



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)  
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

MARCOS PEREIRA MARTINS

**Contribuição ao estudo metabolômico de espécies do gênero *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) da região do Cerrado e da Caatinga**

GOIÂNIA  
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

### 2. Nome completo do autor

Marcos Pereira Martins

### 3. Título do trabalho

Contribuição ao estudo metabólico de espécies do gênero *Cnidocolus* (Euphorbiaceae) da região do Cerrado e da Caatinga

### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato, Professor do Magistério Superior**, em 13/05/2022, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS PEREIRA MARTINS, Discente**, em 26/05/2022, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2817327** e o código CRC **89180832**.

MARCOS PEREIRA MARTINS

**Contribuição ao estudo metabólico de espécies do gênero *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) da região do Cerrado e da Caatinga**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás (UFG) como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Professora Doutora Lucilia Kato

GOIÂNIA  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Martins, Marcos Pereira

Contribuição ao estudo metabolômico de espécies do gênero Cnidocolus (Euphorbiaceae) da região do Cerrado e da Caatinga [manuscrito] / Marcos Pereira Martins. - 2022.  
x, 160 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lucilia Kato.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2022.  
Bibliografia. Apêndice.

Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cnidocolus. 2. flavonoides glicosilados. 3. esteroides. 4. Molecular Networking. 5. Global Natural Products Social Molecular Networking. I. Kato, Lucilia, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº 138 da sessão da Defesa de Doutorado de **Marcos Pereira Martins**, que confere o título de **Doutor em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos 6 (seis) dias do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois), a partir das 14h00, via videoconferência, realizou-se a sessão pública da Defesa de Doutorado intitulada "**Contribuição ao estudo metabólico de espécies do gênero Cnidocolus (Euphorbiaceae) da região do Cerrado e da Caatinga**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Profª. Drª. Lucilia Kato (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva (UFT)**, **Profª. Drª. Geralda de Fátima Lemes (UEG)**, **Prof. Dr. Luciano Moraes Lião (UFG)** e **Profª. Drª. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (UFG)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Doutorado, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Profª. Drª. Lucilia Kato, Presidenta da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato, Professora do Magistério Superior**, em 06/04/2022, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Moraes Liao, Professor do Magistério Superior**, em 06/04/2022, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, Professor do Magistério Superior**, em 06/04/2022, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geralda de Fátima Lemes, Usuário Externo**, em 07/04/2022, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joseilson Alves de Paiva, Usuário Externo**, em 07/04/2022, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2814684** e o código CRC **53FDE2DE**.

*Dedico à minha esposa e meu filho,*

*Leandra e Heitor*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força, perseverança e saúde para superar as dificuldades.

À minha esposa Leandra e ao meu filho Heitor pelo amor, apoio incondicional, pelo conforto nos momentos de angústia e por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lucilia Kato, por ter aberto as portas do LabPN para mim, pela confiança, pelo apoio, incentivo, por seu exemplo como profissional e por acreditar que esse trabalho fosse possível.

Aos professores, Dra. Vanessa Pasqualotto, Dra. Geralda Lemes, Dr. Paiva, Dr. Luciano Liao por toda contribuição, apoio, incentivo e por serem exemplo de profissionais.

A todos os amigos do laboratório (LabPN), pelos momentos de descontração e amizade durante todo esse tempo. De modo especial ao Vinícius, Eurides, Gustavo, Jorge, Matheus, Márcia, Gerso, Diego e Gabriela.

Ao Laboratório de RMN, na pessoa do Prof. Dr. Luciano Liao, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear realizadas tão prontamente. De modo especial, ao meu cunhado Gerlon que me ajudou durante todo o tempo de doutorado, pela companhia, pelas caronas, e pelo auxílio com as análises de RMN/ACP.

Ao Prof. Dr. Marcos da Silva e à Dra. Cellini Castro de Oliveira do Instituto de Ciências Biológicas – ICB1, pela coleta e identificação das espécies relacionadas neste trabalho.

Ao Prof. Luís Cláudio Nascimento da Silva (Universidade CEUMA) pelas análises de ensaio antibacteriano.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Química, pela oportunidade de realizar esse trabalho na instituição.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	1
1.1. Família Euphorbiaceae.....	1
1.2. Gênero <i>Cnidocolus</i> Pohl.....	1
1.3. Produtos Naturais (PNs): fonte de moléculas bioativas.....	10
1.4. Flavonoides .....	12
1.5. Triterpenos e esteroides.....	14
1.6. Metabolômica de Plantas .....	17
1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectrometria de massas (EM) .....	18
1.8. Desreplicação .....	20
1.9. <i>Molecular Networking</i> (MN).....	21
1.10. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Análise de Componentes Principais (ACP).....	23
1.11. Atividade Antibacteriana .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1. Objetivo Geral.....	26
2.2. Objetivos Específicos.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. Instrumentação e solventes .....	27



3.2. Procedimentos Cromatográficos .....	27
3.3. Análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	27
3.4. Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas por Ionização Eletrospray .....	28
3.5. Análise de amostra da espécie <i>C. bahianus</i> por CG-EM .....	28
3.6. Análises dos extratos das folhas das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> por CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares .....	29
3.7. Análise Quimiométrica dos dados de RMN dos extratos das folhas e caule das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	29
3.8. Coleta do material vegetal e preparação dos extratos .....	30
3.9. Análise Fitoquímica das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	31
3.10. Estudo químico dos extratos de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	32
3.10.1. Estudo químico do extrato hexânico das folhas de <i>C. bahianus</i> (CBHF). 32	
3.10.2. Estudo químico do extrato metanólico das folhas de <i>C. urniger</i> (CUMF) 33	
3.11. Ensaio Antimicrobiano dos extratos das folhas e caule de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> frente aos microorganismos <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
4.1. Análise fitoquímica dos extratos das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	36
4.2. Análise de componentes principais (ACP) dos extratos das folhas e caule de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	37
4.3. Anotação de metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> por <i>Molecular Networking</i> e Espectrometria de Massas .....	48
4.4. Elucidação estrutural dos compostos utilizando as técnicas de RMN 1D e 2D, CG-EM E CLAE-EM/EM .....	77
4.4.1. Estudo químico do extrato hexânico das folhas de <i>C. bahianus</i> (CBHF)... 77	
4.4.2. Estudo químico do extrato metanólico das folhas de <i>C. urniger</i> (CUMF) . 82	

4.5. Ensaio Antimicrobiano dos extratos de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> frente aos microorganismos <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	88
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	91
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	92
<b>APÊNDICES</b> .....	109
Apêndice A – Listagem das espécies do gênero <i>Cnidocolus</i> distribuídas no Brasil. ....	110
Apêndice B – Espectros de RMN <sup>1</sup> H dos extratos de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	114
Apêndice C – Relação de compostos anotados na plataforma do GNPS/METLIN para os extratos das espécies de <i>Cnidocolus</i> (modo negativo e positivo).....	122

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas dos compostos isolados da casca do caule de <i>C. phyllacanthus</i> (OHTA <i>et al.</i> , 1994, PAULA <i>et al.</i> , 2016). .....	3
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>C. texanus</i> (YUAN <i>et al.</i> , 2007). .....	4
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do composto isolado de <i>C. souzae</i> (ZAPATA-ESTRELLA <i>et al.</i> , 2014). .....	5
<b>Figura 4.</b> Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>C. chayamansa</i> (PÉREZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2017). .....	5
<b>Figura 5.</b> <i>Cnidoscolus bahianus</i> coletada na cidade Tanque Novo/BA (saída da cidade para Botuporã). Fonte: Cellini C. Oliveira, 2016. ....	6
<b>Figura 6.</b> <i>Cnidoscolus urniger</i> coletada na cidade de Tanque Novo/BA (BA 156). Fonte: Cellini C. Oliveira, 2016. ....	7
<b>Figura 7.</b> <i>Cnidoscolus vitifolius</i> coletada na cidade de Acreúna/GO (25km de Santo Antônio da Barra km 314, BR 060, às margens da rodovia). Fonte: Cellini C. Oliveira, 2016. ....	8
<b>Figura 8.</b> Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>C. vitifolius</i> (BRUM <i>et al.</i> , 1998). .....	9
<b>Figura 9.</b> Exemplos de fármacos derivados de plantas. Adaptado de KINGSTON (2011). .....	11
<b>Figura 10.</b> Medicamentos aprovados de 01 de janeiro de 1981 a 30 de setembro de 2019: B: agente biológico; N: produto natural; NB: produto natural “botânico”; ND: derivado de produto natural; S: totalmente sintético; S/NM: sintético que imita produto natural; S*: síntese total, mas o farmacóforo é derivado de produto natural; S*/NM: síntese total, mas o farmacóforo imita produto natural; V: vacina (NEWMAN e CRAGG, 2020). ....	12
<b>Figura 11.</b> Biossíntese dos flavonoides. Adaptado de Heinrich <i>et al.</i> , 2012. ....	13
<b>Figura 12.</b> Esqueleto básico da estrutura dos flavonoides (VERRI JR. <i>et al.</i> , 2012). ....	14
<b>Figura 13.</b> Uma visão geral da biossíntese dos terpenos a partir do difosfato de isopentenila (IPP). Adaptado de DEWICK, 2011. ....	15
<b>Figura 14.</b> Estrutura do lupeol. Adaptado de TSAI <i>et al.</i> , 2016. ....	16
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática de como as redes moleculares são geradas. Adaptado de WATROUS <i>et al.</i> , 2012. ....	21

<b>Figura 16.</b> Fluxograma do protocolo para a construção de MN. Adaptado de ARON <i>et al.</i> , 2020.....	23
<b>Figura 17.</b> Fluxograma de obtenção dos extratos das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> . Fonte: autoria própria.....	31
<b>Figura 18.</b> Fluxograma de isolamento da mistura de esteroides CBHF-11.2 da espécie <i>C. bahianus</i> . .....	33
<b>Figura 19.</b> Fluxograma de isolamento do esteroide CUMF-18.2 da espécie <i>C. urniger</i> . .....	34
<b>Figura 20.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) dos extratos das folhas e caules das espécies de <i>Cnidocolus</i> . .....	38
<b>Figura 21.</b> Gráfico de scores (a) e loadings (b) da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos das folhas e caule das espécies de <i>Cnidocolus</i> . .....	40
<b>Figura 22.</b> Gráfico de scores (a) e loadings (b) da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos metanólico e etanólico das espécies de <i>Cnidocolus</i> . .....	41
<b>Figura 23.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos das folhas e caules obtidos com metanol e etanol, na região de 3,0 a 4,5 ppm (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	42
<b>Figura 24.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos das folhas de CUMF, CBEF e CVEF (500 MHz, MeOD). .....	43
<b>Figura 25.</b> Experimentos bidimensionais de HMBC (azul) e HSQC-editado (CH <sub>2</sub> em rosa e CH e CH <sup>3</sup> em vermelho) do extrato CBEF (500 MHz para <sup>1</sup> H e 125 MHz para <sup>13</sup> C, MeOD).....	44
<b>Figura 26.</b> Experimentos bidimensionais de HMBC (azul) e HSQC-editado (CH <sub>2</sub> em rosa e CH e CH <sub>3</sub> em vermelho) do extrato CVEF (500 MHz para <sup>1</sup> H e 125 MHz para <sup>13</sup> C, MeOD).....	45
<b>Figura 27.</b> Espectro de difusão (DOSY) por RMN de <sup>1</sup> H do extrato CBEF, com destaque para a presença dos sinais referentes a sete substâncias observadas na região característica de compostos aromáticos.....	47
<b>Figura 28.</b> Rede molecular construída através dos extratos obtidos das folhas de <i>C. bahianus</i> (nó azul), <i>C. urniger</i> (nó verde) e <i>C. vitifolius</i> (nó vermelho), com dados de EM/EM no modo negativo e agrupado pelo software <i>Cytoscape</i> 3.7.2, enfatizando as principais anotações de compostos observados nas bibliotecas GNPS, PubChem e Metlin. ....	50

<b>Figura 29.</b> Nomenclatura de íons formados a partir da fragmentação via reação RDA. Adaptado de CUYCKENS e CLAYES, 2004. ....	51
<b>Figura 30.</b> Expansão da rede molecular no modo negativo, mostrando o <b>cluster I (a)</b> com as anotações dos nós $m/z$ 287,05627 e $m/z$ 303,05081. A figura abaixo ilustra a comparação do espectro de fragmentação do flavonoide anotado como <b>(b)</b> aromadendrina e <b>(c)</b> taxifolina (espectro superior) com o espectro de referência da biblioteca do GNPS (espectro inferior). ....	53
<b>Figura 31.</b> Proposta de fragmentação do metabólito <b>65</b> anotado como aromadendrina (FABRE <i>et al.</i> , 2001). ....	54
<b>Figura 32.</b> Proposta de fragmentação do metabólito <b>66</b> anotado como taxofolina (FABRE <i>et al.</i> , 2001). ....	55
<b>Figura 33.</b> Expansão da rede molecular ( <b>cluste II</b> ) no modo negativo, <b>(a)</b> com as anotações dos nós $m/z$ 289,07190 e $m/z$ 305,06696. A figura ao lado mostra a comparação do espectro de fragmentação do flavonoide anotado como <b>(b)</b> catequina/epicatequina e <b>(c)</b> epigalocatequina. ....	56
<b>Figura 34.</b> Espectro de EM/EM e a fragmentação do metabólito <b>67</b> anotado como catequina/epicatequina. ....	58
<b>Figura 35.</b> Proposta de fragmentação do metabólito <b>67</b> anotado como catequina/epicatequina (KANG <i>et al.</i> , 2016). ....	59
<b>Figura 36.</b> Expansão da rede molecular ( <b>cluster III</b> ) no modo negativo. ....	60
<b>Figura 37.</b> Espectro de EM/EM <b>(a)</b> e a fragmentação do metabólito <b>69 (b)</b> anotado como apigenina-7-(3- <i>p</i> -cumaroil-glucosideo) de $m/z$ 577,13519 [M-H] <sup>-</sup> . ....	61
<b>Figura 38.</b> Espectro de EM/EM <b>(a)</b> e a fragmentação do metabólito <b>70 (b)</b> anotado como kaempferol-3-(4- <i>p</i> -cumaroil-glucosideo) de $m/z$ 593,12988 [M-H] <sup>-</sup> . ....	62
<b>Figura 39.</b> Espectro de EM/EM <b>(a)</b> e a fragmentação do metabólito <b>71 (b)</b> anotado como prunin-3- <i>p</i> -cumarato de $m/z$ 579,15100 [M-H] <sup>-</sup> . ....	64
<b>Figura 40.</b> Espectro de EM/EM <b>(a)</b> e a fragmentação do metabólito <b>72 (b)</b> anotado como prunin-3,6-di- <i>p</i> -cumarato de $m/z$ 725,18317 [M-H] <sup>-</sup> . ....	65
<b>Figura 41.</b> Expansão da rede molecular ( <b>cluster IV</b> ) no modo negativo. ....	66
<b>Figura 42.</b> Alinhamento de espectros <b>(a)</b> e fragmentação <b>(b)</b> do metabólito <b>76</b> anotado como kaempferol-3- <i>O</i> -glucosideo. ....	67
<b>Figura 43.</b> Espectro de massas EM/EM <b>(a)</b> e a proposta de fragmentação <b>(b)</b> do metabólito <b>79</b> anotado como quercetina-3-hexosideo (FABRE <i>et al.</i> , 2001). ....	69

<b>Figura 44.</b> Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito <b>81</b> anotado como kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo. ....	70
<b>Figura 45.</b> Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito <b>86</b> anotado como mauritianin. ....	72
<b>Figura 46.</b> Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito <b>88</b> anotado como quercetina-3-rutinosídeo-7-galactosídeo.....	73
<b>Figura 47.</b> Expansão da rede molecular ( <b>cluster V</b> ) correspondente aos compostos anotados da classe dos ácidos hidroxicinâmicos presentes nos extratos das folhas de <i>Cnidocolus</i> . ....	74
<b>Figura 48.</b> Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito <b>91</b> anotado como ácido-5- <i>p</i> -cumaroilquinico.....	75
<b>Figura 49.</b> Estrutura dos esteroides sitosterol, campesterol, estigmasterol e fucosterol obtidos em mistura (amostra <b>CBHF-11.2</b> ) e isolados a partir do extrato hexânico das folhas de <i>C. bahianus</i> . ....	78
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> /TMS, 500,13 MHz) da mistura de esteroides da amostra <b>CBHF-11.2</b> , com expansões das regiões: (a) 5,40-5,30 ppm, (b) 5,20-5,00 e (c) 3,60-3,40 ppm.....	79
<b>Figura 51.</b> (a) Cromatograma de íons totais da mistura dos esteroides obtidos por CG-EM da amostra <b>CBHF-11.2</b> . (b) Expansão do cromatograma de íons totais da mistura de esteroides com tempo de retenção dos compostos campesterol (33,102 min), estigmasterol (33,441 m min), sitosterol (34,435 min) e fucosterol (34, 583 min).....	81
<b>Figura 52.</b> Espectros de massas dos componentes da amostra <b>CBHF-11.2</b> : (a) campesterol, (b) estigmasterol, (c) sitosterol e (d) fucosterol. ....	82
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> /TMS, 500,13 MHz) do composto <b>CUMF-18.2</b> , com expansões das regiões: (a) 5,38-5,32 ppm, (b) 3,55-3,50 ppm e (c) 2,30-0,65 ppm. ....	83
<b>Figura 54.</b> Estrutura do composto <b>CUMF-18.2</b> isolado do extrato metanólico das folhas de <i>C. urniger</i> .....	85
<b>Figura 55.</b> Mapa de correlação HSQC para o composto <b>CUMF-18.2</b> (sitosterol). ....	86
<b>Figura 56.</b> Mapa de correlação HMBC para o composto <b>CUMF-18.2</b> (sitosterol). ....	87
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD/TMS, 500,13 MHz) do extrato acetato de etila das folhas de <i>C. bahianus</i> (CBAEF). ....	114
<b>Figura 58.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD/TMS, 500,13 MHz) do extrato acetato de etila das folhas de <i>C. vitifolius</i> (CVAEF).....	115

<b>Figura 59.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico do caule de <i>C. bahianus</i> (CBEC). .....	116
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico do caule de <i>C.urniger</i> (CUEC). .....	117
<b>Figura 61.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico do caule de <i>C.vitifolius</i> (CVEC). .....	118
<b>Figura 62.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato metanólico das folhas de <i>C.urniger</i> (CUMF). .....	119
<b>Figura 63.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico das folhas de <i>C.bahianus</i> (CBEF). .....	120
<b>Figura 64.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico das folhas de <i>C.vitifolius</i> (CVEF). .....	121
<b>Figura 65.</b> Estrutura dos compostos anotados presentes nas folhas das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> utilizando dados de EM no modo negativo, verificados nas bases de dados GNPS, PubMed e Metlin. (continua) .....	131
<b>Figura 66.</b> Estrutura dos compostos anotados presentes nos extratos das folhas das espécies de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> utilizando dados de EM no modo positivo, verificados nas bases de dados GNPS, PubMed e Metlin. (continuação) .....	143

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterização dos principais metabólitos secundários dos extratos de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> por cromatografia em camada delgada (WAGNER e BLADT, 2001). (continua) .....	31
<b>Tabela 2.</b> Massa e rendimento dos extratos obtidos das folhas e caule de <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> .....	35
<b>Tabela 3.</b> Resultado da triagem fitoquímica realizada nos extratos das espécies <i>C. bahianus</i> , <i>C. urniger</i> e <i>C. vitifolius</i> . .....	36
<b>Tabela 4.</b> Comparação de dados de RMN de <sup>1</sup> H da mistura de esteroides <b>CBHF-11.2</b> e dados da literatura dos esteroides campesterol, estigmasterol, sitosterol e fucosterol. Fonte: KOJIMA <i>et al.</i> , 1990; MOREAU <i>et al.</i> , 2002; PAULA <i>et. al.</i> , 2016.....	80
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H, HSQC e HMBC do composto <b>CUMF-18.2</b> . (continua) .....	84
<b>Tabela 6.</b> Atividade antimicrobiana representada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de <i>Cnidoscolus</i> frente as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . (continua)..	88
<b>Tabela 7.</b> Espécies do gênero <i>Cnidoscolus</i> distribuídas no Brasil. Adaptado de The Plant List. (continua) .....	110
<b>Tabela 8.</b> Compostos anotados na plataforma do GNPS/METLIN para os extratos das espécies de <i>Cnidoscolus</i> (modo negativo). (continua) .....	122
<b>Tabela 9.</b> Compostos anotados na plataforma do GNPS/Metlin para os extratos das espécies de <i>Cnidoscolus</i> (modo positivo). (continua) .....	137



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
CB	<i>Cnidoscolus bahianus</i>
CBHF	Extrato hexânico das folhas de <i>C. bahianus</i>
CBAEF	Extrato AcOEt das folhas de <i>C. bahianus</i>
CBEF	Extrato etanólico das folhas de <i>C. bahianus</i>
CBHC	Extrato hexânico do caule de <i>C. bahianus</i>
CBAEC	Extrato AcOEt do caule de <i>C. bahianus</i>
CBEC	Extrato etanólico do caule de <i>C. bahianus</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUAE	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
CMN	Classic Molecular Networking
CU	<i>Cnidoscolus urniger</i>
CUMF	Extrato metanólico das folhas de <i>C. urniger</i>
CUHC	Extrato hexânico do caule de <i>C. urniger</i>
CUAEC	Extrato AcOEt do caule de <i>C. urniger</i>
CUEC	Extrato etanólico do caule de <i>C. urniger</i>
CV	<i>Cnidoscolus vitifolius</i>
CVHF	Extrato hexânico das folhas de <i>C. vitifolius</i>
CVAEF	Extrato AcOEt das folhas de <i>C. vitifolius</i>
CVEF	Extrato etanólico das folhas de <i>C. vitifolius</i>
CVEC	Extrato etanólico do caule de <i>C. vitifolius</i>
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	duplo dupleto
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
EM	Espectrometria de Massas

EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
<i>GNPS</i>	Global Natural Products Social Molecular Networking
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IES	Ionização por Eletrospray
<i>m</i>	Multiplete
<i>ACP</i>	Análise quimiométrica de componentes principais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>S</i>	Simpleto
Sf	Subfração
SPE	Solid-Phase Extraction
TMS	Tetrametilsilano
$\Phi$	Diâmetro interno da coluna cromatográfica
$\delta_H$	Deslocamento químico de hidrogênio

## RESUMO

O gênero *Cnidoscolus*, pertencente à família Euphorbiaceae, é conhecido popularmente como cansanção ou favela e está distribuído em diversos países da América. No Brasil, está presente principalmente no domínio fitogeográfico Caatinga e possui várias espécies amplamente utilizadas por comunidades tradicionais. No entanto, há poucos estudos químicos e farmacológicos sobre o gênero e não há a descrição de trabalhos envolvendo a anotação de compostos por *Molecular Networking*. Visando ampliar o conhecimento químico sobre as espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* foram realizadas análises, envolvendo os extratos das folhas e caules, de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLAE-IES-EM/EM), análise de componentes principais (ACP) e o isolamento de alguns metabólitos por cromatografia em coluna filtrante. A atividade microbiana dos extratos de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* frente às cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram avaliadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A ACP dos dados de RMN de hidrogênio dos extratos revelou que o perfil químico das espécies é semelhante. A análise das classes metabólicas presentes nas espécies de *Cnidoscolus* por CLAE-IES-EM/EM (modos positivo e negativo) com conseqüente construção de redes moleculares das espécies estudadas, levou à desreplicação de compostos fenólicos com a anotação de 40 flavonoides (da classe dos flavonois, flavanois, flavonas e flavanonas) e 4 ácidos hidroxicinâmicos. Os metabólitos isolados por cromatografia filtrante foram caracterizados por RMN como pertencentes à classe dos esteroides (sitosterol, estigmasterol, campesterol e fucosterol). O extrato etanólico das folhas de *C. bahianus* apresentou atividade antimicrobiana moderada e os demais não apresentaram atividade para as cepas testadas.

Palavras-chaves: 1. *Cnidoscolus*. 2. flavonoides glicosilados. 3. esteroides. 4. *Molecular Networking*. 5. *Global Natural Products Social Molecular Networking*.

## ABSTRACT

The genus *Cnidoscolus* belongs to the Euphorbiaceae family, is popularly known as *cansanção* or *favela*, and is distributed in several countries in America. In Brazil, this genus is mainly present in the Caatinga phytogeographic domain and has several species widely used by traditional communities. However, there are few chemical and pharmacological studies on this genus and there are no works description involving the annotation of compounds by *Molecular Networking*. In order to expand the chemical knowledge about the species *C. bahianus*, *C. urniger* and *C. vitifolius*, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS), principal component analysis (*PCA*), analyzes were performed involving extracts from leaves and stems, and some metabolites were isolated by filter column chromatography. The antimicrobial activities of *C. bahianus*, *C. urniger* and *C. vitifolius* extracts against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains were evaluated to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The *PCA* of the <sup>1</sup>H NMR data of the extracts revealed that the chemical profile of the species is similar. The analysis of the metabolic classes of the compounds from *Cnidoscolus* species by HPLC-IES-MS/MS (positive and negative modes) with consequent construction of molecular networking of the studied species led to the dereplication of phenolic compounds with the annotation of 40 flavonoids (class of flavonols, flavanols, flavones and flavanones) and 4 hydroxycinnamic acids. The metabolites isolated by filter chromatography were characterized by NMR as belonging to the steroid class (sitosterol, stigmasterol, campesterol and fucosterol). The ethanolic extract of *C. bahianus* leaves showed moderate antimicrobial activity and the others showed no activity for the tested strains.

Keywords: 1. *Cnidoscolus*. 2. flavonoids glycosides. 3. steroids. 4. *Molecular Networking*. 5. Global Natural Products Social Molecular Networking.

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. Família Euphorbiaceae

Euphorbiaceae (Ordem Malpighiales) está entre as maiores famílias de plantas angiospermas distribuídas nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta, especialmente nos continentes africano e americano (WEBSTER, 1994; SÁTIRO e ROQUE, 2008; CREPALDI *et al.*, 2016). As espécies desta família são altamente diversificadas na estrutura vegetativa, representadas principalmente por árvores, arbustos e ervas. De acordo com dados da literatura, é constituída por 299 gêneros com 8.000 espécies, agrupadas em 47 tribos e em sete subfamílias: Phyllanthoideae, Oldfieldoideae, Peroideae, Cheilosoideae, Alcalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae (ESSER, 2012; KUBITZKI, 2014).

A família Euphorbiaceae está amplamente distribuída em diversos lugares do mundo e destaca-se pela diversidade de espécies em diferentes ecossistemas. *Acalypha*, *Chamaesyce*, *Cnidoscolus*, *Croton*, *Euphorbia*, *Hevea*, *Jatropha*, *Manihot*, *Phyllanthus*, *Ricinus* e *Tragia* estão entre os gêneros mais representativos (RAI *et al.*, 2012). Como consequência de sua diversidade, incluem inúmeras espécies economicamente importantes, como por exemplo, *Ricinus communis* L. (mamona), *Manihot esculenta* Crantz (mandioca) e *Hevea brasiliensis* Willd. Ex. A. Juss (seringueira), entre outras (MWINE e VAN DAMME, 2011).

As espécies pertencentes a esta família destacam-se na medicina tradicional por serem utilizadas no tratamento e controle de inúmeras doenças, contribuindo para a saúde de indivíduos de diversas comunidades em todas as partes do mundo. Nesse contexto, destaca-se o gênero *Cnidoscolus* devido ao potencial e diversidade farmacológica, associada à produção de um amplo espectro de metabólitos secundários (BIJEKAR e GAYATRI, 2014; SHARMA *et al.*, 2017).

## 1.2. Gênero *Cnidoscolus* Pohl

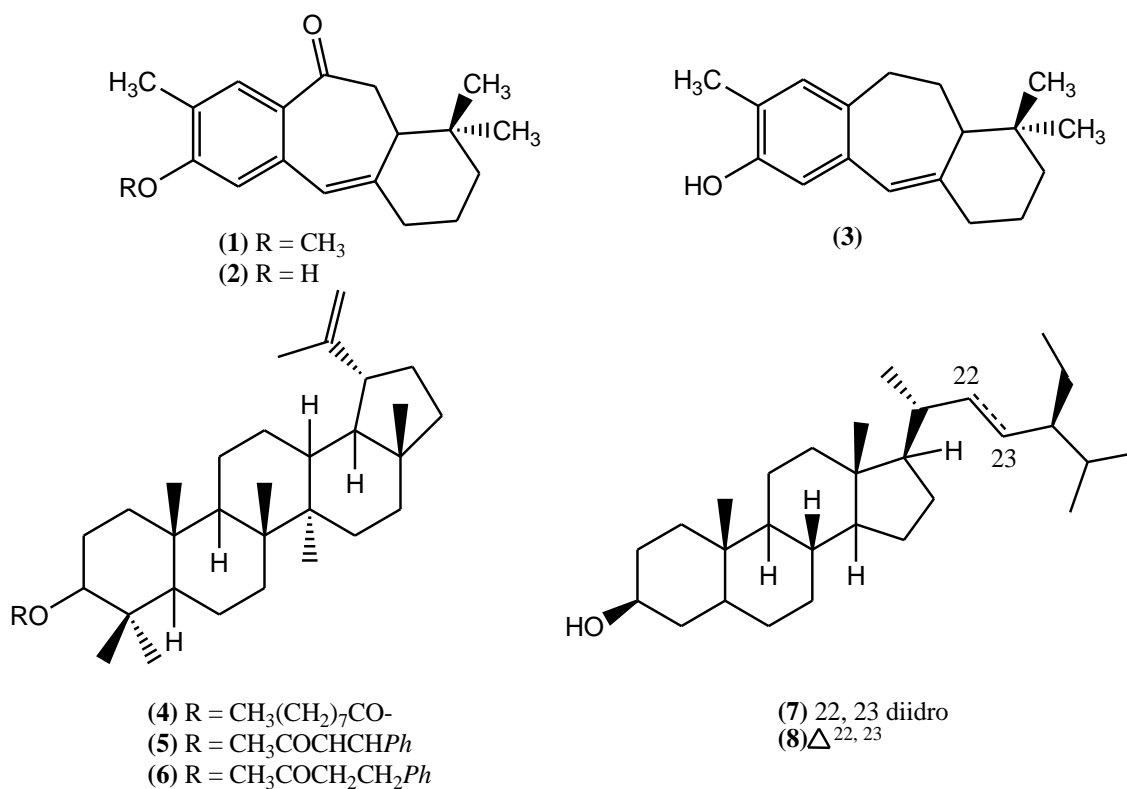
Algumas das espécies de Euphorbiaceae fazem parte do gênero *Cnidoscolus* Pohl, característico de regiões neotropicais, que inclui cerca de 70 espécies (WEBSTER, 1994; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018). México e Brasil representam os países com maior

diversidade de espécies de *Cnidoscolus* (LEÓN-DE LA LUZ *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2014). No Brasil, por exemplo, o gênero é representado por 43 espécies (**Tabela 7, Apêndice A**, página 110) com distribuição em diferentes áreas fitogeográficas, incluindo a ocorrência de 23 espécies no Cerrado e 18 oriundas da Caatinga (THE PLANT LIST, 2013; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2019; FLORA DO BRASIL, 2022). A principal característica do gênero *Cnidoscolus* é a presença de tricomas urticantes distribuídos por toda parte vegetativa e floral e quando estimulados provocam fortes dores localizadas (MELO e SALES, 2008).

Diversos estudos etnofarmacológicos no Brasil mostraram um grande número de espécies vegetais do gênero *Cnidoscolus*, popularmente conhecidas como urtiga, faveleiro, faveleira ou favela e utilizadas por comunidades tradicionais para o tratamento de várias doenças (GOMES *et al.*, 2014). As principais indicações, incluem ação anti-inflamatória, antitumoral, anti-séptico, para o tratamento de infecções renais, infecção vaginal, lesões dermatológicas e oftálmicas, hematomas, contusões, fraturas, apendicite, hemorragia, antibiótico, feridas, verrugas, laxante, diurético, disenteria, diabetes, insônia, úlcera e reumatismo (GOMES *et al.*, 2014; JIMÉNEZ-ARELLANES *et al.*, 2014; PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2019).

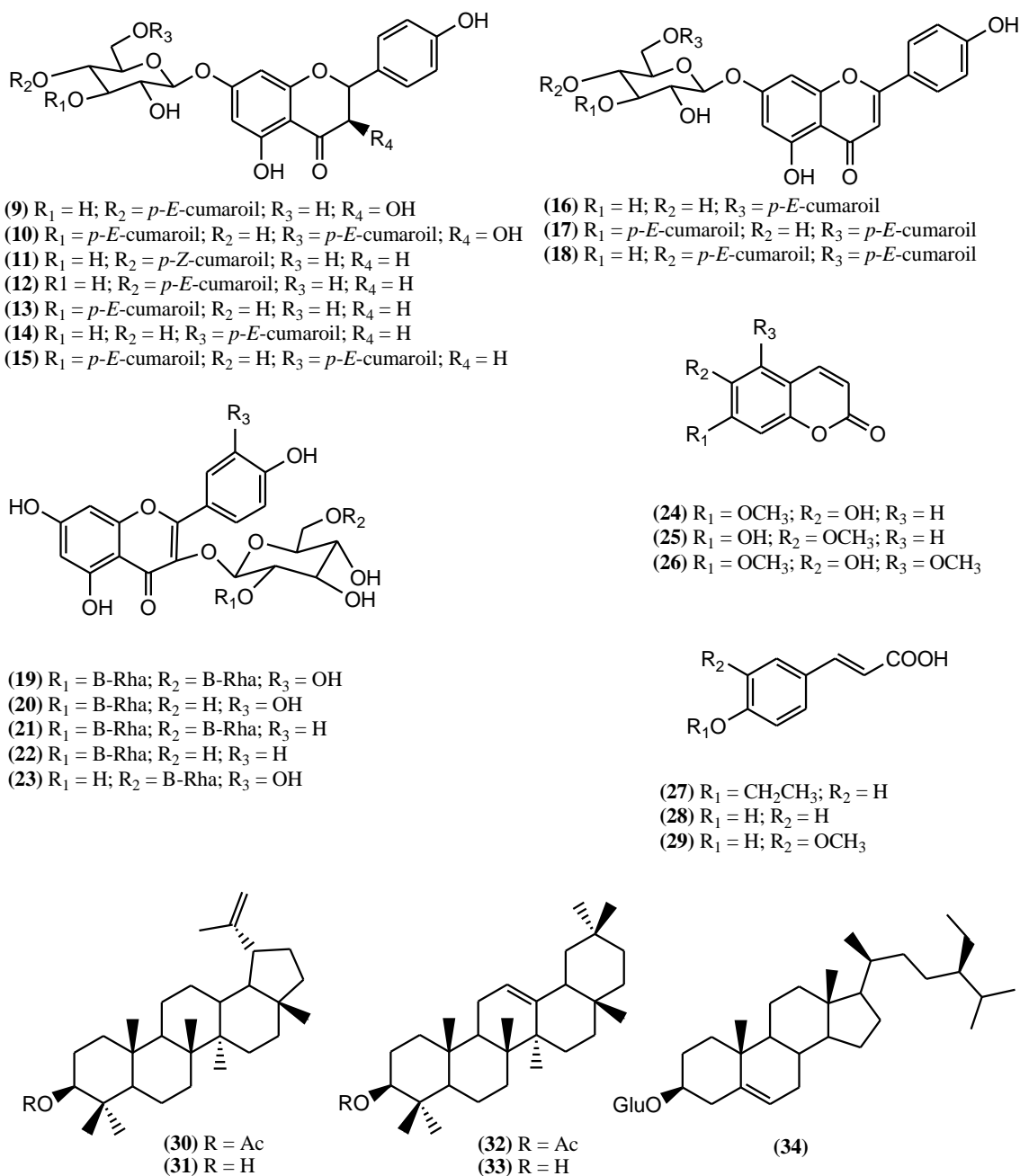
Apesar de existir um número limitado de estudos químicos para as espécies deste gênero, na literatura foram descritas várias classes de compostos bioativos (metabólitos primários ou secundários) distribuídos em diferentes partes das plantas. Peixoto Sobrinho *et al.* (2012) investigaram as características fitoquímicas e a atividade microbiana de extratos orgânicos de quatro espécies do gênero *Cnidoscolus* (*C. infestus*, *C. pubescens*, *C. quercifolius* e *C. urens*) e relataram a presença de metabólitos secundários como, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, esteroides lignanas, saponinas, taninos, triterpenos e xantinas, que estão entre as principais classes de metabólitos secundários isolados do gênero (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2019).

Ohta *et al.* (1994) isolaram os compostos diterpênicos metil favelina (**1**), favelina (**2**) e deoxofavelina (**3**) do extrato metanólico da casca do caule de *C. phyllacanthus*, relatados também para a espécie *C. souzae* (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018). De acordo com Paula *et al.* (2016) também foram isolados do extrato hexânico da casca do caule de *C. phyllacanthus*, uma mistura de triterpenos  $3\beta$ -*O*-nanoiil-lupeol (**4**),  $3\beta$ -*O*-cinamoiil-lupeol (**5**),  $3\beta$ -*O*-diidrocinamoiil-lupeol (**6**), a mistura de esteroides sitosterol (**7**) e estigmasterol (**8**) e do extrato etanólico da casca do caule, os diterpenos metil favelinha e deoxofavelina (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estruturas dos compostos isolados da casca do caule de *C. phyllacanthus* (OHTA *et al.*, 1994, PAULA *et al.*, 2016).

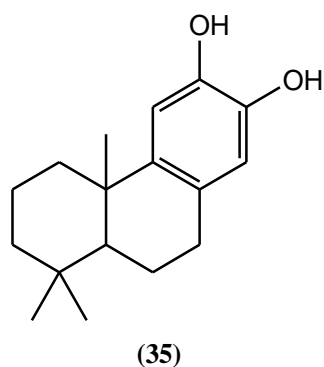
Em estudo realizado por Yuan *et al.* (2007) foram isolados 26 compostos a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *C. texanus*: 15 flavonoides (**9-23**), 3 cumarinas (**24-26**), 3 derivados de ácidos cumáricos (**27-29**), 4 triterpenos (**30-33**) e um fitosterol (**34**). Os flavonoides (**9**), (**10**), (**12**), (**14**) e (**15**) são os mais abundantes e apresentam potencial para serem utilizados como marcadores químicos para distinguir os táxons do gênero *Cnidocolus*. Na **Figura 2** são apresentadas as estruturas dos compostos isolados de *C. texanus*.



**Figura 2.** Estruturas químicas dos compostos isolados de *C. texanus* (YUAN *et al.*, 2007).

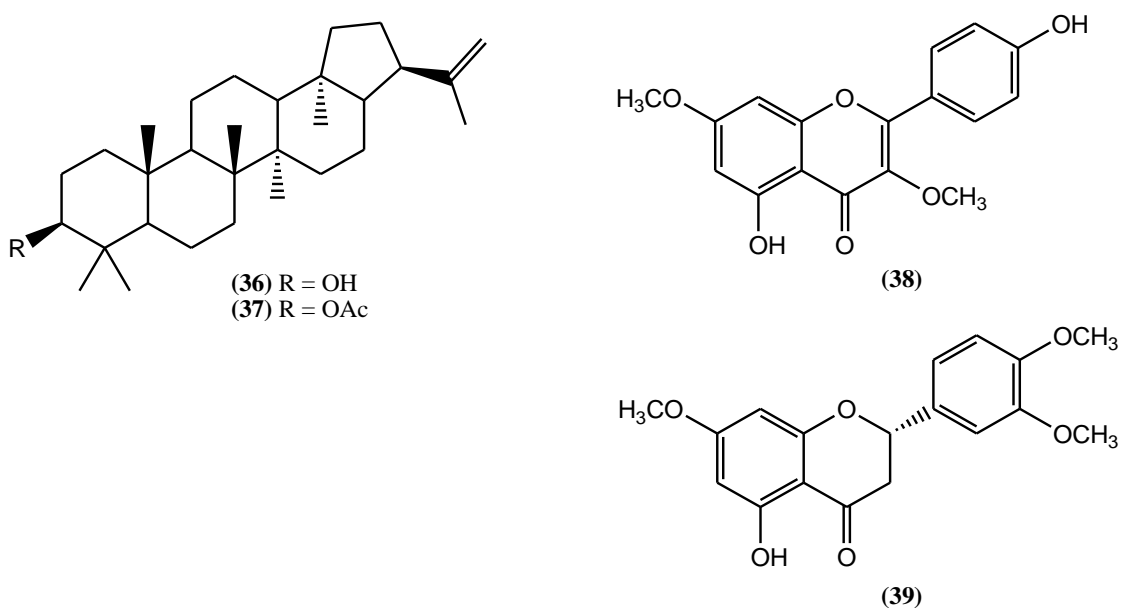
Zapata-Estrella *et al.* (2014) relataram o isolamento da substância 7-deoxynimbidiol (**35**) (**Figura 3**) a partir do extrato etanólico das raízes da espécie *C. souzae*. Este metabólito havia sido isolado previamente de *Celastrus hypoleucus* (Celastraceae) e relatado por apresentar atividade anti-tumoral.





**Figura 3.** Estrutura química do composto isolado de *C. souzae* (ZAPATA-ESTRELLA *et al.*, 2014).

Em estudo realizado por Pérez-González *et al.* (2017) foram descritos a análise fitoquímica, atividade biológica e o isolamento dos compostos moretenol (**36**), acetato de moretenil (**37**), kaempferol-3,7-dimetil éter (**38**) e 5-hidroxi-7-3',4'-trimetoxi-flavanona (**39**) a partir do extrato clorofórmio:metanol das partes aéreas de *C. chayamansa* (**Figura 4**).



**Figura 4.** Estruturas químicas dos compostos isolados de *C. chayamansa* (PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).

Além das análises fitoquímicas descritas, foram realizados estudos farmacológicos envolvendo diversos extratos, frações ou compostos isolados de diferentes espécies do gênero *Cnidocolus*. Utilizando-se modelos experimentais *in vivo* ou *in vitro*, foram confirmadas diversas atividades biológicas como antioxidante, hipoglicêmica, hepatoprotetora, hipocolesterolêmica, citotóxica, antianêmica, antinociceptiva, anti-inflamatória e antimicrobiana (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2011;

GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2019).

Tendo em vista que o estudo fitoquímico contribui significativamente para o conhecimento dos constituintes químicos e do potencial farmacológico em espécies vegetais, as plantas medicinais provaram ser uma importante fonte na busca de novos medicamentos. O gênero *Cnidoscolus* ainda é amplamente inexplorado e apresenta pouca literatura em relação a investigação de compostos bioativos e atividades biológicas. Dessa forma, destaca-se neste trabalho o estudo das espécies *Cnidoscolus bahianus* (Ule) Pax & K.Hoffm, *Cnidoscolus urniger* (Pax) Pax e *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl.

### 1.2.1. *Cnidoscolus bahianus* (Ule) Pax & K.Hoffm.

Conhecida popularmente por “favela-branca”, “favela-brava”, “favela-de-galinha” e “cansação branco”, *C. bahianus* (**Figura 5**) é uma árvore (2-7 metros de altura) facilmente reconhecida pela presença de tricomas urticantes nos frutos, ramos e folhas (ovais e com margem denteada). Ocorre em áreas de caatinga, sobre solos argilosos ou argilo-arenosos, presente em diversos Estados, principalmente, no Nordeste do Brasil (MELO e SALES, 2008; HURBATH *et al.*, 2016). No entanto, não há estudos químicos e biológicos para esta espécie.



**Figura 5.** *Cnidoscolus bahianus* coletada na cidade Tanque Novo/BA (saída da cidade para Botuporã).  
Fonte: Cellini C. Oliveira, 2016.

### 1.2.2. *Cnidoscolus urniger* (Pax) Pax

*Cnidoscolus urniger* (**Figura 6**) conhecida popularmente como “cansação”, é um subarbusto ou arbusto (0,8-1,5 metros de altura), apresenta tricomas urticantes (2-9,5 mm de comprimento) nos ramos, pecíolos, lâminas foliares, inflorescências, periantos e frutos. Facilmente são reconhecidas pelo perianto (invólucro) nas flores e pelos estames completamente livres. A espécie tem ocorrência restrita ao Brasil (Bahia, Pernambuco e Piauí) e também não possui estudo químico e biológico (MELO e SALES, 2008; HURBATH *et al.*, 2016).



**Figura 6.** *Cnidoscolus urniger* coletada na cidade de Tanque Novo/BA (BA 156). Fonte: Cellini C. Oliveira, 2016.

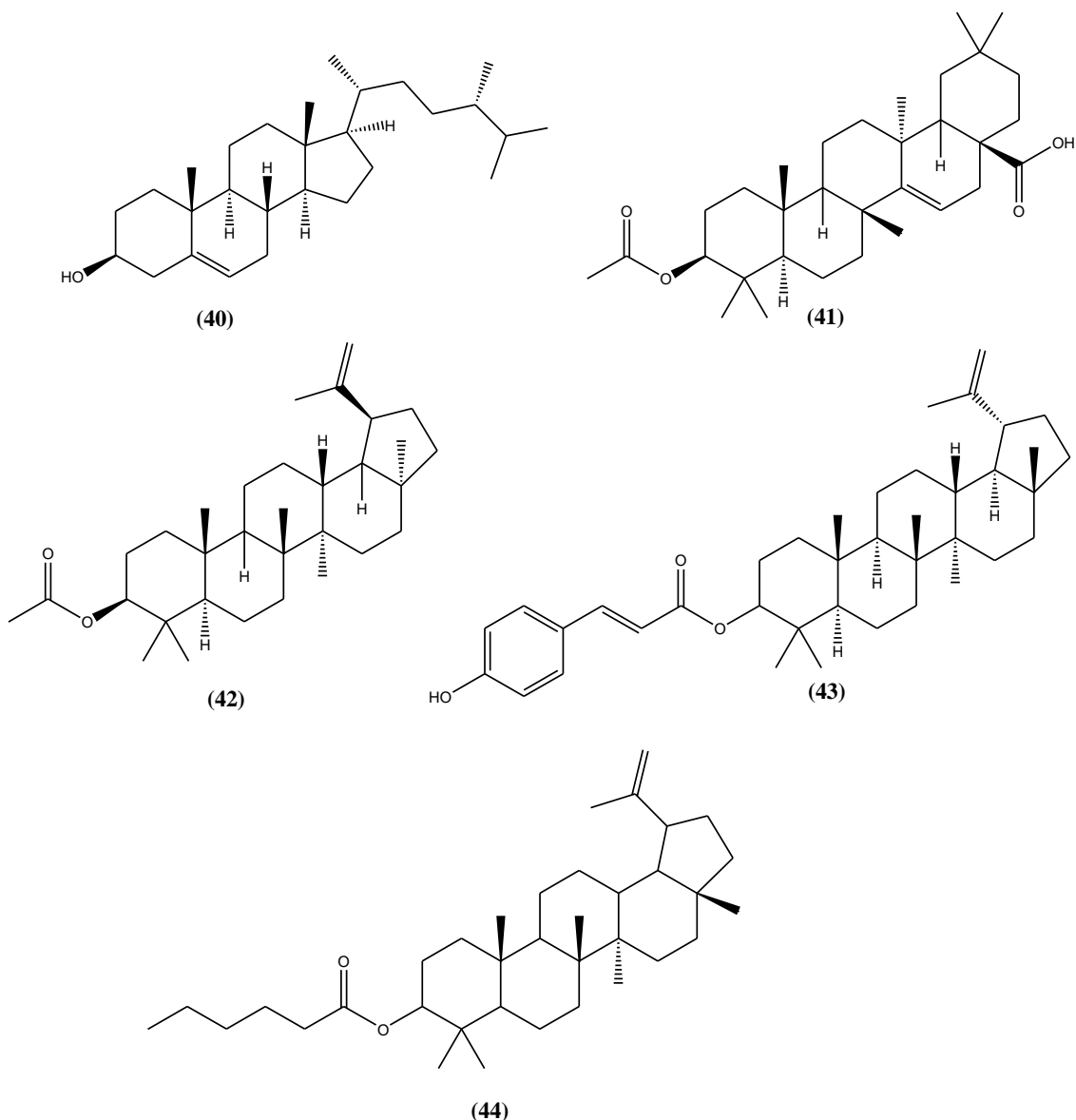
### 1.2.1.3. *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl

*Cnidoscolus vitifolius* (**Figura 7**) é conhecida pelo nome vernacular de “cansação” (Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Pernambuco), “favela” (Pernambuco) e “urtiga” (Ceará), apresenta-se como um arbusto ou árvoreta (0,6-4 metros de altura), com a presença de tricomas urticantes nas lâminas foliares, pecíolos, ramos, inflorescências e frutos. Ocorre na Argentina e no Brasil com predominância em solos arenosos e areno-argilosos (MELO e SALES, 2008; HURBATH *et al.*, 2016).



**Figura 7.** *Cnidocolus vitifolius* coletada na cidade de Acreúna/GO (25km de Santo Antônio da Barra km 314, BR 060, às margens da rodovia). Fonte: Cellini C. Oliveira, 2016.

Brum *et al.* (1998) isolaram a partir do extrato diclorometano do caule de *C. vitifolius*, a mistura de esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol (**40**), ácido 3-acetilaleurítico (**41**), 3- $\beta$ -acetil-lupeol (**42**), cinamoil-lupeol (**43**) e 3- $\beta$ -hexanoil-lupeol (**44**) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Estruturas químicas dos compostos isolados de *C. vitifolius* (BRUM *et al.*, 1998).

Conforme descrito anteriormente, não foram encontrados na literatura estudos fitoquímicos e farmacológicos das espécies *C. bahianus* e *C. urniger* e há poucas informações sobre o potencial fitoquímico de *C. vitifolius*. Os estudos químicos envolvendo as espécies de *Cnidoscolus* evidenciam a presença de compostos bioativos distribuídos em diferentes partes das plantas, como os flavonoides, esteroides, triterpenos e diterpenos são as principais classes encontradas no gênero. Com relação as investigações farmacológicas, as espécies de *Cnidoscolus* mostram que as atividades antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória também são comuns para espécies do gênero (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018). Nesse sentido, faz-se necessária a realização de estudos fitoquímicos e biológicos para as espécies mencionadas.

### 1.3. Produtos Naturais (PNs): fonte de moléculas bioativas

Historicamente, substâncias químicas derivadas de animais, plantas e micro-organismos têm sido utilizadas para tratar doenças. Plantas e micro-organismos produzem substâncias bioativas únicas, conhecidas como produtos naturais, possuindo ampla diversidade estrutural e funcional (MOLINARI, 2009).

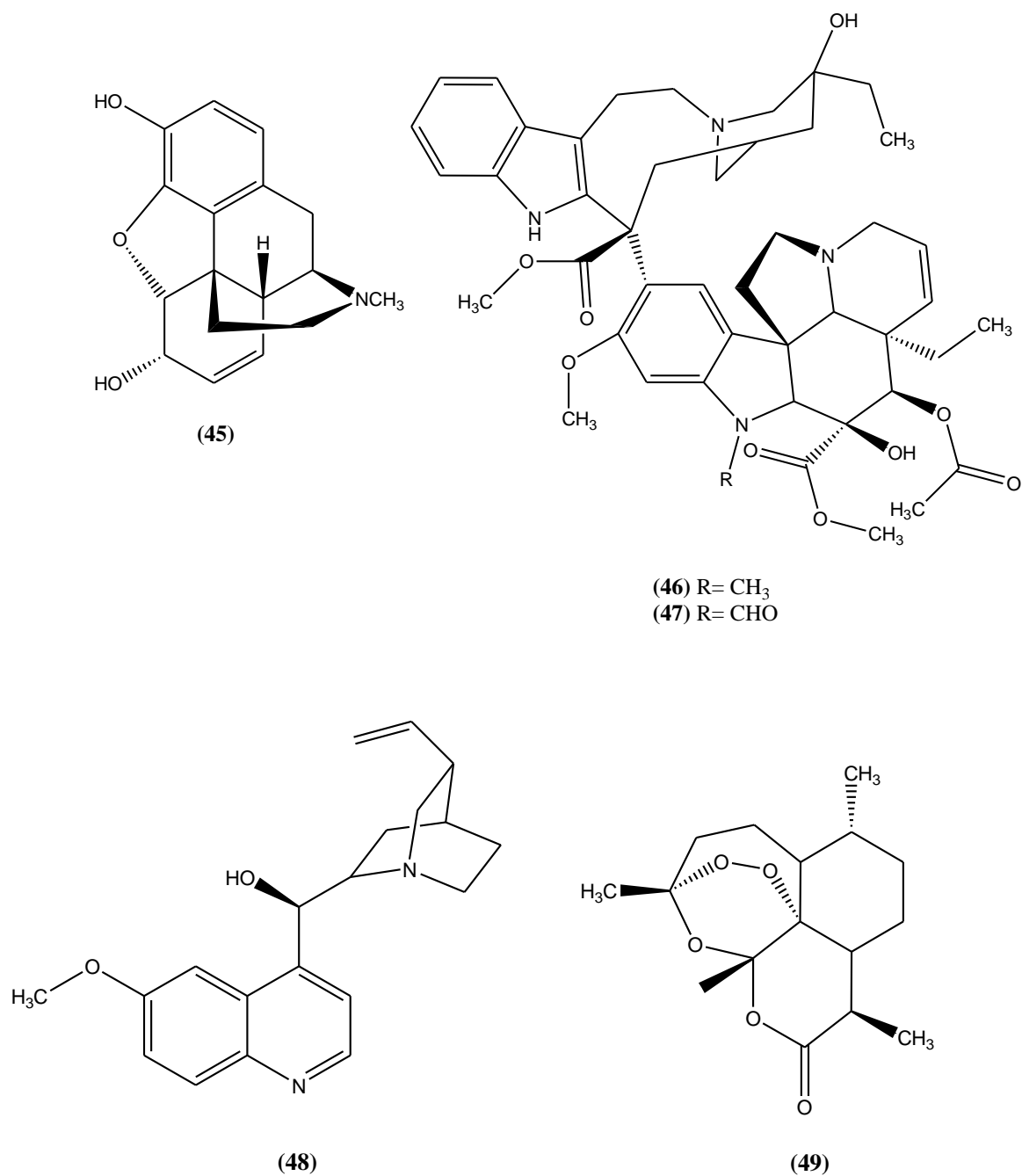
Os produtos naturais são amplamente definidos como um conjunto de pequenas moléculas produzidas por organismos vivos que não estão envolvidas com o metabolismo primário (PYE *et al.*, 2017; MUHAMMAD *et al.*, 2020). Esses compostos são produzidos pelo metabolismo secundário e utilizados pela humanidade para o tratamento medicinal desde os tempos imemoriais (DUTTA *et al.*, 2019).

Os primeiros registros do uso medicinal de plantas foram datados em 2600 a.C, e documentam o uso de extratos de plantas na Mesopotâmia. O registro mais conhecido da medicina egípcia é o “Papiro de Ebers” relatando o uso de mais de 700 remédios, a maioria a base de plantas. Da mesma forma, a Medicina Tradicional Chinesa e a Medicina Tradicional Indiana (Ayurveda) têm sido extensivamente documentadas ao longo dos séculos (CRAGG e NEWMAN, 2013).

No mundo ocidental antigo, os gregos contribuíram significativamente para o desenvolvimento racional do uso de plantas medicinais. Dioscórides, médico grego (100 d.C.) registrou durante suas viagens com o exército romano, a coleta, o armazenamento e o uso de ervas medicinais. Galeno (130-200 d.C.) professor de farmácia e medicina publicou 30 livros sobre prescrições e fórmulas complexas usadas na composição de medicamentos (GURIB-FAKIM, 2006; CRAGG e NEWMAN, 2013).

Os compostos derivados de plantas são atualmente empregados na terapia moderna e desempenham papel fundamental na síntese de moléculas mais complexas (DUTRA *et al.*, 2016). Esses compostos são utilizados como: i) fonte direta de agentes terapêuticos; ii) fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de drogas complexas, semi-sintéticas; iii) protótipos para o delineamento de moléculas; iv) como marcadores taxonômicos para descoberta de novos medicamentos (CALIXTO, 2019).

Diversos fármacos clinicamente utilizados são derivados de produtos naturais provenientes de plantas, dentre eles destaca-se a morfina (45), vimblastina (46), vincristina (47), quinina (48) e artemisinina (49) (Figura 9) (KINGSTON, 2011).

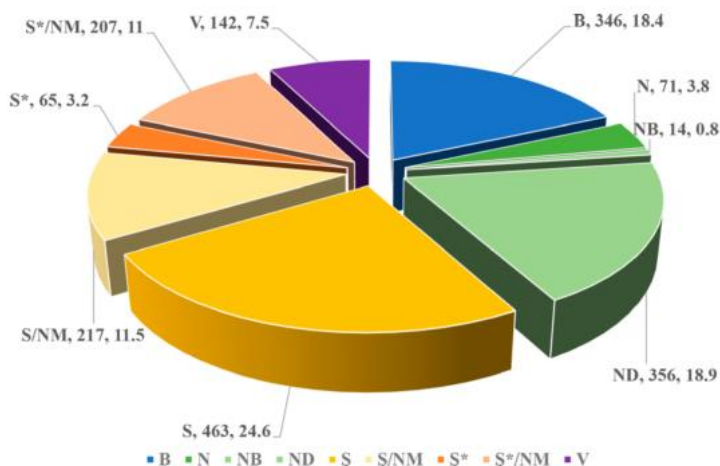


**Figura 9.** Exemplos de fármacos derivados de plantas. Adaptado de KINGSTON (2011).

No período de 1940 a 2020, a utilização de PNs e derivados representaram uma parte substancial no mercado farmacêutico e inúmeras publicações enfatizaram que os PNs continuam a desempenhar um papel altamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN e CRAGG, 2016; HASSAN *et al.*, 2019; NEWMAN e CRAGG, 2020). Vários medicamentos aprovados pela instituição regulatória FDA (Food and Drug Administration) dos EUA vieram direta ou

indiretamente de estudos com PNs, que fornecem ampla diversidade estrutural de novas entidades químicas (PATRIDGE *et al.*, 2016).

Newman e Cragg (2020) realizaram uma revisão abrangendo as fontes de agentes terapêuticos aprovados no período de 1 de janeiro de 1981 a 30 de setembro de 2019 (**Figura 10**) e reforçaram a contribuição dos PNs na descoberta e desenvolvimento de fármacos.



**Figura 10.** Medicamentos aprovados de 01 de janeiro de 1981 a 30 de setembro de 2019: B: agente biológico; N: produto natural; NB: produto natural “botânico”; ND: derivado de produto natural; S: totalmente sintético; S/NM: sintético que imita produto natural; S\*: síntese total, mas o farmacóforo é derivado de produto natural; S\*/NM: síntese total, mas o farmacóforo imita produto natural; V: vacina (NEWMAN e CRAGG, 2020).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, com mais de 50.000 espécies de plantas superiores (CALIXTO, 2019). O aproveitamento e exploração racional dessas espécies de plantas é alcançado através de estudos fitoquímicos e farmacológicos associados a ensaios biológicos que contribuem para a descoberta, confirmação de substâncias relatadas na literatura e identificação de novos compostos bioativos (SILVA *et al.*, 2010). Nesse cenário, destaca-se a Euphorbiaceae, uma das famílias mais ricas em número de espécies vegetais apresentando representantes em diferentes domínios fitogeográficos do Brasil.

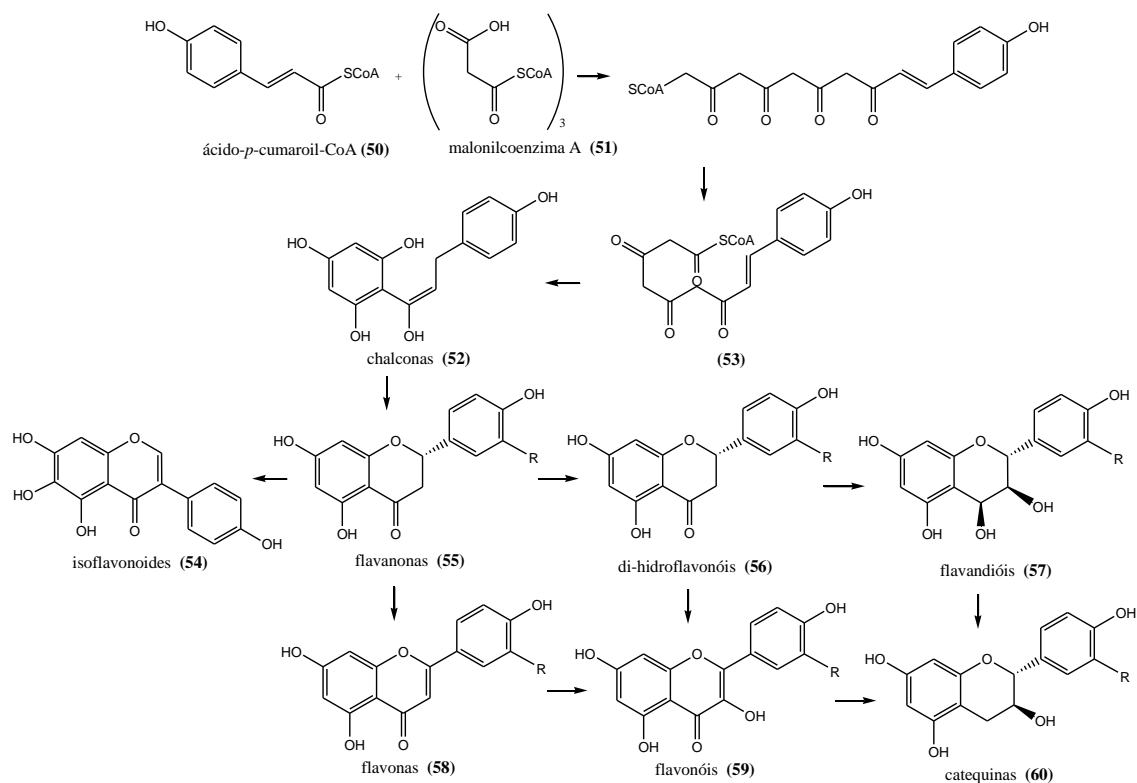
#### 1.4. Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos amplamente encontrados em plantas, possuem cerca de 9.000 compostos diferentes descritos na literatura e desempenham papel essencial em diversos processos biológicos. Esses metabólitos são considerados



biologicamente ativos por apresentarem efeito antioxidante, propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (PANCHE *et al.*, 2016; BAKER, 2022; SHEN *et al.*, 2022).

Os flavonoides são provenientes de biossíntese a partir da combinação de duas vias (chiquimato e acetato) que originam as diferentes formas de flavonoides (52-60) (HEINRICH *et al.*, 2012) (**Figura 11**).

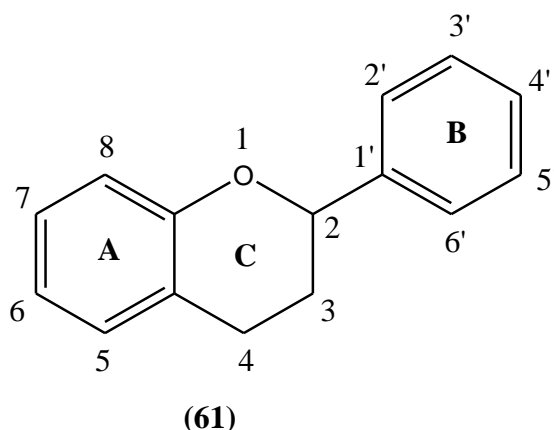


**Figura 11.** Biossíntese dos flavonoides. Adaptado de Heinrich *et al.*, 2012.

Os flavonoides que ocorrem como agliconas e glicosídeos constituem o principal grupo de compostos fenólicos presentes nas plantas e são responsáveis, junto aos carotenoides e as clorofilas, pelas cores azul, roxo, amarelo, laranja e vermelho nas plantas (EVANS, 2009; COSME *et al.*, 2020). Esses compostos também são alvo de estudos metabolômicos baseados em espectrometria de massa (EM) devidos as funções que exercem nas plantas e potenciais benefícios à saúde (AKIMOTO *et al.*, 2016).

Essa classe de compostos está envolvida em processos de adaptação das plantas durante condições de estresse, como proteção contra herbívoros e microrganismos e proteção contra a exposição à radiação UV e Visível, ação alelopática, atração de animais polinizadores e inibição de enzimas (SIMÕES *et al.*, 2017).

A estrutura química dos flavonoides é constituída por três anéis fenólicos formados por 15 carbonos (C6-C3-C6), que consiste em dois anéis aromáticos (denominados anéis A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico oxigenado (denominado anel C) (**Figura 12**) (CHÁVEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020).

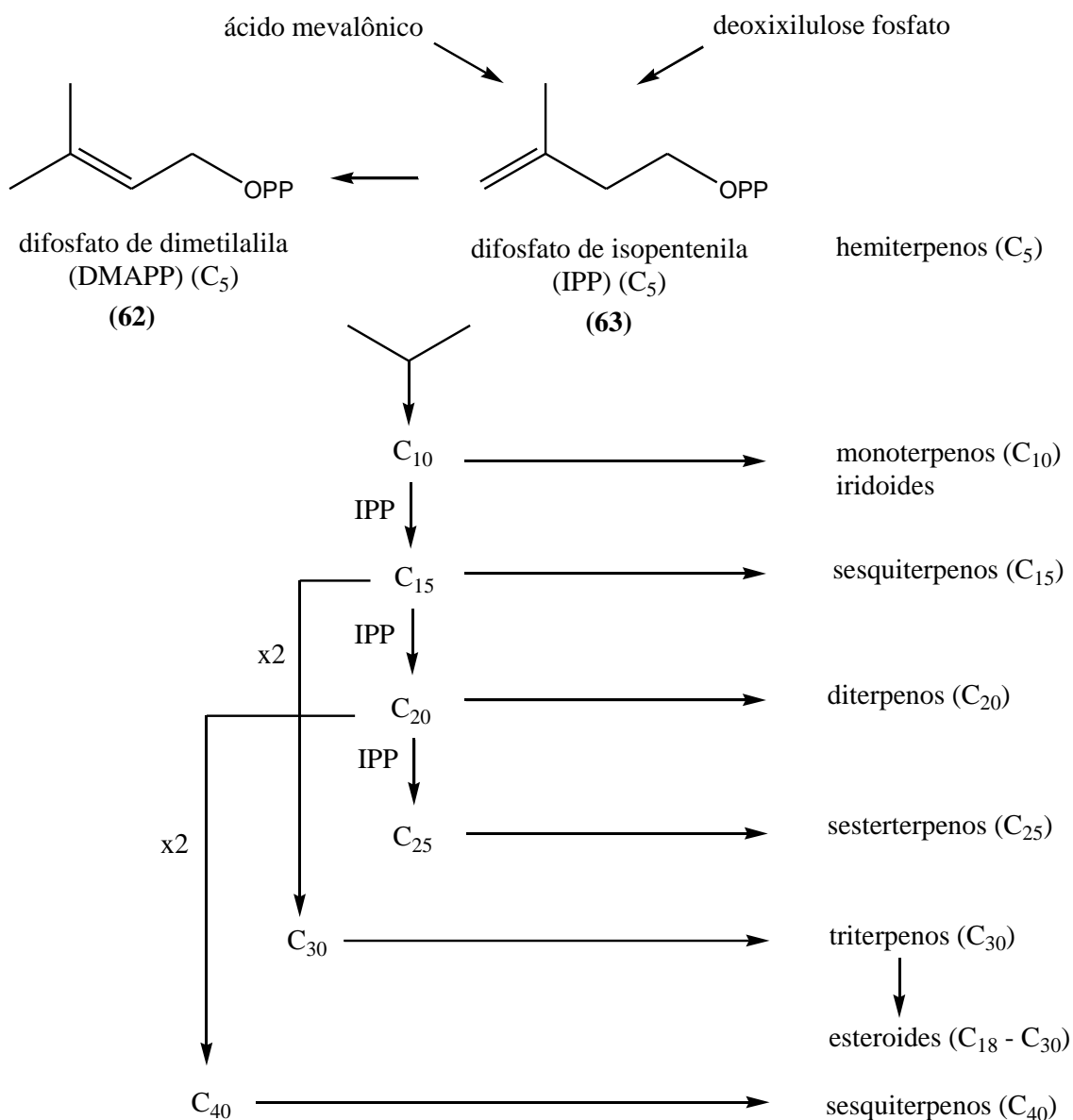


**Figura 12.** Esqueleto básico da estrutura dos flavonoides (VERRI JR. *et al.*, 2012).

As principais classes de flavonoides são chalconas (**52**), isoflavonas (**54**), flavanonas (**55**), flavonas (**58**), flavonóis (**59**), flavanonóis, flavan-3-ols, antocianidinas e auronas (VERRI JR. *et al.*, 2012). A classificação dos flavonoides é baseada no estado de oxidação e no padrão de substituição do anel heterocíclico central, enquanto os compostos individuais dentro de uma classe diferem no padrão de substituição dos anéis A e B.

### 1.5. Triterpenos e esteroides

Os terpenos constituem uma vasta classe de metabólitos secundários derivados de unidades de isoprênicas (C<sub>5</sub>) e biosintetizados através de duas rotas metabólicas: ácido mevalônico e desoxixilulose-fosfato. As estruturas que apresentam esqueletos de carbono (C<sub>5</sub>)<sub>n</sub> são classificadas como hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), esteroides (C<sub>18</sub>-C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>). A biossíntese dos terpenos ocorre a partir da conversão do difosfato de isopentenila (IPP) para difosfato de dimetalalila (DMAPP), reação catalisada por meio da isomerase do IPP (DEWICK, 2011; RENDA *et al.*, 2021) (**Figura 13**).



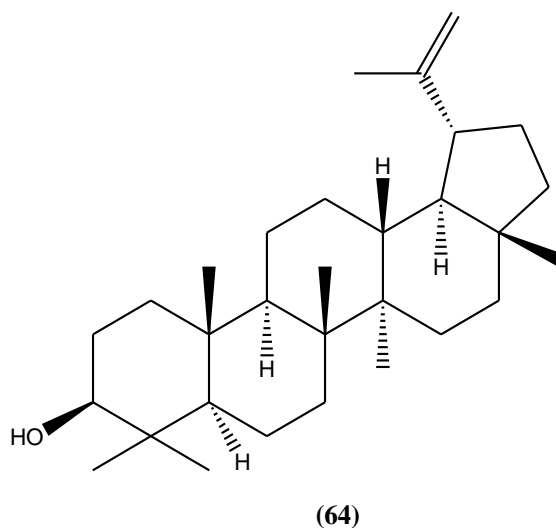
**Figura 13.** Uma visão geral da biossíntese dos terpenos a partir do difosfato de isopentenila (IPP). Adaptado de DEWICK, 2011.

As vias do mevalonato e do metileritritol fosfato são responsáveis pela biossíntese de terpenos e esteroides. Os triterpenos e esteroides são formados pela via do mevalonato, enquanto a maioria dos outros terpenos (C<sub>10</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>40</sub>) são derivados do metileritritol fosfato (DEWICK, 2011).

Os triterpenos são um dos grupos de metabólitos secundários mais abundantes, com mais de 14.000 estruturas conhecidas. Esses compostos desempenham funções importantes na defesa e no desenvolvimento das plantas (CÁRDENAS *et al.*, 2019). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado as diversas propriedades dos triterpenos, como

atividade anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, anti-aterosclerótica e antiviral (NAZARUK e KLUCZYK, 2015).

O lupeol (**Figura 14**), um triterpeno pentacíclico da classe dos lupanos, é encontrado em muitas plantas. Diversos estudos indicaram que o lupeol possui diversas atividades farmacológicas benéficas, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, antidislipidêmica e antimutagênica (TSAI *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Estrutura do lupeol. Adaptado de TSAI *et al.*, 2016.

Os esteroides podem ser considerados metabólitos dos triterpenos, uma vez que se originam do cicloartenol (derivado da ciclização do esqualeno), com a perda de três grupos metila (SIMÕES *et al.*, 2017). Os fitoesteróis, os compostos esteroides das plantas, são componentes estruturais das membranas biológicas e desempenham funções regulatórias importantes. Esses compostos são precursores dos hormônios vegetais, os brassinosteróides (BS), regulando o crescimento e o desenvolvimento das plantas; e estão diretamente envolvidos na transdução de sinal transmembrana por meio da formação de microdomínios lipídicos de membrana (VALITOVA *et al.*, 2016).

Os fitoesteróis são compostos por 27 a 29 átomos de carbono, diferenciando-se na configuração do esqueleto básico, na cadeia lateral ou por seus grupos polares. Mais de 250 fitoesteróis foram identificados, sendo os mais abundantes o campesterol, o estigmasterol e o sitosterol. Os esteroides podem ser encontrados em tecidos vegetais na forma livre e conjugada (FENG *et al.*, 2020). Estudos realizados *in vitro* e em animais mostram que estes compostos apresentam diversos efeitos biológicos tais como, atividade

quimiopreventiva, antioxidante, anti-inflamatória, anti-diabética, anti-aterosclerótica e cardioprotetora (SALEHI *et al.*, 2021).

## 1.6. Metabolômica de Plantas

A abordagem clássica na descoberta de PN bioativos geralmente começa com a triagem biológica de extratos brutos, seguida de procedimentos de fracionamento até o isolamento e a identificação do(s) composto(s) bioativo(s). No entanto, os processos clássicos de isolamento de PN são frequentemente demorados e muitas vezes ineficientes para descobrir novos compostos, levando ao re-isolamento e re-identificação de compostos conhecidos. A associação de ferramentas analíticas a tratamentos computacionais e estatísticos, conhecidas como ferramentas "ômicas", constitui um poderoso aliado para os químicos de produtos naturais (DEMARQUE *et al.*, 2020).

Os estudos metabolômicos são considerados uma das abordagens mais avançadas em relação ao mapeamento químico de um organismo da biodiversidade (FIEHN, 2002; BINO *et al.*, 2004 e FUNARI *et al.*, 2013). Estes estudos englobam a investigação de alterações metabólicas de diversos organismos em resposta aos diferentes fatores físicos (luz UV, calor, desidratação, clima, região, etc.), químicos (fármacos e agrotóxicos) ou biológicos (agentes patogênicos) (FUNARI *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2016, LIU e LOCASALE, 2017).

As estratégias de análise metabolômica podem ser divididas em abordagens não direcionadas (*untargeted*) e direcionadas (*targeted*) cada uma com suas vantagens e limitações. O experimento não direcionado concentra-se na análise simultânea de centenas a milhares de metabólitos de uma variedade de classes, presentes em uma amostra, incluindo compostos desconhecidos. Isso pode ser benéfico para a triagem de biomarcadores (ZAMBONI *et al.*, 2015; CAJKA e FIEHN, 2016).

Entretanto, os principais desafios dessa abordagem estão no tempo necessário para processar as extensas quantidades de dados brutos gerados, as dificuldades em identificar e caracterizar pequenas moléculas desconhecidas, a dependência da cobertura analítica intrínseca da plataforma empregada e a tendência para a detecção de moléculas abundantes (ROBERTS *et al.*, 2012).

Por outro lado, a metabolômica direcionada envolve a análise de um pequeno número de metabólitos quimicamente caracterizados e bioquimicamente selecionados. Através do uso de padrões internos, a análise pode ser realizada de maneira quantitativa

ou semi-quantitativa (ROBERTS *et al.*, 2012). Como a metabolômica direcionada envolve a detecção de um pequeno número de metabólitos com propriedades específicas, requer instrumentos altamente sensíveis e precisos, além de um bom conhecimento da natureza química dos metabólitos (RAI *et al.*, 2013).

Na pesquisa de produtos naturais, diferentes estratégias analíticas são usadas para determinar a composição química de uma amostra vegetal, incluindo a análise de metabólitos alvos (análise qualitativa e quantitativa de um ou poucos metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica), perfil metabólico (identificação e quantificação de certos metabólitos associados a uma via metabólica específica) e *fingerprinting* metabólico (uma análise rápida e global utilizada para classificar as amostras) (FIEHN, 2002; WECKWERTH e KAHL, 2013).

Inúmeros métodos analíticos têm sido utilizados para caracterização química de extratos vegetais, destacando-se os métodos de espectroscopia direta, como ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massa de alta resolução (EMAR). No entanto, devido à diversidade química dos produtos naturais, os metabólitos geralmente precisam ser separados por cromatografia antes da detecção. Neste sentido, a espectrometria de massa (EM) acoplada a cromatografia em fase gasosa ou líquida (CG-EM e CL-EM, respectivamente) tem sido utilizada amplamente (HALBWIRTH *et al.*, 2019).

### **1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectrometria de massas (EM)**

Diante da extensa diversidade de propriedades físico-químicas dos PNs houve a necessidade de utilizar diferentes técnicas analíticas e/ou a combinação entre elas, visando separação de compostos, reprodutibilidade e ampla cobertura do metaboloma (ASZYK *et al.*, 2018). A hifenação CLAE-EM facilita a análise de misturas complexas como em extratos vegetais, geralmente não requer etapas de derivatização e amostras de diferentes matrizes biológicas em faixas desiguais de concentração podem ser analisadas usando CLAE-EM (ALVAREZ-RIVERA *et al.*, 2019).

A ionização por eletrospray (IES) é a principal fonte de ionização usada em estudos metabolômicos empregando CLAE-EM. Essa técnica de ionização branda

apresenta capacidade de produzir um grande número de íons por meio da transferência de carga em solução e geralmente forma íons moleculares intactos que auxiliam na identificação inicial de uma amostra (ZHOU *et al.*, 2013).

As análises por IES podem ser realizadas nos modos de ionização positivo (IES<sup>+</sup>) e negativo (IES<sup>-</sup>), dependendo da polaridade da tensão aplicada. Os compostos básicos podem ser ionizados no IES<sup>+</sup> através da produção de adutos protonados ([M+H]<sup>+</sup>), enquanto compostos ácidos fornecem melhores espectros no IES<sup>-</sup> formando adutos desprotonados ([M-H]<sup>-</sup>) (ALLWOOD e GOODACRE, 2009; STECKEL e SCHLOSSER, 2019).

Os analisadores de massa mais empregados em CL-EM são os do tipo quadrupolo simples (Q), por tempo de voo (TOF), armadilha de íons (IT) e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR) (WU *et al.*, 2013). Cada um desses analisadores pode ser usado independentemente, ou podem ser acoplados em configurações híbridas, técnica descrita como espectrometria de massa sequencial (tandem mass spectrometry) (OLSHINA e SHARON, 2017).

A espectrometria de massas sequencial ou EM/EM refere-se à combinação de dois ou mais experimentos de espectrometria de massas. Em um experimento EM/EM os íons analisados em um primeiro estágio da análise (EM1) são submetidos a fragmentações, os produtos são coletados e analisados em um segundo estágio, o EM2 (GROSS, 2017). Os espectrômetros de massa sequenciais mais empregados incluem o Triplo Quadrupolo (QqQ ou TQ), Quadrupolo-Armadilha de íons Linear (Q-Trap), Triplo Quadrupolo Linear OrbiTrap (LTQ Orbitrap), Quadrupolo-Tempo-de-Voo (QTOF) (WU, 2013).

O avanço de técnicas analíticas hífenadas de separação e detecção, como CL-EM, permitiu a identificação estrutural de metabólitos secundários em misturas complexas e a obtenção do perfil metabólico de espécies vegetais, através de uma ferramenta conhecida como desrepliação, evitando o isolamento de compostos conhecidos na literatura, associada a pesquisa em bibliotecas de dados de espectrometria de massas (FRAIGE *et al.*, 2017).

## 1.8. Desrepliação

Cronologicamente, a utilização do termo “desrepliação” foi primeiramente relatada em 1978. No entanto, somente em 1993 que estudos começaram a ser implementados nesse campo e no final do século passado e início dos anos 2000, a desrepliação passou a ser utilizada em processos de triagem biológica, identificação taxonmica, com o auxílio de técnicas hifenadas como a CL-EM e implementação de bibliotecas e bases de dados de EM permitindo a busca de perfil metabólico, estruturas químicas e fórmulas moleculares de diversas substâncias (GAUDÊNCIO e PEREIRA 2015).

O perfil metabólico das plantas é quimicamente diversificado mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie vegetal. A abordagem clássica para a busca e descoberta de novas substâncias requer procedimentos demorados com etapas extenuantes e complexas de purificação, isolamento e elucidação estrutural, que por diversas vezes resultam na separação compostos conhecidos (HUBERT *et al.*, 2014). Algumas estratégias, como a desrepliação, surgiram visando acelerar a identificação de compostos presentes em um extrato vegetal ou fração purificada, minimizando tempo, esforço e custo (SILVA *et al.*, 2019).

O processo de desrepliação é usado para a identificação rápida de PNs conhecidos, além de ser importante para direcionar o isolamento de compostos bioativos de interesse. Essa abordagem faz uso de instrumentação analítica hifenada, cada uma com suas próprias vantagens, sensibilidade, resolução e escala, como CL-UV, CL-EM e CL-RMN, utilizando rotinas computacionais complexas associadas a bancos de dados para obter o perfil metabólico global de PNs (LANG *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2019).

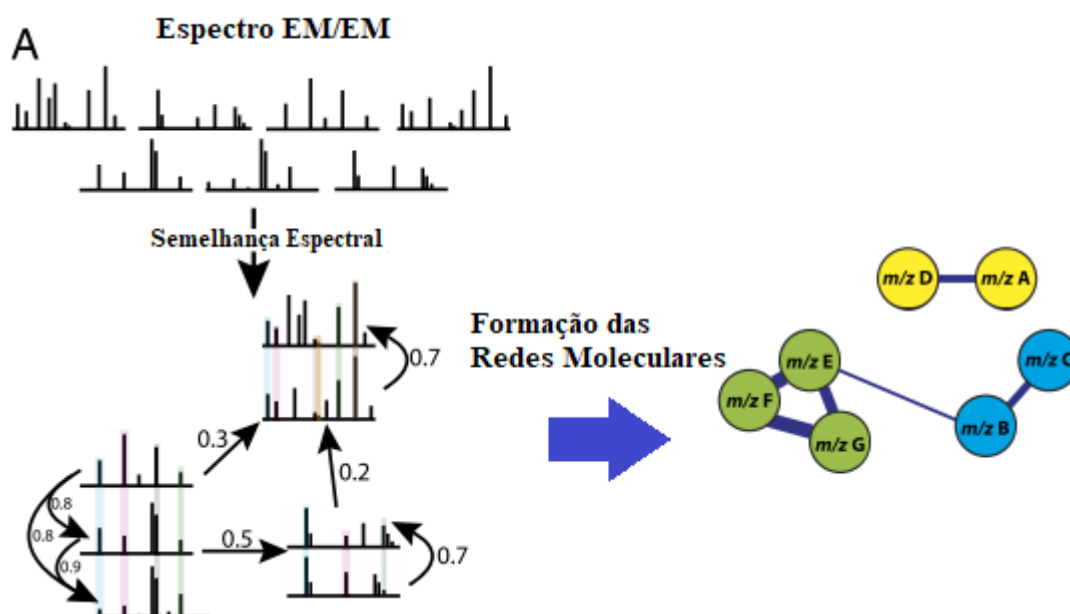
Como diversas plantas são reconhecidas por comunidades tradicionais devido a sua ação etnofarmacológica e/ou quimiopreventiva, a desrepliação pode fornecer informações químicas de extratos vegetais sem a necessidade do processo de isolamento, auxiliando na busca de novas substâncias bioativas (QIU *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2019). A identificação de moléculas conhecidas é observada pela comparação de dados espectrais obtidos em bases de dados, desenvolvidas para auxiliar no processo de desrepliação. Dentre as bases de dados mais relevantes e disponíveis, estão: MassBank, Metlin, Respect, NIST, PubChem e GNPS (YANG *et al.*, 2013; GAUDÊNCIO e PEREIRA 2015; ALLARD *et al.*, 2016; FOX RAMOS *et al.*, 2017).



## 1.9. Molecular Networking (MN)

*Molecular Networking* é uma abordagem organizacional moderna com exibição visual dos dados de espectrometria de massa sequencial (EM/EM). Foi introduzida em 2012 para a análise de metabólitos de um conjunto de colônias microbianas vivas, que permitiu o mapeamento da diversidade química dos micro-organismos através da EM não direcionada (WATROUS *et al.*, 2012).

O experimento de *MN* possibilita a análise metabolômica e a descoberta de novos compostos, com a visualização e interpretação de agrupamentos de compostos de acordo com semelhanças em padrões de fragmentação (**Figura 15**) (WATROUS *et al.*, 2012; QUINN *et al.*, 2017).



**Figura 15.** Representação esquemática de como as redes moleculares são geradas. Adaptado de WATROUS *et al.*, 2012.

O fundamento de *MN* é o alinhamento espectral em pares utilizando algoritmos de similaridade baseados em vetores denominados de *coseno* em combinação com bibliotecas espectrais para comparar o grau de similaridade entre os espectros EM/EM dos conjuntos de dados obtidos para uma determinada matriz. Os espectros de fragmentação EM/EM com valores idênticos ou deslocados pela mesma diferença de razão  $m/z$  são comparados com espectros de bases de dados, em seguida, ocorre o alinhamento dos espectros EM/EM e uma rede de relações espectrais é obtida formando o *MN*. Os agrupamentos resultantes do *MN* permitem a visualização, correlação e

comparação sistematizada de moléculas idênticas, análogos e famílias de compostos, acelerando o processo de desrepliação de produtos naturais (GUTHALS *et al.*, 2014; LYU *et al.*, 2019).

Embora diversos bancos de dados de PNs como, PN - Dicionário de Produtos Naturais, AntiBase e MarinLit auxiliem na desrepliação, esses recursos não estão disponíveis gratuitamente. As bases de dados MassBank, Metlin, mzCloud e ReSpec hospedam espectros de EM/EM mas apresentam limitação em relação as análises de espectros individuais e de arquivos CL-EM. Com o advento do *MN*, foi apresentado ao público a partir de 2013 a plataforma comunitária Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), para analisar dados de EM de produtos naturais (WANG *et al.*, 2016).

O GNPS é a maior plataforma de armazenamento, análise e disseminação de conhecimento para dados de espectrometria EM/EM, que permite o compartilhamento comunitário de espectros, anotação contínua de dados depositados e curadoria de espectros de referência (bibliotecas espectrais) e dados experimentais de extratos vegetais, culturas microbianas a uma variedade de amostras humanas e ambientais (WANG *et al.*, 2016; QUINN *et al.*, 2017).

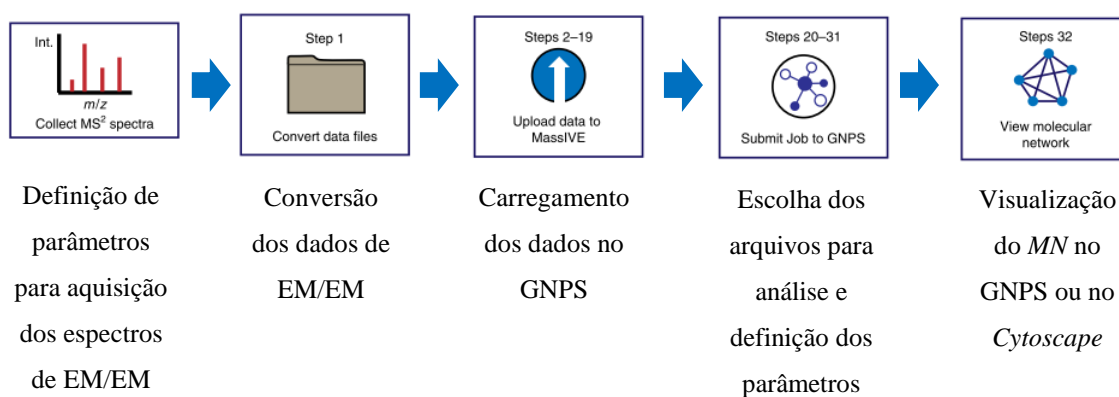
A plataforma apresenta a capacidade de analisar um conjunto de dados e efetuar a comparação com os dados disponíveis na biblioteca espectral, alimentada por mais de 3000 núcleos de CPU no Centro de Espectrometria de Massa Computacional da Universidade da Califórnia em San Diego (*UCSD*) (WANG *et al.*, 2016).

O *GNPS* fornece a pesquisadores de mais de 150 países a possibilidade de deposição de conjuntos de dados através do Repositório de Dados do Ambiente Virtual Interativo de Espectrometria de Massa (*MassIVE*), desenvolvido para facilitar e incentivar o intercâmbio de dados de EM, realizar a desrepliação online e a construção das RMs. Além disso, pode ser acessado em qualquer dispositivo conectado à internet, tornando qualquer conjunto de dados público e acessível para análise (WANG *et al.*, 2016; ARON *et al.*, 2020).

No processo de construção do *MN*, o GNPS utiliza o algoritmo *MS-Cluster* e alinha cada espectro EM/EM em um conjunto de dados e atribui uma pontuação, denominada cosseno (valor que representa a similaridade espectral de EM/EM entre dois nós em um *MN*, pontuação de cosseno igual a 1 representa espectros idênticos e igual a 0

indica nenhuma similaridade). As razões  $m/z$  idênticas e semelhantes são agrupadas utilizando o cosseno em um único agrupamento de consenso (nó) devido à similaridade de seus íons fragmentos. Cada espectro de consenso é consultado em bancos de dados da biblioteca espectral atribuindo-se uma molécula conhecida (ARON *et al.*, 2020).

Aron e colaboradores (2020) fornecem um protocolo para gerar um *MN*, de acordo com as seguintes etapas principais (**Figura 16**): (i) coleta dos dados de EM/EM, (ii) conversão dos arquivos de dados EM/EM para um formato apropriado, (iii) carregamento de dados no repositório público *MassIVE*, (iv) envio do trabalho “job” para a plataforma GNPS e visualização do *MN* obtido. A coleta e o processamento dos dados de EM/EM variam de acordo com o equipamento utilizado, há um protocolo de conversão dos dados para um formato adequado (.mzXML, .mzML ou .mgf) e a visualização da análise de *MN* geradas pelo GNPS pode ser visualizada no próprio navegador ou pelo software livre *Cytoscape*.



**Figura 16.** Fluxograma do protocolo para a construção de *MN*. Adaptado de ARON *et al.*, 2020.

### 1.10. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Análise de Componentes Principais (ACP)

Os dados de RMN e EM em combinação com análise multivariada são ferramentas importantes na avaliação qualitativa e quantitativa de compostos presentes em espécies vegetais e outros organismos (MAULIDIANI *et al.*, 2012). A quantificação de dados espectroscópicos utiliza abordagens capazes de analisar um conjunto de espectros simultaneamente. Entre os métodos desenvolvidos houve a aplicação da técnica estatística denominada análise de componentes principais (ACP) (STOYANOVA E BROWN, 2001).

*ACP* é uma técnica estatística (não supervisionada, ou seja, não requer conhecimento sobre o conjunto de dados) bem conhecida, que tem sido usada extensivamente para analisar, comparar conjuntos de dados, reduzir suas dimensões, e permitir a visualização de agrupamentos de similaridade ou diferença, identificando variações nos dados através dos componentes principais (PC1 e PC2). A *ACP* é exibida na forma gráfica como “*scores*” cada uma das PCs compreende parte da variância dos dados, com a representação desses dados em uma coordenada (STOYANOVA E BROWN, 2001; WARD *et al.*, 2007). O PC1 é utilizado para minimizar a distância total entre os dados e maximizar a variância dos pontos projetados, a PC2 seleciona os dados também de forma semelhante (LEVER *et al.*, 2017).

Assim como a espectrometria de massas a RMN de  $^1\text{H}$  desempenha um papel fundamental na metabolômica de amostras vegetais por proporcionar a aquisição de conjuntos de dados, oriundos de matrizes complexas para a obtenção de perfis metabólicos e possibilitando análises qualitativas e quantitativas com o uso de ferramentas estatísticas como a *ACP* usada para detectar áreas espectrais responsáveis pela separação dos dados analisados (CHOI *et al.*, 2004; WOLFENDER *et al.*, 2009).

### **1.11. Atividade Antibacteriana**

O controle de doenças infecciosas está ameaçado pelo aumento constante do número de microrganismos resistentes a agentes antimicrobianos (OKEKE *et al.*, 2005). A resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais é um problema de importância global (SABO e KNEZEVIC, 2019). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência aos antibióticos leva à custos médicos mais altos, internações hospitalares prolongadas e aumento da mortalidade. A resistência aos antibióticos ocorre quando bactérias se modificam em resposta ao uso desses medicamentos (WHO, 2019). Deste modo, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas terapias antibióticas.

A espécies vegetais são um potencial reservatório para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos para combater microrganismos resistentes a múltiplas drogas (ULLAH *et al.*, 2016). As propriedades antimicrobianas nas plantas são atribuídas à presença de compostos ativos, por exemplo, fenóis, alcaloides, flavonoides, quinonas,

terpenoides, óleos essenciais, taninos, lignanas dentre outros metabólitos secundários (CHANDRA *et al.*, 2017).

Vários métodos podem ser usados para determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato ou de um composto puro. Os métodos mais conhecidos e simples são de difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição em caldo (BALOUIRI *et al.*, 2016). Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), diversos estudos têm utilizado o método de microdiluição em placas, seguindo as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012) (MANETTI *et al.*, 2010; KOOLEN *et al.*, 2013; PARAGINSKI *et al.*, 2014; GARZON *et al.*, 2015).

No sentido de buscar contribuir para a análise metabolômica das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*, que apresentam pouco ou nenhum estudo fitoquímico e biológico descrito na literatura, decidiu-se investigar as diferenças entre os extratos dessas espécies por meio da ACP com dados de RMN de  $^1\text{H}$ , aplicar a desreplicação de compostos presentes nos extratos utilizando a ferramenta de MN, realizar o isolamento de substâncias e a análise da atividade antimicrobiana dos extratos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo químico das espécies pertencentes ao gênero *Cnidocolus* (*C. bahianus* (Ule) Pax & K.Hoffm, *C. urniger* (Pax) Pax, *C. vitifolius* (Mill.) Pohl), utilizar a abordagem de redes moleculares e analisar a atividade antibacteriana dos extratos afim de promover a contribuição metabolômica das espécies estudadas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Comparar os extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* através da análise quimiométrica de componentes principais (ACP);
- Realizar a desreplcação dos extratos das espécies de *Cnidocolus* através da análise dos dados de CLAE-IES-EM/EM pela plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS);
- Caracterizar o perfil químico dos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* por CLAE-IES-EM/EM;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*.
- Isolar e a identificar de metabólitos secundários presentes nas folhas de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* por ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional e espectrometria de massas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Instrumentação e solventes**

Na preparação dos extratos vegetais (partes aéreas e caule) foram utilizadas estufa de ventilação, moíno de facas e evaporador rotativo da marca IKA<sup>®</sup> RV10. Nos procedimentos cromatográficos utilizou-se solvente grau P.A. das marcas Synth, Neon e Biograde. As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas com solventes grau HPLC da J.T. Baker. Nas análises de ressonância magnética nuclear foram usados solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Cambridge Isotopes Laboratories Inc. (CIL).

#### **3.2. Procedimentos Cromatográficos**

As análises por cromatografia em camada delgada analítica e preparativa foram realizadas em placas de sílica gel 60 GF254 suportadas em alumínio e os reveladores usados nestas análises foram a luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) e vanilina sulfúrica. O fracionamento dos extratos e isolamento de compostos foram feitos com sílica gel 60 (70 – 230 mesh) e colunas de vidro com variação do diâmetro e altura conforme a massa da amostra.

#### **3.3. Análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

As amostras foram preparadas em  $\text{CDCl}_3$  e/ou  $\text{CD}_3\text{OD}$  com padrão interno referência TMS (0,05% v/v) no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás do IQ/UFG. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC e DOSY foram adquiridos no espectrômetro Bruker Avance III (500,13 MHz para  $^1\text{H}$  e com campo aplicado de 11,76 Tesla).

### **3.4. Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas por Ionização Eletrospray**

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo Scientific Q Exactive Focus CLUE-EM/EM, utilizando-se fonte de ionização HESI (com voltagem de 3500 V). Os espectros foram adquiridos no modo negativo e positivo de ionização em uma faixa entre  $m/z$  100 e  $m/z$  900 e temperatura do capilar de 320°C, acoplado a um sistema de UHPLC Dionex UltiMate 3000 no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFG (CRTI – UFG). Os perfis cromatográficos foram obtidos usando-se uma coluna ACE de fase reversa C18 (100 x 4,6 mm – 3,0  $\mu$ m) e como fase móvel foi usada uma mistura de acetonitrila (ACN) e água deionizada (acidificada com ácido fórmico 0,1% v/v) com fluxo de 1,0 mL/min. O método utilizado iniciou-se o gradiente com ACN/H<sub>2</sub>O (0:100) por 50 min, 60:40 por 10 min e 0:100 por 10 min esta proporção foi mantida até o final da corrida cromatográfica em 70 min. O preparo das amostras foi realizado em uma concentração de 1,0 mg/mL, dissolvidas em metanol e filtradas em filtros PVDF 0,45  $\mu$ m, com volume de injeção de 10  $\mu$ L para cada amostra.

### **3.5. Análise de amostra da espécie *C. bahianus* por CG-EM**

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada no Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) – Faculdade de Farmácia – UFG, em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GCMS-QP2010Plus (Shimadzu Corporation, Japão). A coluna utilizada no forno foi a DB-5MS (30 m x 0,25 mm id x 0,25  $\mu$ m; espessura de filme). As condições cromatográficas empregada foram as seguintes: temperatura inicial do forno de 100 °C e gradiente com 100 °C por 5 min; 8 °C/min até 300 °C e mantido por 8 min, totalizando 38 min, volume de injeção 1  $\mu$ L, injeção modo Splitless, a temperatura do injetor foi de 300 °C, gás de arraste (hélio) com fluxo de 1,0 mL/min. Os parâmetros operacionais do espectrômetro de massas foram os seguintes: temperatura da interface e da fonte de íons, 250 °C; ionização por impacto de elétrons, 70 eV; o intervalo de  $m/z$  50-800.



### **3.6. Análises dos extratos das folhas das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* por CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares**

Os extratos das folhas de *C. bahianus* (CBAEF, CBEF), *C. urniger* (CUMF) e *C. vitifolius* (CVAEF, CVEF) foram analisados por CLAE-IES-EM/EM. A rede molecular clássica foi criada na plataforma GNPS, utilizando-se os dados de CLAE-IES-EM/EM adquiridos nos modos negativo e positivo de ionização. As redes moleculares no modo clássico foram construídas utilizando o algoritmo fornecido pelo GNPS, o *MSCluster* (para a criação dos espectros de consenso), de acordo com os parâmetros: valores de tolerância de 1,0 para as massas do íon precursor e 0,05 para o íon fragmento. O valor da pontuação de cosseno foi mantido em 0,7 e no mínimo 5 íons fragmentos em comum. As redes moleculares foram visualizadas no software *Cytoscape* versão 3.7.2, style “ripple”, onde os espectros de massa dos íons precursores são representados por nós e as arestas (conexões) indicam o grau de similaridade entre os mesmos, dado pelo valor de cosseno.

### **3.7. Análise Quimiométrica dos dados de RMN dos extratos das folhas e caule das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius***

As amostras foram preparadas pela solubilização de 12,50 mg dos extratos e 500 µL de metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) em tubos concêntricos de 2 mL. Após 1 min de agitação em vórtex, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14500 RPM. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro e analisados imediatamente. Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H foram conduzidos no LabRMN do IQ-UFG utilizando um espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para o <sup>1</sup>H), equipado com sonda BBI (*Double Resonance Broadband*) para amostras em solução.

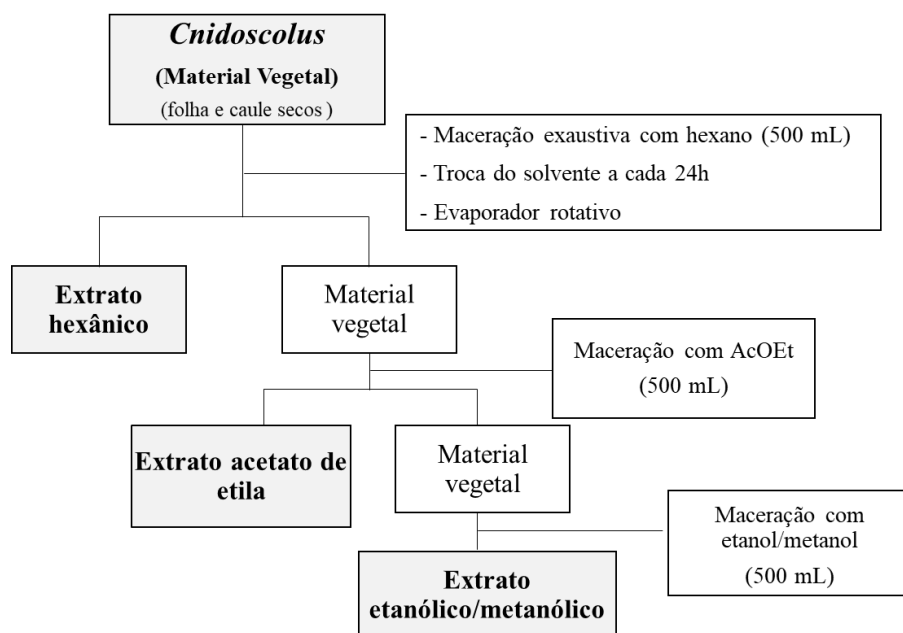
As análises foram realizadas a 25 °C e foram acumuladas 64 promediações (NS). A sintonia e a homogeneidade do campo magnético foram ajustadas automaticamente. Foi utilizada a sequência de pulsos *zgpr* para aquisição dos espectros com supressão do sinal da água, com um tempo de espera de 5 segundos. O ganho do receptor foi fixo em 64 para todas as amostras, para permitir a comparação das intensidades dos sinais. Os espectros foram adquiridos com 64 k pontos, numa janela espectral de 20 ppm, o que levou a um tempo de aquisição de 3,277 segundos. Experimentos 2D de HSQC-editado

e HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) foram realizados para auxiliar na identificação. O experimento de DOSY (*diffusion ordered spectroscopy*) foi realizado com gradiente de campo variando de 2 a 98%, com tempo de difusão (d20) de 80 ms e pulso de gradiente (p30) 1 ms.

Os espectros foram processados no *software TopSpin 4.0*. A fase e a linha de base foram ajustadas automaticamente e, quando necessário, manualmente. O espectro de difusão foi processado usando-se o software GNAT 1.2. Para a análise quimiométrica, os dados foram exportados com 16 k pontos e foram retiradas as regiões de ruídos, da água e do metanol, resultando em 7594 pontos. Os dados foram reduzidos a *buckets (bins)* de 10 variáveis gerando, assim, uma matriz de 760 variáveis e 8 amostras. As ACP foram feitas com os dados centrados na média, usando-se o software The Unscrambler.

### 3.8. Coleta do material vegetal e preparação dos extratos

O projeto de pesquisa foi cadastrado no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número de cadastro A4DFFBE. As folhas e caule de *C. bahianus* (CB) foram coletadas em 11 de janeiro de 2016 na cidade Tanque Novo/BA (saída da cidade para Botuporã), as folhas de *C. urniger* (CU) foram coletadas em 11 de janeiro de 2016, na cidade de Tanque Novo (BA 156) no Estado da Bahia e as folhas e caule de *C. vitifolius* (CV) foram coletadas em 10 de junho de 2017, na cidade de Acreúna/GO (25km de Santo Antônio da Barra, km 314, BR 060, às margens da rodovia) no Estado de Goiás, pela Dra. Cellini Castro de Oliveira. As espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. Marcos José da Silva do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Uma exsicata de cada foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, Unidade de Conservação, PRPPG, sob o número de registro 339 (*C. bahianus*), 338 (*C. urniger*) e 334 (*C. vitifolius*). Após a coleta, as partes aéreas foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C, por 24 horas. Após a secagem, foram trituradas e submetidas a extrações sucessivas do tipo maceração à temperatura ambiente, com renovação do solvente (hexano, acetato de etila, metanol e etanol) a cada 24 horas (**Figura 17**). Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida.



**Figura 17.** Fluxograma de obtenção dos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*.  
Fonte: autoria própria.

### 3.9. Análise Fitoquímica das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*

Os extratos (1 mg de amostra) das três espécies foram aplicados em placas cromatográficas de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> com suporte de alumínio e eluídos em diferentes sistemas de solventes conforme descrito por Wagner e Bladt (2001), para evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários (**Tabela 1**). As placas cromatográficas foram visualizadas em câmara de ultravioleta nos comprimentos de 254 e 365 nm.

**Tabela 1.** Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterização dos principais metabólitos secundários dos extratos de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* por cromatografia em camada delgada (WAGNER e BLADT, 2001). (continua)

<b>Grupo metabólico</b>	<b>Eluente</b>	<b>Revelador</b>
Alcaloides gerais	Tolueno:acetato de etila:dietilamina (70:20:10)	Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Anisaldeído-sulfúrico
Cumarinas	Tolueno:éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%)	KOH etanólico 10%

**Tabela 1.** (continuação)

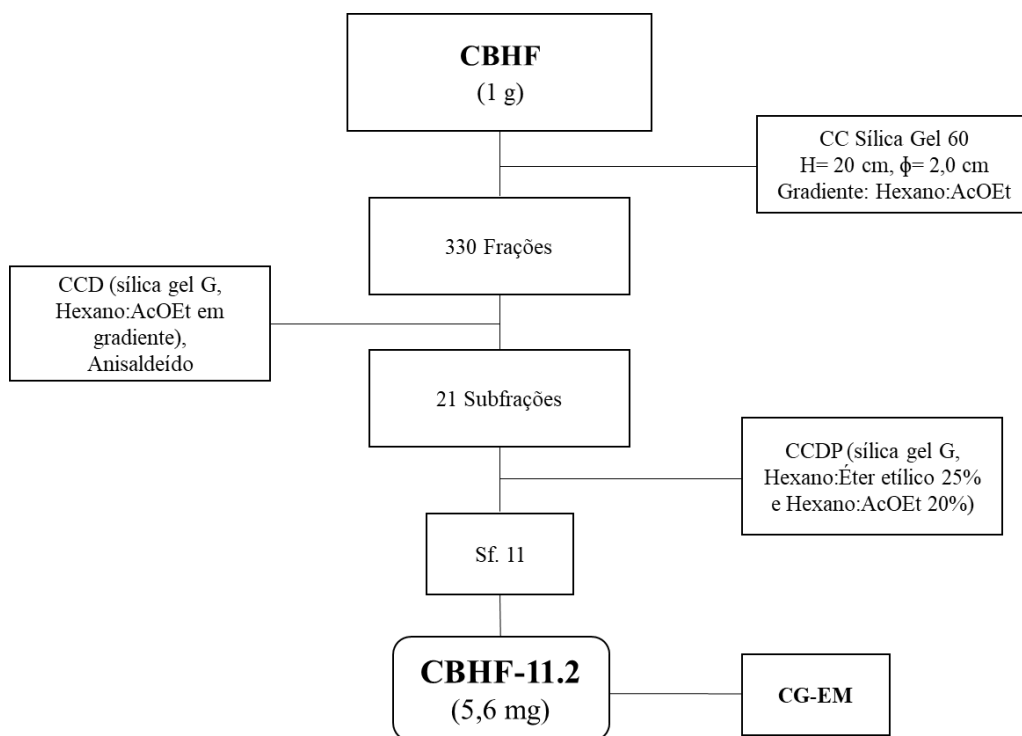
<b>Grupo metabólico</b>	<b>Eluente</b>	<b>Revelador</b>
Flavonoides	AcOEt:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Ácido bórico/Ácido cítrico
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica
Saponinas	Clorofórmio:ácido acético: metanol:água (64:32:12:8)	Anisaldeído-sulfúrico
Triterpenos e esteroides	Tolueno:clorofórmio:etanol (40:40:10)	Lieberman-Burchard

### **3.10. Estudo químico dos extratos de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius***

Os extratos das folhas e caules de *C. bahianus* (CBHF, CBAEF, CBEF, CBAEC, CBEC), *C. urniger* (CUMF, CUEC) e *C. vitifolius* (CUHF, CVAEF, CVEF) que apresentaram as maiores massas foram submetidos à cromatografia em coluna filtrante Sílica Gel 60. As amostras, CBHF e CUMF, apresentaram separação de compostos e foram submetidas a novas purificações.

#### **3.10.1. Estudo químico do extrato hexânico das folhas de *C. bahianus* (CBHF)**

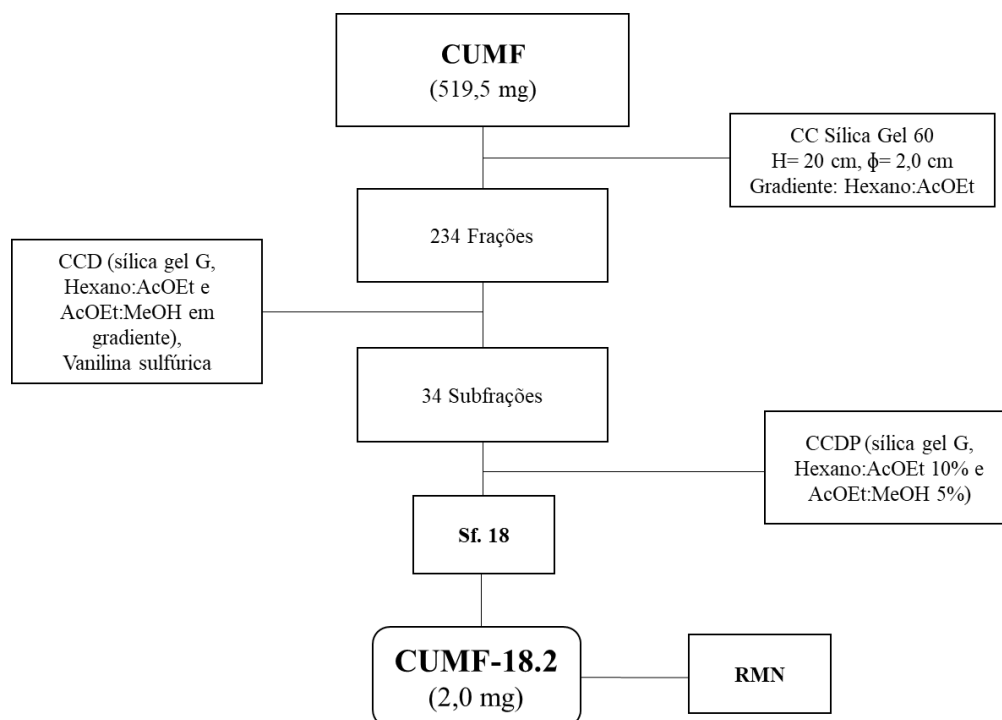
Uma alíquota do extrato CBHF (1 g) foi submetida à cromatografia em coluna filtrante, utilizando Sílica Gel 60 (70 - 230 mesh) como fase estacionária e hexano e acetato de etila em gradiente (0 a 100% acetato de etila), obtendo 330 frações de aproximadamente 10 mL cada coletadas manualmente. As frações foram analisadas por CCD usando como fase móvel a mistura de hexano:AcOEt em gradiente crescente de polaridade e reunidas em 21 subfrações de acordo com os perfis cromatográficos. A subfração Sf. 11 foi submetida a CCDP e analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e CG-EM, resultando no isolamento de uma mistura de esteroides em **CBHF-11.2**. No esquema apresentado na **Figura 18** é mostrado o procedimento experimental para a obtenção da mistura de esteroides **CBHF-11.2**.



**Figura 18.** Fluxograma de isolamento da mistura de esteroides CBHF-11.2 da espécie *C. bahianus*.

### 3.10.2. Estudo químico do extrato metanólico das folhas de *C. urniger* (CUMF)

Uma alíquota do extrato CUMF (519,5 mg) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando Sílica Gel 60 (70 - 230 mesh) como fase estacionária e hexano e acetato de etila em gradiente (0 a 100 % acetato de etila e 95 % acetato de etila a 20 % metanol), obtendo 234 frações de aproximadamente 10 mL cada coletadas manualmente. As frações foram analisadas por CCD usando como fase móvel a mistura de hexano:AcOEt e AcOEt:MeOH e reunidas em 34 subfrações de acordo com os perfis cromatográficos. A subfração Sf. 18 foi submetida a CCDP e analisada por RMN 1D e 2D, resultou no isolamento do esteroide **CUMF-18.2**. No esquema apresentado na **Figura 19** é mostrado o procedimento experimental para a obtenção de **CUMF-18.2**.



**Figura 19.** Fluxograma de isolamento do esteroide CUMF-18.2 da espécie *C. urniger*.

### 3.11. Ensaio Antimicrobiano dos extratos das folhas e caule de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* frente aos microorganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados na Universidade CEUMA – São Luís do Maranhão. A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo, descrito pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em condições de aerobiose. Os extratos foram diluídos de forma seriada e distribuídos em poços de microplaca (TPP, Suíça). No primeiro poço foram adicionados 150 µL do caldo de Mueller-Hinton e 50 µL de cada extrato. Foram testadas concentrações variando de 50 a 0,098 mg/mL. Posteriormente foram inoculados 10 µL da suspensão do microrganismo teste (*Escherichia coli* 042 ou *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), com turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland. As placas foram incubadas a 35°C por 24h. O teste foi realizado em triplicata. Após o período de incubação foram adicionados 50 µL do indicador de óxido-redução resazurina sódica (Sigma-Aldrich®; 0,03%). Após incubação por 40 minutos, alterações da cor azul para a cor rósea foram consideradas como crescimento microbiano. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o metabolismo bacteriano.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 2** são apresentadas as massas do material vegetal e rendimentos dos extratos das folhas e caule obtidos nas extrações com diferentes solventes, conforme os dados relacionados na **Figura 17** (página 31), para as três espécies de *Cnidoscolus* à temperatura ambiente. Os rendimentos dos extratos obtidos podem ter sido influenciados por diversos fatores como a quantidade de material vegetal pulverizado, constituição química da planta, método extrativo e a polaridade dos solventes utilizados.

**Tabela 2.** Massa e rendimento dos extratos obtidos das folhas e caule de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*.

Espécie	Massa do material vegetal pulverizado	Extratos	Massa dos extratos (g) (Rendimento %)
<i>Cnidoscolus bahianus</i>	21,8655 g (folha)	<b>CBHF</b>	1,6821 (7,69)
		<b>CBAEF</b>	0,7208 (3,30)
		<b>CBEF</b>	0,1798 (0,82)
	88,9258 g (caule)	<b>CBHC</b>	1,3786 (1,55)
		<b>CBAEC</b>	1,4057 (1,58)
		<b>CBEC</b>	1,1290 (1,27)
<i>Cnidoscolus urniger</i>	72,4043 g (folha)	<b>CUMF</b>	25,4560 (35,16)
		<b>CUHC</b>	1,8581 (4,29)
	43,3209 g (caule)	<b>CUAEC</b>	0,6914 (1,60)
		<b>CUEC</b>	1,5710 (3,63)
<i>Cnidoscolus vitifolius</i>	91,7795 g (folha)	<b>CVHF</b>	4,5098 (4,91)
		<b>CVAEF</b>	2,8049 (3,06)
	150,0000 g (caule)	<b>CVEF</b>	2,8970 (3,16)
		<b>CVEC</b>	11,3185 (7,55)

Legenda: Folhas de *C. bahianus*: CBHF – extrato hexânico, CBAEF – extrato acetato de etila, CBEF – extrato etanólico; Caule de *C. bahianus*: CBHC – extrato hexânico, CBAEC – extrato acetato de etila, CBEC – extrato etanólico; Folhas de *C. urniger*: CUMF – extrato metanólico; Caule de *C. urniger*: CUHC – extrato hexânico, CUAEC – extrato acetato de etila, CUEC – extrato etanólico; Folhas de *C. vitifolius*: CVHF – extrato hexânico, CVAEF – extrato acetato de etila, CVEF – extrato etanólico; Caule de *C. vitifolius*: CVEC – extrato etanólico.

#### 4.1. Análise fitoquímica dos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*

A análise fitoquímica preliminar dos extratos (**Tabela 3**) das três espécies indicou a presença de metabólitos secundários relevantes para o gênero *Cnidoscolus*, como, antocianinas, cumarinas, flavonoides, terpenos (mono, sesqui e diterpenos), saponinas, triterpenos e esteroides. Os extratos das espécies analisadas apresentaram perfis fitoquímicos semelhantes em relação as classes de metabólitos avaliadas e não houve a detecção da classe química alcaloides em nenhum dos extratos.

**Tabela 3.** Resultado da triagem fitoquímica realizada nos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*.

Grupo metabólico	<i>C. bahianus</i>						<i>C. urniger</i>				<i>C. vitifolius</i>			
	CBHF	CBAEF	CBEF	CBHC	CBAEC	CBEC	CUMF	CUHC	CUAEC	CUEC	CVHF	CVAEF	CVCF	CVEC
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Cumarinas	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Flavonoides	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Mono, sesqui e diterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos e esteróides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Legenda:** - = ausência; + = presença

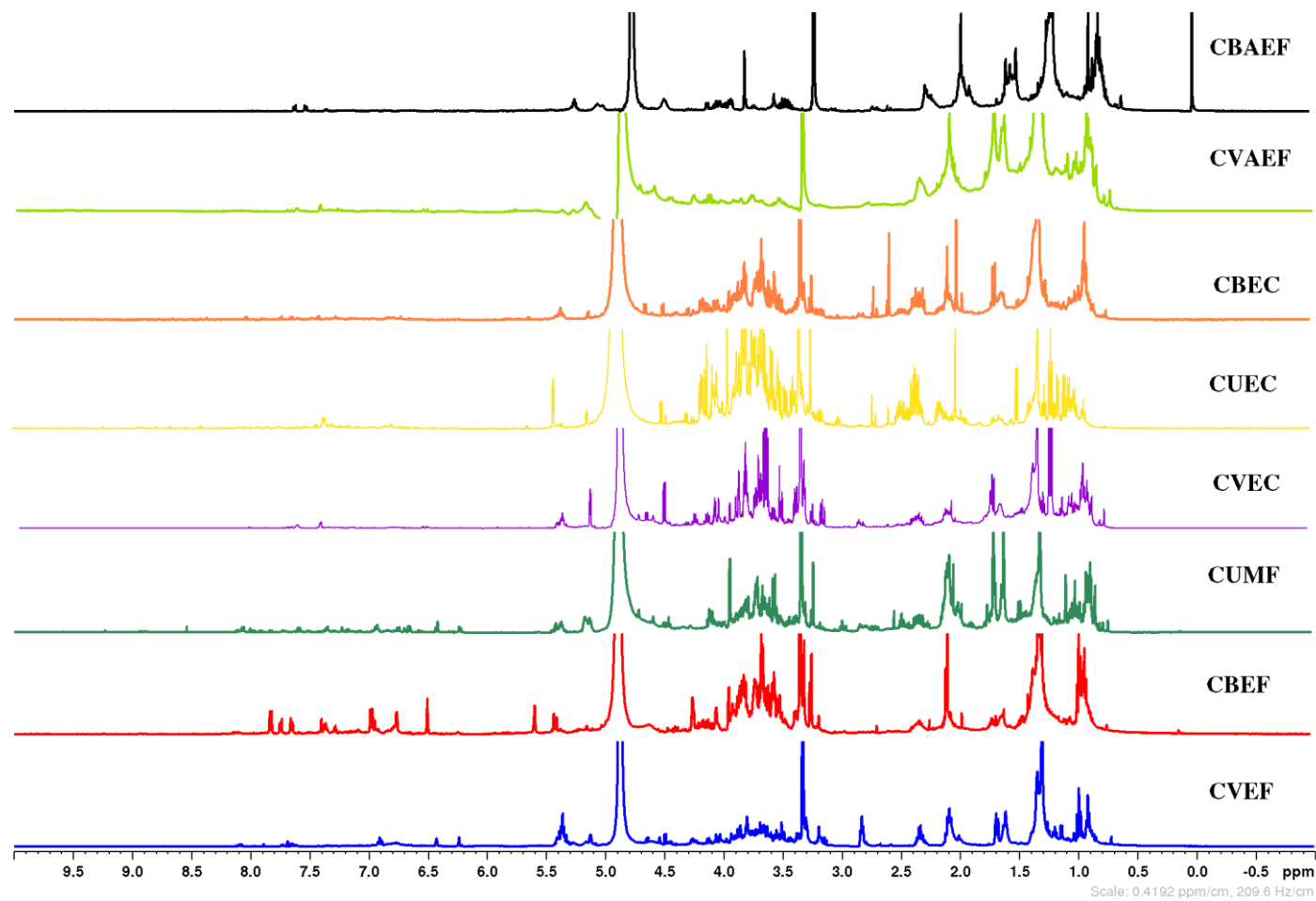
Um número limitado de espécies do gênero *Cnidoscolus* tiveram seus estudos fitoquímicos descritos na literatura, entre os estudos químicos realizados envolvendo as *Cnidoscolus*, pode-se encontrar substâncias bioativas em diferentes partes destas plantas. As classes químicas flavonoides, mono, sesqui e diterpenos, triterpenos, saponinas,



cumarinas e esteroides (YUAN *et al.*, 2007; PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2012; PAULA *et al.*, 2016; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018) se destacam e são consideradas comuns para o gênero, fato que corrobora com o resultado de caracterização fitoquímica observado neste trabalho. Em razão da similaridade verificada entre os extratos quanto a análise fitoquímica realizou-se a análise de componentes principais para os extratos obtidos em acetato de etila, etanol e metanol.

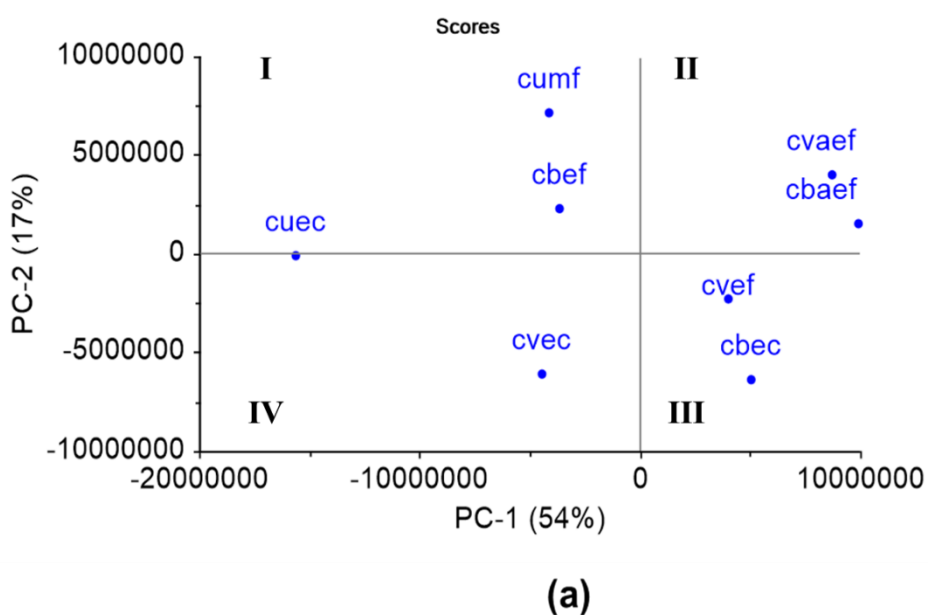
#### **4.2. Análise de componentes principais (ACP) dos extratos das folhas e caule de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius***

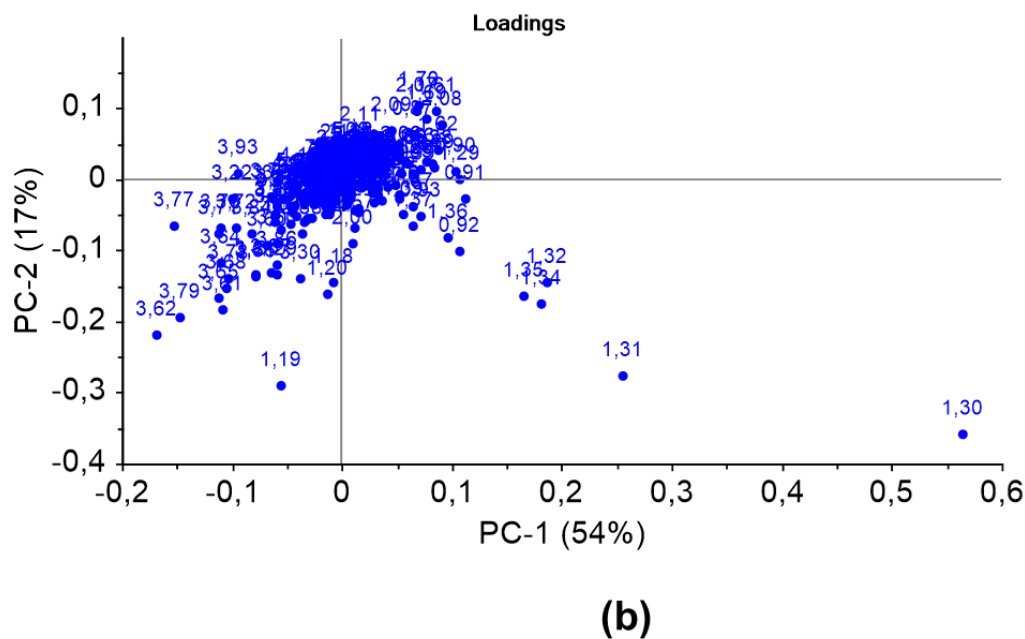
O progresso recente no estudo metabolômico de plantas tem sido auxiliado pelo desenvolvimento de técnicas de análise e elucidação estrutural como a RMN e a vasta quantidade de dados produzidos por esta técnica resultou no aumento do uso de algoritmos que possibilitam a interpretação dos mesmos, como a análise de componentes principais (ACP) (ROCHA *et al.*, 2018). Considerando a análise fitoquímica preliminar realizada (**Tabela 3**) e o perfil químico dos extratos das espécies de *Cnidocolus* (CBAEF, CBEF, CBEC, CUMF, CUEC, CVAEF, CVEF e CVEC) obtidos com a utilização da técnica de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 20** e **Apêndice B**, página 114), foi realizada a análise quimiométrica destes dados para auxiliar na comparação dos extratos.



**Figura 20.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) dos extratos das folhas e caules das espécies de *Cnidocolus*. Legenda: CBAEF- extrato acetato de etila das folhas de *C. bahianus*, CBEF- extrato etanólico das folhas de *C. bahianus*, CBEC- extrato etanólico do caule *C. bahianus*, CUMF- extrato metanólico das folhas de *C. urniger*, CUEC- extrato etanólico do caule de *C. urniger*, CVAEF- extrato acetato de etila das folhas de *C. vitifolius*, CVEF- extrato etanólico das folhas de *C. vitifolius*, CVEC- extrato etanólico do caule de *C. vitifolius*.

A ACP é uma análise quimiométrica não-supervisionada de reconhecimento de padrões e a tendência de agrupamento de dados encontrando similaridades ou diferenças que permitem avaliar e visualizar variações contidas em grupos de amostras (LEVER *et al.*, 2017). No gráfico de scores da PC1 x PC2 (**Figura 21**) observou-se uma variância de 71% (54% PC1 e 17% PC2). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos revelaram semelhanças em relação ao perfil químico e formaram os agrupamentos: CBEF e CUMF (**I**), CBAEF e CVAEF (**II**) e CBEC e CVEF (**III**) (**Figura 21a**) e apresentaram a maior variância dos dados devido às diferenças nas intensidades dos sinais com deslocamentos químicos em 1,30 ppm (sinal característico de hidrogênios de grupo metileno -  $\text{CH}_2$ , comum em extratos de plantas) e 3,77 ppm (sinal característico de hidrogênios carbinólicos de carboidratos) em relação as amostras CVEC e CUEC que se mostraram mais dispersas. As amostras CBAEF e CVAEF exibiram menores quantidades de sinais na região característica de hidrogênios de carboidratos por serem amostras menos polares, ao contrário da amostra CUEC, extrato polar, apresentou menor quantidade de sinais em 1,30 ppm, conforme observado na **Figura 20**.

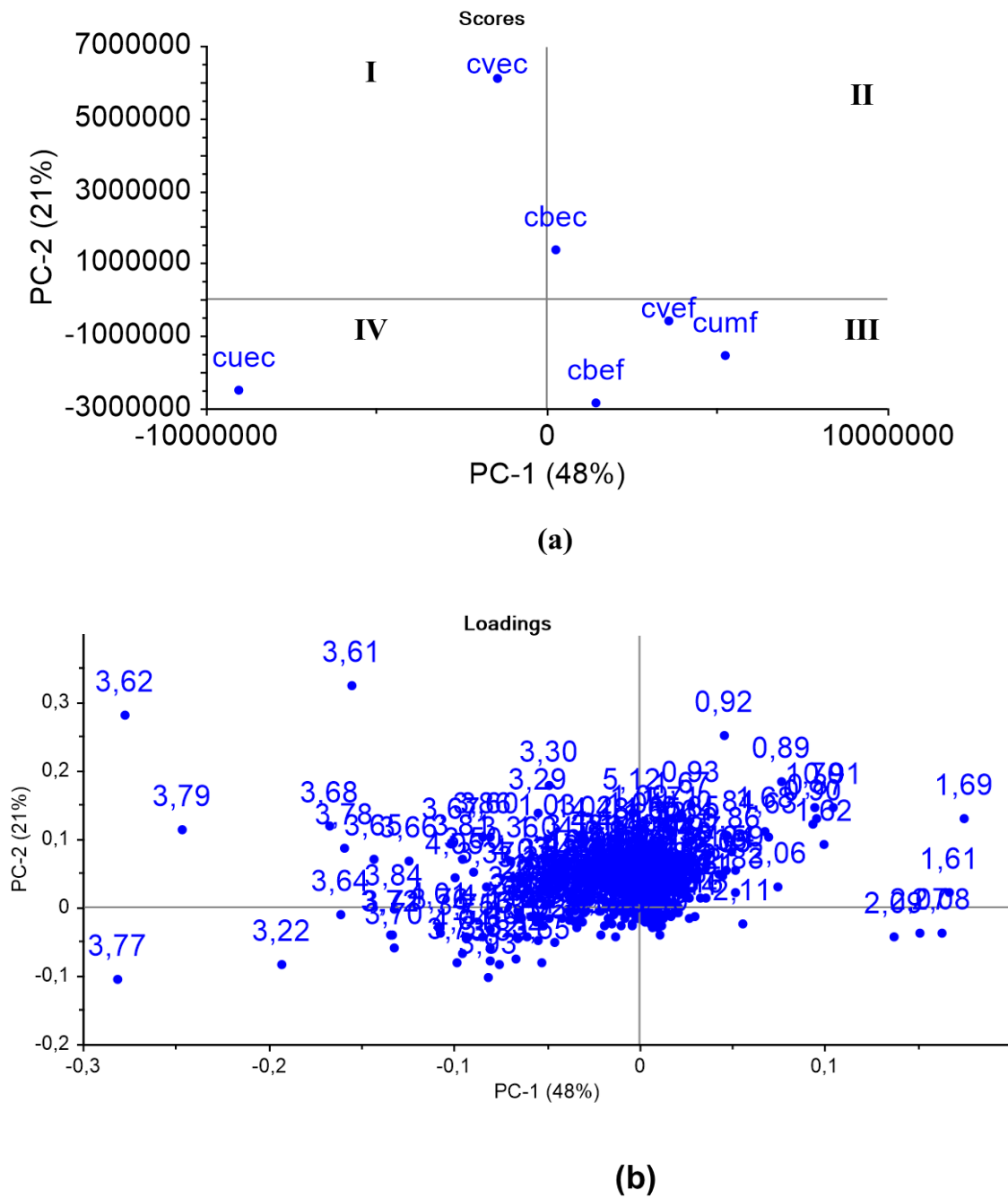




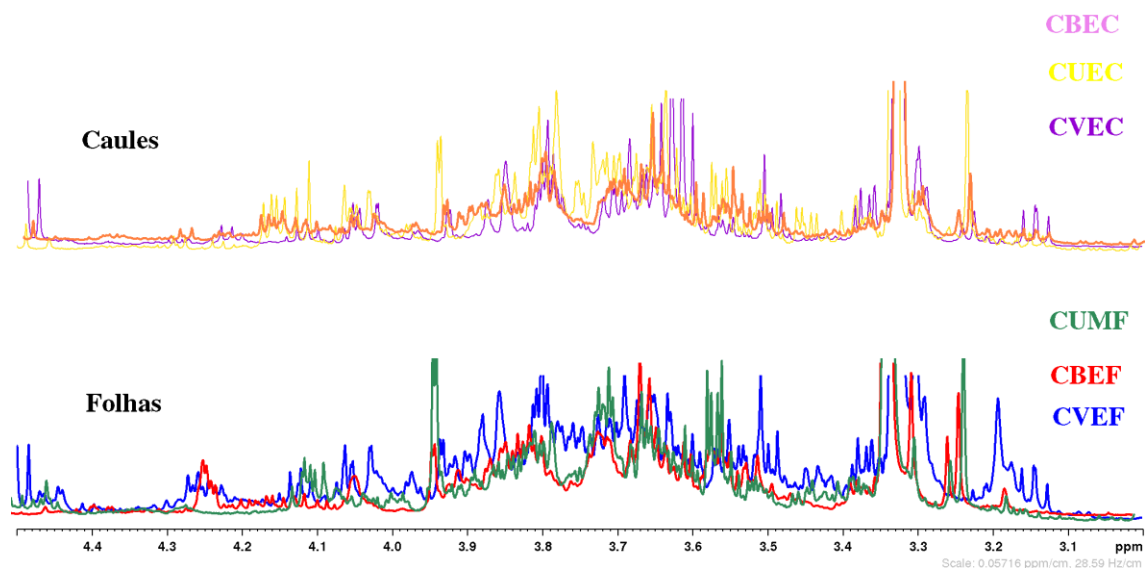
**Figura 21.** Gráfico de *scores* (a) e *loadings* (b) da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos das folhas e caule das espécies de *Cnidoscopus*. Legenda: CBAEF- extrato acetato de etila das folhas de *C. bahianus*, CBEF- extrato etanólico das folhas de *C. bahianus*, CBEC- extrato etanólico do caule *C. bahianus*, CUMF- extrato metanólico das folhas de *C. urniger*, CUEC- extrato etanólico do caule de *C. urniger*, CVAEF- extrato acetato de etila das folhas de *C. vitifolius*, CVEF- extrato etanólico das folhas de *C. vitifolius*, CVEC- extrato etanólico do caule de *C. vitifolius*.

Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos das espécies de *Cnidoscopus* foram definidos segundo as regiões em  $\delta_{\text{H}}$  0 a 1,5 (sinais atribuídos aos hidrogênios de grupos alifáticos),  $\delta_{\text{H}}$  3,0 a 5,0 (sinais característicos de hidrogênios carbinólicos de carboidratos),  $\delta_{\text{H}}$  6,0 a 8,0 (sinais característicos de hidrogênios aromáticos). As diferenças observadas nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 20**) se devem à polaridade dos solventes utilizados, metanol e etanol extraíram maior quantidade de compostos aromáticos, em relação aos extratos obtidos em acetato de etila.

Por esse motivo, uma nova *ACP* foi construída retirando-se os dados espectrais dos extratos obtidos em acetato de etila e os sinais próximos a  $\delta_{\text{H}}$  1,30 dos extratos obtidos em metanol e etanol. No gráfico de *scores* da PC1 x PC2 (**Figura 22**) observou-se uma variância dos dados de 69% (48% PC1 e 21% PC2). Os extratos do caule mostraram-se mais dispersos, enquanto, os extratos das folhas se agruparam em III (**Figura 22**), por possuírem maior teor de carboidratos, com deslocamentos próximos a  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (**Figura 23**).

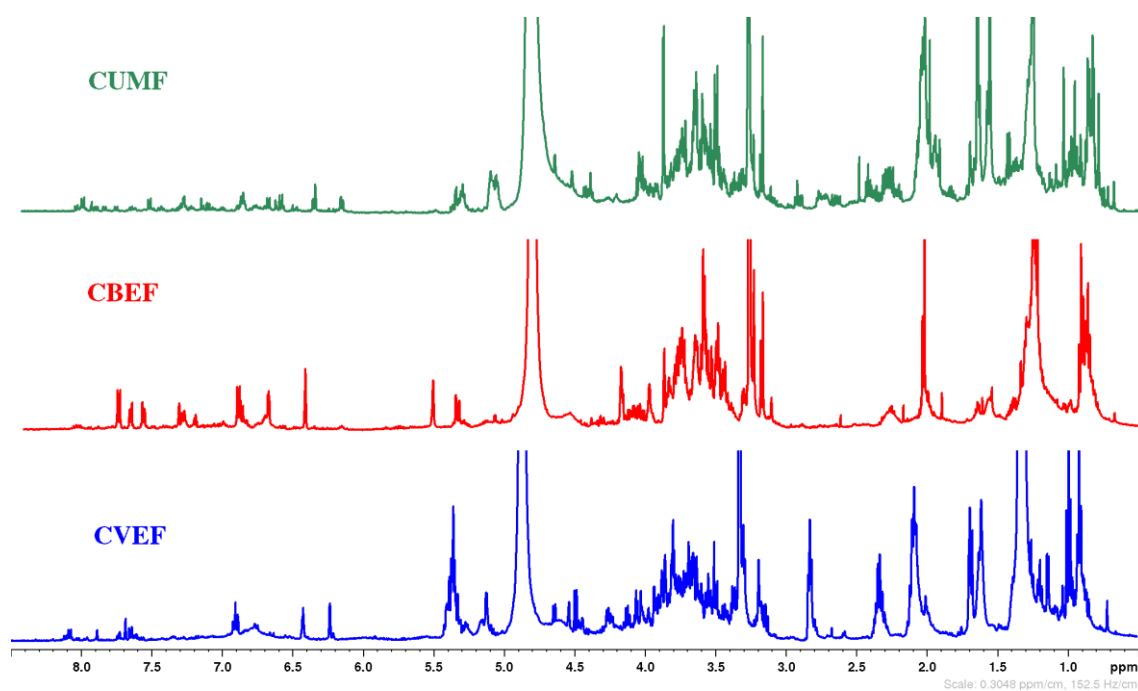


**Figura 22.** Gráfico de *scores* (a) e *loadings* (b) da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos metanólico e etanólico das espécies de *Cnidoscopus*. Legenda: CBAEF- extrato acetato de etila das folhas de *C. bahianus*, CBEF- extrato etanólico das folhas de *C. bahianus*, CBEC- extrato etanólico do caule *C. bahianus*, CUMF- extrato metanólico das folhas de *C. urniger*, CUEC- extrato etanólico do caule de *C. urniger*, CVAEF- extrato acetato de etila das folhas de *C. vitifolius*, CVEF- extrato etanólico das folhas de *C. vitifolius*, CVEC- extrato etanólico do caule de *C. vitifolius*.



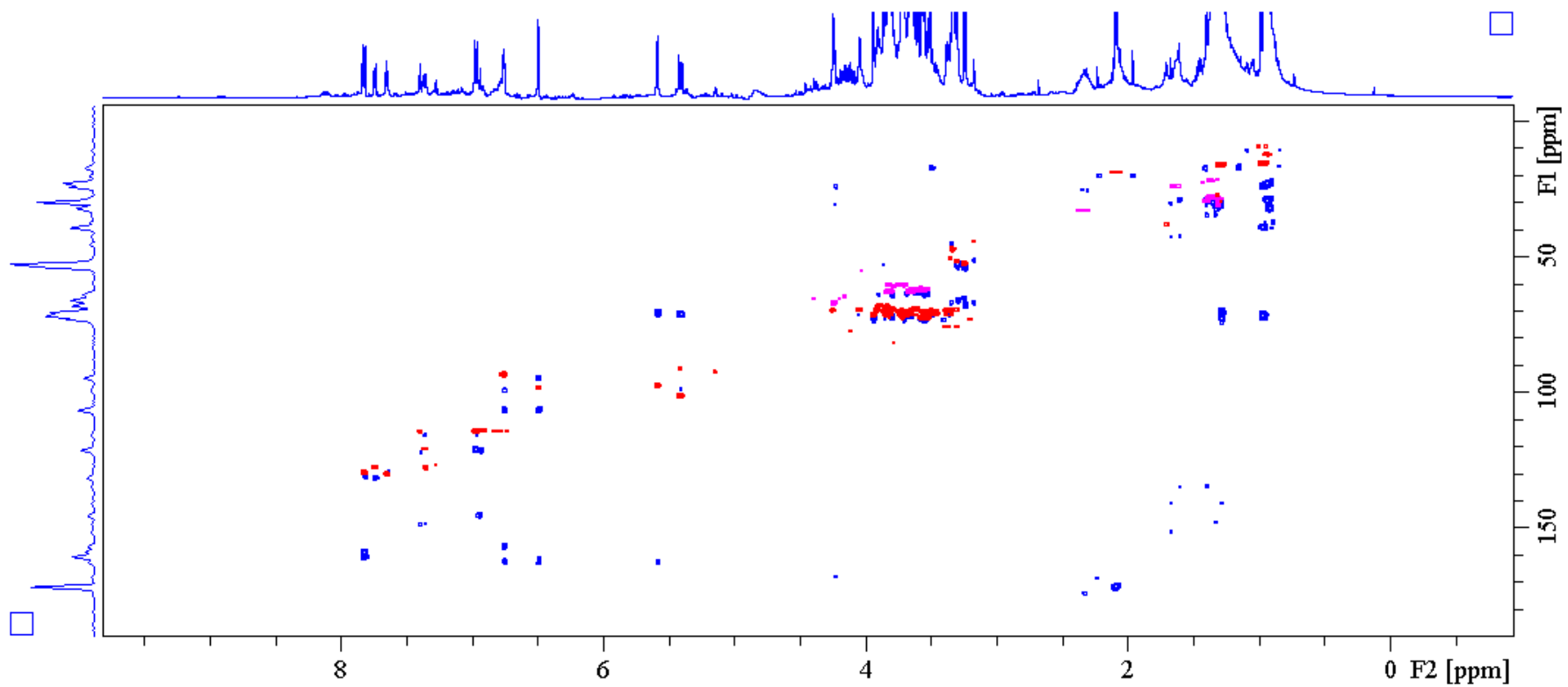
**Figura 23.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos das folhas e caules obtidos com metanol e etanol, na região de 3,0 a 4,5 ppm (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Legenda: CBEF- extrato etanólico das folhas de *C. bahianus*, CBEC- extrato etanólico do caule *C. bahianus*, CUMF- extrato metanólico das folhas de *C. urniger*, CUEC- extrato etanólico do caule de *C. urniger*, CVEF- extrato etanólico das folhas de *C. vitifolius*, CVEC- extrato etanólico do caule de *C. vitifolius*.

A comparação de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos das folhas (**Figura 24**) mostrou a presença de sinais característicos de compostos aromáticos e de carboidratos. Experimentos bidimensionais foram realizados com a amostra CBEF confirmando a presença de carbonos anoméricos fazendo a ligação de açúcares com estruturas aromáticas. Os hidrogênios anoméricos em  $\sim \delta_{\text{H}} 5,5$ , diretamente ligados a carbonos próximos a  $\delta_{\text{H}} 100$  conforme o experimento bidimensional HSQC e estão correlacionados via experimento HMBC com carbonos aromáticos em  $\sim \delta_{\text{H}} 160$  (**Figura 25**). Dessa forma, observou-se que o extrato de folhas de CBEF foi o mais abundante em compostos aromáticos ligados a carboidratos, sugerindo-se a presença de flavonoides glicosilados. Os extratos CUMF e CVEF também apresentaram sinais na região de aromáticos, entretanto, com menor intensidade.



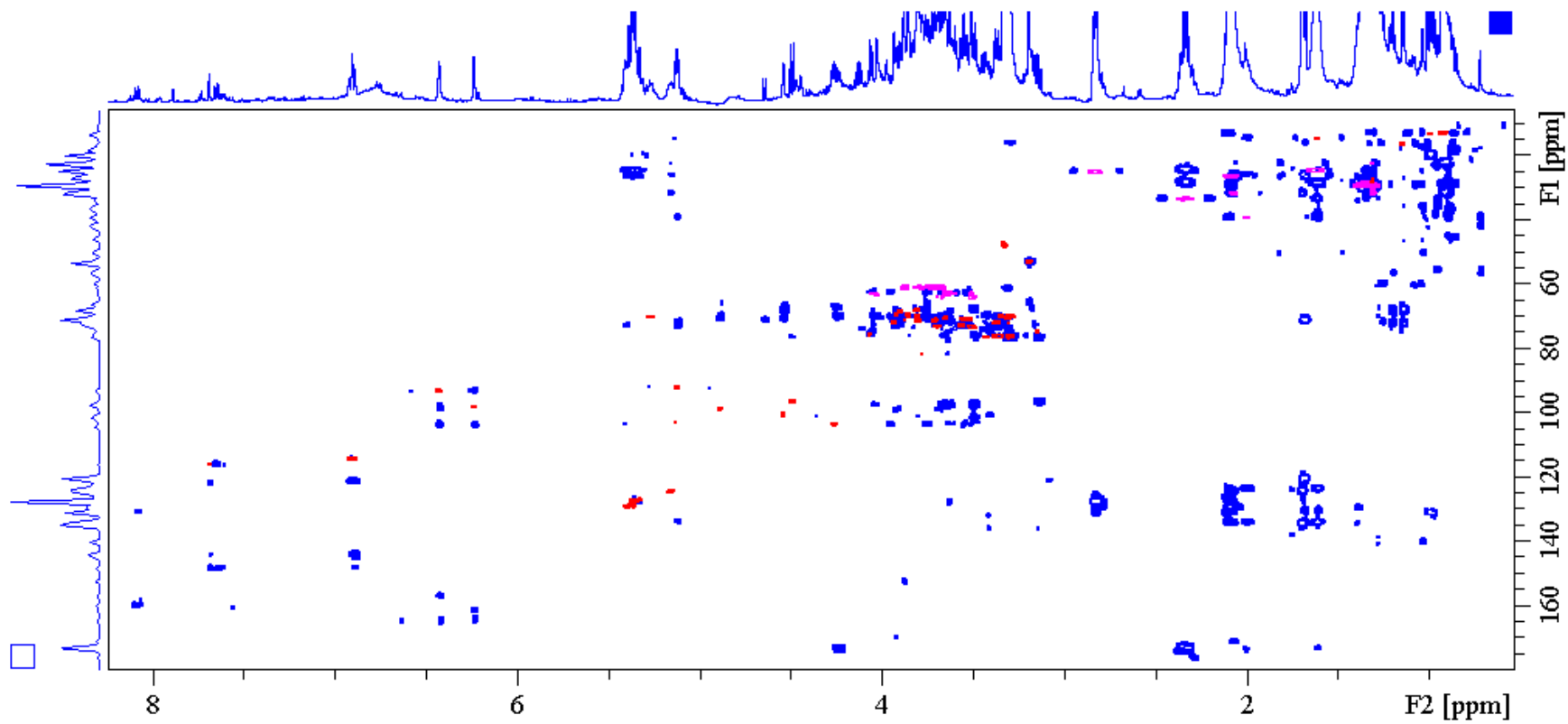
**Figura 24.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos das folhas de CUMF, CBEF e CVEF (500 MHz, MeOD).

Entre as amostras, o extrato CVEF apresentou um multiplete próximo a  $\delta_{\text{H}}$  5,3, sinal característicos de esteroides, com uma correlação característica ao carbono próximo a 130 ppm, no HSQC (**Figura 26**). Observou-se também que o extrato CVEF mostrou-se mais abundante em composto com sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.



**Figura 25.** Experimentos bidimensionais de HMBC (azul) e HSQC-editado ( $\text{CH}_2$  em rosa e  $\text{CH}$  e  $\text{CH}^3$  em vermelho) do extrato CBEF (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ , MeOD).



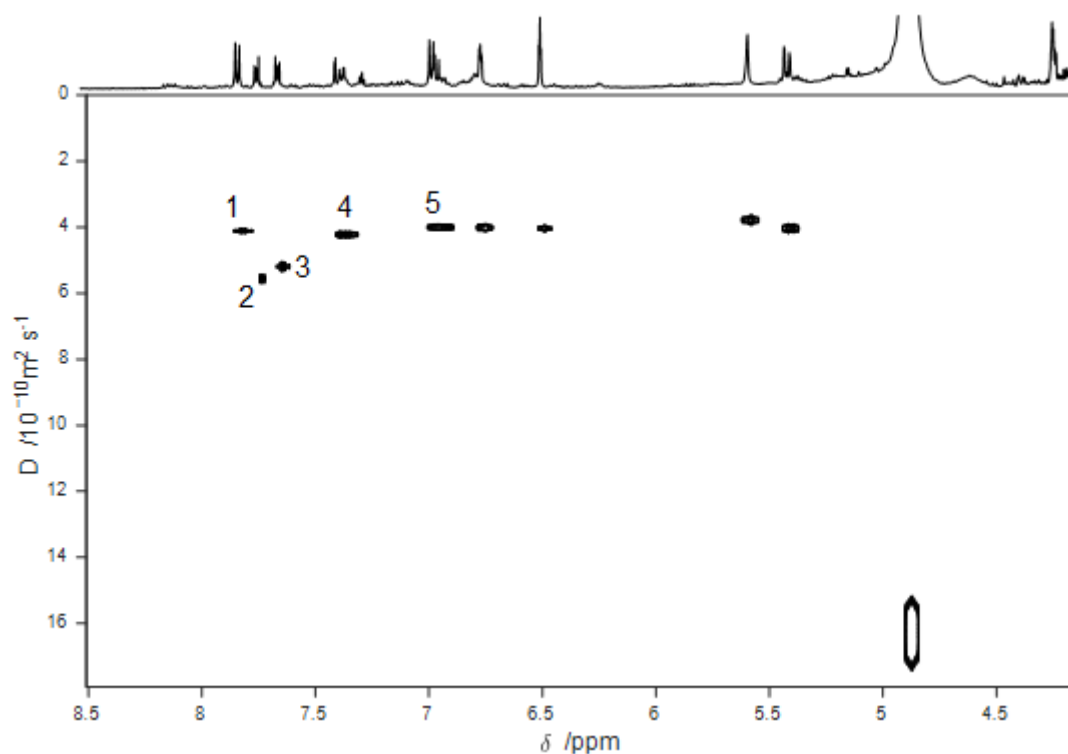


**Figura 26.** Experimentos bidimensionais de HMBC (azul) e HSQC-editado (CH<sub>2</sub> em rosa e CH e CH<sub>3</sub> em vermelho) do extrato CVEF (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ , MeOD).

O extrato etanólico das folhas CBEF se mostrou mais promissor por apresentar sinais característicos de compostos aromáticos mais intensos em relação às outras amostras. No intuito de averiguar a presença das substâncias aromáticas, ligadas a unidades de carboidratos nesta mistura complexa, foi realizado o experimento espectroscopia de difusão ordenada (DOSY), experimento que separa componentes com diferentes difusões em misturas complexas. Esta técnica representa uma ferramenta em potencial em estudos envolvendo produtos naturais (YOU *et al.*, 2021).

Na maioria dos casos, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de extratos vegetais apresentam sinais (picos) sobrepostos, dificultando a precisão da análise. Para resolver a sobreposição dos picos, geralmente, emprega-se o ensaio de DOSY, que aplica a supressão seletiva de sinais usando filtros de relaxamento proporcionando a extração de um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  simplificado como menos sobreposições e a possibilidade de coletar informações como a constante de acoplamento (MAHROUS e FARAG, 2015).

O experimento de DOSY do extrato CBEF apresentou-se, na região característica de hidrogênios de carboidratos, como uma mistura de substâncias, pois várias difusões foram observadas. Por sua vez, a região característica de hidrogênios de aromáticos revelou a presença de cinco substâncias (possivelmente flavonoides glicosilados, conforme observado na análise fitoquímica) como pode ser verificado na **Figura 27**. Uma vez que os sinais apresentaram boa separação, pode-se considerar que a técnica DOSY é uma alternativa para analisar e distinguir sinais de compostos em uma mistura complexa.



**Figura 27.** Espectro de difusão (DOSY) por RMN de  $^1\text{H}$  do extrato CBEF, com destaque para a presença dos sinais referentes a sete substâncias observadas na região característica de compostos aromáticos.

Para o extrato em questão não foi possível realizar experimentos referentes ao isolamento de compostos, devido a pequena quantidade de massa do extrato (0,1798 g) obtido, para a busca das substâncias aromáticas observadas no espectro. No entanto, é possível sugerir que os sinais verificados no espectro de DOSY podem ser da classe de compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonoides glicosilados, cuja presença foi observada na caracterização fitoquímica, que são metabólitos secundários bastante comuns e abundantes em espécies do gênero *Cnidocolus*. Nesse sentido, com a finalidade de averiguar os compostos presentes nos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* realizou-se o processo de desreplicação com a utilização da ferramenta conhecida por *Molecular Networking* (MN) utilizando-se os seus dados de espectrometria de massas.

### 4.3. Anotação de metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* por *Molecular Networking* e Espectrometria de Massas

Com finalidade de detectar e identificar os compostos polares presentes nos extratos das folhas e caules em acetato de etila, etanol e metanol das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*, realizou-se a análise dos extratos por CLAE-IES-EM/EM. Os perfis cromatográficos e fragmentação (EM/EM) obtidos, podem ser utilizados para construir as redes de interações moleculares na plataforma GNPS. Inicialmente, foi realizada a tentativa de análise dos dados por Feature-Based Molecular Networking (FBMN), método utilizado para visualizar e anotar compostos, permitindo uma análise quantitativa e a resolução de isômeros (NOTHIAS *et al.*, 2020).

No entanto, não foi possível realizar a análise pelo método mencionado devido a dificuldades encontradas durante as etapas de pré-processamento dos dados. Dessa forma, optou-se por realizar as análises no modo Classic Molecular Networking (CMN). Esta abordagem apresenta um número reduzido de etapas de pré-processamento de dados (NOTHIAS *et al.*, 2018; ARON *et al.*, 2020). Em uma rede molecular cada nodo representa uma molécula, enquanto os aglomerados (cluster) correspondem a moléculas correlacionadas estruturalmente, baseadas na similaridade dos seus espectros de massas e padrões de fragmentação (CARABALLO-RODRÍGUEZ; DORRESTEIN; PUPO, 2017).

Para a construção das redes moleculares os extratos das folhas foram separados em três grupos: G1 (CBAEF, CBEF); G2 (CUMF) e G3 (CVAEF, CVEF), em seguida, analisados nos modos negativo e positivo por CLAE-IES-EM/EM e os dados obtidos usados para a construção de rede molecular clássica (CMN). Os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo e positivo das espécies de *Cnidocolus* foram inseridos na plataforma GNPS responsável pelo processamento e construção das CMN. Os resultados de cada modo de ionização podem ser acessados nos seguintes endereços eletrônicos:

- **Modo Negativo:**

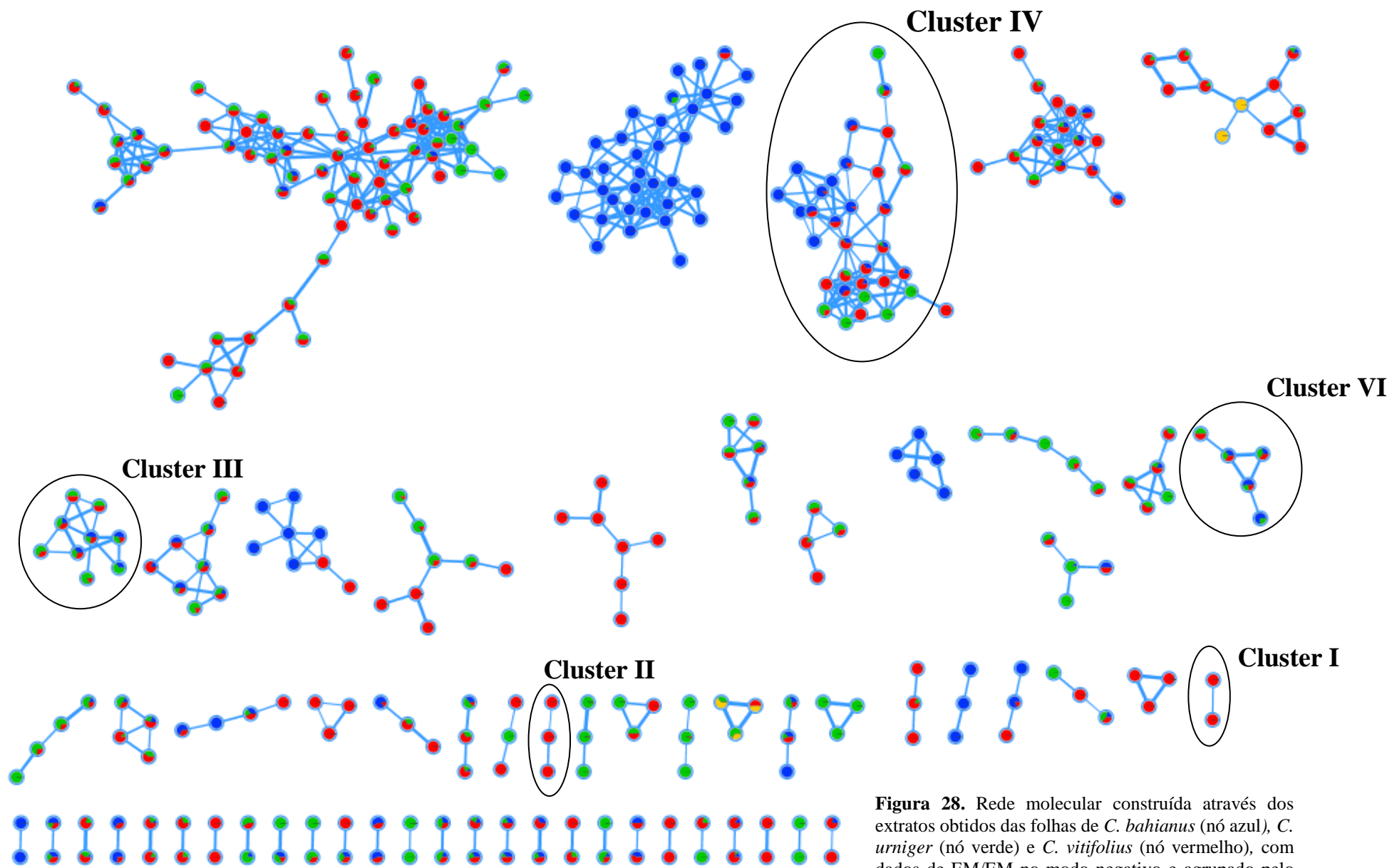
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=38d2df0cc7944488901c6530c8c4fa1>

5

- **Modo Positivo:**

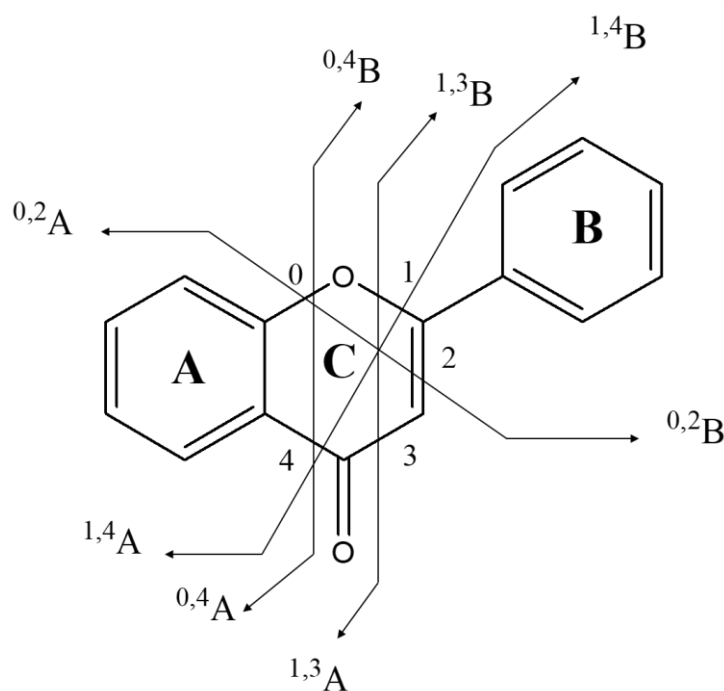
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=30f67eaf99d245dbbcd4e5b7aeab4baf>

A rede molecular clássica obtida através dos dados de espectrometria de massas no modo negativo, visualizada pelo software *Cytoscape*, pode ser observada na **Figura 28** assinalada com os “clusters” de interesse. Os compostos anotados a partir da rede molecular construída com o auxílio de tabelas extraídas de artigos científicos e das bibliotecas GNPS, PubChem e Metlin foram dispostos na **Tabela 8** e **Figura 65** (**Apêndice C**, página 122).



**Figura 28.** Rede molecular construída através dos extratos obtidos das folhas de *C. bahianus* (nó azul), *C. urniger* (nó verde) e *C. vitifolius* (nó vermelho), com dados de EM/EM no modo negativo e agrupado pelo software *Cytoscape* 3.7.2, enfatizando as principais anotações de compostos observados nas bibliotecas GNPS, PubChem e Metlin.

Para a identificação de flavonoides agliconas através de espectrometria de massas por *eletrospray*, as fragmentações mais comuns requerem a clivagem de duas ligações C-C do anel C, com a formação dos íons  $^{i,j}A^{-/+}$  e  $^{i,j}B^{-/+}$ , em que i e j indicam as posições das quebras de ligação (**Figura 29**). Os fragmentos são gerados pela reação Retro Diels-Alder (RDA) e fornecem informações sobre o número e tipo de substituintes nos anéis A e B (CUYCKENS e CLAYES, 2004; HUANG *et al.*, 2020)



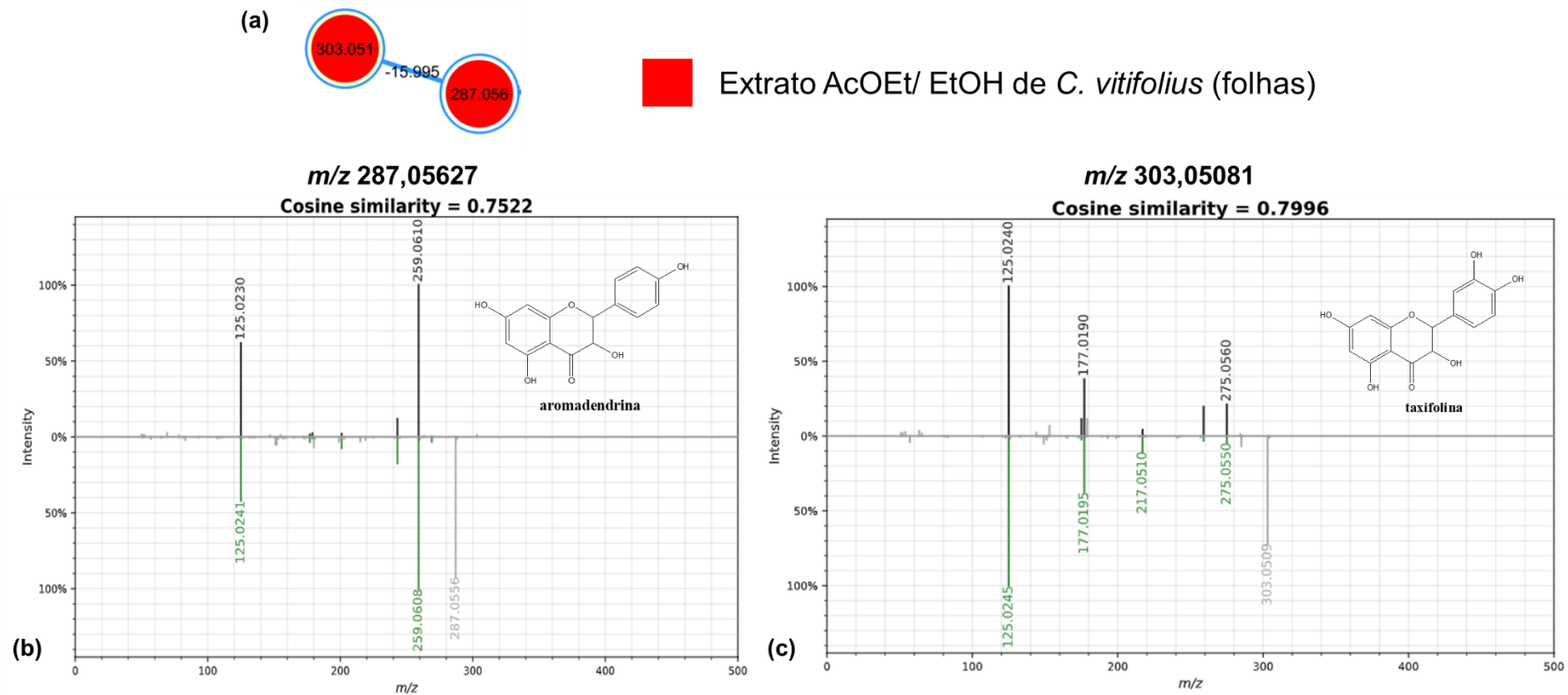
**Figura 29.** Nomenclatura de íons formados a partir da fragmentação via reação RDA. Adaptado de CUYCKENS e CLAYES, 2004.

Um total de 30 compostos foram anotados, incluindo flavonóis (metabólitos **65**, **66**, **70** e **76 a 89**), flavanois (metabólitos **67** e **68**), flavonas (metabólitos **69** e **73**), flavanonas (metabólitos **71**, **72**, **74** e **75**) e ácidos hidroxicinâmicos (metabólitos **90**, **91**, **92**, **93** e **94**).

No cluster **I** (**Figura 30**), a anotação do metabólito **65** apresentou o íon precursor  $m/z$  287,05627  $[M-H]^-$  e produziu os íons produtos  $m/z$  259,06137 e  $m/z$  125,02314 semelhantes ao padrão de fragmentação do composto aromadendrina (**Tabela 8**, **Apêndice C**, página 122). Com a diferença de 15 Da (adição de uma hidroxila), o metabólito **66**, observado no mesmo cluster, apresentou o íon precursor  $m/z$  303,05081  $[M-H]^-$  e íons produtos  $m/z$  275,05716,  $m/z$  259,06064,  $m/z$  177,01851 e  $m/z$  125,02364 semelhantes ao padrão de fragmentação do composto taxifolina conforme observado na comparação do espectro de fragmentação do

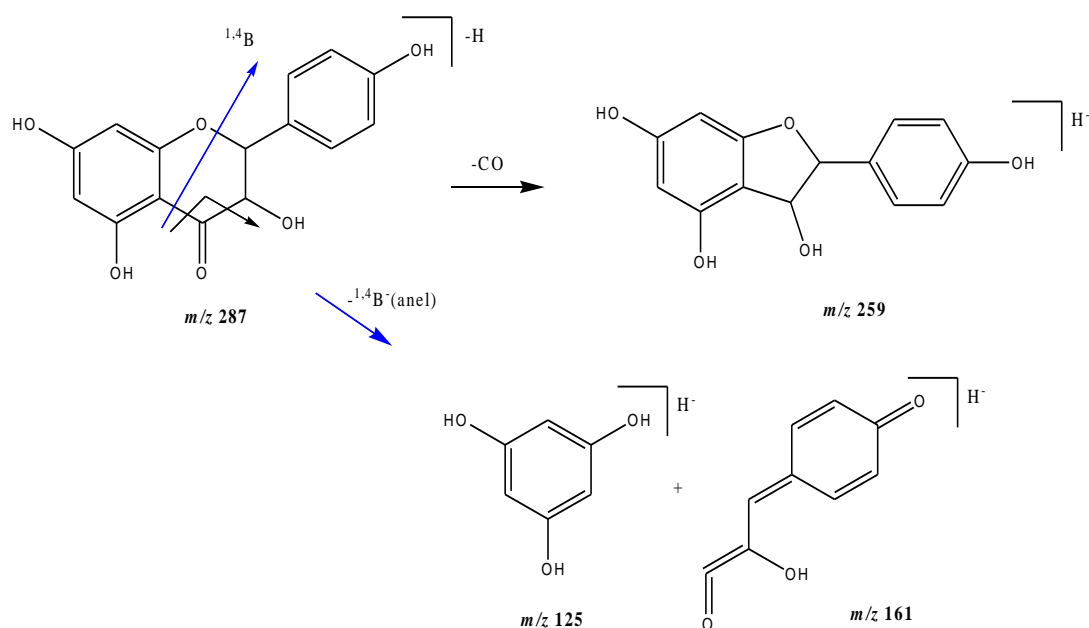
metabólito **65** e **66** anotado e o espectro de referência da biblioteca do GNPS (BRITO *et al.*, 2021).



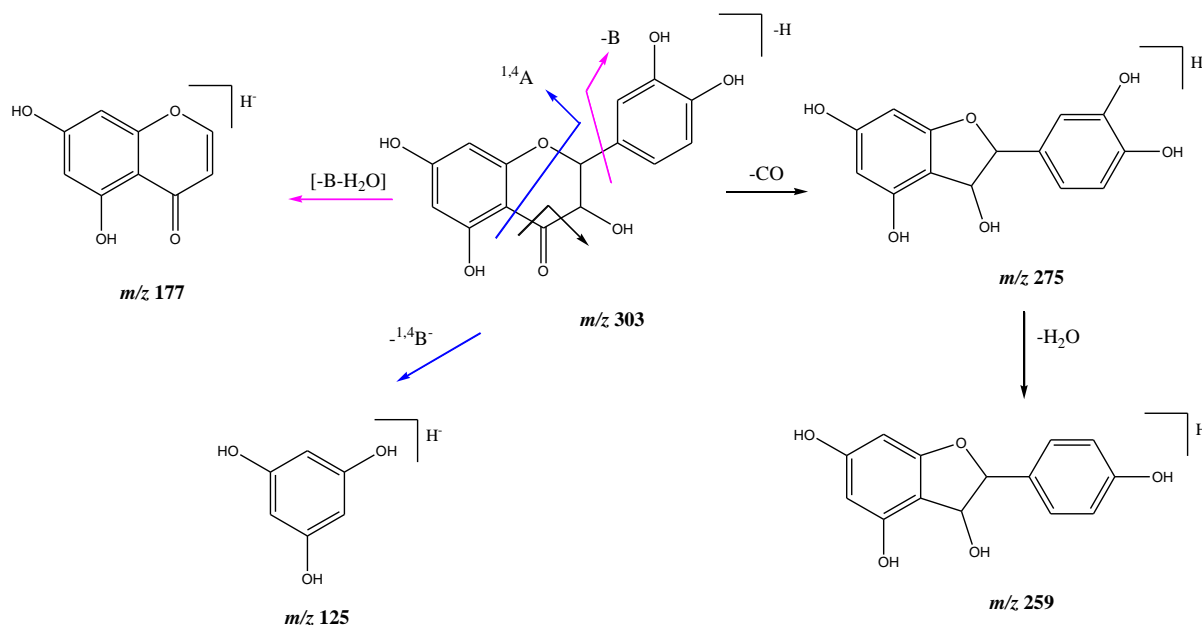


**Figura 30.** Expansão da rede molecular no modo negativo, mostrando o **cluster I** (a) com as anotações dos nós  $m/z$  287,05627 e  $m/z$  303,05081. A figura abaixo ilustra a comparação do espectro de fragmentação do flavonoide anotado como (b) aromadendrina e (c) taxifolina (espectro superior) com o espectro de referência da biblioteca do GNPS (espectro inferior).

As propostas de fragmentação para os metabólitos **65** e **66** podem ser observadas nas **Figuras 31** e **32**. Através fragmentos encontrados para o metabólito **1** verificou-se a perda de uma molécula de CO (28 Da) gerando o fragmento  $m/z$  259,06137  $[M-H-CO]^-$  e a perda do fragmento  $[^{1,4}B^-]$  gerou a  $m/z$  125,02314  $[^{1,4}A^-]$ . Entre os fragmentos encontrados para o metabólito 2 observou-se íons produtos  $m/z$  275,05716  $[M-H-CO]^-$  formado pela perda de CO,  $m/z$  259,06064  $[M-H-CO-H_2O]^-$  formado pela perda de H<sub>2</sub>O,  $m/z$  177,01851  $[M-H-B^-H_2O]$  devido a perda do anel  $[B^-]$  e de H<sub>2</sub>O e  $m/z$  125,02364  $[^{1,4}A^-]$  fragmento observado pela perda do anel  $[^{1,4}B^-]$

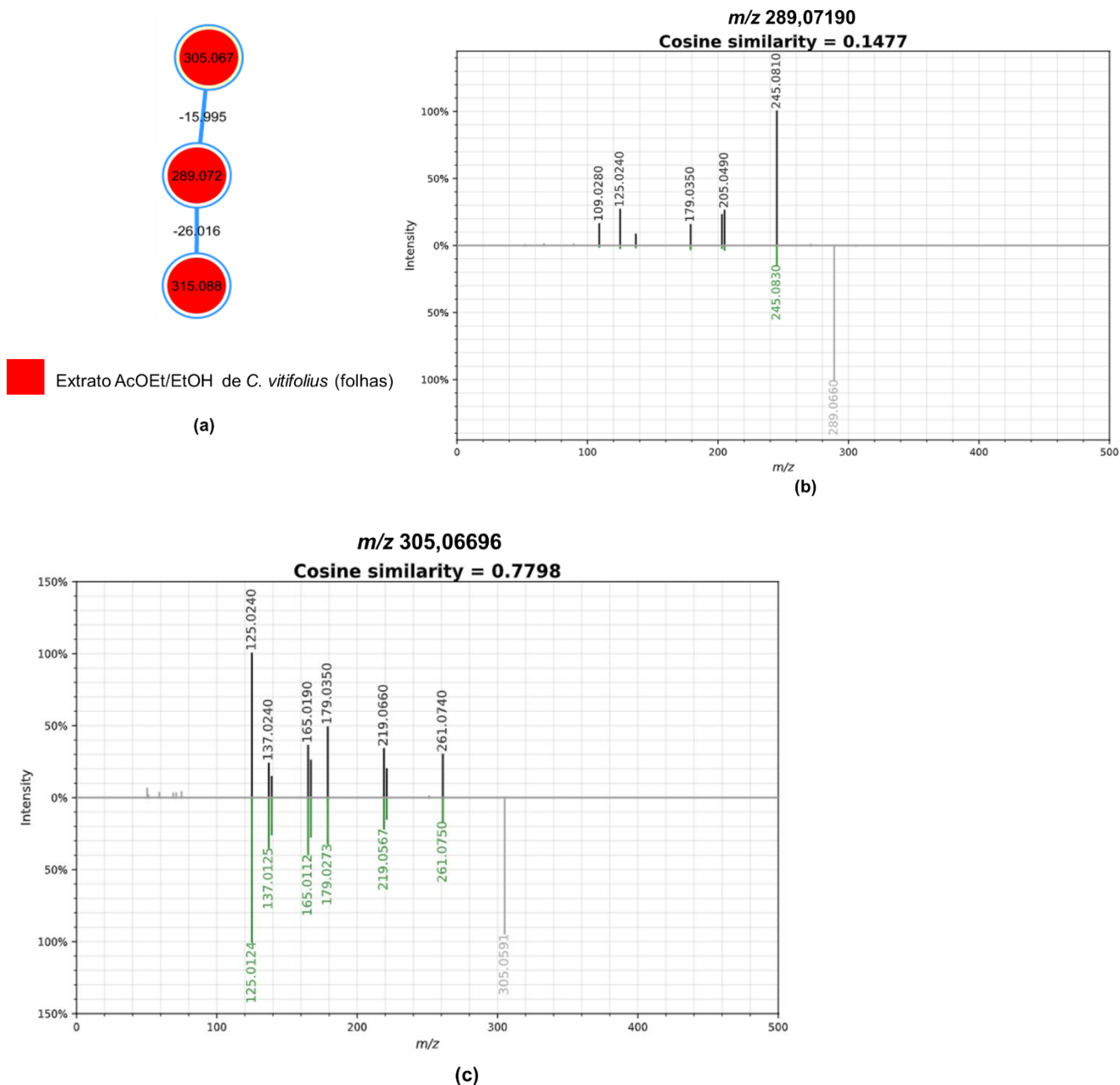


**Figura 31.** Proposta de fragmentação do metabólito **65** anotado como aromadendrina (FABRE *et al.*, 2001).



**Figura 32.** Proposta de fragmentação do metabólito **66** anotado como taxofolina (FABRE *et al.*, 2001).

No cluster **II** (**Figura 33a**) observou-se a correlação entre os compostos **67** e **68**. A anotação do metabólito **67** verificou a presença do íon precursor  $m/z$  289,07190  $[M-H]^-$  e as seguintes fragmentações  $m/z$  245,08179,  $m/z$  205,04974,  $m/z$  179,03403,  $m/z$  165,01819,  $m/z$  137,02338,  $m/z$  125,02299,  $m/z$  109,02824 semelhantes ao padrão de fragmentação do composto catequina/epicatequina (**Tabela 8, Apêndice C**, página 122). Com a diferença de 15 Da (adição de uma hidroxila), o metabólito **68**, observado no mesmo cluster, apresentou o íon precursor  $m/z$  305,06696  $[M-H]^-$  e íons produtos  $m/z$  261,07693,  $m/z$  221,04482,  $m/z$  219,06621,  $m/z$  179,03378,  $m/z$  167,03400,  $m/z$  165,01825,  $m/z$  139,03981,  $m/z$  137,02370 e  $m/z$  125,02333, semelhantes ao padrão de fragmentação do composto epigalocatequina conforme observado na comparação do espectro de fragmentação do metabólito **67** e **68** anotado e o espectro de referência da biblioteca do GNPS (**Figura 33b e 33c**) (DING *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2018; YUZUAK *et al.*, 2018).



**Figura 33.** Expansão da rede molecular (**cluste II**) no modo negativo, (a) com as anotações dos nós  $m/z$  289,07190 e  $m/z$  305,06696. A figura ao lado mostra a comparação do espectro de fragmentação do flavonoide anotado como (b) catequina/epicatequina e (c) epigalocatequina.

O espectro de EM/EM do metabólito **67** (**Figura 34**), anotado como catequina/epicatequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ , MM = 290,07904 g/mol), apresentou sinal do íon molecular de  $m/z$  289,07190  $[M - H]^-$ . De acordo com a proposta de fragmentação (**Figura 35**), foram originados íons fragmentos de  $m/z$  245,08203  $[M-H-CO_2]^-$  com a perda de  $CO_2$ ,  $m/z$  179,03403  $[M-2H-C_6H_5O_2]^-$  com o rompimento do anel B,  $m/z$  165,01819  $[^{1,2}A]^-$  íon diagnóstico observado pela clivagem do anel C,  $m/z$  137,02338  $[^{1,3}A]^-$  íon diagnóstico gerado por RDA com

a clivagem do anel C e  $m/z$  109,02824  $[M-H-C_9H_9O_4]^-$  formado com o rompimento do anel B (CUYCKENS e CLAYES, 2004), conforme a **Tabela 8** (**Apêndice C**, página 122).

F: FTMS - p ESI d Full ms2 289,0718@hcd20,00 [50,0000-315,0000]

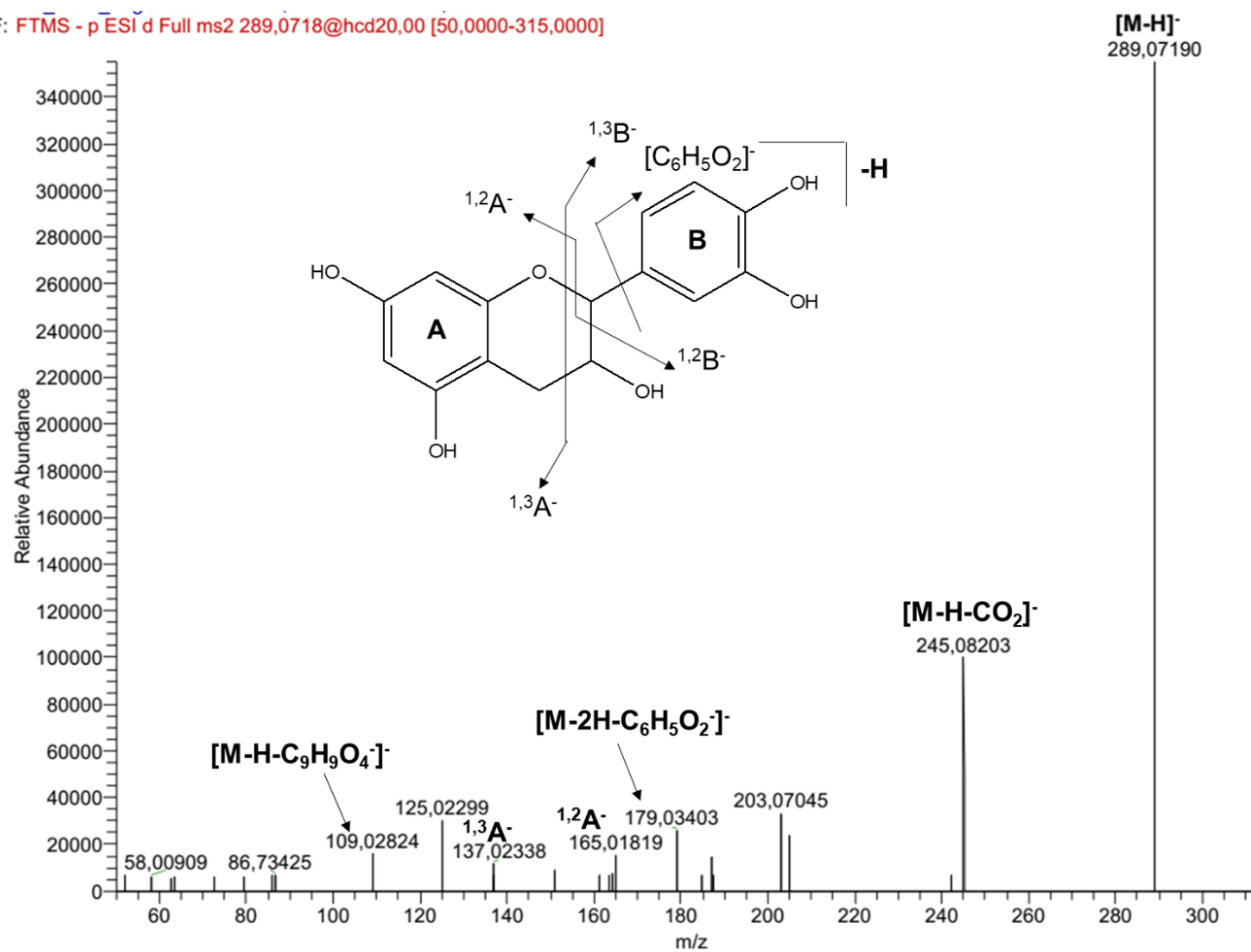
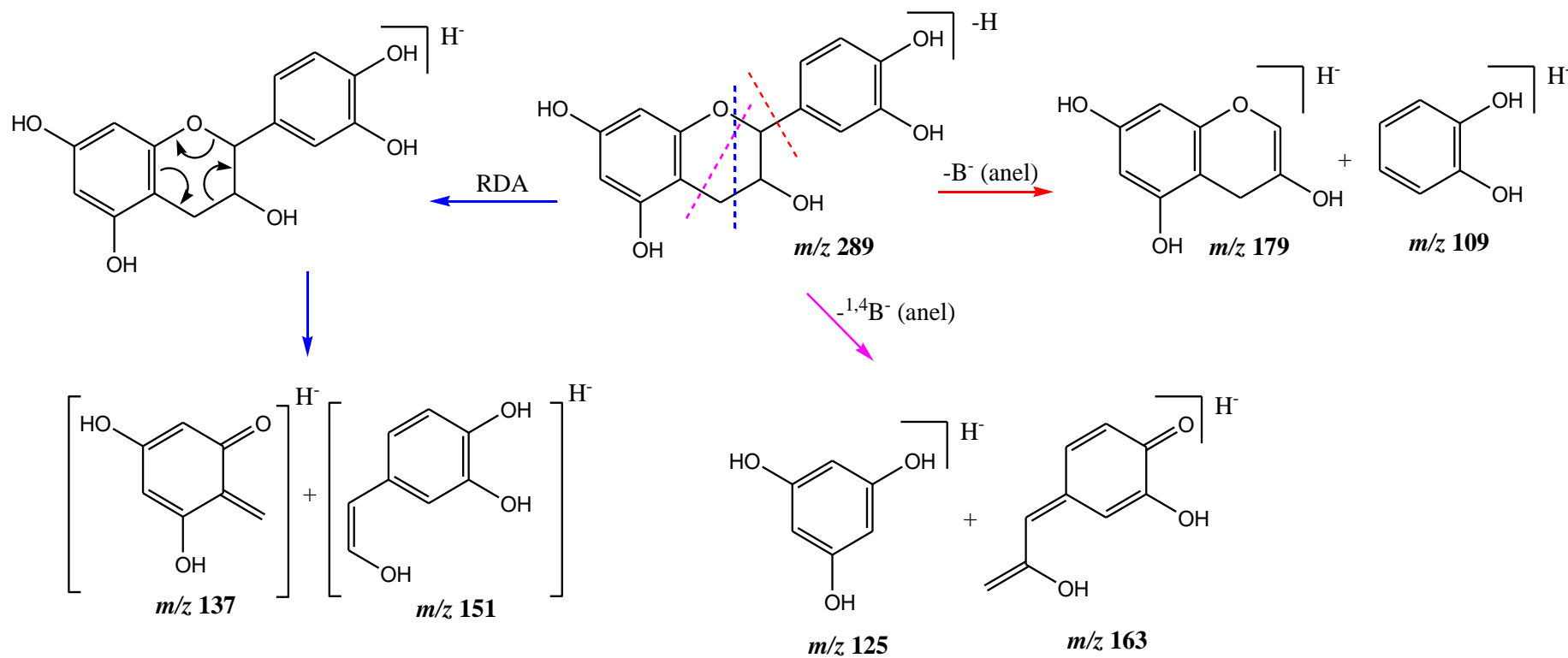


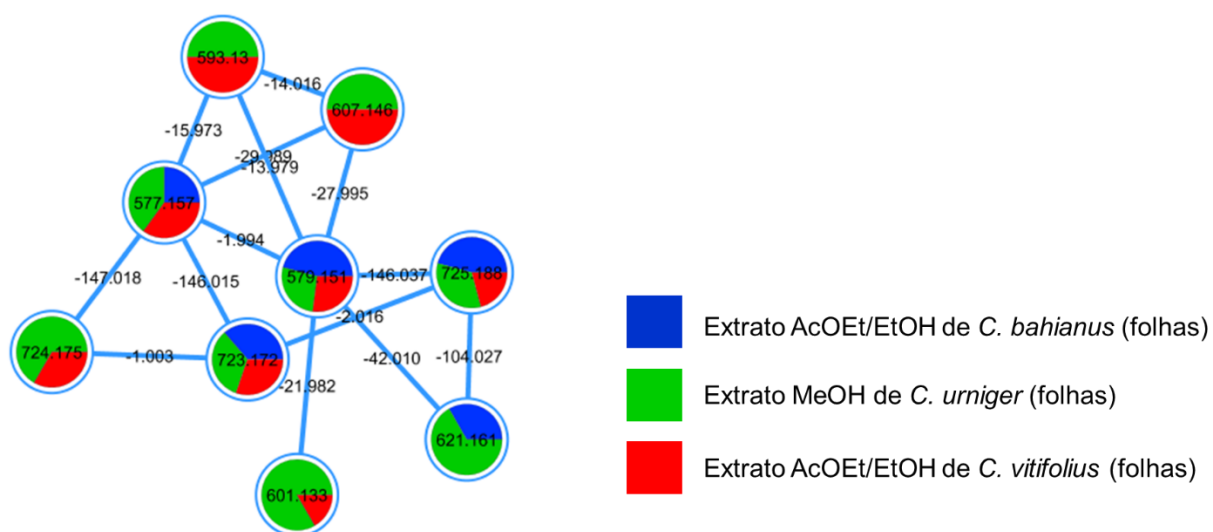
Figura 34. Espectro de EM/EM e a fragmentação do metabólito 67 anotado como catequina/epicatequina.



**Figura 35.** Proposta de fragmentação do metabólito **67** anotado como catequina/epicatequina (KANG *et al.*, 2016).

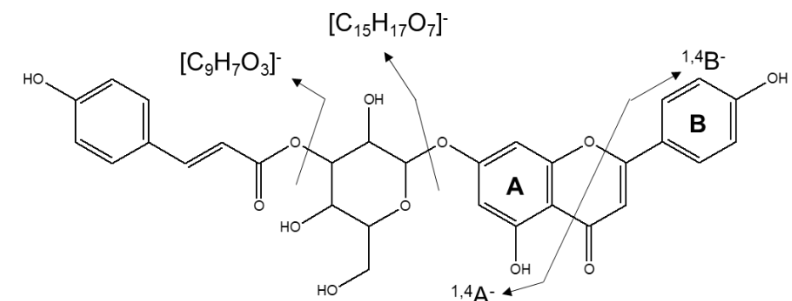
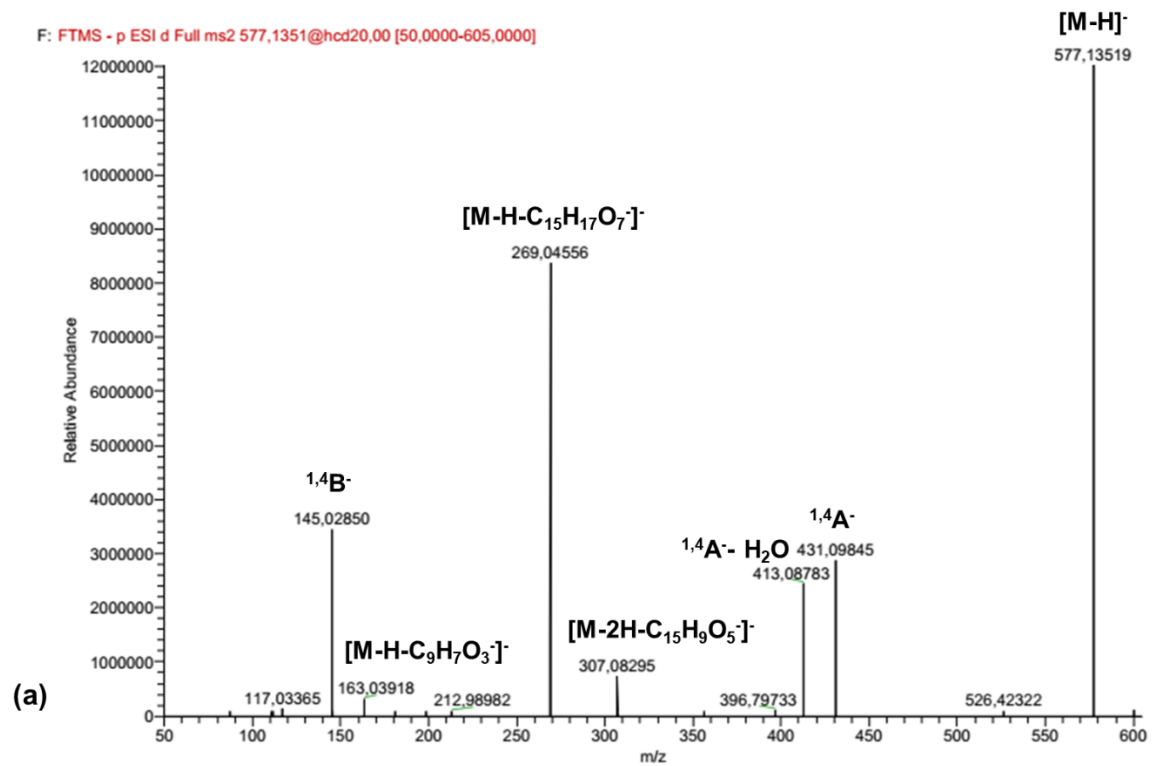
Os flavonoides são produzidos em plantas principalmente na forma de glicosídeos e as ligações glicosídicas são facilmente clivadas de acordo com a fragmentação glicosídica padrão (HUANG *et al.*, 2020). No cluster **III** (**Figura 36**) verificou-se a correlação entre os compostos anotados **69** (flavona), **70** (flavonol), **71** (flavanona) e **72** (flavanona). O metabólito **69**, anotado como apigenina 7-(3-*p*-cumaroil-glucosideo), apresentou o espectro EM/EM com íon molecular de  $m/z$  577,13519 [M-H]<sup>-</sup>, após a retrociclização do anel C gerou os íons fragmentos de  $m/z$  431,09845 [<sup>1,4</sup>A<sup>-</sup>],  $m/z$  413,08783 [<sup>1,4</sup>A<sup>-</sup>-H<sub>2</sub>O] com a perda de uma molécula de H<sub>2</sub>O (-18,01056 Da),  $m/z$  145,02850 [<sup>1,4</sup>B<sup>-</sup>],  $m/z$  307,08295 [M-2H-C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup> com a perda da flavona,  $m/z$  269,04556 [M-H-C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>]<sup>-</sup> devido a perda do grupo substituinte cumaroil-glucosideo ligado a flavona e o fragmento de  $m/z$  163,03918 [M-H-C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>]<sup>-</sup> com a perda da flavona ligada ao anel glucosideo (**Figura 37**).

O espectro de EM/EM do composto **70** (**Figura 38**), anotado como kaempferol 3-(4-*p*-cumaroil-glucosideo) apresentou íon molecular de  $m/z$  593,12988 [M-H]<sup>-</sup> e íons fragmentos de  $m/z$  447,09335 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> observado pela eliminação do substituinte cumaroil,  $m/z$  429,08264 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> devido à perda de H<sub>2</sub>O do substituinte glucosideo,  $m/z$  370,23303 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>-<sup>0,2</sup>X<sup>-</sup>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> íon produto formado pela clivagem cruzada do anel do grupo glucosideo (CUYCKENS e CLAYES, 2004) seguida pela liberação de uma molécula de H<sub>2</sub>O, e o íon  $m/z$  285,04022 [M-H-C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>]<sup>-</sup> formado pela aglicona do flavonol, conforme a **Tabela 8** (Apêndice C, página 122).



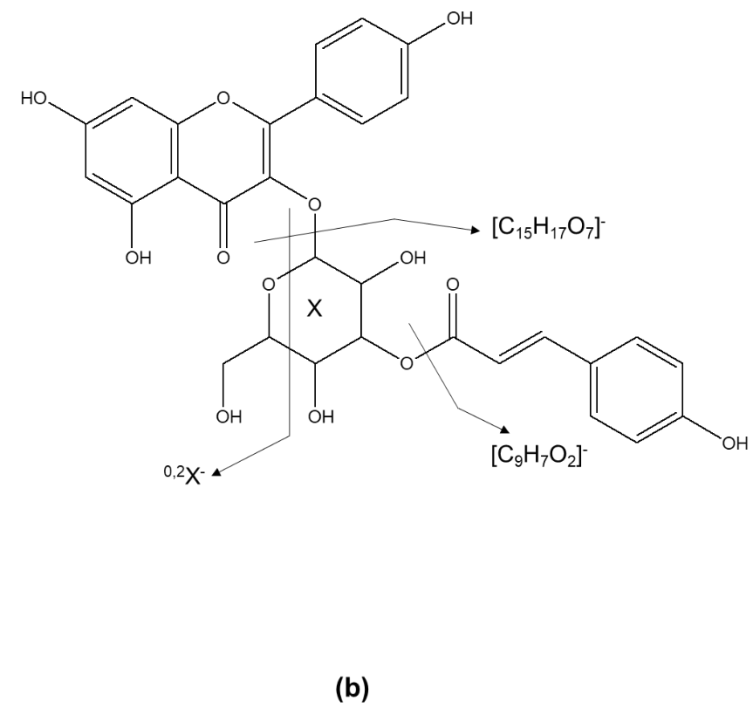
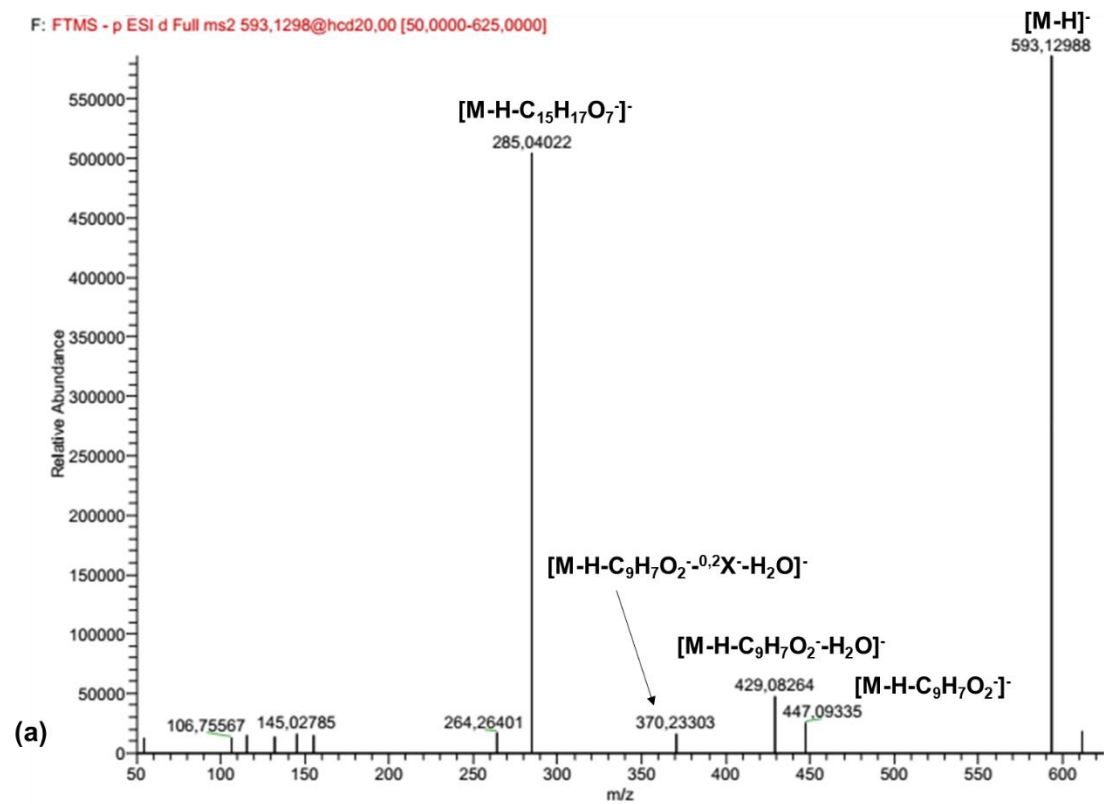
**Figura 36.** Expansão da rede molecular (**cluster III**) no modo negativo.





(b)

**Figura 37.** Espectro de EM/EM (a) e a fragmentação do metabólito **69** (b) anotado como apigenina-7-(3-*p*-cumaroil-glucosideo) de  $m/z$  577,13519 [M-H]-.



**Figura 38.** Espectro de EM/EM (a) e a fragmentação do metabólito **70** (b) anotado como kaempferol-3-(4-*p*-cumaroil-glucosideo) de  $m/z$  593,12988  $[M-H]^-$ .

Os metabólitos **71** ( $m/z$  579,15100 [M-H]<sup>-</sup>) e **72** ( $m/z$  725,18317 [M-H]<sup>-</sup>) estão correlacionados neste cluster e anotados como prunin-3-*p*-cumarato e prunin-3,6-di-*p*-cumarato, respectivamente, apresentam uma diferença de 146 Da que se refere ao fragmento (cumaroil) [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> e íons fragmentos em comum, como os íons de  $m/z$  271 (fragmento aglicona),  $m/z$  163 (fragmento da clivagem da aglicona <sup>0,4</sup>B<sup>-</sup>) e  $m/z$  145 (fragmento cumaroil) (**Tabela 8, Apêndice C**, página 122). O espectro de EM/EM do composto **71** (**Figura 39**) apresentou íon molecular de  $m/z$  579,15100 [M-H]<sup>-</sup> e íons fragmentos de  $m/z$  433,11484 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> observado pela eliminação do substituinte cumaroil,  $m/z$  415,10275 [<sup>0,4</sup>A<sup>-</sup>] e  $m/z$  163,03926 [<sup>0,4</sup>B<sup>-</sup>] gerados por RDA,  $m/z$  307,08221 [M-H-C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup> indicado pela perda do substituinte cumaroil-glucosideo,  $m/z$  271,06119 [M-H-C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>]<sup>-</sup> formado pela aglicona do flavonona,  $m/z$  145,02835 [M-H-C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub>]<sup>-</sup> fragmento formado pela eliminação da flavonona e do anel glucosideo e o íon  $m/z$  119,04983 [<sup>1,3</sup>B<sup>-</sup>] formado por RDA. Observou-se no espectro de EM/EM do composto **72**, de acordo com a **Figura 40**, o íon molecular de  $m/z$  725,18317 [M-H]<sup>-</sup> e o íons de  $m/z$  579,14954 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> formado pela perda de um substituinte cumaroil corroborando com a correlação entre o metabólito **71** observada no cluster III.

Conforme a **Tabela 8 (Apêndice C**, página 122), metabólito **73** ( $m/z$  607,14557 [M-H]<sup>-</sup>), anotado como derivado de apigenina, correlacionou-se diretamente com o composto **5** e apresentou diferença de massa de 30 Da correspondente a presença do grupo metoxila no anel C, o composto **74** ( $m/z$  621,16010 [M-H]<sup>-</sup>) foi anotado como derivado de prunin devido a sua correlação com os metabólitos **71** e **72** e o metabólito **75** ( $m/z$  723,17200 [M-H]<sup>-</sup>) foi anotado também como derivado de prunin por apresentar em sua estrutura dois grupos cumaroil (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>).

F: FTMS - p ESI d Full ms2 579,1354@hcd20,00 [50,0000-610,0000]

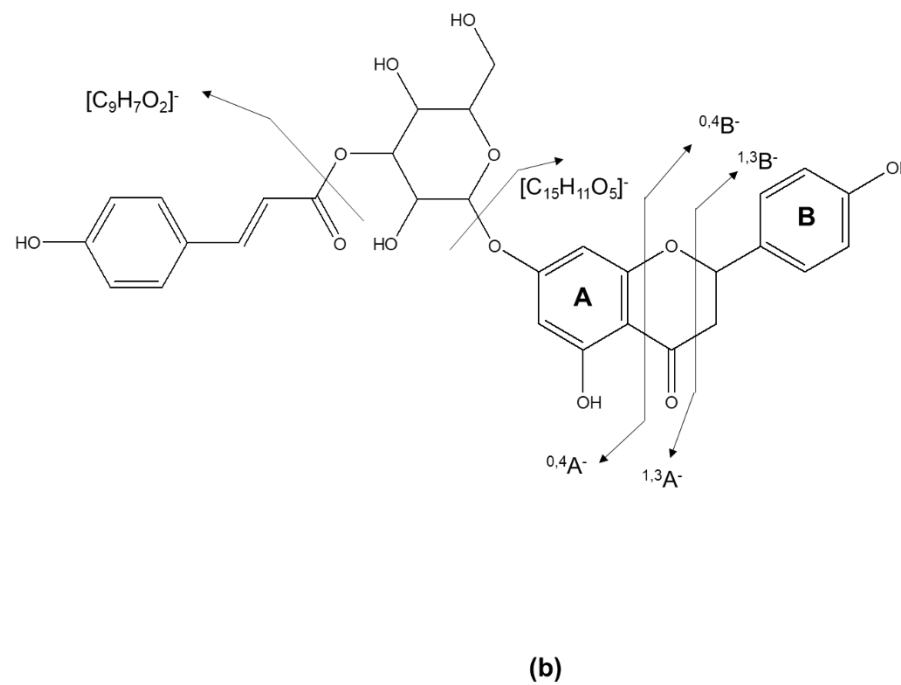
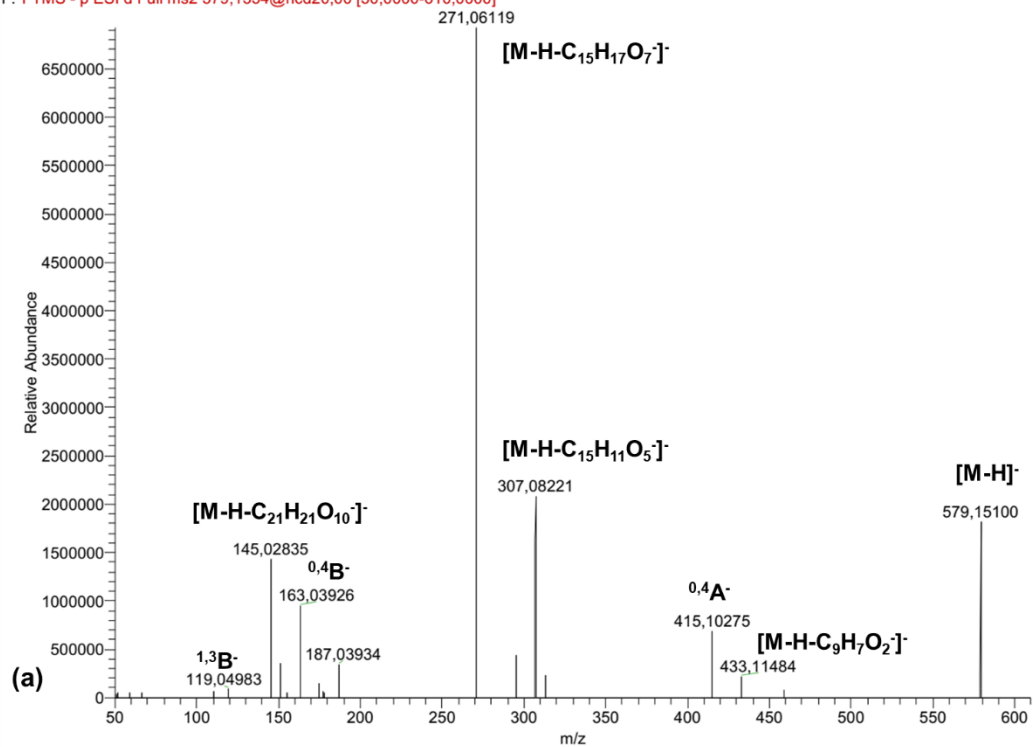
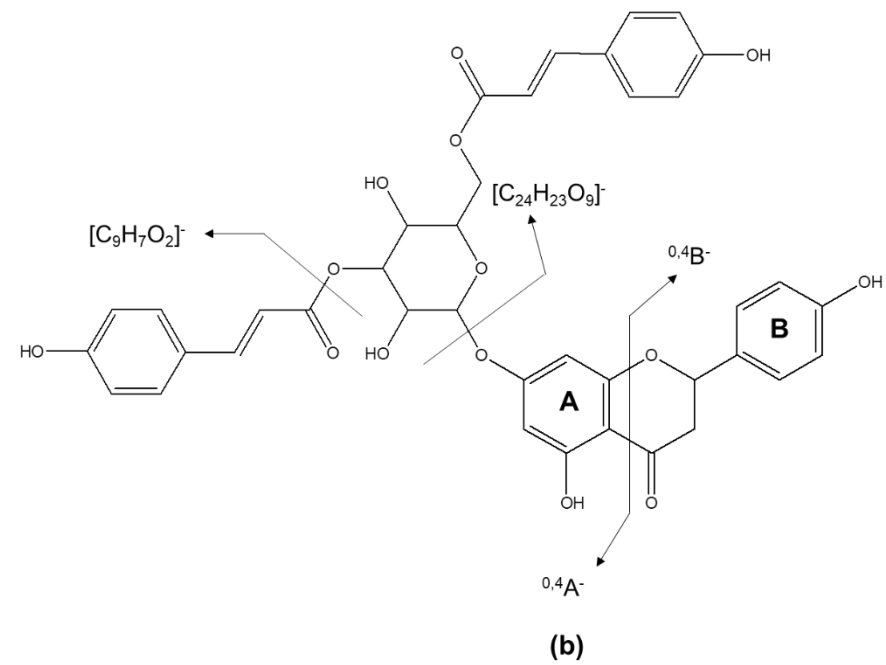
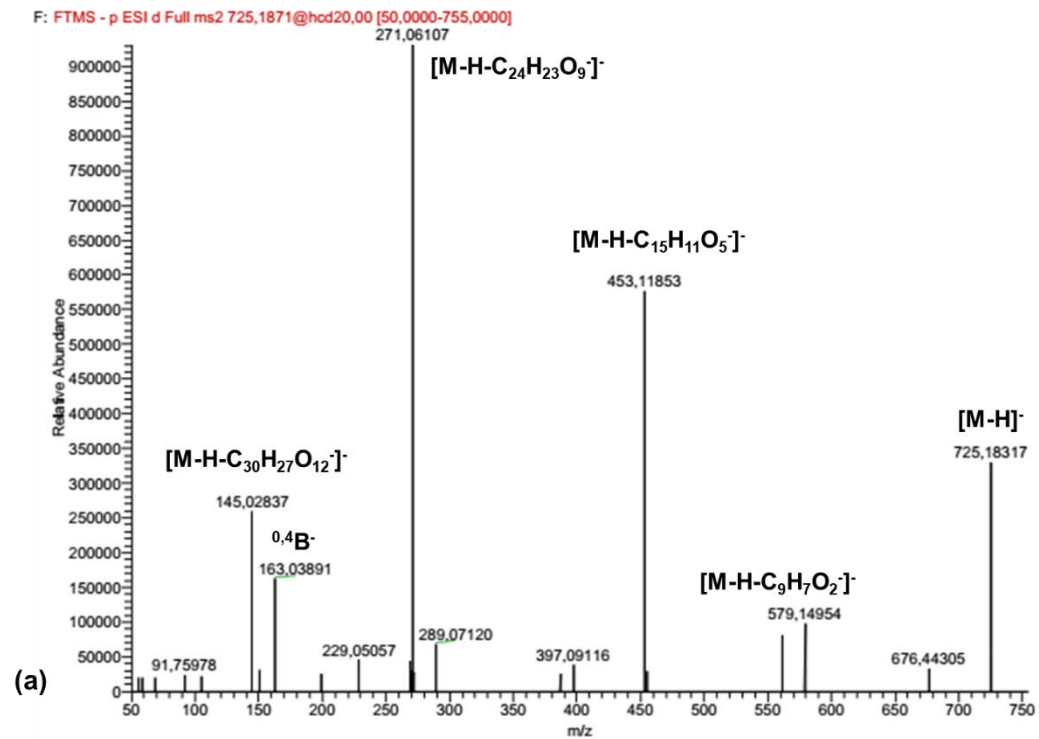
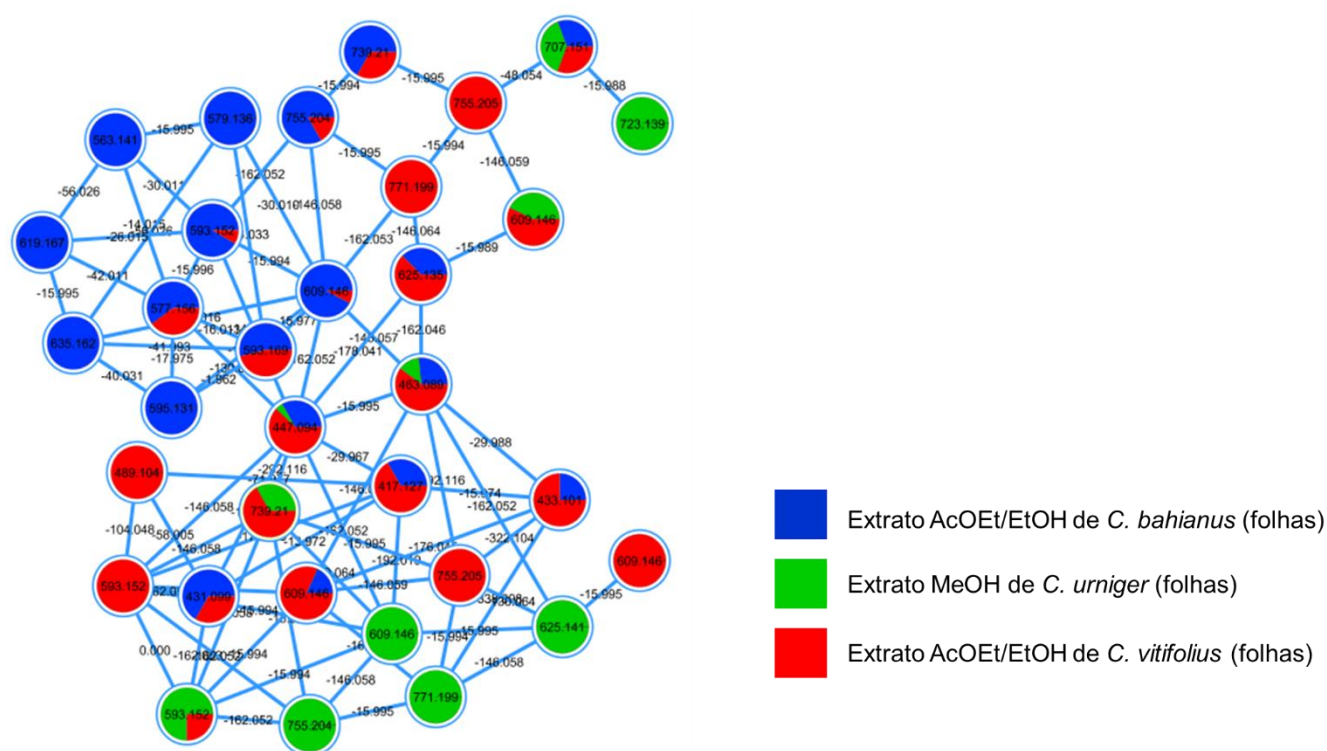


Figura 39. Espectro de EM/EM (a) e a fragmentação do metabólito 71 (b) anotado como prunin-3-*p*-cumarato de *m/z* 579,15100 [M-H]<sup>-</sup>.

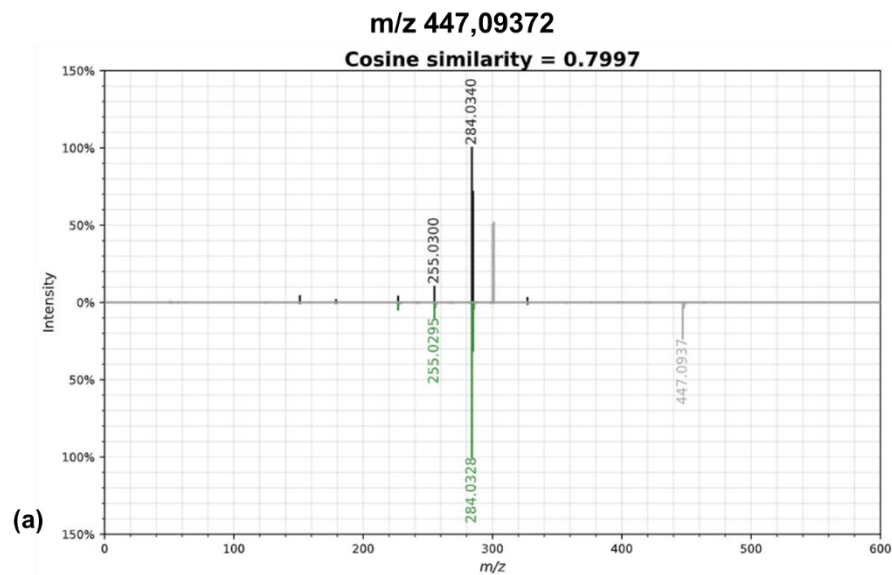


**Figura 40.** Espectro de EM/EM (a) e a fragmentação do metabólito **72** (b) anotado como prunin-3,6-di-*p*-cumarato de  $m/z$  725,18317 [M-H]<sup>-</sup>.

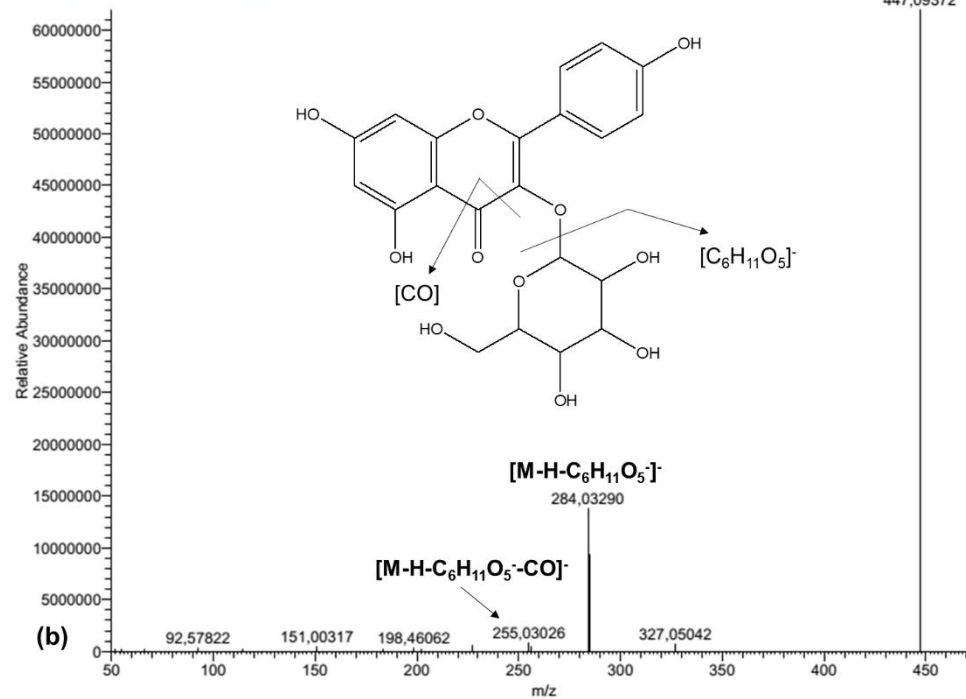
O cluster IV (**Figura 41**) exibiu a correlação entre metabólitos anotados da classe flavonóis. O metabólito **76** apresentou correlação direta com os metabólitos **77, 78, 79, 80, 81 e 81**. O espectro de referência da biblioteca do GNPS e o perfil de fragmentação (**Figura 42**) observado para o metabólito **76**,  $m/z$  447,09372 [M-H]<sup>-</sup>, confirmam a anotação como kaempferol-3-O-glucosídeo, com a presença dos íons fragmentos de  $m/z$  284,03290 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>]<sup>-</sup> formado pela eliminação do anel glucosídeo e o íon de  $m/z$  255,03026 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>-CO]<sup>-</sup> indicado pela perda neutra CO de acordo com a **Tabela 8** (Apêndice C, página 122).



**Figura 41.** Expansão da rede molecular (**cluster IV**) no modo negativo.

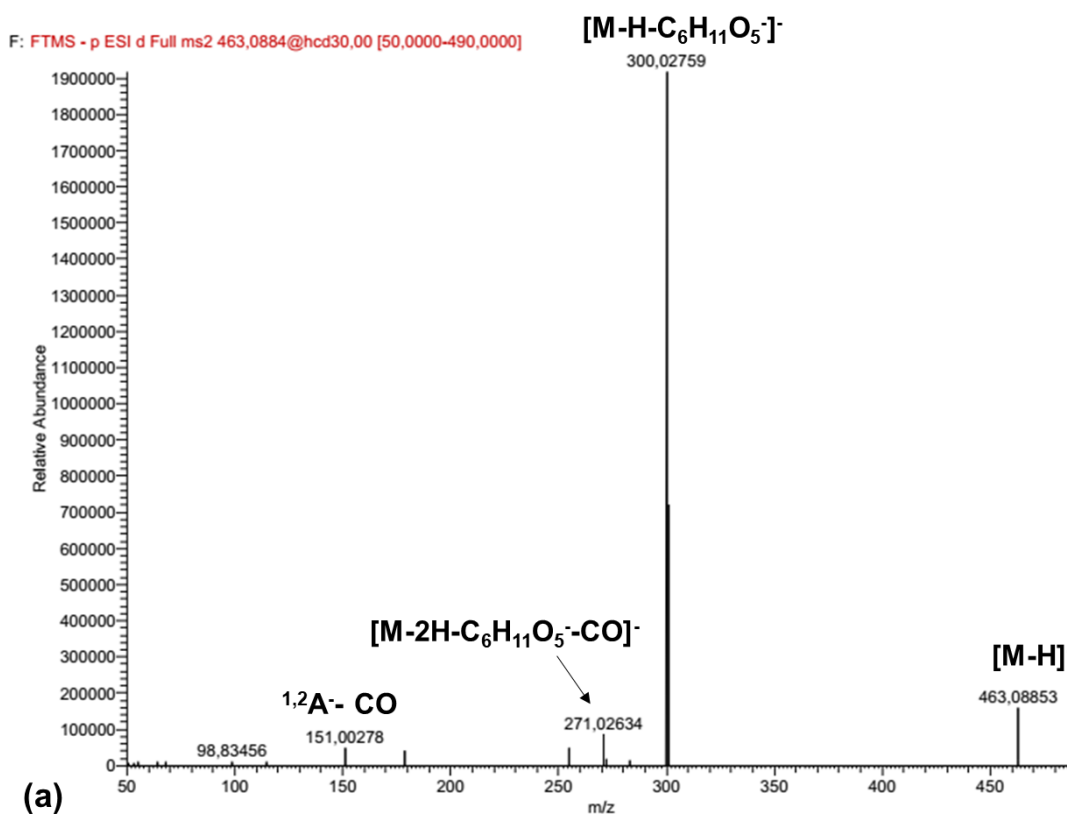


F: FTMS - p ESI d Full ms2 447,0934@hcd20,00 [50,0000-475,0000]

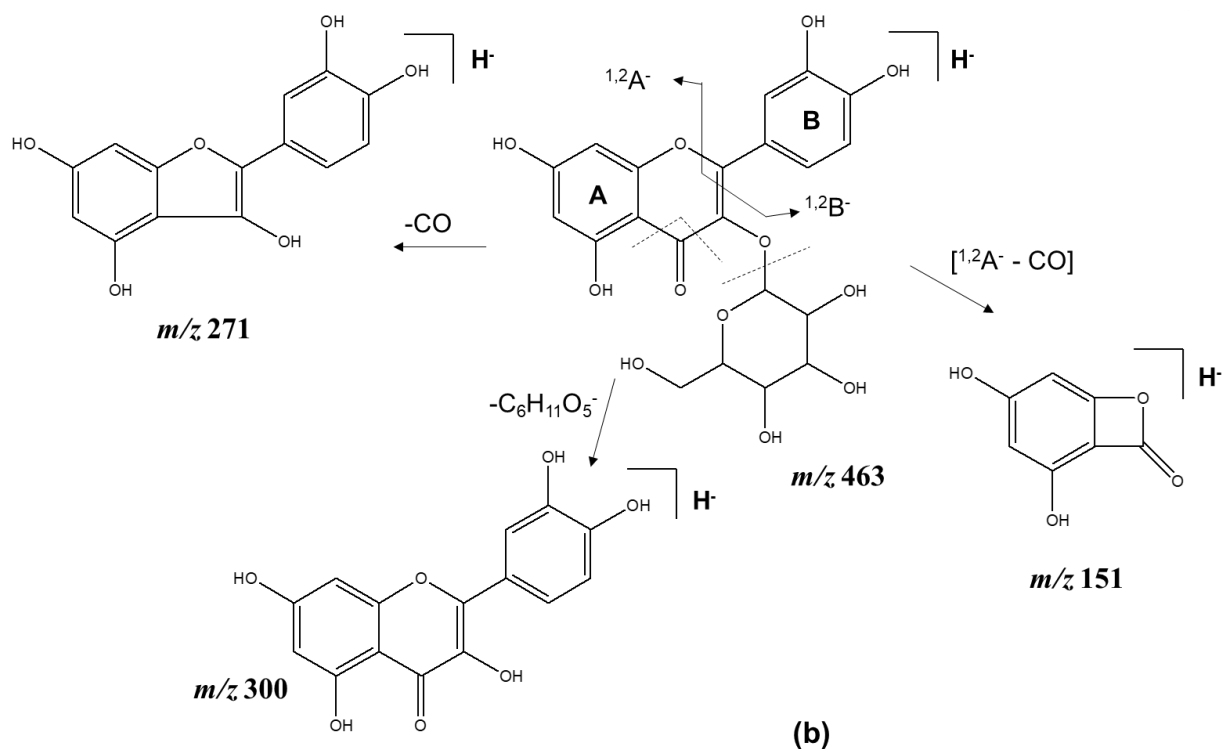


**Figura 42.** Alinhamento de espectros (a) e fragmentação (b) do metabólito 76 anotado como kaempferol-3-*O*-glucosídeo.

O metabólito **77** ( $m/z$  417,08295  $[M-H]^-$ ) anotado como kaempferol-3- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo possui a diferença de 30 Da em relação ao composto **76**, que se refere a ausência do substituinte  $CH_2OH$  do anel glucosídeo e o **78** ( $m/z$  431,09833  $[M-H]^-$ ) anotado como e kaempferol-3-hexosídeo, possuem a diferença de 16 Da devido a ausência de um substituinte OH. Verificou-se que os espectros de EM/EM de ambos apresentaram picos de fragmentação com valores de  $m/z$  similares ao composto **76**, conforme a **Tabela 8** (**Apêndice C**, página 122). O composto **79** apresenta  $m/z$  463,08853  $[M-H]^-$  e anotação como quercetina-*O*-hexosídeo, apresenta mesma diferença de massa de 16 Da em relação ao metabólito **76**, entretanto difere na fragmentação, com a presença dos íons de  $m/z$  300,02759,  $m/z$  271,02634 e  $m/z$  151,00278, de acordo com o espectro de EM/EM e da proposta de fragmentação da **Figura 43**.







**Figura 43.** Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito **79** anotado como quercetina-3-hexosídeo (FABRE *et al.*, 2001).

Os metabólitos anotados **80** ( $m/z$  577,15656  $[M-H]^-$ ) kaempferitrina, **81** ( $m/z$  593,15155  $[M-H]^-$ ) kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, **82** ( $m/z$  593,15137  $[M-H]^-$ ) kaempferol-3-*O*-neohesperidosídeo e **83** ( $m/z$  609,14581  $[M-H]^-$ ) kaempferol-3-*O*-soforosídeo apresentam esqueleto básico de compostos da classe dos kaempferol, diferindo quanto ao substituinte (pentose ou hexose) e na posição dos mesmos entre os anéis A e C. A fragmentação destes metabólitos é semelhante e possui íons produtos em comum, descritos na **Tabela 8** (**Apêndice C**, página 122), como por exemplo a anotação **81** com íons fragmentos de  $m/z$  327,05154  $[M-H-C_6H_5O^- - C_6H_{11}O_4^- - CO]^-$  referente a clivagem do anel B, seguida pela perda da pentose e de CO,  $m/z$  285,04047 observado pela perda do grupo glucosídeo,  $m/z$  255,02820  $[M-H-C_{12}H_{21}O_9^- - CO]^-$  devido à perda dos grupos hexose e de CO e o íon  $m/z$  151,00275  $[^{1,3}A^-]$  formado por RDA (**Figura 44**).

F: FTMS - p ESI d Full ms2 593,1304@hcd20,00 [50,0000-625,0000]

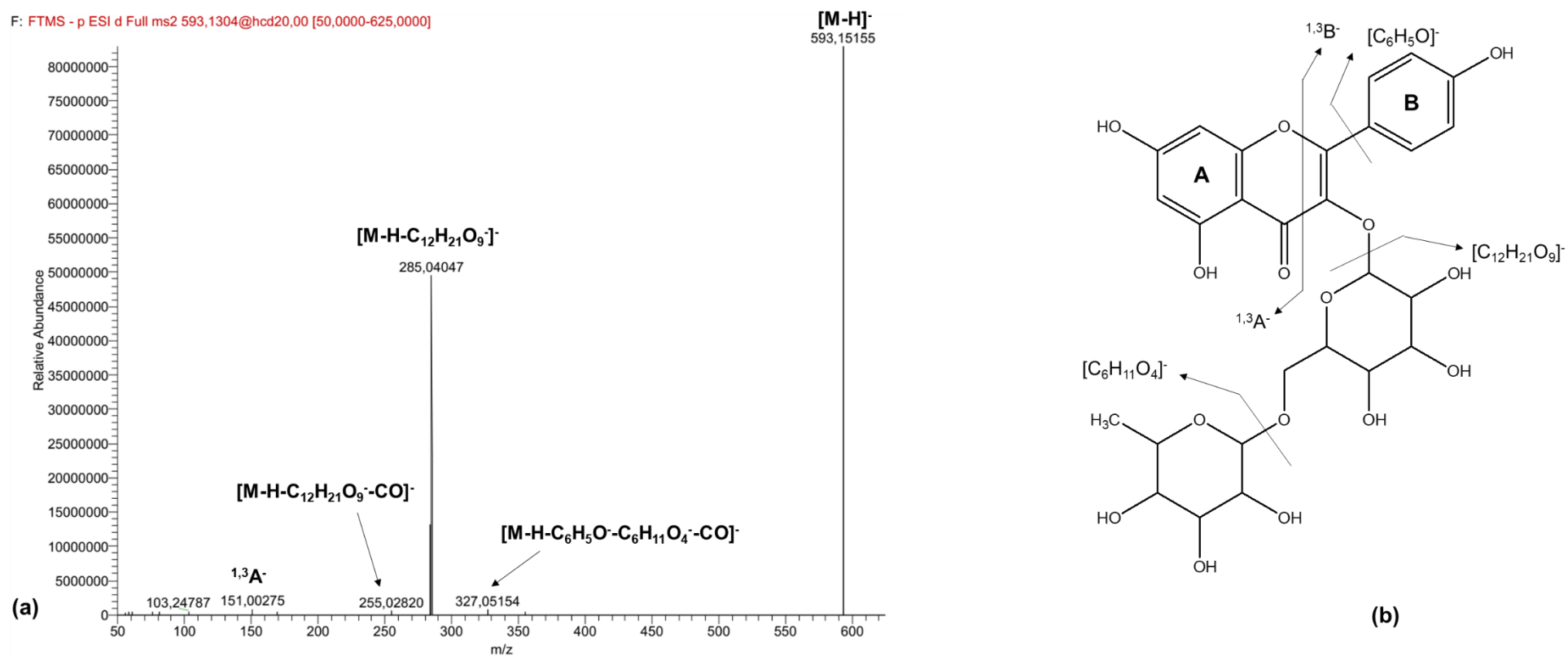


Figura 44. Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito **81** anotado como kaempferol-3-O-rutinosideo.

Os metabólitos **84** ( $m/z$  609,14630 [M-H]<sup>-</sup>) e **85** ( $m/z$  625,13922[M-H]<sup>-</sup>) foram anotados como quercetina-3-*O*-glucosideo-7-*O*-ramnosideo e quercetina-3-glucosil-(1→6)-galactosideo, respectivamente. A fragmentação dos flavonóis observados está descrita na **Tabela 8 (Apêndice C, página 122)**, com a verificação do pico base de  $m/z$  301,03522 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> para a anotação **84** com perda das hexoses e  $m/z$  301,03400 [M-H-C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> para a anotação **85** com a perda do grupo glucosideo.

No espectro de massas EM/EM do composto **86** de  $m/z$  739,20978 [M-H]<sup>-</sup> anotado como mauritianin, a fragmentação levou aos íons produtos de  $m/z$  593,15411 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> correspondente a clivagem de um anel glucosideo,  $m/z$  575,14423 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> referente a perda de uma hexose e H<sub>2</sub>O,  $m/z$  284,03275 [M-H-C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>O<sub>13</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> correspondente ao grupamento ramnopiranosil-galactopiranosideo e o íon de  $m/z$  178,99738 [<sup>1,2</sup>A]<sup>-</sup> referente a clivagem do anel C, de acordo com a **Figura 45**. Com a diferença de uma hidroxila (16 Da) e fragmentação semelhante ao composto **86**, o metabólito **87** foi anotado como kaempferol-3-glucosil-(1→2)-ramnosil-(1→6)-galactosideo ( $m/z$  755,20392 ) conforme a **Tabela 8 (Apêndice C, página 122)**.

O metabólito anotado **88** ( $m/z$  771,19897 [M-H]<sup>-</sup>), derivado de quercetina, apresenta diferença de 16 Da (equivalente ao grupo hidroxila) em relação ao composto **84**, anotado como quercetina-3-rutinosideo-7-galactosideo, a fragmentação observada no espectro de EM/EM (**Figura 46**) mostrou a presença dos íons fragmentos de  $m/z$  591,14288 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> correspondente a perda da hexose do anel A e de H<sub>2</sub>O,  $m/z$  300,02786 [M-H-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>- C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>9</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> referente a perda das hexoses e  $m/z$  178,99678 [<sup>1,2</sup>A]<sup>-</sup> correspondente a clivagem do anel C. Os metabólitos **89** e **90** são derivados de quercetina e foram anotados como quercetina-3-*O*-arabinosideo ( $m/z$  433,07797 [M-H]<sup>-</sup>) e quercetina-3,7-*O*-diramnosideo ( $m/z$  593,15326 [M-H]<sup>-</sup>), respectivamente, possuem íon fragmento intenso de  $m/z$  300,02768 [M-H-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> referente a perda da pentose para o composto **89** e de  $m/z$  301,03516 [M-H- C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>]<sup>-</sup> correspondente a perda das hexoses para o composto **90**, de acordo com a **Tabela 8 (Apêndice C, página 122)**.

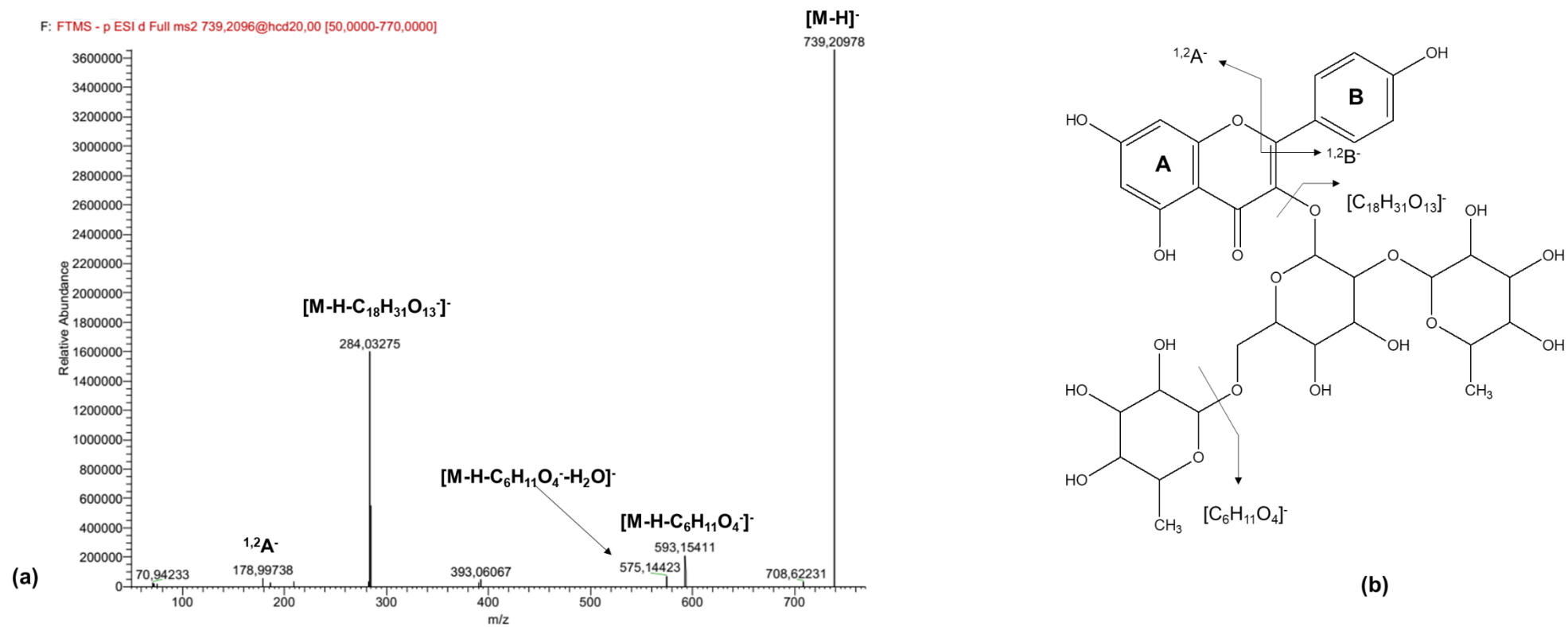


Figura 45. Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito **86** anotado como mauritianin.

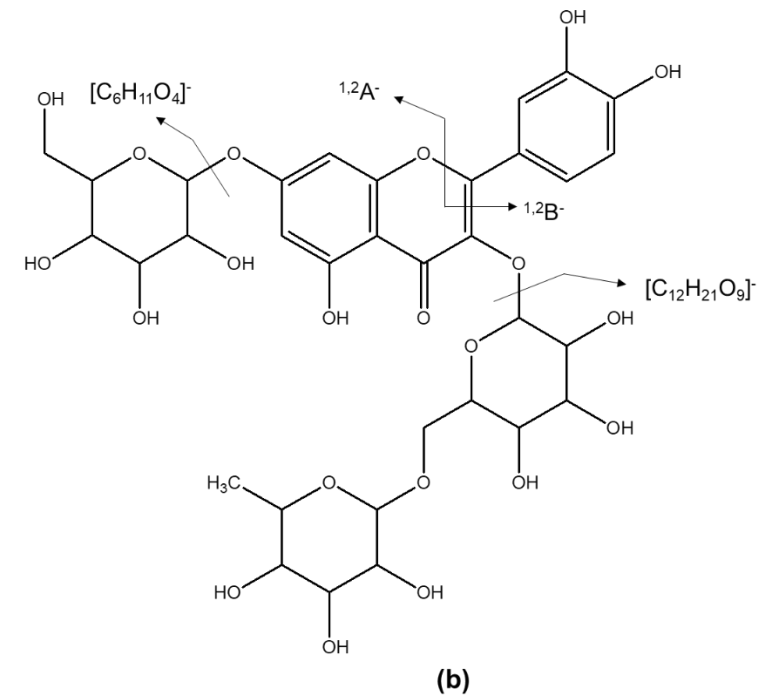
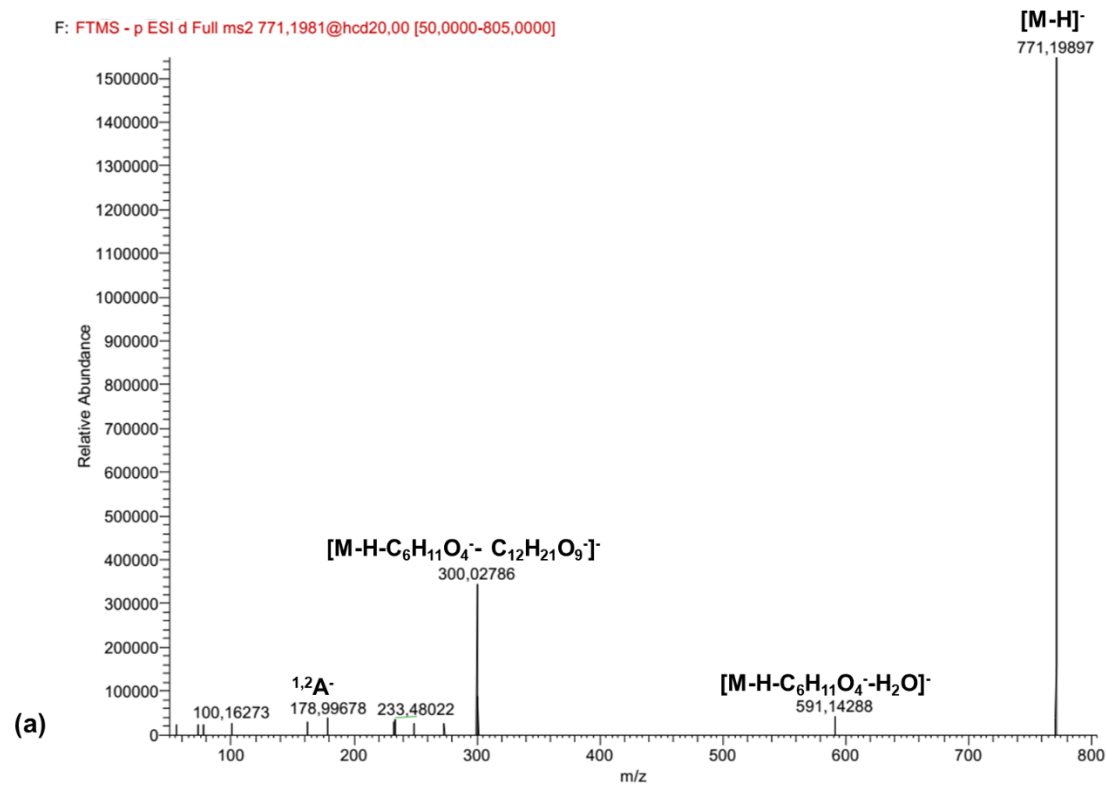
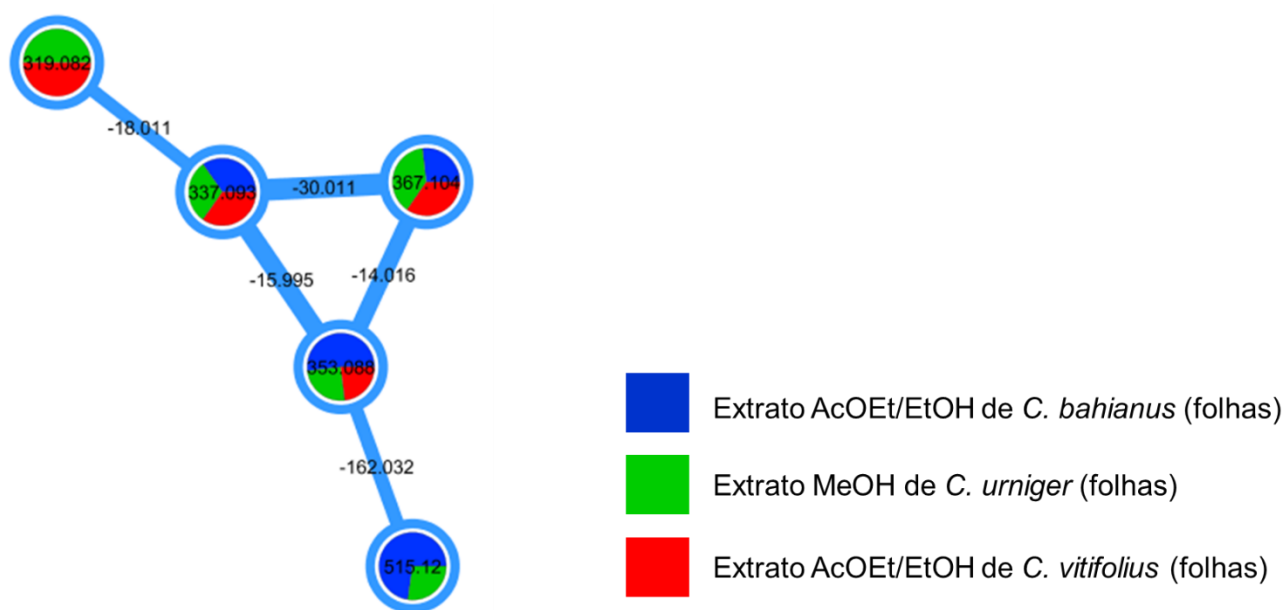
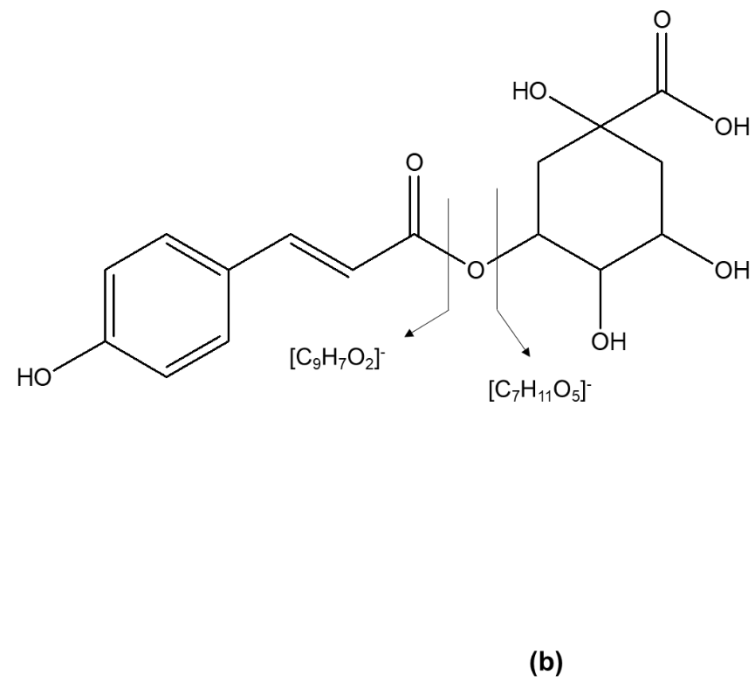
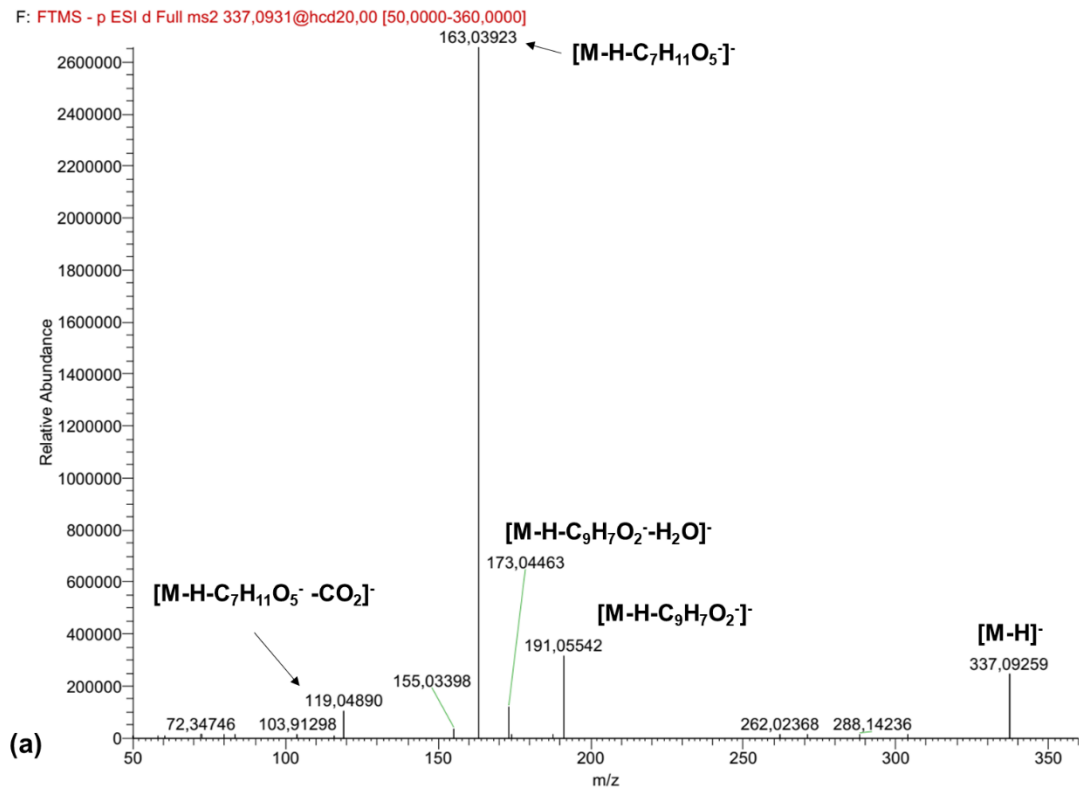


Figura 46. Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito **88** anotado como quercetina-3-rutinosideo-7-galactosideo.

O cluster **V** (**Figura 47**) demonstrou a correlação entre metabólitos anotados da classe de compostos ácidos hidroxicinâmicos. Os metabólitos **91** ( $m/z$  337,09259 [M-H]<sup>-</sup>), **92** ( $m/z$  353,08820 [M-H]<sup>-</sup>), **93** ( $m/z$  367,10361 [M-H]<sup>-</sup>) e **94** ( $m/z$  515,11871 [M-H]<sup>-</sup>) foram anotados como ácido-5-*p*-cumaroilquinico, ácido-3-*O*-cafeoilquinico, ácido-3-*O*-cafeoil-4-*O*-metilquinico e ácido-1,5-dicafeoilquinico, respectivamente. Os metabólitos observados possuem estrutura molecular e padrões de fragmentação similares com a presença de íons produtos de  $m/z$  191 e  $m/z$  173 de acordo com a **Tabela 8** (**Apêndice C**, página 122). A **Figura 48** mostra fragmentação do composto **91**, ácido-5-*p*-cumaroilquinico, apresentou os íons produtos de  $m/z$  191,05542 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> devido a perda da porção cumaroil,  $m/z$  173,04463 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> referente a perda da porção cumaroil e H<sub>2</sub>O, entre os íons que também confirmam as identidades dos metabólitos **92**, **93** e **94**, estão  $m/z$  163,03923 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup> indica a presença do ácido cumárico e  $m/z$  119,04890 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> que representa o ácido cumárico com a perda de H<sub>2</sub>O (CHANDRADEVAN *et al.*, 2020).



**Figura 47.** Expansão da rede molecular (**cluster V**) correspondente aos compostos anotados da classe dos ácidos hidroxicinâmicos presentes nos extratos das folhas de *Cnidocolus*.



**Figura 48.** Espectro de massas EM/EM (a) e a proposta de fragmentação (b) do metabólito **91** anotado como ácido-5-*p*-cumaroilquinico.

A análise CLAE-IES-EM/EM e a abordagem por redes moleculares provaram ser ferramentas eficazes para identificar e anotar diferentes compostos em extratos de plantas. O estudo de desrepliação associado a abordagem em redes moleculares e dados de EM no modo negativo, realizado com os extratos das folhas das espécies de *Cnidocolus*, revelou a anotação de metabólitos da classe dos compostos fenólicos como os flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos. Em relação a análise no modo negativo e a presença de compostos fenólicos nos extratos, destacou-se que os flavonóis anotados como kaempferol e quercetina estão presentes em todos os extratos com destaque para os grupos **G1** (CBAEF, CBEF, CBEC) e **G3** (CVAEF, CVEF, CVEC), no entanto, aromandendrina e taxifolina foram anotadas somente para o grupo **G3** (CVAEF, CVEF). Os flavanóis (catequina e epigallocatequina) foram anotados somente para o extrato CVEF (**G3**). As flavonas (apigenina), flavanonas (prunin e derivados) e os ácidos hidroxicinâmicos foram observados em todos os extratos.

Os dados CLAE-IES-EM/EM no modo positivo dos extratos das folhas das espécies de *Cnidocolus* também foram usados para a construção da rede molecular clássica e a anotação dos compostos obtida com o auxílio das bibliotecas do GNPS, PubChem e Metlin encontra-se organizada na **Tabela 9** (**Apêndice C**, página 137) e a estrutura dos metabólitos obtidos podem ser observadas na **Figura 66** (**Apêndice C**, página 143). Verificou-se que os compostos anotados a partir dos dados no modo positivo apresentaram compostos semelhantes em relação às anotações (classes, metabólitos e fragmentações) observadas na análise com dados no modo negativo.

A rede molecular construída com os dados de EM no modo positivo apresentou a anotação de 14 flavonoides, incluindo as flavonas (metabólitos **95** a **99**) e os flavonóis (metabólitos **100** a **108**). A identificação e anotação de compostos por meio de redes moleculares possui caráter inovador para *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* por não haver na literatura descrição semelhante para estas espécies. Um total de 44 metabólitos foram anotados com base na comparação de seus dados de CLAE-IES-EM/EM e categorizadas nas classes dos flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos, demonstrando que essas espécies possuem um conteúdo fenólico significativo.

Com relação a análise no modo positivo e a presença dos flavonoides (flavona e flavonol) presentes nos extratos, destacou-se que as flavonas (apigenina e luteolina) anotadas foram observadas em todos os extratos presentes nos grupos **G1** (CBAEF, CBEF), **G2** (CUMF) e **G3** (CVAEF, CVEF). Os flavonóis anotados foram observados



em sua maioria em todos os extratos, no entanto, a mircetina foi anotado somente para o grupo **G1**, o metabólito **103** foi encontrado somente no extrato CUMF e o metabólito **107** foi anotado para grupo **G1**.

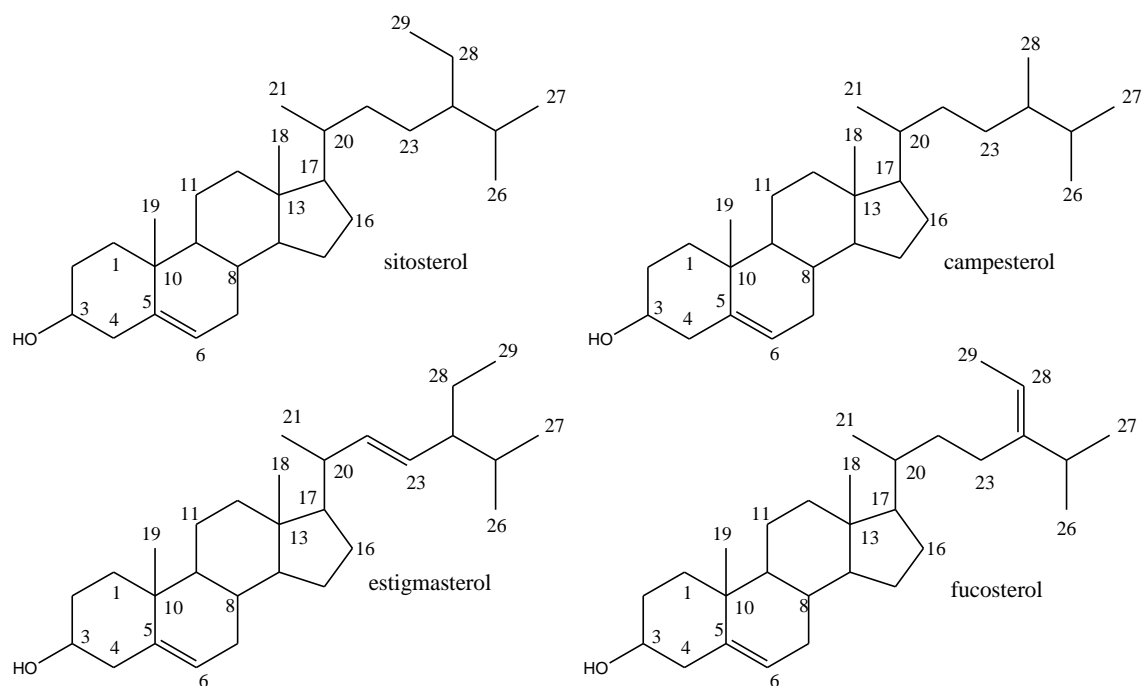
#### **4.4. Elucidação estrutural dos compostos utilizando as técnicas de RMN 1D e 2D, CG-EM E CLAE-EM/EM**

Os estudos fitoquímicos descritos na literatura para espécies do gênero *Cnidoscopus* apresentaram a ocorrência de diversas classes de metabólitos, os flavonoides, triterpenos, esteroides e diterpenos representam as principais classes de compostos que foram isolados. *C. phyllacanthus* e *C. souzae* foram as únicas espécies que relataram a presença de diterpenos. Visando a obtenção desses compostos diterpênicos característicos das *Cnidoscopus*, iniciou-se o estudo químico pelos extratos hexânicos, devido a polaridade dos compostos alvo, seguidos por acetato de etila, etanol e metanol.

Todos os extratos das espécies estudadas neste trabalho, exceto CBEF (por apresentar pouca massa de extrato) e CVEC (devido a literatura apresentar estudo do caule para a espécie *C. vitifolius*), foram analisados por cromatografia em coluna do tipo filtrante (relação amostra/sílica = 1 g/30 g) com o objetivo de se obter compostos característicos do gênero. No entanto, apenas os extratos CBHF e CUMF apresentaram resultados a cerca do isolamento por coluna filtrante.

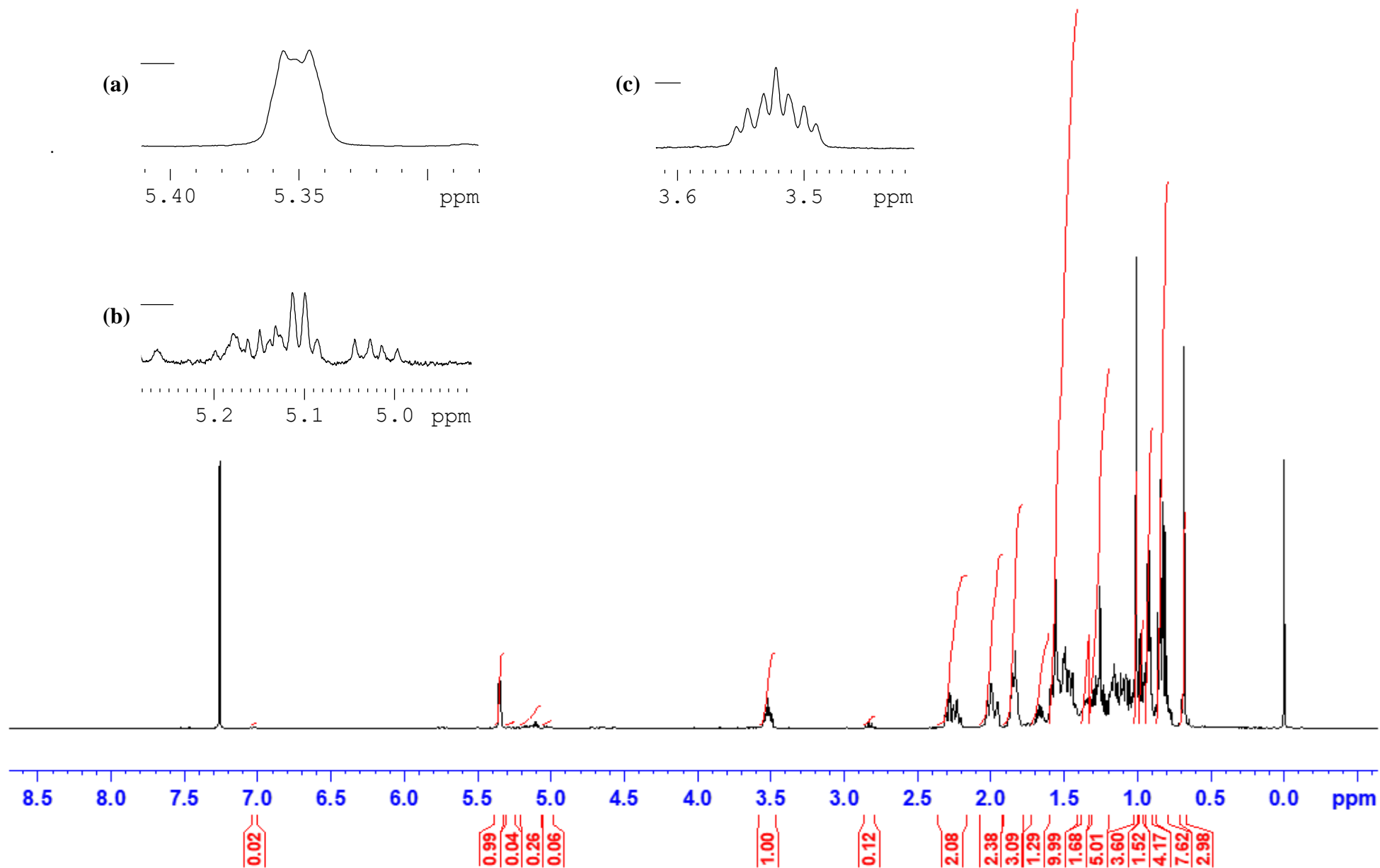
##### **4.4.1. Estudo químico do extrato hexânico das folhas de *C. bahianus* (CBHF)**

O estudo químico do extrato hexânico das folhas de *C. bahianus* resultou no isolamento e identificação da mistura de esteroides (sitosterol, campesterol, estigmasterol e fucosterol) (SONG, *et al.*, 2021) denominada amostra **CBHF-11.2 (Figura 49)**.



**Figura 49.** Estrutura dos esteroides sitosterol, campesterol, estigmasterol e fucosterol obtidos em mistura (amostra **CBHF-11.2**) e isolados a partir do extrato hexânico das folhas de *C. bahianus*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 50**) da amostra **CBHF-11.2**, obtida do extrato hexânico das folhas de CBHF, apresentou sinais característicos de estruturas estereodais, observou-se a presença de um duplete largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (*d*,  $J = 5,0$  Hz) característico do hidrogênio  $\text{H}_6$ , de sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,10 (*q*,  $J = 6,9$  Hz) atribuídos aos hidrogênios ( $\text{H}_{28}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  5,01 (*dd*,  $J = 8,3$  e  $14,7$  Hz) e atribuídos aos hidrogênios ( $\text{H}_{22}$  e  $\text{H}_{23}$ ), da ligação dupla da cadeia lateral do fucosterol e estigmasterol, respectivamente, um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,56-3,48 (*m*, 1H), característico hidrogênios  $\text{H}_3$ , das estruturas esteroideais de campesterol, estigmasterol, sitosterol e fucosterol. Os sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,54 a 2,33 são correspondentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos característicos dos compostos mencionados, verificados na **Tabela 4** (KOJIMA *et al.*, 1990; MOREAU *et al.*, 2002; PAULA *et al.*, 2016).

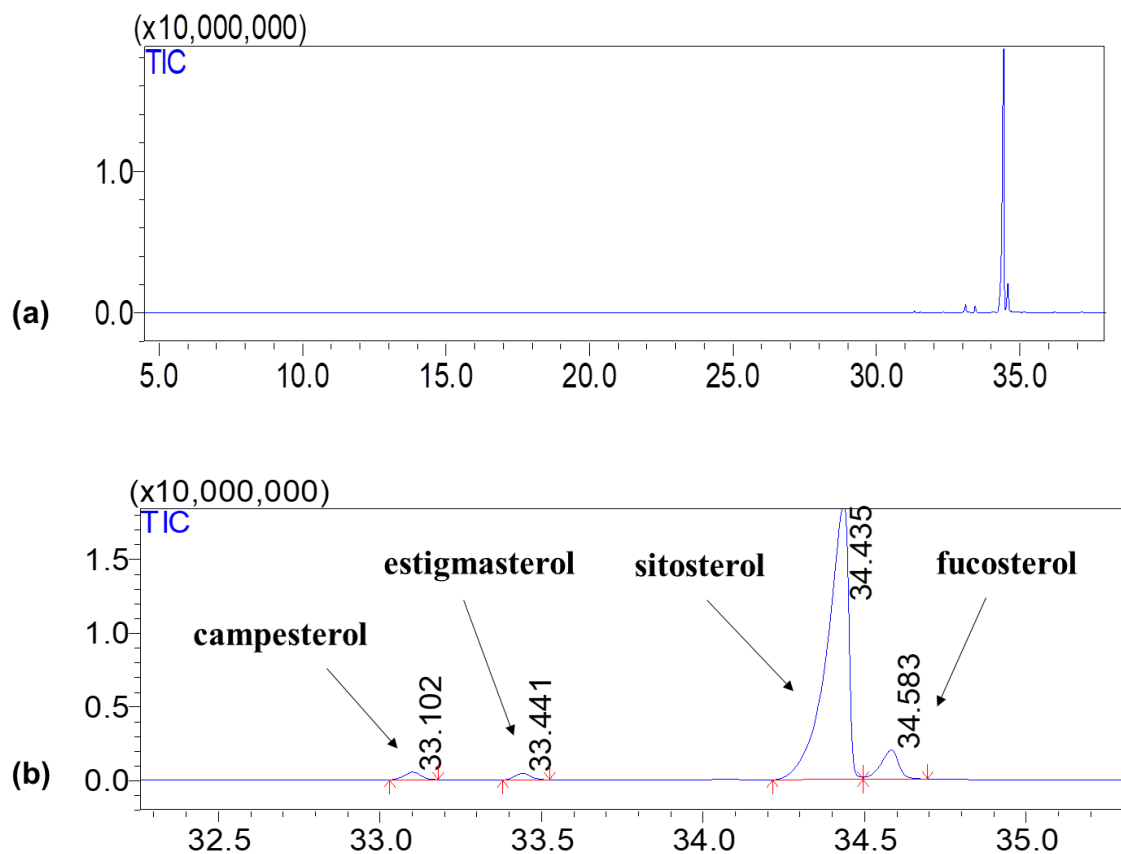


**Figura 50.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS, 500,13 MHz) da mistura de esteroides da amostra **CBHF-11.2**, com expansões das regiões: (a) 5,40-5,30 ppm, (b) 5,20-5,00 e (c) 3,60-3,40 ppm

**Tabela 4.** Comparação de dados de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de esteroides **CBHF-11.2** e dados da literatura dos esteroides campesterol, estigmasterol, sitosterol e fucosterol. Fonte: KOJIMA *et al.*, 1990; MOREAU *et al.*, 2002; PAULA *et al.*, 2016

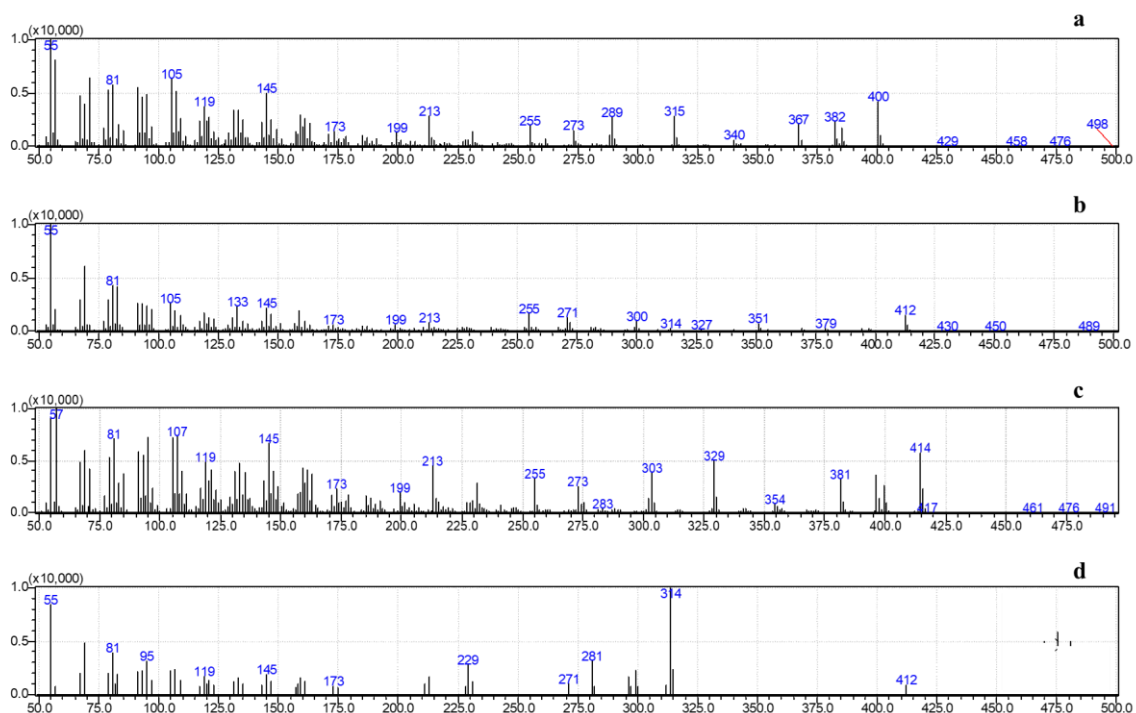
	<b>CBHF-11.2</b>	<b>campesterol</b>	<b>estigmasterol</b>	<b>sitosterol</b>	<b>fucosterol</b>
<b>Hidrogênios</b>	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), Mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), Mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), Mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), Mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), Mult., <i>J</i> (Hz)
<b>H<sub>3</sub></b>	3,56-3,48 ( <i>m</i> )	3,51 ( <i>m</i> )	3,51 ( <i>m</i> )	3,52 ( <i>m</i> )	3,53 ( <i>m</i> )
<b>H<sub>6</sub></b>	5,33 ( <i>d</i> , 5,0)	5,33 ( <i>d</i> , 5,2)	5,33 ( <i>d</i> , 5,2)	5,35 ( <i>d</i> , 5,2)	5,35 ( <i>d</i> , 5,2)
<b>H<sub>18</sub></b>	0,68 ( <i>s</i> )	0,67 ( <i>s</i> )	0,69 ( <i>s</i> )	0,67 ( <i>s</i> )	0,68 ( <i>s</i> )
<b>H<sub>19</sub></b>	1,00 ( <i>s</i> )	1,00 ( <i>s</i> )	1,00 ( <i>s</i> )	1,00 ( <i>s</i> )	1,00 ( <i>s</i> )
<b>H<sub>21</sub></b>	0,97 ( <i>d</i> , 6,9)	0,90 ( <i>d</i> , 6,6)	1,01 ( <i>d</i> , 6,6)	0,92 ( <i>d</i> , 6,6)	0,98 ( <i>d</i> , 6,4)
<b>H<sub>22</sub>, H<sub>23</sub></b>	5,01 ( <i>dd</i> , 8,3 e 14,7)	-	5,00 ( <i>dd</i> , 8,6, 5,2)	-	-
<b>H<sub>26</sub>, H<sub>27</sub></b>	0,83 ( <i>d</i> , 6,9), 0,81 ( <i>d</i> , 6,9)	0,84 ( <i>d</i> , 6,8, H <sub>26</sub> ) 0,79 ( <i>d</i> , 6,8, H <sub>27</sub> )	0,80 ( <i>d</i> , 6,8, H <sub>27</sub> ), 0,85 ( <i>d</i> , 6,8, H <sub>26</sub> )	0,80, 0,82 ( <i>d</i> , 6,8, H <sub>26</sub> , H <sub>27</sub> )	1,01, 1,02 ( <i>d</i> , 6,8, H <sub>26</sub> , H <sub>27</sub> )
<b>H<sub>28</sub></b>	5,10 ( <i>q</i> , 6,9)	0,77 ( <i>d</i> , 6,6)	-	-	5,18 ( <i>q</i> , 6,7)
<b>H<sub>29</sub></b>	0,85 ( <i>d</i> , 7,9)	-	0,76 ( <i>d</i> , 7,8)	0,84 ( <i>d</i> , 7,8)	1,57( <i>d</i> , 7,2)

Os compostos campesterol, estigmasterol, sitosterol e fucosterol presentes na amostra CBHF-11.2, apresentam fórmulas estruturais semelhantes, não sendo possível diferenciá-las nessa análise por RMN de  $^1\text{H}$ . Desse modo, foi realizada a análise da amostra por CG-EM, confirmando a presença de quatro picos no cromatograma, referentes às substâncias mencionadas (**Figura 51**).



**Figura 51.** (a) Cromatograma de íons totais da mistura dos esteroides obtidos por CG-EM da amostra CBHF-11.2. (b) Expansão do cromatograma de íons totais da mistura de esteroides com tempo de retenção dos compostos campesterol (33,102 min), estigmasterol (33,441 min), sitosterol (34,435 min) e fucosterol (34,583 min).

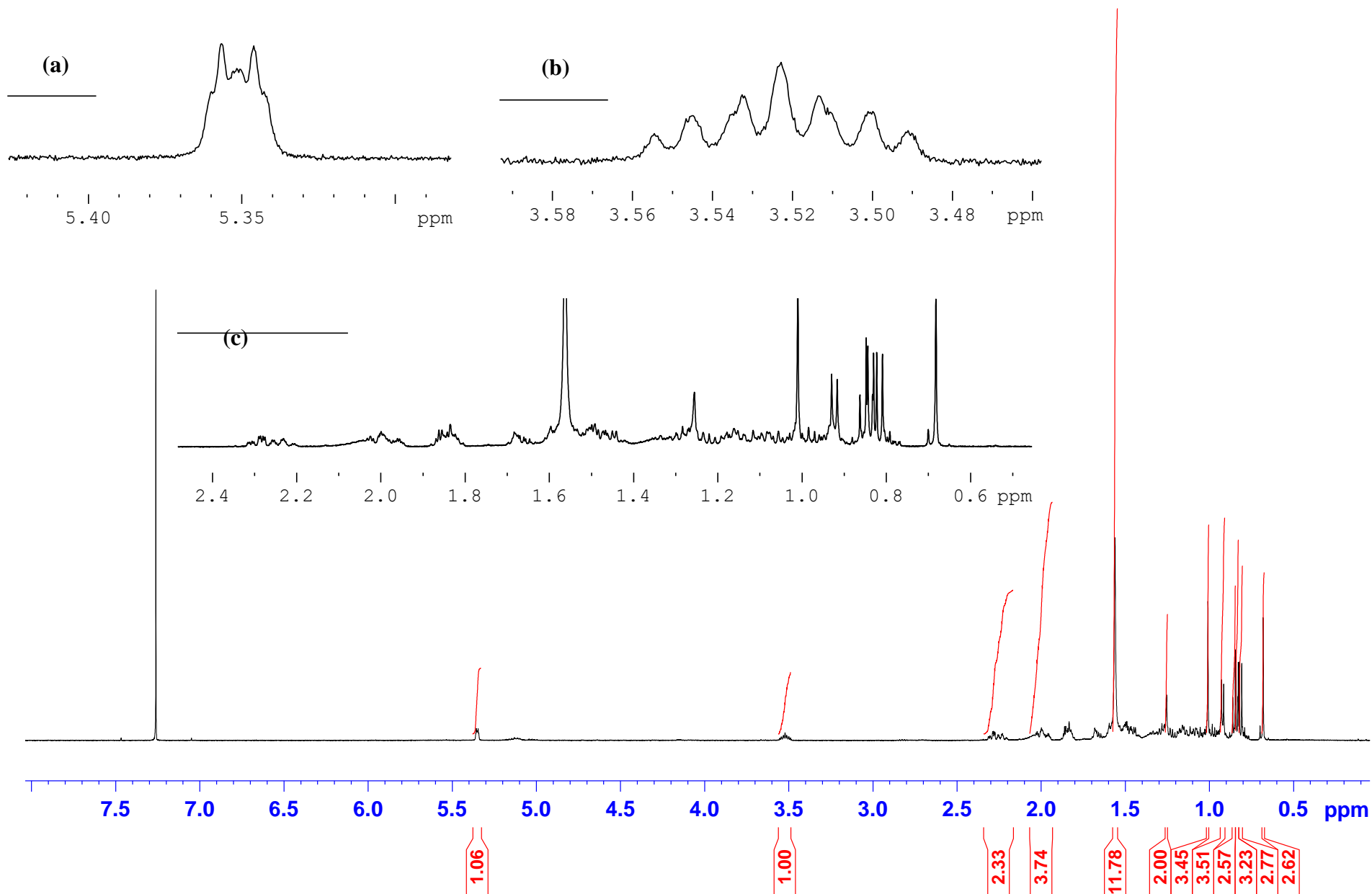
De acordo com a biblioteca do equipamento (NIST Mass Spectral Library), os espectros de massas obtidos através da análise mostraram a presença dos íons moleculares de  $m/z$  400 ( $C_{28}H_{48}O$ ; campesterol; 95% de similaridade),  $m/z$  412 ( $C_{29}H_{48}O$ ; estigmasterol; 92% de similaridade),  $m/z$  414 ( $C_{29}H_{50}O$ ; sitosterol; 93% de similaridade) e  $m/z$  412 ( $C_{29}H_{48}O$ ; fucosterol; 86% de similaridade) (KORNPOINTNER, *et al.*, 2021; SIMONETTE, *et al.*, 2021), representados na **Figura 52**.



**Figura 52.** Espectros de massas dos componentes da amostra **CBHF-11.2**: (a) campesterol, (b) estigmasterol, (c) sitosterol e (d) fucosterol.

#### 4.4.2. Estudo químico do extrato metanólico das folhas de *C. urniger* (CUMF)

O estudo químico do extrato metanólico das folhas de *C. urniger* levou ao isolamento e identificação do composto **CUMF-18.2**. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 53**) de **CUMF-18.2** apresenta múltiplos sinais na região entre  $\delta_{\text{H}}$  2,30 e 0,65, sendo esta região característica de hidrogênios dos grupamentos metínicos, metilênicos e metílicos, comumente presente em compostos terpênicos. Os sinais observados em  $\delta_{\text{H}}$  1,00 (*s*, 3H, H<sub>19</sub>), 0,92 (*d*, 3H, *J*= 6,8 Hz, H<sub>21</sub>), 0,85 (*d*, 3H, *J*= 7,3 Hz, H<sub>29</sub>), 0,83 (*d*, 3H, *J*= 6,8 Hz, H<sub>26</sub>), 0,81 (*d*, 3H, *J*= 6,8 Hz, H<sub>27</sub>) e 0,68 (*s*, 3H, H<sub>18</sub>) foram observados com integração para 3 hidrogênios, que sugerem a presença de seis substituintes metílicos. A presença de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (*d*, 1H, H<sub>6</sub>) atribuído a presença de hidrogênio olefínico, um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,56-3,48 (*m*, 1H, H<sub>3</sub>) correspondente a um hidrogênio ligado ao carbono carbinólico são característicos de compostos de natureza estereoidal (**Tabela 5**).



**Figura 53.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do composto **CUMF-18.2**, com expansões das regiões: (a) 5,38-5,32 ppm, (b) 3,55-3,50 ppm e (c) 2,30-0,65 ppm.

**Tabela 5.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC do composto **CUMF-18.2**. (continua)

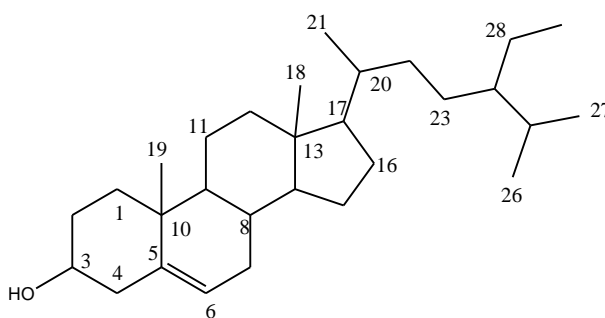
<b>Hidrogênios</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm) (Multiplicidade; <math>J</math> (Hz); Nº de hidrogênios)</b>	<b>HSQC (ppm)</b>	<b>HMBC (ppm)</b>
<b>H<sub>1</sub></b>	1,15	39,8	21,1; 42,3
<b>H<sub>2</sub></b>	1,83	31,7	36,5; 71,8; 140,7
<b>H<sub>3</sub></b>	3,53 ( <i>m</i> ; 1H)	71,8	-
<b>H<sub>4</sub></b>	2,28	42,3	31,7; 31,9; 36,5; 71,8; 121,7
<b>H<sub>5</sub></b>	-	140,7	-
<b>H<sub>6</sub></b>	5,33 ( <i>d</i> ; 5,2; 1H)	121,7	31,9; 36,8; 42,3
<b>H<sub>7</sub></b>	2,00	31,9	21,0; 50,2; 56,8
<b>H<sub>8</sub></b>	1,57	24,3	-
<b>H<sub>9</sub></b>	0,93	50,2	-
<b>H<sub>10</sub></b>	-	36,5	-
<b>H<sub>11</sub></b>	1,49	21,1	39,8; 50,2; 71,8
<b>H<sub>12</sub></b>	1,99	39,8	56,8
<b>H<sub>13</sub></b>	-	51,2	-
<b>H<sub>14</sub></b>	0,98	56,8	24,3
<b>H<sub>15</sub></b>	1,25	28,2	29,2
<b>H<sub>16</sub></b>	1,85	37,2	31,9; 56,1
<b>H<sub>17</sub></b>	1,09	56,1	12,0
<b>H<sub>18</sub></b>	0,68 ( <i>s</i> ; 3H)	12,0	39,7; 42,3; 56,1; 56,8
<b>H<sub>19</sub></b>	1,00 ( <i>s</i> ; 3H)	19,4	36,5; 37,3; 50,2;
<b>H<sub>20</sub></b>	1,35	36,1	23,1
<b>H<sub>21</sub></b>	0,92 ( <i>d</i> ; 6,8; 3H)	18,1	34,0; 36,1; 56,1
<b>H<sub>22</sub></b>	1,34	34,0	36,1



Tabela 5. (conclusão)

Hidrogênios	$\delta_H$ (ppm) (Multiplicidade; $J$ (Hz); Nº de hidrogênios)	HSQC (ppm)	HMBC (ppm)
H <sub>23</sub>	1,15	26,1	-
H <sub>24</sub>	0,92	45,9	23,1; 34,0
H <sub>25</sub>	1,65	29,2	-
H <sub>26</sub>	0,83; <i>d</i> ; 6,8; 3H	19,8	19,0; 29,2; 45,9
H <sub>27</sub>	0,81; <i>d</i> ; 6,8; 3H	19,0	19,8; 29,2; 45,9
H <sub>28</sub>	1,25	23,1	29,2; 12,0
H <sub>29</sub>	0,85; <i>d</i> ; 7,3; 3H	12,0	23,1; 45,9

O composto **CUMF-18.2** foi identificado como sitosterol (**Figura 54**) a partir das análises dos espectros de HSQC (**Figura 55**) e HMBC (**Figura 56**), sendo possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios e carbonos.



**Figura 54.** Estrutura do composto **CUMF-18.2** isolado do extrato metanólico das folhas de *C. urniger*.

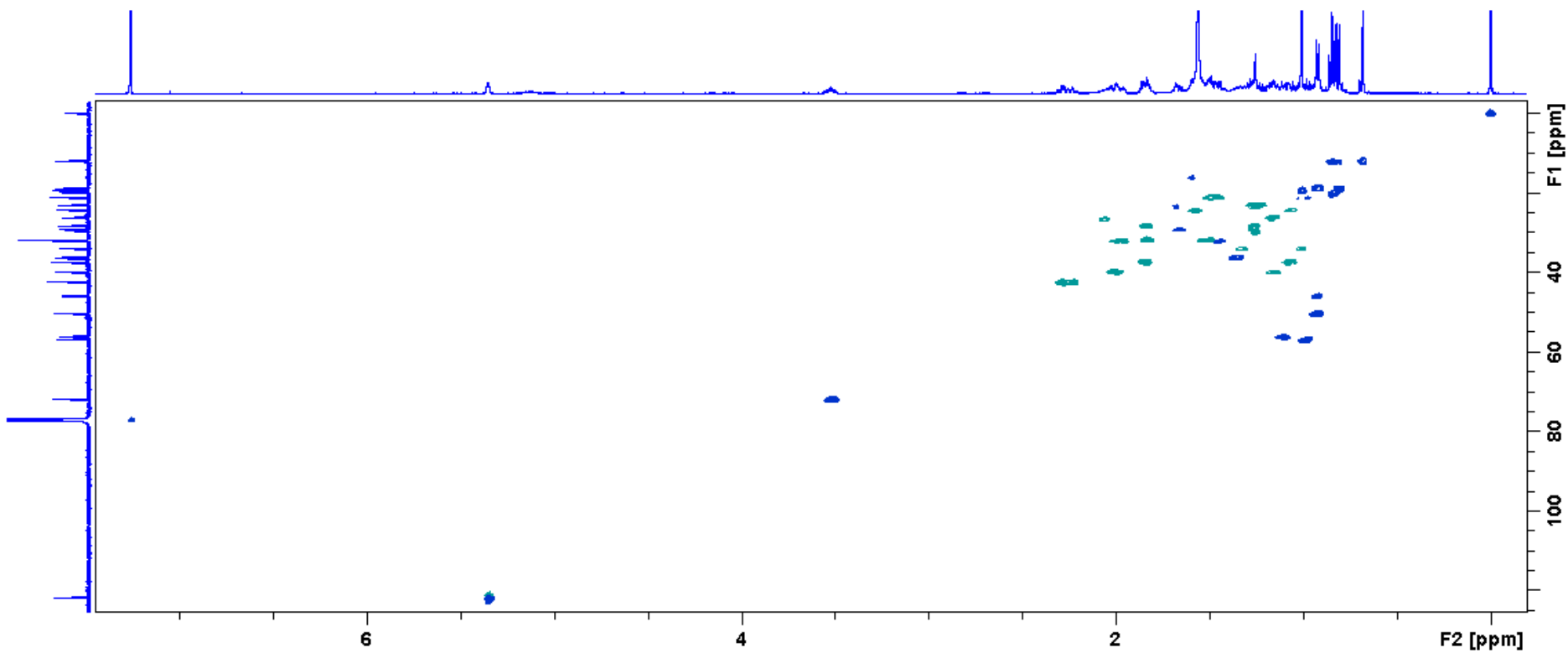
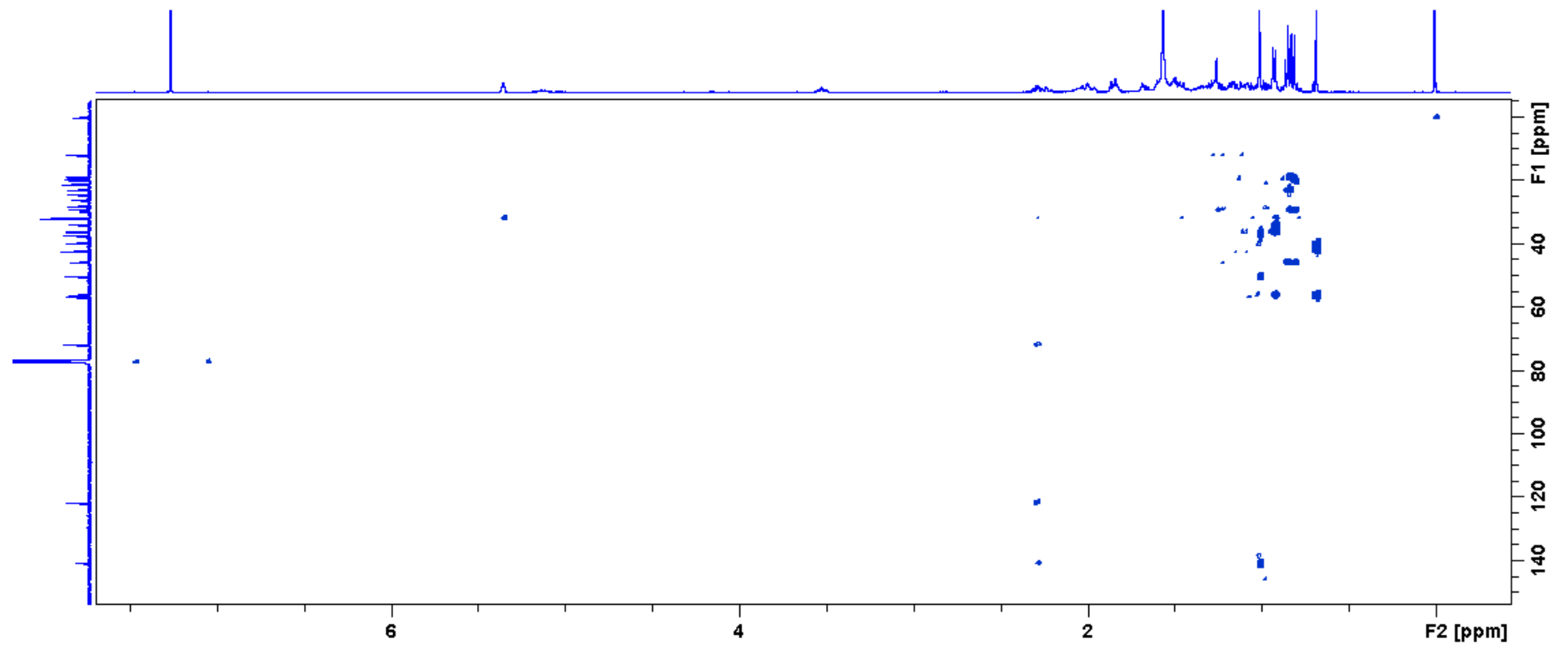


Figura 55. Mapa de correlação HSQC para o composto CUMF-18.2 (sitosterol).



**Figura 56.** Mapa de correlação HMBC para o composto **CUMF-18.2** (sitosterol).

A explicação para o fato da tentativa de isolamento de metabólitos presentes em outros extratos não ter sido satisfatória pode estar relacionada à massa de material vegetal e a maneira como foi realizado o procedimento inicial de extração (extração direta com diversos solventes), com o carreamento e espalhamento das substâncias majoritárias, gerando traços desses compostos em todos os extratos produzidos e conseqüentemente a obtenção reduzida da massa dos extratos.

#### 4.5. Ensaio Antimicrobiano dos extratos de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* frente aos microorganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

O ensaio antimicrobiano *in vitro* frente aos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi realizado para todos os extratos obtidos em hexano, acetato de etila, etanol e metanol. Os resultados da atividade antibacteriana estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Atividade antimicrobiana representada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de *Cnidocolus* frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. (continua)

Extratos	Concentração na placa (µg/mL)	CIM - <i>E. coli</i> (µg/mL)	CIM - <i>S. aureus</i> (µg/mL)
CBHF	3120	3120	1560
CBAEF	2280	~	1140
CBEF	400	200	400
CBHC	3120	3120	1560
CBAEC	3120	3120	~
CBEC	3120	3120	~
CUMF	3120	3120	3120
CUHC	3120	3120	3120
CUAEC	3120	1560	3120

**Tabela 6.** (conclusão)

Extratos	Concentração na placa ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM - <i>E. coli</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM - <i>S. aureus</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )
CUEC	2990	2990	~
CVHF	3840	1920	1920
CVAEF	4060	2030	2030
CVEF	3300	1650	1650
CVEC	4340	2170	2170

Legenda: Folhas de *C. bahianus*: CBHF – extrato hexânico, CBAEF – extrato acetato de etila, CBEF – extrato etanólico; Caule de *C. bahianus*: CBHC – extrato hexânico, CBAEC – extrato acetato de etila, CBEC – extrato etanólico; Folhas de *C. urniger*: CUMF – extrato metanólico; Caule de *C. urniger*: CUHC – extrato hexânico, CUAEC – extrato acetato de etila, CUEC – extrato etanólico; Folhas de *C. vitifolius*: CVHF – extrato hexânico, CVAEF – extrato acetato de etila, CVEF – extrato etanólico; Caule de *C. vitifolius*: CVEC – extrato etanólico.

Os resultados obtidos mostram que o extrato **CBEF** apresentou atividade inibitória moderada contra os microrganismos testados, possivelmente devido à presença de compostos fenólicos, esses metabólitos secundários são amplamente distribuídos em plantas e apresentam atividade antimicrobiana (MADOXX e LAUR, 2010; BOUARAB-CHIBANE *et al.*, 2019). Para os outros extratos observou-se ausência de atividade inibitória.

Estudos realizados com outras espécies do gênero *Cnidocolus* demonstraram atividade antimicrobiana frente cepas padrões e isoladas, confirmando o uso etnomedicinal destas plantas. Peixoto Sobrinho *et al.* (2012) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato metanólico e frações (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e metanólica) de *C. quercifolius*, utilizando o método de difusão em ágar, frente as cepas *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *S. coagulase*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginos*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. O extrato metanólico e a fração diclorometânica das cascas de *C. quercifolius* foram ativos contra *Staphylococcus sp.* e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

No estudo realizado por Rosas-Piñón *et al.* (2011) com o extrato aquoso e etanólico das folhas de *C. multilobus*, utilizando o método de microdiluição, foi

observada a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* (CIM: 62,5 µg/mL para o extrato aquoso e 15,6 µg/mL para o extrato etanólico) e *Porphyromonas gingivalis* (CIM: 500 µg/mL para o extrato aquoso e etanólico).

Adeniran *et al.* (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas, caule e raiz de *C. aconitifolius*, na concentração de 20 mg/mL, usando o método de difusão em ágar frente as cepas de *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato de folhas foi menos ativo contra *K. oxytoca* e *E. coli* enquanto o extrato do caule foi menos ativo contra *K. oxytoca*. Os extratos da raiz, folha e caule foram ativos frente a *Proteus spp.*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*.

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou a contribuição ao estudo metabolômico das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*. As análises de CLAE-IES-EM/EM e *Molecular Networking* foram aplicadas no estudo dos extratos das espécies mencionadas e permitiram a anotação de flavonoides glicosilados e ácidos hidroxicinâmicos. As classes químicas flavonoides e esteroide são consideradas as mais comuns e abundantes para as espécies do gênero *Cnidocolus*. Este trabalho demonstrou que a classe dos flavonoides foi a que apresentou maior diversidade estrutural para as espécies estudadas, com a anotação de flavonóis, flavanonas, flavonas e flavanóis, sendo o primeiro estudo que descreve esses compostos presentes nos extratos foliares. Observou-se também que a análise por *Molecular Networking* utilizando o modo negativo apresentou maior quantidade de compostos anotados que a análise no modo positivo favorecendo o estudo de desrepliação.

Os extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* foram analisados por RMN e comparados através da análise de componentes principais (ACP), revelando a similaridade entre os extratos etanólico/metanólico das folhas para as três espécies, com o direcionamento da desrepliação flavonoides glicosilados e esteroides. O estudo fitoquímico das partes aéreas de *C. bahianus*, por meio do isolamento por cromatografia e elucidação estrutural por RMN e CG-EM levou à identificação de uma mistura de esteroides (sitosterol, campesterol, estigmasterol e fucosterol). Do mesmo modo, o estudo fitoquímico do extrato das folhas de *C. urniger* levou ao isolamento e identificação do composto sitosterol.

O ensaio antimicrobiano *in vitro* dos extratos das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* frente às cepas bacterianas *E. coli* e *S. aureus* mostrou que somente o extrato CBEF apresentou atividade inibitória moderada contra os microrganismos testados.

Dessa forma, o estudo apresentado neste trabalho para *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* possibilitou a contribuição ao conhecimento químico para o gênero *Cnidocolus*, visto que, na literatura não há estudos sobre constituintes químicos e de desrepliação com abordagem em *Molecular Networking* para estas espécies.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENIRAN, O.I., OLAJIDE, O.O., IGWEMMAR, N.C., ORISHADIPE, A., 2013. Phytochemical constituents, antimicrobial and antioxidant potentials of tree spinach *Cnidocolus aconitifolius* (Miller) I. M. Johnston. *J. Med. Plants Res.* 7, 1317–1322.
- AKIMOTO, N., ARA, T., NAKAJIMA, D., SUDA, K., IKEDA, C., TAKAHASHI, S., MUNETO, R., YAMADA, M., SUZUKI, H., SHIBATA, D., SAKURAI, N., 2017. FlavonoidSearch: A system for comprehensive flavonoid annotation by mass spectrometry. *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- ALIGIANNIS, N., HALABALAKI, M., CHAITA, E., KOULOURA, E., ARGYROPOULOU, A., BENAKI, D., KALPOUTZAKIS, E., ANGELIS, A., STATHOPOULOU, K., ANTONIOU, S., SANI, M., KRAUTH, V., WERZ, O., SCHÜTZ, B., SCHÄFER, H., SPRAUL, M., MIKROS, E., SKALTSOUNIS, L.A., 2016. Heterocovariance based metabolomics as a powerful tool accelerating bioactive natural product identification. *Chem. Sel.* 1, 2531–2535.
- ALLARD, P.-M., PÉRESSE, T., BISSON, J., GINDRO, K., MARCOURT, L., PHAM, V.C., ROUSSI, F., LITAUDON, M., WOLFENDER, J.L., 2016. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Anal. Chem.* 88, 3317–3323.
- ALLWOOD, J.W., GOODACRE, R., 2009. An introduction to liquid chromatography - mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.* 21, 33–47.
- ALVAREZ-RIVERA, G., BALLESTEROS-VIVAS, D., PARADA-ALFONSO, F., IBÁÑES, E., CIFUENTES, A., 2019. Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. *Trends Anal. Chem.* 112, 87–101.
- ARON, A.T., GENTRY, E.C., MCPHAIL, K.L., NOTHIAS, L.-F., NOTHIAS-ESPOSITO, M., BOUSLIMANI, A., PETRAS, D., GAUGLITZ, J.M., SIKORA, N., VARGAS, F., HOOFT, J.J.J. VAN DER, ERNST, M., KANG, K. BIN, ACEVES, C.M., CARABALLO-RODRÍGUEZ, A.M., KOESTER, I., WELDON, K.C., BERTRAND, S., ROULLIER, C., SUN, K., TEHAN, R.M., BOYA P., C.A., CHRISTIAN, M.H., GUTIÉRREZ, M., ULLOA, A.M., MORA, J.A.T., MOJICA-FLORES, R., LAKEY-BEITIA, J., VÁSQUEZ-CHAVES, V., ZHANG, Y., CALDERÓN, A.I., TAYLER, N., KEYZERS, R.A., TUGIZIMANA, F., NDLOVU, N., AKSENOV, A.A., JARMUSCH, A.K., SCHMID, R., TRUMAN, A.W., BANDEIRA, N., WANG, M., DORRESTEIN, P.C., 2020. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nat. Protoc.* 15, 1954–1951.



- ASZYK, J., BYLINSKI, H., NAMIESNIK, J., KOT-WASIK, A., 2018. Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry-based metabolomics. *Trends Anal. Chem. J.* 108, 278–295.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79.
- BEZERRA, A.G., NEGRI, G., DUARTE-ALMEIDA, J.M., SMAILI, S.S., CARLINI, E.A., 2016. Análise fitoquímica do extrato hidroetanólico de *Turnera diffusa* Willd e avaliação de seus efeitos na morte de astrócitos. *Einstein* 14, 56–63.
- BIJEKAR, S., GAYATRI, M.C., 2014. Ethanomedicinal properties of Euphorbiaceae family - A comprehensive review. *Int. J. Phytomedicine* 6, 144–156.
- BINO, R.J., HALL, R.D., FIEHN, O., KOPKA, J., SAITO, K., DRAPER, J., NIKOLAU, B.J., MENDES, P., ROESSNER-TUNALI, U., BEALE, M.H., TRETHERWEY, R.N., LANGE, B.M., WURTELE, E.S., SUMNER, L.W., 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.* 9, 418–425.
- BONTA, R.K., 2017. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *J. Pharm. Anal.* 7, 349–364.
- BOUARAB-CHIBANE, L., FORQUET, V., LANTÉRI, P., CLÉMENT, Y., LÉONARD-AKKARI, L., OULAHAL, N., DEGRAEVE, P., BORDES, C., 2019. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (quantitative structure-activity relationship) models. *Front. Microbiol.* 10, 1–23.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161, 839–851.
- BRITO, J.A.G. DE, PINTO, L. DA S., CHAVES, C.F., SILVA, A.J.R. DA, SILVA, M.F. DAS G.F. DA, COTINGUIBA, F., 2021. Chemophenetic significance of *Anomalocalyx uleanus* metabolites are revealed by dereplication using molecular networking tools. *Molecules* 26, 1–20.
- BRUM, R.L., HONDA, N.K., HESS, S.C., CAVALHEIRO, A.J., DELLE MONACHE, F., 1998. Acyl lupeols from *Cnidioscolus vitifolius*. *Phytochemistry* 49, 1127–1128.
- CAJKA, T., FIEHN, O., 2016. Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *Anal. Chem.* 88, 524–545.
- CALIXTO, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91, 1–7.

- CARABALLO-RODRÍGUEZ, A.M., DORRESTEIN, P.C., PUPO, M.T., 2017. Molecular inter-kingdom interactions of endophytes isolated from *Lychnophora ericoides*. *Sci. Rep.* 7, 1–14.
- CÁRDENAS, P.D., ALMEIDA, A., BAK, S., MOSES, T., 2019. Evolution of structural diversity of triterpenoids. *Front. Plant Sci.* 10, 1–10.
- CHANDRA, H., BISHNOI, P., YADAV, A., PATNI, B., MISHRA, A.P., NAUTIYAL, A.R., 2017. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - a review. *Plants* 6, 1–11.
- CHANDRADEVAN, M., SIMOH, S., MEDIANI, A., ISMAIL, N.H., ISMAIL, I.S., ABAS, F., 2020. UHPLC-ESI-Orbitrap-MS analysis of biologically active extracts from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. and *Cleome gynandra* L. leaves. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2020, 1–14.
- CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.L., SEPÚLVEDA, L., VERMA, D.K., LUNA-GARCÍA, H.A., ILINA, A., AGUILAR, C.N., 2020. Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. *Process.* 8, 1–29.
- CHEN, Y., YU, H., WU, H., PAN, Y., WANG, K., JIN, Y., ZHANG, C., 2015. Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in *Pollen typhae* for transformation. *Molecules* 20, 18352–18366.
- CHOI, Y.H., KIM, H.K., HAZEKAMP, A., ERKELENS, C., LEFEBER, A.W.M., VERPOORTE, R., 2004. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and principal component analysis. *J. Nat. Prod.* 67, 953–957.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S., 2006. *Fundamentos de cromatografia.* Unicamp, 1-453.
- COSME, P., RODRÍGUES, A.B., ESPINO, J., GARRIDO, M., 2020. Plant Phenolics: bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants* 9, 1–20.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3670–3695.
- CREPALDI, C.G., CAMPOS, J.L.A., ALBUQUERQUE, U.P., SALES, M.F., 2016. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. *South African J. Bot.* 102, 157–165.
- CUYCKENS, F., CLAEYS, M., 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom* 39, 1–15.

- DEMARQUE, D.P., DUSI, R.G., SOUSA, F.D.M., GROSSI, S.M., SILVÉRIO, M.R.S., LOPES, N.P., ESPINDOLA, L.S., 2020. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. *Sci. Rep.* 10, 1–9.
- DEWICK, P.M., 2011. Medicinal natural products, 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom.
- DING, M., JIANG, Y., YU, X., ZHANG, D., LI, J., WANG, H., SHEN, J., GAO, X., CHANG, Y., 2018. Screening of combinatorial quality markers for natural products by metabolomics coupled with chemometrics. A case study on *Pollen Typhae*. *Front. Pharmacol.* 9, 1–13.
- DU, J., ZHONG, B., SUBBIAH, V., BARROW, C.J., DUNSHEA, F.R., SULERIA, H.A.R., 2021. LC-ESI-QTOF-MS/MS profiling and antioxidant activity of phenolics from custard apple fruit and by-products. *Separations* 8, 1–26.
- DUTRA, R.C., CAMPOS, M.M., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res.* 112, 4–29.
- DUTTA, S., MAHALANOBISH, S., SAHA, S., GHOSH, S., SIL, P.C., 2019. Natural products : An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem. Toxicol.* 128, 240–255.
- ESSER, H.J., 2012. The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil. *Rodriguesia* 63, 209–225.
- EVANS, W.C., 2009. Pharmacognosy, 16. ed. Elsevier, New York.
- FANALI, S., HADDAD, P.R., POOLE, C.F., SCHOENMAKERS, P., LLOYD, D., 2013. Liquid Chromatography: Fundamentals and instrumentation. Elsevier, Oxford.
- FELIPE, D.F., BRAMBILLA, L.Z.S., PORTO, C., PILAU, E.J., CORTEZ, D.A.G., 2014. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS. *Molecules* 19, 15720–15734.
- FENG, S., LIU, X., BELWAL, T., LUO, Z., LI, L., LIMWACHIRANON, J., 2020. Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2 19, 1243–1267.
- FIEHN, O., 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155–171.

FLORA DO BRASIL. *Cnidoscolus*. Disponível em: <  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=1463CFCF1A904AF431C27226E343418E#CondicaoTaxonCP>>.  
Acesso em: 25 de abril. 2022.

FORNSTEDT, T., FORSSÉN, P., WESTERLUND, D., 2015. Basic HPLC theory and definitions: retention, thermodynamics, selectivity, zone spreading, kinetics, and resolution, in: Anderson, Berthod, J.L., Estévez, A.V.P., Stalcup, A.M. (Eds.), Analytical Separation Science. Wiley, pp. 1–24.

FOX RAMOS, A.E., ALCOVER, C., EVANNO, L., MACIUK, A., LITAUDON, M., DUPLAIS, C., BERNADAT, G., GALLARD, J.F., JULLIAN, J.C., MOURAY, E., GRELLIER, P., LOISEAU, P.M., POMEL, S., POUPON, E., CHAMPY, P., BENIDDIR, M.A., 2017. Revisiting previously investigated plants: a molecular networking-based study of *Geissospermum laeve*. J. Nat. Prod. 80, 1007–1014.

FRAIGE, K., DAMETTO, A.C., ZERAIK, M.L., FREITAS, L. DE, SARAIVA, A.C., MEDEIROS, A.I., CASTRO-GAMBOA, I., CAVALHEIRO, A.J., SILVA, D.H.S., LOPES, N.P., BOLZANI, V.S., 2017. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). Phytochem. Anal. 1–9.

FUNARI, C.S., CASTRO-GAMBOA, I., JOSÉ, A., BOLZANI, S., 2013. Metabolômica: uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. Quim. Nova 36, 1605–1609.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, R.V., GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G.A., MÉNDEZ-BOLAINA, E., SÁNCHEZ-MEDINA, A., MALDONADO-SAAVEDRA, O., DOMÍNGUEZ-ORTIZ, M.Á., VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M., MUÑOZ-MUÑIZ, O.D., CRUZ-SÁNCHEZ, J.S., 2014. *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. J. Ethnopharmacol. 151, 937–943.

GARZON, L.R., NUNES, M.S., MARTINI, R., RAMPELOTTO, R.F., HÖRNER, R., LOCATELLI, A., HÖRNER, M., 2015. Complexos triazenidos de platina (II): Avaliação in vitro da atividade antibacteriana e citotóxica frente a bactérias e células de medula óssea de pacientes leucêmicos de um hospital escola. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 36, 285–291.

GAUDÊNCIO, S.P., PEREIRA, F., 2015. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. Nat. Prod. Rep. 32, 779–810.

GIKA, H., VIRGILIOU, C., THEODORIDIS, G., PLUMB, R.S., WILSON, I.D., 2019. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art. J. Chromatogr. B 1117, 136–147.

- GOMES, L.M.A, LIMA-SARAIVA, S.R.G., ANDRADE, T.M.D., SILVA, J.C., DINIZ, T.C., BARRETO, V.N.S., MENDES, R.L., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., QUINTANS, J.S.S., LIMA, J.T., ALMEIDA, J.R.G., 2014. Antinociceptive activity of the ethanolic extract from barks and leaves of *Cnidocolus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. *J. Young Pharm.* 6, 64–69.
- GROSS, J.H., 2017. *Mass Spectrometry: a textbook*, 3rd ed. Springer International Publishing, Germany.
- GURIB-FAKIM, A., 2006. Medicinal plants : Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27, 1–93.
- GUTHALS, A., WATROUS, J.D., DORRESTEIN, P.C., BANDEIRA, N., 2014. The spectral networks paradigm in high throughput mass spectrometry. *Mol Biosyst.* 8, 2535–2544.
- HALBWIRTH, H., STICH, K., CHEYNIER, V., QUIDEAU, S., 2019. Recent Advances in Polyphenol Research, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 1-452.
- HASSAN, S.S. UL, JIN, H., ABU-IZNEID, T., RAUF, A., ISHAQ, M., SULERIA, H.A.R., 2019. Stress-driven discovery in the natural products : A gateway towards new drugs. *Biomed. Pharmacother.* 109, 459–467.
- HEINRICH, M., BARNES, J., GIBBONS, S., WILLIAMSON, E.M., 2012. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Elsevier Ltd., Columbus.
- HESS, S., MACRAE, J.I., 2018. Mass Spectrometric Techniques, in: HOFMANN, A., CLOKIE, S. (Eds.), *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 535–557.
- HOFFMANN, E. DE, STROOBANT, V., 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed. JohnWiley & Sons, England.
- HUANG, G., LIANG, J., CHEN, X., LIN, J., WEI, J., HUANG, D., ZHOU, Y., SUN, Z., ZHAO, L., 2020. Isolation and identification of chemical constituents from *Zhideke* granules by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2020, 1–16.
- HUBERT, J., NUZILLARD, J.-M., PURSON, S., HAMZAOU, M., BORIE, N., REYNAUD, R., RENAULT, J.-H., 2014. Identification of natural metabolites in mixture: a pattern recognition strategy based on <sup>13</sup>C NMR. *Anal. Chem.* 86, 2955–2962.
- HURBATH, F., TORRES, D.S.C., ROQUE, N., 2016. Euphorbiaceae na Serra Geral de Licínio de Almeida, Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 67, 489–531.

- JIMÉNEZ-ARELLANES, M.A., GARCÍA-MARTÍNEZ, I., ROJAS-TOMÉ, S., 2014. Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidioscolus* (Euphorbiaceae). *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 45, 1–6.
- KANG, J., PRICE, W.E., ASHTON, J., TAPSELL, L.C., JOHNSON, S., HEALTH, S., 2016. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. *Food Chem.* 211, 215–226.
- KHAKIMOV, B., AMIGO, J.M., BAK, S., ENGELSEN, S.B., 2012. Plant metabolomics: resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography-mass spectrometry profiles of complex plant extracts using multi-way decomposition methods. *J. Chromatogr. A* 1266, 84–94.
- KINGSTON, D.G.I., 2011. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.* 74, 496–511.
- KOJIMA, H., SATO, N., HATANO, A., OGURA, H., 1990. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 29, 2351–2355.
- KOOLEN, H.H.F., SILVA, F.M.A., GOZZO, F.C., SOUZA, A.Q.L., SOUZA, A.D.L., 2013. Antioxidant , antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC – ESI-MS/MS. *Food Res. Int. J.* 51, 467–473.
- KORNPOINTNER, C., MARTINEZ, A.S., MARINOVIC, S., HASELMAIR-GOSCH, C., JAMNIK, P., SCHRODER, K., LOFKE, C., HALBWIRTH, H., 2021. Chemical composition and antioxidant potential of *Cannabis sativa* L. roots. *Ind. Crop. Prod.* 165, 1–8.
- KUBITZKI, K., 2014. The families and genera of vascular plants: Flowering plants eudicots - Malpighiales, Springer, 51.
- KUMAR, M., KUZHIUMPARAMBIL, U., PERNICE, M., JIANG, Z., RALPH, P.J., 2016. Metabolomics: an emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. *Algal Res.* 16, 76–92.
- KUMAR, S., SINGH, A., KUMAR, B., 2017. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J. Pharm. Anal.* 7, 214–222.
- LANG, G., MAYHUDIN, N.A., MITOVA, M.I., SUN, L., SAR, S. VAN DER, BLUNT, J.W., COLE, A.L.J., ELLIS, G., LAATSCH, H., MUNRO, M.H.G., 2008. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *J. Nat. Prod.* 71, 1595–1599.

- LEÓN-DE LA LUZ, J.L., TROYO-DIÉGUEZ, E., ORTEGA-NIEBLAS, M.M., LÓPEZ-GUTIÉRREZ, F., 1999. “Caribe” (*Cnidocolus angustidens* Torr.), a promising oilseed geophyte from north-west Mexico. *J. Arid Environ.* 41, 299–308.
- LEVER, J., KRZYWINSKI, M., ALTMAN, N., 2017. Principal component analysis. *Nat. Publ. Gr.* 14, 641–642.
- LEVY, A.J., ORANZI, N.R., AHMADIRESKETY, A., KEMPERMAN, R.H.J., WEI, M.S., YOST, R.A., 2019. Recent progress in metabolomics using ion mobility-mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 116, 274–281.
- LI, J.W.H., VEDERAS, J.C., 2014. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science.* 325, 161–166.
- LIRA, S.M., CANABRAVA, N. V, BENJAMIN, S.R., SILVA, J.Y.G., VIANA, D.A., LIMA, C.L.S., PAREDES, P.F.M., MARQUES, M.M.M., PEREIRA, E.O., QUEIROZ, E.A.M., GUEDES, M.I.F., 2017. Evaluation of the toxicity and hypoglycemic effect of the aqueous extracts of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 50, 1–6.
- LIU, X., LOCASALE, J.W., 2017. Metabolomics : A Primer. *Trends Biochem. Sci.* 42, 274–284.
- LOZANO-SÁNCHEZ, J., BORRÁS-LINARES, I., SASS-KISS, A., SEGURA-CARRETERO, A., 2018. Chromatographic technique: high-performance liquid chromatography (HPLC), in: *Modern Techniques for Food Authentication.* Elsevier Inc., pp. 459–526.
- LYU, Q., KUO, T., SUN, C., CHEN, K., HSU, C., LI, X., 2019. Comprehensive structural characterization of phenolics in litchi pulp using tandem mass spectral molecular networking. *Food Chem.* 282, 9–17.
- LYU, Q., WEN, X., LIU, Y., SUN, C., CHEN, K., HSU, C., LI, X., 2021. Comprehensive Profiling of phenolic compounds in white and red chinese bayberries (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) and their developmental variations using tandem mass spectral molecular networking. *J. Agric. Food Chem.* 69, 741–749.
- MADDOX, C.E., LAUR, L.M., 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* 60, 53–58.
- MAHROUS, E.A., FARAG, M.A., 2015. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. *J. Adv. Res.* 6, 3–15.
- MANETTI, L.M., TURRA, A.F., TAKEMURA, O.S., SVIDZINSKI, T.I.E., LAVERDE JUNIOR, A., 2010. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 12, 406–413.

- MAULIDIANI, H., KHATIB, A., SHAARI, K., ABAS, F., SHITAN, M., KNEER, R., NETO, V., LAJIS, N.H., 2012. Discrimination of three *Pegaga* (*Centella*) varieties and determination of growth-lighting effects on metabolites content based on the chemometry of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 60, 410–417.
- MELO, A.L., SALES, M.F., 2008. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* 22, 806–827.
- MEYER, V.R., 2010. *Practical high-performance liquid chromatography*, 5th ed. John Wiley and Sons, United Kingdom.
- MOLINARI, G., 2009. *Natural Products in drug discovery: present status and perspectives*.
- MOREAU, R.A., WHITAKER, B.D., HICKS, K.B., 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* 41, 457–500.
- MOURA, L.F.W.G., SILVA NETO, J.X., LOPES, T.D.P., BENJAMIN, S.R., BRITO, F.C.R., MAGALHÃES, F.E.A., FLOREAN, E.O.P.T., SOUSA, D.O.B., GUEDES, M.I.F., 2019. Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidocolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. *Biomed. Pharmacother.* 109, 1670–1679.
- MUHAMMAD, A., FENG, X., RASOOL, A., SUN, W., LI, C., 2020. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Adv.* 1–40.
- MWINE, T.J., VAN DAMME, P., 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J. Med. Plants Res.* 5, 652–662.
- NAZARUK, J., BORZYM-KLUCZYK, M., 2015. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochem. Rev.* 14, 675–690.
- NEGRI, G., SANTI, D., TABACH, R., 2013. Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. *Rev. Bras. Pl. Med.* 15, 217–224.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., 2016. *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*.



- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., 2020. Natural Products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770–803.
- NIESSEN, W.M.A., 2004. Combined techniques, in: Heftmann, E. (Ed.), *Chromatography 6th Edition: Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods - Part A: Fundamentals and Techniques*. Elsevier B.V., pp. 403–425.
- NORAZHAR, A.I., LEE, S.Y., MUNIRAH, S., FAUDZI, M., SHAARI, K., 2021. Metabolite profiling of *Christia vespertilionis* leaf metabolome via molecular network approach. *Appl. Sci.* 21, 1–29.
- NOTHIAS, L.-F., NOTHIAS-ESPOSITO, M., SILVA, R., WANG, M., PROTSYUK, I., ZHANG, Z., SARVEPALLI, A., LEYSSEN, P., TOUBOUL, D., COSTA, J., PAOLINI, J., ALEXANDROV, T., LITAUDON, M., DORRESTEIN, P.C., 2018. Bioactivity-Based molecular networking for the discovery of drug leads in natural product bioassay-guided fractionation. *J. Nat. Prod.* 81, 758–767.
- NOTHIAS, L., PETRAS, D., SCHMID, R., DÜHRKOP, K., RAINER, J., SARVEPALLI, A., PROTSYUK, I., ERNST, M., TSUGAWA, H., FLEISCHAUER, M., AICHELER, F., AKSENOV, A.A., ALKA, O., ALLARD, P.-M., BARSCH, A., CACHET, X., CARABALLO-RODRIGUEZ, A.M., SILVA, R.R. DA, DANG, T., GARG, N., GAUGLITZ, J.M., GUREVICH, A., ISAAC, G., JARMUSCH, A.K., KAMENÍK, Z., KANG, K. BIN, KESSLER, N., KOESTER, I., KORF, A., GOUELLEC, A. LE, LUDWIG, M., MARTIN H, C., MCCALL, L.-I., NEUMANN, S., NEUWEGER, H., NGUYEN, N.H., NOTHIAS-ESPOSITO, M., SHRESTHA, B., TRIPATHI, A., HOOFT, J.J.J. VAN DER, VARGAS, F., WELDON, K.C., WITTING, M., YANG, H., ZHANG, Z., ZUBEIL, F., KOHLBACHER, O., BÖCKER, S., ALEXANDROV, T., BANDEIRA, N., WANG, M., DORRESTEIN, P.C., 2020. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* 1–10.
- OHTA, T., ENDO, Y., KIKUCHI, R., KABUTO, C., HARADA, N., NOZOE, S., 1994. Absolute stereochemistry of benzocycloheptenone derivatives from *Cnidoscopus phyllacanthus*. *Tetrahedron* 50, 5659–5668.
- OKEKE, I.N., LAXMINARAYAN, R., BHUTTA, Z.A., DUSE, A.G., JENKINS, P., O'BRIEN, T.F., PABLOS-MENDEZ, A., KLUGMAN, K.P., 2005. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis.* 5, 481–493.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G., FERRAZ, C.A.A., OLIVEIRA, A.P., ARAÚJO, C.S., OLIVEIRA, L.F.S., PICOT, L., ROLIM, L.A., ROLIM-NETO, P.J., ALMEIDA, J.R.G.S., 2018. Phytochemical and pharmacological aspects of *Cnidoscopus* Pohl species: a systematic review. *Phytomedicine* 50, 137–147.
- OLSHINA, M.A., SHARON, M., 2017. Mass spectrometry: a technique of many faces. *Q. Rev. Bioph.* 49, 1–30.

- PANCHE, A.N., DIWAN, A.D., CHANDRA, S.R., 2016. Journal of nutritional science. J. Nutr. Sci. 5, 1–15.
- PANDEY, R., KUMAR, B., 2016. HPLC-QTOF-MS/MS Based rapid screening of phenolics and triterpenic acids in leaf extracts of *Ocimum* species and their interspecies variation. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 1–66.
- PARAGINSKI, G.L., BERTICELLI, C.R., ZAMBIAZI, P.J., PARAGINSKI, V.T.K., HÖRNER, M., SANTOS, A.J.R.W.A., HÖRNER, R., 2014. Atividade antibacteriana in vitro e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach. de alguns compostos triazenos. Quim. Nov. 37, 1138–1144.
- PATRIDGE, E., GAREISS, P., KINCH, M.S., HOYER, D., 2016. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. Drug Discov. Today 21, 204–207.
- PAULA, A.C., MELO, K.M., SILVA, A.M., FERREIRA, D.A., MONTE, F.J.Q., SANTIAGO, G.M.P., LEMOS, T.L.G., BRAZ-FILHO, R., MILITÃO, G.C.G., SILVA, P.B.N., SILVA, T.G., 2016. Constituintes químicos e atividade citotóxica de *Cnidocolus phyllacanthus*. Rev. Virtual Quim. 8, 231–241.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S., CASTRO, V.T.N.A., SARAIVA, A.M., ALMEIDA, D.M., TAVARES, E.A., PISCIOTTANO, M.N.C., AMORIM, E.L.C., 2012. Phytochemical screening and antibacterial activity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. J. Med. Plants Res. 6, 3742–3748.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S., CASTRO, V.T.N.A., SARAIVA, A.M., DIEGO, M., TAVARES, E.A., AMORIM, E.L.C., 2011. Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. African J. Pharm. Pharmacol. 5, 2310–2316.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, M.Z., GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G.A., YÉPEZ-MULIA, L., ROJAS-TOMÉ, I.S., LUNA-HERRERA, J., JIMÉNEZ-ARELLANES, M.A., 2017. Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidocolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. Biomed. Pharmacother. 89, 89–97.
- PYE, C.R., BERTIN, M.J., LOKEY, R.S., GERWICK, W.H., LININGTON, R.G., 2017. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. PNAS 114, 5601–5606.
- QIU, F., IMAI, A., MCALPINE, J.B., LANKIN, D.C., BURTON, I., KARAKACH, T., FARNSWORTH, N.R., CHEN, S.-N., PAULI, G.F., 2012. Dereplication, residual

complexity, and rational naming: the case of the Actaea triterpenes. *J. Nat. Prod.* 75, 432–443.

- QUINN, R.A., NOTHIAS, L.F., VINING, O., MEEHAN, M., ESQUENAZI, E., DORRESTEIN, P.C., 2017. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 143–154.
- RAFTERY, D., 2014. Mass spectrometry in metabolomics: methods and protocols. Humana Press 1-352.
- RAI, A., UMASHANKAR, S., SWARUP, S., 2012. Plant metabolomics: from experimental design to knowledge extraction, in: *Plant Metabolomics Approaches*. 279–312.
- RAI, M., CORDELL, G.A., MARTÍNEZ, J.L., MARINOFF, M., RASTRELLI, L., 2013. Medicinal plants biodiversity and drugs, *Drug Development Research*. CRC Press Taylor & Francis Group, New York, 1-710.
- REN, Q., WANG, J., LIU, S., WANG, F., WANG, H., 2017. Identification and determination of isoflavones in germinated black soybean sprouts by UHPLC-Q-TOF-MS mass spectrometry and HPLC-DAD. *Int. J. Food Prop.* 20, 2877–2887.
- RENDA, G., GOCKKAYA, I., SOHRETOGLU, D., 2021. Immunomodulatory properties of triterpenes. *Phytochem Rev* 1–27.
- ROBERTS, L.D., SOUZA, A.L., GERSZTEN, R.E., CLISH, C.B., 2012. Targeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 98, 1–24.
- ROSAS-PIÑÓN, Y., MEJÍA, A., DÍAZ-RUIZ, G., AGUILAR, M.I., SÁNCHEZ-NIETO, S., RIVERO-CRUZ, J.F., 2012. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J. Ethnopharmacol.* 141, 860–865.
- SABO, V.A., KNEZEVIC, P., 2019. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Ind. Crop. Prod.* 132, 413–429.
- SALEHI, B., QUISPE, C., SHARIFI-RA, J., CRUZ-MARTINS, N., NIGAM, M., MISHRA, A.P., KONOVALOV, D.A., OROBINSKAYA, V., ABU-REIDAH, I.M., ZAM, W., SHAROPOV, F., VENNERI, T., CAPASSO, R., KUKULA-KOCH, W., WAWRUSZAK, A., KOCH, W., 2021. Phytosterols: from preclinical evidence to potential clinical applications. *Front. Pharmacol.* 11, 2–18.
- SARKER, S.D., NAHAR, L., 2015. Applications of high performance liquid chromatography in the analysis of herbal products, in: Mukherjee, P.K. (Ed.), *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. Elsevier Inc., USA, pp. 405–425.

- SÁTIRO, L.N., ROQUE, N., 2008. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 22, 99–118.
- SHARMA, A., FLORES-VALLEJO, R.C., CARDOSO-TAKETA, A., VILLARREAL, M.L., 2017. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 208, 264–329.
- SHKONDROV, A.M., KRASTEVA, I.N., 2021. High resolution lc-ms/ms screening for secondary metabolites in bulgarian species of genus *Astragalus* L. *Quim. Nov.* 44, 683–688.
- SILVA, D.H.S., CASTRO-GAMBOA, I., BOLZANI, V.S., 2010. Plant diversity from brazilian cerrado and atlantic forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, Oxford: Elsevier, 95-133.
- SILVA, M.F.S., SILVA, L.M.A., QUINTELA, A.L., SANTOS, A.G., SILVA, F.A.N., OLIVEIRA, F. DE C.E., ALVES FILHO, E.G., BRITO, E.S., CANUTO, K.M., PESSOA, C., ZOCCOLO, G.J., 2019. UPLC-HRMS and NMR applied in the evaluation of solid-phase extraction methods as a rational strategy of dereplication of *Phyllanthus* spp. aiming at the discovery of cytotoxic metabolites. *J. Chromatogr. B* 1120, 51–61.
- SILVA, R.R., DORRESTEIN, P.C., QUINN, R.A., 2015. Illuminating the dark matter in metabolomics. *PNAS* 112, 12549–12550.
- SIMÕES, C.M.O., SHENKEL, E.P., MELO, J. CARLOS P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., 2017. *Farmacognosia - do produto natural ao medicamento*. Artmed, Porto Alegre.
- SIMONETTI, G., FILIPPO, P. DI, POMATA, D., RICCARDI, C., BUIARELLI, F., SONEGO, E., CASTELLANI, F., 2021. Characterization of seven sterols in five different types of cattle feedstuffs. *Food Chem.* 340, 1–8.
- SIMONETTI, G., FILIPPO, P. DI, POMATA, D., RICCARDI, C., BUIARELLI, F., SONEGO, E., CASTELLANI, F., 2021. Characterization of seven sterols in five different types of cattle feedstuffs. *Food Chem.* 340, 1–8.
- SINGH, A., KUMAR, S., KUMAR, B., 2018. LC-MS identification of proanthocyanidins in bark and fruit of six *Terminalia* species. *Nat. Prod. Commun.* 13, 555–560.
- SONG, E., CHOI, J., GWON, H., LEE, K.-Y., CHOI, S.-G., ISLAM, M.A., CHUN, J., HWANG, J., 2021. Phytochemical profile and antioxidant activity of *Dracocephalum moldavica* L. seed extracts using different extraction methods. *Food Chem.* 350, 1–6.

- STECKEL, A., SCHLOSSER, G., 2019. An organic chemist's guide to electrospray mass spectrometric structure elucidation. *Molecules* 24, 1–11.
- TANG, J., DUNSHEA, F.R., SULERIA, H.A.R., 2020. LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds from medicinal plants (hops and juniper berries) and their antioxidant activity. *Foods* 9, 1–25.
- TAO, W., YANG, N., DUAN, J., WU, D., GUO, J., 2011. Simultaneous determination of eleven major flavonoids in the pollen of *Typha angustifolia* by HPLC-PDA-MS. *Phytochem. Anal.* 22, 455–461.
- THE PLANT LIST. A working list for all species. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=cnidoscolus>. Acessado em: 03/01/2022.
- TSAI, F.-S., LIN, L.-W., WU, C.-R., 2016. Lupeol and its role in chronic diseases. Springer International Publishing Switzerland, Taiwan.
- ULLAH, N., PARVEEN, A., BANO, R., ZULFIQAR, I., MARYAM, M., JABEEN, S., LIAQAT, A., AHMAD, S., 2016. In vitro and in vivo protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6, 660–667.
- VALITOVA, J.N., SULKARNAYEVA, A.G., MINIBAYEVA, F. V, 2016. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochem.* 81, 819–834.
- VERRI JR, W.A., VICENTINI, F.T.M.C., BARACAT, M.M., GEORGETTI, S.R., CARDOSO, R.D.R., CUNHA, T.M., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., FONSECA, M.J.V., CASAGRANDE, R., 2012. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms, 1st ed, *Bioactive Natural Products*. Elsevier B.V.
- VESSECCHI, R., LOPES, N.P., 2011. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Quim. Nova* 34, 1875–1887.
- WAGNER, H., BLADT, S., 2001. *Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas*, Springer.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J., 2010. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. Taylor & Francis Group. New York
- WANG, G., 2015. *Plant metabolomics: methods and applications*. Springer, Beijing.
- WANG, M., CARVER, J.J., PHELAN, V. V, SANCHEZ, L.M., GARG, N., PENG, Y., NGUYEN, D.D., WATROUS, J., KAPONO, C.A., LUZZATTO-KNAAN, T., PORTO, C., BOUSLIMANI, A., MELNIK, A. V, MEEHAN, M.J., LIU, W.-T.,

CRÜSEMANN, M., BOUDREAU, P.D., ESQUENAZI, E., SANDOVAL-CALDERÓN, M., KERSTEN, R.D., PACE, L.A., QUINN, R.A., DUNCAN, K.R., HSU, C.-C., FLORES, D.J., GAVILAN, R.G., KLEIGREWE, K., NORTHEN, T., DUTTON, R.J., PARROT, D., CARLSON, E.E., AIGLE, B., MICHELSEN, C.F., JELSBAK, L., SOHLENKAMP, C., PEVZNER, P., EDLUND, A., MCLEAN, J., PIEL, J., MURPHY, B.T., GERWICK, L., LIAW, C.-C., YANG, Y.-L., HUMPF, H.-U., MAANSSON, M., KEYZERS, R.A., SIMS, A.C., JOHNSON, A.R., SIDEBOTTOM, A.M., SEDIO, B.E., KLITGAARD, A., LARSON, C.B., BOYA, C.A., TORRES-MENDOZA, D., GONZALEZ, D.J., SILVA, D.B., MARQUES, L.M., DEMARQUE, D.P., POCIUTE, E., O'NEILL, E.C., BRIAND, E., HELFRICH, E.J.N., GRANATOSKY, E.A., GLUKHOV, E., RYFFEL, F., HOUSON, H., MOHIMANI, H., KHARBUSH, J.J., ZENG, Y., VORHOLT, J.A., KURITA, K.L., CHARUSANTI, P., MCPHAIL, K.L., NIELSEN, K.F., VUONG, L., ELFEKI, M., TRAXLER, M.F., ENGENE, N., KOYAMA, N., VINING, O.B., BARIC, R., SILVA, R.R., MASCUCH, S.J., TOMASI, S., JENKINS, S., MACHERLA, V., HOFFMAN, T., AGARWA, V., WILLIAMS, P.G., DAI, J., NEUPANE, R., GURR, J., RODRÍGUEZ, A.M.C., LAMSA, A., ZHANG, C., DORRESTEIN, K., DUGGAN, B.M., ALMALITI, J., ALLARD, P.-M., PHAPALE, P., NOTHIAS, L.-F., ALEXANDROV, T., LITAUDON, M., WOLFENDER, J.-L., KYLE, J.E., METZ, T.O., PERYEA, T., NGUYEN, D.-T., VANLEER, D., SHINN, P., JADHAV, A., MÜLLER, R., WATERS, K.M., SHI, W., LIU, X., ZHANG, L., KNIGHT, R., JENSEN, P.R., PALSSON, B.Ø., POGLIANO, K., LININGTON, R.G., GUTIÉRREZ, M., LOPES, N.P., GERWICK, W.H., MOORE, B.S., DORRESTEIN, P.C., BANDEIRA, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837.

WARD, J.L., BAKER, J.M., BEALE, M.H., 2007. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS J.* 274, 1126–1131.

WATROUS, J., ROACH, P., ALEXANDROV, T., HEATH, B.S., YANG, J.Y., KERSTEN, R.D., VOORT, M. VAN DER, POGLIANO, K., GROSS, H., RAAIJMAKERS, J.M., MOORE, B.S., LASKIN, J., BANDEIRA, N., DORRESTEIN, P.C., 2012. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1743–1752.

WEBSTER, G.L., 1986. Plant dermatitis. Irritant plants in the spurge family (Euphorbiaceae). *Clin. Dermatol.* 4, 36–45.

WEBSTER, G.L., 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81, 33.

- WECKWERTH, W., KAHL, G., 2013, The handbook of plant metabolomics. Wiley-Blackwell, Hoboken. Germany, 1-433.
- WOLFENDER, J., ALLARD, P., KUBO, M., QUEIROZ, E.F., 2019. Metabolomics strategies for the dereplication of polyphenols and other metabolites in complex natural extracts, in: Halbwirth, H., Stich, K., Cheynier, V., Quideau, S. (Eds.), Recent Advances in Polyphenol Research. John Wiley & Sons, United Kingdom, 183–201.
- WOLFENDER, J.-L., GLAUSER, G., BOCCARD, J., RUDAZ, S., 2009. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. Nat. Prod. Commun. 4, 1417–1430.
- WOLFENDER, J.-L., MARTI, G., THOMAS, A., BERTRAND, S., 2015. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. J. Chromatogr. A 1382, 136–164.
- WOLFENDER, J.-L., RUDAZ, S., CHOI, Y.H., KIM, H.K., 2013. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. Curr. Med. Chem. 20, 1056–1090.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. Facts Sheets. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 14 de maio. 2019.
- WU, H., GUO, J., CHEN, S., LIU, X., ZHOU, Y., ZHANG, X., XU, X., 2013. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography – mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 72, 267–291.
- WU, H., LI, X., YAN, X., AN, L., LUO, K., SHAO, M., JIANG, Y., XIE, R., FENG, F., 2015. An untargeted metabolomics-driven approach based on LC–TOF/MS and LC–MS/MS for the screening of xenobiotics and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 115, 315–322.
- YANG, J.Y., SANCHEZ, L.M., RATH, C.M., LIU, X., BOUDREAU, P.D., BRUNS, N., GLUKHOV, E., WODTKE, A., FELICIO, R., FENNER, A., WONG, W.R., LININGTON, R.G., ZHANG, L., DEBONSI, H.M., GERWICK, W.H., DORRESTEIN, P.C., 2013. Molecular networking as a dereplication strategy. J. Nat. Prod. 76, 1686–1699.
- YUAN, W., LI, S., OWNBY, S., ZHANG, Z., WANG, P., ZHANG, W., BEASLEY, R.S., 2007. Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidocolus texanus*. Planta Med. 73, 1304–1308.

- YOU, Y.-L., LI, F.-F., WANG, N., WANG, S.-Q., 2021. Matrix-assisted DOSY for analysis of indole alkaloid mixtures. *Molecules* 26, 1–11.
- YUZUAK, S., BALLINGTON, J., XIE, D., 2018. HPLC-qTOF-MS/MS-based profiling of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins in berries of two muscadine grape hybrids FLH13-11 and FLH17-66. *Metabolites* 8, 1–24.
- ZAMBONI, N., SAGHATELIAN, A., PATTI, G.J., 2015. Defining the metabolome: size, flux and regulation. *Mol. Cell* 58, 699–706.
- ZAPATA-ESTRELLA, H.E., SÁNCHEZ-PARDENILLA, AZERET D. GARCÍA-SOSA, K., ESCALANTE-EROSA, F., CAMPOS-BUZZI, F., MEIRA-QUINTÃO, N.L., CECHINEL-FILHO, V., PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M., 2014. Bioactive metabolites from *Cnidocolus souzae* and *Acmella pilosa*. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1319–1321.
- ZHANG, X., LIANG, C., LI, C., BU, M., BU, L., XIAO, Y., SUN, H., ZHANG, L., 2018. Simultaneous qualitative and quantitative study of main compounds in *Commelina communis* Linn. by UHPLC-Q-TOF-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 1–13.
- ZHOU, B., XIAO, J.F., TULI, L., RESSOM, H.W., 2013. LC-MS-Based metabolomics. *Mol Biosyst.* 8, 470–481.



# APÊNDICES

**Apêndice A – Listagem das espécies do gênero *Cnidoscolus* distribuídas no Brasil.**

**Tabela 7.** Espécies do gênero *Cnidoscolus* distribuídas no Brasil. Adaptado de The Plant List. (continua)

<b>Espécies</b>	<b>Sinonímia</b>
<i>Cnidoscolus aculeatissimus</i> (Colla) Fern.Casas	<i>Cnidoscolus horridus</i> (Müll.Arg.) Pax & K.Hoffm.; <i>Jatropha aculeatissima</i> Mart.; <i>Jatropha ferox</i> Müll.Arg.; <i>Jatropha horrida</i> Müll.Arg.
<i>Cnidoscolus adenoblepharus</i> Fern.Casas & J.M.Pizarro	-
<i>Cnidoscolus adenoclamys</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus aurelii</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus bahiana</i> Pax & K.Hoffm.	<i>Jatropha bahiana</i> Ule
<i>Cnidoscolus bahianus</i> (Ule) Fern.Casas	<i>Jatropha bahiana</i> Ule
<i>Cnidoscolus bahianus</i> (Ule) Pax & K.Hoffm.	<i>Jatropha bahiana</i> Ule
<i>Cnidoscolus byssinus</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus calcareus</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus calyptratus</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus calyptrodontus</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus ceballosii</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus cervii</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus conicus</i> Fern.Casas & J.M.Pizarro	-
<i>Cnidoscolus froesii</i> (Croizat) Fern.Casas	<i>Cnidoscolus pubescens</i> (Pax) Pax; <i>Jatropha froesii</i> Croizat; <i>Jatropha pubescens</i> Pax
<i>Cnidoscolus graminifolius</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus halteris</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus hamosus</i> Pohl	<i>Jatropha hamosa</i> (Pohl) Müll.Arg.
<i>Cnidoscolus hypokerinus</i> Fern.Casas	-

**Tabela 7.** (continuação)

<b>Espécies</b>	<b>Sinonímia</b>
<i>Cnidoscolus inaequalis</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus infestus</i> Pax & K.Hoffm.	-
<i>Cnidoscolus leuconeurus</i> Pax & K.Hoffm.	<i>Jatropha leuconeura</i> Pax & K.Hoffm.
<i>Cnidoscolus lombardii</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus magni-gerdtii</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus maracayensis</i> (Chodat & Hassl.) Fern.Casas	<i>Jatropha maracayensis</i> Chodat & Hassl.
<i>Cnidoscolus minarum</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus mitis</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus monsanto</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus oligandrus</i> (Müll.Arg.) Pax	<i>Cnidoscolus oligandrus</i> var. <i>xerophilus</i> A.Mattos & Rizzini; <i>Jatropha oligandra</i> Müll.Arg.;
<i>Cnidoscolus paucistamineus</i> (Pax) Pax	<i>Jatropha paucistaminea</i> Pax
<i>Cnidoscolus piranii</i> Fern.Casas & J.M.Pizarro	-
<i>Cnidoscolus populifolius</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus pubescens</i> Pohl	<i>Cnidoscolus obtusifolius</i> Pohl ex Baill.; <i>Janipha arborea</i> Mart. ex Pohl; <i>Jatropha obtusifolia</i> (Pohl ex Baill.) Müll.Arg.; <i>Jatropha obtusifolia</i> var. <i>pubescens</i> (Pohl) Müll.Arg.;
<i>Cnidoscolus quercifolius</i> Pohl	<i>Cnidoscolus lobatus</i> Pohl; <i>Cnidoscolus</i> <i>phyllacanthus</i> (Müll.Arg.) Pax & K.Hoffm.; <i>Cnidoscolus repandus</i> Pohl; <i>Janipha</i> <i>phyllacantha</i> Mart. ex Pohl; <i>Jatropha</i> <i>phyllacantha</i> Müll.Arg.; <i>Jatropha phyllacantha</i> var. <i>lobata</i> (Pohl) Müll.Arg..

Tabela 7. (continuação)

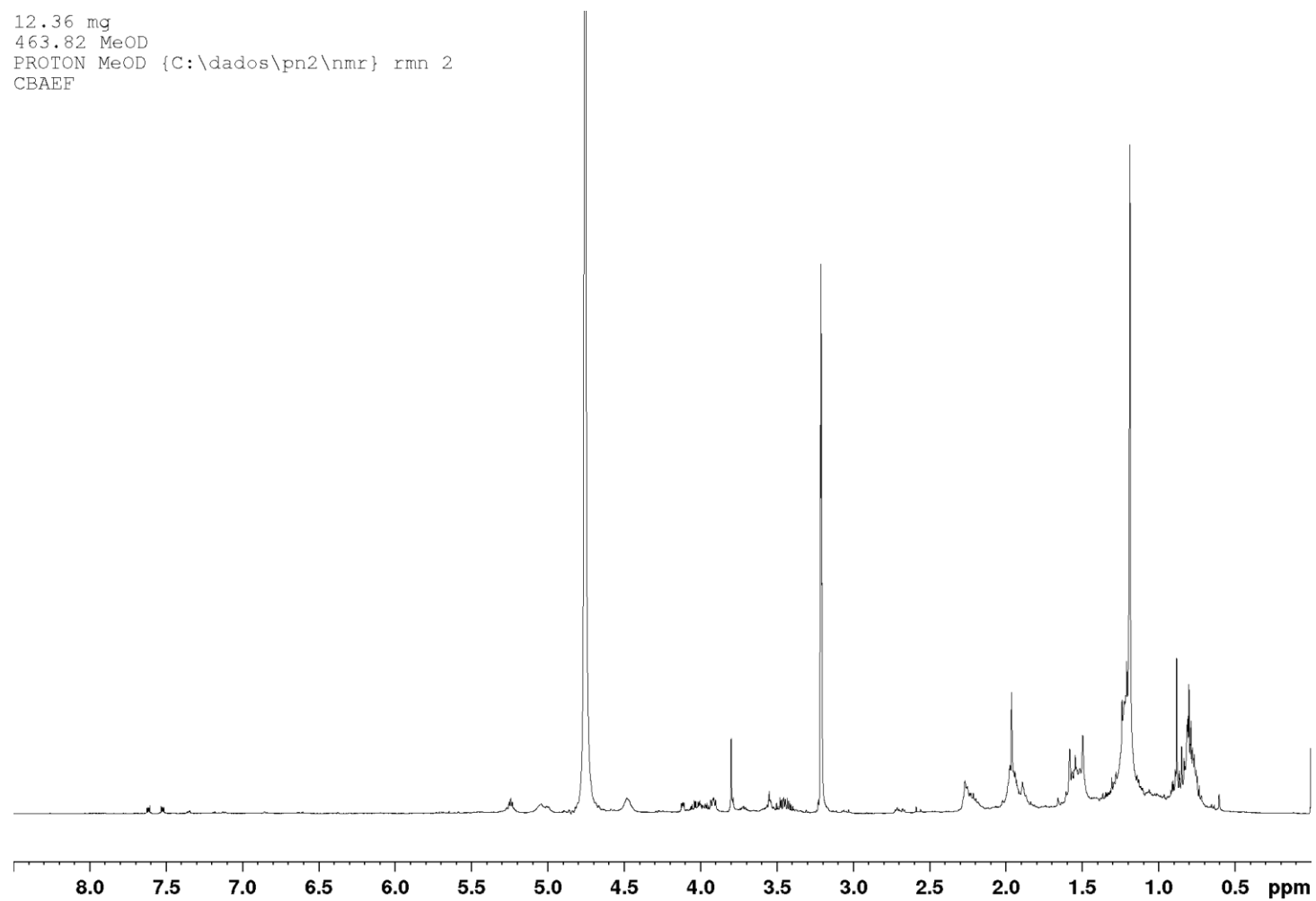
Espécies	Sinonímia
<i>Cnidoscolus rupestris</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus sellowianus</i> Klotzsch ex Pax	<i>Jatropha sellowiana</i> (Klotzsch ex Pax) Pax & K.Hoffm.
<i>Cnidoscolus spathulatus</i> Fern.Casas	-
<i>Cnidoscolus subinteger</i> (Chodat & Hassl.) Pax & K.Hoffm.	<i>Jatropha subintegra</i> (Chodat & Hassl.) Pax & K.Hoffm.; <i>Jatropha vitifolia</i> f. <i>subintegra</i> Chodat & Hassl.
<i>Cnidoscolus tridentifer</i> Fern.Casas & J.M.Pizarro	-
<i>Cnidoscolus ulei</i> (Pax) Pax	<i>Jatropha ulei</i> Pax
<i>Cnidoscolus urens</i> (L.) Arthur	<i>Bivonea urens</i> (L.) Arthur; <i>Cnidoscolus adenophilus</i> (Pax & K.Hoffm.) Pax & K.Hoffm.; <i>Cnidoscolus herbaceus</i> (L.) I.M.Johnst.; <i>Cnidoscolus marcgravii</i> Pohl; <i>Cnidoscolus mexicanus</i> Klotzsch ex Pax, <i>Cnidoscolus michauxii</i> Cham. & Schltldl.; <i>Cnidoscolus osteocarpus</i> Pohl; <i>Cnidoscolus urens</i> subsp. <i>adenophilus</i> (Pax & K.Hoffm.) Breckon; <i>Cnidoscolus urens</i> var. <i>urens</i> ; <i>Cnidoscolus urens</i> subsp. <i>urens</i> ; <i>Janipha urens</i> (L.) Poir. ex Pohl, <i>Jatropha adenophila</i> Pax & K.Hoffm.; <i>Jatropha herbacea</i> L.; <i>Jatropha urens</i> L.; <i>Jatropha urens</i> var. <i>brachyloba</i> Müll.Arg.; <i>Jatropha urens</i> var. <i>herbacea</i> (L.) Müll.Arg.; <i>Jatropha urens</i> var. <i>marcgravii</i> (Pohl) Müll.Arg.; <i>Jatropha urens</i> f. <i>osteocarpa</i> (Pohl) Müll.Arg.; <i>Jatropha urens</i> var. <i>osteocarpa</i> (Pohl) Müll.Arg.; <i>Jussieuia herbacea</i> Houst.; <i>Manihot herbacea</i> (L.) Crantz; <i>Manihot urens</i> (L.) Crantz
<i>Cnidoscolus urentissimus</i> Fern.Casas	-

**Tabela 7.** (conclusão)

<b>Espécies</b>	<b>Sinonímia</b>
<i>Cnidoscolus urnigerus</i> (Pax) Pax	<i>Cnidoscolus urniger</i> (Pax) Pax; <i>Jatropha urnigera</i> Pax;
<i>Cnidoscolus vitifolius</i> (Mill.) Pohl	<i>Cnidoscolus vitifolius</i> var. <i>vitifolius</i> ; <i>Jatropha vitifolia</i> Mill.; <i>Jatropha vitifolia</i> var. <i>obtusifolia</i> Müll.Arg.; <i>Manihot spinosissima</i> Mill. ex Steud.

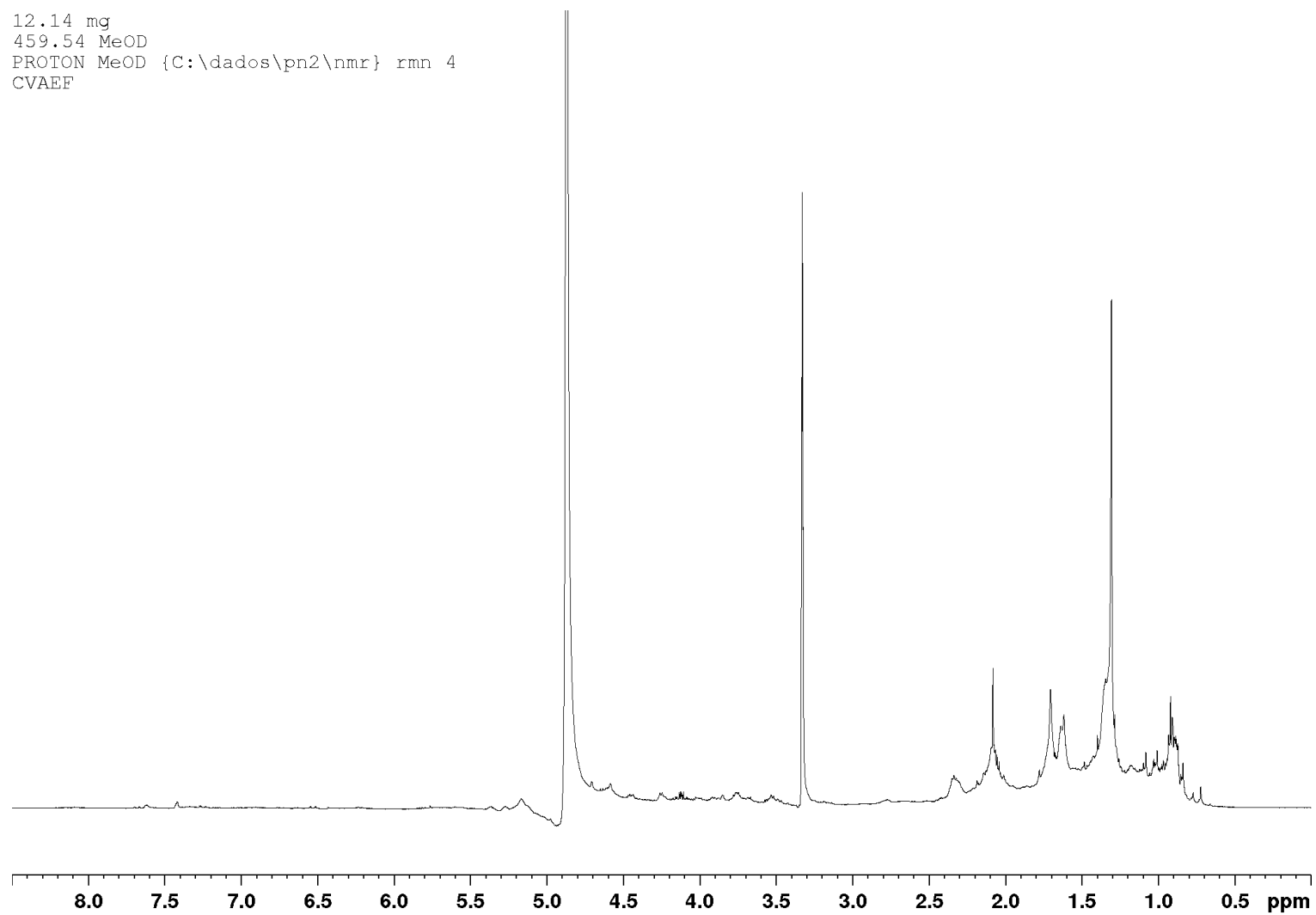
**Apêndice B – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius*.**

12.36 mg  
463.82 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rmn 2  
CBAEF



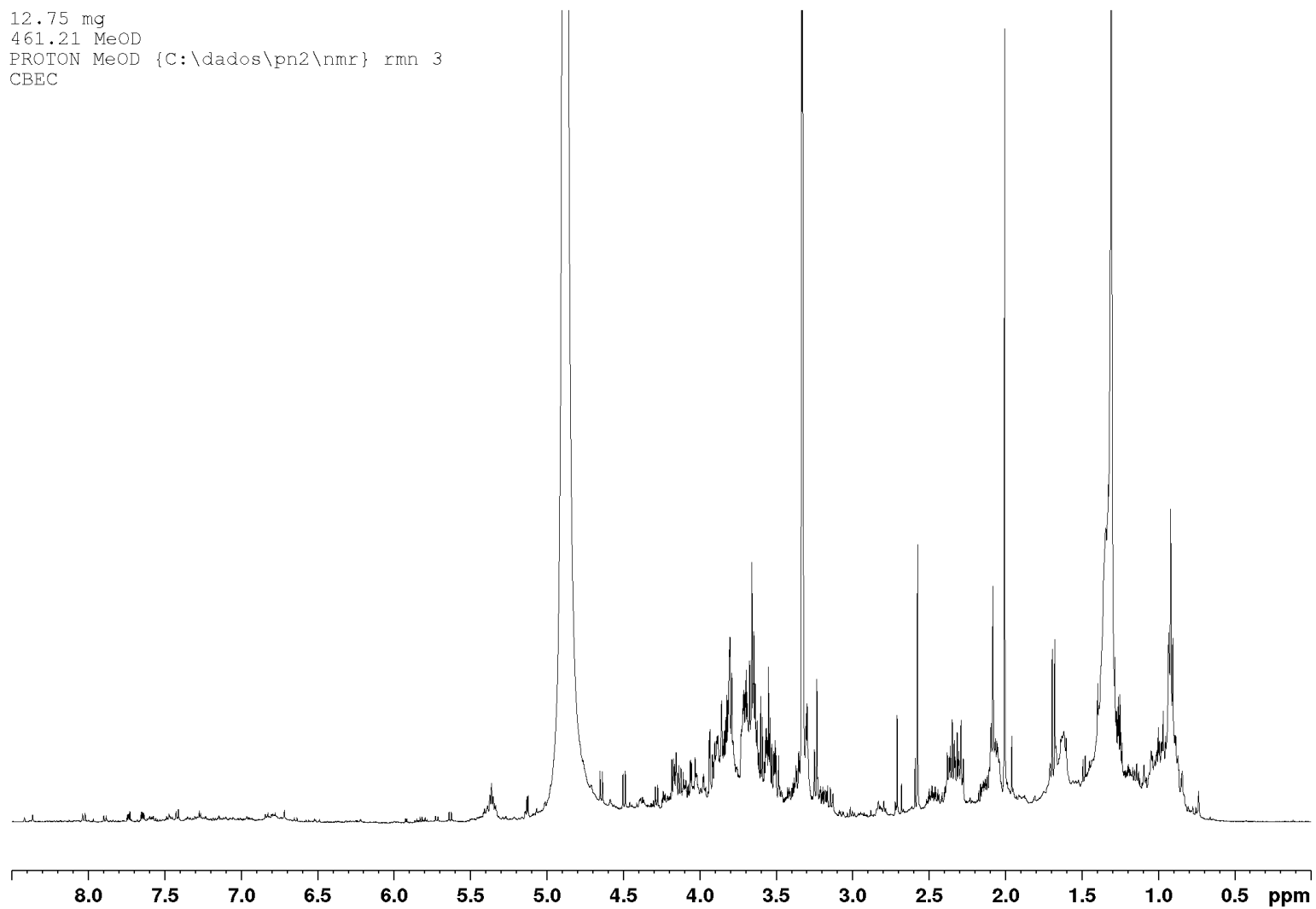
**Figura 57.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato acetato de etila das folhas de *C. bahianus* (CBAEF).

12.14 mg  
459.54 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rmn 4  
CVAEF



**Figura 58.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD/TMS, 500,13 MHz) do extrato acetato de etila das folhas de *C. vitifolius* (CVAEF).

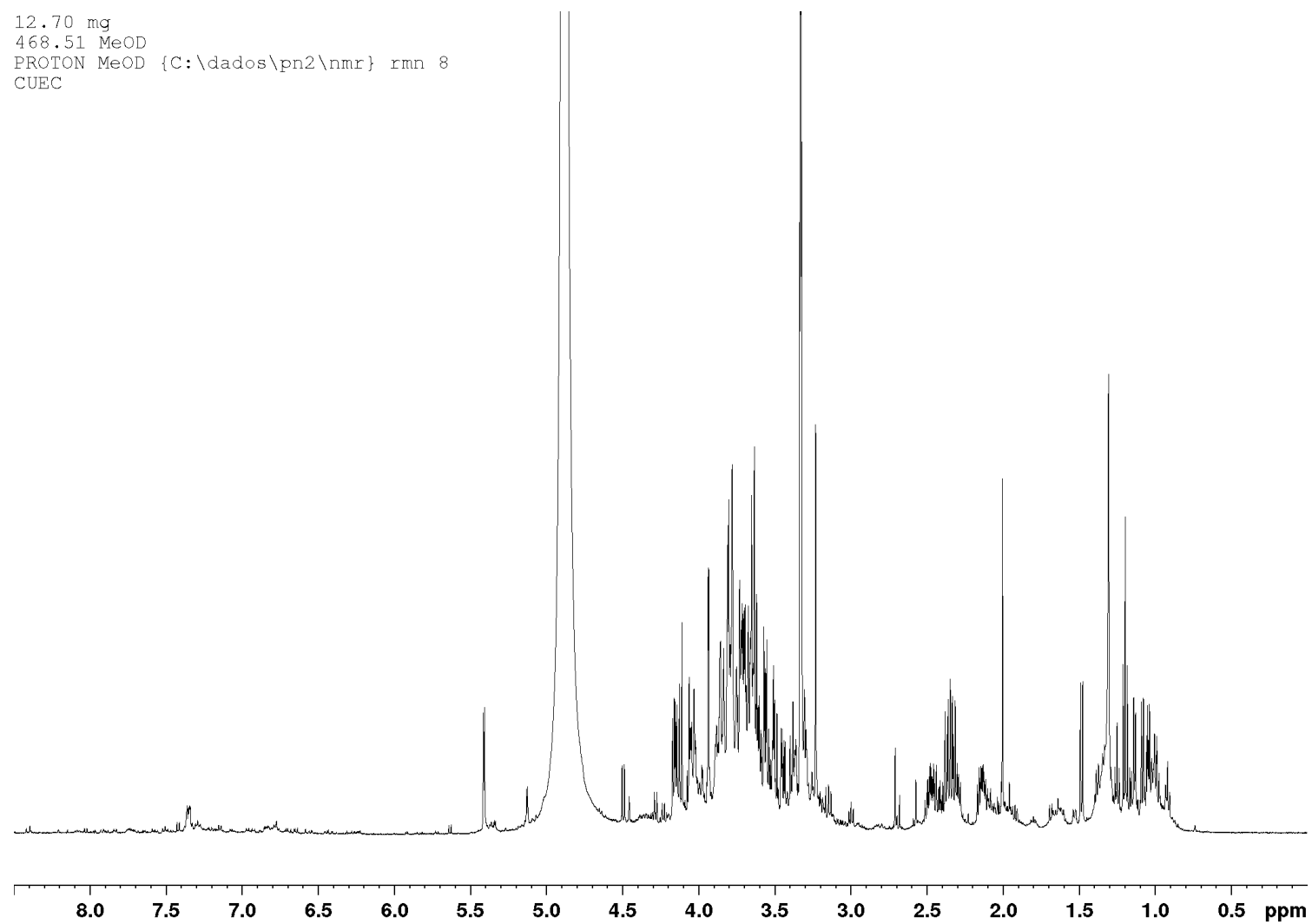
12.75 mg  
461.21 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rmn 3  
CBEC



**Figura 59.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico do caule de *C. bahianus* (CBEC).

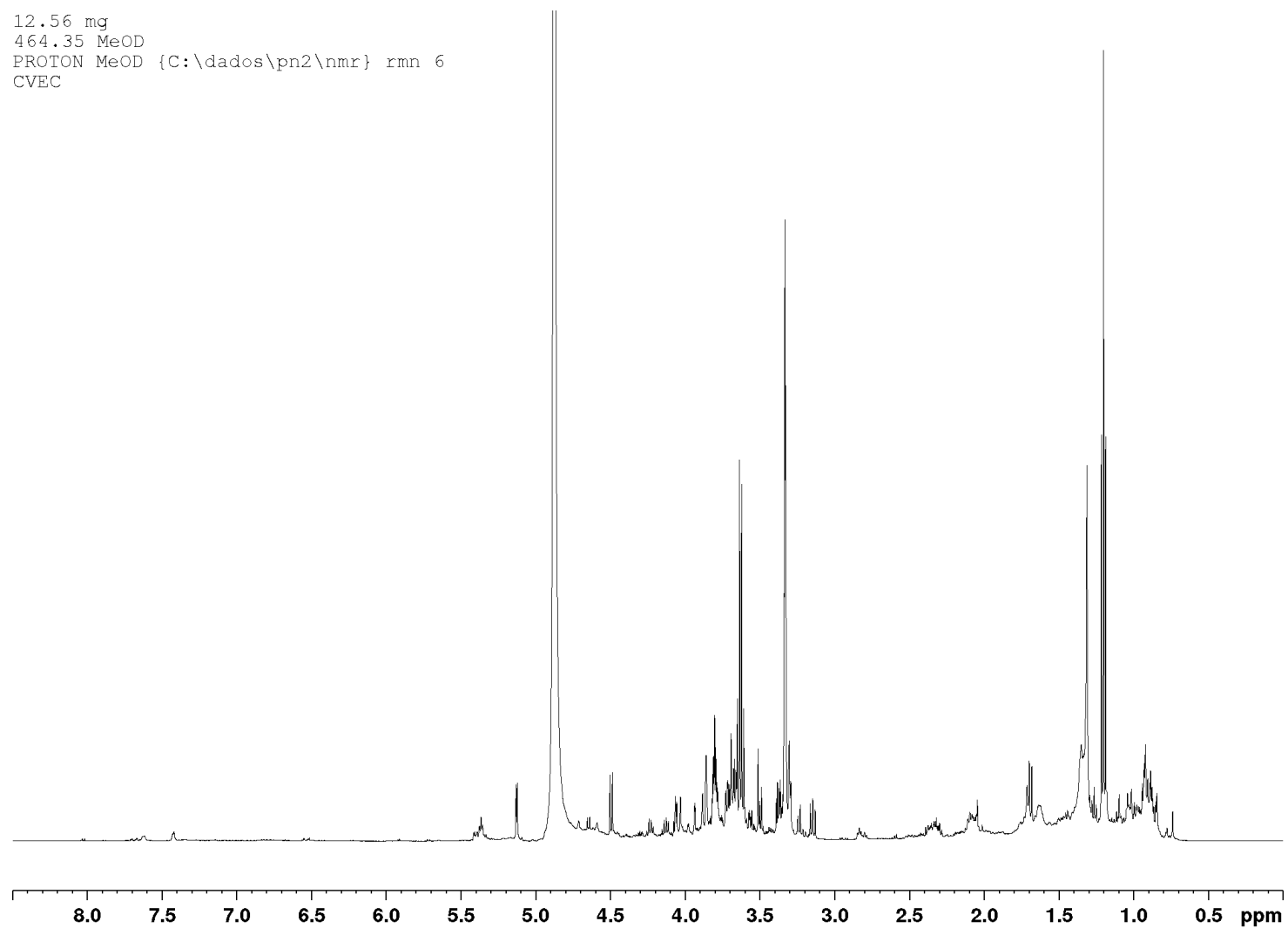


12.70 mg  
468.51 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rmn 8  
CUEC



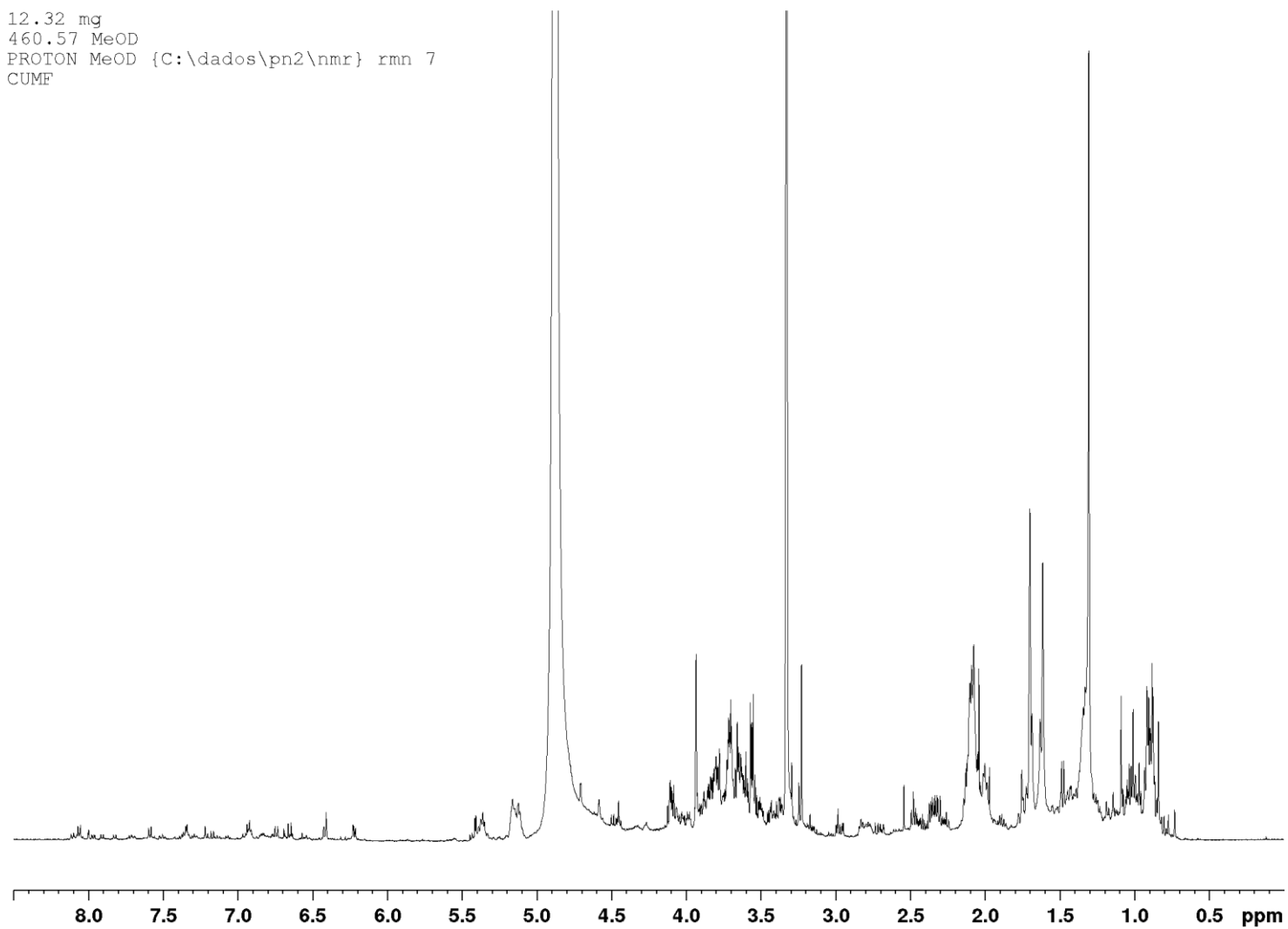
**Figura 60.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico do caule de *C.urniger* (CUEC).

12.56 mg  
464.35 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rnm 6  
CVEC

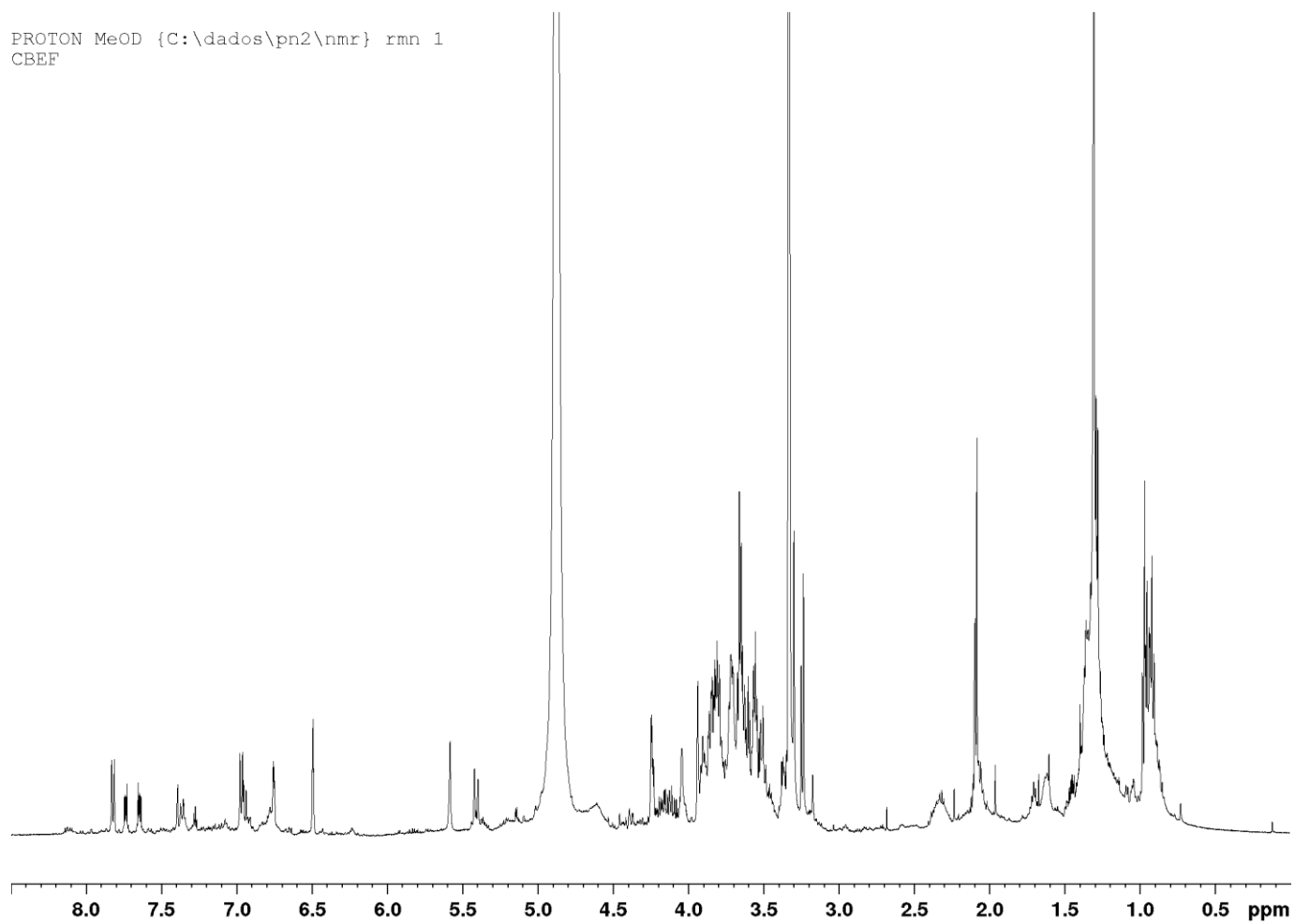


**Figura 61.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD/TMS, 500,13 MHz) do extrato etanólico do caule de *C.vitifolius* (CVEC).

12.32 mg  
460.57 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rmn 7  
CUMF

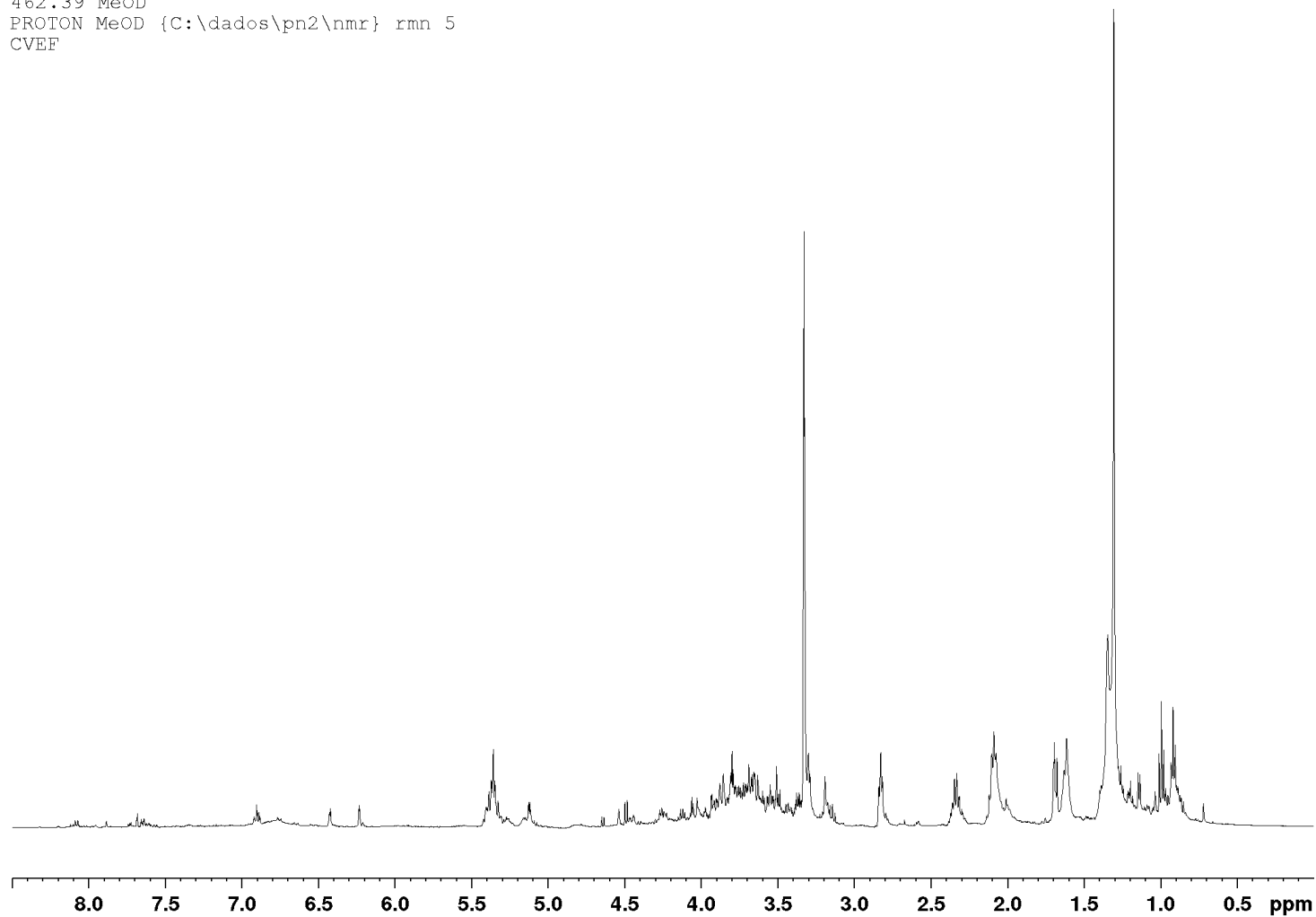


**Figura 62.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato metanólico das folhas de *C.urniger* (CUMF).



**Figura 63.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico das folhas de *C. bahianus* (CBEF).

12.57  
462.39 MeOD  
PROTON MeOD {C:\dados\pn2\nmr} rmn 5  
CVEF



**Figura 64.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ , 500,13 MHz) do extrato etanólico das folhas de *C.vitifolius* (CVEF).

**Apêndice C – Relação de compostos anotados na plataforma do GNPS/METLIN para os extratos das espécies de *Cnidoscopus* (modo negativo e positivo).**

**Tabela 8.** Compostos anotados na plataforma do GNPS/METLIN para os extratos das espécies de *Cnidoscopus* (modo negativo). (continua)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M – H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M – H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
<i>Cluster I – Flavonol</i>									
65	aromadendrina	18,55	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	287,05556	287,05627	0,55	259,06137; 125,02314	G3 (CVAEF, CVEF)	BRITO <i>et al.</i> , 2021
66	taxifolina	16,60	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	303,05050	303,05081	-0,71	275,05716; 259,06064; 177,01851; 125,02364	G3 (CVEF)	BRITO <i>et al.</i> , 2021
<i>Cluster II – Flavanol</i>									
67	catequina/epicatequina	15,91	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07121	289,07190	0,49	245,08203; 205,04974; 179,03403; 165,01819; 137,02338; 125,02299; 109,02824 261,07693; 179,03378;	G3 (CVEF)	DING <i>et al.</i> , 2018; YUZUAK <i>et al.</i> , 2018
68	epigallocatequina	12,2	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	305,06613	305,06696	0,93	165,01825; 139,03981; 137,02; 125,02	G3 (CVEF)	SINGH <i>et al.</i> , 2018; YUZUAK <i>et al.</i> , 2018

Tabela 8. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
<i>Cluster III - Flavona, Flavonol e Flavanona</i>									
69	apigenina-7-(3- <i>p</i> -cumaroil-glucosideo)	36,91	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	577,13460	577,13519	0,07	431,09845; 413,08783; 307,08295; 269,04556; 163,03918; 145,02850	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	BEZERRA, <i>et al.</i> , 2016; METLIN
70	kaempferol-3-(4- <i>p</i> -cumaroil-glucosideo)	37,20	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	593,12952	593,12988	0,80	447,09335; 429,08264; 370,23303; 285,04022; 145,02785	G2 (CUMF), G3 (CVEF)	FELIPE <i>et al.</i> , 2014; METLIN
71	prunin-3- <i>p</i> -cumarato	37,87	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	579,15025	579,15100	0,34	433,11484; 415,10275; 307,08221; 271,06119; 163,03726; 145,02835; 119,0483	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN

Tabela 8. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
72	prunin-3,6-di- <i>p</i> -cumarato	45,57	C <sub>39</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	725,18703	725,18738	0,48	579,14954; 453,11853; 271,06107; 163,03891; 145,02837	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVEF)	GNPS; METLIN
73	derivado de apigenina	37,54	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	607,14517	607,14557	0,65	461,10968; 443,09683; 299,05591; 163,03905; 145,02846	G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS
74	derivado de prunin	42,73	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	621,16082	621,16010	-1,15	349,09210; 271,06122; 163,03998; 145,02846	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF)	GNPS



Tabela 8. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
75	derivado de prunin	44,98	C <sub>39</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	723,17132	723,17200	0,77	577,13733; 559,12506; 453,11935; 269,04565; 163,03883; 145,02846	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS
<b>Cluster IV - Flavonol</b>									
76	kaempferol-3- <i>O</i> -glucosideo	25,85	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447,09274	447,09372	0,43	284,03290; 255,03026	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	DING <i>et al.</i> , 2018
77	kaempferol-3- $\alpha$ -L-arabinopiranosideo	26,83	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	417,082017	417,08295	0,23	284,03271; 255,02901	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	KUMAR <i>et al.</i> , 2017

Tabela 8. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
78	kaempferol-3-hexosideo	28,48	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431,09782	431,09833	-0,04	285,04050; 255,02968	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	KUMAR <i>et al.</i> , 2017
79	quercetina- <i>O</i> -hexosideo	23,55	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463,08765	463,08853	0,71	300,02759; 271,02634; 151,00278	G1 (CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	KUMAR <i>et al.</i> , 2017
80	kaempferitrina	23,72	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	577,15573	577,15656	0,28	431,09845; 285,04031	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN
81	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosideo	24,77	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,15065	593,15155	0,35	327,05154; 285,04047; 255,02820; 151,00275	G3 (CVAEF, CVEF)	CHEN <i>et al.</i> , 2015

Tabela 8. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
82	kaempferol-3- <i>O</i> -neohesperidosideo/ kaempferol-7- <i>O</i> -neohesperidosideo	23,36	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,15065	593,15137	0,17	429,08; 284,03; 179,00	G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	CHEN <i>et al.</i> , 2015
83	kaempferol-3- <i>O</i> -soforosideo	21,95	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,14556	609,14581	0,41	429,09; 300,03; 285,04; 284,03; 179,00; 151,00	G2 (CUMF)	GNPS; METLIN
84	quercetina-3- <i>O</i> -glucosideo-7- <i>O</i> -ramnosideo	19,98	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,14556	609,14630	1,21	463,08862; 446,08557; 301,03522	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	NEGRI <i>et al.</i> , 2013
85	quercetina-3-glucosil-(1→6)-galactosideo	21.15	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	625,14047	625,13922	-1,02	463,08942; 317,03076; 301,03400	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN

Tabela 8. (continuação)

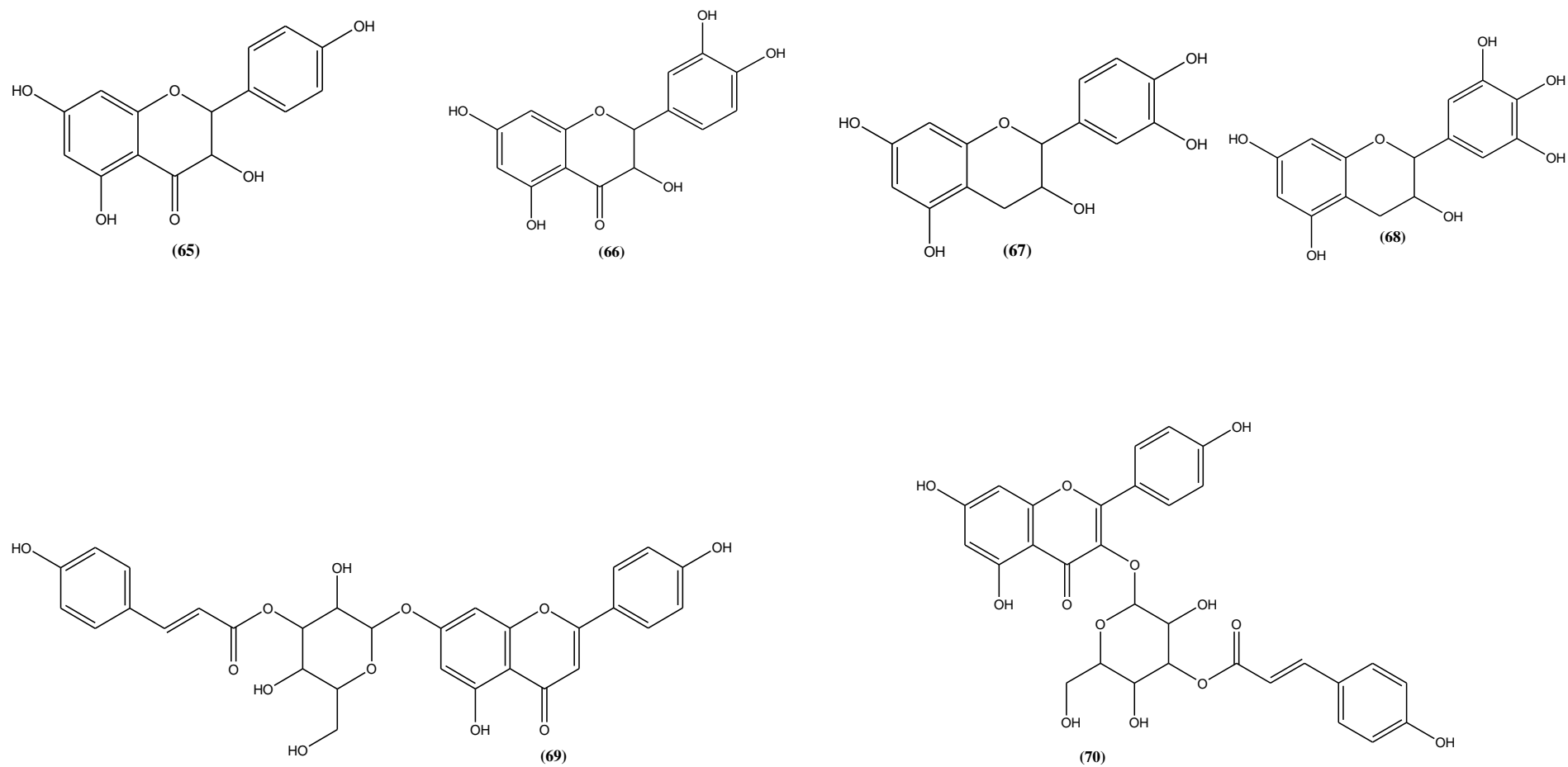
No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
86	kaempferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-galactopiranosideo (mauritanin)	21,36	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	739,20855	739,20978	1,66	593,15411; 575,14423 284,03275; 178,99738	G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	TAO <i>et al.</i> , 2011; SHKONDROV e KRASTEVA, 2021
87	kaempferol-3-glucosil-(1→2)-ramnosil-(1→6)-galactosideo	20,37	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	755,20347	755,20392	0,59	575,14014; 284,03290; 178,99727	G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	DU <i>et al.</i> , 2021
88	quercetina-3-rutinosideo-7-galactosideo	18,91	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	771,19838	771,19897	0,76	591,14288; 300,02786; 178,99678	G2 (CUMF)	TANG <i>et al.</i> , 2020
89	quercetina-3- <i>O</i> -arabinosideo	25,34	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	433,07709	433,07797	0,77	300,02768	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	DU <i>et al.</i> , 2021

Tabela 8. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
90	quercetina-3,7- <i>O</i> -diramnosideo	25,13	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,15065	593,15326	1,12	447,09372 301,03516	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN
<b>Cluster V - Ácido hidroxicinâmico</b>									
91	ácido-5- <i>p</i> -cumaroilquinico	16,15	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	337,09234	337,09259	-1,99	191,05542; 173,04463; 163,03923; 119,04890	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	CHANDRADEVAN <i>et al.</i> , 2020
92	ácido-3- <i>O</i> -cafeoilquinico	16,41	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,08726	353,08820	1,12	191,05548; 179,03424; 173,04488; 135,04480	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	BRITO <i>et al.</i> , 2021

**Tabela 8.** (conclusão)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M - H] <sup>-</sup> m/z teórica	[M - H] <sup>-</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
93	ácido-3- <i>O</i> -cafeoil-4- <i>O</i> -metilquinico	17,32	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	367,10291	367,10361	0,42	193,04997; 191,05582; 173,04506; 134,03629	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	BRITO <i>et al.</i> , 2021
94	ácido-1,5- dicafeoilquinico	26,48	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515,11895	515,11871	-1,53	353,08801; 335,07758; 191,05540; 179,03423; 173,04456	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF)	DU <i>et al.</i> , 2021



**Figura 65.** Estrutura dos compostos anotados presentes nas folhas das espécies *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* utilizando dados de EM no modo negativo, verificados nas bases de dados GNPS, PubMed e Metlin. (continua)

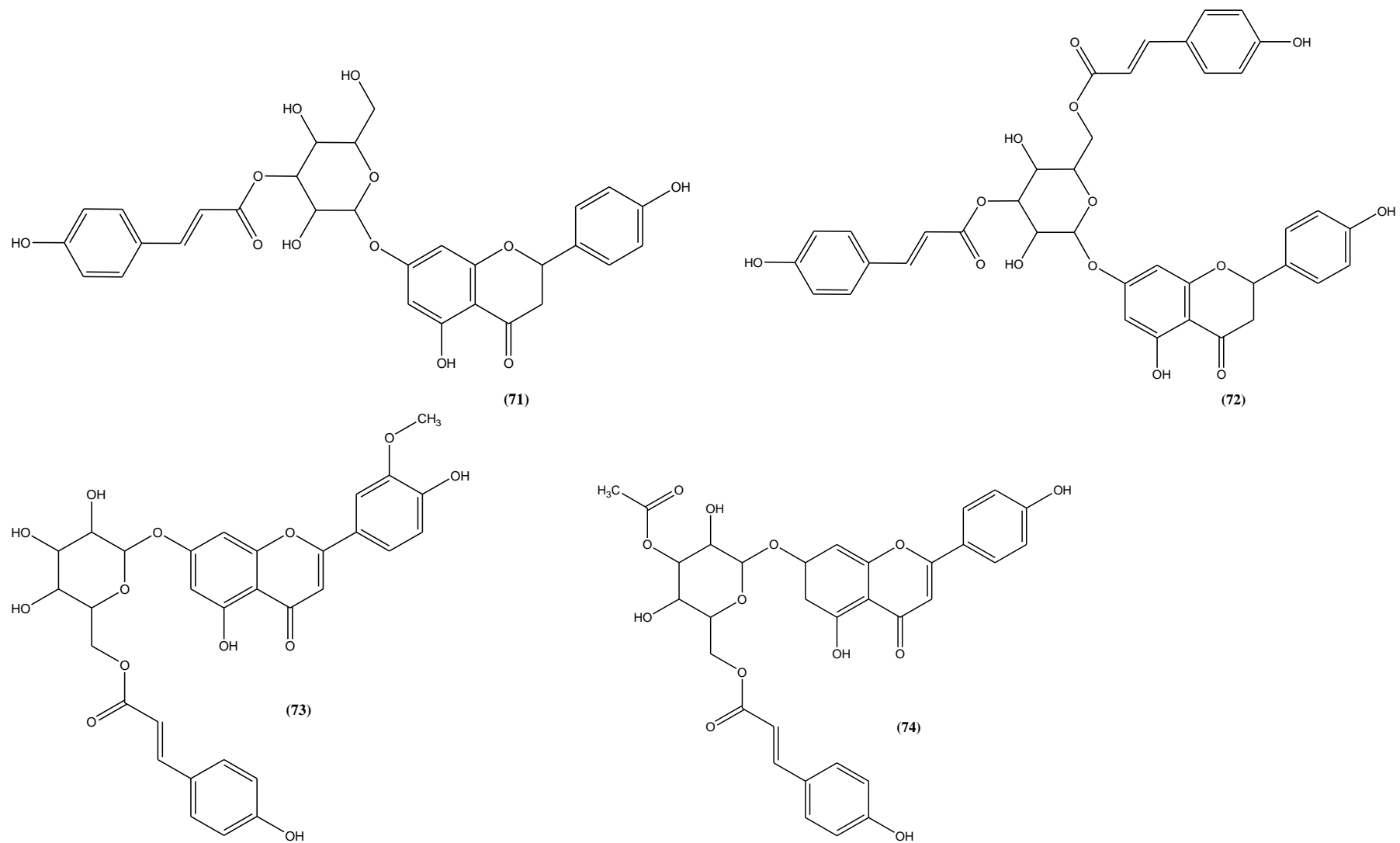
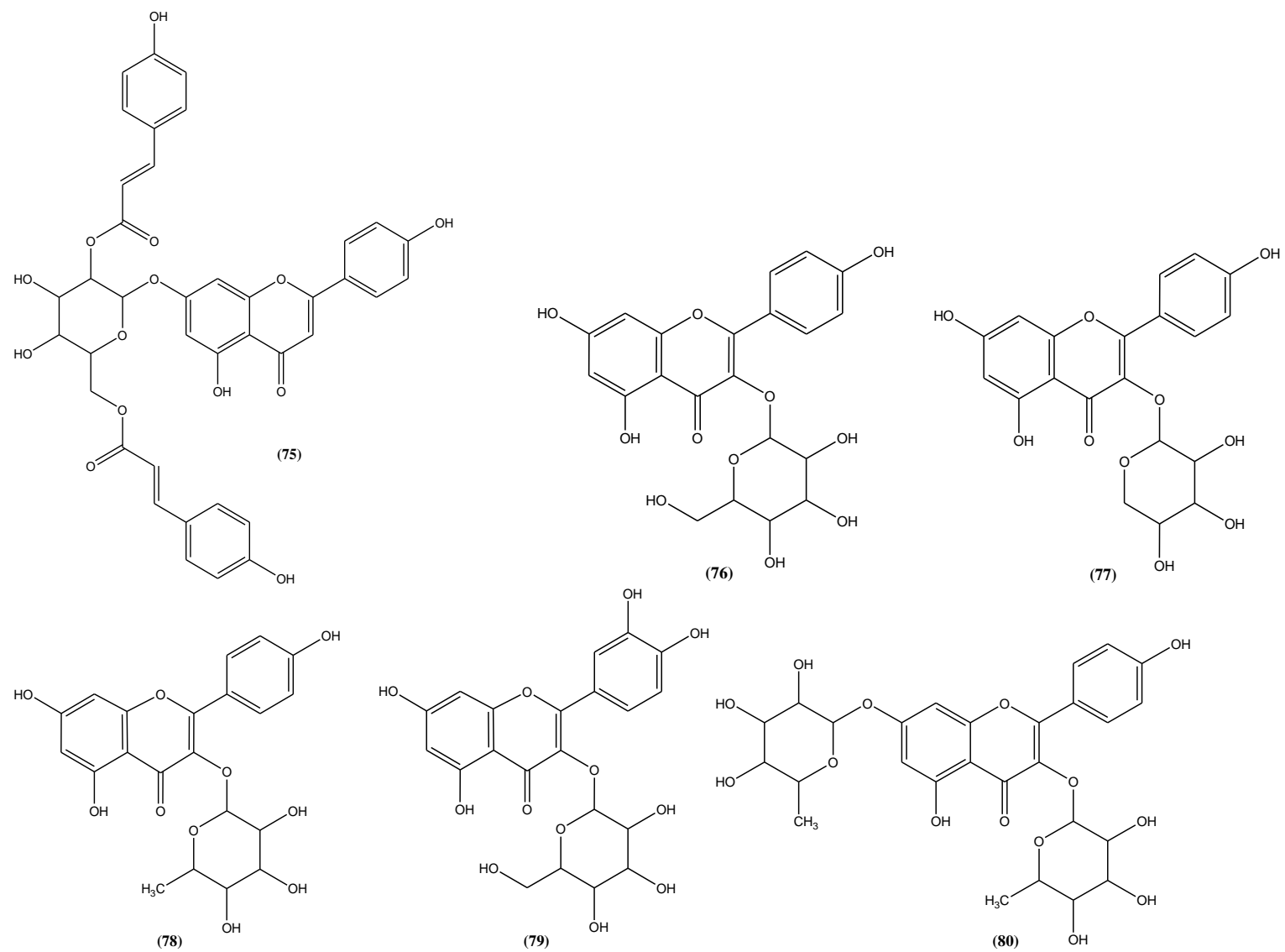


Figura 65. (continuação)





**Figura 65.** (continuação)

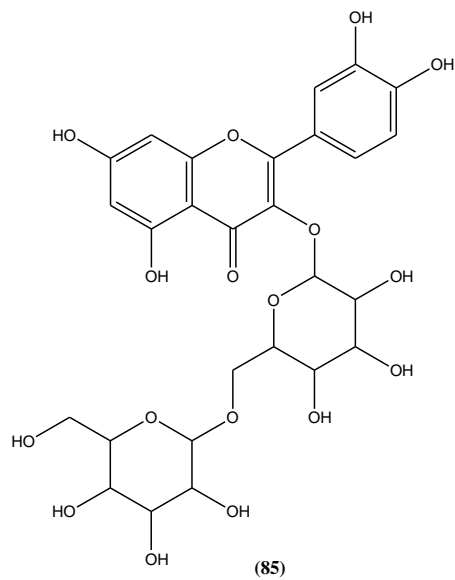
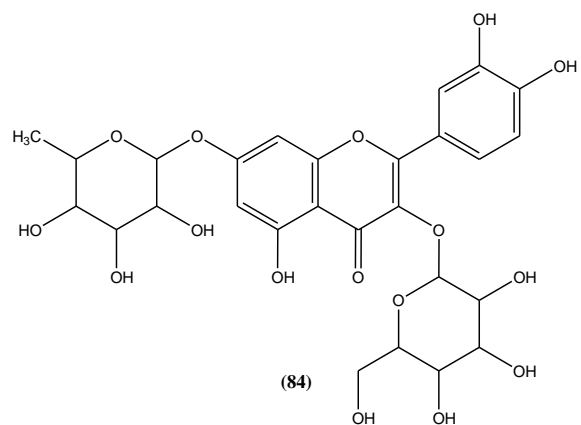
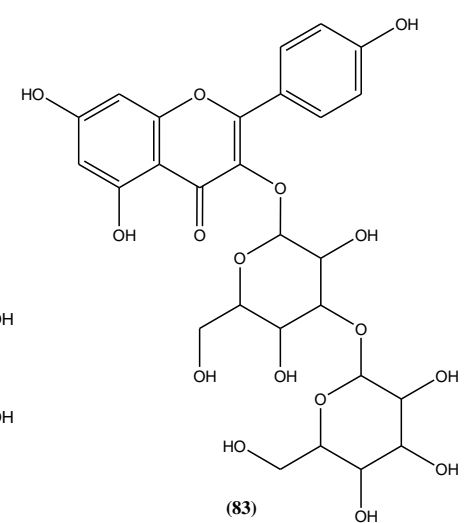
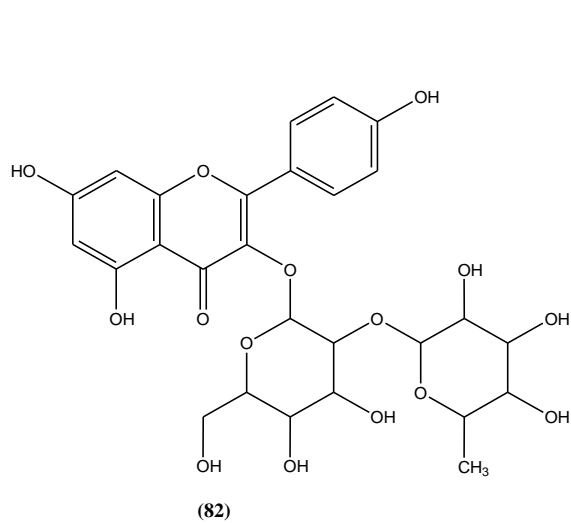
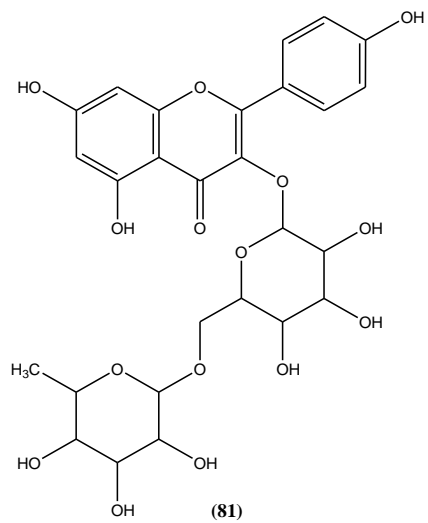


Figura 65. (continuação)

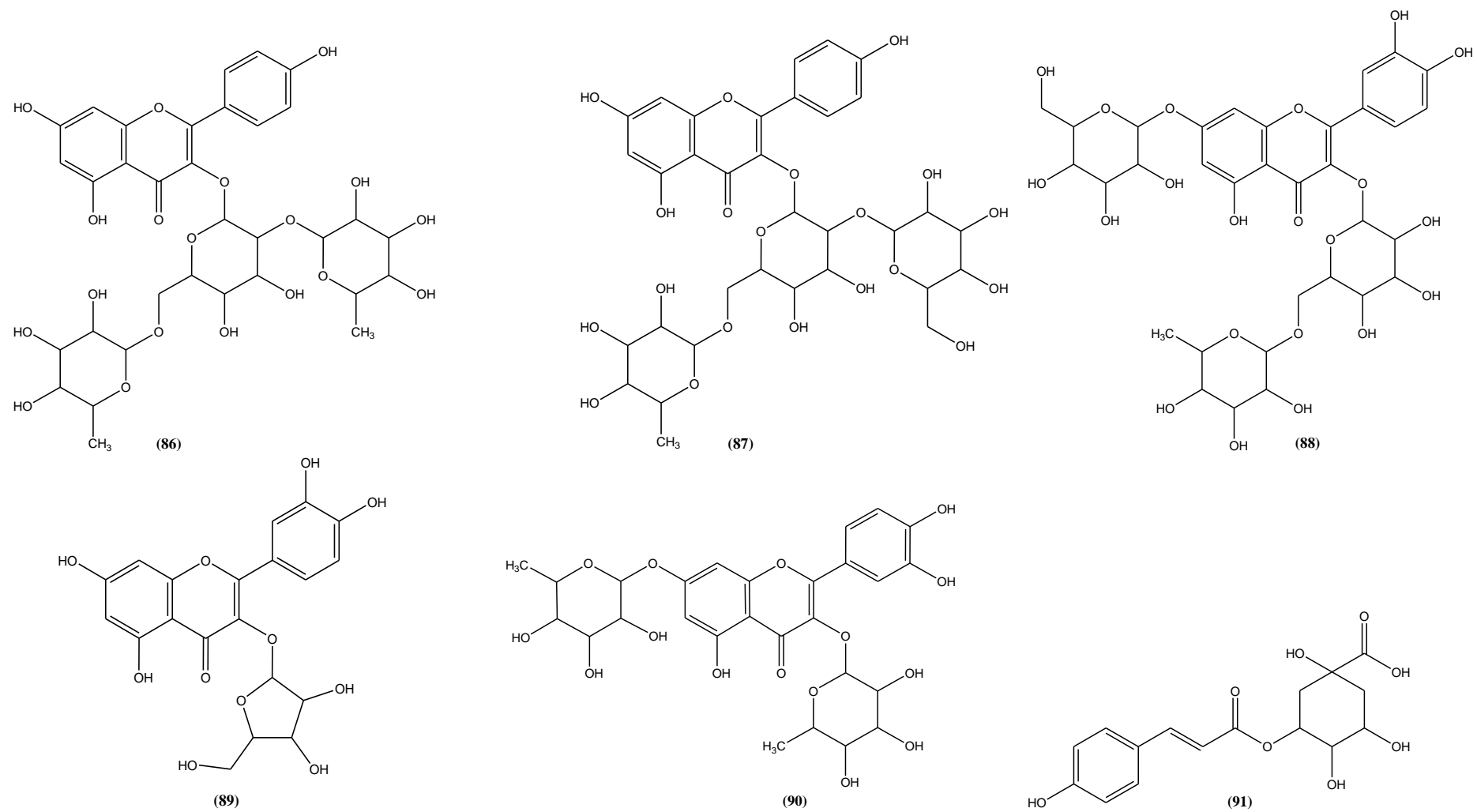
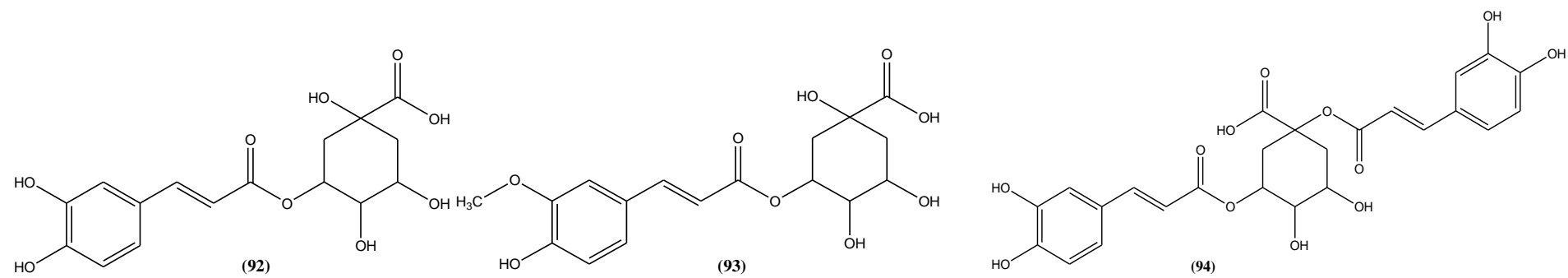


Figura 65. (continuação)



**Figura 65.** (conclusão)

**Tabela 9.** Compostos anotados na plataforma do GNPS/Metlin para os extratos das espécies de *Cnidoscopus* (modo positivo). (continua)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M + H] <sup>+</sup> m/z teórica	[M + H] <sup>+</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
<i>Flavona</i>									
95	apigenina-C-glucosídeo (isovitexina)/kaempferol-3-ramnosídeo (alfelina)	23,37	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433,11347	433,11185	-1,07	415,10205; 397,09143; 379,07941; 367,08185; 337,07114; 313,06921; 287,05435	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	ZHANG <i>et al.</i> , 2018
96	genisteína-7-O-apiosil-(1→6)-glucosídeo (ambocina)	25,62	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	565,15573	565,14948	-1,05	433,11240; 271,05981	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	REN <i>et al.</i> , 2016

**Tabela 9.** (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M + H] <sup>+</sup> m/z teórica	[M + H] <sup>+</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
97	apigenina-7-(3"- <i>p</i> - cumaroil-glucosideo)	34,69	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	579,15025	579,14929	-0,41	271,05984; 147,04401	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; PubChem
98	luteolina-5-O- glucosideo (a)/ luteolina-7-O- glucosideo (b)/ quercetina-3- ramnosideo	21,72	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449,10839	449,10773	-0,10	287,05457	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	PANDEY e KUMAR, 2016; ZHANG <i>et al.</i> , 2018; LYU <i>et al.</i> , 2021

Tabela 9. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M + H] <sup>+</sup> m/z teórica	[M + H] <sup>+</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
99	apigenina-7-(3",6"-di- <i>p</i> -cumaroil- glucosideo)	44,60	C <sub>39</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	725,18703	725,18590	-1,55	27,05978; 165,05420; 147,04414	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN; PubChem
<i>Flavonol</i>									
100	quercetina	20,28	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	303,05048	303,04977	-0,39	285,03873; 257,04343; 229,05040; 165,01826; 137,02298	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	ZHANG <i>et al.</i> , 2018

Tabela 9. (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M + H] <sup>+</sup> m/z teórica	[M + H] <sup>+</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
101	quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo (isoquercitrina)	20,63	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465,10330	465,10309	0,33	303,04999	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	ZHANG <i>et al.</i> , 2018
102	mircetina-3-ramnosídeo	19,83	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465,10330	465,10211	-0,64	369,06149; 319,04514; 303,04980	G1 (CBAEF, CBEF)	LYU <i>et al.</i> , 2021
103	kaempferol-3-sambubiosídeo	24,70	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	581,15065	581,14980	1,46	449,10675; 287,05478	G2 (CUMF)	GNPS; METLIN; PubChem
104	kaempferol-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6"-trans- <i>p</i> -cumaroil)-glucopiranosídeo (tilirosídeo)	34,20	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	595,14517	595,14390	-2,13	287,05472; 147,04399	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF)	REN <i>et al.</i> , 2016

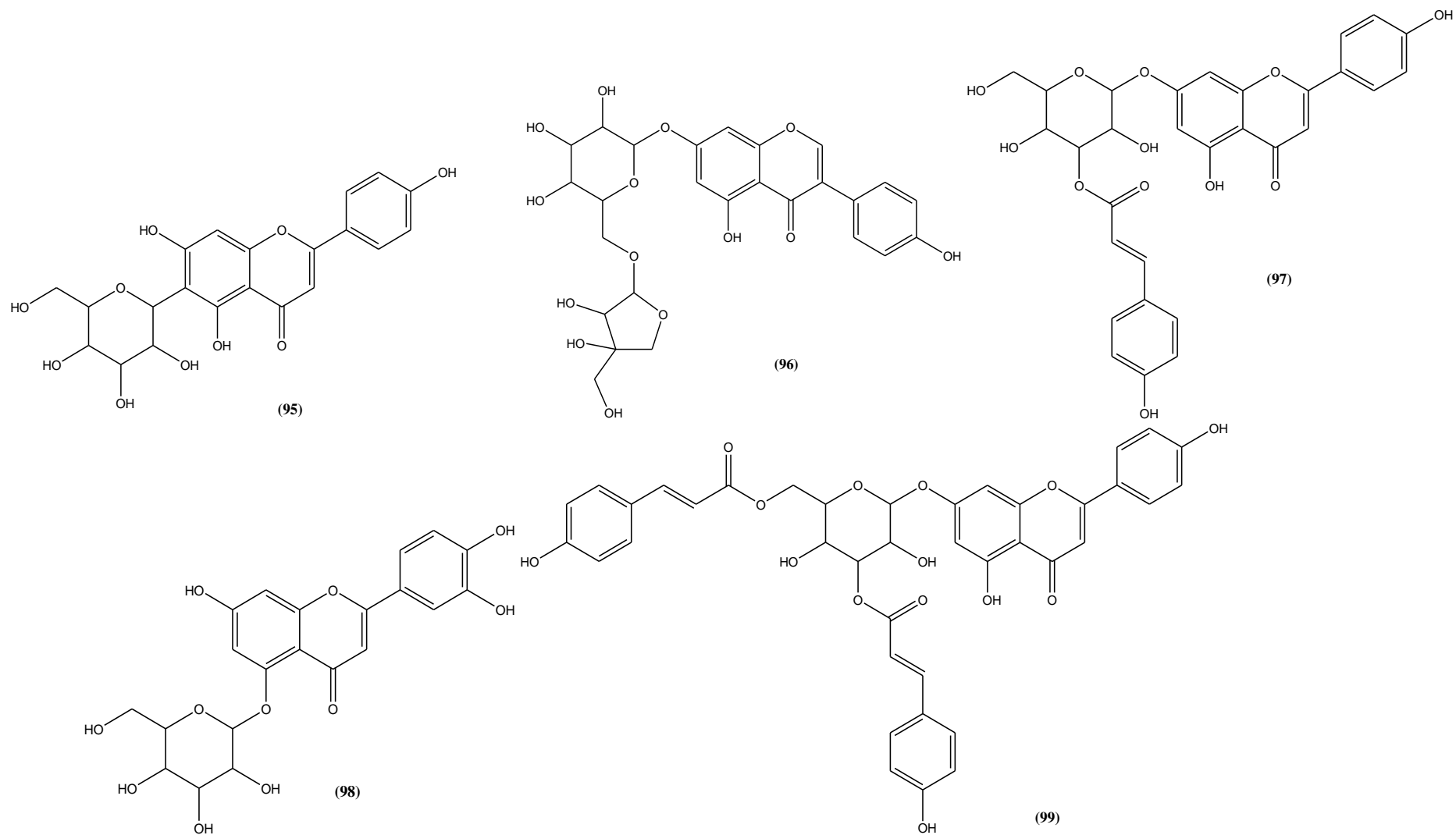


**Tabela 9.** (continuação)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M + H] <sup>+</sup> m/z teórica	[M + H] <sup>+</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
105	kaempferol-7- neohesperidosideo	21,61	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595,16613	595,16530	1,39	449,10748; 431,09784; 287,05496; 129,05472	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN; PubChem
106	quercetina-3-O- rutinosideo	19,92	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611,16121	611,16050	-1,16	465,09946; 449,10760; 303,04977; 287,05545	G1 (CBAEF, CBEF), G2 (CUMF), G3 (CVAEF, CVEF)	PANDEY e KUMAR, 2016; NORAZHAR <i>et al.</i> , 2021

**Tabela 9.** (conclusão)

No.	Anotação	Tr (min)	Fórmula Molecular	[M + H] <sup>+</sup> m/z teórica	[M + H] <sup>+</sup> m/z observada	Erro (ppm)	EM/EM	Grupos	Referências
107	kaempferol-3- ramnosideo-4"- ramnosideo-7- ramnosideo	23,90	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>18</sub>	725,22929	725,22900	-0,39	579,16864; 433,11273; 415,10257; 397,09161; 329,06506; 287,05472; 129,05484	G1 (CBAEF, CBEF)	GNPS; METLIN; PubChem
108	kaempferol-3- rutinosideo 4'- glucosideo	20,43	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	757,21912	757,21860	-1,53	449,10776; 303,05023; 287,05536	G1 (CBAEF, CBEF), G3 (CVAEF, CVEF)	GNPS; METLIN; PubChem



**Figura 66.** Estrutura dos compostos anotados presentes nos extratos das folhas das espécies de *C. bahianus*, *C. urniger* e *C. vitifolius* utilizando dados de EM no modo positivo, verificados nas bases de dados GNPS, PubMed e Metlin. (continuação)

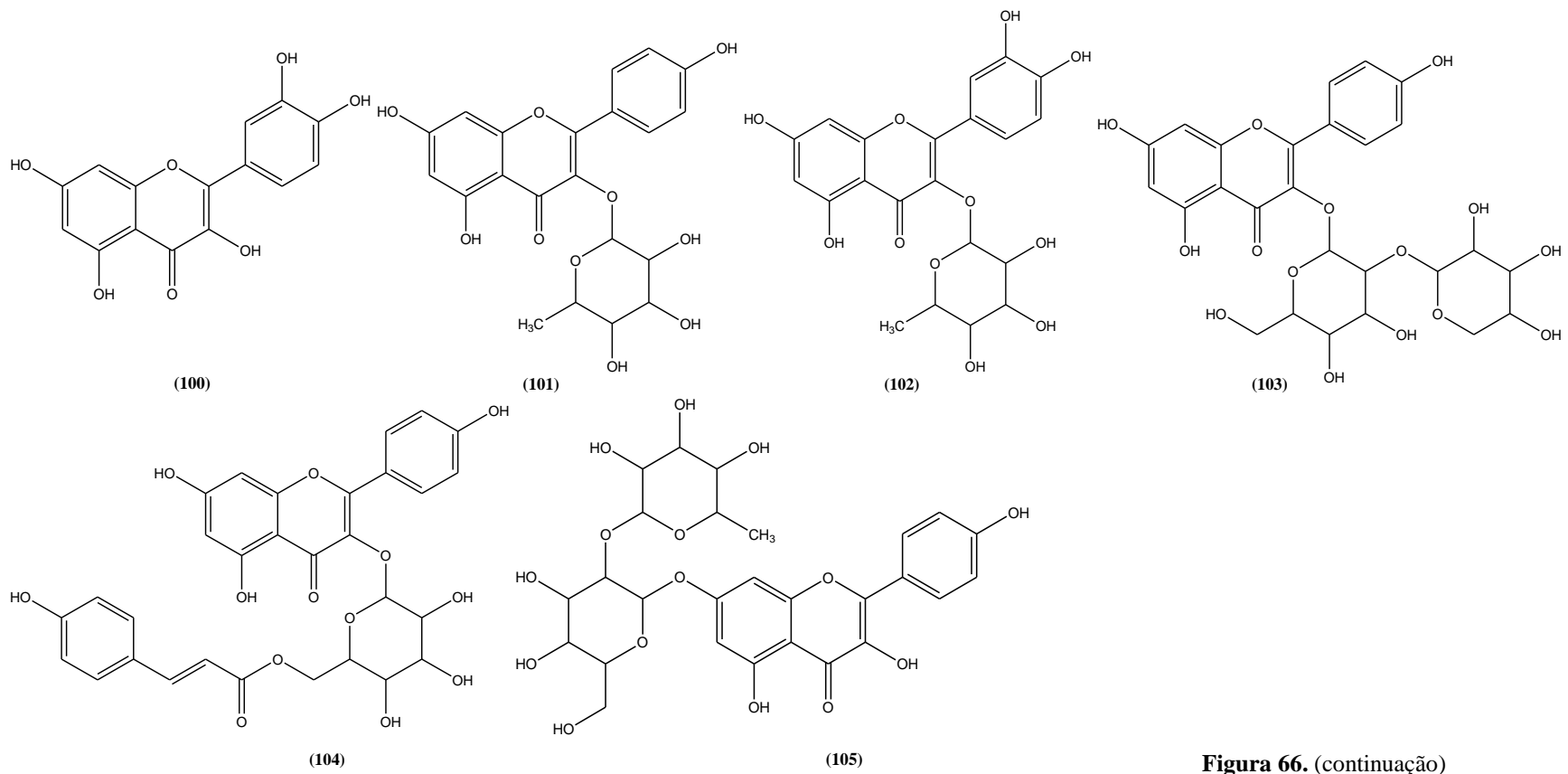
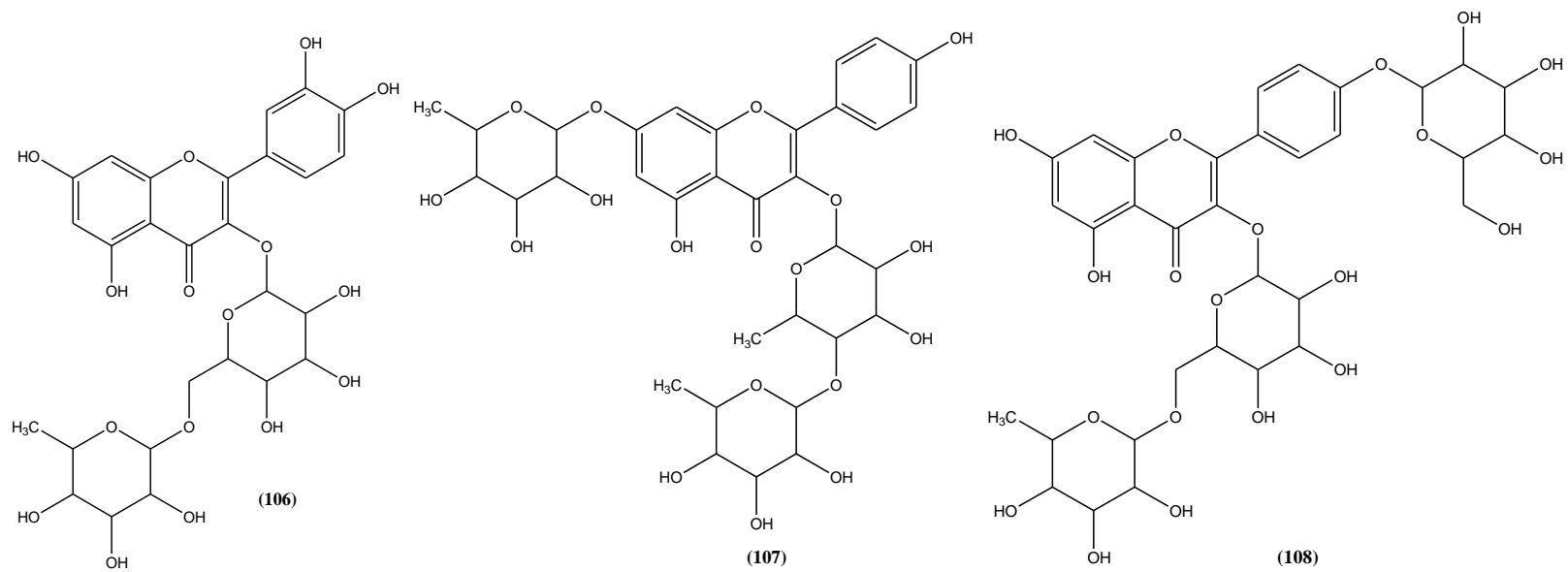


Figura 66. (continuação)



**Figura 66.** (conclusão)