



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAMON ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO METABOLÔMICO DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO
CONVENCIONAIS DE SERGIPE (PANCs)**

**METABOLOMIC STUDY OF NON-CONVENTIONAL FOOD
PLANTS OF SERGIPE (NCFPs)**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAMON ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO METABOLÔMICO DE PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO
CONVENCIONAIS DE SERGIPE (PANCs)**

Exame de dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Química, da
Universidade Federal de Sergipe, para
a obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Branquinho Oliveira

**METABOLOMIC STUDY OF NON-CONVENTIONAL FOOD
PLANTS OF SERGIPE (NCFPs)**

*Exam Master dissertation presented to
the Graduate Programm in Chemistry
of the Federal University of Sergipe to
obtain MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237e Santos, Ramon Alves dos
Estudo Metabolômico de plantas alimentícias não convencionais de Sergipe (PANCs) = Metabolomic study of non-conventional food plants of Sergipe (NCFPs) / Ramon Alves dos Santos ; orientador Tiago Branquinho Oliveira. – São Cristóvão, SE, 2021.
58 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Química. 2. Plantas comestíveis. 3. Antioxidantes. 5. Sergipe. I. Oliveira, Tiago Branquinho, orient. II. Título.

CDU 54(813.7)





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado
de Ramon Alves dos Santos apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de
Sergipe em 30/09/2019

Elas Branquinho Oliveira

Prof. Dr. Tiago Branquinho Oliveira
Departamento de Farmácia - UFS

Nilvan Bezerra da Costa Júnior

Prof. Dr. Nilvan Bezerra da Costa Júnior
Departamento de Química - UFS

Gari Vidal Ccana Ccapatinta

Prof. Dr. Gari Vidal Ccana Ccapatinta
Universidade de São Paulo

SÃO CRISTÓVÃO – SE
Setembro, 2019

RESUMO

O estudo metabolômico de plantas se apresenta como uma ferramenta importante para a busca de novas substâncias ativas, visto que visa descobrir todos os metabolitos produzidos ou modificados por um organismo e através de análises de dados multivariadas definir as correlações *in silico* com suas propriedades biológicas. Sendo as espécies vegetais consumidas pela população, as PANCs (Plantas Alimentícias Não Convencionais), são muitas vezes conhecidas como ervas daninhas ou “matos”, utilizadas para uso alimentício de forma endêmica, pouco ou quase não comercializada nas feiras livres, supermercados, mas que possui um potencial a ser explorado. Dessa forma este trabalho teve como objetivo realizar um estudo metabolômico de 20 espécies vegetais de PANCs consumidas em Sergipe, utilizando extração assistida por ultrassom, espectrometria de massa por infusão direta em Orbitrap-MS e avaliar a citotoxicidade e atividade antioxidante, bem como correlacionar esta propriedade biológica a possíveis substâncias através de estudo *in silico*. O trabalho permitiu correlacionar as análises de citotoxicidade dos extratos a substâncias com razão m/z (420,15 modo positivo e 423,06 modo negativo) na concentração de 100 µg/mL dos extratos vegetais, substâncias com razão m/z (184,93 modo positivo e 507,07 modo negativo) na concentração 1000 µg/mL e também correlacionou a atividade antioxidante extratos vegetais a substâncias de razão m/z (813,51 modo positivo e 832,51 modo negativo). Portanto este trabalho demonstra um importante resultado, visto sugere possíveis substâncias responsáveis pelas propriedades biológica dos extratos, além de contribuir para identificação de extratos vegetais que podem ser sugestivamente tóxicos a alimentação humana.

Palavras-chave: PANCs, *in silico*; citotoxicidade, antioxidante

ABSTRACT

The metabolomic study of plants is an important tool for the search for new active substances, as it aims to discover all metabolites obtained or modified by an organism and, through multivariate data analysis, define correlations *in silico* with its biological properties. As vegetable species consumed by the population, such as PANCs (Non-Conventional Food Plants), they are often similar as weeds or "bushes", used for food use in an endemic way, little or almost not sold in open markets, supermarkets, but that it has a potential to be explored. Thus, this work aimed to carry out a metabolomic study of 20 plant species of PANCs consumed in Sergipe, using ultrasound-assisted extraction, direct infusion mass spectrometry in Orbitrap-MS and to evaluate cytotoxicity and antioxidant activity, as well as to correlate this property to possible substances through an *in silico* study. The common work correlates the cytotoxicity analyzes of extracts to substances with m/z ratio (420.15 positive mode and 423.06 negative mode) at the concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of plant extracts, substances with m/z ratio (184, 93 positive mode and 507.07 negative mode) at 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ concentration and also correlated the antioxidant activity of plant extracts to substances of m/z ratio (813.51 positive mode and 832.51 negative mode). Therefore, this work demonstrates an important result, as it can be associated with the biological properties of the extracts, in addition to contributing to the identification of plant extracts that can be suggestively toxic to human food.

Keywords: PANCs, *in silico*; cytotoxicity, antioxidant

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas Alimentícias Não Convencionais	2
1.2 Estudos Metabolômicos	3
1.2.1 Preparo de Amostra	5
1.2.2 Métodos de extração	5
1.2.3 Métodos de análise de dados	6
1.2.4 Métodos de tratamentos de dados	8
1.3 Atividade citotóxica	9
1.4 Atividade antioxidante.....	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específico	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Materiais e equipamentos.....	11
3.2 Coleta do material botânico	12
3.3 Extração ultrassom	13
3.4 Análise de massas por Orbitrap-MS	13
3.5 Ensaio de radicais DPPH	14
3.6 Ensaio Citotóxico.....	15
3.7 Análises in silico	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Espécies e locais de coleta.....	16
4.2 Ensaio antioxidante pelo método DPPH	18
4.3 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método MTT	19
4.4 Análises in silico e desreplicação	21
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

“Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”

(Antoine-Laurent de Lavoisier)

AGRADECIMENTOS

Toda honra, glória e louvor a Deus. Sem Ele, não teria conseguido.

À minha esposa Damares Alves por estar sempre ao meu lado, amiga e companheira de todas as horas.

À Universidade Federal de Sergipe, pela oportunidade na instituição, especificamente ao Programa de Pós Graduação em Química, Departamento de Química (UFS), pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FAPITEC, CAPES e CNPQ.), pela bolsa de mestrado concedida.

A todos os Professores do PPGQ (DQI-UFS).

À Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula da Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, pela auxílio nas análises *in silico* e financiamento à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte da Universidade Federal de Sergipe, pelo financiamento à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella e a aluna de doutorado Audrey Rouse Soares Tavares Silva da Universidade Federal de Sergipe, pelo ensaios citotóxicos realizados.

À Profa. Dra. Ana Mara de Oliveira e Silva e a aluna de doutorado Anne Karoline de Souza Oliveira da Universidade Federal de Sergipe, pelos ensaios antioxidantes.

Ao Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior e o aluno de doutorado Jhonattas de Carvalho Carregosa da Universidade Federal de Sergipe, pelas análises por espectrometria de massas.

À Profa. Dra. Aurélia Santos Faraoni, a Msc. Iraê Oliveira Moura e a aluna de farmácia Ayres Raquel Moura Santos da Universidade Federal de Sergipe, pelo levantamento e auxílio na coletas das PANCS do estado de Sergipe.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa da Universidade de São Paulo, pelo uso do SIMCA e do método asterbiochem.

Aos professores Dr. Paulo César de Lima Nogueira, Dra. Lisiane dos Santos Freitas, Dra. Samísia Maria Fernandes Machado e Dr. Sandro Navickiene Pelos auxílios com equipamentos e usos de laboratórios em grandes momentos oportunos.

Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários e ao grupo de pesquisa Petroleum and Energy from Biomass (PEB) pelo uso de equipamentos para realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr.Tiago Branquinho Oliveira pela orientações, apoio e contribuições que foram muito relevantes para realização desse trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Alimentos e Bebidas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe.

Aos amigos e colegas pelos momentos de descontração, companheirismo e colaboração.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -	Beta
CG -	Cromatografia Gasosa
CG-EM -	Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massas
CL -	Cromatografia Líquida
DMSO -	Dimetilsulfóxido
EM -	Espectrometria de Massas
GPS -	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de Posicionamento Global)
HCA -	<i>Hierarchical Analysis</i>
HRMS -	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
LRMS/MS	<i>Low-resolution tandem mass spectrometry</i>
MTT -	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-3-H-brometo de tetrazolium
m/z -	Razão massa/carga
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>
PCA -	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS -	<i>Partial Least Squares</i>
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
SIMCA -	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogies</i>
UFS -	Universidade Federal de Sergipe
δ -	Delta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tratamentos de dados de todos os extratos obtidos por espectrometria de massas no software MZmine. Esse tratamento inclui-se eliminação de isótopos, alinhamento, preenchimento dos espaços vazios e subtração com o branco. **21**

Figura 2 - Gráfico de scores da análise estatística supervisionada OPLS-DA dos extratos de 24 amostras de plantas referente ao modo positivo, na contração de 1000 µg/mL. Destacando-se em verde espécies pertencentes ao grupo Não tóxicos (G1) e em azul espécies pertencente ao grupo tóxicos (G2). R^2X : 0,263; R^2Y : 1,0; Q^2 : 0,301. **22**

Figura 3 - Gráfico S-plot modo negativo obtidos por OPLS-DA. Em vermelho as substâncias não tóxicas e em amarelo substâncias que apresentam uma maior correlação com atividade citotóxica. **23**

Figura 4 - Gráfico de scores da análise estatística supervisionada OPLS-DA dos extratos de 24 amostras de plantas referente ao modo negativo, na contração de 1000 µg/mL. Destacando-se em verde espécies pertencentes ao grupo Não tóxicos (G1) e em azul espécies pertencente ao grupo tóxicos (G2). R^2X : 0,334; R^2Y : 1,0; Q^2 : 0,258. **25**

Figura 5 - Gráfico S-plot modo negativo obtidos por OPLS-DA. Em vermelho as substâncias não tóxicas e em amarelo substâncias que apresentam uma maior correlação citotóxica. **25**

Figura 6 - Árvore de decisão J48 no modo positivo, obtida no software Weka na contração de 1000µg/mL **27**

Figura 7 - Árvore de decisão J48 no modo positivo, obtida no software Weka na contração de 100µg/mL. **27**

Figura 8 - Árvore de decisão J48 no modo negativo, obtida no software Weka na contração de 1000ug/mL. **28**

Figura 9 - Árvore de decisão J48 no modo negativo, obtida no software Weka na contração de 100ug/mL. **28**

Figura 10 - Árvore de decisão J48 no modo positivo, obtida no software Weka e correlacionada ao ensaio DPPH. **30**

Figura 11 - Árvore de decisão *J48* no modo negativo, obtida no software Weka e correlacionada ao ensaio DPPH. **30**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de PANCs coletadas no estado de Sergipe.	17
Tabela 2 - Atividade antioxidante de 20 PANCs do estado de Sergipe de acordo com o método de eliminação de radical DPPH.	18
Tabela 3 - Viabilidade celular de 20 espécies de PANCs do estado de Sergipe de acordo com o ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.	19
Tabela 4 - Tabela com as substâncias putativamente identificadas no banco de dados do DNP.	24
Tabela 5 - Tabela com as substâncias putativamente identificadas com o banco de dados do DNP.	26
Tabela 6 - Substâncias determinadas pela árvore de decisão <i>j48</i> como variáveis importante para explicar a citotoxicidade dos extratos, tanto para o modo negativo, quanto para o modo positivo, nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL.	29
Tabela 7 - Possíveis substâncias potencialmente antioxidantes correlacionadas com árvore de decisão <i>j48</i> para o ensaio DPPH.	31

1. INTRODUÇÃO

A flora é uma importante fonte de recursos naturais que pode ser aproveitada para a longevidade da humanidade. Dessa forma, as plantas por sua vez apresentam um potencial a ser explorado, isso devido produzirem metabólitos secundários que são substâncias responsáveis por protege-las da ação de herbívoros, patógenos e variação de temperatura, além de conferirem odores, gostos e cores específicas às espécies. Os metabólitos secundários das plantas apresentam várias classes de substâncias, como cumarinas, flavonoides, terpenos, taninos, alcaloides, etc [5-10]. Um uso comum e popular das plantas é o medicinal, apresentando várias abordagens, dentre as quais são dignas de citação a obtenção de óleos essenciais, a obtenção de extratos vegetais, o isolamento e identificação de novas substâncias bioativas com efeito antibacteriano, citotóxico, antioxidante, etc. [11-12].

As plantas no Brasil ganham destaque na agricultura, especificamente as espécies de uso alimentício, sendo uma rica fonte de nutrientes como vitaminas, sais minerais, aminoácidos, dentre outros. Dessa forma, alimentos como feijão, arroz e milho, por exemplo, são importantes fontes nutricionais entre os alimentos convencionais [13-15]. Segundo Kinupp e Barros, [17] as plantas alimentícias são espécies que possuem uma ou mais partes que podem ser inseridas na dieta alimentar do ser humano, podendo assim fornecer raízes, tubérculos, folhas, brotos, talos, flores, frutos, sementes, rizomas, dentre outras formas comestíveis. Concomitantemente aos alimentos convencionais, estão as PANCs (Plantas Alimentícias Não Convencionais) que são plantas pouco consumidas, ou consumidas por uma pequena parcela de pessoas, ou por um pequeno grupo, que não são produzidas em larga escala [15]. São plantas que em muitos casos estão disponíveis para o homem e muitas vezes chamadas de “mato” ou planta do mato, são acessíveis, porém pouco consumida na salada, refogada e/ou cozida [16-17].

Dessa forma o estudo de espécies vegetais é muito relevante para o ser humano, não só do ponto de vista medicinal, mas também comestível, por isso

diversas abordagens vem sendo desenvolvidas pela comunidade científica, dentre elas estão os estudos metabolômicos. Os estudos metabolômicos consistem nos estudos dos metabólitos que foram produzidos ou modificados por um organismo [18]. Uma das diversas abordagens dos estudos metabolômicos é o uso técnicas analíticas hifenadas em conjunção com análises de dados multivariadas com objetivo de correlacionar os metabólitos a alguma propriedade biológica [18-19].

O presente trabalho busca avaliar o potencial metabolômico de muitas PANCs do estado de Sergipe, com base em um levantamento de espécies vegetais realizado por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Análises de Alimentos e Bebidas do Departamento de Farmácia da UFS), além de corroborar para investigação de pesquisas futuras relacionadas a uma alimentação baseada no consumo de plantas não convencionais.

1.1 Plantas Alimentícias Não Convencionais

As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) são as vezes inexplorada comercial e economicamente, em muitos casos tratadas como invasoras das lavouras, o seu consumo por sua vez pouco utilizada por parte da população [17; 20]. Existem casos em que as plantas são convencionais, entretanto algumas partes delas não as são, por exemplo, a batata doce possui folhas comestíveis na Ásia, o mamão verde e seu talo também, além das flores e os brotos da abóbora [16].

Na natureza existem diversas PANCs, dentre elas estão, por exemplo, *Talinum paniculatum* (conhecida como major gomes, maria-gorda ou língua-de-vaca), *Basella alba* (conhecida como bertalha), *Chenopodium ambrosioides* (mastruz), *Acanthospermum hispidum* (carrapicho-de-carneiro) e *Cajanus cajan* (Feijão Guando) [21-23]. De igual modo a espécie *Pachira aquatica* Aublet, conhecida como monguba é uma PANC, onde os seus frutos possuem sementes comestíveis que são muito consumidas na região amazônica no Brasil. Os frutos de Monguba

podem ser consumidos torrados, crus, assados, cozidos e transformados em farinhas [24].

Ainda sobre as PANCs, existe uma espécie, *Moringa oleífera*, que se destaca por seus diversos usos populares, farmacológicos e gerais [25-28]. No Brasil por exemplo, existe um congresso nacional específico para esta espécie (Encontro Nacional de Moringa - ENAM), que engloba várias linhas temáticas como produção agrícola, produção de óleo e biodiesel, farmacologia, tratamento de água e outros mais [29]. A parte da espécie *Moringa oleífera* mais usada para nutrição humana e animal são as folhas e estas podem ser consumidas cruas ou secas [30].

As PANCs, são espécies que estão inerentemente associadas a dieta nutricional de regiões ou comunidades com limitações de obter alimentos industriais, logo são muito importantes para subsidiar a alimentação, especificamente de populações em desenvolvimento. A literatura aponta que as plantas ‘silvestres comestíveis’ são fontes ricas de metabólitos secundários o que as tornam potenciais notáveis a saúde humana [31]. Estudos metabolômicos, por exemplo, realizados com a espécie *Portulaca oleraceae* (Beldroega) que possui como partes comestíveis ramos, folhas e flores [32], indicaram um total de 85 metabólitos identificados, incluindo 6 aminoácidos, 22 compostos fenólicos, 16 alcaloides e 11 ácidos graxos [33].

1.2 Estudos Metabolômicos

Há muito tempo se estuda os metabólitos em organismos, Nicholson [34], descreve pela primeira vez o termo Metaboloma relacionando-o, a identificação e quantificação integrativa de metabólitos presentes em um sistema biológico em processo fisiopatológico. Segundo Fiehn, [35], qualquer tendência que exclua uma classe de substâncias deve ser rejeitada em metabolômica, visto que esse novo termo deve de forma abrangente e ampla determinar a maior quantidade compostos possíveis.

O metaboloma consiste no conjunto de todos os metabolitos de baixo peso molecular (menor que 1000 Da), produzidos ou sintetizados por um organismo. O metaboloma engloba a maior variedade de substâncias, por exemplo, espécies iônicas, carboidratos hidrofílicos, álcoois, cetonas, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos hidrofóbicos e produtos naturais complexos. Tendo em vista a grande complexidade de se analisar todos os possíveis metabolitos de um organismo, e de que exista uma técnica analítica suficiente para tal investidura, a metabolômica é a nova área da ciência que permite a identificação de todos os metabolitos sintetizados ou produzidos por plantas, microrganismos ou animais de forma qualitativa e quantitativamente. Diante da complexidade da matriz celular de uma planta, por exemplo, dos diferentes metabolitos que esta possui e das técnicas analíticas que existem, isso é relativamente aplicável [36].

A metabolômica é uma área de pesquisa que vem crescendo muito neste século, o número de trabalhos científicos já publicados e disponíveis na literatura são dados que atestam essa veracidade [37]. As pesquisas em metabolômica envolvem os mais diversos enfoques como identificação de biomarcadores em doenças, autenticidade de amostras conforme origem geográfica, discriminação de impressões digitais entre queijos, Identificação de substâncias químicas em plantas que apresentem efeito farmacológico, dentre outros. [38-41].

Diante do crescimento de pesquisas em metabolômica, o Grupo de Trabalho de Análise Química (do inglês, *Chemical Analysis Working Group* - CAWG), reúne pesquisadores em metabolômica com objetivo de elaborarem protocolos e/ou procedimentos operacionais padrões que permitam aprimorar e desenvolver um consenso nessa área de estudo para melhores práticas de análise química. Este grupo traz uma abordagem das diversas etapas que inclui os estudos em metabolômica, discutindo os padrões quanto a preparação de amostras, análise experimental, desempenho instrumental, validação de métodos, identificação de metabolitos e pré-processamento de dados [42].

1.2.1 Preparo de Amostra

Deve-se ter muito cuidado quanto a preparação de amostras em metabolômica, tendo como critério inicial a interrupção instantânea do metabolismo (do inglês *queching metabolic*). Essa interrupção pode ocorrer de várias formas, por exemplo, tratar a amostra com metanol frio (-40°C), realizando variações de pH e/ou baixando bruscamente a temperatura com nitrogênio líquido. Depois de preparadas e devidamente armazenadas, as amostras passam pelo processo de extração e concentração que precisam ser bem cuidadosos para evitar perdas de metabolitos e extrair a maior quantidade de substâncias intra e extracelulares possíveis [21, 43]. Além da interrupção do metabolismo, vale destacar outros pontos interessantes como o processamento dos tecidos, a coleta do material e a forma como todo o material é armazenado, por exemplo, liofilização, uso de luvas e em ultrafreezers respectivamente [42].

Seguindo essa linha de preparo das amostras Creydt, M, [44] coletou caules de *Asparagus officinalis*, congelou em nitrogênio líquido e armazenou a -80°C . Da mesma forma Cadahía, E, et al [45] coletou 30 folhas de 10 mudas de *Fagus sylvatica* L., imergiu-as em nitrogênio, armazenou a -80°C , liofilizou e como processo final armazenou em atmosfera seca e escura até a extração. O nitrogênio líquido e o metanol frio é uma das técnicas mais utilizadas no preparo de amostras para estudos metabolômicos [36; 46].

1.2.2 Métodos de extração

Após coletadas, secas e armazenadas as amostras passam por algum processo de moagem que diminui o tamanho de partícula do vegetal e torna o mesmo mais acessível para o processo de extração. Diversas técnicas podem ser utilizadas em metabolômica, entre as técnicas mais apropriadas estão a extração assistida por micro-ondas, extração em fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, extração em fase sólida e soxhlet (menos apropriada) [46].

Outrossim, diferentemente da fitoquímica tradicional que muitas vezes requer uma pré-seleção ou pré-concepção das amostras investigadas antes de realizar qualquer extração, os estudos em metabolômica permitem de maneira eficiente extrair e mensurar os metabólitos primários e secundários de plantas, além de predizer possíveis características biológicas sem se quer realizar demorados trabalhos de bancada e gasto com solventes. Apesar disso tudo, hoje não existe uma técnica extrativa que possa evitar perdas ou conversões totais de metabólitos durante o processo, logo é necessário desenvolver protocolos, procedimentos e abordagens que evitem a menor quantidade perdas possíveis e consequentemente uma melhor capacidade extrativa [47-48].

Assim sendo, Chagas-Paula [49] equipara a extração assistida por ultrassom com a extração por maceração em agitador, das espécies *Tithonia diversifolia* e *Vigueira gardneri*, chegando a conclusão que a extração por maceração em agitador foi a melhor para o estudo metabolômico, visto que conseguiu obter a maior quantidade de metabólitos que a extração assistida por ultrassom.

Sobre as técnicas de extração, particularmente a extração em fase sólida (SPE) das folhas de *Vitis vinifera* L., Maia [50], desenvolveu uma metodologia para metabolômica não direcionada, chegando a conclusão que esse método foi adequado, visto que permitiu encontrar um maior número de compostos polares e não polares, cobrindo todas as principais classes de metabólitos secundários.

1.2.3 Métodos de análise de dados

Estudos metabolômicos envolve duas abordagens de análise de dados, sendo as abordagens direcionadas e não direcionadas (do inglês, *target* e *untarget*, respectivamente). O estudo direcionado ou metabolômica alvo, envolve um grupo pré-definido de substâncias bioquimicamente estudados e caracterizados, que estão presentes em bancos de dados. Paralelamente, o estudo metabolômico não direcionado, não se restringe a um grupo de compostos alvos, não requer um conhecimento inicial da amostra, permite a análise de todos os metabólitos

mensuráveis sem necessariamente estarem caracterizados. No entanto, conforme a metabolômica avança, com desenvolvimento de técnicas analíticas mais sofisticadas, pode ocorrer a junção dessas duas abordagens [46].

As técnicas de análises mais empregadas em metabolômica são a ressonância magnética nuclear (NMR) e a espectrometria de massa (MS). Com relação a espectrometria de massas, geralmente estão acopladas a técnicas de separação como cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC). A metabolômica alvo, utiliza comumente uma instrumentação mais específica como a espectrometria de massas de baixa resolução em tandem (LRMS/MS), entretanto, a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) também tem encontrado aplicação. Com relação a metabolômica não alvo, são mais aplicados a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) [35 - 36; 43, 46, 51].

Apesar da MS oferecer dados mais confiáveis quando combinado com, por exemplo separações cromatográficas, o uso da espectrometria de massa sem a necessidade de acoplamento a outras técnicas é uma abordagem útil para estudos metabolômicos. A infusão direta (DIMS) em espectrometria de massas, tem como vantagens a análise dos metabólitos presentes nos extratos em um curto período de tempo e um aumento significativo no rendimento em relação a um acoplamento como LC-MS. A análise por infusão direta, geralmente vem sendo usada para obtenção de impressões digitais (*fingerprints*) e não para desreplicação e identificação abrangente de metabólitos. As fontes de ionização comumente utilizada em DIMS são ionização por Eletrospray (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Com relação a aplicação destas duas fontes, a ESI é preferível para compostos bastante polares ou iônicos, termolábeis ou com massa molar elevada ($1000 > \text{Da}$), enquanto que a APCI geralmente apresentará melhores resultados para compostos pouco polares e de polaridades intermediárias. Além da fonte de ionização, analisadores de massas também compõe a instrumentação DIMS, sendo estes responsáveis por separar os íons de acordo com suas relações m/z . Dentre os

analísadores estão tempo de voo (TOF), orbitrap e ressonância ciclôtrônica de íons com transformação de Fourier - FTICR [52-53].

No que se refere ao emprego da espectrometria de massas por infusão direta, a instrumentação DIMS/MS foi capaz de classificar espécies do gênero *Panax* e identificar quatro marcadores químicos presentes em quatro espécies em estudo [54]. De igual modo, utilizando-se DIMS e equiparando com DIMS/MS foi possível discriminar amostras de arroz branco da Coreia e China, além de contribuir para o controle de qualidade de arroz branco [55].

1.2.4 Métodos de tratamentos de dados

Após a análise das amostras, há a necessidade de transformar os dados em informações interpretáveis, isso é feito através de modelos estatísticos. Esses modelos podem buscar identificar a maior quantidade de metabolitos, agrupar e classificar semelhanças ou diferenças químicas, correlacionar a composição química com alguma propriedade biológica, dentre outras aplicações. Dessa forma empregando-se análise de dados multivariados, por exemplo, PCA (*Principal Component Analysis*), SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogies*), PLS (*Partial Least Squares*), OPLS (orthogonal projection to latent structures), HCA (*Hierarchical cluster analysis*) e árvore de decisão (decision tree), é possível identificar as diferenças no perfil químico das amostras, bem como inferir correlações biológicas [44; 56- 57]

O PCA é um método de análise multivariada não supervisionado que busca discriminar as características das amostras, muito utilizado em análises de fingerprinting metabolomic [58 - 60], sendo uma excelente ferramenta quilométrica [61]. A árvore de decisão (do inglês, *decision tree*) é outro método que pode ser usado com objetivo classificatório entre amostras, baseando-se no algoritmo J48 [62]. O OPLS-DA também é um método muito eficiente quanto a análise de discriminantes preditivos para estudos metabolômicos. Este por sua vez é uma extensão do PLS, sendo o que OPLS-DA tem como vantagem ser mais facilmente

explicável no que tange as correlações preditivas entre componentes e alvos [63-64].

1.3 Atividade citotóxica

A citotoxicidade é realizada através de testes que buscam avaliar o crescimento, a reprodução e a morfologia celular. Os testes citotóxicos nada mais são do que testes prévios, simples, rápidos e sensíveis que conseguem identificar a toxicidade e salvar os animais da mesma [65]. Entre os testes citotóxicos mais comumente utilizados para detectar a taxa de crescimento celular, está o método MTT, que é um método barato e reprodutível, além de conseguir testar uma ampla variedade de microrganismos sem necessita de um leitor de microplacas [66].

O método MTT se mostrou eficiente quando usado no trabalho de [66], visto que, foi possível detectar as interações entre compostos (carvacrol, eugenol, cinamaldeído, timol, eucaliptol) e bactérias (*Escherichia coli* e *Listeria innocua*) de forma simples e prática. Em outro trabalho [67] avaliou o teste MTT em células de fibroblastos pulmonares e concluiu que as substâncias 8-hidroxiquinolina, timoquinona e eugenol apresentaram as menores taxas de citotoxicidade, o que foi possível constatar que o ensaio é rápido e prático.

1.4 Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e outros radicais livres ocorrem nas células podendo ocasionar reações em cadeia e danificar moléculas vitais para o ser humano [68]. Dessa forma os radicais livres causam um estresse oxidativo, o qual gera um desequilíbrio entre as moléculas e podem estar relacionados a doenças como Parkinson, Esclerose Lateral, Huntington, Alzheimer, gastrointestinais, etc [69-71].

Os radicais livres, como já visto, quando em altas concentrações impactam prejudicialmente sobre humanos. Em virtude disso, busca-se constantemente

compreender o mecanismo dos radicais livres e desvendar substâncias (antioxidantes) capazes de protegerem o organismo do estresse oxidativo [72]. Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos se destacam como muito importantes economicamente para a indústria de petróleo, alguns são usados no processamento de alimentos, como é o caso do TBHQ (terc-butil-hidroquinona) usado para floração, sabor, importância nutricional e cor do produto alimentar [73]. Apesar de sua relevância comercial, muitos antioxidantes sintéticos são considerados danosos ao ser humano, por exemplo, o BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e o BHT (2,6-diterc-butil-p-creso) que são substâncias muito utilizadas nos alimentos, porém avaliados como possivelmente cancerígenos pela agência internacional para pesquisa do câncer, uma agência parceira da OMS (organização mundial de Saúde) [72-74]. Por outro lado, os antioxidantes naturais surgem como uma alternativa aos sintéticos [75]. Os antioxidantes naturais são substâncias obtidas em sua maioria das plantas, consistindo em extratos de misturas complexas compreendendo uma diversidade de compostos como fenóis, polifenóis, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, flavonóides, aminoácidos e aminas [76]. Antioxidantes naturais, também apresentam uma grande foco para indústria alimentícia, pesquisas enfatizam a importância da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) como aditivo alimentar e contribuinte para hábitos saudáveis [75-76]. De igual modo o kiwi e o bambu são plantas com um relevante potencial antioxidante, podendo ser utilizadas como aditivos alimentares de carnes e peixes, respectivamente [76-77].

Vários métodos antioxidantes *in vitro* foram desenvolvidos com objetivo de descobrir novos fármacos, avaliar o potencial antioxidante, determinar a presença de antioxidantes em frutas, legumes e bebidas, desvendar os diferentes mecanismos dos radicais livres que apresentam diversas formas de atuação, contudo não existe um método universal, mais sim um conjunto de métodos que apresentam sua especificidade [78]. Dentre os métodos mencionados na literatura pode-se citar o método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, método ABTS

(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico), ensaio do poder redutor férrico (FRAP), o sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), e outros [79-81].

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver um estudo metabolômico não direcionado por espectrometria de massa de espécies de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs), avaliar a citotoxicidade e atividade antioxidante dos extratos vegetais, bem como correlacionar estas propriedades biológicas a possíveis substâncias através de métodos *in silico*.

2.2 Específico

- Coletar e obter extratos hidroalcoólicos de PANCs com base em um levantamento de espécies realizado pelo grupo Laboratório de Análises de Alimentos e Bebidas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe.
- Analisar a composição química dos extratos hidroalcoólicos de plantas por Orbitrap-MS.
- Avaliar o efeito citotóxico e antioxidante de várias (PANCs).
- Identificar os picos com base no banco de dados DNP

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

- Balança analítica - modelo APX-200 da marca Denver Instrument Company.
- Liofilizador da marca Liotop - modelo L101.
- Evaporador rotatório da marca BUCHI (modelo R-3), acoplado a uma bomba de vácuo da mesma marca (modelo V-700); com um sistema de refrigeração da marca Microquímica Equipamentos Ltda (modelo MQBTC99-20).
- Centrífuga Excelsa® II - modelo 206 BL

- Ultrafreezer da marca Thermo Scientific- modelo 700 series
- Ultrafreezer da marca Sanyo – modelo MDF-U53VC
- Banho de ultrassom da marca Unique - modelo Ultracleaner1600A
- Microplacas 96 poços Kasvi
- Orbitrap-MS-ESI Exactive HCD Plus (Thermo Scientific, Bremen, Germany).
- Leitor de microplacas, Synergy H1, Biotek

3.2 Coleta do material botânico

O material botânico *in natura* (folhas, flores, caule, raiz ou frutos) foi coletado em quatro regiões do estado de Sergipe como Ilha Men de Sá (Itaporanga d'Ajuda), Campus Rural (São Cristóvão), Sítio Coitezeira (Nossa Senhora das Dores) e no Campus da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão), entre os meses de agosto a novembro de 2018. A exsicata de 01 espécie foi depositada pelo autor no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE), sob número de registro 40841 (*Bidens pilosa* L.). Demais, 19 espécies neste trabalho estudadas foram coletadas e depositadas no mesmo herbário por membros do Laboratório de Alimentos e Bebidas do departamento de farmácia da UFS. Após coleta, as partes botânicas de cada espécie foram armazenadas em sacos com fecho hermético e reservadas em dois ultrafreezer (marca Thermo Scientific, 700 series; marca Sanyo, MDF-U53VC, a temperatura de -80 °C).

Com todas as amostras coletadas foi realizada a maceração *in natura* com Grau e Pistilo Inox (material inerte), vertendo nitrogênio líquido armazenado em garrafa térmica sobre o grau e triturando o material botânico até formar um pó, logo após foram transferidos para microtubos de 10 mL (Kasvi) e armazenados em ultrafreezers (Thermo Scientific, 700 series; marca Sanyo, MDF-U53VC, a temperatura de -80 °C). Em seguida, as amostras foram liofilizadas em liofilizador (Liotop modelo L101) a temperatura de -60 °C e pressão de 7 µmHg e novamente

armazenadas em ultrafreezer (marca Sanyo, MDF-U53VC, a temperatura de -80°C).

3.3 Extração ultrassom

Cerca de 20 mg do pó de cada planta foi dissolvido em 2 mL de solução etanol/água (7/3). A sonicação foi realizada em tubos Falcon® de 15 mL, por 15 min em banho de limpeza ultra-sônica (Unique, modelo Ultracleaner1600A), utilizando gelo a temperatura foi controlada a 20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Os extratos foram centrifugados em 3600 rpm por 20 min (Centrífuga Excelsa® II modelo 206 BL). O sobrenadante foi recolhido com pipeta automática e transferido para microtubos (Kasvi) de 5 mL. De posse do extrato hidroalcoólico, o solvente orgânico foi removido em aparelhagem com conexão e tubos de ensaios específicos, conectados ao evaporador rotatório operando em pressão reduzida (marca BUCHI, modelo R-3). Por último, os extratos aquosos foram armazenados em ultrafreezer (marca Sanyo, MDF-U53VC, a temperatura de -80°C), e posteriormente liofilizadas por 96 horas em equipamento (Liotop modelo L101) e determinou-se os rendimentos. Os extratos foram obtidos em sextuplicatas e depois de secos foram ressuspensos em solução etanol/água 7/3 e feito um pool dos extratos para posteriores análise por espectrometria de massas, ensaios citotóxicos e antioxidantes.

3.4 Análise de massas por Orbitrap-MS

As amostras foram analisadas em um sistema Exactive HCD Plus (Thermo Scientific, Bremen, Germany), por infusão direta utilizando uma seringa de 500 μL (Thermo Scientific, NJ, EUA) na faixa de massa de 100 a 1200 Da para os modos positivo e negativo, a um fluxo de $35 \mu\text{L min}^{-1}$. A fonte de ionização utilizada foi o *Electrospray* Aquecido (HESI). As amostras foram dissolvidas em etanol/água (7/3) produzindo um solução de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, As condições de análise para o modo ESI(+)

e ESI (-) foram: voltagem do spray de +3,2 kV (modo positivo) e -3,6kV (modo negativo), aquecimento da região de vaporização a 100 °C, temperatura capilar de 300 °C, *sheath gas* 30 u.a. (ambos os modos), gás auxiliar em 10 u.a (ambos os modos) e S-Lens a 55 (ambos os modos). As análises foram realizadas seguindo o método da astebiochem.org com algumas modificações.

3.5 Ensaio de radicais DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH·, foi utilizada a metodologia descrita por Brand-Williams [82] e Couto et al [83], com algumas modificações. Alíquotas de 50 µL cada, contendo o extrato etanol/água 7/3 na concentração de 1 mg / mL foram adicionadas em microplaca (96 poços - Kasvi), em seguida foram adicionados 150 µL de solução metanólica do radical DPPH (0,6 mM), diluída previamente em metanol até atingir absorvância entre 0,6 a 0,7 nm. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min com posterior leitura (leitor de microplacas, Synergy H1, Biotek) de absorvância a 515 nm. Para este procedimento experimental foi utilizado como controle negativo a solução de etanol/água 7/3, e como controle positivo o Trolox (100 µg/mL). A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de varredura do radical DPPH, onde o decréscimo nos valores de absorvância das amostras foi correlacionado com a absorvância do controle, e o percentual de varredura do radical DPPH foi expresso utilizando a seguinte equação:

$$(1) \quad \% \text{ de varredura do radical DPPH} = \left[\frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \right] \times 100$$

Onde Abs controle é a absorvância do branco, e a Abs amostra é a absorvância dos extratos. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.6 Ensaio Citotóxico

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pela medida de viabilidade determinada por ensaio de MTT como descrito em ISO 10993-5 (2009), com modificações. Fibroblastos L929 (2 x 10⁴ céls/poço) foram adicionados em placas de 96 poços e mantidos em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 24 h. Após esse período, a cultura foi tratada com os extratos nas concentrações finais de 31,25 a 500 µg/mL e novamente incubados nas condições anteriores por mais 24 h. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS, adicionando a cada poço 200 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich) e incubadas por um período de 3 h. Finalizando o tempo de incubação, o MTT foi aspirado e os cristais de formazan solubilizados com 200 µL DMSO (Sigma-Aldrich). A densidade óptica foi mensurada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata de dois experimentos independentes e os resultados expressos em percentual de viabilidade conforme seguinte equação: %Viabilidade = (OD570 poços experimentais/OD570 poços controle não tratado) x 100.

3.7 Análises *in silico*

Com os dados metabolômicos obtidos por espectrometria de massas e com o uso do software MZmine 2.41.2 (MZmine development team) foi possível realizar os testes *in silico*. Os gráficos de íons totais dos diferentes extratos tiveram seus isótopos eliminados, picos idênticos para cada extrato foram alinhados e espaços vazios preenchidos. Por fim realizou-se uma subtração dos íons totais com o branco, eliminando assim possíveis interferências ou ruídos que não eram propriamente dos extratos. Depois de obtidos os dados prosseguiu-se a desreplicação com o próprio software MZmine, utilizando-se banco de dados abrangentes do DNP.

Após o pré-tratamento de dados no MZmine (exportou-se os dados em .csv) e realizou-se outros tratamentos agora no software R como escalar/centralizar na média e um filtro com o pacote caret para eliminação dos atributos - variáveis X-

com mínima ou nula variação entre as amostras. De posse das atividades biológicas e dados metabolômicos previamente tratados foi possível conduzir as análises multivariadas como árvore de decisão (do inglês, *decision tree*) e as análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (do inglês, *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis* - OPLS-DA), utilizando os softwares Weka 3.8.3 (Universidade de Waikato) e Simca 16 (Unmetrics) respectivamente.

A busca de substâncias químicas que tivessem correlações com as propriedades biológicas utilizando o Weka, ocorreu usando uma normalização supervisionada e o algoritmo classificatório *J48*. Já para as análises estatísticas OPLS-DA seguiu-se o padrão do próprio software utilizando normalização UVar (unit variance) e Pareto. Foi considerado o modelo que apresentasse um melhor R^2X e Q^2 , sendo que para estudos metabolômicos o mais confiável $R^2X > 0,7$ e $Q^2 > 0,5$. Os parâmetros R^2X descreve o ajuste do modelo, já o Q^2 descreve a predição correlacionada com y . Vale aqui lembrar que todas as análises estatísticas foram realizadas para o modo positivo e negativo separadamente e que os mesmos grupos e fonte de dados foram usados, tanto no Weka, quanto no Simca 16.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espécies e locais de coleta

É possível observar (tabela 1), a grande complexidade dos extratos em estudo, tendo em vista que são 20 espécies distribuídas em 19 gêneros e 13 famílias de plantas. Todas essas espécies são PANCs e fazem parte da culinária local de comunidades do estado de Sergipe.

O cuidado com as amostras para obtenção dos extratos vegetais foi criterioso, desde o armazenamento, maceração em nitrogênio líquido até a extração assistida por ultrassom a baixa temperatura, sendo esses critérios relevantes para estudos metabolômicos [84-87]. Todavia, nesse trabalho foi possível observar que, as espécies *Tithonia rotundifolia* (55,62%) e *Mirabilis jalapa* L. (49,76%) são as que

mais apresentaram um rendimento representativo em relação a extração assistida por ultrassom de outras espécies investigadas, Tabela (1).

Tabela 1 - Espécies de PANCs coletadas no estado de Sergipe

Família Botânica	Espécie	Localização das Coletas	Rendimento Médio%
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L.	S 10°55'25.6" W 037°12'00.3" 1m ^A	32,74\folhas, 23,05\raízes, 31,41\flores
	<i>Tithonia rotundifolia</i>	-11° 6' 12,05"S -37° 12' 9,80"W ^B	55,62
Amaranthaceae	<i>Amaranthus deflexus</i> L.	-11°3',39,67"S -37°7'29,68"W ^B	36,10
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill	-11° 6' 12,05"S -37° 12' 49,80"W ^B	33,83
Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i> (L.)	-11°3'39,67"S -37°7'29,68"W ^B	27,06 roxa; 22,21 branca
Crassulaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i>	-11° 6' 12,05"S 37° 12' 49,80"W ^B	38,09
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne	-11° 6' 12,56"S -37° 12' 57,07"W ^B	24,57
Fabaceae	<i>Tamarindus indica</i> L.	-11° 6' 11,98"S -37° 12' 50,23"W ^B	27,90
	<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.	-11° 6' 12,09"S -37° 12' 56,41"W ^B	28,58
	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	-11° 6' 12,05"S -37° 12' 49,80"W ^B	49,76
	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	10° 31' 03,0"S 37° 11' 05,5"W ^C	35,23
Moringaceae	<i>Moringa oleifera</i> Lam	-11° 6' 12,05"S -37° 12' 49,80"W ^B	33,20
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> L.	-11° 6' 11,98"S -37° 12' 50,23"W ^B	31,64
Portulacaceae	<i>Portulaca oleraceae</i> L.	-11° 6' 7,22"S -37° 12' 53,13"W ^B	31,56
	<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	-11° 6' 7,22"S -37° 12' 53,13"W ^B	30,36\branca 29,40\rosa
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	-11° 6' 12,05"S -37° 12' 49,80"W ^B	36,76
	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.)	-11° 6' 12,05"S -37° 12' 49,80"W ^B	27,26

	<i>Pachira aquatica</i> Aubl	-11° 6' 7,22"S -37° 12'53,13"W ^B	23,37
Basellaceae	<i>Basella rubra</i> L.	-11° 6'11,98"S -37° 2'50,23"W ^B	24,18
Arecaceae	<i>Syagrus coronata</i> (Mart.)	11° 6' 7, 22"S -37° 12'53,13"W ^B	33,26

^A Espécie coletada no Campus Rural, ^B espécies coletadas na Ilha Mem de Sá e ^C espécie coletada no sítio Coitezeira. Espécies coletadas na Ilha Mem de Sá foram depositadas no Herbário da UFS-ASE por Iraê O. Moura. Espécies coletadas no Sítio Coitezeira, foram depositadas no Herbário da UFS-ASE por Ayres R. Santos. Espécies coletadas no Campus Rural foram depositadas pelo próprio autor no ASE.

4.2 Ensaio antioxidante pelo método DPPH

O método antioxidante realizado revelou diferentes capacidades de eliminação do radical DPPH dos 24 extratos das 20 PANCs em estudo. Dentre as espécies que mais apresentaram um potencial antioxidante, destacam-se *Kalanchoe pinnata* (9), *Mirabilis jalapa* (13), *Psidium guajava* L.(16) e *Basella rubra* L. (23) demonstrando uma inibição do radical DPPD superior a 70%. Entretanto algumas espécies apresentaram uma menor eficácia quanto a atividade antioxidante, é o caso da *Bidens pilosa* L. (raiz) (2), *Amaranthus deflexus* L (5), e *Prosopis juliflora* (12).

Tabela 2 - Atividade antioxidante de 20 PANCs do estado de Sergipe de acordo com o método de eliminação de radical DPPH.

Espécie	Experimentos em duplicatas		Inibição DPPH (%)
<i>Bidens Pilosa</i> (folhas)	46,11	48,95	47,53 ± 2,01
<i>Bidens Pilosa</i> (raízes)	11,98	5,44	8,71 ± 4,63
<i>Bidens Pilosa</i> (flores)	15,57	14,03	14,80 ± 1,09
<i>Tithonia rotundifolia</i>	34,46	38,28	36,37 ± 2,71
<i>Amaranthus deflexus</i>	10,33	9,21	9,77 ± 0,80
<i>Opuntia ficus-indica</i>	12,97	12,87	12,92 ± 0,07
<i>Ipomoea batatas</i> (Roxa)	69,66	60,88	65,27 ± 6,21
<i>Ipomoea batatas</i> (Branca)	55,65	52,69	54,17 ± 2,09
<i>Kalanchoe pinnata</i>	82,38	83,26	82,82 ± 0,62
<i>Cucurbita moschata</i>	65,07	63,18	64,12 ± 1,34

<i>Tamarindus indica</i>	62,87	60,08	61,48 ± 1,98
<i>Prosopis juliflora</i>	11,57	1,48	6,52 ± 7,14
<i>Mirabilis jalapa</i>	75,75	77,53	76,64 ± 1,26
<i>Pharseoulus lunatus</i>	59,68	53,97	56,83 ± 4,03
<i>Moringa oleífera</i>	52,30	56,20	54,25 ± 2,76
<i>Psidium guajava</i>	78,74	79,50	79,12 ± 0,53
<i>Portulaca oleraceae</i>	28,94	25,91	27,42 ± 2,15
<i>Portulaca grandiflora</i> (Branca)	28,74	24,09	26,42 ± 3,29
<i>Portulaca grandiflora</i> (Rosa)	54,79	54,29	54,54 ± 0,35
<i>Lycopersicon esculentum</i>	62,67	59,83	61,25 ± 2,01
<i>Abelmoschus esculentus</i>	21,90	21,10	21,50 ± 0,57
<i>Pachira aquática</i>	30,14	29,50	29,82 ± 0,45
<i>Basella rubra</i>	76,45	71,76	74,10 ± 3,31
<i>Syagrus coronata</i>	16,94	15,43	16,19 ± 1,07

4.3 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método MTT

O ensaio realizado pelo método MTT frente a linhagem de células L929 (fibroblastos de camundongo) teve como objetivo avaliar a possível citotoxicidade dos extratos etanol/água das 20 espécies de plantas investigadas, Tabela 1, nas concentrações de 100 µg/mL e 1000 µg/mL. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade os quais estão descritos na Tabela 3.

Segundo a ISO 10993-5 os extratos que reduzem a viabilidade abaixo de 70% são considerados potencialmente citotóxicos, logo os extratos que apresentarem uma viabilidade superior a 70%, podem ser consideradas não tóxicos.

Tabela 3 - Viabilidade celular de 20 espécies de PANCs do estado de Sergipe de acordo com o ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.

Espécie	Viabilidade Celular	
	100ug/ML	1000ug/mL
<i>Bidens Pilosa</i> (Folhas)	131,97 %	126,46 %
<i>Bidens Pilosa</i> (Raízes)	103,88 %	106,87 %

<i>Bidens Pilosa</i> (Flores)	114,66 %	115,33 %
<i>Tithonia rotundifolia</i>	44,54 %	19,54 %
<i>Amaranthus deflexus</i>	105,54 %	132,91 %
<i>Opuntia ficus-indica</i>	80,58 %	93,00%
<i>Ipomoea batatas</i> (Roxa)	108,71 %	110,29 %
<i>Ipomoea batatas</i> (Branca)	114,12 %	79,04 %
<i>Kalanchoe pinnata</i>	127,14 %	182,22 %
<i>Cucurbita moschata</i>	146,92 %	126,17 %
<i>Tamarindus indica</i>	129,59 %	105,05 %
<i>Prosopis juliflora</i>	144,78 %	135,05 %
<i>Mirabilis jalapa</i>	88,32 %	61,52 %
<i>Phaseolus lunatus</i>	103,63 %	42,43 %
<i>Moringa oleifera</i>	114,44 %	20,50 %
<i>Psidium guajava</i>	151,08 %	40,88 %
<i>Portulaca oleraceae</i>	111,37 %	96,35 %
<i>Portulaca grandiflora</i> (Branca)	69,18 %	109,45 %
<i>Portulaca grandiflora</i> (Rosa)	154,06 %	164,29 %
<i>Lycopersicon esculentum</i>	71,69 %	19,60 %
<i>Abelmoschus esculentus</i>	133,90 %	118,66 %
<i>Pachira aquatica</i>	113,68 %	66,11 %
<i>Basella rubra</i>	139,28 %	67,36 %
<i>Syagrus coronata</i>	119,87 %	62,68 %

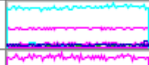
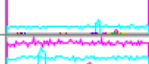
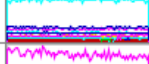
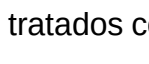
Como apresentado na tabela 3, praticamente todos os extratos não revelaram citotoxicidade na concentração de 100µg/mL, com exceção da espécie *Portulaca grandiflora* Hook (código 18, 69,18%) que apresentou uma viabilidade celular menor que 70%.

Na concentração de 1000 µg/mL 9 extratos etanol/água (4, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24) percentual de viabilidade celular superior a 70% logo são potencialmente tóxicas nessa concentração.

4.4 Análises *in silico* e desreplicação

De posse das impressões digitais metabólicas obtidas após análise por espectrometria de massa com infusão direta em analisador de massas Orbitrap-MS, os dados foram tratados com o software MZmine (Figura 1). O tratamento de dados foram eliminação dos isótopos, alinhamento e preenchimento dos espaços vazios. Após os devidos tratamentos foram detectados 5645 picos de todos os extratos obtidos no modo positivo e 7454 no modo negativo, onde utilizando-se o branco foi possível eliminar contaminantes, ruídos e interferentes que pudessem estar presentes tanto nas amostras e de igual forma no branco, restando assim 2780 e 3212, respectivamente.

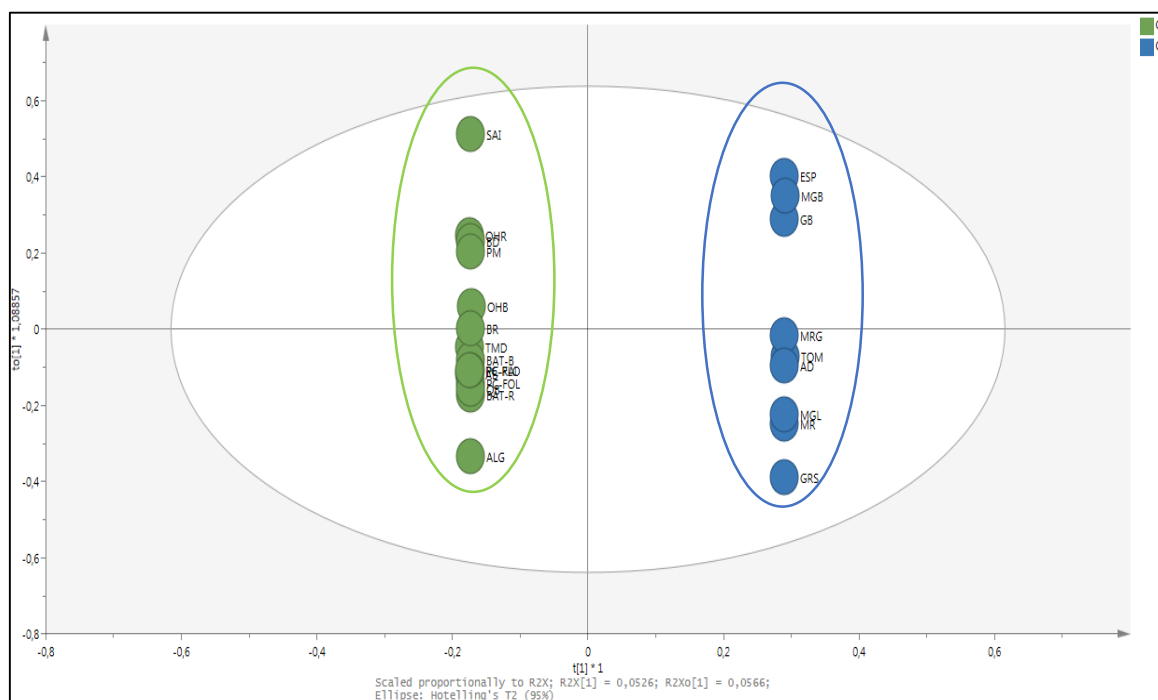
Figura 1 - Tratamentos de dados de todos os extratos obtidos por espectrometria de massas no software MZmine. Esse tratamento inclui-se eliminação de isótopos, alinhamento, preenchimento dos espaços vazios e subtração com o branco.

ID:		m/z:		RT:	
ID	Average		Identity	Comment	Peak shape
	m/z	RT			
608	365.1052	0.58			
610	383.1155	0.50	(3, Dihydroxyphenyl)3, dihydrox8, dimethy4H, 8benzo[1, b:3, b']di...		
612	204.0558	0.43			
614	366.1085	0.48	Phosphoserine; (j)Àform, P,DPh ester, Et ester		
615	219.0264	0.65	4, Dihydrox7furo[3, g][1]benzopyraone		
616	381.0789	0.55	2', 4, 5, 6, 6Pentahydroxydiphenyl ether 2, 4dicarboxylic acid; ...		
622	281.0703	0.39	Tryptophan; (Sform, NChloroacetyl		

Os dados foram importados do software MZmine e posteriormente tratados com o software R pacote “caret”. O prévio tratamento usando o R, permitiu filtrar os dados, onde foi possível a partir de um total 2780 e 3213 obter 2746 e 3200 substâncias no modo de detecção positivo e negativo, respectivamente. Também com o R os valores foram escalados e centralizados na média.

De posse desses dados foram realizadas as análises PLS-DA e OPLS-DA no software SIMCA 16. A análise de dados PLS-DA não apresentou um modelo satisfatório para esse estudo, visto que apresentou um R^2 e Q^2 muito abaixo do ideal, logo considerou-se utilizar o modelo OPLS-DA. Com relação ao OPLS-DA também não foi possível obter um bom modelo para atividade citotóxica na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e para atividade antioxidante, entretanto, construiu-se gráficos de scores para atividade citotóxica na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Esse tipo de análise permitiu discriminar as duas classes relacionadas à atividade citotóxica (G1) e (G2) e identificar as substâncias discriminantes, Figuras 2, 3, 4 e 5.

Figura 2 – Gráfico de scores da análise estatística supervisionada OPLS-DA dos extratos de 24 amostras de plantas referente ao modo positivo, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Destacando-se em verde espécies pertencentes ao grupo Não tóxicos (G1) e em azul espécies pertencente ao grupo tóxicos (G2). R^2X : 0,263; R^2Y : 1,0; Q^2 : 0,301.



Sobre a análise OPLS-DA para o modo positivo, vale destacar que esse modelo apresentou um R^2X : 263 e Q^2 :0,301, não sendo o ideal para estudos metabolômicos

que seria $R^2X > 0,7$ e $Q^2 > 0,5$ [62, 88]. No entanto o modelo OPLS-DA conseguiu classificar corretamente os extratos em estudo, dividindo-os em dois grupos G1 (15 amostras) para extratos não ativos ou não tóxicos e G2 (9 amostras) para extratos ativos ou tóxicos frente a linhagem de células fibroblastos L929.

Certos de que o modelo OPLS-DA consiste em melhorar a separação, distinguir as classes e determinar os potenciais biomarcadores, foi realizado uma análise no S-plot com o software Simca, a qual revelou substâncias importantes para o modelo. O VIP é uma análise inicial, necessária para seleção das substâncias que estão correlacionadas a citotoxicidade, vale lembrar que o VIP não necessariamente está correlacionado a propriedade biológica, mas define as variáveis mais importante para o modelo [49]. Para um modelo significativo um valor $VIP > 1$ é considerado uma função importante para seleção dos marcadores químicos. No gráfico s-plot são classificados dois grupos e as substâncias mais distantes da origem, ou seja, que estão nas extremidades são as maiores contribuintes para o separação entre os grupos G1 e G2.

Como pode ser visto no gráfico S-plot, figura 3, foi possível obter uma melhor separação para os íons que se localizam longe das origens, nas extremidades. Estes por sua vez são os íons biomarcadores que mais contribuem para discriminar as separações. Adicionalmente aos resultados com uso da base de dados DNP, os íons ativos ou potencialmente tóxicos foram tentativamente identificados, tabela 12.

Figura 3 – Gráfico S-plot modo negativo obtidos por OPLS-DA. Em **vermelho** as substâncias não tóxicas e em **amarelo** substâncias que apresentam uma maior correlação com atividade citotóxica.

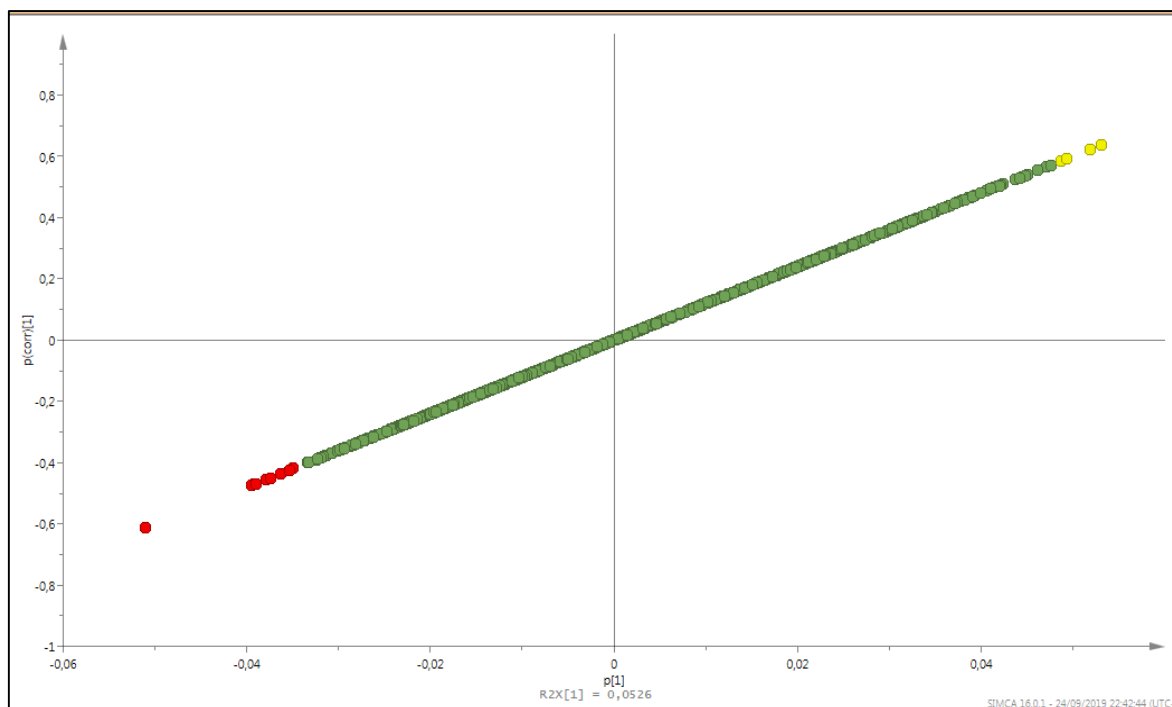


Tabela 4 - Tabela com as substâncias putativamente identificadas no banco de dados do DNP.

ID	m/z	Fórmula	Nome
976	361,0088	-	NI
1032	104,9925	-	NI
1075	339,0274	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₇	Perclorato de 4'-di-hidroxi-flavílio
881	289,0891	-	NI

Da mesma forma, a análise OPLS-DA para o modo negativo, apresentou um R^2X : 0,334 e Q^2 :0,258 abaixo do valor ideal para estudos metabolômicos, entretanto, conseguiu discriminar e classificar as amostras em relação a sua propriedade biológica, figura 3. Também buscou-se identificar os íons ativos e mais representativos para o modelo, figura 5,.

Figura 4 – Gráfico de scores da análise estatística supervisionada OPLS-DA dos extratos de 24 amostras de plantas referente ao modo negativo, na contração de 1000 µg/mL. Destacando-se em **verde** espécies pertencentes ao grupo Não tóxicos

(G1) e em azul espécies pertencente ao grupo tóxicos (G2). R^2X : 0,334; R^2Y : 1,0; Q^2 : 0,258.

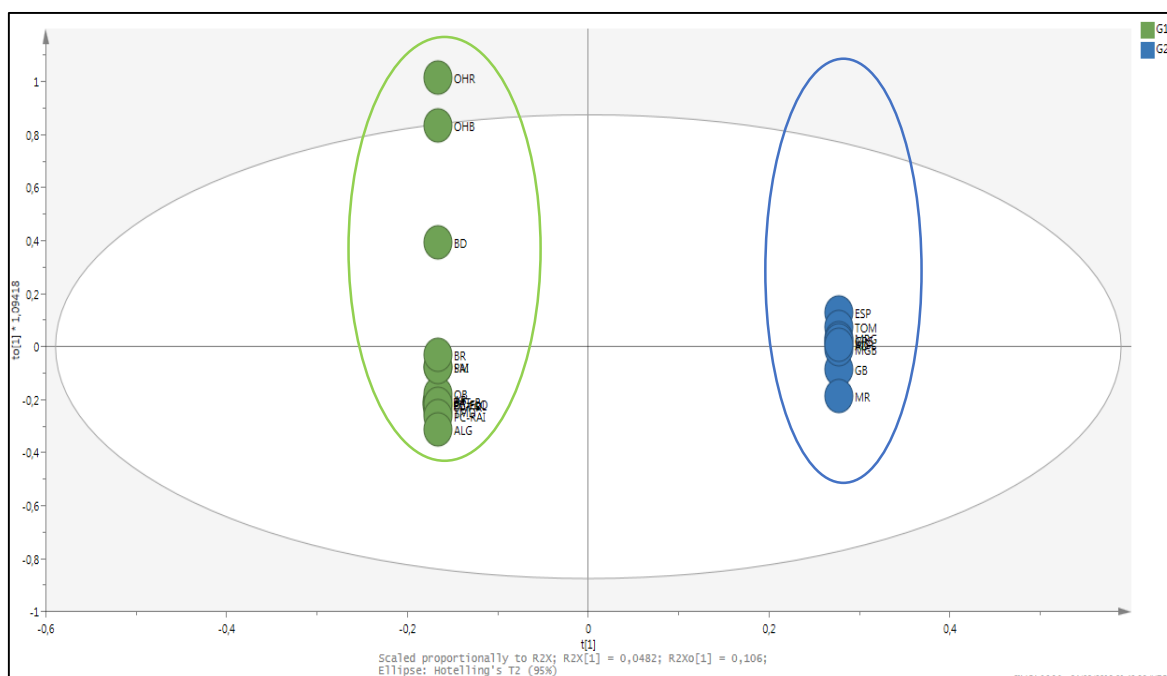


Figura 5 – Gráfico S-plot modo negativo obtidos por OPLS-DA. Em vermelho as substâncias não tóxicas e em amarelo substâncias que apresentam uma maior correlação citotóxica.

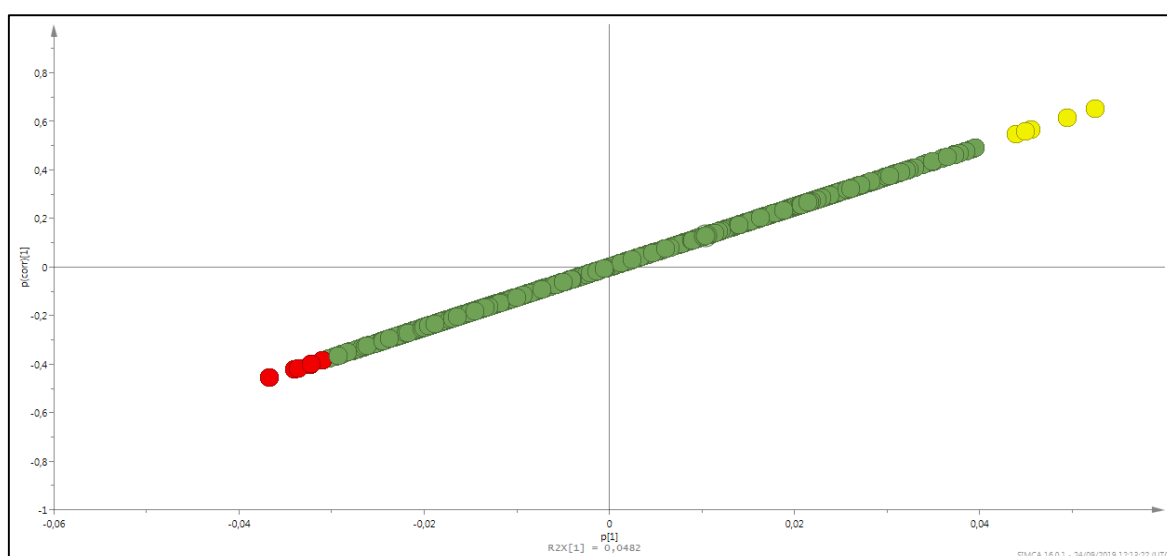


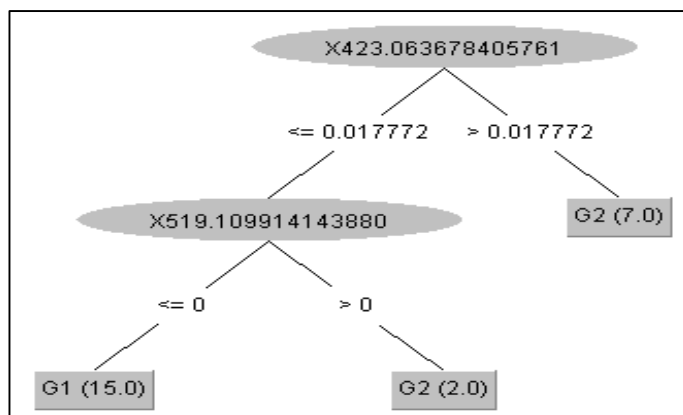
Tabela 5 - Tabela com as substâncias putativamente identificadas com o banco de dados do DNP.

ID	m/z	Fórmula	Nome
1210	440,0804	C ₂₂ H ₁₉ N ₀₇ S	Xestoquinol
2037	254,9266	-	NI
2065	112,0156	C ₃ H ₃ N ₃ O ₂	Nitroimidazol
2132	284,0992	C ₁₀ H ₂₃ N ₀₄	Amindeoxiglicose, DTE, ditioacetal
1919	507,0732	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₁₁ S ₂	N-dimetox glicosinolato de indolilmetil

Ainda sobre as análises *in silico* também foi realizado uma árvore de decisão baseada no algoritmo *J48* no software Weka. Nesse experimento os dados foram divididos duas classes como não tóxicos (G1) para amostras com viabilidade celular superior a 70% e tóxicos (G2) para amostras com viabilidade celular inferior a 70%. Vale ressaltar que a árvore de decisão foi realizada em dois experimentos independentes para concentração de 100ug/mL e 1000 ug/mL.

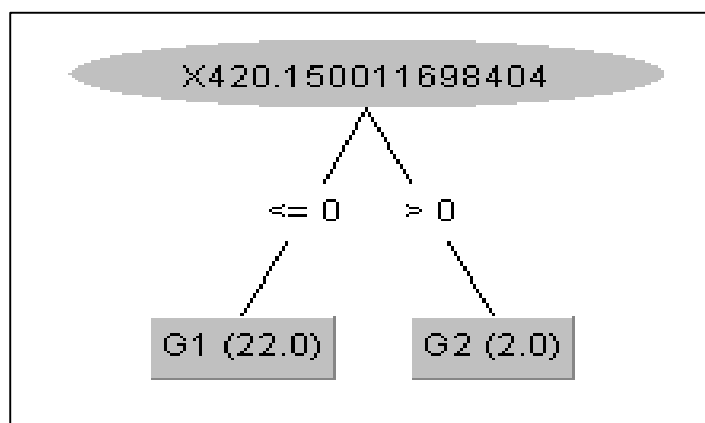
As árvores de decisão foram construídas com base nas áreas sobre as curvas, onde foi observado as m/z que podem explicar possíveis correlações de atividade das amostras. A árvore de decisão para o modo positivo na concentração de 1000µg/mL demonstra que o picos de m/z 423,063678405761 e 519,109914143880 estão correlacionados a citotoxicidade dos extratos em estudo, Figura 2. É bem verdade que se o pico 423,063678405761 apresentar apenas uma área > 0,017772, este conferirá toxicidade na referida concentração.

Figura 6 - Árvore de decisão *J48* no modo positivo, obtida no software Weka na contração de 1000µg/mL.



De igual modo a, árvore de decisão J48 obtida no modo positivo na concentração de 100µg/mL demonstra que se o pico de razão m/z 420,150011698404 apresentar uma área superior a 0,0, este estará correlacionado a toxicidade do extrato, porém se este for menor que 0,0 não apresentará potencial tóxico ao extrato nessa concentração, figura 3.

Figura 7 - Árvore de decisão J48 no modo positivo, obtida no software Weka na contração de 100µg/mL.



Seguindo essa mesma linha de raciocínio foram realizadas árvores de decisão para o modo negativo, apresentando como marcadores químicos

507,073170659449 e 632,280288696289 na concentração de 1000ug/mL, e 184,926729838053 na concentração de 100ug/mL, figuras 4 e 5.

Figura 8 - Árvore de decisão J48 no modo negativo, obtida no software Weka na contração de 1000ug/mL.

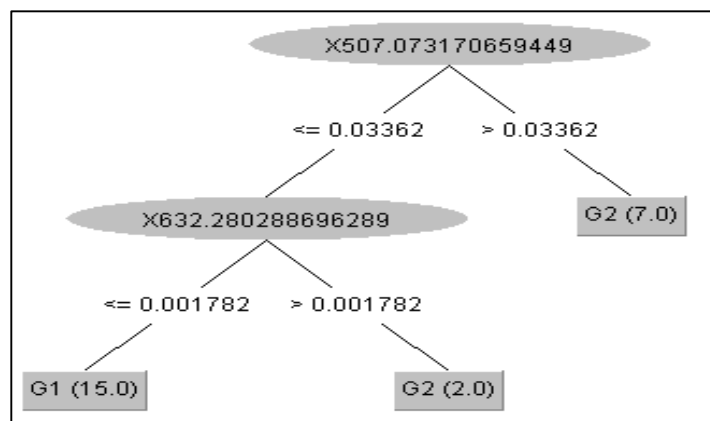
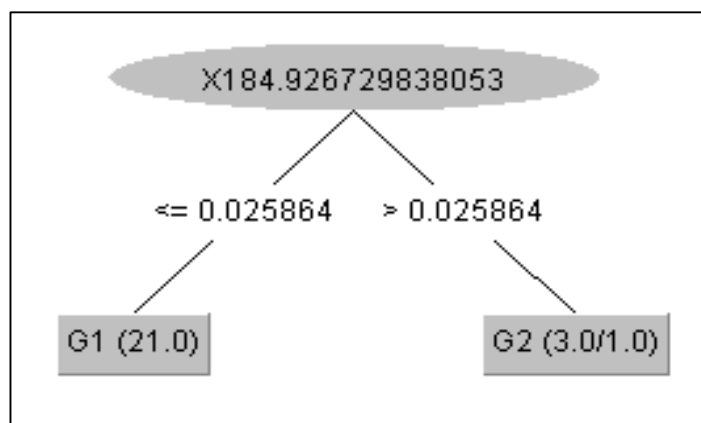


Figura 9 - Árvore de decisão J48 no modo negativo, obtida no software Weka na contração de 100ug/mL.



Sobre a composição química e análise *in silico*, atenção desse ser dada ao biomarcador 1919 que foi indicado tanto pelo modelo OPLS-DA, quanto pela árvore de decisão *j48*, logo este demonstrou ser bastante importante para avaliar a viabilidade celular dos extratos das 20 espécies estudadas, tabela 10.

Tabela 6 - Substâncias determinadas pela árvore de decisão *J48* como variáveis importante para explicar a citotoxicidade dos extratos, tanto para o modo negativo, quanto para o modo positivo, nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL.

ID	m/z	Fórmula	Nome
Modo Negativo			
721	423,0637		NI
3732	519,1099		NI
3182	20,1500		NI
Modo Positivo			
1919	507,0732	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₁₁ S ₂	N-dimetox glicosinolato de indolilmetil
	632,2803		NI
4210	184,9267		NI

Sobre as atividades biológicas, também foram construídas árvores de decisão para o ensaios DPPH, tanto para o modo positivo, quanto para o negativo, figura 6 e 7. Arvore de decisão *J48* para essa análise estatística foi desenvolvida com três categorias (G1 = extrato muito antioxidante com percentual de inibição entre 60-82%; G2 = extrato antioxidante com percentual de inibição entre 25-60%); G3 = extrato pouco antioxidante com percentual de inibição entre 1-25%), tabela 2. Referente a atividade antioxidante DPPH a árvore de decisão correlaciona sua propriedade biológica a área dos picos m/z 583,413625, 356,066243 e 399,162043 para o modo positivo, porém 458,081614, 812,498952 e 542,143300 para o modo negativo.

Figura 10 - Árvore de decisão J48 no modo positivo, obtida no software Weka e correlacionada ao ensaio DPPH.

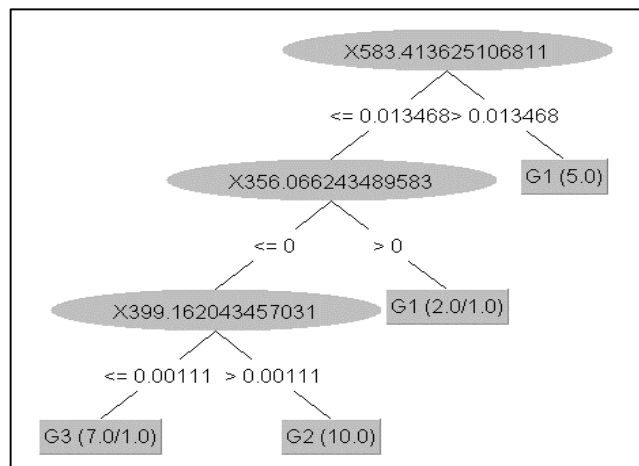
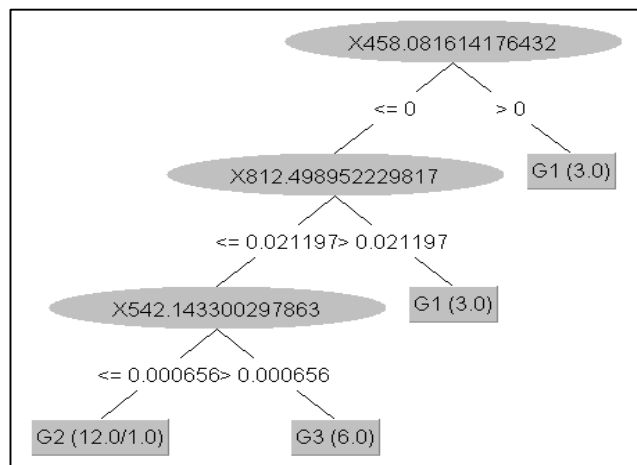


Figura 11 - Árvore de decisão J48 no modo negativo, obtida no software Weka e correlacionada ao ensaio DPPH.



As análises com a árvore J48, indicam 6 substâncias como biomarcadores da atividade antioxidante DPPH, sendo apenas 1 delas identificada na base de dados DNP, tabela 12.

Tabela 7 - Possíveis substâncias potencialmente antioxidantes correlacionadas com árvore de decisão *j48* para o ensaio DPPH.

ID	m/z	Fórmula	Nome
Modo Positivo			
1907	583,4136		NI
3739	356,0662	C ₁₁ H ₁₇ NO ₁₀ S	2, ácido dihidroximetilenobutanóico
5543	399,1624		NI
Modo Negativo			
4695	458,0816		NI
2687	812,4990		NI
2128	542,1433		NI

5. CONCLUSÃO

O trabalho em questão possibilitou a partir de estudos metabolômicos, ensaios de atividades antioxidantes e citotóxicas, bem como de análises *in silico* determinar possíveis marcadores químicos de 20 espécies vegetais de PANCs do estado de Sergipe. O trabalho não conseguiu atingir seu objetivo máximo, entretanto, perspectivas futuras, já em andamento, como análises UPLC-QTOF-MS e análises *in silico* com outros tratamento de dados podem melhorar e completar esse estudo, muito importante para investigações PANCs do estado de Sergipe.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SABER, F. R.; ABDELBAR, G. A.; SALAMA, M. M.; SALEH, D. O.; FATHY, M. M.; SOLIMAN, F. M. M. UPLC/QTOF/MS profiling of two *Psidium* species and the in-vivo hepatoprotective activity of their nano-formulated liposomes. *Food Research International* **2018**, 105, 1029-1038.
- [2] RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. A.; BRUGINSKI, E. R. D.; LIMA, E. S.; CAMPOS, E. F.; MACHADO, M. B. Chemical characterization and antioxidant

capacity of the araçá-pera (*Psidium acutangulum*): An exotic Amazon fruit. *Food Research International* **2015**, 75, 315-327.

[3] XU, D. P.; ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; LI, S.; LI, H. B. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chemistry* **2017**, 217, 552-559.

[4] LUBER, J.; PALMIERI, M. J.; BOTELHO, C. M.; RINALDO, D.; VIEIRA, L. F.A.; Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. *An Acad. Bras. Cienc.* **2015**, 87, 903-913.

[5] NIRO, E.; MARZAIOLE, R.; DE CRESCENZO, S.; D'ABROSCA, B.; CASTALDI, S.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A.; RUTIGLIANO, F. A.; Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community. *Soil Biology & Biochemistry* **2016**, 95, 30-39.

[6] MALACARNE, M.; ANTONIOLLI, G.; BERTOLDI, D.; NARDIN, T.; LARCHER, R. Botanical origin characterisation of tannins using infrared spectroscopy. *Food Chemistry* **2018**, 267, 204-209.

[7] PATIL, S. P.; KUMBHAR, S. T. Evaluation of terpene-rich extract of *Lantana camara* L. leaves for antimicrobial activity against mycobacteria using Resazurin Microtiter Assay (REMA). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **2018**, 7, 4, 511-515.

[8] LIN, M.; ZHANG, J.; CHEN, X.; Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods* **2018**, 47, 469-479.

- [9] YIN, X.; ZHÃO, F.; FENG, X.; LI, J.; YANG, X.; ZHANG, H.; TU, P. Four new spirobenzylisoquinoline N-oxide alkaloids from the whole plant of *Corydalis hendersonii*. *Fitoterapia* **2018**, 128, 31-35.
- [10] RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* **2011**, 6, 1720-1731;
- [11] OGBOLE, O.O.; SEGUN, P.A.; FASINU, P.S. Antimicrobial and antiprotozoal activities of twenty-four Nigerian medicinal plant extracts. *South African Journal of Botany* **2018**, 117, 240–246.
- [12] SHARMA, A.; VALLEJO, R. C. F.; TAKETA, A. C.; VILLARREAL, M. L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, 208, 264-329.
- [13] CHIGWEDERE, C. M.; TADELE, W. W.; WIBOWO, J. Y. S.; KEBEDE, B. T.; LOEY, A. M. V.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M. E. Insight into the evolution of flavor compounds during cooking of common beans utilizing a headspace untargeted fingerprinting approach. *Food Chemistry* **2019**, 275, 224–238.
- [14] DINGA, C.; LIU, A.; LI, P.; PEI, Y.; TAO, T.; WANG, Y.; YAN, W.; YANGA, G.; SHAO, X. Distribution and quantitative analysis of phenolic compounds in fractions of Japonica and Indica rice. *Food Chemistry* **2019**, 274, 384–391.
- [15] SHENG, S.; LI, T.; LIU, R. Corn phytochemicals and their health benefits. *Food Science and Human Wellness* **2018**, 7, 185–195.
- [16] RANIERI, G. R.; NASCIMENTO, A.S.R.V.; BORGES, F. *Guia Prático de PANC-Plantas Alimentícias Não Convencionais*. Instituto Kairós, 1 edição, São Paulo, 2017.

- [17] KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências* **2007**, 5, 63-65.
- [18] VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in Metabolome Analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, 24, 613– 646.
- [19] CHAGAS-PAULA, A. D.; ZHANG, T. COSTA, F. B.; EDRADA-EBEL, R. A. A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. *Metabolites* **2015**, 5, 404-430.
- [20] SOUSA, H, N.; ARAÚJO, T, K, S.; OLIVEIRA, B, P, T.; GUÉNEAU, S, G, E. Unconventional Food Plants: Mapping of main actors in Distrito Federal Plantas Alimentícias Não Convencionais: Mapeamento dos atores-chave no Distrito Federal. Porto Alegre, Brasil, 2018.
- [21] JESUS, R. S. In vitro antimicrobial, antimycobacterial activity, and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian Journal of Microbiology* **2018**, 49, 296-302.
- [22] LIU, Z.; LIB, P.; SUN, X.; ZHOU, F.; YANG, C.; LIB, L.; MATSUMOTO, H.; LUO, X.; Fluazifop-P-butyl induced ROS generation with IAA (indole-3-acetic acid) oxidation in *Acanthospermum hispidum* D.C. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2017**, 143, 312-318.
- [23] ARAÚJO, L. B. D. C.; SILVA, S. L.; GALVÃO, M. A. M.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, E. L.; RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L.; Total phytosterol content in drug

materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, 23, 736-742.

[24] JORGE, N.; LUZIA, D, M, M.; Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquatica* Aublet para aproveitamento alimentar. *Acta Amazonica* **2012**, 42, 1,149 - 156.

[25] MA, Z, F.; AHMAD, J.; ZHANG, H.; KHAN, I.; MUHAMMAD, S. Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. *South African Journal of Botany* **2018**, article inpres.

[26] SHIRANI, Z.; SANTHOSHA, C.; IQBA, J.; BHATNAGAR, A.; Waste Moringa oleifera seed pods as green sorbent for efficient removal of toxic aquatic pollutants. *Journal of Environmental Management* **2018**, 227, 95–106.

[27] KITUYI, J, L.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P.; ONGULU, R, A.; KIPLAGAT, A.; GACHANJA, A. Efficiency of pre-treated Moringa oleifera for the removal of Cd²⁺ and Zn²⁺ ions from wastewaters. *Ecohydrology & Hydrobiology* **2013**, 13, 267–271.

[28] KHOR, K, Z.; LIM, V.; MOSES, E, J.; SAMAD, N, A. The In Vitro and In Vivo Anticancer Properties of Moringa oleifera. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2018**.

[29] Conforme; <http://www.encontromoringa.com.br/eventos/enam2018>.

[30] LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: *An Overview*. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 12791-12835.

- [31] FREITAS, J. A.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; F.B. COSTA, F. B. LC-MS metabolic profiling comparison of domesticated crops and wild edible species from the family Asteraceae growing in a region of São Paulo state, Brazil. *Phytochemistry Letters*, **2021**, 42, 45–51.
- [32] DIAS, R, N.; SILA, T, P, S.; MATOS, S, M.; SILVA, D, M, S.; SILVA, E, S.; SANTOS, C, S, V.; DURIGAN, M, F, B.; *Revista Ambiente: Gestão e Desenvolvimento* **2018**, 11,1, SSN ONLINE:1981-4127.
- [33] FARAG, M. A.; SHAKOUR, Z. T. A. Metabolomics driven analysis of 11 *Portulaca* leaf taxa as analysed via UPLC-ESI- MS/MS and chemometrics. *Phytochemistry*, **2019**, 161, 117–129.
- [34] NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, **1999**, 29,11, 1181-1189.
- [35] FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genom* **2001**, 2, 155–168.
- [36] VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do Metaboloma, uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, ano IX, 36, janeiro-junho, 2006.
- [37] NAOMI L. KUEHNBAUM E PHILIP BRITZ-MCKIBBIN. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 2437–2468.

- [38] CHATTERJEE, N. S.; CHEVALLIER, O. P.; WIELOGORSKA, E.; BLACK, C.; ELLIOTT, C. T. Simultaneous authentication of species identity and geographical origin of shrimps: Untargeted metabolomics to recurrent biomarker ions. *N.S. J. Chromatogr.* **2019**, 1599, 75–84.
- [39] HUANG¹, M.; ZHAO¹, H.; GAON, S.; LIU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, T.; CAI, X.; LI, Z.; LI, L.; LIZ, Y.; YU, C. Identification of coronary heart disease biomarkers with different severities of coronary stenosis in human urine using non-targeted metabolomics based on UPLC-Q-TOF/MS
- [40] ROCCHETTI, G.; LUCINI, L.; GALLO, A.; MASOERO, F.; TREVISAN, M.; GIUBERTI, G. Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses. *Food Research International*, **2018**, 113, 407-413.
- [41] CHASSAGNE, F.; HADDAD, M.; AMIEL, A.; PHAKEOVILAY, C.; MANITHIP, C.; BOURDY, G.; DEHARO, E.; MARTI, G. A metabolomic approach to identify anti-hepatocarcinogenic compounds from plants used traditionally in the treatment of liver diseases. *Fitoterapia*, **2018**, 127, 226-236.
- [42] SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M.; BEGER, R.; DAYKIN, C.A.; FAN, T. W. M.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; HANKEMEIER, T.; HARDY, N.; HARNLY, J. Proposed minimum reporting standards for chemical Analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, 3, 3, 211 - 221.
- [43] GORROCHATEGUI, E.; JAUMOT, J.; LACORTE, S.; TAULER, R.; Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 82, 425–442.

- [44] CREYDT, M.; ARNDT, M. HUDZIK, D.; FISCHER, M. Plant Metabolomics: Evaluation of Different Extraction Parameters for Nontargeted UPLC-ESI-QTOF-Mass Spectrometry at the Example of White Asparagus officinalis. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66, 12876–12887.
- [45] CADAHÍA, E. ; SIMÓN, B, F.; ARANDA, I.; SANZ, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, D.; PINTO, E. non-targeted metabolomic profile of fagus sylvatica l. leaves sing liquid chromatography with mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **2015**, 26, 171–182.
- [46] MUSHTAQ, M. Y.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; WILSON, E. G. Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. *Phytochem. Anal.* **2014**, 25, 291–306.
- [47]TUGIZIMANA, F.; PIATER, L.; DUBERY, I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *Plant metabolomics* **2013**, 109, 5/6, 1-11.
- [48] BIJTTEBIER, S.; AUWERA, A. V. D.; FOUBERT, K.; VOORSPOELS, S.; PIETERS, L.; APERS, S. Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. *Analytica Chimica Acta* **2016**, 935, 136-150.
- [49] CHAGAS-PAULA, D. A. Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial antioxidante *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico*. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2013.
- [50] MAIA, M.; MONTEIRO, F.; SEBASTIANA, M.; MARQUES, A. P.; FERREIRA, A. E. N.; FREIRE, A. P.;CORDEIRO, C.; FIGUEIREDO, A.; SILVA, M. S. S.

Metabolite extraction for high-throughput FTICR-MS-based metabolomics of grapevine leaves. *EuPA Open Proteomics* **2016**, 12, 4–9.

[51] DUDZIK, D.; BARBAS-BERNARDOS, C.; GARCÍA, A.; GARCÍA, C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2018**, 147, 149–173.

[52] WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A* **2015**, 1382, 136-164.

[53] LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica* **2009**, 1, 2, 35 -61.

[54] KIM, S.; SHIN, B, LIM, D. K.; YANG, T.; LIM, J.; PARKA, J. H.; KWOND, S. W. Expeditionary discrimination of four species of the Panax genus using direct infusion-MS/MS combined with multivariate statistical analysis. *Journal of Chromatography B* **2015**, 1002, 329–336.

[55] LIM , D. K. Y.; MO, C.; LONG, N. P.; LIM, J.; KWOND, S, W. A rapid and reliable method for discriminating rice products from different regions using MCX-based solid-phase extraction and DI-MS/MS-based metabolomics approach *Journal of Chromatography B* **2017**, 185–192.

[56] WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomic. *Curr Metabolomics*, **2013**, 1, 1, 92–107.

[57] KOK, E.; DIJK, J. V.; VOORHUIJZEN, M.; STAATS, M.; SLOT, M.; LOMMEN, A.; VENEMA, D.; PLA, M.; CORUJO, M.; BARROS, E.; HUTTEN, R.; JANSEN, J.;

VOET, H. V. D. Omics analyses of potato plant materials using an improved one-class classification tool to identify aberrant compositional profiles in risk assessment procedures. *Food Chemistry*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.224>.

[58] SOUARD, F.; DELPORTE, C.; STOFFELEN, P.; THÉVENOT, E. A.; NORET, N.; DAUVERGNE, B.; KAUFFMANN, J.; ANTWERPEN, P. V.; STÉVIGNY, C. Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted profiling study using LC-HRMS. *Food Chemistry* **2018**, 245, 603–612.

[59] VILLA-RUANO, N.; RAMÍREZ-MERAZ, M.; MÉNDEZ-AGUILAR, R.; ZEPEDA-VALLEJO, L. G.; ÁLVAREZ-BRAVO, A.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; BECERRA-MARTÍNEZ, E. ¹H NMR-based metabolomics profiling of ten new races from *Capsicum annuum* cv. serrano produced in Mexico. *Food Research International* **2019**, 119, 785–792.

[60] DEY, P.; SARKAR, I.; DUTTA, S.; SAHA, M. R.; CHAUDHURI, T. K. Correlative metabolomic fingerprinting and molecular docking studies of dermatological phytotherapeutics of South-Eastern Himalaya. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **2019**, 9, 243-248.

[61] WORLEY, B.; POWERS, ROBERT. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics*. **2013**, 1, 1, 92–107.

[62] SANTOS, F. A.; SOUSA, I. P.; FURTADO, N. A. J. C.; COSTA, F. B. Combined OPLS-DA and decision tree as a strategy to identify antimicrobial biomarkers of volatile oils analyzed by gas chromatography–mass spectrometry. *Rev. bras. Farmacogn.* **2018**, 28, 6.

[63] BOCCARD, J.; RUTLEDG, D. N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 769, 30–39.

- [64] LUZ, L. R.; PORTO, D. D.; CASTRO, C. B.; SILVA, M. F. S.; FILHO, E. G. A.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S.; PESSOA, H. B. C.; ZOCCOLO, G. J. Metabolomic profile of *Schinopsis brasiliensis* via UPLC-QTOF-MS for identification of biomarkers and evaluation of its cytotoxic potential. *Journal of Chromatography B* **2018**, 1099, 1, 97-109.
- [65] LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices (Review). *Biomedical Reports*, **2015**, 3, 617-620.
- [66] REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *LWT - Food Science and Technology*, **2019**, 101, 183–190.
- [67] HOUDKOVA, M.; RONDEVALDOVA, J.; DOSKOCIL, I.; KOKOSKA, L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*, **2017**, 118, 56–62.
- [68] OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, **2015**, 74, 10–36.
- [69] LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 133, 379-402.
- [70] WOJTUNIK-KULESZA, A. ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2016**, 78, 39–49.

[71] PATLEVIC, P.; VASCOVA, J.; SVORC Jr., P.; VASKO, L.; SVORC, P. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res*, **2016**, 5, 250–258.

[72] OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, **2019**, 144, 135–143.

[73] NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A.; SHAHAR YAR, M. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, 178, 687-704.

[74] DAWIDOWICZ, A. L.; OLSZOWY, M.; JÓZ´WIK-DOLEBA, M. antagonistic antioxidant effect in butylated hydroxytoluene/butylated hydroxyanisole mixture. *Journal of Food Processing and Preservation*, ISSN 1745-4549.

[75] OLIVEIRA, V. S.; AUGUSTA, I. M.; BRAZ, M. V. C.; RIGER, C. J.; PRUDÊNCIO, E. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; SAMPAIO, G. R.; TORRES, E. A. F. S.; SALDANHA, T. Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126274>.

[76] NIRMALAA, C.; BISHT, M. S.; BAJWA, H. K.; SANTOSH, O. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, **2018**, 77, 91–99.

[77] TIAN, Y.; PUGANEN, A.; ALAKOMI, H.; UUSITUPA, A.; SAARELA, M.; YANG, B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Research International*, **2018**, 106, 291–303.

[78] ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.; Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, **2010**, 33, 10, 2202-2210.

[79] ABDULLAH I. HUSSAIN, A. I.; CHATHA, S. A. S.; NOOR, S.; ARSHAD, M. U.; KHAN, Z. A.; RATHORE, H. A.; SATTAR, M. Z. A. Effect of Extraction Techniques and Solvent Systems on the Extraction of Antioxidant Components from Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Hulls. *Food Anal. Methods*, **2012**, 5, 890-896.

[80] RODRÍGUEZ-BONILLA, P.; GANDÍA-HERRERO, F.; MATENCIO, A.; GARCÍA-CARMONA, F.; LÓPEZ-NICOLÁS, J. M. Comparative Study of the Antioxidant Capacity of Four Stilbenes Using ORAC, ABTS+, and FRAP Techniques. *Food Anal. Methods*, **2017**, 10, 2994–3000.

[81] CASTRO-LÓPEZ, C.; VENTURA-SOBREVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M. D. ROJAS, R.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILAR, C. N.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, **2017**, 237, 1139–1148.

[82] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M, E.; BERSET. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, **1995**, 28, 1, 1995, 25-30.

[83] COUTO, H, G, S, A.; BLANK, A. F.; SILVA, A, M, O.; NOGUEIRA, P, C, L.; ARRIGONI-BLANK, M, F.; NIZIO, D, A, C.; PINTO, J, A, O. Essential oils of basil chemotypes: Major compounds, binary mixtures, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, **2005**.

- [84] MAMAT, S, F.; AZIZAN, K, A.; BAHARUM, S, N.; NOOR, N, M.; AIZAT, W, M. Metabolomics analysis of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) fruit pericarp using different extraction methods and GC-MS. *Plant OMICS* **2018**, 11(2), 89-97. <https://doi.org/10.21475/poj.11.02.18.pne1191>.
- [85] Yue, W.; Sun, W.; Rao, R, S, P.; Ye, N.; Yang, Z.; Chen, M.; Non-targeted Metabolomics Reveals Distinct Chemical Compositions Among Different Grades of Bai Mudan White Tea. *Food Chemistry* **2019**, 277, 289–297.
- [86] Zhang, Qunfeng.; Wu, S.; Li, Y.; Ni, K.; Yi, X.; Shi, Y.; Ma, L.; Willmitzer, L.; Ruan, J.; Characterization of three different classes of non-fermented teas using untargeted metabolomics. *Food Research International* **2019**, 121, 697-704.
- [87] Mushtaq, M, Y.; Choi, Y, H.; Verpoorte, R.; Wilson, E, G.; Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. *Phytochem. Anal.* **2014**, 25, 291–306.
- [88] Huang, B.; Zha, Q.; Chen, T.; Xiao, S.; Xie, Y.; Luo, P.; Wang, Y.; Liu, E.; Zhou, H. Discovery of Markers for Discriminating the age of Cultivated Ginseng by Using UHPLC-QTOF/MS Coupled With OPLS-DA. *Phytomedicine* **2018**, 45, 8–17.