

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, UNIFAL-MG**

**OLÍVIA DA SILVA DOMINGOS**

**METABOLÔMICA DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, FITOQUÍMICA E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL**

**Alfenas/MG**

**2018**

**OLÍVIA DA SILVA DOMINGOS**

**METABOLÔMICA DE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, FITOQUÍMICA E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Química pelo  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Química Orgânica  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Aparecida Chagas de Paula  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisi Gomes Soares

**Alfenas/MG**

**2018**

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

Domingos, Olívia da Silva.  
D671m Metabolômica de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, fitoquímica e  
avaliação das atividades anti-inflamatória e antitumoral / Olívia da Silva  
Domingos – Alfenas/MG, 2018.  
91 f.: il --

Orientadora: Daniela Aparecida Chagas de Paula.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de  
Alfenas, Alfenas, MG, 2018.  
Bibliografia.

1. Edema. 2. Infiltração de Neutrófilos. 3. Neoplasias. 4. Cromatografia  
Líquida de Alta Pressão. 5. Biflavonóides. I. Paula, Daniela Aparecida  
Chagas de. II. Título.

CDD-547

**Olívia da Silva Domingos**

**“Metabolômica de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória e antitumoral”**

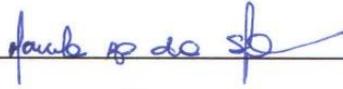
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 27/02/2018

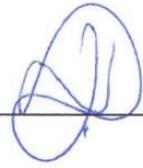
Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Diogo Montes Vidal  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a Deus e todas as energias boas do universo e espíritos de luz que me guiam no caminho do bem, me dando paz e suporte para realizar meus sonhos e vencer todos os desafios. Obrigada pela minha existência, minha família, amigos e todas as coisas maravilhosas que aconteceram e pessoas especiais que estiveram comigo durante essa trajetória. Obrigada pelas vitórias e dificuldades, que me fizeram evoluir.

À minha filha de patas Nina, agradeço por seu amor incondicional, sua companhia e por fazer transbordar nossa família de amor e alegria. Obrigada por me inspirar a cuidar e lutar pelo bem de todas as formas de vida. Agradeço ainda a todos os anjinhos que encontrei neste caminho.

Aos meus pais sou grata por sempre confiarem em mim, me apoiarem e incentivarem a crescer sem ter medo, especialmente à minha mãe por sempre estar comigo e pela assistência financeira. E à minha irmã e todos os demais familiares, que mesmo estando longe sempre torceram por mim, em especial à minha avó Clarice, tão querida e inspiradora.

Às minhas migas, pelo apoio e amizade, por ajudarem a me manter sempre forte e motivada a seguir em frente, Licinha e toda a família Barbosa, Bianca, Érika, Neiva...amo todas vocês!

Às minhas queridas orientadoras, professoras Dra. Dani e Dra. Marisi, agradeço muito por todas as oportunidades e confiança que deram a mim, pelo conhecimento compartilhado e ensinamentos para a minha vida. Tenho muita sorte e orgulho por tê-las como mestres. Espero de todo o coração ter correspondido às suas expectativas e sempre ter a orientação e amizade de vocês.

A todos os demais professores que tanto me ensinaram ao longo de toda à minha vida, meu muito obrigada! Especialmente aos professores Dr. Marcelo Henrique e Dra. Claudinha, minhas primeiras inspirações na Química, pessoas tão especiais e que me incentivaram muito a seguir este caminho, sempre terei vocês como grandes exemplos. Também agradeço à querida professora Dra. Daniele, pelos ensinamentos transmitidos a todos nós do LFQM e ao professor Dr. Ivo, pela amizade e apoio dado a todos nós.

À professora Dra. Marisa Ionta e ao doutorando Renato de Oliveira Horvath pela realização dos ensaios de cito-toxicidade. Ao grupo ASTEBIOCHEM pela realização das análises UHPLC-UV-HRFTMS e por nos disponibilizar o acesso ao software SIMCA-P. Ao Dr. Michael Murgu pelas análises de HRMS dos compostos isolados. E à querida professora

Dra. RuAngelie Edrada-Ebel por compartilhar seus conhecimentos sobre metabólômica.

A todos do LFQM pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados sempre e por tornarem os dias mais leves e divertidos. Especialmente à Bianca, amiga de laboratório e de vida, presente em todos os momentos. E ao Mário, sempre tão disposto a nos ajudar e ensinar, com sabedoria e humildade, saiba que você fez grande diferença no meu desenvolvimento como pesquisadora, muito obrigada por tudo. À Tati, grande companheira de ensaios e amiga e ao Welton por sua bondade e disposição em ajudar. A todos os demais amigos do grupo, Aline, Cris, Albert, Victor, Laís, João, Luíza, Dani Cabral, Dani Garcia, Felipe, Larissa, Patrícia, Marcela, Paula, foi muito bom conviver e aprender com vocês!

A UNIFAL-MG e ao PPGQ pela minha formação acadêmica e a todos os funcionários desta universidade, técnicos dos laboratórios, em especial à querida Glorinha. Também à Marcela, secretária do PPGQ por sempre nos orientar da melhor forma possível.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPQ, FAPEMIG (APQ-02353-17) e FINEP pelo suporte financeiro imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho.

De modo geral, agradeço a todos que em algum momento passaram pela minha vida, me ajudaram a evoluir e tornaram possível a realização deste trabalho.

## RESUMO

As abordagens metabolômicas são importantes na análise de misturas complexas, pois podem auxiliar em evitar o isolamento de substâncias já conhecidas e guiar o isolamento de substâncias desejadas, tais como as inéditas ou correlacionadas com alguma propriedade investigada. Entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo destacam-se os anti-inflamatórios, entretanto, estes fármacos apresentam diversas limitações com relação à sua potência, eficácia e principalmente efeitos adversos. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novos anti-inflamatórios, priorizando-se agentes com mecanismos de ação inovadores. Sabe-se ainda que as condições inflamatórias aumentam o risco de câncer, podendo surgir em alguns casos antes mesmo da ocorrência de alterações malignas. O câncer representa uma das principais causas de morte no mundo e os fármacos antitumorais disponíveis também apresentam limitações. A espécie *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* tem demonstrado significativo potencial anti-inflamatório e citotóxico. Neste contexto, foi realizada a avaliação da atividade citotóxica e anti-inflamatória das frações hidroetanólica, acetato de etila e hexânica de diferentes partes de *C. pluviosa* e, posteriormente, análises metabolômicas (HPLC-UV- HRFTMS) e *in silico* a fim de verificar-se os biomarcadores destas propriedades farmacológicas. Assim, o processo cromatográfico guiado levou ao isolamento de dois derivados metoxilados inéditos do biflavonoide caesalpinioflavona, denominados 4''-metoxicaesalpinioflavona e 7-metoxicaesalpinioflavona, além da obtenção de uma bichalcona, a ruschalcona VI, já identificada nesta espécie. Estas substâncias demonstraram ser capazes de promover a redução dual de edema e recrutamento de neutrófilos *in vivo*. Além disso, dois desses biomarcadores apresentaram eficácia melhor do que os fármacos de referência. Tais resultados corroboram com aqueles obtidos estatisticamente por meio das análises metabolômicas, confirmando que estas abordagens direcionaram claramente o isolamento de substâncias de interesse. Também se verificou que as substâncias isoladas se correlacionam positivamente com a atividade citotóxica a determinadas linhagens de células tumorais, portanto, deverão ser submetidas aos ensaios de cito-toxicidade. Dessa forma, constatou-se que a espécie *C. pluviosa* é extremamente promissora na busca de novas substâncias e biomarcadores de ambas as atividades avaliadas.

Palavras-chave: Edema. Recrutamento de neutrófilos. Atividade citotóxica. UHPLC-UV-HRFTMS. Biflavonoide.

## ABSTRACT

The metabolomic approaches are important in the analysis of complex mixtures, since they can help avoid the isolation of substances already known and guide the isolation of target substances, such as those unpublished or correlated with some investigated property. Anti-inflammatories are among the most widely used therapeutic agents in the world, however, these drugs have several limitations regarding their potency, efficacy, and mainly adverse effects. Thus, it is necessary to search for new anti-inflammatories, prioritizing agents with innovative mechanisms of action. It is also known that the inflammatory conditions increase the risk of cancer, appearing even before the occurrence of malignant changes. Cancer is one of the leading causes of death in the world and available antitumor drugs also have limitations. The species *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* has demonstrated significant anti-inflammatory and cytotoxic potential. In this context, the cytotoxic and anti-inflammatory activity of the hydroethanolic, ethyl acetate and hexane fractions from different parts of *C. pluviosa* was evaluated and, subsequently, metabolomic (HPLC-UV-HRFTMS) and *in silico* analysis determined the biomarkers of these pharmacological properties. Thus, the guided chromatographic process led to the isolation of two unknown methoxylated derivatives of the biflavonoid caesalpinioflavone, called 4'''-methoxycaesalpinioflavone and 7-methoxycaesalpinioflavone, in addition to obtaining a bichalcone, rhuschalcone VI, already identified in this species. These substances promoted dual *in vivo* inhibition of edema and neutrophil recruitment. In addition, two of these biomarkers showed better efficacy than the reference drug. These results corroborated with those obtained statistically through metabolomic analyzes, confirming that these approaches clearly directed the isolation of substances of interest. The isolated substances were also correlated positively with cytotoxic activity against some types of tumoral cells; therefore, they should be submitted to cytotoxic assays. Thus, it was verified that the species *C. pluviosa* is extremely promising in the search for new substances and biomarkers of both activities evaluated.

Key words: Edema. Neutrophils recruitment. Cytotoxic activity. UHPLC-UV-HRFTMS. Biflavonoid.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Principais vias envolvidas na metabolização do ácido araquidônico .....	21
<b>Figura 2 -</b>	Exemplos de anti-inflamatórios que atuam por diferentes mecanismos de ação .....	23
<b>Figura 3 -</b>	Esquema representativo do ciclo celular .....	25
<b>Figura 4 -</b>	<i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> (Benth.) GP Lewis .....	27
<b>Figura 5 -</b>	Compostos isolados a partir da casca do caule de <i>C. pluviosa</i> .....	28
<b>Figura 6 -</b>	Biflavonoide caesalpinioflavona .....	29
<b>Figura 7 -</b>	Oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina .....	34
<b>Figura 8 -</b>	Redução da resazurina em resofurina .....	35
<b>Figura 9 -</b>	Cromatograma da fração ECa3.4 obtido por HPLC-UV-DAD (coluna C18, fluxo de 1 mL/min, eluente: gradiente de 5 a 100% de MeCN:H <sub>2</sub> O com 0,1% de ácido acético por 30 min) .....	39
<b>Figura 10 -</b>	Cromatograma da fração ECa3.4 obtido por HPLC-UV-DAD (coluna C18, fluxo de 1,5 mL/min, eluente: 50% de MeCN:H <sub>2</sub> O com 0,1% de ácido acético por 30 min) .....	40
<b>Figura 11 -</b>	Fluxograma do processo cromatográfico para obtenção das substâncias 1, 2 e 3 a partir das cascas do caule de <i>C. pluviosa</i> .....	41
<b>Figura 12 -</b>	Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações de <i>C. pluviosa</i> no modelo de edema de orelha em camundongos .....	45
<b>Figura 13 -</b>	Efeito das frações de <i>C. pluviosa</i> no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO) .....	47
<b>Figura 14 -</b>	Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem A549, após 48 de tratamento com as frações .....	48
<b>Figura 15 -</b>	Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem MCF-7, após 48 de tratamento com as frações .....	49
<b>Figura 16 -</b>	Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem HT144, após 48 de tratamento com as frações .....	49
<b>Figura 17 -</b>	Cromatogramas (modo negativo) de todas as frações sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV-HRFTMS .....	50

<b>Figura 18</b> -	Distribuição das frações de <i>C. pluviosa</i> obtidos na análise por PCA .....	52
<b>Figura 19</b> -	Distribuição das frações de <i>C. pluviosa</i> de acordo com a propriedade citotóxica obtida na análise por PLS .....	53
<b>Figura 20</b> -	Distribuição das frações de <i>C. pluviosa</i> de acordo com a propriedade anti-inflamatória obtida na análise por PLS .....	53
<b>Figura 21</b> -	VIPs correlacionadas com a atividade citotóxica das frações de <i>C. pluviosa</i> .....	54
<b>Figura 22</b> -	VIPs correlacionadas com a atividade anti-inflamatória das frações de <i>C. pluviosa</i> .....	54
<b>Figura 23</b> -	Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade citotóxica das frações de <i>C. pluviosa</i> .....	55
<b>Figura 24</b> -	Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória das frações de <i>C. pluviosa</i> .....	55
<b>Figura 25</b> -	Espectro de massas da ruschalcona VI (1) .....	80
<b>Figura 26</b> -	Ruschalcona VI (1) e isoliquiritigenina .....	62
<b>Figura 27</b> -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da ruschalcona VI (1), 300 MHz, CD <sub>3</sub> OD .....	80
<b>Figura 28</b> -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da ruschalcona VI (1), 300 MHz, CD <sub>3</sub> OD .....	81
<b>Figura 29</b> -	Espectro de massas da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2) .....	81
<b>Figura 30</b> -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	82
<b>Figura 31</b> -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	82
<b>Figura 32</b> -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	83
<b>Figura 33</b> -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	83
<b>Figura 34</b> -	Espectro de correlação COSY da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	84
<b>Figura 35</b> -	Espectro de correlação COSY da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	84

<b>Figura 36</b> -	Espectro de correlação HSQC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	85
<b>Figura 37</b> -	Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	85
<b>Figura 38</b> -	Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2) 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	86
<b>Figura 39</b> -	Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	86
<b>Figura 40</b> -	Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	87
<b>Figura 41</b> -	Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	87
<b>Figura 42</b> -	Estrutura química da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2) .....	67
<b>Figura 43</b> -	Espectro de massas da 7-metoxicaesalpinioflavona (3) .....	88
<b>Figura 44</b> -	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	88
<b>Figura 45</b> -	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	89
<b>Figura 46</b> -	Espectro de correlação COSY da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	89
<b>Figura 47</b> -	Espectro de correlação HSQC da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	90
<b>Figura 48</b> -	Espectro de correlação HMBC da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6 .....	90
<b>Figura 49</b> -	Estrutura química da 7-metoxicaesalpinioflavona (3) .....	67
<b>Figura 50</b> -	Avaliação da atividade anti-inflamatória das substâncias no modelo de edema de orelha em camundongos .....	70
<b>Figura 51</b> -	Efeito das substâncias no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO) .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Codificação adotada para as frações <i>C. pluviosa</i> .....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Efeito das frações de <i>C. pluviosa</i> no edema da orelha exibido em percentagem de inibição .....	44
<b>Tabela 3 -</b>	Efeito das frações de <i>C. pluviosa</i> no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO) .....	46
<b>Tabela 4 -</b>	Variável importante para a projeção (VIP) do modelo PLS construído para a atividade citotóxica .....	57
<b>Tabela 5 -</b>	Variável importante para a projeção (VIP) do modelo PLS construído para a atividade anti-inflamatória .....	59
<b>Tabela 6 -</b>	Dados de RMN de <sup>1</sup> H da ruschalcona VI (1), 300 MHz, CD <sub>3</sub> OD .....	63
<b>Tabela 7 -</b>	Dados de RMN da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	66
<b>Tabela 8 -</b>	Dados de RMN da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	68
<b>Tabela 9 -</b>	Efeito das substâncias no edema da orelha exibido em percentagem de inibição .....	69
<b>Tabela 10 -</b>	Efeito das substâncias no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO) .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A549 -</b>	Carcinoma de pulmão
<b>AA -</b>	Ácido araquidônico
<b>AIEs -</b>	Anti-inflamatórios esteroidais
<b>AINEs -</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>ANN -</b>	<i>Artificial neural networks</i>
<b>ANOVA -</b>	Análise de variância
<b>(AP) -1 -</b>	Proteína ativadora
<b>CaAc -</b>	Fração acetato de etila do extrato das cascas do caule
<b>CaAcHe -</b>	Extrato acetato de etila/hexânico das cascas do caule de <i>C. pluviosa</i>
<b>CaE -</b>	Fração hidroetanólica do extrato das cascas do caule
<b>CaHe -</b>	Fração hexânica do extrato das cascas do caule
<b>CC -</b>	Cromatografia em coluna
<b>CCD -</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CD<sub>3</sub>OD -</b>	Metanol deuterado
<b>Cdks -</b>	Proteínas quinases dependentes de ciclinas
<b>CEUA -</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CONCEA -</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>COSY -</b>	Correlation Spectroscopy
<b>COX -</b>	Ciclooxigenase
<b>CYP -</b>	Citocromo P450
<b>DAD-UV/Vis -</b>	Detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos
<b>d -</b>	Dubleto
<b>dd -</b>	Duplo dubleto
<b>DMEM -</b>	Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO -</b>	Dimetilsufóxido
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub> -</b>	Dimetilsufóxido deuterado
<b>DNA -</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNP -</b>	Dictionary of Natural Products
<b>EDTA -</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>EMP -</b>	Erro médio padrão
<b>ESI -</b>	<i>Electrospray Ionization</i>

<b>FlAc -</b>	Fração acetato de etila do extrato das flores
<b>FlE -</b>	Fração hidroetanólica do extrato das flores
<b>FlHe -</b>	Fração hexânica do extrato das flores
<b>FM -</b>	Fórmula molecular
<b>FoAc -</b>	Fração acetato de etila do extrato das folhas
<b>FoE -</b>	Fração hidroetanólica do extrato das folhas
<b>FoHe -</b>	Fração hexânica do extrato das folhas
<b>HCA -</b>	<i>Hierarchical cluster analysis</i>
<b>HMBC -</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HPLC -</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HRGC -</b>	<i>High Resolution Gas Chromatography</i>
<b>HRMS -</b>	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
<b>HSQC -</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>HTS -</b>	<i>High-throughput screening</i>
<b>HT144 -</b>	Melanoma
<b>Hz -</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub> -</b>	Concentração inibitória média
<b>ID -</b>	Número de identificação
<b>J -</b>	Deslocamento químico
<b>LC -</b>	Leucotrieno
<b>LC -</b>	<i>Liquid Chromatography</i>
<b>LFQM -</b>	Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
<b>LOX -</b>	Lipoxigenase
<b>LTB<sub>4</sub> -</b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LX -</b>	Lipoxinas
<b>M -</b>	Mitose
<b>MCF-7 -</b>	Adenocarcinoma mamário
<b>MeCN -</b>	Acetonitrila
<b>MeCN:H<sub>2</sub>O -</b>	Solução de acetonitrila e água
<b>ML3000 -</b>	Licofelone
<b>MPO -</b>	Mieloperoxidase
<b>MS -</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>m/z -</b>	massa/carga

<b>NF-<math>\kappa</math>B</b> -	Fator nuclear de transcrição kappa-B
<b>OPSL</b> -	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i>
<b>PCA</b> -	<i>Principal component analysis</i>
<b>PG</b> -	Prostaglandina
<b>PGE<sub>2</sub></b> -	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b> -	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLS</b> -	<i>Partial Least Squares</i>
<b>Q<sup>2</sup></b> -	Coeficiente de correlação
<b>R<sup>2</sup></b> -	Coeficiente de correlação
<b>RDBE</b> -	<i>Ring double bond equivalents</i>
<b>RMN-</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN de <sup>13</sup>C</b> -	Ressonância magnética nuclear de carbono
<b>RMN de <sup>1</sup>H</b> -	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>rpm</b> -	Rotação por minuto
<b>s</b> -	Singleto
<b>sl</b> -	Singleto largo
<b>SFB</b> -	Soro Fetal Bovino
<b>t</b> -	Tripleto
<b>TMB</b> -	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>TOF</b> -	Time-of-flight
<b>t<sub>R</sub></b> -	Tempo de retenção
<b>TX</b> -	Tromboxanos
<b>UHPLC</b> -	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>VIP</b> -	Variável importante para a projeção
<b>X</b> -	Variáveis preditoras
<b>Y</b> -	Variáveis dependentes
<b><math>\lambda</math></b> -	Comprimento de onda
<b><math>\delta_C</math></b> -	Deslocamento químico do carbono
<b><math>\delta_H</math></b> -	Deslocamento químico do hidrogênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	METABOLÔMICA .....	18
2.2	ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO .....	20
2.3	ASPECTOS DO CÂNCER .....	24
2.4	FAMÍLIA LEGUMINOSAE .....	26
2.5	GÊNERO <i>Caesalpinia</i> .....	26
2.6	ESPÉCIE <i>Caesalpinia pluviosa</i> var. <i>peltophoroides</i> .....	26
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
4.1	OBJETIVO GERAL .....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	32
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	32
<b>5.1.1</b>	<b>Animais</b> .....	32
<b>5.1.2</b>	<b>Edema de orelha</b> .....	33
<b>5.1.3</b>	<b>Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos</b> .....	33
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA .....	35
<b>5.2.1</b>	<b>Linhagens celulares e condições de cultivo</b> .....	35
<b>5.2.2</b>	<b>Ensaio de viabilidade celular</b> .....	35
5.3	METABOLÔMICA .....	36
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES .....	43
<b>6.1.1</b>	<b>Edema de orelha</b> .....	43
<b>6.1.2</b>	<b>Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos</b> .....	45
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA .....	47
6.3	METABOLÔMICA .....	49
6.4	DESREPLICAÇÃO .....	55
6.5	ESTUDO FITOQUÍMICO .....	61
6.6	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL .....	61
<b>6.6.1</b>	<b>Substância 1</b> .....	62
<b>6.6.2</b>	<b>Substância 2</b> .....	63
<b>6.6.3</b>	<b>Substância 3</b> .....	67

6.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS .....	68
6.7.1	Edema de orelha .....	69
6.7.2	Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos .....	70
7	CONCLUSÃO .....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	APÊNDICE .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

Mesmo com a grande diversidade de fármacos provenientes da química combinatória e tecnologias de triagem de alto desempenho (HTS, do inglês high-throughput screening), produtos naturais ainda apresentam grande relevância para a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos devido à variedade de metabólitos secundários de importância biológica biossintetizados por organismos vivos (NEWMAN, 2016; NGO et al., 2013).

O conjunto de metabólitos de peso molecular baixo/intermediário presentes em um organismo ou matriz biológica foi denominado como metaboloma em 1998 por Stephen Oliver (GROMSKI et al., 2015; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Existem diferentes abordagens analíticas que podem ser empregadas para a interpretação dos dados metabólicos de acordo com as respostas que se espera obter.

As metodologias de análise de dados de metaboloma podem ser classificadas como metabolômica alvo (*target*), que tem como foco um conjunto de metabólitos conhecidos e metabolômica global ou não-direcionada (*untarget*), que avalia os perfis metabolômicos de forma mais abrangente (GORROCHATEGUI et al., 2016).

A identificação e quantificação em uma amostra de um grupo pré-determinado de metabólitos pertencentes a uma classe específica é realizada pelo processo conhecido como perfil metabólico. Já a impressão digital metabólica é uma análise que possibilita a rápida classificação de amostras diferentes, de acordo com sua origem ou importância biológica. Enquanto que, a metabolômica trata-se de análises abrangentes, em que todos os metabólitos de uma matriz biológica são identificados e quantificados. (ERNST et al., 2014; FIEHN, 2002; WOLFENDER et al., 2015).

A metabolômica, assim como as demais chamadas ciências ômicas, tais como a genômica, a transcriptômica e a proteômica, analisam um sistema biológico de forma holística, afim de compreender as inter-relações da composição química, metabolismo e funções que resultam no funcionamento dos organismos (FUNARI et al., 2013).

Tais abordagens metabolômicas possibilitam a análise de matrizes biológicas altamente complexas através da utilização de métodos analíticos modernos. Para a interpretação e mineração da grande quantidade de dados espectroscópicos e/ou cromatográficos que são gerados, faz-se necessária a utilização de ferramentas de análise multivariada de dados a fim de classificar as amostras em grupos; monitorar mudanças em sua composição metabolômica, já que espécimes de uma mesma espécie que crescem sob diferentes condições ambientais podem produzir e acumular metabólitos primários e secundários diferentemente (Sampaio; Edrada-Ebel; da Costa, 2016); ou determinar os compostos relacionados com propriedades farmacológicas (CHAGAS-

PAULA et al., 2015a; CHAGAS-PAULA et al., 2015b; WOLFENDER et al., 2015).

Entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo destacam-se os anti-inflamatórios, entretanto, estes fármacos apresentam diversas limitações com relação à sua potência, eficácia e principalmente efeitos adversos. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas substâncias com potencial anti-inflamatório e, neste contexto, prioriza-se a busca por agentes com mecanismos de ação inovadores, tais como substâncias que sejam capazes de inibir tanto a ciclooxigenase (COX) quanto a lipoxigenase (5-LOX), visando uma maior atividade anti-inflamatória e minimizando os efeitos indesejados (CHAGAS-PAULA et al., 2015b; KONG; HOOPER; GANEA, 2016).

A inflamação está relacionada com diversas doenças responsáveis por causar um grande número de morbidade e mortalidade, dentre estas, o câncer. Células e mediadores inflamatórios estão presentes em ambientes tumorais, inclusive, em alguns tipos de câncer as condições inflamatórias surgem antes mesmo da ocorrência de alterações malignas. Entretanto, o papel destes mediadores na progressão de tumores ainda não é totalmente esclarecido (MANTOVANI et al., 2008).

O câncer representa uma das principais causas de morte no mundo, sendo que, apesar do aprimoramento nos métodos de diagnóstico, muitos tipos de câncer são diagnosticados em fase avançada. Dessa forma, os tratamentos convencionais nestes casos são apenas paliativos. Além disso, os fármacos antitumorais disponíveis apresentam eficácia limitada e vários efeitos adversos. Grande parte dos medicamentos atualmente utilizados no tratamento quimioterápico são oriundos de produtos naturais, assim, esta constitui uma importante fonte de pesquisa para a identificação de novos compostos com atividade citotóxica (NEWMAN; CRAGG, 2016; OTTO; SICINSKI, 2017).

Neste contexto, a espécie *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*, membro da família Leguminosae, em trabalhos anteriormente realizados no Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) demonstrou significativo potencial anti-inflamatório e citotóxico (BALDIM, 2012b; BALDIM, et al., 2015; CARVALHO, 2012; CARVALHO, 2013). Além de apresentar outras propriedades relatadas na literatura (BUENO; MOREIRA; RODRIGUES, 2016; DEHARO et al., 2001; GIACOMINI et al., 2014; KAYANO, 2011; TAKEMURA et al., 2013). Sendo assim, *C. pluviosa* é uma espécie promissora na investigação de novos agentes anti-inflamatórios e citotóxicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão apresentados os principais assuntos tratados neste trabalho.

### 2.1 METABOLÔMICA

As abordagens metabolômicas, por utilizarem técnicas analíticas sensíveis, possibilitam a identificação preliminar e classificação dos metabólitos majoritários e minoritários de uma amostra biológica (NGO et al., 2013).

Dada a grande diversidade de metabólitos que apresentam propriedades químicas bastante distintas (como polaridade, carga, solubilidade e volatilidade), um único método analítico não permite a análise de todos os metabólitos de uma amostra. Assim, faz-se necessário o uso de diferentes ferramentas analíticas a fim de identificar e classificar metabólitos de várias classes, sendo as mais empregadas a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) e a cromatografia líquida (LC) de alta e de ultra-alta eficiência (HPLC e UHPLC, respectivamente) ou em menor extensão, eletroforese capilar, acoplados a espectrômetro de massas (MS) ou ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis) e, ainda, ressonância magnética nuclear (RMN) (ARETZ et al., 2016; GORROCHATEGUI et al., 2016).

A RMN se trata de um método que apresenta alta seletividade, reprodutibilidade analítica, natureza não destrutiva e simplicidade de preparação da amostra e, assim é empregada na elucidação estrutural dos metabólitos. Entretanto, apresenta sensibilidade relativamente baixa em relação à MS. A MS além da alta sensibilidade, permite a análise de uma ampla gama de metabólitos (ARETZ et al., 2016; KELLOGG et al., 2017). Tais técnicas se completam e, quando integradas, fornecem informações importantes para as análises metabolômicas (GORROCHATEGUI et al., 2016).

A combinação de UHPLC acoplada à espectroscopia de massas de alta resolução (HRMS) com ionização por *electrospray* (ESI) é um importante método empregado em estudos metabolômicos de plantas já que abrange vários compostos de polaridade intermediária, incluindo as principais classes de metabólitos secundários presentes nas plantas (DE VOS et al., 2007; FUNARI et al., 2013). O Orbitrap<sup>TM</sup> é um dos analisadores de massas de alta resolução utilizados, que registra a oscilação dos íons, cuja frequência fornece informações sobre a massa molecular do metabólito. Alguns equipamentos de UHPLC-HRMS-ESI-Orbitrap possuem câmara de colisão que permite a fragmentação dos íons, fornecendo informações estruturais adicionais (LIU; LOCASALE, 2017).

O tratamento do conjunto de dados espectroscópicos e/ou cromatográficos gerados nos

estudos metabolômicos representa uma importante etapa destes estudos (YI et al., 2016). Assim, os dados brutos devem ser processados em um formato para que, posteriormente, possam ser facilmente analisados (KATAJAMAA; OREŠIČ, 2007). Os formatos de dados mais conhecidos são formatos baseados em XML (mzXML, mzData e mzML), netCDF e arquivos de texto clássicos (JCAMP-DX ou txt) (GORROCHATEGUI et al., 2016).

Existem vários softwares comerciais e livres destinados ao processamento de dados metabolômicos, tais como OpenMS (<http://open-ms.sourceforge.net/>), MetAlign (<http://www.metalign.nl>) e MZmine (<http://sourceforge.net/projects/mzmine/>) (YI et al., 2016). O procedimento usual de processamento de dados apresenta várias etapas, incluindo filtragem, detecção de picos, deconvolução, alinhamento e normalização. Através do método de filtragem os ruídos dos dados são reduzidos. A etapa de detecção de picos permite detectar todos os sinais correspondentes aos íons, evitando registrar sinais falso positivos. A deconvolução tem por objetivo separar as diferentes substâncias que apresentam o mesmo tempo de retenção ( $t_R$ ). O alinhamento dos picos é realizado afim de corrigir as diferenças de tempo de retenção de um mesmo metabólito em corridas diferentes (KATAJAMAA; OREŠIČ, 2007; YI et al., 2016). Para remover variações nas intensidades dos íons que são provenientes de fontes experimentais é realizada a normalização dos dados, deixando todos em uma mesma escala (GORROCHATEGUI et al., 2016).

A identificação preliminar de moléculas que já possuem sua estrutura conhecida é realizada através do método denominado desrepliação (do inglês, *dereplication*, que significa “não replicar”). Sendo de extrema importância na análise de misturas complexas, pois pode auxiliar em evitar o isolamento de substâncias já conhecidas e guiar o isolamento de substâncias desejadas, tais como as inéditas ou correlacionadas com alguma propriedade investigada (BOUSLIMANI et al.; 2014; WOLFENDER et al., 2010).

Várias ferramentas, como por exemplo o software MZmine e bancos de dados estão disponíveis para realizar a desrepliação de metabólitos a partir de dados espectroscópicos de massas (YI et al., 2016). Através da massa precisa de um metabólito, que é calculada com base em uma  $m/z$ , são geradas várias possíveis fórmulas moleculares, sendo assim, existem critérios baseados em conceitos químicos e informações estruturais para filtrar a fórmula molecular real (WERNER et al., 2008; YI et al., 2016). Por exemplo, a regra do nitrogênio determina que um composto com massa molecular ímpar possuirá um número de nitrogênios ímpar. A ESI produz íons com número par de elétrons, sendo assim, os valores de RDBE (*ring plus double bond equivalents*) para esses casos serão números fracionários, enquanto que, para íons radicalares (um elétron desemparelhado, como os produzidos por ionização por impacto de elétrons) os valores de RDBE serão números inteiros (WERNER et al., 2008).

Para análise dos dados metabolômicos várias ferramentas estatísticas podem ser empregadas. Métodos de regressão multivariada não supervisionados, tais como análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) permitem explorar de modo geral o conjunto de dados, verificando tendências e formando conglomerados de dados ou *clusters* de acordo com as similaridades das amostras. Enquanto que os métodos supervisionados avaliam conjuntos de dados conhecidos, afim de verificar padrões e regras para classificar amostras, determinar biomarcadores e prever informações sobre novos dados. Os métodos supervisionados podem ser classificados como lineares, tais como o método dos mínimos quadrados parciais (PLS), o método dos mínimos quadrados parciais ortogonais (OPSL) e técnicas de aprendizado de máquina (do inglês *machine-learning*) e métodos não lineares, como é o caso das redes neurais artificiais (ANN) e algoritmos genéticos (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; MADSEN; LUNDSTEDT; TRYGG, 2010; MAHADEVAN et al., 2008; TRYGG; HOLMES, 2007; YI et al., 2016).

## 2.2 ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação consiste em um mecanismo de defesa do sistema imunológico em resposta a uma infecção ou lesão tecidual, causada por agentes microbiológicos, substâncias químicas ou traumas físicos (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; CARDINAL et al., 2016). A inflamação está relacionada com diversas doenças, tais como asma, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, osteoporose, doença de Alzheimer, certos tipos de câncer e acidente vascular cerebral, responsáveis por causar um grande número de morbidade e mortalidade (CARDINAL et al., 2016; SLAVICH, 2015).

No processo inflamatório, ocorre a liberação do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poli-insaturado de 20 átomos de carbono, membro da série de ácidos graxos ômega-6, que encontra-se na membrana fosfolipídica das células e é liberado através da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (MEIRER; STEINHILBER; PARENTE, 2001; PROSCHAK, 2014). O AA pode ser metabolizado por três vias, levando a formação de diferentes classes de eicosanoides, ácidos graxos de 20 carbonos das séries ômega-3 e ômega-6 (KOEBERLE; WERZ, 2015) (Figura 1).

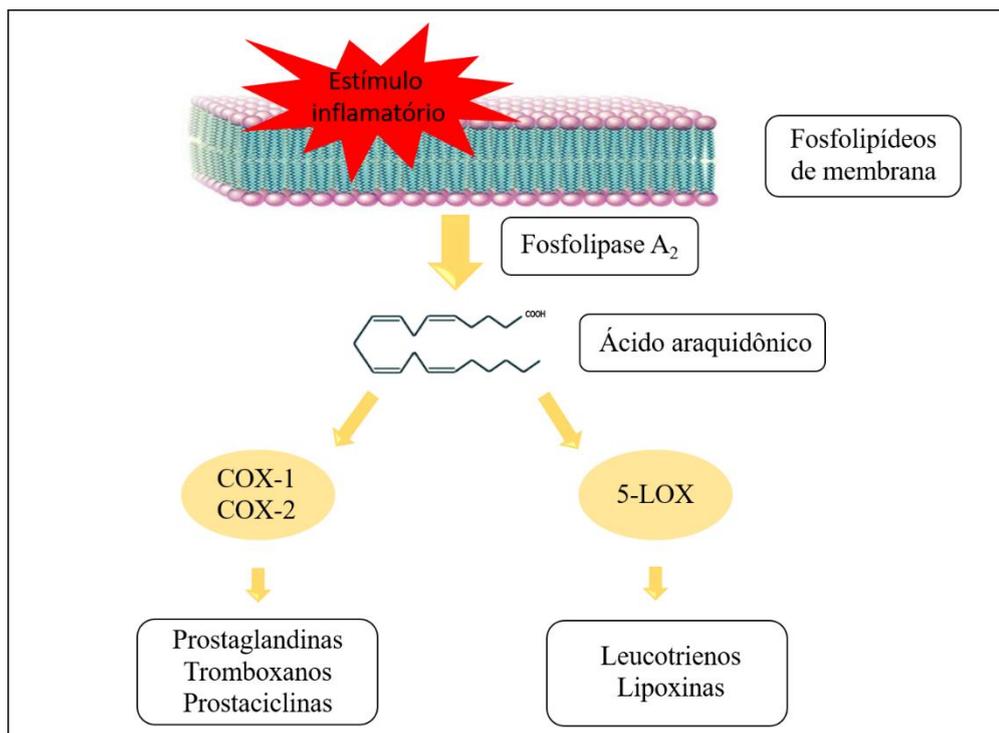


Figura 1 – Principais vias envolvidas na metabolização do ácido araquidônico.  
Fonte: Do autor

A partir do AA e sob catálise da enzima 5-lipoxigenase são biossintetizados os mediadores inflamatórios leucotrienos (LCs), que são produzidos pelos leucócitos, macrófagos e mastócitos, e apresentam um sistema trieno conjugado de ligações duplas, e as lipoxinas (LX) (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

Na via da ciclooxigenase, são biossintetizados os mediadores inflamatórios prostanoides: prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e prostaciclinas (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014). Existem três isoformas de COX, a COX-1, a COX-2 e a COX-3, esta última descoberta recentemente. A COX-1 é uma enzima que pode ser detectada na maioria dos tecidos e está associada à produção de prostaglandina, sendo envolvida com diversos efeitos fisiológicos, como homeostase vascular, agregação plaquetária, proteção gástrica e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Já a COX-2 é uma enzima expressa durante a inflamação e atua na mediação central da dor e da febre (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014; PARENTE, 2001).

Há ainda a via do citocromo P450 (CYP), onde o AA é convertido em ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

Prostaglandinas provocam sinais de inflamação aguda, como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, formação de edema, dor e febre. Entretanto, as prostaglandinas apresentam efeito citoprotetor no trato gastrointestinal e regulam o ciclo sanguíneo renal (PARENTE, 2001).

LCs estão associados às condições relatadas na inflamação crônica, pois são agentes

quimiotáticos que estimulam o recrutamento de leucócitos em locais de inflamação, levando ao dano tecidual. Eles podem provocar ulceração por oclusão de microvasos, redução do fluxo sanguíneo, liberação de mediadores que causam necrose tecidual e promover broncoconstrição e alterações da permeabilidade vascular. Além disso, podem potencializar danos no trato gastrointestinal (PARENTE, 2001).

Os dois principais mediadores responsáveis pela resposta inflamatória são o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Dessa forma, as enzimas 5-LOX e COX são os principais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (KONG; HOOPER; GANEA, 2016; KOROTKOVA; LUNDBERG, 2014; MEIRER; STEINHILBER; MENG; LIU; LAI, 2015; PALLIO et al., 2016; PROSCHAK, 2014).

Para o tratamento de inflamação aguda e crônica, são amplamente utilizados anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) clássicos tais como, aspirina, ibuprofeno e indometacina (Figura 2), que atuam inibindo tanto a COX-1 quanto a COX-2. Porém, devido aos efeitos adversos decorrentes da inibição da COX-1 apresentados por estes fármacos, tais como toxicidade renal e gastrointestinal, foram desenvolvidos inibidores seletivos para COX-2 (PARENTE, 2001). Dentre estes inibidores encontram-se: piroxicam, meloxicam, diclofenaco, naproxeno e nimesulida (inibidores seletivos para COX-2, primeira geração); e celecoxibe, rofecoxib, etoricoxibe, valdecoxibe, parecoxibe e lumiracoxibe (inibidores altamente seletivos para COX-2, segunda geração; Figura 2) (MENG; LIU; LAI, 2015; PALLIO et al., 2016; PARENTE, 2001). Entretanto, verificou-se também importantes efeitos adversos cardiovasculares decorrentes da utilização destes fármacos (PARENTE, 2001).

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou corticoides (Figura 2), tais como a prednisona, dexametasona e betametasona são drogas que mimetizam os efeitos do hormônio cortisol. Eles exibem poderosos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, inibindo as manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação. Isto é, não apenas o rubor, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparo de feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica. Os AIEs atuam reprimindo a atividade dos principais fatores de transcrição inflamatórios, tais como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e a proteína ativadora (AP) - 1. Porém, quando utilizados em tratamentos a longo prazo, apresentam sérios efeitos colaterais, incluindo osteoporose, diabetes, fraturas ósseas, hipertensão, resistência periférica à insulina, hiperglicemia, retardo do crescimento em crianças, diminuição da libido, impotência, irritação gástrica, úlcera péptica, glaucoma, catarata, distúrbios do sono, irritabilidade, depressão, entre outros (NEWTON, 2013; STANBURY; GRAHAM, 1998).

Além desses fármacos, também há disponível um inibidor seletivo de 5-LOX, conhecido como zileuton (nome comercial Zylflo) (Figura 2), utilizado para o tratamento de pacientes com

asma persistente crônica, mas que apresenta restrições devido a sua toxicidade hepática (STEINHILBER; HOFMANN, 2014).

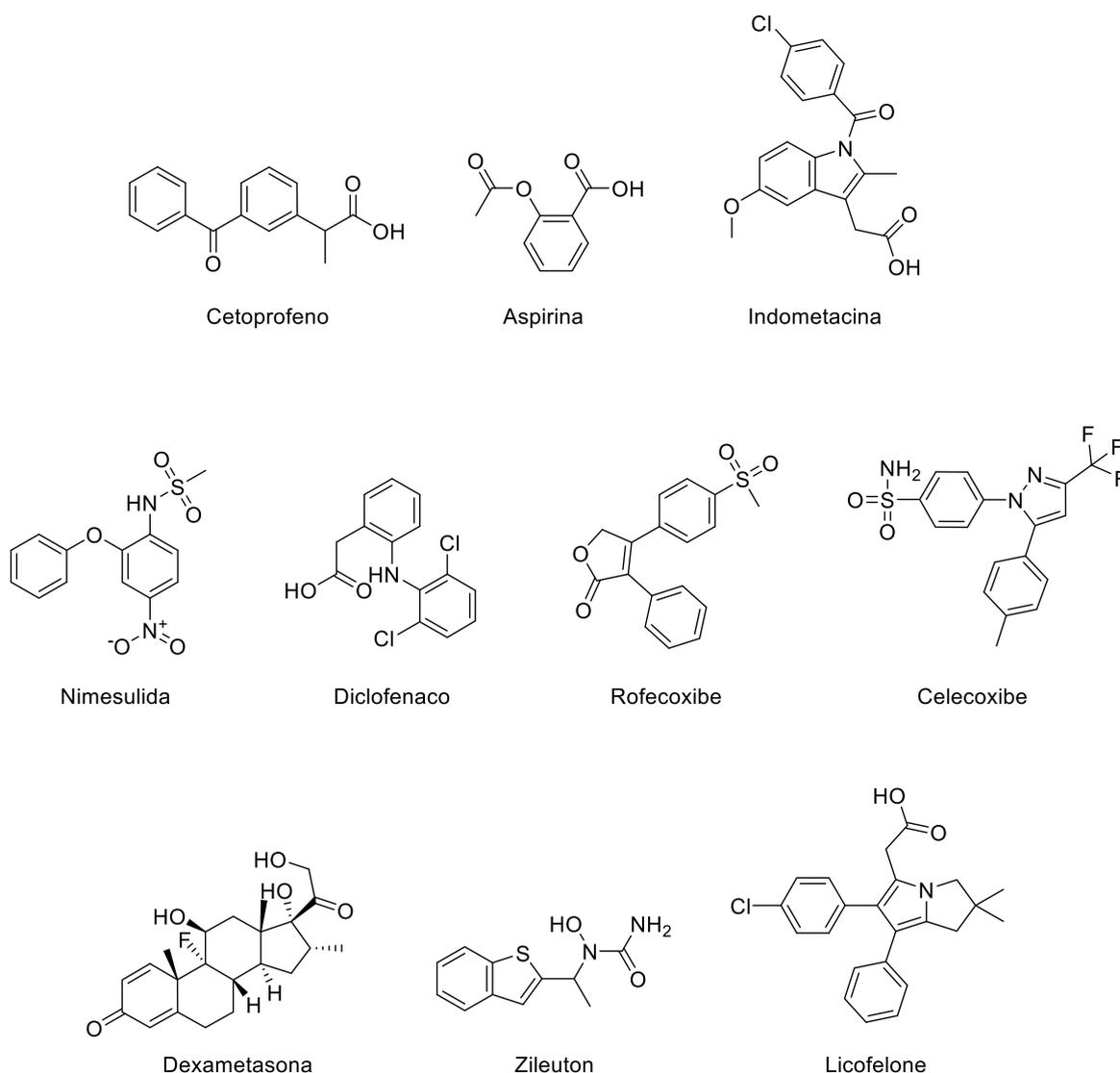


Figura 2 – Exemplos de anti-inflamatórios que atuam por diferentes mecanismos de ação.  
Fonte: Do autor

Já que tratamentos anti-inflamatórios que visam apenas um alvo na cascata do AA são acompanhados de diversos efeitos colaterais, torna-se evidente que, para uma doença de grande complexidade como a inflamação, deve-se buscar abordagens com multialvos (KOEBERLE; WERZ, 2015; MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014). Como agentes que sejam capazes de inibir tanto a COX quanto a 5-LOX, visando uma maior atividade anti-inflamatória e, possivelmente, minimizando os efeitos adversos. Sendo que, ao inibir a produção concomitantemente das prostaglandinas e leucotrienos, esses agentes devem exibir perfil farmacológico semelhante ao dos glicocorticoides, com grande potencial anti-inflamatório mas sem apresentar os efeitos secundários graves normalmente associados ao uso destes, já que os

inibidores duais não afetam o metabolismo intermediário ou funções endócrinas (PARENTE, 2001; KAUR, 2017).

Há algumas famílias estruturais dos inibidores duais das enzimas COX e 5-LOX desenvolvidas, destacando-se o licofelone (também nomeado ML3000) (Figura 2), que apresentou efeitos comparáveis aos AINEs convencionais, mas com um perfil de segurança gastrointestinal melhorado, em ensaios pré-clínicos e clínicos, que encontra-se em fase III para o tratamento da osteoartrite (KAUR, 2017).

A inibição dual da produção de PGs e LCs pode ser avaliada através do ensaio anti-inflamatório *in vivo* de edema de orelha induzido por óleo de cróton. A diminuição da formação do edema nas orelhas dos animais tratados com agentes anti-inflamatórios constata a possível inibição da produção de PGs. Ainda neste ensaio, a inibição da síntese de LCs é avaliada através da dosagem de mieloperoxidase (MPO). Esta enzima é expressa pelos neutrófilos, sendo que a diminuição da quantidade de MPO na orelha indica que poucos neutrófilos foram recrutados por LTB<sub>4</sub>, logo a via da 5-LOX foi inibida. (SOSA et al., 2002; TUBARO et al., 1986a; TUBARO et al., 1986b).

### 2.3 ASPECTOS DO CÂNCER

Define-se como neoplasia um tecido cujas células apresentam capacidade de se proliferar descontroladamente, além de seus limites normais (EVAN; VOUSDEN, 2001). Neoplasias que permanecem localizadas em um tecido são consideradas benignas, enquanto que, aquelas que tem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes são denominadas como neoplasia maligna ou câncer. Células cancerígenas apresentam desregulação do ciclo celular, que é controlado por numerosos mecanismos afim de assegurar a correta divisão celular (OTTO; SICINSKI, 2017; SHERR; BARTEK, 2017; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O ciclo celular consiste nos processos de mitose (M) e interfase (I), que são regulados por várias proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdks). A mitose é o processo no qual ocorre a divisão nuclear e inclui as fases prófase, metáfase, anáfase e telófase. A interfase inclui a fase G<sub>1</sub>, onde a célula se prepara para a síntese do DNA, seguida da fase S, em que ocorre a replicação do DNA e a fase G<sub>2</sub>, que antecede a mitose. Há ainda a fase G<sub>0</sub>, onde as células encontram-se em um estado de repouso. Entretanto, a célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G<sub>0</sub>), assim, esta passa diretamente da fase M para nova fase G (Figura 3) (SHERR; BARTEK, 2017; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

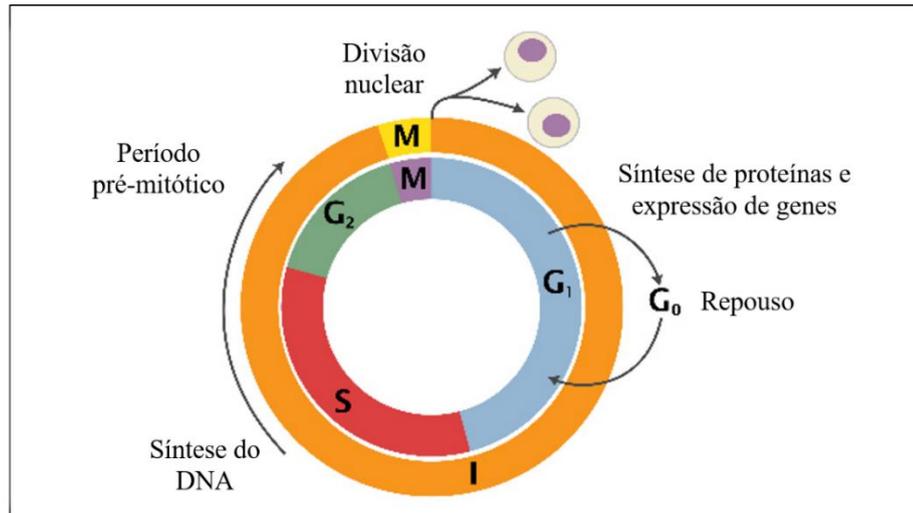


Figura 3 – Esquema representativo do ciclo celular.  
Fonte: Do autor

Células cancerígenas apresentam desregulação do ciclo celular devido a mutações de proteínas e alterações nos seus mecanismos de controle, relacionadas principalmente com os proto-oncogenes e com os genes supressores de tumores. Sendo que, os proto-oncogenes mutados ou oncogenes podem induzir o crescimento tumoral, enquanto que, a inativação de genes supressores de tumores resulta em disfunção das proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular. As Cdk's são enzimas que estimulam a progressão do ciclo e, são ativadas quando complexadas às ciclinas. Diferentes complexos Cdk-ciclinas se formam ao longo do ciclo celular sendo responsáveis pela progressão do ciclo (SHERR; BARTEK, 2017; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

A conexão entre câncer e inflamação pode ser verificada pelo fato de que as condições inflamatórias aumentam o risco de câncer, como por exemplo, indivíduos que apresentam doenças inflamatórias intestinais, tais como, colite ulcerativa crônica e doença de Crohn, apresentam uma maior predisposição em desenvolver câncer de cólon. Além disso, há alterações genéticas, tais como oncogenes, que podem promover o desenvolvimento de ambas doenças (COUSSENS; WERB, 2002; LU; OUYANG; HUANG, 2006; MANTOVANI et al., 2008).

O recrutamento de leucócitos em locais de inflamação leva a uma liberação de radicais livres que podem promover dano celular e genômico, e a liberação de eicosanoides desencadeia a proliferação celular. Assim, a combinação desses processos facilita o processo carcinogênico, inclusive constata-se que células cancerosas apresentam altas concentrações de COX-2, (CHA; DUBOIS, 2007; ULRICH; BIGLER; POTTER, 2006).

Neste contexto, AINEs se mostraram promissores agentes quimiopreventivos, sendo que, estudos epidemiológicos e ensaios clínicos verificaram que o uso a longo prazo destes fármacos pode diminuir a incidência de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de cólon, estômago,

mama e pulmão. Dessa forma, conhecendo-se os efeitos adversos provenientes do uso de AINEs a longo prazo, reforça-se ainda mais a necessidade pela busca de novos agentes que apresentam menor toxicidade (ULRICH; BIGLER; POTTER, 2006; WANG; DUBOIS, 2006).

## 2.4 FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Fabaceae, em 1981 classificada em Leguminosae (ANGIOSPERM GROUP, 2003) inclui grandes árvores, arbustos e plantas herbáceas e é a terceira mais numerosa entre as famílias de plantas superiores, atrás apenas da Orchidaceae e Asteraceae, compreendendo 730 gêneros que reúnem mais de 19400 espécies, encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América e África (RAHMAN; PARVIN, 2014).

Plantas desta família são largamente empregadas na medicina tradicional por apresentarem diversas propriedades, tais como, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimalárica e diurética. O uso medicinal das plantas desta família pela população tem revelado excelentes resultados e aos poucos, estudos científicos vêm comprovando a eficácia em vários modelos experimentais, justificando o uso na medicina popular (AHMAD; ANWAR; HIRA, 2016).

Esta família compreende três importantes subfamílias, Caesalpinioideae, Papilionoideae (Faboideae) e Mimosoideae, diferenciadas segundo sua estrutura floral (AHMAD; ANWAR; HIRA, 2016).

## 2.5 GÊNERO *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia* pertencente à subfamília de plantas Caesalpinioideae ou Caesalpinaceae, apresenta mais de 500 espécies, sendo principalmente espécies lenhosas, comumente encontradas em zonas tropicais e subtropicais (BALDIM et al., 2012b; GIACOMINI et al., 2014; NAWWAR et al., 2015).

Vários estudos verificaram que espécies deste gênero exibem as atividades analgésica, adaptogênica, antiúlcera, antihelmíntica, antibacteriana, inseticida, antifúngica, anti-inflamatória, antipirética, antioxidante, antiproliferativa, antiviral, imunomoduladora e imunossupressora. Dentre os metabólitos presentes nestas espécies, responsáveis por tais propriedades, predominam-se os derivados fenólicos, esteroides, triterpenoides e diterpenos (BALDIM et al., 2012b; HEMALATHA et al., 2007; WEI et al., 2016).

## 2.6 ESPÉCIE *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*

*Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) GP Lewis (Figura 4), retratada também

sob suas sinônimas *Poincianella* DC. *pluviosa*, *Caesalpinia peltophoroides* (Benth.) e *Caesalpinia pluviosa* DC., é uma espécie nativa do Brasil, encontrada principalmente na região da Mata Atlântica e do Pantanal (Giacomini et al., 2014), e popularmente conhecida como mucitaiba-verdadeira na Bahia, coração-de-negro, falso-pau-brasil e sibipiruna em Minas Gerais, coração-de-negro na Paraíba, maria-preta em Pernambuco e pau-brasil-do-amarelo em São Paulo (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Florestas).



Figura 4 - *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) GP Lewis.  
Fonte: Jardineiro.net

A *C. pluviosa* é uma árvore de clima tropical, de crescimento rápido, com folhas pequenas e caducas. A floração ocorre entre setembro a novembro e produz flores amarelas organizadas em cachos. A frutificação dá origem a vagens entre julho e agosto e os frutos têm uma cor verde claro fosforescente, e podem ficar vários meses à espera de dispersores naturais, geralmente pássaros (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Florestas).

A espécie, além de amplamente utilizada para a arborização no Brasil, é utilizada na medicina tradicional para cicatrização de feridas e, na Bolívia, para o tratamento de disenteria (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* com o extrato hidroalcolico das cascas do caule de *C. pluviosa* sugerem sua atividade cicatrizante (BUENO; MOREIRA; RODRIGUES, 2016; GIACOMINI et al., 2014). Ainda foi relatada a atividade antimalárica dos seus extratos metanólico e etanólico (DEHARO et al., 2001; KAYANO, 2011). Foram verificados também resultados promissores com o extrato metanólico de *C. pluviosa* como possível agente herbicida (TAKEMURA et al., 2013).

Quanto à composição fitoquímica da espécie, é relatada a presença de metabólitos de diversas classes, tais como, esteróis, taninos, flavonoides e saponinas. Nas flores de *C. pluviosa* foram identificados as substâncias brevifoincarboxilato, 5-hidroximetilfurfural, luteolina, ácido gálico, sitosterol, sitosterol glucosilado e esqualeno e, em seu óleo essencial, encontram-se alcanos de cadeia longa (GIACOMINI et al., 2014).

Galato de etila, ruschalcona VI, lupeol, ácido betulínico e estigmasterol, foram isolados a partir da casca do caule de *C. pluviosa* e submetidos à avaliação frente a bactéria *Staphylococcus*

*aureus* e ao teste *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*. Verificou-se o potencial bactericida e antimalárico do extrato diclorometano e da substância ruschalcona VI (Figura 5) (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006; OGUNGBE; ERWIN; SETZER, 2014). Além da atividade antimalárica, a ruschalcona VI apresenta atividade antiproliferativa moderada contra células de câncer colorretal (MDEE; YEBOAH; ABEGAZ, 2003; MIHIGO et al., 2010).

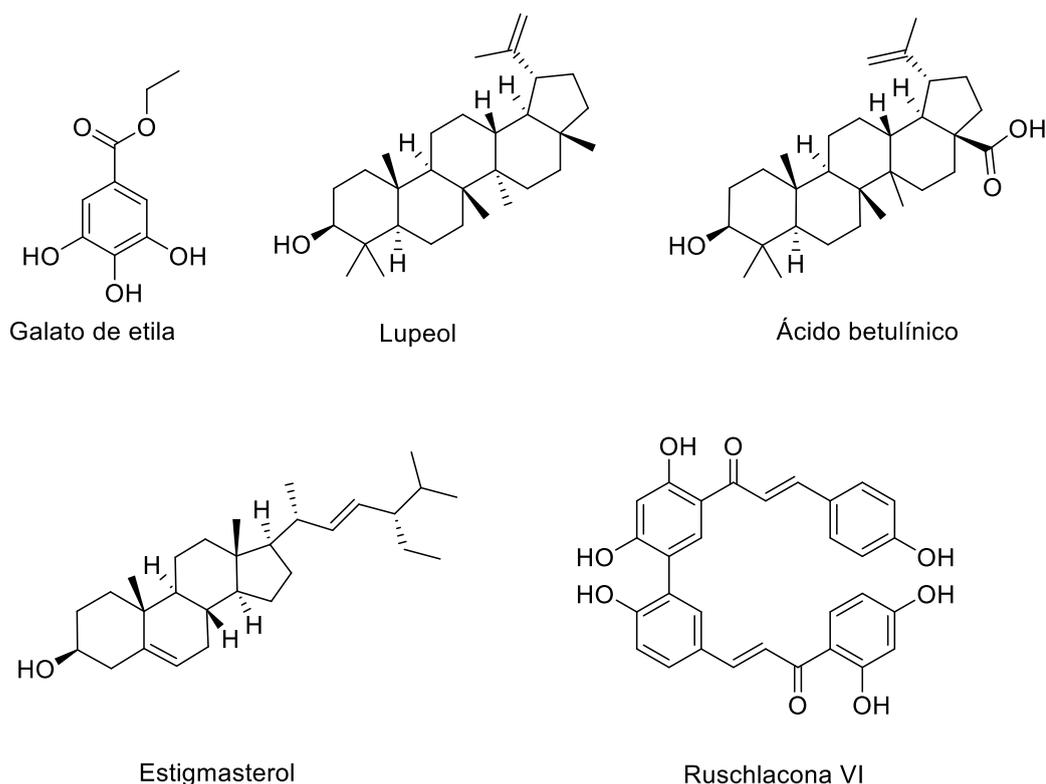


Figura 5 – Compostos isolados a partir da casca do caule de *C. pluviosa*.  
Fonte: Do autor

A espécie *C. pluviosa* tem sido continuamente estudada no LFQM, UNIFAL-MG, quanto ao seu potencial citotóxico e anti-inflamatório (BALDIM, 2012b; CARVALHO, 2012; MASSONI, 2014; MASSONI, 2017). Verificou-se significativa atividade anti-inflamatória dos extratos brutos das folhas, casca do caule, flores e frutos, avaliados no ensaio anti-inflamatório de edema de pata induzido por carragenina (BALDIM, 2012a; CARVALHO, 2012). Dados obtidos no referido laboratório mostraram que o óleo essencial extraído das flores de *C. pluviosa* apresenta potencial citotóxico, sendo que os valores de IC<sub>50</sub> encontrados foram inferiores ao do controle positivo, cisplatina (CARVALHO, 2013). Foi também verificada a redução da viabilidade de células tumorais quando expostas ao extrato da casca do caule da espécie e estudos subsequentes permitiram o isolamento do biflavonoide caesalpinioflavona (Figura 6), um dos responsáveis pelo efeito citotóxico previamente observado (BALDIM, et al., 2015).

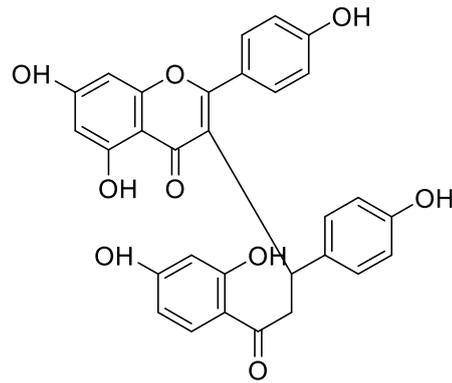


Figura 6 – Biflavonoide caesalpinioflavona.  
Fonte: Do autor

Dessa forma, pretende-se investigar as propriedades anti-inflamatórias e citotóxica de *C. pluviosa* em associação com estudos metabolômicos para determinar quais são as substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Dentro do contexto de destaque dos produtos naturais como fonte de descoberta de novos fármacos e considerando que muitos dos medicamentos de aplicação convencional na terapêutica apresentam diversos efeitos colaterais e eficácia limitada, a avaliação da atividade anti-inflamatória e citotóxica de bioativos de origens vegetal, faz-se de extrema importância.

Extratos e substâncias de *C. pluviosa* já demonstraram atividade anti-inflamatória e citotóxica (BALDIM, 2012b; BALDIM et al. 2015). No entanto, somente uma substância inédita teve a sua atividade citotóxica (BALDIM et al. 2015) avaliada. Logo o estudo metabolômico e a avaliação destes extratos podem revelar outros princípios ativos.

Assim, propõe-se neste trabalho a avaliação do perfil metabólico da espécie promissora *C. pluviosa* através de estudos metabolômicos e a avaliação das atividades anti-inflamatória e citotóxica das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica de diferentes partes de *C. pluviosa* e das substâncias isoladas. Além disso, um mecanismo de ação que iniba o edema e recrutamento celular concomitantemente é avaliado pela primeira vez, uma vez que se acredita que este mecanismo pode ser mais eficaz e ocasionar efeitos adversos menores.

## 4 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos a serem alcançados ao longo do trabalho.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química de *C. pluviosa* através de estudos metabolômicos; realizar a avaliação das atividades anti-inflamatória e citotóxica das frações de diferentes partes de *C. pluviosa* e realizar o isolamento dos possíveis princípios ativos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica das flores, folhas e cascas do caule de *C. pluviosa*;
- b) Realizar ensaios anti-inflamatório e citotóxico com as frações previamente obtidas;
- c) Realizar análises metabolômicas para verificar os biomarcadores correlacionados com as atividades biológicas observadas;
- d) Desrepliar os biomarcadores e substâncias possivelmente inéditas;
- e) Obter extrato acetato de etila/hexânico das cascas do caule de *C. pluviosa*;
- f) Isolar biomarcadores e substâncias possivelmente inéditas a partir do extrato acetato de etila/hexânico das cascas do caule de *C. pluviosa*;
- g) Submeter as substâncias isoladas aos ensaios biológicos.

## 5 METODOLOGIA

As frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica das flores, folhas e cascas do caule de *C. pluviosa* (Tabela 1) que foram submetidas às avaliações anti-inflamatória e citotóxica e aos estudos metabolômicos foram obtidos conforme previamente descrito por BALDIM, 2012a.

Tabela 1 - Codificação adotada para as frações de *C. pluviosa*.

Material vegetal	Frações	Código
	Hexânica	CaHe
Caule	Acetato de etila	CaAc
	Hidroetanólica	CaE
	Hexânica	FoHe
Folhas	Acetato de etila	FoAc
	Hidroetanólica	FoE
	Hexânica	FIHe
Flores	Acetato de etila	FIAc
	Hidroetanólica	FIE

Fonte: Do autor

### 5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Nesta seção serão expostos os ensaios anti-inflamatórios realizados com os extratos e substâncias isoladas.

#### 5.1.1 Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL -MG e mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $20 \pm 2$  °C) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos (25-35 g) aclimatados às condições do laboratório, sendo agrupados em grupos de 8 animais.

Os ensaios foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG (protocolo de aprovação número 02/2017), que seguiu as regras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais ficaram alojados antes do experimento no Laboratório de Parasitologia e Patologia, para ambientação, onde também foi realizado o experimento, sob autorização do Prof. Dr. Ivo Caldas.

### 5.1.2 Edema de orelha

O ensaio anti-inflamatório *in vivo* de edema de orelha foi realizado conforme a metodologia revisada por Tubaro et al. (1986) e referências mais recentes (BALDIMI et al., 1992; CHAGAS-PAULA et al., 2011; FACHINI-QUEIROZ et al., 2012). A inflamação cutânea foi induzida na orelha esquerda dos camundongos (n=8) pela aplicação tópica de 20 µL da solução irritante de óleo de cróton (5% v/v) dissolvido em acetona. Na orelha direita foi aplicada somente acetona. Trinta minutos após a aplicação do óleo de cróton, foi realizado tratamento tópico com as frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica das flores, folhas e cascas do caule de *C. pluviosa* e com a substância isolada na dose de 0,5 mg/orelha, sendo que todas as amostras foram dissolvidas em solução de 20% de acetona em glicerina. Os animais do grupo controle negativo receberam apenas a solução irritante, enquanto os do grupo controle positivo foram tratados topicamente com fármacos de referência indometacina e dexametasona também nas doses de 0,5 mg/orelha, para controle de inibição do edema e do recrutamento celular respectivamente (BALDIMI et al., 1992; FACHINI-QUEIROZ et al., 2012; SARAIVA et al., 2011) 30 min após indução da inflamação. Os animais foram sacrificados por inalação de isoflurano, 6 horas após a indução da inflamação para a excisão de um fragmento de orelha de 6 mm de diâmetro de ambas orelhas, utilizando um punch. A quantificação do edema foi determinada por meio da diferença de peso entre os fragmentos das orelhas esquerdas e das respectivas orelhas direitas. Os dados foram analisados por ANOVA one-way seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média ± erro médio padrão (EMP). O programa utilizado para análise estatística dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0.

As percentagens de inibição do edema foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição de edema} = \frac{\text{Valor médio do grupo veículo} - \text{valor médio do grupo tratado}}{\text{Valor médio do grupo veículo}} * 100$$

### 5.1.3 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

Os fragmentos de orelha obtidos no ensaio de edema de orelha foram mantidos em 200 µL de tampão NaEDTA/NaCl pH 4,7 a -20 °C até serem analisados, sendo que sua manipulação sempre foi realizada sob gelo.

Ao início da análise, os fragmentos de orelha em solução de tampão foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foi adicionado mais 600 µL tampão NaEDTA/NaCl pH 4,7. Estes

foram então homogeneizados utilizando o macerador de tecidos Turrax (13000 rpm; 3 vezes) e, posteriormente, centrifugados a 3000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi reservado e os precipitados foram ressuspensos em 600 µL de tampão pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio e homogeneizados novamente utilizando o macerador de tecidos Turrax 13000 rpm (3 vezes). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes utilizados para avaliar a inibição da enzima MPO.

A quantificação da MPO é realizada através de um ensaio colorimétrico utilizando os reagentes 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Onde a enzima MPO é responsável por catalisar a oxidação da TMB (incolor) pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina (coloração azul). A reação é então interrompida pela adição de ácido sulfúrico, fazendo com que a solução adquira coloração amarela (Figura 7).

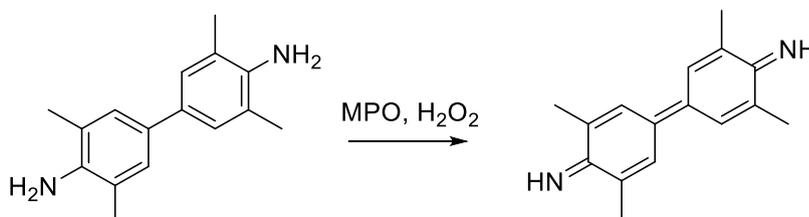


Figura 7 – Oxidação da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-diimina.

Fonte: Do autor

Inicialmente foram adicionados 50 µL de cada amostra de sobrenadante por poço na placa de 96 poços, em triplicatas, sendo quem que em cada placa havia uma replicata de cada controle (positivo e negativo). Todas as amostras foram manuseadas sob baixas temperaturas e ausência de luz. Após plaqueadas todas as amostras, as placas foram mantidas tampadas e dentro da geladeira. Foi preparada uma solução com os reagentes A e B (TMB 1,6 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM) do kit BD OptEIA™ na proporção de 1:1, sendo utilizados um total de 6 mL de solução por placa, 15 min antes da análise. Depois foram adicionados 50 µL da solução preparada em cada poço e ao fim de 10 min, adicionou-se 50 µL/poço da solução aquosa de ácido sulfúrico para interromper a reação enzimática que ocorre. Após mais 10 min foi feita a leitura de absorbância em 450 nm. Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média ± erro médio padrão (EMP). O programa utilizado para análise estatística dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados pelo doutorando Renato de Oliveira Horvath no Laboratório de Biologia Animal Integrativa, LABAINT, UNIFAL-MG, sob supervisão da professora Dra. Marisa Ionta.

### 5.2.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Os testes foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos: HT144 (melanoma), MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e A549 (carcinoma de pulmão). As células foram cultivadas em Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil). Estas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>) e subculturas foram obtidas por digestão enzimática (tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02%). Estoques foram congelados na presença de 10% de DMSO e mantidos em biofreezer (-80 °C).

### 5.2.2 Ensaio de viabilidade celular

As células foram semeadas em placas de 96 poços, cujo inóculo inicial foi de 1x10<sup>4</sup> células/poço. Após aderência, as células foram tratadas com as frações nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL. As frações foram diluídas em DMSO. O fármaco referência utilizado como controle positivo foi a cisplatina na concentração de 6 µg/mL. A partir das soluções-estoque, novas diluições foram realizadas em meio de cultura, imediatamente antes do uso, para obtenção das concentrações de uso. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,1% (v/v).

A viabilidade celular foi avaliada através de ensaio colorimétrico utilizando resazurina. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (coloração azul) é reduzida a resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona) (coloração rosa) por atividade enzimática mitocondrial das células viáveis e metabolicamente ativas (Figura 8).

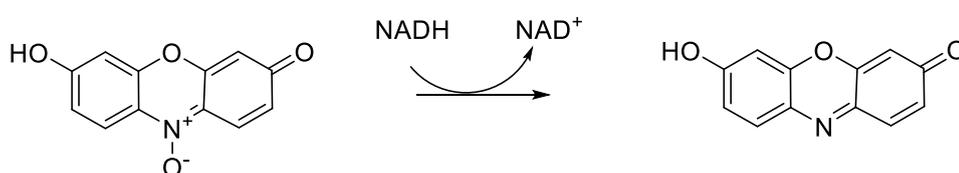


Figura 8 – Redução da resazurina em resorufina.  
Fonte: Do autor

Após 48 h de tratamento das linhagens com as frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica das flores, folhas e cascas do caule de *C. pluviosa*, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo 10% da solução de resazurina e após 4 h a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 540 nm. Os valores de absorbância obtidos foram subtraídos da média de absorbância do branco. A absorbância aferida é diretamente proporcional ao número de células vivas e, portanto, a viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre culturas não tratadas e tratadas. Os experimentos foram conduzidos em quadruplicatas e os resultados obtidos na 1ª série experimental foram confirmados com mais uma série subsequente. Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey e expressos como média ± erro médio padrão (EMP). O programa utilizado para análise estatística dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0.

### 5.3 METABOLÔMICA

O método cromatográfico empregado nos estudos metabolômicos foi desenvolvido conforme CHAGAS-PAULA, 2013. Todas as frações foram avaliadas em UPLC-UV-HRFTMS (Thermo Scientific Exactive™ equipado com tecnologia Orbitrap™, Thermo Scientific®). Utilizou-se o seguinte método cromatográfico: coluna cromatográfica de diâmetro de partícula - 3 µm (C18 - 150 x 3 mm; ACE®), um fluxo de 0,3 mL/min de um gradiente MeCN/água; 0,1% ácido fórmico na água, 5% de MeCN em 5 min, 5% - 100% de MeCN em 50 min; a temperatura da coluna foi controlada em 30 °C.

O espectrômetro foi operado utilizando os seguintes parâmetros: modo positivo e negativo concomitante; faixa de varredura de 75 - 1200 *m/z*; alta resolução: 50000; microvarredura: 1; *lock mass* (íon de *m/z* conhecida presente nas amostras, que permite a correção, em tempo real, de desvios de leitura de *m/z*; 83,0604 *m/z* do dímero de MeCN + H) no modo positivo; máximo tempo de injeção: 250 ms. Os parâmetros da fonte de ionização por ESI foram: taxa do fluxo de gás: 50; taxa do fluxo de gás auxiliar: 17; voltagem no spray: + e - 4,5 kV; corrente no spray: 1,4 MA; temperatura capilar: 320 °C; voltagem no capilar: + e - 30 V; voltagem na lente: + e - 90 V; voltagem no cone (*skimmer*): + e - 20 V.

Antes da sequência de análises, uma calibração do aparelho foi realizada para cada polaridade, utilizando contaminantes de baixa massa molecular e a solução Thermo calmix (Sigma-Aldrich®). Os dados foram gravados usando o software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific®). As amostras foram analisadas randomicamente, sendo que uma amostra e um branco foram analisados no início, meio e fim da sequência de análises cromatográficas.

Com o emprego do software MZmine 2.10 (MZmine Development Team) os

cromatogramas das diferentes frações foram deconvoluídos, tiveram os seus isótopos eliminados, picos idênticos nas diferentes análises foram alinhados e os espaços vazios preenchidos.

A partir dos resultados da avaliação das atividades anti-inflamatória e citotóxica e dos dados cromatográficos de cada fração (previamente tratados no MZmine e exportados deste software em formato .csv) foram realizadas as análises de correlação *in silico*. Estas análises foram feitas empregando-se análises estatísticas multivariadas supervisionadas realizadas no software SIMCA-P 13.0.2.0<sup>©</sup> (Unmetrics), a fim de determinar os biomarcadores das atividades avaliadas.

No SIMCA-P foram realizados o PLS e o OPLS. A PCA é útil no escopo deste trabalho apenas para verificar as características metabolômicas das frações, independentemente das suas propriedades anti-inflamatórias e citotóxicas, e detecção de *outliers* ou tendências. Todos os parâmetros utilizados no software SIMCA-P para as análises estatísticas PCA, PLS e OPLS foram os padrões do próprio software. Os dados foram avaliados sem normalização e com as normalizações disponíveis, sendo empregada a normalização ParN, que gerou o melhor modelo estatístico. Posteriormente foram feitas as análises visando a obtenção da variável importante para a projeção (VIP) e a visão geral dos coeficientes, com a finalidade de se verificar os biomarcadores das atividades biológicas avaliadas.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com os dados cromatográficos com detecção de massas nos modos positivo e negativo separadamente.

Realizou-se posteriormente, a desrepliação das VIPs obtidas a partir dos modelos construídos para as atividades biológicas avaliadas, utilizando-se o abrangente banco de dados de massa de alta resolução Dictionary of Natural Products<sup>©</sup> (DNP). A fim de que a desrepliação fosse ainda mais confiável, a confrontação com dados da literatura foi realizada pela construção de um banco de dados *in house* a partir da composição química já descrita na literatura de espécies do gênero *Caesalpinia*. Esse banco de dados foi construído baixando-se as informações de massa monoisotópica através do SciFinder Scholar<sup>®</sup>.

#### 5.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

Para a realização do estudo fitoquímico, inicialmente foi escolhido como material de partida, as cascas do caule de *C. pluviosa*, que já haviam demonstrado atividade anti-inflamatória em trabalhos anteriores (BALDIM, 2012a) e do qual foi isolado um novo biflavonoide com atividade citotóxica, caesalpinioflavona (BALDIM et al., 2015). Além disso, verificou-se a presença de importantes biomarcadores das atividades biológicas avaliadas nas frações desta parte da planta, inclusive estes biomarcadores se encontravam de forma majoritária nestas frações e

apresentavam polaridade intermediária, sendo que tais características poderiam ainda otimizar o processo de isolamento. Dessa forma, o procedimento cromatográfico foi direcionado a fim de propiciar o isolamento destas substâncias de interesse farmacológico.

As cascas do caule foram coletadas em março de 2016 no campus da UNIFAL-MG, na cidade de Alfenas-MG. As coordenadas geográficas do campus são: latitude: 21° 25' 45'' sul e longitude: 45° 56' 50'' oeste. A identificação botânica de *C. pluviosa* foi realizada na Universidade Federal de Alfenas pelo Professor Dr. Marcelo Polo (Instituto de Ciências da Natureza). E a espécie foi catalogada numa exsicata sob o número UALF-1634 e depositada no herbário da universidade.

Após a coleta, o material vegetal foi submetido ao processo de secagem em estufa com circulação de ar por 72 horas em temperatura padrão de 45 °C e posteriormente triturado em moinho de facas tipo cróton TE-625. Depois, realizou-se a maceração exaustiva por quatro dias consecutivos do material vegetal seco e triturado (3 kg) em mariote, utilizando uma mistura dos solventes acetato de etila e hexano na proporção de 1:1 (5 L). O extrato acetato de etila/hexânico das cascas do caule de *C. pluviosa* (CaAcHe) obtido foi então concentrado em rota-evaporador com pressão reduzida e temperatura de 40 °C e depois acondicionado ao freezer a -20 °C, até que fosse submetido às etapas posteriores.

Uma alíquota do extrato CaAcHe (10 g) foi submetida ao processo de fracionamento empregando-se a técnica de cromatografia em coluna (CC), onde utilizou-se uma coluna com diâmetro interno de 5,5 cm empacotada com 271,5 g de sílica gel 60 - 70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 mm) e os seguintes eluentes: hexano 100%, hexano/acetato de etila 1:1, acetato de etila 100%, acetato de etila/etanol 1:1 e etanol 100%. Foram coletadas 23 frações com um volume de 250 mL, que foram concentradas em rota-evaporador e agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico. Sendo que, nos processos de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se placas com base de alumínio sílica gel 60 (Macherey-Nagel;  $\lambda = 254$  nm) e luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  ou 365 nm) como revelador.

Posteriormente, a partir de 3 g da fração ECa2, reunião das frações 7-9 obtidas da coluna anterior, foi realizado um novo fracionamento utilizando-se uma coluna com diâmetro interno de 2,5 cm empacotada com Sephadex LH20 Sigma-Aldrich e metanol como eluente. Foram coletadas 73 frações com um volume de 12 mL, que também foram agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico.

A fração ECa2.7, reunião das frações 50-73 obtidas da coluna Sephadex anteriormente realizada, quando submetida à técnica de CCD, demonstrou se tratar de uma substância aparentemente pura.

Realizou-se ainda outro fracionamento a partir de 2,5 g da fração ECa3, reunião das

frações 10-13 obtidas também a partir da coluna realizada com o extrato CaAcHe, utilizando-se uma coluna com diâmetro interno de 2,5 cm empacotada com 61,5 g de sílica gel 60 - 70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 mm) e os seguintes eluentes: hexano/acetato de etila 1:1, hexano/acetato de etila 6:4, acetato de etila 100% e etanol 100%. Foram coletadas 53 frações com um volume de 50 mL, que também foram concentradas em rota-evaporador e agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico.

A fração ECa3.4, reunião das frações 19-21 obtidas desta coluna, foi então submetida a análise por HPLC, sendo utilizado o equipamento modulado da Shimadzu Prominence de duas bombas de fase móvel LC-20AD e desgaseificador DGU-20A 3R, auto-injetor SIL-20A HT, forno para coluna CTO-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A, DAD) e comunicador CBM-20. Todos os solventes utilizados foram grau HPLC e água Milli-Q.

Para obtenção do perfil cromatográfico desta fração, 1 mg da amostra foi diluída em 1 mL de acetonitrila e posteriormente filtrada em microfiltro com membrana de poros de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro. Utilizou-se coluna analítica de fase reversa (C18) Shim-pack CLC-ODS(M) 5 µm 4,6 mm x 250 mm. Como fase móvel empregou-se um gradiente de 5 a 100 % de MeCN:H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido acético por 30 min com fluxo de 1 mL/min. Após verificado o perfil cromatográfico da fração (Figura 9), definiu-se o método de separação isocrático.

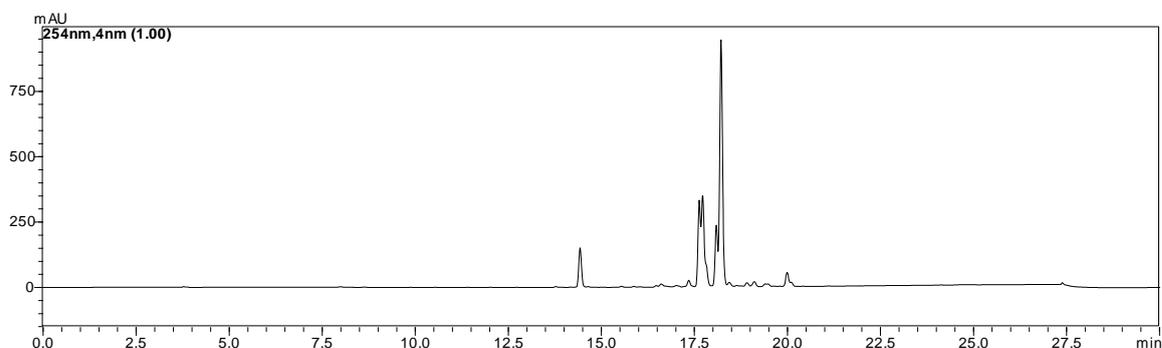


Figura 9 – Cromatograma da fração ECa3.4 obtido por HPLC-UV-DAD (coluna C18 - 5 µm 4,6 mm x 250 mm, fluxo de 1 mL/min, eluente: gradiente de 5 a 100 % de MeCN:H<sub>2</sub>O com 0,1 % de ácido acético por 30 min).

Fonte: Do autor

A separação foi realizada utilizando-se coluna semi-preparativa de fase reversa (C18) Inertsil ODS-4 5 µm 7,6 mm x 250 mm. Utilizou-se 100 mg da amostra, que foi preparada de modo semelhante ao descrito anteriormente. Como fase móvel utilizou-se 50% de MeCN:H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido acético por 30 min, com fluxo de 1,5 mL/min.

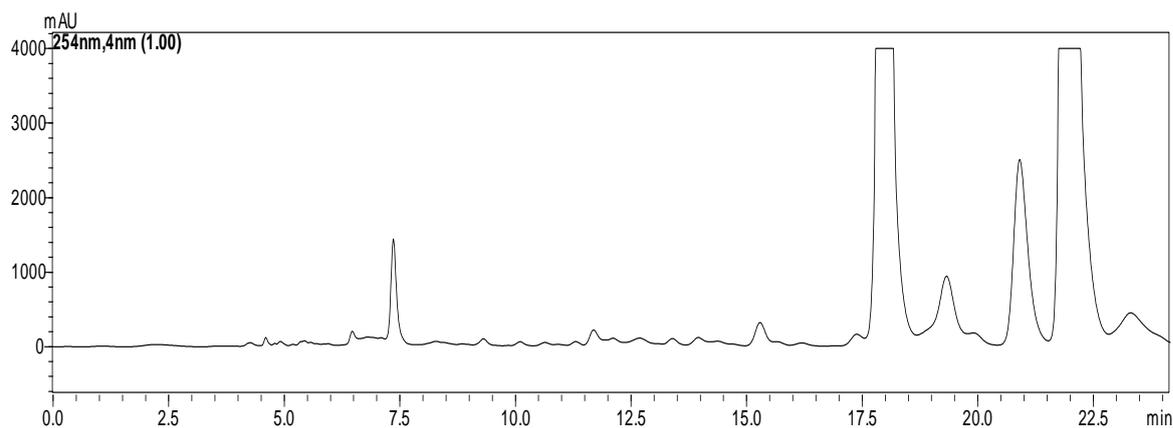


Figura 10 – Cromatograma da fração ECa3.4 obtido por HPLC-UV-DAD (coluna C18 - 5  $\mu$ m 7,6 mm x 250 mm, fluxo de 1,5 mL/min, eluente: 50% de MeCN:H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido acético por 30 min).

Fonte: Do autor

Todas as frações obtidas (Figura 10) foram coletadas de acordo com seu tempo de retenção para que pudessem ser submetidas às técnicas espectrométricas de identificação.

Na Figura 11 pode-se verificar um fluxograma do processo cromatográfico que levou à obtenção das substâncias isoladas.

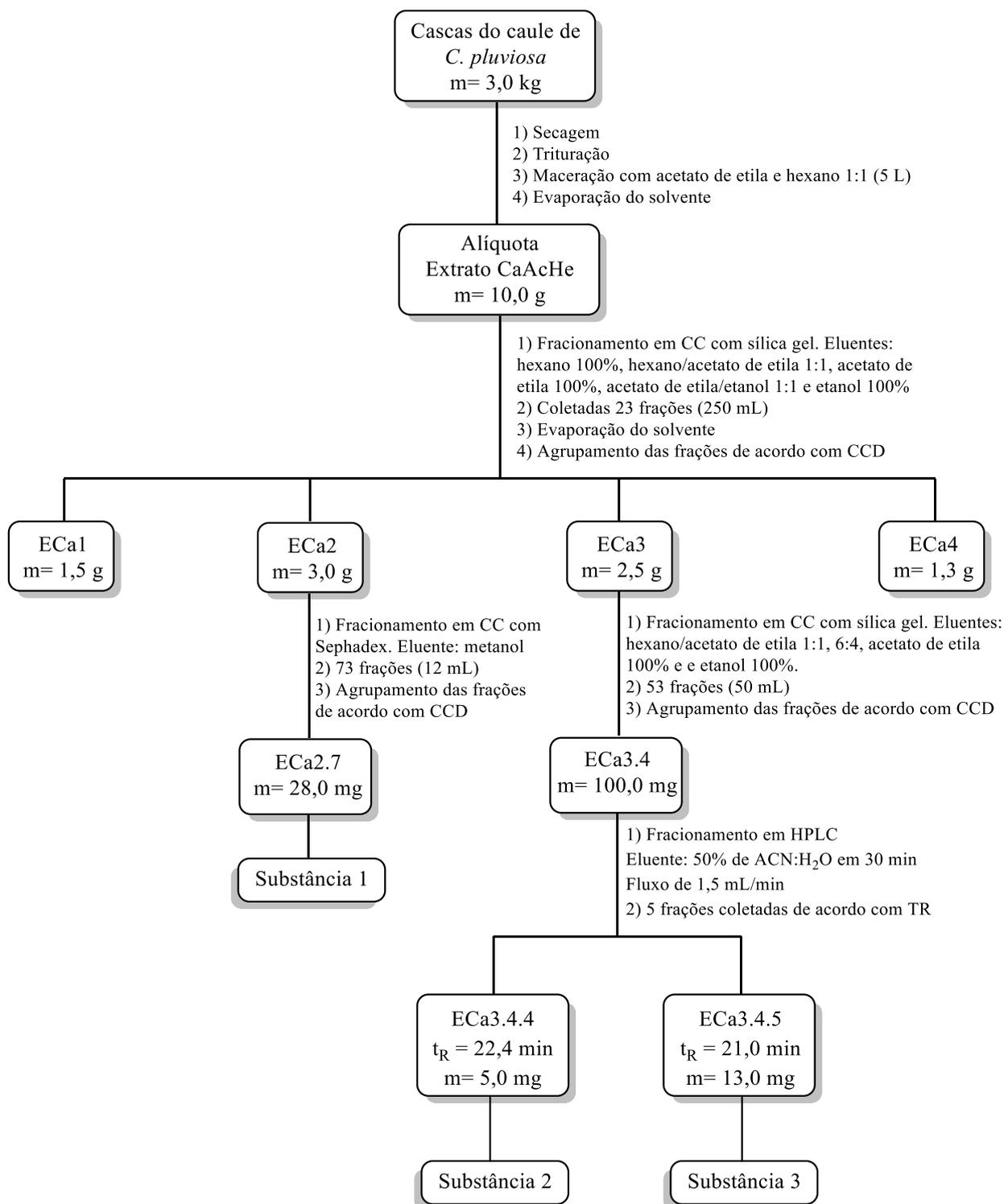


Figura 11 – Fluxograma do processo cromatográfico para obtenção das substâncias 1 (ruschalcona VI), 2 (4'''-metoxicaesalpinioflavona) e 3 (7-metoxicaesalpinioflavona) a partir das cascas do caule de *C. pluviosa*.

Fonte: Do autor

#### 5.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

Os espectros de massas de alta resolução em modo electrospray negativo HRESIMS foram obtidos utilizando-se espectrômetro TOF- HRMS (Waters- XEVO-G2XSQTOF-LC).

A amostra ECa2.7, que aparentava se tratar de uma substância aparentemente pura, assim como todas as amostras obtidas a partir da separação da fração ECa3.4 em HPLC, foram submetidas à técnica de ressonância magnética nuclear uni-dimensional de  $^1\text{H}$  e, quando necessário, também foram obtidos os espectros de  $^{13}\text{C}$  e os espectros bidimensionais de correlação (COSY, HSBC e HMBC). A amostra ECa2.7 foi preparada em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e as demais em DMSO deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ). Os espectros de ressonância magnética nuclear a 300 MHz foram obtidos em espectrômetro Bruker.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os resultados obtidos neste trabalho.

### 6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES

A avaliação da atividade anti-inflamatória através do modelo do edema de orelha utilizando óleo de cróton é empregada para avaliar o efeito anti-edematogênico e inibição do recrutamento de neutrófilos conforme previamente mencionado (TUBARO et al., 1986b).

#### 6.1.1 Edema de orelha

A atividade anti-inflamatória das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica das flores, folhas e cascas do caule de *C. pluviosa* foram avaliadas através do ensaio de edema da orelha induzido por óleo de cróton. O óleo de cróton é um agente irritante, responsável por causar danos celulares e ativar a fosfolipase A2, liberando ácido araquidônico, precursor dos mediadores inflamatórios prostaglandinas e os leucotrienos, envolvidos na formação de edema e na migração de neutrófilos, respectivamente, dentre outros efeitos (FACHINI-QUEIROZ et al., 2012).

Após a aplicação de óleo cróton na orelha esquerda dos camundongos foi possível verificar uma resposta inflamatória aparente, devido a formação de edema e rubor, sinais cardinais da inflamação (MEDZHITOV, 2010).

Os fármacos utilizados indometacina e dexametasona reduziram significativamente o edema da orelha, em 56,61% e 86,51%, respectivamente, quando comparados ao veículo (Tabela 2).

Todas as frações testadas, com exceção da fração FIAC, apresentaram resultados significativos frente à redução do edema de orelha (Figura 12). As frações e a indometacina, fármaco utilizado como referência para este ensaio, são consideradas estatisticamente semelhantes através do teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ).

Dessa forma, pode-se inferir que as três partes analisadas de *C. pluviosa*, (caule, folhas e flores), devem apresentar diferentes compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória exibida.

Tabela 2 - Efeito das frações de *C. pluviosa* no edema da orelha exibido em percentagem de inibição.

Amostra	Edema de orelha (mg) média ± EMP	% de inibição
CaHe	0,66 ± 0,6*	82,53
CaAc	1,30 ± 0,7*	65,61
CaE	2,09 ± 1,1*	44,71
FoHe	1,46 ± 0,5*	61,38
FoAc	1,11 ± 0,4*	70,64
FoE	1,10 ± 0,4*	70,90
FIHe	1,99 ± 1,0*	47,35
FIAc	3,44 ± 1,2 <sup>ns,#</sup>	8,99
FIE	2,05 ± 1,0*	45,77
Veículo	3,78 ± 0,5 <sup>#</sup>	---
Indometacina	1,64 ± 0,4*	56,61
Dexametasona	0,51 ± 0,3 <sup>*,#</sup>	86,51

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média ± EMP. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$  e <sup>ns</sup> indica que não há diferença estatística em comparação com o veículo. <sup>#</sup> indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência indometacina, onde  $p \leq 0,05$ .

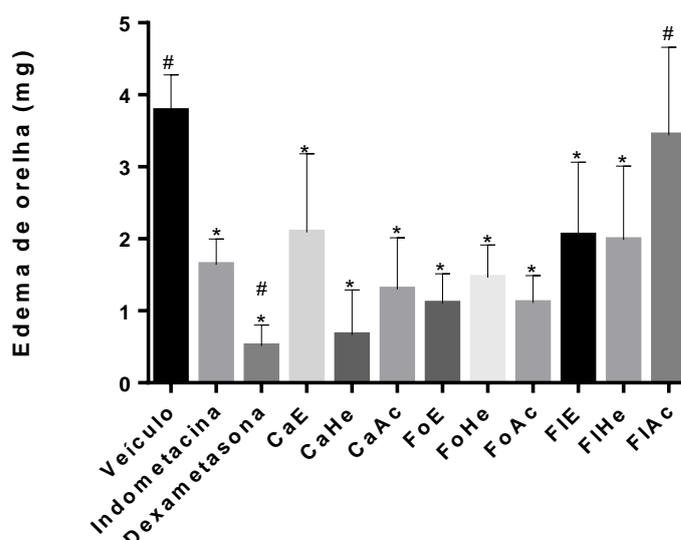


Figura 12 - Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações de *C. pluviosa* no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média  $\pm$  EMP. \* indica os níveis de significante diferença em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$  e ns indica que não há diferença estatística em comparação com o veículo. # indica os níveis de significância em comparação com o fármaco referência indometacina, onde  $p \leq 0,05$ .

### 6.1.2 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

Neste modelo experimental de edema de orelha, a atividade anti-inflamatória também pode ser constatada através da quantificação da MPO. A MPO, uma enzima encontrada nos neutrófilos e em outras células de origem mielóide, é um marcador em tecidos inflamados. Dessa forma, sua inibição pode resultar em uma atividade anti-inflamatória (ZHONG et al., 2016).

A diminuição da quantidade da MPO na orelha indica que poucos neutrófilos foram recrutados, logo a via da LOX foi inibida (CHAGAS-PAULA et al., 2011; CHAGAS-PAULA, et al., 2015; SARAIVA et al., 2011). A atividade da MPO é verificada através dos valores de absorbância obtidos no ensaio, sendo estes proporcionais à concentração da enzima nas amostras.

Neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares circulantes que, ao migrarem para o tecido inflamado, possuem como principais funções a fagocitose e eliminação de patógenos. O tratamento com glicocorticoides, tais como a dexametasona, é capaz de suprimir a migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória através da redução na expressão de moléculas de adesão (INAMURA et al., 2001).

O fármaco de referência, dexametasona, apresentou valor de absorbância igual a  $0,48 \pm 0,07$ , quando comparado ao veículo (Tabela 3).

Todas frações testadas apresentaram resultados significativos frente à inibição da MPO, equiparáveis à atividade da dexametasona. As frações e a dexametasona, fármaco utilizado como referência para este ensaio, são consideradas estatisticamente semelhantes através do teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 13).

Portanto, todas as frações de *C. pluviosa*, com exceção da fração FIAC (que não gerou redução do edema de orelha), se mostraram promissores agentes capazes de promover a inibição dual da via da COX e da via da 5-LOX.

Tabela 3 - Efeito das frações de *C. pluviosa* no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).

Amostra	Absorbância média $\pm$ EMP
CaHe	0,52 $\pm$ 0,18*
CaAc	0,59 $\pm$ 0,20*
CaE	0,52 $\pm$ 0,13*
FoHe	0,47 $\pm$ 0,18*
FoAc	0,54 $\pm$ 0,16*
FoE	0,48 $\pm$ 0,15*
FIHe	0,59 $\pm$ 0,16*
FIAC	0,54 $\pm$ 0,13*
FIE	0,60 $\pm$ 0,16*
Veículo	0,86 $\pm$ 0,05#
Dexametasona	0,48 $\pm$ 0,07*

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média  $\pm$  EMP. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$ .

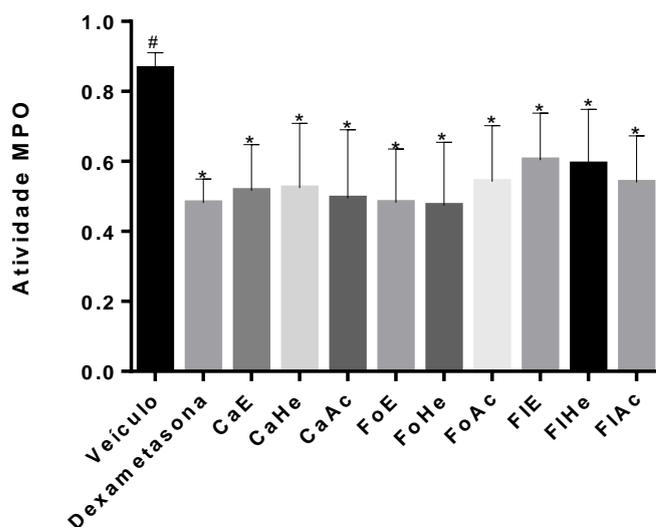


Figura 13 - Efeito das frações de *C. pluviosa* no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. \* indica os níveis de significante diferença em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica os níveis de significância em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$ .

## 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os resultados obtidos na investigação da atividade citotóxica das frações de *C. pluviosa* sobre células tumorais humanas permitiram observar que o efeito das frações sobre a viabilidade celular, ou seja, o percentual de células tumorais viáveis, difere de acordo com a linhagem celular e as concentrações utilizadas.

A avaliação da atividade citotóxica das frações frente a linhagem A549 (carcinoma de pulmão) apresentou os resultados mais expressivos (Figura 14). Sendo que o percentual de células viáveis nas culturas tratadas com as frações FIAC, FoAc e CaE (100  $\mu\text{g/mL}$ ), foi de cerca de 52,11%, 50,05% e 52,69%, respectivamente. Ainda em relação a esta linhagem, verificou-se que, com exceção das frações FIE, FIHe, FoE e CaHe, as demais frações reduziram o percentual de células viáveis significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

Já a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama) foi a menos responsiva ao tratamento com as frações (Figura 15), sendo que a fração CaAc foi aquela que apresentou menor percentual de células viáveis, cerca de 65,25% (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Enquanto que, ao ser avaliada na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , não mostrou potencial citotóxico tão significativo. Ainda na avaliação desta linhagem, se mostraram ativas, as frações FoAc (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e a fração CaE (100  $\mu\text{g/mL}$ ).

Estes dados corroboram com os resultados obtidos anteriormente nos ensaios antitumorais

realizados com outras frações de *C. pluviosa*, em que verificou-se as mesmas respostas nas avaliações frente a estas duas linhagens (CARVALHO, 2012).

Em relação aos ensaios realizados com a linhagem HT144 (melanoma), as frações FIE, FIAC, FoAc, CaE, CaAc (em ambas concentrações) e a fração FoE na concentração de 100 µg/mL diminuíram o percentual das células viáveis, quando comparadas ao veículo (Figura 16). Sendo que, a fração FoAc, quando avaliada na concentração de 100 µg/mL, foi capaz de diminuir a viabilidade celular em cerca de 54,09%.

A partir destes resultados é possível verificar que, de modo geral, as frações acetato de etila foram aquelas que apresentaram potencial citotóxico mais significativo. Assim, pode-se inferir que os compostos responsáveis pela atividade avaliada devem apresentar polaridade intermediária, tais como flavonoides.

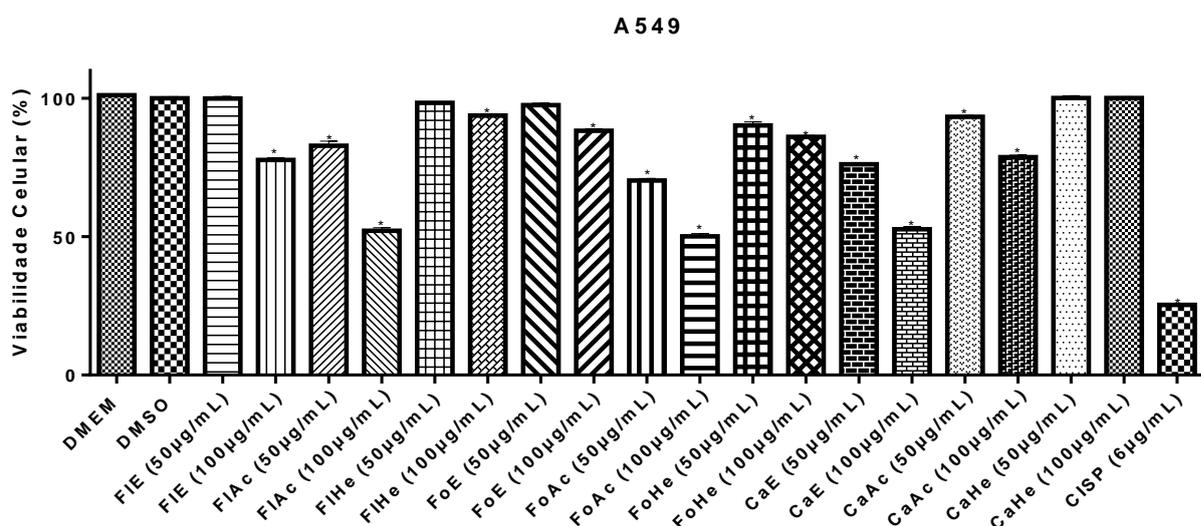


Figura 14 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem A549, após 48 horas de tratamento com as frações de *C. pluviosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ .

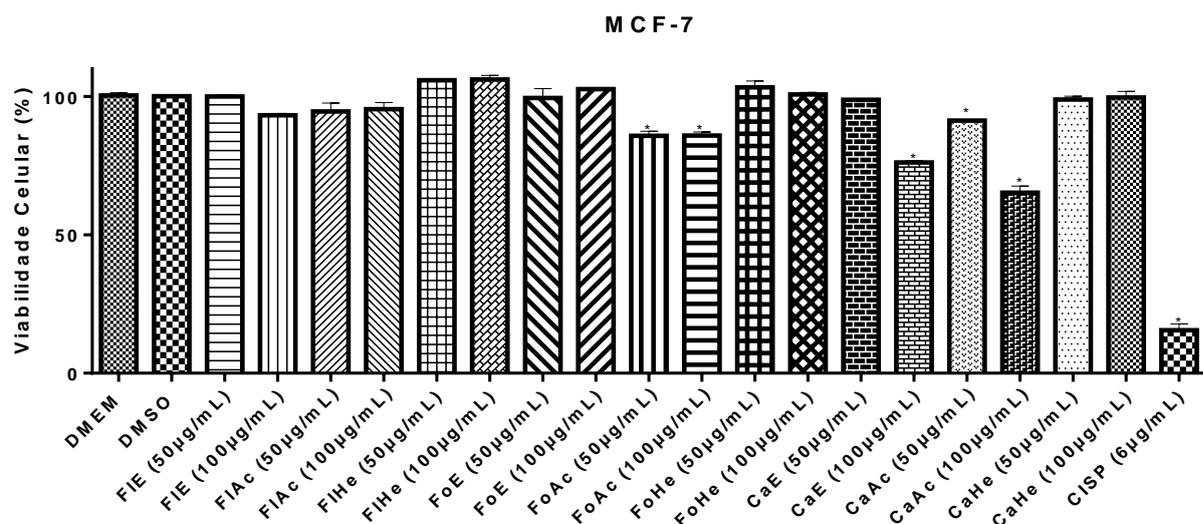


Figura 15 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem MCF-7, após 48 horas de tratamento com as frações de *C. pluviosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ .

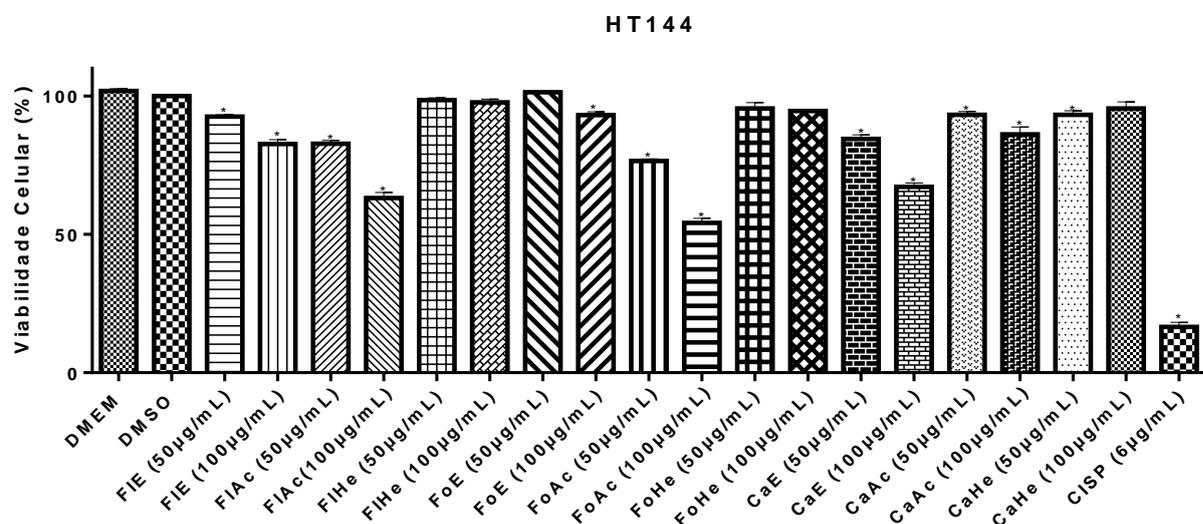


Figura 16 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem HT144, após 48 horas de tratamento com as frações de *C. pluviosa*.

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. \* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ .

### 6.3 METABOLÔMICA

O método cromatográfico empregado para que posteriormente as frações pudessem ser submetidas aos estudos metabolômicos possibilitou uma boa distribuição de seus constituintes

por todo o cromatograma (Figura 17). Este se trata de um método bastante abrangente e que tem sido utilizado com sucesso para a análise de extratos de espécies de outras famílias (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015a; CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015b).

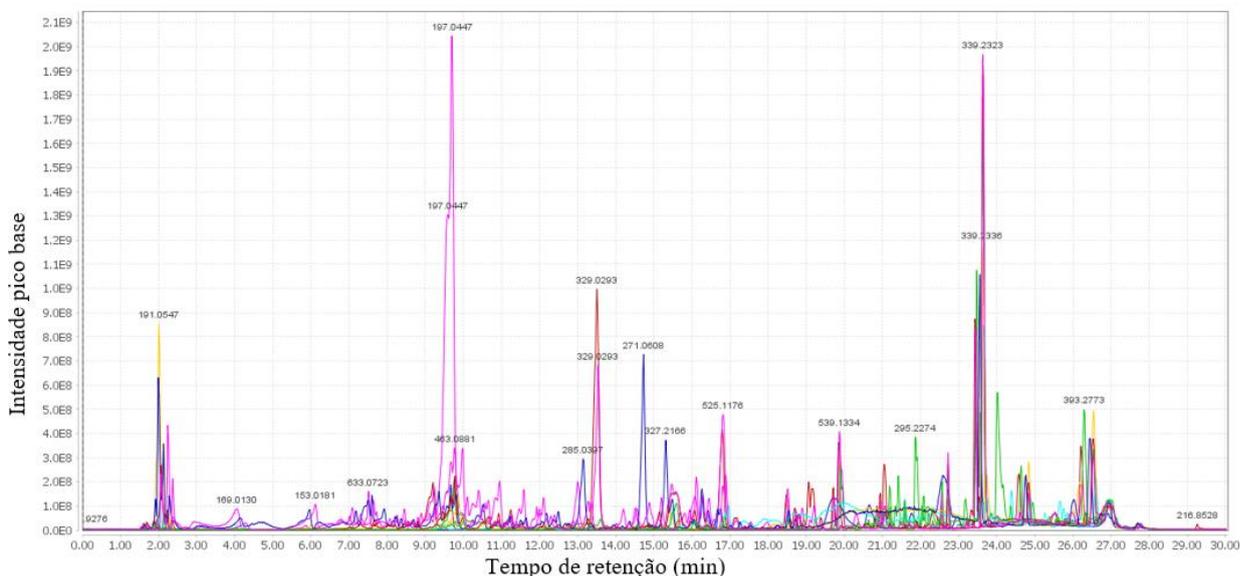


Figura 17 - Cromatogramas (modo negativo) de todas as frações sobrepostos, obtidos através de UPLC-UV-HRFTMS (fluxo 0,3 mL/min, gradiente MeCN/água; 0,1% ácido fórmico na água, 5% de MeCN em 5 min, 5%-100% de MeCN em 50 min, temperatura da coluna 30 °C, coluna C18, 3 µm, 150 x 3 mm).

Fonte: Do autor

Os dados cromatográficos de cada fração, após tratados no MZmine, foram exportados deste software em formato .csv para a realização das análises de correlação *in silico* no software SIMCA-P a fim de verificar os biomarcadores das atividades avaliadas.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com os dados cromatográficos com detecção de massas nos modos positivo e negativo separadamente, mas por uma questão de simplificação serão apresentados os resultados referentes ao modo negativo, onde foram detectadas 536 substâncias, enquanto que no modo positivo detectou-se 52 substâncias. Assim, pode-se inferir que a maior parte dos metabólitos presentes nas frações avaliadas apresentam grupos ácidos, o que explica sua ionização ocorrer principalmente pela perda de prótons.

Os tempos de retenção e as  $m/z$  foram as variáveis independentes X, também chamadas de variáveis preditoras e as atividades biológicas (anti-inflamatória e citotóxica) foram as variáveis dependentes Y. Assim, as análises estatísticas empregadas neste trabalho possibilitaram verificar a relação entre os metabólitos detectados (variáveis X) e as propriedades farmacológicas (variáveis Y) exibidas pelas frações avaliadas (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; HAWKINS, 2004).

Dessa forma, a partir dos modelos construídos, foi possível selecionar as variáveis dependentes associadas com as variáveis independentes. Além disso, os modelos permitem prever a atividade biológica de novas frações, verificando a presença destas variáveis X, os biomarcadores das atividades (HAWKINS, 2004).

Cada modelo construído pode ser interpretado através do parâmetro  $R^2$ , que informa o quão ajustado é o modelo e de  $Q^2$ , que é usado como critério da robustez e habilidade preditiva do modelo (BALDIM et al., 2017; GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; YULIANA et al., 2011). Muitos autores consideram  $Q^2 > 0,5$  é um indicador de que modelos complexos possuem habilidade preditiva. Por outro lado, altos valores de  $Q^2$  e  $R^2$  podem sugerir que esteja ocorrendo um super ajuste (*overfitting*) do modelo. Denomina-se *overfitting* a utilização de modelos que violam o princípio da parcimônia, através do emprego de modelos mais flexíveis do que o necessário ou que contenham componentes irrelevantes (HAWKINS, 2004).

Um método para detectar *overfitting* é através da chamada "randomização" de Y, que consiste em repetir a análise com as variáveis dependentes randomizadas e avaliar os resultados. Este método (*scrambling*) pode ser empregado juntamente com a validação (cruzada e externa), que consiste em dividir o conjunto de dados para que uma parte dos dados seja utilizada para treinar o modelo e outra parte para validá-lo (ALEXANDER; TROPSHA; WINKLER, 2015; BALDIM et al., 2017; GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002).

Inicialmente, realizou-se no SIMCA-P a análise estatística multivariada não supervisionada PCA ( $R^2X = 0,53$ ), que permite a obtenção de uma visão geral das amostras avaliadas, fornecendo *clusters* (agrupamentos), tendências e *outliers* (TRYGG; HOLMES, 2007). Na figura 18 pode-se verificar que as frações não se agruparam de acordo com suas atividades biológicas, mas de acordo com o perfil químico, já que este tipo de análise é capaz de resumir as variações entre os dados. Pode-se verificar que a fração CaAc, que apresenta diversas atividades biológicas relatadas, encontra-se afastada do *cluster* formado, pois deve exibir substâncias que a torna diferente das demais frações. Assim como a fração FlAc, que também deve possuir compostos distintos daqueles apresentados pelas frações presentes no *cluster*, lembrando que esta é a única fração que não foi capaz de promover a inibição dual do edema e recrutamento de neutrófilos.

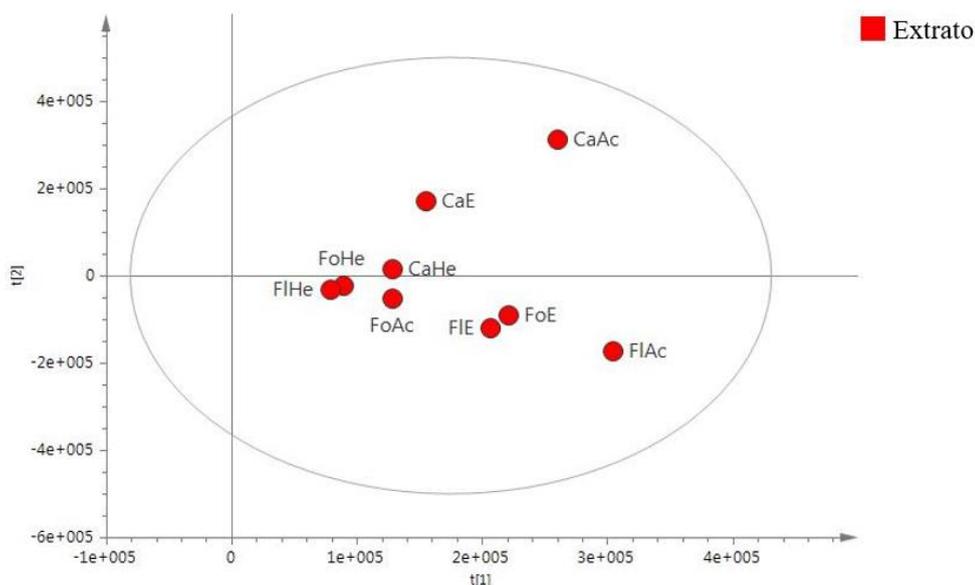


Figura 18 – Distribuição das frações de *C. pluviosa* obtidos na análise por PCA.  
Fonte: Do autor

Em seguida, foram realizadas as análises estatísticas multivariadas supervisionadas PLS e OPLS para a classificação de novas amostras e determinação de biomarcadores. Para tal, as classes de cada amostra, isto é, suas propriedades biológicas foram informadas previamente para a construção do modelo.

Sendo que, para as análises realizadas com os resultados da avaliação anti-inflamatória, as frações CaE, CaAc, CaHe, FoE, FoAc, FoHe, FIE e FIHe, que apresentaram tanto inibição do edema de orelha quanto inibição da MPO foram definidas como ativa (A), enquanto que a fração FIAC, que apresentou inibição apenas da MPO foi definida como não ativa (N).

Já para as análises realizadas a partir do ensaio citotóxico, foram avaliados os resultados obtidos com a utilização da linhagem A549, aquela mais responsiva ao tratamento. Onde as frações CaE, CaAc, FoAc, FoHe e FIAC, que inibiram a viabilidade celular na menor concentração avaliada foram definidas como ativa e as demais (CaHe, FoE, FIHe e FIE) foram definidas como não ativa.

Na OPLS as variações sistemáticas em X são definidas por dois componentes, um componente preditivo que modela a correlação entre X e Y e um componente ortogonal que expressa a variação de X não relacionada com Y (YULIANA et al., 2011). Entretanto, neste caso, o emprego da OPLS violaria o princípio da parcimônia, já que foram obtidos resultados satisfatórios utilizando-se um modelo mais simples, PLS. Como PLS permitiu explicar a relação do conjunto de dados com as propriedades investigadas, onde foram obtidos os seguintes valores:  $R^2X = 0,617$ ,  $R^2Y = 0,993$  e  $Q^2 = 0,752$  para as análises com os resultados da atividade anti-inflamatória e,  $R^2X = 0,678$ ,  $R^2Y = 0,996$  e  $Q^2 = 0,825$  para as análises com os resultados da atividade citotóxica (Figuras 19 e 20).

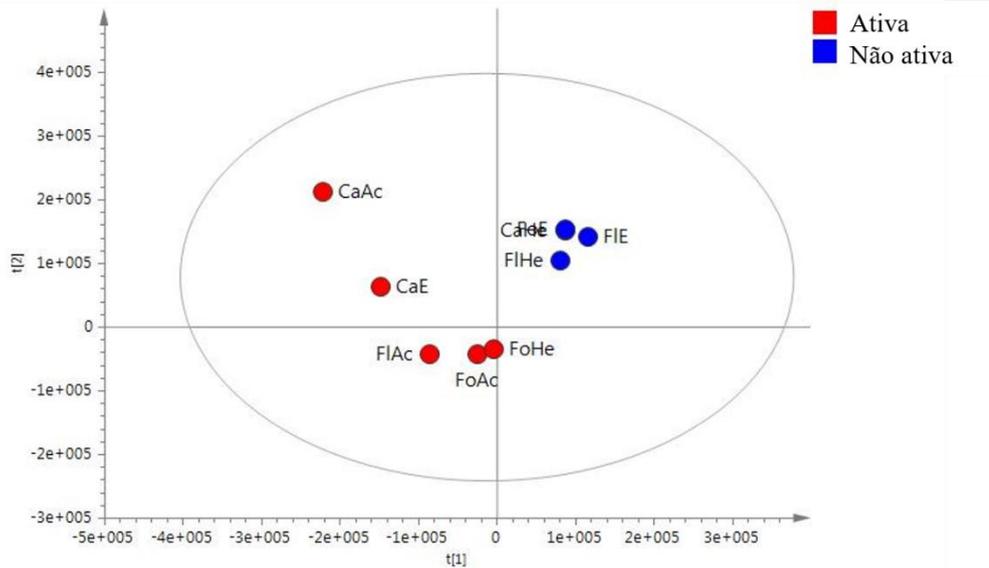


Figura 19 - Distribuição das frações de *C. pluviosa* de acordo com a propriedade citotóxica obtida na análise por PLS.

Fonte: Do autor

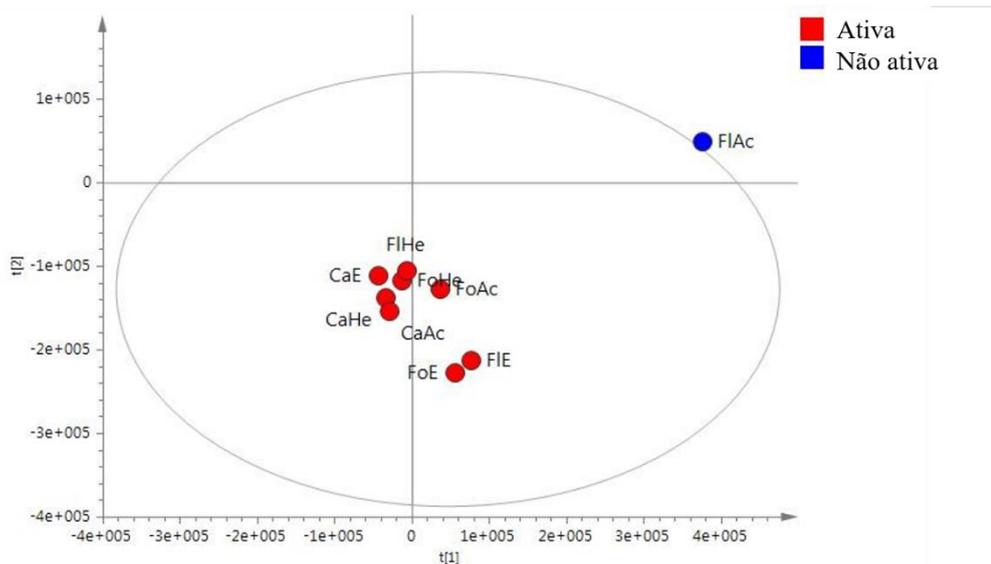


Figura 20 - Distribuição das frações de *C. pluviosa* de acordo com a propriedade anti-inflamatória obtida na análise por PLS.

Fonte: Do autor

Posteriormente, a partir do modelo PLS construído, pode-se verificar a variável importante para a projeção (VIP), que é a medida da importância das variáveis independentes no modelo em relação à sua correlação com as variáveis dependentes (Figuras 21 e 22). Sendo assim, é possível identificar quem são as variáveis que exercem forte influência para a projeção do modelo, comparando-se os valores de VIP, sendo mais importantes as variáveis com valores de  $VIP > 1,0$  (MAHADEVAN et al., 200; SOH et al., 2008).

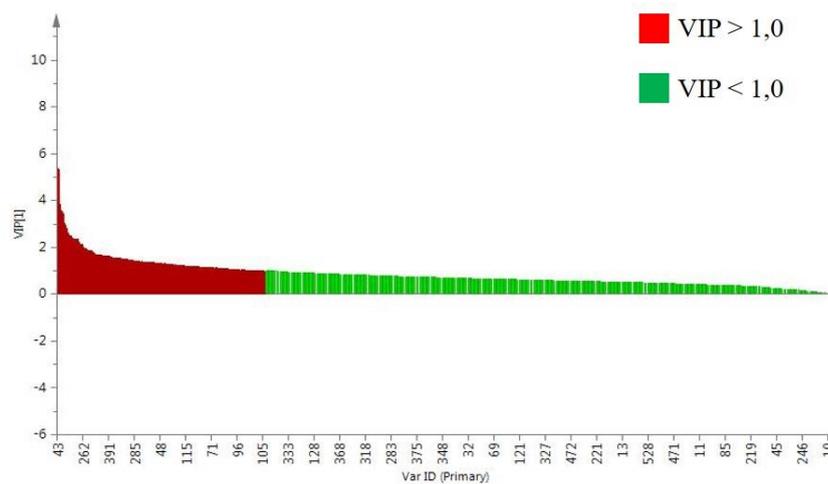


Figura 21 – VIPs correlacionadas com a atividade citotóxica das frações de *C. pluviosa*. Em vermelho VIP > 1,0.

Fonte: Do autor

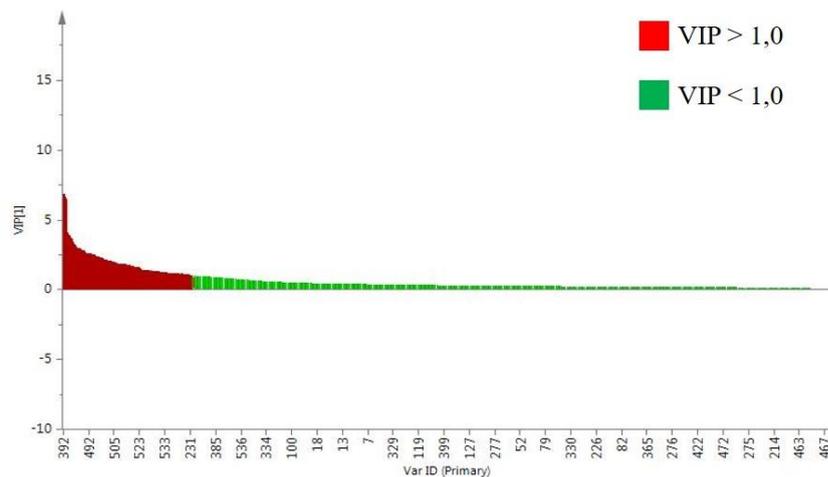


Figura 22 – VIPs correlacionadas com a atividade anti-inflamatória das frações de *C. pluviosa*. Em vermelho VIP > 1,0.

Fonte: Do autor

Em uma outra análise também obtida a partir do modelo PLS foi possível verificar qual a correlação da propriedade investigada com as variáveis a partir da visão geral dos coeficientes (Figuras 23 e 24). Sendo que a magnitude dos coeficientes mostra o grau de influência da variável, enquanto que o sinal do coeficiente determina a direção da influência, seja positiva ou negativa. Ou seja, pode-se investigar se a presença e/ou ausência de uma substância faz com que a fração apresente atividade ou não. Os biomarcadores da atividade são as substâncias que apresentam correlação positiva e VIPs > 1 (SOH *et al.*, 2008).

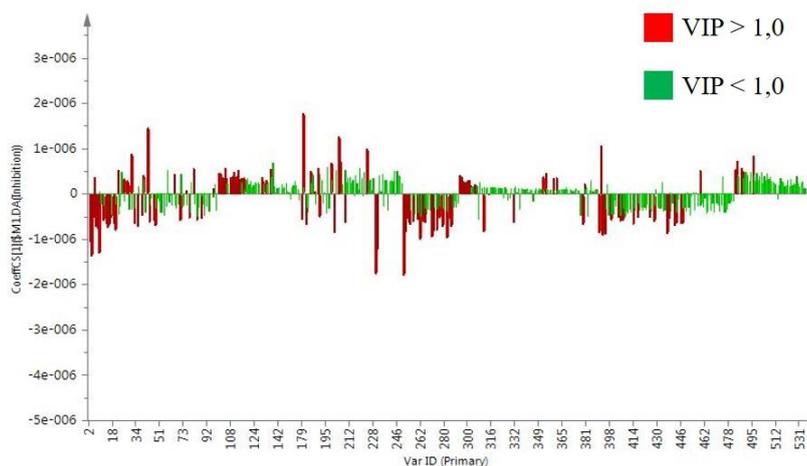


Figura 23 – Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade citotóxica das frações de *C. pluviosa*. Em vermelho VIP > 1,0.

Fonte: Do autor

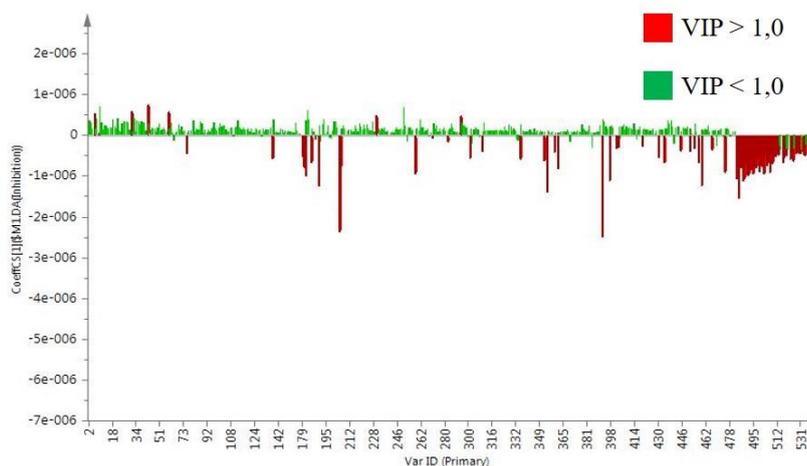


Figura 24 – Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória das frações de *C. pluviosa*. Em vermelho VIP > 1,0.

Fonte: Do autor

## 6.4 DESREPLICAÇÃO

A desreplcação das substâncias com valores de VIP maiores que 1,0 permitiu verificar que as classes das variáveis importantes para a projeção dos modelos construídos para as propriedades farmacológicas estudadas são, predominantemente, compostos fenólicos, conforme espera-se para espécies do gênero *Caesalpinia* (BALDIM et al., 2012b; GIACOMINI et al., 2014; HEMALATHA et al., 2007; WEI et al., 2016). Estas substâncias selecionadas pelos valores de VIPs (Tabelas 4 e 5) em sua maioria se tratavam de compostos majoritários. Sendo assim, foi possível obter a impressão digital metabólica das frações avaliadas.

A partir do banco de dados DNP e do banco de dados *in house* criado a partir dos metabólitos presentes em espécies do gênero *Caesalpinia* relatados na literatura, verificou-se que algumas VIPs apresentaram vários *hits*, sendo alguns destes compostos já identificados em outras

espécies do gênero. Entretanto, para diversas VIPs não foi encontrado nenhum *hit*, mesmo empregando tais bancos de dados abrangentes, o que sugere que estas se tratam de substâncias possivelmente inéditas.

Ao iniciar-se a desreplicação foi verificado que a variável importante para o modelo da atividade citotóxica com  $m/z = 525,1186$ , que apresentou valor de VIP igual a 3,9 (segundo maior valor de VIP) se trata do biflavonoide caesalpinioflavona, que já teve sua atividade citotóxica anteriormente relatada (BALDIM, et al., 2015). Tal biflavonoide também foi constatado como sendo uma variável importante para a projeção do modelo da atividade anti-inflamatória (VIP = 1,4). Este se trata de um metabólito majoritário nas frações acetato de etila e hidroetanólica das cascas do caule da espécie, que exibiram potencial citotóxico e anti-inflamatório significativos frente aos ensaios realizados. Além disso, este composto correlacionou-se positivamente com ambas as atividades, podendo ser considerados biomarcadores das mesmas.

Foi observado também que a substância com  $m/z = 509,1242$ , denominada ruschalcona VI, se trata de uma variável importante para a atividade citotóxica (VIP = 1,7), correlacionando-se positivamente com a mesma. Em relação à atividade anti-inflamatória, mesmo estando em uma *gray area*, onde não há uma clara discriminação dos dados, (VIP = 0,9), a ruschalcona VI pode ser considerada como importante para a separação dos grupos no modelo PLS, uma vez que apresentou uma forte correlação positiva com esta atividade. Assim, por estar presente em grande quantidade na fração estudada, ela foi isolada e submetida ao ensaio anti-inflamatório.

Em relação às variáveis que apresentam  $m/z = 539,1342$  e  $t_R$  iguais a 19,9 min (ID = 6) e 19,1 min (ID = 100), foi encontrado apenas um *hit*, que se trata de um metabólito presente em uma espécie de outra família, incomum nas espécies da família Leguminosae, o que já sugeria que estas se tratavam de substâncias possivelmente inéditas. Posteriormente, foram isolados e identificados dois isômeros com esta  $m/z$  que se tratam de derivados metoxilados inéditos da caesalpinioflavona. Ainda foi possível verificar que os compostos ID = 6 e ID = 100 também são importantes para a projeção do modelo da atividade citotóxica (VIP = 2,4 e 1,5 respectivamente) e do modelo da atividade anti-inflamatória (VIP = 1,3 e 1,5 respectivamente) e correlacionam-se positivamente com estas atividades.

Tabela 4 – Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo PLS construído para a atividade citotóxica.

(continua)

ID	VIP	$m/z$	$t_R$	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Hits
43*	5,4	329,030087	10,6	-0,62	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>	11 (compostos fenólicos)
31*	3,9	525,118560	16,8	-2,71	C <sub>30</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	22 (caesalpinioflavona, identificada em <i>C. pluviosa</i> )
251	3,6	453,262405	23,8	-0,47	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> Cl	0
231	3,5	271,227588	24,1	-1,43	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	17 (ácidos graxos)
180*	3,0	463,087903	9,9	-1,59	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	71 (compostos fenólicos)
295*	2,8	395,098022	9,8	-1,72	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	4 (compostos fenólicos)
4	2,6	295,227567	22,4	-1,82	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	45 (ácidos graxos e compostos fenólicos)
113*	2,5	461,072387	10,9	-1,02	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub>	27 (compostos fenólicos)
205*	2,5	611,408728	22,4	-0,41	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub> Cl	0
81*	2,4	571,124084	16,8	-1,82	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	15 (compostos fenólicos)
232	2,4	287,222649	17,4	-1,09	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	9 (ácidos graxos)
6*	2,4	539,134196	19,9	-2,256	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub>	1 (floribundiquinona A, identificada em <i>Berchemia floribunda</i> , mas foi identificada como a nova 4'''-metoxicaesalpinioflavona)
392*	2,2	271,061001	16,1	-1,39	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	115 (compostos fenólicos)
22*	2,1	553,150146	20,9	-0,35	C <sub>32</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub>	2 (flavonóides identificados em espécies de <i>Dalbergia</i> )
190*	1,9	285,040309	13,2	-1,16	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	80 (compostos fenólicos)
282*	1,9	748,513773	26,7	2,56	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	0
437	1,9	533,171447	1,9	-1,86	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>17</sub>	0
3	1,9	455,352701	23,7	-2,43	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	300 (ácido betulínico, identificado em <i>C. pluviosa</i> )
104*	1,9	315,014695	11,4	-0,67	C <sub>15</sub> H <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	1 (metil éster ácido elágico, identificado em espécies de diferentes gêneros)
395	1,8	758,542005	26,9	-0,84	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> O <sub>11</sub> N	0
202	1,7	609,124931	12,0	-0,77	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>	24 (compostos fenólicos)
110*	1,7	603,005188	9,3	-0,31	C <sub>28</sub> H <sub>11</sub> O <sub>16</sub>	0
40*	1,7	523,102925	19,2	-1,04	C <sub>30</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	8 (compostos fenólicos)
26*	1,7	585,139902	19,9	-0,59	C <sub>32</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub>	2 (protosapanina E, identificado em <i>C. pluviosa</i> )
28*	1,7	509,123606	18,5	-2,24	C <sub>30</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	22 (ruschalcona VI, identificado em <i>C. pluviosa</i> )
8	1,6	293,212196	21,7	-0,81	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	71 (ácidos graxos)
272	1,6	477,261904	22,7	2,31	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> Cl	0
297*	1,6	537,197998	11,6	-0,78	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> O <sub>12</sub>	41 (compostos fenólicos)
391	1,6	927,183898	9,7	0,18	C <sub>42</sub> H <sub>39</sub> O <sub>24</sub>	0
275	1,6	475,246780	22,1	-0,54	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub> Cl	0
252	1,6	469,389068	25,4	-0,36	C <sub>28</sub> H <sub>53</sub> O <sub>5</sub>	0
182	1,6	387,113843	2,2	-2,54	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	0
298*	1,6	303,050964	10,1	-0,20	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	61 (compostos fenólicos)

Tabela 5 – Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo PLS construído para a atividade citotóxica.

ID	VIP	$m/z$	$t_R$	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Hits
100*	1,5	539,134155	19,1	-2,26	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub>	1 (floribundiquinona A, identificada em <i>Berchemia floribunda</i> , mas foi identificada como a nova 7-metoxicaesalpinioflavona)
496*	1,5	621,437117	22,4	-0,29	C <sub>36</sub> H <sub>61</sub> O <sub>8</sub>	11 (compostos fenólicos)
35	1,5	677,476799	26,5	0,04	C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> O <sub>8</sub> Cl	0
485*	1,5	613,406587	22,6	-0,58	C <sub>32</sub> H <sub>57</sub> O <sub>9</sub> N <sub>2</sub>	0
442	1,5	525,451932	26,1	-0,98	C <sub>32</sub> H <sub>61</sub> O <sub>5</sub>	0
394	1,5	553,077575	14,9	0,01	C <sub>30</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	14 (compostos fenólicos)
102*	1,5	583,124511	18,7	-0,02	C <sub>32</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	1 (rugulosina, identificado em <i>Cladonia graciliformis</i> )
285	1,4	481,293363	24,9	-0,18	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub> Cl	0
224*	1,4	577,268802	22,1	-0,01	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>11</sub> S	0
446	1,4	533,397655	22,8	-0,22	C <sub>30</sub> H <sub>58</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
19	1,4	279,232678	24,3	-0,91	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	62 (ácidos graxos)
109*	1,4	569,108703	15,7	-0,52	C <sub>31</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	2 (flavonóides identificados em espécies de <i>Garcinia</i> )
206*	1,4	951,074661	8,4	-1,21	C <sub>42</sub> H <sub>23</sub> O <sub>23</sub> N <sub>4</sub>	0
111*	1,4	537,118362	19,2	-1,29	C <sub>31</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	1 (rheidina A, identificado em <i>Rheum rhabarbarum</i> )
7	1,4	911,713195	23,6	-0,31	C <sub>60</sub> H <sub>95</sub> O <sub>6</sub>	0
443	1,4	561,429056	25,9	0,03	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
33	1,4	255,232626	25,5	-1,23	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	29 (ácidos graxos)
447	1,3	431,316401	23,4	-0,77	C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> O <sub>4</sub>	90 (ácidos graxos e compostos fenólicos)
48	1,3	651,475752	24,0	-0,38	C <sub>39</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
66*	1,3	586,460265	25,3	-0,63	C <sub>34</sub> H <sub>65</sub> O <sub>4</sub> NCl	0
300*	1,3	423,166136	12,1	0,06	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub>	56 (compostos fenólicos)
414	1,3	829,110931	8,3	0,62	C <sub>36</sub> H <sub>29</sub> O <sub>23</sub>	0
44	1,3	389,246342	23,8	-0,26	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> Cl	0
16	1,3	543,462949	24,2	-0,12	C <sub>32</sub> H <sub>63</sub> O <sub>6</sub>	0
76*	1,3	329,233110	16,3	-0,69	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	22 (ácidos graxos)
255	1,3	505,366516	25,7	-0,13	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
209	1,3	615,098999	9,2	-2,43	C <sub>29</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	0
185*	1,3	300,998685	9,3	-1,09	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	1 (ácido elágico, identificado em espécies de diferentes gêneros)
428	1,2	597,392751	26,4	0,13	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> Cl	0
115*	1,2	659,067703	13,5	-0,34	C <sub>32</sub> H <sub>19</sub> O <sub>16</sub>	0
101*	1,2	493,366465	26,4	-0,12	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
188*	1,2	319,045785	10,6	-0,50	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	13 (etil brevifolincarboxilato, identificado em <i>C. pluviosa</i> )
257	1,2	549,283645	21,7	-2,46	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Cl	0
254	1,2	477,321846	25,5	-1,39	C <sub>28</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub>	23 (esteroides)
87	1,2	675,460562	26,1	-0,28	C <sub>37</sub> H <sub>68</sub> O <sub>8</sub> Cl	0

Tabela 6 – Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo PLS construído para a atividade citotóxica.

ID	VIP	<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i>	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Hits
488*	1,2	409,176757	12,5	-0,26	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	0
438	1,2	404,103668	1,9	-2,25	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub> N	0
407	1,2	391,066864	14,8	-0,53	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub>	3 (compostos fenólicos)
299*	1,2	923,153045	10,9	0,62	C <sub>42</sub> H <sub>35</sub> O <sub>24</sub>	0
12	1,1	329,175921	22,8	0,11	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub>	255 (compostos fenólicos)
47	1,1	313,238150	20,9	-0,68	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub>	29 (ácidos graxos)
306*	1,1	673,214233	11,9	0,60	C <sub>33</sub> H <sub>37</sub> O <sub>15</sub>	5 (compostos fenólicos)
301*	1,1	269,045442	14,7	0,27	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	103 (compostos fenólicos)
359*	1,1	275,019645	8,5	-0,39	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	3 (xantonas)
399	1,1	593,130493	12,9	0,71	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	49 (compostos fenólicos)
132*	1,1	613,084014	12,7	-1,41	C <sub>29</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	0
39	1,1	281,248451	25,5	-0,48	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub>	58 (ácidos graxos)
96*	1,1	343,045608	16,5	-0,93	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	17 (compostos fenólicos)
489*	1,1	379,165825	12,0	-1,33	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	0
331	1,1	437,108288	15,3	-1,43	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	16 (compostos fenólicos)
135*	1,1	609,413655	25,6	-2,47	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> Cl	0
17	1,0	497,363023	25,1	-1,31	C <sub>32</sub> H <sub>49</sub> O <sub>4</sub>	57 (compostos fenólicos e esteróides)
5	1,0	365,245882	24,8	-1,45	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> Cl	0
352*	1,0	237,040059	11,1	-1,31	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	18 (compostos fenólicos)
425	1,0	619,421439	26,4	-2,50	C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	0
78	1,0	568,361826	20,2	2,50	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub> N <sub>3</sub>	0
417	1,0	797,553953	26,8	-1,29	C <sub>44</sub> H <sub>73</sub> O <sub>7</sub> N <sub>6</sub>	0
253	1,0	311,222558	19,9	-0,72	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	25 (ácidos graxos)
105*	1,0	358,201934	23,3	-1,15	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> N	0

Fonte: Do autor

Nota: ID: número de identificação designado pelo MZmine, *t<sub>R</sub>*: tempo de retenção em minutos.

\* variáveis que apresentam correlação positiva com a atividade citotóxica

Tabela 7 – Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo PLS construído para a atividade anti-inflamatória.

ID	VIP	<i>m/z</i>	<i>t<sub>R</sub></i>	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Hits
392 <sup>#</sup>	6,9	271,061001	16,1	-1,39	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	115 (compostos fenólicos)
205 <sup>#</sup>	6,6	611,408728	22,4	-0,41	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub> Cl	0
485 <sup>#</sup>	4,1	613,406587	22,6	-0,58	C <sub>32</sub> H <sub>57</sub> O <sub>9</sub> N <sub>2</sub>	0
190 <sup>#</sup>	3,8	285,040309	13,2	-1,16	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	10 (compostos fenólicos)
181	3,6	327,217286	15,4	-1,37	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub>	37 (compostos fenólicos)
488 <sup>#</sup>	3,0	409,176757	12,4	-0,26	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	0
489 <sup>#</sup>	2,9	379,165825	12,0		C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	0
180 <sup>#</sup>	2,8	463,087903	9,9	-1,60	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	71 (compostos fenólicos)
491	2,6	395,161091	11,1	-0,37	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	0

Tabela 8 – Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo PLS construído para a atividade anti-inflamatória.

ID	VIP	$m/z$	$t_R$	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Hits
185 <sup>#</sup>	2,6	300,998685	9,3	-1,10	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	1 (ácido elágico, identificado em espécies de diferentes gêneros)
492	2,6	337,092738	9,2	-0,27	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	18 (compostos fenólicos)
495	2,6	750,529089	24,0	1,30	C <sub>40</sub> H <sub>82</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub> BrCl	0
475	2,5	363,193962	15,4	-1,20	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
493	2,3	252,050914	9,6	-1,96	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> N	0
496 <sup>#</sup>	2,3	621,437117	22,4	-0,29	C <sub>36</sub> H <sub>61</sub> O <sub>8</sub>	11 (compostos fenólicos)
206 <sup>#</sup>	2,3	951,074661	8,4	-1,21	C <sub>42</sub> H <sub>23</sub> O <sub>23</sub> N <sub>4</sub>	0
457	2,2	433,113306	10,0	0,40	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> Br	0
486	2,1	543,129247	14,7	-0,78	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	19 (compostos fenólicos)
487	2,1	387,238416	18,7	-1,02	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> O <sub>7</sub>	1 (ácido norcaperatico, identificado em <i>Cantharellus floccosus</i> )
502	2,1	425,171936	11,6	0,17	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	0
505	2,0	403,233625	17,5	-0,25	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> O <sub>8</sub>	0
509	1,9	439,187347	12,8	-0,26	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	0
506	1,9	365,209715	17,2	-0,85	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
490	1,8	309,082260	2,1	-1,49	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	1 (glicopiranosil, identificado em <i>Sonchus oleraceus</i> )
301 <sup>#</sup>	1,8	269,045442	14,7	0,27	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	103 (compostos fenólicos)
517	1,8	830,114318	8,3	0,01	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>20</sub> N <sub>9</sub>	0
43 <sup>#*</sup>	1,8	329,030087	10,6	-0,62	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>	11 (compostos fenólicos)
76 <sup>#</sup>	1,8	329,233110	16,3	-0,69	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	22 (ácidos graxos)
352 <sup>#</sup>	1,8	237,040059	11,1	-1,31	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	18 (compostos fenólicos)
526	1,7	476,040832	8,6	0,62	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> S	0
508	1,7	354,098236	12,7	-0,21	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> N	0
494	1,7	329,066286	15,9	-1,18	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	153 (compostos fenólicos)
100 <sup>#*</sup>	1,5	539,134155	19,1	-2,26	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub>	1 (floribundiquinona A, identificada em <i>Berchemia floribunda</i> , mas foi identificada como a nova 7-metoxicaesalpinioflavona)
534	1,4	734,517439	22,6	0,28	C <sub>37</sub> H <sub>72</sub> O <sub>11</sub> N <sub>3</sub>	0
31 <sup>#*</sup>	1,4	525,118560	16,8	-2,71	C <sub>30</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	22 (caesalpinioflavona, identificada em <i>C. pluviosa</i> )
282 <sup>#</sup>	1,4	748,513773	26,2	0,89	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	0
520	1,3	437,231079	14,4	-0,17	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub> Cl	0
451	1,3	331,066886	2,3	-0,55	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub>	12 (compostos fenólicos)
6 <sup>#*</sup>	1,3	539,134196	19,9	-2,26	C <sub>31</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub>	1 (floribundiquinona A, identificada em <i>Berchemia floribunda</i> , mas foi identificada como a nova 4 <sup>'''</sup> -metoxicaesalpinioflavona)
528	1,2	323,199127	16,7	-1,03	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> Cl	0
466	1,2	561,429542	25,8	0,74	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>5</sub> Cl	0
419	1,2	433,235646	21,2	2,85	C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	0

Tabela 9 – Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo PLS construído para a atividade anti-inflamatória.

ID	VIP	$m/z$	$t_R$	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Hits (conclusão)
403	1,2	391,066808	13,2	-0,67	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub>	3 (compostos fenólicos)
309	1,2	571,088124	13,1	-0,13	C <sub>30</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	14 (compostos fenólicos)
504	1,2	655,442627	15,3	-0,07	C <sub>36</sub> H <sub>63</sub> O <sub>10</sub>	0
512	1,2	402,249603	13,9	-0,30	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub> N	0
188 <sup>#</sup>	1,2	319,045785	10,6	-0,50	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	13 (etil brevifolincarboxilato, identificado em <i>C. pluviosa</i> )
402	1,2	262,071942	11,3	-0,59	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> N	0
359 <sup>#</sup>	1,2	275,019645	8,5	-0,39	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	3 (xantonas)
231 <sup>#*</sup>	1,1	271,227588	24,1	-1,43	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	17 (ácidos graxos)
28 <sup>#*</sup>	0,9	509,123606	18,5	-2,24	C <sub>30</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>	22 (ruschalcona VI, identificado em <i>C. pluviosa</i> )

Fonte: Do autor

Nota: ID: número de identificação designado pelo MZmine,  $t_R$ : tempo de retenção em minutos.

<sup>#</sup> variáveis presentes em ambos modelos (atividades citotóxica e anti-inflamatória)

\* variáveis que apresentam correlação positiva com a atividade anti-inflamatória

## 6.5 ESTUDO FITOQUIMICO

A partir das cascas do caule de *C. pluviosa* coletadas e submetidas aos procedimentos anteriormente descritos, obteve-se 110,54 gramas do extrato acetato de etila/hexânico das cascas do caule de *C. pluviosa* (CaAcHe), resultando em um rendimento de 3,67%.

Uma alíquota do extrato CaAcHe submetida à diferentes técnicas cromatográficas levou ao isolamento das substâncias 1 (ECa2.7), 2 (ECa3.4.5) e 3 (ECa3.4.4), sendo que todas estas foram isoladas na forma de um sólido amarelo. As substâncias 2 e 3, isoladas em HPLC, apresentaram tempo de retenção iguais a 22,4 e 21,0 min, respectivamente.

Foi possível obter 28,0 mg da substância 1; 13,0 mg da substância 2 e 5,0 mg da substância 3. Dessa forma, apenas as substâncias 1 e 2 puderam ser submetidas ao ensaio anti-inflamatório, pois não havia quantidade suficiente da substância 3 para a realização deste ensaio *in vivo*.

As demais amostras obtidas a partir da separação em HPLC não se encontravam puras e não se apresentavam em uma quantidade satisfatória para a realização de outras técnicas de separação. Entretanto, há ainda uma série de frações obtidas a partir deste extrato que são promissoras para o isolamento de novas substâncias e busca de biomarcadores. Assim, estas deverão ser amplamente estudadas pelo LFQM.

## 6.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

Para a elucidação estrutural da substância 1, fez-se necessário apenas a análise do espectro

de RMN de  $^1\text{H}$ , pois observou-se que este metabólito se trata de uma substância já isolada na espécie *C. pluviosa*. Desta forma, a interpretação do espectro obtido juntamente com a comparação dos dados da literatura, possibilitou a sua identificação de forma inequívoca.

Já em relação às substâncias 2 e 3, logo no início da análise de seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  verificou-se que as mesmas se tratavam de derivados metoxilados do biflavonoide caesalpinioflavona, devido ao conjunto de sinais apresentados, o que foi confirmado pelos demais experimentos realizados.

### 6.6.1 Substância 1

O espectro de massas de alta resolução obtido por HRESIMS, em modo negativo, exibiu o íon  $[\text{M}-\text{H}]^-$  de  $m/z$  509,1234 (calcd. para  $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{O}_8$ , 509,1236, erro = 0,6 ppm) (Figura 25).

A partir da análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra, verificou-se que a mesma se tratava de uma substância já isolada a partir do caule de *C. pluviosa*, um composto fenólico denominado 4,2',4',4'',2''',4'''-hexahidroxí-3,5'''-bichalcona (ruschalcona VI) (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006).

Ruschalcona VI (Figura 26) é uma bichalcona composta de duas moléculas de isoliquiritigenina unidas através da ligação entre o C-5' do anel A de uma molécula de isoliquiritigenina e o C-3 do anel B de outra molécula de isoliquiritigenina. Este metabólito é o único exemplo de um dímero natural em que as duas unidades chalconas estão ligadas por uma ligação C-C (Mihigo et al., 2010) e foi primeiramente isolado a partir da casca da raiz de *Rhus pyroides* Burch. (Anacardiaceae) (MDEE; YEBOAH; ABEGAZ, 2003).

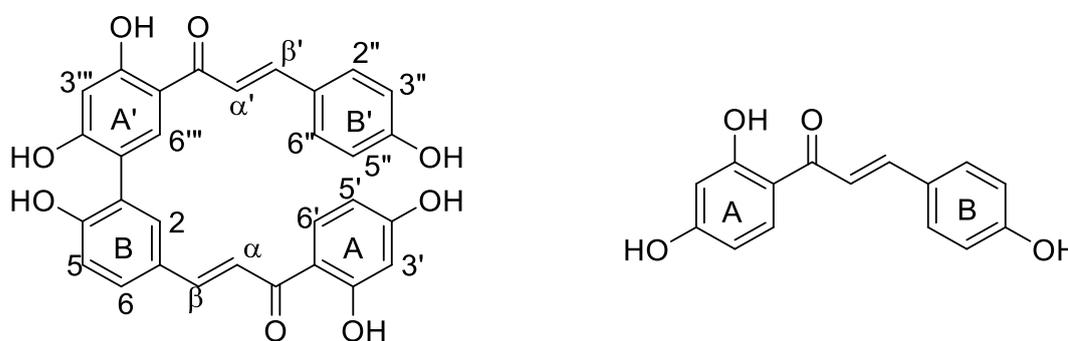


Figura 25 - Ruschalcona VI (1) e isoliquiritigenina.  
Fonte: Do autor

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 27 e 28) foram identificados dois conjuntos de sinais referentes aos alcenos trans  $[\delta_{\text{H}} 7,83$  (1H,  $d$ , 15,6 Hz) e 7,63 (1H,  $d$ , 15,6 Hz)] e  $[\delta 7,79$  (1H,  $d$ , 15,4 Hz) e 7,58 (1H,  $d$ , 15,3 Hz)]. Na região de aromáticos, entre 6 e 8 ppm, verificou-se também

sinais relativos aos hidrogênios do anel *p*-substituído [ $\delta_{\text{H}}$  7,57 (2H, *d*, 8,3 Hz) e 6,78 (2H, *d*, 8,3 Hz)]; ao grupo 2,4-dioxifenil [ $\delta_{\text{H}}$  7,96 (1H, *d*, 9,0 Hz), 6,37 (1H, *dd*, 8,8; 2,3 Hz.) e 6,27 (1H, *d*, 2,3 Hz)]; ao anel aromático tri-substituído [ $\delta_{\text{H}}$  6,95 (1H, *d*, 8,4 Hz), 7,61 (1H, *dd*, 8,3; 2,0 Hz), 7,66 (1H, *sl*)] e ao anel aromático tetra-substituído [ $\delta_{\text{H}}$  7,95 (1H, *s*) e 6,42 (1H, *s*)] (Tabela 6).

Tabela 10 – Dados de RMN da ruschalcona VI (1), 300 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, J/Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (m, J/Hz)*
2	7,66 ( <i>sl</i> )	7,67 ( <i>d</i> , 2,1)
5	6,95 ( <i>d</i> , 8,4)	6,94 ( <i>d</i> , 8,5)
6	7,61 ( <i>dd</i> , 8,3 e 3,0)	7,61 ( <i>dd</i> , 8,5 e 2,1)
3'	6,27 ( <i>d</i> , 2,3)	6,28 ( <i>d</i> , 2,4)
5'	6,37 ( <i>dd</i> , 8,8 e 2,3)	6,37 ( <i>dd</i> , 9,1 e 2,4)
6'	7,96 ( <i>d</i> , 9,0)	7,95 ( <i>d</i> , 9,1)
$\alpha$	7,63 ( <i>d</i> , 15,6)	7,63 ( <i>d</i> , 15,5)
$\beta$	7,83 ( <i>d</i> , 15,6)	7,83 ( <i>d</i> , 15,5)
2''/6''	7,57 ( <i>d</i> , 8,3)	7,57 ( <i>d</i> , 8,7)
3''/5''	6,78 ( <i>d</i> , 8,3)	6,78 ( <i>d</i> , 8,7)
3'''	6,42 ( <i>s</i> )	6,42 ( <i>s</i> )
6'''	7,95 ( <i>s</i> )	7,95 ( <i>s</i> )
$\alpha'$	7,58 ( <i>d</i> , 15,3)	7,58 ( <i>d</i> , 15,7)
$\beta'$	7,79 ( <i>d</i> , 15,3)	7,79 ( <i>d</i> , 15,7)

Fonte: Do autor

Nota: \* 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006).

## 6.6.2 Substância 2

O espectro de massas de alta resolução obtido por HRESIMS, em modo negativo, exibiu um íon quase molecular [M-H]<sup>-</sup> em *m/z* 539,1346 (calcd. para C<sub>31</sub>H<sub>23</sub>O<sub>9</sub>, 539,1342, erro = 0,7 ppm) (Figura 29).

A partir do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 2 (Figura 30), obtido em DMSO-*d*<sub>6</sub>, foi possível verificar sinais em  $\delta_{\text{H}}$  12,66 e  $\delta_{\text{H}}$  11,87, referentes a duas hidroxilas.

Já na região referente aos hidrogênios aromáticos foram identificados sinais correspondentes a dois anéis *p*-substituídos [ $\delta_{\text{H}}$  6,73 (2H, *d*, J= 8,6 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,98 (2H, *d*, J= 8,6 Hz)] e [ $\delta_{\text{H}}$  6,81 (2H, *d*, J= 8,7 Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  7,08 (2H, *d*, J= 8,7 Hz)]. Ainda nesta região, verificou-se os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,26 (1H, *d*, J= 2,0 Hz);  $\delta_{\text{H}}$  7,18 (1H, *d*, J= 8,6 Hz) e um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  6,16 referente a três hidrogênios, que posteriormente, confirmou-se que correspondia aos hidrogênios H-6'' [ $\delta_{\text{H}}$  6,15 (1H, *dd*, J= 8,6; 2,2 Hz)], H-6 [ $\delta_{\text{H}}$  6,17 (1H, *d*, J= 2,0 Hz)] e H-8'' [ $\delta_{\text{H}}$  6,17 (1H, *d*,

$J=2,2$  Hz)]. Este conjunto de sinais observados já sugere que a substância seja pertencente à classe dos biflavonoides (Figura 31).

Na expansão da região mais blindada, entre  $\delta_H$  2,9 e 4,6, foi verificada a presença de uma metoxila em  $\delta_H$  3,66. Também se verificou o sinal referente ao hidrogênio H-2'' em  $\delta_H$  4,57 (1H,  $t$ ,  $J=6,7$  Hz) e um sinal referente aos hidrogênios diasterotópicos H-3a'' e H-3b'' em  $\delta_H$  2,97 (1H,  $dd$ ,  $J=13,9; 6,7$  Hz). Entretanto, o outro sinal de multiplicidade  $dd$  foi sobreposto pelo sinal da água em  $\delta_H$  3,44 (Figura 32).

No espectro de RMN  $^{13}C$  (Figura 33) observou-se os sinais correspondentes aos carbonos C-2'' em  $\delta_C$  48,4 e C-3'' em  $\delta_C$  34,5 e à metoxila OMe-4''' em  $\delta_C$  55,4. Na região de carbonos  $sp^2$  há a presença de 22 sinais, que são referentes aos carbonos dos quatro anéis aromáticos e à dupla ligação, sendo que, na região mais desblindada, entre  $\delta_C$  150 e 170, encontram-se os carbonos ligados diretamente ao oxigênio. Considerou-se que há a sobreposição de carbonos em  $\delta_C$  164,4, devido à maior intensidade deste sinal quando comparados aos demais desta região. Ainda pode-se inferir que os sinais mais intensos em  $\delta_C$  114,0; 115,7; 130,4 e 130,7 correspondem aos carbonos do anel  $p$ -substituído. Também se verificou os sinais referentes aos carbonos carbonílicos C-4 em  $\delta_C$  181,1, que se encontra mais blindado devido ao efeito da dupla conjugada e C-4'' em  $\delta_C$  201,3.

Através do espectro  $^1H \times ^1H$  COSY (Correlation Spectroscopy) pode-se verificar a correlação do hidrogênio H-5'' em  $\delta_H$  7,18 com o hidrogênio H-6'' em  $\delta_H$  6,15. Também foi possível ver a correlação dos hidrogênios dos anéis  $p$ -substituído, onde há o acoplamento dos hidrogênios em  $\delta_H$  7,08 com os hidrogênios em  $\delta_H$  6,81 e o acoplamento dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,73 com os hidrogênios em  $\delta_H$  6,98 (Figura 34).

Ainda no espectro  $^1H \times ^1H$  COSY é possível ver a correlação dos hidrogênios diasterotópicos H-3a'' e H-3b'' em  $\delta_H$  2,97 e em  $\delta_H$  3,44 com o hidrogênio H-2'' em  $\delta_H$  4,57 (Figura 35).

A partir do espectro  $^1H \times ^{13}C$  HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (Figura 36), constata-se a correlação dos hidrogênios H-3a'' e H-3b'' em  $\delta_H$  2,97 e  $\delta_H$  3,44 com o carbono em  $\delta_C$  34,5, o que confirma que estes são hidrogênios diasterotópicos. Também foi observada a correlação do hidrogênio H-2'' em  $\delta_H$  4,57 com o carbono em  $\delta_C$  48,4. Verificou-se ainda a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  3,66 com o carbono em  $\delta_C$  em 55,4, correspondente à metoxila OMe-4'''. E, por fim, as correlações dos hidrogênios dos anéis aromáticos com seus respectivos carbonos: H-2'''/6''' em  $\delta_H$  6,73 com C-2'''/6''' em  $\delta_C$  114, 0; H-3'/5' em  $\delta_H$  6,81 com C-3'/5' em  $\delta_C$  115, 7; H-3'''/5''' em  $\delta_H$  6,98 com C-3'''/5''' em  $\delta_C$  130,4; H-2'/6' em  $\delta_H$  7,08 com C-2'/6' em  $\delta_C$  130,7; H-5'' em  $\delta_H$  7,18 com C-5'' em  $\delta_C$  131,7 e H-8 em  $\delta_H$  6,26 com C-8 em  $\delta_C$  94,1.

A partir da análise  $^1H \times ^{13}C$  HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (Figura 37) em associação com os demais experimentos discutidos anteriormente, foi possível confirmar

a estrutura da substância 2.

Inicialmente verificou-se a correlação dos hidrogênios H-3a'' e H-3b'' em  $\delta_H$  2,97 e  $\delta_H$  3,44 com a carbonila C-4' em  $\delta_C$  201,3, com o carbono C-2'' em  $\delta_C$  48,4, com o carbono C-3''' /5''' em  $\delta_C$  130,4 e com o sinal em  $\delta_C$  119,4, que se refere ao carbono quaternário C-3 (Figura 38).

Foram observadas as correlações do hidrogênio H-2'' em  $\delta_H$  4,57 com os carbonos C-3'' em  $\delta_C$  34,5 e C-3 em  $\delta_C$  119,4. Também foi verificada sua correlação com ambas as carbonilas, em  $\delta_C$  181,1 e 201,3. Há ainda correlação com um sinal em  $\delta_C$  164,4, podendo inferir que seja correspondente ao carbono C-2, já que este é o único carbono diretamente ligado a oxigênio e, portanto, desblindado, presente na vizinhança do hidrogênio H-2''. Pode-se observar também a correlação de H-2'' com um sinal em  $\delta_C$  132,2, referente ao carbono quaternário C-1''' (Figura 39).

Foi possível verificar a correlação dos hidrogênios H-2''' /6''' em  $\delta_H$  6,73 com o carbono C-1'''  $\delta_C$  em 132,1. Ainda se verificou a correlação dos hidrogênios H-2''' /6''' em  $\delta_H$  6,73 e dos hidrogênios H-3''' /5''' em  $\delta_H$  6,98 com o carbono C-4'''  $\delta_C$  em 158,1. Também se observou a correlação do sinal em  $\delta_H$  3,66, correspondente à metoxila, com o carbono C-4''', o que confirma, de forma inequívoca a posição da metoxila neste derivado do biflavonoide caesalpinioflavona (Figura 40).

Verificou-se a correlação dos hidrogênios H-2' /6' em  $\delta_H$  7,08 com o carbono C-2 em  $\delta_C$  164,4 e com um sinal em  $\delta_C$  160,0. Os hidrogênios H-3' /5' em  $\delta_H$  6,81 também correlacionam com este sinal em  $\delta_C$  160,0. Portanto, pode-se inferir que tal sinal corresponde ao carbono C-4'. Ainda há a correlação dos hidrogênios H-3' /5' com o sinal em  $\delta_C$  122,8, referente ao carbono C-1' (Figura 41).

Pode-se verificar que o sinal em  $\delta_C$  99,4 acopla com o hidrogênio H-8 em  $\delta_H$  6,26 e não apresenta correlação com nenhum hidrogênio no espectro de correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC, sendo referente ao carbono quaternário C-10. E assim, o sinal em  $\delta_C$  113,1, que também não apresenta correlação com nenhum hidrogênio no espectro de correlações  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  HSQC corresponde ao carbono quaternário C-10''. Observa-se inclusive que o hidrogênio H-8 também está correlacionado com o sinal em  $\delta_C$  103,5, sendo então este sinal referente ao carbono C-6. Além disso, ainda pode-se inferir que o sinal em  $\delta_C$  103,0 corresponde ao carbono C-8'', pois este encontra-se na posição orto em relação à duas hidroxilas e, portanto, torna-se mais blindado quando comparado ao C-6'' que está na posição orto em relação a uma hidroxila, sendo então o sinal em  $\delta_C$  108,2 corresponde ao C-6''.

Em relação aos demais sinais observados, pode-se inferir que o sinal em  $\delta_C$  157,7 corresponde ao C-9, pois este correlaciona-se apenas com H-8. Já o sinal em  $\delta_C$  165,2 corresponde ao carbono C-7, pois correlaciona-se com H-8 e com o multipletto em  $\delta_H$  6,16, referente ao H-6. E o sinal em  $\delta_C$  161,9, que apresenta correlação com apenas com o multipletto corresponde ao carbono C-5. Há

ainda o sinal em  $\delta_C$  163,5, que acopla com o H-6'' e H-5'' e o sinal em  $\delta_C$  164,4, que acopla com H-8'' e H-5'', assim tais sinais, correspondem à C-7'' e C-9'', respectivamente.

Tabela 11 – Dados de RMN da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Posição	$\delta^{13}C$	$\delta^1H$ (m, J/Hz)
2	164,4	-
3	119,4	-
4	181,1	-
5	161,9	-
6	103,5	6,17 (d, 2,0)
7	165,2	-
8	94,1	6,26 (d, 2,0)
9	157,7	-
10	99,4	-
1'	122,8	-
2'/6'	130,7	7,08 (d, 8,7)
3'/5'	115,7	6,81 (d, 8,7)
4'	160,0	-
2''	48,4	4,57 (t, 6,7)
3a''	34,5	2,97 (dd, 13,9 e 6,7)
3b''	34,5	3,44 (dd)*
4''	201,3	-
5''	131,7	7,18 (d, 8,6)
6''	108,2	6,15 (dd, 8,6 e 2,2)
7''	163,5	-
8''	103,0	6,17 (d, 2,2)
9''	164,4	-
10''	113,1	-
1'''	132,2	-
2'''/6'''	114,0	6,73 (d, 8,6)
3'''/5'''	130,4	6,98 (d, 8,6)
4'''	158,1	-

Fonte: Do autor

Nota: \*O sinal está sobreposto pelo sinal da água.

As atribuições de todos os átomos de carbonos e seus respectivos hidrogênios que foram constatadas encontram-se na Tabela 7.

Dados todos os resultados observados a partir dos espectros de RMN obtidos, foi possível identificar a substância 2 (Figura 42) como sendo um derivado metoxilado inédito do biflavonóide caesalpinioflavona, que foi denominado de 4'''-metoxicaesalpinioflavona.

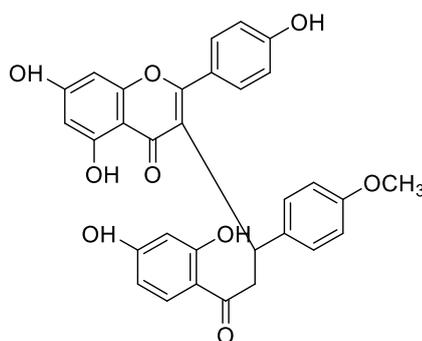


Figura 26 - Estrutura química da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2).  
Fonte: Do autor

### 6.6.3 Substância 3

O espectro de massas de alta resolução foi obtido por HRESIMS em modo negativo exibiu um íon quase molecular  $[M-H]^-$  em  $m/z$  539,1356 (calcd. para  $C_{31}H_{23}O_9$ , 509,1342, erro = 2,6 ppm) (Figura 43).

Todos os espectros obtidos a partir da substância 3 (Figura 44, 45, 46, 47 e 48) foram analisados de forma semelhante às análises descritas anteriormente para a substância 2 e constatou-se que esta se trata de outro derivado metoxilado inédito do biflavonóide caesalpinioflavona, diferindo apenas a posição da metoxila, que neste caso encontra-se ligada ao carbono C-7. Dessa forma, tal substância pode ser denominada 7-metoxicaesalpinioflavona (Figura 49).

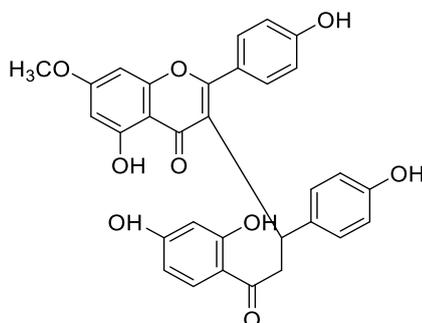


Figura 27 - Estrutura química da 7-metoxicaesalpinioflavona (3).  
Fonte: Do autor

As atribuições de todos os átomos de carbono e seus respectivos hidrogênios que foram constatadas encontram-se na Tabela 8.

Tabela 12 – Dados de RMN da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J/Hz)
2	164,6	-
3	119,6	-
4	181,4	-
5	157,7	-
6	92,7	6,57 (d, 2,0)
7	165,9	-
8	98,6	6,36 (d, 2,0)
9	161,6	-
10	104,4	-
1'	122,7	-
2'/6'	130,7	7,07 (d, 8,7)
3'/5'	115,7	6,81 (d, 8,7)
4'	160,1	-
2''	48,6	4,55 (t, 6,9)
3a''	34,5	2,98 (dd, 13,9 e 7,14)
3b''	34,5	3,55 (dd)*
4''	201,2	-
5''	131,7	7,17 (d, 8,6)
6''	108,3	6,15 (dd, 9,4 e 2,2)
7''	163,5	-
8''	103,0	6,16 (d, 2,2)
9''	164,8	-
10''	113,1	-
1'''	130,3	-
2'''/6'''	130,4	6,85 (d, 8,6)
3'''/5'''	115,4	6,56 (d, 8,6)
4'''	156,0	-

Fonte: Do autor

Nota: \*O sinal está sobreposto pelo sinal da água.

## 6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS

Realizou-se o ensaio anti-inflamatório com as substâncias isoladas ruschalcona VI (1) e 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2) e com a caesalpinioflavona, já que se verificou que se tratam de

biomarcadores da atividade anti-inflamatória.

### 6.7.1 Edema de orelha

A partir do ensaio realizado, pode-se constatar o significativo potencial anti-inflamatório das substâncias isoladas ruschalcona VI, 4'''-metoxicaesalpinioflavona e da caesalpinioflavona, quando comparadas ao veículo (Figura 50).

Houve redução de cerca de 43,07%, 47,38% e 69,23% do edema de orelha nos grupos tratados com a ruschalcona VI, 4'''-metoxicaesalpinioflavona e caesalpinioflavona, respectivamente. Os valores encontrados são equiparáveis ao apresentado pelo fármaco referência, destacando-se a caesalpinioflavona, que inclusive demonstrou potencial superior àquele apresentado pelo fármaco de referência, indometacina (Tabela 9).

Tabela 13 - Efeito das substâncias no edema da orelha exibido em percentagem de inibição.

Amostra	Edema de orelha (mg) média ± EMP	% de inibição
Caesalpinioflavona	1,0 ± 0,7 <sup>*,#</sup>	69,23
4'''-metoxicaesalpinioflavona	1,71 ± 0,9 <sup>*</sup>	47,38
Ruschalcona VI	1,85 ± 0,4 <sup>*</sup>	43,07
Veículo	3,25 ± 0,8 <sup>#</sup>	---
Indometacina	1,84 ± 0,8 <sup>*</sup>	43,38
Dexametasona	1,43 ± 0,8 <sup>*</sup>	56,00

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média ± EMP. \* indica os níveis de significante diferença em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência, indometacina, onde  $p \leq 0,05$ .

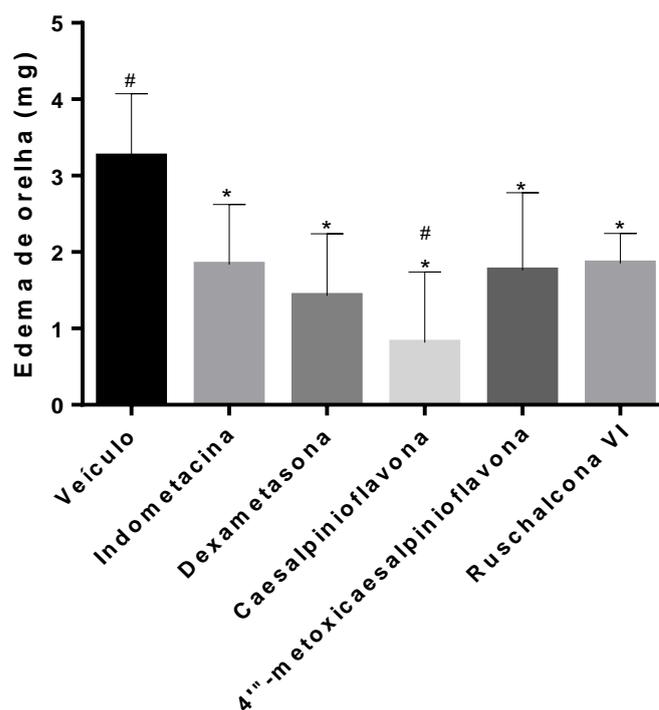


Figura 28 - Avaliação da atividade anti-inflamatória das substâncias no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett. \* indica os níveis de significante diferença em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência, indometacina, onde  $p \leq 0,05$ .

### 6.7.2 Ensaio de MPO para avaliar recrutamento de neutrófilos

As substâncias isoladas ruschalcona VI, 4'''-metoxicaesalpinioflavona e a caesalpinioflavona, apresentaram resultados extremamente significativos frente à inibição da MPO quando comparado ao veículo (Figura 51), destacando-se a ruschalcona VI, que inclusive demonstrou potencial superior àquele apresentado pelo fármaco de referência, dexametasona (Tabela 10).

Dessa forma, tais substâncias apresentaram pela primeira vez significativo potencial anti-inflamatório, demonstrando ser capaz de promover a inibição dual da produção de prostaglandinas e leucotrienos.

Tais resultados corroboram com aqueles obtidos estatisticamente por meio das análises metabolômicas, onde já havia sido constatado que estas substâncias de tratam de biomarcadores da atividade anti-inflamatória. Sendo assim, torna-se clara a importância das ferramentas metabolômicas a fim de direcionar o isolamento de substâncias de interesse, de modo a otimizar os procedimentos fitoquímicos.

Tabela 14 – Efeito das substâncias no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).

Amostra	Absorbância média ± EMP
Caesalpinioflavona	0,48 ± 0,09*
4'''-metoxicaesalpinioflavona	0,60 ± 0,15* #
Ruschalcona VI	0,16 ± 0,05* #
Veículo	0,95 ± 0,07#
Dexametasona	0,44 ± 0,04*

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média ± EMP. \* indica os níveis de significante diferença em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$ .

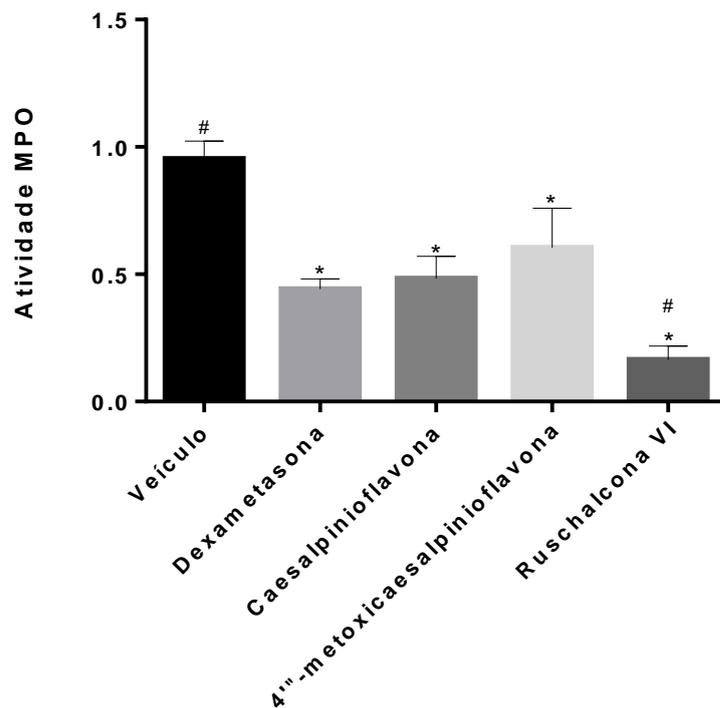


Figura 29 - Efeito das substâncias no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).

Fonte: Do autor

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett. \* indica os níveis de significante diferença em comparação com o veículo, onde  $p \leq 0,05$ . # indica os níveis de significante diferença em comparação com o fármaco referência, dexametasona, onde  $p \leq 0,05$ .

## 7 CONCLUSÃO

As frações de *C. pluviosa*, se mostraram extremamente promissoras na busca por novos agentes anti-inflamatórios e citotóxicos. Todas as frações, exceto uma, foram capazes de reduzir tanto a formação de edema quanto o recrutamento de neutrófilos, sendo que, as substâncias isoladas 4''-metoxicaesalpinioflavona e ruschalcona VI e a caesalpinioflavona confirmaram esta propriedade e a 7-metoxicaesalpinioflavona posteriormente será também avaliada. Em relação aos ensaios citotóxicos, algumas das frações avaliadas apresentaram um percentual de inibição da viabilidade celular em torno de 50%, o que é bastante significativo se tratando de extratos. Se verificou que estas substâncias também se correlacionam positivamente com a atividade citotóxica, portanto, deverão ser submetidas adicionalmente aos ensaios de citotoxicidade. Deve-se ainda ressaltar que a caesalpinioflavona, um dos biomarcadores constatados nas análises, já teve sua atividade citotóxica anteriormente relatada.

Tais resultados corroboram aqueles obtidos por meio das ferramentas metabolômicas, que direcionaram claramente o isolamento das substâncias de interesse, salientando a grande importância destas abordagens para a análise de misturas complexas.

Além disso, ainda é importante destacar que os biomarcadores isolados demonstraram mecanismo anti-inflamatório requerido, possivelmente serão mais eficazes e ocasionará menores efeitos adversos que os medicamentos comercializados atualmente. Outros biomarcadores permaneceram não identificados o que torna a série de frações obtidas de *C. pluviosa* muito promissora para o isolamento de novas substâncias e moléculas bioativas.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; ANWAR, F.; HIRA, S. Review on medicinal importance of Fabaceae family. **Pharmacology Online**, Pakistan, v. 3, p. 151–156, 2016
- ALEXANDER, D.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R2: Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, DC p. 1-25, 2015.
- ANGIOSPERM, T H E GROUP, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, 141, p. 399–436, 2003.
- ARETZ, I; MEIERHOFER, D. Advantages and pitfalls of mass spectrometry based metabolome profiling in systems biology. **International Journal of Molecular Sciences**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 1-14, 2016.
- BALDIM, J. L. B. **Estudo químico e bioprospecção de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides***. 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012a.
- BALDIM, J. L. B. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, sl, v. 17 p. 7887–7902, 2012b.
- BALDIM, J. L. B. et al., Caesalpinioflavone, a new cytotoxic biflavonoid isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, sl, v. 26, n. 4, p. 804–809, 2015.
- BALDIM, J. L. B. et al. The Correlation between chemical structures and antioxidant , prooxidant , and antitrypanosomatid properties of flavonoids. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, sl, v. 2017, p. 1-12, 2017.
- BALDIMI, J. C. et al. Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear edema in mice - a comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory arugs. **Phytotherapy Research**, sl, v. 6, n. 1, p. 1–5, 1992.
- BOUSLIMANI, A. et al. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Product Reports**, sl, v. 31, n. 6, p. 718-729, 2014.
- BUENO, F. G. et al. Enhanced cutaneous wound healing *in vivo* by standardized crude extract of *Poincianella pluviosa*. **Plos One**, San Francisco, p. 1–13, 2016.
- CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). **Planta medica**, sl, v. 69, n.1, p. 973–983, 2003.
- CARDINAL, S. et al. Anti-inflammatory properties of quebecol and its derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, sl, v. 26, n. 2, p. 440–444, 2016.

CARVALHO, B. A. **Estudo químico e avaliação das propriedades biológicas de folhas e flores de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides***. 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

CARVALHO, B. A. et al. Essential oil from *Caesalpinia peltophoroides* flowers – chemical composition and *in vitro* cytotoxic evaluation. **Natural Product Communications**, sl, v. 8, n.5, p. 679–682, 2013.

CHAGAS-PAULA, D. A. **Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* ( Asteraceae )**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 136, n. 2, p. 355–362, 2011.

CHAGAS-PAULA, D. A. **Estudos metabolômicos de Astedraceae por UPLC - UV - HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico***. 2013. 118f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. **Planta Medica**, sl, v. 81, n. 6, p. 450–458, 2015a.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. A metabolomic approach to target compounds from the asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites**, sl, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015b.

CHA, Y. I.; DUBOIS, R. N. NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2. **Annu. Rev. Med.**, sl, v. 58, p. 239–52, 2007.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature Publishing Group**, sl, v. 420, n. December, p. 860-867, 2002.

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

DEHARO, E et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach . Part V . Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 77, p. 91–98, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA FLORESTAS; CARVALHO, P. E. R. **Sibipiruna (*Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*)**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies\\_arboreas\\_brasileiras/arvore/CONT000f u1aqjv302wyiv807nyi6scjx0ro9.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000f u1aqjv302wyiv807nyi6scjx0ro9.html)> Acesso em junho/2017.

- ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, sl, v. 31, n. 6, p. 784, 2014.
- EVAN, G. I; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, sl, v. 411, p. 342-348, 2001.
- FACHINI-QUEIROZ, F. C. et al. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, sl, v. 2012, p. 1-10, 2012.
- FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, sl, v. 48, n. 1-2, p. 155-171, 2002.
- FLORES, Y.; VILA, J.; ALMANZA, G. R. Secondary metabolites from *Caesalpinia pluviosa*. **Bolivian Journal Of Chemistry**, sl, n. 1, p. 1-8, 2006.
- FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Quimica Nova**, sl, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.
- GIACOMINI, F. et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on *in vitro* cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, sl, v. 99, p. 252-260, 2014.
- GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! **Journal of Molecular Graphics and Modelling** 20, sl, v. 20, p. 269-276, 2002.
- GORROCHATEGUI, E. et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, sl, v. 82, p. 425-442, 2016.
- GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, sl, v. 879, p. 10-23, 2015.
- HAWKINS, D. M. The Problem of Overfitting. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, sl, v. 44, n. 1, p. 1-12, 2004.
- HEMALATHA, K. et al. Analgesic activity of *Caesalpinia sappan*. Heartwood. **Pharmaceutical Biology**, sl, v. 209, n.5, p. 18-21, 2017.
- INAMURA, H. et al. Expression of adhesion molecules on cord-blood-derived, cultured human mast cells and effect of dexamethasone on intercellular adhesion molecule-1 expression on the mast cells treated by phorbol myristate acetate. **Allergy**, sl, v. 4, n. 5, p. 672-678, 2001.
- KATAJAMAA, M.; OREŠIČ, M.. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics.

**Journal of Chromatography A**, sl, v. 1158, n. 1–2, p. 318–328, 2007.

KAUR, G.; SILAKARY, O. Multiple target-centric strategy to tame inflammation. **Medicinal Chemistry**, sl, v. 9, p. 1361–1376, 2017.

KAYANO, A. C. A. V. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. **Malaria Journal**, sl, p. 1–11, 2011.

KELLOGG, J. J. et al. Comparison of metabolomics approaches for evaluating the variability of complex botanical preparations: green tea (*Camellia sinensis*) as a case study. **Journal of Natural Products**, sl, p. 1–9, 2017.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, sl, v. 19, n. 12, p. 1871–1882, 2015.

KONG, W.; HOOPER, K. M.; GANEA, D. The natural dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitor flavocoxid is protective in EAE through effects on Th1/Th17 differentiation and macrophage/microglia activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, sl, v. 53, p. 59–71, 2016.

KOROTKOVA, M.; LUNDBERG, I. E. The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease. **Nature Reviews Rheumatology**, sl, v. 10, n. 5, p. 295–303, 2014.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A Primer. **Trends in Biochemical Sciences**, sl, v. 42, n. 4, p. 274–284, 2017.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Mol Cancer Res**, sl, v. 4, p. 221–233, 2006.

MADSEN, R.; LUNDSTEDT, T.; TRYGG, J. Chemometrics in metabolomics — A review in human disease diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, sl, v. 659, p. 23–33, 2010.

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

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, sl, v. 454, n. July, p. 436–444, 2008.

MASSONI, M. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato da raiz de *Caesalpinia var. peltophoroides*: isolamento, caracterização e modificação estrutural envolvendo a obtenção de complexos de rutênio, platina e vanádio**. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

MASSONI, M. et al. Propyl gallate metal complexes: Circular dichroism, BSA-binding, antioxidant and cytotoxic activity. **Polyhedron**, sl, v. 129, p. 214–221, 2017.

MDEE, L. K.; YEBOAH, S. O.; ABEGAZ, B. M. Rhuschalcones II - VI, five new bichalcones from the root bark of *Rhus pyroides*. **Journal of Natural Products**, sl, v. 66, n.5, p. 599–604,

2003.

MEDZHITOV, R. Overview Essay Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, sl, v. 140, p. 771–776, 2010.

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

MENG, H.; LIU, Y.; LAI, L. Diverse ways of perturbing the human arachidonic acid metabolic network to control inflammation. **Accounts of Chemical Research**, sl, v. 48, n. 8, p. 2242–2250, 2015.

MIHIGO, S. O. et al. Total synthesis, antiprotozoal and cytotoxicity activities of rhuschalcone VI and analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, sl, v. 18, n. 7, p. 2464–2473, 2010.

NAWWAR, M. A. et al. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, sl, p. 553–558, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, sl, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWTON, R. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. **European Journal of Pharmacology**, sl, p. 1–6, 2013.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, sl, v. 30, n. 4, p. 584, 2013.

OGUNGBE, I. V.; ERWIN, W. R.; SETZER, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, sl, v. 48, p. 105–117, 2014.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Publishing Group**, sl, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.

PALLIO, G. et al. Use of a balanced dual cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase inhibitor in experimental colitis. **European Journal of Pharmacology**, sl, v. 789, p. 152–162, 2016.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: Is two better than One? **Journal of Rheumatology**, sl, v. 28, n. 11, p. 2375–2382, 2001.

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

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, sl, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.

SARAIVA, R. A. et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 136, p. 504–510, 2011.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell Cycle - Targeted Cancer Therapies. **Review in Advance first**, sl, p. 1–17, 2017.

SLAVICH, G. M. Understanding inflammation, its regulation, and relevance for health: A top scientific and public priority. **Brain, Behavior, and Immunity**, sl, v. 45, p. 13–14, 2015.

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

SOSA, S. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, v. 81, n. 2, p. 211–215, 2002.

STANBURY, R. M.; GRAHAM, E. M. Systemic corticosteroid therapy - side effects and their management. **Br J Ophthalmol**, sl, p. 704–708, 1998.

STEINHILBER, D.; HOFMANN, B. Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, sl, v. 114, n. 1, p. 70–77, 2014.

TAKEMURA, T. et al. Screening of the growth-inhibitory effects of 168 plant species against Lettuce Seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, sl, p. 1095–1104, 2013.

TRYGG, J.; HOLMES, E. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, sl, v. 6, p. 469–479, 2007.

TUBARO, A.; DRI, P.; MELATO, M.; et al. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. **Agents and Actions**, sl, v. 19, n. 5–6, p. 371–373, 1986a.

TUBARO, A. et al. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, sl, v. 17, n. 3-4, p. 347–349, 1986b.

ULRICH, C. M.; BIGLER, J.; POTTER, J. D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. **Nature**, sl, v. 6, n. February, p. 130–140, 2006.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, sl, v. 36, p. 131–149, 2003.

VILLAS-BOAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, sl, v. 23, n.8, p. 385-386, 2005

WANG, D; DUBOIS, R. N. Prostaglandins and cancer. **Recent advances in basic science**, sl, v. 55, p. 115-122, 2006.

WEI, H. et al. New Cassane Diterpenes from the seeds of *Caesalpinia decapetala*. **Phytochemistry Letters**, sl, v. 16, p. 52-55, 2016.

WERNER, E. et al. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. **Journal of Chromatography B**, sl, v. 871, n. 2, p. 143–163, 2008.

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

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

WU, J. et al. Seven new cassane furanoditerpenes from the seeds of *Caesalpinia minax*. **Fitoterapia**, sl, v. 92, p. 168–176, 2014.

YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, sl, v. 914, p. 17–34, 2016.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, sl, v. 25, n. 2, p. 157–169, 2011.

ZHONG, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory effects of volatile oils from processed products of *Angelica sinensis* radix by GC–MS-based metabolomics. **Journal of Ethnopharmacology**, sl, 2016.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A – Espectros

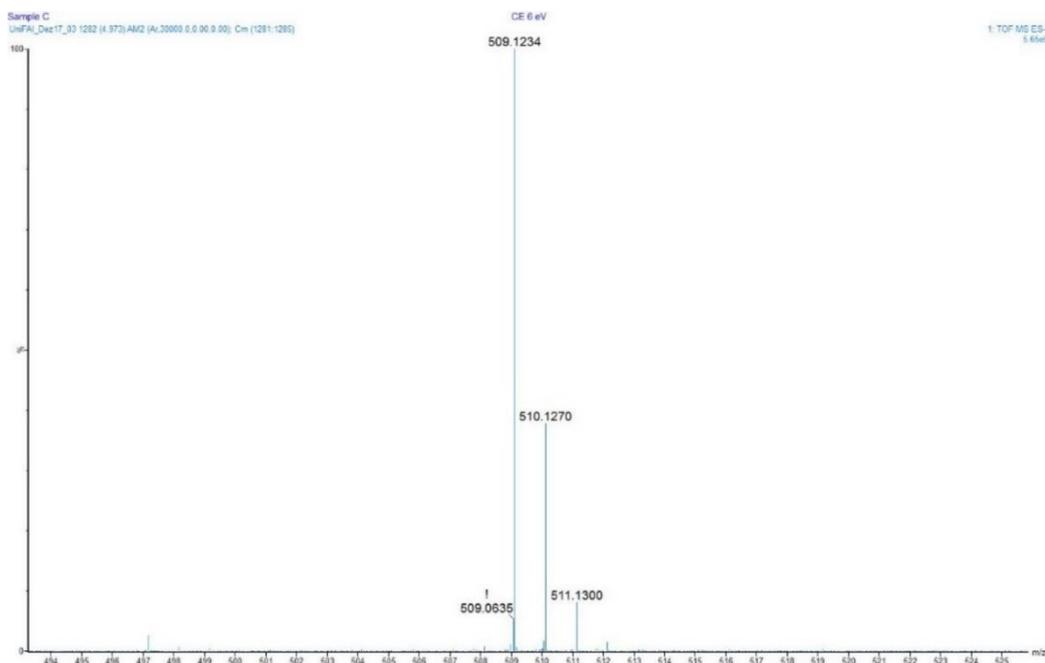
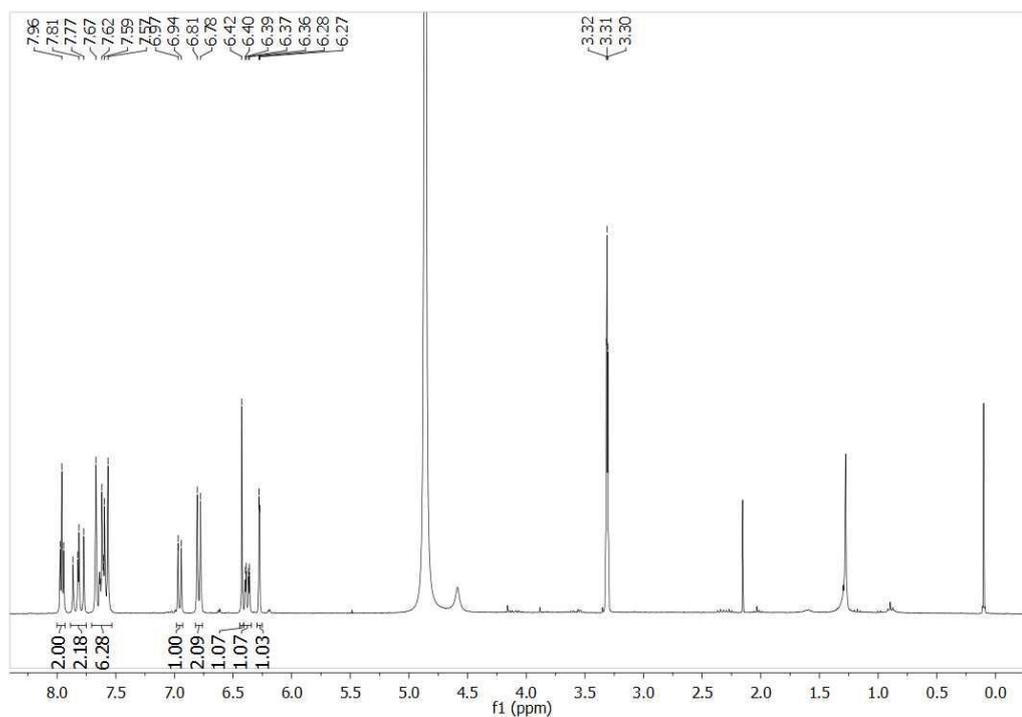


Figura 25 - Espectro de massas da ruschalcona VI (1).

Fonte: Do autor

Figura 27 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da ruschalcona VI (1), 300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Fonte: Do autor

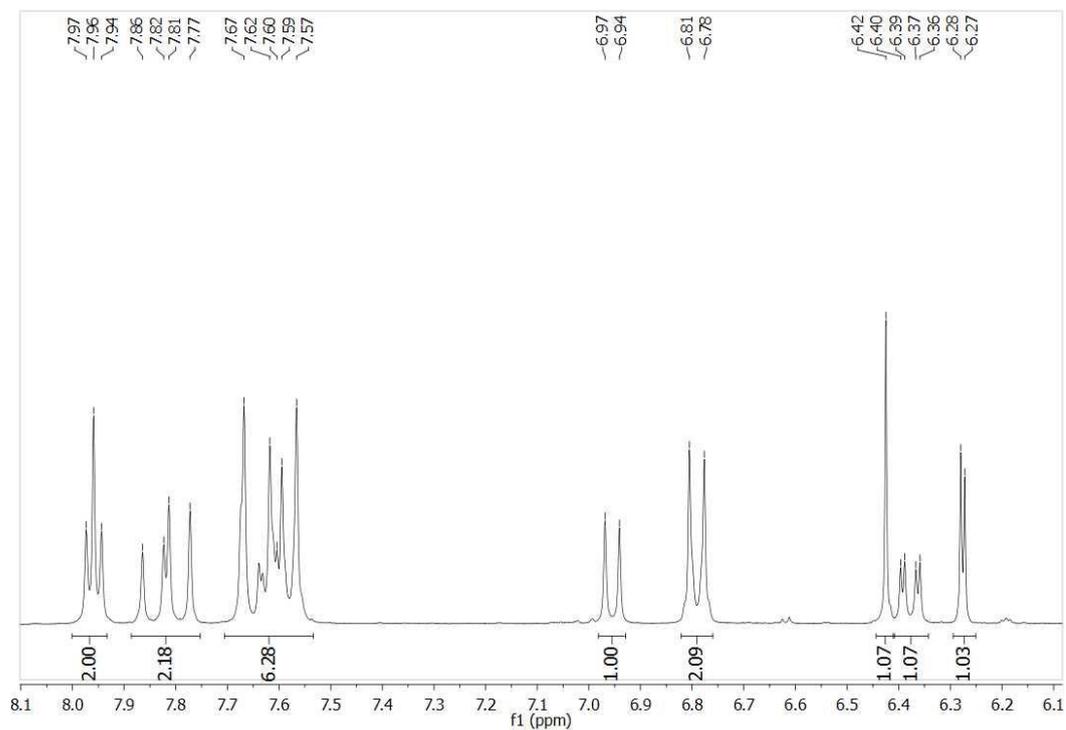


Figura 30 – Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da ruschalcona VI (1), 300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ .  
Fonte: Do autor

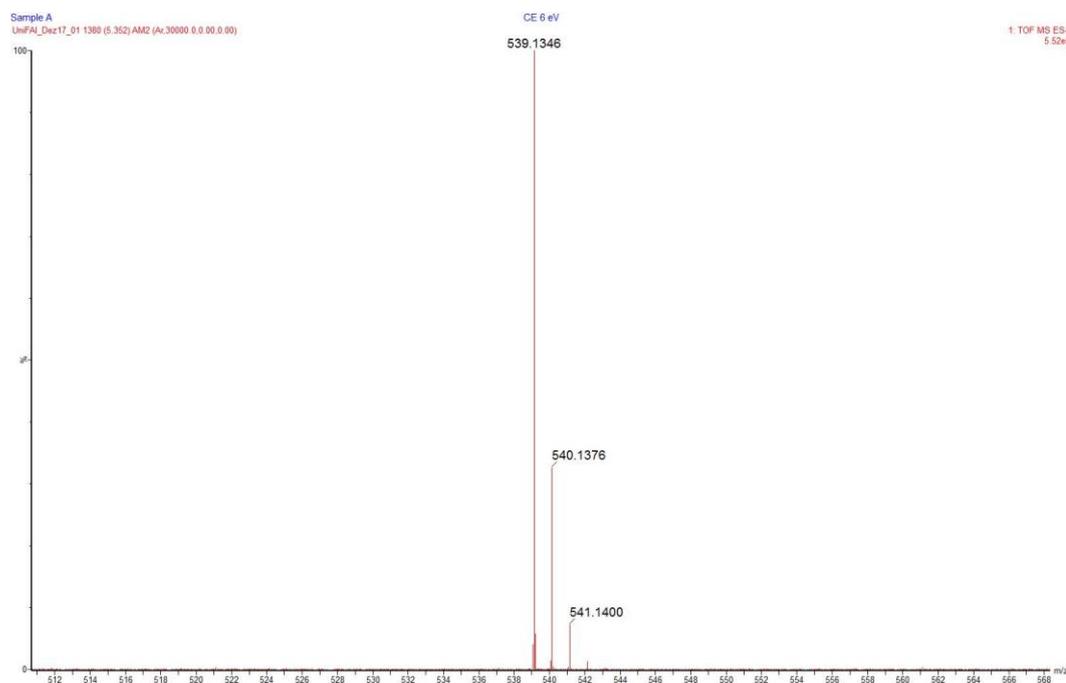


Figura 31 - Espectro de massas da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2).  
Fonte: Do autor

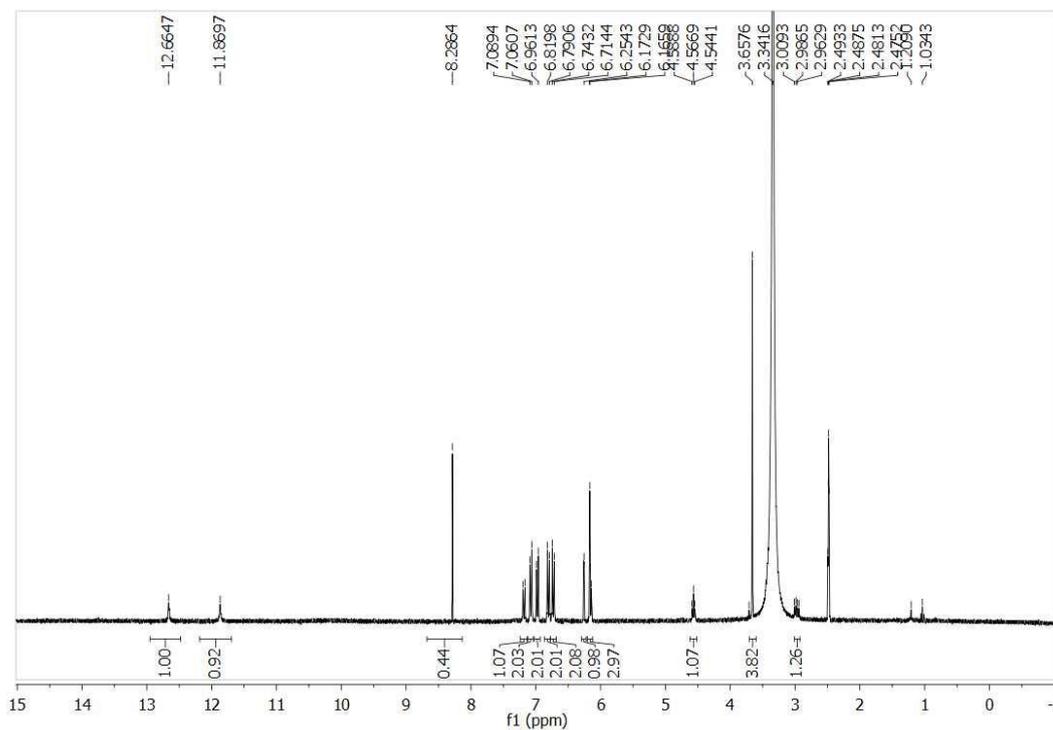


Figura 32 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .  
Fonte: Do autor

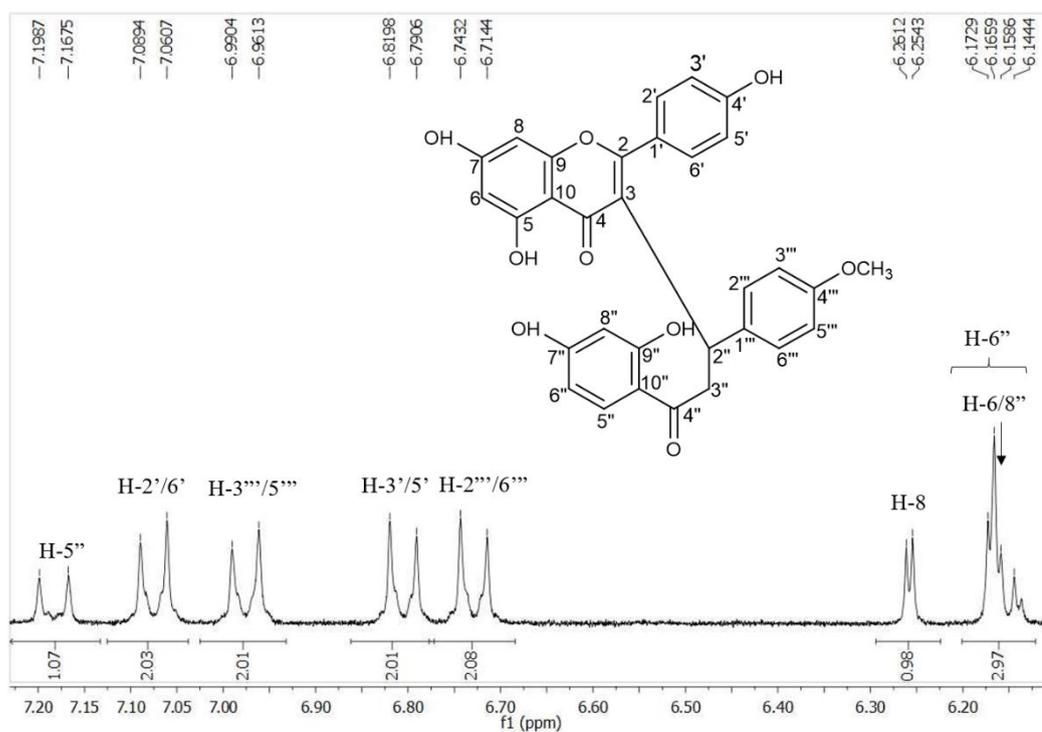


Figura 33 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .  
Fonte: Do autor

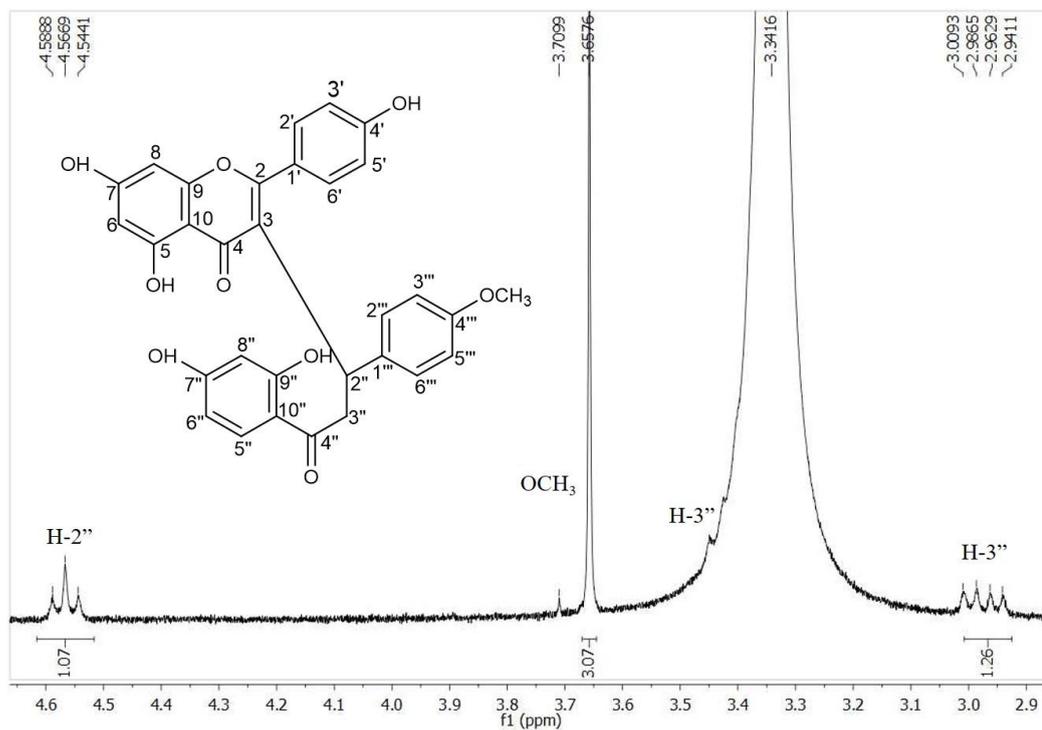


Figura 34 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ .  
Fonte: Do autor

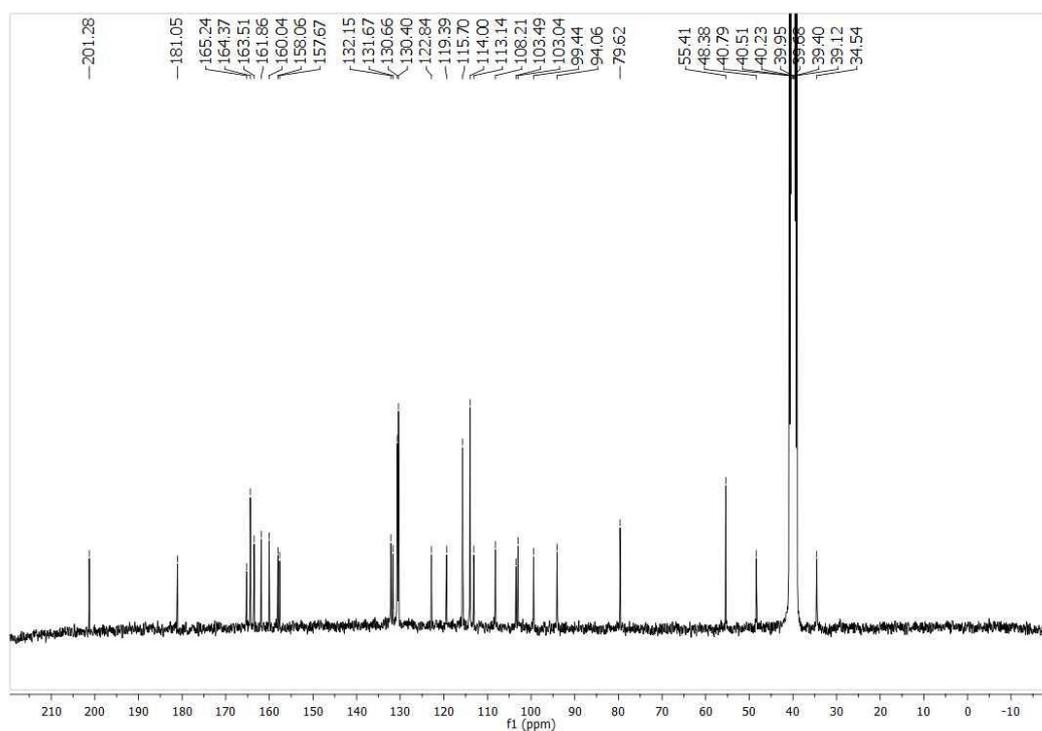


Figura 35 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ .  
Fonte: Do autor

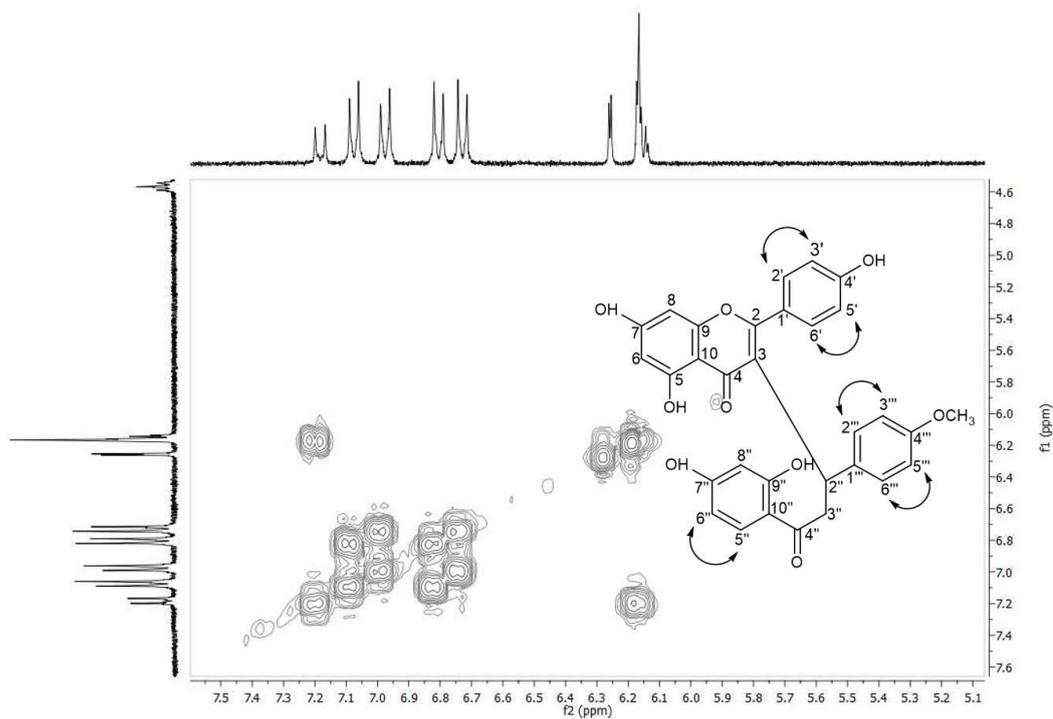


Figura 36 – Espectro de correlação COSY da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

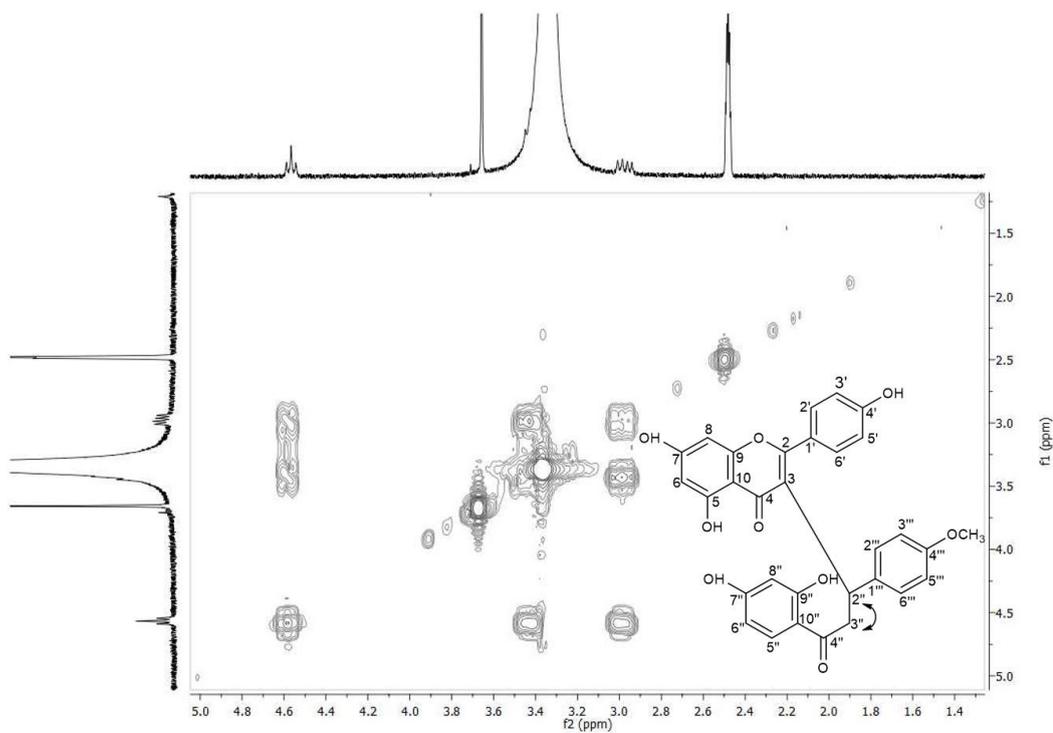


Figura 37 – Espectro de correlação COSY da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

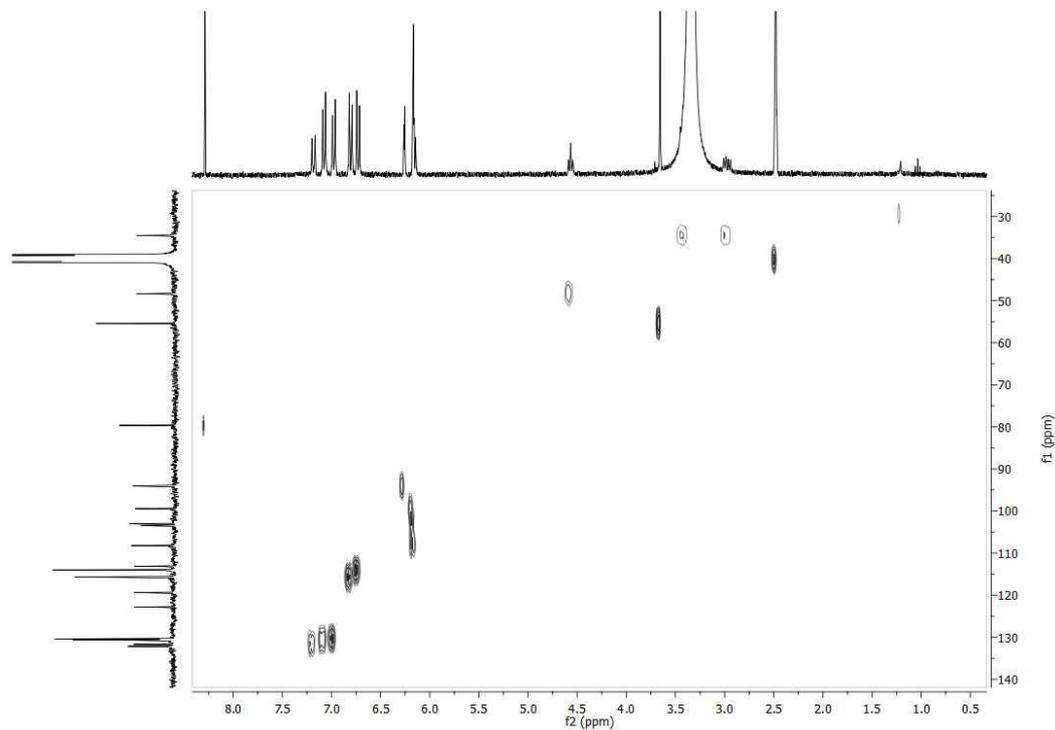


Figura 38 – Espectro de correlação HSQC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

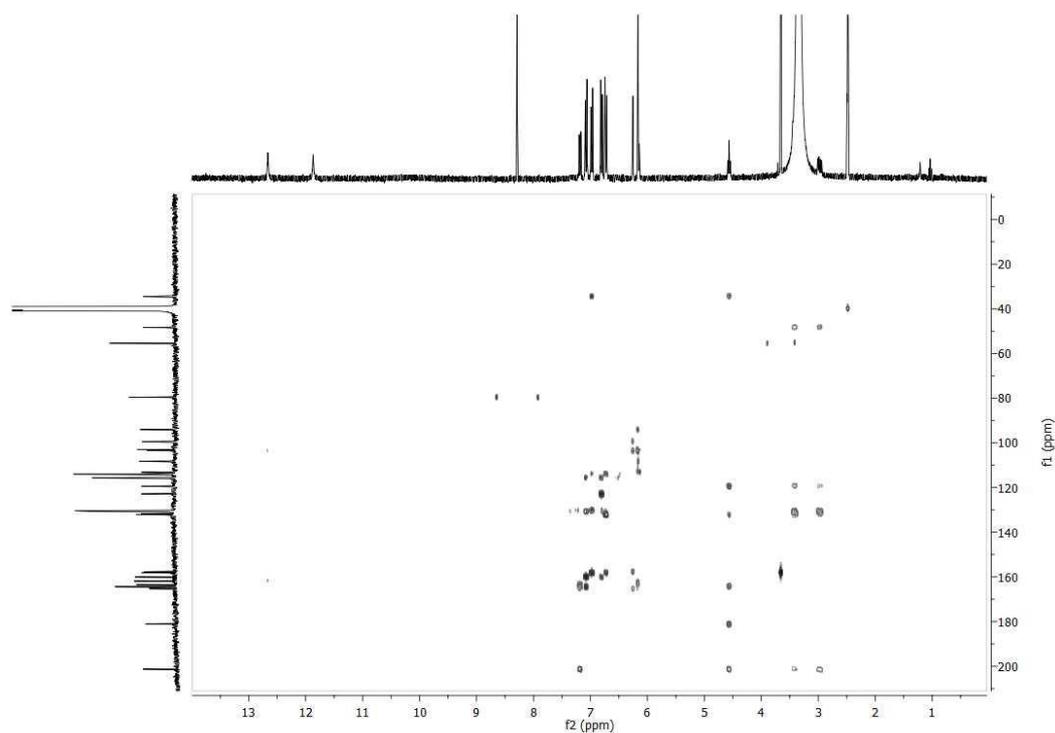


Figura 39 – Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

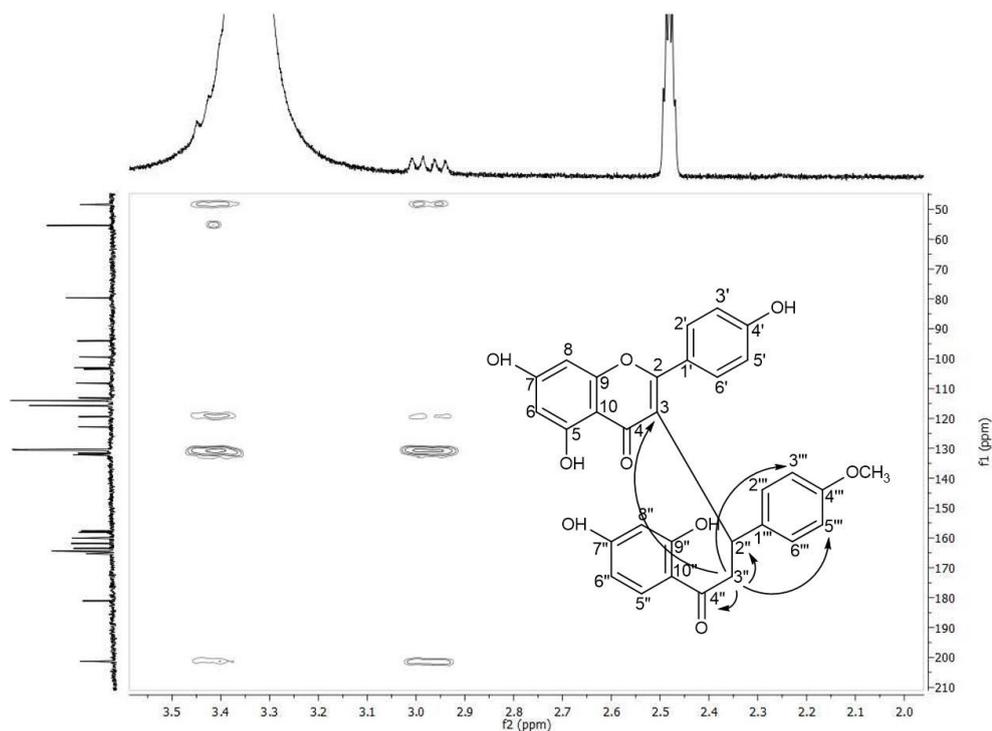


Figura 40 – Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2) 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

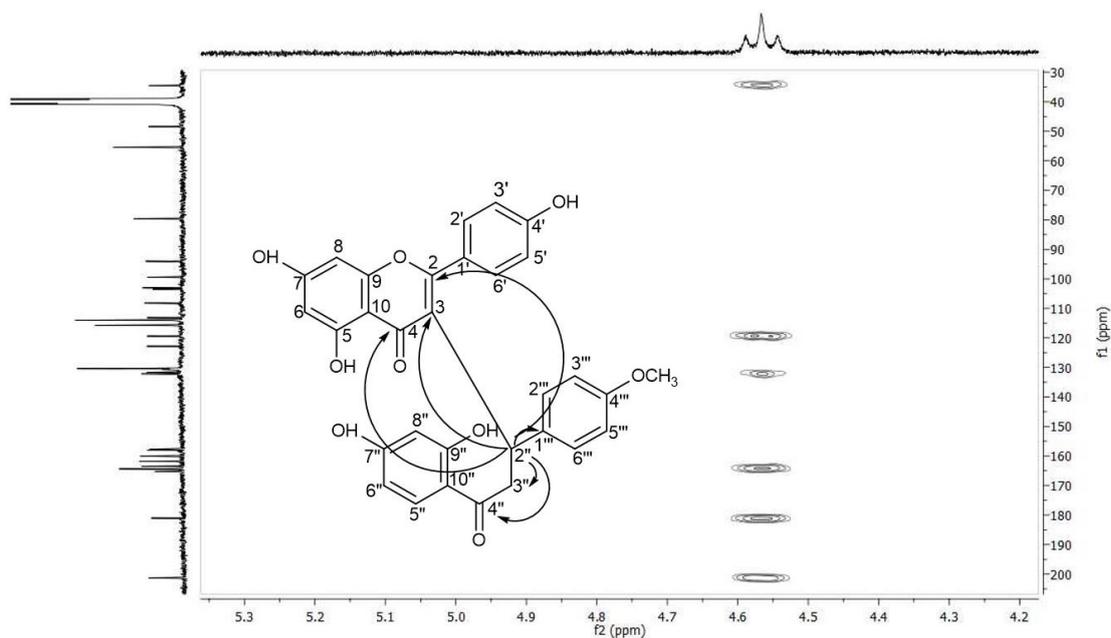


Figura 41– Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

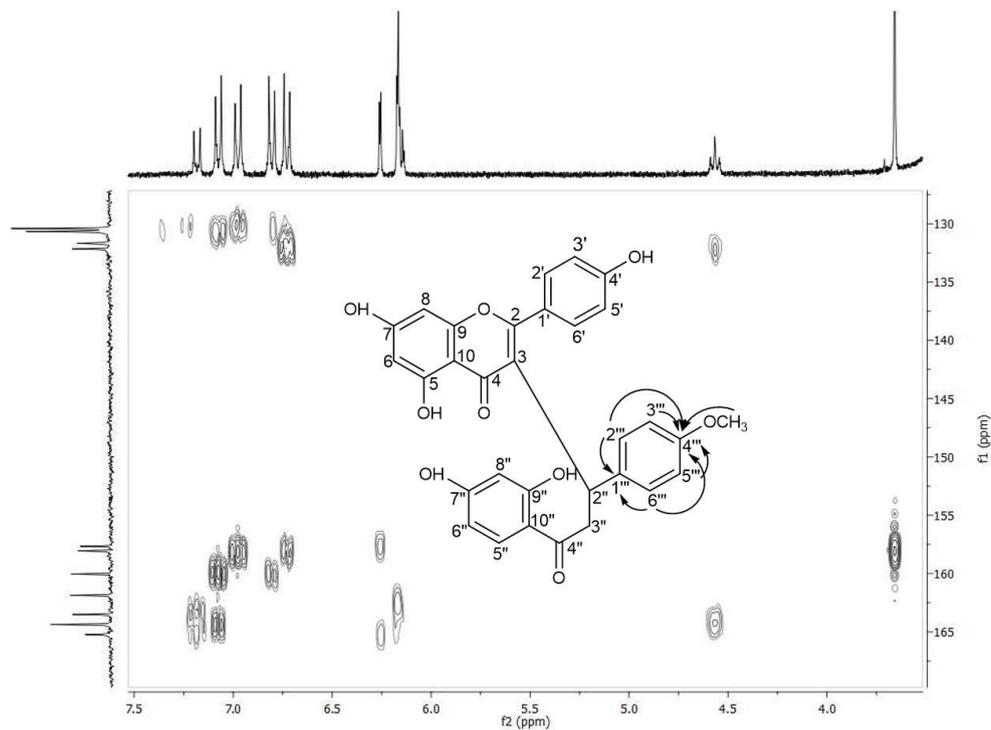


Figura 42 – Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

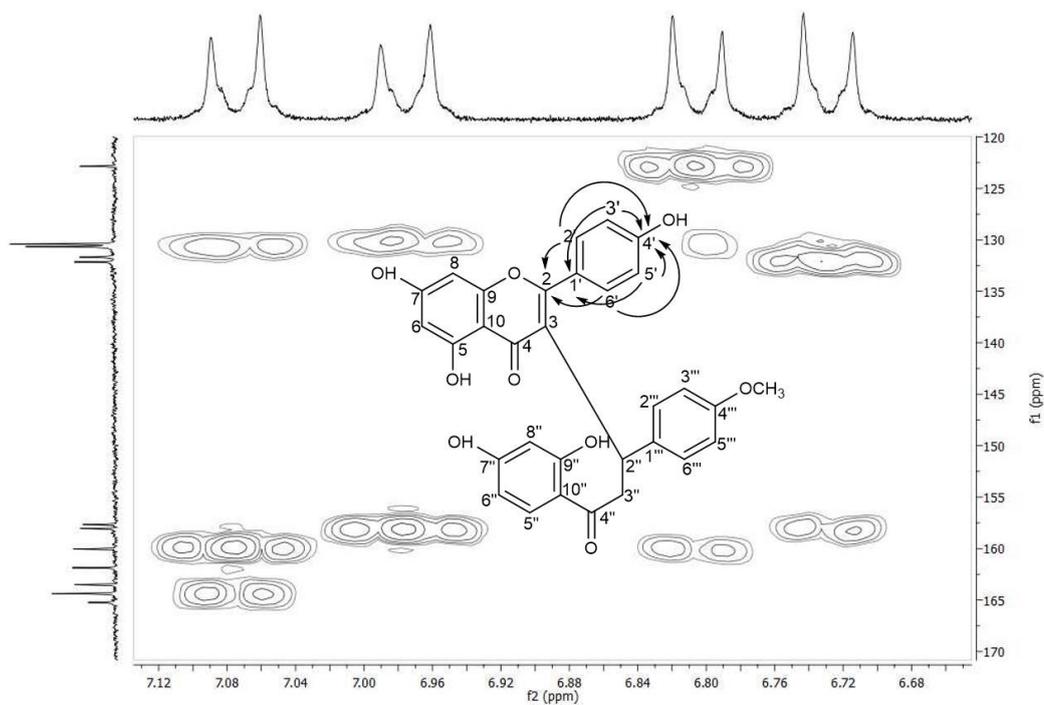


Figura 43 – Espectro de correlação HMBC da 4'''-metoxicaesalpinioflavona (2), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

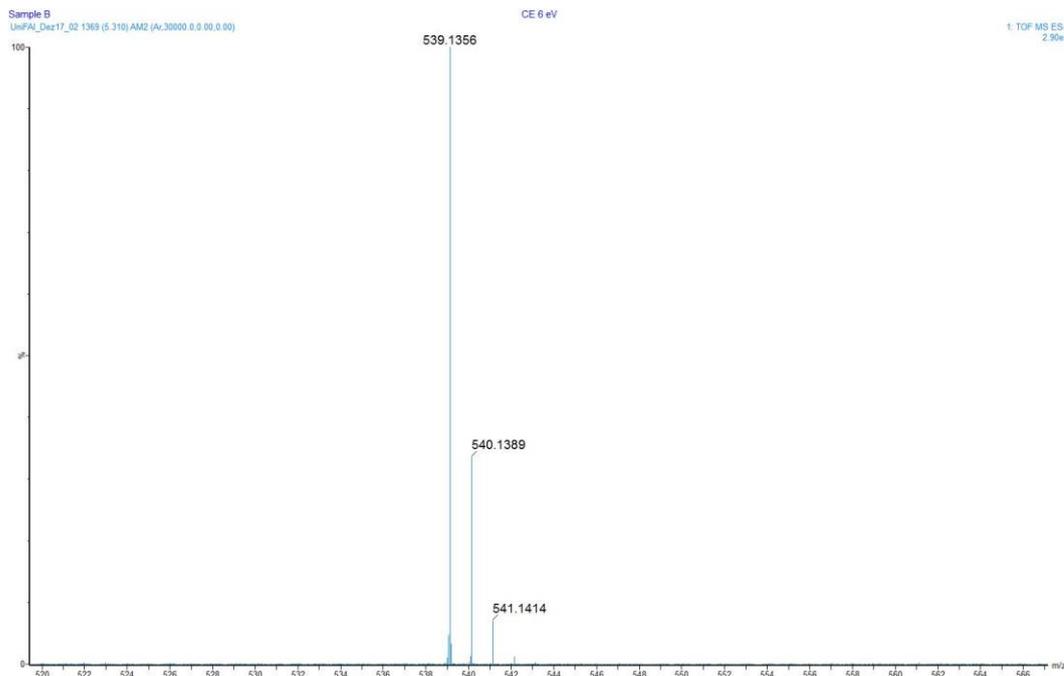


Figura 44 - Espectro de massas da 7-metoxicaesalpinioflavona (3).

Fonte: Do autor

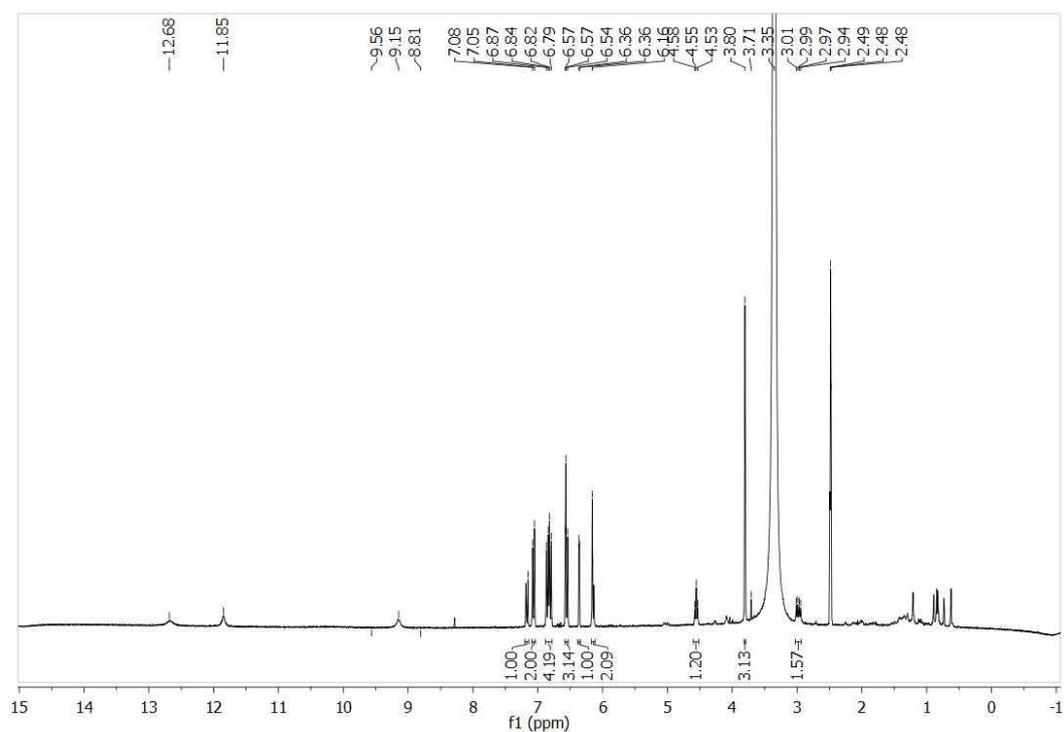


Figura 45 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .

Fonte: Do autor

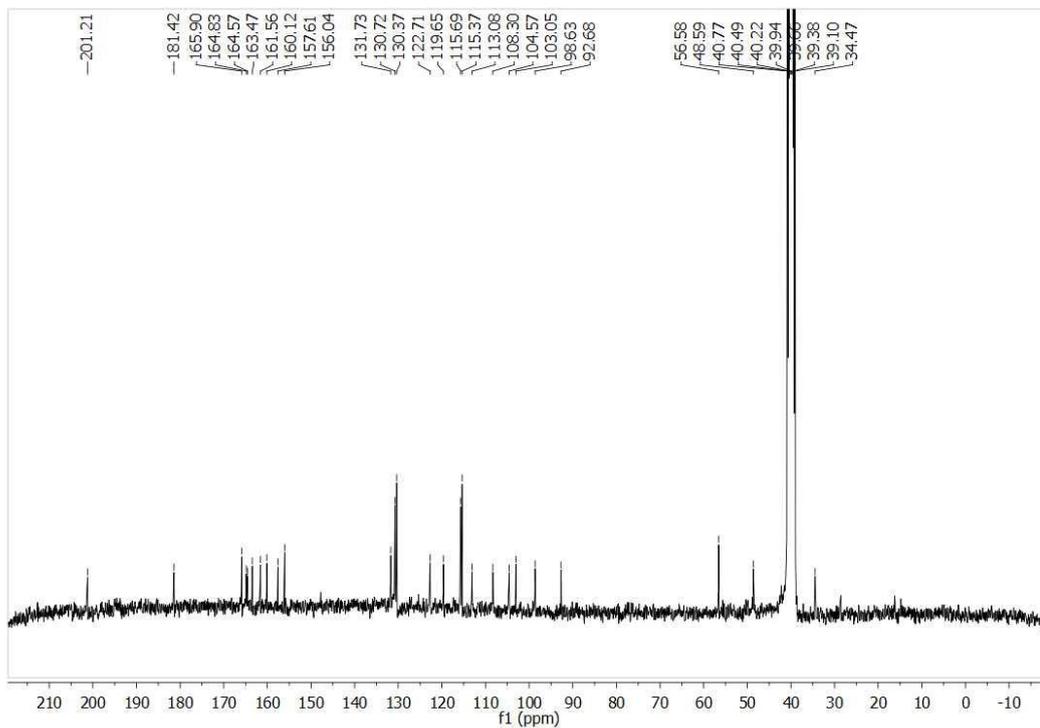


Figura 46 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .  
Fonte: Do autor

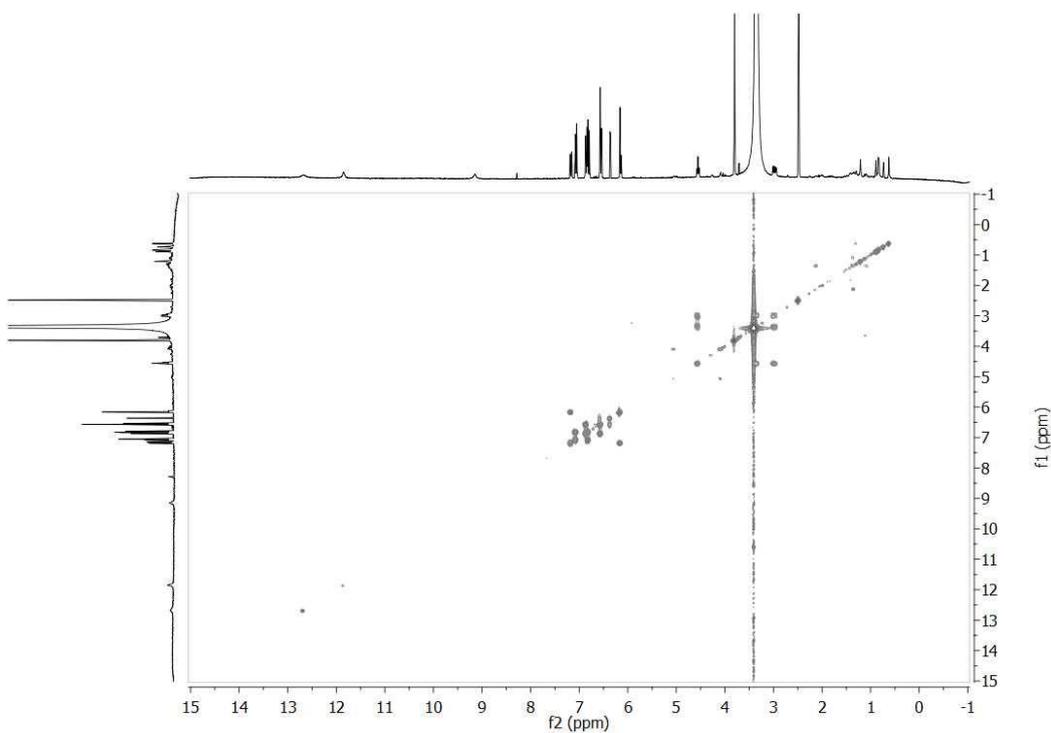


Figura 47 – Espectro de correlação COSY da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ .  
Fonte: Do autor

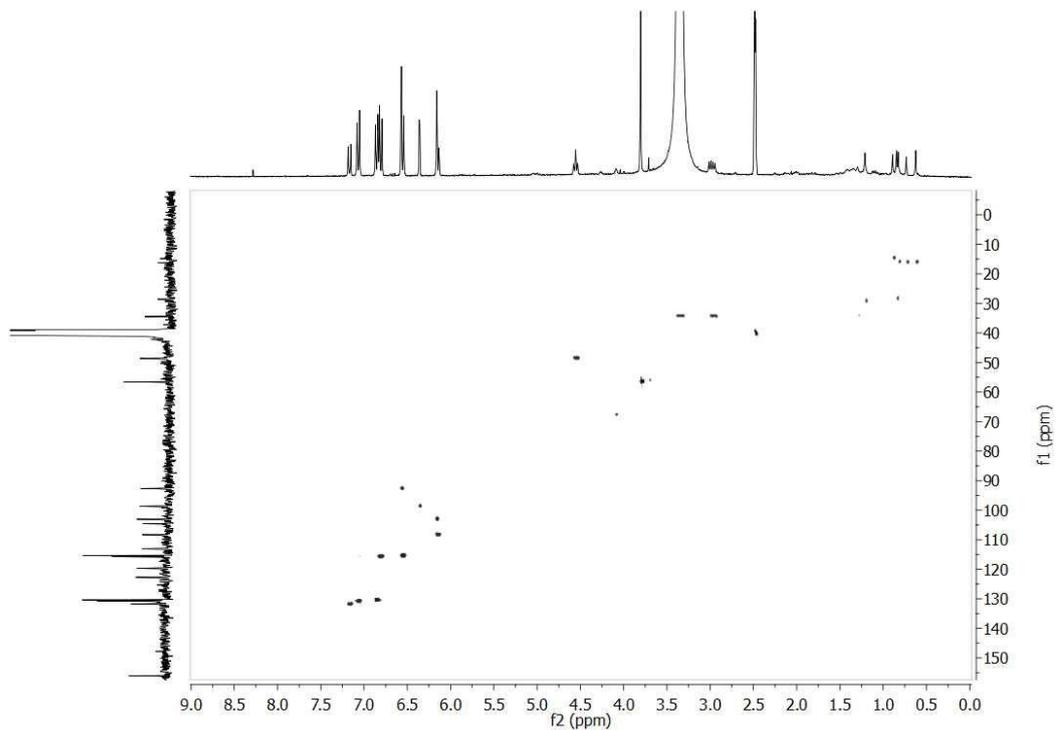


Figura 48 – Espectro de correlação HSQC da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor

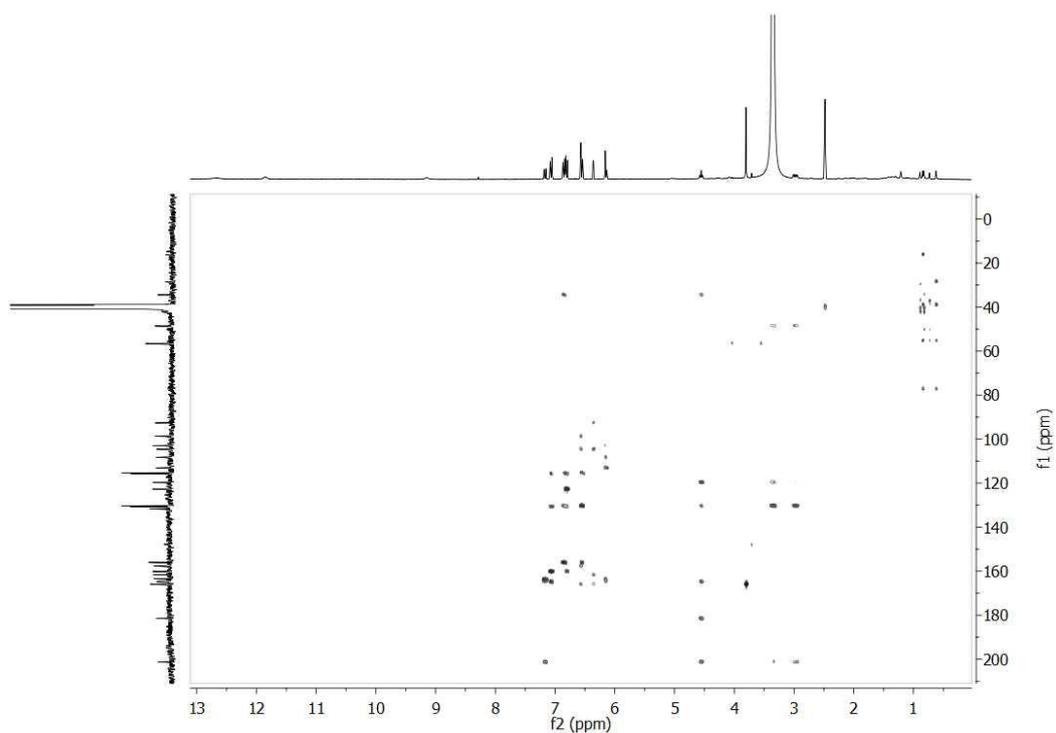


Figura 49 – Espectro de correlação HMBC da 7-metoxicaesalpinioflavona (3), 300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>.  
Fonte: Do autor