantificação de MPO em fragmentos de orelha permitiria inferir acerca de uma possível inibição da via das LOX, de modo indireto (AFONSO *et al.*, 2012; BARONE *et al.*, 1995; BRADLEY *et al.*, 1982; NOIRI *et al.*, 2000). Entretanto, o recrutamento de neutrófilos não está exclusivamente relacionado às elevadas concentrações de LTB₄, mas também de outros agentes quimiotáticos como IL-8 e outros quimioatraentes, indicando a não especificidade do ensaio da atividade de MPO quanto aos níveis de LTB₄ numa amostra biológica (HAVIXBECK *et al.*, 2016; KAPLANSKI *et al.*, 2003). Desta forma, o ensaio de quantificação de MPO permite

relacionar de forma genérica o potencial anti-inflamatório por inibição do recrutamento de neutrófilos e uma possível inibição na via das LOX.

A comparação dos grupos de amostras testadas quanto à atividade de MPO foi realizada a partir dos valores da absorbância. A média e desvio padrão dos valores de absorbância dos grupos de amostras testadas no ensaio são apresentados na tabela 13 a seguir. O ensaio para espécie *P. pluviosa* já havia sido realizado no trabalho publicado por Domingos e colaboradores (2019) e por isso, os resultados não puderam ser comparados estatisticamente com os controles negativo e positivo deste trabalho. O controle positivo utilizado no ensaio foi a dexametasona, um anti-inflamatório esteroidal descrito por reduzir a concentração de agentes quimiotáticos dos neutrófilos, suprimindo o recrutamento destes (INAMURA *et al.*, 2001).

Tabela 14 - Valores médios de absorbância do ensaio de recrutamento de neutrófilos das espécies de Fabaceae testadas no ensaio *in vivo*.

Amostras	Absorbância média ± DP
Controle Negativo	1,26 ± 0,35
Dexametasona	0,43 ± 0,09**
<i>A. polyphylla</i> (1)	0,62 ± 0,10*
<i>P. pluviosa</i> (13)	0,48 ± 0,15*#
<i>E. contortisiliquum</i> (18)	0,78 ± 0,32
<i>H. balansae</i> (20)	1,51 ± 0,59
<i>P. dubium</i> (35)	1,17 ± 0,27

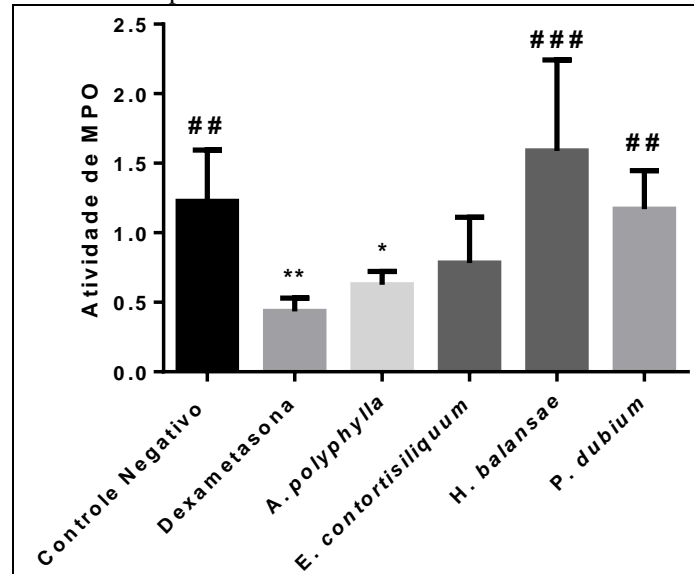
FONTE: Tabela adaptada com dados próprios do autor e de Domingos *et al.* (2019).

Legenda: Amostras com valores de edema estatisticamente diferentes do controle negativo, comparados por ANOVA *one-way* seguido de teste comparativo de Dunnett com *(p ≤ 0.05) e ** (p ≤ 0.01).

#Resultado obtido de DOMINGOS *et al.* (2019).

Como já citado, Domingos *et al.* (2019) já havia demonstrado a potencial de inibição do recrutamento de neutrófilos do extrato de *P. pluviosa*. Além disso, *A. polyphylla* apresentou também potencial anti-inflamatório por este mecanismo de ação, comprovado por meio dos resultados que se apresentaram estatisticamente diferentes do controle negativo. A partir do gráfico da figura 24 pôde-se observar ainda que a espécie *E. contortisiliquum* apresentou nenhuma diferença estatística nos valores de atividade MPO comparados com ambos os controles negativo e positivo. Este resultado sugere que a atividade de MPO apresentado por esta espécie possui valores estatisticamente intermediários entre os controles e sua atividade anti-inflamatória por este mecanismo de ação não pôde ser determinada.

Figura 24 - Avaliação da atividade anti-inflamatória por inibição do recrutamento de neutrófilos das amostras testadas no ensaio *in vivo* de edema de orelha. O teste foi realizado em grupos de oito replicatas ($n = 8$) e comparados estatisticamente por ANOVA *one-way* seguido do teste comparativo de Dunnett. O gráfico representa valores de média do edema \pm DP.



FONTE: Do autor.

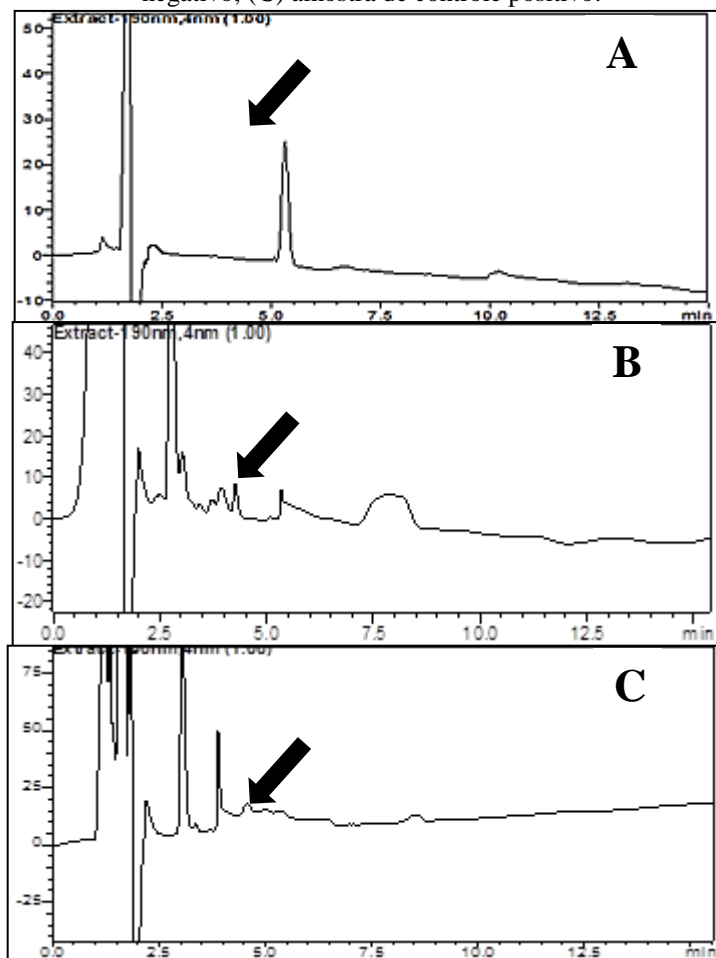
Legenda: A diferença estatística entre os grupos comparados com o controle negativo é representada por * ($p \leq 0.05$) e ** ($p \leq 0.01$). ## ($p \leq 0.01$) e ### ($p \leq 0.001$), comparados com dexametasona.

4.5 DETERMINAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PGE₂ EM FRAGMENTOS DE ORELHA E ANÁLISE POR LC-UV-DAD

Inicialmente, o perfil cromatográfico por LC-UV-DAD de uma solução 1 mg/mL de PGE₂ diluída em acetonitrila foi injetada a fim de se obter o tempo de retenção do analito bem como sua curva de absorção no UV para sua identificação na amostra biológica. O pico referente à PGE₂ se apresentou com tempo de retenção de 5,3 min (figura 25) com máximo de absorção em 190 nm, resultado este que corrobora com estudos prévios da literatura (TERRAGNO *et al.*, 1981).

Sendo assim, diversas metodologias de preparo de amostra foram testadas com fragmentos de orelha do controle negativo do teste *in vivo* realizado previamente (aquelas que foram induzidas à inflamação e não foram tratadas, onde se espera encontrar assim maior quantidade do PGE₂ em relação aos demais grupos do teste *in vivo*). As amostras preparadas foram analisadas por LC-UV-DAD para monitoramento e detecção do analito de interesse.

Figura 25 - Cromatogramas obtidos por LC-UV-DAD:
(A) solução padrão de PGE₂; (B) amostra de controle negativo; (C) amostra de controle positivo.



FONTE: Do autor.

A amostra foi analisada por LC-UV-DAD no mesmo método cromatográfico que a solução de padrão de PGE₂. Pôde-se observar a presença de um pico característico com mesmo tempo de retenção (5,3 min, aproximadamente) e mesmo máximo de absorção no UV, permitindo inferir que o método de preparo de amostra permitia extrair quantidades detectáveis de PGE₂. Com isso, o mesmo procedimento de preparo de amostra foi realizado para fragmentos do controle positivo, aqueles em que tiveram tratamento e assim se esperaria quantidades reduzidas de PGE₂. A análise do cromatograma obtido permitiu observar a ausência de PGE₂ nestas amostras, corroborando com resultados já esperados obtidos pelo teste *in vivo*. Apesar do método de preparo de amostras utilizado ter permitido a extração de quantidades detectáveis de PGE₂ nos fragmentos de orelha, os picos apresentaram valores muito baixos de área, indicando a baixa sensibilidade da técnica na detecção deste analito. Deste modo, decidiu-se pelo desenvolvimento do método de quantificação de PGE₂ nos fragmentos de orelha, bem como de outros eicosanoides envolvidos no processo inflamatório,

por LC-MS/MS que se apresenta como uma técnica mais sensível (MARTINS-JÚNIOR *et al.*, 2006) quando comparado com LC-UV-DAD. Os cromatogramas da solução do padrão de PGE₂ e das amostras de fragmento de orelha dos controles negativo e positivo do teste *in vivo* são mostrados na figura 25 e permitem a visualização dos resultados anteriormente descritos.

4.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂ e LTB₄ POR LC-MS/MS EM AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA ORIUNDOS DE ENSAIO *IN VIVO*

A etapa inicial para o início da validação do método para quantificação de PGE₂ e LTB₄ nas amostras de fragmentos de orelha advindos do ensaio *in vivo* de edema de orelha consistiu na injeção em triplicata dos padrões de cada analito variando-se a concentração na faixa entre 500 e 0,06 ng/mL (compreendendo 7 pontos) na matriz e na solução, contendo em cada uma das soluções diferentes concentrações de PGE₂ e LTB₄ e o PI na concentração de 25 ng/mL, para construção das curvas de calibração. Os valores de R² superiores a 0,99 para cada um dos analitos em matriz e em solução (tabela 14 a seguir) demonstram que ambos os analitos apresentam linearidade de detecção na faixa de concentração analisada, seja na matriz biológica ou em solução. Isso permite inferir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo e os dados estão de acordo com as exigências da ANVISA (BRASIL, 2017).

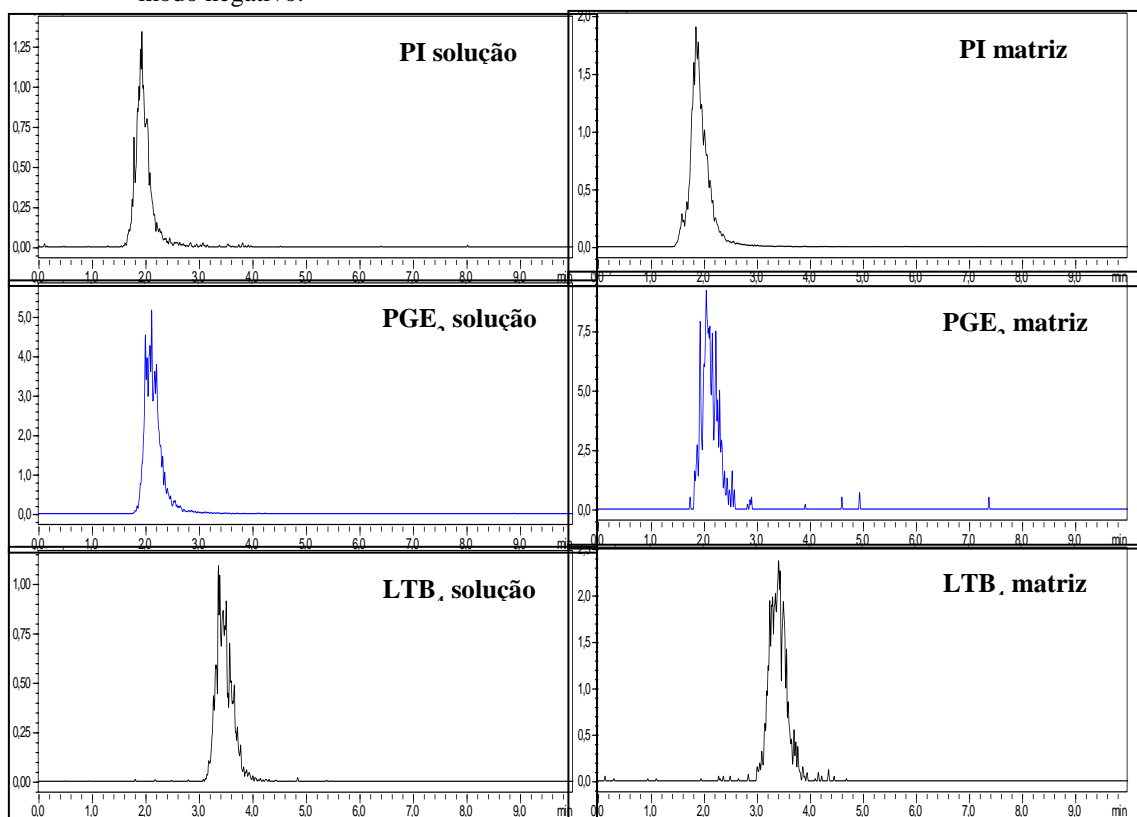
Tabela 15 - Equações das retas das curvas de calibração para PGE₂ e LTB₄ e seus respectivos coeficientes de correlação.

Analito	Equação da reta ($y = a \cdot x + b$)	R ² (Coeficiente de Correlação)
PGE ₂ matriz	$y = 307,0 \cdot x + 479,6$	0,9967
LTB ₄ matriz	$y = 323,1 \cdot x - 68,7$	0,9991
PGE ₂ solução	$y = 1230,0 \cdot x - 929,5$	0,9925
LTB ₄ solução	$y = 730,8 \cdot x + 3495,0$	0,9976

FONTE: Do autor.

Os cromatogramas apresentados na figura 26 a seguir permitem observar detecção dos compostos em análise na matriz biológica comparado em solução. Além disso, é possível se observar ainda que apesar do PI e PGE₂ apresentarem picos com tempos de retenção minuciosamente próximos, eles não interferem na detecção entre si, por utilizarem transições de *m/z* distintas no método SRM, o que permite inferir sobre a alta seletividade do método SRM para detecção de PGE₂ e LTB₄, uma vez que somente picos referentes aos analitos são detectados e registrados.

Figura 26 - Cromatogramas obtidos com novo método cromatográfico em solução e em matriz biológica do (limite superior de quantificação – LSQ) do PI, PGE₂ e LTB₄ por detecção por SRM no modo negativo.



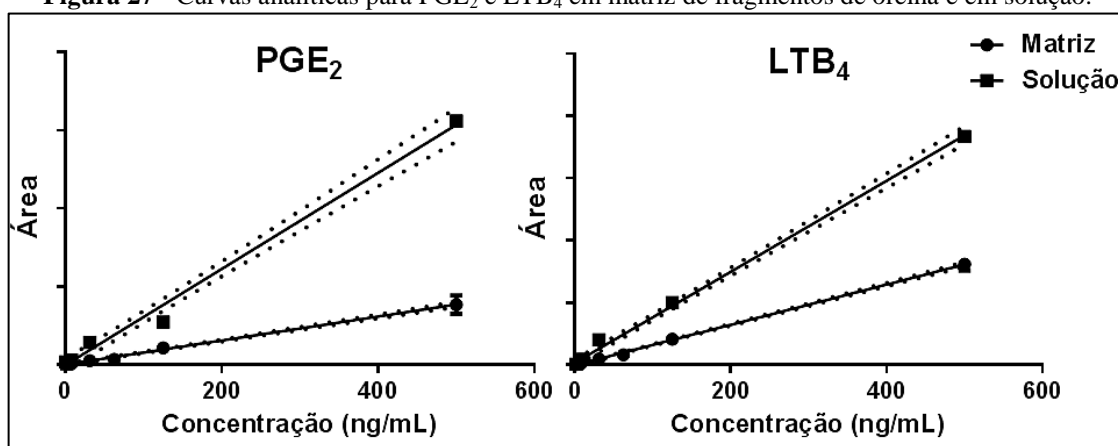
FONTE: Do autor.

O limite de quantificação (LQ) do método foi determinado como a concentração da solução padrão de menor valor utilizada para a construção da curva analítica, com valor igual a 1,95 ng/mL.

A seletividade representa a capacidade do método desenvolvido de detectar seletivamente um composto na presença de outras diversas substâncias sem interferência na intensidade no sinal do mesmo, na análise de amostras complexas. A determinação da seletividade de um método pode ser dada também pela comparação dos coeficientes angulares (inclinações) das curvas de cada analito na matriz biológica e em solução. Deste modo, quanto mais próximo os valores desses coeficientes, ou seja, quanto mais paralelas as curvas em matriz e solução, mais seletivo é o método desenvolvido (RIBANI *et al.*, 2004).

Comparando-se os valores de coeficientes angulares das curvas analíticas construídas em matriz biológica e em solução, para cada um dos analitos (tabela 14), é possível observar que em ambos os casos, as inclinações (coeficientes angulares) das curvas dos analitos PGE₂ e LTB₄ em matriz são significativamente distintas das curvas em solução, representando assim o não paralelismo entre as retas obtidas. A figura 27 a seguir permite comparar visualmente a inclinação entre as duas curvas analíticas obtidas para PGE₂ e LTB₄, respectivamente.

Figura 27 - Curvas analíticas para PGE₂ e LTB₄ em matriz de fragmentos de orelha e em solução.



FONTE: Do autor.

A figura 27 permite observar ainda que para ambos os analitos PGE₂ e LTB₄, as curvas em solução possuem uma maior inclinação se comparado com as respectivas curvas em matriz. Isso permite inferir que as curvas em solução possuem maior sensibilidade quando comparadas com as construídas em matriz. Isso se deve ao fato de que na matriz há grande quantidade de compostos presentes que saem co-eluídos juntos dos analitos de interesse. Deste modo, ocorre uma co-ionização de muitas moléculas simultaneamente, que causa supressão dos íons do analito e consequente redução da detecção dos mesmos, diminuindo assim a sensibilidade do método quando comparado com os compostos puros em solução (SILVA *et al.*, 2015; TAYLOR, 2005). Deste modo, pode-se inferir que há um efeito de matriz considerável que causa supressão iônica aos íons de detecção dos analitos, mesmo utilizando-se transições de m/z específicas de cada analito.

Apesar da grande seletividade ou mesmo especificidade reconhecida no método de monitoramento SRM por LC-MS/MS, onde apenas o sinal do analito de interesse é registrado, ainda assim é possível haver interferências da matriz, onde substâncias mesmo invisíveis ao sinal registrado pelo método SRM em LC-MS/MS podem provocar interferência na detecção (intensidade) do analito (GOSETTI *et al.*, 2010).

O efeito de matriz foi avaliado baseando-se no trabalho de Preste (2007) que relaciona a inclinação da curva (coeficiente angular da reta) de um analito na matriz com a inclinação da curva analítica obtida em solução de acordo com a equação 7 a seguir:

$$\text{Efeito de Matriz (\%)} = \frac{(a_{\text{matriz}} - a_{\text{solução}})}{a_{\text{solução}}} \times 100 \quad (\text{eq. 7})$$

onde a é o coeficiente angular da equação da reta obtida pela curva analítica.

Tabela 16 - Valores de % de efeito de matriz para PGE₂ e LTB₄ baseado em cálculos segundo Preste (2008).

Analito	Efeito de Matriz (%)
PGE ₂	75,04
LTB ₄	55,79

FONTE: Do autor.

Os valores obtidos na tabela 15 foram calculados utilizando-se os valores de coeficientes angulares das equações de reta das curvas analíticas contidas na tabela 14. É possível observar pelos resultados obtidos que a matriz biológica dos fragmentos de orelha causa grande interferência na detecção dos analitos aqui em estudo. Os elevados valores de % de efeito de matriz permitem inferir que grande quantidade de outros componentes da matriz interfere na detecção das transições selecionadas para cada analito (PGE₂ e LTB₄). Contudo, ainda que o método apresente um efeito de matriz indesejado, outros parâmetros foram avaliados, para que se possa garantir que os níveis de concentração de PGE₂ e LTB₄ determinados nas amostras de orelha possam ser comparados.

Os resultados das recuperações absoluta e relativa são mostrados na tabela 16 a seguir.

Tabela 17 - Valores da média de % de recuperação absoluta e relativa para PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de orelha em duas concentrações controle.

Analito	% Recuperação absoluta		% Recuperação relativa	
	200 ng/mL	40 ng/mL	200 ng/mL	40 ng/mL
PGE ₂	21,61	18,63	23,57	23,14
LTB ₄	36,26	32,40	38,50	32,16

FONTE: Do autor.

Pelos valores apresentados na tabela 16 é possível observar que, em geral, os valores de recuperação de PGE₂ e LTB₄ para o método de extração no preparo de amostras de fragmentos de orelha são baixos. Para recuperação absoluta os valores variaram entre 18,63 a 36,26 % enquanto que na recuperação relativa os valores variam entre 23,14 e 38,50 %. Isso indica, que de modo geral, menos da metade dos eicosanoides em estudo, presentes nos fragmentos de orelha foi extraído. Pode-se destacar também que o LTB₄ apresentou maiores valores de recuperação, absoluta e relativa, quando comparado com a PGE₂. Isso indica que o método de extração utilizado no preparo de amostra é mais eficiente para o

leucotrieno do que para a prostaglandina. Além disso, pode-se destacar também que para cada analito a faixa de variação da % de recuperação dos analitos em diferentes concentrações é pequena, permitindo inferir que a concentração deles na amostra não interfere significativamente na recuperação. Apesar disso, deve-se considerar que o método de preparo das amostras de fragmentos de orelha para extração de PGE₂ e LTB₄ é bastante simples e por isso, as taxas de recuperação obtidas são consideravelmente relevantes, uma vez que não foi utilizado grandes quantidades de solvente nem tampouco metodologias com grande número de passos.

Os valores de precisão intra e inter-dia do método desenvolvido para análise e quantificação de PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de orelha são mostrados na tabela 17 a seguir:

Tabela 18 - Valores médios de precisão intra e inter-dia, em CV (%), para PGE₂ e LTB₄ em duas concentrações controle.

Analito	Precisão intra-dia		Precisão inter-dia	
	CV (%)		CV (%)	
	200 ng/mL	40 ng/mL	200 ng/mL	40 ng/mL
PGE ₂	0,21	6,44	6,01	7,29
LTB ₄	12,71	3,97	9,77	2,63

FONTE: Do autor.

Os valores da tabela 17 permitem observar que o método desenvolvido apresenta valores aceitáveis de dispersão dos resultados, em % CV, de acordo com normas da ANVISA, que estabelece valores de % CV de até 15 %. Todos os valores determinados foram baixos, com variação máxima de 12,71 % dentre as concentrações avaliadas. Isso permite inferir que o método desenvolvido possui grande poder de repetibilidade utilizando-se o mesmo método de análise e equipamento, seja em um mesmo dia ou em dias diferentes.

Os valores de exatidão são expressos na tabela 18 a seguir:

Tabela 19 - Valores médios de exatidão intra e inter-dia, em EPR (%), para PGE₂ e LTB₄ em duas concentrações controle.

Analito	Exatidão intra-dia		Exatidão inter-dia	
	EPR (%)		EPR (%)	
	200 ng/mL	40 ng/mL	200 ng/mL	40 ng/mL
PGE ₂	7,63	13,72	6,04	16,00*
LTB ₄	16,06*	7,59	-6,03	7,45

FONTE: Do autor.

Legenda: *Valores acima dos aceitáveis de acordo com o guia de validação da ANVISA.

Para ambos os eicosanoides analisados, PGE₂ e LTB₄, valores de exatidão apresentaram-se pouco superiores a 15 % recomendado pelo guia de validação da ANVISA. Dessa forma, tem-se que embora o erro apresentado tenha sido de 16 % (valor relativamente baixo e próximo do aceitável) o método apresenta pequenas distorções na quantificação desses analitos, o que era esperado devido ao efeito de matriz confirmado anteriormente. Entretanto, ainda assim o método pode ser utilizado para comparação de grupos de amostras como ensaio limite, comparável a um teste de impureza, tendo-se em vista o valor de limite de quantificação determinado (BRASIL, 2017).

A avaliação da estabilidade de ambos os analitos em estudo, PGE₂ e LTB₄, durante o processo de preparo e análise das amostras (considerando-se o tempo de injeção de aproximadamente 8 a 9 horas a uma temperatura ambiente de 22 °C), o teste de estabilidade foi realizado para somente amostras em triplicata em uma única concentração alta (concentração teórica de 200 ng/mL), já que as amostras foram mantidas em gelo e ausência de luz até o momento exato da injeção. A tabela 19 apresenta os valores de concentração no tempo inicial e final da amostra preparada.

Tabela 20 - Valores de concentração de PGE₂ e LTB₄ em amostra de fragmentos de orelha a 200 ng/mL, injetada em dois tempos distintos (0 e 9 h), mantidos a 22 °C (n = 3).

Analito	Concentração (ng/mL)		% Redução
	Tempo Inicial (0 h)	Tempo Final (9 h)	
PGE ₂	222,5	193,6	13,0
LTB ₄	205,7	172,6	16,1

FONTE: Do autor.

Pôde-se observar que para o intervalo de tempo avaliado em que a amostra foi deixada à temperatura ambiente durante o processamento até sua análise, os analitos sofreram degradação em uma quantidade considerável, o que corrobora com os estudos de Maddipati e Zhou (2011). Estes testes foram realizados anterior à determinação das outras figuras de

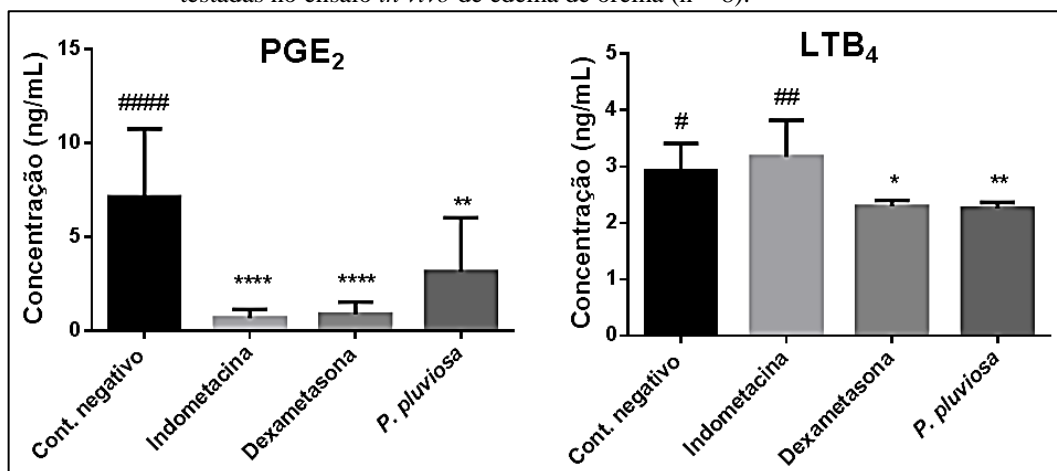
mérito, o que foi determinante para o cuidado no preparo e condicionamento das amostras sob baixas temperaturas e ausência de luz até o momento das análises.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE PGE₂ E LTB₄ EM AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ORELHA ORIUNDOS DE ENSAIO *IN VIVO*

Após a determinação das figuras de mérito do método para análise dos níveis de PGE₂ e LTB₄ entre grupos de amostras de fragmentos de orelha advindos do teste *in vivo*, quatro grupos diferentes de amostras foram comparados quanto aos níveis de ambos os eicosanoides: controle negativo (onde não houve tratamento), dexametasona e indometacina (fármacos de referência utilizados como padrão positivo no ensaio *in vivo* de edema de orelha) e a amostra de extrato bruto de *P. pluviosa* - testada no ensaio *in vivo* do trabalho de Domingos *et al.* (2019). Os fragmentos de orelha das outras amostras testadas no ensaio *in vivo* deste trabalho (*A. polyphylla*, *E. contortisiliquum*, *H. balansae* e *P. dubium*) não foram analisadas no método descrito.

Os níveis de PGE₂ e LTB₄ foram estimados de acordo com a área dos respectivos picos, utilizando-se a equação da curva de calibração obtida para cada um dos analitos em matriz biológica (tabela 14). As amostras avaliadas no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton foram testadas em grupo de 8 animais. Assim, os fragmentos de orelha de quatro diferentes grupos de amostras do teste *in vivo* tiveram os valores de concentração de PGE₂ e LTB₄ comparados estatisticamente por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação de Dunnett ($p < 0,05$). As amostras foram comparadas com as dos controles negativo e positivo (dexametasona). Os gráficos apresentados na figura 28 permitem visualizar a média \pm DP dos níveis de PGE₂ e LTB₄ (em ng/mL) dos quatro diferentes grupos de amostras analisados.

Figura 28 - Níveis de PGE₂ e LTB₄ (média ± DP) de quatro diferentes grupos de amostras testadas no ensaio *in vivo* de edema de orelha (n = 8).



FONTE: Do autor.

Legenda: *Diferenças estatísticas apresentadas por *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) e ****($p \leq 0.0001$) quando comparados com o controle negativo e #($p \leq 0.05$), ##($p \leq 0.01$), e ####($p \leq 0.0001$) quando comparados com dexametasona.

A análise estatística comparativa (figura 28) demonstrou que os grupos de fragmentos de orelhas de ratos tratados, seja por indometacina, dexametasona ou extrato de *P. pluviosa*, apresentaram quantidades de PGE₂ significativamente menores que o controle negativo (grupo não tratado), indicando o potencial de inibição da produção de PGE₂ por estas amostras no ensaio de edema de orelha. Sendo assim, tem-se que os dados obtidos da quantificação de PGE₂ nos fragmentos de orelha por LC-MS/MS corroboram com os da atividade antiedematogênica das amostras testadas em ensaio *in vivo* obtidos por Domingos *et al.* (2019), uma vez que a formação do edema pode ser relacionada aos elevados níveis de prostaglandinas, principalmente a PGE₂ (PERINI *et al.*, 2010).

Indometacina é um AINE utilizado como controle positivo no teste de edema de orelha e tem sido bem descrito como inibidor seletivo da via COX-dependente em processos inflamatórios, causando redução somente dos metabólitos desta via, como a PGE₂ (CARVALHO, CARVALHO, RIOS-SANTOS, 2004). A dexametasona, um AIE, é utilizado também como controle positivo neste mesmo ensaio por inibir a ação das PLA₂ impedindo a liberação do ácido araquidônico. Assim a dexametasona, por inibir o início da cascata da inflamação causa diminuição das quantidades de ambos, PGE₂ e LTB₄ (WRIGHT *et al.*, 2010). Deste modo, espera-se que dentre os controles positivos testados no ensaio *in vivo* de edema de orelha somente a dexametasona cause redução da produção dos níveis de LTB₄.

A análise estatística comparativa (figura 28 anterior) mostra que somente as amostras de dexametasona e extrato de *P. pluviosa* apresentaram níveis de LTB₄ significativamente inferiores e diferentes do controle negativo. Tais resultados corroboram com o esperado para

os fármacos de referência. Como já mencionado anteriormente, a dexametasona causa inibição das PLA₂ que impede a liberação de AA e consequentemente inibe a produção de ambos PGE₂ e LTB₄. Já a indometacina, por ser um inibidor seletivo das COX, não influencia assim nos níveis de LTB₄. Assim sendo, os resultados obtidos corroboram com o esperado, permitindo inferir que o método validado em LC-MS/MS permite comparar estatisticamente os níveis de LTB₄ entre as amostras, como observado para as amostras controles positivos e negativo. A partir do resultado para a amostra de extrato de *P. pluviosa* pode-se inferir que a amostra de extrato de *P. pluviosa* causa também inibição da produção de LTB₄.

Considerando-se os resultados obtidos pelo método de análise desenvolvido, a redução dos níveis de PGE₂ e LTB₄ apresentada pela amostra de *P. pluviosa* permite inferir que o extrato desta espécie testado no ensaio *in vivo* de edema de orelha age possivelmente na inibição de ambas as vias enzimáticas COX e LOX, simultaneamente, ou mesmo da PLA₂, impedindo a liberação de AA na etapa inicial da cascata da inflamação. Desta forma, os resultados aqui descritos corroboram com os dos demais ensaios realizados com esta espécie, confirmando o grande potencial anti-inflamatório desta espécie pela ação por diferentes mecanismos de ação na inflamação (DOMINGOS *et al.*, 2019).

O método desenvolvido para determinação dos níveis de PGE₂ e LTB₄ em amostras de fragmentos de orelha por LC-MS/MS apresentou altos índices de efeito de matriz o que deve estar associado à % relativamente baixa de recuperação destas substâncias pelo método de extração utilizado. A extração não somente dos eicosanoides em estudo, mas também de muitos outros compostos que não sejam de interesse pode causar supressão iônica na detecção de PGE₂ e LTB₄, suprimindo a detecção dos mesmos e fazendo com que o valor da concentração associado a eles (pela curva analítica) seja aparentemente menor. Com isso, os valores calculados nestas análises podem não representar os reais valores desses compostos nestas amostras (comprovado pelos desvios nos valores de exatidão determinados na seção anterior).

Entretanto, o método relativamente simples de extração e análise utilizado se apresentou bastante reprodutível (devido aos valores satisfatórios de precisão intra e inter-dia e baixos DP), no qual as quantidades de PGE₂ e LTB₄ extraídas são aproximadamente constantes e proporcionais às quantidades dos mesmos nas amostras. Deste modo, a metodologia desenvolvida para análise de PGE₂ e LTB₄ nas amostras de fragmentos de orelha permite determinar os níveis de LTB₄ e PGE₂ entre amostras como um ensaio limite (BRASIL, 2017) ou determinação do desempenho de amostras, como no caso de ensaios

como aqui apresentado (GARCIA *et al.*, 2011), tendo-se entre elas amostras do controle positivo e/ou negativo para comparação.

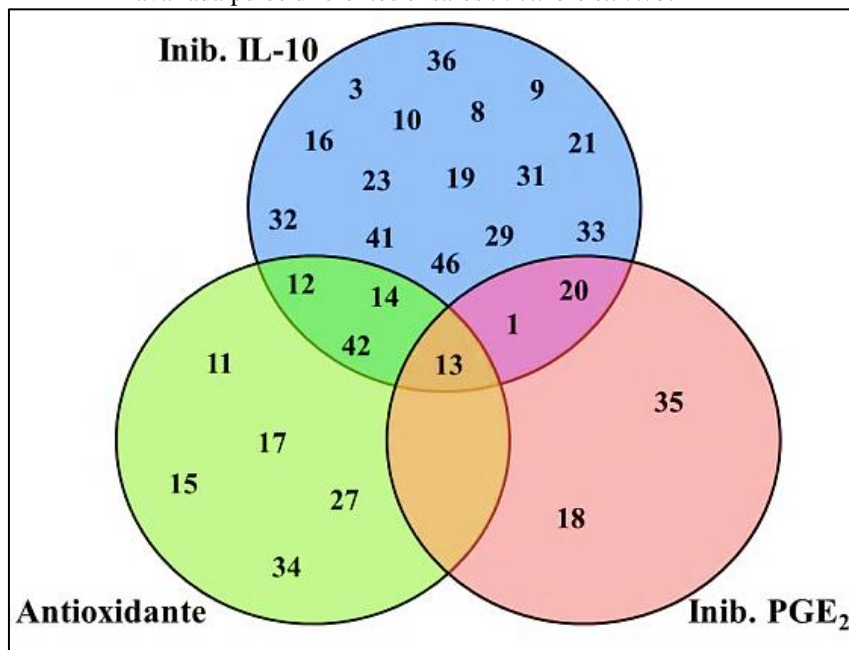
O método desenvolvido para extração e quantificação de PGE₂ e LTB₄ em amostras de fragmentos de orelha representa uma metodologia simples, robusta, rápida e eficaz para avaliação de inibição das vias COX e LOX, ou ainda da PLA₂ pelas amostras testadas no ensaio *in vivo* de edema de orelha. O preparo de amostra utilizou passos simples de trituração e homogeneização do material biológico com solução tampão, sem uso de quaisquer outros materiais mais específicos ou de maior custo para extração dos analitos. Além disso, considerando-se a disponibilidade do equipamento LC-MS/MS, o método pode ser utilizado após o teste *in vivo* de edema de orelha com amostras diversas (produtos naturais ou sintéticos) que se apresentarem ativas no teste anti-inflamatório *in vivo* de edema de orelha, para avaliação do mecanismo de ação contra a inflamação, permitindo a busca por novos agentes anti-inflamatórios de maior eficácia.

4.8 RESUMO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS AMOSTRAS DE FABACEAE NOS BIOENSAIOS AVALIADOS

Através do diagrama de *Venn* da figura 29 a seguir, podem-se representar as amostras de Fabaceae (pelo devido código, de acordo com a tabela 1) relacionando-as com o mecanismo de ação contra a inflamação nos ensaios *in vitro* e *ex vivo*. Assim, as amostras apresentadas na figura 29 são aquelas que mostraram resultados promissores de atividade anti-inflamatória por um dos mecanismos de ação: antioxidante, inibição da produção de IL-10 e inibição da produção de PGE₂. Aquelas que apresentaram ativas em mais de um mecanismo de ação são apresentadas nas interseções entre os conjuntos de amostras. Já aquelas que não apresentaram atividade em nenhum dos três mecanismos de ação testados contra a inflamação, não aparecem em nenhum dos conjuntos. Desta forma, é possível observar que *P. pluviosa* (13) representa a espécie mais promissora para obtenção de compostos com atividade anti-inflamatória dentre as espécies estudadas neste trabalho nos ensaios *in vitro* e *ex vivo*, por se apresentar ativa nos três diferentes ensaios avaliados. Estes resultados corroboram com os estudos de Domingos *et al.* (2019) que comprovou o grande potencial anti-inflamatório de diferentes extratos e compostos isolados desta espécie. Além disso, outras espécies apresentaram-se ativas em pelo menos dois dos ensaios realizados: *C. ferrea* (12), *C. pulcherrima* (14) e *S. adstringens* (42) foram ativas nos ensaios antioxidante e de inibição da produção de IL-10; já as espécies *A. polyphylla* (1) e *H. balansae* (20)

apresentaram-se ativas em ambos os ensaios *ex vivo* realizados no sangue (inibição da produção de IL-10 e PGE₂), bem como no ensaio *in vivo* de edema de orelha.

Figura 29 - Resumo da atividade anti-inflamatória das espécies de Fabaceae avaliada pelos diferentes ensaios *in vitro* e *ex vivo*.

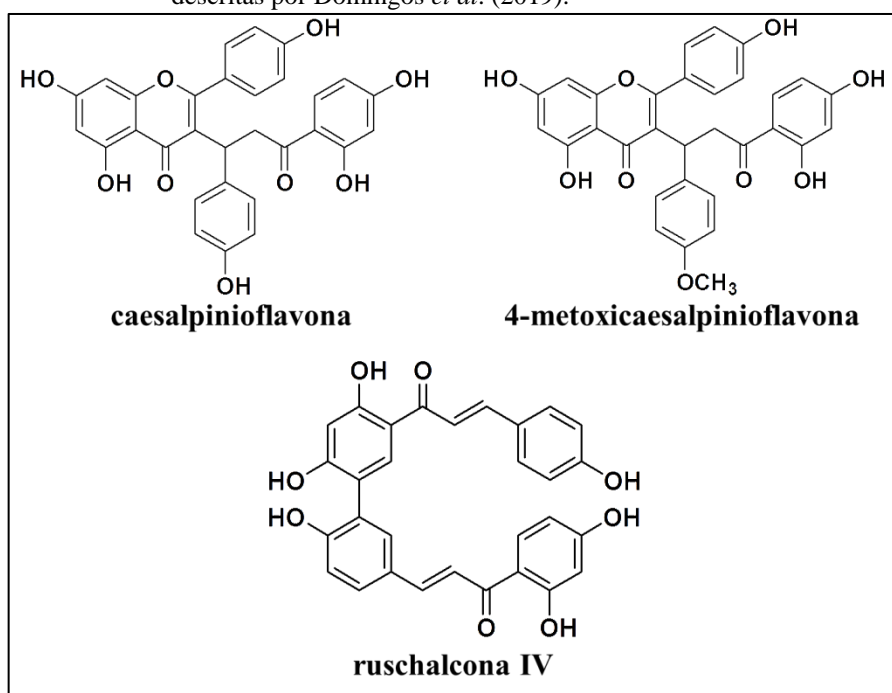


FONTE: Do autor.

A partir dos resultados até aqui apresentados, pode-se inferir que a espécie *A. polyphylla* (**1**) apresenta grande potencial anti-inflamatório, com resultados de atividade regulatória na produção de PGE₂ e IL-10, além da inibição do edema de orelha e também do recrutamento de neutrófilos, comparável ao fármaco de referência dexametasona. Já a espécie *P. pluviosa* (**13**) também apresentou potencial anti-inflamatório promissor, sendo ativo em todos os bioensaios realizados neste trabalho, além de ter apresentado grande potencial antioxidante, sendo esta espécie já bem descrita na literatura quanto ao seu potencial anti-inflamatório. No método desenvolvido para análise de PGE₂ e LTB₄ em amostras de fragmentos de orelha advindos do ensaio *in vivo*, a espécie *P. pluviosa* (**13**) apresentou ainda possível mecanismo de ação de inibição dual das vias COX e LOX, ou ainda de PLA₂, comparável aos AIE's. *H. balansae* (**20**) apresentou atividade anti-inflamatória em ambos os ensaios *ex vivo* no sangue, além de ter sido determinada também com ação antiedematogênica. Apesar de *A. polyphylla* (**1**) não ter apresentado potencial antioxidante neste trabalho, esta espécie foi recentemente reportada com tal atividade utilizando-se o mesmo ensaio (atividade sequestrante por DPPH) por Cesarino *et al.* (2020). Entretanto, vale a pena ressaltar que a amostra de extrato bruto inicialmente preparada no trabalho de Cesarino e seus colaboradores utilizou o etanol puro como solvente extrator e maceração em repouso. Já no nosso trabalho, o

extrato bruto da mesma espécie foi obtido com uma mistura EtOH:H₂O (7:3, V:V) com 0,1 % de ácido acético e com uso de agitação constante, o que garante a diferença na composição química entre estes extratos e conseqüentemente a diferença nos resultados da atividade antioxidante entre eles. De forma geral, os resultados de *A. polyphylla* (1), *P. pluviosa* (13) e *H. balansae* (20) estabelecem estas espécies como fontes promissoras de compostos com grande potencial anti-inflamatório. Domingos *et al.* (2019) mostrou a presença de alguns compostos com grande potencial anti-inflamatório na espécie *P. pluviosa* como caesalpinioflavona e seu derivado metoxilado 4''-metoxi-caesalpinioflavona, além da ruschalcona IV, as quais têm suas estruturas mostradas na figura 30 a seguir. Estes compostos mostraram-se ativos na inibição do edema de orelha bem como do recrutamento de neutrófilos, com resultados comparáveis ao fármaco de referência dexametasona.

Figura 30 - Estruturas química de compostos isoladas de *P. pluviosa* com atividade anti-inflamatória por diferentes mecanismos de ação, descritas por Domingos *et al.* (2019).



FONTE: Do autor.

Já as espécies *A. polyphylla* (1) e *H. balansae* (20) ainda não foram descritas na literatura quanto ao potencial anti-inflamatório e representam espécies inéditas para estudos fitoquímicos quanto a essa propriedade farmacológica. Neste sentido, as espécies *L. férrea* (12), *C. pulcherrima* (14) e *S. adstringens* (42) também representam fontes promissoras de compostos com potencial anti-inflamatório, uma vez que apresentaram atividade em dois

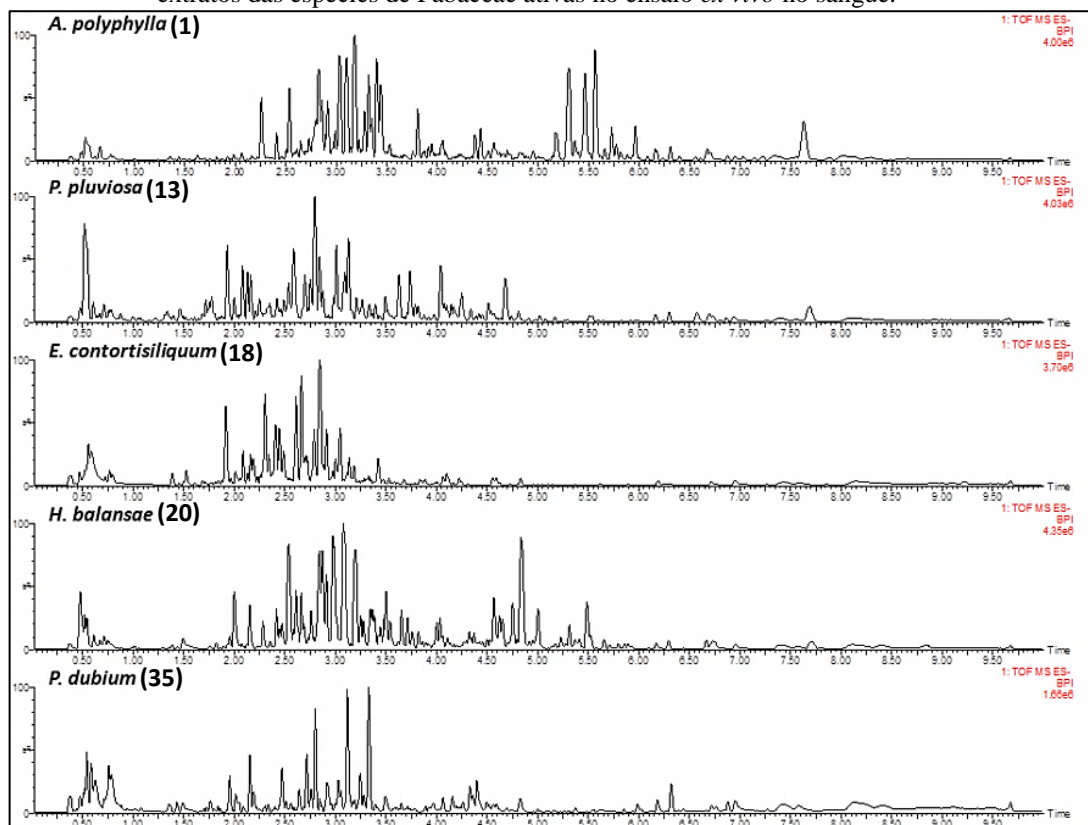
ensaios diferentes (antioxidante e de inibição da produção de IL-10, simultaneamente) além de já serem bastante relatadas na literatura para este potencial farmacológico.

4.9 PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS ATIVOS NO ENSAIO *EX VIVO* DE INIBIÇÃO DE PGE₂ NO SANGUE HUMANO

A princípio, por meio de uma abordagem bioguiada dos resultados da atividade anti-inflamatória, uma análise comparativa foi feita acerca do perfil metabólico dos extratos das espécies de Fabaceae ativos no ensaio *ex vivo* no sangue humano, e também testados no ensaio *in vivo* de edema de orelha em camundongos. A investigação e comparação do perfil metabólico das espécies ativas no ensaio de inibição da produção de PGE₂ foram realizadas a fim de relacionar, de forma manual, a maior quantidade possível de compostos anotados entre os cinco extratos ativos, com a atividade anti-inflamatória por inibição da produção de PGE₂ no sangue e ainda com a atividade antiedematogênica *in vivo*. Assim, por meio de dados obtidos por UPLC-ESI-QTOF-MS², o conjunto de dados foi obtido para cada um dos modos de ionização após o processamento, como descrito na seção 4.2. Uma grande diversidade de picos foi obtida, e estes foram caracterizados por diferentes combinações de T_R e *m/z* em MS¹, como exemplificado na figura 31 a seguir, que mostra o perfil cromatográfico desses extratos obtidos no modo negativo.

Muitos picos puderam ser anotados por desrepliação utilizando-se bases de dados abrangentes e comparações de padrões de fragmentação. Os compostos anotados nos cinco extratos ativos no ensaio *ex vivo* são mostrados na tabela do APÊNDICE B. Nela é possível se observar que 146 compostos (C1 a C146) puderam ter sua estrutura ou pelo menos sua classe química caracterizada a partir dos valores do íons precursor e produtos comparados com bases de dados por meio da ferramenta MetFrag, como descrito na seção 3.22. A tabela do APÊNDICE B apresenta ainda as espécies de Fabaceae analisadas em que cada composto foi detectado, considerando-se áreas de picos com valores maiores de 2000.

Figura 31 - Comparação do perfil cromatográfico obtido no modo de ionização negativo dos extratos das espécies de Fabaceae ativas no ensaio *ex vivo* no sangue.



FONTE: Do autor.

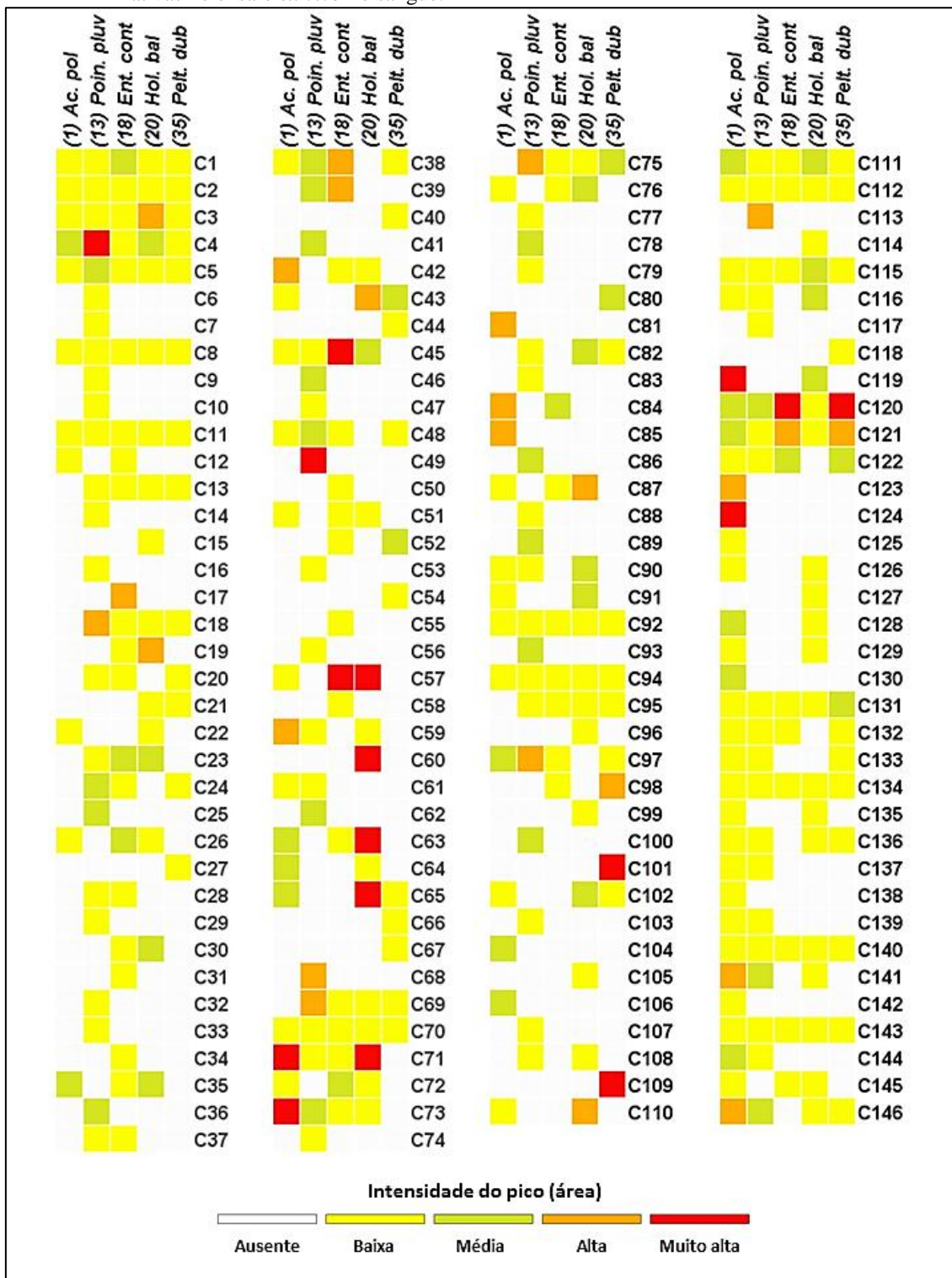
A figura 32 a seguir apresenta um gráfico de heatmap, com uma comparação qualitativa dos compostos anotados de acordo com a intensidade relativa dos picos detectados em cada um dos cinco extratos analisados. Como pode ser observado na tabela do APÊNDICE B juntamente com o gráfico heatmap da figura 32, uma grande diversidade de compostos fenólicos pôde ser anotada e caracterizada entre os cinco extratos de espécies de Fabaceae desreplcados. A grande maioria pertence a algumas subclasses como flavonoides glicosilados ou agliconas e derivados de ácido hidróxibenzóico. Vale a pena destacar que muitos flavonoides têm sido descritos na literatura por sua atividade antioxidante devido aos grupos hidroxilas em diferentes posições nas estruturas e também com grande potencial anti-inflamatório (BALDIM *et al.*, 2017). Os derivados dos flavonoides quercetina, miricetina, luteolina, taxifolina, glicosilados ou não, são descritos com atividade inibitória na liberação de alguns mediadores pró-inflamatórios em testes com células isoladas induzidas à inflamação por LPS. Alguns glicosídeos do kaempferol apresentaram fraca atividade de inibição na produção de PGE₂ e NO também em células isoladas ativadas por LPS. Por outro lado, estes flavonoides derivados glicosilados do kaempferol mostraram uma boa atividade anti-inflamatória em teste de edema e com resultados melhores que glicosídeos de quercetina

(XIAO, 2017). Em nosso trabalho, a maioria dos glicosídeos de kaempferol e quercetina anotados estava presente em comum nos extratos ativos em ambos os ensaios *ex vivo* e *in vivo* – *A. polyphylla* (1), *P. pluviosa* (13), *E. contortisiliquum* (18), and *H. balansae* (20). Embora a espécie *P. dubium* (35) tenha apresentado atividade no ensaio *ex vivo* de inibição da produção de PGE₂ ela não foi ativa no ensaio *in vivo* e estes glicosídeos estavam presentes em menor número nesta espécie o que indica a grande importância deles contra a inflamação, principalmente no ensaio *in vivo*. Entretanto, esta espécie apresentou bons resultados no ensaio *ex vivo* de inibição da produção de IL-10, o que permite inferir a importância de alguns compostos presentes nesta espécie.

Outros polifenóis tais como ácido gálico, ácido elágico e seus derivados foram anotados no extrato da espécie *P. pluviosa* (13). Como já descrito na literatura, estes compostos têm sido relatados por suas atividades anti-inflamatórias em diferentes mecanismos de ação como, por exemplo, na inibição da fosfodiesterase, redução de mediadores inflamatórios tais como NO, PGE₂, IL-6 e TNF- α e redução da expressão de COX-2 e iNOS (BENSAAD *et al.*, 2017; CHOUBEY *et al.*, 2015; DEROSA, MAFFIOLI, SAHEBKAR, 2016; LORENZO *et al.*, 2019). Uma visão geral de todos os compostos fenólicos anotados nos cinco extratos analisados mostra que eles estão presentes em menor número (diversidade) e com menores intensidades em *P. dubium* (35). Estes resultados sugerem que esta classe de compostos pode ser de grande importância para a atividade anti-inflamatória das quatro espécies ativas no ensaio *in vivo*, principalmente os glicosídeos de kaempferol e quercetina.

Saponinas também representam um número significativo de compostos caracterizados nas espécies ativas nos dois ensaios deste trabalho, *ex vivo* e *in vivo*. Em geral, elas foram quase todas detectadas com áreas de picos com intensidades variando-se de média a muito alta em pelo menos uma das espécies em que foram detectadas. Além disso, a maioria delas estava presente nos extratos das espécies *A. polyphylla* e *H. balansae*. Muitas saponinas têm sido descritas por sua atividade anti-inflamatória, principalmente aquelas derivadas do ácido oleanólico, tendo como alvo o fator NF- κ B ou mesmo inibindo a expressão de enzimas como iNOS e COX-2 (POLLIER, GOOSSENS, 2012; WU *et al.*, 2016).

Figura 32 - Perfil metabólico dos compostos anotados (C1-C146) entre os cinco extratos de espécies ativas no ensaio *ex vivo* no sangue.



FONTE: Do autor.

Alguns derivados de esfingolípídios também foram caracterizados entre as espécies analisadas tais como esfingosina, hexadecasfinganina e fitosfingosina. Na literatura, este último e alguns de seus derivados são relacionados à atividade anti-inflamatória e são

utilizados principalmente em produtos contra doenças crônicas de inflamação da pele (KIM *et al.*, 2014; PAVICIC *et al.*, 2007).

Outros compostos com atividade anti-inflamatória já descrita puderam também ser caracterizados em algumas das espécies de Fabaceae analisadas como derivados dos ácidos caféico e quínico (FRAIGE *et al.*, 2018), ácidos graxos (MORAIS *et al.*, 2017), e feoforbídeos A e B (ISLAM *et al.*, 2013).

A desreplcação dos extratos das cinco espécies de Fabaceae permitiu inferir que muitos compostos anotados nestas amostras podem agir juntos contra a inflamação. A partir dos resultados aqui apresentados, estudos fitoquímicos posteriores destas cinco espécies poderão ser realizados a fim de se guiar ao isolamento de substâncias com estrutura e/ou potencial anti-inflamatório inéditos.

4.10 ESTUDOS METABOLÔMICOS DAS AMOSTRAS DE FABACEAE

Os estudos metabolômicos utilizam-se de ferramentas e abordagens tecnológicas como instrumentos computacionais, softwares e tabela de dados de metabólitos representativos de um conjunto de amostras a fim de criar modelos de predição de atividades biológicas ou mesmo caracterizar e identificar compostos ou grupos destes fortemente responsáveis por uma propriedade biológica qualquer, quando se utiliza ferramentas para análises discriminantes. A estas amostras podem ser relacionadas diferentes propriedades farmacológicas, como a anti-inflamatória neste caso. Utilizando-se diversos artifícios matemáticos e análises estatísticas multivariadas é possível se relacionar a composição química dos metabólitos presentes nestas amostras e assim se descobrir aqueles de maior importância para o potencial farmacológico atribuído àquelas. Dentre as análises estatísticas multivariadas mais utilizadas em estudos metabolômicos estão a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) ou ainda a sua variante, OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*), que são métodos supervisionados de redução de dimensões, ou ainda a análise de componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*), um método não supervisionado (WORLEY, POWERS, 2013). Desta forma, é possível caracterizar e identificar os compostos que mais contribuem para uma atividade farmacológica entre um grupo de amostras analisado. Sendo assim a metabolômica compreende um método de estudo químico mais abrangente quando comparado com a abordagem bioguiada na busca por compostos com atividade anti-inflamatória entre as espécies de plantas estudadas.

Após o processamento dos dados de UPLC-ESI-QTOF-MS², os estudos metabolômicos foram realizados neste trabalho com o conjunto de dados obtidos (seção 4.3) (onde os picos com T_R e m/z em MS¹ foram associados a cada amostra) utilizando-se o software MassLynx. As análises são descritas a seguir.

4.10.1 Análises por Componentes Principais dos dados

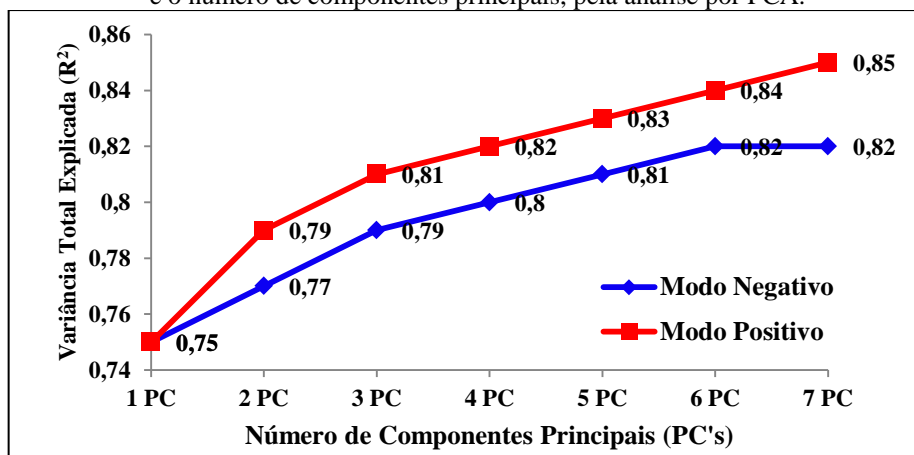
A análise por componentes principais (PCA) é uma análise multivariada não supervisionada que permite explorar e verificar as variáveis relacionadas à maior variância entre os dados. Para isso, novas variáveis ortogonais entre si são construídas no modelo matemático (chamadas de componentes principais) de forma independente e que descrevam em decréscimo e de forma complementar, a variância entre cada observação (amostra). Assim, o 1º componente deve explicar a maior de variância entre as amostras do conjunto de dados; o 2º componente deve explicar a segunda maior variância entre as observações, e assim sucessivamente. Assim, em análises por PCA o número de variáveis é reduzido significativamente sem a perda de informações relevantes e, por isso, permitem avaliar o máximo da informação dentro do conjunto de dados com o menor número de variáveis possíveis. Desta forma, entende-se que a PCA é um método de redução de dimensões. Em PCA, amostras são agrupadas em *clusters* com base nas suas semelhanças, porém sem a informação de classes ou grupos (DUARTE, 2016). Neste caso, a análise por PCA buscou avaliar agrupamento das amostras de extrato das espécies de Fabaceae estudadas de acordo com sua similaridade, baseado somente na composição química destas amostras, sem informação prévia sobre grupos da atividade biológica (anti-inflamatória) a fim de se verificar previamente a formação de *clusters*.

Em análises por PCA o valor de R^2 define a correlação entre os dados de acordo com o modelo estatístico. Ele é chamado de “qualidade de ajuste” (*goodness of fit*) e pode ser entendido como “quão bem-adequados” estão os dados ao modelo aplicado. Este coeficiente de correlação apresenta valores entre 0 (dados pouco ajustados) e 1 (dados fortemente correlacionados). Para análises em metabolômica, é ideal que o valor de R^2 seja maior que 0.5, o que indica uma boa correlação entre amostras de alta complexidade como as inclusas neste tipo de estudo (YULIANA *et al.*, 2011a).

O gráfico da figura 33 a seguir mostra a variância total explicada de acordo com o número de componentes principais. A escolha do número de componentes foi feita de tal modo que permita explicar a variância total do conjunto de dados de modo satisfatório na

análise por PCA, sem adição de informação demasiada. Observou-se que a variância total do modelo (R^2) explicada por apenas 2 componentes principais explica mais de 70 % da variância total do conjunto de dados, para a análises dos dados obtidos em ambos os modos de ionização. Entretanto, a partir do 3º componente a variância acumulada (em ambos os modos de ionização) aumenta em menores valores (até o 7º componente avaliado) o que torna dispensável a partir daí a adição de novos componentes para a construção do modelo matemático de PCA. Desta forma, a análise de PCA foi conduzida com o conjunto de dados normalizados, com o método normalização *Automatic (conditional)* e nenhum escalamento e 2 componentes para os dados em ambos os modos de ionização, com coeficientes de correlação (R^2) de 0.77 e 0.79, para os dados no modo negativo e positivo, respectivamente.

Figura 33 - Relação entre porcentagem de variância total do modelo (R^2) explicada e o número de componentes principais, pela análise por PCA.



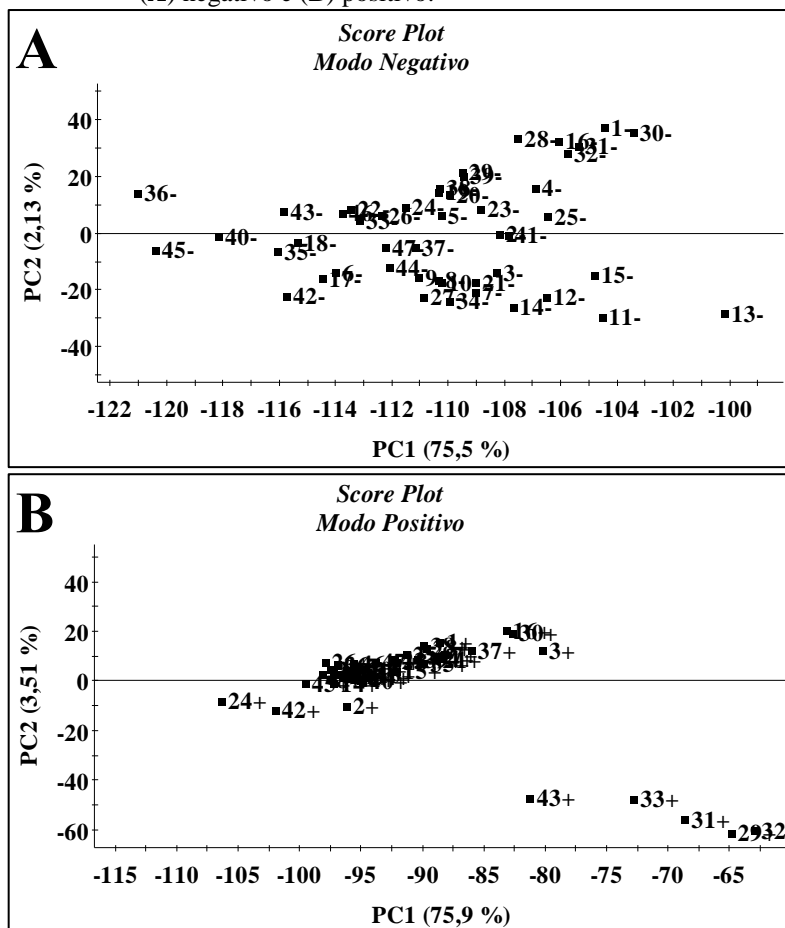
FONTE: Do autor.

A representação gráfica por PCA pode ser realizada por dois tipos de *plots*: *Score Plot* e *Loading Plot*. No *Score Plot* são apresentadas as amostras em um novo sistema de eixo de coordenadas formado pelos componentes principais, calculados de acordo com a variância entre elas. Assim quanto mais distantes as amostras se apresentam umas das outras ao longo de um eixo (componente principal), mais diferentes ou dissimilares elas são; analogamente, quanto mais próximas (formação de grupos ou *clusters* entre elas) mais similares elas são. Já o *Loading Plot* apresenta as variáveis originais das amostras de acordo com sua contribuição na construção de cada componente. Assim, nele é possível observar quais as principais variáveis responsáveis pela diferenciação entre as amostras (diferentes *clusters* observados no *Score Plot*) (DUARTE, 2016).

Os gráficos de *Score Plot* da figura 34 permitem observar que a projeção das observações (amostras) se distribuem por todo espaço PCA indicando a grande variabilidade

química entre elas. Entretanto, nenhuma relação entre estas amostras em *cluster* e os ensaios de atividade anti-inflamatória avaliados pôde ser inferida.

Figura 34 - Gráficos *Score Plot* de PCA obtidos com todas as amostras de extratos após processamento para os modos: (A) negativo e (B) positivo.



FONTE: Do autor.

Deve-se levar em consideração que este estudo engloba um total de 47 amostras de extratos de diferentes espécies distribuídas entre 31 gêneros e 3 subfamílias, além de que a família Fabaceae compreende a terceira maior família de plantas no mundo (KNOTHE *et al.*, 2016). Tudo isso permite inferir que a observação acerca da grande distribuição entre as amostras observada pelos gráficos *Score Plot* em PCA da figura 34 pode ser considerada natural e esperada, considerando-se a grande diversidade química existente entre as espécies (alcaloides, fenólicos diversos como flavonoides, taninos, lignanas, cumarinas, além de outros como policetídeos, terpenos, saponinas, ácidos orgânicos glicosilados, etc.) (WINK, 2013).

Apesar da grande diversidade química apontada pela análise por PCA dos dados em ambos os modos de ionização, deve-se considerar o fato de que PCA consiste de um método estatístico multivariado não supervisionado. Entretanto, a análise supervisionada por PLS-DA

permitiu relacionar a grande quantidade de compostos em comum entre as diferentes amostras de extrato das espécies de Fabaceae deste estudo à atividade anti-inflamatória por diferentes mecanismos de (atividade antioxidante, ou inibição de IL-10 ou PGE₂), o que possibilitou a busca da identidade destes possíveis compostos mais intimamente ligados a estas atividades farmacológicas como descrito a seguir.

4.10.2 Metabolômica das amostras Fabaceae quanto à atividade antioxidante

É possível se relacionar a atividade antioxidante apresentada entre as amostras de extrato de espécies de Fabaceae com a composição química entre elas a fim de se descobrir os principais compostos presentes nelas responsáveis por tal atividade (os biomarcadores), por meio de análises estatísticas supervisionadas como PLS-DA ou OPLS-DA. Estes algoritmos, assim como análises por PCA, também são métodos de redução de dimensões baseado em projeções, o que permite a fácil visualização de dados em forma de gráficos como *Score Plot* e *Loading Plot* (TRYGG, HOLMES, LUNDSTEDT, 2006). Entretanto, em análises por PLS-DA ou OPLS-DA, o conjunto de dados contendo as variáveis independentes X ou atributos (substâncias químicas) são relacionadas (supervisionadas) com outra matriz de dados das variáveis dependentes Y, que contém a informação (classe) de certa propriedade (como a farmacológica, neste caso) de cada instância (amostra) (WORLEY, POWERS, 2013).

As análises por PLS-DA utiliza recursos estatísticos em que se relaciona um componente preditivo entre as variáveis X e Y enquanto OPLS-DA utiliza dois componentes: um que relaciona as variáveis dependentes e independentes e outro ortogonal, que apresenta as variações em X não relacionadas a Y (YULIANA *et al.*, 2011a). Neste sentido, OPLS-DA apresenta-se como um modelo estatístico de maior complexidade quando comparado com PLS-DA, mas ainda necessário para análise daqueles conjuntos de dados complexos que não possam ser explicados por PLS-DA (TRIBA *et al.*, 2015).

As análises por PLS-DA ou OPLS-DA foram monitoradas por ambos os parâmetros R² e Q², que servem para validação do modelo construído, pelo método de validação cruzada (*cross-validation*) *k-fold*. Em suma, os métodos de validação cruzada dividem um número específico de amostras para a construção do modelo (conjunto de treinamento) e também um número específico para o teste do modelo treinado (conjunto de validação). Assim, para cada conjunto treinamento há um conjunto de validação que será testado. A validação é feita *k* vezes (*k-fold*) com os diferentes conjuntos treinamento e de validação e o modelo estatístico é geralmente monitorado pelos valores de coeficientes R² e Q² (DUARTE, 2016). O coeficiente de correlação R², como já apresentado anteriormente nas análises por PCA, é a qualidade do

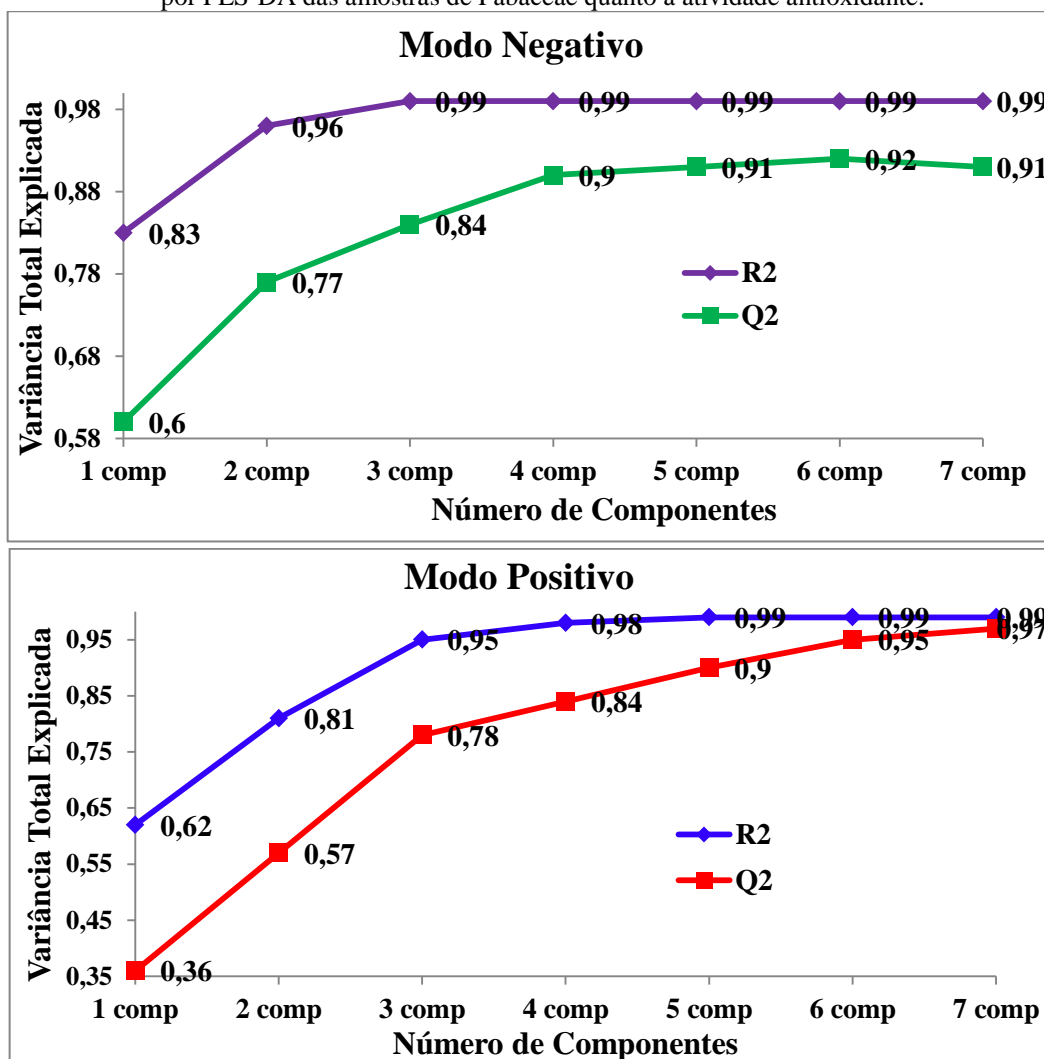
ajuste (*goodness of fit*) e indica a adequação dos dados em relação ao modelo estatístico. Já o parâmetro Q^2 é chamado de qualidade de predição (*goodness of prediction*) e representa a robustez e a capacidade preditiva do método estatístico. Desta forma, Q^2 é um parâmetro que permite avaliar a capacidade de um modelo estatístico em prever resultados de amostras desconhecidas (BALDIM *et al.*, 2017). De modo similar ao parâmetro R^2 , Q^2 também apresenta valores entre 0 e 1. Para estudos metabolômicos, tem-se que quando $Q^2 > 0,5$ o modelo pode ser considerado bom e quando $Q^2 > 0,9$ o modelo é excelente. Entretanto, deve-se atentar ainda para que a diferença entre os valores entre R^2 e Q^2 não seja discrepante, e que esta seja preferencialmente de no máximo 0,3. Caso contrário, isso pode indicar problemas no modelo estatístico criado, como superajuste dos dados (*overfitting*), levando a predições, análises ou interpretações errôneas (DUARTE, 2016; TRIBA *et al.*, 2015).

As análises metabolômicas foram realizadas por PLS-DA e OPLS-DA, na tentativa de correlacionar os dados de composição química das amostras de Fabaceae em estudo com a atividade antioxidante. Para isso, foram feitas diversas análises variando-se o método de normalização e escalamento de dados a fim de selecionar aquela que fornecesse o melhor modelo estatístico, para ambos os modos de ionização. Entretanto, foram obtidos resultados satisfatórios por PLS-DA que é um modelo mais simples que OPLS-DA, o que vai de encontro ao princípio da parcimônia. Tal princípio diz que um modelo estatístico deve ser construído de tal modo que tenha informação suficiente e nada além do necessário para sua construção (HAWKINS, 2004; VANDEKERCKHOVE, MATZKE, WAGENMAKERS, 2015). O método de normalização e escalamento que permitiu obter melhores valores de R^2 e Q^2 nas análises por PLS-DA foram respectivamente *Automatic (conditional)* e *Unit Variance*, para ambos os modos de ionização.

A escolha do número de componentes principais para a construção do modelo foi feita monitorando-se os parâmetros R^2 e Q^2 simultaneamente, para que fossem obtidos valores satisfatórios destes com um número mínimo de componentes, de acordo com o princípio da parcimônia.

Assim, de acordo com os dados apresentados nos gráficos da figura 35, pôde-se verificar que as análises por PLS-DA permitiram correlacionar o conjunto de dados com a atividade antioxidante satisfatoriamente com valores de R^2 e Q^2 respectivamente iguais a 0,99 e 0,84 para o modo negativo e 0,95 e 0,78 para o modo positivo, ambos com os 3 primeiros componentes. Estes parâmetros se demonstraram adequados para a análise da correlação do conjunto de dados das amostras de Fabaceae com seus respectivos potenciais antioxidantes.

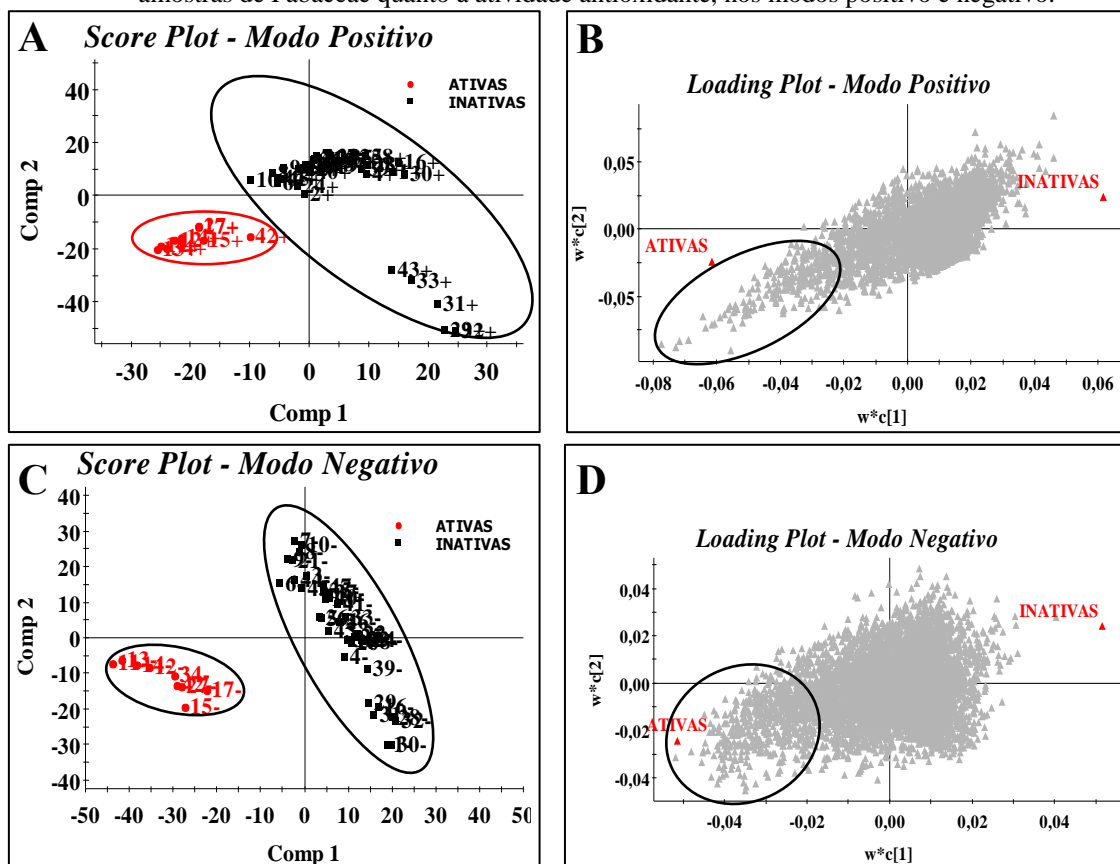
Figura 35 - Método de seleção do número de componentes principais a ser utilizado na análise por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto à atividade antioxidante.



FONTE: Do autor.

Neste sentido, foi possível se observar a nítida formação de dois *clusters*, para as amostras ativas e inativas no ensaio antioxidante, em ambos os modos de ionização, pelos gráficos de *Score Plot* (gráficos A e C da figura 36 a seguir). Isso demonstra que existe uma dissimilaridade na composição química entre os diferentes grupos (ativas e inativas) de amostras. Além disso, os gráficos de *Loading Plot* (gráficos da figura 36B e 36D) para cada modo de ionização analisado permitem observar ainda que existe uma grande quantidade daquelas substâncias que contribuem para o agrupamento das amostras ativas quanto ao potencial antioxidante, uma vez que grande parte destas substâncias (em destaque na elipse em vermelho) se encontra numa região do gráfico correspondente ao *cluster* das amostras ativas no *Score Plot*, em ambos os modos de ionização. Já para as amostras inativas poucos compostos se encontram na respectiva região, o que permite inferir que uma pequena porção de compostos contribui para distinção das amostras como inativas.

Figura 36 - Representação dos gráficos de *Score Plot* e *Loading Plot* das análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto à atividade antioxidante, nos modos positivo e negativo.



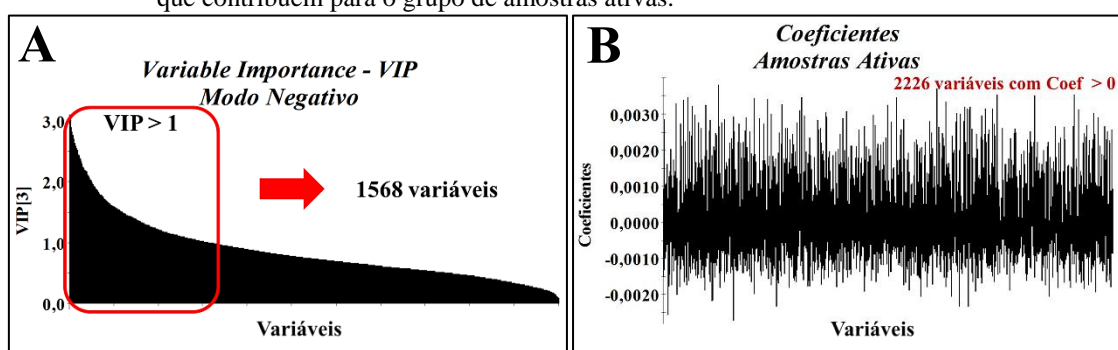
FONTE: Do autor.

Outro modo de se buscar pelos possíveis compostos de grande importância para a atividade antioxidante é analisando-se o gráfico *VIP-Plot*. Este gráfico organiza os compostos importantes na projeção em ordem decrescente de *VIP* (*Variable Importance in the Projection*) que representa a importância daquela variável (substância) na projeção do modelo construído. No gráfico *VIP-Plot* busca-se aqueles compostos de valores de *VIP* maiores que 1 os quais se apresentam de maior importância para a diferenciação entre os grupos de amostras (ativas e inativas) no modelo construído (MAHADEVAN *et al.*, 2008; MOURIER *et al.*, 2015; SOH *et al.*, 2008).

Pelo gráfico de *VIP-Plot* da figura 37A, é possível observar que 1568 compostos apresentaram valores de *VIP* maiores que 1, indicando a grande quantidade de compostos que são importantes para o modelo criado, no modo negativo, para a distinção entre as amostras ativas e inativas. Quanto maior o valor do *VIP* mais fortemente uma substância estará relacionada à distinção entre esses grupos (YULIANA *et al.*, 2011a). Entretanto, estes compostos de maior importância para o modelo ($VIP > 1$) podem estar correlacionados com o grupo ativo ou inativo, sem distinção clara. Para que se possa ter essa diferenciação, é necessária a análise dos coeficientes de cada variável de acordo com o grupo de amostras de

interesse (nesse caso, o ativo) (figura 37B). Assim, aquelas variáveis com valores positivos de coeficientes nas amostras ativas (com coeficientes acima do eixo das abscissas no gráfico da figura 37B) são tais que contribuem positivamente para a atividade das amostras. Quanto maior o valor de coeficiente de uma variável, maior a contribuição dela para a atividade antioxidante. De modo contrário, aqueles compostos com coeficientes negativos contribuirão negativamente para a atividade das amostras (SOH *et al.*, 2008).

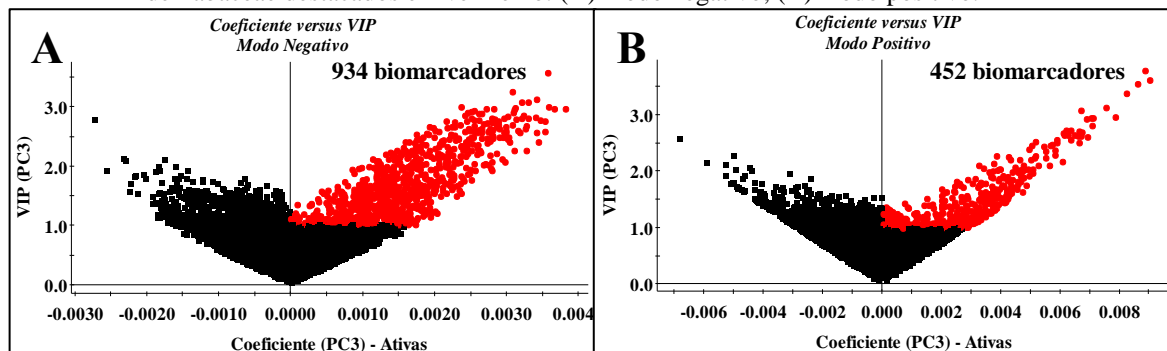
Figura 37 - (A) Representação de gráfico *VIP-Plot* obtido da análise por PLS-DA das amostras no modo negativo quanto à atividade antioxidante, com o número de compostos com VIP maiores que 1 em destaque. (B) Representação do gráfico de coeficientes das variáveis que contribuem para o grupo de amostras ativas.



FONTE: Do autor.

Tendo-se em vista as informações anteriormente apresentadas e considerando-se ainda o grande número de compostos com valores de VIP maiores que 1 (1568 compostos) e coeficientes positivos (2226 compostos) para a atividade antioxidante para o exemplo apresentado na figura 37, fica clara a necessidade da seleção das variáveis que possuam simultaneamente valores de VIP maiores que 1 e com coeficientes positivos para a atividade antioxidante. Desta forma, isso permitiria selecionar claramente os compostos mais importantes e determinantes para a atividade antioxidante, ou seja, a seleção dos biomarcadores desta atividade. Uma ferramenta muito útil para este feito é o gráfico *Coeficiente versus VIP* que permite fazer esta seleção de modo simples, rápido e sem confusões. Pode-se observar então na figura 38 a seguir estes gráficos para ambos os modos de ionização, que destacam bem os compostos de maior interesse em vermelho (os biomarcadores) da atividade antioxidante.

Figura 38 - Gráficos *Coefficiente versus VIP* com os biomarcadores da atividade antioxidante nas amostras de Fabaceae destacados em vermelho: (A) modo negativo; (B) modo positivo.



FONTE: Do autor.

Os gráficos da figura 38 permitem observar que embora a seleção dos biomarcadores da atividade antioxidante das amostras de Fabaceae tenha sido bastante criteriosa (somente aqueles de $VIP > 1$ e coeficientes positivos) ainda assim foi obtida uma quantidade relativamente grande de compostos (934 para o modo negativo e 452 para o modo positivo). A tabela 20 apresenta 15 biomarcadores selecionados, no modo negativo, em ordem decrescente dos valores de VIP.

Tabela 21 - Relação de 15 biomarcadores da atividade antioxidante, em ordem decrescente dos valores de VIP, com os respectivos dados cromatográficos (T_R e $m/z - MS^1$), obtidos de acordo com o gráfico *Coefficiente versus VIP* da análise por PLS-DA das amostras de Fabaceae no modo negativo.

Composto	Tempo de Retenção (min)	m/z (Da)	Coefficiente	VIP
1	2.39	423.089	0.0035638	3.58199
2	2.79	617.105	0.00307798	3.26912
3	2.70	169.013	0.00341805	3.13482
4	1.87	609.125	0.00320021	3.08774
5	2.16	897.188	0.00329888	3.07974
6	2.31	261.075	0.00358706	3.01158
7	3.00	615.099	0.00236677	3.0053
8	2.07	913.183	0.00311981	2.98317
9	2.31	591.116	0.00281278	2.97459
10	2.56	592.121	0.00366381	2.97349
11	2.65	463.068	0.00271009	2.97182
12	3.60	497.116	0.00381085	2.96898
13	1.96	449.129	0.00310672	2.95346
14	2.76	631.093	0.00254295	2.94646
15	2.52	453.100	0.0025085	2.93184

FONTE: Do autor.

Percebe-se que os compostos aqui selecionados como biomarcadores estão fortemente relacionados com a atividade antioxidante, principalmente aqueles com maiores valores de VIP e coeficiente, simultaneamente, evidenciado pelos valores de VIP maiores que 1 e

coeficientes positivos. Deste modo, é possível inferir que a metabolômica utilizando-se de recursos estatísticos como a análise por PLS-DA permite selecionar os compostos de interesse e altamente correlacionados a certa propriedade. As substâncias selecionadas até aqui foram as que o modelo fortemente indicou como responsáveis pela atividade antioxidante. Com os dados até aqui obtidos, poderão ser cruzadas as informações como as dos biomarcadores responsáveis pela ação anti-inflamatória por outro mecanismo de ação (a partir dos resultados dos ensaios já descritos anteriormente) e assim se buscar os biomarcadores mais valiosos, ou seja, aqueles que tenham maior importância na ação do processo inflamatório por diferentes mecanismos. Além disso, estes compostos podem ser anotados por meio de comparação com bancos de dados a fim de se caracterizar tais biomarcadores pelos valores de razão m/z e ainda pelos padrões de fragmentação.

4.10.3 Metabolômica das amostras Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de PGE₂

As análises estatísticas multivariadas por PLS-DA e OPLS-DA foram realizadas para as amostras de Fabaceae a fim de correlacioná-las com seu potencial de inibição da produção de PGE₂. Seguindo-se a mesma estratégia descrita para a atividade antioxidante, na seção 4.10.2 anterior, os dois diferentes métodos estatísticos foram testados dentre os diversos métodos de normalização e escalamento de dados para que se obtivesse o modelo estatístico satisfatório, confiável e o mais simples possível, na busca pelos potenciais compostos responsáveis por tal potencial farmacológico testado. PLS-DA se apresentou como o método estatístico com parâmetros apropriados à análise dos dados. Para os dados no modo negativo, foram utilizados os métodos *Automatic (conditional)* e *Unit Variance* para normalização e escalamento, respectivamente, enquanto que para o modo positivo utilizou-se nenhum método de normalização (*None*) e *Unit Variance*, também, para escalamento. A seleção do número de componentes principais foi feito também de modo análogo ao da seção anterior (figura 35) e os valores obtidos são apresentados na tabela 21 a seguir. Estes dados foram satisfatórios para a construção dos modelos que correlacionassem a composição química com a atividade de inibição da produção de PGE₂ das amostras, para os dados em ambos os modos de ionização, embora tenha sido necessário maior número de componentes, quando comparado com as análises para a atividade antioxidante descritas anteriormente.

Tabela 22 - Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA em função do número de componentes para correlação dos dados com a atividade de inibição da produção de PGE₂.

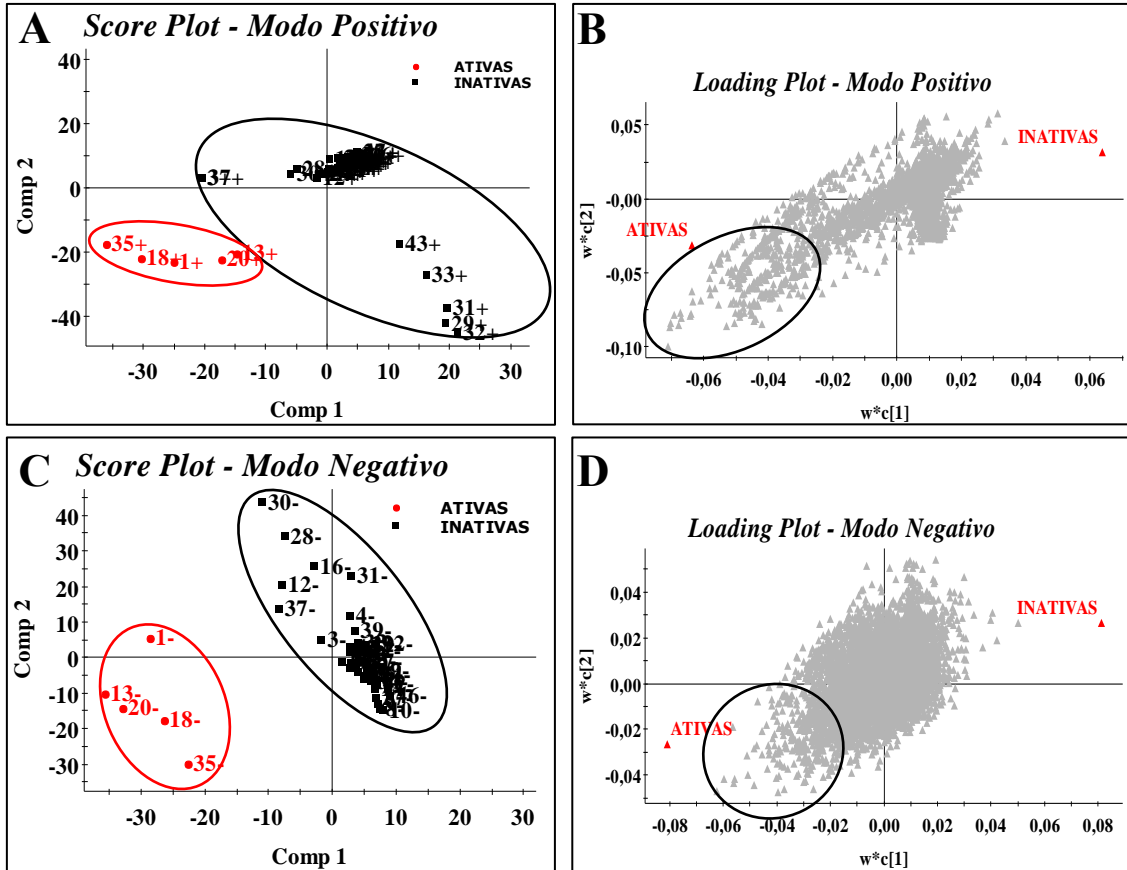
		1 Comp	2 Comp	3 Comp	4 Comp	5 Comp	6 Comp	7 Comp
Modo Positivo	R²	0,54	0,77	0,97	0,99	0,99	0,99	0,99
	Q²	0	0,11	0,53	0,63	0,76	0,84	0,84
Modo Negativo	R²	0,82	0,95	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99
	Q²	0	0	0,21	0,44	0,60	0,70	0,77

FONTE: Do autor.

As análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de PGE₂ permitiram obter os parâmetros de correlação $R^2 = 0,99$ e $Q^2 = 0,77$ com 7 componentes para o modo negativo. Já para o modo positivo, os valores destes parâmetros foram $R^2 = 0,99$ e $Q^2 = 0,76$ utilizando-se somente 5 componentes. Isso indica que os dados no modo positivo se correlacionam melhor com tal atividade biológica apresentada pelas amostras e isso permite a construção de um modelo estatístico mais simples. Além disso, apesar do maior número de componentes principais utilizado para os dados no modo negativo, foi possível ainda se obter uma correlação satisfatória entre os dados da composição das amostras e a atividade de inibição da produção de PGE₂.

Os gráficos *Score Plot* das figuras 39A e 39C mostram que para ambos os modos de ionização, há uma distinção clara, pela formação de *clusters*, entre as amostras ativas (em vermelho) e inativas (em preto). Já os gráficos de *Loading Plot* (gráficos das figuras 39B e 39D) mostram que também para ambos os modos de ionização, há um grande número de compostos que contribuem para as amostras ativas e que isso é mais acentuado no modo positivo, por apresentar um grande número de variáveis que se encontram na região correspondente às amostras ativas (como mostra a elipse em vermelho em destaque nos gráficos das figuras 39B e 39D). De modo contrário, as amostras inativas apresentam pequeno número de substâncias nesta respectiva região do gráfico *Loading Plot*, indicando que poucas delas contribuem para este grupo de amostras.

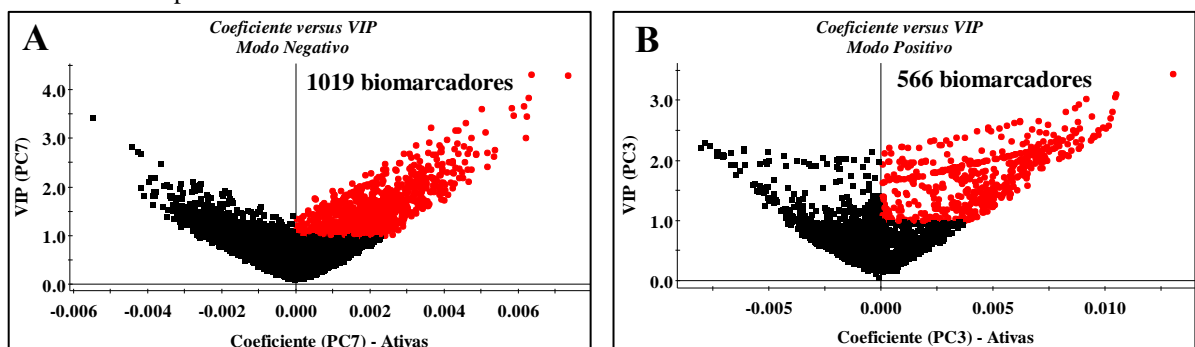
Figura 39 - Gráficos de *Score Plot* e *Loading Plot* das análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de PGE₂, nos modos positivo e negativo.



FONTA: Do autor.

A análise do gráfico de *Coeficiente versus VIP* (figura 40), neste caso, permitiu a análise dos principais compostos e que mais contribuem para a inibição da produção de PGE₂ (VIP > 1 e Coeficientes > 0, para as amostras ativas). Foi possível encontrar através destas análises, 1019 potenciais biomarcadores (em vermelho, nos gráficos) da inibição da produção de PGE₂ nas amostras de Fabaceae em estudo, no modo negativo, e 566 para o modo positivo.

Figura 40 - Gráficos *Coeficiente versus VIP* com os potenciais biomarcadores inibitórios da produção de PGE₂ nas amostras de Fabaceae em destaque em vermelho: (A) modo negativo; (B) modo positivo.



FONTA: Do autor.

4.10.4 Metabolômica das amostras Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de IL-10

De modo análogo como descrito nas seções 4.10.2 e 4.10.3 anteriores, análises com os modelos estatísticos PLS-DA e OPLS-DA foram realizadas a fim de se obter a melhor correlação entre a composição química das amostras de Fabaceae e a atividade anti-inflamatória pela inibição da produção de IL-10. Para os dados no modo negativo, o modelo estatístico que mostrou melhor correlação foi PLS-DA, com normalização dos dados *Automatic (conditional)* e nenhum método de escalamento (*None*). Os parâmetros de avaliação do modelo estatístico PLS-DA obtidos com estes métodos de normalização e escalamento são mostrados na tabela 22 a seguir.

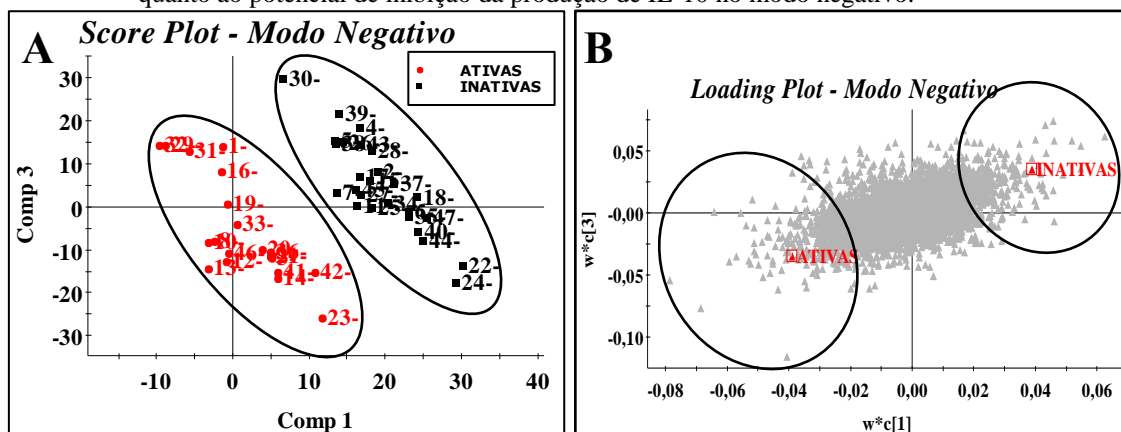
Tabela 23 - Parâmetros estatísticos de avaliação do modelo PLS-DA em função do número de componentes para correlação dos dados com a atividade de inibição da produção de IL-10.

		1 Comp	2 Comp	3 Comp	4 Comp	5 Comp	6 Comp	7 Comp
Modo	R²	0,35	0,74	0,93	0,97	0,99	0,99	0,99
Negativo	Q²	0	0,53	0,62	0,70	0,75	0,83	0,88

FONTE: Do autor.

Para os dados no modo negativo, foram utilizados cinco componentes para a construção do modelo PLS-DA mais adequado, o qual permitiu a obtenção dos parâmetros $R^2 = 0,99$ e $Q^2 = 0,75$. O modelo construído foi satisfatório, demonstrando a nítida dissimilaridade entre as amostras ativas (vermelho) e inativas (em preto), como mostra o gráfico de *Score Plot* da figura 41A a seguir. Grande número de variáveis contribui para cada um dos grupos de amostras aqui em análise (ativas tidas como inibidoras da produção de IL-10 e vice-versa). Entretanto, existe uma quantidade relativamente equivalente de substâncias que contribuem para as amostras ativas e inativas, como mostra o gráfico de *Loading Plot* da figura 41B. Os dados no modo positivo não puderam ser correlacionados com o potencial de inibição de IL-10, por nenhum dos métodos, PLS-DA ou OPLS-DA, por não ter sido possível se obter parâmetros de correlação (R^2 e Q^2) satisfatórios e por isso o modelo estatístico não pôde ser validado.

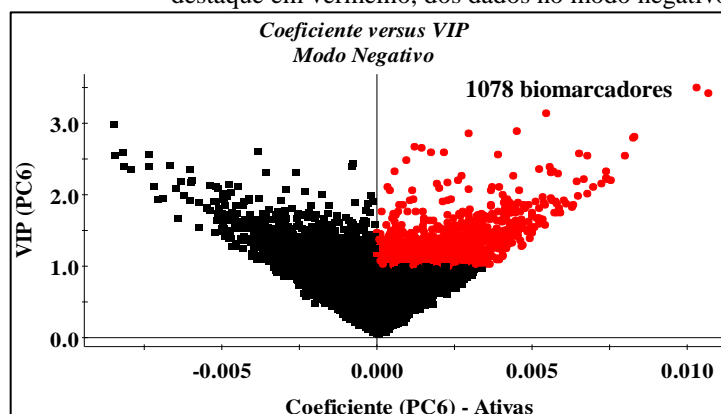
Figura 41 - Gráficos de *Score Plot* e *Loading Plot* das análises por PLS-DA das amostras de Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de IL-10 no modo negativo.



FONTE: Do autor.

O gráfico *Coefficiente versus VIP* da figura 42 demonstra que há 1078 biomarcadores em potencial para a inibição da produção de IL-10 nas amostras de Fabaceae testadas (destacados em vermelho). Como já explicitado anteriormente, não foi possível se obter um modelo estatístico que permitisse a análise de correlação com os dados no modo positivo e por isso a busca por esses biomarcadores não pôde ser realizada com os dados neste modo de ionização.

Figura 42 - Gráfico *Coefficiente versus VIP* com os potenciais biomarcadores responsáveis pela inibição da produção de IL-10 nas amostras de Fabaceae em destaque em vermelho, dos dados no modo negativo.



FONTE: Do autor.

4.11 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES ANTI-INFLAMATÓRIOS POR DIAGRAMAS DE VENN

Embora os estudos metabolômicos sejam bastante eficientes na busca por compostos correlacionados com propriedades específicas (como a anti-inflamatória, deste trabalho), observa-se que ainda assim foi obtida uma grande quantidade de biomarcadores. Uma

estratégia para se descobrir biomarcadores destacadamente valiosos para a atividade anti-inflamatória neste caso consiste em se cruzar dados sobre estes compostos altamente correlacionados com tal propriedade farmacológica por diferentes mecanismos de ação.

Os estudos metabolômicos anteriormente descritos permitiram selecionar os biomarcadores responsáveis pela atividade apresentada pelas amostras de Fabaceae em cada um dos ensaios a que foram submetidas (*in vitro* antioxidante e *ex vivo* de inibição da produção de PGE₂ e IL-10). Desta forma, cruzando-se a informação da identidade (T_R e *m/z* em MS¹) de cada um desses biomarcadores associados à atividade em cada um dos três ensaios citados é possível associar as substâncias mais promissoras que possam agir contra o processo inflamatório, uma vez que estariam associadas a tal propriedade pelos três mecanismos de ação, simultaneamente.

Para isso, uma análise utilizando-se diagramas de *Venn* foi realizada agrupando em conjuntos, os compostos apontados como potenciais (biomarcadores) contra a inflamação em cada um dos diferentes mecanismos de ação avaliados neste trabalho (antioxidante, inibição da produção de IL-10 e inibição de PGE₂). Assim, os compostos apontados como biomarcadores em cada um dos mecanismos de ação encontram-se em um dos três conjuntos no diagrama de *Venn*. Aqueles apontados como biomarcadores pelos estudos metabolômicos em mais de um mecanismo de ação, estão em comum (interseção) entre os conjuntos. Já aqueles compostos que não foram apontados como biomarcadores em nenhum dos mecanismos de ação contra a inflamação, na metabolômica, não foram inclusos nos conjuntos. Esta análise permitiu descobrir dentre os biomarcadores de cada uma das atividades testadas, quais compostos apresentam-se ativos em todas elas, o que permite inferir que estes seriam tais compostos com grande potencial contra a inflamação, por agirem em diferentes vias do processo inflamatório. A tabela 23 apresenta a quantidade de biomarcadores obtidos nos estudos metabolômicos descritos anteriormente para cada bioensaio e a figura 43 resume os resultados do cruzamento da identidade deles entre os ensaios testados, com o número de biomarcadores nos conjuntos, destacando aqueles em interseção entre estes conjuntos. Ressalta-se aqui a impossibilidade de se buscar os biomarcadores das amostras de Fabaceae quanto ao potencial de inibição da produção de IL-10 para o modo positivo, uma vez que não foi possível se obter resultados satisfatórios pelas análises por PLS-DA ou OPLS-DA, em metabolômica.

Tabela 24 - Quantidade de biomarcadores obtidos pelos estudos metabolômicos de correlação da composição química das amostras de Fabaceae e a atividade farmacológica, em cada um dos ensaios.

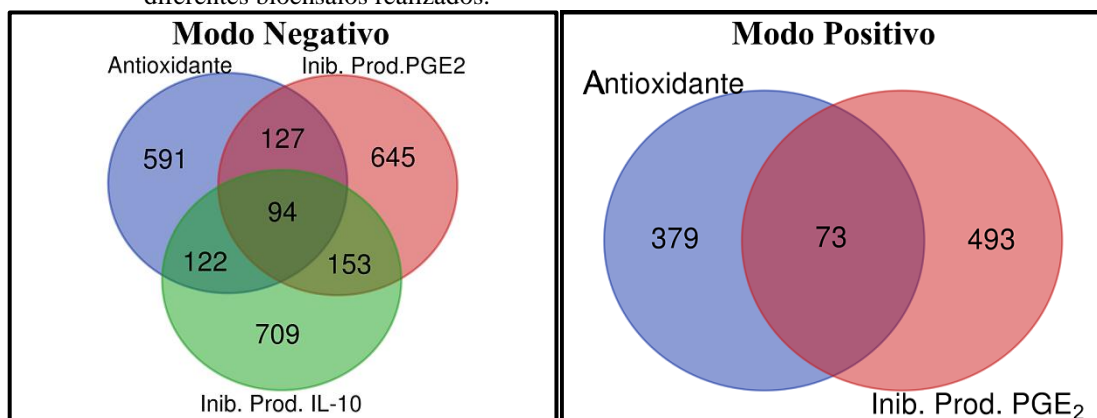
Atividade	Modo Negativo	Modo Positivo
<i>Antioxidante</i>	934	452
<i>Inibição da Produção de PGE₂</i>	1019	566
<i>Inibição da Produção de IL-10</i>	1078	-

FONTE: Do autor.

Observa-se que em geral, o número de biomarcadores encontrados para cada um dos ensaios é relativamente próximo, variando-se entre 934 e 1078, para os dados no modo negativo e 452 e 566, no modo positivo.

O diagrama de *Venn* da figura 43 permite observar que embora houvesse um grande número de compostos atribuídos à atividade anti-inflamatória em cada ensaio (de acordo com a tabela 23 anterior) é possível selecionar somente aqueles compostos ativos em comum em dois ou três dos ensaios. Assim, percebe-se que para o modo negativo 94 biomarcadores são altamente correlacionados às três atividades testadas, o que indica o grande potencial anti-inflamatório dessas substâncias, pela possibilidade de agirem por três mecanismos de ação diferentes contra o processo inflamatório. Ainda no modo negativo, outros números maiores de biomarcadores podem estar relacionados ainda a pelo menos dois mecanismos de ação diferentes, o que permite atribuir também uma certa prioridade na busca pela identidade destes compostos. Para o modo positivo, 73 substâncias se apresentaram como altamente correlacionadas com o potencial antioxidante e inibidor da produção de PGE₂ pelas amostras de Fabaceae.

Figura 43 - Diagramas de *Venn* com a sobreposição do número de biomarcadores identificados como de grande potencial para a atividade anti-inflamatória por se apresentarem em comum e importantes nas amostras de plantas de Fabaceae, analisados por metabolômica nos diferentes bioensaios realizados.



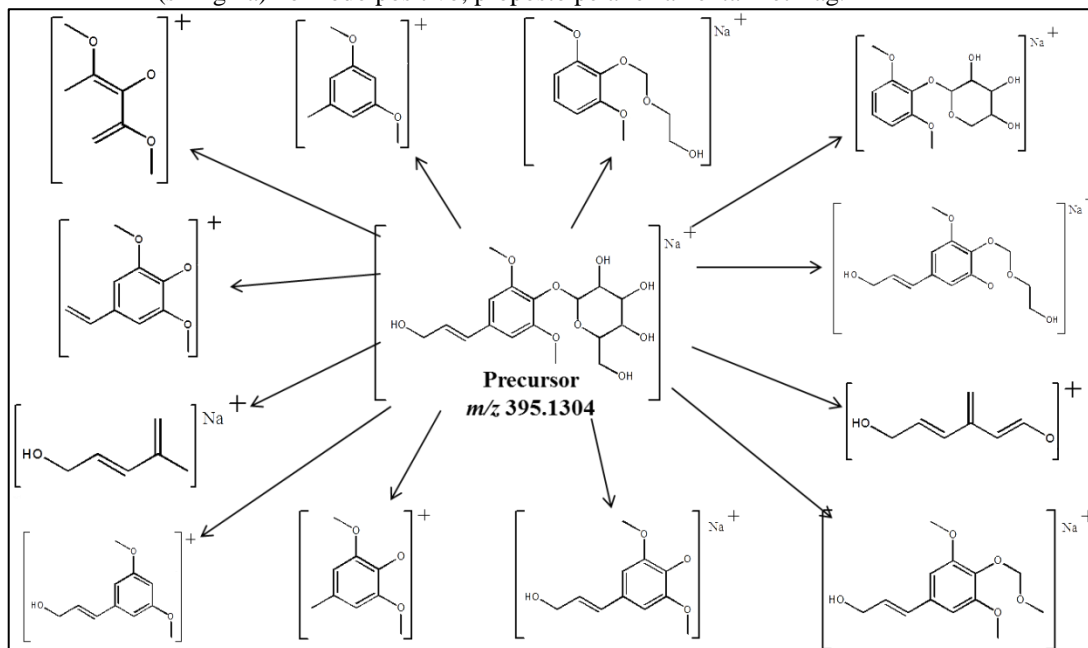
FONTE: Do autor.

Utilizando-se desta estratégia, a caracterização dos compostos pode ser feita priorizando-se aqueles com mais de um mecanismo de ação contra a inflamação, o que permitiria identificar ou mesmo guiar o isolamento daqueles compostos de grande potencial anti-inflamatório nas amostras de Fabaceae.

4.12 ANOTAÇÃO DOS PRINCIPAIS BIOMARCADORES DE FABACEAE CONTRA A INFLAMAÇÃO

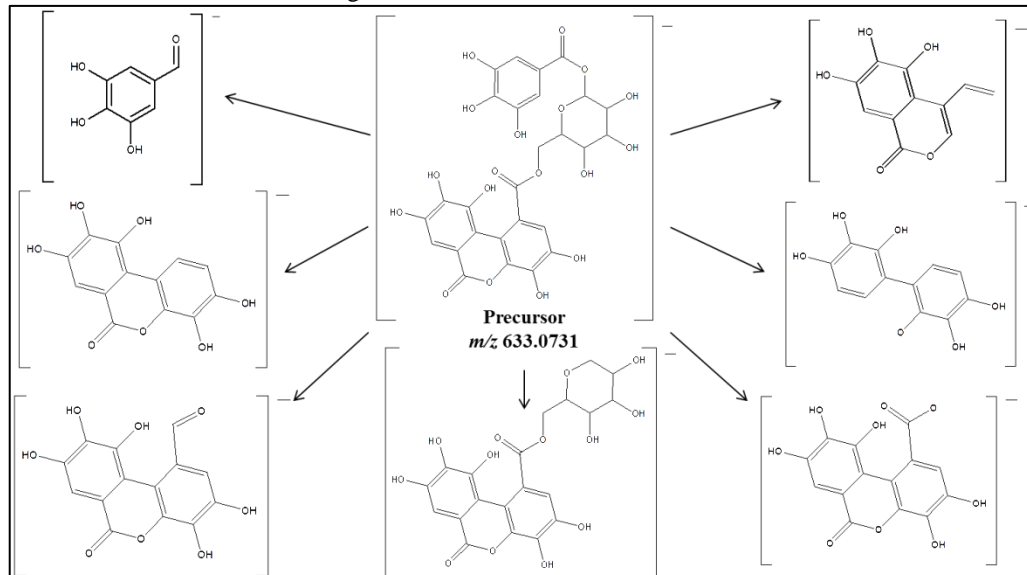
A identificação dos principais biomarcadores apontados pelos estudos metabolômicos como importantes e altamente correlacionados com a atividade anti-inflamatória, foi feita por anotação utilizando-se a ferramenta MetFrag. Este consiste de um software online que opera como um fragmentador *in silico* e que combina o poder de predição da identidade de uma substância baseado em padrões isotópicos e de fragmentação MS/MS. O software cruza tais dados com informações contidas nas principais bases de dados como PubChem, LipidMaps e KEGG, para exibir a identidade dos principais candidatos de cada biomarcador, pela fórmula molecular do composto e razão m/z do íon precursor. Os candidatos à identidade de cada biomarcador são exibidos em um *score ranking* que leva em consideração o valor exato da razão m/z dos íons precursor e fragmentos, o valor de energia de dissociação de ligação (*Bonding Dissociation Energy* - BDE) e os sinais dos íons produtos formados a partir dos íons precursores que passam pela célula de colisão e são então fragmentados (RUTTKIES *et al.*, 2016). A busca por possíveis fórmulas moleculares e suas identidades foi feita previamente também com auxílio das regras apresentadas por Kind e Fiehn (2008) aliado a bases de dados abrangentes como DNP (2015), METLIN e SciFinder[®]. A anotação dos compostos no MetFrag foi feita considerando-se as ionizações do tipo $[M-H]^-$ para o modo negativo e $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ para o modo positivo, considerando-se desvios nos valores de m/z de até no máximo 10 ppm. As figuras 44 e 45 a seguir mostram exemplos de biomarcadores anotados, onde os fragmentos apresentados explicam os sinais no espectro de massas (pelos valores de m/z), considerando-se os valores de desvios permitidos (10 ppm, neste caso). As reações de formação destes fragmentos são iônicas e tais como descritas por Demarque *et al.* (2016).

Figura 44 - Sugestão de fragmentos formados a partir do íon precursor do biomarcador P14 (siringina) no modo positivo, proposto pela ferramenta MetFrag.



FONTE: Do autor.

Figura 45 - Sugestão de fragmentos formados a partir do íon precursor do biomarcador N45 (1-O-galoil-6-O-luteoil-alfa-D-glucose) no modo negativo, proposto pela ferramenta MetFrag.



FONTE: Do autor.

Tendo-se em vista o valor de m/z dos íons precusores bem como dos respectivos fragmentos formados a partir deles, pode-se inferir que a metodologia aqui utilizada representa uma técnica bastante eficaz para proposta de identificação de compostos, sugerindo um maior grau de confiabilidade nas identidades propostas quando comparado ao se considerar somente valores de m/z dos íons precusores dos candidatos à identificação. Assim

sendo, as identidades propostas para os biomarcadores em comum nos bioensaios avaliados, no modo negativo e positivo, são mostrados respectivamente nas tabelas dos APÊNDICES C e D.

Analisando-se as tabelas dos APÊNDICES C e D observa-se que uma grande quantidade dos compostos apontados como biomarcadores com grande potencial contra inflamação puderam ter suas estruturas ou pelo menos suas classes químicas anotadas. No total, 57,5 % dos potenciais biomarcadores no modo positivo puderam ser caracterizados (42 compostos) e 39,4 % no modo negativo (37 compostos).

Em geral, maior parte dos biomarcadores anotados, em ambos os modos de ionização, são polifenóis tais como flavonoides glicosilados e derivados do ácido gálico. Apesar de muitos deles terem tido suas estruturas definidas pela anotação, outros tiveram somente suas classes químicas definidas devido à ambiguidade ou diversas possibilidades apresentadas pelos padrões de fragmentação dos candidatos à identidade destes biomarcadores.

Dentre os biomarcadores de grande potencial contra a inflamação anotados como derivados de flavonoides destaca-se o composto N32 (gossipetina 8-glucosídeo-3-sulfato). Embora a ocorrência de flavonoides sulfatados seja descrita de forma genérica em muitas famílias de plantas angiospermas, estes compostos ainda não foram descritos para espécies da família Fabaceae. Alguns estudos têm mostrado diversas atividades biológicas apresentadas por estes tipos de compostos destacando-se o potencial antioxidante, anticoagulante e também anti-inflamatório (no controle da expressão de COX-2, por exemplo) (TELES, SOUZA, SOUZA, 2018). Já flavonoides clorados, como o biomarcador P19 anotado como uma cloro-tetrahidroxiflavona, embora também seja de menor ocorrência que os respectivos flavonoides não-clorados, já têm sido reportados para representantes desta família (LI *et al.*, 2015). Além disso, o potencial anti-inflamatório para um flavonoide clorado com esta estrutura já foi descrita, por reduzir espécies reativas (atividade antioxidante) e modular a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8 em ensaios com sangue total humano, como testado nos ensaios do nosso trabalho (PROENÇA *et al.*, 2017). Tais resultados corroboram a importância destes biomarcadores, apontados pelos estudos metabolômicos realizados, para a atividade anti-inflamatória nos ensaios realizados. Outro biomarcador caracterizado como flavonoide que merece destaque é aquele anotado como tendo nitrogênio em sua estrutura (P20). Este tipo de composto é também conhecido como flavonoide-alcaloide e ocorre geralmente em espécies que produzam metabólitos destas duas classes, como no caso da família Fabaceae (KHADEM, MARLES, 2012). Alguns compostos

desta subclasse também têm sido destacados pela atividade anti-inflamatória, como na inibição da COX (ILKEI *et al.*, 2018).

Observa-se também que grande número de polifenóis anotados entre os biomarcadores, em ambos os modos de ionização, são caracterizados pelos diversos derivados do ácido gálico, como aqueles ligados a glicosídeos ou seus diversos oligômeros, como os derivados de ácido elágico e as elagitaninas. Estes compostos também têm sido descritos com diferentes mecanismos de ação contra inflamação (CHOUBEY *et al.*, 2015; DEROSA, MAFFIOLI, SAHEBKAR, 2016; BENZAAD *et al.*, 2017; LORENZO *et al.*, 2019).

Além dos demais flavonoides anotados entre os biomarcadores de Fabaceae, outros polifenóis também puderam ser caracterizados pela anotação, tais como derivados de ácido cinâmico, como P23 e N93. O potencial anti-inflamatório de diversos destes derivados foi também já descrito na literatura (PRAGASAM, VENKATESAN, RASSOL, 2013; ZHAO *et al.*, 2016; TAOFIQ *et al.*, 2017).

Outros compostos com atividade anti-inflamatória já descrita na literatura também foram propostos na anotação dos biomarcadores como as saponinas principalmente as derivadas do ácido oleanólico (P51, P52, P57, P58, P59 e P60) (CALIXTO, OTUKI, SANTOS, 2003; POLLIER, GOOSSENS, 2012; WU *et al.*, 2016) e derivado de feoforbídeo A (P66) (ISLAM *et al.*, 2013).

Apesar da grande quantidade de compostos anotados entre os biomarcadores utilizando-se a abordagem de desreplicação (anotação de picos) apresentada neste trabalho, ainda assim muitos deles não puderam ter suas estruturas propostas e, portanto, tiveram somente suas fórmulas moleculares sugeridas. Isso indica que estes podem representar compostos com estrutura e atividade anti-inflamatória inéditas. Além disso, é importante ressaltar que a anotação dos compostos aqui apresentados (com até mesmo a estereoquímica determinada, para alguns compostos) foi realizada com base na descrição prévia na literatura da ocorrência desses compostos em espécies do mesmo gênero ou família (Fabaceae) em estudo neste trabalho. Sendo assim, para a confirmação da estrutura exata dos compostos anotados é necessário o isolamento e utilização de técnicas de análises como RMN, UV, IV, MS, dicroísmo circular, etc. em conjunto.

Sendo assim, os resultados dos estudos metabolômicos aqui obtidos representam outra estratégia na busca por biomarcadores das amostras de Fabaceae contra a inflamação e diferente da apresentada na seção 4.9. Naquela, a anotação dos compostos e comparação do perfil metabólico das espécies ativas no ensaio *ex vivo* de inibição de PGE₂ permitiu observar

de forma manual uma grande quantidade de compostos presentes majoritariamente naquelas amostras de extrato e obter informações acerca da atividade anti-inflamatória na literatura. Entretanto, nenhuma informação acerca dos compostos ainda não conhecidos naquelas amostras pôde ser obtida. Já por meio da metabolômica, a anotação dos compostos se deu entre os biomarcadores tidos como mais promissores entre as amostras de Fabaceae para a atividade anti-inflamatória (por serem apontados como importantes em três diferentes bioensaios) onde, apesar de muitos *hits* na anotação, grande quantidade de substâncias das amostras vegetais de Fabaceae também se apresentou como desconhecida e possivelmente inédita.

Considerando-se as ideias apresentadas acima acerca da atividade anti-inflamatória dos diversos compostos anotados e ainda a ausência de identidade para muitos deles, tem-se que os estudos metabolômicos aqui realizados consistem de uma estratégia valiosa que auxiliará na condução de estudos fitoquímicos posteriores dos extratos das diferentes espécies de Fabaceae estudados neste trabalho. Desta forma, estes potenciais biomarcadores (principalmente aqueles que não puderam ter sua estrutura química proposta) poderão ser isolados, precisamente identificados através das diversas técnicas analíticas disponíveis como espectroscopia nas regiões do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN), dentre outros. Devidamente identificados, poderão posteriormente ser avaliados quanto à atividade anti-inflamatória pelos mecanismos de ação testados no presente trabalho, bem como por outros ensaios descritos na literatura a fim de se buscar compostos com melhor eficácia no tratamento da inflamação e menores efeitos adversos, permitindo o progresso e desenvolvimento ainda maior da bioprospecção das espécies desta família para obtenção de novos compostos com potencial anti-inflamatório.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho compreendeu um estudo abrangente com diferentes propostas de avaliação da atividade anti-inflamatória de amostras de extratos de 47 espécies diferentes da família Fabaceae. Através do uso de diversas técnicas analíticas modernas, a composição química destes extratos pôde ser relacionada com a atividade anti-inflamatória.

O uso de ensaio *in vitro* com DPPH permitiu inferir acerca da atividade antioxidante das amostras. Apesar de apresentar uma metodologia simples, os resultados deste ensaio permitiram relacionar a ação das amostras de extratos na prevenção da formação de espécies reativas radicalares que podem ser formadas nos processos inflamatórios, e que podem levar ainda a doenças como câncer, Alzheimer, Parkinson, entre outras.

O bioensaio *ex vivo* que avaliou a inibição da produção de IL-10 no sangue humano representou uma abordagem mais próxima de um ensaio *in vivo*, uma vez que se utilizou sangue bruto humano em que o microambiente ali utilizado se aproximava mais de um sistema *in vivo* que *in vitro*. A partir disso, após a padronização do uso do indutor da inflamação e tempo de incubação no teste, a quantificação desta citocina por meio de kit ELISA permitiu comparar o desempenho das amostras de extratos vegetais em estudo com o fármaco de referência dexametasona, na regulação da produção de IL-10. Além dos resultados das amostras por este mecanismo de ação, a metodologia determinada permite avaliar a regulação de amostras na produção de outros diferentes mediadores da inflamação, de acordo com a disponibilidade do kit de detecção ELISA, representando uma metodologia versátil para avaliação da atividade anti-inflamatória.

Neste sentido, a mesma metodologia do bioensaio *ex vivo* no sangue humano foi utilizada para avaliação da regulação de amostras de extratos na produção de PGE₂. Desta forma, o uso de LC-MS/MS na detecção de PGE₂ produzida no sangue se apresentou como uma técnica seletiva, sensível e eficaz para quantificação de PGE₂ nas amostras de plasma. Assim, a regulação da produção de PGE₂ pelas amostras de extratos vegetais de Fabaceae bem como fármacos de referência permitiu obter resultados promissores acerca da atividade anti-inflamatória das espécies em estudo, bem como inferir sobre um possível mecanismo de ação, seja por inibição da via da COX ou mesmo PLA₂. As espécies ativas foram *A. polyphylla*, *P. pluviosa*, *E. contorsiliquum*, *H. balansae* e *P. dubium*.

Já os resultados do bioensaio *in vivo* de edema de orelha em ratos confirmaram o potencial anti-inflamatório daquelas amostras advindas do ensaio *ex vivo* da produção de PGE₂, onde quatro das cinco espécies ativas no ensaio *ex vivo* apresentaram-se ativas também

no ensaio *in vivo*, indicado pela atividade antiedematogênica delas (*A. polyphylla*, *P. pluviosa*, *E. contorsiliquum*, *H. balansae*). Estes resultados confirmaram a relevância do ensaio *ex vivo* desenvolvido de avaliação da produção de PGE₂ no sangue como método de triagem eticamente valioso para avaliação da atividade anti-inflamatória de grande número de amostras, como neste trabalho. Isto porque o ensaio no sangue permitiu que somente pequeno número de amostras vegetais fosse guiado para o ensaio *in vivo*, evitando-se assim o uso indiscriminado de animais.

Em relação ao potencial anti-inflamatório das 47 espécies de Fabaceae estudadas neste trabalho, algumas delas apresentaram-se fortemente promissoras: as amostras de extrato das espécies *A. polyphylla*, *H. balansae* e *P. pluviosa* foram ativas na inibição da produção de IL-10 e PGE₂ no sangue, bem como na inibição do edema de orelha no ensaio *in vivo*. Já as espécies *L. ferrea*, *C. pulcherrima* e *S. adtringens* apresentaram-se ativas quanto à atividade antioxidante e também na inibição da produção de IL-10.

Já o ensaio de dosagem de MPO a partir das amostras de fragmentos de orelha do ensaio *in vivo* permitiu concluir que duas dentre as cinco espécies de Fabaceae (*A. polyphylla* e *P. pluviosa*) ativas no ensaio *ex vivo* de inibição da produção de PGE₂ apresentaram também atividade de inibição de recrutamento de neutrófilos. Embora a espécie do gênero *Poincianella* já tenha sido solidamente relatada quanto a atividade anti-inflamatória na literatura, bem como alguns de seus compostos, *A. polyphylla* ainda não foi relatada quanto a este potencial farmacológico, apresentando-se como uma espécie inédita.

Com o intuito de se avaliar o mecanismo de ação das amostras vegetais testadas no modelo de inflamação cutânea, uma metodologia foi desenvolvida para extração e detecção dos principais mediadores envolvidos na inflamação (PGE₂ e LTB₄) a partir dos fragmentos de orelha do ensaio *in vivo*. A metodologia apresentou poucos passos na extração destes metabólitos, com homogeneização simples do material biológico e uso reduzido de solvente. Embora o método tenha apresentado altos níveis de efeito de matriz em sua validação, ele se apresentou eficaz como ensaio limite, de acordo com os guias de validação, na diferenciação dos níveis de ambos os eicosanoides entre os grupos controles (positivos e negativo) e da amostra vegetal analisada (*P. pluviosa*). Como esperado, ele permitiu confirmar a redução dos níveis de PGE₂ pelos fármacos de referência (indometacina e dexametasona) e de LTB₄, somente pela dexametasona. Além disso, em relação à espécie vegetal analisada (*P. pluviosa*), foi possível inferir que a amostra age no modelo de inflamação cutânea, inibindo a produção de PGE₂ e LTB₄, simultaneamente, levando-se à conclusão de que ela possa agir em ambas as

vias enzimáticas, COX e LOX, ou mesmo na inibição da PLA₂, como os AIEs. O método desenvolvido poderá ainda ser utilizado para avaliação do mecanismo de ação de diversas outras amostras, de origem natural ou sintética, em trabalhos futuros.

A análise do perfil metabólico das amostras de extrato das espécies de Fabaceae estudadas neste trabalho foi feita de duas formas a fim de se buscar os principais compostos com atividade anti-inflamatória. Para isso, utilizou-se de técnicas modernas de anotação de picos com uso de dados de LC-HRMS/MS e comparação com bases de dados abrangentes, bem como uma ferramenta de fragmentação e comparação *in silico* (MetFrag), o que permitiu a obtenção de informações valiosas acerca da proposta de identidade dos compostos anotados.

Inicialmente, somente as amostras ativas no ensaio *ex vivo* de inibição de PGE₂ no sangue foram desreplicadas e os compostos anotados foram comparados por sua ocorrência e intensidade das áreas dos respectivos picos entre as amostras. Esta análise do perfil metabólico permitiu reconhecer que a maioria dos compostos anotados contribuem para atividade anti-inflamatória naquelas amostras, de acordo com suas identidades e/ou classes químicas, baseados em estudos da literatura.

Outra análise mais abrangente, por meio dos estudos metabolômicos, permitiu comparar o perfil metabólico de todas as espécies de Fabaceae em estudo de forma abrangente e relacioná-lo com a atividade anti-inflamatória, permitindo-se buscar os principais biomarcadores responsáveis por este potencial farmacológico destas amostras por diferentes mecanismos de ação. Assim, o cruzamento dos resultados permitiu guiar a anotação dos compostos fortemente promissores à atividade anti-inflamatória por diferentes mecanismos de ação, simultaneamente. Desta forma, estudos fitoquímicos posteriores poderão ser guiados pelos resultados deste trabalho a fim de se isolar os compostos com estrutura proposta para confirmação da identidade ou atividade anti-inflamatória ou ainda para identificação daqueles tidos como inéditos pela estrutura ou atividade anti-inflamatória.

A anotação dos compostos realizada neste trabalho permitiu reconhecer a grande diversidade de compostos possivelmente presentes nas espécies vegetais de Fabaceae estudadas, de acordo com relatos da literatura e com os dados de cromatografia e espectrometria de massas de alta resolução das amostras de extrato, tendo sido anotados compostos como flavonoides glicosilados ou agliconas, triterpenos, saponinas, esfingolipídios, alcaloides, elagitaninas e derivados de ácido elágico, e ainda outros menos comuns como flavonoides clorado, sulfurado ou nitrogenado.

Por fim, este trabalho consistiu de um estudo sustentável e ético de grande número de amostras, com uso de diferentes metodologias e ferramentas para avaliação da atividade anti-inflamatória e do perfil metabólico, a fim de se buscar espécies e/ou compostos com tal propriedade. Os métodos desenvolvidos para avaliação da atividade anti-inflamatória *ex vivo* em sangue humano, compreendem metodologias relativamente simples, versáteis, baratas e representativas para o estudo em que foram propostos. O uso reduzido do número de animais e também de massa vegetal das partes renováveis dos indivíduos estudados, permitem o desenvolvimento da bioprospecção das espécies da família Fabaceae de forma ética para a obtenção de compostos com maior eficácia e menores efeitos adversos na terapia da inflamação. Além disso, os resultados deste trabalho destacam a grande importância da biodiversidade da flora brasileira como fonte valiosa para obtenção de agentes fitoterápicos e/ou fitomedicamentos, ou mesmo para inspiração na síntese de novos fármacos, evidenciando a grande necessidade de medidas contra o desmatamento e manutenção da vida das espécies.

REFERÊNCIAS

AFONSO, P. V. *et al.* LTB₄ is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. **Developmental Cell**. v.22, n.5, p. 1079-1091, 2012.

AI, W. *et al.* Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.10, n.9, p. 3834-3842, 2013.

AL-HARBI, N. O. *et al.* Dexamethasone attenuates LPS-induced acute lung injury through inhibition of NF-κB, COX-2, and pro-inflammatory mediators. **Immunological Investigations**. v.45, n.4, p. 349-369, 2016.

ANDRADE, A. L. P.; MIOTTO, S. T. S.; SANTOS, E. P. A subfamília Faboidea (Fabaceae Lindl.) no parque estadual do Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**. v.36, n.4, p.737-768, 2009.

ARAÚJO, A. A. *et al.* Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.156, p. 88-96, 2014.

ARAÚJO, P. *et al.* Development and validation of an extraction method for the determination of pro-inflammatory eicosanoids in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1353, p. 57-64, 2014.

ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**. v.33, p. 1582-1614, 2015.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**. v.72, p. 4-15, 2015.

BALDIM, J. L. *et al.* Caesalpinioflavone, a New Cytotoxic Biflavonoid Isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. **J. Braz. Chem. Soc**. v.26, n.4, p. 804-809, 2015.

BALDIM, J. L. *et al.* The Correlation between Chemical Structures and Antioxidant, Prooxidant, and Antitrypanosomatid Properties of Flavonoids. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2017, p. 1-12, 2017.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arq. Bras. Cardiol.** v.94, n.4, 522-529, 2010.

BARONE, F. C. *et al.* Time-related changes in myeloperoxidase activity and leukotriene B₄ receptor binding reflect leukocyte influx in cerebral focal stroke. **Mol. Chem. Neurophatol.** v.24, n.1, p. 13-30, 1995.

BEER, L. **Guidelines for Measurement of Cytokines in Human Serum and Plasma: Effects of Blood Sample Handling Procedures on Measured Cytokine and Chemokine Concentrations in Human Serum and Plasma**, Akademiker Verlag, November, 9, 2013.

BENSAAD, L.A. *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complement Altern Med.** v.17, n.47, p. 1-10, 2017.

BEZERRA, G. P. *et al.* Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology.** v.149, n.1, p. 62-69, 2013.

BOONPHONG, S. *et al.* Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. **Journal of Natural Products.** v.70, n.5, p. 795-801, 2007.

BORGES, H. D. S. **15-Deoxi-A12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) reduz a produção de IL-8 induzida por alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em linhagem de queratinócitos humanos.** 2017. 70f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, UFU, Uberlândia, 2017.

BORGSTRÖM, L. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* veritas. **Allergy.** v.54, p. 88-92, 1999.

BOUDJOU, S. *et al.* Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. **Food Chemistry.** v.138, n.2-3, p. 1543-1550, 2013.

BOUR, A. M. J. J. *et al.* Interaction of indomethacin with cytokine production in whole blood. Potential mechanism for a brain-protective effect. **Experimental Gerontology.** v.35, n.8, p. 1017-1024, 2000.

BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The journal of Investigative dermatology.** v.78, n.3, p. 206-209, 1982.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27 D 22 DMD 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_22_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3. Acesso em 01 jul. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC Nº 166 24/06/2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. DOU 25/06/2017 – ANVISA.** Brasília, 2017. Disponível em <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>, acesso em 15 fev. 18.

BRIDEAU, C. *et al.* A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. **Inflamm. Res.** v.45, p. 68-74, 1996.

BRUNE, K.; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pain Research.** v.8, p. 105-118, 2015.

BUKHARI, I. A. *et al.* Analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet activities of the methanolic extract of *Acacia modesta* leaves. **Inflammopharmacology.** v.18, p. 187-196, 2010.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of Botanicals? A critical perspective. **Planta Med.** v.78. p. 747-754, 2012.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Planta Med.** v.69, p. 973-983, 2003.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova.** v.41, n.1, p. 75-91, 2018.

CAO, H. *et al.* An improved LC-MS-MS method for the quantification of prostaglandins E₂ and D₂ production in biological fluids. **Analytical Biochemistry.** v.372, n.1, p. 41-51, 2008.

CARDINAL, S. *et al.* Anti-inflammatory properties of quebecol and its derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v.26, p. 440-444, 2016.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anestesiol.** v.54, n.3, p. 448-464, 2004.

CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises em pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova.** v.32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

CASTRO, A. P. *In vivo* schistosomicidal activity of 7-epiclusianone and its quantification in the plasma of healthy and *Schistosoma mansoni* infected mice using UPLC-MS/MS. **Phytomedicine.** v.38, p. 66-73, 2018.

CELOTTI, F.; LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacological Research.** v.43, n.5, 2001.

CESARINO, E. C. *et al.* Composição química e atividade antioxidante de *Acacia polyphylla* (Fabaceae). **Revista Virtual de Química.** v.12, n.2, p. 424-432, 2020.

CHAGAS-PAULA, D. A. *et al.* Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. **Planta Med.** v.81, p. 450-458, 2015.

CHARLIER, C.; MICHAUX, C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (LOX-5) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v.38, n.7-8, p. 645-659, 2003.

CHOUBEY, S.; VARUGHESE, L.R.; KUMAR V.; BENIWAL V. Medicinal importance of gallic acid and its esters derivatives: a patent review. **Pharm Pat Anal.** v.4, n.4, p. 305-315, 2015.

CROTI, A. E. M. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova.** v.29, n.2, p. 287-292, 2006.

CROUVEZIER, S. *et al.* The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes *in vitro*. **Cytokine.** v.13, n.5, p. 280-286, 2001.

DE GROOTE, D. *et al.* Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. **Cytokine.** v.4, n.3, p. 239-248, 1992.

DEIDDA, M. *et al.* Metabolomics, a promising approach to translational research in cardiology. **IJC Metabolic & Endocrine**. v.9, p. 31-38, 2015.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrosprays ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Nat. Prod. Rep.** v.33, p. 432-455, 2016.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** v.15, n.8, p. 511-523, 2015.

DEROSA G.; MAFFIOLI P.; SAHEBKAR A. (2016). Ellagic acid and its role in chronic diseases. In: Gupta S, Prasad S, Aggarwal B. Anti-inflammatory nutraceuticals and chronic diseases. **Adv Exp Med Biol**. v.928, p. 473-479, 2016.

DE VOS, R. C. H. *et al.* Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**. v.2, n.4, p. 778-791, 2007.

DNP. Dictionary of Natural Products, online database, 2015.

DOMINGOS, O. S. *et al.* Anti-Inflammatory Derivatives with Dual Mechanism of Action from the Metabolic Screening of *Poincianella pluviosa*. **Molecules**. v.24, n.4375, p. 1-16, 2019.

DUARTE, G. H. B. **Metabolômica por LC-ESI-QTOF-MS em plasma de camundongos NOD/SCID sob tratamento quimioterápico: potenciais biomarcadores da leucemia.** 2016. 77p. Dissertação (Mestrado em Química) – Unicamp, Campinas, SP, 2016.

DZOYEM, J. P.; ELOFF, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**. v.160, p. 194-201, 2015.

EBERHARD, J. *et al.* Quantitation of Arachidonic Acid Metabolites in Small Tissue Biopsies by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**. v.280, p. 258-263, 2000.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. Inflammation. disponível em www.britannica.com/science/inflammation, acesso em 30/10/2019.

ERNST, M. *et al.* Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Products Reports**. v.31, p. 784-806, 2014.

ESKDALE, J. *et al.* Interleukin 10 secretion relation to human IL-10 locus haplotypes. **PNAS**. v.95, n.16, p. 9465-9470, 1998.

FERREIRA, A. B. H. **Aurélio: o dicionário da língua portuguesa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Positivo, 2010.

FILHO, V. C. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**. v.23, n.10, p. 1347-1354, 2009.

FOGH, K.; HERLIN, T.; KRAGBALLE, K. Eicosanoids in skin of patients with atopic dermatitis: Prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ are present in biologically active concentrations. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.83, n.2, p. 450-455, 1989.

FRAIGE, K., *et al.* Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Phytochem. Anal.** v.29, n.2, p. 196-204, 2018.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**. v.36, n.10, p. 1605-1609, 2013.

FURMAN, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**. v.25, p. 1822-1832, 2019.

GALVÃO, A. F. *et al.* Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. **Anal. Bioanal. Chem.** v.408, p. 3613-3623, 2016.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**. v.2, n.3, p. 119-145, 2009.

GARCIA, P. L. *et al.* Analytical Method Validation. In: AKYAR, I. **Wide Spectra of Quality Control**. Croatia: InTech Europe, cap. 1, p. 3-20, 2011.

GOLLAN, D. E.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. J. **Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy**. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. 2017.

GOMES, E. C. B. S. *et al.* Evaluation of Antioxidant and Antiangiogenic Properties of *Caesalpinia Echinata* Extracts. **Journal of Cancer**. v.5, n.2, p. 143-150, 2014.

GONZÁLEZ, O. *et al.* Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**. v.1353, p. 10-27, 2014.

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

GOSETTI, F. *et al.* Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatography A**. v. 1217, n. 25, p. 3929-3937, 2010.

GUARIZE, L. *et al.* Anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of *Senna macranthera* leaves. **Natural Product Research**. v.26, n.4, p. 331-343, 2012.

GUIJAS, C. *et al.* METLIN: a technology platform for identifying knowns and unknowns. **Analytical Chemistry**. v.90, n.5, p.3156-3164, 2018.

HARIZI, H.; CORCUFF, J-B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**. v.14, n.10, p. 461-469, 2008.

HARVEY, A. L. *et al.* The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.14, n.2, p. 111-129, 2015.

HAVIXBECK, J. J. *et al.* Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. **Journal of Leukocyte Biology**. v.99, p. 241-252, 2016.

HAWKINS, D. M. The Problem of Overfitting. **J. Chem. Inf. Comput. Sci**. v.44, p. 1-12, 2004.

HENRIQUES, B. O. *et al.* *In vitro* TNF- α inhibitory activity of Brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2016, p. 1-15, 2016.

HUANG, Y. *et al.* Design, synthesis, biological evaluation and docking study of novel indole-2-amide as anti-inflammatory agents with dual inhibition of COX and 5-LOX. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.180, p. 41-50, 2019.

HUNG, L. *et al.* Human *ex vivo* and *in vitro* disease models to study food allergy. **Asia Pacific Allergy**. v.9, n.1, p. 1-13, 2019.

ILKEY, V.; HAZAI, L.; ANTUS, S.; BÖLCSKEI, H. Chapter 8 - Flavonoid Alkaloids: isolation, bioactivity, and synthesis. In.: **Studies in Natural Products Chemistry**. v.56, p. 247 -285, 2018.

INAMURA, H. *et al.* Expression of adhesion molecules on cord-blood-derived, cultured human mast cells and effect of dexamethasone on intercellular adhesion molecule-1 expression on the mast cells treated by phorbol myristate acetate. **Allergy**, v.4, n.5, p. 672–678, 2001.

ISLAM, M.N. *et al.* Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide A and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. **Food Chem Toxicol**. v.55, p.541-548, 2013.

KANCHANA, P.; SANTHA, M. L.; RAJA, K. D. A review on *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.5, n.1, p. 356-371, 2016.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **Int. J. Mol. Sci**. v.20, p. 1-31, 2019.

KAPLANSKI, G. *et al.* IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in Immunology**. v.24, n.1, p. 25-29, 2003.

KATAJAMAA, M.; ORESIC, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **Journal of Chromatography A**. v.1158, p. 318-328, 2007.

KENNEDY, B. M.; HARRIS, R. E. Cyclooxygenase and lipoxygenase gene expression in the inflammogenesis of breast cancer. **Inflammopharmacology**. v.26, p. 909-923, 2018.

KEUSTERMANS, G. C. E. *et al.* Cytokine assays: An assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. **Methods**. v.61, p. 10-17, 2013.

KHADEM, S.; MARLES, R. J. Chromone and flavonoid alkaloids: occurrence and bioactivity. **Molecules**. v.17, p. 191-206, 2012.

KHANAPURE, S. P. *et al.* Eicosanoids in Inflammation: Biosynthesis, Pharmacology, and Therapeutic Frontiers. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.7, p. 311-340, 2007.

KIM, B. *et al.* Phytosphingosine derivatives ameliorate skin inflammation by inhibiting NF- κ B and JAK/STAT signaling in keratinocytes and mice. **J Invest Dermatol**. v.134, n.4, p. 1023-1032, 2014.

KIM, E. *et al.* Syk/Src-targeted anti-inflammatory activity of *Codariocalyx motorius* ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v.155, p. 185-193, 2014.

KIND, T.; FIEHN, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. **BMC Bioinformatics**. v.8, n.105, p. 1-20, 2007.

KNOTHE, G. *et al.* Fatty acid profiles of some Fabaceae seed oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v.93, p. 1007-1011, 2016.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**. v.1, n.2, p. 35-61, 2009.

LANG, G. *et al.* Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**. v.71, p. 1595-1599, 2008.

LENG, S. X. *et al.* ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. **Journal of Gerontology: MEDICINAL SCIENCES**. v.63A, n. 8, p. 879-884, 2008.

LEAL, L. S. S. *et al.* The anti-inflammatory and antinociceptive effects of proteins extracted from *Acacia farnesiana* seeds. **Rev. Bras. Plantas Medicinai**s. v.18, n.1, p. 38-47, 2016.

LEVITZ, S. M. *et al.* Effects of interleukin-10 on human peripheral blood mononuclear cell responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**. v.64, n.3, p. 945-951, 1996.

LI, B. *et al.* Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. **Analytica Chimica Acta**. v.651, n.2, p. 234-240, 2009.

LI, J. *et al.* Natural therapeutic agents for neurodegenerative diseases from a traditional herbal medicine *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.25, p. 53-58, 2015.

LI, Q. *et al.* COX-2/12-LOX dual pathway, a novel strategy for treatment of multiple myeloma? **Biosci Hypotheses**, v.2, p. 81-84, 2009.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA Jr, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**. v.12, n.3, p. 218-220, 1998.

LINDMARK, E. *et al.* IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. **British Journal of Haematology**. v.102, p. 597-604, 1998.

LIU, K. *et al.* Novel approach to classify plants based on metabolite-content similarity. **Biomed Research International**. v.17, p. 1-12, 2017.

LIU, Z. *et al.* Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. **Cytokine**. v.2, p. 141-147, 2009.

LIMA, J. C. S. *et al.* Experimental Evaluation of Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for Antiinflammatory Activity. **Phytotherapy Research**. v. 12, p. 218-220, 1998.

LÓ, S.M.S.; DUARTE, M. R. Morpho-anatomical study of the leaf and stem of pau-alecrim: *Holocalyx balansae*. *Rev. Bras. Farmacognosia*. v.21, n.1, p. 4-10, 2011.

LONGNECKER, *et al.* Environmental metabolomics: Databases and tools for data analysis. **Marine Chemistry**. v.177, p. 366-373, 2015.

LORENZO, J.M. *et al.* Sources, chemistry and biological potential of ellagitannins and ellagic acid derivatives. **Stud Nat Prod Chem**. v.60, p. 189-221, 2019.

MADDIPATI, K. R.; ZHOU, S. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. v. 94, p. 59-72, 2011.

MAHADEVAN, S. *et al.* Analysis of Metabolomic Data Using Support Vector Machines. **Analytical Chemistry**, sl, v. 80, n. 19, p. 7562–7570, 2008.

MARGALIT, A.; DUFFIN, K. L.; ISAKSON, P. C. Rapid Quantitation of a Large Scope of Eicosanoids in Two Models of Inflammation: Development of an Electrospray and Tandem Mass Spectrometry Method and Application to Biological Studies. **Analytical biochemistry**. v.235, n.93, p. 73–81, 1996.

MARTÍNEZ, B.; PÉREZ-CASTILLO, A.; SANTOS, A. The mitochondrial respiratory complex I is a target for 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ action. **Journal of Lipid Research**. v.46, p. 736-743, 2005.

MARTINS-JÚNIOR, H. A. *et al.* Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “*tandem*” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**. v.29, n.3, p. 586-592, 2006.

MAYRINGER, I.; REINDL, M.; BERGER, T. A critical comparison of frequently used methods for the analysis of tumor necrosis factor- α expression by human immune cells. **Journal of Immunological Methods**. v.235, p. 33-40, 2000.

MCLAIN, R. F.; KAPURAL, L.; MEKHAIL, N. A. Epidural steroids for back and leg pain: Mechanism of action and efficacy. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v.71, n.12, p. 961-970, 2004.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, sl, v.114, n.1, p. 83–91, 2014.

MEIRELLES, A. F. G. **Uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial para determinação do perfil de eicosanoides em plasma após estimulação: comparação entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis**. 2016. 84p. Dissertação (Mestre em Ciências) – USP, Ribeirão Preto, SP, 2016.

MENDES, R. T. *et al.* Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 52, n.5, p. 767-782, 2012.

MESAROS, C.; LEE, S. H.; BLAIR, I. A. Targeted quantitative analysis of eicosanoids lipids in biological samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 877, p. 2736-2745, 2009.

MILES, E. A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P. C. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. **Nutrition**. v.21, n.3, p. 389-394, 2005.

MOLEIRO, A. F. *et al.* A critical analysis of the available *in vitro* and *ex vivo* methods to study retinal angiogenesis. **Journal of Ophthalmology**. v. 2017. p. 1-19, 2017.

MORAIS, S.M. *et al.* Fatty acid profile and anti-inflammatory activity of fixed plant oils. **Acta Sci Veter**. v.45, n.1437, p. 1-8, 2017.

MOURIER, P. A. J. *et al.* Analytical and statistical comparability of generic enoxaparins from the USA market with the originator product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.115, p. 431-442, 2015.

MUNN, L. L. Cancer and inflammation. **WIREs Syst Biol Med**. v.9, n.2, e.1370, 2016.

MURPHY, R. C. *et al.* Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. **Analytical Biochemistry**. v.346, p. 1-42, 2005.

NEGI, A.; SHARMA, N.; SINGH, M. F. Spectrum of pharmacological activities from *Bauhinia variegata*: a review. **Journal of Pharmacy Research**. v.5, n.2, p. 1-6, 2012.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. v.83, n.3, p. 770-803, 2020.

NGHONJUYI, N. W. *et al.* Acute and sub-chronic toxicity studies of three plants used in Cameroonian ethnoveterinary medicine: *Aloe vera* (L.) Burm. f. (Xanthorrhoeaceae) leaves, *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds or leaves, and *Mimosa pudica* L. (Fabaceae) leaves in Kabir chicks. **Journal of Ethnopharmacology**. v.178, p. 40-49, 2016.

NOIRI, E. *et al.* An *in vivo* approach showing the chemotactic activity of leukotriene B₄ in acute renal ischemic-reperfusion injury. **PNAS**. v.97, n.2, p. 823-828, 2000.

NGO, S. T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v.35, p.347-369, 2014.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método de DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.17, n.1, p. 36-44, 2015.

OJEWOLE, J. A. O.; ADEWUNMI, C. O. Anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of *Tetrapleura tetraptera* (Taub) [Fabaceae] fruit aqueous extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.95, p. 177-182, 2004.

OOMAH, B. D.; CORBÉ, A.; BALASUBRAMANIAN, P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, n.14, p. 8225- 8230, 2010.

OUYANG, W. *et al.* Regulation and functions of IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**. v.29, p. 71-109, 2011.

PALOMINO, D. C. T., MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. **Einstein (São Paulo)**. v.13, n.3, p. 469-473, 2015.

PANNUNZIO, A.; COLUCCIA, M. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: a review of oncology and medicinal chemistry literature. **Pharmaceuticals**. v.11, p. 1-20, 2018.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**. v.28, n.11, 2001.

PARENTE, L.; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. **Biochemical Pharmacology**. v.65, p. 153-159, 2003.

PATEL, S. S. *et al.* Screening of *Caesalpinia pulcherrima* Linn flowers for analgesic and anti-inflammatory activities. **International Journal of Applied Research in Natural Products**. v.3, n.3, p. 1-5, 2010.

PAVICIC T. *et al.* Anti-microbial and anti-inflammatory activity and efficacy of phytosphingosine: an *in vitro* and *in vivo* study addressing acne vulgaris. **Int J Cosmet Sci.** v.29, n.3, p. 181-190, 2007.

PERANTEAU, W. H. *et al.* IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **Journal of Investigative Dermatology.** v.128, p. 1852-1860, 2008.

PERINI, J. A. L. *et al.* Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev. Nutr.** v.23, n.6, p. 1075-1086, 2010.

PETERS, S.; VELZEN, E.; JANSEN, H. Parameter selection for peak alignment in chromatographic sample profiling: objective quality indicators and use of control samples. **Anal. Bioanal. Chem.** v.394, p. 1273-1281, 2009.

POLLIER, J.; GOOSSENS, A. Oleanolic acid. **Phytochemistry.** v.77, p. 10-15, 2012.

POOJARY, M. M.; VISHNUMURTHY, K. A.; ADHIKARI, A. V. Extraction, characterization and biological studies of phytochemicals from *Mammea suriga*. **Journal of Pharmaceutical Analysis.** v.5, n.3, p. 182-189, 2015.

POONGOTHAI, G.; SRIPATHI, S. K. A review of insulinomimetic pinitol from plants. **Int. Journal of Pharma and Bio Sciences.** v.4, n.2, p. 992-1009, 2013.

PRAGASAM, S. J.; VENKATESAN, V.; RASOOL, M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of *p*-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. **Inflammation.** v.36, n.1, p. 169-176, 2013.

PRESTE, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multiresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GS-MS (NCI-SIM).** 2007. 54p. Dissertação (Mestre em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

PROENÇA, C. *et al.* Chlorinated flavonoids modulate the inflammatory process in human blood. **Inflammation.** v.40, n.4, p. 1155-1165, 2017.

PUPPOLO, M.; VARMA, D.; JANSEN, S. A. A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. **Journal of Chromatography B.** v.964, p. 50-64, 2014.

ONIGA, S. D. *et al.* COX inhibition profile and molecular docking studies of some 2-(trimethoxyphenyl)-thiazoles. **Molecules**. v.22, p. 1-15, 2017.

QUEIROZ, A. C. *et al.* The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v.128, p.377-383, 2010.

RAHMAN, A. H. M. M.; PARVIN, M. I. A. Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**. v.2, n.1, p. 6-8, 2014.

RAJARAM, C. *et al.* Evaluation of anti-arthritic activity of *Caesalpinia pulcherrima* in Freund's complete adjuvant induced arthritic rat model. **Journal of Young Pharmacists**. v.7, n.2, p. 128-132, 2015.

RAMSDEN J.J. In: **Bioinformatics. Computational Biology**, v.10. Springer, London, 2009.

RAO, Y. K.; FANG, S.; TZENG, Y. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, n. 3, p. 249-253, 2005.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RUTTKIES, C. *et al.* MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond *in silico* fragmentation. **Journal of Cheminformatics**. v.8, n.3, p. 1-16, 2016.

SAEKI, K.; YOKOMIZO, T. Identification, signaling, and functions of LTB₄ receptors. **Seminars in Immunology**. v.22, p. 30-36, 2017.

SANTANA *et al.* Activity of Fabaceae species extracts against fungi and *Leishmania*: vatacarpan as a novel potent anti-*Candida* agent. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.25, p. 401-406, 2015.

SANTOS, M. F. C. *et al.* New bicyclic [3.2.1] octane neolignins derivatives from *Aniba firmula* with potent anti-inflammatory activity on account of dual inhibition of PGE₂ production and cell recruitment. **Phytochemistry Letters**. v.30, p. 31-37, 2019.

SCHNEIDER, I.; BUCAR, F. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. **Phyther Res**. v.19, p. 81-102, 2005.

SCHNEIDER, C. P.; SCHWACHA, M. G.; CHAUDRY, I. H. The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. **Biochimica and Biophysica Acta**. v.1689, n.1, p. 22-32, 2004.

SHEN, B. A. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**. v.163, n.6, p. 1297-1300, 2015.

SHEWALE, V. D. *et al.* Anti-Inflammatory Activity of *Delonix regia* (Boj. Ex. Hook). **Advances in Pharmacological Sciences**. v. 2012, p. 1-4, 2012.

SHI, D. *et al.* *In vitro* and *ex vivo* systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. **Biomaterials**. v.198, p. 228-249, 2019.

SHINDE, D. D. *et al.* LC-MS/MS for the simultaneous analysis of arachidonic acid and 32 related metabolites in human plasma: Basal plasma concentrations and aspirin-induced changes of eicosanoids. **Journal of Chromatography B**. v.911, p. 113-121, 2012.

SHREEDHARA, C. S. *et al.* Screening of *Bauhinia purpurea* Linn. for analgesic and anti-inflammatory activities. **Indian Journal of Pharmacology**. v.41, n.2, p. 75-79, 2009.

SIBUL *et al.* Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory potential of herb and root extracts of seven selected legumes. **Industrial Crops and Products**. v.83, p.641-653, 2016.

SILVA, D. *et al.* A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. **Acta Tropica**. v.127, n.2, p. 75-81, 2013.

SILVA, F. L. N. *et al.* Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**. v.7, p. 53-62, 2015.

SILVA, J. J. L. *et al.* Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesth Plast Surg**. v.33, p. 104-109, 2009.

SILVA, M. J. D. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos das folhas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista –UNESP. Araraquara. p. 120. 2016.

SOH, J. L. P. *et al.* Utility of multivariate analysis in modeling the effects of raw material properties and operating parameters on granule and ribbon properties prepared in roller compaction. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, sl, v.34, p. 1022–1035, 2008.

SONG, X. *et al.* Analytical performance of nano-LC-SRM using nondepleted human plasma over an 18-month period. **Proteomics**. v.16, p. 2118-2127, 2016.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, J. N. S. *et al.* Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v.18, n.6, p. 1276-1280, 2007.

STRAUS, D. S. *et al.* 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NK- κ B signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**. v.97, n.9, p. 4844-4849, 2000.

SUGIMOTO, M. *et al.* Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. **Current Bioinformatics**. v.7, p. 96-108, 2012.

SULEK, K. *et al.* A combined metabolomic and phylogenetic study reveals putatively prebiotic effects of high molecular weight arabino-oligosaccharides when assessed by *in vitro* fermentation in bacterial communities derived from humans. **Anaerobe**. v.28, p. 68-77, 2014.

SWENNEN, E. L. R.; BAST, A.; DAGNELIE, P. C. Immunoregulatory effects of adenosine 5'-triphosphate on cytokine release from stimulated whole blood. **European Journal of Immunology**. v.35, n.3, p. 852-858, 2005.

TANG, T. *et al.* Macrophage responses to lipopolysaccharide are modulated by a feedback loop involving prostaglandin E₂, dual specificity phosphatase 1 and tristetraprolin. **Scientific Reports**. v.7, n.4350, p. 1-13, 2017.

TAOFIQ, O. *et al.* Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges, and future perspectives, a review. **Molecules**. v.22, n.281, p.1-24, 2017.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**. v.38, p. 328-334, 2005.

TELES, Y. C. F.; SOUZA, M. S. R.; SOUZA, M. F. V. Sulphated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities. **Molecules**. v.23, n.480, p. 1-11, 2018.

TERRAGNO, A.; RACHELLE RYDZIK, R.; TERRAGNO, N. A. High Performance Liquid Chromatography and UV detection for the separation and quantitation of prostaglandins. **Prostaglandins**. v.21, n.1, p. 101-112, 1981.

THEODORO-JÚNIOR, O. A. *et al.* A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates pulmonary mechanics, inflammation and remodeling induced by elastase in mice. **Int. Journal of Molecular Sciences**. v.18, n.403, p. 1-18, 2017.

THOMET, O. A. R. *et al.* Anti-inflammatory activity of an extract of *Petasites hybridus* in allergic rhinitis. **International immunopharmacology**. v.2, n.7, p. 997-1006, 2002.

THURM, C. W.; HALSEY, J. F. Measurement of cytokine production using whole blood. **Current Protocols in Immunology**. Chapter 7, Unit 7.18B, 2005.

TONINI, G. **Polimorfismo no gene da interleucina-10 (IL-10) em mulheres infectadas pelo papiloma vírus humano (HPV)**. 2009. 125p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS – Porto Alegre, RS.

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

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**. v.6, p. 469-479, 2006

TUBARO, A. *et al.* The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**. v.17, n.3-4, p. 347-349, 1985.

ULRICH-MERZENICH *et al.* Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**. v.14, p.70-82, 2007.

VAN DER LINDEN, M. W. *et al.* Determination of tumour necrosis factor- α and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. **Journal of Immunological Methods**. v.218, n.1-2, p. 63-71, 1998.

VANDEKERCKHOVE, J.; MATZKE, D.; WAGENMAKERS, E.-J. Model comparison and the principle of parsimony. In: Busemeyer, J. R. *et al.* **The Oxford handbook of computational and mathematical psychology**. p. 300-320, 2015.

VARMA, V. R. *et al.* Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: a targeted metabolomics study. **PLOS Medicine**. v.15, n.1, p. 1-31, 2018.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**. v.10, p. 53-56, 2005.

VIJAYALAKSHMI, D. *et al.* *In vitro* inflammatory activity of *Aloe vera* by down regulation of MMP-9 in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v.141, n.1, p. 542-546, 2012.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano IX, n.36, p. 58-69, 2006.

WHO. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in patients with COVID-19. **World Health Organization**, disponível em [https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/the-use-of-non-steroidal-anti-inflammatory-drugs-\(nsaids\)-in-patients-with-covid-19](https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/the-use-of-non-steroidal-anti-inflammatory-drugs-(nsaids)-in-patients-with-covid-19), acesso em 01/05/2020.

WHORTON, A. R.; SWEETMAN, B. J.; OATES, J. A. Application of High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry to Analysis of Prostaglandin E₁ in Biological Media. **Analytical Biochemistry**. v.98, p. 455-463, 1979.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**. v.89, p. 164-175, 2013.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**. v.14, p. 1808-1832, 2010.

WOLFENDER, J.-L. *et al.* Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **J. Chromatogr. A**. v.1382, p.136-164, 2015.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Curr. Metabolomics**. v.1, n.1, p. 92-107, 2013.

WRIGHT, H. L. *et al.* Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**. v.49, p. 1618-1631, 2010.

WU, P. *et al.* Triterpenoids saponins with anti-inflammatory activities from *Ilex pubescens* roots. **Phytochemistry**. v.134, p. 122-132, 2016.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance? **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.57, n.9, p. 1874-1905, 2017.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J Clin Invest**, v.107, p. 135-142, 2001.

YANG, P. *et al.* Determination of endogenous tissue inflammation profiles by LC/MS/MS: COX- and LOX-derived bioactive lipids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Acids**. v.75, p. 385-395, 2006.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. **Cytokine**. v.11, n.8, p.600-605, 1999.

YULIANA, N. D. *et al.* Comprehensive Extraction Method Integrated with NMR Metabolomics: A New Bioactivity Screening Method for Plants, Adenosine A1 Receptor Binding Compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Anal. Chem**. v.83, p. 6902-6906, 2011a.

YULIANA, N. D. *et al.* Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytherapy Research**. v. 25, p.157-169, 2011b.

ZARIN, M. A. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. **Food Science and Humans Wellness**. v.5, p. 65-75, 2016.

ZHANG, J-M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **Int. Anesthesiol. Clin**. v.45, n.2, p. 27-37, 2007.

ZHAO, Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of *p*-coumaric acid in LPS-stimulated RAW264.7 cells: involvement of NF- κ B and MAPKs pathways. **Medicinal Chemistry**. v.6, n.5, p.327-330-, 2016.

ZHOU, B. *et al.* LC-MS-based metabolomics. **Mol. Biosyst.** v.8, n.2, p. 470-481, 2012.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa – “Bioprospecção em espécies vegetais da família Fabaceae, da mata atlântica mineira, visando a obtenção de substâncias com potencial anti-inflamatório”. No caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição.

Não haverá nenhum gasto com sua participação. Não haverá cobrança alguma de quaisquer instrumentos ou equipamentos utilizados. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador(a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

TÍTULO DA PESQUISA: Bioprospecção em espécies vegetais da família Fabaceae, da mata atlântica mineira, visando a obtenção de substâncias com potencial anti-inflamatório.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares

ENDEREÇO: Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal – LFQM

Sala Q205 – Prédio Q – Instituto de Química - Unifal-MG (campus sede)

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP - 37130-001 – Alfenas-MG

TELEFONE: (35) 3299-1318 ou (35) 99803-8667

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula (pesquisadora), Welton Rosa (doutorando), Prof. Dr. Ivo Santana Caldas (pesquisador)

OBJETIVOS: Este projeto visa a usar sangue humano para avaliação de mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória in vitro de diferentes extratos de espécies de plantas, para estudo e isolamento bioguiado de compostos ativos.

JUSTIFICATIVA: Devido aos inúmeros efeitos colaterais apresentados pelos anti-inflamatórios presentes atualmente no mercado, há-se a necessidade de buscar novos compostos ativos. O uso de plantas para esse fim representa uma área promissora considerando-se a grande biodiversidade regional. O desenvolvimento e uso de ensaio simples, rápido, barato e eficiente para avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro em sangue bruto humano permite a busca de novos agentes anti-inflamatórios de modo eticamente correto considerando-se a triagem de grande número de extratos de diferentes espécies de plantas, evitando-se o uso de animais para tal fim, uma vez que sangue bruto pode mimetizar bem o sistema em estudo proposto pelo ensaio.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: O sangue dos doadores adicionados de heparina (anticoagulante) será incubado com indutor de inflamação com ou sem amostras de extratos de diferentes plantas, o que permitirá avaliar o potencial anti-inflamatório destas espécies frente ao ensaio in vitro. Além disso, baseado em metodologias já descritas na literatura, será proposto um novo método de análise de biomarcadores da inflamação no sangue por LC-MS/MS, permitindo descobrir potenciais agentes anti-inflamatórios derivados de plantas.

RISCOS E DESCONFORTOS: Os doadores eventualmente podem sofrer vertigens, hematomas, leve desconforto ou quaisquer eventualidades comuns à coleta de sangue. Entretanto, todos os riscos e possíveis eventualidades serão reduzidos uma vez que a coleta terá ajuda e suporte de pessoal capacitado para a coleta do sangue e apoio da infraestrutura do Laboratório Central de Análises Clínicas – LACEN (Unifal-MG). Além disso, todos os materiais utilizados serão estéreis e descartáveis, eliminando qualquer risco de contaminação.

BENEFÍCIOS: é importante destacar que a sua participação no projeto permitirá avaliar mecanismos de ação anti-inflamatória inovadores de diferentes amostras sejam elas extratos de plantas, frações, substâncias puras isoladas ou ainda substâncias sintéticas e semi-sintéticas

que possam a vir a ser planejadas. Adicionalmente, os testes ex vivo a serem desenvolvidos neste projeto apresentarão metodologias simples, rápidas, baratas, acessíveis, que viabilizam a pesquisa em períodos de escassez de financiamento e não menos importante, economia e uso racional de animais para pesquisa de novos medicamentos. Isso, além de contribuir para a P&D do Brasil, é relevante para a formação de recursos humanos, assim como pode resultar também em moléculas líderes para o desenvolvimento de medicamentos com maior eficácia para toda a população.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: o sangue do doador será usado única e exclusivamente para avaliação da atividade anti-inflamatória, não havendo qualquer outro fim. Os dados obtidos nessa pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível pessoal, sendo garantido o sigilo total dos doadores. Além disso, o voluntário poderá obter informações sobre os resultados da pesquisa a qualquer momento procurando um dos pesquisadores envolvidos no projeto. Ao final do mesmo, os resultados retornarão à população por meio de divulgação científicas e em eventos.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Eu, _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pela pesquisadora Dra. Marisi Gomes Soares, e foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado) ou o Comitê de Ética para Pesquisa (CEP) - UNIFAL-MG, com endereço na Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP - 37130-001, Fone: (35) 3299-1318, no e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas ou eventos, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

Alfenas, _____ de _____ de 20____.

(Nome por extenso)

(Assinatura)

APÊNDICE B – Compostos anotados a partir da desreplicação dos extratos ativos no ensaio *ex vivo* de inibição da produção de PGE₂ em sangue humano.

ID	Ionização	T _R (min)	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íons Fragmentos [#] (<i>m/z</i>)	Erro (ppm)	Fórmula Molecular	Identidade or Classe do Composto	Espécies*
C1	[M+H] ⁺	0.383	182.9618	170.9256; <u>154.9657</u> ; <u>138.9715</u> ; 124.9386; 108.9611	5.35	C ₄ H ₆ O ₂ S ₃	Composto sulfurado 1	1, 13, 18, 20, 35
C2	[M-H] ⁻	0.476	165.0389	152.9924; <u>147.0292</u> ; 134.8664; 131.8282	-6.15	C ₅ H ₁₀ O ₆	L- ácido xilônico	1, 13, 18, 20, 35
C3	[M-H] ⁻	0.476	195.0485	<u>177.0377</u> ; 164.9839; <u>159.0290</u> ; 152.9841	2.68	C ₁₀ H ₁₂ O ₂ S	Composto sulfurado 2	1, 13, 18, 20, 35

C4	[M-H] ⁻	0.519	191.0546	<u>179.0540</u> ; 177.0024; <u>173.0444</u> ; 171.0292; 165.0390	-5.05	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quínico	1, 13, 18, 20, 35
C5	[M-H] ⁻	0.783	191.0199	179.0547; <u>175.0237</u> ; 173.0440; 163.0592; 161.0421; <u>157.0123</u>	3.77	C ₆ H ₈ O ₇	Derivado do ácido succínico	1, 13, 18, 20, 35
C6	[M-H] ⁻	0.891	204.0860	186.0737; 175.0273; 169.0125; 165.0164; <u>159.0291</u> ; <u>158.0799</u>	-5.87	C ₈ H ₁₅ NO ₅	Amino dideoxiglicosídeo	13
C7	[M+H] ⁺	0.933	332.1332	<u>152.0689</u> ; <u>142.0853</u> ; <u>136.0728</u> ; <u>124.0739</u> ; 108.0792	-4.05	C ₁₄ H ₂₁ NO ₈	5'-O-beta-D- Glucosilpiridoxina	13
C8	[M-H] ⁻	1.374	737.2349	<u>705.2072</u> ; <u>661.2184</u> ; 517.0815; <u>449.1273</u> ; 337.0184; <u>305.0855</u> ; <u>249.0382</u> ; <u>205.0494</u> ; <u>193.0116</u>	7.60	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₈	Triglicosídeo de di- hidroximetilflavona	1, 13, 18, 20, 35

C9	[M-H] ⁻	1.429	331.0651	300.9974; 275.0175; <u>271.0441</u> ; <u>241.0362</u> ; <u>211.0227</u> ; <u>169.0123</u>	-4.30	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	Galoilglucosídeo	13
C10	[M-H] ⁻	1.480	169.0130	<u>157.0131</u> ; <u>153.0177</u> ; <u>151.0022</u>	-4.14	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	13
C11	[M-H] ⁻	1.499	685.1825	<u>667.1721</u> ; 635.0555; <u>581.1365</u> ; <u>539.1256</u> ; <u>521.1138</u> ; 490.1547; 432.1481; <u>363.0922</u> ; <u>345.0803</u> ; <u>303.0695</u> ; <u>217.0333</u> ; 175.0220	8.22	C ₃₃ H ₃₄ O ₁₆	Derivado de flavonoide glicosilado	1, 13, 18, 20, 35
C12	[M-H] ⁻	1.612	369.1388	325.1058; 261.0862; <u>237.0958</u> ; 204.0860; <u>160.0384</u>	-2.41	C ₁₄ H ₂₆ O ₁₁	Dissacarídeo	1, 18
C13	[M-H] ⁻	1.774	331.0654	<u>313.0548</u> ; 300.9972; <u>271.0442</u> ; <u>211.0231</u> ; <u>169.0119</u> ; <u>168.0046</u> ; <u>149.9942</u>	-3.40	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	<i>beta</i> -Glucogalina	13, 18, 20, 35
C14	[M-H] ⁻	1.787	343.0655	<u>331.0656</u> ; <u>313.0545</u> ; 300.9973; 275.0179; 247.0230; <u>211.0232</u> ; <u>191.0537</u> ; <u>173.0439</u> ; <u>169.0124</u>	-2.99	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	Teogalina	13

C15	[M+Na] ⁺	1.810	443.1659	281.1121; 263.1002; 245.0898; 217.0957; 199.0848; <u>179.0724</u> ; 171.0901; 156.0708; 133.0742; <u>120.0792</u>	-5.17	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	Lactona	20
C16	[M+Na] ⁺	1.823	166.0847	147.0428; <u>138.0538</u> ; <u>124.0383</u> ; 120.0793; 153.0165	1.81	C ₇ H ₁₃ NO ₂	Estaquidrina	13
C17	[M-H] ⁻	1.909	865.1989	<u>577.1348</u> ; <u>543.0937</u> ; <u>451.1024</u> ; <u>425.0863</u> ; <u>407.0762</u> ; 371.0611; <u>289.0697</u> ; <u>287.0540</u> ; <u>245.0435</u> ; <u>243.0277</u> ; 209.0282	1.05	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Proantocianidina 1	18
C18	[M-H] ⁻	1.946	315.0704	269.0429; 257.0436; 243.0273; 229.0482; <u>209.0471</u> ; 194.0802; 189.0022; 175.0371; <u>161.0219</u> ; 152.0085	-3.84	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	Galoil glicosídeo	13, 18, 20, 35
C19	[M-H] ⁻	2.004	255.0497	245.0435; 209.0307; <u>193.0485</u> ; <u>179.0331</u> ; <u>165.0535</u> ; 161.0224	-3.06	C ₁₁ H ₁₂ O ₇	Ácido piscídico	18, 20
C20	[M-H] ⁻	2.011	477.1238	449.0875; 407.0763; 289.0700; <u>255.0489</u> ; <u>168.0042</u> ; <u>153.0169</u>	-1.33	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₄	Ácido di- hidroxibenzoico diglicosilado	13, 18, 35

C21	[M-H] ⁻	2.053	380.1540	320.1963; 304.1646; 289.0689; <u>275.1389</u> ; <u>261.1222</u> ; <u>247.1063</u> ; 204.0640; 191.0170; <u>167.0327</u>	-7.92	C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₆	<i>Trans</i> -zeatina-7- <i>beta</i> -D-glucosídeo	20, 35
C22	[M-H] ⁻	2.067	433.0980	<u>415.0860</u> ; <u>371.0604</u> ; 301.0555; 279.1068; 209.0287; 191.0184; 168.0044; 149.9943	-2.51	C ₁₈ H ₂₆ O ₈ S ₂	Composto sulfurado 3	1, 20
C23	[M-H] ⁻	2.123	447.1136	<u>401.1072</u> ; <u>373.1116</u> ; <u>341.0854</u> ; <u>315.0703</u> ; <u>271.0808</u> ; <u>255.0492</u> ; 223.0573; <u>207.0282</u> ; 195.0629; 163.0370; <u>152.0090</u>	-0.60	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	Di-hidroxibenzoato diglicosilado	13, 18, 20
C24	[M-H] ⁻	2.132	461.1287	409.0769; 381.0413; 357.0457; 337.0191; <u>313.0550</u> ; 300.9979; 275.0176; 247.0231; <u>219.0284</u> ; <u>197.0441</u> ; <u>169.0124</u> ; <u>152.0097</u>	-1.78	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	Derivado de ácido hidroxybenzóico diglicosilado	13, 18, 35
C25	[M-H] ⁻	2.159	495.0771	<u>463.0509</u> ; 449.1273; 425.0142; 365.0174; <u>313.0546</u> ; <u>300.9975</u> ; <u>275.0182</u> ; <u>247.0231</u> ; <u>169.0126</u>	-0.78	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ácido digaloilquínico	13

C26	[M-H] ⁻	2.189	355.0655	<u>337.0554</u> ; 289.0695; 245.0793; 209.0282; <u>191.0177</u> ; <u>177.0177</u> ; <u>161.0226</u>	-2.89	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	Glucuronido do ácido caféico	1, 18, 20
C27	[M-H] ⁻	2.194	219.0484	191.0535; <u>183.0274</u> ; 179.0323; 173.0063	-9.50	C ₈ H ₁₂ O ₇	Ácido cítrico	35
C28	[M+H] ⁺	2.203	146.0586	<u>130.0637</u> ; 127.0378; 123.0426; <u>118.0635</u> ; <u>117.0567</u> ; <u>115.0530</u>	2.86	C ₉ H ₇ NO	Indol-3-carbaldeído	13, 18
C29	[M-H] ⁻	2.281	285.0603	<u>249.0388</u> ; 247.0233; 229.0121; 219.0281; <u>211.0233</u> ; 203.0331; 191.0315; <u>179.0328</u> ; <u>169.0123</u> ; 161.0224; <u>152.0097</u>	-2.61	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	Uralenneosídeo	13
C30	[M-H] ⁻	2.282	313.0907	<u>269.1006</u> ; <u>255.0480</u> ; 248.9836; <u>221.0435</u> ; 203.0317; 195.0546; <u>161.0430</u> ; <u>159.0284</u>	-5.25	C ₁₄ H ₁₈ O ₈	Ácido mandélico <i>O</i> -beta-D- glucopiranosídeo	18, 20
C31	[M+H] ⁺	2.331	277.1656	247.0590; 163.0378; <u>147.0431</u> ; 139.0380; <u>119.0482</u>	-3.07	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	<i>p</i> - Coumaroilagmatina	18

C32	[M-H] ⁻	2.360	356.0974	300.9973; 289.0701; 275.0179; 247.0232; 229.0122; <u>217.0125; 203.0327; 191.0325; 169.0126</u>	-2.13	C ₁₅ H ₁₉ NO ₉	Leucodopachroma glucosídeo	13
C33	[M-H] ⁻	2.3858	635.0876	613.0460; <u>605.0786; 483.0769; 463.0509; 425.0139;</u> <u>313.0547; 300.9973; 275.0181; 273.0027; 247.0231;</u> <u>245.0075; 169.0126</u>	-1.33	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	Trigaloil glucosídeo	13
C34	[M+H] ⁺	2.388	177.0540	<u>163.0380; 149.0586; 145.0275; 139.0383; 134.0349;</u> <u>127.0382; 123.0431; 117.0326</u>	-6.61	C ₁₀ H ₈ O ₃	Herniarina	18
C35	[M-H] ⁻	2.427	417.1032	<u>385.0804; 355.0673; 300.0539; 289.0697; 285.0602;</u> <u>255.0504; 241.0701; 209.0296; 191.0185; 179.0329;</u> <u>152.0098</u>	-0.25	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₂	Ácido hydroxibenzóico diglicosilado	1, 18, 20
C36	[M-H] ⁻	2.431	801.0792	<u>757.0895; 745.0314; 633.0720; 613.0468; 603.0616;</u> <u>463.0505; 425.0138; 316.9926; 300.9974; 273.0029;</u> <u>247.0233; 169.0128</u>	0.66	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₃	Ácido mallotínico	13

C37	[M+H] ⁺	2.438	867.2165	<u>725.2104</u> ; <u>697.1581</u> ; 611.1627; <u>579.1506</u> ; <u>437.0871</u> ; <u>425.0869</u> ; <u>409.0912</u> ; 360.1439; <u>301.0703</u> ; <u>289.0701</u> ; <u>247.0595</u> ; 208.0960; <u>191.0696</u> ; <u>163.0381</u> ; <u>139.0382</u>	3.29	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Arecatanino A1 or B1	13, 18
C38	[M-H] ⁻	2.442	577.1350	<u>451.1031</u> ; <u>425.0872</u> ; <u>407.0765</u> ; 355.0655; <u>339.0858</u> ; <u>299.0555</u> ; <u>289.0703</u> ; <u>255.0282</u> ; <u>245.0792</u> ; <u>245.0426</u> ; <u>203.0693</u> ; <u>161.0224</u>	0.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Procianidina B5	1, 13, 18, 35
C39	[M-H] ⁻	2.480	865.1987	<u>755.1810</u> ; <u>739.1681</u> ; 723.1934; <u>695.1418</u> ; <u>587.1198</u> ; <u>577.1351</u> ; <u>543.0944</u> ; 525.0820; <u>451.1022</u> ; <u>425.0867</u> ; <u>407.0764</u> ; <u>339.0848</u> ; <u>299.0549</u> ; <u>289.0702</u> ; <u>287.0544</u> ; <u>243.0282</u> ; <u>161.0220</u>	0.81	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Proantocianidina 2	13, 18
C40	[M-H] ⁻	2.486	353.0860	<u>325.0909</u> ; <u>305.0645</u> ; <u>289.0693</u> ; 267.0686; 249.0723; 219.0631; <u>195.0639</u> ; <u>191.0538</u> ; <u>179.0323</u> ; 173.0426; 163.0369	-3.57	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Ácido clorogênico	35
C41	[M-H] ⁻	2.488	291.0131	235.9430; 207.9446; 190.9418; <u>174.9682</u>	-3.42	C ₁₃ H ₈ O ₈	Ácido brevifolincarboxílico	13

C42	[M-H] ⁻	2.533	595.1665	<u>505.1344</u> ; <u>487.1233</u> ; <u>475.1235</u> ; <u>457.1130</u> ; <u>415.1022</u> ; <u>385.0916</u> ; <u>355.0810</u> ; <u>343.0806</u> ; <u>325.0703</u> ; <u>313.0703</u> ; <u>265.0338</u> ; <u>239.0547</u>	0.34	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	Isobutrina	1, 18, 20
C43	[M-H] ⁻	2.610	755.2061	<u>609.1467</u> ; <u>610.1500</u> ; <u>593.1531</u> ; <u>431.0952</u> ; <u>430.0891</u> ; <u>369.0803</u> ; <u>299.0750</u> ; <u>285.0374</u> ; <u>284.0306</u> ; <u>239.0539</u>	3.48	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Derivado de apigenina triglicosilada	1, 20, 35
C44	[M-H] ⁻	2.638	439.0864	<u>417.0786</u> ; <u>395.0963</u> ; <u>378.0040</u> ; <u>353.0864</u> ; <u>335.0748</u> ; <u>289.0695</u> ; <u>233.0641</u> ; <u>191.0535</u> ; <u>173.0432</u>	-2.86	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂	Ácido malonilclorogênico	35
C45	[M-H] ⁻	2.656	593.1506	<u>575.1267</u> ; <u>503.1190</u> ; <u>473.1083</u> ; <u>413.0868</u> ; <u>395.0762</u> ; <u>383.0761</u> ; <u>353.0654</u> ; <u>325.0699</u> ; <u>297.0749</u> ; <u>289.0700</u>	-0.08	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Derivado de apigenina diglicosilada	1, 13, 18, 20
C46	[M+H] ⁺	2.690	783.0703	<u>483.0766</u> ; <u>471.0197</u> ; <u>453.0094</u> ; <u>427.0296</u> ; <u>321.0239</u> ; <u>291.0861</u> ; <u>249.1113</u> ; <u>139.0383</u> ; <u>123.0432</u>	2.80	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	Punicalina	13
C47	[M+H] ⁺	2.695	471.0204	<u>453.0096</u> ; <u>427.0300</u> ; <u>321.0243</u> ; <u>301.0707</u> ; <u>261.0391</u> ; <u>249.0391</u> ; <u>177.0538</u> ; <u>153.0175</u> ; <u>123.0430</u>	0.91	C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃	Dilactona do ácido valoneico	13

C48	[M-H] ⁻	2.716	289.0704	<u>275.0179</u> ; <u>249.0387</u> ; <u>247.0230</u> ; <u>229.0118</u> ; <u>205.0485</u> ; <u>203.0330</u> ; <u>187.0381</u> ; <u>175.0382</u> ; 169.0123; <u>159.0426</u>	-2.82	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina	1, 13, 18, 35
C49	[M-H] ⁻	2.720	951.0746	<u>933.0648</u> ; <u>915.0547</u> ; <u>765.0580</u> ; <u>631.0578</u> ; <u>613.0474</u> ; <u>463.0511</u> ; <u>445.0404</u> ; <u>316.9929</u> ; <u>300.9978</u> ; <u>273.0028</u> ; <u>247.0234</u>	0.65	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Geraniina	13
C50	[M-H] ⁻	2.723	239.0561	219.0281; 217.0481; <u>205.0480</u> ; 203.0697; 189.0050; 177.0172; <u>175.0370</u> ; <u>165.0168</u> ; <u>161.0221</u>	2.24	C ₁₁ H ₁₂ O ₆	2-Succinyl-6- hidroxi-2,4- ciclohexadieno-1- carboxilato	18
C51	[M-H] ⁻	2.730	863.1839	<u>711.1355</u> ; <u>693.1248</u> ; 595.1656; <u>573.1031</u> ; <u>559.0876</u> ; <u>451.1017</u> ; <u>411.0709</u> ; 313.0810; <u>299.0545</u> ; <u>289.0699</u> ; <u>285.0389</u> ; <u>193.0488</u>	1.80	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	Cinnamtanino D1	1, 18, 20

C52	[M+H] ⁺	2.745	495.4271	<u>421.3412</u> ; <u>350.2680</u> ; <u>282.2416</u> ; <u>264.2307</u> ; <u>266.2458</u> ; <u>214.1900</u> ; <u>171.1477</u> ; <u>169.1321</u> ; 129.1374	-0.64	C ₂₈ H ₅₄ N ₄ O ₃	Derivado de esfingolípido 1	18, 35
C53	[M-H] ⁻	2.752	465.1029	450.9932; 425.0138; 413.0869; 345.1172; <u>316.0210</u> ; 300.9975; <u>285.0390</u> ; <u>275.0181</u> ; <u>247.0234</u> ; <u>191.0538</u> ; <u>151.0018</u>	-0.87	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	Taxifolina glucosídeo	13
C54	[M-H] ⁻	2.759	337.0910	327.0701; 307.1001; <u>289.0695</u> ; <u>233.0646</u> ; <u>191.0537</u> ; <u>173.0431</u>	-3.99	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido <i>p</i> - coumaroilquínico	35
C55	[M-H] ⁻	2.809	577.1344	<u>559.1246</u> ; 473.1087; 453.0650; <u>451.1024</u> ; <u>425.0866</u> ; <u>407.0765</u> ; 389.1809; <u>383.0764</u> ; <u>325.0699</u> ; 297.0748; <u>289.0703</u> ; <u>287.0547</u> ; <u>245.0800</u> ; <u>161.0228</u>	-0.36	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Proantocianidina 3	18
C56	[M-H] ⁻	2.839	953.0896	<u>935.0787</u> ; <u>909.0678</u> ; <u>829.1099</u> ; <u>801.0793</u> ; <u>783.0688</u> ; <u>633.0727</u> ; <u>481.0617</u> ; <u>463.0513</u> ; <u>337.0189</u> ; <u>300.9976</u> ; <u>275.0182</u> ; 205.0490	-0.03	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇	Ácido chebulágico	13

C57	[M-H] ⁻	2.840	563.1410	<u>545.1300</u> ; <u>503.1190</u> ; <u>473.1082</u> ; <u>443.0974</u> ; <u>425.0870</u> ; <u>413.0869</u> ; <u>383.0762</u> ; <u>353.0654</u> ; <u>325.0702</u> ; <u>297.0751</u>	1.62	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Isovitexina 2 ^{'''} -O-arabinosídeo	1, 18, 20
C58	[M+Na] ⁺	2.844	391.0810	<u>379.0816</u> ; <u>361.0716</u> ; <u>363.0861</u> ; <u>373.0715</u> ; <u>351.0855</u> ; <u>349.0710</u> ; <u>337.0711</u> ; <u>325.0707</u> ; <u>321.0754</u> ; <u>307.0604</u> ; <u>295.0599</u> ; <u>283.0598</u>	4.16	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	Ácido 12-desoxinogalônico	18
C59	[M-H] ⁻	2.859	447.0930	<u>429.0816</u> ; <u>383.0761</u> ; <u>357.0605</u> ; <u>327.0499</u> ; <u>311.0547</u> ; <u>297.0396</u> ; <u>285.0389</u> ; <u>269.0442</u> ; <u>250.0704</u>	0.58	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Derivado de apigenina glycosilado 1	1, 13, 20
C60	[M-H] ⁻	2.874	299.0764	<u>263.0550</u> ; <u>250.0705</u> ; <u>233.0448</u> ; <u>221.0433</u> ; <u>205.0357</u> ; <u>191.0326</u> ; <u>177.0385</u>	-0.99	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	Ácido hidroxibenzóico glucosídeo	20
C61	[M+Na] ⁺	2.879	329.0657	<u>311.0538</u> ; <u>300.0594</u> ; <u>299.0543</u> ; <u>283.0590</u> ; <u>165.0169</u>	-2.14	C ₁₈ H ₁₂ NO ₄	Derivado quinolínico	1, 13
C62	[M-H] ⁻	2.881	479.0821	<u>450.9931</u> ; <u>316.0213</u> ; <u>300.9977</u> ; <u>271.0228</u> ; <u>247.0231</u> ; <u>214.0258</u>	-0.98	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	Miricetina glucosídeo	13

C63	[M-H] ⁻	2.903	593.1512	<u>563.1423</u> ; <u>473.1094</u> ; <u>447.0945</u> ; <u>430.0905</u> ; <u>383.0768</u> ; <u>353.0657</u> ; <u>325.0703</u> ; <u>299.0764</u> ; <u>285.0386</u> ; <u>255.0281</u>	0.93	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Quercetina 3-metil éter 7-ramnosídeo- 3'-xilósídeo	1, 18, 20
C64	[M-H] ⁻	2.916	461.1086	<u>443.1001</u> ; <u>383.0762</u> ; <u>341.0656</u> ; <u>327.0494</u> ; <u>313.0355</u> ; <u>298.0470</u> ; <u>285.0389</u> ; <u>193.0128</u> ; <u>175.0020</u>	0.46	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	6-Metoxiluteolina 7-ramnosídeo	1, 20
C65	[M-H] ⁻	2.925	739.2094	<u>679.1515</u> ; <u>635.1616</u> ; <u>577.1585</u> ; <u>563.1409</u> ; <u>473.1082</u> ; <u>433.1135</u> ; <u>383.0763</u> ; <u>353.0656</u> ; <u>325.0866</u> ; <u>313.0769</u> ; <u>293.0443</u> ; <u>283.0596</u> ; <u>271.0602</u> ; <u>193.0127</u>	1.14	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	Kaempferol 3- isoramnonosídeo	1, 20, 35
C66	[M+H] ⁺	2.930	383.3743	<u>309.2885</u> ; <u>287.0539</u> ; <u>238.2151</u> ; <u>196.2043</u> ; <u>171.1476</u> ; <u>169.1321</u> ; <u>153.0167</u> ; <u>147.0425</u> ; <u>129.1371</u> ; <u>112.1108</u>	-1.79	C ₂₂ H ₄₆ N ₄ O	Pitecolobina	35

C67	[M-H] ⁻	2.960	379.1017	359.1474; 329.1365; 300.0254; <u>289.0700</u> ; 271.0223; 255.0277; <u>233.0644</u> ; <u>191.0542</u> ; <u>173.0433</u>	-3.19	C ₁₈ H ₂₀ O ₉	4-Hidroxi- <i>trans</i> - cinnamoil 2- <i>O</i> ,3- <i>O</i> - diacetil- <i>beta</i> -D- xilopiranosídeo	35
C68	[M-H] ⁻	3.009	615.0990	<u>497.0350</u> ; <u>463.0864</u> ; <u>445.0397</u> ; <u>343.0438</u> ; <u>313.0549</u> ; <u>301.0247</u> ; <u>300.0260</u> ; <u>273.0030</u> ; <u>255.0284</u> ; <u>169.0121</u>	0.63	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	Quercetina galoilglucosídeo	13
C69	[M+H] ⁺	3.031	303.0498	295.0600; 283.0597; 267.0645; <u>165.0171</u> ; <u>163.0380</u> ; <u>153.0171</u>	-2.24	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	13, 18, 20, 35
C70	[M-H] ⁻	3.031	609.1460	<u>577.1521</u> ; <u>503.1192</u> ; <u>461.1088</u> ; <u>445.1138</u> ; <u>417.1027</u> ; <u>371.0772</u> ; <u>341.0661</u> ; <u>325.0706</u> ; <u>298.0465</u> ; <u>297.0397</u> ; 282.0521; <u>269.0446</u> ; <u>193.0494</u>	0.71	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Quercetina 3- <i>O</i> - ramnosídeo 7- <i>O</i> - glucosídeo	1, 13, 18, 20, 35

C71	[M-H] ⁻	3.044	577.1572	<u>457.1176</u> ; <u>413.0873</u> ; <u>387.0924</u> ; <u>353.0657</u> ; <u>341.0659</u> ; <u>323.0553</u> ; <u>311.0552</u> ; <u>293.0447</u> ; <u>269.0442</u> ; <u>249.0601</u>	2.54	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	Apigenina 7- rutinosídeo	1, 13, 18, 20
C72	[M-H] ⁻	3.059	607.1674	<u>581.2246</u> ; <u>575.1361</u> ; <u>487.1245</u> ; <u>445.1133</u> ; <u>427.1030</u> ; <u>419.1703</u> ; <u>324.0627</u> ; <u>307.0600</u> ; <u>292.0363</u>	1.81	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	Flavonoide glicosilado	1, 18, 20
C73	[M-H] ⁻	3.085	431.0975	<u>357.0963</u> ; <u>341.0659</u> ; <u>323.0552</u> ; <u>311.0554</u> ; <u>295.0601</u> ; <u>283.0601</u> ; <u>269.0443</u> ; <u>239.0698</u> ; <u>224.0466</u> ; <u>197.0584</u> ; <u>183.0433</u>	-0.75	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Apigenina 7-O- beta-D-glucosídeo	1, 13, 18, 20
C74	[M-H] ⁻	3.094	300.9976	<u>283.0596</u> ; <u>273.0023</u> ; <u>257.0070</u> ; <u>245.0071</u> ; <u>229.0120</u> ; <u>217.0119</u> ; <u>201.0170</u> ; <u>185.0222</u> ; <u>173.0226</u>	-2.81	C ₁₄ H ₆ O ₈	Ácido elágico	13
C75	[M-H] ⁻	3.107	463.0877	<u>301.0274</u> ; <u>300.0261</u> ; <u>271.0234</u> ; <u>255.0283</u> ; <u>243.0282</u> ; <u>227.0330</u>	0.10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina glucosídeo	13, 18, 20, 35

C76	[M-H] ⁻	3.198	593.1511	<u>545.1307</u> ; <u>503.1196</u> ; <u>473.1098</u> ; <u>459.1290</u> ; <u>425.0873</u> ; <u>413.0877</u> ; <u>399.0924</u> ; <u>353.0661</u> ; <u>343.0816</u> ; <u>313.0726</u> ; <u>293.0446</u> ; <u>282.0523</u> ; <u>267.0710</u> ; 245.0922; 203.0809; <u>193.0491</u>	0.76	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Derivado de luteolina diglicosilada	1, 18, 20
C77	[M-H] ⁻	3.233	951.0741	<u>907.0858</u> ; 829.1099; <u>765.0575</u> ; 693.2404; <u>633.0737</u> ; 593.1509; 539.2130; 491.1917; 477.1033; <u>463.0537</u> ; 359.1488; 315.0709; <u>300.9985</u> ; <u>273.0027</u> ; <u>169.0127</u>	0.13	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Pentagaloil glicosídeo	13
C78	[M-H] ⁻	3.266	599.1045	<u>537.1961</u> ; <u>517.1920</u> ; <u>463.0521</u> ; <u>431.0971</u> ; 399.1650; <u>345.0603</u> ; <u>313.0536</u> ; <u>300.9978</u> ; <u>285.0384</u> ; <u>273.0025</u> ; <u>247.0226</u> ; <u>211.0238</u> ; <u>169.0125</u>	1.34	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	Quercetina galoilramnosídeo	13
C79	[M+H] ⁺	3.272	585.1249	453.0089; 337.0699; <u>313.0703</u> ; <u>295.0596</u> ; <u>283.0598</u> ; <u>267.0645</u> ; <u>163.0377</u> ; <u>153.0173</u>	0.79	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	2"-O- Galoilisovitexina	13
C80	[M-H] ⁻	3.291	433.0764	<u>301.0327</u> ; <u>300.0256</u> ; <u>271.0228</u> ; <u>255.0277</u> ; <u>243.0275</u> ; <u>227.0325</u> ; <u>178.9960</u>	-1.59	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Quercetina 3- glicosídeo	35

C81	[M-H] ⁻	3.296	707.1836	<u>645.1839</u> ; <u>605.1520</u> ; <u>563.1415</u> ; <u>545.1308</u> ; <u>473.1092</u> ; <u>455.0984</u> ; <u>443.0982</u> ; <u>413.0877</u> ; <u>395.0770</u> ; <u>353.0662</u> ; <u>341.0662</u> ; <u>323.0556</u> ; <u>293.0449</u> ; <u>281.0450</u>	1.78	C ₃₂ H ₃₆ O ₁₈	Kaempferide 3- ramnosídeo-7-(6"- succinilglucosídeo)	1
C82	[M-H] ⁻	3.328	447.0923	<u>426.1396</u> ; <u>337.0934</u> ; <u>284.0314</u> ; <u>255.0284</u> ; <u>227.0333</u> ; <u>193.0487</u>	-0.98	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Derivado de apigenina glicosilada 2	13, 20,35
C83	[M-H] ⁻	3.3332	319.0445	<u>300.9976</u> ; <u>284.0309</u> ; <u>273.0024</u> ; <u>255.0285</u> ; <u>245.0077</u> ; <u>227.0335</u> ; <u>217.0127</u> ; <u>189.0174</u> ; <u>169.0126</u>	-2.81	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	Brevifolin carboxilato de etila	13
C84	[M-H] ⁻	3.417	575.1396	<u>473.1082</u> ; <u>431.0978</u> ; <u>413.0870</u> ; <u>341.0659</u> ; <u>311.0553</u> ; <u>283.0599</u>	-0.84	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₄	Hidroximetil glutaroil vitexina	1, 18
C85	[M-H] ⁻	3.438	589.1564	<u>527.1558</u> ; <u>487.1246</u> ; <u>445.1139</u> ; <u>427.1031</u> ; <u>337.0710</u> ; <u>325.0710</u> ; <u>293.0446</u> ; <u>282.0523</u> ; <u>231.0289</u> ; <u>217.0127</u> ; <u>193.0492</u>	1.13	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₄	Derivado de flavonoide glicosilado	1

C86	[M-H] ⁻	3.494	625.1195	<u>583.1089</u> ; <u>539.2129</u> ; <u>553.1927</u> ; <u>487.1241</u> ; <u>463.0872</u> ; <u>401.1801</u> ; <u>316.0213</u> ; <u>300.0260</u> ; <u>271.0250</u> ; <u>255.0287</u> ; <u>161.0227</u>	0.24	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅	Quercetina cafeoilgalactosídeo	13
C87	[M-H] ⁻	3.501	593.1529	<u>551.1415</u> ; <u>523.2186</u> ; <u>489.1051</u> ; <u>429.1031</u> ; <u>361.1648</u> ; <u>285.0391</u> ; <u>257.0434</u> ; <u>229.0488</u>	3.79	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol 3- glucosil-(1->2)- ramnosídeo	1, 18, 20
C88	[M+H] ⁺	3.522	271.0596	<u>229.0483</u> ; <u>177.0543</u> ; <u>163.0378</u> ; <u>153.0170</u> ; <u>147.0427</u> ; <u>145.0273</u> ; <u>135.0424</u> ; <u>121.0270</u>	-3.87	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Genisteína	13
C89	[M-H] ⁻	3.630	315.0134	<u>299.9898</u> ; <u>270.9868</u> ; <u>242.9920</u> ; <u>227.1273</u> ; <u>216.0047</u> ; <u>200.0097</u> ; <u>183.1371</u> ; <u>160.0146</u>	-2.21	C ₁₅ H ₈ O ₈	Ácido 3- <i>O</i> - metilelágico	13
C90	[M-H] ⁻	3.631	521.1304	<u>461.1098</u> ; <u>431.0984</u> ; <u>399.0926</u> ; <u>367.1015</u> ; <u>337.0933</u> ; <u>314.0421</u> ; <u>285.0402</u> ; <u>218.0441</u> ; <u>193.0481</u> ; <u>152.0091</u>	1.69	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	Derivado de di- hidroxiflavona glicosilado	1, 13, 20

C91	[M-H] ⁻	3.651	431.0978	<u>337.0913</u> ; <u>301.0703</u> ; <u>285.0386</u> ; <u>284.0313</u> ; <u>255.0283</u> ; <u>227.0332</u> ; <u>193.0485</u>	-0.06	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol ramnosídeo	1, 20
C92	[M+H] ⁺	3.694	218.2105	207.0641; 177.0533; 167.0689; 152.0597; 147.0425; 137.0584; 127.0384	-6.89	C ₁₂ H ₂₇ NO ₂	Derivado de esfingolípido 2	1, 13, 18, 20, 35
C93	[M-H] ⁻	3.744	609.1254	<u>567.1152</u> ; <u>535.3100</u> ; <u>463.0874</u> ; <u>301.0318</u> ; <u>300.0260</u> ; <u>271.0236</u> ; <u>255.0284</u> ; <u>191.0542</u> ; 169.0124	1.58	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	Quercetina <i>p</i> - coumarilglucosídeo	13
C94	[M+H] ⁺	3.793	262.2369	207.0640; <u>200.1997</u> ; 177.0536; 167.0690; 147.0426; 137.0585	-5.03	C ₁₄ H ₃₁ NO ₃	Derivado de esfingolípido 3	1, 13, 18, 20, 35
C95	[M+H] ⁺	3.886	306.2637	287.0542; 265.1534; 249.0777; <u>244.2261</u> ; 207.0639; 191.0708; 177.0534; 167.0690; 163.0738; 147.0427; 137.0584; 127.0383	-2.40	C ₁₆ H ₃₅ NO ₄	Derivado de esfingolípido 4	13, 18, 20, 35

C96	[M+Na] ⁺	3.972	439.2303	<u>287.0546</u> ; <u>207.0640</u> ; <u>177.0535</u> ; <u>167.0693</u> ; <u>147.0430</u> ; <u>137.0580</u>	-1.12	C ₂₁ H ₃₆ O ₈	Atractyloside	20
C97	[M-H] ⁻	4.057	285.0390	<u>265.0699</u> ; <u>241.0486</u> ; <u>217.0488</u> ; <u>205.0488</u> ; <u>199.0383</u> ; <u>175.0378</u> ; <u>163.0382</u> ; <u>151.0017</u> ; <u>145.0277</u>	-3.21	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	1, 13, 18, 35
C98	[M+H] ⁺	4.071	439.4375	<u>365.3516</u> ; <u>294.2782</u> ; <u>252.2674</u> ; <u>226.2514</u> ; <u>171.1479</u> ; <u>169.1323</u> ; <u>129.1374</u> ; <u>112.1109</u>	-0.20	C ₂₆ H ₅₄ N ₄ O	Budmunchiamina L4	18, 35
C99	[M-H] ⁻	4.110	359.0753	<u>337.0898</u> ; <u>285.0383</u> ; <u>237.0382</u> ; <u>223.0587</u> ; <u>193.0480</u> ; <u>165.0531</u>	-3.88	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	6-C-metilmiricetina 3,4"-dimetiléter	20
C100	[M-H] ⁻	4.250	329.0291	<u>314.0052</u> ; <u>300.0251</u> ; <u>298.9821</u> ; <u>270.9888</u> ; <u>255.0280</u> ; <u>242.9926</u> ; <u>214.9972</u> ; <u>187.0018</u>	-1.96	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Ácido di-O- metilelágico	13
C101	[M+H] ⁺	4.300	465.4530	<u>391.3674</u> ; <u>320.2937</u> ; <u>278.2824</u> ; <u>252.2671</u> ; <u>171.1479</u> ; <u>169.1322</u> ; <u>129.1374</u> ; <u>112.1108</u>	-0.51	C ₂₈ H ₅₆ N ₄ O	Budmunchiamina L6	35

C102	[M-H] ⁻	4.322	971.4875	<u>957.5084</u> ; 799.2125; 776.2411; <u>645.3642</u> ; 632.1992; 417.1174; 403.1022; <u>223.0590</u> ; <u>193.0483</u>	2.39	C ₄₈ H ₇₆ O ₂₀	Saponina derivada do ácido oleanólico 1	1, 20, 35
C103	[M-H] ⁻	4.336	271.0600	247.0228; <u>235.0606</u> ; 227.1278; 223.0597; <u>205.0487</u> ; 195.0650; 191.0556; 183.1370; <u>179.0328</u> ; <u>175.0376</u> ; 169.0126; <u>163.0379</u> ; <u>161.0225</u>	-2.40	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Tri- hidroxiflavanona	13
C104	[M-H] ⁻	4.371	811.4488	667.2599; 455.0981; 427.1031; 399.0929; 353.1022; 341.1014; 293.0442; 223.0597; 193.0496	0.99	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₅	Saponina 1	1
C105	[M-H] ⁻	4.372	591.1717	535.1230; <u>489.1386</u> ; <u>447.1279</u> ; <u>403.1023</u> ; <u>327.0851</u> ; <u>285.0742</u> ; <u>270.0509</u> ; 193.0479	0.53	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	Biochanina A 7- <i>O</i> - rutinosídeo	20
C106	[M-H] ⁻	4.428	781.4379	<u>763.4270</u> ; <u>657.3633</u> ; <u>631.3848</u> ; 607.3325; 587.2687; 549.3648; <u>503.2501</u> ; 495.3313; <u>473.3619</u> ; 427.1063; 413.0878; <u>401.1416</u> ; 353.1010; 341.1020; 282.0515; <u>249.0593</u> ; 223.0599; 193.0491; <u>183.1374</u>	0.60	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	Saponina 2	1

C107	[M+H] ⁺	4.471	271.0593	<u>243.0639</u> ; 221.0703; 207.0654; <u>177.0550</u> ; <u>163.0382</u> ; <u>153.0170</u> ; <u>147.0428</u> ; 137.0584; <u>119.0476</u>	-4.98	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenina	13
C108	[M-H] ⁻	4.531	285.0404	<u>271.0235</u> ; 265.0679; <u>255.0269</u> ; <u>227.0332</u> ; 211.1312; <u>193.0118</u> ; <u>192.0049</u> ; 183.1376; <u>177.0172</u> ; 171.1007; <u>169.0118</u> ; <u>163.0383</u>	1.70	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Tetra- hidroxiflavanona	13, 20
C109	[M+H] ⁺	4.557	467.4683	<u>393.3825</u> ; <u>322.3094</u> ; 299.1475; 281.1371; <u>254.2827</u> ; <u>169.1321</u>	-1.25	C ₂₈ H ₅₈ N ₄ O	Budmunchiamina G	35
C110	[M-H] ⁻	4.564	955.4934	<u>937.4824</u> ; <u>893.4912</u> ; 697.1772; 681.1830; <u>629.3695</u> ; <u>539.3724</u> ; 475.1228; 447.0967; <u>327.2152</u> ; 285.0384	3.29	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	Saponina derivada do ácido oleanólico 2	1, 20
C111	[M-H] ⁻	4.566	327.2159	301.0694; 285.0381; 255.0285; 234.1112; 223.0585; <u>211.1313</u> ; <u>201.1105</u> ; 193.0480	-3.82	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Ácido tri-hidroxi octadienólico	1, 13, 18, 20, 35

C112	[M+H] ⁺	4.620	290.2681	271.0218; <u>228.2306</u> ; 207.0635; <u>184.2040</u> ; 175.0378; 167.0696	-4.89	C ₁₆ H ₃₅ NO ₃	Derivado de esfingolípido 5	1, 13, 18, 20, 35
C113	[M-H] ⁻	4.679	537.0820	<u>443.0394</u> ; <u>417.0601</u> ; <u>399.0494</u> ; <u>375.0494</u> ; <u>331.0591</u> ; <u>309.0386</u>	-0.33	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	Amentoflavona	13
C114	[M-H] ⁻	4.757	403.1017	390.0015; 331.2462; 313.2362; <u>301.0690</u> ; <u>281.0640</u> ; <u>263.0540</u> ; 243.9798; <u>223.0585</u> ; 193.0477; 189.0527	-3.00	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	Chalconaringenina 2'-xilósídeo	20
C115	[M-H] ⁻	4.828	329.2319	301.0691; 283.0591; 268.0355; 249.1082; 243.0633; <u>229.1429</u> ; 223.0584; <u>211.1317</u> ; 193.0482; 183.1362; 171.1000; 152.0087	-2.73	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	Ácido tri-hidroxi octadecenóico	1, 13, 18, 20, 35
C116	[M-H] ⁻	4.988	287.2207	249.1077; 241.0083; 223.0580; <u>211.1319</u> ; 197.1154; 193.0844; 183.1362; 178.0594; 163.0385	-5.34	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	Ácido di-hidroxi palmítico	1, 13, 20

C117	[M-H] ⁻	5.021	343.0444	<u>328.0208</u> ; <u>312.9970</u> ; <u>297.9737</u> ; <u>285.0022</u> ; <u>269.9785</u> ; <u>257.0076</u> ; <u>241.9832</u> ; <u>213.9888</u> ; <u>197.9935</u> ; <u>185.9944</u>	-2.90	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	Ácido tri- <i>O</i> -metil elágico	13
C118	[M+H] ⁺	5.113	495.4994	<u>473.4194</u> ; <u>421.4138</u> ; <u>350.3405</u> ; <u>308.3294</u> ; <u>282.3138</u> ; <u>171.1477</u> ; <u>169.1321</u> ; <u>129.1371</u> ; <u>112.1105</u>	-1.59	C ₃₀ H ₆₂ N ₄ O	14-Normetil budmunchiamina K	35
C119	[M-H] ⁻	5.297	987.5172	<u>923.4851</u> ; <u>879.5095</u> ; <u>795.4528</u> ; <u>733.4539</u> ; <u>615.3891</u> ; <u>597.3791</u> ; <u>492.2708</u> ; <u>339.1999</u> ; <u>247.0808</u> ; <u>205.0713</u>	0.73	C ₄₉ H ₈₀ O ₂₀	Saponina derivada do ácido oleanólico 3	1, 20
C120	[M+H] ⁺	5.307	274.2736	<u>256.2624</u> ; <u>242.2454</u> ; <u>230.2466</u> ; <u>212.2358</u> ; <u>201.0447</u> ; <u>106.0850</u> ; <u>102.0899</u>	-3.66	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	Hexadecasfinganin a	1, 13, 18, 20, 35
C121	[M+H] ⁺	5.363	318.2996	<u>300.2884</u> ; <u>256.2622</u> ; <u>212.2353</u> ; <u>146.1161</u>	-3.83	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	Fitosfingosina	1, 13, 18, 20, 35

C122	[M+H] ⁺	5.420	362.3260	<u>300.2886</u> ; 282.3142; <u>256.2624</u> ; 171.1476; 169.1322; <u>146.1162</u> ; <u>132.1004</u>	-2.85	C ₂₀ H ₄₃ NO ₄	Derivado aminoicosane	1, 13, 18, 35
C123	[M-H] ⁻	5.445	795.4536	<u>765.4419</u> ; <u>733.4523</u> ; 687.3235; <u>615.3902</u> ; <u>543.2814</u> ; <u>457.3669</u> ; 339.1931; 311.1676; <u>205.0703</u>	0.65	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	Saponina 3	1
C124	[M-H] ⁻	5.560	765.4430	<u>719.3996</u> ; <u>655.3333</u> ; <u>633.4008</u> ; <u>615.3903</u> ; <u>595.2790</u> ; <u>543.2807</u> ; <u>457.3678</u> ; 339.1977; 325.1829; 269.1305	0.63	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	Saponina 4	1
C125	[M+H] ⁺	5.563	789.4419	767.4611; 635.4167; <u>617.4054</u> ; <u>599.3955</u> ; 441.3727; 423.3624; 331.0635; <u>203.1782</u>	-0.79	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₃	Saponina 5	1
C126	[M-H] ⁻	5.655	985.5009	<u>921.4840</u> ; <u>849.4618</u> ; <u>791.4202</u> ; <u>765.4402</u> ; <u>719.3997</u> ; <u>675.4089</u> ; <u>633.3984</u> ; <u>593.2633</u> ; 327.2162; 183.0108	0.08	C ₄₉ H ₇₈ O ₂₀	Saponina derivada do ácido oleanólico 4	1, 20
C127	[M-H] ⁻	5.656	283.0588	<u>268.0350</u> ; <u>267.0275</u> ; <u>239.0325</u> ; <u>223.0372</u> ; <u>211.0374</u> ; <u>195.0423</u> ; <u>183.0087</u> ; 167.0478	-6.54	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Di-hidroxi metoxiflavona	20

C128	[M-H] ⁻	5.726	779.4581	<u>717.4579</u> ; <u>631.3855</u> ; <u>599.3946</u> ; <u>581.3843</u> ; 509.3994; <u>441.3714</u> ; 339.1971; 327.2161; <u>309.2050</u> ; 297.1318; 255.0290; 221.1521; 183.0108	-0.09	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	Saponina 6	1, 20
C129	[M-H] ⁻	5.779	895.5058	<u>877.4943</u> ; 861.4457; <u>779.4579</u> ; 721.2403; <u>687.4446</u> ; <u>633.3999</u> ; <u>599.3944</u> ; 577.1953; 559.1861; 541.1774; 509.3873; <u>415.1447</u> ; <u>397.1340</u> ; <u>383.1180</u> ; 339.1983; 327.2153; <u>309.2054</u> ; <u>293.2108</u> ; <u>220.1451</u> ; <u>205.0697</u> ; 183.0108	0.32	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	Saponina derivada do ácido oleanólico 5	1, 20
C130	[M-H] ⁻	5.955	633.4003	<u>615.3890</u> ; 577.1977; 559.1862; <u>457.3665</u> ; <u>437.3408</u> ; <u>409.3448</u> ; 397.1328; 339.1988; 325.1838; 311.1667; <u>293.2108</u> ; 182.0108	0.06	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	Saponina 7	1
C131	[M+H] ⁺	6.034	302.3045	<u>284.2932</u> ; <u>258.2769</u> ; 171.1471; 169.1324; 129.1370; 112.1102; <u>106.0849</u>	-4.64	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	Esfinganina	1, 13, 18, 20, 35

C132	[M+H] ⁺	6.076	346.3311	<u>328.3199</u> ; <u>284.2935</u> ; 240.2668; 171.1471; <u>102.0896</u>	-2.94	C ₂₀ H ₄₃ NO ₃	Derivado de Esfingolípido 6	1, 13, 18, 35
C133	[M+Na] ⁺	6.169	699.3572	<u>571.2428</u> ; <u>537.3038</u> ; <u>497.3121</u> ; 437.1928; <u>406.1804</u> ; <u>365.1064</u> ; 353.2686; <u>333.1508</u> ; 307.2621; <u>261.2208</u> ; <u>243.2097</u> ; 201.1649; <u>173.1307</u> ; <u>145.1001</u> ; <u>135.1157</u> ; <u>119.0841</u>	0.60	C ₃₃ H ₅₆ O ₁₄	Ácido graxo glicosilado	1, 13, 35
C134	[M+Na] ⁺	6.212	437.1931	<u>405.1660</u> ; 349.1807; 314.7950; 305.1582; 303.1157; <u>201.0464</u> ; <u>135.0793</u> ; <u>119.0843</u> ; <u>117.0689</u> ; <u>115.0519</u>	-2.08	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	Magnosinina	1, 13, 18, 20, 35
C135	[M-H] ⁻	6.691	293.2101	<u>279.2310</u> ; <u>277.2161</u> ; 265.1459; 255.2309; 197.0255; 191.0060; 183.0103	-5.35	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	Derivado do ácido octadecenóico	1, 20
C136	[M+H] ⁺	6.704	330.3360	<u>312.3263</u> ; 307.2627; 177.1105; 133.0849	-3.64	C ₂₀ H ₄₃ NO ₂	Derivado de esfingolípido 7	1, 13, 20, 35

C137	[M+H] ⁺	6.906	356.3518	<u>338.3413</u> ; 307.2624; 177.1118; 133.0850	-2.96	C ₂₂ H ₄₅ NO ₂	Derivado de esfingolípido 8	1, 13
C138	[M+H] ⁺	7.036	496.3395	459.2491; <u>313.2729</u> ; 307.2629; <u>184.0723</u> ; <u>177.1102</u> ; <u>133.0848</u> ; <u>124.9980</u>	-1.64	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	Derivado de ácido graxo fosfatado 1	1
C139	[M-H] ⁻	7.196	571.2879	<u>397.1334</u> ; 391.2238; 339.1985; <u>325.1836</u> ; 315.0474; <u>311.1666</u> ; 299.0416; 279.2309; 255.2310; 241.0097; 225.0058; 183.0102	-1.08	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	Derivado triterpenoide	1, 13
C140	[M-H] ⁻	7.349	311.1665	287.2209; 283.2605; 279.2308; 255.2305; <u>239.0683</u> ; <u>225.0564</u> ; 207.0387; <u>197.0247</u> ; 191.0037; <u>183.0093</u> ; <u>170.0012</u>	5.72	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	Derivado de naftalenodiona	1, 13, 18, 20, 35
C141	[M-H] ⁻	7.670	555.2836	483.2720; 397.1336; 339.1979; 325.1833; 311.1663; 299.0429; <u>279.2304</u> ; 255.2317; 225.0059; 206.9955; 183.0106; 164.9848	5.51	C ₂₈ H ₄₄ O ₁₁	Saponina 8	1, 13, 20
C142	[M-H] ⁻	7.881	483.2719	397.1340; 339.1979; 325.1832; 311.1667; <u>255.2314</u> ; 183.0108	-1.19	C ₂₂ H ₄₅ O ₉ P	Derivado de ácido graxo fosfatado 2	1

C143	[M+H] ⁺	8.109	425.2146	<u>365.1938</u> ; 341.3041; 335.2576; 307.2625; 261.2202; 283.2614; <u>184.0726</u> ; 177.1111; <u>165.0898</u> ; <u>133.0855</u>	-6.93	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	Éster terpenóide	1, 13, 18, 20, 35
C144	[M+H] ⁺	8.302	607.2549	<u>481.2605</u> ; 439.3420; <u>393.2079</u> ; 351.2891; 333.2784; 307.2630; 263.2358; 245.2255; 221.1376; 195.1215; 177.1112; 133.0853	-1.25	C ₃₅ H ₃₄ N ₄ O ₆	Feoforbídeo B	1, 13
C145	[M+H] ⁺	8.505	797.5203	621.2721; 547.2347; 519.2395; 307.2631; 263.2361; <u>245.2257</u> ; 177.1114; 133.0853	-0.09	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₀	Derivado de ácido graxo glicosilado	1, 18, 20
C146	[M+H] ⁺	9.001	593.2780	<u>533.2551</u> ; <u>505.2263</u> ; <u>461.2326</u> ; <u>447.2177</u> ; <u>433.2369</u> ; 307.2628; 177.1113; 133.0853	2.70	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅	Feoforbídeo A	1, 13, 20, 35

FONTE: Do autor.

Legenda: A anotação dos principais picos detectados foi feita por comparação de m/z dos íons precursores de cada composto com bases de dados abrangentes como DNP, METLIN e SciFinder. Uma comparação adicional foi feita com padrões de fragmentação *in silico* por meio da ferramenta online MetFrag combinado com outras bases de dados como KEGG, LipidMaps e PubChem.

#Íons fragmentos com m/z em destacados na tabela são aqueles também apontados pelo MetFrag nas bases de dados (KEGG, LipidMaps ou PubChem) com desvio de até 10 ppm.

*A presença nos extratos, dos compostos anotados, foi baseada em valores de área do pico superiores a 2000.

APÊNDICE C – Biomarcadores do modo positivo (P1-P73) com identidades ou classes anotadas por comparação com bases de dados abrangentes e padrões de fragmentação pelo MetFrag.

ID	Ionização	T _R (min)	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íons Fragmentos [#] (<i>m/z</i>)	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Identidade ou classe do composto
P1	[M+Na] ⁺	0.40	320.8153	-	2,63	C ₃ H ₂ Cl ₂ O ₄ P ₂ S ₂	-
P2	[M+H] ⁺	0.75	303.1539	<u>262.1270</u> ; <u>250.1058</u> ; <u>244.1167</u> ; <u>235.1066</u> ; <u>216.1218</u> ; <u>201.1224</u> ; <u>182.0797</u> ; <u>176.0899</u> ; <u>169.0347</u> ; <u>158.1160</u> ; <u>153.0746</u> ; <u>141.0398</u> ; <u>98.0590</u>	-5.65	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆	(3R,4R,5S,6S)-4-(5-Etilpirimidina-2-yl)oxiheptano-1,2,3,5,6-pentol
P3	[M+H] ⁺	1.20	439.1698	-	2,34	C ₂₆ H ₂₃ N ₄ OP	-
P4	[M+H] ⁺	1.63	200.0836	-	-3.08	C ₁₀ H ₁₄ ClNO	-
P5	[M+H] ⁺	1.89	577.1345	<u>545.1076</u> ; <u>535.1231</u> ; <u>527.0966</u> ; <u>517.1125</u> ; <u>451.1013</u> ; <u>437.0861</u> ; <u>427.1014</u> ; <u>409.0908</u> ; <u>407.0751</u> ; <u>393.0603</u> ; <u>383.0750</u> ; <u>358.1277</u> ; <u>341.1009</u> ; <u>313.0692</u> ; <u>303.0843</u> ; <u>301.0697</u> ; <u>289.0699</u> ; <u>275.0540</u> ; <u>271.0589</u> ; <u>259.0590</u> ; <u>247.0590</u> ; <u>245.0432</u> ; <u>229.0481</u> ; <u>191.0690</u> ; <u>163.0377</u> ; <u>151.0380</u> ; <u>139.0378</u> ; <u>127.0378</u> ; <u>123.0427</u>	-0.18	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	Proantocianidina A2
P6	[M+H] ⁺	1.90	867.2161	<u>769.0844</u> ; <u>715.1670</u> ; <u>697.1564</u> ; <u>679.1443</u> ; <u>579.1499</u> ; <u>545.1076</u> ; <u>517.1125</u> ; <u>451.1013</u> ; <u>437.0861</u> ; <u>427.1014</u> ; <u>409.0908</u> ; <u>393.0603</u> ; <u>383.0750</u> ; <u>358.1277</u> ; <u>341.1009</u> ; <u>301.0697</u> ; <u>289.0699</u> ; <u>271.0589</u> ; <u>247.0590</u> ; <u>163.0377</u> ; <u>139.0378</u> ; <u>127.0378</u>	2.83	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	Arecatanina A1 ou B1
P7	[M+H] ⁺	1.94	437.1077	<u>404.1012</u> ; <u>326.0955</u> ; <u>301.0244</u> ; <u>289.0224</u> ; <u>247.0184</u> ; <u>231.0215</u> ; <u>220.0742</u> ; <u>206.0041</u> ; <u>181.0118</u> ; <u>164.0543</u> ; <u>147.0083</u> ; <u>132.0105</u>	-1.58	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	(+)-Taxifolina 3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosídeo
P8	[M+Na] ⁺	1.95	436.1230	<u>378.0227</u> ; <u>371.0041</u> ; <u>361.9710</u> ; <u>352.9936</u> ;	-0.70	C ₁₉ H ₁₉ N ₅ O ₆	6-Amino6-desoxifutalosina

				333.0167; 321.0228; 303.0113; 289.0697; 277.0328; <u>247.0605</u> ; 216.1110; <u>191.0318</u> ; <u>181.0567</u> ; <u>163.0377</u> ; 153.0170; <u>138.0538</u>			
P9	[M+Na] ⁺	2.16	472.1988	-	-1.98	C ₂₂ H ₃₇ Cl ₂ NO ₄	-
P10	[M+H] ⁺	2.23	674.2242	-	-0.63	C ₃₇ H ₃₉ NO ₇ S ₂	-
P11	[M+H] ⁺	2.33	621.0731	-	0.49	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₈	-
P12	[M+H] ⁺	2.33	639.0846	-	1.94	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₉	-
P13	[M+H] ⁺	2.44	674.2245	-	0.38	C ₃₉ H ₃₆ N ₃ O ₄ PS	-
P14	[M+Na] ⁺	2.49	395.1304	<u>345.0948</u> ; 313.0686; <u>305.0649</u> ; <u>289.0692</u> ; 287.0537; <u>273.0748</u> ; 271.0593; <u>263.0545</u> ; 259.1175; <u>247.0589</u> ; <u>245.0432</u> ; <u>231.0643</u> ; <u>203.0325</u> ; <u>193.0840</u> ; <u>179.0329</u> ; <u>177.0534</u> ; <u>163.0376</u> ; <u>147.0429</u> ; <u>139.0379</u> ; <u>123.0426</u> ; <u>119.0477</u> ; 115.0529	-3.56	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	Siringina
P15	[M+H] ⁺	2.51	293.0287	<u>277.0327</u> ; <u>261.0381</u> ; <u>247.0224</u> ; <u>235.0231</u> ; 229.0479; <u>219.0276</u> ; <u>205.0120</u> ; <u>191.0327</u> ; 177.0535; <u>163.0379</u> ; <u>153.0172</u> ; 147.0427; 145.0272; 135.0433; 123.0425	-3.57	C ₁₃ H ₈ O ₈	Ácido brevifolincarboxílico
P16	[M+H] ⁺	2.51	481.0620	453.0087; <u>445.0400</u> ; 427.0293; <u>337.0184</u> ; <u>321.0239</u> ; <u>303.0129</u> ; 289.0704; 277.0334; <u>275.0179</u> ; <u>247.0230</u> ; <u>235.0227</u> ; <u>219.0275</u> ; 191.0326; 163.0378; <u>153.0174</u> ; 147.0429	0.34	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₄	Ácido elágico 1- <i>beta</i> -O-glucosídeo
P17	[M+H] ⁺	2.52	310.1464	<u>277.0335</u> ; 259.0228; <u>247.0229</u> ; <u>235.0232</u> ; 219.0277; <u>205.0494</u> ; 191.0330; 179.0325; <u>163.0377</u> ; 153.0171; <u>146.0260</u> ; <u>139.0381</u> ; <u>135.0428</u> ; <u>123.0427</u>	6.71	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	Alcaloide
P18	[M+H] ⁺	2.54	801.0802	<u>785.0864</u> ; <u>615.0646</u> ; 579.1512; <u>481.0620</u> ; 471.0197; 453.0093; 427.0294; 409.0913; <u>337.0188</u> ; <u>321.0237</u> ; <u>303.0138</u> ; <u>277.0338</u> ; <u>271.0595</u> ; <u>247.0591</u> ; <u>139.0383</u> ; <u>127.0380</u>	1.91	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₃	Elagitanina

P19	[M+H] ⁺	2.55	321.0185	<u>303.0026</u> ; 296.9939; <u>291.0035</u> ; <u>284.9929</u> ; <u>272.9936</u> ; <u>260.9942</u> ; <u>256.9993</u> ; 254.9837; <u>242.9850</u> ; <u>230.9857</u> ; <u>218.9862</u> ; <u>206.9870</u> ; <u>204.9714</u> ; <u>202.9922</u> ; 199.9778; 176.9789; <u>163.0009</u> ; <u>147.0070</u> ; <u>144.9917</u> ; <u>135.0085</u> ; 123.0098	5.94	C ₁₅ H ₉ ClO ₆	Clorotetrahidroxiflavona
P20	[M+H] ⁺	2.63	386.1597	337.0189; 303.0135; <u>301.0701</u> ; <u>286.0467</u> ; 277.0338; <u>258.0515</u> ; <u>247.0600</u> ; <u>177.0537</u> ; <u>153.0173</u> ; <u>147.0430</u> ; <u>135.0433</u> ; <u>123.0429</u>	-1.72	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	Derivado de flavonoide nitrogenado
P21	[M+H] ⁺	2.65	329.1014	303.0133; <u>301.0700</u> ; <u>286.0468</u> ; 277.0337; 261.0388; <u>247.0596</u> ; 221.0071; <u>207.0643</u> ; <u>193.0122</u> ; <u>177.0536</u> ; <u>165.0535</u> ; <u>153.0172</u> ; <u>147.0430</u> ; <u>135.0429</u> ; <u>119.0475</u>	-3.39	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	Hidroxi-tri-metoxiflavanona
P22	[M+H] ⁺	2.69	783.0703	<u>633.0765</u> ; <u>617.0787</u> ; 579.1503; <u>499.0523</u> ; <u>453.0096</u> ; <u>427.0294</u> ; 409.0918; 337.0190; <u>303.0135</u> ; 289.0702; 277.0335; 247.0594; 213.0538; 163.0380; <u>153.0173</u> ; <u>139.0385</u>	2.80	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	Punicalina
P23	[M+Na] ⁺	2.74	215.0691	203.0336; 193.0124; <u>177.0538</u> ; 166.9965; <u>163.0381</u> ; <u>161.0600</u> ; 153.0174; <u>147.0430</u> ; <u>139.0385</u> ; <u>135.0425</u> ; <u>127.0384</u> ; <u>123.0433</u> ; <u>115.0527</u> ; 108.1684	3.19	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	Derivado de ácido cumárico
P24	[M+H] ⁺	2.83	538.1464	-	0.42	C ₂₆ H ₂₃ N ₃ O ₁₀	-
P25	[M+H] ⁺	2.86	785.0869	<u>597.0524</u> ; 577.1356; 499.0519; <u>453.0098</u> ; <u>427.0296</u> ; 337.0196; 329.0660; <u>321.0249</u> ; <u>303.0139</u> ; <u>277.0344</u> ; 249.0389; <u>221.0079</u> ; 203.0330; 177.0540; <u>165.0173</u> ; <u>153.0176</u> ; 127.0386	4.01	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	Terflavina B
P26	[M+H] ⁺	2.97	630.2751	-	0.30	C ₃₄ H ₃₉ N ₅ O ₅ S	-
P27	[M+Na] ⁺	2.97	648.2289	-	3.19	C ₂₉ H ₃₉ NO ₁₄	-
P28	[M+H] ⁺	2.99	273.0769	247.0227; <u>229.0491</u> ; 221.0076; <u>219.0281</u> ;	2.20	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Tri-hidroxiflavanona

				<u>213.0532</u> ; <u>201.0513</u> ; <u>191.0335</u> ; <u>179.0336</u> ; <u>177.0540</u> ; <u>167.0695</u> ; <u>163.0380</u> ; <u>153.0174</u> ; <u>147.0429</u> ; <u>139.0384</u> ; <u>127.0386</u> ; <u>123.0431</u>			
P29	[M+H] ⁺	3.00	209.0384	-	-0.36	C ₉ H ₈ N ₂ O ₂ S	-
P30	[M+H] ⁺	3.01	227.2115	-	-3.69	C ₁₃ H ₂₆ N ₂ O	-
P31	[M+Na] ⁺	3.03	365.1561	<u>345.0971</u> ; <u>323.1115</u> ; <u>317.0655</u> ; <u>303.0496</u> ; <u>287.0547</u> ; <u>270.0521</u> ; <u>249.1114</u> ; <u>242.0569</u> ; <u>207.0641</u> ; <u>193.0492</u> ; <u>181.0495</u> ; <u>177.0540</u> ; <u>167.0695</u> ; <u>153.0541</u> ; <u>147.0430</u> ; <u>128.0626</u> ; <u>115.0531</u>	-4.18	C ₁₇ H ₂₆ O ₇	Jasmolona glucosilada
P32	[M+H] ⁺	3.09	171.0280	<u>154.0208</u> ; <u>153.0175</u> ; <u>147.0429</u> ; <u>146.0352</u> ; <u>137.0224</u> ; <u>127.0386</u> ; <u>125.0223</u> ; <u>119.0481</u> ; <u>109.0274</u>	-7.89	C ₇ H ₆ O ₅	Derivado de ácido tri- hidroxibenzóico
P33	[M+Na] ⁺	3.10	617.1324	<u>563.3405</u> ; <u>519.1595</u> ; <u>467.0819</u> ; <u>411.1983</u> ; <u>331.0445</u> ; <u>303.0493</u> ; <u>287.0589</u> ; <u>257.0439</u> ; <u>229.0480</u> ; <u>201.0530</u> ; <u>153.0171</u> ; <u>137.0223</u> ; <u>125.0222</u>	8.56	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	Hiacintina
P34	[M+H] ⁺	3.16	210.1842	-	-7.56	C ₁₃ H ₂₃ NO	-
P35	[M+H] ⁺	3.21	297.0749	<u>283.0586</u> ; <u>275.0554</u> ; <u>271.0587</u> ; <u>263.0566</u> ; <u>257.0460</u> ; <u>247.0612</u> ; <u>245.0437</u> ; <u>241.0488</u> ; <u>235.0724</u> ; <u>229.0487</u> ; <u>221.0520</u> ; <u>217.0481</u> ; <u>209.0795</u> ; <u>205.0474</u> ; <u>201.0478</u>	-4.71	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	Aspulvinona E
P36	[M+H] ⁺	3.23	437.1227	<u>411.1063</u> ; <u>393.0963</u> ; <u>377.1004</u> ; <u>361.0700</u> ; <u>329.0688</u> ; <u>317.0995</u> ; <u>301.0698</u> ; <u>285.0746</u> ; <u>271.0590</u> ; <u>257.0800</u> ; <u>241.0483</u> ; <u>229.0483</u> ; <u>213.0530</u> ; <u>189.0535</u> ; <u>163.0381</u> ; <u>147.0430</u> ; <u>139.0382</u> ; <u>123.0428</u>	-2.16	C ₂₄ H ₂₀ O ₈	3- <i>O</i> - Cinnamatoepigalocatequina
P37	[M+H] ⁺	3.36	577.1570	<u>541.1348</u> ; <u>527.2473</u> ; <u>415.1024</u> ; <u>397.0919</u> ; <u>379.0815</u> ; <u>361.0711</u> ; <u>337.0711</u> ; <u>313.0709</u> ; <u>309.0757</u> ; <u>295.0612</u> ; <u>283.0602</u> ; <u>267.0651</u> ;	2.19	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₄	Apigenina-7-[6''-(3-hidroxi-3- metilglutaril)glucosídeo]

<u>177.0175; 165.0174; 149.0224</u>							
P38	[M+H] ⁺	3.41	541.1373	-	4.98	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₂	-
P39	[M+H] ⁺	3.47	145.0386	-	-3.84	C ₂ H ₅ N ₆ P	-
P40	[M+H] ⁺	3.47	163.0526	-	1.18	C ₆ H ₁₁ O ₃ P	-
P41	[M+Na] ⁺	3.53	445.1829	-	-2.11	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	-
P42	[M+H] ⁺	3.72	599.3296	-	2.05	C ₃₀ H ₅₁ N ₂ O ₆ PS	-
P43	[M+H] ⁺	3.85	147.0433	<u>131.0482</u> ; 128.0605; <u>123.0422</u> ; <u>119.0478</u> ; <u>115.0530</u>	-8.87	C ₉ H ₆ O ₂	Cumarina
P44	[M+H] ⁺	3.92	639.1758	<u>579.1505</u> ; <u>553.1348</u> ; <u>509.1442</u> ; 439.2300; 379.0821; 337.0710; <u>313.0707</u> ; <u>295.0607</u> ; <u>283.0604</u> ; <u>271.0598</u> ; <u>207.0647</u> ; <u>177.0539</u> ; <u>175.0383</u> ; <u>147.0428</u> ; <u>137.0586</u>	6.91	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₄	2''-O-ferulateisoscoparina
P45	[M+H] ⁺	3.92	819.2561	-	7.41	C ₄₂ H ₄₂ O ₁₇	-
P46	[M+H] ⁺	3.93	757.1981	<u>675.1915</u> ; <u>639.1722</u> ; <u>609.1624</u> ; 509.1448; <u>491.1343</u> ; 439.2290; 379.0824; 355.1176; <u>327.0869</u> ; <u>313.0706</u> ; <u>299.0554</u> ; <u>271.0595</u> ; <u>207.0651</u> ; <u>177.0541</u> ; <u>167.0697</u> ; <u>145.0276</u> ; <u>137.0589</u>	0.14	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₈	Kaempferol 3-(6'''- cafeoilglucosil)-(1->4)- ramnosídeo
P47	[M+H] ⁺	3.96	727.1877	<u>673.3040</u> ; <u>633.2237</u> ; <u>609.1631</u> ; 541.2978; <u>509.1443</u> ; <u>479.1337</u> ; 455.3519; <u>435.1261</u> ; 393.0971; <u>313.0706</u> ; <u>285.0756</u> ; <u>271.0597</u> ; <u>241.0490</u> ; <u>207.0649</u> ; <u>177.0544</u> ; <u>137.0588</u>	0.37	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₇	Pelargonidina- 3-O-beta-D- (cafeoil)-sambubiosídeo
P48	[M+H] ⁺	4.01	653.1873	<u>509.1441</u> ; 471.2204; 461.1445; 439.3561; 423.3621; 393.0983; 333.0796; 315.0862; 299.0913; 285.0748; 256.0724; 243.1003; <u>207.0651</u> ; <u>177.0541</u> ; <u>167.0695</u> ; <u>147.0430</u>	0.41	C ₃₃ H ₃₂ O ₁₄	Derivado de cinamoil- flavonoide
P49	[M+Na] ⁺	4.05	557.2369	-	1.13	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₀	-
P50	[M+H] ⁺	4.09	533.1295	481.2410; 455.3521; 437.3419; 419.3314; 393.0981; 379.0822; 351.0869; <u>327.0869</u> ; <u>313.0712</u> ; <u>299.0912</u> ; <u>285.0754</u> ; <u>271.0599</u> ;	-0.04	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	Apigenina-7-metileter-5-(6''- malonilglucosídeo)

				<u>207.0649</u> ; <u>177.0541</u> ; <u>167.0697</u> ; <u>147.0430</u> ; <u>127.0386</u>			
P51	[M+Na] ⁺	4.36	835.4451	813.4630; 719.2941; <u>647.3799</u> ; <u>629.3695</u> ; <u>567.2422</u> ; <u>471.3472</u> ; <u>453.3364</u> ; 439.3567; 421.3467; 337.1065; <u>305.0846</u> ; <u>215.1783</u> ; 177.0531; <u>159.1158</u> ; <u>145.1000</u>	-0.59	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₅	Saponina derivada de ácido oleanólico diglicosilado
P52	[M+H] ⁺	4.37	795.4509	691.2588; <u>629.3693</u> ; 617.2212; <u>471.3471</u> ; <u>453.3366</u> ; <u>435.3254</u> ; 421.3459; <u>395.2944</u> ; <u>289.0539</u> ; <u>283.0601</u> ; <u>203.1786</u> ; 177.0530; 141.0171	-2.75	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	Saponina derivada de ácido oleanólico diglicosilado
P53	[M+Na] ⁺	4.79	719.2876	-	-2.08	C ₃₄ H ₄₈ O ₁₅	-
P54	[M+Na] ⁺	4.86	343.0801	<u>328.0572</u> ; 311.0553; <u>299.0910</u> ; <u>284.0678</u> ; <u>271.0595</u> ; <u>256.0717</u> ; <u>241.0492</u> ; <u>227.0689</u> ; <u>213.0535</u> ; <u>207.0655</u> ; <u>177.0539</u> ; <u>162.0303</u> ; <u>145.0494</u> ; <u>128.0610</u> ; <u>127.0379</u>	2.11	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	4-Coumaroilchiquimato
P55	[M+Na] ⁺	5.02	439.2778	-	-1.38	C ₂₁ H ₄₀ N ₂ O ₆	-
P56	[M+H] ⁺	5.17	809.4322	-	-0.19	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	-
P57	[M+Na] ⁺	5.37	817.4355	687.3198; <u>599.3958</u> ; <u>567.2787</u> ; 515.1307; <u>457.3680</u> ; <u>439.3563</u> ; <u>421.3464</u> ; <u>405.3496</u> ; <u>361.0746</u> ; 312.0628; 284.0670; 255.0650; 241.0484; <u>203.1779</u> ; <u>159.1155</u> ; <u>133.0995</u>	0.57	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	Saponina derivada de ácido oleanólico diglicosilado
P58	[M+H] ⁺	5.42	867.4756	833.4216; <u>817.4361</u> ; <u>717.3679</u> ; <u>687.3185</u> ; <u>599.3932</u> ; <u>567.2791</u> ; <u>457.3680</u> ; 239.3554; <u>423.3617</u> ; <u>361.0728</u> ; <u>318.2997</u> ; <u>283.0600</u> ; 256.2628	1.60	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	Malonilsaikosaponina A
P59	[M+Na] ⁺	5.55	767.4660	689.3358; 635.4167; <u>599.3955</u> ; <u>581.3864</u> ; <u>481.3651</u> ; <u>441.3727</u> ; <u>423.3624</u> ; <u>405.3517</u> ; <u>331.0635</u> ; 313.0522; <u>217.1940</u> ; <u>203.1782</u>	-6.54	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₀	Tetra-acetildaucosterol
P60	[M+Na] ⁺	5.56	789.4411	767.4611; 689.3358; <u>635.4167</u> ; <u>599.3955</u> ; <u>581.3864</u> ; <u>441.3727</u> ; <u>423.3624</u> ; <u>405.3517</u> ;	1.25	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	Akeboside Std

				331.0635; 313.0522; 217.1940; 203.1782; 133.0999			
P61	[M+Na] ⁺	5.96	345.0963	<u>329.0633</u> ; 314.7961; 305.1586; <u>300.0586</u> ; <u>284.0661</u> ; <u>257.0417</u> ; 201.0454; <u>167.0315</u> ; <u>153.0176</u> ; 140.0667; <u>133.0844</u> ; <u>128.0602</u>	3.70	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	Derivado de cumarina
P62	[M+Na] ⁺	5.96	599.3944	481.3656; <u>441.3732</u> ; 423.3622; 405.3517; 307.2616; 247.9597; <u>229.1950</u> ; <u>203.1789</u> ; <u>161.1312</u> ; <u>133.0998</u> ; <u>119.0844</u>	3.38	C ₃₄ H ₅₆ O ₇	Triterpeno esteroidal
P63	[M+H] ⁺	6.31	351.2020	-	0.30	C ₁₆ H ₃₀ O ₈	-
P64	[M+H] ⁺	8.54	621.2705	-	-1.31	C ₃₆ H ₃₆ N ₄ O ₆	-
P65	[M+H] ⁺	9.03	623.2857	-	0.12	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₀	-
P66	[M+H] ⁺	9.18	607.2910	<u>539.2422</u> ; <u>535.2693</u> ; <u>533.2549</u> ; <u>461.2327</u> ; <u>447.2180</u> ; 307.2628; 177.1111; 133.0854	-1.72	C ₃₆ H ₃₈ N ₄ O ₅	Derivado de Feoforbídeo
P67	[M+H] ⁺	9.32	657.2677	-	-5.49	C ₃₉ H ₃₆ N ₄ O ₆	-
P68	[M+Na] ⁺	9.51	816.8839	-	-0.44	C ₃₁ H ₁₁ ClN ₄ O ₁₂ S ₄	-
P69	[M+Na] ⁺	9.52	649.3036	-	-0.97	C ₄₁ H ₄₂ N ₂ O ₄	-
P70	[M+H] ⁺	9.52	671.2836	-	-3.02	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₀	-
P71	[M+H] ⁺	9.52	861.4913	-	-0.20	C ₅₀ H ₆₄ N ₆ O ₇	-
P72	[M+Na] ⁺	9.53	687.2565	-	-0.73	C ₄₀ H ₄₀ O ₉	-
P73	[M+Na] ⁺	9.53	878.5730	-	-0.36	C ₅₄ H ₈₁ NO ₅ S	-

FONTE: Do autor.

Legenda: A anotação dos principais picos detectados foi feita por comparação de *m/z* dos íons precursores de cada composto com bases de dados abrangentes como DNP, METLIN e SciFinder. Uma comparação adicional foi feita com padrões de fragmentação *in silico* por meio da ferramenta online MetFrag combinado com outras bases de dados como KEGG, LipidMaps e PubChem.

#Íons fragmentos com *m/z* em destacados na tabela são aqueles também apontados pelo MetFrag nas bases de dados (KEGG, LipidMaps ou PubChem) com desvio de até 10 ppm.

APÊNDICE D – Biomarcadores do modo negativo (N1-N94) com identidades ou classes anotadas por comparação com bases de dados abrangentes e padrões de fragmentação pelo MetFrag.

ID	Ionização	T _R (min)	Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íons Fragmentos [#] (<i>m/z</i>)	Erro (ppm)	Fórmula molecular	Identidade ou classe do composto
N1	[M-H] ⁻	0.54	533.1724	<u>515.1609</u> ; <u>503.1594</u> ; <u>485.1502</u> ; <u>473.1497</u> ; <u>383.1172</u> ; <u>355.0281</u> ; <u>303.0697</u> ; <u>300.9977</u> ; <u>281.0868</u> ; <u>275.0186</u> ; <u>221.0644</u> ; <u>217.0339</u> ; <u>191.0536</u> ; <u>175.0237</u> ; <u>163.0592</u>	1.16	C ₁₉ H ₃₄ O ₁₇	2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -glycero-manno-heptopiranosil-glucoexopiranosil)glucoexopiranosose
N2	[M-H] ⁻	0.85	295.1009	-	-6.81	C ₁₁ H ₂₀ O ₉	-
N3	[M-H] ⁻	0.90	481.0607	<u>425.0137</u> ; <u>399.0343</u> ; <u>337.0180</u> ; <u>300.9970</u> ; <u>275.0174</u> ; <u>257.0068</u> ; <u>229.0119</u>	-2.36	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	2,3-(<i>S</i>)-hexahidroxidifenoil-D-glucose
N4	[M-H] ⁻	1.05	649.0671	<u>605.0768</u> ; <u>481.0598</u> ; <u>425.0134</u> ; <u>399.0330</u> ; <u>373.0537</u> ; <u>343.0645</u> ; <u>300.9964</u> ; <u>275.0175</u> ; <u>247.0227</u> ; <u>191.0535</u> ; <u>169.0119</u>	-0.94	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉	Trímero de ácido gálico glicosilado
N5	[M-H] ⁻	1.33	402.1019	-	-4.32	C ₁₆ H ₂₁ NO ₁₁	-
N6	[M-H] ⁻	1.46	633.0723	<u>513.1418</u> ; <u>463.0497</u> ; <u>397.0762</u> ; <u>331.0663</u> ; <u>300.9972</u> ; <u>275.0173</u> ; <u>249.0392</u> ; <u>205.0482</u> ; <u>169.0118</u>	-0.78	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Corilagina
N7	[M-H] ⁻	1.48	435.1129	-	-2.23	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₃	-
N8	[M-H] ⁻	1.53	463.0505	<u>425.0126</u> ; <u>411.0289</u> ; <u>300.9970</u> ; <u>275.0174</u> ; <u>249.0375</u> ; <u>229.0118</u> ; <u>203.0329</u> ; <u>169.0121</u> ; <u>293.0283</u> ; <u>275.0175</u> ; <u>249.0381</u> ; <u>235.0596</u> ; <u>219.0284</u> ; <u>205.0485</u> ; <u>191.0316</u> ; <u>179.0691</u> ; <u>169.0122</u> ; <u>164.0453</u>	-1.66	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₃	Ácido elágico glucosídeo
N9	[M-H] ⁻	1.58	311.0386	<u>337.0176</u> ; <u>331.0652</u> ; <u>311.0395</u> ; <u>300.9973</u> ; <u>293.0277</u> ; <u>275.0176</u> ; <u>249.0389</u> ; <u>235.0594</u> ; <u>205.0476</u> ; <u>179.0695</u> ; <u>169.0124</u>	-5.50	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	Ácido caftárico
N10	[M-H] ⁻	1.58	355.0286	<u>337.0176</u> ; <u>331.0652</u> ; <u>311.0395</u> ; <u>300.9973</u> ; <u>293.0277</u> ; <u>275.0176</u> ; <u>249.0389</u> ; <u>235.0594</u> ; <u>205.0476</u> ; <u>179.0695</u> ; <u>169.0124</u>	-4.33	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₁	Ácido chebúlico
N11	[M-H] ⁻	1.66	593.1286	-	-3.80	C ₃₁ H ₂₂ N ₄ O ₉	-

N12	[M-H] ⁻	1.68	479.1042	-	1.04	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₅	-
N13	[M-H] ⁻	1.70	799.0625	<u>777.2305</u> ; <u>493.1186</u> ; <u>465.1244</u> ; <u>371.0973</u> ; <u>313.0545</u> ; <u>300.9975</u> ; <u>271.0444</u> ; <u>247.0231</u> ; <u>211.0232</u> ; <u>169.0124</u>	-0.65	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₃	Lagerstanino A
N14	[M-H] ⁻	1.73	867.2394	-	-1.44	C ₃₅ H ₄₈ O ₂₅	-
N15	[M-H] ⁻	1.85	441.1037	-	0.90	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₂	-
N16	[M-H] ⁻	1.95	765.2078	-	-1.51	C ₃₁ H ₄₂ O ₂₂	-
N17	[M-H] ⁻	2.11	633.0722	<u>495.0769</u> ; <u>483.0753</u> ; <u>465.1234</u> ; <u>425.0128</u> ; <u>343.0645</u> ; <u>300.9969</u> ; <u>275.0175</u> ; <u>249.0381</u> ; <u>211.0230</u> ; <u>191.0546</u> ; <u>169.0120</u>	-0.94	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	Elagitanino
N18	[M-H] ⁻	2.21	625.0567	-	6.79	C ₂₁ H ₂₂ O ₂₂	-
N19	[M-H] ⁻	2.24	453.1190	-	0.97	C ₂₄ H ₂₂ O ₉	-
N20	[M-H] ⁻	2.25	307.0077	-	-4.27	C ₁₃ H ₈ O ₉	-
N21	[M-H] ⁻	2.27	725.0723	-	-2.15	C ₃₁ H ₂₂ N ₂ O ₁₉	-
N22	[M-H] ⁻	2.30	459.0189	-	-2.33	C ₂₀ H ₁₂ O ₁₃	-
N23	[M-H] ⁻	2.31	415.0290	-	-2.74	C ₁₉ H ₁₂ O ₁₁	-
N24	[M-H] ⁻	2.34	547.0538	-	-6.11	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₈	-
N25	[M-H] ⁻	2.34	569.0489	-	-2.01	C ₁₇ H ₁₄ N ₈ O ₁₅	-
N26	[M-H] ⁻	2.34	975.1315	-	-2.73	C ₄₃ H ₂₈ N ₈ O ₂₀	-
N27	[M-H] ⁻	2.35	551.0376	-	-8.28	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₁₆	-
N28	[M-H] ⁻	2.35	646.0610	-	0.09	C ₃₈ H ₁₉ NO ₆ P ₂	-
N29	[M-H] ⁻	2.37	637.0580	-	3.20	C ₄₀ H ₁₄ O ₉	-
N30	[M-H] ⁻	2.41	550.0303	-	-1.53	C ₃₁ H ₉ N ₃ O ₈	-
N31	[M-H] ⁻	2.42	528.0355	-	-2.64	C ₃₁ H ₇ N ₅ O ₅	-
N32	[M-H] ⁻	2.42	559.0354	<u>477.0666</u> ; <u>463.0511</u> ; <u>445.0401</u> ; <u>425.0143</u> ; <u>399.0345</u> ; <u>361.0945</u> ; <u>323.1150</u> ; <u>300.9976</u> ; <u>273.0026</u> ; <u>247.0231</u> ; <u>217.0125</u> ; <u>179.0334</u> ; <u>169.0125</u>	-7.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₆ S	Gossipetina 8-glucosídeo-3-sulfato
N33	[M-H] ⁻	2.43	757.0893	<u>745.320</u> ; <u>633.0731</u> ; <u>613.0479</u> ; <u>603.0628</u> ;	0.61	C ₃₃ H ₂₆ O ₂₁	Balanofotanino E

				<u>587.0680</u> ; <u>575.0674</u> ; <u>463.0515</u> ; <u>445.0405</u> ; <u>425.0147</u> ; <u>300.9978</u> ; <u>273.0032</u> ; <u>247.0237</u> ; <u>214.9971</u> ; <u>169.0128</u>				
N34	[M-H] ⁻	2.45	568.0406	-	-1.95	C ₃₁ H ₁₁ N ₃ O ₉	-	
N35	[M-H] ⁻	2.45	638.0469	-	2.66	C ₂₅ H ₂₁ NO ₁₇ S	-	
N36	[M-H] ⁻	2.46	485.0455	-	8.26	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₈	-	
N37	[M-H] ⁻	2.46	537.0402	-	4.25	C ₂₅ H ₆ N ₁₂ O ₂ S	-	
N38	[M-H] ⁻	2.46	616.0518	-	-0.04	C ₂₆ H ₂₃ N ₃ O ₉ S ₃	-	
N39	[M-H] ⁻	2.47	631.0594	<u>613.0469</u> ; <u>587.0665</u> ; <u>463.0509</u> ; <u>445.0403</u> ; <u>425.0140</u> ; <u>405.0460</u> ; <u>337.0183</u> ; <u>300.9972</u> ; <u>275.0179</u> ; <u>247.0229</u> ; <u>191.0338</u> ; <u>169.0125</u>	3.57	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₈	Terflavina D	
N40	[M-H] ⁻	2.49	649.0683	<u>631.0579</u> ; <u>613.0468</u> ; <u>463.0511</u> ; <u>445.0400</u> ; <u>405.0465</u> ; <u>337.0179</u> ; <u>313.0544</u> ; <u>300.9975</u> ; <u>291.0133</u> ; <u>273.0024</u> ; <u>247.0233</u> ; <u>219.0281</u> ; <u>191.0337</u> ; <u>169.0126</u>	0.91	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₉	Lagerstanino C	
N41	[M-H] ⁻	2.50	247.0233	<u>229.0128</u> ; <u>219.0282</u> ; <u>201.0180</u> ; <u>191.0338</u> ; <u>173.0225</u> ; <u>169.0124</u> ; <u>161.0229</u> ; <u>145.0279</u>	-3.91	C ₁₂ H ₈ O ₆	Brevifolin [Gerânio]	
N42	[M-H] ⁻	2.50	583.0376	-	0.77	C ₃₇ H ₁₃ O ₆ P	-	
N43	[M-H] ⁻	2.50	785.0842	<u>559.0781</u> ; <u>463.0508</u> ; <u>461.0352</u> ; <u>425.0135</u> ; <u>405.0463</u> ; <u>337.0187</u> ; <u>300.9975</u> ; <u>291.0132</u> ; <u>275.0178</u> ; <u>273.0026</u> ; <u>247.0231</u> ; <u>219.0282</u> ; <u>191.0338</u> ; <u>169.0124</u>	0.57	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	Telimagrandina I	
N44	[M-H] ⁻	2.54	953.0906	<u>935.0801</u> ; <u>865.1984</u> ; <u>765.0580</u> ; <u>651.0841</u> ; <u>633.0731</u> ; <u>615.0621</u> ; <u>577.1349</u> ; <u>481.0621</u> ; <u>463.0511</u> ; <u>425.0865</u> ; <u>407.0764</u> ; <u>300.9979</u> ; <u>289.0706</u> ; <u>275.0184</u> ; <u>245.0805</u>	1.02	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇	Elagitanino	
N45	[M-H] ⁻	2.59	633.0731	<u>577.1348</u> ; <u>463.0517</u> ; <u>425.0142</u> ; <u>329.0294</u> ; <u>300.9979</u> ; <u>275.0183</u> ; <u>247.0234</u> ; <u>229.0125</u> ; <u>177.0181</u>	0.48	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	1- <i>O</i> -galoil-6- <i>O</i> -luteoil- <i>alfa</i> -D-glucose	

N46	[M-H] ⁻	2.65	554.0431	-	2.29	C ₂₁ H ₁₇ NO ₁₇	-
N47	[M-H] ⁻	2.66	384.1434	-	-3.42	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	-
N48	[M-H] ⁻	2.67	394.0587	-	6.11	C ₂₀ H ₁₃ NO ₈	-
N49	[M-H] ⁻	2.69	298.9819	-	-2.99	C ₁₄ H ₄ O ₈	-
N50	[M-H] ⁻	2.69	299.9895	-	-2.15	C ₁₃ H ₇ N ₃ O ₂ S ₂	-
N51	[M-H] ⁻	2.69	300.9971	-	-4.47	C ₁₄ H ₆ O ₈	-
N52	[M-H] ⁻	2.69	466.0273	-	3.25	C ₁₈ H ₁₃ NO ₁₄	-
N53	[M-H] ⁻	2.71	495.1242	-	1.92	C ₃₃ H ₂₀ O ₅	-
N54	[M-H] ⁻	2.72	951.0746	<u>933.0634</u> ; <u>865.1979</u> ; <u>803.0927</u> ; <u>785.0814</u> ; <u>739.1674</u> ; <u>713.1504</u> ; <u>695.1401</u> ; <u>633.0740</u> ; <u>577.1339</u> ; <u>463.0505</u> ; <u>449.0998</u> ; <u>425.0860</u> ; <u>407.0757</u> ; <u>337.0179</u> ; <u>300.9973</u> ; <u>289.0697</u> ; <u>273.0027</u> ; <u>259.0596</u>	0.65	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Elagitanino
N55	[M-H] ⁻	2.76	449.1080	<u>316.9929</u> ; <u>300.9979</u> ; <u>275.0179</u> ; <u>273.0028</u> ; <u>247.0234</u> ; <u>229.0126</u> ; <u>217.0129</u> ; <u>191.0343</u> ; <u>169.0125</u> ; <u>159.0427</u>	-0.87	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	Cartamidina glicosilada
N56	[M-H] ⁻	2.78	243.0649	<u>225.0539</u> ; <u>215.0701</u> ; <u>201.0538</u> ; <u>185.0591</u> ; <u>177.0173</u> ; <u>169.0126</u> ; <u>159.0434</u> ; <u>151.0275</u> ; <u>145.0279</u>	-3.44	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	Piceatanol
N57	[M-H] ⁻	2.78	925.0942	<u>865.1975</u> ; <u>829.1107</u> ; <u>783.0685</u> ; <u>765.0578</u> ; <u>755.0729</u> ; <u>631.0901</u> ; <u>613.0467</u> ; <u>597.0516</u> ; <u>577.1333</u> ; <u>575.1176</u> ; <u>479.0821</u> ; <u>465.1017</u> ; <u>445.0398</u> ; <u>316.0210</u> ; <u>300.9977</u> ; <u>285.0390</u> ; <u>275.0178</u> ; <u>273.0029</u> ; <u>243.0645</u> ; <u>229.0124</u> ; <u>169.0127</u> ; <u>151.0019</u>	-0.56	C ₄₀ H ₃₀ O ₂₆	Elagitanino
N58	[M-H] ⁻	2.79	907.0844	<u>865.1975</u> ; <u>829.1107</u> ; <u>783.0685</u> ; <u>765.0578</u> ; <u>755.0729</u> ; <u>631.0901</u> ; <u>613.0467</u> ; <u>597.0516</u> ; <u>479.0821</u> ; <u>465.1017</u> ; <u>445.0398</u> ; <u>316.0210</u> ; <u>300.9970</u> ; <u>285.0390</u> ; <u>243.0645</u> ; <u>229.0124</u> ; <u>169.0127</u> ; <u>151.0019</u>	0.28	C ₄₀ H ₂₈ O ₂₅	Derivado de brevifolina carboxilato-galotanino

N59	[M-H] ⁻	2.81	559.0362	-	0.33	C ₂₄ H ₁₆ O ₁₆	-
N60	[M-H] ⁻	2.82	582.0558	-	-0.90	C ₂₆ H ₁₄ N ₇ O ₈ P	-
N61	[M-H] ⁻	2.83	476.0403	-	-0.72	C ₂₇ H ₁₁ NO ₈	-
N62	[M-H] ⁻	2.85	275.0185	<u>249.0391</u> ; <u>247.0236</u> ; <u>237.0024</u> ; <u>231.0281</u> ; <u>229.0127</u> ; <u>221.0440</u> ; <u>205.0490</u> ; <u>203.0334</u> ; <u>201.0179</u> ; <u>191.0326</u> ; <u>175.0375</u> ; <u>169.0125</u> ; <u>161.0227</u>	-2.47	C ₁₃ H ₈ O ₇	Urolitina M5
N63	[M-H] ⁻	2.91	652.0642	-	-0.45	C ₃₃ H ₂₀ NO ₁₂ P	-
N64	[M-H] ⁻	2.95	573.0548	-	-1.93	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁ S ₃	-
N65	[M-H] ⁻	2.96	537.0411	-	-0.23	C ₂₁ H ₁₆ N ₈ O ₄ P ₂ S	-
N66	[M-H] ⁻	3.01	564.0461	-	-2.14	C ₁₉ H ₁₉ NO ₁₉	-
N67	[M-H] ⁻	3.02	557.1289	<u>529.1159</u> ; <u>497.0351</u> ; <u>463.0510</u> ; <u>447.0941</u> ; <u>429.0823</u> ; <u>407.0760</u> ; <u>391.0801</u> ; <u>357.0610</u> ; <u>327.0496</u> ; <u>309.0393</u> ; <u>300.9986</u> ; <u>271.0575</u> ; <u>243.0647</u> ; <u>211.0253</u> ; <u>193.0124</u> ; <u>169.0126</u> ; <u>161.0227</u> ; <u>151.0025</u>	-1.11	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	(<i>E</i>)-3-(6- <i>O</i> -Galoi-beta-D-glucopiranosiloxi) estilbeno-3',4',5-triol
N68	[M-H] ⁻	3.06	582.0560	-	-3.22	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂₀	-
N69	[M-H] ⁻	3.09	733.1036	-	-0.68	C ₃₅ H ₂₆ O ₁₈	-
N70	[M-H] ⁻	3.15	335.0392	<u>313.0561</u> ; <u>300.9998</u> ; <u>285.0387</u> ; <u>273.0027</u> ; <u>247.0230</u> ; <u>217.0123</u> ; <u>191.0534</u> ; <u>169.0126</u> ; <u>161.0224</u> ; <u>151.0015</u>	-3.31	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	Metilgaloilgalato
N71	[M-H] ⁻	3.21	378.0633	-	5.08	C ₂₀ H ₁₃ NO ₇	-
N72	[M-H] ⁻	3.23	951.0741	<u>933.0647</u> ; <u>907.0854</u> ; <u>765.0588</u> ; <u>737.0624</u> ; <u>633.0739</u> ; <u>599.1042</u> ; <u>583.1089</u> ; <u>539.2117</u> ; <u>463.0523</u> ; <u>431.0976</u> ; <u>399.1649</u> ; <u>313.0543</u> ; <u>300.9978</u> ; <u>285.0388</u> ; <u>273.0025</u> ; <u>169.0126</u>	0.13	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Elagitanino
N73	[M-H] ⁻	3.25	498.0693	-	1.43	C ₂₄ H ₁₃ N ₅ O ₈	-
N74	[M-H] ⁻	3.32	721.1995	<u>699.2509</u> ; <u>659.1982</u> ; <u>619.1672</u> ; <u>577.1566</u> ; <u>559.1459</u> ; <u>495.1298</u> ; <u>457.1133</u> ; <u>413.0873</u> ;	2.09	C ₃₃ H ₃₈ O ₁₈	6'''-(3-Hidroxi-3-metilglutaroil)isoviolantina

				<u>395.0768</u> ; <u>341.0659</u> ; <u>311.0551</u> ; <u>293.0447</u> ; <u>282.0522</u> ; <u>223.0603</u> ; <u>193.0497</u> ; <u>161.0444</u>			
N75	[M-H] ⁻	3.33	273.0056	-	4.40	C ₁₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	-
N76	[M-H] ⁻	3.33	319.0445	300.9976; <u>284.0309</u> ; <u>273.0024</u> ; 255.0285; <u>245.0077</u> ; 227.0335; <u>217.0127</u> ; 211.0313; <u>201.0178</u> ; <u>189.0174</u> ; <u>173.0226</u> ; <u>169.0126</u> ; <u>161.0228</u>	-2.81	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	Brevifolincarboxilato de etila
N77	[M-H] ⁻	3.36	409.0774	-	0.76	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₁	-
N78	[M-H] ⁻	3.38	599.1970	-	-1.00	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₅	-
N79	[M-H] ⁻	3.43	347.0821	-	-1.35	C ₁₀ H ₂₀ O ₁₃	-
N80	[M-H] ⁻	3.54	583.1091	563.2139; 551.3065; 525.2330; <u>479.0813</u> ; <u>465.0676</u> ; <u>461.0709</u> ; <u>447.0564</u> ; 435.1128; 389.2534; <u>341.0658</u> ; <u>328.0215</u> ; 312.9973; <u>300.9988</u> ; <u>285.0396</u> ; <u>273.0028</u> ; <u>247.0233</u> ; <u>227.1267</u> ; <u>217.0124</u> ; <u>191.0541</u> ; <u>169.0125</u> ; <u>161.023</u>	0.54	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	Quercetina 3-(6"-p-hidroxiibenzoilgalactosídeo)
N81	[M-H] ⁻	3.61	300.9975	-	-3.14	C ₁₄ H ₆ O ₈	-
N82	[M-H] ⁻	3.63	315.0134	<u>299.9898</u> ; <u>270.9868</u> ; <u>242.9920</u> ; 227.1273; <u>216.0047</u> ; <u>200.0097</u> ; <u>188.0093</u> ; 183.1371; <u>172.0145</u> ; <u>160.0146</u> ; <u>152.0096</u>	-2.21	C ₁₅ H ₈ O ₈	Ácido 3-O-metilelágico
N83	[M-H] ⁻	3.61	497.0352	-	-0.85	C ₂₃ H ₁₄ O ₁₃	-
N84	[M-H] ⁻	3.71	697.2269	-	1.09	C ₃₂ H ₄₃ O ₁₅ P	-
N85	[M-H] ⁻	3.81	471.1322	-	6.53	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	-
N86	[M-H] ⁻	3.85	422.9975	391.0818; 375.0862; <u>336.9976</u> ; <u>309.0031</u> ; <u>300.9974</u> ; 289.0704; 271.0595; 255.0648; 245.0800; 229.0483; 205.0484; <u>179.0336</u> ; <u>161.0228</u>	-3.17	C ₂₀ H ₈ O ₁₁	Eschweilenol B
N87	[M-H] ⁻	3.96	391.0655	373.2571; 327.0488; 313.0563; 300.9978; <u>285.0385</u> ; 267.0697; 255.0290; 249.0594; 227.1271; 191.0547; 183.1370; <u>169.0127</u> ;	-2.62	C ₁₈ H ₁₆ O ₁₀	5,7,3',4',5'-Pentahidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona

				161.0224; 151.0015			
N88	[M-H] ⁻	4.02	571.0886	<u>353.1053</u> ; 337.1032; <u>309.0418</u> ; <u>298.0471</u> ; <u>285.0416</u> ; <u>257.0442</u> ; <u>229.0489</u> ; <u>227.0339</u> ; 185.0539	1.65	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₂	2,3-Di-hidro-3,3",4',4"',5,5",7,7"- octahidroxi-3',3'''-biflavona
N89	[M-H] ⁻	4.22	569.2228	533.2385; 503.3365; 493.3150; <u>477.1930</u> ; 445.1115; <u>401.1797</u> ; 375.2736; 300.9979; 289.0703; 285.0381; 271.0238; <u>235.0602</u> ; <u>223.0589</u> ; 205.0486; 193.0477; 169.0126; 163.0377	-1.09	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₃	Seguinósídeo I
N90	[M-H] ⁻	4.24	314.0054	-	-3.76	C ₁₁ H ₁₀ NO ₈ P	-
N91	[M-H] ⁻	4.25	329.0287	329.0286; <u>314.0052</u> ; <u>298.9821</u> ; <u>270.9888</u> ; <u>255.0280</u> ; <u>242.9926</u> ; <u>227.0330</u> ; <u>214.9972</u> ; 187.0018	-3.18	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	Ácido 2,3-Di- <i>O</i> -metilelágico
N92	[M-H] ⁻	4.29	511.1606	<u>445.1100</u> ; 403.1908; 391.0443; 373.2567; 327.2151; 300.9976; <u>289.0683</u> ; <u>285.0382</u> ; 270.9870; <u>265.0702</u> ; <u>255.0281</u> ; <u>235.0597</u> ; <u>223.0593</u> ; <u>205.0492</u> ; <u>193.0491</u> ; <u>175.0375</u> ; 169.0126; 163.0371	0.34	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₀	6",6"- Dimetilpirano[2",3":7,8]kaempferol 4'-metil eter 3-ramnosídeo
N93	[M-H] ⁻	4.36	593.1299	<u>575.2122</u> ; 533.2379; <u>423.0707</u> ; <u>391.0661</u> ; <u>375.0493</u> ; <u>300.0256</u> ; <u>271.0236</u> ; <u>255.0279</u> ; <u>223.0587</u> ; <u>205.0488</u> ; 169.0119	0.64	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	Luteolina 7-(2"- <i>p</i> - coumaroilglucosídeo)
N94	[M-H] ⁻	4.97	359.0750	<u>329.0283</u> ; <u>312.0249</u> ; 300.9963; <u>285.0386</u> ; <u>269.0081</u> ; 249.1098; <u>183.0097</u> ; 169.0112	-4.72	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Tri-hidroxi-trimetoxiflavona

FONTE: Do autor.

Legenda: A anotação dos principais picos detectados foi feita por comparação de *m/z* dos íons precursores de cada composto com bases de dados abrangentes como DNP, METLIN e SciFinder. Uma comparação adicional foi feita com padrões de fragmentação *in silico* por meio da ferramenta online MetFrag combinado com outras bases de dados como KEGG, LipidMaps e PubChem.

#Íons fragmentos com *m/z* em destacados na tabela são aqueles também apontados pelo MetFrag nas bases de dados (KEGG, LipidMaps ou PubChem) com desvio de até 10 ppm.